

**Studien zur Zusammensetzung der Inhaltsstoffe
getrockneter Heidelbeeren
und Formulierungen zum
Colon-Targeting von Anthocyanen**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Anett Oehme
aus Augustusburg

Würzburg 2010

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am

.....

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

Doktorurkunde ausgehändigt am

MEINER
FAMILIE

„GEGEN DAS FEHLSCHLAGEN EINES PLANES GIBT ES KEINEN BESSEREN
TROST ALS SOFORT EINEN NEUEN ZU MACHEN.“

JOHANN PAUL FRIEDRICH RICHTER, 1763-1825

Danksagung

Zur Entstehung und zum Gelingen dieser Dissertation haben zahlreiche Personen beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Schreier, der es ermöglicht hat die Promotion an seinem Lehrstuhl aufzunehmen und auch nach seiner Pensionierung fortzuführen sowie erfolgreich abzuschließen. Seine Anregungen und Hilfen sowie das stets offene und vertrauensvolle Verhältnis haben die Arbeit gelingen lassen. Vielen Dank!

Herrn Prof. Dr. Ingfried Zimmermann vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Technologie der Universität Würzburg danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit zur Durchführung der Coating Experimente. Allen Mitarbeitern der Pharmazeutischen Technologie, insbesondere Frau Dr. Anne-Kathrin Peter-Müller und Herrn Dirk Leutner sei gedankt für die Einführung in die Technologie, die nette Aufnahme und das stets offene Ohr bei Fragen und Problemen.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Rogler und Frau Dr. Heidi Piberger danke ich für die Durchführung der Studien am murinen Modell der experimentellen DSS-Colitis.

Frau Prof. Dr. Leane Lehmann gebührt mein Dank, da sie durch Überlassung von Räumlichkeiten und Geräten sowie zeitweise finanzielle Unterstützung Fortführung und Abschluss der Promotion möglich gemacht hat.

Ein besonderer Dank gilt den Probanden für die Bereitstellung der Ileo- und Colostomiebeutel.

Frau Petra Risse und Herrn Dr. Norbert Pöllinger von der Firma Glatt (Binzen) gebührt mein Dank für die Realisierung von Coating Experimenten sowie die unproblematische Bereitstellung des Wurster-Behälters.

Den Herren Dres. Gerhard Krammer und Jakob Ley von der Firma Symrise (Holzminden) sei gedankt für die Bereitstellung von Heidelbeerextrakt sowie die Möglichkeit zur Anwendung der „Laminar Jet Break-up“-Technologie.

Herrn Dr. Manfred Penning und der Firma Synthapharm (Mülheim a. d. Ruhr) danke ich für Informationen zum Thema Schellack sowie die Bereitstellung von wässriger Schellacklösung und HPMC.

Der Abteilung für Elektronenmikroskopie am Biozentrum der Universität Würzburg danke ich für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Dem Bundesministerium für Forschung und Bildung sei für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projekts 0313848 gedankt.

Weiterer Dank gehört dem „Werkstatt-Team“ und Herrn Dr. Bernd Reyer für zahllose Reparaturen in teils „hoffnungslosen Fällen“ bzw. für die Unterstützung in IT-Belangen. Herrn Fritz vom Technischen Betrieb und seinen Kollegen danke ich für ihre herzliche Aufnahme im Keller, die außerordentliche Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen sowie die sehr unterhaltsamen gemeinsamen Mittagspausen. Ihnen allen gebührt zudem ganz besonderer Dank aufgrund Ihrer tatkräftigen Unterstützung beim Umzug.

Ein großes Dankeschön geht an meine Forschungspraktikanten Stefan Mittelmaier, Gabi Nüchter, Carolin Pfenning, Steffi Hermann und Tanja Welch, die mich tatkräftig, hoch motiviert und erfolgreich unterstützt haben.

Bei allen Kollegen im Arbeitskreis bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft, erwähnen möchte ich an dieser Stelle insbesondere Frau Theresia Feuerbach als „gute Seele“ des Aromalabors, Dr. Wolfgang Hümmer für die stets kompetente und zeitnahe Beratung und Hilfe bei technischen Problemen an LC-MS und HPLC sowie Dr. Bastian Knaup für die Einführung in das Inkubations-Modell.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Mitstreiterinnen in Labor und Büro - Ebru Ates, Sanja Locher und Claudia Freitag. Danke für eure Freundschaft, die fachlichen und sonstigen Diskussionen, eure Motivation, eure Unterstützung und vieles vieles andere mehr!

Das abschließende und ganz besonders große Dankeschön aber gehört meiner Familie. Danke für eure grenzenlose Liebe und Unterstützung!

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen	XV
Erläuterungen	XVII
Abkürzungsverzeichnis	XVIII
Zusammenfassung	XXIII
Summary	XXVII
1 Einleitung und Zielstellung	1
2 Kenntnisstand	5
2.1 Polyphenole	5
2.1.1 Polyphenole als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe	5
2.1.2 Phenolische Säuren	7
2.1.3 Lignin	8
2.1.4 Flavonoide	9
2.1.4.1 Flavonole	10
2.1.4.2 Flavan-3-ole	11
2.1.5 Proanthocyanidine	12
2.2 Anthocyane	12
2.2.1 Struktur	12
2.2.2 pH-Abhängigkeit der Struktur	14
2.2.3 Farbe	16
2.2.3.1 Copigmentierung	17
2.2.3.2 Selbstassoziation	17
2.2.3.3 Metalloanthocyane	18
2.2.4 Anthocyanstabilität	18
2.2.5 Vorkommen	20
2.3 Verfügbarkeit und Metabolismus	21
2.3.1 Verfügbarkeit	21
2.3.2 Metabolismus, Absorption und Exkretion von Polyphenolen	22

2.3.2.1	Gastrointestinaler Metabolismus und Absorption	23
2.3.2.2	Metabolismus nach Absorption	24
2.3.2.3	Exkretion	25
2.3.3	Metabolismus und Absorption der Anthocyane	25
2.3.3.1	Gastrointestinaler Metabolismus	26
2.3.3.2	Absorption und Transport	28
2.3.3.3	Metabolisierung	30
2.3.4	Bioverfügbarkeit von Anthocyanen	30
2.4	Biologische Effekte von Anthocyanen	32
2.4.1.1	Antioxidative Aktivität	32
2.4.1.2	Anti-inflammatorische Aktivität	35
2.4.1.3	Antikanzerogene Aktivität	36
2.4.1.4	Antimikrobielle Aktivität	37
2.5	Heidelbeeren	39
2.5.1	Die Gattung Heidelbeeren (<i>Vaccinium</i>)	39
2.5.2	Die Art Heidelbeere (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	39
2.5.3	Heidelbeeren (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.) in der Volksmedizin und pharmazeutischen Anwendung	40
2.5.4	Die kaukasische Blaubeere (<i>Vaccinium arctostaphylos</i> L.)	41
2.6	Verkapselung von Wirkstoffen zur gezielten Freisetzung im Dickdarm - Colon-Targeting	42
2.6.1	Verkapselung	42
2.6.2	Colon-Targeting	43
2.6.2.1	pH-Wert-kontrollierte Freisetzung	44
2.6.2.2	Zeit-kontrollierte Freisetzung	46
2.6.2.3	Druck-kontrollierte Freisetzung	47
2.6.2.4	Mikroflora-kontrollierte Freisetzung	48
2.6.2.5	Zeit-, pH-Wert und Mikroflora-kontrollierte Freisetzung	49
2.6.3	Pektin als Verkapselungsmaterial zum Colon-Targeting	50
2.6.4	Kollagen aus dem Meeresschwamm <i>Chondrosia reniformis</i> Nardo	53
2.6.5	Schellack	54
2.6.6	„Laminar Jet Break-up“-Technologie	57
2.6.7	Wirbelschicht-Coating nach dem Wurster-Verfahren	59

3	Ergebnisse und Diskussion	63
3.1	Studien zur Charakterisierung der Zusammensetzung von getrockneten Heidelbeeren und stofflichen Veränderungen infolge Trocknung	63
3.1.1	Bestimmung von Anthocyanprofil und -gehalt in getrockneten Heidelbeeren	64
3.1.2	Bestimmung von Profil und Gehalt von Flavonolen, Flavan-3-olen und phenolischen Säuren	68
3.1.3	Bestimmung von kondensierten Gerbstoffen	71
3.1.4	Bestimmung der Gesamtzusammensetzung von getrockneten Heidelbeeren	73
3.1.5	Bestimmung der Zusammensetzung der Ballaststofffraktion von getrockneten Heidelbeeren	74
3.1.6	Bestimmung von Hydroxymethylfurfural in getrockneten Heidelbeeren	78
3.1.7	Studien zur Trocknung von Heidelbeeren	80
3.1.8	Modell-Untersuchungen zum Anthocyanabbau während der Trocknung von anthocyanhaltigen Früchten	83
3.2	Formulierungen zum Colon-Targeting von Anthocyanen -Herstellung und Charakterisierung sowie <i>in vivo</i> Effekt auf die experimentelle murine DSS-Colitis	86
3.2.1	Herstellung von pektinbasierten Formulierungen zum Colon-Targeting von Anthocyanen und ihre Charakterisierung (Labormaßstab)	89
3.2.1.1	Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BRT, P4BL, P4BZ, P4BSch mittels Eintropftechnik	89
3.2.1.2	Charakterisierung von Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BRT, P4BL, P4BZ, P4BSch	90
3.2.1.3	Freisetzungseigenschaften von Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BRT, P4BL, P4BZ, P4BSch	93
3.2.2	Herstellung von Formulierungen zum Colon-Targeting von Anthocyanen unter Verwendung von Schwammkollagen aus <i>Chondrosia Reniformis</i> Nardo und ihre Charakterisierung (Labormaßstab)	95
3.2.2.1	Herstellung von Anthocyan-Kollagen-Kugeln KB und Anthocyan-Kollagen-Pektin-Kugeln P3KB mittels Eintropftechnik	96
3.2.2.2	Charakterisierung von Anthocyan-Kollagen-Kugeln KB und Anthocyan-Kollagen-Pektin-Kugeln P3KB	96
3.2.2.3	Freisetzungseigenschaften von Anthocyan-Kollagen-Kugeln KB und Anthocyan-Pektin-Kollagen-Kugeln P3KB	98

3.2.3 Herstellung von mit Schellack gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BGwSch und ihre Charakterisierung (Technikums-maßstab)	100
3.2.3.1 Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BG mittels „Laminar Jet Break- up“-Technologie	100
3.2.3.2 Charakterisierung von Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BG	101
3.2.3.3 Herstellung von mit Schellack gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BGwSch19, P4BGwSch15, P4BGwSch8	102
3.2.3.4 Charakterisierung von mit Schellack gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BGwSch19, P4BGwSch15, P4BGwSch8	106
3.2.3.5 Freisetzungseigenschaften von mit Schellack gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BGwSch19, P4BGwSch15, P4BGwSch8	107
3.2.3.6 Untersuchungen zur Lagerstabilität von Anthocyan-Pektin-Kugeln	109
3.2.3.7 Herstellung von mit Schellack/Hydroxypropylmethylcellulose gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln HPMC5, HPMC15	109
3.2.3.8 Charakterisierung von mit Schellack/Hydroxypropylmethylcellulose gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln HPMC5, HPMC15	110
3.2.3.9 Freisetzungseigenschaften von mit Schellack/Hydroxypropylmethylcellulose gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln HPMC5, HPMC15	111
3.2.4 Studien zum <i>in vivo</i> Effekt von mit Schellack gecoateten Anthocyan- Pektin-Kugeln P4BGwSch19 auf die experimentelle murine DSS-Colitis	113
4 Material und Methoden	118
4.1 Material	118
4.1.1 Chemikalien	118
4.1.2 Untersuchungsmaterial	118
4.1.3 Verbrauchsmaterial	118
4.1.4 Säulenchromatographie (SC)	119
4.2 Geräte	119
4.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	119
4.2.2 Präparative Hochleistungsflüssigchromatographie (präp. HPLC)	122
4.2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)	124
4.2.4 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)	129
4.2.5 Kapillargaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID)	130
4.2.6 Mikrokugelherstellung	130
4.2.7 Wirbelschicht-Coating	130

4.2.8 Elektronenmikroskopie	132
4.2.9 Sonstige Geräte	132
4.3 Methoden	133
4.3.1 Isolierung von Anthocyan-Referenzen	133
4.3.1.1 Herstellung der Anthocyan-Rohextrakte	133
4.3.1.2 Reinigung der Anthocyan-Rohextrakte mittels Säulen-chromatographie	133
4.3.1.3 Isolierung von Anthocyan-Referenzen mittels präparativer HPLC	134
4.3.1.4 Identifizierung der Anthocyan-Reinsubstanzen	134
4.3.2 Zusammensetzung von getrockneten Heidelbeeren (gHB)	134
4.3.2.1 Probenvorbereitung	134
4.3.2.2 Bestimmung von Polyphenolen	135
4.3.2.2.1 Bestimmung von Anthocyanen	135
4.3.2.2.2 Bestimmung von phenolischen Säuren, Flavan-3-olen und Flavonolen	136
4.3.2.2.3 Bestimmung kondensierter Gerbstoffe	137
4.3.2.3 Untersuchungen zur Gesamtzusammensetzung von getrockneten Heidelbeeren	138
4.3.2.3.1 Bestimmung der Trockenmasse	138
4.3.2.3.2 Bestimmung des Aschegehalts	139
4.3.2.3.3 Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Kjeldahl	139
4.3.2.3.4 Bestimmung des Fettgehalts nach Caviezel	140
4.3.2.3.5 Bestimmung des pH-Werts	140
4.3.2.3.6 Enzymatische Bestimmung des Fructose-, Glucose und Saccharosegehalts	141
4.3.2.3.7 Enzymatische Bestimmung des Äpfelsäuregehalts	142
4.3.2.3.8 Enzymatische Bestimmung des Citronensäuregehalts	143
4.3.2.3.9 Enzymatische Bestimmung des Ascorbinsäuregehalts	143
4.3.2.3.10 Gravimetrische Bestimmung von löslichen und unlöslichen Ballaststoffen	144
4.3.2.4 Bestimmung von HMF	147
4.3.2.5 Zusammensetzung der Ballaststofffraktion	148
4.3.2.5.1 Gewinnung der ethanolunlöslichen Rückstands (EUR)	148
4.3.2.5.2 Zuckerreferenzgemisch	148
4.3.2.5.3 Hydrolyse und gravimetrische Bestimmung des Klason-Lignin	148
4.3.2.5.4 Analytik der Neutralzucker	149
4.3.2.5.5 Bestimmung von Uronsäuren	150
4.3.2.5.6 Bestimmung kondensierter Gerbstoffe	151
4.3.2.5.7 Bestimmung Protein	151
4.3.3 Studie zur Trocknung von Heidelbeeren	151

4.3.3.1	Trocknung von frischen Heidelbeeren bei verschiedenen Temperaturen	151
4.3.3.2	Probenvorbereitung	152
4.3.3.3	Bestimmung der Trockenmasse	152
4.3.3.4	Bestimmung von Polyphenolen	152
4.3.3.4.1	Bestimmung von Anthocyanen	152
4.3.3.4.2	Bestimmung von phenolischen Säuren, Flavan-3-olen und Flavonolen	152
4.3.3.5	Analytik von HMF	152
4.3.4	Modell-Untersuchungen zur Anthocyanstabilität während der Trocknung von anthocyanhaltigen Früchten	153
4.3.4.1	Herstellung von Inkubationspuffer und Anthocyanstammlösung	153
4.3.4.2	Studiendesign und Analytik	153
4.3.5	Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln (Labormaßstab)	154
4.3.5.1	Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln mittels Eintropftechnik	154
4.3.5.1.1	Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln (P4BL und P4BRT)	154
4.3.5.1.2	Herstellung von Anthocyan-Pektin-Zein-Kugeln (P4BZ)	155
4.3.5.1.3	Herstellung von Pektin-Kugeln (P3RT)	155
4.3.5.2	Coating mit ethanolischer Schellacklösung	155
4.3.5.2.1	Herstellung der Sprühlösung	155
4.3.5.2.2	Coatingprozess	156
4.3.6	Herstellung von Anthocyan-Kollagen-Kugeln (KB, P3KB)	156
4.3.6.1	Herstellung von Anthocyan-Kollagen-Kugeln (KB)	156
4.3.6.2	Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kollagen-Kugeln (P3KB)	156
4.3.7	Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln (Technikums-Maßstab)	157
4.3.7.1	Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln mittels „Laminar Jet Break-up“-Technologie	157
4.3.7.1.1	Herstellung von glycerinhaltigen Anthocyan-Pektin-Kugeln (P4BG)	158
4.3.7.1.2	Herstellung von glycerinhaltigen Pektin-Kugeln (P4G)	158
4.3.7.2	Coating mit wässriger Schellacklösung und Hydroxypropylmethylcellulose	158
4.3.7.2.1	Herstellung der Sprühlösungen	158
4.3.7.2.2	Messung der Größenverteilung der Sprühflüssigkeitstropfen	159
4.3.7.2.3	Kalibrierung der kapazitiven Feuchtesensoren	159
4.3.7.2.4	Coatingprozess	160
4.3.8	Charakterisierung der hergestellten Formulierungen	160
4.3.8.1	Bestimmung des Anthocyangehalts	160
4.3.8.2	Wassergehalt	161
4.3.8.2.1	Bestimmung des Wassergehalts anhand des Trocknungsverlustes	161
4.3.8.2.2	Bestimmung des Wassergehalts mittels Karl-Fischer-Titration	161
4.3.8.3	Verkapselungseffizienz	162
4.3.8.4	Coatinglevel	162

4.3.8.5	Untersuchung der Freisetzungseigenschaften in Magensaftsimulanz und Ileostomieflüssigkeit sowie Colostomieflüssigkeit	163
4.3.8.5.1	Probanden	163
4.3.8.5.2	Vorbereitung der Freisetzungsstudien	163
4.3.8.5.3	Herstellung des Magensaftsimulanz	163
4.3.8.5.4	Herstellung der Inokuli aus Ileostomie- und Colostomieflüssigkeit	164
4.3.8.5.5	Durchführung der Freisetzungsstudien	165
4.3.8.5.6	Probenaufarbeitung und Analytik	166
4.3.8.5.7	Bestimmung der vollständigen Anthocyan-Freisetzung	167
4.3.8.5.8	Berechnung der Anthocyan-Freisetzung	167
4.3.9	Experimentelle Colitis im Tiermodell	168
4.3.9.1	Tiermodell	168
4.3.9.2	Histologischer Score	168
4.3.9.3	Isolierung und Zytokin-Bestimmung der mesenterialen Lymphknoten	169
4.3.9.4	Bestimmung des Anthocyanangehalts im Mausfaeces	169
4.3.9.5	Statistische Auswertung	170
5	Strukturmatrix	171
6	Literatur	177
7	Anhang	204

Veröffentlichungen

Originalpublikationen

- Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G., Sand, P.G. Anthocyanins and their metabolites are weak inhibitors of cytochrome P450 3A4. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, 52, 1428-1433.
- Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Rogler, G., Piberger, H., Hajak, G., Sand, P.G. Anthocyanins and anthocyanidins are poor inhibitors of CYP2D6. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **2008**, 31, 3-9.
- Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Rogler, G., Piberger, H., Hajak, G., Sand, P.G. Inhibition of proteasome activity by anthocyanins and anthocyanidins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 372, 57-61.
- Knaup, B., Kempf, M., Fuchs, J., Valotis, A., Kahle, K., Oehme, A., Richling, E., Schreier, P., Model experiments mimicking the human intestinal transit and metabolism of D-galacturonic acid and amidated pectin. *Mol. Nutr. Food. Res.* **2008**, 52, 840-848.
- Knaup, B., Oehme, A., Valotis, A., Schreier, P., Anthocyanins as lipoxygenase inhibitors. *Mol. Nutr. Food. Res.* **2009**, 53, 617-624.
- Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G., Sand, P.G. Berry anthocyanins and their aglycons inhibit monoamine oxidases A and B. *Pharmacol. Res.* **2009**, 59, 306-311.
- Korte, G., Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G., Sand, P.G. An examination of anthocyanins' and anthocyanidins' affinity for cannabinoid receptors. *J. Med. Food.* **2009**, 12, 1407-1410.
- Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G., Sand, P.G. Phospholipase A2 is inhibited by anthocyanidins. *J. Neural. Transm.* **2009**, 116, 1071-1077.
- Dreiseitel, A., Oosterhuis, B., Vukman, K.V., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G., Sand, P.G. Berry anthocyanins and anthocyanidins exhibit distinct affinities for efflux transporters BCRP and MDR1. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, 158, 1942-1950.
- Korte, G., Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Geiger, S., Heilmann, J., Sand, P.G. Tea catechins' affinity for human cannabinoid receptors. *Phytomedicine.* **2009**, 17, 19-22.

Oehme, A., Valotis, A., Schreier, P. Heidelbeeren zur Vorbeugung und Therapie von entzündlichen Darmerkrankungen? *Nutrition News*. **2009**, 7 2009/1, 1-3.

Sand, P.G., Dreiseitel, A., Stang, M., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G. Cytochrome P450 2C19 inhibitory activity of common berry constituents. *Phytoth Res*. **2010**, 24, 304-307.

Hasslauer, I., Oehme, A., Locher, S., Valotis, A., van't Slot, G., Humpf, H.-U., Schreier, P., Flavan-3-ol C-glycosides – preparation and model experiments mimicking the human intestinal transit. *Mol. Nutr. Food Res*. **2010**, published online: May 12 2010.

Oehme, A., Krammer, G., Schreier, P. Studien zur Formulierung anthocyanhaltiger Extrakte. *Lebensmittelchemie*. **2010**, 64, 33.

Piberger, H., Schreier, P., Oehme, A., Krammer, G., Dreiseitel, A., Sand, P.G., Schoelmerich, J., Obermeier, F., Rogler, G. Bilberries and their anthocyanins ameliorate experimental colitis. *J. Nutr.*, eingereicht.

Oehme, A., Valotis, A., Krammer G., Zimmermann I., Schreier, P., Preparation and characterization of shellac coated anthocyanin pectins beads as dietary colonic delivery system. *Mol. Nutr. Food Res.*, eingereicht.

Posterbeiträge

Piberger, H., Schreier, P., Oehme, A., Krammer, G., Schölmerich, J., Obermeier, F., Rogler, G. Heidelbeeren und deren Anthocyane als therapeutische Chance für Patienten mit CED. 115. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), Wiesbaden, April 2009.

Oehme, A., Krammer, G., Schreier, Peter. Studien zur Formulierung anthocyanhaltiger Extrakte. 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin, 14.-16. September 2009.

Erläuterungen

Die in der vorliegenden Dissertation untersuchten Verbindungen sind mit fettgedruckten arabischen Zahlen durchnummeriert. Die unter Abschnitt 5 aufgeführte Strukturmatrix fasst die Verbindungen im Überblick zusammen.

Die abgebildeten Spektren und Chromatogramme wurden unter Verwendung der Originaldaten erstellt.

Gesetzlich geschützte, eingetragene Warenzeichen sind im Text durch den Zusatz „[®]“ oder „TM“ gekennzeichnet.

Lösungen sind wässrige Lösungen, wenn das Lösungsmittel nicht gesondert angeführt ist. Zur Herstellung wurde Reinstwasser eingesetzt.

Abkürzungsverzeichnis

A°	Amidierungsgrad
AACC	„American Association of Cereal Chemists“
abs.	absolut
am.	amerikanisch
amu	„atomic mass unit“ (atomare Masseneinheit)
AP-1	activator protein-1
APK	Anthocyan-Pektin-Kugeln
APB	“anthocyanin pectin beads”
bidest.	bidestilliert
BCRP	“breast cancer resistance protein”
BSA	„bovine serum albumine“ (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
(+/-)-C	(+/-)-Catechin
ca.	circa
Caco-2	humane Colonkrebszelllinie
CD	Circular Dichroismus
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CID	“collision induced dissociation” (kollisionsinduzierte Dissoziation)
cm	Zentimeter
COMT	Catechol-O-methyl-Transferase
COX	Cyclooxygenase
Cy	Cyanidin
Cy-3-gal	Cyanidin-3-O-galactosid
Cy-3-glc	Cyanidin-3-O-glucosid
Cy-3-ara	Cyanidin-3-O-arabinosid
DAD	Diodenarray-Detektion
d. h.	das heißt
Dp	Delphinidin
Dp-3-gal	Delphinidin-3-O-galactosid
Dp-3-glc	Delphinidin-3-O-glucosid
Dp-3-ara	Delphinidin-3-O-arabinosid
DSS	Natriumdodecylsulfat
dt.	Deutsch
(-)-EC	(-)-Epicatechin
EC-Nr.	„enzyme commission“ (Numerisches Klassifikationssystem der Enzyme)
Ed./Eds.	Editor/Editoren

EI	Elektronenstoßionisation
engl.	englisch
ERK	„extracellular signal-related kinases“
ESI	Elektrospray-Ionisierung
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EUR	ethanolunlöslicher Rückstand
eV	Elektronenvolt
FDA	“U.S. Food and Drug Administration” (Am. Gesundheitsbehörde)
FG	Frischgewicht
FID	Flammenionisationsdetektion
FRAP	„ferric reducing activity of plasma“
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
gHB	getrocknete Heidelbeeren
GLUT	Glucosetransporter
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	Stunde
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPLC	„high performance liquid chromatography“ (Hochleistungsflüssigchromatographie)
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
HRGC-MS	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie
HV	hochverestert
Hz	Hertz
i. A.	im Allgemeinen
I.D.	Innendurchmesser
i. d. R.	in der Regel
JNK	„C-Jun N-terminal kinase“
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
kg	Kilogramm
konz.	konzentriert
L	Liter
LC	„liquid chromatography“(Flüssigchromatographie)
LDL	„low density lipoprotein“
LFGB	Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch
LOX	Lipoxygenase
lt.	laut

m	Meter
M	Molar (mol/L)
MAP	“mitogen-activated protein”
MCT	Monocarbonsäuretransporter
MDR1	“multidrug resistance protein”
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
[M-H] ⁻	deprotoniertes Molekülion
[M] ⁺	protoniertes Molekülion
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/L)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
Mv	Malvidin
Mv-3-gal	Malvidin-3-O-galactosid
Mv-3-glc	Malvidin-3-O-glucosid
Mv-3-ara	Malvidin-3-O-arabinosid
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NF-κB	Nuklear-Faktor-κ-B
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMR	„nuclear magnetic resonance“ (Kernresonanzspektroskopie)
NV	niedrigverestert
o. g.	oben genannte
ORAC	“oxygen radical absorption capacity”
p. a.	<i>pro analysis</i>
PCDC	“pressure controlled colon delivery capsule”
PEG	Polyethylenglycol
Pg	Pelargonidin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
pK _a	Säurekonstante
Pn	Peonidin
Pn-3-gal	Peonidin-3-O-galactosid

Pn-3-glc	Peonidin-3-O-glucosid
Pn-3-ara	Peonidin-3-O-arabinosid
PPO	Polyphenoloxidase
präp.	präparativ
psi	Druckeinheit; 100 psi = 5170 Torr
Pt	Petunidin
Pt-3-gal	Petunidin-3-O-galactosid
Pt-3-glc	Petunidin-3-O-glucosid
Pt-3-ara	Petunidin-3-O-arabinosid
PVDF	Polyvinylidifluorid
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
Quer-3-gal	Quercetin-3-O-galactosid
Quer-3-glc	Quercetin-3-O-glucosid
Quer-3-rha	Quercetin-3-O-rhamnosid
Quer-3-rut	Quercetin-3-O-rhamnoglucosid
rel.	relativ
RNS	“reactive nitrogen species” (reaktive Stickstoffspezies)
ROS	“reactive oxygen species” (reaktive Sauerstoffspezies)
RP	“reversed phase” (Umkehrphase)
rpm	“rounds per minute” (Umdrehungen pro Minute)
s.	siehe
SC	Säulenchromatographie
SD	„standard deviation“ (Standardabweichung)
SGLT	„sodium dependent glucose transporter“ (Natrium-abhängiger Glucose-transporter)
SULT	Sulfotransferase
SRM	“single reaction monitoring”
TBARS	“thiobarbituric acid reagent substances”
TEAC	“trolox equivalent antioxidant capacity”
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TNF	“tumornecrose factor”
t _R	Retentionszeit
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	„unified mass unit“ (atomare Masseneinheit)
u. a.	unter anderem
UGT	Uridin-5'-diphosphat-Glucuronosyltransferasen
U.S.P.	United States Pharmacopeia

UV	ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
VE°	Veresterungsgrad
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
z. B.	zum Beispiel
ZZuIV	Zusatzstoffzulassungs-Verordnung
λ	Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	mikromolar

Zusammenfassung

Die Ergebnisse verschiedener *in vitro* Untersuchungen und Tierstudien deuten darauf hin, dass Anthocyane zur Prävention und Therapie von intestinalen Erkrankungen wie akutem Durchfall oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) sowie Darmkrebs geeignete Naturstoffe sind. Mit bis zu 780 mg/100 g Frischgewicht weisen Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.) besonders hohe Anthocyanengehalte auf. In getrockneter Form sind diese Beeren ein bewährtes Therapeutikum in der Volksheilkunde und werden als pharmazeutische Droge *Myrtilli fructus* zur Unterstützung der Therapie unspezifischer akuter Durchfallerkrankungen eingesetzt. Diese traditionellen Anwendungen hat man jüngst in einer Studie am Modell der experimentellen murinen DSS-Colitis aufgegriffen, in welcher ein therapeutischer Effekt von getrockneten Heidelbeeren (gHB) nachgewiesen wurde. Ob die Anthocyane oder andere Inhaltsstoffe verantwortlich für die beobachteten Wirkungen sind, ist noch unbekannt. Ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, gHB zu charakterisieren, indem potentielle Wirkkomponenten anhand analytischer Inhaltsstoffbestimmung identifiziert und bei der Trocknung ablaufende Prozesse untersucht wurden:

- I. Nach extraktiver Probenaufarbeitung wurden Anthocyanprofil und -gehalt von gHB-Handelsware mittels HPLC-ESI-MS/MS und HPLC-UV/Vis bestimmt. Dabei zeigte sich, dass sich das Anthocyanprofil der untersuchten gHB, die in oben genanntem DSS-Colitis-Modell verwendet worden waren, von dem frischer Wildheidelbeeren (*V. myrtillus* L.) unterschied. Die gHB wiesen zusätzlich eine Delphinidin-hexose-pentose sowie verschiedene Anthocyanpentosen auf, wie sie für die Heidelbeerart *V. arctostaphylos* L. charakteristisch sind. Infolgedessen ist davon auszugehen, dass *V. arctostaphylos* L.-Beeren zur Herstellung der gHB verwendet wurden. In den untersuchten gHB wurde ein Anthocyanengehalt von 384 ± 39 mg/100g TM bestimmt. Im Vergleich zu frischen *V. myrtillus* L.- sowie zu *V. arctostaphylos* L.-Früchten wiesen die gHB damit einen deutlich geringeren Anthocyanengehalt auf.
- II. Als momomere Nicht-Anthocyan-Polyphenole wurden verschiedene phenolische Säuren, Quercetinglycoside sowie das Aglycon Quercetin mittels HPLC-ESI-MS/MS bzw. HPLC-DAD identifiziert und quantifiziert. Chlorogensäure stellte dabei mit 147 ± 5 mg/100 g TM die Hauptkomponente dar. Der Gesamtgehalt an monomeren Nicht-Anthocyan-Polyphenolen von 288 ± 8 mg/100 g TM war mit dem der Anthocyane vergleichbar.

- III. Kondensierte Gerbstoffe (Procyanidine) in gHB wurden mittels Thiolyse erfasst. Mit $2,23 \pm 0,05$ g/100 g TM war ihr Anteil dreimal höher als die Summe der monomeren Polyphenole, Anthocyane, phenolische Säuren und Flavonole.
- IV. Mit 44 ± 2 g/100 g TM waren Ballaststoffe die dominierende Nährstoffgruppe in gHB. Zur Untersuchung der Zusammensetzung dieser Fraktion wurden nach Hydrolyse Neutralzucker als Alditolacetate mittels HRGC-MS bzw. HRGC-FID analysiert sowie Uronsäuren photometrisch bestimmt. Derart identifizierte Hauptbausteine der Zellwandpolysaccharide waren Glucose, Xylose sowie Uronsäure. Als Rückstand nach Hydrolyse wurde gravimetrisch das sog. Klason-Lignin erfasst. Zellwandpolysaccharide und Klason-Lignin waren mit jeweils ca. 36 % in der Ballaststofffraktion enthalten und stellten deren Hauptkomponenten dar.
- V. Als Indikator für die thermische Belastung bei Trocknung der gHB wurde 5-Hydroxymethylfurfural mit HPLC-MS/MS und HPLC-DAD nachgewiesen und quantifiziert. Der ermittelte Gehalt von $7,9 \pm 0,2$ mg/100 g TM lag in einem für getrocknete Früchte üblichen Bereich.
- VI. Um den Einfluss der Trocknung auf den Polyphenolgehalt direkt zu verfolgen, wurden frische Kulturheidelbeeren (*V. corymbosum* L.) bei 30°C, 50°C und 70°C im Umlufttrockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Vor und nach Trocknung wurden Polyphenole mittels HPLC-MS/MS und HPLC-DAD bzw. HPLC-UV/Vis untersucht. Trocknung bei 30°C führte zu einer leichten Zunahme im Anthocyanengehalt, wohingegen der Temperaturanstieg auf 50°C sowie 70°C mit einem deutlichen Anthocyanabbau verbunden war. Phenolische Säuren und Flavonole erwiesen sich als thermostabiler; ein geringer Abbau wurde nur bei Chlorogensäure beobachtet.
- VII. Die Stabilität der Anthocyanine Cyanidin-3-galactosid und Cyanidin-3-glucosid wurde in einem *in vitro* Modell untersucht, das die Bedingungen in der Pflanzenzelle während der Trocknung von Früchten simulierte. Der dabei beobachtete Anthocyanabbau wies eine Reaktionskinetik 1. Ordnung auf. Die Reaktionsgeschwindigkeit war stark von der Temperatur abhängig, der Zuckerrest hatte dagegen keinen Einfluss. Als Abbauprodukt wurde Protocatechusäure mittels HPLC-DAD-MS/MS identifiziert.

Neben der Menge der mit der Nahrung aufgenommener Anthocyane ist deren Verfügbarkeit am Wirkort die Grundlage für potentielle Effekte. Während der Passage durch den Gastrointestinaltrakt (GIT) unterliegen Anthocyane bekanntlich einem chemischen und mikrobiellen Abbau, wodurch die effektive Wirkkonzentration stark vermindert wird. Colon-Targeting, bei dem Wirkstoffe durch Verkapselung vor einem chemischen und enzymatischen Abbau im oberen GIT geschützt werden, stellt eine Möglichkeit dar, die Verfügbarkeit von Anthocyanen für direkte Effekte im Dickdarm zu erhöhen. Die Zielsetzung im zweiten Teil der Arbeit beinhaltete daher die Herstellung und Charakterisierung von im Lebensmittelbereich zugelassenen Formulierungen für das Colon-Targeting von Anthocyanen. Für diese Studien dienten kommerziell aus Wildheidelbeeren *V. myrtillus* L. gewonnene Extrakte (Anthocyangehalte von 65 bis 84 g/100g) als Anthocyanquelle.

- I. Zur Charakterisierung der Freisetzungseigenschaften der hergestellten Colon-Targeting-Formulierungen wurde ein *in vitro* und *ex vivo* Modell entwickelt und angewendet, das durch aufeinanderfolgende Inkubation der Materialien in Magensaftsimulanz (3 h bei pH 2) und Ileostomie- (4 h bei pH 6,3) sowie Colostomieflüssigkeit (15 h bei pH 6,2) die Passage des humanen GIT simulierte. Freigesetzte Anthocyangehalte wurden mittels HPLC-DAD erfasst.
- II. Im Labormaßstab wurde der Heidelbeerextrakt mittels Eintropftechnik nach dem Prinzip der ionotropen Gelierung mit Calciumionen in eine Matrix aus amidiertem Pektin verkapselt. Durch anschließendes hydrophobes Coating mit Schellack wurde die vorzeitige Freisetzung der Pigmente aus den Anthocyan-Pektin-Kugeln (APK) P4BRT im Magensaftsimulanz deutlich verringert, sodass mit Schellack gecoateten APK P4BSch im genannten Modell-System ein Anthocyantransport in den Dickdarm erreicht wurde.
- III. Aufgrund seiner Säureunlöslichkeit wurde auch die Eignung von Kollagen aus dem Meeresschwamm *Chondrosia reniformis* Nardo als Verkapselungsmatrix untersucht. Es gelang, Heidelbeerextrakt in dieses Material zu verkapseln. Trotz partieller Magensaftresistenz waren die Formulierungen jedoch aufgrund von Degradation im simulierten Dünndarm nicht zum Colon-Targeting geeignet.
- IV. Zur Bereitstellung von mit Schellack gecoateten APK für *in vivo* Studien war eine Steigerung der Produktionsrate vom Gramm- in den Kilogramm-Maßstab erforderlich, was durch Einsatz der „Laminar Jet Break-up“-Technologie realisiert wurde. APK P4BG wurden mit dieser Methode ebenfalls durch ionotrope Gelierung einer anthocyanhaltigen Pektinlösung in Gegenwart von Calciumionen hergestellt. Im Unterschied zum Labormaßstab war der Einsatz

von Glycerin als Weichmacher in der Formulierung erforderlich. Das anschließende Coating der so hergestellten APK P4BG erfolgte mittels Wurster-Technologie unter Verwendung von wässriger Schellacklösung. Materialien mit Coatinglevel von 8, 15 bzw. 19 % w/w (P4BGwSch8, P4BwSch15 und P4BwSch19) wurden erzeugt. Die Formulierungen wiesen Anthocyangehalte von 2,2 bis 2,6 g/100g auf. Im vorgestellten *in vitro* und *ex vivo* Inkubationsmodell zeigten unmodifizierte APK P4BG eine vorzeitige Anthocyan-Freisetzung in Magensaftsimulanz infolge schneller Ablösung der sehr gut wasserlöslichen Pigmente von der Oberfläche. Dieser Effekt wurde durch Coating mit Schellack in Abhängigkeit vom Coatinglevel verringert. Das Material P4BGwSch19 stellte das am besten geeignete Colon-Targeting-System dar, da mit diesem Anthocyane im simulierten Magen und Dünndarm zurückgehalten und im Dickdarm freigesetzt wurden.

- V. Um das Auflösungsverhalten der Schellackschicht zu optimieren, wurden APK P4BG mit wässriger Schellacklösung gecoatet, welcher der wasserlösliche Porenbildner Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) in Konzentrationen von 5 % bzw. 15 % (w/w, bezogen auf Schellack) zugesetzt war. Die so hergestellten gecoateten APK HPMC5 und HPMC15 zeigten eine verbesserte Magensaftresistenz im Vergleich zum nur mit Schellack gecoateten Material. Aufgrund des mit 5 % vergleichsweise geringen HPMC-Anteils ähnelte das weitere Freisetzungsverhalten von HPMC5 dem von P4BGwSch19. Mit HPMC15 wurde bei beschleunigter Anthocyan-Freisetzung in Ileostomieflüssigkeit ein vollständiger Abbau des Materials in Colostomieflüssigkeit erzielt.
- VI. Der *in vivo* Effekt des entwickelten anthocyanhaltigen Colon-Targeting-Systems P4BGwSch19 bei entzündlichen Darmerkrankungen wurde am Modell der murinen DSS-Colitis untersucht. Im Gegensatz zur Gabe der identischen Dosis an unverkapseltem Heidelbeerextrakt resultierte die orale Zufuhr der mit Schellack gecoateten APK in keinem signifikanten Unterschied in Colonlänge, histologischem Score sowie IL6- und IFN γ -Sekretion im Vergleich zu Placebo- und Kontrollgruppen. Eine unzureichende Eignung des verwendeten murinen Modells für Freisetzungsstudien könnte hierfür verantwortlich sein.

Summary

Results of various *in vitro* tests and animal models indicate the potential of anthocyanins as natural substances in the prevention and therapy of intestinal diseases such as acute diarrhea or chronic inflammatory bowel disease. Bilberries (*V. myrtillus* L.) possess notably high anthocyanin contents up to 780 mg/100g fresh weight. After drying these berries represent a proven remedy in folk medicine. In addition, they are applied as pharmaceutical drug *Myrtillus fructus* to support the therapy of unspecific acute diarrheal diseases.

Recently, this traditional usage was picked up in a model study on experimental murine DSS colitis that demonstrated a therapeutic effect of dried bilberries (DBB). However, so far it is not known whether anthocyanins or other ingredients account for the observed results. Thus, the first object of the present work was to characterize DBB by identification of potential active compounds with analytical methods as well as by analysis of processes occurring during drying.

- I. After extractive sample preparation the anthocyanin profil and the content of commercially available DBB were determined by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-UV/Vis. It was shown that anthocyanin profil of the analyzed DBB, used in the above mentioned DSS colitis model, differed from that of fresh bilberries (*V. myrtillus* L.). DBB additionally contained a delphinidin hexose pentose as well as several anthocyanin pentoses, characteristic for the bilberry species *V. arctostaphylos* L. Thus, it is assumed that berries of *V. arctostaphylos* L. were used for manufacturing of DBB. The analyzed DBB revealed an anthocyanin content of 384 ± 39 mg/100g dry matter (dm). In comparison to fresh *V. myrtillus* L. as well as *V. arctostaphylos* L. fruits the berries showed a significantly reduced anthocyanin content.
- II. Phenolic acids, quercetin glycosides as well as the aglycon quercetin were identified as monomeric non anthocyanin like polyphenols and quantified by HPLC-ESI-MS/MS and HPLC-DAD, respectively. With 147 ± 5 mg/100g dm chlorogenic acid represented the dominating compound. The overall content of non-anthocyanin like polyphenols of 288 ± 8 mg/100g was similar to the anthocyanin content.
- III. Condensed tannins (procyanidins) in DBB were analyzed by thiolysis. With 2.23 ± 0.05 g/100g dm the content of condensed tannins was found to be three times higher compared to the sum of monomeric polyphenols (anthocyanins, phenolic acids, flavonols).

- IV. With 44 ± 2 g/100g dm dietary fiber was the dominant nutrient group in dried bilberries. To characterize the composition of this fraction the neutral sugars were analyzed after acid hydrolysis and derivatization to alditol acetates by HRGC-MS and HRGC-FID, respectively. Uronic acids were investigated photometrically. Main cell wall constituents identified by this way were glucose, xylose as well as uronic acid. As the residue after acid hydrolysis Klason-Lignin was determined by gravimetric technique. Cell wall polysaccharide as well as Klason-Lignin were enclosed each with approximately 36 % in the fiber fraction, hence representing the dominating compounds.
- V. 5-(Hydroxymethyl)furfural was detected as an indicator of thermal treatment during drying of the DBB and quantified by HPLC-MS/MS and HPLC-DAD. The content of 7.9 ± 0.2 mg/100g found is characteristic for dried fruits.
- VI. In order to directly investigate the influence of drying on the polyphenol content, fresh bilberries *V. corymbosum* L. were dehydrated in a drying cabinet at 30°C, 50°C as well as 70°C to constant weight. Before and after drying polyphenols were analyzed by HPLC-MS/MS as well as HPLC-DAD and HPLC-UV/Vis, respectively. During drying at 30°C a slight increase of anthocyanin content was found. Rise of temperature to 50°C and 70°C was connected with clear anthocyanin degradation. Phenolic acids and flavonols possessed accelerated thermo resistance. A slight degradation was determined only for chlorogenic acid.
- VII. Stability of anthocyanins cyanidin-3-galactoside and cyanidin-3-glucoside was studied in an *in vitro* model simulating the conditions in the plant cell during drying of fruits. The observed anthocyanin degradation showed a reaction kinetic of 1st order. Reaction speed had a strong temperature dependency. In contrast, the type of sugar residue had no influence. Protocatechuic acid was identified by HPLC-DAD-MS/MS as degradation product.

Besides the daily amount of anthocyanins ingested, their availability at the site of action represents the basis of the pigments' potential effects. As it is generally known, during passage of the gastrointestinal tract (GIT) anthocyanins are chemically and microbiologically degraded. This results in a severe decrease of the active dose. Colon-targeting, to protect the of active compounds from chemical and enzymatic decomposition in the upper GIT by encapsulation is a possibility to increase the availability of anthocyanins for direct effects in the colon. Thus, the objective in the second part of this work was the preparation and characterization of formulations for

dietary colon-targeting of anthocyanins. In these studies, commercially manufactured extracts from bilberries *V. myrtillus* L. (anthocyanin content from 65 to 84 g/100g) were applied as source of anthocyanins.

- I. For characterization of the release properties of the designed colon-targeting-systems an *in vitro* and *ex vivo* model was used mimicking the transit of the human GIT by consecutive incubation in simulated gastric fluid (3 h, pH 2), ileostomy fluid (4 h, pH 6,3) as well as colostomy fluid (15 h, pH 6,2). The content of anthocyanins released were analyzed by HPLC-DAD.
- II. In laboratory scale bilberry extract was encapsulated in a matrix of amidated pectin by ionotropic gelation in the presence of calcium ions. Conventional dripping method was applied. By additional hydrophobic coating with shellac, premature release of pigments from anthocyanin pectin beads (APB) P4BRT in simulated gastric fluid was significantly reduced. Thus, an anthocyanin transport in the colon was demonstrated with shellac coated APB P4BSch in the applied model system.
- III. Due to its insolubility in acid media, applicability of marine sponge collagen from *Chondrosia reniformis* nardo as a matrix for encapsulation was also studied. We succeeded in encapsulating bilberry extract into this material. Despite partial resistance towards degradation in the simulated stomach the materials were not suitable for colon-targeting as they were degraded in ileostomy fluid.
- IV. To provide shellac coated ABP for *in vivo* tests an increase in production rate from the gram to the kilogram scale was necessary. It was realized by application of laminar jet break up-technology for manufacturing of APB P4BG by ionotropic gelation of an anthocyanin pectin solution in the presence of calcium ions. In contrast to laboratory scale, the usage of glycerol as a plasticizer in the material was necessary. Subsequent coating of these APB P4BG was performed by Wurster technique with aqueous shellac solution. Formulations with coating levels of 8, 15 and 19 % w/w, respectively, were prepared showing anthocyanin contents from 2.2 to 2.6 g/100g. In the mentioned *in vitro* and *ex vivo* model system unmodified APB P4BG showed premature anthocyanin release in simulated gastric fluid due to fast dissolution of the highly soluble pigments from the surface. This effect was reduced by shellac coating in relation to the coating level. Material P4BGwSch19 represented the most suitable colon-targeting-sys-

tem, as anthocyanins were retarded in the simulated stomach as well as the ileum and were released in the colon.

- V. To optimize dissolution properties of the shellac film, ABP were coated with aqueous shellac solution containing the water soluble pore former hydroxypropyl methylcellulose in concentrations of 5 and 15 % (w/w, based on shellac), respectively. Compared to shellac coated materials these formulations HPMC5 and HPMC15 exhibited an improved gastric resistance. Due to the comparatively low HPMC content of 5 % the release properties of HPMC5 were similar to that of P4BGwSch19. HPMC15 showed in connection with accelerated anthocyanin release in ileostomy fluid material a complete degradation in colostomy fluid.
- VI. The *in vivo* effect of the designed anthocyanin colon targeting-system P4BGwSch19 was studied in the model of murine DSS colitis. In contrast to application of the same dose of unmodified bilberry extract, feeding of shellac coated APB resulted in no significant difference of colon length, histological score as well as IL6- and IFN γ -secretion compared to placebo and control groups. As a consequence of this inconsistency, it has to be checked whether the murine model used is suitable for studying release properties.

1 Einleitung und Zielstellung

Anthocyane zählen als Polyphenole zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und sind als wichtigste Gruppe wasserlöslicher Farbpigmente verantwortlich für die intensive Blau-, Violett- und Rotfärbung von pflanzlichen Geweben. Die Bezeichnung Anthocyane umfasst die Aglycone (Anthocyanidine) sowie die glycosylierten Anthocyanine. Als gemeinsames Strukturmerkmal weisen Anthocyane ein Flavan-Grundgerüst mit einer positiven Ladung am Sauerstoff auf, unterscheiden sich jedoch im Hydroxy- und Methoxy-Substitutionsmuster sowie in Art, Anzahl, Position und Acylierung der Zuckerreste.

In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass Anthocyane umfangreiche biologische Aktivitäten aufweisen wie antioxidative, antiinflammatorische, antimikrobielle, anti-karzinogene und neuroprotektive Wirkungen, die Verbesserung der Sicht, die Vorbeugung von Adipositas sowie Effekte auf Zellen, Blutgefäße und Blutplättchen, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Reduzierung von koronaren Herz-erkrankungen stehen (Mazza und Kay, 2008).

Verschiedene *in vitro* Untersuchungen und Tierstudien deuten zudem darauf hin, dass Anthocyane in der Prävention und Therapie von intestinalen Erkrankungen wie akutem Durchfall, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) sowie Darmkrebs positive Effekte hervorrufen. So wiesen Osman *et al.* (2008) und Piberger (2009) eine Verbesserung der experimentellen DSS-Colitis durch Anthocyane nach. Knap *et al.* (2009) und Hou *et al.* (2005) zeigten, dass Anthocyane potente Inhibitoren von Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen, den Schlüsselenzymen bei Entzündungsprozessen, darstellen. Eine effektive Hemmung der Kanzerogenese im Colon¹ durch Anthocyane wurde festgestellt (Hagiwara *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2003; Cooke *et al.*, 2006). Puupponen-Pimiä *et al.* (2005) und Molan *et al.* (2009) beschrieben eine antimikrobielle Aktivität von Anthocyanen gegenüber pathogenen Bakterien sowie eine prebiotische Wirkung der Pigmente gegenüber der positiven Darmmikroflora.

Anthocyane sind innerhalb des Pflanzenreiches weit verbreitet und treten v. a. in Früchten und Blüten auf. Mit bis zu 780 mg/100 g Frischgewicht weisen Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.) besonders hohe Gehalte auf. In getrockneter Form sind diese Beeren als bewährtes Therapeutikum in der Volksheilkunde bekannt und werden als pharmazeutische Droge *Myrtilli fructus* zur Unterstützung der Therapie unspezifischer akuter Durchfallerkrankungen eingesetzt. Die Droge wird üblicherweise durch Trocknung von *V. Myrtillus* L.-Beeren im Schatten oder unter künstlicher Wärmezufuhr hergestellt (Hegi, 1957/58; Blaschek *et al.*, 2006). In einer aktuellen Studie am murinen

¹ Grimmdarm, größter Abschnitt des Dickdarms

Modell der akuten und chronischen DSS-Colitis wurde das Potential von getrockneten Heidelbeeren (gHB) bei der Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen wissenschaftlich belegt. Durch Gabe von gHB trat eine signifikante Verbesserung der Colitis ein. Die typische entzündungsbedingte Colonverkürzung war vermindert, und in der akuten Colitis wurde zudem eine Hemmung der Sekretion proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen (Piberger, 2009).

Ob die Anthocyane für diese Wirkung verantwortlich sind, ist noch unbekannt. Weitere Inhaltsstoffe der gHB wie Flavonole, Flavan-3-ole, Tannine oder Ballaststoffe werden ebenfalls in Zusammenhang gebracht mit positiven Effekten bei entzündlichen Darmerkrankungen (Glavez *et al.*, 2005; Huber *et al.*, 2007; Shapiro *et al.*, 2007). Zudem können infolge von Verarbeitungsschritten wie z.B. Trocknung Prozesse ablaufen, welche die stofflichen Eigenschaften im Vergleich zum ursprünglichen Lebensmittel verändern. Michalczyk *et al.* (2009) beschrieben in diesem Zusammenhang eine mehr als 50 %ige Reduzierung im Anthocyangehalt von Heidelbeeren nach Lufttrocknung bei 40°C für 72 h. Bei der Trocknung von kohlenhydratreichen Früchten wurden Veränderungen infolge Maillard-Reaktion und Karamellisierung nachgewiesen (Murkovic und Pichler, 2006).

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es daher, durch Analyse der Inhaltsstoffe potentielle Wirkkomponenten in gHB, die für den o.g. biologischen Effekt verantwortlich sind, zu identifizieren und während der Trocknung ablaufende Prozesse zu charakterisieren. Dazu wurden Untersuchungen zu Profil und Gehalt von Anthocyanen und anderen Polyphenolen sowie zur Gesamtzusammensetzung durchgeführt. Parallel wurde die Zusammensetzung der Ballaststofffraktion erfasst. Eine Studie zur Trocknung von Heidelbeeren bei verschiedenen Temperaturen sollte zudem einen direkten Nachweis von stofflichen Veränderungen ermöglichen.

Neben der regelmäßigen Zufuhr von anthocyanhaltigen Lebensmitteln wird das Wirkpotential dieser Pigmente vor allem von ihrer Verfügbarkeit bestimmt. So müssen Anthocyane Darm und Darmgewebe intakt erreichen, um *in vivo* Effekte bei der Prävention und Therapie von intestinalen Erkrankungen zu zeigen. Dies ist zum einen systemisch über die Blutbahn nach Absorption im oberen GIT möglich. Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit der Pigmente werden jedoch nur sehr geringe Plasmakonzentrationen im Bereich von 1 bis 120 nmol/l erreicht (Manach *et al.*, 2005; McGhie und Walton, 2007). Dagegen wurde *in vitro* eine erhöhte lokale Verfügbarkeit von Anthocyanen durch direkte Aufnahme in intestinale Epithelzellen nachgewiesen. Infolgedessen gelten lokale Effekte der Pigmente als der wahrscheinlichere Wirk-

mechanismus (Steinert *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009). Problematisch dabei ist jedoch, dass die Anthocyane im Darm nicht stabil sind und v. a. im Colon einem raschen chemischen und mikrobiellen Abbau unterliegen (Aura *et al.*, 2005; Keppler und Humpf, 2005; Borges *et al.*, 2007).

Eine Möglichkeit, um die Verfügbarkeit von Anthocyanen für direkte Effekte im Dickdarm zu erhöhen, stellt das sog. Colon-Targeting dar. Dabei werden Wirkstoffe durch Verkapselung vor einem chemischen und enzymatischen Abbau im oberen GIT geschützt, in den Dickdarm transportiert und dort gezielt freigesetzt. Um ein Colon-Targeting von Wirkstoffen zu erreichen, wurden verschiedene Methoden entwickelt. Die Verwendung von bakteriell abbaubarem Polymer als Bestandteil der Verkapselungsmatrix stellt die spezifischste Methode dar, da hier die Freisetzung durch die enzymatische Aktivität der Dickdarmmikroflora gezielt am Wirkort erfolgt. (Sinha und Kumria, 2003; McConnell *et al.*, 2008b). Verschiedene pharmazeutische Studien zeigten das Potential von amidiertem Pektin für das Colon-Targeting (Liu *et al.*, 2003). Es handelt sich um ein lineares Polysaccharid, das überwiegend aus teilweise amidierten und methylierten α -(1-4)-verknüpften *D*-Polygalacturonsäure-Ketten besteht. Amidiertes Pektin ist in Mundhöhle und Magen stabil und wird anschließend zu einem geringen Teil durch die Mikroflora im terminalen Ileum² sowie vollständig im Dickdarm abgebaut (Cummings *et al.*, 1979; Saito *et al.*, 2005; Knaup *et al.*, 2008). Als Zusatzstoff E440 darf amidiertes Pektin *quantum satis* bei der Herstellung von Lebensmitteln eingesetzt werden.

Studien zur Verkapselung und Stabilisierung von Anthocyanen im GIT existieren bisher nur in begrenzter Anzahl. Frank *et al.* (2009) brachten zu diesem Zweck Blaubeerextrakt in submikrone Emulsionstropfen ein. Zwei weitere Arbeiten beschreiben den Einsatz von Glucan- sowie Chitosan-Natriumalginat-Gelen zur Verkapselung der Pigmente (Zhang *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2006). Daten zur Wirksamkeit der Systeme fehlen jedoch weitgehend.

Das zweite Ziel der Arbeit stellte deshalb die Herstellung von Formulierungen zum Colon-Targeting von Anthocyanen dar. Amidiertes Pektin wurde als Matrixsubstanz für die Verkapselung verwendet. Die Effekte weiterer Komponenten (Zein³, Schellack, Hydroxypropylmethylcellulose, Kollagen aus dem Meeresschwamm *Chondrosia Reniformis* Nardo) wurden untersucht. Die optische Charakterisierung der Formulierungen erfolgte mittels Rasterelektronenmikroskopie. Anthocyangehalt und -profil wurden nach Extraktion mittels HPLC-UV/Vis erfasst. Um die Freisetzungseigenschaften zu bestimmen, wurden die hergestellten Systeme in einem *in vitro* und *ex vivo*

² Hüftdarm, größter Abschnitt des Dünndarms, mündet in den Dickdarm

³ hydrophobes, oberflächenaktives Protein aus Mais

Modellsystem untersucht, das durch Inkubation in Magensaftsimulanz, Ileostomieflüssigkeit und Colostomieflüssigkeit die Passage des humanen GIT simuliert. Eine im Rahmen der Arbeit hergestellte, zum Colon-Targeting geeignete Formulierung wurde zudem *in vivo* bezüglich ihres Effekts auf die murine DSS-Colitis untersucht.

2 Kenntnisstand

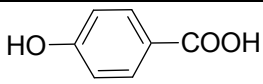
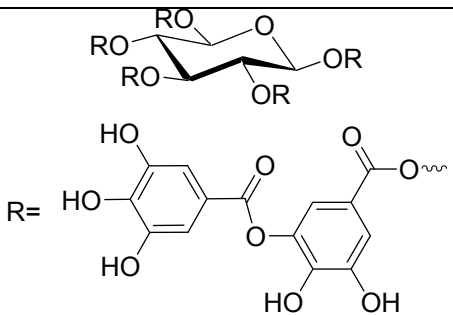
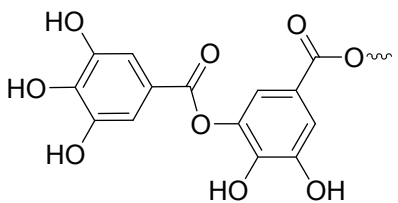
2.1 Polyphenole

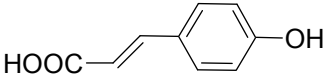
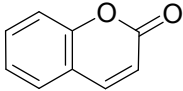
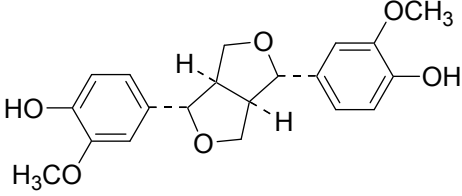
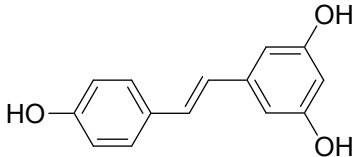
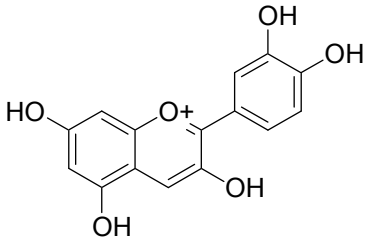
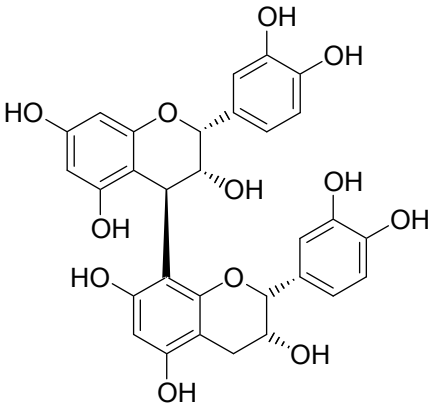
2.1.1 Polyphenole als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Der Begriff Polyphenole bezeichnet Verbindungen, die aus mindestens einem, mit einer oder mehreren Hydroxylgruppen verknüpftem aromatischen Ring bestehen. Mehrere tausend derartige Substanzen wurden bisher beschrieben. Sie sind in der gesamten Pflanzenwelt verbreitet und kommen zur Erhöhung der Wasserlöslichkeit meist glycosyliert oder acyliert vor. Die Klassifizierung der Polyphenole erfolgt auf der Grundlage von Anzahl und Anordnung der Kohlenstoffatome. In Tabelle 2-1 sind die Grundstrukturen wichtiger in Lebensmitteln vorkommender Polyphenolgruppen dargestellt (Dey und Harborne, 1997).

Bei Polyphenolen handelt sich um sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Diese im Sekundärmetabolismus gebildeten Verbindungen sind nicht am Energiestoffwechsel beteiligt, haben aber dennoch vielfältige Funktionen in der Pflanze, u. a. als Gerüstsubstanzen, als Abwehrstoffe gegenüber Krankheiten und Schädlingen, als Lock- und Duftstoffe sowie als Schutz vor UV-Strahlung (Dey und Harborne, 1997). Zudem weisen Polyphenole verschiedenste biologische Aktivitäten z.B. antioxidative, antikanzerogene, antimikrobielle und antiinflammatorische Effekte auf. Sie werden deshalb seit einigen Jahren als protektive und gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe in der menschlichen Ernährung angesehen (Watzl und Leitzmann, 2005).

Tabelle 2-1: Grundstrukturen und Beispielverbindungen wichtiger in Lebensmitteln vorkommender Polyphenol-Klassen (modifiziert nach Dey und Harborne, 1997)

Skelett	Klassifizierung	Beispiel	Struktur
C_6-C_1	Hydroxybenzoesäuren	<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	
$(C_6-C_1)_n : \text{Glc}$	Tannin	Pentadigalloylglucose	 $R =$ 

Skelett	Klassifizierung	Beispiel	Struktur
C ₆ -C ₃	Hydroxyzimt-säuren	<i>p</i> -Cumar-säure	
	Cumarine	Cumarin	
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignane	Pinoresinol	
(C ₆ -C ₃) _n	Lignine	Guajacyl-Lignin	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbene	Resveratrol	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoide	Cyanidin	
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Proantho-cyanidine	Procyanidin B2	

Im Folgenden wird ein Überblick über Strukturen, Quellen und Gehalte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Polyphenolklassen (phenolische Säuren, Lignin, Flavonole, Flavan-3-ole, Procyanidine, Anthocyane) gegeben. Da Anthocyane den Schwerpunkt der Arbeit bilden, wird auf diese Flavonoid-Klasse detaillierter eingegangen.

2.1.2 Phenolische Säuren

Hydroxybenzoesäure- und Hydroxyzimtsäure-Derivate mit C₆-C₁- bzw. C₆-C₃-Grundstruktur werden unter dem Begriff „phenolische Säuren“ zusammengefasst. Sie sind in der Pflanze überwiegend im Schalenbereich lokalisiert (Watzl und Leitzmann, 2005).

Das Vorkommen von freien Hydroxybenzoesäuren wie Gallussäure, 4-Hydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, Syringasäure oder Protocatechusäure (Abb. 2-1) in essbaren Pflanzen ist gering (Tomas-Barberan und Clifford, 2000).

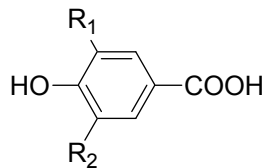


Abb. 2-1: Struktur von Hydroxybenzoesäuren (R₁/R₂=H: p-Hydroxybenzoesäure; R₁=OH, R₂=H: Protocatechusäure; R₁=OCH₃, R₂=H: Vanillinsäure; R₁/R₂=OCH₃: Syringasäure; R₁=OH, R₂=OH: Gallussäure).

Ausnahmen bilden Teeblätter, die Gallussäure in Konzentrationen von bis zu 12 g/kg TM aufweisen (Lin *et al.*, 1998) sowie verschiedene Beeren (20 - 270 mg Hydroxybenzoesäuren/kg FW) (Manach *et al.*, 2004). Hydroxybenzoesäuren liegen stattdessen vorwiegend verestert vor, z.B. mit Zuckern, Flavan-3-olen, kondensierten Tanninen oder organischen Säuren, wobei Galloylglucose einen Grundbaustein der hydrolysierbaren Gerbstoffe darstellt (Tomas-Barberan und Clifford, 2000).

Hydroxyzimtsäuren wie Kaffeesäure, p-Cumarsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure (Abb. 2-2) sind im Vergleich zu Hydroxybenzoesäuren weiter in pflanzlicher Nahrung verbreitet. Kaffeesäure stellt dabei den Hauptvertreter dar. Hydroxyzimtsäuren treten meist glycosyliert oder mit Chinasäure, Shikimisäure oder Weinsäure verestert auf (Manach *et al.*, 2004; Crozier *et al.*, 2009). Das wichtigste Konjugat ist die üblicherweise als Chlorogensäure bezeichnete 5-O-Kaffeoylchinasäure. Sie liegt z.B. im Kaffeegetränk mit 70 - 350 mg/Tasse und in Beerenfrüchten mit 0,5 - 2 g/kg FW in hohen Konzentrationen vor (Clifford, 1999).

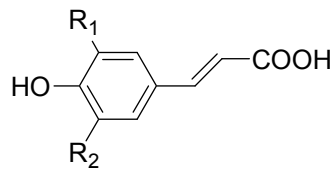


Abb. 2-2: Struktur von Hydroxycimtsäuren ($R_1/R_2=H$: *p*-Cumarsäure; $R_1=OH$, $R_2=H$: Kaffeesäure; $R_1=OCH_3$, $R_2=H$: Ferulasäure; $R_1/R_2=OCH_3$: Sinapinsäure).

2.1.3 Lignin

Lignin stellt einen Bestandteil der pflanzlichen Zellwand dar. Einlagerung von Lignin (Verholzung) v. a. in die Sekundärwand führt zur Verfestigung und Erhöhung der Wasserundurchlässigkeit. Dadurch werden die Stabilität von Stämmen und der Transport von Wasser und gelösten Nährstoffen im Leitungssystem verbessert sowie die Pflanze vor Pathogenen schützt.

Lignine sind pflanzliche Heteropolymere, die überwiegend durch dehydrierende Polymerisation der Hydroxycimtalkohole *p*-Cumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol (Abb. 2-3) gebildet werden.

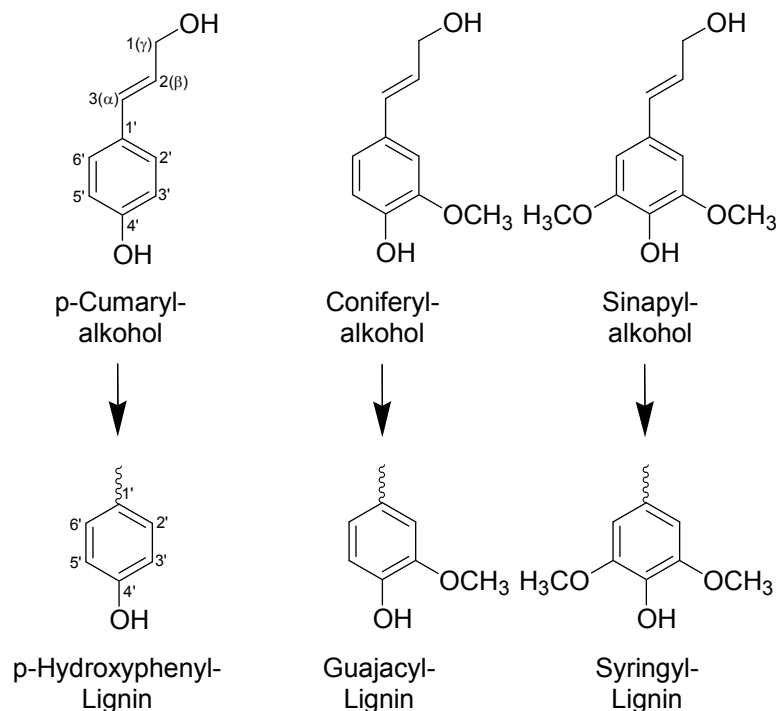


Abb. 2-3: Struktur der Monolignole und sich daraus ableitende Lignin-Typen (modifiziert nach Lewis und Yamamoto, 1990).

Die Kopplungsreaktion wird von einer Peroxidase bzw. Laccase katalysiert und verbraucht Wasserstoffperoxid bzw. Sauerstoff. Lignin besteht aus Phenylpropan-

einheiten, die sich von den o. g. Monolignolen ableiten und v. a. über β -O-4' (β -Aryl-Ether) Brücken sowie β -5', β - β -, 5'-5', 5'-O-4'- und β -1'- Bindungen verknüpft sind. Anhand der Substitution am phenolischen Ring werden verschiedene Lignin-Typen, Hydroxyphenyl-, Guajacyl- und Syringyl-Lignin (Abb. 2-3) unterschieden. Die exakte Struktur und Zusammensetzung des Lignins variiert stark in Abhängigkeit von der Taxonomie der Pflanze, dem Zelltyp, der Zellwandschicht und äußeren Einflüssen (Boerjan *et al.*, 2003; Belitz *et al.*, 2008).

2.1.4 Flavonoide

Mit derzeit mehr als 9000 Verbindungen stellen Flavonoide die größte Gruppe der Polyphenole dar (Williams und Grayer, 2004). Sie weisen eine Flavan-Grundstruktur auf, bestehend aus zwei aromatischen Ringen (A und B), die über eine Kette aus drei Kohlenstoffatomen verbunden sind und mit einem Sauerstoffatom einen heterocyclischen Pyran-Ring (C) bilden (Abb. 2-4). Flavonoide werden in die in Abb. 2-4 gezeigten Untergruppen unterteilt, die sich bezüglich der Oxidationsstufe des Sauerstoffs unterscheiden. Flavonole, Flavone, Flavan-3-ole, Anthocyane, Flavanone und Isoflavone stellen die Hauptvertreter der über die Nahrung aufgenommenen Flavonoide dar (Crozier *et al.*, 2009). Flavonoide kommen in der Natur vorwiegend glycosyliert vor und liegen wie die phenolischen Säuren aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung überwiegend in den Randschichten der Pflanze und den Blättern vor (Watzl und Leitzmann, 2005).

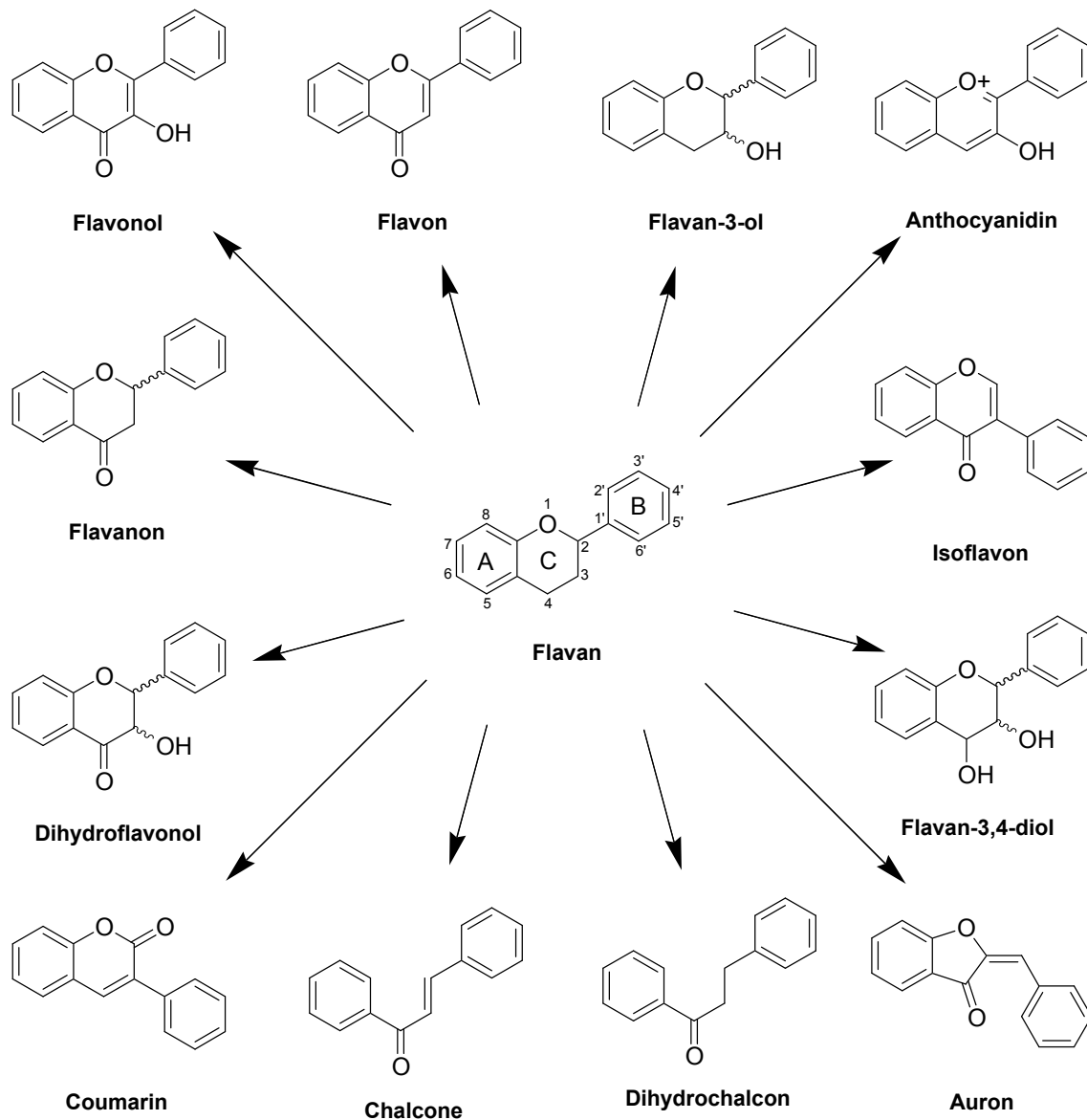


Abb. 2-4: Flavan-Grundstruktur sowie Übersicht über die verschiedenen Untergruppen der Flavonoide (modifiziert nach Crozier *et al.*, 2009).

2.1.4.1 Flavonole

Flavonole stellen die am weitesten im Pflanzenreich verbreitete Gruppe der Flavonoide dar. Durch Substitution des Grundgerüsts mit Hydroxy- und Methoxyresten tritt eine Vielzahl von unterschiedlichen Verbindungen auf. In Lebensmitteln dominieren die Aglycone Quercetin, Myricetin, Kämpferol und Isorhamnetin (Abb. 2-5), die überwiegend als O-Glycoside vorliegen. Die Zuckerbindung erfolgt hauptsächlich in Position 3 des C-Rings. Konjugation kann aber auch in Position 5-, 7-, 4'-, 3'- und 5'-auftreten (Crozier *et al.*, 2009). Hauptquellen für die Aufnahme von Flavonolen in der menschlichen Ernährung stellen Zwiebeln (350 - 1200 mg/kg FG), Kohl (300 - 600 mg/kg FG), Lauch (30 - 225 mg/kg FG), Tomaten (15 - 200 mg/kg FG) sowie Blaubeeren (30 - 160 mg/kg FG) dar (Manach *et al.*, 2004).

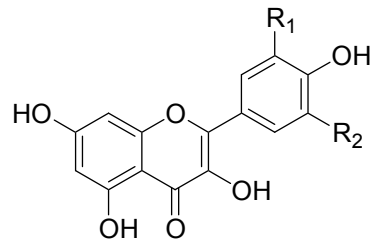


Abb. 2-5: Struktur von Flavonolen ($R_1/R_2=H$: Kämpferol; $R_1=OH$, $R_2=H$: Quercetin; $R_1=OCH_3$, $R_2=H$: Isorhamnetin; $R_1/R_2=OH$: Myricetin).

2.1.4.2 Flavan-3-ole

Bei Flavan-3-olen handelt es sich um chirale Verbindungen, deren Hauptvertreter (+)- und (-)-Catechin sowie (+)- und (-)-Epicatechin darstellen, wobei in der Natur vor allem die Isomere (+)-Catechin und (-)-Epicatechin (Abb. 2-6) vorkommen. Im Gegensatz zu den anderen Flavonoiden liegen sie nicht glycosidisch gebunden vor. Derivate entstehen durch Veresterung mit Gallussäure ((Epi)Catechingallate) oder durch Variation des Hydroxylierungsmusters am C-Ring. Zusätzliche Hydroxylierung in Position 5' führt zur Bildung von (Epi)Gallocatechin, bei Fehlen der OH-Gruppe in Position 3' liegt (Epi)Afzelechin vor. Letztere stellen jedoch Minorkomponenten dar. Weiterhin bilden Flavan-3-ole durch oxidative Kupplung komplexe Strukturen aus, die als Proanthocyanidine oder kondensierte Tannine bezeichnet werden (vgl. 2.1.5) (Crozier *et al.*, 2009). Hohe Gehalte an Flavan-3-olen wurden v. a. in Schokolade (460 - 610 mg/kg FG), Bohnen (350 - 500 mg/kg), Grüntee (100 - 800 mg/L), Aprikosen (100 - 250 mg/kg FG) und Rotwein (80 - 300 mg/L) nachgewiesen (Manach *et al.*, 2004). (Epi)Catechin kommt dabei v. a. in Früchten vor, wogegen (Epi)Gallocatechin und (Epi)Gallocatechingallat die Hauptverbindungen in Tee und Leguminosensamen darstellen (Arts *et al.*, 2000). Durch Reaktion mit prolinreichen Proteinen der Mundhöhle sind Flavan-3-ole für den adstringierenden Geschmack vieler der o. g. Lebensmittel verantwortlich (Aron und Kennedy, 2008).

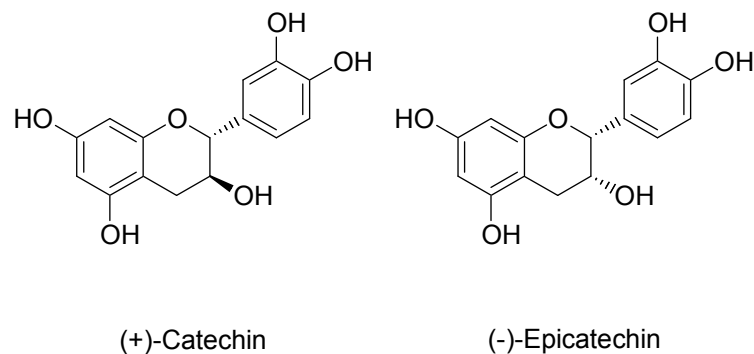


Abb. 2-6: Strukturen von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin.

2.1.5 Proanthocyanidine

Bei Proanthocyanidinen, auch als kondensierte Gerbstoffe bezeichnet, handelt es sich um komplexe Polymerstrukturen, die durch oxidative Kopplung von bis zu 50 Flavan-3-ol-Monomeren entstehen (Crozier *et al.*, 2009). Durch die Komplexierung von Speichelproteinen tragen Proanthocyanidine, wie die Monomere, zum adstringierenden Geschmack vieler Früchte (Trauben, Äpfel, Beeren) und Getränke (Wein, Tee) sowie zum bitteren Geschmack von Schokolade bei (Santos-Buelga und Scalbert, 2000). Es werden verschiedene Typen unterschieden. Bei Typ B-Proanthocyanidinen tritt die Kopplung zwischen Position 4 des C-Rings und den Positionen 6 oder 8 am A-Ring auf. Typ A-Verbindungen weisen eine zusätzliche Etherbindung zwischen Position 2 und 7 auf. Kondensierte Gerbstoffe, die ausschließlich aus (Epi)Catechin-Einheiten bestehen, überwiegen in Pflanzen und werden als Procyanidine bezeichnet. Prodelphinidine und Propelargonidine, bestehend aus (Epi)Gallocatechin- bzw. (Epi)Afzelechin-Einheiten, sind weniger verbreitet (Crozier *et al.*, 2009). Aufgrund der Vielfalt an Strukturen und molekularen Massen sind die Gehalte an kondensierten Tanninen nur schwer bestimmbar (Manach *et al.*, 2004). Früchte stellen mit Gesamt-Proanthocyanidingehalten von 330 mg/100 g FG in Blaubeeren, 420 mg/100 g FG in Cranberries und 260 mg/100 g FG in Pflaumen Hauptquellen dar. Bohnen (800 mg/100 g FG) und Haselnüsse (500 mg/100 g FG) weisen ebenfalls hohe Gehalte auf (Gu *et al.*, 2004).

2.2 Anthocyane

Anthocyane, deren Bezeichnung von den griechischen Wörtern *anthos* = Blume und *kianos* = blau abgeleitet ist, stellen mit über 550 bisher bekannten Verbindungen die größte Gruppe wasserlöslicher Farbpigmente im Pflanzenreich dar und sind für die Blau-, Violett- und Rotfärbung von pflanzlichen Geweben verantwortlich. Innerhalb der Gruppe der Anthocyane unterscheidet man zwischen Aglyconen (Anthocyanidine) und Anthocyan-O-Glycosiden (Anthocyanine oder Anthocyane), wobei infolge erhöhter Stabilität in Pflanzen fast ausschließlich die glycosylierten Derivate vorkommen (Watzl *et al.*, 2002; Daayf und Lattanzio, 2006).

2.2.1 Struktur

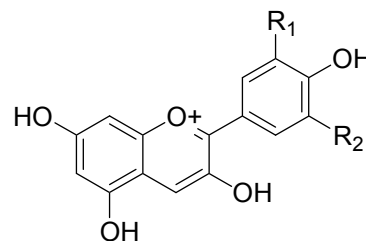
Im Gegensatz zu den anderen Flavonoiden besitzen Anthocyane bei saurem pH-Wert eine kationische 2-Phenylbenzopyrylium-Struktur (Flavylium-Kation) mit einer

positiven Ladung am C-Ring (Abb. 2-4). Zweiunddreißig verschiedene Aglycone, die sich im Hydroxylierungs- und Methoxylierungsmuster unterscheiden, wurden bisher identifiziert (Daayf und Lattanzio, 2006). In pflanzlichen Nahrungsmitteln kommen allerdings überwiegend nur die sechs Aglycone Pelargonidin (Pg), Cyanidin (Cy), Delphinidin (Dp), Petunidin (Pt), Peonidin (Pn) und Malvidin (Mv) vor, deren Strukturen in Tabelle 2-2 dargestellt sind (Clifford, 2000). Cyanidin-Glycoside stellen mit einem Anteil von etwa 50 % die dominierenden Pigmente in Früchten und Gemüsen dar. Delphinidin- (12 %), Pelargonidin- (12 %), Peonidin- (12 %), Petunidin- (7 %) und Malvidin-Derivate (7 %) sind weniger verbreitet (Castaneda-Ovando *et al.*, 2009).

Die stets auftretende Glycosylierung erfolgt bevorzugt in Position 3 des C-Rings, ist aber auch in Position 5 oder 7 des A-Rings sowie seltener in Position 3', 4' und 5' am B-Ring möglich (Mazza und Miniati, 1993). Als Zucker finden sich Glucose, Rhamnose, Xylose, Galactose, Arabinose und Glucuronsäure. Die meisten Anthocyane besitzen eine, zwei oder drei Monosaccharideinheiten, häufig treten dabei 3,5- und 3,7-Diglucoside auf. Zudem wurden mit Di- oder Trisacchariden (Rutinoside, Sophoroside, Sambubioside) glycosylierte Aglycone identifiziert (Clifford, 2000; Daayf und Lattanzio, 2006). Weiterhin sind die Zuckerreste vieler Anthocyane mit aliphatischen Säuren wie Äpfel-, Essig-, Oxal-, Malon- oder Bernsteinsäure bzw. aromatischen Säuren wie Kaffee-, *p*-Cumar- oder Ferulasäure verestert. Variationen in Art, Anzahl und Position von Acylresten tragen zur großen strukturellen Vielfalt innerhalb der Anthocyane bei (Daayf und Lattanzio, 2006).

Tabelle 2-2: Strukturen der sechs in essbaren Pflanzen häufigsten Anthocyanidine (modifiziert nach Castaneda-Ovando *et al.*, 2009)

Anthocyanidin	Substitution	Substitution	
		R ₁	R ₂
Pelargonidin	Pg	-H	-H
Cyanidin	Cy	-OH	-H
Delphinidin	Dp	-OH	-OH
Peonidin	Pn	-OCH ₃	-H
Petunidin	Pt	-OCH ₃	-OH
Malvidin	Mv	-OCH ₃	-OCH ₃



2.2.2 pH-Abhängigkeit der Struktur

Anthocyane liegen in wässriger Lösung in einem pH-Wert abhängigen Gleichgewicht vor, das durch die vier Gleichgewichtsformen Flavylumkation (AH^+), quinoide Base (A), Carbinol-Pseudobase (B) und Chalcon (C) charakterisiert ist (Abb. 2-7).

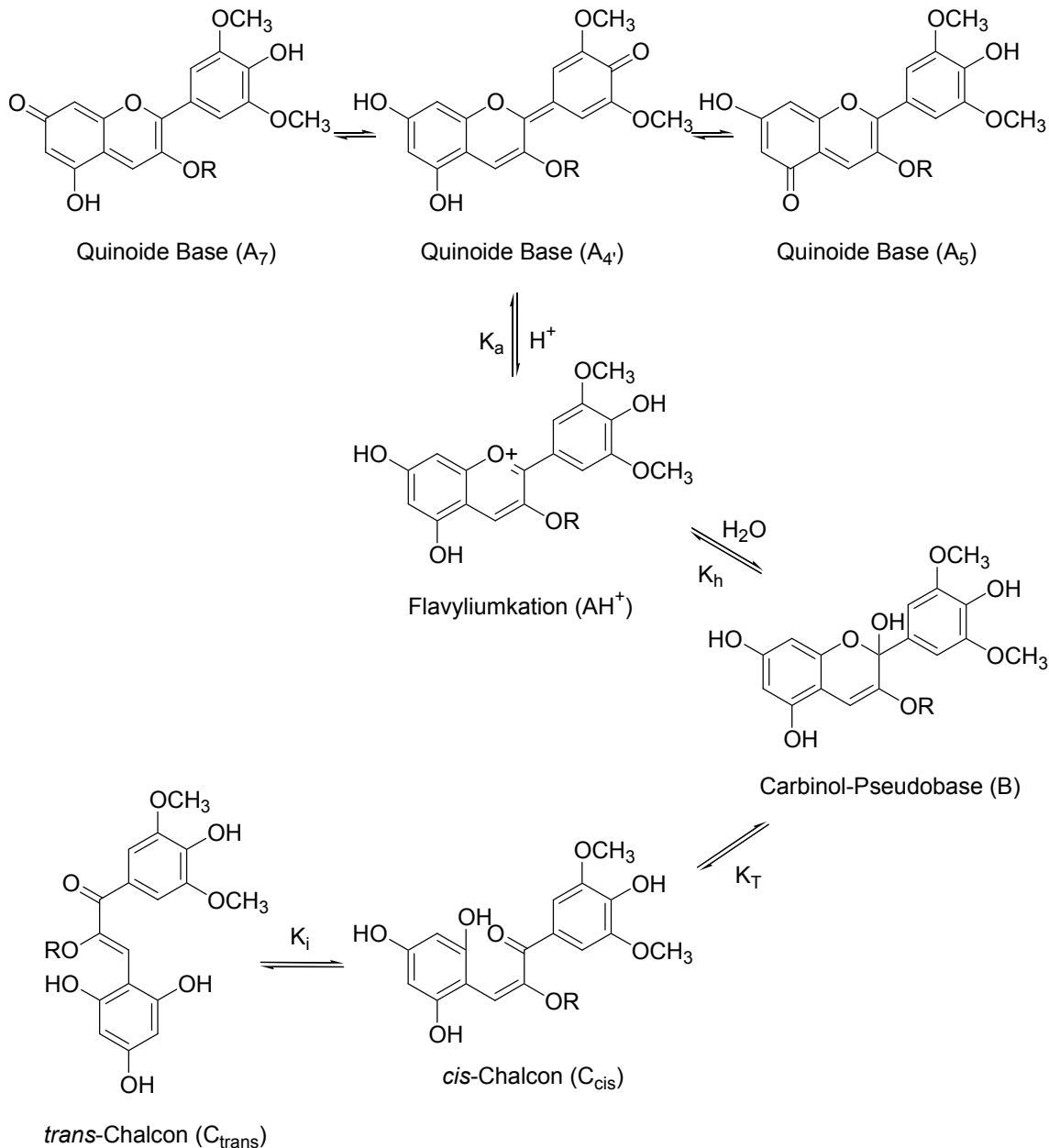


Abb. 2-7: Strukturelle Umwandlung von Malvidin-3-glucosid in wässriger Lösung, R: Glucose, K_h : Gleichgewichtskonstante Hydratisierung $K_h = ([B]/[AH^+])_{a_{H^+}}$; K_a : Gleichgewichtskonstante Protonentransfer $K_a = ([A]/[AH^+])_{a_{H^+}}$; K_T : Gleichgewichtskonstante Tautomerisierung $K_T = ([C]/[B])$; K_i : Gleichgewichtskonstante Isomerisierung $K_i = ([C_{trans}]/[C_{cis}])$ (modifiziert nach Pina, 1998).

Im stark Sauren dominiert das rote oder violette Flavyliumkation. Bei pH-Werten > 2 kommt es zur schnellen Abspaltung eines Protons in Position 5, 7 oder 4' und zur Bildung der blauen quinoiden Base, die bei pH-Wert-Anstieg (pH 6-8) weiter zur ionischen Form deprotoniert wird. Parallel erfolgt die langsame, aber thermodynamisch bevorzugte Hydratisierung des Flavyliumkations in Position 2 des C-Rings zur farblosen Carbinol-Pseudobase (auch bezeichnet als Hemiacetal oder Chromenol) (Brouillard und Delaporte, 1977; Brouillard und Dubois, 1977). C4-Addukte werden aufgrund ungünstiger kinetischer und thermodynamischer Bedingungen hierbei nicht gebildet (Cheminant und Brouillard, 1986).

Zudem steht die Carbinol-Pseudobase im tautomeren Gleichgewicht mit der schwach gelben Chalcon-Pseudobase, die in *cis*- oder *trans*-Form vorliegen kann. Bei in Position 3 glycosylierten Anthocyanen überwiegt die Ringform im Gleichgewicht. Da die Ringöffnung eine endotherme Reaktion darstellt, führt eine Erhöhung der Temperatur zur Zunahme des Chalcon-Anteils. (Brouillard und Delaporte, 1977; Cheminant und Brouillard, 1986).

Die pH-Wert abhängige Verteilung der einzelnen Gleichgewichtsformen wird vom Substitutionsmuster des Anthocyanmoleküls bestimmt (Brouillard *et al.*, 1982; Mazza und Brouillard, 1987). Abb. 2-8 zeigt beispielhaft die Anteile der einzelnen Gleichgewichtsformen für Malvidin-3-glucosid. Für diese Molekülstruktur wurde festgestellt, dass bei 25°C die Gleichgewichtskonstante K_h der Hydratisierung ($K_h = \frac{[B]}{[AH^+]} a_{H^+} = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) größer als diejenige des Protonentransfers K_a ($K_a = \frac{[A]}{[AH^+]} a_{H^+} = 5,7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) ist. Infolgedessen stellt die farblose Carbinol-Pseudobase im schwach sauren bis leicht alkalischen Bereich die dominierende Spezies dar, und entsprechende Lösungen sind nur schwach gefärbt (Brouillard *et al.*, 1978). Im Gegensatz dazu weisen z.B. komplexe Anthocyane, die am Zuckerrest mit planaren aliphatischen oder aromatischen Säuren acyliert sind, infolge intramolekularer hydrophober Wechselwirkungen (vgl. 2.2.3.1) eine stabile Färbung in schwach sauren Lösungen auf (Dangles *et al.*, 1993; Figueiredo *et al.*, 1996).

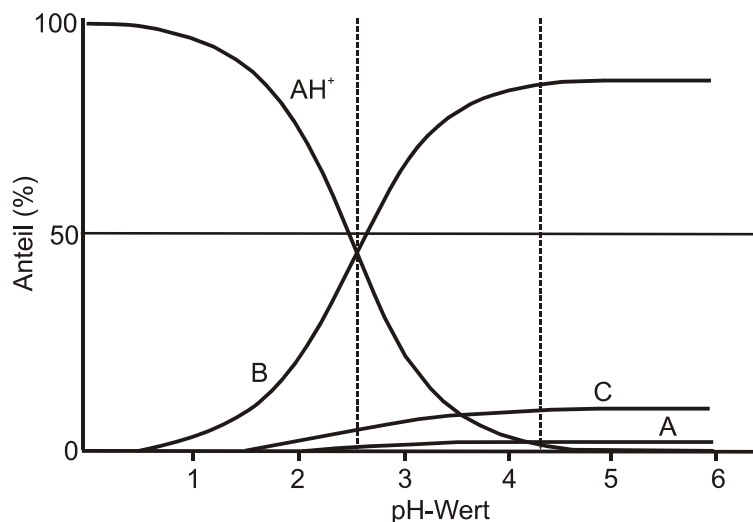


Abb. 2-8: Verteilung der Gleichgewichtsformen von Malvidin-3-glucosid in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 25°C. AH⁺: Flavylium-Kation, B: Carbinol-Pseudobase, A: quinoide Basen; C: Chalcone (modifiziert nach Timberlake, 1980).

2.2.3 Farbe

Anthocyane weisen bei stark saurem pH-Wert Absorptionsmaxima im ultravioletten Spektralbereich bei 265 - 275 nm sowie im Sichtbaren bei 465 - 560 nm auf. Letzteres ist für die charakteristische rote bis violette Farbe des Flavyliumkations verantwortlich (Merken und Beecher, 2000). Neben anderen Faktoren wie Lösungsmittel, Temperatur, pH-Wert und Konzentration wird die Lage der Absorptionsmaxima und damit die Farbe v. a. vom Substitutionsmuster des Anthocyangrundgerüsts bestimmt (Mazza und Brouillard, 1987). Hydroxylierung oder Methoxylierung in den Positionen 3, 4', 3', 7, 5, 5' führt mit abnehmender Intensität zu einer Verschiebung des Maximums in Richtung höherer Wellenlängen (Rotverschiebung, bathochromer Effekt). Eine Blauverschiebung (hypsochromer Effekt) wird dagegen durch Hydroxylierung oder Methoxylierung in Position 6 oder 8 oder Glycosylierung hervorgerufen. Auch die Acylierung der Zuckerreste beeinflusst das Absorptionsspektrum. Die Substitution mit Zimtsäure resultiert in einem bathochromen Effekt (Giusti *et al.*, 1999; Torskangerpoll *et al.*, 1999).

In der Pflanzenzelle liegen Anthocyane bei pH-Werten von 2,8 bis 5,5 vor (Asen *et al.*, 1972; Brouillard, 1983). Wie im Abschnitt 2.2.2 erläutert, sind anthocyanhaltige Lösungen in diesem pH-Wert-Bereich aufgrund der Dominanz des farblosen Pseudo-Carbinols oftmals nur schwach gefärbt. Um eine Farbstabilisierung in diesem Bereich zu ermöglichen, existieren neben den o. g. strukturellen Variationen in der Pflanzenzelle weitere Mechanismen wie Copigmentierung (2.2.3.1), Selbstassoziation (2.2.3.2)

und Bildung von Metalloanthocyanen (2.2.3.3), um die Anteile der gefärbten Gleichgewichtsformen zu erhöhen (Brouillard, 1981).

2.2.3.1 Copigmentierung

Copigmentierung bezeichnet die Wechselwirkung von Anthocyanen mit anderen Molekülen, die zu einer Farbverstärkung (hyperchromer Effekt) und einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen (bathochromer Effekt) führt. intermolekulare Copigmentierung tritt u. a. in Gegenwart anderer Flavonoide, phenolischer oder organischer Säuren, Alkaloiden oder Aminosäuren auf (Asen *et al.*, 1972; Malien-Aubert *et al.*, 2001). Zudem wird intramolekulare Copigmentierung bei acylierten Anthocyanen beobachtet, wobei es zu Wechselwirkungen zwischen dem Anthocyanchromophor und kovalent gebundenen phenolischen Resten kommt (Brouillard, 1983; Yoshida *et al.*, 1991).

Anthocyan-Copigment-Komplexe sind durch eine „Sandwich-artige“ vertikale Schichtung der Moleküle bzw. Molekülteile charakterisiert, die durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Kernen hervorgerufen wird. Zudem treten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen hydrophilen Zuckerresten sowie Charge-Transfer-Wechselwirkungen auf (Goto und Kondo, 1991). Diese Anordnung verringert den nukleophilen Angriff von Wasser, wodurch die Bildung des farblosen Pseudo-Carbinols (B) zurückgedrängt und der Anteil der farbigen Spezies Flavylumkation (AH^+) und quinoide Base (A) im Gleichgewicht erhöht wird (Brouillard, 1981).

2.2.3.2 Selbstassoziation

Selbstassoziation von Anthocyanmolekülen stellt eine spezielle Form der Copigmentierung dar, die dadurch charakterisiert ist, dass sich die Farbintensität anthocyanhaltiger Lösungen abweichend vom Lambert Beerschen Gesetz nicht linear mit der Konzentration ändert. So wurde eine 300fache Zunahme der Absorption beobachtet, wenn bei pH 3,16 die Konzentration einer Cyanidin-3,5-diglucosidlösung von 10^{-4} auf 10^{-2} M erhöht wurde (Asen *et al.*, 1972). Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich auch bei pH 7,0 für Malvidin-3,5-diglucosid (Hoshino *et al.*, 1981). In Abhängigkeit von der Anthocyanstruktur kommt es zudem zu batho- oder hypsochromer Verschiebung des Absorptionsmaximums (Hoshino *et al.*, 1980; Hoshino *et al.*, 1981). Untersuchungen mittels Circular Dichroismus (CD)- und 1H -NMR-Spektroskopie zeigten, dass es infolge hydrophober Wechselwirkungen zu einer vertikalen Stapelung der aromatischen Kerne der bei diesen pH-Werten vorliegenden farbigen Gleich-

gewichtsformen Flavyliumkation (AH^+) oder quinoide Base (B) kommt (Hoshino *et al.*, 1981; Hoshino *et al.*, 1982; Hoshino, 1991; Hoshino, 1992). Selbstassoziation tritt bei Anthocyan-Konzentrationen über 10^{-3} M auf (Hoshino *et al.*, 1980; Goto und Kondo, 1991; Houbiers *et al.*, 1998).

2.2.3.3 Metalloanthocyane

Anthocyane, die zwei *ortho* ständige Hydroxylgruppen am B-Ring aufweisen, bilden mit Metallionen wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} Chelatkomplexe. Dadurch kommt es zu einer Blauverschiebung (hypsochromer Effekt) und Farbstabilisierung (Daayf und Lattanzio, 2006). Für verschiedene Al^{3+} -Anthocyan-Komplexe wird dieser Effekt auf eine Stabilisierung der ionisierten quinoiden Base gegenüber einem Abbau durch reaktive Sauerstoffspezies zurückgeführt (Moncada *et al.*, 2003).

Commelinin aus der blau gefärbten Blume *Commelina cummunis* und Protodelphin aus der Blume *Saliva patens* stellen Beispiele für Metalloanthocyane dar. Sie bestehen jeweils aus sechs mehrfach glycosylierten und acylierten Delphinidinmolekülen, die mit Flavonmolekülen copigmentiert und mit zwei Mg^{2+} -Ionen komplexiert sind (Kondo *et al.*, 1992; Takeda *et al.*, 1994).

2.2.4 Anthocyanstabilität

Anthocyane sind nur bei stark sauren Bedingungen stabil (Cabrita *et al.*, 2000; Seeram *et al.*, 2001). Neben dem pH-Wert wird der Abbau von weiteren Faktoren beeinflusst. So wirken erhöhte Temperaturen, Licht und Sauerstoff beschleunigend (Attoe und von Elbe, 1981; Cabrita *et al.*, 2000). Strukturelle Faktoren wie Glycosylierung und Acylierung erhöhen dagegen die Stabilität (Dangles *et al.*, 1993; Figueiredo *et al.*, 1996; Giusti und Wrolstad, 2003). Zudem unterliegen Anthocyane einem enzymatischen Abbau z.B. durch Polyphenoloxidase in pflanzlichen Zellen oder durch Glycosidasen der intestinalen Mikroflora (Keppler und Humpf, 2005; Welch *et al.*, 2008).

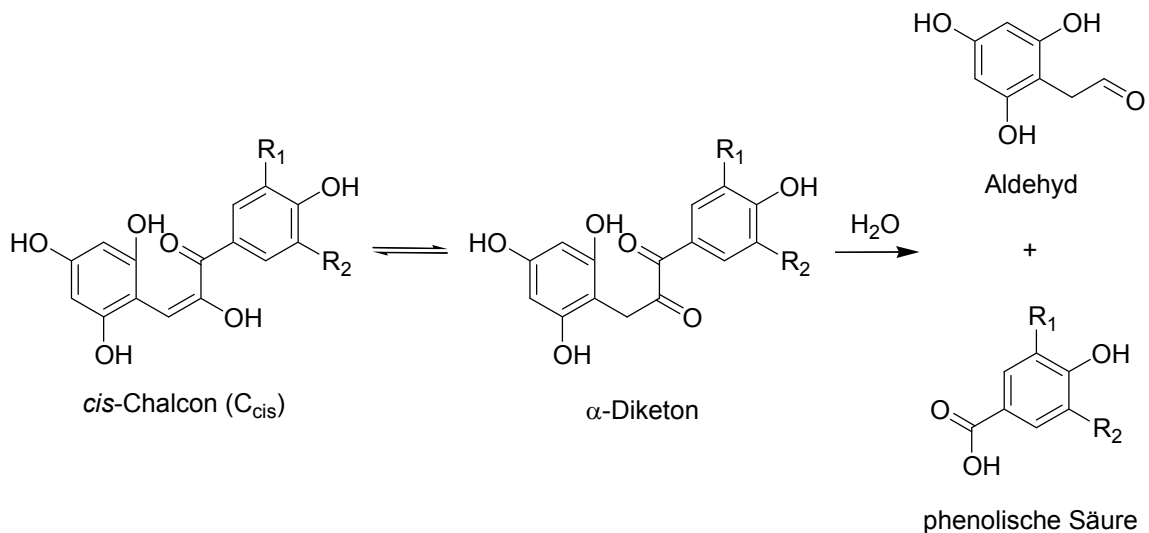


Abb. 2-9: Zerfall und Zerfallsprodukte von Anthocyanidinen. $R_1/R_2=H$: Pelargonidin, p-Hydroxybenzoesäure; $R_1=OH$, $R_2=H$: Cyanidin, Protocatechusäure; $R_1/R_2=OH$: Delphinidin; Gallussäure; $R_1=OCH_3$, $R_2=H$: Peonidin, Vanillinsäure; $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$: Petunidin, 3-Methoxy-4,5-hydroxybenzoesäure; $R_1=OCH_3$, $R_2=OCH_3$: Malvidin, Syringasäure. (modifiziert nach Clifford, 2000; Fleischhut *et al.*, 2006).

Der chemische Zerfall der besonders instabilen Anthocyanidine verläuft über das im Abschnitt 2.2.2 beschriebene Chalcon, das über eine Keton-Enol-Tautomerie zum α -Diketon umgelagert wird. Dieses ist instabil und zerfällt rasch in einen Aldehyd und eine phenolische Säure (Abb. 2-9), welche das charakteristische Substitutionsmuster des B-Rings zeigt (Harper, 1968; Jurd, 1972; Clifford, 2000; Fleischhut *et al.*, 2006).

Anthocyane weisen im Vergleich zu Anthocyanidinen eine deutlich erhöhte Stabilität auf, da infolge der Glycosylierung in Position 3 am C-Ring die Umlagerung zum instabilen α -Diketon nicht möglich ist (Fleischhut *et al.*, 2006). Die Stabilität der Anthocyane hängt zudem vom Substitutionsmuster des B-Rings ab. So nimmt die Stabilität bei 3,5-Diglucosiden mit abnehmender Methoxylierung und zunehmender Hydroxylierung in der Reihenfolge Malvidin > Peonidin > Petunidin > Cyanidin > Delphinidin ab (Hrazdina *et al.*, 1970).

Als Wege für den Abbau von Anthocyanen werden diskutiert (Hrazdina, 1971; Jurd, 1972; Adams, 1973; Seeram *et al.*, 2001; Keppler und Humpf, 2005):

- (i) eine Umwandlung über das Chalconglycosid zum Cumaringlycosid durch Abspaltung des B-Rings,
- (ii) die Ringspaltung und die Bildung phenolischer Säuren ohne vorherige Hydrolyse,
- (iii) die Hydrolyse zum Aglycon und dessen Abbau unter Freisetzung von Aldehyd und phenolischer Säure (v. a. bei hohen Temperaturen und sauren pH-Werten).

Als Zerfallsprodukte des A-Rings wurden dabei 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd, Phloroglucinol, 2,4-Dihydroxybenzoesäure und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure detektiert (Piffaut *et al.*, 1994; Seeram *et al.*, 2001; Sadilova *et al.*, 2007)

2.2.5 Vorkommen

Anthocyane sind innerhalb des Pflanzenreichs weit verbreitet und treten v. a. in Früchten und Blüten, aber auch in Blättern, Stielen, Samen und Wurzeln auf (Crozier *et al.*, 2009). Die Pigmente sind dabei üblicherweise in den Vakuolen von Epidermiszellen lokalisiert (Markham *et al.*, 2000). Zierpflanzen und Blumen weisen infolge Polyglycosylierung und Polyacylierung i. A. eine komplexere Anthocyanzusammensetzung als Früchte auf (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Die Anthocyanengehalte innerhalb einer Art zeigen teilweise beträchtliche Schwankungen, die auf verschiedene Einflussfaktoren wie Sorte, Boden, Licht, Feuchtigkeit, Temperatur, Düngung aber auch die verwendete analytische Methode zurückzuführen sind (Kähkönen *et al.*, 2001). Tabelle 2-3 gibt einen Überblick über Vorkommen und Gehalte von Anthocyanen in pflanzlichen Lebensmitteln.

Tabelle 2-3: Anthocyanengehalte in verschiedenen pflanzlichen Lebensmitteln.

Quelle	Hauptanthocyane	Gehalt	
		(mg/100 g FW)	Literatur
Aronia	Cy-3-gal, Cy-3-ara	1500	(Wu <i>et al.</i> , 2004a)
		500	(Slimestad <i>et al.</i> , 2005)
		320	(Zheng und Wang, 2003)
Aubergine ^a	Dp-3-rut-5-gal, Dp-3-rut	45	(Wu und Prior, 2005a) (Sadilova <i>et al.</i> , 2006)
Cranberry	Cy-3-gal, Cy-3-ara, Pn-3-gal, Pn-3-ara	50	(Wu und Prior, 2005b) (Zheng und Wang, 2003)
Erdbeere	Pg-3-glc	30 - 100	(Wu und Prior, 2005b) (Hollands <i>et al.</i> , 2008)
Himbeere (rot)	Cy-3-soph, Cy-3-soph-5-rha, Cy-3-rut, Cy-3-glc	45 - 100	(Wu und Prior, 2005b) (Wang und Lin, 2000)

Quelle	Hauptanthocyane	Gehalt (mg/100 g FW)	Literatur
Heidel- beere	Dp-3-gal, Dp-3-glc, Dp-3- ara, Cy-3-gal, Cy-3-glc, Cy-3-ara, Pt-3-glc, Mv-3- glc	350 - 520	(Lätti <i>et al.</i> , 2008)
		600	(Kähkönen <i>et al.</i> , 2003)
		780	(Kraus, 2006)
Rhabarber	Cy-3-glc, Cy-3-rut	0 - 154	(Wrolstad und Heatherb, 1968) (Rumpunen und Henriksen, 1999)
Schwarze Johannis- beere	Dp-3-glc, Dp-3-rut, Cy-3- glc, Cy-3-rut	320 - 590	(Wu <i>et al.</i> , 2004a)
		230	(Kähkönen <i>et al.</i> , 2003)
Schwarze Karotte ^b	Cy-3-xyl-glc-gal, Cy-3- (fer)xyl-glc-gal, Cy-3- (p-cum)xyl-glc-gal	5 - 1740	(Kammerer <i>et al.</i> , 2004)
Süßkirsche	Cy-3-rut	25 - 77	(Wu und Prior, 2005b)
			(Kim <i>et al.</i> , 2005)
Traube (blau)	Dp-3-glc, Pn-3-glc, Mv-3- glc	60 - 97 9 - 101	(Wu und Prior, 2005b)
			(Mazza <i>et al.</i> , 1999)
			(Munoz-Espada <i>et al.</i> , 2004)
Zwiebel (rot)	Cy-3-glc, Cy-3-(mal)glc	23 - 46	(Wu und Prior, 2005a) (Gorinstein <i>et al.</i> , 2008)

^aAnthocyanengehalt in der Schale, ^bAngabe in mg/100 g TM

2.3 Verfügbarkeit und Metabolismus

2.3.1 Verfügbarkeit

Polyphenole werden aufgrund ihres Vorkommens in vielen pflanzlichen Lebensmitteln (vgl. 2.1 und 2.2.5) täglich über die Nahrung aufgenommen. Neben der zugeführten Menge ist eine ausreichende Verfügbarkeit der Verbindungen im Körper die Voraussetzung für gesundheitliche Effekte *in vivo* (Cermak *et al.*, 2009). Als Maß dafür gilt die sog. Bioverfügbarkeit, die üblicherweise definiert ist als Geschwindigkeit

und Konzentration, mit denen ein bioaktiver Lebensmittelinhaltsstoff in der Blutbahn auftritt (U.S. Food and Drug Administration, 2004; Cermak *et al.*, 2009).

Die Verfügbarkeit der Verbindungen wird von der Absorption, der Metabolisierung sowie der Elimination bestimmt. Metabolisierung findet durch die Mikroflora des Gastrointestinaltraktes (GIT) sowie in den Körperzellen statt (Manach *et al.*, 2004). Sie führt zur Verringerung der effektiven Konzentration der Ausgangsverbindungen sowie zur Entstehung von Metaboliten mit abweichender chemischer Struktur sowie variierenden biologischen Effekten (Manach *et al.*, 2004; Crozier *et al.*, 2009).

Die Bioverfügbarkeit der einzelnen Polyphenole unterscheidet sich stark. Entsprechende Daten zu maximaler Plasmakonzentration (c_{\max}), Zeitdauer des Erreichens von c_{\max} (t_{\max}) sowie relativer urinärer Ausscheidung bezogen auf die zugeführte Dosis wurden von Manach *et al.* (2005) zusammengefasst (Tabelle 2-4). Detailliertere Angaben zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen enthält Abschnitt 2.3.4.

Tabelle 2-4: Zusammenfassung pharmakokinetischer Daten aus 97 Studien zur Bioverfügbarkeit von Polyphenolen. Die Daten entsprechen der Aufnahme von 50 mg Aglycon-Äquivalent (Manach *et al.*, 2005).

Polyphenol	t_{\max} (h)	c_{\max} ($\mu\text{mol/L}$)	relative urinäre Ausscheidung (%)
Quercetin-Glycoside	1,3 \pm 0,3	1,46 \pm 0,45	2,5 \pm 1,2
Rutin	6,5 \pm 0,7	0,20 \pm 0,06	0,7 \pm 0,3
(Epi)Catechin	1,8 \pm 0,1	0,40 \pm 0,09	18,5 \pm 5,7
Gallussäure	1,6 \pm 0,2	4,00 \pm 0,57	37,7 \pm 1,0
Chlorogensäure	1,0	0,26	0,3
Kaffeesäure	1,4 \pm 0,6	0,96 \pm 0,26	10,7
Ferulasäure	2,0	0,03	26,7 \pm 17,6
Anthocyane	1,5 \pm 0,4	0,3 \pm 0,2	0,4 \pm 0,3
Procyanidin Dimere	2,0	0,02 \pm 0,01	-

2.3.2 Metabolismus, Absorption und Exkretion von Polyphenolen

Absorption, Metabolismus und Exkretion von Polyphenolen verlaufen weitgehend nach einem allgemeinen Mechanismus, der nachfolgend zusammenfassend dargestellt ist. Davon abweichende Besonderheiten bei Anthocyanen werden gesondert im Abschnitt 2.3.3 beschrieben.

2.3.2.1 Gastrointestinaler Metabolismus und Absorption

Polyphenole sind in Lebensmitteln v. a. in Form von Glycosiden, Estern oder Polymeren enthalten (vgl. 2.1). Ihre Absorption erfolgt im Allgemeinen im Dünndarm nach hydrolytischer Spaltung (Manach *et al.*, 2004). Für einige Glucoside wurde auch die intakte Aufnahme nachgewiesen (Walgren *et al.*, 2000; Nemeth *et al.*, 2003).

Ausnahmen hiervon stellen Anthocyane dar, die bereits im Magen resorbiert werden (vgl. 2.3.3) (Miyazawa *et al.*, 1999; Passamonti *et al.*, 2003; Talavera *et al.*, 2004). Weiterhin deuten mehrere Studien darauf hin, dass auch ein Aglycon wie Quercetin sowie freie phenolische Säuren wie Kaffeesäure, *p*-Cumarsäure, Ferulasäure, Gallussäure und - in geringerem Ausmaß - auch das Konjugat Chlorogensäure bereits im Magen absorbiert werden (Olthof *et al.*, 2001; Crespy *et al.*, 2002; Konishi *et al.*, 2006). Die Beteiligung des Monocarbonsäuretransporters (MCT) an der Aufnahme der phenolischen Säuren wird vermutet (Konishi *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2006).

Eine weitere Sonderstellung nehmen Flavan-3-ole ein, die in der Natur nicht glycosyliert, aber zum Teil mit Gallussäure verestert vorkommen. Sie passieren die intestinale Mucosa ohne vorherige Hydrolyse oder Dekonjugation mittels passiver Diffusion (Scalbert und Williamson, 2000; Donovan *et al.*, 2001; Spencer, 2003).

Hydrolytische Prozesse im Dünndarm erfolgen enzymkatalysiert. Die Spaltung von Polyphenolglucosiden ist v. a. auf die Aktivität des intestinalen Enzyms Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) zurückzuführen. LPH ist auf der luminalen Seite der Bürstensaummembran lokalisiert und dient vorwiegend dem Abbau von Lactose, spaltet aber auch β -Glucoside (Day *et al.*, 2000; Nemeth *et al.*, 2003; Crozier *et al.*, 2009). Hydroxyzimtsäureester werden durch in ilealen Enterozyten sowie im Lumen nachgewiesene Esterase-Aktivität gespalten (Andreasen *et al.*, 2001; Kern *et al.*, 2003; Lafay *et al.*, 2006). Am Beispiel von Quercetinderivaten wurde gezeigt, dass auch die ileale Mikroflora die Fähigkeit zur Hydrolyse von Glucosiden und Galactosiden aufweist (Knaup *et al.*, 2007). Als ein weiterer Weg wird die Hydrolyse von Flavonoid-Glycosiden (z.B. Glucoside, Galactoside, Xyloside, Arabinoside) durch das Enzym cytosolische β -Glucosidase (CBG) in den Epithelzellen beschrieben (Berrin *et al.*, 2002; Nemeth *et al.*, 2003). So im Lumen freigesetzte Aglycone gelangen aufgrund ihrer erhöhten Lipophilie mittels passiver Diffusion in die Enterozyten (Day *et al.*, 2000).

Daneben wurde ein aktiver Transport von größeren und hydrophileren Molekülen durch die Membran nachgewiesen, der die Grundlage der intrazellulären Hydrolyse durch CBG darstellt. Die Datenlage zu beteiligten intestinalen Membran-Transportern ist derzeit jedoch noch unzureichend und teilweise widersprüchlich (Passamonti *et al.*,

2009). Ein aktiver Transport unter Beteiligung des Na⁺-abhängigen Glucose-transporters 1 (SGLT1) wurde beschrieben (Walgren *et al.*, 2000; Nemeth *et al.*, 2003). Eine neuere Studie zeigt jedoch, dass Flavonoide von SGLT1 nicht transportiert werden und stattdessen den Transporter inhibieren (Kottra und Daniel, 2007). Von Chen *et al.* (2007) wurde der Glucose-Transporter 2 (GLUT 2) als Mechanismus zur Aufnahme von Quercetin-3-glucosid in Caco-2 Zellen identifiziert. Eine Beteiligung von MCT, natriumabhängigem MCT sowie ein durch Anionenaustausch vermittelter Transport bei der Aufnahme von Flavonoiden in Endothelzellen kann ausgeschlossen werden (Kobayashi und Konishi, 2008).

Verbindungen wie z.B. Flavonoidarabinoside, -xyloside und -rutinoside, die in Magen und Dünndarm nicht hydrolysiert und resorbiert werden oder über den enterohepatischen Kreislauf resezerbierte Polyphenole gelangen in den Dickdarm (Olthof *et al.*, 2003; Manach *et al.*, 2004). Dort unterliegen sie einem extensiven Abbau durch die Enzyme der Mikroflora. Die enzymatische Aktivität der Colon-Mikroflora katalysiert eine Vielzahl von Reaktionen wie die Hydrolyse von Glycosiden, Glucuroniden und Estern, Dehydroxylierungen, Demethylierungen, Decarboxylierungen sowie Ringspaltungen (Selma *et al.*, 2009). Aglycone werden nach ihrer hydrolytischen Freisetzung rasch weiter zu niedermolekularen aromatischen Verbindungen abgebaut, wodurch sich ihre Absorptionsrate stark reduziert (Crozier *et al.*, 2009). Die Art der gebildeten Metabolite wird von der Molekülstruktur bestimmt. Flavonole werden bevorzugt zu Phenyllessigsäuren und Phenylpropionsäuren abgebaut, die Spaltung von Flavan-3-olen und Proanthocyanidinen führt u. a. zu Phenylvalerolactonen und Phenylpropionsäure. Aus Anthocyanen werden Hydroxybenzoesäure-Derivate gebildet. Phenylpropionsäuren und Hydroxybenzoesäuren bzw. Pyrogallol, Catechol und Methylcatechol entstehen beim mikrobiellen Abbau von Hydroxyzimtsäuren bzw. Hydroxybenzoesäuren (Selma *et al.*, 2009). Diese mikrobiellen Metabolite der Polyphenole werden im Dickdarm durch MCT-vermittelten Transport absorbiert und können hohe Plasmakonzentrationen erreichen (Watanabe *et al.*, 2006; Crozier *et al.*, 2009; Selma *et al.*, 2009).

2.3.2.2 Metabolismus nach Absorption

Nach Absorption in die Enterozyten bzw. nach Absorption und Transport in Leber und Nieren unterliegen die aufgenommenen Verbindungen einer intensiven Biotransformation. Durch Reaktion von Sulfotransferasen (SULT), Uridin-5'-diphosphat Glucuronosyltransferasen (UGT) und Catechol-O-methyl-Transferase (COMT) werden v. a. sulfatierte, mit Glucuronsäure konjugierte sowie methylierte Derivate gebildet

(Manach *et al.*, 2004; Crozier *et al.*, 2009). Zu Sulfatierung kommt es bevorzugt in der Leber (Falany, 1997). Glucuronidierung tritt zuerst im Darmepithel und später in der Leber auf (Spencer *et al.*, 1999; Crespy *et al.*, 2001). Nach Tilgmann und Ulmanen (1996) liegt die höchste COMT-Aktivität in Leber und Niere vor. Die Metabolite werden über die Blutbahn in Zielgewebe- und Organe transportiert (Crozier *et al.*, 2009). Zudem wird ein Teil der gebildeten Konjugate durch aktive Effluxtransporter wie Multi-drug Resistance Protein (MRP) aus den Enterozyten zurück in das Darmlumen sekretiert (Walgren *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2006; Brand *et al.*, 2008).

2.3.2.3 Exkretion

Die Ausscheidung von Polyphenolen erfolgt über zwei Wege. Sulfatierte und methylierte Metabolite werden im Urin eliminiert, wobei die Gesamtmenge der ausgeschiedenen Substanzen mit der maximalen Plasmakonzentration in Zusammenhang steht (Manach *et al.*, 2004). Dagegen werden große, mehrfach konjugierte Verbindungen bevorzugt über die Galle ausgeschieden. Aufgrund von β -Glucuronidase-Aktivität der Dickdarmmikroflora daraus freigesetzte Aglycone werden teilweise reabsorbiert (enterohepatischer Kreislauf) (Manach *et al.*, 2004; Crozier *et al.*, 2009).

2.3.3 Metabolismus und Absorption der Anthocyane

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu den anderen Flavonoiden wurden bei Anthocyanen Besonderheiten bei der Metabolisierung und Absorption festgestellt. Die für Anthocyane charakteristischen Prozesse werden in diesem Kapitel detaillierter vorgestellt. Ausgehend vom gegenwärtigen Wissensstand zeigt Abb. 2-10 einen schematischen Überblick über Absorption, Metabolismus und Ausscheidung von Anthocyanen.

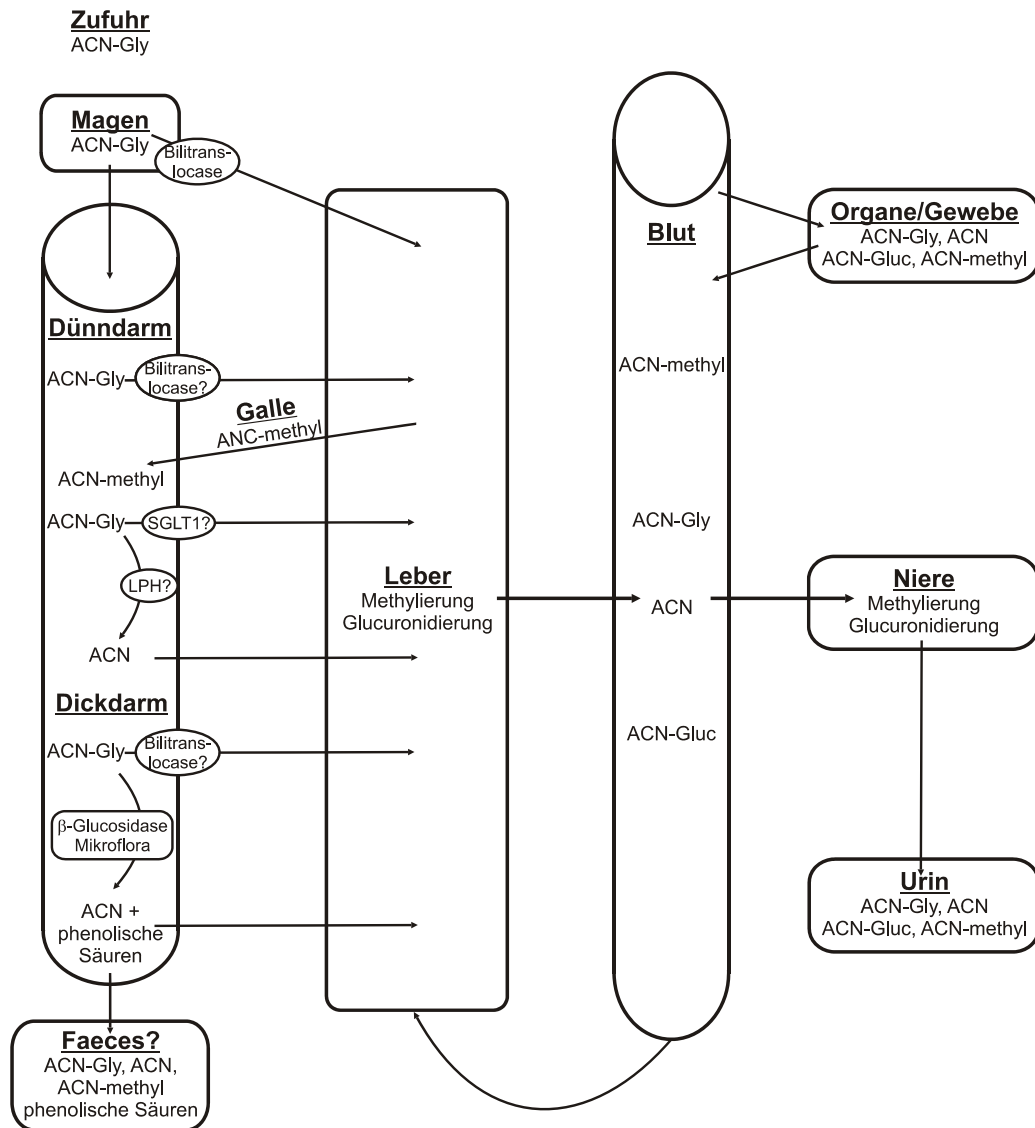


Abb. 2-10: Schematische Darstellung der Absorption, des Metabolismus und der Exkretion von Anthocyanen. ACN-Gly: Anthocyan-glycosid, ACN: Anthocyanidin, ACN-methyl: methylierter Metabolit, ACN-Gluc: glucuronidierter Metabolit; SGLT1: Natrium-abhängiger Glucose-transporter 1, LPH: Lactase Phlorizin Hydrolase (modifiziert nach McGhie und Walton, 2007; Passamonti *et al.*, 2009).

2.3.3.1 Gastrointestinaler Metabolismus

Wie bereits in den Abschnitten 2.2.2 und 2.2.4 dargestellt, liegen Anthocyane in Abhängigkeit vom pH-Wert in unterschiedlichen Gleichgewichtsformen vor, die durch variierende Stabilität gekennzeichnet sind. Da auf dem Weg durch den GIT Abschnitte mit unterschiedlichen pH-Wert-Bedingungen passiert werden, unterliegen Anthocyane im Vergleich zu anderen Polyphenolen einer verstärkten Modifizierung.

Unter den sauren Bedingungen des Magens dominiert das Flavylumkation (vgl. 2.2.2 sowie Abb. 2-7), das die stabilste Gleichgewichtsform der Anthocyane darstellt (Brouillard und Delaporte, 1977; Mazza und Brouillard, 1987; Seeram *et al.*, 2001). Der chemische Abbau der Pigmente im Magen ist somit begrenzt, was in verschiedenen *in*

in vitro Studien unter Verwendung von simuliertem Magensaft bestätigt wurde (McDougall *et al.*, 2005a; McDougall *et al.*, 2005b; Bermudez-Soto *et al.*, 2007; McDougall *et al.*, 2007). Aufgrund der bakteriziden Wirkung der Magensäure ist die bakterielle Besiedlung des Magens gering (10^1 - 10^5 KBE/mL) (Autenrieth, 2003). Mikrobielle Abbauprozesse sind somit ebenfalls zu vernachlässigen. In einer Studie mit Ratten wurde von He *et al.* (2009) nachgewiesen, dass Anthocyane im Magen weitgehend stabil sind.

Die pH-Werte in Dünn- und Dickdarm variieren zwischen 5,5 und 7,4 (Fallingborg, 1999). Anthocyane liegen in diesem pH-Bereich überwiegend als Carbinol-Pseudobase und zu geringeren Anteilen als Anhydrobase und Chromenol vor (vgl. 2.2.2, Abb. 2-7 und Abb. 2-8) und sind somit chemisch instabil (vgl. 2.2.4) (Brouillard und Delaporte, 1977; Mazza und Brouillard, 1987; Seeram *et al.*, 2001). Ein rascher Abbau von Anthocyanen in simuliertem Duodenalsaft sowie sterilisiertem Darminhalt wurde nachgewiesen (Keppler und Humpf, 2005; McDougall *et al.*, 2005a; McDougall *et al.*, 2005b; Bermudez-Soto *et al.*, 2007; McDougall *et al.*, 2007). Die Abbaurate wurde dabei von der Struktur der Verbindungen beeinflusst (McDougall *et al.*, 2007).

Neben der anthocyan-spezifischen chemischen Spaltung unterliegen die Pigmente im Dünn- und v. a. im Dickdarm der für Polyphenolglycoside typischen Enzymkatalysierten Metabolisierung durch LPH und Enzyme der Mikroflora (Crozier *et al.*, 2009). Es wurde z.B. gezeigt, dass Darmbakterien der Gattungen *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* β -Glucosidase-Aktivität aufweisen und zum bakteriellen Abbau von Delphinidin-3-glucosid und Malvidin-3-glucosid beitragen (Avila *et al.*, 2009).

In verschiedenen *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* Studien sowie Tiermodellen wurde die Metabolisierung von Anthocyanen im Dünn- und Dickdarm untersucht. In allen Studien wurde der Abbau der Pigmente festgestellt, wobei Aglyconstruktur und Zuckerrest die Geschwindigkeit der Degradation beeinflussten:

Kraus (2006) nutzte Ileostomieflüssigkeit zur *ex vivo* Untersuchung des Abbaus von Anthocyanmonoglycosiden im menschlichen Dünndarm. Nach 4 h, einer Zeitspanne, die etwa der Dünndarm-Transitzeit entspricht, wurden strukturabhängig zwischen 2 % und 60 % der Anthocyane wiedergefunden. Die Stabilität der untersuchten Verbindungen nahm in der Reihenfolge Anthocyanarabinosid > -galactosid > glucosid ab. Zudem erwiesen sich methoxylierte Anthocyane stabiler als hydroxylierte Verbindungen. In einer *in vivo* Studie mit Ileostomieprobanden wurden nach Verzehr von Heidelbeeren noch höhere Anthocyan-Wiederfindungen in der Ileostomieflüssigkeit von 28 % bis 85 % (Beeinflussung durch Zuckerrest) ermittelt (Kahle *et al.*, 2006). Die hohe

verzehrte Dosis von 300 g Heidelbeeren muss bei der Bewertung der Wiederfindungsraten jedoch berücksichtigt werden.

Keppler und Humpf (2005) zeigten in einem *in vitro* Modell mit Schweinecaecuminhalt, dass die untersuchten mono- und diglycosylierten Anthocyane in Abhängigkeit vom Zuckerrest innerhalb von 20 min bis 2 h abgebaut wurden. Eine rasche Deglycosylierung durch die Enzyme der intestinalen Mikroflora wurde beobachtet, gefolgt vom spontanen Zerfall der freigesetzten instabilen Anthocyanidine. Als Abbauprodukte wurden Phloroglucinolaldehyd sowie phenolische Säuren mit dem charakteristischen Substitutionsmuster des B-Rings identifiziert. Vergleichbare Ergebnisse lieferte die Inkubation von Anthocyanoglucosiden aus Rotwein in Dickdarminhalt von frisch geschlachteten Schweinen. Nach 6 h waren die Pigmente nicht mehr vorhanden und stattdessen die bereits genannten phenolischen Metabolite detektierbar (Forester und Waterhouse, 2008). Auch in humaner Faecessuspension wurden Anthocyanmono- und diglucoside sowie acylierte Anthocyane durch hydrolytische Spaltung und Zerfall der Aglycone zu phenolischen Säuren abgebaut (Aura *et al.*, 2005; Fleschhut *et al.*, 2006). He *et al.* (2005) stellte in Untersuchungen zur Stabilität von Anthocyanen in Caecuminhalt und Faeces von Ratten fest, dass Glucoside rasch, Galactoside moderat und Arabinoside sowie Xyloside kaum abgebaut wurden.

Im Tiermodell mit Ratten konnten Borges *et al.* (2007) nachweisen, dass es nach der Passage der Anthocyane (Cyanidin-3-glucosid-rutinosid, Cyanidin-3-sophorosid, Cyanidin-3-glucosid) vom Magen in den unteren GIT zu einer raschen Verringerung der Wiederfindungsrate kam. So waren 4 h und 6 h nach Aufnahme nur noch 11 % bzw. 2 % der aufgenommenen Anthocyane detektierbar. Im Darminhalt von Schweinen wurden 4 h nach Zufuhr in Abhängigkeit von Zuckerrest und Aglyconstruktur 78 % Cyanidin-3-sambubiosid, 50 - 44 % Cyanidin-3-sambubiosid-5-rhamnosid, Cyanidin-3-rutinosid und Pelargonidin-3-rutinosid, aber nur 3 % Cyanidin-3-glucosid wiedergefunden (Wu *et al.*, 2006).

2.3.3.2 Absorption und Transport

Im Gegensatz zu anderen Flavonoiden werden Anthocyane im GIT überwiegend als intakte Glycoside rasch resorbiert und eliminiert. Die im Plasma bestimmten Anthocyankonzentrationen sind jedoch sehr gering (vgl. 2.3.1) (Miyazawa *et al.*, 1999; Manach *et al.*, 2005). Der Magen sowie das Jejunum stellen die bevorzugten Absorptionorte für Anthocyane dar (Passamonti *et al.*, 2003; Talavera *et al.*, 2003; Talavera *et al.*, 2004; Walton *et al.*, 2006). Aglyconstruktur, Zuckerrest und Acylierung beeinflussen die Aufnahme (Prior und Wu, 2006). Anschließend erfolgt ein Transport in die Blutbahn und eine Ausscheidung über den Urin. Über zugrundeliegende Ab-

sorptionsmechanismen und Transportsysteme ist bisher wenig bekannt (McGhie und Walton, 2007):

Da es sich bei Anthocyanen um glycosylierte, wasserlösliche Moleküle mit Molekulargewichten über 400 Da handelt, ist eine Aufnahme durch passive Diffusion unwahrscheinlich. Stattdessen muss ein aktiver Transport in die Zelle erfolgen (Passamonti *et al.*, 2009).

Die Beteiligung von Bilitranslocase an der Aufnahme von Anthocyanen wird vermutet (Passamonti *et al.*, 2003; Karawajczyk *et al.*, 2007; Passamonti *et al.*, 2009). Dabei handelt es sich um einen Transporter für organische Anionen (z.B. Bilirubin, Nicotinsäure), der in Plasmamembranen lokalisiert ist. Bilitranslocase wurde zuerst aus Leberzellen isoliert. Mittlerweile wurde der Transporter auch auf der luminalen Oberfläche des intestinalen Epithels (Magenepithelzellen, Jejunum-Enterozyten, Caco-2 Zellen), in proximalen Tubular-Zellen der Niere sowie in vaskulären Endothelzellen identifiziert (Passamonti *et al.*, 2009; Maestro *et al.*, 2010). Bilitranslocase wird von verschiedenen Anthocyanen im unteren μM -Konzentrations-Bereich kompetitiv inhibiert. Methylierte Anthocyane weisen die höchste Affinität auf, mono- und diglycosylierte Anthocyane stellen bessere Liganden als ihre Aglycone dar (Passamonti *et al.*, 2002). Vorkommen und Anthocyan-Affinität des Transporters deuten darauf hin, dass es sich bei Bilitranslocase um einen spezifischen Carrier für Anthocyane handelt (Passamonti *et al.*, 2009).

Für Quercetin-glucoside wurde eine SGLT1 vermittelte Aufnahme in Caco-2 Zellen beschrieben (Walgren *et al.*, 2000). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Flavonolen wird deshalb als weiterer Mechanismus zur intestinalen Anthocyan-Absorption eine Beteiligung von Transportern des Hexose-Stoffwechsels diskutiert (Milbury *et al.*, 2002). Faria *et al.* (2009) untersuchten in Caco-2 Zellen die Expression von Glucose-Transportern in Gegenwart von Anthocyanen. Ein Effekt auf den fakultativen GLUT2 wurde festgestellt. Dagegen wurde die Expression von SGLT 1 von den Pigmenten nicht beeinflusst. Auch eine Tiermodell-Studie von Felgines *et al.* (2008) zeigte, dass die Aufnahme von Cyanidin-3-glucosid nicht von Glucose beeinflusst wird.

In mehreren Untersuchungen hat man gezeigt, dass Anthocyane über die apikale Seite effektiv in Caco-2 Zellen aufgenommen werden, jedoch waren die Pigmente dabei gar nicht oder nur in sehr geringen Mengen (< 4 %) auf der serosalen Seite detektierbar (Yi *et al.*, 2006; Steinert *et al.*, 2008; Faria *et al.*, 2009). Als Ursache hierfür wird vermutet, dass Anthocyane aufgrund fehlender Transportmechanismen die basolaterale Membran nur in geringerem Umfang passieren. Zudem zeigen

Anthocyane Affinität zu Effluxtransportern wie Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) und Multidrug Resistance Protein (MDR1) (Dreiseitel *et al.*, 2009). Infolgedessen ist auch ein Rücktransport ins Lumen nicht auszuschließen, der mit der Translokation über die basolaterale Membran in Konkurrenz steht. Vergleichbare Effekte wurden für andere Polyphenole aufgezeigt (Tian *et al.*, 2006; Brand *et al.*, 2008).

2.3.3.3 Metabolisierung

Auch Anthocyane unterliegen nach Aufnahme der in Abschnitt 2.3.2.2 bereits allgemein für Polyphenole beschriebenen Metabolisierung. Anthocyane wurden in Blut und Urin als glucuronidierte und/oder methylierte Metabolite, aber auch in ihrer ursprünglichen Form nachgewiesen (Felgines *et al.*, 2003; Talavera *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005; Ichiyangi *et al.*, 2008). Sulfatierte Konjugate entstehen nur zu einem geringen Anteil (Felgines *et al.*, 2003; Hassimotto *et al.*, 2008). Art und Umfang der Metabolisierung werden von Aglyconstruktur, Zuckerrest und zugeführter Dosis bestimmt (Wu *et al.*, 2005). So wurden Anthocyan-rutinoside und -sambubioside im Urin von Schweinen weitgehend unmetabolisiert (Wu *et al.*, 2005) ausgeschieden. Methylierungsreaktionen finden hauptsächlich in der Leber durch COMT statt. Bisher wurden v. a. 3'-O- aber auch 4'-O-methylester von Cyanidinen und 4'-O-methylester von Delphinidin-Derivaten nachgewiesen (Ichiyangi *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004b). Da für die COMT-Reaktion eine Catecholstruktur erforderlich ist, scheint eine derartige Metabolisierung von Pelargonidin-, Peonidin- und Malvidin-Derivaten unwahrscheinlich (Prior und Wu, 2006).

Der Mechanismus der Glucuronidierung ist bisher unklar. Zwei mögliche Wege werden diskutiert (Wu *et al.*, 2005):

- (i) die direkte Umsetzung der Anthocyanoglucoside zu Glucuronsäuren durch das Enzym UDP-Glucose Dehydrogenase,
- (ii) die Glucuronidierung der Aglycons nach vorheriger Hydrolyse.

2.3.4 Bioverfügbarkeit von Anthocyanen

Wie der in Tabelle 2-5 gezeigte Überblick von Daten aus Human-Studien belegt, sind Anthocyane durch eine schlechte Bioverfügbarkeit charakterisiert. Die Ursachen hierfür sind bisher unbekannt.

Tabelle 2-5: Zusammenfassung von Daten aus Studien zur humanen Bioverfügbarkeit von Anthocyanen. c_{max} : maximale Plasmakonzentration, t_{max} : Zeit zum Erreichen von c_{max} , relative urinäre Ausscheidung als prozentualer Anteil der zugeführten Anthocyanosis (modifiziert nach McGhie und Walton, 2007).

Material	Anthocyan- dosis (mg)	t_{max} (h)	c_{max}	relative urinäre Ausscheidung (%)
schwarze Johannisbeere	236	1,3-1,8	120 nmol/L	0,11
schwarze Johannisbeere	1240	0,75	53 µg/L	0,07
Rotwein	68	0,8	1,4 nmol/L	0,02
Rotwein	180	1,5	43 µg/L	0,23
alkoholfr. Rotwein	56	1,5	1,7 nmol/L	0,02
roter Traubensaft	117	2,0	2,8 nmol/L	0,02
roter Traubensaft	284	0,5	100 µg/L	0,18
Holunderbeere	720	1,2	97 nmol/L	0,06
Aronia	721	2,8	96 nmol/L	0,15

Da die Pigmente in Abhängigkeit vom pH-Wert in verschiedenen Gleichgewichtsformen vorliegen, beim physiologischen pH-Wert von 7,4 instabil sind und eine Bindung an Plasmaproteine aufweisen, kann zum einen nicht ausgeschlossen werden, dass die Bioverfügbarkeit unterbewertet wird, da wichtige Metabolite nicht erfasst wurden oder Abbaureaktionen während der Bestimmung von Plasma- und Urinkonzentrationen auftraten (Manach *et al.*, 2005). Zum anderen unterliegen die Anthocyane einem intensiven chemischen und mikrobiellen Abbau im Dün- und Dickdarm, der die Aufnahme beeinflusst (vgl. 2.3.3.1). Untersuchungen zur Absorption sowie zur urinären und faecalen Ausscheidung dabei gebildeter Metabolite fehlen weitgehend (Kay, 2006).

Ein geringer apikaler Transport im intestinalen Epithel könnte ein weiterer Faktor sein, der die systemische Verfügbarkeit begrenzt (Steinert *et al.*, 2008; Passamonti *et al.*, 2009). Da im Gegensatz die lokale Verfügbarkeit von Anthocyanen in Enterocyten deutlich besser ist, erscheinen *in situ* Effekte der Pigmente in Geweben des GIT als wahrscheinlicherer Wirkmechanismus (Steinert *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009).

2.4 Biologische Effekte von Anthocyanen

In den letzten Jahren haben zahlreiche Studien gezeigt, dass Anthocyane umfangreiche biologische Aktivitäten aufweisen wie antioxidative, antiinflammatorische, antimikrobielle, antikanzerogene und neuroprotektive Wirkungen sowie die Induktion von Apoptose, die Verbesserung der Sicht und die Vorbeugung von Adipositas bewirken. Zudem zeigen Anthocyane eine Vielzahl von Effekten auf Zellen, Blutgefäße und Blutplättchen, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Reduzierung von koronaren Herzerkrankungen stehen (Mazza und Kay, 2008).

Bei der Bewertung dieser Daten muss jedoch berücksichtigt werden, dass viele aus *in vitro*- oder Tiermodell-Studien stammen, deren Übertragung auf die *in vivo* Situation nicht ohne weiteres möglich ist. So wurden oft wesentlich höhere Dosen verwendet als tatsächlich über die menschliche Ernährung zugeführt werden. Weiterhin muss die Instabilität der Anthocyane unter physiologischen Bedingungen in Betracht gezogen werden. Effekte, die nach längerer Inkubationszeit der Verbindungen erhalten wurden, könnten auch aus der Wirkung von Abbauprodukten resultieren (Prior und Wu, 2006; Mazza und Kay, 2008; Crozier *et al.*, 2009).

Im Folgenden werden Untersuchungen zu biologischen Effekten von Anthocyanen vorgestellt, auf die das Potential der Pigmente in der Prävention und Therapie von intestinalen Erkrankungen zurückgeführt wird.

2.4.1.1 Antioxidative Aktivität

Oxidative Veränderungen von zellulären Molekülen wie DNA, Proteinen, Membranlipiden durch reaktive Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) führen zu eingeschränkter Zellfunktion und schließlich zum Tod der Zelle. Diese Schädigung wird als „oxidativer Stress“ bezeichnet. Sie stellt einen der Hauptmechanismen dar, der degenerative Alterungsprozesse des Organismus und damit verbundene Erkrankungen wie Krebs, Herz-Kreislauferkrankungen, Katarakt oder kognitive Dysfunktion hervorruft und scheint auch an der Entstehung von Entzündungen beteiligt zu sein (Sies, 1986; Reiter *et al.*, 2002; Mazza und Kay, 2008).

Im menschlichen Organismus entstehen ROS und RNS während der normalen Zellaktivität aus einem Teil des lebenswichtigen Sauerstoffs. Ausgangspunkt für die Entstehung bildet überwiegend die Ein-Elektronenreduktion von molekularem Sauerstoff zum Superoxidradikalanion ($\cdot\text{O}_2^-$) z.B. während der Zellatmung in den Mitochondrien

oder als Nebenweg von Enzymreaktionen wie Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS). Zudem kann eine Induktion durch exogene Faktoren wie UV-Licht, Röntgen- und Gammastrahlen, Zigarettenrauch, Luftverschmutzung, Arznei- und Nahrungsmittel erfolgen. Abb. 2-11 zeigt schematisch den Mechanismus der Bildung radikalischer und nichtradikalischer ROS und RNS. Durch Weiterreaktion mit organischen Molekülen R werden Peroxylradikale ($\text{ROO}\cdot$), Alkoxyradikale ($\text{RO}\cdot$) und organische Peroxide (ROOH) gebildet. Das Hydroxylradikal ($\text{HO}\cdot$), aber auch Peroxynitrit (O_2NO^-) und Alkoxyradikale ($\text{RO}\cdot$) stellen besonders reaktive Intermediate dar (Pietta, 2000; Reiter *et al.*, 2002; Löffler *et al.*, 2007).

Parallel zu ihrer destruktiven Wirkung steuern ROS/RNS und die Reaktionen freier Radikale in Zellen jedoch auch eine Vielzahl von wichtigen chemischen Reaktionen wie die Funktion von Makrophagen und Neutrophilen sowie die Bildung von Eicosanoiden (Sies, 1986).

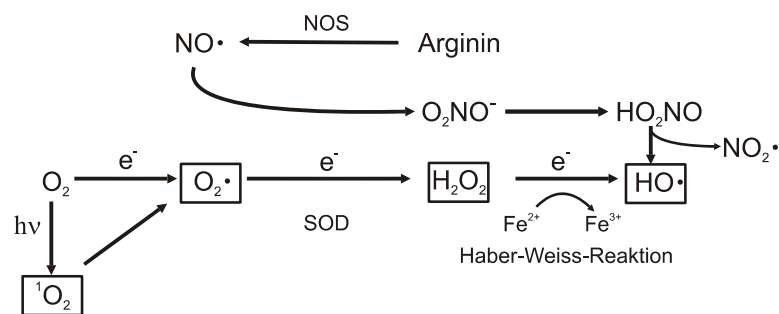


Abb. 2-11: Entstehung von ROS und RNS. Superoxidradikalanion ($\cdot\text{O}_2^-$), Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Hydroxylradikal ($\text{HO}\cdot$), Peroxylradikal ($\text{ROO}\cdot$) oder Stickstoffmonoxidradikal ($\text{NO}\cdot$), Stickstoffdioxidradikal ($\text{NO}_2\cdot$), Peroxynitrit (O_2NO^-), NOS: Stickstoffmonoxid-Synthase, SOD: Superoxiddismutase (nach Sies, 1986; Reiter *et al.*, 2002).

In vivo existieren zahlreiche Mechanismen, um die Zerstörung durch ROS/RNS zu begrenzen. Zum einen werden Radikale durch verschiedene Enzymreaktionen inaktiviert. Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Reaktion von zwei Superoxidradikalanionen ($\cdot\text{O}_2^-$) zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Wasserstoffperoxid wird anschließend durch Katalase oder Glutathionperoxidase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut. Glutathionperoxidase ist ebenfalls am Abbau von organischen Peroxiden (ROOH) beteiligt.

Zum anderen werden die Sauerstoffradikale nichtenzymatisch durch verschiedene endogene oder über die Nahrung zugeführte Antioxidantien abgefangen, wobei v. a. Plasmaproteinithiole und Ureat sowie Vitamin C und Vitamin E von Bedeutung sind.

Bei entstandenen oxidativen Schäden existieren in der Zelle außerdem verschiedene Mechanismen zur Reparatur von geschädigter DNA bzw. zur Neubildung von Proteinen und Fetten (Pietta, 2000; Löffler *et al.*, 2007).

Anthocyane gehören zu den potenten Antioxidantien, die mit der Nahrung zugeführt werden. Mazza *et al.* (2002) und Cao *et al.* (1998) stellten in Untersuchungen mit humanen Probanden mittels Ferric Reducing Activity of Plasma- (FRAP), Oxygen Radical Absorption Capacity- (ORAC) und Trolox Equivalent Antioxidant Capacity- (TEAC) Assay eine Erhöhung in der antioxidativen Kapazität von Serum und Urin nach Verzehr von Heidelbeeren, Rotwein oder Blaubeer-Extrakt fest. Die Supplementierung von Aroniasaft bei Sportlern unter Trainingsbedingungen führte zu einer Absenkung des mittels „Thiobarbituric Acid Reagent Substances“ (TBARS) bestimmten Redoxstatus des Blutes. Als Ursache hierfür wird eine Steigerung des endogenen antioxidativen Systems vermutet (Pilaczynska-Szczesniak *et al.*, 2005). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Probanden nach Aufnahme eines anthocyanhaltigen- und polyphenolreichen Safts aus verschiedenen Beeren im Vergleich zur Kontrolle eine reduzierte oxidative DNA-Schädigung sowie eine Zunahme an reduziertem Glutathion aufwiesen (Weisel *et al.*, 2006).

Auch die Daten aus verschiedenen *in vivo* und *ex vitro* Studien bestätigen die antioxidative Aktivität der Pigmente. Die Verhinderung der Oxidation von Low Density Lipoprotein (LDL) und Liposomen durch Beeren-Extrakte und Traubensäfte wurde gezeigt (Frankel *et al.*, 1998; Heinonen *et al.*, 1998). Ramirez-Tortosa *et al.* (2001) wiesen nach, dass ein anthocyanhaltiger Extrakt DNA-Schäden, hervorgerufen durch Vitamin E-Mangel infolge von oxidativem Stress, verringert. Narayan *et al.* (1999) stellten fest, dass Anthocyane, die aus einer Kultur von Karottenzellen extrahiert wurden, dosisabhängig die enzymatische und nichtenzymatische Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren inhibierten. Anthocyane aus Brombeeren verhinderten durch Peroxylradikale induzierte oxidative Schädigung und daraus resultierende Cytotoxizität in Caco-2 Zellen (Elisia und Kitts, 2008).

Die antioxidative Aktivität der Anthocyane *in vitro* resultiert aus ihrer Struktur, wobei insbesondere die *ortho*-Dihydroxyl-Struktur am B-Ring Bedeutung hat. Anthocyane sind in der Lage, Wasserstoffatome aus den Hydroxylgruppen auf radikalische ROS/RNS abzugeben und diese somit abzufangen. Das gebildete Anthocyan-Alkoxyradikal ist durch Delokalisation der Elektronen im phenolischen System stabilisiert und somit im Vergleich zu den freien Radikalen weniger reaktiv. Durch Reaktion mit einem weiteren Radikal kann es in die stabile Chinonstruktur übergehen (RiceEvans *et al.*, 1996; Pietta, 2000). Zudem komplexieren Anthocyane an oxidativen Prozessen beteiligte Metallionen und beeinflussen beteiligte Proteine und Enzyme durch Bindung in ihrer Funktion (Narayan *et al.*, 1999; Kong *et al.*, 2003; Mazza und Kay, 2008; Knaup *et al.*, 2009). Die antioxidative Aktivität wird durch Glycosylierung in

Position 3 am C-Ring und Glucuronidierung reduziert, da so die Delokalisation verringert wird (Tsuda *et al.*, 1994; RiceEvans *et al.*, 1996; Mazza und Kay, 2008).

2.4.1.2 Anti-inflammatorische Aktivität

Bei Entzündungen handelt es sich um allgemeine Prozesse des Körpers, die als Reaktion auf Verletzungen ausgelöst werden. Kennzeichen sind Schwellung, Rötung, Schmerz und Fieber (*tumor, rubor, dolor, calor*). Entzündungen stellen essentielle Bestandteile von Heilungsprozessen dar und werden über eine Vielzahl komplexer Signalwege unter Beteiligung von Cytokinen wie Interleukin, Tumornekrose Faktor (TNF), Interferon, dem Transkriptionsfaktor Nuklear-Faktor- κ -B (NF- κ B) sowie verschiedenen Enzymen (COX, LOX) und Eicosanoiden (Leukotriene, Prostaglandine) gesteuert. Mit negativen Konsequenzen für den Körper verbunden sind anhaltende Entzündungsprozesse wie sie z.B. bei Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Asthma auftreten (Kim *et al.*, 2004; Hotamisligil, 2006; Löffler *et al.*, 2007; Crozier *et al.*, 2009).

Verschiedene Studien beschreiben die antiinflammatorische Wirkung von Anthocyanen. Osman *et al.* (2008) und Piberger (2009) zeigten in Untersuchungen am Mausmodell eine signifikante Verbesserung der experimentellen Colitis bei Gabe von Heidelbeerextrakt. Bei Carrageen-induzierter Lungenentzündung bei Ratten wurde eine dosisabhängige Verbesserung bestimmter Entzündungsparameter durch in Brombeerextrakt enthaltene Anthocyane festgestellt (Rossi *et al.*, 2003).

In vitro konnte nachgewiesen werden, dass Cyanidin und v. a. Delphinidin die Expression des Enzyms COX-2 in murinen Macrophagen durch Blockierung der „Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase“ Kaskade und der dazugehörigen Aktivierung von NF- κ B und activator Protein-1 (AP-1) inhibieren. Da Pelargonidin, Peonidin und Malvidin keinen Effekt aufwiesen, scheint die Wirkung von der *ortho*-Dihydroxylstruktur am B-Ring abzuhängen (Hou *et al.*, 2005). Auch eine Inhibierung der humanen 5-LOX durch Anthocyane wurde beschrieben. Hier stellen ebenfalls Delphinidinglycoside die wirkungsvollsten Hemmstoffe dar (Knaup *et al.*, 2009). In einer weiteren Studie von Dreiseitel *et al.* (2008) wurde festgestellt, dass Anthocyanidine und ihre Glycoside wirksame Inhibitoren der Proteasom-Aktivität sind. Infolge deren Hemmung kommt es via NF- κ B-Inaktivierung zu einer Absenkung der Cytokin-Produktion. Somit stellt dieser Effekt einen weiteren Mechanismus dar, der für die antiinflammatorische Wirkung von Anthocyanen verantwortlich sein könnte.

2.4.1.3 Antikanzerogene Aktivität

Der menschliche Organismus besteht aus etwa 10^{13} Zellen, die in Organen und Geweben Funktionseinheiten bilden. Die Zellen einiger Gewebe (Epidermis, Darmepithel, Knochenmark) werden ständig abgebaut und neu gebildet, andere wie z.B. Nervenzellen bleiben bis zum Tod des Menschen bestehen. Treten Störungen im Fließgleichgewicht zwischen programmiertem Zelltod durch Apoptose und Zellproliferation auf, besteht die Gefahr der Tumorentstehung. Auslöser hierfür ist i. A. eine Veränderung von spezifischen DNA-Abschnitten (Proto-Onkogene, Anti-Onkogene), die an der Regulation des Zellwachstums beteiligt sind. Die durch Mutation aktivierten Onkogene codieren Proteine wie Wachstumsfaktoren, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren und sind somit in der Lage, unkontrollierte Zellproliferation auszulösen (Löffler *et al.*, 2007).

Ergebnisse aus verschiedenen Tiermodell-Studien zeigten ein antikanzerogenes Potential von Anthocyanen. So hat man festgestellt, dass gefriergetrocknete schwarze Himbeeren und insbesondere die darin enthaltenen Anthocyane die Entwicklung von N-Nitromethylbenzylamin-induzierten Speiseröhrentumoren in der Ratte unterdrückten (Wang *et al.*, 2009). Nach oraler Zufuhr von Anthocyanen aus schwarzem Reis wurde eine Inhibierung des Wachstums von Lungen-Karzinom-Zellen in Mäusen beobachtet (Chen *et al.*, 2005). Afaq *et al.* (2005) wiesen nach, dass anthocyan- und tanninhaltiger Extrakt aus Granatäpfeln die Entwicklung von Hautkrebs bei CD-1 Mäusen, der durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat hervorgerufen wurde, signifikant inhibierte. In mehreren Studien wurde eine Wirkung von Anthocyanen auf Darmkrebs festgestellt. In *Apc^{Min}* Mäusen war die Anzahl und Größe von cecalen Adenomen nach Aufnahme von gefriergetrockneten Kirschen, einem daraus isolierten Anthocyanextrakt sowie dem Aglycon Cyanidin reduziert (Kang *et al.*, 2003). Im selben Modell war die Anzahl von Adenomen im Dünndarm um 45 % bzw. 30 % reduziert, wenn die Tiere über 12 Wochen Cyanidin-3-glucosid bzw. einen Anthocyanextrakt aus Heidelbeeren erhielten (Cooke *et al.*, 2006). Anthocyane aus violetterem Mais und Kartoffeln sowie Rotkohl reduzierten signifikant die colorektale Karzinogenese in Ratten, die man mit 1,2-Dimethylhydrazin behandelt hatte (Hagiwara *et al.*, 2001; Hagiwara *et al.*, 2002).

Die diesen Effekten zugrundeliegenden chemopräventiven Eigenschaften der Anthocyane sind vielfältig und wurden meist *in vitro* untersucht. Sie beinhalten:

- (i) die Radikalfängereigenschaften der Pigmente,
- (ii) die Stimulierung von an der Entgiftung beteiligten Phase II-Enzymen,
- (iii) die Reduzierung von Zellproliferation, Entzündungen und Invasivität,
- (iv) die Induktion von Apoptose und Differenzierung der Tumorzellen.

Dabei modifizieren Anthocyane Expression und Aktivierung von mehreren Genen, die mit den genannten zellulären Funktionen verbunden sind. Beispielsweise werden Gene beeinflusst, die MAP Kinase-, den „extracellular signal-related kinases“ (ERK), den „C-Jun N-terminal kinases“ (JNK) oder den „phosphoinositide 3-kinase“ (PI3K) Signalweg regulieren (Wang und Stoner, 2008).

Dagegen lieferten epidemiologische Studien bisher keinen eindeutigen Beweis für die antikanzerogene Aktivität von Anthocyanen (Wang und Stoner, 2008). In zwei Fall-Kontroll-Studien mit Patienten mit Mund- und Rachen- sowie Prostatakrebs konnten keine Effekte nachgewiesen werden (Bosetti *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2007). In einer Pilotstudie mit Darmkrebspatienten hat man jedoch gezeigt, dass die täglich Aufnahme von 3 x 20 g getrockneten schwarzen Himbeeren über einen Zeitraum von 2 - 4 Wochen in den Tumoren, aber nicht im gesunden Gewebe die Proliferationsrate reduzierte und die Apoptose erhöhte (Wang *et al.*, 2007). Aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit der Pigmente (vgl. 2.3.4) scheint *in vivo* der antikanzerogene Effekte der Anthocyane auf den GIT und die Haut begrenzt, da hier eine lokale Wirkung möglich ist (Wang und Stoner, 2008).

2.4.1.4 Antimikrobielle Aktivität

Eine Funktion von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wie Anthocyanen stellt die chemische Abwehr von Pathogenen (Bakterien, Viren, Pilzen) dar (Escribano-Bailon *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang zeigten Padmavati *et al.* (1997), dass anthocyanhaltige Extrakte aus den Blättern und dem Perikarp von pigmentiertem Reis das Wachstum des Reispfades *Xanthomons oryzae* pv. *Oryzai* inhibierten. In Blättern der Baumwollpflanze wurde ein Anstieg der Anthocyankonzentration infolge Befall durch das pathogene Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *Malvecearum* (Smith) Dye festgestellt (Kangatharalingam *et al.*, 2002).

Auch außerhalb der Pflanze gelten Anthocyane als antimikrobiell wirksam. Traditionell werden Heidelbeeren und Cranberries in der Volksmedizin bei bakteriellen Erkrankungen wie Durchfall und Harnwegsinfekten eingesetzt (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005). Pratt *et al.* (1960) und Powers *et al.* (1960) untersuchten die antimikrobielle Wirkung von Anthocyanen aus Trauben und Erdbeeren, wobei Delphinidin-3-glucosid, Pelargonidin-3-glucosid und Malvidin-3,5-diglucosid als wirksamste Komponenten

identifiziert wurden. In Studien mit anthocyanreichen Fraktionen aus Cranberry-Saft wurde eine antibakterielle Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 nachgewiesen. Zhao *et al.* (2009) untersuchten *in vitro* die antimikrobielle Wirkung von Polyphenolextrakten aus violetterem Mais (*Zea mays* L.). Sie fanden eine Inhibierung des Wachstums von *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*, jedoch keinen Effekt bei *Escherichia coli*. Da der Extrakt mit der höchsten Anthocyankonzentration die beste Hemmwirkung aufwies, wurde der antimikrobielle Effekt auf die enthaltenen Anthocyane und dabei v. a. auf Cyanidin-Derivate zurückgeführt.

Im Gegensatz dazu zeigten Werlein *et al.* (2005), dass Konzentrate aus Holunder- und Schwarzen Johannisbeeren das Wachstum ausgewählter Mikroorganismen inhibierten, dieser Effekt bei Verwendung der isolierten Anthocyane jedoch nicht vorhanden war. Auch die Ergebnisse weiterer Studien mit Beerenextrakten deuten darauf hin, dass die nachgewiesenen antimikrobiellen Eigenschaften nur zu einem geringen Anteil auf einfache Polyphenole und stattdessen überwiegend auf die Wirkungen komplexer Proanthocyanidine, Tannine und Ellagitannine zurückzuführen sind (Puupponen-Pimia *et al.*, 2001; Leitao *et al.*, 2005; Puupponen-Pimia *et al.*, 2005; Heinonen, 2007).

Trotz der Hemmung verschiedener pathogener Bakterien wurde keine Aktivität von phenolischen Beerenextrakten gegenüber prebiotischen Laktobazillen gefunden (Puupponen-Pimia *et al.*, 2001; Puupponen-Pimia *et al.*, 2005). Molan *et al.* (2009) wiesen nach Zugabe von Blaubeerextrakt sogar eine signifikante Zunahme von *Lactobacillus rhamnosus* und *Bifidobacterium* in humanen Faeceskulturen sowie im Darminhalt von Ratten nach Fütterung des Extraktes nach, was auf eine prebiotische Wirkung anthocyanhaltiger Beerenextrakte hindeutet.

Als Grundlage der antimikrobiellen Wirkung von Polyphenolen wird vermutet, dass es nach Zellwand-Passage durch Reaktion mit intrazellulären Molekülen (Enzyme, DNA) zur Beeinflussung des bakteriellen Stoffwechsels kommt (Leitao *et al.*, 2005). Parallel wurde gezeigt, dass komplexere Polyphenole z.B. Proanthocyanidine mit der bakteriellen Anhaftung an die Oberfläche der Wirtszelle wechselwirken, indem es durch Bindungen der Polyphenole an Proteine zur Veränderung der Zellwandstruktur und -integrität kommt (Foo *et al.*, 2000; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005).

2.5 Heidelbeeren

2.5.1 Die Gattung Heidelbeeren (*Vaccinium*)

Die Gattung der Heidelbeeren (*Vaccinium*) gehört zur botanischen Familie der Heidekrautgewächse (*Ericaceae*) und wird weiter in die Subgenera *Vaccinium* und *Oxycoccus* L. sowie zahlreiche Sektionen unterteilt. Zur Gattung gehören etwa 450 Arten von Halbsträuchern und Sträuchern, deren Früchte weiche, dünnhäutige, meist saftige Beeren sind. Heidelbeeren sind über die gesamte Nord- und Südhalbkugel verbreitet (Hegi, 1957/58; Blaschek *et al.*, 2006). Bekannte Vertreter sind *V. myrtillus* L. (Heidelbeere), *V. corymbosum* L. (Kulturheidelbeere), *V. macrocarpon* Aiton (Cranberry) oder *V. vitis-idaea* L. (Preiselbeere).

2.5.2 Die Art Heidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.)

Im deutschen Sprachgebrauch wird die Bezeichnung Heidelbeere nicht nur für die Beeren sondern auch für Pflanzen und Früchte der Art *V. myrtillus* L. verwendet. Es handelt sich dabei um bis zu 50 cm hohe, stark verzweigte, buschige Halbsträucher mit spitz-ovalen Blättern, die als Unterwuchs in nicht zu schattigen Wäldern mit frischem, humusreichem, saurem Boden, auf Hochmooren oder in subalpinen Zwergstrauchheiden vorkommen. Als Früchte reifen von Juli bis September kugelige, bis 1 cm große, blauschwarze, saftige und vielsamige Beeren (Hegi, 1957/58). Die intensive blauschwarze Färbung der Heidelbeeren wird durch Anthocyane hervorgerufen, die in der Schale und im Fruchtfleisch enthalten sind (Riihinen *et al.*, 2008).

V. myrtillus L. ist in ganz Mittel- und Nordeuropa sowie Asien und Nordamerika verbreitet (Hegi, 1957/58). Die Beeren werden roh, gezuckert oder eingemacht verzehrt oder zur Herstellung von Konfitüren, Fruchtsäften und Beerenweinen verwendet (Franke, 1997). Zudem finden sie als Therapeutikum in der Volksmedizin Anwendung (Hegi, 1957/58).

Das Wildobst wird in Deutschland heute aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes bei der Ernte kaum noch gewerblich gesammelt, stattdessen werden die frischen Früchte aus Österreich und dem Balkan importiert (Franke, 1997).

Neben essentiellen Vitaminen und Mineralien sowie Ballaststoffen sind Heidelbeeren durch das reiche Vorkommen zahlreicher phenolischer Verbindungen charakterisiert. Mit Gehalten von 360-780 mg/100 g FW dominieren die Anthocyane (Kraus, 2006; Lätti *et al.*, 2008). Das typische Anthocyanprofil von *V. myrtillus* L. setzt sich aus 15 Hauptkomponenten zusammen, wobei es sich um die Aglycone

Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Peonidin und Malvidin, jeweils in Position 3 mit Galactose, Glucose bzw. Arabinose verknüpft, handelt (Baj *et al.*, 1983).

Als weitere phenolische Komponenten wurden Hydroxyzimtsäuren wie Chlorogensäure, Kaffeesäure, *p*-Cumarsäure und Ferulasäure (Brenneisen und Steinegger, 1981a), Flavonole in Form von verschiedenen Quercetin-, Myricetin- und Laricitrinyglycosiden (Koponen *et al.*, 2008), mono- und dimere Flavan-3-ole (Brenneisen und Steinegger, 1981a; Määttä-Riihinen *et al.*, 2005) sowie geringe Mengen an Hydroxybenzoesäuren wie Salicyl-, Protocatechu- und Syringasäure (Brenneisen und Steinegger, 1981a; Kähkönen *et al.*, 2001; Zadernowski *et al.*, 2005) identifiziert.

2.5.3 Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.) in der Volksmedizin und pharmazeutischen Anwendung

Heidelbeeren sind ein altbekanntes und beliebtes Mittel in der Volksheilkunde und wurden traditionell getrocknet oder in Form von Mus, Saft, Wein oder Spirituose innerlich bei leichterem Durchfall, Erbrechen, Blutungen, zur Behandlung von Hämorrhoiden und Bronchialkatarrh sowie in Form von Umschlägen bei Hautkrankheiten und schlecht heilenden Geschwüren angewendet (Hegi, 1957/58; Blaschek *et al.*, 2006).

Auch heute werden Heidelbeeren bzw. Zubereitungen aus Heidelbeeren zu therapeutischen Zwecken eingesetzt. Getrocknete Heidelbeeren finden als pharmazeutische Droge *Myrtilli fructus* Anwendung zur Unterstützung der Therapie unspezifischer akuter Durchfallerkrankungen. Hierbei werden 1 - 2 Teelöffel getrocknete Beeren mit etwas Flüssigkeit eingenommen oder dieselbe Menge als kalte oder heiße Auszüge (Tees) verabreicht. Äußerlich werden getrocknete Heidelbeeren zur lokalen Therapie leichter Entzündungen der Mund- und Rachenschleimhaut verwendet.

Die Gewinnung der Droge *Myrtilli fructus* erfolgt ausschließlich aus reifen Früchten der Art *Vaccinium myrtillus* L. Diese werden von Juli bis August aus Wildbeständen gesammelt und im Schatten oder unter künstlicher Wärmezufuhr luftgetrocknet. Es resultieren blauschwarze, etwa 3 - 6 mm große, stark geschrumpfte Beeren, die unregelmäßig kugelig und teilweise noch kurz gestielt sind sowie zahlreiche, ca. 1 mm große Samen enthalten. Hauptlieferländer sind ost- und südosteuropäische Länder wie Russland, Polen, Rumänien oder Bulgarien (Blaschek *et al.*, 2006).

Heidelbeeranthocyan (VMA) -Zubereitungen werden innerlich bei Brüchigkeit und veränderter Permeabilität der Blutkapillaren, zur Epithelregenerierung, bei Magen- und Darmgeschwüren sowie äußerlich zur Förderung der Vernarbung von Wunden ange-

wendet. Die Gewinnung von VMA-Zubereitungen erfolgt durch Extraktion von frischen oder gefrorenen Heidelbeeren. Hauptinhaltsstoff stellen Heidelbeeranthocyane dar (Blaschek *et al.*, 2006).

2.5.4 Die kaukasische Blaubeere (*Vaccinium arctostaphylos* L.)

Bei Heidelbeeren der Art *V. arctostaphylos* L. handelt es sich um bis zu 5 m hohe Sträucher mit gelbbraunen Zweigen, länglich-eiförmigen, fein gezähnten, sommergrünen Laubblättern und schwarzen Beerenfrüchten, die in der Türkei, Armenien und im Westkaukasus bis in eine Höhe von 2000 m verbreitet sind (Hegi, 1957/58).

Die sehr geschätzten Beeren werden für den Eigenverbrauch, aber auch für den gewerblichen Handel geerntet. Sie werden zu Säften und Marmeladen verarbeitet. Zudem finden sie traditionell Anwendung in der Volksmedizin als antidiabetisches und blutdrucksenkendes Mittel (Ayaz *et al.*, 2001; Lätti *et al.*, 2009).

V. arctostaphylos L.-Beeren sind mit einem durchschnittlichen Gehalt von 1420 mg/100g TM reich an Anthocyanen. Sie unterscheiden sich von anderen *Vaccinium*-Arten durch ein einzigartiges Anthocyanprofil, das durch hohe Anteile an Delphinidin- und Glucose-Konjugaten sowie Anthocyan-Sambubiosiden charakterisiert ist (Lätti *et al.*, 2009). In deutlich geringeren Mengen wurden zudem verschiedene Hydroxybenzoesäure- und Hydroxyzimtsäurederivate in den Beeren nachgewiesen. Kaffeesäure und p-Cumarsäure in freier und veresterter Form stellten dabei die Hauptvertreter dar (Ayaz *et al.*, 2005). Daten zu weiteren phenolischen Inhaltsstoffen sind derzeit nicht verfügbar. Ayaz *et al.* (2001) identifizierten China- und Citronensäure als die dominierenden nichtphenolischen Säuren sowie Glucose und Fructose bzw. Saccharide in *V. arctostaphylos*-Früchten.

Neben der regelmäßigen Zufuhr von Anthocyanen als Bestandteil pflanzlicher Lebensmittel oder isoliert in Form anthocyanhaltiger Extrakte wird das Wirkpotential der Pigmente vor allem von ihrer Verfügbarkeit bestimmt. So müssen Anthocyane z.B. Darm und Darmgewebe intakt erreichen, um *in vivo* Effekte bei der Prävention und Therapie von intestinalen Erkrankungen zu zeigen. Dies ist zum einen systemisch über die Blutbahn nach Absorption im oberen GIT möglich. Wie in Kapitel 2.3.4 dargestellt, sind die Pigmente jedoch durch eine schlechte Bioverfügbarkeit charakterisiert; lokale Effekte gelten als der wahrscheinlichere Wirkmechanismus. Infolge des intensiven chemischen und mikrobiellen Abbaus wird die Anthocyankonzentration während der Passage des GIT aber stark verringert. Eine Möglichkeit die Verfügbarkeit von Anthocyanen für direkte Effekte im Dickdarm zu erhöhen, stellt das Colon-Targeting

dar. Diese spezielle Verkapselungstechnik und Methoden zu ihrer Realisierung werden im nachfolgenden Abschnitt ausführlich vorgestellt.

2.6 Verkapselung von Wirkstoffen zur gezielten Freisetzung im Dickdarm - Colon-Targeting

2.6.1 Verkapselung

Verkapselung stellt eine Technik dar, bei der ein Stoff oder Stoffgemisch in einem anderen Material eingebettet oder mit diesem ummantelt wird. Die Technik findet vielfältige Anwendung, u. a. in der chemischen und pharmazeutischen Industrie, in der Biotechnologie sowie bei der Herstellung von Kosmetika und Lebensmitteln. Es gibt unterschiedlichste Gründe, um Inhaltsstoffe zu verkapseln (Lakkis, 2007; Shafiur Rahman, 2007):

- i. Vermeidung oder Verzögerung von chemischen Reaktionen,
- ii. Verbesserung von Verarbeitung, Verteilung, Mischen,
- iii. Maskierung von unerwünschten Gerüchen oder bitteren Geschmackseindrücken,
- iv. Stabilisierung leicht flüchtiger Substanzen,
- v. Schutz funktioneller Inhaltsstoffe wie Vitamine, Mikroorganismen, Aromen oder bioaktive Substanzen vor stofflicher Veränderung z.B. durch Feuchtigkeit, Sauerstoff, Licht oder Reaktion mit Matrixbestandteilen,
- vi. Erzielung kontrollierter Freisetzungseigenschaften („controlled release“).

Eine Vielzahl von Technologien wie Sprühtrocknung, Sprühkühlung, Koazervation, Wirbelschichtcoating, Liposomentechnik oder Extrusion stehen zur Verkapselung zur Verfügung. Als Verkapselungsmaterialien im Lebensmittelbereich dienen Polysaccharide (z.B. Stärke, Maltodextrin, Natriumalginat), Lipide (z.B. Triacylglyceride, Fette, Bienenwachs), Proteine (Gelatine, Molkenproteine) oder Polymere (Polyvinylpyrrolidon, Schellack) (Madene *et al.*, 2006; Lakkis, 2007).

Verkapselungssysteme mit kontrollierten Freisetzungseigenschaften *in vivo*, welche die enthaltenen Stoffe langanhaltend gleichmäßig („sustained release“) oder gezielt am Wirkort („delayed release“) freisetzen, finden im pharmazeutischen und biomedizinischen Bereich bereits zahlreiche Anwendungen u. a. als magensaftresistente Tabletten oder Retard-Präparate (Brannon-Peppas, 1995; Wise, 2000; Mohamed und

van der Walle, 2008). Durch den gerichteten Transport des Wirkstoffes in das Zielorgan und die lokale Freisetzung werden bei reduzierter Gesamtdosis und somit verminderter Gefahr von systemischen Nebenwirkungen hohe lokale Wirkkonzentrationen erreicht (Chen und Subirade, 2009).

Im Gegensatz dazu steht die Entwicklung von „controlled release“-Systemen für biologisch aktive Lebensmittelinhaltsstoffe erst am Anfang (Champagne und Fustier, 2007; Chen und Subirade, 2009). Sie wird u. a. dadurch erschwert, dass aufgrund der Reglementierung durch das Lebensmittelrecht viele der in Pharmazie und Biotechnologie erprobten Materialien nicht eingesetzt werden dürfen (Champagne und Fustier, 2007). Gegenwärtige Arbeiten auf diesem Gebiet beschäftigen sich mit der Verkapselung von probiotischen Mikroorganismen und polyphenolischen Pflanzeninhaltsstoffen in eine Hydrogelmatrix oder ein Emulsionssystem. Ziel dabei ist es, die Stabilität dieser bioaktiven Bestandteile im Magen zu erhöhen und einen gezielten Transport in den unteren GIT zu ermöglichen (Chandramouli *et al.*, 2004; Iyer *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Frank und Schuchmann, 2009).

2.6.2 Colon-Targeting

Eine spezielle Form der kontrollierten Freisetzung *in vivo* stellt das Colon-Targeting dar. Es dient dazu, Wirkstoffe vor einem Abbau durch Verdauungssekrete und Enzyme sowie Absorption im oberen GIT zu schützen, in den Dickdarm zu transportieren und dort gezielt freizusetzen.

Primärer Zweck und Vorteil des Colon-Targetings ist die effizientere Therapie von Erkrankungen des Dickdarms wie Obstipation, Reizdarm, colorektales Karzinom oder entzündliche Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) (Ciftci, 1996; Meissner und Lamprecht, 2008). Trotz ausgeprägtem mikrobiellem Metabolismus gilt der Dickdarm zudem zunehmend als ein geeigneter Zielort für die Resorption oral schlecht bioverfügbarer Wirkstoffe wie Proteine, Peptide und Nukleinsäuren, da in diesem Abschnitt des GIT neutrale pH-Wert-Bedingungen, geringere proteolytische Aktivität sowie eine lange Transitzeit vorliegen (Nakamura *et al.*, 2002; Bourgeois *et al.*, 2005; Kosaraju, 2005). Weiterhin kann ein Wirkstofftransport in den Dickdarm von Vorteil sein, wenn eine verzögerte Absorption angestrebt wird. Dies ist beispielsweise bei der Behandlung von Krankheiten wie nächtlichem Asthma, Angina pectoris und Arthritis erforderlich, die vom Tagesrhythmus beeinflusst werden (Youan, 2004; van den Mooter, 2006).

Der Dickdarm ist 1,5 bis 1,8 m lang und setzt sich aus Caecum (Blinddarm mit Wurmfortsatz), Colon (Grimmdarm) und Rektum (Mast- oder Enddarm) zusammen. Mit

einer Länge von ca. 1 m stellt das Colon den größten Dickdarmabschnitt dar (Schwegler, 1998). Als Hauptfunktion des Dickdarms gilt die aktive Absorption von Elektrolyten und Wasser aus dem Chymus sowie die Speicherung und Ausscheidung des Faeces (Löffler *et al.*, 2007). Die Oberflächenvergrößerung der Dickdarmschleimhaut ist gering, da eine Zottenstruktur fehlt. Absorption organischer Moleküle findet im Colon nur in geringerem Umfang statt, wie z.B. für Proteine und kurzkettige Fettsäuren gezeigt wurde (Antonin *et al.*, 1992; Jorgensen *et al.*, 2001).

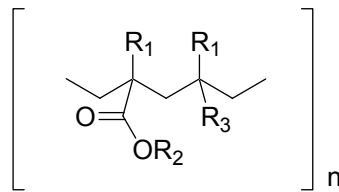
Ausgangspunkt für die Herstellung von Systemen zum colonspezifischen Wirkstofftransport bilden Morphologie und Physiologie des menschlichen Verdauungstraktes. Tabelle 2-6 gibt einen Überblick über Länge, Transitzeiten, pH-Werte und Mikroflora in Mundhöhle, Magen, Dünndarm und Dickdarm und zeigt, dass sich die einzelnen Abschnitte des GIT in verschiedensten Merkmalen unterscheiden. Auf Grundlage der Charakteristika (i) pH-Wert, (ii) Transitzeit, (iii) Druck und (iv) Mikroflora wurden im Rahmen pharmazeutischer Forschung unterschiedliche Systeme für den gezielten Transport in den Dickdarm entwickelt. Funktionsprinzipien und Wirksamkeit dieser Formulierungen werden in den folgenden Kapiteln insbesondere auf Grundlage von Arbeiten von Basit (2005) und van der Mooter (2006) zusammengefasst.

2.6.2.1 pH-Wert-kontrollierte Freisetzung

Der pH-Wert im Magen liegt im sauren Bereich und steigt im Verlauf des GIT bis zu einem Wert von 7 an (Tabelle 2-6). Dieser pH-Gradient wird bei der pH-Wert-kontrollierten Freisetzungsmethode ausgenutzt, indem aus pH-Wert sensitiven Polymeren bestehende Coatings eingesetzt werden. Diese Verbindungen sind im sauren Medium unlöslich, ionisieren, lösen sich bei neutralen oder schwach alkalischen pH-Werten und setzen den wirkstoffhaltigen Kern frei. In der pharmazeutischen Industrie stehen zu diesem Zweck v. a. zahlreiche Poly(meth)acrylat-Derivate (Eudragite®) mit unterschiedlichem, pH-Wert abhängigem Auflösungsverhalten zur Verfügung (Abb. 2-12).

Tabelle 2-6: Physiologische Parameter des menschlichen GIT (Schwegler, 1998; Fallingborg, 1999; Graff *et al.*, 2000; Autenrieth, 2003; Silbernagl und Despopoulos, 2003; Aas *et al.*, 2005; Moll und Moll, 2005)

Ort	Länge (cm)	Transitzeit	pH-Wert	Bakterien	Häufige Bakterienspezies
Mundhöhle		1-60 s	7	10 ⁹ KBE/mL	Mundhöhlenflora (<i>Streptococcus</i> ssp., <i>Gemella</i> ssp., <i>Granulicatella</i> ssp.)
Magen	65	1-3 h	1,8-4	10 ¹ -10 ⁵ KBE/mL	Mundhöhlenflora, Laktobakterien, grampositive Kokken, <i>Helicobacter pylori</i>
	Duodenum	20-30	6-7	10 ³ -10 ⁴ KBE/mL	Mundhöhlenflora, Laktobakterien, grampositive Kokken
Dünndarm	Jejunum	120	2-6 h	10 ³ -10 ⁴ KBE/mL	Laktobakterien, <i>Streptococcus</i> , wenige Anaerobier
	Ileum	180	6-7,4	10 ⁸ -10 ⁹ KBE/mL	grampositive Kokken, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Bacteroides</i> spp., andere Anaerobier
	Caecum	7	5,5-7		<i>Bacteroides</i> ssp., <i>Clostridium</i> ssp., <i>Bifidobakteriae</i> , <i>Eubakteria</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Fusobacteriae</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>
Dickdarm	Colon	150	14-80 h	10 ¹¹ -10 ¹² KBE/g	
	Rektum	15	7		



R₁: -CH₃; -H

R₂: -CH₃; -CH₃CH₂

R₃: -COOH (Eudragit L und S)

-COOCH₂CH₂N⁺(CH₃)₃Cl⁻ (Eudragit RL und RS)

Abb. 2-12: Chemische Struktur des Eudragit[®]-Polymers.

Für lebensmitteltechnische Anwendungen sind die synthetischen Eudragite[®] nicht zugelassen, natürliche Alternativen stellen Schellack (vgl. Kap. 2.6.5) und *Chondrosia*-Schwammkollagen (vgl. Kap. 2.6.4) dar.

Bei Untersuchungen mit humanen Probanden wurden für Eudragit[®] gecoatete Colon-Targeting-Systeme allerdings variable Freisetzungsorte, vom Ileum bis zum distalen Colon reichend, sowie sehr unterschiedliche Freisetzungzeiten nachgewiesen. Teilweise blieb die Freisetzung völlig aus (Ashford *et al.*, 1993). Dies zeigt, dass der gastrointestinale pH-Wert kein ausreichend stabiler Mechanismus für die gezielte Wirkstofffreisetzung um Dickdarm ist, da er stark von Ernährungsgewohnheiten, Krankheiten, der Gegenwart von Fettsäuren, Kohlendioxid und anderen Fermentationsprodukten sowie inter- und intraindividuellen Schwankungen beeinflusst wird.

Trotz dieser schwankenden Freisetzungseigenschaften *in vivo* werden einige auf diesem Wirkprinzip basierende orale Darreichungsformen (z.B. Asacol[®]MR, Mesren[®], Entocort[®]) zur Therapie von entzündlichen Darmerkrankungen durchaus erfolgreich eingesetzt.

2.6.2.2 Zeit-kontrollierte Freisetzung

Der Zeitraum, der für den Transport in den Dickdarm erforderlich ist, wird bei Zeit-kontrollierten Colon-Targeting-Systemen ausgenutzt. Sie sind so aufgebaut, dass es nach einer definierten Verzögerungszeit von üblicherweise 5 oder 6 h zur Freisetzung des Wirkstoffes kommt. Problematisch bei dieser Anwendung ist, dass gastrointestinale Transitzeiten starken inter- und intraindividuellen Schwankungen unterliegen. Die Dünndarm-Transitzeit ist mit 3 - 4 h zwar recht konstant, doch kann der zur

Magenpassage benötigte Zeitraum in Abhängigkeit von Ernährungszustand, Tageszeit und den Eigenschaften der Formulierung stark variieren. Das Prinzip der Zeit-kontrollierten Freisetzung wurde in PulsincapTM umgesetzt. Diese Formulierung besteht aus einer undurchlässigen Kapsel, die auf einer Seite mit einem Hydrogelstopfen verschlossen ist. Dieser Stopfen quillt im GIT, löst sich nach vordefinierter Zeit von der Kapsel ab und ermöglicht somit die Freisetzung des Wirkstoffes. Humane *in vivo* Studien haben jedoch gezeigt, dass die Position der Kapsel zum Freisetzungzeitpunkt stark schwankte und die Wirkstofffreisetzung infolge des geringen Wasseranteils im Faeces unzureichend erfolgte (Hebden et al., 1999; Wilding, 2000).

Obwohl der Einfluss der variierenden Magenpassage durch ein magensaft-resistentes Coating der Kapsel minimiert werden kann, ist die Anwendung Zeit-kontrollierter Systeme, auch aufgrund ihrer technologisch aufwändigen Herstellung, beschränkt.

2.6.2.3 Druck-kontrollierte Freisetzung

Systeme zur Druck-kontrollierten Freisetzung basieren auf Unterschieden im gastrointestinalen Druck, der durch muskuläre Kontraktion der Darmwand entsteht und zur Zerkleinerung und Förderung von Chymus bzw. Faeces dient. Im Colon treten relativ starke peristaltische Wellen auf, die in Verbindung mit gesteigerter Viskosität zu einem erhöhten luminalen Druck führen.

Zur Herstellung Druck-kontrollierter Targeting-Formen („pressure controlled colon delivery capsule“ - PCDC) werden wirkstoffhaltige Lipidkapseln mit dem wasser-unlöslichen Polymer Ethylcellulose beschichtet. Nach oraler Aufnahme schmilzt das Lipidmaterial, und das System ähnelt einem gefüllten Ethylcelluloseballon. Magen und Dünndarm werden aufgrund des geringeren gastrointestinalen Drucks und des höheren Flüssigkeitsanteils intakt passiert. Durch den Anstieg des luminalen Drucks im Colon kommt es schließlich zum Zerbersten des Systems und zur Freisetzung.

Derzeit ist noch unklar, inwieweit inter- und intraindividuelle Schwankungen im gastrointestinalen Druck die Funktion von PCDCs beeinflussen. In einer ersten, kleineren Humanstudie wurde gezeigt, dass diese Systeme einen vielversprechenden Ansatz zum Colon-Targeting darstellen.

2.6.2.4 Mikroflora-kontrollierte Freisetzung

Grundlage für Mikroflora-kontrollierte Colon-Targeting-Systeme bildet die Fähigkeit der Dickdarmflora, Materialien zu metabolisieren, die von den endogenen Verdauungsenzymen des oberen GIT nicht abgebaut werden können. Obwohl Bakterien im gesamten GIT vorkommen, weist der Dickdarm mit 10^{11} - 10^{12} KBE/g die höchste Besiedlungsrate (Tabelle 2-6) und - damit verbunden - höchste metabolische Aktivität auf. Die Dickdarmflora besteht aus 400 bis 500 Species. Es handelt sich zu 99,9 % um obligat anaerobe Bakterien, die zur Energiegewinnung mit vielfältigen Enzymen ausgestattet sind. Enzym-kontrollierte Systeme werden in Form von (i) Prodrugs oder (ii) bakteriell abbaubaren Verkapselungsmaterialien eingesetzt.

Bei Prodrugs handelt es sich dabei um Derivate pharmakologischer Wirkstoffe, die zum Schutz vor vorzeitigem Abbau oder Resorption im Magen und Dünndarm an einen Carrier gebunden werden und dadurch inaktiviert sind. Ein Beispiel hierfür ist Sulfasalazin. Dieser Prodrug-Wirkstoff wird in Präparaten wie Salazopyrin® zur Therapie von CED eingesetzt und besteht aus 5-Aminosalicylsäure, die zur Verhinderung der Resorption im Dünndarm über eine Azobindung mit Sulfapyridin verknüpft ist. Im Dickdarm kommt es zur enzymatischen Spaltung der Azobindung und zur Freisetzung des aktiven Wirkstoffs (Abb. 2-13). Mit Prodrugs wird ein gezielter Transport in den Dickdarm erreicht. Allerdings machen die Veränderungen des Wirkstoffmoleküls sowie die Freisetzung des Carriers zusätzliche toxikologische Untersuchungen vor der Verwendung erforderlich.

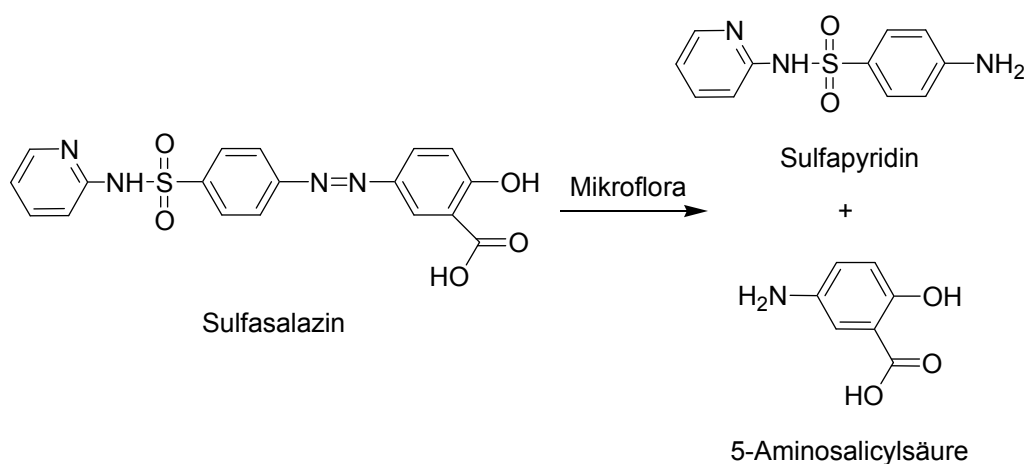


Abb. 2-13: Freisetzung von 5-Aminosalicylsäure aus dem Prodrug-Wirkstoff Sulfasalazin (modifiziert nach Chourasia und Jain, 2003).

Eine sichere und universeller einsetzbarere Alternative stellt die Verwendung von bakteriell abbaubaren Polymeren als Verkapselungsmatrix oder Coatingsubstanz dar. Eine Vielzahl von Materialien wie Pektin, Chitosan, Guarkernmehl, resistente Stärke und Galactomannan wird dabei eingesetzt. Im Dickdarm kommt es durch mikrobiellen Abbau der natürlichen Polymere zur Wirkstofffreisetzung. Vorzeitige Freisetzung im oberen GIT v. a. von gut wasserlöslichen Wirkstoffen durch Quellung der hydrophilen Polymere kann durch chemische Modifizierung vermindert werden.

Die Eignung von Mikroflora-kontrollierten Formulierungen zum Colon-Targeting wurde in verschiedenen Studien mit humanen Probanden v. a. für wasserunlösliche Wirkstoffe gezeigt. Als erste derartige Formulierung wurde COLAL-PRED™ im Rahmen klinischer Studien zur Behandlung von akuter Colitis ulcerosa auf seine Wirksamkeit getestet. Das System besteht aus Prednisolonmetasulfobenzoat-Natriumhaltigen Pellets, die mit einer Mischung aus Amylose und Ethylcellulose gecoatet sind. Laut Information des Herstellers zeigte COLAL-PRED™ in einer 2008 abgeschlossenen Phase III-Studie bei reduzierten Nebenwirkungen eine mit konventionellem Prednisolon vergleichbare Effizienz (Alizyme, 2010).

Enzym-kontrollierte Systeme stellen somit aufgrund ihrer hohen Selektivität einen besonders vielversprechenden Ansatz für das Colon-Targeting dar. Probleme wie eingeschränkte Filmbildungseigenschaften der Polymere, geringe Wirkstoffbeladung und aufwändige Herstellungsverfahren müssen jedoch noch gelöst werden. Weiterhin sind ernährungs-, alters- oder krankheitsbedingte Schwankungen in der mikrobiellen Enzymaktivität nicht völlig auszuschließen.

2.6.2.5 Zeit-, pH-Wert und Mikroflora-kontrollierte Freisetzung

Eine weitere Entwicklung auf dem Gebiet des Colon-Targetings stellen Systeme dar, die mehrere der o. g. Methoden kombinieren. Ein Beispiel hierfür mit in Humanstudien validierter Targeting-Effektivität ist die CODES™-Technologie. Zusätzlich zur Freisetzung durch die Mikroflora werden dabei pH-Wert und Zeit-Effekte genutzt. Das mehrstufige System besteht aus einem wirkstoffhaltigen bioabbaubaren Kern (z.B. aus Lactulose, Mannitol, Maltose oder Inulin), der mit drei Filmschichten gecoatet ist:

- (i) einer inneren säurelöslichen Schicht,
- (ii) einem hydrophilen Polymer als Zwischenschicht,
- (iii) einer äußeren magensaftresistenten Hülle.

Die Zwischenschicht dient dazu, jegliche Wechselwirkungen zwischen den gegensätzlich geladenen Polymeren zu vermeiden. Der Magen wird intakt passiert und die äußere magensaftresistente Barriere löst sich im Dünndarm. Anschließend erfolgt die Auflösung der hydrophilen Schicht. Die säurelösliche innere Hülle bleibt intakt, weist aber eine definierte Permeabilität auf, wodurch Wasser in das Innere gelangt. Im Dickdarm diffundiert die gelöste Lactulose aus der Hülle und wird von der Darmflora metabolisiert. Die dabei gebildeten organischen Säuren rufen eine lokale pH-Wert-Absenkung hervor, die schließlich zur Auflösung der inneren Coatingschicht und zur Wirkstofffreisetzung führt. Die Auflösungszeit kann anhand der Dicke der säurelöslichen Hülle sowie des Gehalts an bioabbaubarem Kern gesteuert werden.

Ravi *et al.* (2008) entwickelten ein CODES™ System mit Inulin als Kernmaterial, einem Guarkernmehl-Film als säurelöslicher Schicht, Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) als Zwischenschicht und Schellack als magensaftresistenter Hülle, das aufgrund seiner Bestandteile auch für die Anwendung im Lebensmittelbereich geeignet ist.

2.6.3 Pektin als Verkapselungsmaterial zum Colon-Targeting

Wie in Abschnitt 2.6.2.4 beschrieben, stellt Pektin ein bioabbaubares Polysaccharid dar, das zur Herstellung von Colon-Targeting-Systemen mit Mikroflora-kontrollierter Freisetzung verwendet wird.

Pektine sind lineare Polysaccharide mit einer durchschnittlichen Molekularmasse von 50 bis 180 kDa, die in Pflanzen weit verbreitet sind und aus den Schalen von Citrusfrüchten oder aus Apfeltrestern gewonnen werden. Sie bestehen, wie in Abb. 2-11 dargestellt, vorwiegend aus partiell methylierten α -(1→4)-D-Galacturonsäure-Ketten („smooth regions“), die in den sog. „hairy regions“ von α -(1→2) verknüpften L-Rhamnose-Resten unterbrochen sind. Weiterhin sind D-Galactane, L-Arabinane und Arabinogalactane in geringen Mengen kovalent an die Hauptkette gebunden (Shina und Kumria, 2001; Belitz *et al.*, 2008).

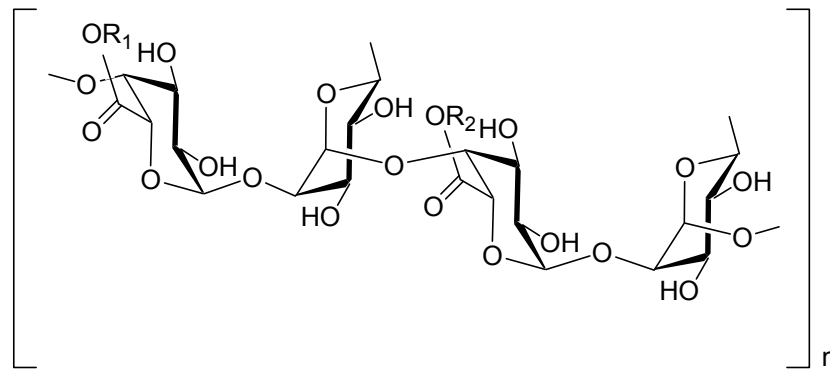


Abb. 2-14: Grundstruktur des Pektinmoleküls. Hochverestertes (HV) - und niedrigverestertes (NV) - Pektin: $R_1=H$, $R_2=OCH_3$; amidiertes Pektin: $R_1=H$, $R_2=NH_2$ oder OCH_3 (modifiziert nach Belitz *et al.*, 2008).

In Abhängigkeit vom Methylierungsgrad an den Carboxylgruppen der Galacturon-säurereste unterscheidet man hochverestertes (HV-Pektin, Veresterungsgrad (VE) > 50 %) und niedrigverestertes Pektin (NV-Pektin, VE < 50 %). Amidiertes Pektin wird durch Entesterung mit alkoholischem Ammoniumhydroxid hergestellt. Laut ZZuIV dürfen HV-, NV- und amidiertes Pektin als Zusatzstoffe E 440 *quantum satis* bei der Herstellung von Lebensmitteln eingesetzt werden (ZZuIV) und stellen somit geeignete Materialien zur Entwicklung von Colon-Targeting-Systemen im Lebensmittelbereich dar.

Während der Passage des GIT werden Pektine von den endogenen Verdauungs-enzymen nicht gespalten (Löffler *et al.*, 2007). In Mundhöhle und Magen sind die Polysaccharide stabil (Knaup *et al.*, 2008). Im Dünndarm tritt infolge mikrobieller Aktivität v. a. im terminalen Ileum ein geringer Abbau auf (Saito *et al.*, 2005; Knaup *et al.*, 2008). Der Hauptanteil des Pektins gelangt jedoch intakt in den Dickdarm und wird dort vollständig durch die Mikroflora metabolisiert (Cummings *et al.*, 1979; Knaup *et al.*, 2008). Bakterien der Stämme *Eubacterium elegans* und *Bacteroides thetaiotaomicron* sind am Abbau beteiligt (Salyers *et al.*, 1977; Dongowski *et al.*, 2000)

Pektine sind hydrophile Polymere, die in wässrigen Medien quellen und somit nicht in der Lage sind, hydrophile Wirkstoffe vor einer vorzeitigen Freisetzung im oberen GIT zu schützen (Shina und Kumria, 2001). Eine Strategie, dieses Problem zu lösen, stellt die Quervernetzung von Pektin in Gegenwart divalenter Ionen wie Calcium (Rubinstein *et al.*, 1993) dar. Aufgrund elektrostatischer Bindungen zwischen Galacturon-säureresten und Calciumionen sowie van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten kommt es dabei zur Ausbildung von Pektinat-Hydrogelen mit einer sog. „shifted egg-Box“-Konfiguration (Grant *et al.*, 1973; Braccini, 2001). Die Gele besitzen einen stärker hydrophoben, weniger wasserlöslichen Charakter (Liu *et al.*, 2003). Die Abbaubarkeit durch die Dickdarmflora wird durch die Quervernetzung nicht beeinflusst (Rubinstein *et al.*, 1993).

Der Einsatz erfolgt einerseits in Form von Filmüberzügen oder durch Tablettierung von Calcium Pektinat-Wirkstoff-Gemischen (Rubinstein *et al.*, 1993; Sriamornsak *et al.*, 1997). Andererseits ist es möglich, die aktive Substanz bereits bei der Herstellung des Pektinat-Hydrogels direkt einzubringen, indem wirkstoffhaltige Pektinlösung zur Quervernetzung in Calciumchloridlösung eingetroppt wird. Infolge ionotroper Gelierung kommt es sofort zur Entstehung von gelartigen, wirkstoffhaltigen Kugeln (Sriamornsak und Nunthanid, 1998). Dieser Herstellungsprozess kann effektiv mit der in Abschnitt 2.6.6 vorgestellten „Laminar Jet Break-up“-Technologie realisiert werden.

Die Bildung Calcium-induzierter Gele wird von einer Vielzahl von Faktoren wie Calciumgehalt, Veresterungs- bzw. Amidierungsgrad, pH-Wert und Temperatur beeinflusst (Liu *et al.*, 2003; Lootens *et al.*, 2003). Eine Erhöhung des Calciumanteils führt zu einer verstärkten Quervernetzung und Aggregation, bei Überschreitung eines definierten Optimums werden jedoch minderwertige Gele erhalten (Ashford *et al.*, 1994). Bei zu hoher Veresterung oder Amidierung der Galacturonsäurereste ist die Anzahl freier Carboxylgruppen zu gering, um eine stabile „shifted egg-box“-Konfiguration aufzubauen, in der jedes Calcium-Ion mit zwei Säureresten wechselwirkt. Es resultieren Gele mit erhöhter Freisetzungsrates (Liu *et al.*, 2003). Da amidiertes niedrigverestertes Pektin weniger hydrophil und somit unempfindlicher in Bezug auf Schwankungen von pH-Wert und Calciumionenkonzentration ist, gilt es als besonders geeignetes Derivat für die Herstellung von stabilen Gelformulierungen (Wakerly *et al.*, 1997; Shina und Kumria, 2001).

Neben der Quellung der Matrix, die wie oben beschrieben z.B. mittels Calcium-induzierter Vernetzung reduziert werden kann, wird die vorzeitige Freisetzung auch durch Diffusion des Wirkstoffs von der Oberfläche der Formulierung hervorgerufen. Insbesondere gut wasserlösliche Substanzen werden schnell hydratisiert und diffundieren in das umgebende Medium. Dadurch kommt es zur Entstehung von Poren und Kanälen, wodurch Wasser in das Pektinigel eintritt und die Freisetzung weiter beschleunigt (Liu *et al.*, 2003). Bei der Verwendung einer Calciumpektinat-Matrix zur Verkapselung wasserlöslicher Wirkstoffe ist deshalb eine zusätzliche äußere Schicht erforderlich, die als wasserundurchlässige Barriere fungiert (Liu *et al.*, 2003; Maestrelli *et al.*, 2008). Die hierfür potentiell geeigneten Polymere, Schwammkollagen und Schellack, deren Einsatz für lebensmitteltechnologische Anwendungen zulässig ist, werden in den nachfolgenden Kapiteln 2.6.4 und 2.6.5 vorgestellt.

2.6.4 Kollagen aus dem Meeresschwamm *Chondrosia reniformis* Nardo

Kollagene sind wasserunlösliche Faserproteine, die in Form verschiedener Typen v. a. in der extrazellulären Matrix von Bindegeweben vorkommen. Sie bestehen aus drei helikal verwundenen Peptidketten. Die Zusammenlagerung dieser als Tropokollagen bezeichneten Tripelhelices führt zur Bildung von Kollagenfibrillen mit charakteristischer Querstreifung. Typisch für die Aminosäurezusammensetzung von Kollagen sind hohe Gehalte an Glycin und Prolin sowie das Vorkommen von 4-Hydroxyprolin und 5-Hydroxylysin (Belitz *et al.*, 2008). Kollagen ist ein bioabbaubares Material mit geringer Immunogenität (Friess, 1998) und wird deshalb häufig in Pharmazie, Kosmetik und Lebensmitteltechnologie eingesetzt. Häute und Knochen von Schweinen und Rindern stellen derzeit die Hauptquelle zur Kollagengewinnung dar. Aufgrund der entwicklungs-geschichtlich sehr frühzeitigen Herausbildung der Kollagene treten sie auch in Schwämmen auf. *Chondrosia reniformis* Nardo ist ein nierenförmiger Meeresschwamm aus dem Mittelmeer, der aufgrund seines hohen Kollagengehalts von 40 % als alternative Quelle genutzt werden kann (Garrone *et al.*, 1975).

Zur Gewinnung wird laut Studie von Swatschek *et al.* (2002) das zerkleinerte *Chondrosia reniformis* Nardo Material in Tris-HCl-Puffer pH 9,5 suspendiert und das Kollagen nach Zentrifugation aus dem Überstand durch Ansäuern mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 4 ausgefällt, gewaschen und gefriergetrocknet. Nur wenige Daten existieren bisher zur Charakterisierung von *Chondrosia*-Kollagen. Mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurde gezeigt, dass das Schwammkollagen bei neutralem pH-Wert aus ungeordneten Fibrillen besteht, welche die kollagentypische periodische Querstreifung aufweisen. Auch in der Aminosäurezusammensetzung liegt eine große Ähnlichkeit zu bovinem Typ I Kollagen vor. Geringe Unterschiede zeigen sich v. a. in den Gehalten an Glycin, Glutamin, Glutaminsäure und Hydroxyprolin (Swatschek *et al.*, 2002; Lin und Liu, 2006). Ursache hierfür kann das Vorhandensein größerer nichthelikaler Strukturabschnitte im *Chondrosia*-Kollagenmolekül sein. Zudem kann eine Verunreinigung des untersuchten Kollagens mit assoziierten Glycoproteinen nicht völlig ausgeschlossen werden (Garrone *et al.*, 1975; Heinemann *et al.*, 2007).

Trotz vergleichbarer Struktur zeigt *Chondrosia*-Kollagen ein anderes pH-Wert abhängiges Verhalten als Typ I Kollagen. Aufgrund starker intrafibrillärer Quervernetzung wird es bei Einwirkung schwacher Säuren nicht zu monomerem Tropokollagen abgebaut (Imhoff und Garrone, 1983). Stattdessen lagern sich die einzelnen Kollagenfibrillen zu dicht gepackten, säureunlöslichen Fasern zusammen (Heinemann *et al.*, 2007). In neutralen Pufferlösungen kommt es zur Dispergierung des Kollagens infolge

des Zerfalls der Fasern in einzelne Fibrillen (Heinemann *et al.*, 2007). In stark sauren bzw. stark alkalischen Lösungen tritt hydrolytischer Abbau ein. Der isoelektrische Punkt von in Wasser suspendiertem *Chondrosia*-Kollagen liegt im Bereich von 6,5 - 8,5. Infolge des hohen Gehalts an sauren Aminosäuren weist frisch hergestellte Kollagen-Dispersion einen pH-Wert von $4,44 \pm 0,05$ auf (Swatschek *et al.*, 2002) .

Durch seine Beständigkeit bei sauren pH-Werten ist der Einsatz von *Chondrosia*-Kollagen als magensaftresistente, wasserundurchlässige Barriere zur Herstellung von „controlled release“-Formulierungen möglich. Nicklas *et al.* (2009) zeigten, dass mit *Chondrosia*-Kollagen im Dragierkessel gecoatete Tabletten gegen einen Zerfall in simuliertem Magensaft geschützt sind, sich in Phosphatpuffer pH 6,8 jedoch rasch auflösen. Aufgrund seines natürlichen Ursprungs kann *Chondrosia*-Kollagen auch zum Coating von Lebensmittelbestandteilen eingesetzt werden (Nicklas *et al.*, 2009) .

2.6.5 Schellack

Bei Schellack handelt es sich um die gereinigte und aufbereitete Form des natürlichen Polymers LAC, das von der parasitären Lackschildlaus *Kerria Lacca* (Kerr) Lindinger sekretiert wird. Das Insekt ist auf verschiedenen Bäumen und Sträuchern wie *Schleichera oleosa* (Kusum Baum), *Butea monoperma* (Malabar Lackbaum), *Zizyphus mauritiana* (Indische Jujube) in Indien, Burma, Thailand und Südostasien heimisch. Von den mehr als 65 bekannten Untergruppen haben nur die Insektenstämme Rangeeni und Kushimi in Indien sowie Thai in Thailand wirtschaftliche Bedeutung. Die Eigenschaften des Harzes variieren in Abhängigkeit von Insektenstamm und Wirtsbaum deutlich. Die weiblichen Lackschildläuse nehmen Phloemsaft aus den Zweigen der Wirtspflanze auf, der im Körper umgewandelt und als Polyesterharz sekretiert wird. Es kommt zur Entstehung dicker Harzkrusten um die Zweige, die dem Schutz der Brut vor extremen Temperaturen und Fraßfeinden dienen. Zur kommerziellen Gewinnung des sog. Stocklacks werden die umkrusteten Äste abgekratzt oder abgeschnitten. Nach mechanischer Abtrennung von Holzanteilen wird der Stocklack gewaschen und wasserlösliche Anteile wie der Farbstoff Laccainsäure herausgelöst. Der so erhaltene, wasserunlösliche Körnerlack wird getrocknet (Penning, 1990; Blaschek *et al.*, 2006).

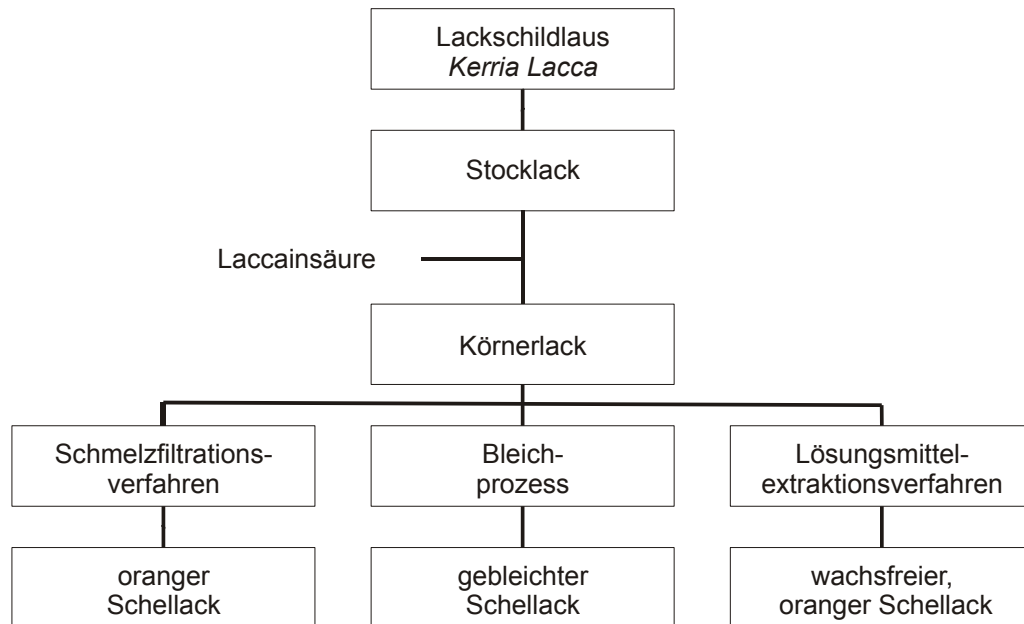


Abb. 2-15: Verarbeitung von Schellack (schematisch nach Buch *et al.*, 2009)

Die Weiterverarbeitung von Schellack kann mit drei unterschiedlichen Verfahren erfolgen (Abb. 2-15). Neben der Herkunft werden die Eigenschaften des Schellacks v. a. durch den Verarbeitungsprozess beeinflusst (Buch *et al.*, 2009). Im Schmelzfiltrationsverfahren wird der aufgeschmolzene Körnerlack unter hohem Druck durch einen Filter gepresst und anschließend auf einem Abrollband zu einem dünnen Film gezogen, der beim Abkühlen bricht. In so gewonnenem „orangenen Schellack“ ist das natürliche Wachs weiterhin enthalten.

Im Bleichverfahren zur Herstellung von gebleichtem und entwachstem Schellack wird Körnerlack in Natriumcarbonatlösung gelöst, entwachst, filtriert und mit Natriumhypochlorit gebleicht. Es resultiert eine farblose Lösung, aus der nach Auswaschen der Chlorbleichlauge Schellack als weißes Pulver durch Zugabe von Schwefelsäure ausgefällt wird. Der Einsatz von Natriumhypochlorit führt zu einer geringen Lagerbeständigkeit sowie zu Veränderungen im Lösungsverhalten des Schellacks infolge Selbstvernetzung der Carboxylgruppen (Penning, 1990).

Keine Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung des Harzes treten dagegen beim Lösungsmittel-extraktionsverfahren auf. Hierbei wird Körnerlack in Alkohol gelöst. Wachs und Verunreinigungen werden durch verschiedene Filtrationsstufen und Farbstoffe durch Absorption an Aktivkohle entfernt. Nach Verdampfen des Alkohols wird der Schellack zu einem Film gezogen, und die entstehenden Blätter werden getrocknet. Durch sorgfältige Auswahl der Vorstufen und

Einsatz des Lösungsmittelextraktionsverfahrens kann Schellack in hoher Qualität mit einer engen Spezifikation sowie minimaler Batch-to-Batch-Variation hergestellt werden (Penning, 1990).

Obwohl die Zusammensetzung nicht vollständig aufgeklärt ist, handelt es sich bei Schellack um ein Harz mit einer durchschnittlichen Molekularmasse von ca. 1000 Da, das aus aliphatischen und cyclischen Hydroxycarbonsäuren in Ester- und Lactonform besteht. Als Hauptkomponenten wurden Aleuritinsäure-, Schellol- und Jalarinsäure identifiziert (Abb. 2-16). Weiterhin sind geringe Anteile an Schellackwachs sowie Farbstoffe (Laccainsäure, Erythrolaccain) nachweisbar (Fiedler, 2002; Blaschek *et al.*, 2006).

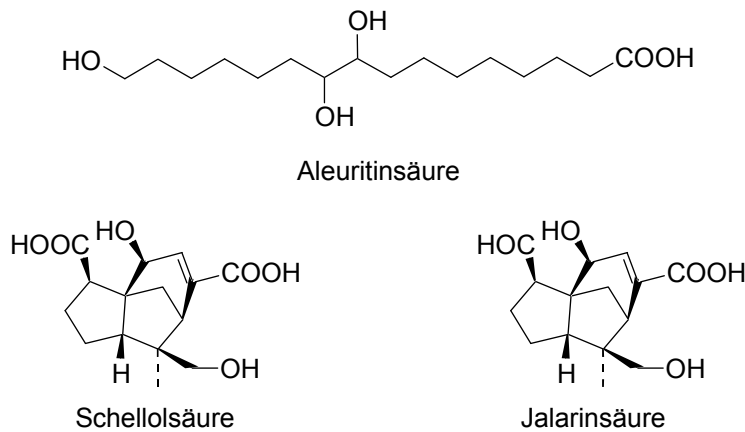


Abb. 2-16: Strukturen der Schellack-Hauptbestandteile (modifiziert nach Blaschek *et al.*, 2006) .

Schellack ist in Wasser und wässrigen Säuren unlöslich, löst sich jedoch in polaren organischen Lösungsmitteln, organischen Säuren und Alkoholen sowie in wässrig-alkalischen Lösungen (Cole *et al.*, 1995). Die pK_a -Werte verschiedener kommerziell erhältlicher Schellacke liegen im Bereich von 5,60 bis 6,59 (Buch *et al.*, 2009). Das Harz weist sehr gute Filmbildungseigenschaften auf. Die Filme zeichnen sich durch Glanz, Oberflächenhärte, hohe Abriebfestigkeit, geringe Wasserdampfdurchlässigkeit sowie ein pH-Wert abhängiges Lösungsverhalten aus. Schellack ist nicht toxisch, physiologisch unbedenklich und eignet sich aufgrund der genannten Eigenschaften u. a. zur Herstellung von magensaftresistenten Überzügen, „controlled release“-Coatings, Feuchtigkeitsbarrieren und Glanzschichten. Nach dem Lösungsmittelverfahren hergestellter Schellack ist gemäß Deutschem Arzneibuch, Europäischem Arzneibuch sowie der United States Pharmacopeia für Pharma-Anwendungen zugelassen. Weiterhin darf Schellack (E904) laut ZZuV als Überzugsmittel für

verschiedene Lebensmittel sowie dementsprechend auch für Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt werden und besitzt den „generally recognized as safe (GRAS)“ – Status der U.S. Food and Drug Administration (FDA) (ZZuIV; Wade und Weller, 1994).

Die Herstellung von Schellackfilmen und -mikrokapseln erfolgt unter Verwendung von alkoholischen bzw. wässrig-alkalischen Lösungen mittels Extrusion oder Sprühcoating. Letzteres kann z.B. in der Wirbelschicht mittels Wurster-Verfahren (vgl. 2.6.7) durchgeführt werden (Cole *et al.*, 1995; Xue und Zhang, 2008).

2.6.6 „Laminar Jet Break-up“-Technologie

Die „Laminar Jet Break-up“-Technologie wurde von Hulst *et al.* (1985) entwickelt, um die Produktivität gegenüber der konventionellen Eintropfmethode bei der Immobilisierung von Biokatalysatoren in eine Hydrogelmatrix zu steigern. Sie basiert auf der Theorie der Instabilität laminarer Strömungen bei Überlagerung mit mechanischer Vibration. Neben der im Vergleich zur Eintropfmethode erhöhten Leistung ist diese Technik reproduzierbarer und ermöglicht die Herstellung kleinerer Kugeln mit idealer Form und gleichmäßiger Größenverteilung (Hulst *et al.*, 1985; Haas, 1993). Eine Steigerung der Produktionsrate lässt sich durch die Kombination mehrerer Düseneinheiten erreichen (Brandenberger und Widmer, 1998).

Rayleigh (1878) untersuchte als erster die Instabilität laminarer Jets newtonscher Flüssigkeiten. Weber (1931) weitete die Analyse auf nicht-newtonsche Flüssigkeiten aus und zeigte, dass sich die optimale Wellenlänge λ_{opt} für das schnellste Zerbrechen des Jets ergibt nach:

$$\lambda_{opt} = \pi \cdot \sqrt{2} \cdot d_j \cdot \sqrt{1 + \frac{3\eta}{\sqrt{\rho\sigma d_j}}} \quad (2.1)$$

wobei d_j der Durchmesser des Jets, η die Viskosität, ρ die Dichte und σ die Oberflächenspannung ist. Es bilden sich gleichmäßige Tropfen, wenn der Jet bei folgender Wellenlänge vibriert wird:

$$3,5 d_j < \lambda < 7 d_j \quad (2.2)$$

Die Wellenlänge ist mit der Frequenz der Vibration f und der Geschwindigkeit des Jets v_j verknüpft nach:

$$\lambda = \frac{v_j}{f} \quad (2.3)$$

Der Durchmesser d der entstehenden Tropfen ergibt sich nach:

$$d = \sqrt[3]{1,5 \cdot d_j^2 \cdot \lambda_{opt}} \quad (2.4)$$

Die Größe der Kugeln wird, bei konstantem Düsendurchmesser, nur von den rheologischen Eigenschaften der Polymerlösung beeinflusst und kann in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Jets und der Vibrationsfrequenz variiert werden (Brandenberger und Widmer, 1998). Mit Hilfe des theoretischen Ansatzes kann die Frequenz für eine optimale Tropfenbildung berechnet werden, die in der Praxis jedoch selten mit der Frequenz für bestmögliche Kugelproduktion übereinstimmt. Die Ermittlung der tatsächlich geeigneten Herstellungsbedingungen erfolgt deshalb i. A. empirisch (Serp *et al.*, 2000).

Abb. 2-17 zeigt eine schematische Darstellungen des apparativen Aufbaus sowie die verwendete Düse. Die wirkstoffhaltige Polymerlösung wird durch die Düsenplatte gepumpt. Dabei entsteht ein laminarer Jet, dessen Geschwindigkeit vom Druck abhängt. Das Signal des Sinusgenerators wird in der Vibrationseinheit in eine mechanische Bewegung des Stempels umgewandelt, der mit einer Membranschicht in der Düse verbunden ist. Durch die Bewegung der Membran wird das Signal auf die Flüssigkeit übertragen. Dies führt zur Vibration des Jets und resultiert in dessen Zerschneiden. Die entstehenden Tropfen fallen in die Quervernetzerlösung. Der Einsatz einer Stroboskoplampe ermöglicht die visuelle Beobachtung der Tropfenbildung (Hulst *et al.*, 1985).

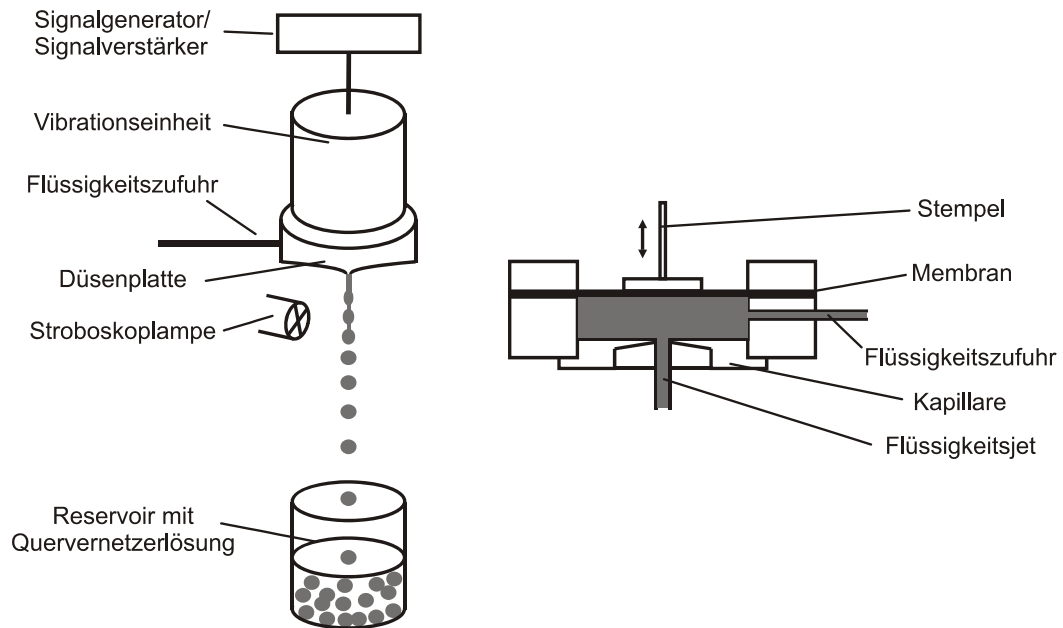


Abb. 2-17: Schematische Darstellung einer Apparatur zur Verkapselung mittels Laminar-Jet-Break-up-Technologie (links), der vibrierenden Düse (rechts) (modifiziert nach Hulst *et al.*, 1985; Yang *et al.*, 2005).

2.6.7 Wirbelschicht-Coating nach dem Wurster-Verfahren

Coating (dt. Beschichtung) beschreibt ein Verfahren, bei dem eine klar definierte Filmschicht um einen existierenden Kern erzeugt wird. Die technische Umsetzung erfolgt unter Verwendung von zwei Verfahren.

In Weiterentwicklung des traditionellen Dragierkessels wird zur Beschichtung größerer, nicht-wirbelfähiger Partikel das Trommel-Coating eingesetzt. Hier wird die Filmlösung von oben auf die Partikel aufgetragen, die in einer Drehtrommel permanent bewegt und gemischt werden. Durch Zuführung von Prozessluft wird eine Verdunstung der Flüssigkeit und Trocknung der Filmschicht erreicht (Cole *et al.*, 1995).

Zum anderen wird das deutlich schnellere Wirbelschicht-Verfahren angewendet, das auf dem Prinzip des Aufsprühens einer feinverteilten Coatinglösung auf fluidisierte Partikel beruht. In Abhängigkeit von der Sprühhichtung der Coatingflüssigkeit wird zwischen „top spray coating“ (Gegenstromverfahren), „bottom spray coating“ (Gleichstromverfahren) und „tangential spray coating“ (Tangentialverfahren) unterschieden (Olsen, 1989).

Eine Verbesserung des Gleichstromverfahrens stellt die Wurster-Technologie dar (Wurster, 1959). Mit dieser Methode sind besonders homogene und damit hochwertige Coatingschichten zugänglich, da durch die Zirkulation der Partikel die Trocknungsrate erhöht und die Gefahr von Agglomeration vermindert wird (Christensen und Bertelsen,

1997; Teunou und Poncelet, 2002). Zur Herstellung von „controlled release“-Coatings wird deshalb bevorzugt das Wurster-Verfahren eingesetzt.

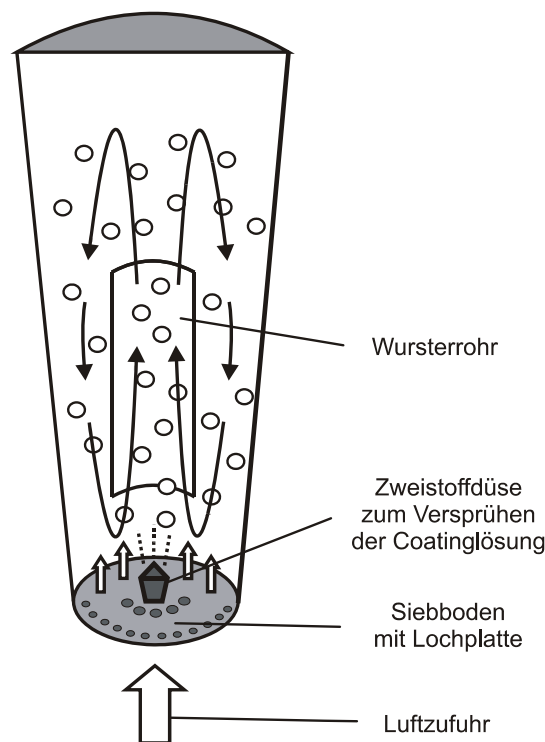


Abb. 2-18: Querschnittsdarstellung eines Wurster-Produktbehälters (modifiziert nach Madene *et al.*, 2006; Werner *et al.*, 2007).

Abb. 2-18 zeigt den dabei verwendeten Produktbehälter. Im Gegensatz zu den o. g. anderen Verfahren ist ein Steigrohr (Wursterrohr) integriert. Die Sprühdüse ist auf einem Siebboden angebracht, unter dem sich eine Lochplatte befindet. Die Perforation der Platte nimmt zur Mitte hin zu und erzeugt dadurch eine schnelle Luftströmung durch das Wursterrohr. Die in Abb. 2-19 schematisch dargestellten Mikroprozesse finden während des Coatings statt. Partikel werden infolge des Fluidisierungsstroms durch das Steigrohr nach oben in die Sprühzone gefördert und kollidieren mit Sprühtropfen, die kontinuierlich in gleicher Richtung aus der Düse freigesetzt werden. Die Sprühtropfen beginnen bereits während des Aufstiegs zu trocknen. Nach erfolgreicher Anhaftung verteilt sich der Flüssigkeitstropfen auf der Oberfläche des Partikels und trocknet weiter ab. Währenddessen bewegt sich das Partikel im Wursterrohr weiter nach oben in die Expansionszone. Dort wird es durch die verringerte lokale Luftgeschwindigkeit langsamer und fällt anschließend außerhalb des Steigrohrs zurück. Beim Auftreffen auf den Boden darf das Partikel nicht mehr kleben, da hohe Teilchendichte und geringe Bewegung in diesem Bereich Agglomerationsprozesse fördern. Inter-Partikel-Agglomeration stellt das größte Problem bei Wirbel-

schichtverfahren dar, da es dadurch zu rascher Defluidisierung und zum Zusammenbruch des Prozesses kommen kann. Auf dem Boden bewegt sich das Partikel durch das Teilchenbett, bis es in der Zone des horizontalen Transports erneut durch das Wursterrohr nach oben beschleunigt wird. Durch wiederholtes Durchlaufen dieses Kreislaufs kommt es zur Entstehung einer Filmschicht (Werner *et al.*, 2007).

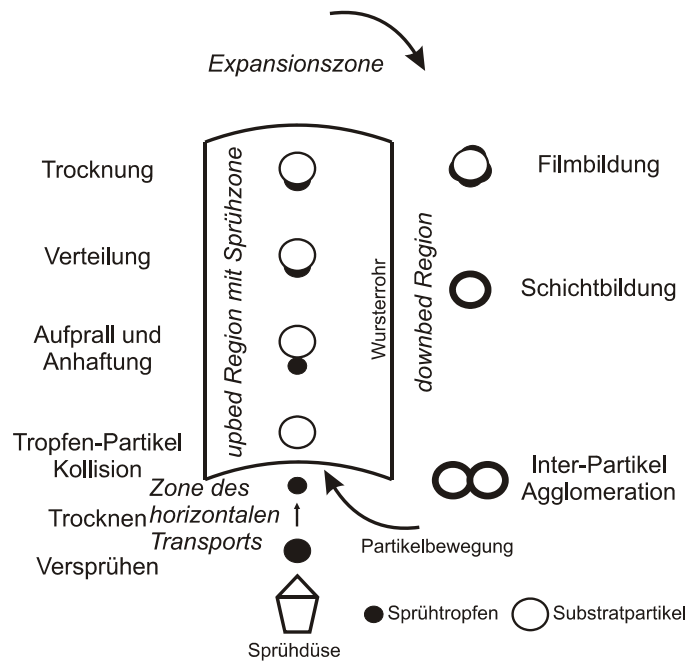


Abb. 2-19: Während des Coatings mittels Wurster-Technologie auftretende Zonen und Mikroprozesse (Schema modifiziert nach Werner *et al.*, 2007).

Beim Wirbelschicht-Coating, zusammengesetzt aus den Teilschritten Fluidisierung, Sprühen und Trocknen, handelt es sich um einen komplexen Prozess, der von bis zu zwanzig Produkt- und Prozessparametern beeinflusst wird (Maa *et al.*, 1996; Cheng und Turton, 2000). Tabelle 2-7 fasst die wichtigsten Einflussvariablen bei Anwendung der Wurster-Technik zusammen. Aufgrund dieser Komplexität stellen umfassende Erfahrungswerte in Verbindung mit Ausprobieren bis heute die primär genutzte Methode zur Optimierung von Coatingprozessen dar (Link und Schlunder, 1997; Dixit und Puthli, 2009).

Tabelle 2-7: Parameter zur Beeinflussung der Qualität mittels Wurster-Technologie hergestellter Coatingschichten (Maa *et al.*, 1996; Cheng und Turton, 2000).

Prozess	Einflussfaktor
Fluidisierung	Volumenstrom der Fluidisierungsluft
	Größe, Position des Wursterrohrs
	Größe, Größenverteilung, Dichte des zu coatenden Materials
	Oberflächeneigenschaften des zu coatenden Materials
Sprühen	Batchgröße
	Sprühluftdruck
	Sprührate
	Tröpfchengröße
	Design der Sprühdüse (pneumatisch, rotierend, etc.)
	Abstand der Düse vom Partikelbett
Trocknen	Viskosität, Oberflächenspannung, Dichte der Sprühlösung
	Einlasstemperatur der Fluidisierungsluft
	Volumenstrom der Fluidisierungsluft
	Relative Feuchtigkeit der Fluidisierungsluft
	Sprühluftdruck

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Studien zur Charakterisierung der Zusammensetzung von getrockneten Heidelbeeren und stofflichen Veränderungen infolge Trocknung

Heidelbeeren stellen ein bewährtes Therapeutikum in der Volksheilkunde dar. Sie wurden traditionell getrocknet oder als Mus, Saft, Wein oder Spirituose vor allem zur Behandlung von Durchfall und Erbrechen angewendet. Auch heute noch werden getrocknete Heidelbeeren (gHB) als pharmazeutische Droge *Myrtilli fructus* zur Unterstützung der Therapie unspezifischer akuter Durchfallerkrankungen eingesetzt (Hegi, 1957/58; Blaschek *et al.*, 2006). Ausgehend von dieser traditionellen Verwendung wurde in einer aktuellen Arbeit von Piberger (2009) das Potential von gHB bei der Behandlung von CED durch Studien am murinen Modell der akuten und chronischen „Dextran Sodium Sulfate“ (DSS)-Colitis evaluiert. Es wurde gezeigt, dass gHB eine interessante Therapiemöglichkeit darstellen könnten, da deren Gabe eine Verhinderung der entzündungsbedingten Colonverkürzung sowie - bei akuter Colitis - zusätzlich eine Hemmung der Sekretion proinflammatorischer Zytokine bewirkte.

Welche Komponenten aus gHB für die genannten biologischen Aktivitäten verantwortlich sind, ist bisher unbekannt. Anthocyane, die in frischen Heidelbeeren in hohen Konzentrationen vorkommen, weisen hierfür wichtige antioxidative, anti-karzinogene, antiinflammatorische und antimikrobielle Effekte auf (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005; Mazza und Kay, 2008; Wang und Stoner, 2008). Auch andere Polyphenole (Quercetin-Glycoside, Epigallocatechingallat, Tannine) werden mit positiven Wirkungen bei CED in Zusammenhang gebracht (Loeb *et al.*, 1989; Huber *et al.*, 2007; Shapiro *et al.*, 2007). Daneben wird auch der günstige Effekt einer Ballaststoffzufuhr bei Patienten mit Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn beschrieben (Glavez *et al.*, 2005).

Um Hinweise auf Wirkkomponenten in gHB zu erhalten, wurden in dieser Arbeit die Inhaltsstoffe der in der Studie von Piberger (2009) verwendeten, kommerziell erworbenen gHB untersucht. Gehalte und Profile von Anthocyanen und anderen phenolischen Bestandteilen, die Gesamtzusammensetzung sowie die Zusammensetzung der Ballaststofffraktion wurden bestimmt. Aufgrund der thermischen Belastung während der Trocknung von Heidelbeeren sind chemische Veränderungen der Inhaltsstoffe infolge Karamellisierung und Maillard-Reaktion unvermeidlich (Ledl und Schleicher, 1990; Kroh, 1994). Anhand des Indikators HMF wurde das Ausmaß der

thermischen Belastung von gHB evaluiert. Auch Polyphenolgehalt und -profil von Lebensmitteln werden durch Trocknungsprozesse beeinflusst (Amarowicz *et al.*, 2009). Um festzustellen, ob es bei der Herstellung von gHB zu entsprechenden Veränderungen bei phenolischen Inhaltsstoffen kommt, wurden Trocknungsstudien mit frischen Heidelbeeren sowie Modelluntersuchungen zur Anthocyan-Stabilität durchgeführt.

3.1.1 Bestimmung von Anthocyanprofil und -gehalt in getrockneten Heidelbeeren

Zur Identifizierung und Quantifizierung wurden die Anthocyane aus den zerkleinerten gHB in Anlehnung an eine Methode von Kraus (2006) unter Verwendung von 5 % Ameisensäure in Methanol (v/v) vollständig extrahiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung des Anthocyanprofils mittels Hochleistungsflüssigchromatographie- mit Detektion im ultravioletten/sichtbaren Wellenlängenbereich (HPLC-UV/Vis) und HPLC-Elektrospray-Ionisierung-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS).

Anthocyane sind bei pH-Werten > 2 instabil und liegen als Mischung verschiedener Gleichgewichtsformen vor (vgl. 2.2.2, 2.2.4). Um die Stabilität der Verbindungen zu gewährleisten und um Peakverbreiterung durch mehrere Gleichgewichtsformen zu vermeiden, muss die HPLC-Analytik der Pigmente unter Verwendung eines stark sauren Fließmittelsystems durchgeführt werden, sodass das stabile Flavyliumkation dominiert (Welch *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb 10 % Ameisensäure (v/v) und Acetonitril als Eluenten eingesetzt (vgl. 4.2.1, HPLC-System 1). Abb. 3-1 a) zeigt als repräsentatives Beispiel ein mit HPLC-System 1 aufgenommenes Chromatogramm der aus gHB isolierten Anthocyane.

Die Identifizierung der enthaltenen Verbindungen erfolgte zum einen durch Retentionszeitvergleich mit authentischen Anthocyan-Referenzen, die man durch Isolierung aus verschiedenen Früchten (vgl. 4.3.1) gewonnen hatte. Zur Ermittlung von massenspektrometrischen Daten war eine direkte Kopplung zwischen dem o. g. HPLC-System und dem Massenspektrometer aufgrund des hohen Ameisensäureanteils im Eluenten nicht möglich. Stattdessen wurden die im HPLC-System eluierenden Peaks fraktioniert und nach Lyophilisation separat mittels HPLC-MS/MS (vgl. 4.2.3, HPLC-MS/MS-System 3) untersucht.

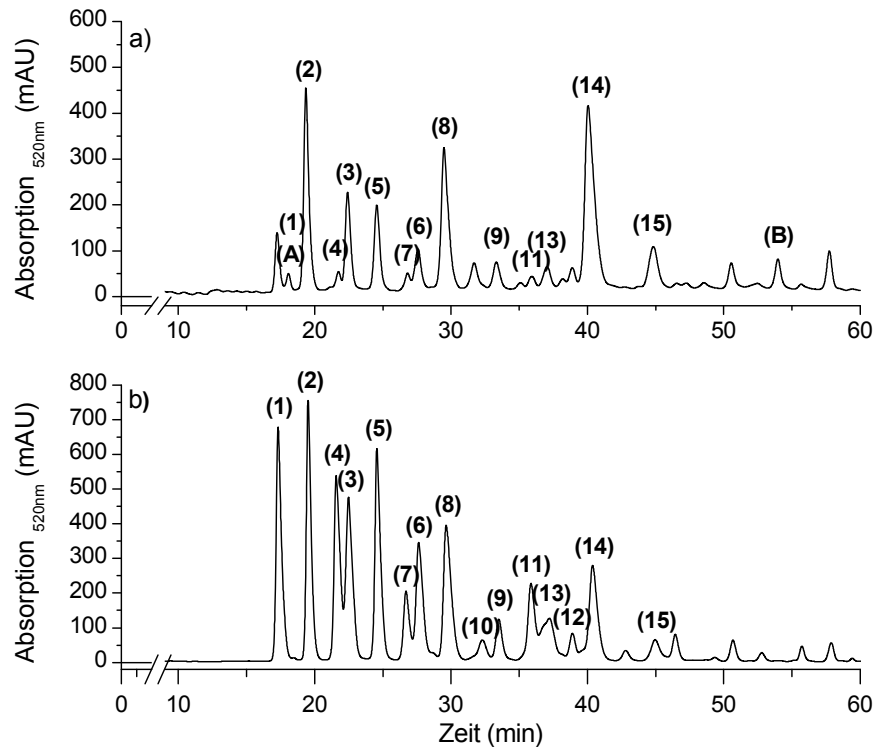


Abb. 3-1: HPLC-Chromatogramme von Anthocyanextrakten aus (a) gHB und (b) frischen Wildheidelbeeren *Vaccinium myrtillus* L. Detektion: $\lambda = 520$ nm. Peakzuordnung siehe Tabelle 3-1. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.2.2.1.

Parallel wurde der Anthocyanextrakt aus gHB direkt mittels HPLC-MS/MS-System 2 (vgl. 4.2.3) analysiert. Die Verwendung von 2,5 % Ameisensäure (v/v) als Eluent, der für MS einsetzbaren Maximalkonzentration, resultierte in einer Verschlechterung der Auflösung (Daten nicht gezeigt). Dennoch wurden mit dieser Methode weitere Minorcomponenten im Extrakt identifiziert, die jedoch keinem der in Abb. 3-1 gezeigten Peaks zugeordnet werden konnten. Die massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten im positiven Modus zur Detektion der bereits in Lösung vorliegenden Flavylumkationen $[M]^+$. Bei Fragmentierung dieser Precursor-Ionen unter Stoßaktivierung kam es zur Abspaltung der Zuckerreste als ungeladene Fragmente. Die detektierten ionischen Produktfragmente (MS^2) entsprachen den jeweiligen Aglyconen.

Tabelle 3-1 fasst die anhand von Retentionszeitvergleich mit Standardsubstanzen und massenspektrometrischen Daten im Extrakt aus gHB identifizierten Anthocyane zusammen; die angegebenen Retentionszeiten beziehen sich auf die Darstellung in Abb. 3-1 a).

Tabelle 3-1: HPLC-UV/Vis- und HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Charakterisierung der in den untersuchten gHB enthaltenen Anthocyane mit Retentionszeit (t_{ret}), Precursor-Ion ($[M]^+$), Produktionsfragmenten (MS^2) bei einer Stoßenergie von 25 eV. Die Retentionszeit bezieht sich auf die Angaben in Abb. 3-1 a). Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.2.2.1.

Anthocyan	t_{Ret} (min)	$[M]^+$ (m/z)	MS^2 (m/z (rel. Intensität, %))
Delphinidin-3-O-galactosid (1)	17,2	465,3	303,2 (100)
Delphinidin-hexose-pentose (A)	18,1	597,4	303,1 (100)
Delphinidin-3-O-glucosid (2)	19,4	465,2	303,2 (100)
Cyanidin-3-O-galactosid (4)	21,8	449,2	287,2 (100)
Delphinidin-3-O-arabinosid (3)	22,4	435,3	303,2 (100)
Cyanidin-3-O-glucosid (5)	24,6	449,2	287,2 (100)
Petunidin-3-O-galactosid (7)	26,8	479,2	317,2 (100)
Cyanidin-3-O-arabinosid (6)	27,6	419,2	287,2 (100)
Petunidin-3-O-glucosid (8)	29,5	479,2	317,2 (100)
Petunidin-3-O-arabinosid (9)	33,3	449,2	317,2 (100)
Peonidin-3-O-glucosid (11)	36,2	463,3	301,2 (100)
Malvidin-3-O-galactosid (13)	37,5	493,3	331,2 (100)
Malvidin-3-O-glucosid (14)	40,1	493,2	331,2 (100)
Malvidin-3-O-arabinosid (15)	44,8	463,2	331,2 (100)
Petunidin-pentose	-	449,2	317,2 (100)
Peonidin-pentose	-	433,2	301,2 (100)
Malvidin-pentose (B)	54,0	463,2	331,2 (100)

Die charakteristische Anthocyanzusammensetzung von frischen Wildheidelbeeren *Vaccinium myrtillus* L., zum Vergleich in Abb. 3-1 b) dargestellt, besteht aus 15 Haupt-Anthocyanen (3-Galactoside, 3-Glucoside und 3-Arabinoside von Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Peonidin, Malvidin) (Baj *et al.*, 1983). Diese Verbindungen wurden mit Ausnahme der Minorbestandteile Peonidin-3-O-galactosid und Peonidin-3-O-arabinosid auch im Extrakt aus gHB identifiziert (Abb. 3-1 a)). Allerdings waren im Vergleich zum Anthocyanprofil von *V. myrtillus* L. deutliche Unterschiede in den Peakflächen und somit im Verhältnis der einzelnen Anthocyane erkennbar. Im Extrakt aus gHB wurden zudem weitere Minoranthocyane nachgewiesen, bei denen es sich um eine Delphinidin-hexose-pentose (Abb. 3-1, Peak (A)) sowie um verschiedene Anthocyanpentosen, vermutlich Anthocyanxyloside (Abb. 3-1, Peak (B), Petunidin-pentose, Peonidin-pentose) handelt.

Der Gehalt der in gHB enthaltenen Anthocyane wurde mittels HPLC-UV/Vis ermittelt. Es erfolgte eine externe Kalibrierung unter Verwendung der authentischen Anthocyan-Referenzen (vgl. 4.3.1). Die untersuchten gHB wiesen einen Gesamtanthocyanengehalt von 378 mg/100 g TM auf (Tabelle 3-2). Frische Wildheidelbeeren *V. myrtillus* L. sind durch deutlich höhere Anthocyanengehalte von bis zu 5400 mg/100 g TM gekennzeichnet (Lätti *et al.*, 2008).

Bei Vergleich mit Daten aus einer Studie von Lätti *et al.* (2009) zeigte sich, dass das Anthocyanprofil der untersuchten gHB starke Ähnlichkeit mit dem der Wildheidelbeerart *Vaccinium arctostaphylos* L. aufweist, die im Nordosten der Türkei heimisch ist. Im Gegensatz zu *V. myrtillus* L. enthält diese Art mit einem Delphinidin-sambubiosid ebenfalls eine Delphinidin-hexose-pentose, außerdem wurden Delphinidin-, Petunidin-, Peonidin- und Malvindinxyloside nachgewiesen. Zudem sind *V. arctostaphylos* L.-Früchte durch einen geringeren Anthocyanengehalt als *V. myrtillus* L. charakterisiert (Lätti *et al.*, 2009).

Aufgrund der festgestellten Unterschiede muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei der untersuchten, aus der Türkei stammenden gHB-Handelsware nicht, wie für die Arzneidroge *Myrtilli fructus* typisch, um *V. myrtillus* L., sondern um *V. arctostaphylos* L. handelt.

Lätti *et al.* (2009) bestimmten in 5 verschiedenen *V. arctostaphylos* L.-Sorten Anthocyanengehalte im Bereich von 1299 - 1592 mg/100 g TM. Im Vergleich zeigte sich, dass vor allem die Konzentration an Delphinidin- und Cyanidin-glycosiden sowie Petunidin-3-glucosid im vorliegenden getrockneten Beerenmaterial vermindert ist. Als Ursachen hierfür sind Schwankungen im Anthocyanengehalt denkbar, die durch unterschiedliche Bedingungen während des Wachstums wie z.B. Temperatur, Licht, Feuchtigkeit, Düngung sowie durch sortenspezifische Unterschiede hervorgerufen werden (Kähkönen *et al.*, 2003). Auch der Reifegrad der Beeren kann einen Einfluss zeigen, da der Anthocyanengehalt im Verlauf der Reifung zunimmt (Kalt und McDonald, 1996). Anthocyan-Abbau infolge des Trocknungsprozesses stellt einen weiteren möglichen Einflussfaktor dar, da festgestellt wurde, dass eine Lufttrocknung bei 40°C für 72 h zu einer mehr als 50 %igen Reduzierung im Anthocyanengehalt von Heidelbeeren führen kann (Michalczyk *et al.*, 2009). Verschiedene Faktoren wie Polyphenoloxidase-Aktivität, Gehalt an organischen Säuren und Zuckern, pH-Wert sowie Anthocyanstruktur beeinflussen ebenfalls einen Abbau (de Ancos *et al.*, 2000).

Tabelle 3-2: Vergleich der ermittelten Anthocyangehalte in gHB sowie von Literaturdaten zum Anthocyangehalt von *V. arctostaphylos* L. (Lätti *et al.*, 2009). Angabe in mg/100 g TM \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.2.2.1.

Anthocyan	gHB	<i>V. arctostaphylos</i> L. (Lätti <i>et al.</i> , 2009)
	Gehalt (mg/100 g TM)	
Delphinidin-3-O-galactosid (1)	9,5 \pm 0,6	80 \pm 13
Delphinidin-3-O-glucosid (2)	44 \pm 4	288 \pm 8
Delphinidin-3-O-arabinosid (3)	18 \pm 2	156 \pm 13
Delphinidin-hexose-pentose (A) ¹	5,0 \pm 0,3	9 \pm 4
Cyanidin-3-O-galactosid (4)	4,8 \pm 0,2	37 \pm 24
Cyanidin-3-O-glucosid (5)	33 \pm 3	117 \pm 43
Cyanidin-3-O-arabinosid (6)	11 \pm 1	76 \pm 17
Petunidin-3-O-galactosid (7)	6,7 \pm 0,6	18 \pm 5
Petunidin-3-O-glucosid (8)	44 \pm 4	199 \pm 9
Petunidin-3-O-arabinosid (9)	21 \pm 2	32 \pm 6
Peonidin-3-O-glucosid (11)	7,6 \pm 0,6	31 \pm 15
Malvidin-3-O-galactosid (13)	11 \pm 1	23 \pm 6
Malvidin-3-O-glucosid (14)	89 \pm 8	231 \pm 33
Malvidin-3-O-arabinosid (15)	61 \pm 10	26 \pm 8
Malvidin-pentose (B) ¹	11 \pm 2	12 \pm 4 ²
Gesamt	384	1314

¹ quantifiziert als Cyanidin-3-glucosid-Äquivalent; ² Peonidin-/Malvidin-Xylosid

3.1.2 Bestimmung von Profil und Gehalt von Flavonolen, Flavan-3-olen und phenolischen Säuren

Zur Untersuchung von Nicht-Anthocyan-Polyphenolen in gHB wurden diese nach Määttä-Riihinen *et al.* (2004) mit Ethylacetat extrahiert und anschließend mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Diodenarray-Detektion (HPLC-DAD) und HPLC-DAD-ESI-MS/MS (vgl. 4.2.1, HPLC-System 5 und 4.2.3, HPLC-MS/MS-System 4) analysiert. Die Identifizierung der enthaltenen Verbindungen erfolgte durch Retentionszeitvergleich mit Standardsubstanzen sowie anhand der spektroskopischen und massenspektrometrischen Daten. Tabelle 3-3 zeigt die charakteristischen Parameter der in gHB nachgewiesenen Verbindungen.

Tabelle 3-3: HPLC-DAD- und HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Charakterisierung der in den gHB enthaltenen Polyphenole mit Retentionszeit (t_{Ret}), Absorptionsmaximum (Λ_{max}), Precursor-Ion ($[M-H]^-$), Produktionenfragmenten (MS^2) und der zur Fragmentierung eingesetzten Stoßenergie. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.2.2.2.

	t_{Ret} (min)	Λ_{max} (nm)	$[M-H]^-$ (m/z)	MS^2 (m/z (rel. Intensität, %))	eV
Gallussäure (16)	12,3	272	169,4	125,3 (100),	20
Protocatechusäure (17)	16,7	260	153,2	109,2 (100), 108,2 (80)	30
Syringasäure (18)	23,4	276	197,0	182,1 (100), 123,2 (80), 167,1 (70)	25
Chlorogensäure (19)	21,1	326	353,3	191,2 (100), 179,4 (10)	25
Kaffeesäure (20)	23,8	324	179,3	135,3 (100)	25
<i>p</i> -Cumarsäure (21)	28,6	310	163,3	119,2 (100)	25
Quer-3-gal (22)	29,6	354	463,2	300,2 (100), 301,1 (40)	30
Quer-3-glc (23)	29,9	354	463,2	300,2 (100), 301,1 (50)	30
Quer-3-rha (24)	32,2	350	446,8	300,2 (100), 301,2 (20)	30
Quercetin (26)	40,5	370	301,1	151,2 (100); 179,1 (40)	30

Die Quantifizierung der Verbindungen erfolgte anhand des Absorptionssignals mittels externer Kalibrierung mit Referenzsubstanzen. Hydroxymethylsäuren wurden bei 320 nm, Flavonole bei 360 nm und Hydroxybenzoesäuren bei 260 nm oder 280 nm erfasst. In Abb. 3-2 sind die so ermittelten Polyphenolgehalte zusammengestellt.

Neben Anthocyanen wurden in den untersuchten gHB als weitere phenolische Bestandteile verschiedenen Hydroxybenzoesäuren, Hydroxymethylsäuren und Flavonole identifiziert. Mono- und dimere Flavan-3-ole waren nicht nachweisbar. Die Untersuchung von polymeren Proanthocyanidinen wird in Abschnitt 3.1.3 beschrieben.

Mit 147 ± 5 mg/100 g TM und 73 ± 1 mg/100 g TM stellen Chlorogensäure und Protocatechusäure die Hauptkomponenten dar (Abb. 3-2). Ein Gesamtgehalt an Nicht-Anthocyan-Polyphenolen von 288 ± 8 mg/100 g TM wurde ermittelt. Somit sind phenolische Säuren und Flavonole in vergleichbaren Gehalten wie Anthocyane (384 mg/100 g TM, Tabelle 3-2) in den untersuchten gHB enthalten, sie stellen ebenfalls potentielle Wirkkomponenten dar. Ein Effekt von Quercetin-3-rhamnosid auf die experimentelle Colitis bei Ratten wurde im übrigen bereits nachgewiesen (DeMedina *et al.*, 1996; Camuesco *et al.*, 2004)

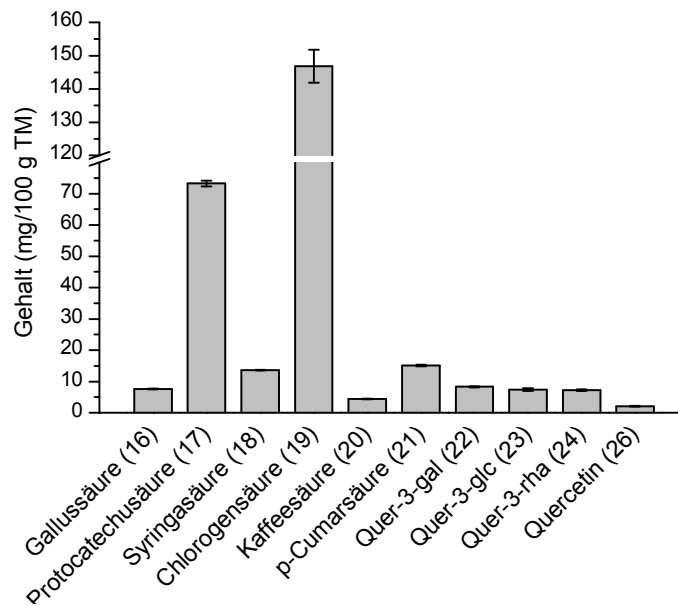


Abb. 3-2: Mittels HPLC-DAD ermittelte Gehalte an phenolischen Säuren und Flavonolen in gHB. Angabe in mg/100 g TM. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.2.2.2.

Beeren der Gattung *Vaccinium* sind durch eine Polyphenolverteilung charakterisiert, die neben Anthocyanen üblicherweise aus Hydroxyzimtsäuren sowie Flavonolen und zu geringeren Anteilen aus Hydroxybenzoesäuren besteht. Einige Arten wie *V. vitis idaea* L. und *V. oxycoccos* L. weisen zudem hohe Gehalte an Flavan-3-olen und Procyanidinen auf (Kähkönen *et al.*, 2001; Taruscio *et al.*, 2004). Chlorogensäure stellt mit Gehalten von 50 - 100 mg/100 g FW in den Arten *V. corymbosum* L. und *V. angustifolium* Ait. das bedeutendste farblose Polyphenol dar (Gao und Mazza, 1994; Cho *et al.*, 2004). Auch in *V. myrtillus* L.-Früchten dominiert Chlorogensäure innerhalb der phenolischen Säuren (Brenneisen und Steinegger, 1981a; Brenneisen und Steinegger, 1981b). Gesamtgehalte an Nicht-Anthocyan-Polyphenolen im Bereich von 200 - 1400 mg/100 g TM werden für diese Früchte beschrieben (Kähkönen *et al.*, 2001).

Das Polyphenolprofil der von uns untersuchten gHB, das neben Anthocyanen aus Hydroxyzimt- und Hydroxybenzoesäuren sowie Flavonolen besteht, ist somit typisch für *Vaccinium*-Früchte. Auch die bestimmten Polyphenolgehalte liegen im o. g. charakteristischen Konzentrationsbereich. Die einzige Auffälligkeit stellt der vergleichsweise hohe Gehalt an Hydroxybenzoesäuren dar. Dies kann auf sortenspezifische Unterschiede zurückgeführt werden. So wurden im Gegensatz zu anderen *Vaccinium*-Arten in *V. parvifolium* Hydroxybenzoesäuren in höheren Anteilen als Hydroxyzimtsäuren und Flavonole nachgewiesen (Taruscio *et al.*, 2004). Auch eine durch die Trocknung der Beeren hervorgerufene Erhöhung des Gehalts infolge Freisetzung von gebundenen Hydroxybenzoesäuren ist möglich. Dieser Effekt wurde

z.B. bei der Trocknung von Datteln beschrieben (Al-Farsi *et al.*, 2005). Auch eine Entstehung als Produkt des Anthocyanabbaus ist nicht auszuschließen (Adams, 1973).

Im vorherigen Abschnitt 3.1.1 wurde diskutiert, dass es sich bei den untersuchten gHB nicht, wie für die pharmazeutische Droge typisch, um *V. myrtillus* L., sondern um *V. arctostaphylos* L.-Früchte handeln dürfte. Diese Annahme wird durch die Analytik der weiteren Polyphenole bestätigt, da in den untersuchten Beeren ähnliche Gehalte von Anthocyanen und farblosen Polyphenolen bestimmt wurden. *V. myrtillus* L.-Früchte sind dagegen durch einen bis zu 20-fach höheren Anthocyangehalt charakterisiert (Kähkönen *et al.*, 2001; Määttä-Riihinen *et al.*, 2004).

Phenolische Säuren in *V. arctostaphylos* L.-Beeren wurden von Ayaz *et al.* (2005) untersucht. Die Autoren identifizierten 13 Verbindungen, wobei in Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten Kaffee-, Chlorogen- und *p*-Cumarsäure, gefolgt von Protocatechu-, Syringa- und Salicylsäure Hauptkomponenten der freien phenolischen Säuren darstellten. Im Vergleich zu anderen Vaccinium-Früchten und den untersuchten Beeren sind die in dieser Studie in *V. arctostaphylos* L. bestimmten Gehalte an phenolischen Säuren allerdings um Faktor 1000 geringer (Taruscio *et al.*, 2004; Ayaz *et al.*, 2005).

3.1.3 Bestimmung von kondensierten Gerbstoffen

Der Gehalt an kondensierten Gerbstoffen in gHB wurde in Anlehnung an Guyot *et al.* (2001) mittels Thiolyse-Methode untersucht. Dazu wurde das feinzerkleinerte, getrocknete Beerenmaterial mit Benzylmerkaptan umgesetzt. Abb. 3-3 zeigt den Reaktionsablauf. Benzylmerkaptan agiert als Nukleophil und spaltet die Bindungen zwischen C4 und C8 der Procyanidinuntereinheiten, wobei es zur Freisetzung von Catechin, Epicatechin sowie ihren Benzylthioetheraddukten kommt. Die Retentionszeiten letztgenannter Reaktionsprodukte wurden durch Umsetzung einer Procyanidin-Referenzmischung (B₁, B₂, B₃, B₄) bestimmt.

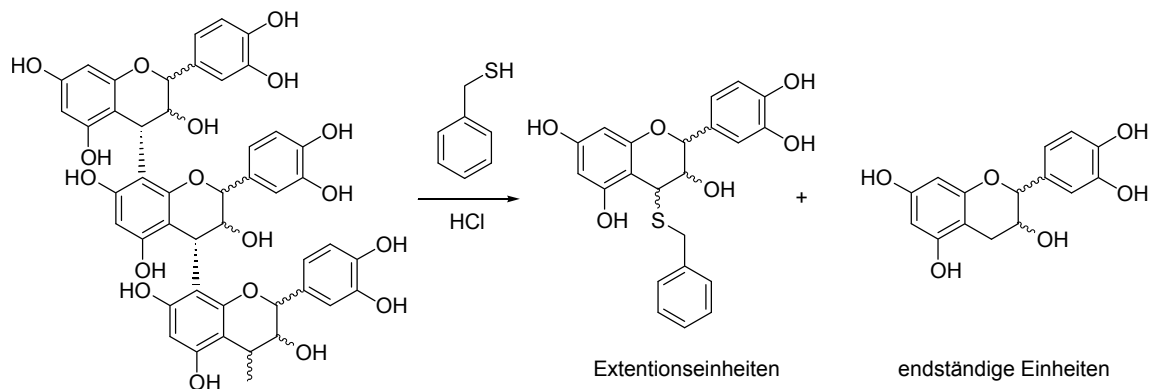


Abb. 3-3: Thiolytische Spaltung von kondensierten Tanninen mittels Benzylmercaptan als nukleophiles Reagenz (modifiziert nach Hümmer, 2009).

Bei Thiolyse der gHB wurden Catechin, Epicatechin und Epicatechinthioether freigesetzt. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte mittels HPLC-DAD (vgl. 4.2.1, HPLC-System 5) durch Vergleich der Retentionszeiten und UV-Spektren mit Catechin- und Epicatechin-Standardsubstanzen bzw. den Daten aus der Umsetzung eines Procyanidin-Referenzgemisches.

Der Gehalt an kondensierten Gerbstoffen wurde mittels externer Kalibrierung als Summe der Gehalte an Catechin, Epicatechin und Epicatechinbenzylthioether erfasst (Ramirez-Coronel *et al.*, 2004). Epicatechin wurde zur Quantifizierung des Benzylthioethers verwendet (Gu *et al.*, 2002). Auf diese Weise wurde in gHB ein Gesamtgehalt an kondensierten Gerbstoffen von $2,23 \pm 0,05$ g/100 g TM ermittelt. In guter Übereinstimmung bestimmten Gu *et al.* (2002) mittels Normal-Phasen-HPLC einen Gesamtprocyanidingehalt in Heidelbeeren von 1,9 g/100 g TM. Ein ähnlicher Gesamtproanthocyaningehalt von 1,07 g/100 g TM wurde mittels Thiolyse im frischen *V. vitis-idaea* L.-Früchten gefunden (Hellstrom und Mattila, 2008). Kondensierte Gerbstoffe sind somit in dreifach höherer Konzentration als monomere Polyphenole (Anthocyane, phenolische Säuren, Flavonole, vgl. 3.1.1 und 3.1.2) in gHB enthalten. Ein Effekt dieser Polyphenolkategorie bei akuter Diarrhöe sowie ulcerativer Colitis wurde beschrieben (Loeb *et al.*, 1989; Huber *et al.*, 2007). In Verbindung mit dem hohen nachgewiesenen Gehalt dürfte es sich hierbei um Inhaltsstoffe mit hohem Wirkpotential handeln.

Gallotannine, die zweite Gerbstoffklasse, wurden nicht untersucht, da Heidelbeeren vorwiegend kondensierte Gerbstoffe enthalten (Foo und Porter, 1981).

3.1.4 Bestimmung der Gesamtzusammensetzung von getrockneten Heidelbeeren

Um neben den Daten zu Polyphenolen weitere Informationen zu potentiellen Wirkkomponenten zu erhalten, wurden Untersuchungen zur Gesamtzusammensetzung der Beeren durchgeführt. Neben den Nährstoffbestandteilen Fett, Protein, Zucker (Glucose, Fructose, Saccharose) sowie Ballaststoffen wurden die Gehalte an organischen Säuren (Citronensäure, L-Äpfelsäure, L-Ascorbinsäure) sowie Asche untersucht (Abb. 3-4). Zur Standardisierung der Daten wurden diese auf die Trockenmasse bezogen. Der Trockenmassegehalt der untersuchten gHB betrug $91,4 \pm 0,1$ g/100 g FW.

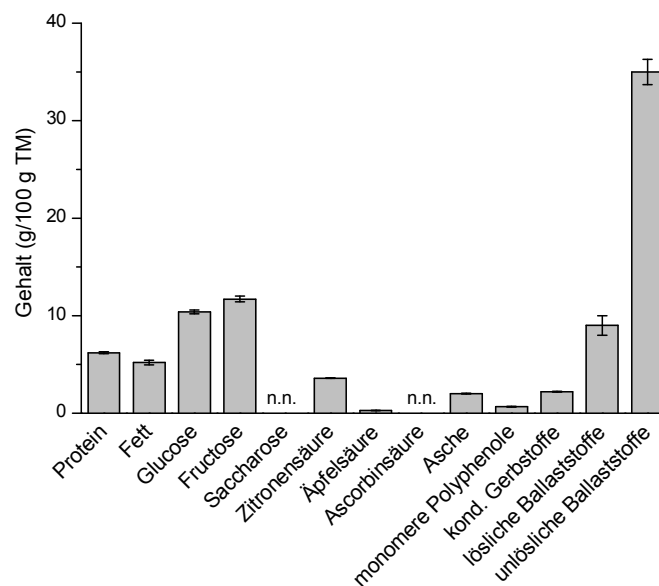


Abb. 3-4: Gehalte an Nährwertbestandteilen sowie Asche, organischen Säuren und Polyphenolen in gHB. n.n. - nicht nachweisbar. Monomere Polyphenole: Anthocyane, Flavonole, phenolische Säuren, vgl. Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2. Angaben in g/100 g TM. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.2.3.

Lösliche und unlösliche Ballaststoffe stellten mit 44 ± 2 g/100 g TM die Hauptkomponenten in gHB dar und werden somit beim Verzehr der Beeren in hohen Dosen zugeführt. Im Vergleich mit Literaturdaten von frischen Heidelbeeren weisen die gHB einen erhöhten Ballaststoffgehalt auf (Saarivirta und Kreula, 1979; Mongeau und Brassard, 1989; Souci *et al.*, 2000). Untersuchungen zur Zusammensetzung der Ballaststofffraktion werden in Abschnitt 3.1.5 beschrieben.

Neben den Ballaststoffen stellten die freien Zucker, Glucose ($10,4 \pm 0,2$ g/100 g TM) und Fructose ($11,7 \pm 0,3$ g/100 g TM), dominierende Bestandteile in den untersuchten gHB dar. Wie in Tabelle 3-4 zusammengefasst ist, werden für frische *Vaccinium-*

Beeren jedoch i. A. höhere Zuckergehalte beschrieben. Der Zuckergehalt in Beerenfrüchten ist abhängig vom Reifegrad und steigt im Verlauf der Reifung an (Kalt und McDonald, 1996; Ayaz *et al.*, 2001). Der im Vergleich zu Literaturdaten festgestellte Unterschied kann also daraus resultieren, dass die zur Trocknung verwendeten Beeren nicht völlig reif waren.

Die quantifizierten organischen Säuren Citronen- und Äpfelsäure sind typisch für Beerenfrüchte (Kalt und McDonald, 1996; Souci *et al.*, 2000; Ayaz *et al.*, 2001). Wie für Erdbeeren beschrieben, wird die in den frischen Beeren außerdem vorkommende Ascorbinsäure während des Trocknungsprozesses abgebaut (Asami *et al.*, 2003).

Tabelle 3-4: Zuckergehalt in frischen Früchten der Gattung *Vaccinium*.

	Glucose	Fructose	Literatur
	(g/100 g TM)		
<i>V. myrtillus L.</i>	16,1	21,8	(Souci <i>et al.</i> , 2000)
<i>V. myrtillus L.</i>	32,9	32,9	(Ayaz <i>et al.</i> , 2001)
<i>V. vitis-idaea L.</i>	20,5	19,8	(Souci <i>et al.</i> , 2000)
<i>V. arctostaphylos L.</i>	26,2	25,3	(Ayaz <i>et al.</i> , 2001)

3.1.5 Bestimmung der Zusammensetzung der Ballaststofffraktion von getrockneten Heidelbeeren

Gemäß Angaben in Abschnitt 3.1.4 stellen Ballaststoffe den Hauptbestandteil von gHB dar. Laut Definition der American Association of Cereal Chemists (AACC) handelt es sich dabei um Bestandteile essbarer Pflanzen oder analoge Kohlenhydrate, die gegenüber der Verdauung und Absorption im menschlichen Dünndarm resistent sind und im Dickdarm teilweise oder vollständig fermentiert werden. Ballaststoffe beinhalten Polysaccharide (Cellulose, Hemicellulose, Pektin), Oligosaccharide, Lignin und assoziierte Pflanzensubstanzen (Wachse, Cutin, Suberin) (DeVries, 2003). Für Ballaststoffe wurde ein Potential in der Therapie von CED beschrieben (Glavez *et al.*, 2005). Zudem steht die Stoffklasse in Zusammenhang mit zahlreichen weiteren gesundheitsfördernden Effekten wie z.B. einer Senkung des Serumcholesterol- und Blutzuckerspiegels, verbesserter Darmfunktion und der Verringerung des Darmkrebsrisikos (Anderson *et al.*, 1994). Aufgrund dieser biologischen Aktivität, des hohen Anteils in gHB sowie der komplexen Zusammensetzung wurde die Ballaststofffraktion aus gHB näher untersucht.

Die Ballaststofffraktion aus gHB wurde in Anlehnung an die gravimetrische Ballaststoffbestimmung (L 00.00-18, Januar 1997, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFBG) sowie *Hilz et al. (2005)* durch Extraktion mit 80 %igem Ethanol (v/v) isoliert. Da aus Kostengründen auf eine Proteasebehandlung im Vorfeld der Extraktion verzichtet wurde, enthielt diese als ethanolunlöslicher Rückstand (EUR) bezeichnete Fraktion neben Ballaststoffen auch 10,5 % Protein (Abb. 3-7).

Um die Zusammensetzung der Saccharidfraktion des EUR zu bestimmen, wurde mit Schwefelsäure hydrolysiert. Die neutralen Monosaccharide im Hydrolysat wurden anschließend zu Alditolacetaten derivatisiert und gaschromatographisch untersucht (Englyst und Cummings, 1988). Die Identifizierung der Alditolacetatpeaks erfolgte mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS, vgl. 4.2.4, GC-MS-System 1) durch Retentionszeitvergleich mit derivatisierten Standardsubstanzen sowie anhand von massenspektrometrischen Daten. Wie Abb. 3-5 zeigt, wurden als Neutralzucker Arabinose, Xylose, Mannose, Glucose und Galactose sowie als Minor-komponenten Rhamnose und Fucose im Hydrolysat aus gHB identifiziert.

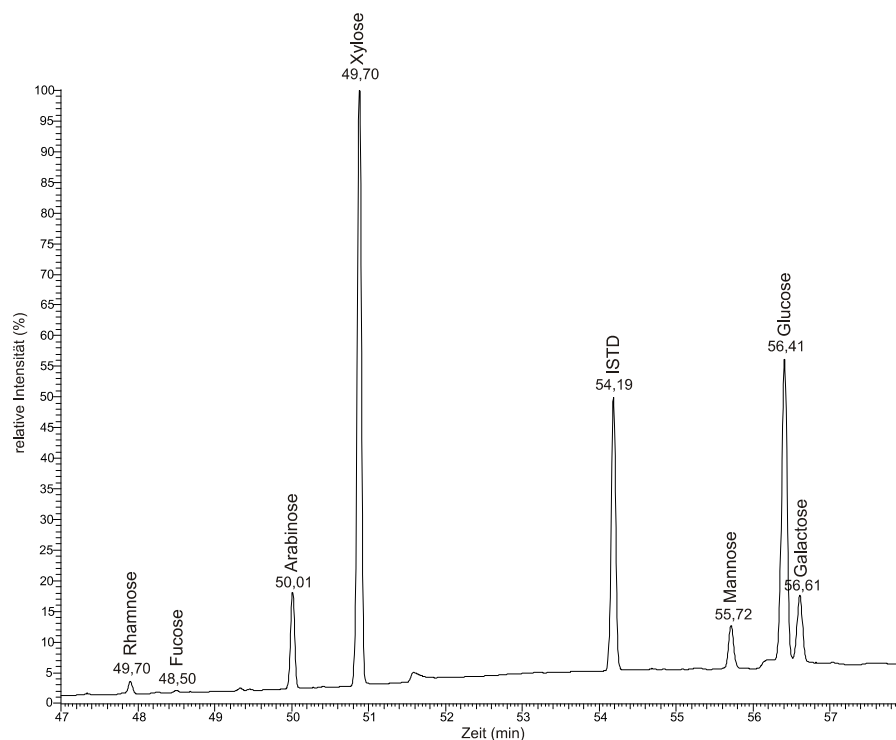


Abb. 3-5: GC-MS-Chromatogramm (Ausschnitt) der Monosaccharide im ethanolunlöslichen Rückstand aus gHB, bestimmt nach Hydrolyse und Derivatisierung. Alditolacetate wurden mit dem Namen des entsprechenden Glycosids bezeichnet. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.2.5.4.

Die Quantifizierung der Neutralzucker wurde mittels Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID, vgl. 4.2.5, GC-FID System 1) durchgeführt. Der Gehalt an Uronsäuren wurde photometrisch bestimmt (Blumenkrantz und Asboe-Hansen,

1973). Mit der angewandten Methode lässt sich nicht zwischen den einzelnen Urnsäuren unterscheiden. Für Wildheidelbeeren *V. myrtillus* L. wird das überwiegende Vorkommen von Galacturonsäure beschrieben (Hilz *et al.*, 2005), weshalb die Kalibrierung mit diesem Saccharid erfolgte. Abb. 3-6 fasst die Monosaccharidgehalte in der Ballaststofffraktion aus gHB zusammen. Glucose und Xylose sowie Galacturonsäure stellen die dominierenden Bestandteile dar, was auf hohe Cellulose-, Xyloglycan- und Pektingehalte im EUR und somit in der Ballaststofffraktion hindeutet. Hilz *et al.* (2005) untersuchten Zellwandpolysaccharide von frischen Heidelbeeren *V. myrtillus* L. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Daten wurden in dieser Studie ebenfalls überwiegend Glucose (35 %), Xylose (29 %) und Galacturonsäure (21 %) als Bestandteile der Zellwandbausteine nachgewiesen. Eine vergleichbare Monosaccharidzusammensetzung in der Ballaststofffraktion von frischen Blaubeeren wurde auch von Mongeau und Brassard (1989) ermittelt.

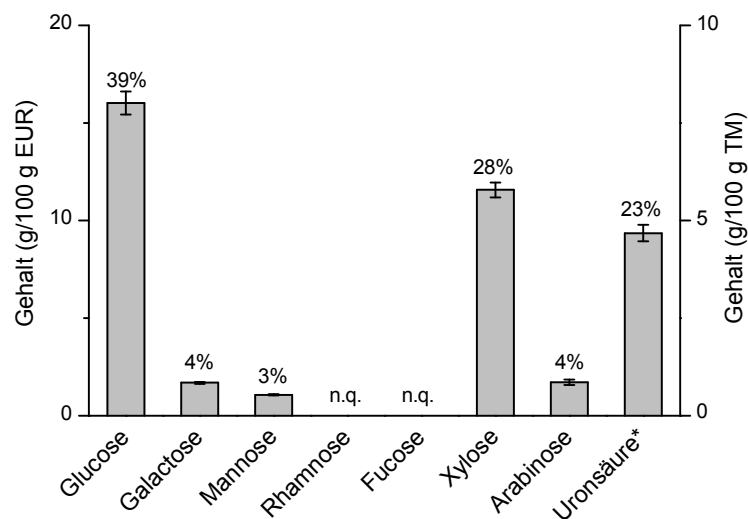


Abb. 3-6: Monosaccharid-Zusammensetzung des ethanolunlöslichen Rückstands aus gHB. Angabe in % - Anteil am Gesamtzucker. n.q. - nicht quantifiziert. *als Galacturonsäure-Äquivalente. Angaben in g/100 g EUR oder TM. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitte 4.3.2.5.4, 4.3.2.5.5.

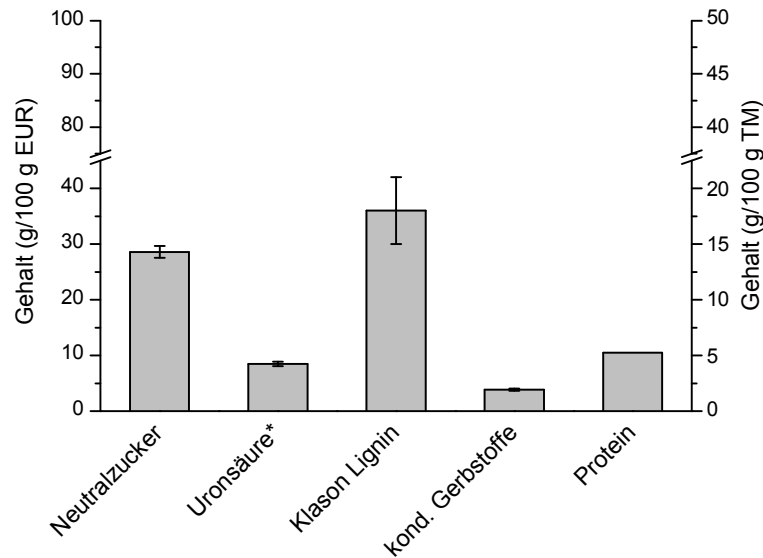


Abb. 3-7: Zusammensetzung des ethanolunlöslichen Rückstands aus gHB sowie Gehalt der Ballaststoffkomponenten bezogen auf die Trockenmasse der gHB. *als Galacturonsäure-Äquivalente. Angaben in g/100 g EUR oder TM. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.2.5.

Im EUR liegen die Zucker nicht als Monosaccharide vor, sondern, wie bereits ausgeführt, wahrscheinlich überwiegend in Form von Cellulose, Xyloglycanen und Pektinen. Um den Anteil dieser Oligo- und Polysaccharide am EUR zu berechnen, muss der Wasserverlust bei Knüpfung einer glycosidischen Bindungen durch Korrekturfaktoren (für Hexosen 0,90, für Pentosen 0,88; für Uronsäuren 0,91) berücksichtigt werden (Marlett und Vollendorf, 1994). Die in den untersuchten gHB ermittelten Gehalte an Neutralzucker- und Uronsäurepolymeren zeigt Abb. 3-7.

Der Rückstand nach der Entfernung der Zellwandpolysaccharide durch Hydrolyse wurde gravimetrisch als sog. Klason-Lignin erfasst (Abb. 3-7). Bei Klason-Lignin handelt es sich um einen Parameter zur Abschätzung des Ligningehalts, da mit der Ligninmatrix verknüpfte Strukturproteine, Tannine, Wachse sowie unverdauliche Maillard-Reaktionsprodukte mit erfasst werden (Mongeau und Brooks, 2001). Klason-Lignin und Zellwandpolysaccharide sind mit jeweils ca. 36 % in ähnlichen Anteilen in der Ballaststofffraktion enthalten und stellen die Hauptkomponenten dar.

Marlett (1992) fand bei der Untersuchung von Heidelbeeren einen Ballaststoffgehalt von 18,5 g/100 g TM sowie einen Klason-Lignin-Gehalt von 6,2 g/100 g TM. Diese Werte liegen deutlich unter den in dieser Studie bestimmten Gehalten von 44 ± 2 g/100 g TM und 18 ± 6 g/100 g TM (vgl. Abb. 3-4, Abb. 3-7). Als Ursachen hierfür sind sortenspezifische Unterschiede bzw. die Verwendung verschiedener analytischer Methoden anzunehmen. Mit 33 % stimmt der Lignin-Anteil an der Ballaststofffraktion jedoch gut mit den von uns ermittelten Ergebnissen überein.

In Übereinstimmung mit den dargestellten Ergebnissen identifizierten Waver *et al.* (2006) mittels NMR ebenfalls Cellulose, Hemicellulose, Pektine sowie Lignin als dominierende Bestandteile in der Ballaststofffraktion aus Heidelbeeren.

Die über die Ballaststofffraktion der gHB zugeführten Lignine und Neutralzucker werden im Colon zu Enterolignanen (Enterolacton, Enterodiol) und kurzkettigen Fettsäuren metabolisiert (Mortensen und Clausen, 1996; Begum *et al.*, 2004). Diese Verbindungen werden im Zusammenhang mit anticancerogenen und antiinflammatorischen Effekten im Darm diskutiert (Stonerook *et al.*, 1996; Adlercreutz, 2007). Lignine und Saccharide könnten somit, v. a. im Hinblick auf die hohen zugeführten Mengen, ebenfalls potentielle Wirkstoffkomponenten in gHB darstellen.

Saura-Calixto *et al.* (1991) wiesen darauf hin, dass auch kondensierte Gerbstoffe in der Ballaststofffraktion enthalten sind. Infolgedessen wurden diese Polyphenole von uns ebenfalls erfasst. Die Quantifizierung erfolgte mittels Thiolyse, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben. Ein im Gegensatz zu den anderen Bestandteilen geringer Gehalt von $1,6 \pm 0,2$ g/100 g TM wurde ermittelt (Abb. 3-7). Bei Vergleich mit der Gesamtzusammensetzung der gHB (Abb. 3-4) wird deutlich, dass die bestimmten kondensierten Tannine größtenteils in der Ballaststofffraktion enthalten sind. Wie Abb. 3-7 zeigt, kommen sie aber in geringeren Mengen als die anderen Ballaststoffbestandteile vor.

3.1.6 Bestimmung von Hydroxymethylfurfural in getrockneten Heidelbeeren

Die untersuchten Heidelbeeren wurden bei der Verarbeitung einer Trocknung unterzogen. Für die Droge *Myrtillus Fructus* ist dabei eine Lufttrocknung im Schatten oder unter künstlicher Wärmezufuhr üblich (Blaschek *et al.*, 2006). Durch thermische Belastung kommt es in Lebensmitteln z.B. infolge Karamellisierung oder Maillard-Reaktion zu chemischen Veränderungen der Inhaltsstoffe, die den Nährwert und die sensorische Qualität beeinflussen, aber auch zur Entstehung von potentiell mutagenen und kanzerogenen Verbindungen führen. Bei 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) handelt es sich um eine Verbindung, die als Produkt der Maillard-Reaktion oder durch Abbau von Hexosen unter schwach sauren Bedingungen entsteht und deren Bildung durch Erhitzung stark beschleunigt wird (Ledl und Schleicher, 1990; Kroh, 1994). HMF wird deshalb als Indikator für eine Qualitätsminderung durch übermäßige Erhitzung oder Lagerung bei verschiedenen kohlenhydrathaltigen Lebensmitteln, u. a. getrockneten Früchten, betrachtet (Vinas *et al.*, 1992; Rada-Mendoza *et al.*, 2002; Murkovic und

Pichler, 2006; Rufian-Henares *et al.*, 2008). Das toxikologische Potential von HMF wurde bisher noch nicht abschließend bewertet. In hohen, für die Aufnahme über Lebensmittel meist nicht relevanten Konzentrationen ist die Verbindung zytotoxisch und ruft Irritationen von Augen, Haut, Respirationstrakt und Schleimhäuten hervor. Im Tiermodell wurde zudem ein mutagenes Potential gezeigt (Zhang *et al.*, 1993). Epidemiologische Daten, die einen Zusammenhang beschreiben zwischen der HMF-Aufnahme und einem erhöhten Krebsrisiko beim Menschen sowie Informationen zur chronischen Kanzerogenität der Verbindung fehlen noch (Severin *et al.*, 2010).

Um die Auswirkungen des Trocknungsprozesses auf die untersuchten gHB zu evaluieren, wurde demzufolge HMF als Indikator erfasst. Die Identifizierung der Verbindung erfolgte durch Vergleich von Retentionszeit und UV-Spektrum mit der Referenzsubstanz sowie anhand von massenspektrometrischen Daten. Der Gehalt des Erhitzungsindikators wurde mittels HPLC-DAD (vgl. 4.2.1, HPLC-System 4) quantifiziert.

Die von uns untersuchte gHB-Handelsware wies einen HMF-Gehalt von $7,9 \pm 0,2$ mg/100 g TM auf, der durch ca. einjährige Lagerung bei Raumtemperatur auf einen Wert von $18,0 \pm 0,9$ mg/100 g TM anstieg.

Murkovic *et al.* (2006) untersuchten verschiedene getrocknete Früchte (Aprikosen, Pfirsiche, Birnen, Pflaumen, Datteln, Feigen, Ananas, Apfel) und fanden stark schwankende HMF-Gehalte im Bereich von 0,1 bis 220 mg/100 g. In einer Studie zu HMF-Gehalten in Lebensmitteln aus Norwegen wurden für Rosinen und Dörripflaumen Werte von 0,5 mg/100 g und 23,7 mg/100 g beschrieben (Husoy *et al.*, 2008). Viele andere erhitzte Lebensmittel (Brot, Kekse, Konfitüren, getrocknetes Gemüse) wiesen dagegen HMF-Anteile unter 0,1 mg/100 g auf (Husoy *et al.*, 2008). Ursache für die hohen HMF-Gehalte in getrockneten Früchten sind der hohe Zuckergehalt sowie die lange Trocknung bei erhöhten Temperaturen (Muratore *et al.*, 2006; Murkovic und Pichler, 2006). Die große Spannweite innerhalb der untersuchten Früchte wird auf individuelle Unterschiede bei den Trocknungsbedingungen sowie auf unterschiedliche Zusammensetzungen zurückgeführt (Murkovic und Pichler, 2006).

Der HMF-Gehalt in den untersuchten gHB lag in einem für getrocknete Früchte üblichen Bereich. Der hohe Betrag zeigt an, dass es infolge der Trocknung, aber auch aufgrund der Lagerung zu stofflichen Veränderungen in den Beeren gekommen ist. In einer im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie zur Trocknung von Heidelbeeren (vgl. 3.1.7) wurde deutlich, dass ein HMF-Gehalt, wie er in den untersuchten gHB vorliegt, mit einer Verminderung im Anthocyanengehalt in Zusammenhang steht.

3.1.7 Studien zur Trocknung von Heidelbeeren

Wie im Abschnitt 3.1.1 dargestellt wurde, wiesen die untersuchten, kommerziell erworbenen gHB einen vergleichsweise geringen Anthocyangehalt auf, was u. a. auf einen trocknungsbedingten Abbau zurückzuführen sein könnte. Um den Einfluss der Trocknung auf den Polyphenolgehalt direkt zu verfolgen, wurden frische Heidelbeeren bei der für die Herstellung der Arzneidroge *Myrtilli Fructus* üblichen Temperatur von 30°C (Blaschek *et al.*, 2006) sowie zusätzlich bei 50°C und 70°C im Umlufttrockenschrank bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die ursprünglichen Polyphenolgehalte wurden nach Gefriertrocknung der Beeren erfasst. Da Wildheidelbeeren saisonal nicht verfügbar waren, wurden Kulturheidelbeeren für die Trocknungsstudien eingesetzt. Anthocyane, Flavonole und phenolische Säuren wurden, wie in den Abschnitten 3.1.1 und 3.1.2 beschrieben, nach Extraktion mittels HPLC-MS/MS identifiziert und mittels HPLC-DAD bzw. HPLC-UV/Vis quantifiziert. Zudem wurde HMF als Indikator für die thermische Belastung erfasst.

Die untersuchten Früchte zeigten einen für Kulturheidelbeeren *V. corymbosum* L. typischen Anthocyangehalt sowie das charakteristische Anthocyanprofil (Cho *et al.*, 2004), bestehend aus den in Position 3 mit Galactose, Glucose bzw. Arabinose verknüpften Algyconen Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Peonidin und Malvidin. Die dominierenden Verbindungen stellten die Galactoside und Arabinoside von Delphinidin, Petunidin und Malvidin dar (Chromatogramm nicht gezeigt). In Abb. 3-8 sind die in den bei verschiedenen Temperaturen getrockneten Beeren bestimmten Anthocyangehalte dargestellt. Im Vergleich zum Ausgangsmaterial kam es durch Trocknung bei 30°C zu keiner Abnahme im Anthocyangehalt, stattdessen war sogar eine leichte Zunahme festzustellen. Bellincontro *et al.* (2004) fanden ebenfalls einen Anstieg des Anthocyangehalts von Trauben bei Trocknung im Luftstrom bei 21°C. Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf eine Induktion der Anthocyanbiosynthese infolge des auftretenden Wasserstresses zurückzuführen ist. Ausgangspunkt der Flavonoidbiosynthese stellt die Aminosäure L-Phenylalanin dar, die über den Shikimisäureweg gebildet wird (Crozier *et al.*, 2009). Eine Zunahme des Polyphenolgehalts infolge der Stimulierung dieser metabolischen Wege durch Wassermangel während der Reifung von Trauben wurde beschrieben (Kennedy *et al.*, 2002; Ojeda *et al.*, 2002).

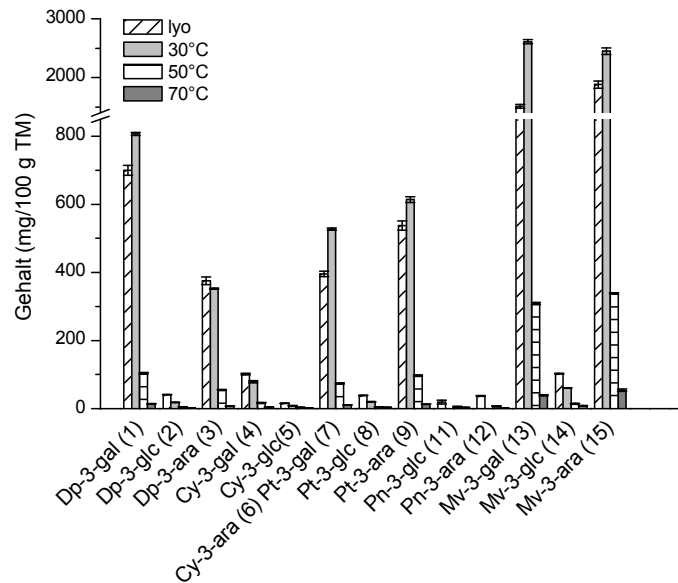


Abb. 3-8: Anthocyanengehalt in Heidelbeeren nach Gefriertrocknung sowie Trocknung bei 30°C, 50°C und 70°C im Umlufttrockenschrank. Angaben in mg/100 g TM. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.3.4.1.

Bei Erhöhung der Temperatur auf 50°C bzw. 70°C trat dagegen ein deutlicher Anthocyanabbau auf. In Übereinstimmung hiermit beschrieben Michalczyk *et al.* (2009) eine mehr als 50 %ige Reduzierung im Anthocyanengehalt von Heidelbeeren *V. myrtillus* L. bei Lufttrocknung bei 40°C für 72 h. Die Trocknung von Kulturheidelbeeren *V. corymbosum* L. bei 50 bis 90°C für 5,5 h führte ebenfalls zu einer Halbierung des Anthocyanengehalts (Lohachoopol *et al.*, 2004). Neben der thermisch induzierten chemischen Degradation der Pigmente ist die Ursache hierfür v. a. ein Abbau durch in den Früchten vorkommende Polyphenoloxidase (PPO). Anthocyane stellen kein direktes Substrat des Enzyms dar (Kader *et al.*, 1998; Kader *et al.*, 1999). In Gegenwart von Chlorogensäure, die in Heidelbeeren in hoher Konzentration vorkommt (Abb. 3-9), sowie PPO werden sie jedoch rasch abgebaut, da die PPO-katalysierte Oxidation von Chlorogensäure zu Entstehung von Chinonen führt, die mit Anthocyanen unter Bildung von braunen Polymeren weiterreagieren (Sarni *et al.*, 1995; Kader *et al.*, 1997b). PPO ist im Cytosol der Pflanzenzelle lokalisiert. Polyphenole kommen dagegen im der Vakuole vor. Voraussetzung des PPO-katalysierten Polyphenolabbaus ist somit eine Dekompartimentierung, wie sie z.B. durch Trocknungsprozesse bei erhöhter Temperatur hervorgerufen wird (Raynal *et al.*, 1989).

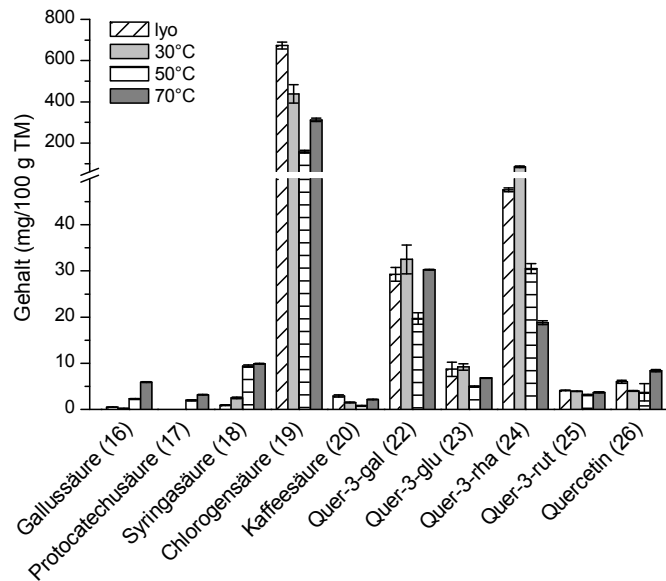


Abb. 3-9: Gehalte an phenolischen Säuren und Flavonolen in Heidelbeeren nach Gefrier-trocknung sowie Trocknung bei 30°C, 50°C und 70°C im Umlufttrockenschrank. Angaben in mg/100 g TM. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.3.4.2.

Der Einfluss der Trocknung auf phenolische Säuren und Flavonole ist in Abb. 3-9 dargestellt. Im Vergleich zu den Anthocyanen sind diese Verbindungen thermostabiler. Ein deutlicher Abbau wurde nur bei Chlorogensäure bei 50°C beobachtet. Ein über 90 %iger Verlust dieser Hydroxyzimtsäure wurde auch während der Trocknung von Birnen festgestellt (Ferreira *et al.*, 2002). Ursache ist der bereits erwähnte Abbau durch PPO. Kater *et al.* (1997a) zeigten, dass Chlorogensäure und Kaffeesäure die bevorzugten Substrate von PPO aus Heidelbeeren darstellen. Die festgestellte geringere Degradation bei 70°C im Vergleich zu 50°C resultiert aus der zunehmenden Inaktivierung des Enzyms bei höherer Temperatur (Raynal *et al.*, 1989).

Für die Hydroxybenzoesäuren Gallus-, Protocatechu- und Syringasäure wurde dagegen ein Anstieg im Gehalt beobachtet. Wie in Abschnitt 3.1.2 bereits für gHB diskutiert, kann dies aus einer Freisetzung aus Konjugaten, aber auch aus dem Anthocyanabbau resultieren, da phenolische Säuren als Anthocyanabbauprodukte identifiziert wurden.

Als Indikator für die thermische Belastung während der Trocknung wurde der Gehalt an HMF im untersuchten Beerenmaterial bestimmt (Abb. 3-10). Nach Lyophilisation der frischen Beeren war kein HMF nachweisbar. Auch Trocknung bei 30°C resultierte nur in einem geringen HMF-Gehalt. Trocknung bei 50°C und insbesondere bei 70°C führte dagegen zu einer starken Anreicherung der Indikatorverbindung. Die ermittelten Ge-

halte stimmen gut mit für Trockenfrüchte typischen HMF-Konzentrationen überein (Murkovic und Pichler, 2006).

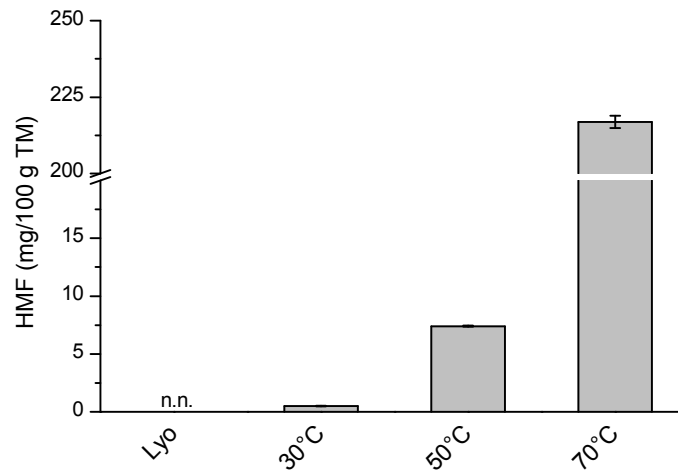


Abb. 3-10: 5-Hydroxymethylfurfural-Gehalt in Heidelbeeren nach Gefriertrocknung sowie Trocknung bei 30°C, 50°C und 70°C im Umlufttrockenschrank. n.n. - nicht nachweisbar. Angaben in mg/100 g TM. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.3.5.

Bei gemeinsamer Betrachtung von HMF- und Polyphenolgehalten in den untersuchten Kulturheidelbeeren zeigt sich, dass Trocknung bei starker thermischer Belastung, charakterisiert durch einen hohen HMF-Gehalt, mit einer Reduzierung im Polyphenol- und dabei insbesondere im Anthocyanengehalt verbunden ist.

3.1.8 Modell-Untersuchungen zum Anthocyanabbau während der Trocknung von anthocyanhaltigen Früchten

Um den im vorherigen Kapitel beschriebenen Anthocyanabbau in Heidelbeeren bei starker thermischer Belastung näher zu charakterisieren, wurde die chemische Anthocyanstabilität in einem Modell-System untersucht, das die Bedingungen in der Pflanzenzelle während der Trocknung von Früchten simuliert.

Dazu wurden die Anthocyane Cy-3-gal bzw. Cy-3-glc in Citronensäure-Kaliumhydrogenphosphat-Puffer bei pH 3 unter Lichtausschluss für 7 Tage bei 50°C bzw. 32 Tage bei 30°C inkubiert. Die Inkubationszeiten wurden in Anlehnung an die zur Trocknung der Heidelbeeren benötigten Zeiträume (vgl. 3.1.7 und 4.3.3) gewählt. Der Anthocyanengehalt der Lösungen wurde zu definierten Zeitpunkten mittels HPLC-UV/Vis (vgl. 4.2.1/HPLC-System 2) analysiert. Abb. 3-11 zeigt die Konzentration der untersuchten Anthocyane während der Inkubation im Modell-System. Bei beiden

Temperaturen kam es jeweils zum Abbau der zwei Pigmente. Bei Auftragung im Logarithmus(Gehalt)/Zeit-Diagramm ergab sich stets ein linearer Zusammenhang. Der Abbau weist somit eine Reaktionskinetik 1. Ordnung auf.

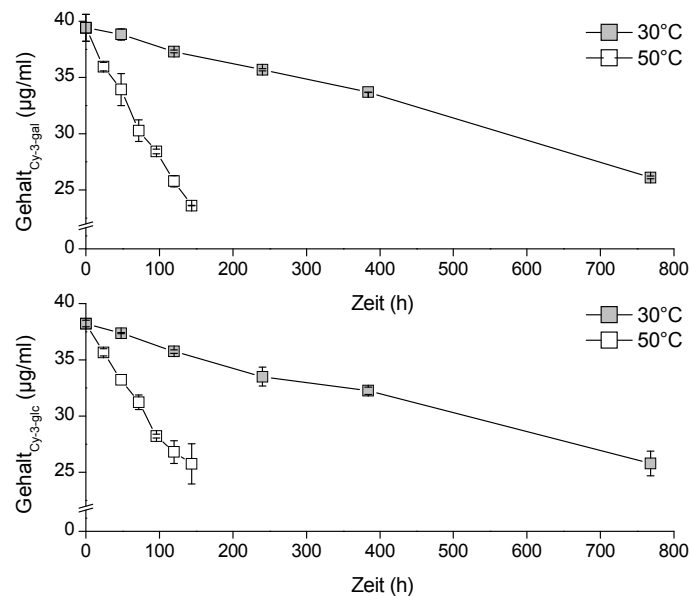


Abb. 3-11: Verringerung der Konzentration von Cy-3-gal (oben) und Cy-3-glc (unten) bei Inkubation in Citronensäure-Kaliumhydrogenphosphat-Puffer, pH 3 bei 30°C bzw. 50°C. Angaben in µg/mL. Mittelwert ± Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.4.

Bei früheren Untersuchungen unter ähnlichen pH-Wert- und Temperatur-Bedingungen wurde für Anthocyane in ethanolischer Wein-Modelllösung sowie in Sauerkirsch- und Blutorangensaft eine Degradation der Pigmente nachgewiesen, die ebenfalls einer Reaktion 1. Ordnung entsprach (Kirca und Cemeroglu, 2003; Tseng *et al.*, 2006; Bonerz *et al.*, 2007).

Zur Charakterisierung der Geschwindigkeit des Abbaus wurden von uns Halbwertszeiten $t_{1/2}$ (Tabelle 3-5) ermittelt. Die Berechnung erfolgte aus der Steigung k der Geraden im Logarithmus(Gehalt)/Zeit-Diagramm (Abb. 3-11) nach:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (3.1)$$

Tabelle 3-5: Halbwertszeiten des Abbaus von Cy-3-gal und Cy-3-glc bei Inkubation in Citronensäure-Kaliumhydrogenphosphat-Puffer, pH 3 bei 30°C und 50°C.

	$t_{1/2}$ 30°C (d)	$t_{1/2}$ 50°C (d)
Cy-3-gal (4)	58	8
Cy-3-glc (5)	58	10

Anhand der in Tabelle 3-5 angegebenen Halbwertszeiten wird deutlich, dass der Zuckerrest keinen Einfluss auf den chemischen Anthocyanabbau in schwach saurer Lösung hat, da Galactosid und Glucosid gleich schnell abgebaut wurden. Sadilova *et al.* (2007) konnten ebenfalls keine Unterschied im Abbau von Glucose- und Galactose-derivaten von Anthocyanen feststellen. Allerdings führte Glycosylierung mit Pentosen, Di- bzw. Trisacchariden bzw. Acylierung des Zuckerrestes zu Variationen in den Halbwertszeiten.

In unserer Studie wurde die Abbaurrate stark von der Temperatur beeinflusst (Tabelle 3-5), deren Erhöhung die Degradation verstärkte. Diese Temperaturabhängigkeit des Anthocyanabbaus stimmt mit Literaturdaten überein (Cemeroglu *et al.*, 1994; Kirca und Cemeroglu, 2003; Tseng *et al.*, 2006; Kirca *et al.*, 2007). Als weiterer Faktor, der hier nicht untersucht wurde, beeinflusst auch die Aglyconstruktur die Degradationsrate (Hrazdina *et al.*, 1970).

Die im hier vorgestellten *in vitro* Modell ermittelten Halbwertszeiten des Anthocyanabbaus entsprechen in etwa den Zeiträumen, die in unserer in Abschnitt 3.1.7 beschriebenen Studie zur Trocknung von Kulturheidelbeeren bei 30°C und 50°C verwendet wurden. Bei Übertragung dieser Daten wäre somit über den Trocknungszeitraum eine Halbierung der Pigmentkonzentration zu erwarten. Es zeigte sich jedoch, dass Cy-3-gal und Cy-3-glc *in vivo* bei 30°C weitgehend intakt blieben (Abschnitt 3.1.7). Diese erhöhte Stabilität in der Pflanzenzelle im Vergleich zum *in vitro* Modell kann auf Mechanismen wie Copigmentierung, Selbstassoziation oder Komplexbildung mit Metallen zurückgeführt werden (vgl. 2.2.3). Andererseits trat bei der Trocknung von Heidelbeeren bei 50°C ein im Vergleich zum *in vitro* Modell beschleunigter Abbau auf. Wie in Kapitel 3.1.7 diskutiert, kommt es *in vivo* bei erhöhter Temperatur zu Dekompartimentierung, wodurch parallel zum chemischen Anthocyanabbau eine enzymatische Degradation durch PPO begünstigt wird und die Degradation somit verstärkt.

Um Informationen zu Anthocyanabbauprodukten zu erhalten, wurden die Inkubationsansätze zusätzlich mittels HPLC-DAD-MS/MS (vgl. 4.2.3/HPLC-MS/MS-System 4) untersucht. Mittels Retentionszeitvergleich mit der Referenzsubstanz sowie anhand des UV-Spektrums und massenspektrometrischer Daten wurde dabei in allen Inkubationsansätzen Protocatechusäure als Abbauprodukt der Cyanidin-glycoside identifiziert. Die Identität der weiteren Metabolitpeaks konnte nicht ermittelt werden (Abb. 3-12). Das Aglycon Cyanidin wurde nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

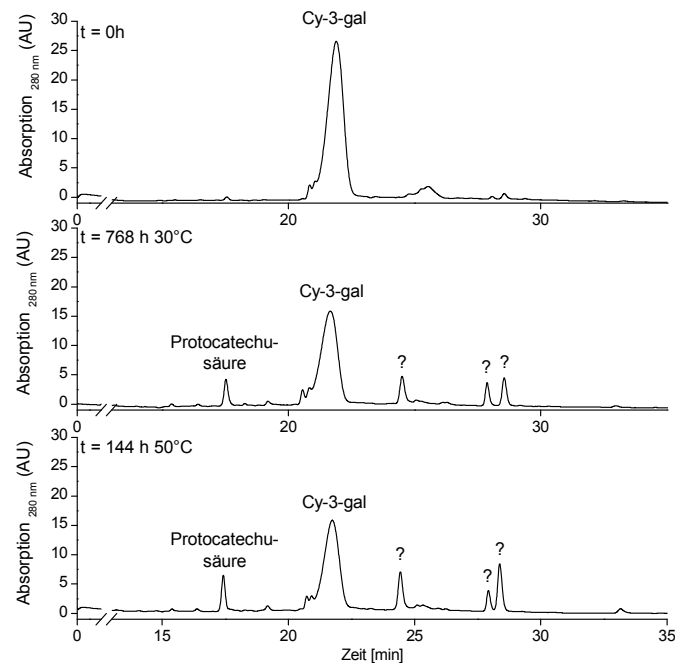


Abb. 3-12: HPLC-Chromatogramme einer Lösung von Cy-3-gal nach Inkubation in Citronensäure-Kaliumhydrogenphosphat-Puffer, pH 3 für (oben) 0 h, (Mitte) 768 h bei 30°C und (unten) 144 h bei 50 ° C. ? - unbekannter Metabolit. Detektion: $\lambda = 280 \text{ nm}$. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.4.

Hydroxybenzoesäure-Derivate stellen bekannte Anthocyanabbauprodukte dar und werden aus dem B-Ring nach einem noch weitgehend unbekanntem Mechanismus freigesetzt (Adams, 1973; Keppler und Humpf, 2005; Sadilova *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse bestätigen die an anderer Stelle geäußerte Vermutung, dass die in gHB (vgl. 3.1.1) sowie in getrockneten Kulturheidelbeeren (vgl. 3.1.7 Modell-Studie zur Trocknung) detektierten, erhöhten Gehalte an Hydroxybenzoesäuren aus dem Anthocyanabbau stammen könnten.

3.2 Formulierungen zum Colon-Targeting von Anthocyanen - Herstellung und Charakterisierung sowie *in vivo* Effekt auf die experimentelle murine DSS-Colitis

Verschiedene *in vitro* Untersuchungen und Tierstudien deuten darauf hin, dass Anthocyane in der Prävention und Therapie von intestinalen Erkrankungen wie akutem Durchfall, CED sowie Darmkrebs positive Effekte hervorrufen (zu biologischen Effekten von Anthocyanen vgl. 2.4). So wurde u. a. festgestellt, dass die Pigmente aufgrund ihres antioxidativen Potentials radikalinduzierte oxidative Schädigung sowie die dadurch hervorgerufene Apoptose von Caco-2 Zellen verhindern (Elisia und Kitts, 2008). Weiterhin sind sie wirksame Inhibitoren von Lipoxygenase und Cyclooxygenase, den Schlüsselenzymen bei Entzündungsprozessen (Hou *et al.*, 2005; Knaup *et al.*,

2009), rufen eine Verbesserung der experimentellen Colitis hervor (Osman *et al.*, 2008; Piberger, 2009) und hemmen effektiv die Kanzerogenese im Colon (Hagiwara *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2003; Cooke *et al.*, 2006). Zudem wurde antimikrobielle Aktivität gegenüber pathogenen Bakterien sowie prebiotische Wirkung gegenüber der positiven Darmmikroflora nachgewiesen (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005; Molan *et al.*, 2009).

Um Wirkungen im Darm zu zeigen, müssen Anthocyane in die Gewebe in diesem Teil des GIT gelangen. Dies ist zum einen nach Absorption im oberen GIT systemisch über die Blutbahn möglich. Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit der Pigmente werden jedoch nur sehr geringe Plasmakonzentrationen im Bereich von 1 bis 120 nmol/L erreicht (Manach *et al.*, 2005; McGhie und Walton, 2007). Dagegen wurde *in vitro* eine erhöhte lokale Verfügbarkeit von Anthocyanen durch direkte Aufnahme in intestinale Epithelzellen nachgewiesen (Yi *et al.*, 2006; Steinert *et al.*, 2008). Infolgedessen gelten lokale Effekte der Pigmente als wahrscheinlicherer Wirkmechanismus (Steinert *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009). Problematisch hierbei ist jedoch, dass die Anthocyane im Darm nicht stabil sind und v. a. im Colon einem raschen chemischen und mikrobiellen Abbau unterliegen (Aura *et al.*, 2005; Keppler und Humpf, 2005; Borges *et al.*, 2007).

Eine Möglichkeit, um die Verfügbarkeit von Anthocyanen für direkte Effekte im Dickdarm zu erhöhen, stellt das sog. Colon-Targeting dar. Dabei werden Wirkstoffe durch Verkapselung vor einem chemischen und enzymatischen Abbau im oberen GIT geschützt, in den Dickdarm transportiert und dort gezielt freigesetzt.

Um ein Colon-Targeting von Wirkstoffen zu erreichen, wurden verschiedene Methoden entwickelt (vgl. 2.6.2). Die Verwendung von bakteriell abbaubaren Polymermatrices verbunden mit einer Wirkstofffreisetzung durch die enzymatische Aktivität der Dickdarmmikroflora stellt die spezifischste Methode dar (Sinha und Kumria, 2003; McConnell *et al.*, 2008b).

Ziel der durchgeführten Arbeiten war es, Systeme für das Colon-Targeting von Anthocyanen zu entwickeln, um damit die lokale Verfügbarkeit der bioaktiven Pigmente am potentiellen Wirkort Dickdarm zu erhöhen. Die Formulierungen sollten für eine Verwendung im Lebensmittelbereich geeignet sein. Um die Freisetzungseigenschaften während der Passage des humanen GIT zu untersuchen, wurden die hergestellten Systeme in Magensaftsimulanz, Ileostomaflüssigkeit und Colostomieflüssigkeit inkubiert. Die optische Charakterisierung erfolgte mittels Rasterelektronenmikroskopie. Anthocyanengehalt und -profil wurden mittels HPLC-UV/Vis bestimmt.

Studien zur Verkapselung und Stabilisierung von Anthocyanen im GIT existieren bisher nur in begrenzter Anzahl. Frank *et al.* (2009) brachten zu diesem Zweck Blaubeerextrakt in submikrone Emulsionstropfen ein. Zwei weitere Arbeiten beschreiben den Einsatz von Glucan- sowie Chitosan-Natriumalginat-Gelen zur Verkapselung der Pigmente (Zhang *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2006). Daten zur Wirksamkeit der Systeme fehlen jedoch weitgehend.

In der vorliegenden Arbeit wurde amidiertes Pektin als Matrixsubstanz für die Verkapselung eingesetzt. Die entwickelten Formulierungen basieren somit auf dem Prinzip der Mikroflora-kontrollierten Freisetzung. Wie in Abschnitt 2.6.3 ausführlich dargestellt, handelt es sich bei amidiertem Pektin um ein lineares Polysaccharid, das überwiegend aus teilweise amidierten und methylierten α -(1-4)-verknüpften D-Polygalacturonsäure-Resten besteht. Amidiertes Pektin ist in Mundhöhle und Magen stabil und wird anschließend zu einem geringen Teil durch die Mikroflora im terminalen Ileum sowie vollständig im Dickdarm abgebaut (Cummings *et al.*, 1979; Saito *et al.*, 2005; Knaup *et al.*, 2008). Verschiedene pharmazeutische Studien belegen das Potential des Polymers als Matrixsubstanz für das Colon-Targeting (Liu *et al.*, 2003). Im Vergleich zu hoch- oder niedrigverestertem Pektin ist amidiertes Pektin weniger hydrophil und bildet somit stabilere Verkapselungsmatrices aus (Wakerly *et al.*, 1997). Als Zusatzstoff E440 darf amidiertes Pektin *quantum satis* bei der Herstellung von Lebensmitteln eingesetzt werden und ist somit zur Entwicklung von Colon-Targeting-Systemen im Lebensmittelbereich geeignet.

Als Anthocyanquelle diente ein anthocyanhaltiger Heidelbeerextrakt. Auf dessen Anthocyanzusammensetzung wird nachfolgend eingegangen (vgl. Abb. 3-14), sodass an dieser Stelle auf eine gesonderte Darstellung des Anthocyanprofils verzichtet wurde. Die Verwendung weiterer im Lebensmittelbereich zulässiger Substanzen wie des hydrophoben Proteins Zein, des Polymers Schellack (vgl. 2.6.5), des Porenbildners Hydroxypropylmethylcellulose sowie von Kollagen aus dem Meeresschwamm *Chondrosia Reniformis* Nardo (vgl. 2.6.4) als Bestandteile der Colon-Targeting-Systeme wurde evaluiert.

3.2.1 Herstellung von pektinbasierten Formulierungen zum Colon-Targeting von Anthocyanen und ihre Charakterisierung (Labormaßstab)

3.2.1.1 Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BRT, P4BL, P4BZ, P4BSch mittels Eintropftechnik

Die Einkapselung des Heidelbeerextraktes in die Pektinmatrix erfolgte nach dem Prinzip der ionotropen Gelierung (Dupuis *et al.*, 2006). Dabei wird die Eigenschaft von niedrig verestertem Pektin ausgenutzt, in Gegenwart von zweiwertigen Kationen infolge Quervernetzung der Galacturonsäureketten durch elektrostatische und van-der-Waals-Wechselwirkungen stabile Gele nach der „shifted Egg-box“-Konfiguration auszubilden (Grant *et al.*, 1973; Braccini, 2001). Bei amidiertem Pektin treten zusätzlich Wasserstoffbrückenbindungen über die Amidgruppen auf, wodurch resistenter Gele erhalten werden (Thakur *et al.*, 1997).

Zur Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln (APK) wurde 0,2 % (w/v) Heidelbeerextrakt in einer 4 %igen (w/v) Lösung aus amidiertem Pektin suspendiert. Diese Mischung wurde anschließend mit zwei Peristaltikpumpen (durchschnittliche Gesamtflussrate 100 g/h) durch Kanülen in 1,7 % (w/v) Calciumchlorid- bzw. ethanolische Zein-Calciumchloridlösung eingetropft (Abb. 4-1). Bei Kontakt mit der Quervernetzerlösung bildeten sich sofort violette Gelkugeln, die nach definierter Verweilzeit in der Lösung abgesaugt, gewaschen und getrocknet wurden. Während der Trocknung kam es durch den Wasserverlust zu einer deutlichen Schrumpfung der Gelkugeln. Pawar *et al.* (2008) beschrieben, dass durch Erhöhung der Pektinkonzentration die Verkapselungseffizienz verbessert wird. In Vorversuchen wurde jedoch festgestellt, dass Lösungen mit höherem Pektinanteil aufgrund steigender Viskosität nicht für die Vertropfung geeignet waren. Nach Dupuis *et al.* (2006) werden durch Quervernetzung mit Zinkionen resistenter Pektinengele erhalten. Trotz möglicherweise etwas schlechteren Verkapselungseigenschaften wurden von uns Calciumionen eingesetzt, da Calcium als Mengenelement in höherer Konzentration unbedenklich im Rahmen der menschlichen Ernährung zugeführt werden kann. Eine geringe Calciumchloridkonzentration von 1,7 % (w/v) in der Quervernetzerlösung wurde gewählt, da höhere Gehalte zu einem stark erhöhten Restwassergehalt der APK nach Trocknung bei RT führten. Ursache hierfür ist ein gesteigerter Anteil an freiem, hygroskopischem Calciumchlorid im Material (Bourgeois *et al.*, 2006).

Der Effekt der Trocknungsbedingungen auf die Eigenschaften der APK wurde überprüft, indem Kugeln bei Raumtemperatur getrocknet bzw. lyophilisiert wurden. Ein

Teil der bei Raumtemperatur getrockneten APK wurde zusätzlich unter Verwendung von 6 %iger (w/v) ethanolischer Schellacklösung mit Talkum (30 % w/w bezogen auf Schellack) als Trennmittel mittels Wurster-Technologie in einer Mini-Glatt Wirbelschichtanlage gecoatet. Die Prozessbedingungen wurden in Anlehnung an Pearnchob *et al.* (2003b) gewählt. Anhand der Gewichtszunahme während des Prozesses wurde ein Coatinglevel von 7 % (w/w) errechnet. Einen Überblick über Herstellungsbedingungen und Bezeichnung der Formulierungen gibt Tabelle 3-6.

Tabelle 3-6: Bezeichnung und Herstellungsbedingungen von APK. RT - Raumtemperatur.

Formulierung	Quervernetzer	Trocknung	Coating (Coatinglevel)
P4BL	CaCl ₂	Lyophilisation	-
P4BRT	CaCl ₂	RT	-
P4BZ	CaCl ₂ /Zein	RT	-
P4BSch	CaCl ₂	RT	Schellack (7 % (w/w))

3.2.1.2 Charakterisierung von Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BRT, P4BL, P4BZ, P4BSch

Zur optischen Charakterisierung der Systeme wurden rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen angefertigt. In Abhängigkeit von der Formulierung zeigten die APK unterschiedliche Formen und Oberflächeneigenschaften. Nach Trocknung bei Raumtemperatur (P4BRT, Abb. 3-13 c, d) wiesen die APK eine kugelige Form und glatte Oberfläche auf. Aufgrund dieser Merkmale wurden P4BRT auch als Ausgangsmaterial für das Coating mit Schellack, wodurch eine mit feinen Rissen durchzogene, glatte Schicht erzeugt wurde (P4BSch, Abb. 3-13 g, h), verwendet.

Durch Lyophilisation (P4BL, Abb. 3-13 a, b) entstanden leicht vergrößerte, stark strukturierte und fragile Sphären. Zeinhaltige APK (P4BZ, Abb. 3-13 e, f) zeigten ebenfalls eine stark strukturierte Oberfläche, wobei es sich wahrscheinlich um eine Proteinschicht handelt. Die mittels REM erfassten Eigenschaften der Formulierungen stimmen mit denen vergleichbarer Pektin-Systeme aus der Literatur überein (Chan *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006; Pawar *et al.*, 2008).

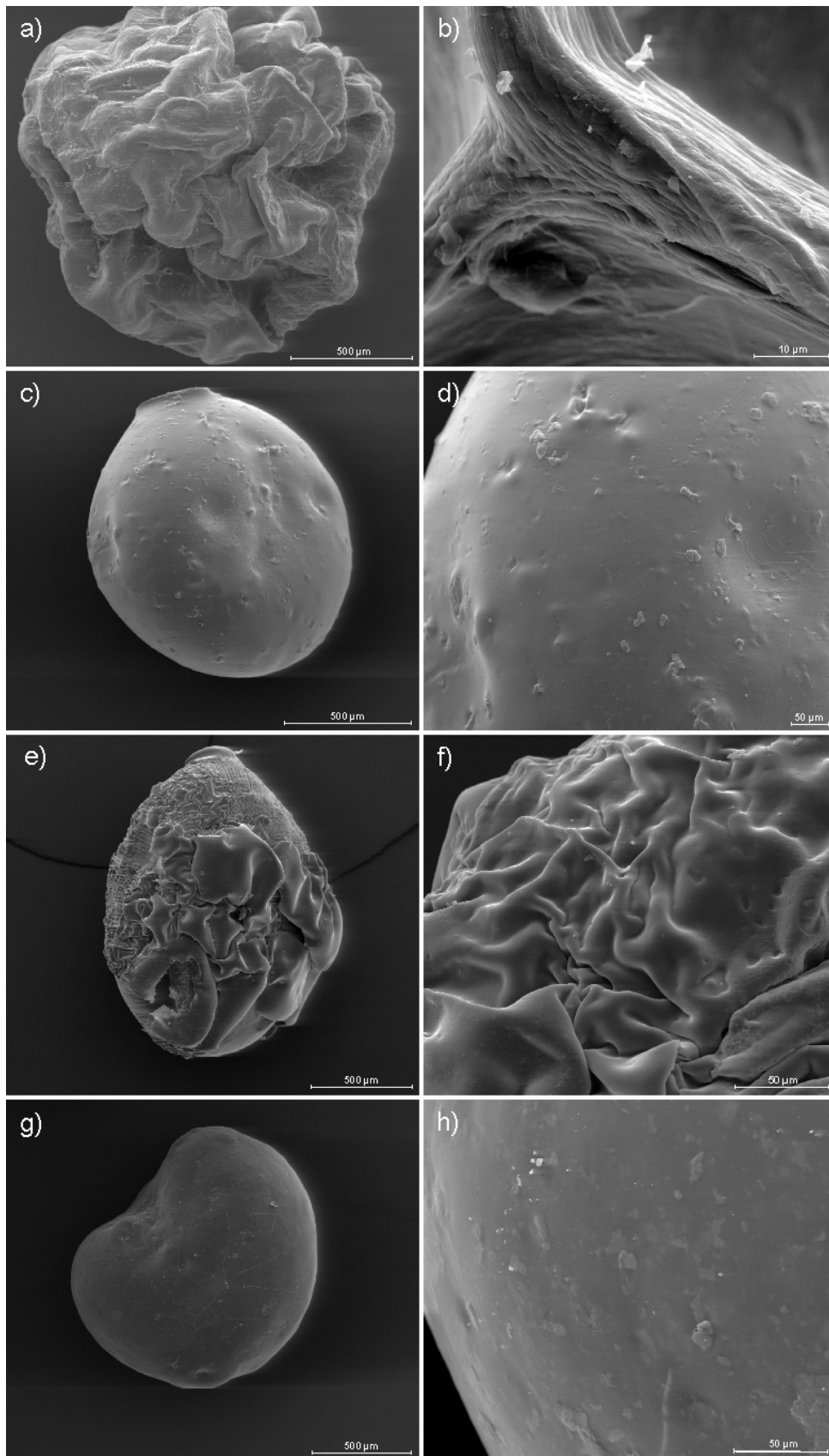


Abb. 3-13: REM-Aufnahmen von APK a), b) P4BL, c), d) P4BRT, e), f) P4BZ und g), h) P4BSch. Zu Herstellungsbedingungen der Formulierungen vgl. Tabelle 3-6 sowie Abschnitt 4.3.5.

Anthocyangehalt und -profil der Formulierungen wurden nach Extraktion mittels HPLC-UV/Vis untersucht. Das Chromatogramm des Extrakts zeigt die typischen Anthocyane, die im verwendeten Heidelbeerextrakt enthalten waren (Abb. 3-14). Die entwickelte Methode ist somit geeignet, Anthocyane in die Pektinmatrix zu verkapseln.

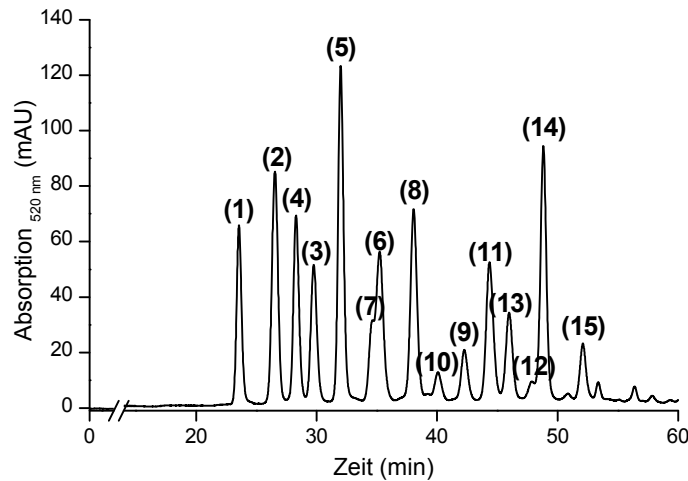


Abb. 3-14: HPLC-Chromatogramm des Anthocyanprofils der bei Raumtemperatur getrockneten APK P4BRT nach Extraktion. Detektion: $\lambda = 520 \text{ nm}$. Peakzuordnung: (1) Dp-3-gal, (2) Dp-3-glc, (3) Dp-3-ara, (4) Cy-3-gal, (5) Cy-3-glc, (6) Cy-3-ara, (7) Pt-3-gal, (8) Pt-3-glc, (9) Pt-3-ara, (10) Pn-3-gal, (11) Pn-3-glc, (12) Pn-3-ara, (13) Mv-3-gal, (14) Mv-3-glc, (15) Mv-3-ara. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.

Die nach Extraktion erfassten Gesamt-Anthocyangehalte der Materialien P4BRT und P4BSch lagen bei $1,49 \pm 0,02 \text{ g/100 g}$ und $1,38 \pm 0,05 \text{ g/100 g}$. In der zur Herstellung verwendeten Lösung waren 5 g/100 g Heidelbeerextrakt bezogen auf den Gehalt an amidiertem Pektin enthalten. Der verwendete Heidelbeerextrakt wies einen Anthocyangehalt von 65% auf. Aus dem Verhältnis von eingesetzter zu im Material wiedergefundener Pigmentmenge ergibt sich, bei Berücksichtigung des Wassergehalts von $11,9 \pm 0,2 \text{ g/100 g}$, für das Material P4BRT eine Verkapselungseffizienz von 52% (zur Berechnung der Verkapselungseffizienz vgl. 4.3.8.3). Ursache für diese geringe Rate ist die gute Wasserlöslichkeit der Anthocyane, die dazu führt, dass ein Teil der Pigmente während der Herstellung der APK in die Quervernetzerlösung übergeht. Ähnlich geringe Effizienzen wurden auch für die Verkapselung anderer, teilweise wasserlöslicher Verbindungen (Theophyllin, Metronidazol, bovines Serumalbumin) in Pektinmatrices beschrieben (Sriamornsak, 1998; Maestrelli *et al.*, 2008; Pawar *et al.*, 2008).

3.2.1.3 Freisetzungseigenschaften von Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BRT, P4BL, P4BZ, P4BSch

In der vorliegenden Arbeit wurden die Freisetzungseigenschaften der hergestellten APK durch aufeinanderfolgende Inkubation in Magensaftsimulanz (3 h, pH 2,0), Ileostomieflüssigkeit (3 h, pH 6,3) und Colostomieflüssigkeit (15 h, pH 6,2) bestimmt. Dazu wurden Aliquote des Überstands zu definierten Zeitpunkten entnommen und der Gehalt der freigesetzten Anthocyane mittels HPLC-DAD (4.2.1, System 3) bestimmt. Inkubationszeiten in den einzelnen Medien wurden so gewählt, dass sie den Transitzeiten im humanen GIT entsprachen (Graff *et al.*, 2000). Die pH-Bedingungen basierten auf pH-Wert-Messungen in den eingesetzten Ileostomie- und Colostomieflüssigkeiten sowie auf Literaturdaten (Fallingborg, 1999).

Der Einsatz von Ileo- und Colostomieflüssigkeit aus Stomabeuteln stellt eine geeignete Methode zur Simulation des humanen intestinalen Metabolismus dar (Kahle *et al.*, 2006; Knaup *et al.*, 2007; Knaup *et al.*, 2008). Durch Untersuchungen zur anaeroben Gesamtkeimzahl (Ileostomieflüssigkeit: $2 \cdot 10^8$ bis $1 \cdot 10^9$ KBE/g; Colostomieflüssigkeit: $2 \cdot 10^9$ bis $5 \cdot 10^9$ KBE/g) sowie zur Enzymaktivität wurde die metabolische Kompetenz der verwendeten Stomabeutelinhalte nachgewiesen (Knaup, 2008).

In vielen Studien wird die Wirkstofffreisetzung unter Verwendung von Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten sowie variierenden Inkubationszeiträumen untersucht (Pillay und Fassihi, 1999; Qussi und Suess, 2005; Liu *et al.*, 2006). Mit dieser Methode kann geprüft werden, ob eine Formulierung geeignet ist, die vorzeitige Freisetzung im Magen zu verhindern. Informationen über das Verhalten des Materials im so simulierten Dünndarm und Dickdarm sind dagegen nicht auf die *in vivo* Situation übertragbar, insbesondere dann nicht, wenn Systeme mit Mikroflora-kontrollierter Liberation getestet werden (Yang *et al.*, 2002). Eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurde erzielt, indem Caecuminhalt von Ratten oder Bakterienstämme in den Freisetzungsm Medien Verwendung fanden (Rubinstein *et al.*, 1993; Ravi *et al.*, 2008). Das hier eingesetzte Modell erlaubt eine weiter verbesserte Simulation des humanen GIT, da der Einfluss der enzymatischen Aktivität der humanen Mikroflora auf den Abbau der Formulierungen berücksichtigt wird.

Abb. 3-15 zeigt am Beispiel von Mv-3-gal die Anthocyan-Freisetzung aus den Formulierungen P4BRT, P4BL, P4BZ und P4BSch in Magensaftsimulanz und Ileostomieflüssigkeit. Auf eine Inkubation in Colostomieflüssigkeit wurde aufgrund der hohen Freisetzung in den o. g. Medien verzichtet. Anthocyane sind unter den sauren

Bedingungen des Magens stabil, unterliegen jedoch einem chemischen und mikrobiellen Abbau im Darm (McGhie und Walton, 2007). Die Abbaurate der einzelnen Verbindungen variiert in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster am B-Ring und vom Zuckerrest. Mv-3-gal stellt eines der stabileren Anthocyane dar (Kahle *et al.*, 2006; Kraus, 2006). Da es sehr gut chromatographisch erfasst werden kann und in ausreichend hoher Konzentration in den APK vorkommt, wurde Mv-3-gal als repräsentativer Indikator der Anthocyan-Freisetzung verwendet. Die Daten zur Freisetzung der weiteren enthaltenen Anthocyane sind im Abschnitt 7 (Anhang) tabellarisch aufgeführt.

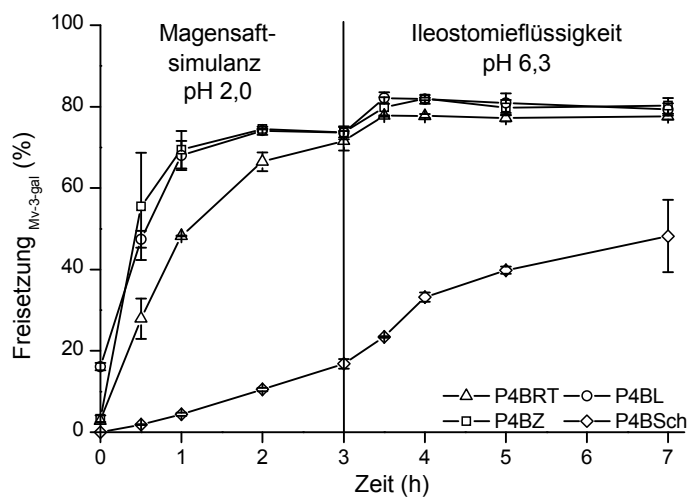


Abb. 3-15: Freisetzungsprofil von Mv-3-gal aus bei Raumtemperatur getrockneten APK (P4BRT), lyophilisierten APK (P4BL), zeinhaltigen APK (P4BZ) und mit Schellack gecoateten APK (P4BSch) während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomieflüssigkeit. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Wie aus Abb. 3-15 hervorgeht, wurden aus den Formulierungen P4BRT und P4BL über 70 % des enthaltenen Mv-3-gal bereits im Magensaftsimulanz freigesetzt. Die Systeme sind somit nicht zum Colon-Targeting geeignet. Ursache dieser mangelnden Magensaftresistenz ist die Diffusion der sehr gut wasserlöslichen Pigmente aus der Oberfläche beider Formulierungen in das umgebende Medium. Dadurch entstehen Poren und Kanäle, welche die Quellung der Matrix durch Wassereintritt fördern sowie die weitere Freisetzung beschleunigen (Liu *et al.*, 2003). Ähnliche Effekte wurden für die Freisetzung anderer wasserlöslicher Wirkstoffe aus Pektinmatrices festgestellt (Chan *et al.*, 2001; Maestrelli *et al.*, 2008; Pawar *et al.*, 2008) Eine Möglichkeit, diesen vorzeitigen Wirkstoffaustritt sowie Wassereintritt im Magen zu verringern, stellt eine Hydrophobierung der Oberfläche dar.

Liu *et al.* (2006) beschrieben in diesem Zusammenhang, dass durch Integration des hydrophoben Proteins Zein in die Pektinmatrix die Quellung in physiologischen Medien zurückgedrängt wird. Bei Zein handelt es sich um ein hydrophobes Speicherprotein aus Mais, das eine hohe Oberflächenaktivität aufweist. Aufgrund des natürlichen Ursprungs ist Zein in Lebensmitteln einsetzbar. Im Gegensatz zur o. g. Studie wies bei unseren Studien die Integration von Zein keinen Effekt auf, da zeinhaltige APK P4BZ eine vergleichbar hohe und vorzeitige Freisetzung in Magensaftsimulanz wie P4BRT und P4BL zeigten.

Eine weitere Alternative zur Hydrophobierung der Oberfläche stellt ein Coating der Pektin-Kugeln dar. In der pharmazeutischen Praxis finden zu diesem Zweck zahlreiche Polymere auf Methacrylsäure-Basis (Eudragit®) mit genau definierten Freisetzungseigenschaften Verwendung (van den Mooter, 2006). Für den Einsatz in Lebensmitteln sind diese Verbindungen jedoch nicht zugelassen. Eine natürliche Alternative zur Erzeugung von Magensaftresistenzen stellt Schellack dar (vgl. 2.6.5). Dabei handelt es sich um ein natürliches, bei saurem pH-Wert unlösliches Polymer, das aus dem Harz der Lackschildlaus *Kerria lacca* gewonnen wird. Schellackfilme zeichnen sich durch eine sehr geringe Wasser- und Säurepermeabilität sowie hohe Filmbildungstendenz und Thermoplastizität aus (Penning, 1996; Qussi und Suess, 2005). Gemäß ZZuIV darf Schellack *quantum satis* in bestimmten Lebensmitteln sowie Nahrungsergänzungsmitteln eingesetzt werden.

Wie sich aus Abb. 3-15 ergibt, reduzierte das Coating mit Schellack (P4BSch, Coatinglevel 7 % w/w) die Anthocyan-Freisetzung in Magensaftsimulanz auf unter 20 %. Während der simulierten Magen- und Dünndarmpassage wurden 48 ± 9 % des enthaltenen Mv-3-gal freigesetzt. Die noch im Material enthaltenen Pigmente gelangen in den Dickdarm. Mit Schellack gecoateten APK (P4BSch) wurde somit unter den gewählten Versuchsbedingungen ein Anthocyantransport in den Dickdarm erreicht.

3.2.2 Herstellung von Formulierungen zum Colon-Targeting von Anthocyanen unter Verwendung von Schwammkollagen aus *Chondrosia Reniformis* Nardo und ihre Charakterisierung (Labormaßstab)

Kollagen aus dem Meeresschwamm *Chondrosia Reniformis* Nardo bildet bei saurem pH-Wert unlösliche Faserbündel und wird im Gegensatz zu Säugerkollagen nicht zu Tropokollagen abgebaut. Im neutralen pH-Wert-Bereich ist es in Form

einzelner Fibrillen dispergierbar (Heinemann *et al.*, 2007). Aufgrund dieser pH-Wert abhängigen Lösungseigenschaften hat man jüngst das Kollagen zur Herstellung von magensaftresistenten Coatings verwendet (Nicklas *et al.*, 2009). Die natürliche Herkunft des Polymers ermöglicht seine Verwendung im Lebensmittelbereich. Ziel der durchgeführten Untersuchungen war zu prüfen, ob Schwammkollagen auch in Colon-Targeting-Systemen einsetzbar ist. Entsprechende Formulierungen wurden von uns hergestellt und bezüglich ihrer Funktionalität im Modell-System charakterisiert.

3.2.2.1 Herstellung von Anthocyan-Kollagen-Kugeln KB und Anthocyan-Kollagen-Pektin-Kugeln P3KB mittels Eintropftechnik

Anthocyan-Kollagen-Kugeln (KB) wurden hergestellt, indem Heidelbeerextrakt (0,6 % w/w) in einer Dispersion aus Schwammkollagen (5 % w/w in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,4) gelöst über eine Spritze mit Kanüle (ID=1 mm) in 0,1 N Salzsäure eingetropfte wurde. Beim Eintropfen der anthocyanhaltigen Kollagen-Dispersion in die saure Lösung bildeten sich kleine, feste Aggregate. Das Kollagen, das in der schwach alkalischen Lösung in Form von Fibrillen suspendiert war, aggregiert im sauren Medium sofort zu unlöslichen Faserstrukturen (Heinemann *et al.*, 2007). Ein Teil der Anthocyane diffundierte in die Eintropflösung, was an deren Rotfärbung erkennbar war. Die Anthocyan-Kollagenkugeln wurden mit einem Büchner-Trichter abgesaugt, mit Reinstwasser gewaschen und auf einem Gitter bei Raumtemperatur getrocknet.

Anthocyan-Kollagen-Pektin-Kugeln (P3KB) wurden hergestellt, indem eine Mischung aus Heidelbeerextrakt (0,2 % w/w), Schwammkollagen (1,5 % w/w in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,4) und amidiertem Pektin (3 % w/w in Wasser) über eine Spritze mit Kanüle (ID=1 mm) in Calciumchloridlösung eingetropfte wurde. Beim Eintropfen der Dispersion in die Quervernetzerlösung bildeten sich infolge ionotroper Gelierung der Pektinmatrix Kollagen-Pektin-Gelkugeln (vgl. 3.2.1.1). Die Kugeln wurden mit einem Büchner-Trichter abgesaugt, mit Reinstwasser gewaschen und auf einem Gitter bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.2.2 Charakterisierung von Anthocyan-Kollagen-Kugeln KB und Anthocyan-Kollagen-Pektin-Kugeln P3KB

Abb. 3-16 zeigt REM-Aufnahmen der hergestellten Systeme sowie ihrer Oberflächen. Bei den Anthocyan-Kollagen-Kugeln (KB, Abb. 3-16 c, d) handelte es sich um unregelmäßig geformte Partikel. Die Oberflächenstruktur ist faserartig, wie für Schwammkollagen unter sauren Bedingungen typisch. Anthocyan-Kollagen-Pektin-Kugeln (Abb. 3-16 a, b) wiesen dagegen eine kugelähnliche Form auf. Im Vergleich zu

in Abb. 3-13 gezeigten Anthocyan-Pektin-Kugeln (P4BRT) ist die Oberfläche rauer was aus der Integration des Kollagens in die Matrix resultiert.

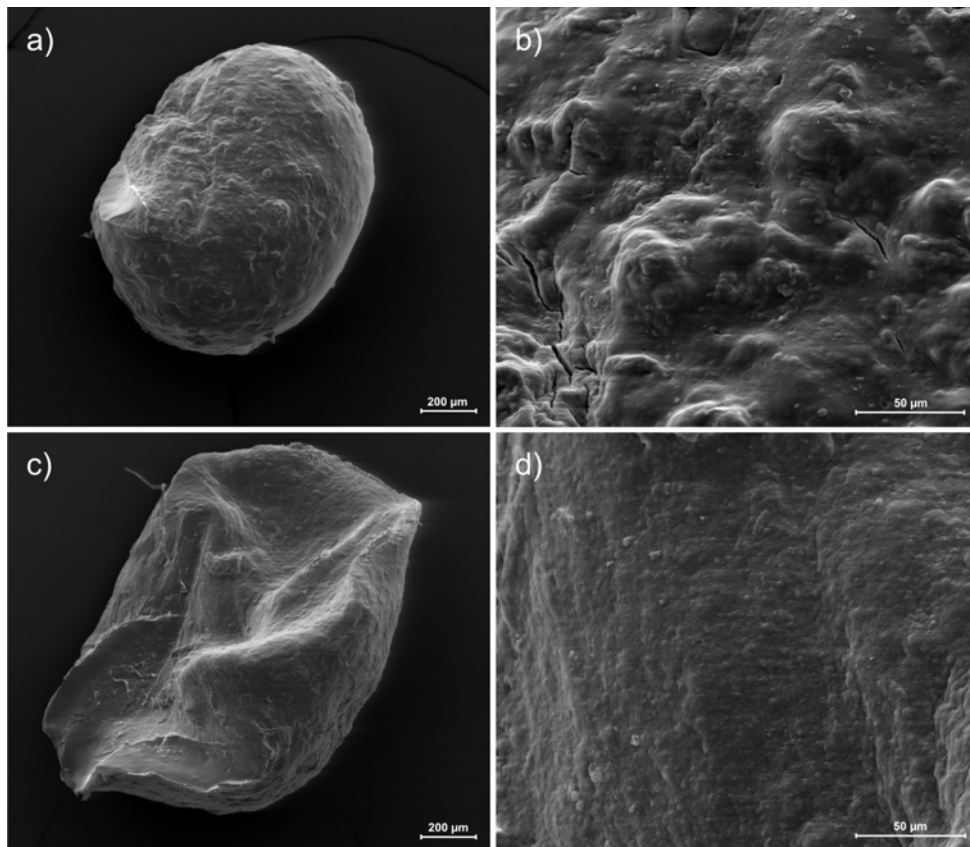


Abb. 3-16: REM-Aufnahmen von Formulierungen mit Schwammkollagen a), b) Anthocyan-Kollagen-Pektin-Kugeln P3KB, c), d) Anthocyan-Kollagen-Kugeln KB. Zu Herstellungsbedingungen der Formulierungen vgl. Abschnitt 4.3.6.

Zur Ermittlung des Anthocyangehalts und -profils wurden die Pigmente vollständig aus den Formulierungen extrahiert und anschließend mittels HPLC-UV/Vis (4.2.1, System 1) untersucht (Abb. 3-17). Die charakteristischen, im verwendeten Extrakt enthaltenen Anthocyane aus Heidelbeeren waren in den Formulierungen nachweisbar. Die Verkapselung von Anthocyanen unter Verwendung von *C. reniformes* Nardo Kollagen war somit erfolgreich. Anthocyangehalte von $2,6 \pm 0,1$ g/100 g und $1,1 \pm 0,1$ g/100 g wurden für KB und P3KB ermittelt. Aus dem Verhältnis von tatsächlich im Material wiedergefundener zu theoretischer Anthocyanmenge ergab sich eine Verkapselungseffizienz von jeweils 43 % (zur Berechnung vgl. 4.3.8.3).

Wie die im Abschnitt 3.2.1.1 charakterisierten APK wiesen somit auch die kollagenhaltigen Formulierungen geringe Anthocyangehalte auf. Ursache ist erneut die gute Wasserlöslichkeit der Pigmente, infolge derer auch bei dem hier vorgestellten Herstellungsprozess ein Teil der Substanzen in die Eintropflösung übergang und diese rot färbte.

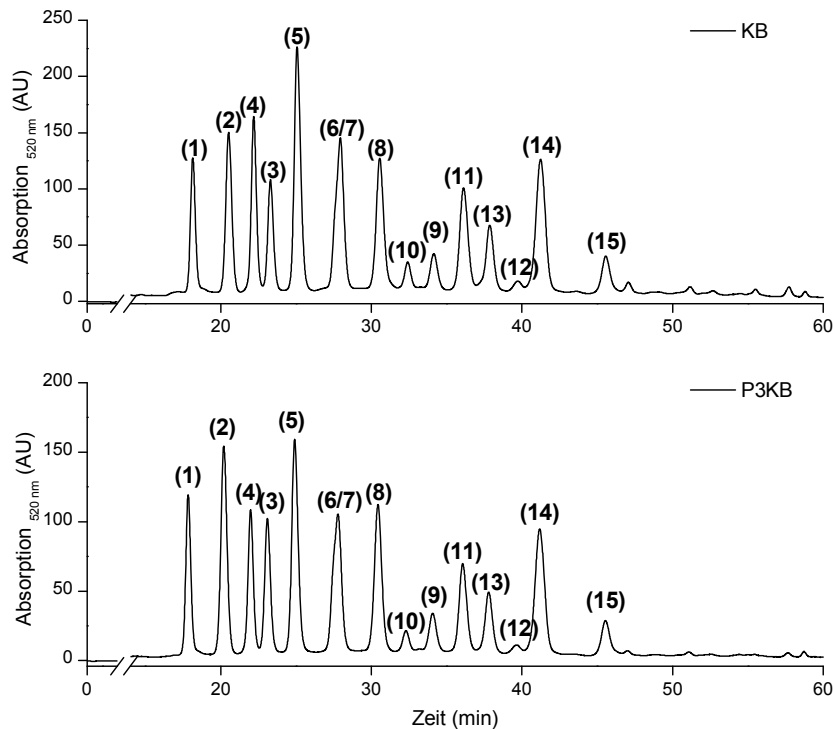


Abb. 3-17: HPLC-Chromatogramme der Anthocyanprofile von (oben) Anthocyan-Kollagen-Kugeln KB und (unten) Anthocyan-Kollagen-Pektin-Kugeln P3KB nach Extraktion. Detektion: $\lambda = 520 \text{ nm}$. Peakzuordnung: (1) Dp-3-gal, (2) Dp-3-glc, (3) Dp-3-ara, (4) Cy-3-gal, (5) Cy-3-glc, (6) Cy-3-ara, (7) Pt-3-gal, (8) Pt-3-glc, (9) Pt-3-ara, (10) Pn-3-gal, (11) Pn-3-glc, (12) Pn-3-ara, (13) Mv-3-gal, (14) Mv-3-glc, (15) Mv-3-ara. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.

3.2.2.3 Freisetzungseigenschaften von Anthocyan-Kollagen-Kugeln KB und Anthocyan-Pektin-Kollagen-Kugeln P3KB

Die Freisetzungseigenschaften der kollagenhaltigen Formulierungen wurden mittels Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomieflüssigkeit untersucht (Abb. 3-18). Aus den P3KB wurden während der Inkubation in Magensaftsimulanz bereits 70 % des enthaltenen Mv-3-gal freigesetzt. Wie bereits für Zein festgestellt (vgl. 3.2.1.3), konnte durch die Integration des säureunlöslichen Schwammkollagens in die Pektinmatrix die vorzeitige Freisetzung der sehr gut löslichen Pigmente nicht verhindert werden. Das Materialgemisch ist somit nicht für das Colon-Targeting geeignet.

Die Anthocyan-Freisetzung aus KB während 3-stündiger Inkubation in Magensaftsimulanz lag dagegen unter 50 %. Die Formulierung wies also eine teilweise Magensaftresistenz auf, die auf die Unlöslichkeit des Schwammkollagens im Säuren zurückzuführen ist. Während der anschließenden Inkubation in Ileostomieflüssigkeit stieg jedoch nach sehr kurzer Zeit die Anthocyan-Freisetzung auf über 70 % an. Ursachen hierfür sind die Suspendierung der Kollagen-Fibrillen im neutralen Milieu (Heinemann *et al.*, 2007) und der Abbau des Kollagens durch die Proteasen im

Dünndarm. Die anthocyanhaltigen Kollagenkugeln zeigten zwar eine teilweise Magensaftresistenz, sind aber aufgrund der Instabilität der Formulierung in Ileostomieflüssigkeit ebenfalls nicht zum Colon-Targeting geeignet.

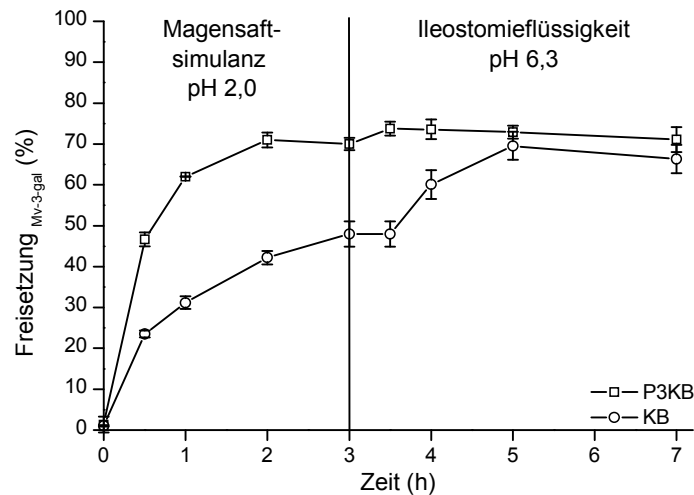


Abb. 3-18: Freisetzungsprofil von Mv-3-gal aus Anthocyan-Kollagen-Kugeln KB und Anthocyan-Pektin-Kollagen-Kugeln P3KB während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomieflüssigkeit. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Trotz mangelnder Eignung als Matrixsubstanz erschien aufgrund der ermittelten Daten und, wie von Nicklas *et al.* (2009) kürzlich beschrieben, die Verwendung von Schwammkollagen aus *C. reniformis* Nardo als magensaftresistentes Coating einer im Dünndarm weitgehend stabilen Formulierung (z.B. Pektin) sinnvoll. Parallel zu den hier vorgestellten Untersuchungen wurde auch das Coating von Anthocyan-Pektin-Kugeln mit Schwammkollagen untersucht. Aufgrund der Viskosität der Lösung war ein Verdüsen im Rahmen des Wirbelschicht-Prozesses nicht realisierbar. Alternativ wurde das klassische Dragierkessel-Verfahren verwendet, womit jedoch trotz vielfacher Versuche keine gleichmäßige Coatingschicht aufgebracht werden konnte. Wenn es gelingt, die Filmbildung durch Verbesserung der Coating-Rezeptur sowie durch Weiterentwicklung des Herstellungsprozesses zu optimieren, könnte Schwammkollagen eine Alternative zu Schellack als magensaftresistentes Coating darstellen.

3.2.3 Herstellung von mit Schellack gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BGwSch und ihre Charakterisierung (Technikumsmaßstab)

Im Abschnitt 3.2.1.1 wurde gezeigt, dass im verwendeten Modellsystem mit Schellack gecoateten APK ein Transport von Anthocyanen in den Dickdarm erreicht wird (vgl. 3.2.1). Um weiterführende Studien zur Wirksamkeit dieser Colon-Targeting-Formulierung *in vivo* durchzuführen, war die Herstellung von mehreren Kilogramm des Materials erforderlich. Diese Menge ließ sich mit der bisher verwendeten Methodik (Eintropftechnik, Mini-Glatt Wirbelschichtanlage) jedoch nicht gewinnen. Infolgedessen wurde eine neue Herstellungsmethode für Schellack gecoatete APK unter Verwendung der „Laminar Jet Break-up“-Technologie etabliert (vgl. 2.6.6). Bei dieser von Hulst *et al.* (1985) entwickelten Technik wird die Instabilität laminarer Strömungen bei Überlagerung mit mechanischer Vibration definierter Wellenlänge zur Produktion von Hydrogelkugeln ausgenutzt. Das anschließende Coating erfolgte an einer GPCG 1 Wirbelschichtanlage, die Batchgrößen von bis zu 5 kg erlaubt.

3.2.3.1 Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BG mittels „Laminar Jet Break-up“-Technologie

Zur Herstellung der APK wurde ausgehend von der im Labormaßstab etablierten Methode amidiertes Pektin in Reinstwasser gelöst (4 % w/w) und mit Heidelbeerextrakt (0,4 % w/w bezogen auf Pektin) versetzt. Zudem wurde, wie nachfolgend noch begründet, Glycerin (10 % w/w bezogen auf Pektin) zugegeben. Die Mischung wurde anschließend mit einer Flussrate von 6000 g/h durch eine vibrierende Düse gepumpt. Im Vergleich zur Herstellung mittels Eintropfmethode entsprach dies einer Steigerung der Produktionsrate um den Faktor 60. Durch die überlagerte mechanische Vibration an der Düse zerbrach der Flüssigkeitsstrom in gleichförmige Tropfen. Diese fielen in die calciumchloridhaltige Quervernetzerlösung und bildeten aufgrund ionotroper Gelierung sofort Gelkugeln. Diese violetten APK (P4BG) wurden mittels Sieb aus der Quervernetzerlösung abgetrennt, mit Wasser gewaschen und anschließend schonend getrocknet, wobei sich die Größe der Kugeln aufgrund des Wasserverlustes stark verminderte. Im Vergleich zur Labormethode ließ sich der Gehalt an Heidelbeerextrakt in der Eintropflösung verdoppeln, ohne dass Probleme bei der Förderung durch die Düse auftraten. Eine weitere Erhöhung des Anthocyananteils führte jedoch zu ungleichmäßiger Vertropfung. Aufgrund der hohen Produktionsmenge konnte die Trocknung nicht wie im Labormaßstab im Umlufttrockenschrank durchgeführt werden. Demzufolge wurde in der Wirbelschicht getrocknet. In Vorversuchen ist dabei festgestellt worden, dass es zu einer sehr starken Deformation der APK, verbunden mit

einer Eindellung der Oberfläche, kam (Daten nicht gezeigt). Durch Zusatz des Weichmachers Glycerin zur anthocyanhaltigen Pektinlösung ließ sich dieser Effekt soweit reduzieren, dass die hergestellten Kugeln für das spätere Coating verwendbar waren.

3.2.3.2 Charakterisierung von Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BG

REM-Aufnahmen (Abb. 3-19) zeigten, dass das getrocknete Material P4BG trotz Glycerinzusatz leichte Eindellungen aufwies. Die Oberfläche der Kugeln war im Vergleich zu P4BRT (Abb. 3-13) rauer, was aus dem Glycerinzusatz oder dem veränderten Trocknungsverfahren resultieren kann. Der mittlere Durchmesser der Kugeln lag bei 1,6 mm.

Neben P4BG wurden mit der gleichen Methode anthocyanfreie Pektin-Kugeln P4G hergestellt, die in der später beschriebenen *in vivo* Studie (vgl. 3.2.4) als Placebo-material dienten.

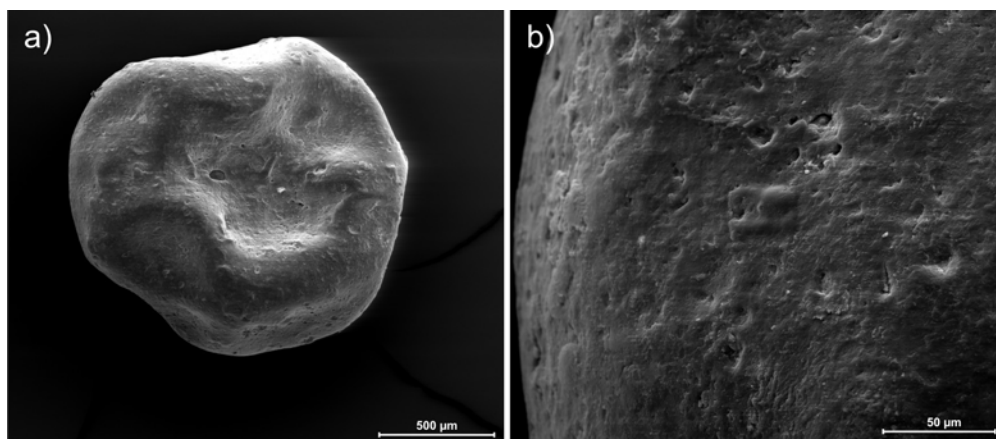


Abb. 3-19: REM-Aufnahmen von APK P4BG. Zu Herstellungsbedingungen der Formulierungen vgl. Abschnitt 4.3.7.1.

Identifizierung und Quantifizierung der in den APK enthaltenen Anthocyane erfolgte, wie für das im Labormaßstab hergestellte Material, nach Extraktion mittels HPLC-UV/Vis unter Verwendung von Referenzsubstanzen.

Abb. 3-20 zeigt das Anthocyanprofil von P4BG nach Extraktion. Es besteht wie der verwendete Heidelbeereextrakt aus den 15 für die Beerenfrüchte typischen Anthocyanen. Mittels „Laminar Jet Break-up“-Technologie wurden somit Anthocyane ebenfalls erfolgreich in die Pektinmatrix verkapselt. Der nach Extraktion im Material P4BG erfasste Anthocyangehalt lag bei $2,62 \pm 0,05$ g/100 g. Im Vergleich zum im Labormaßstab hergestellten Material P4BRT wies die Formulierung P4BG einen um

den Faktor 1,75 höheren Anthocyangehalt auf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass mittels „Laminar Jet Break-up“-Technologie eine Pektinlösung mit höherem Anthocyangehalt verarbeitet werden konnte.

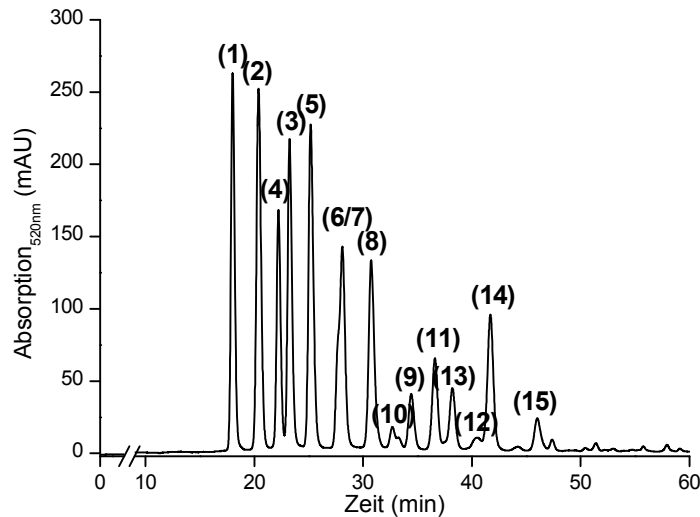


Abb. 3-20: HPLC-Chromatogramm des Anthocyanprofils der mittels „Laminar Jet Break-up“-Technologie hergestellten APK P4BG nach Extraktion. Detektion: $\lambda = 520 \text{ nm}$. Peakzuordnung: (1) Dp-3-gal, (2) Dp-3-glc, (3) Dp-3-ara, (4) Cy-3-gal, (5) Cy-3-glc, (6) Cy-3-ara, (7) Pt-3-gal, (8) Pt-3-glc, (9) Pt-3-ara, (10) Pn-3-gal, (11) Pn-3-glc, (12) Pn-3-ara, (13) Mv-3-gal, (14) Mv-3-glc, (15) Mv-3-ara. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.1.

3.2.3.3 Herstellung von mit Schellack gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BGwSch19, P4BGwSch15, P4BGwSch8

Das mittels „Laminar Jet Break-up“-Technologie hergestellte Material P4BG wurde zur Hydrophobierung der Oberfläche in der Wirbelschicht mit Schellack gecoatet. Um den Einfluss der Filmdicke auf die Freisetzungseigenschaften zu untersuchen, wurden Materialien mit variierendem Coatinglevel (vgl. Tabelle 3-8, P4BGwSch19, P4BGwSch15, P4BGwSch8) hergestellt.

Im Gegensatz zum Labormaßstab wurde statt ethanolischer Schellacklösung wässrige Ammoniumschellackatlösung für das Coating eingesetzt. Letztere wird durch Umsetzung von Schellack mit Ammoniumsalzlösungen hergestellt und ist in standardisierter, gleichbleibender Qualität kommerziell erhältlich. Die erzeugten Filmschichten sind somit reproduzierbar. Die Verwendung der wässrig-alkalischen Sprühlösung ist durch den Verzicht auf das explosive und teure organische Lösungsmittel sicherer und wirtschaftlicher (Qussi und Suess, 2005). Den Hauptvorteil stellt jedoch die Lagerstabilität der damit erzeugten Filmschichten dar. In Untersuchungen mit Paracetamol-Pellets wurde festgestellt, dass sich die Freisetzungseigenschaften von mit ethanolischer Schellacklösung gecoateten Materialien innerhalb eines Jahres

Lagerung bei 25°C und 60 % Luftfeuchtigkeit stark veränderten und eine vorzeitige Freisetzung in Magensaftsimulanz auftrat. Als Ursache für diese reduzierte Magensaftresistenz wird eine Verringerung der Anzahl an Carboxylgruppen im Schellackfilm durch inter- und intramolekulare Veresterungsreaktionen angenommen. Mit wässrig-alkalischer Schellacklösung beschichtete Pellets zeigten dagegen nach Lagerung unter identischen Bedingungen keine Veränderung (Penning, 1996; Specht *et al.*, 1998), da durch die Ammoniumsalzbildung an den Carboxylgruppen die Veresterung verhindert wird (Limmatvapirat *et al.*, 2005).

Das Coating der APK P4G erfolgte mittels Wurster-Technologie an einer GPGC 1 Wirbelschichtanlage (Glatt, Binzen). Wässrige Schellacklösung (12 % w/w) mit Talkum (10 % w/w bezogen auf Schellack) als Trennmittel und Glycerin (10 % w/w bezogen auf Schellack) als Weichmacher wurde eingesetzt. Wie in Abschnitt 2.6.7 ausführlich beschrieben, handelt es sich beim Coating in der Wirbelschicht um einen komplexen Prozess, der von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst wird. Die geeigneten Produkt- sowie Prozessparameter wurden auf Grundlage von Literaturdaten gewählt und, sofern erforderlich, optimiert (Trenktrog *et al.*, 1996; Qussi und Suess, 2005).

Einen wichtigen Faktor hierbei stellt die Größe der Sprühflüssigkeitstropfen dar, die u. a. für das Auftreten von Agglomeration verantwortlich ist (Maa *et al.*, 1996). Zur Charakterisierung der Tropfengrößenverteilung beim Versprühen von wässrigen Schellacklösungen wurden Untersuchungen mittels Laserdiffraktometrie durchgeführt. Bei dieser Methode wird das bei Durchleuchtung der Tropfen erzeugte Beugungsmuster einer Laserlichtquelle erfasst und zur Berechnung der Teilchengröße verwendet.

Die Messanordnung wurde so gewählt, dass die Größenmessung im Sprühkegel der Coatinglösung in einer Höhe von ca. 5 cm erfolgte. Dort befindet sich während des Coatingprozesses das Wursterrohr, wo es zu Aufprall und Anhaftung der Sprühtropfen auf die Substratpartikel kommt. Neben den Eigenschaften der Sprühlösung (Dichte, Viskosität, Oberflächenspannung) wird die Tropfengröße vom Sprühluftdruck und der Sprührate beeinflusst (Cole *et al.*, 1995), die in diesem Versuch im Bereich von 1,0 bis 2,0 bar bzw. 6,2 bis 11,0 g/min variiert wurden.

Die Versuchsergebnisse (Tabelle 3-7) zeigten, dass ein erhöhter Sprühdruck zu einer feineren Dispergierung führte. Durch den in Abschnitt 3.2.3.7 vorgestellten Zusatz von Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) zur wässrigen Sprühlösung stieg die Tropfengröße dagegen leicht an. Dies könnte aus der Veränderung der Viskosität der Lösung infolge Zusatzes des Polysaccharids resultieren. Bei beiden Lösungen wirkt sich die Sprührate im untersuchten Bereich nicht auf die Sprühtropfengröße aus. Nach

Maa *et al.* (1996) tritt Agglomeration bei Coatingprozessen in geringerem Umfang auf, wenn das Verhältnis zwischen Substratpartikel- und Sprühtropfengröße ansteigt. Zudem verbessern kleine Tropfen die Benetzung und Ausbildung einer gleichmäßigen Filmschicht (Guignon *et al.*, 2002). Im vorliegenden Prozess wurde eine Verringerung der Sprühtropfengröße durch Erhöhung des Sprühluftdrucks auf 1,5 oder 2,0 bar erreicht (Tabelle 3-7). Von Nachteil ist dabei allerdings, dass mit steigendem Sprühluftdruck auch ein zunehmender Anteil an Coatingmaterial und Substratpartikeln bis in den Produktfilter oberhalb der Expansionszone gefördert wird. Dieser verstopft dadurch, und der Luftstrom im System wird eingeschränkt. Um eine feinere Dispergierung der Tröpfchen bei ausreichender Funktionsfähigkeit der Anlage zu gewährleisten, wurden die Coatingprozesse beim mittleren Sprühdruk von 1,5 bar durchgeführt.

Tabelle 3-7: Median der Tropfengröße beim Versprühen von 12 % (w/w) wässriger Schellacklösung und 12 % (w/w) wässriger Schellacklösung mit 15 % HPMC (w/w bezogen auf Schellack) (2. Wert in Klammern). Beide Sprühlösungen enthielten zusätzlich Glycerin und Talkum in Konzentrationen von 10 % (w/w) bezogen auf Schellack. n.b. - nicht bestimmt. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.7.2.2.

Median Sprühtropfengröße (μm)	Sprühdrate		
	6,2 g/min	9,2 g/min	11,0 g/min
Sprühluftdruck 1,0 bar	n.b.	n.b.	22,20 (21,56)
1,5 bar	15,67 (17,24)	14,89 (17,78)	15,44 (17,39)
2,0 bar	n.b.	n.b.	14,92 (16,30)

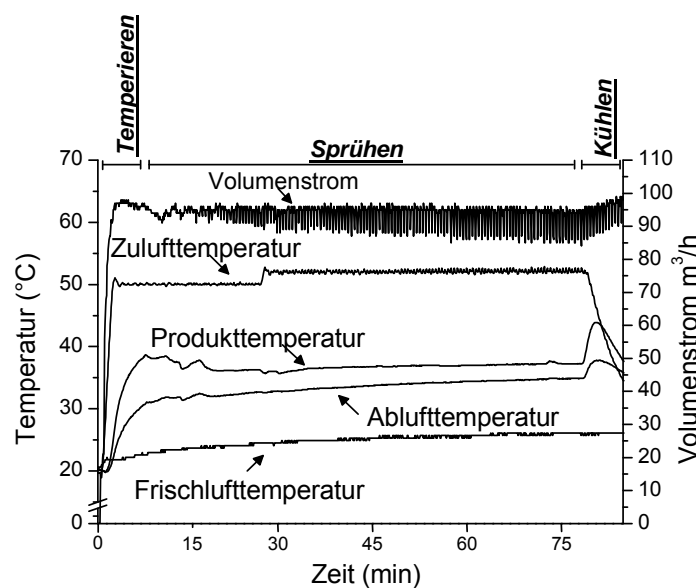


Abb. 3-21: Frischluft-, Zuluft-, Produkt- und Ablufttemperatur sowie Sprühdrate während des Coatings von APK P4BG mit wässriger Schellacklösung (12 % w/w) mit Talkum sowie Glycerin (je 10 % w/w bezogen auf Schellack).

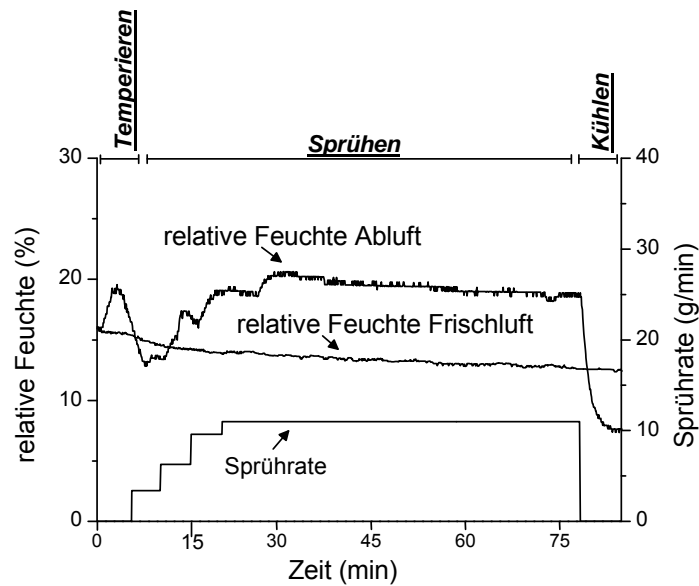


Abb. 3-22: Relative Feuchte von Frisch- und Abluft sowie Sprütrate während des Coatings von APK P4BG mit wässriger Schellacklösung (12 % w/w) mit Talkum sowie Glycerin (je 10 % w/w bezogen auf Schellack).

Abb. 3-21 und Abb. 3-22 zeigen exemplarisch die Verläufe weiterer Kenngrößen (Volumenstrom, Temperaturen, Feuchtigkeiten, Sprütrate) während des Coatings der APK mit wässriger Schellacklösung. Der Beschichtungsprozess ist in die Phasen Temperieren, Sprühen und Kühlen unterteilt. Die Erfassung der Prozessparameter erfolgte mittels in die Wirbelschichtanlage integrierter Sensoren (vgl. 4.2.7).

Der Volumenstrom erreichte nach kurzer Zeit den Sollwert von $96 \text{ m}^3/\text{h}$, der erforderlich war, um das zu coatende Material ausreichend zu fluidisieren. Die zunehmende Schwankung im Verlauf des Prozesses ist auf die steigende Belegung des Stauchfilters und die damit verbundene Verminderung der Luftströmung beim Abrütteln zurückzuführen.

Die Zulufttemperatur stieg ebenfalls innerhalb weniger Minuten auf den Anfangssollwert von 50°C . Im Verlauf des Prozesses wurde der Wert auf 52°C erhöht, um bei erhöhter Sprütrate die Produkttemperatur konstant zu halten. Die Zulufttemperatur wurde so gewählt, dass eine Produkttemperatur (= Lufttemperatur im Produktbehälter) von ca. 35°C vorlag. In diesem Temperaturbereich war ausreichende Trocknung des wässrigen Coatings gewährleistet, die thermische Belastung der APK blieb gering.

Die Temperatur der Frischluft, wobei es sich um Raumluft handelte, erhöhte sich durch die Abwärme des Gerätes leicht. Abluft- und Produkttemperatur verliefen weitgehend parallel, jedoch war die Abluft infolge Abkühlung bei Durchgang durch die Produktrückhaltefilter um 3 bis 5°C kühler.

Die rel. Feuchte der Abluft stieg im Vergleich zur Zuluft während des Temperierens kurz an, was auf das Trocknen des zu coatenden Materials zurückzuführen ist. Der sich anschließende zunehmende Feuchtigkeitseintrag durch Erhöhung der Sprühdosis spiegelte sich ebenfalls in einem Anstieg der Abluftfeuchte wieder. Während des Kühlens, nach Ende des Sprühprozesses, sank die Feuchte wieder ab. Die Frischluftfeuchte blieb weitgehend konstant. Der leichte Anstieg im Verlauf des Prozesses resultierte aus dem Temperaturanstieg der Frischluft.

3.2.3.4 Charakterisierung von mit Schellack gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BGwSch19, P4BGwSch15, P4BGwSch8

In Abb. 3-19 sind exemplarisch REM-Aufnahmen des Materials P4BGwSch19 dargestellt. Die Filmbildung aus einer Vielzahl einzelner Tröpfchen der Sprühdosis ist erkennbar. Durch das Coating mit wässriger Schellacklösung wurde eine glänzende farblose Filmschicht auf dem Material erzeugt.

Das Coatinglevel der Materialien wurde auf Grundlage der Veränderung in Anthocyan- und Wassergehalt berechnet (vgl. 4.3.8.4). Tabelle 3-8 fasst die entsprechenden Daten sowie die Kurzbezeichnung der hergestellten Materialien zusammen.

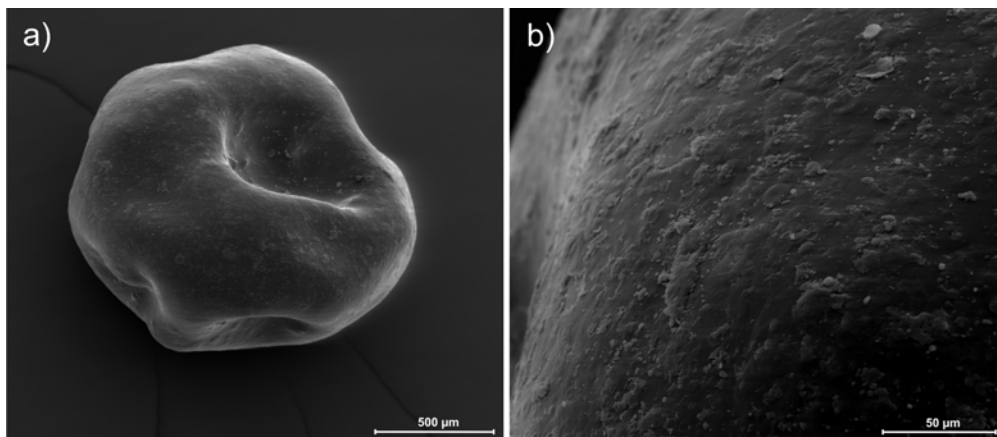


Abb. 3-23: REM-Aufnahmen von mit wässriger Schellacklösung gecoateten APK P4BGwSch19. Zu Herstellungsbedingungen der Formulierungen vgl. Abschnitt 4.3.7.2.

Tabelle 3-8: Bezeichnung sowie Anthocyangehalt, Wassergehalt und Coatinglevel von APK und mit wässriger Schellacklösung gecoateten APK. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.

Formulierung	Anthocyangehalt (g/100 g)	Wassergehalt (g/100 g)	Coatinglevel¹ (%)
P4BG	2,62 \pm 0,05	8,10 \pm 0,01	-
P4BGwSch8	2,45 \pm 0,01	6,88 \pm 0,07	8
P4BGwSch15	2,31 \pm 0,03	5,80 \pm 0,02	15
P4BGwSch19	2,22 \pm 0,01	5,88 \pm 0,03	19

¹ zur Berechnung vgl. 4.3.8.4

3.2.3.5 Freisetzungseigenschaften von mit Schellack gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BGwSch19, P4BGwSch15, P4BGwSch8

Die Freisetzungseigenschaften der hergestellten Formulierungen (vgl. Tabelle 3-8) wurden im bereits beschriebenen Modellsystem untersucht, das die Passage des humanen GIT simuliert. Dazu wurden die Materialien bei 37°C 3 h in Magensaftsimulanz pH 2,0 und 4 h in Ileostomieflüssigkeit pH 6,3 inkubiert. Bei Formulierung P4BGwSch19 wurde die Inkubation für 15 h in Colostomieflüssigkeit pH 6,2 fortgesetzt.

Abb. 3-24 zeigt beispielhaft die Freisetzung von Mv-3-gal aus den untersuchten Materialien in Magensaftsimulanz und Ileostomieflüssigkeit. Aus den ungecoateten APK P4BG wurden 75 % des enthaltenen Mv-3-gal bereits in Magensaftsimulanz freisetzt. Der gleiche Effekt wurde für im Labormaßstab hergestellte APK festgestellt und bereits an anderer Stelle diskutiert (vgl. 3.2.1.3). Coating mit 8 % Schellack als hydrophobe Barriere reduzierte die vorzeitige Anthocyan-Freisetzung nicht. Durch Erhöhung des Coatinglevels auf 15 % und 19 % wurde die Freisetzung der Pigmente im Magensaftsimulanz jedoch auf 35 % bzw. 18 % vermindert. Die Dicke der Filmschicht ist somit umgekehrt proportional zur Freisetzungsrage. Dies hat man bereits in anderen Studien zur Freisetzung aus mit Schellack gecoateten Materialien gezeigt (Pearnchob *et al.*, 2003b; Qussi und Suess, 2005). Im Vergleich zum im Labormaßstab hergestellten Material P4BSch war ein höheres Coatinglevel für die Erreichung einer vergleichbaren Magensaftresistenz erforderlich. APK P4BG wiesen eine unregelmäßigere Partikelform auf. Infolgedessen wurde ein höherer Schellackanteil benötigt, um eine stabile Filmschicht zu erzeugen.

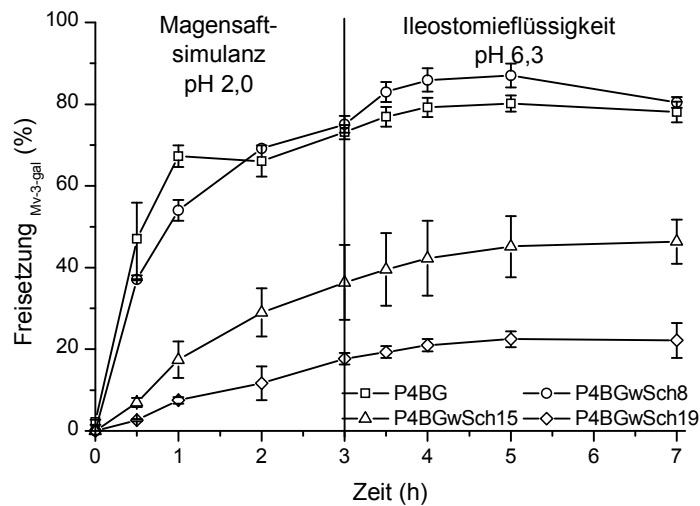


Abb. 3-24: Freisetzungsprofil von Mv-3-gal aus ungecoateden APK P4BG sowie mit wässriger Schellacklösung gecoateten APK P4BGwSch8 (Coatinglevel 8%), P4BGwSch15 (Coatinglevel 15%) und P4BGwSch19 (Coatinglevel 19%) während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomieflüssigkeit. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

In Ileostomieflüssigkeit wurden aus P4BGwSch15 und P4BGwSch19 ebenfalls geringe Mengen an Anthocyanen abgegeben, sodass sich während der Inkubation eine Gesamtfreisetzung (in Magensaftsimulanz/Ileostomieflüssigkeit) von 46 ± 5 % bzw. 22 ± 4 % des enthaltenen Mv-3-gal ergab. Es wird deutlich, dass der Hauptanteil der Anthocyane in der Formulierung eingeschlossen bleibt und unter den Modellbedingungen in den Dickdarm gelangt. Da die Formulierung P4BGwSch19 die geringste Freisetzung in Magensaftsimulanz und Ileostomieflüssigkeit aufwies, wurden diese Kugeln zusätzlich in Colostomieflüssigkeit inkubiert. Nach 15 h anaerober Inkubation war das Material fast vollständig abgebaut. Durch Bestimmung des nach Inkubation in Magensaftsimulanz, Ileostomie- und Colostomieflüssigkeit noch im Material enthaltenen Pigmentanteils wurde eine Gesamtfreisetzungsrate von 89 ± 16 % ermittelt. Die große Spannweite in der Freisetzungsrate wird auf geringe Unterschiede in den Eigenschaften der Schellackschicht zwischen einzelnen Kugeln zurückgeführt, die ein unterschiedliches Auflösungsverhalten hervorrufen (Förmer *et al.*, 2006).

Unter den Bedingungen des hier verwendeten *in vitro* und *ex vivo* Modells zur Simulation des humanen GIT wurde somit mit Schellack gecoateten APK P4BGwSch19 ein gerichteter Transport der Pigmente in den Dickdarm sowie eine Freisetzung in diesem Darmabschnitt erzielt.

3.2.3.6 Untersuchungen zur Lagerstabilität von Anthocyan-Pektin-Kugeln

Zur Untersuchung der *in vivo* Wirksamkeit wurde das Material P4BGwSch19 im Modell der murinen DSS-Colitis untersucht und über einen Zeitraum von bis zu drei Monaten mit dem Futter verabreicht. Infolgedessen musste die Lagerstabilität der APK charakterisiert werden. Aus bei 4°C und unter Lichtausschluss gelagertem Material wurden zu definierten Zeitpunkten Stichproben entnommen und der Gesamtanthocyan-gehalt nach Extraktion mittels HPLC-UV/Vis bestimmt. Abb. 3-25 zeigt, dass der Anthocyan-gehalt in den Materialien P4BG sowie P4BGwSch19 während der Lagerung weitestgehend konstant blieb. Untersuchungen zur Freisetzung nach Lagerung wurden nicht durchgeführt, da - wie im Abschnitt 3.2.3.3 beschrieben - bekannt ist, dass sich wässrige Schellackfilme durch konstante Freisetzungseigenschaften auszeichnen.

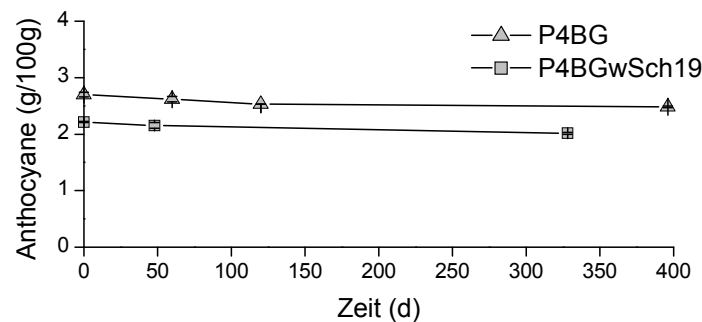


Abb. 3-25: Veränderung des Anthocyan-gehalts in APK P4BG und mit wässriger Schellacklösung gecoateten APK P4BGwSch19 (Coatinglevel 19%) während Lagerung bei 4°C unter Lichtausschluss. Angaben in g/100 g. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.1.

3.2.3.7 Herstellung von mit Schellack/Hydroxypropylmethylcellulose gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln HPMC5, HPMC15

Schellack stellt eine natürliche Alternative zur Erzeugung von magensaftresistenten Überzügen dar, da das Polymer infolge der Zusammensetzung aus verschiedenen Hydroxycarbonsäuren bei saurem pH-Wert unlöslich ist. Die pK_a -Werte verschiedener kommerziell erhältlicher Schellacke liegen im Bereich von 5,60 bis 6,50 (Buch *et al.*, 2009), weshalb es im Darm aufgrund der dort vorherrschenden pH-Wert-Bedingungen zur Auflösung der Überzüge kommt sollte. Verschiedene Studien beschreiben jedoch, dass sich das Polymer zu langsam in intestinalen Flüssigkeiten auflöst, was zur Freisetzung zu geringer Wirkstoffkonzentrationen führt (Pearnchob *et al.*, 2003a; Pearnchob *et al.*, 2004; Qussi und Suess, 2005).

Eine Möglichkeit, das Auflösungsverhalten von Schellackschichten zu verbessern, stellt die Integration von Porenbildnern wie Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) dar. Bei

HPMC handelt es sich um mit 2-Hydroxypropyl- sowie Methylresten veretherte Cellulose, die eine sehr gute Wasserlöslichkeit aufweist (Rhodes und Porter, 1998). Gemäß ZZuV darf die Verbindung als Zusatzstoff E 464 *quantum satis* bei der Herstellung von Lebensmitteln eingesetzt werden.

Um den Einfluss des Porenbildners auf die Freisetzungseigenschaften des entwickelten Colon-Targeting-Systems zu evaluieren, wurden auf dem Substrat P4BG2 Schellackfilme mit einem Gehalt an HPMC erzeugt.

Wässrige Schellacklösungen (12 % w/w) mit 5 % bzw. 15 % HPMC (w/w bezogen auf Schellack) sowie mit Talkum (10 % w/w bezogen auf Schellack) und Glycerin (10 % w/w bezogen auf Schellack) wurden als Sprühhösung verwendet. Die Durchführung des Coatings erfolgte wie in Abschnitt 3.2.3.3 beschrieben, mittels Wurster-Technologie. Verläufe der Prozessparameter entsprachen weitgehend den in Abb. 3-21 und Abb. 3-22 für das Coating mit wässriger Schellacklösung gezeigten.

3.2.3.8 Charakterisierung von mit Schellack/Hydroxypropylmethylcellulose gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln HPMC5, HPMC15

REM-Aufnahmen der mit HPMC-haltiger Schellacklösung gecoateten Formulierungen zeigt Abb. 3-26. Die Zusammensetzung der Filmschicht aus einer Vielzahl einzelner Tropfen ist auch hier erkennbar. Im Gegensatz zu reinen Schellackfilmen weisen die Filmschichten kleine runde Poren auf, wobei es sich um in die Schellackschicht eingeschlossenes HPMC handelt. Diese charakteristische Oberflächenstruktur wurde auch bei mit Schellack/HPMC gecoateten Cellulosepellets beobachtet (Qussi und Suess, 2005).

Zur weiteren Charakterisierung der Materialien wurden nach dem Coating Anthocyan- und Wassergehalt bestimmt, um davon ausgehend das erzeugte Coatinglevel zu berechnen (Tabelle 3-9; zur Berechnung vgl. 4.3.8.4). Die dabei ermittelten Anthocyangehalte waren geringer als die in Kapitel 3.2.3.3 für P4BG bzw. die daraus hergestellten gecoateten Materialien gezeigten Werte. Das hier verwendete Substrat P4BG2 wurde analog zur P4BG hergestellt, allerdings wurde ein Heidelbeerextrakt mit einem geringeren Anthocyangehalt verwendet.

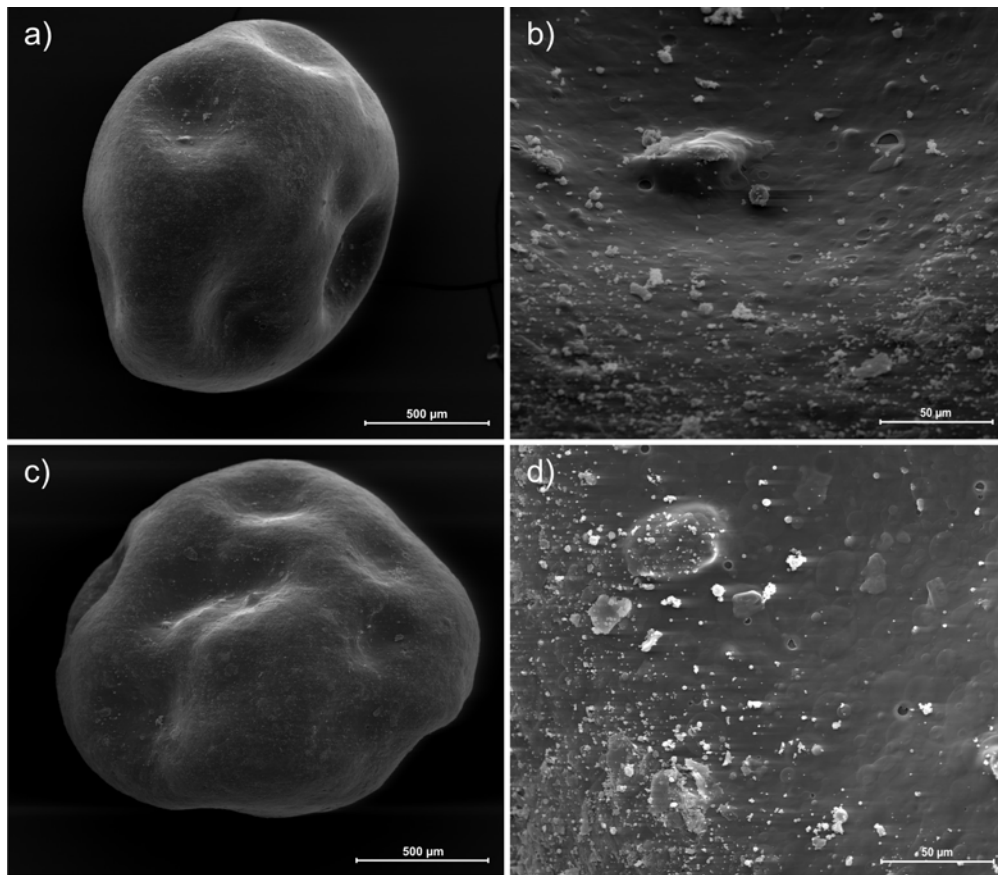


Abb. 3-26: REM-Aufnahmen von APK, die mit wässriger Schellacklösung (12 % w/w) mit 5 % HPMC (w/w bezogen auf Schellack) (HPMC5 a, b) bzw. 15 % HPMC (w/w bezogen auf Schellack) (HPMC15 c, d) gecoatet wurden. Zu Herstellungsbedingungen der Formulierungen vgl. Abschnitt 4.3.7.2.

Tabelle 3-9: Bezeichnung sowie Anthocyan Gehalt, Wassergehalt und Coatinglevel von APK, die mit wässriger Schellacklösung (12 % w/w) mit 5 % HPMC (w/w bezogen auf Schellack) (HPMC5) bzw. 15 % HPMC (w/w bezogen auf Schellack) (HPMC15) gecoatet wurden. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.

Formulierung	Anthocyan Gehalt (g/100 g)	Wassergehalt (g/100 g)	Coatinglevel ¹ (%)
HPMC5	1,51 \pm 0,05	5,9 \pm 0,2	16
HPMC15	1,48 \pm 0,16	5,8 \pm 0,1	19

¹ zur Berechnung vgl. 4.3.8.4

3.2.3.9 Freisetzungseigenschaften von mit Schellack/Hydroxypropylmethylcellulose gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln HPMC5, HPMC15

Die Freisetzungseigenschaften der Formulierungen HPMC5 und HPMC15 wurden im bereits beschriebenen Modellsystem untersucht. Dazu wurden die Materialien bei 37°C 3 h in Magensaftsimulanz pH 2,0, 4 h in Ileostomieflüssigkeit pH 6,3 und schließlich 15 h in Colostomieflüssigkeit pH 6,2 inkubiert, um die Passage des

humanen GIT zu simulieren. Abb. 3-27 zeigt beispielhaft die Freisetzung von Mv-3-gal aus den untersuchten Formulierungen in Magensaftsimulanz und Ileostomieflüssigkeit. Ferner ist die Freisetzung aus ausschließlich mit Schellack gecoateten APK (P4BGwSch19) dargestellt.

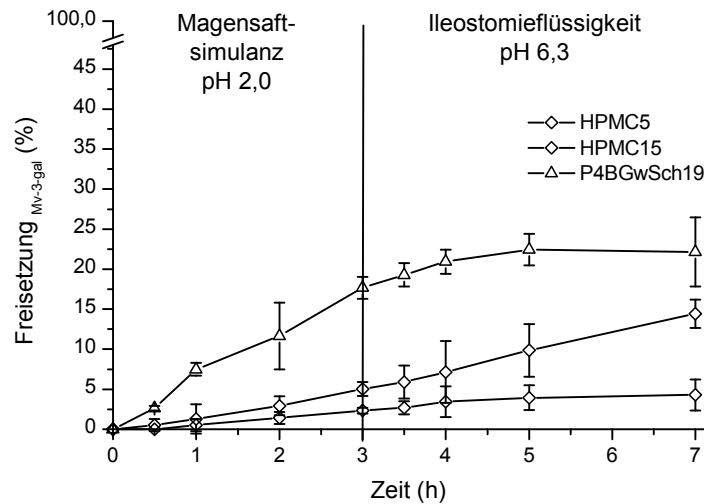


Abb. 3-27: Freisetzungsprofil von Mv-3-gal aus mit wässriger Schellacklösung gecoateten APK P4BGwSch19 sowie aus APK, die mit wässriger Schellacklösung mit einem Gehalt von 5 % (w/w) HPMC (HPMC5) bzw. 15 % (w/w) HPMC (HPMC15) gecoatet wurden während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomieflüssigkeit. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Im Vergleich zu P4BGwSch19 zeigten die mit Schellack-HPMC-Lösung gecoateten Formulierungen mit Freisetzungsraten ≤ 5 % eine verbesserte Magensaftresistenz. Dies wird darauf zurückgeführt, dass HPMC als zusätzlicher Weichmacher wirkt, der Plastizität und Stabilität der Filme erhöht und somit die Barrierefunktion verbessert (Qussi und Suess, 2006). In der Formulierung mit 5 % HPMC ist offensichtlich der Anteil an Porenbildnern zu gering, um einen Effekt auf die Anthocyan-Freisetzung in Ileostomieflüssigkeit zu zeigen. Dagegen erhöhte ein Zusatz von 15 % HPMC die Freisetzung im Ileum deutlich. Nach anschließender Inkubation der Formulierungen über einen Zeitraum von 15 h in Colostomieflüssigkeit wurden durch Bestimmung der noch im Material enthaltenen Pigmente Gesamtfreisetzungsraten von 85 ± 19 % (HPMC5) sowie 100 % (HPMC15) ermittelt. Das Material HPMC5 zeigte dabei mit P4BGwSch19 vergleichbar eine fast vollständige Degradation und Anthocyan-Freisetzung, jedoch verbunden mit einer gewissen Inhomogenität des Materials. Die Formulierung HPMC15 wurde dagegen vollständig abgebaut, die verkapselten Pigmente wurden vollständig freigesetzt. Nach Qussi *et al.* (2006) kommt es durch Auflösung von HPMC zur zunehmenden Bildung von Poren in der Schellackmatrix, welche die Wirkstofffreisetzung in das umgebende Medium beschleunigt.

Durch den Einsatz des Porenbildners HPMC in einer Konzentration von 15 % (bezogen auf den Schellackanteil) wurde somit eine vollständige Anthocyan-Freisetzung aus gecoateten APK im simulierten Dickdarm erreicht. Allerdings ist diese Modifikation auch mit einer beschleunigten Freisetzung in Ileostomieflüssigkeit verbunden.

3.2.4 Studien zum *in vivo* Effekt von mit Schellack gecoateten Anthocyan-Pektin-Kugeln P4BGwSch19 auf die experimentelle murine DSS-Colitis

Ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der Effekte von Wirkstoffen bei entzündlichen Darmerkrankungen stellt die murine „Dextran Sodium Sulfat“ (DSS)-Colitis dar (Elson *et al.*, 1995). Durch Gabe von DSS wird dabei in Mäusen schnell, effektiv und reproduzierbar eine Entzündung der Dickdarmmukosa induziert, die durch Durchfall, Colonverkürzung und Gewichtsabnahme sowie durch multiple Erosionen, Ulzerationen, den Verlust von Krypten sowie Makrophagen- bzw. Lymphozyteninfiltration charakterisiert ist (Gaudio *et al.*, 1999). Dabei wirkt in dieser chemisch ausgelösten Colitis DSS toxisch auf das mukosale Epithel, was zu verstärkter Apoptose und Phagozytose durch Makrophagen führt. Der dadurch hervorgerufene Barriereverlust resultiert in einem Kontakt zwischen luminalen Antigenen und Lymphozyten der *Lamina propria*, welche zu verstärkter Produktion proinflammatorischer Zytokine angeregt werden (Piberger, 2009).

Der *in vivo* Effekt des entwickelten anthocyanhaltigen Colon-Targeting-Systems P4BGwSch19 bei entzündlichen Darmerkrankungen wurde am o. g. Modell der murinen DSS-Colitis untersucht, da dieses Tiermodell im Rahmen einer Projektkooperation zugänglich war und bereits erfolgreich zur Charakterisierung der Wirkung von unformuliertem Heidelbeerextrakt verwendet worden war (Piberger, 2009).

Bei der Bewertung der Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass die untersuchte Formulierung P4BGwSch19 auf Grundlage der Bedingungen im humanen GIT entwickelt wurde. Dieser unterscheidet sich anatomisch und physiologisch von dem der Maus. So liegen z.B. Unterschiede in pH-Werten und mikrobieller Besiedelung vor, die dieses Tiermodell zur Simulation der Wirkstofffreisetzung aus Colon-Targeting-Systemen während der Passage des menschlichen Verdauungstrakts weniger geeignet machen (Kararli, 1995; McConnell *et al.*, 2008a).

Im Rahmen der durchgeführten Untersuchung wurden Mäuse mit Pellets gefüttert, die mit Schellack gecoateten APK P4BGwSch19 bzw. dem entsprechenden anthocyanfreien Placebomaterial P4GwSch19 vermischt waren. Die Kontrollgruppe erhielt

normale Futterpellets. Die Placebogruppe wurde mitgeführt, um einen durch die weiteren Bestandteile der Formulierung (amidiertes Pektin, Glycerin, Schellack) hervorgerufenen Effekt auszuschließen. Zwei Wochen nach Beginn der Fütterung wurde die chronische Colitis induziert, indem in vier Zyklen 2,5 % DSS über das Trinkwasser verabreicht wurde. Vier Wochen nach der letzten DSS-Gabe hatte sich die chronische Colitis manifestiert und war, wie eingangs beschrieben, durch Erosionen und Veränderungen der Colonmukosa charakterisiert. Der Versuch wurde beendet und mesenteriale Lymphknoten sowie das Colon zur Bestimmung von Colonlänge, der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (IL6 und IFN γ) sowie des histologischen Scores entnommen. Letzterer wurde als Maß für den Entzündungsgrad an einem distalen Stück des Colons nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung verblindet bewertet. Zur Ermittlung des Gesamtscores wurden Epithelschäden als auch das entzündliche Infiltrat begutachtet.

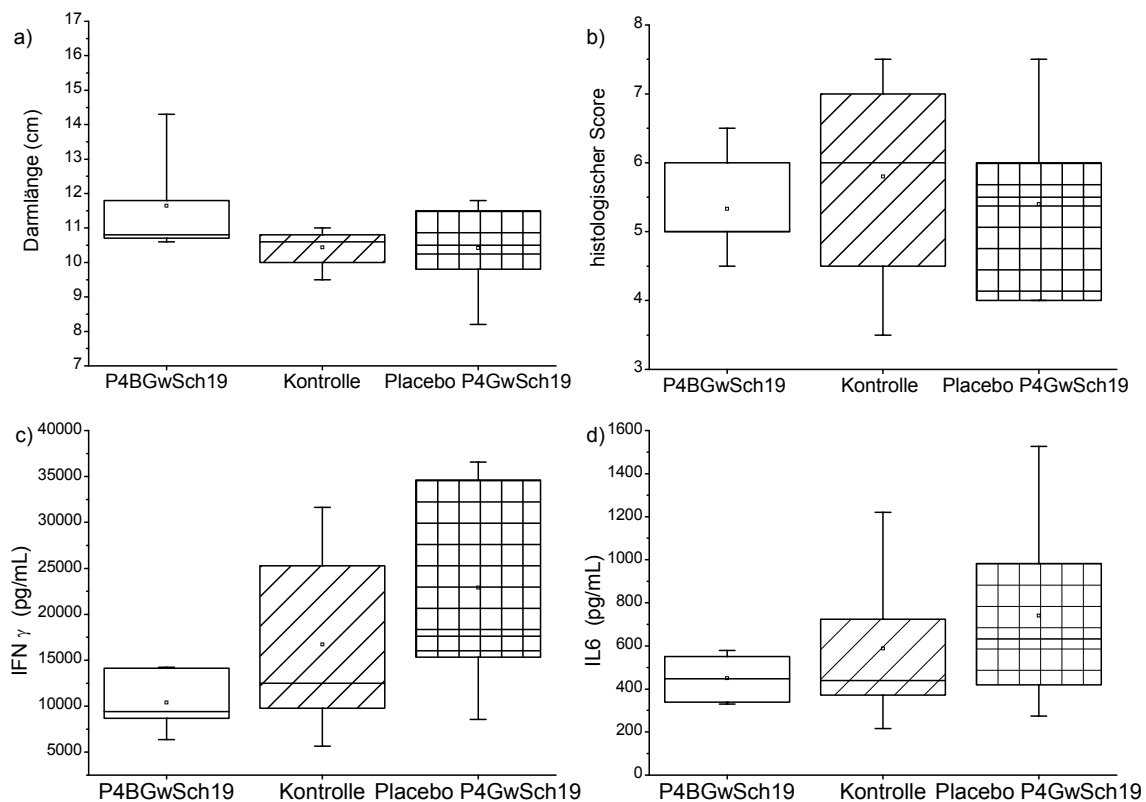


Abb. 3-28: Wirkung von mit Schellack gecoateten APK P4BGwSch19 auf a) Darmlänge, b) histologischen Score, c) IFN γ -Sekretion und d) IL6-Sekretion während der murinen chronischen DSS-Colitis. Fehlerwahrscheinlichkeit p wurde bestimmt mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (* $p=0.001$; ** $p<0.001$; P4BGwSch19 $n=6$; Kontrolle $n=10$; Placebomaterial P4GwSch19 $n=10$). Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.9.

Abb. 3-28 fasst die ermittelten Ergebnisse zusammen und zeigt, dass die orale Zufuhr von mit Schellack gecoateten APK P4BGwSch19 in keinem signifikanten Unterschied in Colonlänge, histologischem Score sowie IL-6 und IFN- γ Sekretion im Vergleich zu Placebo- und Kontrollgruppe resultierte. Zwischen Placebo- und Kontrollgruppe wurden ebenfalls keine Unterschiede festgestellt. Somit zeigten auch die weiteren Bestandteile des Materials keinen Effekt.

Die Formulierung wurde dem Futter in einem Anteil von 31 % (w/w) zugesetzt, sodass ein Gehalt an Anthocyanextrakt von 1 % im Futter vorlag. In den Untersuchungen mit Zufuhr des unformulierten Heidelbeerextrakts wurde gezeigt, dass dieser in einer Konzentration von 1 % zu einer deutlichen Verbesserung der chronischen Colitis führte. Dies war charakterisiert durch eine signifikante Erhöhung der Colonlänge (15 %, $p=0,01$) sowie eine Reduktion des histologischen Scores (29 %, $p=0,001$) und der Zytokin-Sekretion (IL6: 50%, $p<0,001$, IFN γ ; 70 %, $p<0,001$) (Piberger, 2009).

Um Informationen über die Freisetzung der Pigmente zu erhalten, wurde der Faeces von mit APK gefütterten Mäusen gesammelt und analysiert. Reste der intakten Formulierung waren darin visuell nicht nachweisbar. Anthocyangehalt und -profil der Proben wurden nach Extraktion mittels HPLC-UV/Vis (vgl. 4.2.1, System 1) bestimmt. Ein Gesamtanthocyangehalt von $0,60 \pm 0,03$ mg/g Faeces wurde ermittelt. Im Rahmen der durchgeführten Studie nahmen die Mäuse täglich durchschnittlich 5,3 g des Futters und somit ca. 38 mg Anthocyane auf. Parallel schied jedes Tier pro Tag ca. 800 mg/d Faeces aus. Ausgehend von diesen Werten wurden ca. 1 % der zugeführten Pigmente im Faeces wiedergefunden.

Wie Abb. 3-29 zeigt, unterschied sich das Anthocyanprofil der Faecesproben deutlich von dem der APK im Futter der Tiere. Die Anteile von Anthocyanarabinosiden waren deutlich erhöht, Dp-3-glc und Cy-3-glc dagegen stark reduziert. Dies stimmt mit einer Studie von He *et al.* (2005) überein, die zeigte, dass Anthocyanarabinoside in Faeces relativ stabil waren, wohingegen Glucoside einer raschen Metabolisierung unterlagen.

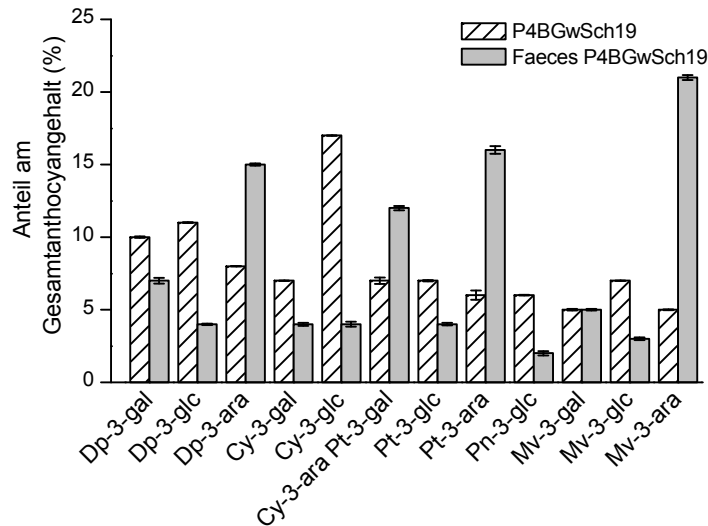


Abb. 3-29: Prozentuale Zusammensetzung des Anthocyanprofils von mit Schellack gecoateten APK P4BGwSch19 und von Mausfaeces nach Fütterung von Schellack gecoateten APK P4BGwSch19. Mittelwert \pm Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.9.4.

Fehlende Exkretion intakter APK, eine geringe Anthocyanwiederfindungsrate und die Veränderung im Profil der Pigmente belegen, dass eine Freisetzung der verkapselten Anthocyane stattgefunden hat, wodurch diese Abbau- und/oder Absorptionsprozessen ausgesetzt worden sind. Der im Vergleich zum freien Heidelbeerextrakt fehlende Effekt in der chronischen DSS-Colitis kann also nicht aus einer nicht erfolgten Freisetzung der Pigmente resultieren, wie dies z.B. für ein mit Schellack beschichtetes System zur Applikation eines akuten Rodentizids beschrieben wurde (Nadian und Lindblom, 2002). Es kann allerdings keine Aussage dazu getroffen werden, an welcher Stelle im GIT der Maus und nach welchem Mechanismus die Freisetzung der Pigmente erfolgt ist. Wie bereits zu Beginn des Abschnitts erwähnt, existieren Unterschiede in Anatomie und Physiologie des murinen im Vergleich zum humanen GIT. Neben geringerer Organgröße und gesteigertem Wassergehalt ist der murine GIT durch eine erhöhte mikrobielle Besiedelung von Magen (10^7 - 10^9 KBE/g) und proximalen Dünndarm (10^7 - 10^9 KBE/g) charakterisiert (Kararli, 1995). Weiterhin weist der murine Magen (nüchtern pH 4, nach Fütterung pH 3) einen höheren, der Darm (pH < 5,2) dagegen einen geringeren pH-Wert auf (McConnell *et al.*, 2008a). Vergleichsdaten zu den Bedingungen im humanen GIT zeigt Tabelle 2-6 in Abschnitt 2.6.2. Unter diesen Bedingungen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die genannten Unterschiede eine veränderte Freisetzung v. a. bei Systemen wie P4BGwSch19 mit pH-Wert und Mikroflora-kontrollierter Liberation hervorrufen. Beispielsweise könnte infolge erhöhter mikrobieller Aktivität im oberen Teil des murinen GIT bereits dort eine mikrobielle

Degradation der Formulierung P4BGwSch19 verbunden mit Anthocyan-Freisetzung erfolgt sein.

Andererseits könnten auch unzureichende Eigenschaften der Formulierung für den fehlenden Effekt von P4BGwSch19 im Vergleich zum unformulierten Heidelbeerextrakt verantwortlich sein. Aufgrund seines pK_a -Werts von 5,6 bis 6,6 löst sich Schellack nur langsam in intestinalen Flüssigkeiten auf (Buch *et al.*, 2009). Daher ist nicht auszuschließen, dass die Freisetzung zu langsam erfolgte und somit zu geringe Wirkkonzentrationen erzeugt wurden bzw. es zu spät (*Colon sigmoideum*, Rectum) zum Abbau der Formulierung kam. Wie in den Abschnitten 3.2.3.7 bis 3.2.3.9 beschrieben und untersucht, stellt der Einbau von wasserlöslichen Porenbildnern wie HPMC einen Weg dar, um das Auflösungsverhalten von Schellackfilmen zu optimieren.

Eine dritte mögliche Ursache für den fehlenden Effekt in der murinen DSS-Colitis ergibt sich aus Arbeiten von Vitaglione *et al.* (2007) und Kay *et al.* (2009), die darauf hindeuten, dass nicht die Anthocyane selbst, sondern ihre phenolischen Metabolite für die festgestellten gesundheitspositiven Effekte verantwortlich sind. Infolge der kontrollierten Freisetzung von Anthocyanen im Dickdarm, die mit der entwickelten Formulierung erzielt wird, kommt es erst im letzten Darmabschnitt zum Abbau der Pigmente. Dadurch wird die Bildung und Absorption der potentiell wirksamen Anthocyanmetabolite im Vergleich zur Aufnahme der freien Pigmente verzögert; veränderte biologische Aktivität könnte die Folge sein.

Weitere Untersuchungen sind somit erforderlich, um den *in vivo* Effekt von mit Schellack gecoateten APK zu evaluieren und die fehlende Wirkung auf die chronische murine DSS-Colitis im Vergleich zum umformulierten Extrakt zu klären. Ein geeigneteres Modell für *in vivo* Freisetzungstudien stellen beispielsweise Kaninchen dar, da diese dem humanen GIT vergleichbarere pH-Werte und Mikroflora-Anteile im Verdauungstrakt aufweisen (Kararli, 1995; Freire *et al.*, 2010).

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p. a.-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), VWR (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Gruessing (Filsum) und Caesar & Loretz (Hilden) bezogen.

Amidiertes Pektin (AF 020, VE° 29 %, A° 20 %, Galacturonsäuregehalt 86 %) wurde von Herbstreith & Fox (Neuenbürg) bereit gestellt. Schellack und Talkum wurde von Caesar & Loretz (Hilden) bezogen. Wässrige Schellacklösung (SSB Aqua Gold®) und HPMC (Pharmacoat 606®) lieferte Synthapharm (Mülheim a. d. Ruhr). Enzymkits zur Bestimmung von Saccharose/D-Glucose/D-Fructose, Citronen-, Ascorbin- und Äpfelsäure wurden von R-Biopharm (Darmstadt) bezogen. Lösungsmittel wurden vor der Verwendung über Füllkörperkolonnen rektifiziert. Reinstwasser wurde aus der hauseigenen Millipore™-Aufbereitungsanlage gewonnen (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Für HPLC- und HPLC-MS-Analysen wurden ‚gradient grade‘ Lösungsmittel von Acros Organics (Geel, Belgien) und Merck (LiChrosolv®, Darmstadt) verwendet. Reinstgase lieferten die Firmen Linde (Berlin) und Messer Griesheim (Frankfurt).

4.1.2 Untersuchungsmaterial

Getrocknete Heidelbeeren (*Myrtilli Fruct. tot.*) wurden von der Alfred Galke GmbH (Gittelde/Harz) bezogen. Wildheidelbeeren (tiefgekühlt), Erdbeeren (tiefgekühlt), Kulturheidelbeeren (frisch) sowie Cranberry-Muttersaft wurden im lokalen Handel erworben. Aroniakonzentrat wurde von einem kommerziellen Hersteller bezogen. Bilberry-Extrakte aus Wildheidelbeeren *Vaccinium myrtillus* L. (Anthocyangehalte von 65 bis 84 g/100g) wurden von Symrise (Holzminden) und Kollagen aus *Chondrosia reniformis* Nardo von Klinipharm (Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

4.1.3 Verbrauchsmaterial

Alle Verbrauchsmaterialien wurden bei den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe), Fisher-Scientific (Dreieich), Sarsted (Nümbrecht) und Hartenstein (Würzburg) erworben. HPLC-Zubehör wurde von Wicom (Heppenheim), GC-Zubehör von CTZ (Kriftel) bezogen.

4.1.4 Säulenchromatographie (SC)

Trennsäule: 35 x 4 cm I.D.

Füllmaterial: Amberlite XAD-7 (20 – 60 mesh) Sigma-Aldrich (Steinheim)

4.2 Geräte

4.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC-System 1

Gerät: Alexys 100 LC-EC System, Hochdruckgradientensystem (Antec Leyden, Zouterwoude, Niederlande)

Pumpe: Alexys LC100 (Antec Leyden, Zouterwoude, Niederlande)

Autosampler: Alexys AS100 (Antec Leyden, Zouterwoude, Niederlande)

Trennsäule: Hypersil ODS (5 µm Partikelgröße, 4,0 x 125 mm) (Knauer, Berlin)

Eluenten: A: 10 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) : Acetonitril (1:1, v/v)

B: 10 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v)

Fluss: 0,5 mL/min

Gradient:	Zeit	Eluent B [%]
	0	94
	40	78
	60	56
	63	6
	68	6
	71	94
	80	94

Injektion: Autosampler: 100 µL Probenschleife, 100 µL Injektionsvolumen

Detektor: SPA-10A UV-Vis-Detektor (Shimadzu, Duisburg)

$\lambda = 520 \text{ nm}$

Software: Alexys data system (Antec Leyden, Zouterwoude, Niederlande)

HPLC-System 2

Gerät: Alexys 100 LC-EC System, Hochdruckgradientensystem (Antec Leyden, Zouterwoude, Niederlande)

Pumpe: Alexys LC100 (Antec Leyden, Zouterwoude, Niederlande)

Autosampler: Alexys AS100 (Antec Leyden, Zouterwoude, Niederlande)

Trennsäule: Hypersil ODS (5 µm Partikelgröße, 4,0 x 125 mm) (Knauer, Berlin)

Eluenten: A: 10 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) : Acetonitril (1:1, v/v)
B: 10 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v)

Fluss: 0,5 mL/min

Gradient:

Zeit	Eluent B [%]
0	90
20	63
23	6
28	6
31	90
40	90

Injektion: Autosampler: 100 µL Probenschleife, 50 µL Injektionsvolumen

Detektor: SPA-10A UV-Vis-Detektor (Shimadzu, Duisburg)
 $\lambda = 520 \text{ nm}$

Software: Alexys data system (Antec Leyden, Zouterwoude, Niederlande)

HPLC-System 3

Gerät: Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series, Hochdruckgradientensystem (Hewlett Packard, Waldbronn)

Pumpe: Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Hewlett Packard, Waldbronn)

Autosampler: Wisp 712b (Waters, Eschborn)

Trennsäule: Hypersil ODS (5 µm Partikelgröße, 4,0 x 125 mm) (Knauer, Berlin)

Eluenten: A: 10 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v)
B: Acetonitril, LiChrosolv®

Fluss: 0,5 mL/min

Gradient:	Zeit	Eluent B [%]
	0	3
	40	11
	60	22
	65	80
	70	80
	75	3
	85	3

Injektion: Autosampler: 25 μ L Injektionsvolumen

Detektor: Hewlett Packard Photodiodenarray, DAD, 1100 Series (Hewlett Packard, Waldbronn)

λ = 200 - 600 nm

Software: Hewlett Packard ChemStation[®] Software (Hewlett Packard, Waldbronn)

HPLC-System 4

Gerät: Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series, Hochdruckgradientensystem (Hewlett Packard, Waldbronn)

Pumpe: Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Hewlett Packard, Waldbronn)

Autosampler: Wisp 712b (Waters, Eschborn)

Trennsäule: XBrigde[™] C18 (5 μ m Partikelgröße, 4,6 x 150 mm) (Waters, Eschborn)

Eluenten: A: 0,1 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v)

B: Methanol, LiChrosolv[®]

Fluss: 0,7 mL/min

Gradient:	Zeit	Eluent B [%]
	0	5
	11	75
	15	75
	18	5
	25	5

Injektion: Autosampler: 20 μ L Injektionsvolumen

Detektor: Hewlett Packard Photodiodenarray, DAD, 1100 Series (Hewlett Packard, Waldbronn)

λ = 200 - 600 nm

Software: Hewlett Packard ChemStation[®] Software (Hewlett Packard, Waldbronn)

HPLC-System 5

Gerät: Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series, Hochdruckgradientensystem (Hewlett Packard, Waldbronn)

Pumpe: Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Hewlett Packard, Waldbronn)

Autosampler: Wisp 712b (Waters, Eschborn)

Trennsäule: Synergy Hydro-RP (4 µm Partikelgröße, 4,6 x 250 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg)

Eluenten: A: 0,1 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v)
B: Acetonitril, LiChrosolv[®]

Fluss: 0,8 mL/min

Gradient:	Zeit	Eluent B [%]
	0	1
	45	45
	47	99
	50	99
	52	1
	60	1

Injektion: Autosampler: 25 µL Injektionsvolumen

Detektor: Hewlett Packard Photodiodenarray, DAD, 1100 Series (Hewlett Packard, Waldbronn)

$\lambda = 200 - 600 \text{ nm}$

Software: Hewlett Packard ChemStation[®] Software (Hewlett Packard, Waldbronn)

4.2.2 Präparative Hochleistungsflüssigchromatographie (präp. HPLC)

Präp. HPLC-System 1

Gerät: Knauer Niederdruckgradientensystem (Knauer, Berlin)

Pumpe: K1001, 50 mL Pumpenkopf (Knauer, Berlin)

Trennsäule: XBrigde[™] C18 (5 µm Partikelgröße, 19 x 150 mm) (Waters, Eschborn)

Eluenten:	A: 10 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) B: Acetonitril, LiChrosolv®
Fluss:	8 mL/min
Gradient:	Wildheidelbeeren: 0-36 min 2 % B isokratisch, 36-50 min 4 % B isokratisch, 50-75 min 6 % B isokratisch, 75-85min 9 % B isokratisch Erdbeeren: 6 % B isokratisch Cranberry: 0-30 min 4 % B isokratisch, 30-60 min 6 % B isokratisch Aronia: 0-60 min 2-8 % B linear
Injektion:	Rheodyne Six-Port Injektionssystem, 1 mL Probenschleife (Rheodyne, Alsbach a.d. Bergstraße: 400 µL Injektionsvolumen
Detektor:	Knauer UV/Vis Detektor (Knauer, Berlin) $\lambda = 520 \text{ nm}$
Schreiber:	SE 120 BBC Goertz Metrawatt Datenschreiber (Goertz, Wien, Öster- reich)

Präp. HPLC-System 2

Gerät:	Knauer Hochdruckgradientensystem (Knauer, Berlin)
Pumpen:	HPLC PUMP 64 (Knauer, Berlin)
Trennsäule:	Knauer Eurospher® C18 (5 µm Partikelgröße, 16 x 250 mm) (Knauer, Berlin)
Eluenten:	A: 10 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) B: Acetonitril, LiChrosolv®
Fluss:	15 mL/min
Gradient:	13 % B isokratisch
Injektion:	Rheodyne Six-Port Injektionssystem, 1 mL Probenschleife (Rheodyne, Alsbach a.d. Bergstraße: 600 µL Injektionsvolumen
Detektor:	Knauer UV/Vis Detektor (Knauer, Berlin) $\lambda = 520 \text{ nm}$
Software:	Knauer HPLC Software (Knauer, Berlin)

Präp. HPLC-System 3

Gerät:	Knauer Niederdruckgradientensystem (Knauer, Berlin)
Pumpe:	Maxi Star K1000, 10 mL Pumpenkopf (Knauer, Berlin)
Trennsäule:	Hypersil ODS (5 µm Partikelgröße, 4,0 x 125 mm) (Knauer, Berlin)
Eluenten:	A: 10 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) B: Acetonitril, LiChrosolv®
Fluss:	0,5 mL/min
Gradient:	8 % B isokratisch
Injektion:	Rheodyne Six-Port Injektionssystem, 100 µL Probenschleife (Rheodyne, Alsbach a.d. Bergstraße: 50 µL Injektionsvolumen)
Detektor:	Wellchrom Spektralfotometer K2501 (Knauer, Berlin) $\lambda = 520 \text{ nm}$
Software:	Eurochrom Software (Knauer, Berlin)

4.2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

HPLC-MS/MS-System 1

HPLC:	Hochdruckgradientenanlage (Applied Biosystems, Bensheim)
Pumpe:	Applied Biosystems 140b Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten (Bensheim)
Autosampler:	Spark (Triathlon, Emmen, Niederlande)
Trennsäule:	Symmetry C18 (5 µm Partikelgröße, 2,1 x 150 mm) (Waters, Eschborn)
Eluenten:	A: 1 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) B: Acetonitril, LiChrosolv®
Fluss:	0,2 mL/min
Gradient:	0-20 min 1-50 % B linear
Injektion:	Autosampler: 100 µL Probenschleife, 50 µL Injektionsvolumen
Massenspektrometer:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Electrospray Ionisations-Interface (ESI)
ESI-Kapillare:	Desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm I.D.) (J&W Scientific, Folsom, USA)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur

Eingangskapillare:	250°C
Modus:	positiv
Kapillarspannung:	3,5 kV
Sheathgas:	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0 (10 L/min)
Messbereich:	m/z 150 - 1000 (Full Scan Modus)
Kollisionsgas:	Argon 5.0, Kollisionsgasdruck 2,0 mTorr
Kollisionsenergie:	25 eV
Multiplierspannung:	1 300 V für ESI-MS, 1 650 V für ESI-MS/MS
Software:	Xcalibur™ Software Version 1.2 (Thermo Fisher, Dreieich)

HPLC-MS/MS-System 2

HPLC:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series, Hochdruck-gradientensystem (Hewlett Packard, Waldbronn)	
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruck-gradienten, 1100 Series (Hewlett Packard, Waldbronn)	
Autosampler:	Wisp 712b (Waters, Eschborn)	
Trennsäule:	XBrigde™ C18 (5 µm Partikelgröße, 4,6 x 150 mm) (Waters, Eschborn)	
Eluenten:	A: 2,5 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) B: Acetonitril, LiChrosolv®	
Fluss:	0,2 mL/min	
Gradient:	Zeit	Eluent B [%]
	0	3
	120	23
	125	80
	130	80
	135	3
Injektion:	Autosampler: 75 µL Injektionsvolumen	
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray, DAD, 1100 Series (Hewlett Packard, Waldbronn) $\lambda = 200 - 600 \text{ nm}$	
Software:	Hewlett Packard ChemStation® Software (Hewlett Packard, Waldbronn)	
Massen-spektrometer:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassen-spektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Electrospray	

	Ionisations-Interface (ESI)
ESI-Kapillare:	Desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm I.D.) (J&W Scientific, Folsom, USA)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Eingangskapillare:	250°C
Modus:	positiv
Kapillarspannung:	3,5 kV
Sheathgas:	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0 (10 L/min)
Messbereich:	m/z 150 - 1000 (Full Scan Modus)
Kollisionsgas:	Argon 5.0, Kollisionsgasdruck 2,0 mTorr
Kollisionsenergie:	25 eV
Multiplierspannung:	1 300 V für ESI-MS, 1 650 V für ESI-MS/MS
Software:	Xcalibur™ Software Version 1.2 (Thermo Fisher, Dreieich)

HPLC-MS/MS-System 3

HPLC:	Hochdruckgradientenanlage (Applied Biosystems, Bensheim)
Pumpe:	Applied Biosystems 140b Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten (Bensheim)
Autosampler:	Spark (Triathlon, Emmen, Niederlande)
Trennsäule:	Gemini C18 (3 µm Partikelgröße, 2 x 150 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg)
Eluenten:	A: 1 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) B: Acetonitril, LiChrosolv®
Fluss:	0,2 mL/min
Gradient:	isokratisch, 50 % B
Injektion:	Autosampler: 100 µL Probenschleife, 50 µL Injektionsvolumen
Massenspektrometer:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Electrospray Ionisations-Interface (ESI)
ESI-Kapillare:	Desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm I.D.) (J&W Scientific, Folsom, USA)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Eingangskapillare:	250°C
Modus:	positiv
Kapillarspannung:	3,5 kV

Sheathgas:	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0 (10 L/min)
Messbereich:	m/z 150 - 1000 (Full Scan Modus)
Kollisionsgas:	Argon 5.0, Kollisionsgasdruck 2,0 mTorr
Kollisionsenergie:	25 eV
Multiplierspannung:	1 300 V für ESI-MS, 1 650 V für ESI-MS/MS
Software:	Xcalibur™ Software Version 1.2 (Thermo Fisher, Dreieich)

HPLC-MS/MS-System 4

Gerät:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series, Hochdruck-gradientensystem (Hewlett Packard, Waldbronn)															
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Hewlett Packard, Waldbronn)															
Autosampler:	Wisp 712b (Waters, Eschborn)															
Trennsäule:	Synergy Hydro-RP (4 µm Partikelgröße, 4,6 x 250 mm) (Phenomenex, Aschaffenburg)															
Eluenten:	A: 0,1 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) B: Acetonitril, LiChrosolv®															
Fluss:	0,8 mL/min, 0,2 mL/min nach Split															
Gradient:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zeit</th> <th>Eluent B [%]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>45</td> <td>45</td> </tr> <tr> <td>47</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>50</td> <td>99</td> </tr> <tr> <td>52</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>60</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>		Zeit	Eluent B [%]	0	1	45	45	47	99	50	99	52	1	60	1
Zeit	Eluent B [%]															
0	1															
45	45															
47	99															
50	99															
52	1															
60	1															
Injektion:	Autosampler: 25 µL Injektionsvolumen															
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray, DAD, 1100 Series (Hewlett Packard, Waldbronn) λ = 200 - 600 nm															
Software:	Hewlett Packard ChemStation® Software (Hewlett Packard, Waldbronn)															
Massenspektrometer:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Electrospray Ionisations-Interface (ESI)															

ESI-Kapillare:	Desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm I.D.) (J&W Scientific, Folsom, USA)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Eingangskapillare:	250°C
Modus:	negativ
Kapillarspannung:	3,2 kV
Sheathgas:	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0 (10 L/min)
Messbereich:	m/z 150 - 1000 (Full Scan Modus)
Kollisionsgas:	Argon 5.0, Kollisionsgasdruck 2,0 mTorr
Kollisionsenergie:	20-30 eV
Multiplierspannung:	1 600 V für ESI-MS 1 950 V für ESI-MS/MS
Software:	Xcalibur™ Software Version 1.2 (Thermo Fisher, Dreieich)

HPLC-MS/MS-System 5

HPLC:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series, Hochdruckgradientensystem (Hewlett Packard, Waldbronn)	
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Hewlett Packard, Waldbronn)	
Autosampler:	Wisp 712b (Waters, Eschborn)	
Trennsäule:	XBrigde™ C18 (5 µm Partikelgröße, 4,6 x 150 mm) (Waters, Eschborn)	
Eluenten:	A: 0,1 % Ameisensäure in Reinstwasser (v/v) B: Methanol, LiChrosolv®	
Fluss:	0,7 mL/min, 0,2 mL/min nach Split	
Gradient:	Zeit	Eluent B [%]
	0	5
	11	75
	15	75
	18	5
	25	5
Injektion:	Autosampler: 20 µL Injektionsvolumen	
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray, DAD, 1100 Series (Hewlett Packard, Waldbronn) λ = 200 - 600 nm	
Software:	Hewlett Packard ChemStation® Software (Hewlett Packard,	

	Waldbronn)
Massen-spektrometer:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassen-spektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Electrospray Ionisations-Interface (ESI)
ESI-Kapillare:	Desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm I.D.) (J&W Scientific, Folsom, USA)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Eingangskapillare:	250°C
Modus:	positiv
Kapillarspannung:	3,3 kV
Sheathgas:	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0 (10 L/min)
Messbereich:	m/z 100 - 700 (Full Scan Modus)
Multiplierspannung:	1 600 V für ESI-MS
Software:	Xcalibur™ Software Version 1.2 (Thermo Fisher, Dreieich)

4.2.4 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

GC-MS-System 1

Gaschromatograph:	HP Agilent 6890 GC System (Agilent Technologies, Wilmington, USA)
Injektor:	Split/Splitless-Injektor (Split 1:20), Temperatur 250°C
Autosampler:	Agilent 7683 Series Injektor (Agilent Technologies, Waldbronn)
Trennsäule:	DB-Wax (30 m x 0,25 mm I.D., d _f 0,25 µm) (J&W, Agilent, Waldbronn)
Trägergas:	2,0 mL/min Helium 5.0
Temperaturprogramm:	30°C, 10 min isotherm, 25°C/min, 240°C
Massenspektrometer:	Agilent 5379 Mass Selective Detector MSD (Agilent Technologies, Wilmington, USA)
Ionenquelle:	Elektronenstoßionisation (EI) mit 70 eV, Temperatur 220°C
Quellendruck:	1*10 ⁻⁵ mbar
Kathodenstrom:	1,5 mA
Photomultiplier:	1 800 V
Massenbereich:	m/z 38 bis 450
Software:	Xcalibur™ Software Version 1.2 (Thermo Electron, Dreieich)

4.2.5 Kapillargaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID)

GC-FID System 1

Gerät:	HP 5890 Series II (Hewlett Packard, Santa Clara, USA)
Injektor:	Split/Splitless-Injektor (Split 1:20), Temperatur 220°C
Autosampler:	HP 7613 GC/SFC Injektor (Hewlett Packard, Santa Clara, USA)
Trennsäule:	DB-Wax (30 m x 0,25 mm I.D., d_f 0,25 μ m) (J&W, Agilent, Waldbronn)
Trärgas:	3,2 mL/min Helium 5.0
Make-up Gas:	30 mL/min Stickstoff 5.0
Brennergase:	30 mL/min Wasserstoff 5.0, 300 mL/min gereinigte Luft
Temperaturprogramm:	50°C, 3 min isotherm, 4°C/min, 250°C
Detektor:	Flammenionisationsdetektor, Temperatur 250°C
Software:	Hewlett Packard ChemStation ((Hewlett Packard, Santa Clara, USA)

4.2.6 Mikrokugelherstellung

Geräte:	Anlage zur Mikrovertropfung (Brace, Alzenau) Wirbelschichttrockner Aeromatic (Niro, Columbia, USA)
---------	---

4.2.7 Wirbelschicht-Coating

Coating-System 1

Gerät:	Mini Glatt Wirbelschichtanlage mit Wursterinsatz (Glatt, Binzen)
Verfahren:	Bottom-Spray-Verfahren nach Wurster
Düse:	Zweistoffdüse (ID 1,5 mm)
Luftmenge:	1,5 bar
Einlasstemperatur:	25°C
Produkttemperatur:	23°C
Sprühdruck:	1,0 – 1,9 bar
Sprührate:	0,8 – 1,2 g/min

Batchgröße:	60 g
Versprühte Menge	136 g
Temperieren:	2 min, 25°C Produkttemperatur
Trocknen:	5 min, 35°C Produkttemperatur

Coating-System 2

Gerät:	Glatt Wirbelschichtgranulator GPCG 1.1 mit Wurster-Produktbehälter (Glatt, Binzen), zusätzlich ausgestattet mit: kapazitiven Hydrometern (Hygromess Transmitter, Typ 41045 und 71326, Hydrocontrol, Hanau) zur Messung der relativen Feuchte und Temperatur von Frisch- und Abluft; einem Sensor zur Erfassung des Absolutdrucks der Umgebungsluft (Typ 40.4303, Jumo, Fulda), Differenzdrucksensoren (Typ 604A-1, Dwyer, Michigan, USA) zur Erfassung des Druckunterschieds an der Frischluftfeuchte- und Abluftfeuchtemessstelle; einem Widerstandsthermometer (Typ 90295 F44, Jumo, Fulda) zur Erfassung der Produkttemperatur
Anlagensteuerung:	ECOVIEW (Glatt, Binzen)
Verfahren:	Bottom-Spray-Verfahren nach Wurster
Düse:	Zweistoffdüse (ID 1,5 mm)
Luftmenge:	95-99 m ³ /h
Einlasstemperatur:	50-55°C
Produkttemperatur:	35-37°C
Sprühdruck:	1,5 bar
Sprührate:	3-9 g/min
Batchgröße:	450 g
Versprühte Menge:	730 g (P4BGwSch19), 570 g (P4BGwSch15), 285 g (P4BGwSch8), 660 g (HPMC)
Temperieren:	5 min, 37°C Produkttemperatur

4.2.8 Elektronenmikroskopie

Gerät:	Vakuum-Sputterer SCD 005 (BAL-TEC, Schalksmühle)
Sputtermaterial:	Palladium/Platin
Gerät:	Elektronenmikroskop Zeiss DSM 962 (Carl Zeiss, Oberkochen)
Beschleunigungs- spannung:	15 kV
Vergrößerung:	50x, 500x

4.2.9 Sonstige Geräte

Anaerobenkammer:	Plexiglaskammer, Gasvolumen ca. 0,25 m ³ , hergestellt in der Werkstatt des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg. Gasbetrieb Kohlendioxid 4.5/Stickstoff 5.0 (80/20, v/v)
Anaerobentopf:	Anaerocult (Merck, Darmstadt)
Fettbestimmungsautomat:	Fat Determination B-820 mit B-821 Autosampler (Büchi, Essen). Gasbetrieb Wasserstoff 5.0, synth. Luft
Karl-Fischer-Apparatur:	Titratoren 870 KF Titrimo plus, Titrierstand 830 Ti Stand (Metrohm, Herisau, Schweiz)
Kjeldahl-Apparatur:	Büchi Aufschlusseinheit K424, Büchi Destillationseinheit K355 (Büchi, Essen)
Laser-Granulometer:	ParticleSizer 2600 (Malvern Instruments, Herrenberg)
Lyophilisator:	Christ Alpha1-4 (Christ, Osterode)
Magnetrührer:	IKAMAG [®] RH (IKA Labortechnik, Staufen) Variomag Multipoint HP (Variomag, Daytona Beach, USA)
Mixer:	Rondo 1000 Maxi Chopper 400 W (Tefal, Selongey Cedex, Frankreich)
Peristaltikpumpe:	Peristaltic Pump P-1 (GE Healthcare, Uppsala, Schweden)
Photometer:	Spectronic Genesys [™] 2 PC UV-VIS-Spectrophotometer (Spectronic Instruments, NY, USA)
pH-Meter:	WTW pH 526 mit WTW pH-Electrode SenTix 41 (Wissenschaftliche Technische Werkstätten, Weilheim)
Rotavapor:	Rotavapor R-200, Heating Bath B-490, Vacuum System B-

	173, Vacuum Controller B-720, Recirculation Chiller 700 (Büchi, Essen)
Thermostat:	Lauda K6 (Lauda, Lauda-Königshofen)
Trockenschrank:	Modell 400 (Memmert, Schwabach) GfL Typ 3033 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Ultraschallbad:	Branson 1210 (Branson Ultrasonic Corp., Danbury, USA) Transsonic T 460 (Elma, Singen)
Ultra-Turrax:	Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen)
Vortexer:	Vortex Genie (Scientific Industries, NY, USA)
Waagen:	Mettler PL 300 Analysenwaage (Mettler-Toledo, Gießen); Mettler AT 21 Comparator (Mettler-Toledo, Gießen); Sartorius BP 210 S Analysenwaage (Sartorius AG, Göttingen)
Wasserbad:	Heidolph Instruments (Schwabach)
Zentrifugen:	EBA12 (Hettich, Tuttlingen) Univeral 16 (Hettich, Tuttlingen)

4.3 Methoden

4.3.1 Isolierung von Anthocyan-Referenzen

4.3.1.1 Herstellung der Anthocyan-Rohextrakte

Cranberry-Muttersaft wurde gefriergetrocknet und in 2 % Ameisensäure (v/v) gelöst. Kommerzielles Aroniakonzentrat wurde im Verhältnis 1:3 mit 2 % Ameisensäure (v/v) verdünnt. Zur Gewinnung von Anthocyan-Rohextrakten aus Wildheidelbeeren und Erdbeeren wurden je 300 g der tiefgefrorenen Früchte zerkleinert. Die Pürees wurden nach Kähkönen *et al.* (2003) mit 300 mL Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (49/50/1, v/v/v) versetzt, durchmischt und 15 min im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (1650 x g, 15 min), die Überstände vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Vakuum bei 35°C entfernt. Die Rückstände wurden gefriergetrocknet und erneut in 2 % Ameisensäure (v/v) gelöst.

4.3.1.2 Reinigung der Anthocyan-Rohextrakte mittels Säulenchromatographie

Die Anthocyan-Rohextrakte wurden mittels Säulenchromatographie unter Verwendung des polymeren Adsorbentmaterials XAD-7 (4.1.4) aufgereinigt (Kähkönen *et al.*, 2003). Die Säule wurde mit 2 % Ameisensäure (v/v) konditioniert. Nach

Applikation der Anthocyan-Rohextrakte wurde zur Abtrennung von Zucker und organischen Säuren zunächst mit 2 % Ameisensäure (v/v) gewaschen. Die Anthocyane wurden mit einem Gemisch aus Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (49/49/2, v/v/v) eluiert, bis keine Rotfärbung des Eluats mehr auftrat. Noch auf der Säule verbliebene Substanzen wurden mit 2 % Ameisensäure in Acetonitril (v/v) eluiert und die Säule anschließend für die erneute Verwendung konditioniert. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer im Vakuum bei 35°C wurden die anthocyanhaltigen Eluate gefriergetrocknet und vor der weiteren Verwendung in 10 % Ameisensäure (v/v) gelöst.

4.3.1.3 Isolierung von Anthocyan-Referenzen mittels präparativer HPLC

Die Fraktionierung der aufgereinigten Anthocyanextrakte erfolgte mittels präparativer RP-HPLC (präp. HPLC-System 1, 4.2.2) Die erhaltenen Fraktionen wurden nach schonender Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer bei 35°C gefriergetrocknet. Fraktionen, die keine ausreichende Reinheit aufwiesen (Reinheitskontrolle mit HPLC-System 3, 4.2.1), wurden zur Entfernung von unpolaren Verunreinigungen mit Ethylacetat extrahiert bzw. einer erneuten Aufreinigung mittels präparativer RP-HPLC (präp. HPLC Systeme 2 und 3, 4.2.2) unterzogen.

4.3.1.4 Identifizierung der Anthocyan-Reinsubstanzen

Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels RP-HPLC-MS/MS (HPLC-MS/MS-System 1, 4.2.3) untersucht. Die Identifizierung der isolierten Anthocyane erfolgte anhand der massenspektrometrischen Daten, mittels Retentionszeitvergleich mit Standardsubstanzen sowie unter Berücksichtigung von Literaturdaten zum Anthocyanprofil der eingesetzten Früchte (Prior *et al.*, 2001; Kähkönen *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004a; Abby *et al.*, 2005).

4.3.2 Zusammensetzung von getrockneten Heidelbeeren (gHB)

4.3.2.1 Probenvorbereitung

Die getrockneten Heidelbeeren (gHB) wurden in einem handelsüblichen Küchenmixer zu einem groben Pulver zerkleinert und anschließend nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff im Mörser fein vermahlen.

4.3.2.2 Bestimmung von Polyphenolen

4.3.2.2.1 Bestimmung von Anthocyanen

Probenvorbereitung

Es wurden ca. 1 g der nach 4.3.2.1 zerkleinerten gHB in Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 4 mL 10 % Ameisensäure (v/v) versetzt, gemischt und über Nacht zum Quellen im Kühlschrank belassen. Anschließend wurde 5 min im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert (2700 x g, 5 min). Der Überstand wurde abpipettiert und in Anlehnung an Kraus (2006) 11-mal bis zum Verschwinden der Rotfärbung mit 5 mL 5 % Ameisensäure in Methanol (v/v) extrahiert. Alle Überstände wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 35°C schonend entfernt. Der Rückstand wurde quantitativ in einen 10 mL-Kolben überführt und mit 10 % Ameisensäure (v/v) zur Marke aufgefüllt. Nach Filtration (Rotalibo Spritzenfilter, PVPP, 0,45 µm, Roth, Karlsruhe) wurde die Lösung direkt mittels HPLC-System 1 (vgl. 4.2.1) und HPLC-MS/MS-System 2 (vgl. 4.2.3) analysiert. Die bei der Analytik mit HPLC-System 1 eluierenden Peaks wurden gesammelt und außerdem mittels HPLC-MS/MS-System 3 (s. 4.2.3) untersucht. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung.

Für vergleichende Betrachtungen wurde auch das Anthocyanprofil von frischen tiefgekühlten Wildheidelbeeren *Vaccinium myrtillus* L. analysiert. Dazu wurden ca. 5 g der pürierten Beeren in ein Zentrifugenglas eingewogen und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Kalibriergeraden

Kalibriergeraden zur Quantifizierung des Anthocyangehalts wurden unter Verwendung von isolierten Anthocyan-Referenzen (s. 4.3.1) erstellt. Dazu wurden zwischen 200 und 400 µg Substanz auf 1 µg genau in Glasvials eingewogen und in 1 mL 10 % Ameisensäure (v/v) gelöst. Aus den Stammlösungen wurden durch Zugabe von 10 % Ameisensäure (v/v) in Verhältnissen von 1:2 bis 1:100 verschiedene Verdünnungen hergestellt. Anschließend wurden Stammlösungen und Verdünnungen mittels HPLC-UV/Vis (System 1, 4.2.1) vermessen. Die Detektion der einzelnen Verbindungen erfolgte bei 520 nm.

Die Kalibriergeraden wurden durch Auftragen der Konzentration $c_{\text{Anthocyan}}$ gegen die Flächen $F_{\text{Anthocyan}}$ erstellt. Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden bei einem Signal/Rauschverhältnis von 3:1 bzw. 10:1 ermittelt und lagen zwischen 0,04 und 0,06 µg/mL bzw. 0,13 und 0,18 µg/mL.

Identifizierung und Quantifizierung

Die Identifizierung der enthaltenen Anthocyane wurde anhand des Vergleiches von Retentionszeiten und massenspektrometrischen Daten der Probenmoleküle mit authentischen Referenzsubstanzen durchgeführt. Zur Quantifizierung mittels HPLC-UV/Vis wurde das Absorptionssignal bei 520 nm verwendet. Die Auswertung der einzelnen Substanzen erfolgte anhand der entsprechenden Kalibriergeraden.

4.3.2.2 Bestimmung von phenolischen Säuren, Flavan-3-olen und Flavonolen

Probenvorbereitung

Es wurden ca. 0,5 g der nach 4.3.2.1 zerkleinerten gHB in Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 5 mL 10 % Ameisensäure (v/v) versetzt, gemischt und über Nacht zum Quellen im Kühlschrank belassen. Anschließend wurden in Anlehnung an Määttä-Riihinen *et al.* (2004) 5 mL Ethylacetat zugefügt und nach wiederholtem Schütteln zentrifugiert (2700 x g, 5 min). Der Überstand wurde abpipettiert und die Extraktion mit Ethylacetat 8-mal wiederholt. Alle Überstände wurden vereinigt und das Lösungsmittel zuerst am Rotationsverdampfer bei 35°C und dann im Stickstoffstrom vollständig entfernt. Der Rückstand wurde anschließend in 1 mL Reinstwasser/Methanol 1:1 (v/v) gelöst und im Verhältnis 1:1 mit Standardlösung 3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure (50 µg/mL) in Reinstwasser/Methanol 1:1 (v/v) verdünnt. Nach Filtration (Rotalibo Spritzenfilter, PVDF, 4,5 µm, Roth, Karlsruhe) wurde die Lösung direkt zur Analytik mittels HPLC-DAD-MS/MS (System 4, 4.2.3) eingesetzt. Die Bestimmung wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.

Kalibriergeraden

Die Kalibriergeraden zur Quantifizierung des Polyphenolgehalts wurden unter Verwendung von kommerziell erworbenen Flavonoidreferenzen erstellt. Dazu wurden zwischen 1 und 2 mg Substanz auf 1 µg genau in 5- oder 10 mL-Messkolben eingewogen und mit Methanol zur Marke aufgefüllt. Aus den Stammlösungen wurden durch Zugabe von Methanol und Reinstwasser in den Verhältnissen 1:2, 1:4, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 Verdünnungen hergestellt. Anschließend wurden Stammlösungen und Verdünnungen im Verhältnis 1:1 mit Standardlösung (3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure (50 µg/mL) in Reinstwasser/Methanol 1:1 (v/v)) versetzt und mittels HPLC-DAD (System 5, 4.2.1) vermessen. Die Detektion der einzelnen Verbindungsklassen erfolgte bei folgenden Wellenlängen: Flavonole 360 nm, Hydroxyzimtsäuren 320 nm, Flavan-3-ole 280 nm, phenolische Säuren 260 oder 280 nm. Der Standard 3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure wurde bei 304 nm erfasst.

Die Kalibriergeraden wurden durch Auftragen der Konzentration $c_{\text{Polyphenol}}$ gegen das Flächenverhältnis $F_{\text{Polyphenol}}/F_{\text{Standard}}$ erstellt. Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden bei einem Signal/Rauschverhältnis von 3:1 bzw. 10:1 ermittelt und lagen zwischen 0,03 und 0,06 $\mu\text{g/mL}$ bzw. 0,11 und 0,17 $\mu\text{g/mL}$.

Identifizierung und Quantifizierung

Die Identifizierung der enthaltenen Polyphenole wurde anhand des Vergleiches von Retentionszeiten, UV-Spektren und massenspektrometrischen Daten der Probenmoleküle mit authentischen Referenzsubstanzen durchgeführt.

Zur Quantifizierung mittels HPLC-DAD wurde das Absorptionssignal verwendet. Die Auswertung der einzelnen Substanzen erfolgte anhand der entsprechenden Kalibriergeraden.

4.3.2.2.3 Bestimmung kondensierter Gerbstoffe

Die Ermittlung des Gehalts an kondensierten Gerbstoffen erfolgte mittels Thiolyse. Die Methode wurde nach Guyot *et al.* (2001) modifiziert. Es wurden 11 mg feinerkleinerte gHB genau in Vials eingewogen, mit 400 μL Thiolyseagenz (5 % Benzylmerkaptan (v/v); 1,1 % Salzsäure in Methanol (v/v)) versetzt und gut verschlossen. Die Reaktionsmischung wurde 6 h bei 40°C in einem Heizblock erhitzt. Diese Reaktionszeit, die zur vollständigen Spaltung der polymeren Procyanidine erforderlich ist, wurde in Vorversuchen ermittelt. Anschließend wurde die Mischung auf Raumtemperatur abgekühlt, im Verhältnis 1:1 mit Standardlösung (3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure (50 $\mu\text{g/mL}$) in Reinstwasser/Methanol 1:1 (v/v)) versetzt und mittels HPLC-DAD (System 5, 4.2.1) vermessen. Eine Wiederfindungsrate von 96,3 % wurde unter Verwendung einer aus Tamarinden isolierten Procyandin-Referenz (0,6 mg/mL in Methanol) ermittelt.

Kalibriergeraden

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden 2 mg Epicatechin genau in einen 1 mL-Messkolben sowie 1,2 mg Catechin genau in einen 10 mL-Messkolben eingewogen und mit Methanol zur Marke aufgefüllt. Aus den Stammlösungen wurden durch Zugabe von Methanol in den Verhältnissen 1:1,5; 1:2,25; 1:3; 1:5; 1:10; 1:20; 1:50; 1:66; 1:100 und 1:200 Verdünnungen hergestellt. Anschließend wurden Stammlösungen und Verdünnungen im Verhältnis 1:1 mit Standardlösung (3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure (50 $\mu\text{g/mL}$) in Reinstwasser/Methanol 1:1 (v/v)) versetzt und mittels HPLC-DAD (System 5, 4.2.1) vermessen. Die Detektion von Catechin, Epicatechin sowie Catechin-

und Epicatechinbenzylthioether erfolgte bei 280 nm. Der Standard 3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure wurde bei 300 nm erfasst.

Die Kalibriergeraden wurde durch Auftragen der Konzentration C_{Catechin} bzw. $C_{\text{Epicatechin}}$ gegen das Flächenverhältnis F/F_{Standard} erstellt.

Identifizierung und Quantifizierung

Die Retentionszeiten der Thiolyseprodukte Catechinbenzylthioether und Epicatechinbenzylthioether wurden durch Umsetzung einer Mischung der Procyanidine B₁, B₂, B₃ und B₄ bestimmt. Die Identifizierung des enthaltenen Catechins und Epicatechins wurde anhand des Vergleiches von Retentionszeiten und UV-Spektren mit den authentischen Referenzsubstanzen durchgeführt. Zur Quantifizierung mittels HPLC-DAD wurde das Absorptionssignal bei 280 nm verwendet. Die Auswertung erfolgte anhand von Kalibriergeraden. Epicatechin wurde zur Quantifizierung des entstandenen Epicatechinbenzylthioether verwendet. Kondensierte Gerbstoffe wurde als Summe der ermittelten Gehalte an Catechin, Epicatechin und Epicatechinbenzylthioether erfasst (Ramirez-Coronel *et al.*, 2004; Bakowska-Barczak und Kolodziejczyk, 2008). Vor Thiolyse waren Flavan-3-ole in den untersuchten gHB nicht nachweisbar.

4.3.2.3 Untersuchungen zur Gesamtzusammensetzung von getrockneten Heidelbeeren

4.3.2.3.1 Bestimmung der Trockenmasse

Die Trockenmasse wurde gravimetrisch anhand des Trocknungsverlustes bei erhöhter Temperatur bestimmt (Matissek und Steiner, 2006). Dazu wurden ca. 1 g gHB genau in eine vorher bei $104 \pm 2^\circ\text{C}$ getrocknete und konstant gewogene Quarzglas- oder Nickelschale eingewogen und anschließend 4 h im Trockenschrank bei $104 \pm 2^\circ\text{C}$ getrocknet. Nach 20-minütigem Abkühlen im Exikkator wurde ausgewogen. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Trockenmasse wurde berechnet nach:

$$TM = \frac{m_2 - m_1}{m_E} \cdot 100 \quad (4.1)$$

TM	<i>Trockenmasse (g/100 g)</i>
m_1	<i>Masse der leeren Schale (g)</i>
m_2	<i>Masse von Schale und Probe nach Trocknung (g)</i>
m_E	<i>Einwaage (g)</i>

4.3.2.3.2 *Bestimmung des Aschegehalts*

Der Glührückstand wurde durch direkte Veraschung im Muffelofen ermittelt (Matissek und Steiner, 2006). Dazu wurden ca. 10 g gHB in eine vorher bei $550 \pm 10^\circ\text{C}$ im Muffelofen geglüht und konstant gewogene Quarzschale eingewogen. Über der Bunsenbrennerflamme wurde der Inhalt schwach durchgeglüht bis keine Verschwelungsprodukte mehr entwichen. Anschließend wurde im Muffelofen bei $550 \pm 10^\circ\text{C}$ 6 h geglüht bis die Asche weiß war. Nach 20-minütigem Abkühlen im Exiskktor wurde ausgewogen. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Der Aschegehalt wurde berechnet nach:

$$A = \frac{m_2 - m_1}{m_E} \cdot 100 \quad (4.2)$$

A	Aschegehalt (g/100 g)
m_1	Masse der leeren Quarzschale (g)
m_2	Masse von Quarzschale und Probe nach Veraschung (g)
m_E	Einwaage (g)

4.3.2.3.3 *Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Kjeldahl*

Der Gesamtproteingehalt wurde nach Kjeldahl aus dem, mittels Aufschluss der organischen Substanz mit Schwefelsäure, freigesetzten und bestimmten Stickstoffanteil berechnet (Matissek und Steiner, 2006).

Ca. 0,5 g feinzerkleinerte gHB wurden genau in die Gläser der Aufschlusseinheit (Geräteparameter s. 4.2.9, Kjeldalapparat) eingewogen. Nach der Zugabe von ca. 3 g Katalysatormischung ($\text{TiO}_2:\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}:\text{K}_2\text{SO}_4$, 3:3:100, w/w/w) wurden 20 mL konz. Schwefelsäure ergänzt. Anschließend wurde ca. 4 h unter Wasserstrahlvakuum zum Sieden und nach der Grünfärbung des Rückstandes noch 15 min weiter erhitzt. Anschließend wurde nach Zugabe von einigen Tropfen Phenolphthalein, 40 mL dest. H_2O und 32 % (w/w) Natronlauge (bis zur Blaufärbung) zur aufgeschlossenen Probe hinzugefügt und 4 min in der Wasserdampf-Destillationseinheit (Geräteparameter s. 4.2.9, Kjeldalapparat) in eine Vorlage aus 25 mL 0,1 N Salzsäure destilliert. Zur Bestimmung des Säuregehalts der Vorlage wurde mit 0,1 N Natronlauge gegen Tashiro-Indikator bis zur Graufärbung titriert. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Der Proteingehalt der Probe berechnet sich nach:

$$P = \frac{V_B - V_H \cdot 0,0014 \cdot 6,25}{m_E} \cdot 100 \quad (4.3)$$

P	<i>Proteingehalt (g/100 g)</i>
V _B	<i>Verbrauch an 0,1 N NaOH im Reagenzienblindversuch (ml)</i>
V _H	<i>Verbrauch an 0,1 N NaOH im Hauptversuch (ml)</i>
m _E	<i>Einwaage (g)</i>
6,25	<i>Umrechnungsfaktor zur Bestimmung des Proteingehalts</i>

4.3.2.3.4 *Bestimmung des Fettgehalts nach Caviezel*

Die Bestimmung erfolgte halbautomatisch nach der Büchi Caviezel-Methode, wobei nach alkalischer Extraktion und Verseifung die freien Fettsäuren nach gaschromatographischer Trennung mit Tridecansäure als internem Standard identifiziert und quantifiziert werden.

Zur Extraktion und Verseifung wurden ca. 2,0 g zerkleinerte gHB und 0,1 g Tridecansäure in ein entsprechendes Extraktionsgefäß genau eingewogen und anschließend ca. 1,5 g Kaliumhydroxidplättchen, 45 mL n-Butanol und ein Magnetrührstäbchen hinzugefügt. Nach 30-minütigem Erhitzen wurde, unter weiterem Rühren, 40 mL der sauren Reaktionslösung (325 g Dinatriumhydrogenphosphat + 25 mL 85 % Ameisensäure ad 1 L H₂O) zur heißen Lösung gegeben und noch 3 min weitergerührt. Nach dem Ende des Rührens bildeten sich zwei Phasen. Ca. 1 mL der oberen Phase wurde in ein Probenvial überführt und zur gaschromatographischen Untersuchung verwendet (Geräteparameter s. 4.2.9, Fettbestimmungsautomat). Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

4.3.2.3.5 *Bestimmung des pH-Werts*

Die Bestimmung des pH-Werts erfolgte in Anlehnung an Methode L 31.00-3 (Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB). Genau 50 g zerkleinerte gHB wurden in 500 mL Reinstwasser über 20 h gerührt und anschließend 20 min im Ultraschallbad behandelt. Ein 20 mL Aliquot wurde entnommen, zentrifugiert (1650 x g, 10 min) und der Überstand durch ein Faltenfilter filtriert. Die pH-Wert-Messung erfolgte im Filtrat. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

4.3.2.3.6 *Enzymatische Bestimmung des Fructose-, Glucose und Saccharosegehalts*

Saccharose, Glucose und Fructose wurden enzymatisch unter Verwendung eines Testkits (Saccharose/D-Glucose/D-Fructose Nr. 10 716 260 035, R-Biopharm, Darmstadt) bestimmt. Zur Herstellung der Testlösung wurden 5 g gHB in einen 50 mL-Messkolben eingewogen, mit Reinstwasser aufgefüllt, über Nacht gerührt und anschließend 20 min im Ultraschallbad behandelt. Ein Aliquot wurde entnommen, zentrifugiert (1650 x g, 10 min) und der Überstand durch ein Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wurde im Verhältnis 1:50 mit Reinstwasser verdünnt zur enzymatischen Bestimmung eingesetzt. Die enzymatische Bestimmung wurde im Halbmikromaßstab auf Grundlage des vom Hersteller vorgegebenen Pipettierschemas durchgeführt. Es wurden Probenvolumina von 50 µL eingesetzt. Die spektralphotometrische Messung des gebildeten NADPH erfolgte bei 340 nm (vgl. 4.2.9, Photometer) gegen Luft. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Der Fructose-, Glucose- und Saccharosegehalt der Proben wurde berechnet nach:

$$c_{\text{Zucker}} = \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000 \cdot EW} \cdot \Delta E \cdot F \cdot 100 \quad (4.4)$$

c_{Zucker}	<i>Fructose-, Glucose- oder Saccharosegehalt (g/100 g)</i>
V	<i>Testvolumen</i>
v	<i>Probenvolumen</i>
ΔE	<i>Extinktionsdifferenz Probe/Leerwert</i>
ε	<i>Extinktionskoeffizient von NADPH (bei 340 nm: 6,3 (l mmol⁻¹ cm⁻¹))</i>
MG	<i>Molekulargewicht des zu bestimmenden Zuckers (g/mol) (Saccharose: 342,3 g/mol, Glucose: 180,16 g/mol, Fructose: 180,16 g/mol)</i>
d	<i>Schichtdicke</i>
F	<i>Verdünnungsfaktor</i>
EW	<i>Einwaage (g/L)</i>

4.3.2.3.7 Enzymatische Bestimmung des Äpfelsäuregehalts

L-Äpfelsäure wurde enzymatisch unter Verwendung eines Testkits (L-Äpfelsäure Nr. 10 139 068 035, R-Biopharm, Darmstadt) bestimmt. Zur Herstellung der Testlösung wurden 5 g gHB in einen 100 mL-Messkolben eingewogen, in 60 mL Reinstwasser suspendiert und 20 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde mit Reinstwasser auf 100 mL aufgefüllt, zentrifugiert (1650 x g, 10 min) und durch einen Faltenfilter filtriert. 15 mL der Lösung wurden mit 1 N Natronlauge auf pH 8 - 9 eingestellt und im Messkolben auf 25 mL aufgefüllt. Nach Entfärben mit PVPP wurde die Lösung zur Messung eingesetzt. Die enzymatische Bestimmung wurde auf Grundlage des vom Hersteller vorgegebenen Pipettierschemas durchgeführt. Es wurde ein Probenvolumen von 100 µL eingesetzt. Die spektralphotometrische Messung des gebildeten NADPH erfolgte bei 340 nm (vgl. 4.2.9, Photometer) gegen Luft. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Der L-Äpfelsäuregehalt der Probe wurde berechnet nach:

$$c_{L\text{-Äpfelsäure}} = \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000 \cdot EW} \cdot \Delta E \cdot F \cdot 100 \quad (4.5)$$

$c_{L\text{-Äpfelsäure}}$	<i>L-Äpfelsäuregehalt (g/100 g)</i>
V	<i>Testvolumen</i>
v	<i>Probenvolumen</i>
ΔE	<i>Extinktionsdifferenz Probe/Leerwert</i>
ε	<i>Extinktionskoeffizient von NADPH (bei 340 nm: 6,3 (l mmol⁻¹ cm⁻¹))</i>
MG	<i>Molekulargewicht: 134,09 (g/mol)</i>
d	<i>Schichtdicke</i>
F	<i>Verdünnungsfaktor</i>
EW	<i>Einwaage (g/L)</i>

4.3.2.3.8 Enzymatische Bestimmung des Citronensäuregehalts

Citronensäure wurden enzymatisch unter Verwendung eines Testkits (Citronensäure Nr. 10 139 076 035, R-Biopharm, Darmstadt) bestimmt. Zur Herstellung der Testlösung wurden 5 g gHB in einen 100 mL-Messkolben eingewogen, in 60 mL Reinstwasser suspendiert und 20 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde mit Reinstwasser auf 100 mL aufgefüllt, zentrifugiert (1650 x g, 10 min) und durch einen Faltenfilter filtriert. 15 mL der Lösung wurden mit 1 N Natronlauge auf pH 8 bis 9 eingestellt, im Messkolben auf 25 mL aufgefüllt und erneut im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die enzymatische Bestimmung wurde auf Grundlage des vom Hersteller vorgegebenen Pipettierschemas durchgeführt. Es wurde ein Probenvolumen von 200 µL eingesetzt. Die spektralphotometrische Messung des gebildeten NADPH erfolgte bei 340 nm (vgl. 4.2.9, Photometer) gegen Luft. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Der Citronensäuregehalt der Probe wurde berechnet nach:

$$c_{\text{Citronensäure}} = \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000 \cdot EW} \cdot \Delta E \cdot F \cdot 100 \quad (4.6)$$

$c_{\text{Citronensäure}}$	Citronensäuregehalt (g/100 g)
V	Testvolumen
v	Probenvolumen
ΔE	Extinktionsdifferenz Probe/Leerwert
ε	Extinktionskoeffizient von NADPH (bei 340 nm: 6,3 (l mmol ⁻¹ cm ⁻¹))
MG	Molekulargewicht: 192,1 (g/mol)
d	Schichtdicke
F	Verdünnungsfaktor
EW	Einwaage (g/L)

4.3.2.3.9 Enzymatische Bestimmung des Ascorbinsäuregehalts

L-Ascorbinsäure wurde enzymatisch unter Verwendung eines Testkits (L-Ascorbinsäure Nr. 10 409 677 035, R-Biopharm, Darmstadt) bestimmt. Zur Herstellung der Testlösung wurden 5 g gHB in einen 100 mL-Messkolben eingewogen, in 60 mL Reinstwasser suspendiert und 20 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde mit Reinstwasser auf 100 mL aufgefüllt, filtriert und mit PVPP entfärbt. Die enzymatische Bestimmung wurde auf Grundlage des vom Hersteller vorgegebenen Pipettierschemas durchgeführt. Es wurde ein Probenvolumen von 200 µL eingesetzt. Das bei der Ascorbinsäure-Bestimmung gebildete MTT-Formazan

wurde bei 578 nm gegen Luft detektiert. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Der Ascorbinsäuregehalt der Probe wurde berechnet nach:

$$c_{L-Ascorbinsäure} = \frac{V \cdot MG}{\varepsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000 \cdot EW} \cdot \Delta E \cdot 100 \quad (4.7)$$

$c_{L-Ascorbinsäure}$	<i>L-Ascorbinsäuregehalt (g/100 g)</i>
V	<i>Testvolumen</i>
v	<i>Probevolumen</i>
ΔE	<i>Extinktionsdifferenz Probe/Leerwert</i>
ε	<i>Extinktionskoeffizient von MTT-Formazan (bei 578 nm: 16,9 (l mmol⁻¹ cm⁻¹))</i>
MG	<i>Molekulargewicht: 176,13 (g/mol)</i>
d	<i>Schichtdicke</i>
EW	<i>Einwaage (g/L)</i>

4.3.2.3.10 Gravimetrische Bestimmung von löslichen und unlöslichen Ballaststoffen

Die enzymatisch-gravimetrische Bestimmung der löslichen und unlöslichen Ballaststoffe erfolgte nach Methode L 00.00-18 (Januar 1997, Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 64 LFGB).

Enzymatischer Abbau

In ein 600 mL-Becherglas wurden 1 g gHB auf 0,1 mg genau eingewogen und mit 40 mL MES/TRIS-Pufferlösung (9,76g MES und 6,10g TRIS in 0,85 L Reinstwasser lösen, pH-Wert bei 20°C mit 6 N Natronlauge auf 8,3 einstellen, mit Reinstwasser auf 1 L auffüllen) versetzt. Die Suspension wurde gerührt bis die Probe gleichmäßig suspendiert war. Anschließend wurde der pH-Wert mit 5 % Natriumhydroxidlösung (w/v) auf 8,3 eingestellt. Unter ständigem Rühren wurden 50 µL α -Amylase-Suspension (EC-Nr. 3.2.1.1) zugegeben, das Becherglas mit einem Uhrgläschen abgedeckt und 30 min bei 95 bis 100°C im Wasserbad erhitzt. Zum Proteinabbau wurden danach 100 µL Proteaselösung (50 mg Protease (EC-Nr. 3.4.21.14) in 1 mL MES/TRIS-Pufferlösung) zugegeben und erneut 30 min bei 60°C gerührt. Anschließend wurden 5 mL 0,56 M Salzsäure zugefügt und mit Hilfe von 5 % Natriumhydroxidlösung (w/v) oder 5 % Salzsäure (v/v) der pH-Wert auf 4,0 bis 4,7 eingestellt. Nach Zugabe von 300 µL Amyloglucosidase-Suspension (EC-Nr.3.2.1.) wurde wieder 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert.

Bestimmung der unlöslichen Ballaststoffe

Nach dem enzymatischen Abbau wurde die noch 60°C warme Suspension unter leichtem Vakuum durch einen Büchnertrichter mit aschefreiem, über Nacht bei $103 \pm 2^\circ\text{C}$ im Trockenschrank getrockneten und ausgewogenem Filterpapier abgesaugt. Das Becherglas und der Rückstand wurden zweimal mit je 10 mL Wasser von 70°C gewaschen und dabei eventuell noch in den Bechergläsern vorhandene Rückstände mit einem Gummiwischer quantitativ überführt. Filtrat und Waschwasser wurden vereint und zur Bestimmung der löslichen Ballaststoffe in tarierte 600 mL Bechergläser überführt.

Der Rückstand im Rundfilter wurde jeweils zweimal mit 15 mL 78 %igem Ethanol (v/v), 15 mL 95 %igem Ethanol (v/v) und 15 mL Aceton gewaschen. Der Rundfilter mit dem Rückstand wurde über Nacht bei $103 \pm 2^\circ\text{C}$ im Trockenschrank getrocknet und nach 30-minütigem Abkühlen im Exsikkator zur Bestimmung der unlöslichen Ballaststoffe gewogen.

Bestimmung der löslichen Ballaststoffe

Zu Filtrat und Waschwasser wurde das vierfache Volumen an auf 60°C erwärmten 95 %igem Ethanol (v/v) gegeben. Anschließend wurde das Becherglas abgedeckt und bis zur Ausbildung des Niederschlags über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Niederschlag wurde unter leichtem Vakuum durch einen Büchnertrichter mit aschefreiem, über Nacht bei $103 \pm 2^\circ\text{C}$ im Trockenschrank getrockneten und ausgewogenem Filterpapier abgesaugt, wobei der Rückstand im Becherglas mit einem Gummiwischer und kleinen Portionen 78 %igem Ethanol (v/v) aus einer Spritzflasche quantitativ in den Rundfilter überführt wurde.

Der im Filtertiegel bzw. im Rundfilter befindliche Rückstand wurde dreimal mit je 15 mL 78 %igem Ethanol (v/v), zweimal mit je 10 mL 95 %igem Ethanol (v/v) und dreimal mit je 10 mL Aceton gewaschen. Der Filtertiegel bzw. Rundfilter mit dem Rückstand wurde über Nacht bei $103 \pm 2^\circ\text{C}$ im Trockenschrank getrocknet und nach Abkühlen im Exsikkator ausgewogen.

Die Bestimmung wurde mit jeweils zwei, in der Masse nur wenig abweichenden Proben durchgeführt. Aus einem Ansatz wurde nach dem Auswägen des Ballaststoffrückstandes der Mineralstoffgehalt (vgl. Kapitel 2.4) bestimmt. Der zweite Ansatz diente zur Ermittlung des Proteingehalts des Rückstands. Parallel wurden zwei Ansätze zur Bestimmung des Blindwertes mitgeführt.

Bestimmung des Mineralstoffgehalts des Rückstands

Der Mineralstoffgehalt in den Rückständen von Probe bzw. Blindwert wurde wie in Kapitel 4.3.2.3.2 dargestellt durch Veraschen im Muffelofen bei 500°C bestimmt.

Bestimmung der Proteingehalts des Rückstands

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde wie in Kapitel 4.3.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Das Filterpapier mit dem Rückstand wurde direkt in das Aufschlussglas gegeben.

Berechnung des Gehalts an löslichen und unlöslichen Ballaststoffen

Der Gehalt an löslichen und unlöslichen Ballaststoffen wird berechnet nach:

$$B = \frac{\frac{m_{R1} + m_{R2}}{2} - m_P - m_A - m_B}{\frac{m_1 + m_2}{2}} \cdot 100 \quad (4.8)$$

$$m_B = \frac{m_{R1Blind} + m_{R2Blind}}{2} - m_{PBlind} - m_{ABlind} \quad (4.9)$$

B	<i>Gehalt an löslichen bzw. unlöslichen Ballaststoffen (g/100 g)</i>
m_{R1}, m_{R2}	<i>Masse der Rückstände (mg)</i>
m_P	<i>Masse des im Rückstand enthaltenen Proteins (mg)</i>
m_A	<i>Masse der im Rückstand enthaltenen Mineralstoffe (mg)</i>
m_1, m_2	<i>Einwaagen (mg)</i>
m_B	<i>Korrigierter Blindwert (mg)</i>
$m_{R1Blind},$	<i>Masse der Rückstände im Blindwert (mg)</i>
$m_{R2Blind}$	
m_{PBlind}	<i>Masse des im Rückstand des Blindwerts enthaltenen Proteins (mg)</i>
m_{ABlind}	<i>Masse der im Rückstand des Blindwerts enthaltenen Mineralstoffe (mg)</i>

4.3.2.4 Bestimmung von HMF

Probenvorbereitung

Ca. 250 mg gHB wurden in Eppendorf-Caps eingewogen. Nach Zugabe von 1 mL Methanol wurde 10 min auf dem Vortexer gemischt, anschließend zentrifugiert (14000 x g, 10 min) und der Überstand im Verhältnis 1:1 mit Reinstwasser verdünnt. Nach dem Filtrieren (Rotalibo Spritzenfilter, PVDF, 4,5 µm, Roth, Karlsruhe) wurde die Lösung im Verhältnis 1:1 mit Standardlösung (3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure (50 µg/mL) in Reinstwasser/Methanol 1:1 (v/v)) versetzt und zur Analytik mittels HPLC-System 4 (s. Kapitel 4.2.1) verwendet.

Kalibriergeraden

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurde 49 mg HMF auf 0,1 mg genau in einen 100 mL-Messkolben eingewogen und mit Reinstwasser zur Marke aufgefüllt (entspricht 0,49 mg/mL). Aus der Stammlösung wurden durch Zugabe von Reinstwasser in den Verhältnissen 1:2,5, 1:5, 1:25, 1:50, 1:250, 1:500, 1:2500 Verdünnungen hergestellt. Anschließend wurden Stammlösungen und Verdünnungen im Verhältnis 1:1 mit Standardlösung (3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure (50 µg/mL) in Reinstwasser/Methanol 1:1 (v/v)) versetzt und mittels HPLC-DAD (System 4, 4.2.2) vermessen. Die Detektion von HMF erfolgte bei 286 nm. Der Standard 3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure wurde bei 304 nm erfasst.

Die Kalibriergerade wurde durch Auftragen der Konzentration c_{HMF} gegen das Flächenverhältnis $F_{\text{HMF}}/F_{\text{Standard}}$ erstellt. Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden bei einem Signal/Rauschverhältnis von 3:1 bzw. 10:1 ermittelt und lagen bei 0,007 µg/mL und 0,027 µg/mL.

Identifizierung und Quantifizierung

Die Identifizierung des enthaltenen HMF wurde anhand des Vergleiches von Retentionszeit und UV-Spektrum mit der authentischen Referenzsubstanz durchgeführt. Zudem erfolgte ein Vergleich der massenspektrometrischen Daten nach Analytik mit HPLC-DAD-MS-System 5 (vgl. 4.2.3).

Zur Quantifizierung mittels HPLC-DAD wurde das Absorptionssignal bei 286 nm verwendet. Die Auswertung erfolgte anhand einer Kalibriergerade.

4.3.2.5 Zusammensetzung der Ballaststofffraktion

4.3.2.5.1 Gewinnung der ethanolunlöslichen Rückstands (EUR)

Zur Gewinnung des ethanolunlöslichen Rückstands wurden feinzerkleinerte gHB mit 80 % Ethanol (v/v) extrahiert. Dazu wurde ca. 1 g des Probenmaterials genau in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 10 mL 80 % Ethanol (v/v) versetzt, mehrfach geschüttelt, 10 min im Ultraschallbad behandelt und zentrifugiert (1650 x g, 4 min). Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen, um keinen Feststoff zu verlieren. Die Extraktion wurde 11-mal wiederholt. Der Rückstand wurde lyophilisiert und ausgewogen.

4.3.2.5.2 Zuckerreferenzgemisch

Um zu ermitteln, welcher Anteil der Zucker unter den Hydrolysebedingungen zersetzt wird, muss bei der Hydrolyse ein Zuckerreferenzgemisch mitgeführt werden (Englyst und Cummings, 1988). Für die Herstellung des Referenzgemisches wurden 600 mg D-(+)-Glucose, 600 mg D-(+)-Xylose, 100 mg D-(+)-Mannose, 100 mg D-(-)-Arabinose, 100 mg D-(+)-Galactose und 500 mg D-(+)-Galacturonsäure eingewogen und im Mörser gut homogenisiert. Ca. 20 mg des Zuckerreferenzgemisches wurden in einen 10 mL-Messkolben eingewogen und mit 1 N Schwefelsäure zur Marke aufgefüllt. Ein Aliquot der Lösung wurde nach Derivatisierung (vgl. 4.3.2.5.4) zur Bestimmung der exakten Neutralzuckergerhalte vor Hydrolyse mittels GC-FID eingesetzt. Ein weiterer Teil diente zur photometrischen Bestimmung des Galacturonsäuregehalts. Die Hydrolyse des Zuckerreferenzgemisches wurde bei einer Einwaage von 20 bis 25 mg wie unter 4.3.2.5.3 beschrieben durchgeführt. Das Hydrolysat wurde ohne Filtration direkt für die weitere Analytik verwendet. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

4.3.2.5.3 Hydrolyse und gravimetrische Bestimmung des Klason-Lignin

In 10 mL-Schliffreagenzgläser mit Rührfisch wurden ca. 35 mg EUR eingewogen und unter Rühren mit 1 mL 12 N Schwefelsäure versetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass der Feststoff so wenig wie möglich verklumpt. Die Reagenzgläser wurden mit Schliffstopfen fest verschlossen und mit Schliffklemmen gesichert. Anschließend wurde im Wasserbad bei 35°C 1 h unter permanentem Rühren erhitzt. Nach Zugabe von 11 mL Reinstwasser wurde im siedenden Wasserbad für weitere 3 h unter Rühren erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde unter leichtem Vakuum durch eine, für 4 h bei $103 \pm 2^\circ\text{C}$ im Trockenschrank getrocknete und ausgewogene Fritte (Borosilikat 3.3,

Porengröße 4) abgesaugt und das zur Neutralzucker- und Uronsäurebestimmung benötigte Filtrat gesammelt. Das als Rückstand erhaltene Klason-Lignin wurde bis zur Säurefreiheit mit 15 mL Reinstwasser gewaschen. Rückstand und Fritte wurden anschließend 4 h bei $103 \pm 2^\circ\text{C}$ im Trockenschrank getrocknet und nach 20-minütigem Abkühlen im Exikkator ausgewogen. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

4.3.2.5.4 Analytik der Neutralzucker

Derivatisierung

Die Derivatisierung der Zucker zur Alditolacetaten wurde in Anlehnung an Englyst und Cummings (1988) durchgeführt. Dazu wurden 3 mL abgekühltes Hydrolysat von Probe (vgl. 4.3.2.5.3) oder Zuckerreferenzgemisch (vgl. 4.3.2.5.2) bzw. unhydrolysiertes Zuckerreferenzgemisch (vgl. 4.3.2.5.2) in ein Hydrolyseröhrchen (Glas, mit Schraubverschluss) pipettiert, mit 0,5 mL D-Allose-Standardlösung (1 mg/mL in 1 N Schwefelsäure) versetzt und am Vortexer gemischt. Anschließend wurde 1 mL 12 M Ammoniaklösung zugegeben, der pH-Wert mit pH-Papier geprüft und eventuell bis zur alkalischen Reaktion weitere Ammoniaklösung zugegeben. Dann wurden 0,4 mL Natriumborhydridlösung (50 mg Natriumborhydrid in 1 mL 3 M Ammoniaklösung, vor der Verwendung frisch hergestellt) und 5 μL 2-Octanol zupipettiert, das Hydrolyseröhrchen verschlossen und 1 h im Wasserbad bei 40°C erwärmt.

Nach dem Abkühlen wurden 0,3 mL Eisessig zugefügt und am Vortexer gemischt. Ein 0,5 mL-Aliquot dieser Lösung wurde in ein Reagenzglas überführt und mit 0,5 mL 1-Methylimidazol und 5 mL Acetanhydrid versetzt. Das Reagenzglas wurde mit einem Gummistopfen verschlossen und nach dem Mischen 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Zugabe von 1 mL abs. Ethanol, Mischen und 5 min Standzeit wurden 5 mL Reinstwasser zupipettiert und erneut 5 min gewartet. Dann wurde das Reagenzglas in ein Eisbad gestellt, 0,5 mL Bromphenolblaulösung (0,04 % Bromphenolblau in Reinstwasser (w/v)) und 5 mL 7,5 M Kaliumhydroxidlösung zugefügt und gemischt. Nach 3-minütiger Wartezeit wurden noch einmal 5 mL 7,5 M Kaliumhydroxidlösung hinzugegeben und gemischt. Nach Phasentrennung wurde die obere Ethylacetat-Phase in ein GC-Vial überführt, im Stickstoffstrom auf ca. die Hälfte des Ausgangsvolumens eingengt und zur Analytik mittels HRGC-MS (System 1, 4.2.4) und GC-FID (System 1, 4.2.5) eingesetzt.

Kalibriergeraden

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden ca. 17 mg D-(-)-Glucose, 12 mg D-(+)-Xylose, 3 mg D-(-)-Arabinose, 3 mg D-(+)-Galactose und 2 mg D-(+)-Mannose auf 1 µg genau in 5 mL-Messkolben eingewogen und mit 1 N Schwefelsäure zur Marke aufgefüllt. Aliquote der Stammlösungen (100 bis 900 µl) wurden mit 1 N Schwefelsäure auf 3 mL ergänzt. Diese Verdünnungen wurden nach Zugabe von Allose-Standardlösung wie oben beschrieben derivatisiert und analysiert.

Die Kalibriergeraden wurden durch Auftragen der Konzentration c_{Zucker} gegen das Flächenverhältnis $F_{\text{Zucker}}/F_{\text{Standard}}$ erstellt.

Identifizierung und Quantifizierung

Die Identifizierung der enthaltenen Zucker erfolgte mittels GC-MS anhand des Vergleiches von Retentionszeiten und Massenspektren mit authentischen Referenzsubstanzen. Hierfür wurden D-(+)-Glucose, D-(+)-Xylose, D-(+)-Mannose, D-(-)-Arabinose, D-(+)-Galactose, L-Rhamnose und D-Fucose wie oben beschrieben derivatisiert und mittels HRGC-MS (System 1, 4.2.4) analysiert.

Die Quantifizierung erfolgte mittels GC-FID und wurde über externe Kalibriergeraden ausgewertet. Die mittels Zuckerreferenzgemisch erfassten Wiederfindungsraten nach Hydrolyse von 93,0 % (D-(+)-Glucose), 85,7 % (D-(+)-Xylose), 91,4 % (D-(+)-Mannose), 96,3 % (D-(-)-Arabinose), 93,4 % (D-(+)-Galactose) und 85,4 % (Galacturonsäure), wurden bei der Berechnung einbezogen. Bei der Angabe von Polysaccharidgehalten wurden weiterhin durch Wasserabspaltung bedingte Korrekturfaktoren von 0,88 (Pentosen) und 0,90 (Hexosen) einbezogen.

4.3.2.5.5 Bestimmung von Uronsäuren

Photometrische Bestimmung

Die Bestimmung der Uronsäuren erfolgte nach der Methode von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973).

In zwei Eppendorf-Caps (Messwert und Blindwert) wurden jeweils 50 µL Probenhydrolysat (vgl. 4.3.2.5.3), 20 µL Zuckerreferenzgemisch-Hydrolysat (vgl. 4.3.2.5.2) oder 50 µL unhydrolysiertes Zuckerreferenzgemisch (vgl. 4.3.2.5.2) pipettiert. Das Volumen wurde mit 1 N Schwefelsäure zu 200 µL ergänzt und die Eppendorf-Caps im Eisbad gekühlt. Anschließend wurden 1,2 mL Natriumtetraboratlösung (0,0125 M Natriumtetraborat in konz. Schwefelsäure) zugegeben, die Caps fest verschlossen, am Vortexer gemischt und 5 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Dann wurde genau 5 min im Eisbad abgekühlt und bei Raumtemperatur stehen gelassen.

In eines der Eppendorf-Caps (Messwert) wurden 20 μL *m*-Phenylphenollösung (0,15 % *m*-Phenylphenol in 0,5 % Natriumhydroxidlösung (w/v)) pipettiert, zum zweiten (Blindwert) wurden 20 μL 0,5 % Natriumhydroxidlösung (w/v) hinzugefügt. Nach dem Mischen durch vorsichtiges Schütteln wurde 3 min im Ultraschallbad behandelt und die Lösung anschließend in Quarzglasküvetten überführt. Die Bestimmung des gebildeten Farbstoffes erfolgte spektralphotometrisch bei 520 nm gegen den entsprechenden Blindwert (vgl. 4.2.9, Photometer). Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Kalibriergerade

Eine externe Kalibrierung erfolgte, indem 50 mg D-(+)-Galacturonsäure in einen 500 mL-Messkolben eingewogen und mit Reinstwasser zur Marke aufgefüllt wurden. Aus der Stammlösung wurden durch Zugabe von Reinstwasser in den Verhältnissen 1:1,25; 1:1,67; 1:2; 1:2,5; 1:4 und 1:10 Verdünnungen hergestellt. Stammlösung und Verdünnungen wurden anschließend wie oben beschrieben behandelt (eingesetztes Volumen 20 μL) und photometrisch vermessen. Die Kalibriergerade wurde durch Auftragen der Konzentration $c_{\text{Galacturonsäure}}$ gegen die Extinktion $E_{\text{Galacturonsäure } 520\text{nm}}$ erstellt. Die mittels Zuckerreferenzgemisch erfassten Wiederfindungsrate nach Hydrolyse für D-(+)-Galacturonsäure von 85,4 % wurde bei der Berechnung einbezogen. Bei der Angabe von Polysaccharidgehalten wurde der durch Wasserabspaltung bedingte Korrekturfaktor von 0,91 berücksichtigt.

4.3.2.5.6 Bestimmung kondensierter Gerbstoffe

Die Ermittlung des Gehalts an kondensierten Gerbstoffen erfolgte wie in Abschnitt 4.3.2.2.3. beschrieben als Dreifachbestimmung. Es wurden ca. 6 mg EUR eingesetzt.

4.3.2.5.7 Bestimmung Protein

Die Ermittlung des Gesamtproteingehalts nach Kjeldahl erfolgte wie in Kapitel 4.3.2.3.3. beschrieben als Doppelbestimmung. Es wurden ca. 120 mg EUR in die Gläser der Aufschlussapparatur direkt eingewogen.

4.3.3 Studie zur Trocknung von Heidelbeeren

4.3.3.1 Trocknung von frischen Heidelbeeren bei verschiedenen Temperaturen

Frische Kulturheidelbeeren wurden im lokalen Handel erworben. Aliquote von je 150 g wurden anschließend einer Trocknung im Trockenschrank bei Temperaturen von

30°C, 50°C und 70°C unterzogen. Die Trocknung wurde nach 30 Tagen (30°C), 9 Tage (50°C) bzw. 4 Tagen (70°C) beendet, als kein Gewichtsverlust mehr auftrat. Parallel wurde ein Aliquot der frischen Kulturheidelbeeren lyophilisiert.

4.3.3.2 Probenvorbereitung

Die lyophilisierten bzw. getrockneten Kulturheidelbeeren wurden in einem handelsüblichen Küchenmixer zu einem groben Pulver zerkleinert und anschließend nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff im Mörser fein vermahlen.

4.3.3.3 Bestimmung der Trockenmasse

Die Trockenmasse wurde wie in Kapitel 4.3.2.3.1 beschrieben, bestimmt. Es erfolgte eine Doppelbestimmung.

4.3.3.4 Bestimmung von Polyphenolen

4.3.3.4.1 Bestimmung von Anthocyanen

Die Bestimmung des Anthocyangehalts erfolgte wie in 4.3.2.2.1 beschrieben. Es wurden ca. 0,5 g der zerkleinerten Kulturheidelbeeren (lyophilisiert oder getrocknet) zur Probenvorbereitung eingesetzt.

4.3.3.4.2 Bestimmung von phenolischen Säuren, Flavan-3-olen und Flavonolen

Die Bestimmung des Gehalts an Flavonolen und phenolischen Säuren erfolgte wie in 4.3.2.2.2 beschrieben. Es wurden ca. 0,5 g der zerkleinerten Kulturheidelbeeren (lyophilisiert oder getrocknet) zur Probenvorbereitung eingesetzt.

4.3.3.5 Analytik von HMF

Die Bestimmung des HMF-Gehalts erfolgte wie in 4.3.2.4 beschrieben. Es wurden ca. 250 mg der zerkleinerten Kulturheidelbeeren (lyophilisiert oder getrocknet) zur Probenvorbereitung eingesetzt. Bei lyophilisierten Kulturheidelbeeren wurde der Überstand im Verhältnis 1:1, bei allen getrockneten Kulturheidelbeeren im Verhältnis 1:10 mit Reinstwasser verdünnt.

4.3.4 Modell-Untersuchungen zur Anthocyanstabilität während der Trocknung von anthocyanhaltigen Früchten

4.3.4.1 Herstellung von Inkubationspuffer und Anthocyanstammlösung

Die Inkubationsversuche zur Untersuchung der Anthocyanstabilität während der Trocknung von Früchten wurden unter Verwendung von McIlvaine-Puffer pH 3 durchgeführt. Der Puffer wurde hergestellt, indem 0,1 M Citronensäurelösung bei Temperaturen von 30°C bzw. 50°C mit 0,2 M Kaliumhydrogenphosphatlösung auf pH 3 eingestellt wurde (McIlvaine Puffer pH 3_{30°C} bzw. McIlvaine Puffer pH 3_{50°C}).

Zur Herstellung der Anthocyanstammlösungen (0,5 mM) wurde ca. 900 µg nach 4.3.1 isoliertes Cy-3-gal und Cy-3-glc auf 1 µg genau in Vials eingewogen und mit McIlvaine-Puffer pH 3 versetzt, sodass eine Konzentration von 224,5 µg/mL vorlag. Diese Anthocyanstammlösungen wurden direkt nach Herstellung weiterverwendet.

4.3.4.2 Studiendesign und Analytik

Zur Untersuchung der chemischen Stabilität der Anthocyane bei Trocknungsprozessen wurde 400 µL McIlvaine Puffer pH 3_{30°C} bzw. McIlvaine Puffer pH 3_{50°C} in 1,5 mL Glasvials mit Schraubdeckel pipettiert und bei 30°C bzw. 50°C 30 min im Trockenschrank temperiert.

Anschließend wurden 100 µL Cy-3-gal bzw. Cy-3-glc-Stammlösung zugefügt, die Vials fest verschlossen, am Vortexer gemischt und für 0, 5, 10, 15, 20, 32 Tage bei 30°C bzw. für 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 Tage bei 50°C im Trockenschrank inkubiert. Zum Reaktionsabbruch wurden 50 µL Ameisensäure zupipettiert und gemischt. Anschließend wurden die Proben mittels HPLC-System 2 (vgl. 4.2.1) und HPLC-MS/MS 4 (vgl. 4.2.3) analysiert. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

4.3.5 Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln (Labormaßstab)

4.3.5.1 Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln mittels Eintropftechnik

Die Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln (APK) erfolgte nach dem Prinzip der ionotropen Gelierung und wurde im Labormaßstab mittels Eintropftechnik durchgeführt. Dazu wurde anthocyanhaltige Pektinlösung, wie in Abb. 4-1 dargestellt, unter Verwendung von zwei Peristaltikpumpen über Kanülen (ID 0,7 mm) in langsam gerührte calciumchloridhaltige Quervernetzerlösung eingetropft. Die dabei entstehenden Kugeln wurden über einen Büchnertrichter abgesaugt, gewaschen und auf Gitterrosten bei Raumtemperatur im Umlufttrockenschrank getrocknet oder lyophilisiert.

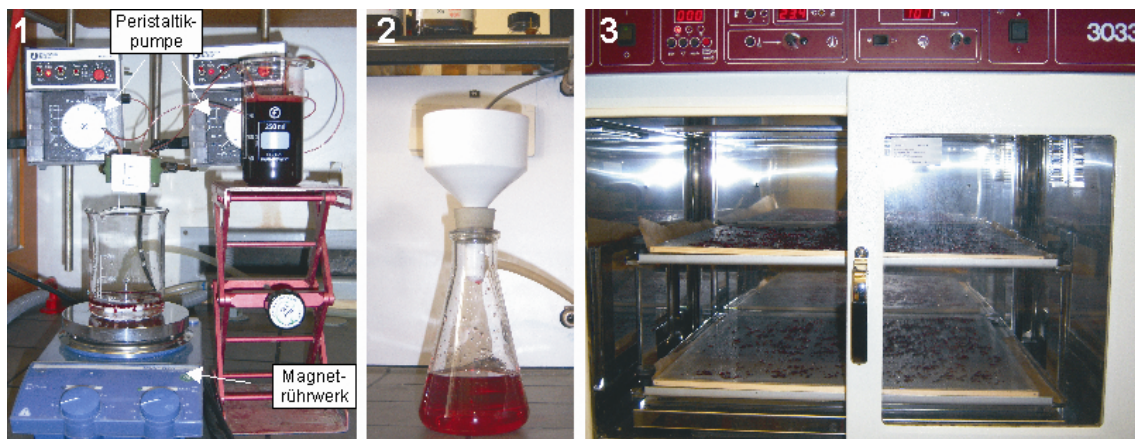


Abb. 4-1: Herstellung von APK mittels Eintropftechnik. 1 Eintropfen der anthocyanhaltigen Pektinlösung in Calciumchloridlösung. 2 Absaugen der APK mittels Büchnertrichter, 3 Trocknung der APK auf Gitterrosten im Umlufttrockenschrank.

4.3.5.1.1 Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln (P4BL und P4BRT)

Genau 8 g amidiertes Pektin wurden unter Rühren in 160 mL Reinstwasser gelöst. Genau 400 mg Bilberry-Extrakt wurden in 40 mL Reinstwasser dispergiert. Die Pektin- und die Anthocyanlösung wurden unter Rühren gemischt bis eine homogene Lösung (4 % amidiertes Pektin (w/v), 5 % Bilberry-Extrakt (w/w)) vorlag und anschließend im Vakuum entgast. Jeweils 20 mL der Lösung wurden mit einem Fluss von ca. 0,8 mL/min bei Raumtemperatur in 100 mL langsam gerührte 1,7 %ige Calciumchloridlösung (w/v) eingetropft. Die dabei entstandenen Kugeln wurden weitere 10 min in der Calciumchloridlösung belassen, anschließend über einen Büchnertrichter abgesaugt und fünfmal mit je 100 mL Reinstwasser sowie einmal mit 10 mL Aceton gewaschen. Die APK wurden lyophilisiert (P4BL) oder auf Gitterrosten ausgebreitet bei Raumtemperatur im Umlufttrockenschrank getrocknet (P4BRT). Durch mehrfache Wiederholung des Ansatzes wurden 60 g des Materials P4BRT hergestellt.

4.3.5.1.2 Herstellung von Anthocyan-Pektin-Zein-Kugeln (P4BZ)

Genau 8 g amidiertes Pektin wurden unter Rühren in 160 mL Reinstwasser gelöst. Genau 400 mg Bilberry-Extrakt wurden in 40 mL Reinstwasser dispergiert. Die Pektin- und die Anthocyanlösung wurden unter Rühren gemischt bis eine homogene Lösung (4 % amidiertes Pektin (w/v), 5 % Bilberry-Extrakt (w/w)) vorlag und anschließend im Vakuum entgast. Jeweils 20 mL der Lösung wurden mit einem Fluss von ca. 0,8 mL/min bei Raumtemperatur in 100 mL einer langsam gerührten ethanolischen Zeinlösung (10 % Zein (w/v), 0,5 % Calciumchlorid (w/v) in 75 %igem wässrigem Ethanol (v/v)) eingetropf. Die dabei entstandenen Kugeln wurden weitere 10 min in der Eintropflösung belassen, anschließend über einen Büchnertrichter abgesaugt und zweimal mit je 25 mL Ethylacetat sowie zweimal mit 100 mL Reinstwasser gewaschen. Die APK (P4BZ) wurden auf Gitterrosten ausgebreitet bei Raumtemperatur im Umlufttrockenschrank getrocknet.

4.3.5.1.3 Herstellung von Pektin-Kugeln (P3RT)

Amidiertes Pektin wurde unter Rühren in einer Konzentration von 3 % (w/v) in Reinstwasser gelöst und die Lösung im Vakuum entgast. Jeweils 200 mL der Pektinlösung wurden mit einer Flussrate von ca. 1,8 mL/min bei Raumtemperatur in 300 mL langsam gerührte 6 %ige Calciumchloridlösung (w/v) eingetropf. Die dabei entstandenen Kugeln wurden weitere 20 min in der Calciumchloridlösung belassen, anschließend über einen Büchnertrichter abgesaugt und mehrfach mit Reinstwasser und Aceton gewaschen. Die Pektin-Kugeln (P3RT) wurden auf Gitterrosten ausgebreitet und bei Raumtemperatur im Umlufttrockenschrank getrocknet. Durch mehrfache Wiederholung des Ansatzes wurden 500 g des Materials P3RT hergestellt.

4.3.5.2 Coating mit ethanolischer Schellacklösung

4.3.5.2.1 Herstellung der Sprühlösung

Zur Herstellung der Sprühlösung (6 % Schellack (w/v), 30 % Talkum (w/w) in abs. Ethanol) wurden 30 g Schellack unter Rühren in 500 mL abs. Ethanol gelöst und unlösliche Anteile anschließend durch Zentrifugation (1650 x g, 10 min) abgetrennt. Als Trennmittel wurde 9 g Talkum zugefügt und die Lösung 2 min mittels Ultra-Turrax dispergiert.

4.3.5.2.2 Coatingprozess

Das Coating von APK P4BRT mit Schellack erfolgte unter Verwendung von Coating-System 1 (vgl. 4.2.7). Es wurde eine Mischungen von APK P4BRT (vgl. 4.3.5.1.1) und Pektin-Kugeln P3RT (vgl. 4.3.5.1.3) im Verhältnis 1:4 zum Coating eingesetzt, da die erforderliche minimale Batchgröße von 60 g sonst nicht erreicht werden konnte. Während des Coating-Prozesses wurde die Sprühlösung kontinuierlich gerührt, um ein Absetzen des Trennmittels zu verhindern. Die Förderung der Sprühlösung erfolgte mit einer Schlauchquetschpumpe. Nach dem Coating wurden die durch ihre dunkle Färbung charakterisierten anthocyanhaltigen Kugeln für die weitere Analytik manuell separiert.

4.3.6 Herstellung von Anthocyan-Kollagen-Kugeln (KB, P3KB)

Vor der Verwendung wurde das Schwamm-Kollagen aus *Chondrosia reniformis* Nardo lyophilisiert und im Mörser fein vermahlen.

4.3.6.1 Herstellung von Anthocyan-Kollagen-Kugeln (KB)

In Anlehnung an Nicklas *et al.* (2009) wurde eine Kollagen-Dispersion hergestellt. Dazu wurden 2,5 g fein zerkleinertes Kollagen aus *Chondrosia reniformis* Nardo mit 2,6 g Reinstwasser versetzt und zum Quellen stehen gelassen. Anschließend wurden 20 g 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) zugegeben und gut gerührt. Der pH-Wert wurde mit ca. 12 g 0,1 N Natronlauge auf 7,4 eingestellt. Unter Rühren wurden 10 g 0,1 M Phosphatpuffer ergänzt, sodass die Dispersion einen Kollagengehalt von 5,3 % (w/w) aufwies. Zur Dispersion wurden 289 mg Billberry-Extrakt zugeführt und unter Rühren homogenisiert. Die anthocyanhaltige Kollagendispersion wurde mittels Spritze und Kanüle (ID 1,0 mm) in 0,1 N Salzsäurelösung eingetroppt. Die erhaltenen anthocyanhaltigen Aggregate wurden mit einem Büchner-Trichter abgesaugt, mit Reinstwasser gewaschen und auf einem Gitter bei Raumtemperatur getrocknet.

4.3.6.2 Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kollagen-Kugeln (P3KB)

Wie in Abschnitt 4.3.6.1 beschrieben, wurde eine Dispersion mit einem Kollagengehalt von 2,5 % (w/w) hergestellt. Parallel wurden 1,8 g amidiertes Pektin in 20 mL Reinstwasser gelöst. Zur Pektinlösung wurden 40 mL 2,5 %ige Kollagen-dispersion und 140 mg Bilberry-Extrakt gegeben und unter Rühren homogenisiert. Die anthocyanhaltige Dispersion wurde, wie in Abb. 4-1 dargestellt, unter Verwendung von

zwei Peristaltikpumpen und Kanülen (ID 0,7 mm) in langsam gerührte 1,7 %ige Calciumchloridlösung (w/v) eingetropt. Die dabei entstandenen Kugeln wurden über einen Büchnertrichter abgesaugt, mit Reinstwasser gewaschen und auf Gitterrosten bei Raumtemperatur im Umlufttrockenschrank getrocknet.

4.3.7 Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln (Technikums-Maßstab)

4.3.7.1 Herstellung von Anthocyan-Pektin-Kugeln mittels „Laminar Jet Break-up“-Technologie

Die Herstellung von APK erfolgte nach dem Prinzip der ionotropen Gelierung mittels „Laminar Jet Break-up“-Technologie an einer Mikrovertropfungsanlage (Brace, Alzenau, vgl. 4.2.6) bestehend aus Pumpe, Frequenzgenerator, Verstärker, vibrierender Düseneinheit, Stroboskoplampe und Reaktionstank (siehe Abb. 4-2).

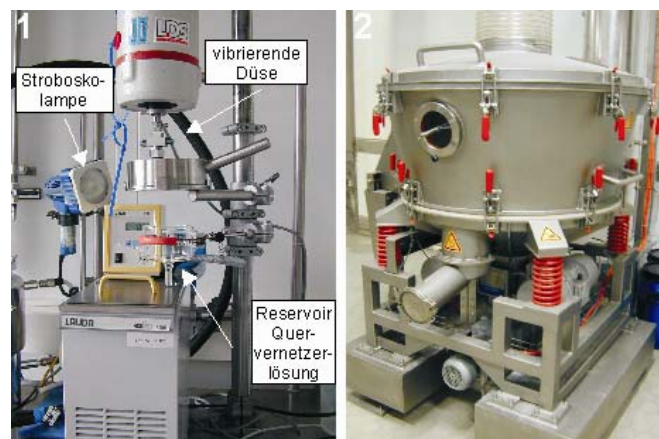


Abb. 4-2: Herstellung von APK mittels „Laminar Jet Break-up“-Technologie. 1 Mikrovertropfungsanlage. 2 Wirbelschichttrockner (Bilder Symrise).

Die Experimente wurden bei einer Flussrate von 6000 g/h durchgeführt. Eine Vibrationsfrequenz von 125 Hz sowie eine Amplitude von 4,5 waren eingestellt. Der Durchmesser der verwendeten vibrierenden Düse betrug 1,5 mm. Es wurde in eine Quervernetzerlösung (Calciumchlorid:Isopropanol:Wasser, 5:25:70 (w/w/w)) eingetropt. Die gebildeten Kugeln wurden mittels Sieb sofort aus der Quervernetzerlösung abgetrennt, mit Wasser gewaschen und in der Wirbelschicht bei 19°C schonend getrocknet.

4.3.7.1.1 Herstellung von glycerinhaltigen Anthocyan-Pektin-Kugeln (P4BG)

Zur Herstellung der Eintropflösung wurde 160 g amidiertes Pektin unter Rühren in 3424 g Wasser gelöst. Anschließend wurden 400 g Glycerin und 16 g Bilberry-Extrakt unter permanentem Rühren zugefügt.

4.3.7.1.2 Herstellung von glycerinhaltigen Pektin-Kugeln (P4G)

Zur Herstellung der Eintropflösung wurde 160 g amidiertes Pektin unter Rühren in 3424 g Wasser gelöst. Anschließend wurden 400 g Glycerin unter permanentem Rühren zugefügt.

4.3.7.2 Coating mit wässriger Schellacklösung und Hydroxypropylmethylcellulose

4.3.7.2.1 Herstellung der Sprühlösungen

Wässrige Schellacklösung

Zur Herstellung der Sprühlösung (12,2 % Schellack (w/w), 10 % Talkum (w/w bezogen auf Schellack), 10 % Glycerin (w/w bezogen auf Schellack)), wurden 450 g wässrige Schellacklösung (SSB Aqua Gold[®], Synthapharm, Mülheim a. d. Ruhr) mit 450 g Reinstwasser versetzt. Nach Zugabe von 11,25 g Talkum als Trennmittel und 11,25 g Glycerin als Weichmacher wurde die Lösung 2 min mittels Ultra-Turrax dispergiert.

Wässrige Schellacklösung mit 5 % Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)

Zur Herstellung der Sprühlösung (12,2 % Schellack (w/w), 5 % HPMC (w/w bezogen auf Schellack), 10 % Talkum (w/w bezogen auf Schellack), 10 % Glycerin (w/w bezogen auf Schellack)), wurden 5,63 g HPMC (Pharmacoat 606[®], Synthapharm, Mülheim a. d. Ruhr) in 450 g Reinstwasser unter Rühren gelöst. Anschließend wurden 450 g wässrige Schellacklösung (SSB Aqua Gold[®], Synthapharm, Mülheim a. d. Ruhr) zugefügt. Nach Zugabe von 11,25 g Talkum als Trennmittel und 11,25 g Glycerin als Weichmacher wurde die Lösung 2 min mittels Ultra-Turrax dispergiert.

Wässrige Schellacklösung mit 15 % HPMC

Zur Herstellung der Sprühlösung (12,2 % Schellack (w/w), 15 % HPMC (w/w bezogen auf Schellack), 10 % Talkum (w/w bezogen auf Schellack), 10 % Glycerin (w/w bezogen auf Schellack)), wurden 16,88 g HPMC (Pharmacoat 606[®], Synthapharm, Mülheim a. d. Ruhr) in 450 g Reinstwasser unter Rühren gelöst. Anschließend wurden

450 g wässrige Schellacklösung (SSB Aqua Gold[®], Synthapharm, Mülheim a. d. Ruhr) zugefügt. Nach Zugabe von 11,25 g Talkum als Trennmittel und 11,25 g Glycerin als Weichmacher wurde die Lösung 2 min mittels Ultra-Turrax dispergiert.

4.3.7.2.2 Messung der Größenverteilung der Sprühflüssigkeitstropfen

Die Messung der Größenverteilung der Sprühflüssigkeitstropfen erfolgte mittels Laserdiffraktometrie unter Verwendung eines Laser-Granulometers (ParticleSizer 2600, Malvern Instruments, Herrenberg). Das Gerät war mit einem Helium-Neon-Laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) ausgestattet. Eine Sammellinse mit einer Brennweite von 300 mm (Messbereich 5,8 μm bis 564 μm) wurde verwendet. Die Sprühdüse der Wirbelschichtanlage wurde mittig ca. 40 cm vor der Empfangseinheit und 5 cm unterhalb des Laserstrahls positioniert. Im „Sprühtest“-Modus der Wirbelschichtanlage wurde der erzeugte Sprühkegel der Messung unterzogen. Als charakteristische Sprühtropfengröße wurde der Wert erfasst, der 50 % in der Verteilungssummenkurve entsprach (Medianwert).

4.3.7.2.3 Kalibrierung der kapazitiven Feuchtesensoren

Die verwendete Wirbelschichtanlage GPCG1 ist zur Erfassung der Frisch- und Abluffeuchte mit Feuchtesensoren (Hygromess[®] Transmitter Typ 41045B, Typ 71326, Hydrocontrol, Hanau) ausgestattet. Es handelt sich dabei um kapazitive Feuchtesensoren, sog. Metalloxidsensoren. Zwischen zwei Platinelektroden befindet sich ein dielektrisches, hygroskopisches Polymer. Diese Anordnung bildet einen Kondensator, dessen feuchteabhängige Dielektrizitätskonstante zur Bestimmung ausgenutzt wird. Zur Kompensation des Temperatureinflusses bei der Ermittlung der relativen Feuchte ist in den Sensorkopf ein Thermoelement integriert.

Die Kalibrierung der Feuchtemessung der Sensoren erfolgte, wie von Köster (2001) beschrieben, unter Verwendung von Salzlösungen (LiCl , MgCl_2 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$), die bei definierter Temperatur in einem geschlossenen System bestimmte rel. Luftfeuchtigkeiten erzeugen. Ausgehend von den Temperaturen während des Coatingprozesses, wurde über einen Bereich von 20°C bis 60°C kalibriert. Dazu wurden die beiden Feuchtesensoren aus der Wirbelschichtanlage ausgebaut und mit Sensorkopf nach unten fixiert. Auf den Sensorkopf wurde eine spezielle Klimakammer aufgeschraubt, deren Boden mit Salz und Salzlösung zu gleichen Anteilen (jeweils ca. 3 g) gefüllt war. Die gesamte Klimakammer wurde anschließend in einem mit PEG gefüllten Thermostat temperiert.

Aus den Unterschieden zwischen gemessenen rel. Feuchten und real vorliegenden rel. Feuchten (Referenzwerte nach Literatur) wurden Korrekturwerte errechnet. Aus diesen wurde anschließend mittels Origin-Software eine Funktion zur Berechnung des Korrekturfaktors in Abhängigkeit von Temperatur und gemessener rel. Feuchte ermittelt.

4.3.7.2.4 Coatingprozess

Das Coating von glycerinhaltigen APK (P4BG) sowie anthocyanfreiem Placebo-material (P4G) mit wässriger Schellacklösung sowie wässriger Schellack/HPMC-Lösung wurde an dem in Abb. 4-3 gezeigten Glatt Wirbelschichtgranulator GPCG 1.1 (Glatt, Binzen) im Botten-Spray-Verfahren nach Wurster durchgeführt (Coating-System 2, vgl. 4.2.7). Die Förderung der Sprühlösung erfolgte mit einer Schlauchquetschpumpe. Während des Coating-Prozesses wurde die Sprühlösung kontinuierlich gerührt, um ein Absetzen des Trennmittels zu verhindern.

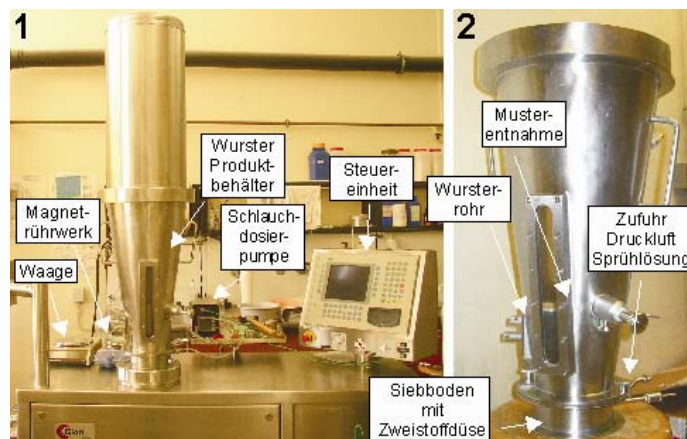


Abb. 4-3: Wirbelschichtanlage zum Coating von APK. 1 Instrumentierung der GPGC 1. 2 Wurster-Produktbehälter.

4.3.8 Charakterisierung der hergestellten Formulierungen

4.3.8.1 Bestimmung des Anthocyangehalts

Der Anthocyangehalt der APK wurde nach Extraktion bestimmt. Dazu wurden die APK nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff im Mörser zu einem feinen Pulver vermahlen. Ein Aliquot (42 mg) wurden anschließend in ein Reagenzglas eingewogen und mit 2,5 mL 10 % Ameisensäure (v/v) und einem Magnetrührstäbchen versetzt. Nach Ultraschallbehandlung (5 min) und Rühren wurde zentrifugiert (2700 x g, 10 min) und der Überstand in einen 5 mL-Messkolben überführt. Die Extraktion wurde 4-mal mit 2,5 mL 5 % Ameisensäure in Methanol (v/v) wiederholt. Die methanolischen Über-

stände wurden vereinigt, das Lösungsmittel schonend am Rotationsverdampfer bei 35°C entfernt und der Rückstand quantitativ ebenfalls in den 5 mL-Messkolben überführt. Nach Auffüllen mit 10 % Ameisensäure (v/v) wurde membranfiltriert (Rotalibo Spritzenfilter, PVPP, 4,5 µm, Roth, Karlsruhe) und der Anthocyangehalt mittels HPLC-System 1 (vgl. 4.2.1) bestimmt.

4.3.8.2 Wassergehalt

4.3.8.2.1 Bestimmung des Wassergehalts anhand des Trocknungsverlustes

Der Wassergehalt der glycerinfreien Formulierungen wurde gravimetrisch anhand des Trocknungsverlustes bei erhöhter Temperatur bestimmt (Matissek und Steiner, 2006). Dazu wurden ca. 1 g der Formulierung in eine vorher bei $104 \pm 2^\circ\text{C}$ getrocknete und konstant gewogene Quarzschale eingewogen und anschließend 4 h im Trockenschrank bei $104 \pm 2^\circ\text{C}$ getrocknet. Nach 20-minütigem Abkühlen im Exiskikator wurde ausgewogen. Es erfolgte eine Doppelbestimmung. Der Wassergehalt wurde berechnet nach:

$$W = 100 - \left(\frac{m_2 - m_1}{m_E} \cdot 100 \right) \quad (4.10)$$

W	Wassergehalt (g/100 g)
m_1	Masse der leeren Quarzglasschale (g)
m_2	Masse von Quarzglasschale und Probe nach Trocknung (g)
m_E	Einwaage (g)

4.3.8.2.2 Bestimmung des Wassergehalts mittels Karl-Fischer-Titration

Die Bestimmung des Wassergehalts glycerinhaltiger Formulierungen erfolgte mittels Karl-Fischer-Titration. Dazu wurden die Formulierungen nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff im Mörser zu einem feinen Pulver vermahlen und ca. 100 mg des Pulvers in konditioniertem HYDRANAL[®]-Methanol (Riedel-de Haën, Seelze) suspendiert (vgl. 4.2.9, Karl-Fischer-Apparatur). Anschließend wurde mit HYDRANAL[®]-Composite 5-Titrant (Riedel-de Haën, Seelze) als Karl-Fischer-Reagenz bis zum Endpunkt titriert. Es erfolgte eine Doppelbestimmung. Der Wassergehalt W wurde berechnet nach:

$$W = \frac{EP_1 \cdot \text{Titer} \cdot 0,1}{C00} \quad (4.11)$$

W	Wassergehalt (%)
EP ₁	Volumen HYDRANAL®-Composite 5 (mL)
C00	Einwaage (g)

4.3.8.3 Verkapselungseffizienz

Die Verkapselungseffizienz VE wurde in Anlehnung an Dupuis *et al.* (2006) berechnet nach:

$$VE = \frac{W_{AE}}{W_{A0}} \cdot 100 \quad (4.12)$$

VE	Verkapselungseffizienz (%)
W _{AE}	tatsächlicher Anthocyanengehalt bezogen auf den Feststoffgehalt der Formulierung (g/100 g)
W _{A0}	theoretischer Anthocyanengehalt bezogen auf den Feststoffanteil der zur Herstellung verwendeten anthocyanhaltigen Lösung (g/100 g)

4.3.8.4 Coatinglevel

Das Coatinglevel wurde auf Grundlage von Anthocyan- und Wassergehalt der Formulierung vor und nach dem Coating berechnet nach:

$$CL = \frac{A_0 \cdot (100 - W_C)}{A_C} - A_0 - (100 - A_0 - W_0) \quad (4.13)$$

CL	Coatinglevel (%)
A ₀	Anthocyanengehalt vor dem Coating (mg/g)
A _C	Anthocyanengehalt nach dem Coating (mg/g)
W ₀	Wassergehalt vor dem Coating (mg/g)
W _C	Wassergehalt vor nach Coating (mg/g)

4.3.8.5 Untersuchung der Freisetzungseigenschaften in Magensaftsimulanz und Ileostomieflüssigkeit sowie Colostomieflüssigkeit

Die Anthocyan-Freisetzung aus den Formulierungen wurde unter Verwendung von Magensaftsimulanz und Ileostomieflüssigkeit untersucht. Bei den Formulierungen P4BGwSch19, HPMC5 und HPMC15 wurde zudem die Freisetzung in Colostomieflüssigkeit analysiert.

4.3.8.5.1 Probanden

Drei weibliche, normalgewichtige Probanden im Alter von 36 bis 41 Jahren nahmen an der Studie teil. Alle drei besitzen seit sieben bis acht Jahren ein endständiges Ileostoma, das aufgrund einer Erkrankung des Darmes an Morbus Crohn gelegt werden musste. Bei keiner der Probandinnen wurde seit dieser Zeit eine ileale Operation durchgeführt.

Die Colostomieflüssigkeiten wurden von 2 weiblichen Probanden (40 und 70 Jahre) bereitgestellt. Beiden Probandinnen hatte man infolge Dickdarmkrebses oder entsprechender Vorstufen 15 und 32 Jahre vor Beginn der hier durchgeführten Untersuchungen ein linksseitiges Colostoma gelegt. Nach Entfernung des erkrankten Colonbereichs wurden keine weiteren Symptome für Dickdarmkrebs beobachtet.

Die Probandinnen verzichteten 48 h vor dem Versuchen auf anthocyanhaltige Nahrungsmittel (Früchte, Säfte, Wein und Gelees). Innerhalb der letzten vier Wochen vor Studienbeginn wurde keine der Teilnehmerinnen mit Antibiotika behandelt.

4.3.8.5.2 Vorbereitung der Freisetzungsstudien

Die bei den Inkubationen verwendeten Glasgeräte wurden mindestens 3 h bei 150°C im Trockenschrank ausgeheizt und in die Anaerobenkammer überführt. Diese wurde mindestens 3 h mit einem N₂/CO₂-Gasgemisch (80:20, (v/v)) begast.

4.3.8.5.3 Herstellung des Magensaftsimulanz

Die Bedingungen des Magens wurden mit künstlichem Magensaft modifiziert nach Gillat *et al.* (1985) simuliert. Dazu wurden 2,050 mg Natriumchlorid (70mM), 1,860 mg Kaliumchlorid (50mM) und 2,410 mg Pepsin (14mM, EC-Nr. 3.4.23.1) in 400 mL Reinstwasser gelöst mit 1 %iger Salzsäurelösung (v/v) bei 37°C auf pH 2 eingestellt und mit Reinstwasser auf 500 mL aufgefüllt. Vor der Inkubation wurde die Lösung auf 37°C temperiert.

4.3.8.5.4 Herstellung der Inokuli aus Ileostomie- und Colostomieflüssigkeit

Herstellung der Inkubationspuffer

Für die Freisetzungsversuche wurden die Ileostomie- und Colostomieflüssigkeiten mit anaerobem Carbonat-Phosphat-Puffer (Reduktionspuffer) nach Lebet *et al.* (1998) verdünnt. Die Zusammensetzung dieses Reduktionspuffers ist in Tabelle 4-1 dargestellt. Die Zusammensetzung der Spurenelementlösung ist Tabelle 4-2 zu entnehmen.

Tabelle 4-1: Zusammensetzung des Reduktionspuffers nach Lebet *et al.* (1998).

Bestandteil	Konzentration (g/L)
NaHCO ₃	9,240
Na ₂ PO ₄ x 12 H ₂ O	7,125
NaCl	0,470
KCl	0,450
Harnstoff	0,400
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	0,108
Na ₂ SO ₄ (wasserfrei)	0,100
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,100
Spurenelementlösung	10 mL/L
Resazurin	1 mL/L
Reinstwasser	<i>ad</i> 1 000 mL

Tabelle 4-2: Zusammensetzung der Spurenelementlösung nach Lebet *et al.* (1998).

Bestandteil	Konzentration (g/L)
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	3,680
MnSO ₄ x H ₂ O	1,159
ZnSO ₄ x H ₂ O	0,440
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,120
NiCl ₂	0,100
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,098
Mo ₇ (NH ₄) ₆ O ₂₄ x H ₂ O	0,017
Reinstwasser	<i>ad</i> 1 000 mL

Die in Tabelle 4-1 gelisteten Salze wurden in einem Becherglas genau eingewogen und mit etwa 300 mL Reinstwasser im Ultraschallbad vollständig in Lösung gebracht. Nach Zugabe von 10 mL Spurenelementlösung wurde die Pufferlösung mit 1 N Salzsäurelösung auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt (Ileum pH 6,3; Colon pH 6,2). Anschließend wurde der Indikator Resazurin hinzugegeben, in einen 1 L-

Messkolben überführt und dieser mit Reinstwasser bis zur Marke aufgefüllt. Der Reduktionspuffer wurde für 30 Minuten bei 80°C im Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen unter Stickstoffatmosphäre wurden 5 mL einer frisch hergestellten Cysteinhydrochloridlösung (0,1 g/mL) als reduzierendes Agens zugegeben und der Puffer bis zum Farbumschlag von blau nach schwach rosa mit Stickstoff begast.

Zur Ermittlung eines Richtwertes für die Pufferherstellung wurden im Vorfeld der Untersuchungen die pH-Werte von mehreren Ileostomie- und Colostomieflüssigkeiten gemessen. Die Messungen erfolgten direkt nach dem Transport ins Labor ohne vorherige Verdünnung mittels digitalem pH-Meter.

Herstellung der Inokuli

Die Abnahme der Ileostoma- und Colostomabeutel erfolgte nüchtern am frühen Morgen. Die Beutel wurden zur Erzeugung einer sauerstoffreduzierten und kohlendioxidangereicherten Atmosphäre zusammen mit Anaerocult® C (Merck, Darmstadt) in einem 2,5 L Anaerobentopf (Merck, Darmstadt) umgehend ins Labor transportiert. Dort wurde das Gefäß sofort in die anaerobe Kammer überführt. Der Inhalt des Ileostoma- bzw. Colostomabeutels wurde in einem Becherglas mit dem gleichen Volumen an Carbonat-Phosphat-Puffer (auf 37 °C temperiert, pH 6,3 (Ileostomieflüssigkeit) bzw. pH 6,2 (Colostomieflüssigkeit) versetzt, mit einem Glasstab vermischt und über Glaswolle filtriert. Das so erhaltene Filtrat wurde als Inokulum (Bakterienquelle) in den Freisetzungsversuchen verwendet.

4.3.8.5.5 Durchführung der Freisetzungstudien

Genau 252 mg APK wurden in verschließbare Inkubationsgläser (Glas, 25 mL) eingewogen und mit 15 mL Magensaftsimulanz (auf 37°C temperiert) sowie einem Magnetührstäbchen versetzt. Anschließend wurde im Trockenschrank bei 37°C unter permanentem Rühren für 3 h inkubiert. Nach 0; 0,5; 1; 2 und 3 h wurde jeweils 1 mL des Überstands entnommen, in Inkubationsröhrchen (100 x 16 mm, PP, Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert und das Gesamtvolumen mit Magensaftsimulanz wieder auf 15 mL ergänzt. Nach 3 h Inkubation wurde das Magensaftsimulanz vollständig abpipettiert und die Kugeln zweimal mit Reinstwasser gewaschen. Die Inkubationsgläser wurden mit Stickstoff gespült, in die Inkubationskammer überführt, wo 15 mL Ileostoma-Inokulum zugefügt wurden und erneut im Trockenschrank (37°C, permanentes Rühren) inkubiert. Nach 0; 0,5, 1; 2 und 4 h wurde jeweils 1 mL des Überstands entnommen, in Inkubationsröhrchen (100 x 16 mm, PP, Sarstedt, Nümbrecht) mit 100 µL Ameisensäure pipettiert und das Gesamtvolumen wieder auf 15 mL ergänzt.

Alle entnommenen Proben der Überstände wurden, um die Enzymreaktion zu stoppen, 2 min im Ultraschallbad behandelt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde gefriergetrocknet.

Bei Fortsetzung der Freisetzungsuntersuchungen mit Colostomieflüssigkeit (P4BGwSch19, HPMC5, HPMC15) wurde nach 4 h Inkubation in Ileostomieflüssigkeit der Überstand vollständig abpipettiert und die Kugeln zweimal mit Reinstwasser gewaschen. Nach Spülen der Gläser mit Stickstoff wurde in der Inkubationskammer 15 mL Colostoma-Inokulum zugefügt. Die Inkubationsgläser wurden in einem Anaerobentopf platziert, der zu Erzeugung einer sauerstoffreduzierten und kohlendioxidangereicherten Atmosphäre mit Anaerocult® C (Merck, Darmstadt) bestückt war. Im Trockenschrank (37°C, permanentes Rühren) wurde anschließend weitere 15 h inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde der Überstand abpipettiert, noch vorhandenes Kugelmateriale in flüssigem Stickstoff eingefroren und direkt gefriergetrocknet.

Als Kontrollen dienten Proben von Magensaftsimulanz, Ileostomie- und Colostomieflüssigkeit ohne Probenmaterial. Alle Experimente waren Doppelbestimmungen.

4.3.8.5.6 Probenaufarbeitung und Analytik

Die gefriergetrockneten Proben der Überstände wurden dreimal mit je 1 mL 5 % Ameisensäure in Methanol (v/v) extrahiert, wobei jeder Extraktionsschritt Schütteln am Vortexer und 10-minütiges Behandeln mit Ultraschall beinhaltete. Die Überstände wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom vollständig entfernt. Der Rückstand wurde in 1 mL Standardlösung (0,05 mg/mL 3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure in 10 % Ameisensäure (v/v)) gelöst, membranfiltriert (Rotalibo-Spritzenfilter PVPP, 0,45 µm Porengröße; Roth, Karlsruhe) und zur HPLC-Analytik unter Verwendung von HPLC-System 3 (vgl. 4.2.1) verwendet. Anthocyane wurden bei 520 nm detektiert, der Standard bei 320 nm.

Lyophilisierte Rückstände der APK wurden nach Auswaage in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Mörser zu einem feinen Pulver vermahlen. Aliquote wurden in ein Zentrifugenglas überführt und die Anthocyane wie in Abschnitt 4.3.8.1 beschrieben extrahiert und analysiert.

4.3.8.5.7 Bestimmung der vollständigen Anthocyan-Freisetzung

Die vollständige Anthocyan-Freisetzung (100 %) aus den Materialien wurde nach Extraktion ermittelt. Dazu wurden die APK nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff im Mörser zu einem feinen Pulver vermahlen. Ein Aliquot von 42 mg wurden anschließend in ein Reagenzglas eingewogen und mit 2,5 mL 10 % Ameisensäure (v/v) und einem Magnetrührstäbchen versetzt. Nach Ultraschallbehandlung (5 min) und Rühren wurde zentrifugiert (2700 x g, 10 min) und der Überstand in einen 5 mL-Messkolben überführt. Die Extraktion wurde 4-mal mit 2,5 mL 5 % Ameisensäure in Methanol (v/v) wiederholt. Die methanolischen Überstände wurden vereinigt, das Lösungsmittel schonend am Rotationsverdampfer bei 35°C entfernt und der Rückstand quantitativ ebenfalls in den 5 mL-Messkolben überführt. Nach Auffüllen mit 10 % Ameisensäure (v/v) wurde mit 3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäurelösung (1 mg/mL in Methanol) im Verhältnis 20:1 versetzt, gemischt, membranfiltriert (Rotalibo Spritzenfilter, PVPP, 4,5 µm, Roth, Karlsruhe) und mittels HPLC-System 3 (vgl. 4.2.1) analysiert. Anthocyane wurden bei 520 nm detektiert, der Standard bei 320 nm.

4.3.8.5.8 Berechnung der Anthocyan-Freisetzung

Die Berechnung der Anthocyan-Freisetzung AFS erfolgte nach:

$$AFS = \frac{\left(\frac{F_{Peak}}{F_{STD}}\right)_t}{\left(\frac{F_{Peak}}{F_{STD}}\right)_{100\%}} \cdot \frac{20}{19} \cdot 100 \quad (4.14)$$

AFS	Anthocyan-Freisetzung (%)
$\left(\frac{F_{Peak}}{F_{STD}}\right)_t$	Verhältnis der Peakflächen von Anthocyan und Standard im Überstand zum Zeitpunkt t
$\left(\frac{F_{Peak}}{F_{STD}}\right)_{100}$	Verhältnis der Peakflächen von Anthocyan und Standard bei vollständiger Freisetzung (vgl. 4.3.8.5.7)
t	Inkubationszeit (0h; 0,5h; 1h; 2,h; 3h; 3,5h; 4h; 5h; 7h)
$\frac{20}{19}$	Korrekturfaktor zur Berücksichtigung der Verdünnung mit Standardlösung

4.3.9 Experimentelle Colitis im Tiermodell

4.3.9.1 Tiermodell

Für den Tierversuch zur Testung von mit Schellack gecoateten APK (P4BGwSch19) wurden 4 bis 6 Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse (Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich) mit einem Ausgangsgewicht von ca. 20 g verwendet. Die Tiere hatten Futter und Wasser *ad libitum*. Die Studien wurden durch die Ethikkommission genehmigt. Die Mäuse wurden mit normalem Mausfutter (Ssniff Spezialdiäten, Soest) gefüttert, das mit Schellack gecoatete APK (P4BGwSch19) bzw. das identische anthocyanfreie Placebomaterial (mit Schellack gecoatete Pektin-Kugeln P4GwSch19) in einem Anteil von 31 % enthielt.

Um eine gleichmäßige Aufnahme der Formulierungen zu gewährleisten, wurden die APK unter das normale Mausfutter gemischt und dieses anschließend pelletiert (Ssniff Spezialdiäten, Soest). Die Kontrollgruppe erhielt ausschließlich normales Mausfutter.

Zwei Wochen vor dem Beginn der experimentellen Colitis wurde mit der Diät begonnen und diese über die gesamte Dauer der Experimente weitergeführt. Die chronische Colitis wurde durch vier Zyklen mit 2,5 % DSS für sieben Tage, unterbrochen von je sieben Tagen Wasser induziert. Vier bis sechs Wochen nach dem letzten DSS-Zyklus manifestierte sich die chronische Colitis. Die Tiere wurden 4 Wochen nach der letzten DSS-Gabe durch CO₂-Vergasung getötet. Der Dickdarm und die mesenterialen Lymphknoten wurden entnommen und für histologische und funktionelle Untersuchungen präpariert.

4.3.9.2 Histologischer Score

Zur Beurteilung des histologischen Scores als Maß für den Entzündungsgrad wurde 1 cm des distalen Drittels des Colons jeder Maus entfernt, in Paraffin eingebettet, mit Mayer's Hämatoxylinlösung sowie Eosin gefärbt und verblindet bewertet. Jeder histologische Score repräsentiert den Mittelwert dreier Gewebeschnitte und setzt sich wie folgt zusammen:

Epithel: (E) 0: normale Morphologie, 1: Verlust einzelner Becherzellen, 2: Verlust von Becherzellen in großen Arealen, 3: Verlust von einzelnen Krypten, 4: Verlust von Krypten in großen Arealen

Infiltration: (I) 0: keine Infiltration, 1: geringe Infiltration um die Kryptenbasis, 2: Infiltrat reicht bis an die L. muscularis mucosae, 3: extensive Infiltration bis zur L. muscularis mucosae und Verdickung der Mukosa mit zahlreichen Ödemen, 4: Infiltration der Submukosa

Der Gesamtscore ergibt sich aus der Summe des Epithel- und des Infiltrations-scores.

4.3.9.3 Isolierung und Zytokin-Bestimmung der mesenterialen Lymphknoten

Mesenteriale Lymphknoten jeder Maus wurden in 10 mL kaltem Zellkultur-Medium (RPMI-1640) mit 10 % fötalem Kälberserum, 100 U/mL Penicillin, 100 µL/mL Streptomycin (PAA, Cölbe) überführt und mit einem Spitzenstempel gründlich zerdrückt. Die herausgelösten Zellen wurden durch Filtration durch ein Sieb (70 µm) vom Bindegewebe abgetrennt. Nach dem Zentrifugieren (600 x g, 15 min, 4°C) wurden die Zellen mit Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. 96 Well-Platten wurden mit 2,5 µg/Well monoclonalen anti-CD3 Antikörpern (bereitgestellt durch Prof. W. Falk, Uniklinikum Regensburg) beschichtet. 2 x 10⁵ Zellen/Well, resuspendiert in Zellkulturmedium, wurden unter sterilen Bedingungen ausgesät. Nach 24 h wurden die Überstände gesammelt. Die Sekretion von IFN γ (Pierce, Rockford, USA) wurde mittels ELISA bestimmt. Das Zytokin IL-6 wurde mittels Luminex-Technologie unter Verwendung des Luminex® mouse Milliplex™ Map Kit (Millipore, Schwalbach) ermittelt. Die Durchführung der Assays erfolgte nach den entsprechenden Protokollen der Hersteller.

4.3.9.4 Bestimmung des Anthocyangehalts im Mausfaeces

Mausfaeces wurde gesammelt, lyophilisiert und anschließend im Mörser zu einem feinen Pulver zerkleinert. Es wurden ca. 800 mg des feinzerkleinerten Probenmaterials in Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 5 mL 5 % Ameisensäure in Methanol (v/v) versetzt, am Vortexer gemischt und 5 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde zentrifugiert (2700 x g, 5 min) und der Überstand abpipettiert. Die Extraktion wurde 11-mal bis zum Verschwinden der Rotfärbung wiederholt. Alle Überstände wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 35°C schonend entfernt. Der Rückstand wurde quantitativ in einen 10 mL-Kolben überführt und mit 10 % Ameisensäure (v/v) zur Marke aufgefüllt. Nach Filtration (Rotalibo Spritzenfilter, PVPP, 0,45 µm, Roth, Karlsruhe) wurde die Lösung direkt mittels HPLC-System 1 (vgl. 4.2.1).

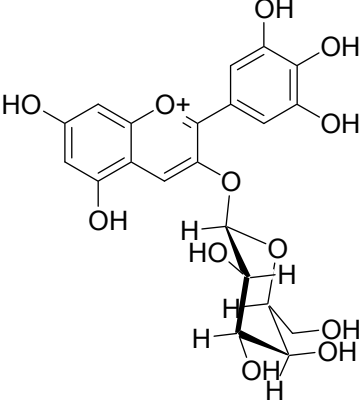
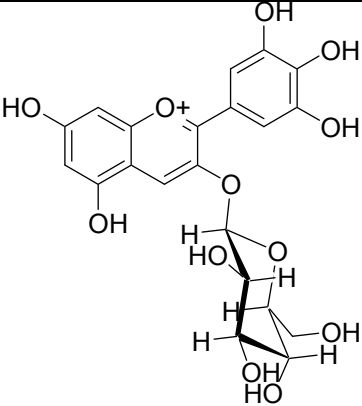
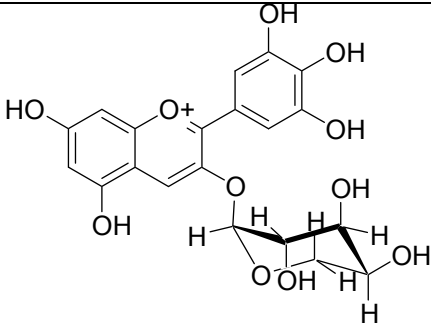
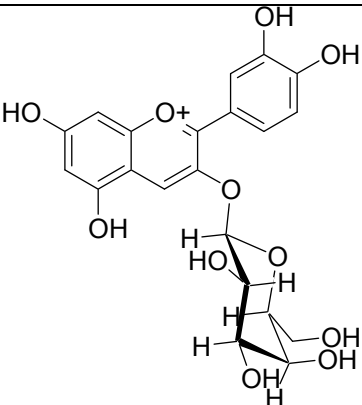
Die Identifizierung der enthaltenen Anthocyane wurde anhand des Vergleiches von Retentionszeiten mit authentischen Referenzsubstanzen durchgeführt. Zur Quantifizierung mittels HPLC-UV/Vis wurde das Absorptionssignal bei 520 nm verwendet. Die Auswertung der einzelnen Substanzen erfolgte anhand der entsprechenden Kalibriergeraden (vgl. 4.3.2.2.1).

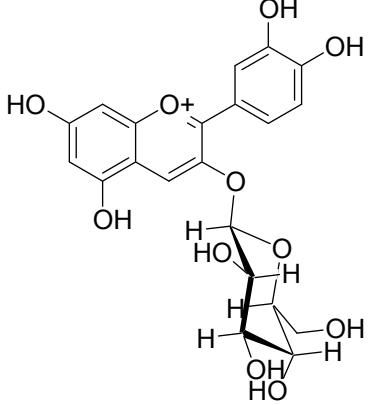
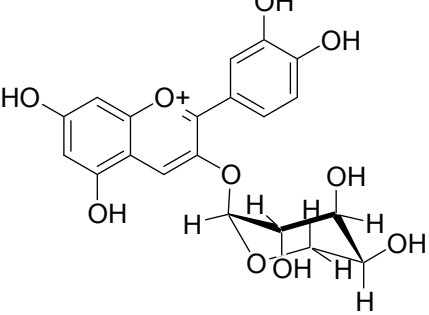
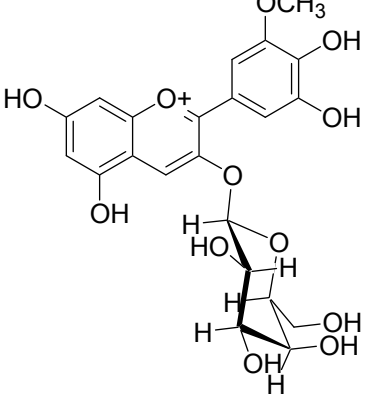
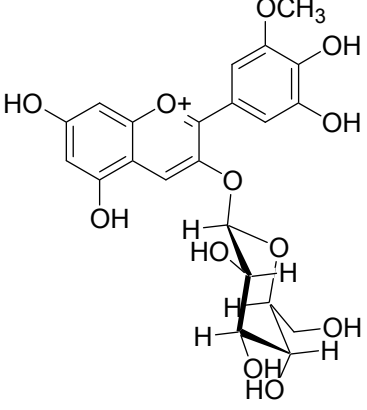
4.3.9.5 Statistische Auswertung

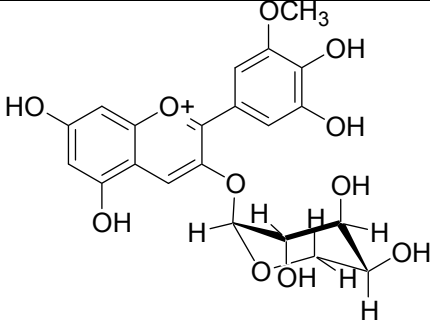
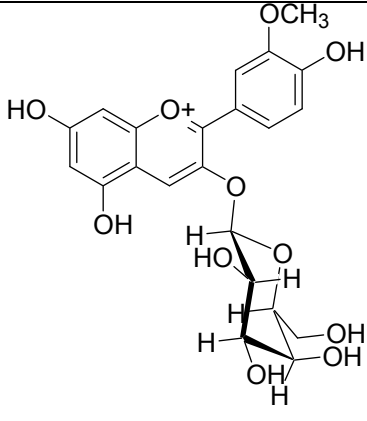
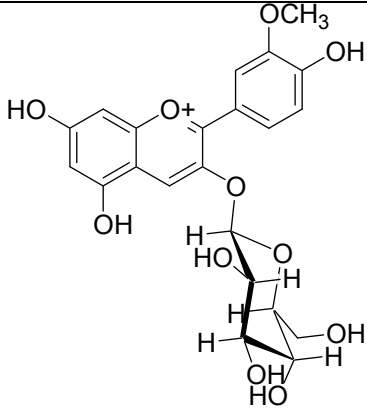
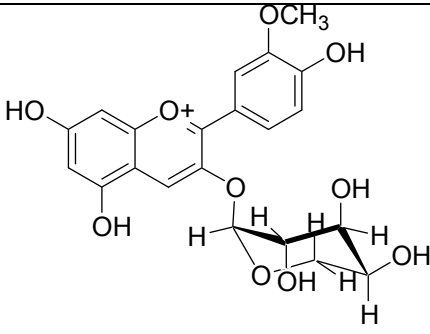
Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SigmaStat 3.0 Software. Verwendet wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test. Unterschiede wurden als signifikant definiert, wenn die Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war.

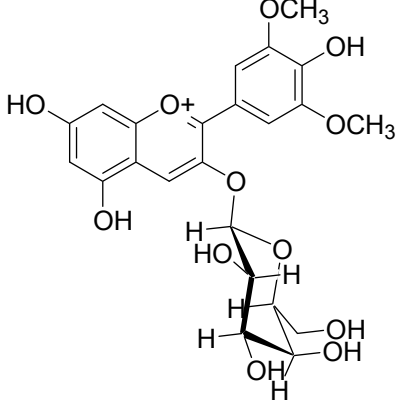
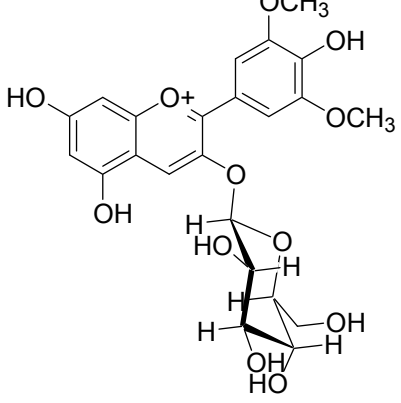
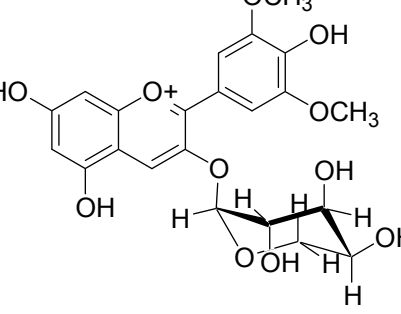
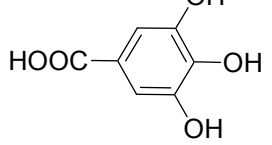
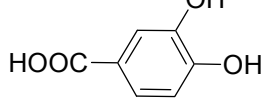
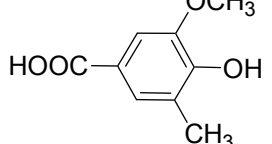
5 Strukturmatrix

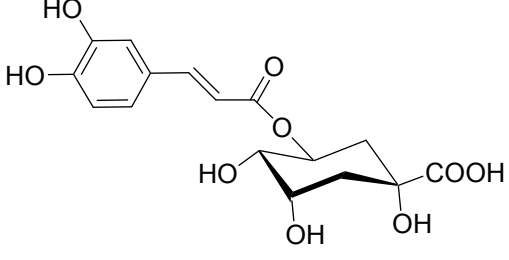
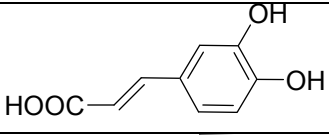
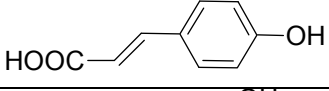
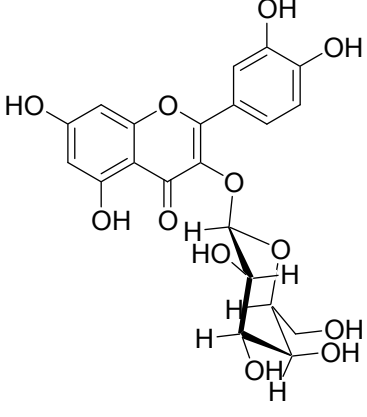
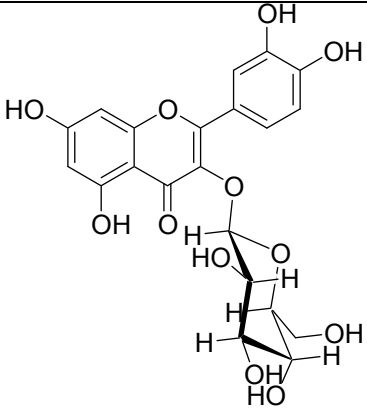
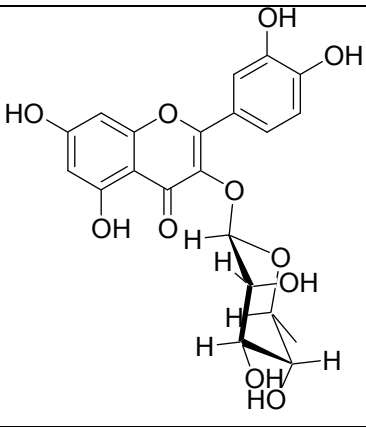
Strukturformeln ausgewählter Polyphenole, chronologisch geordnet nach Nennung im Text.

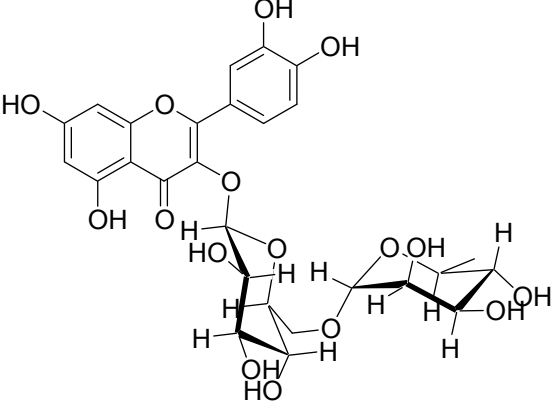
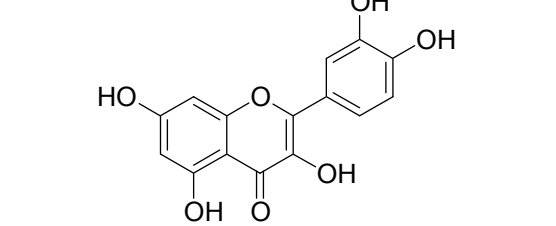
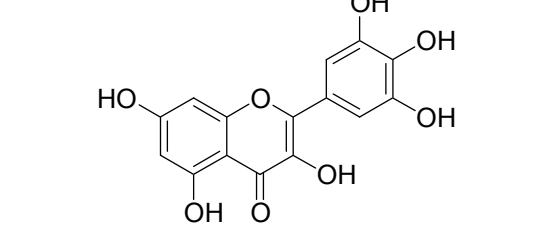
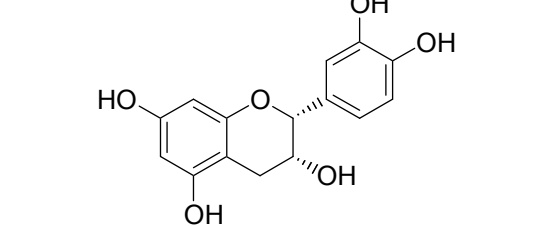
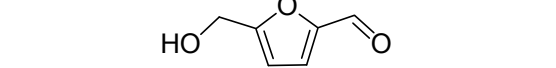
Nr.	Substanz	Struktur
(1)	Delphinidin-3-O-galactosid	 <p>The structure shows a delphinidin cation (a 3,4,5-trihydroxyflavylium ion) linked at the 3-position to a galactose molecule in its cyclic Haworth projection. The galactose has hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6.</p>
(2)	Delphinidin-3-O-glucosid	 <p>The structure shows a delphinidin cation linked at the 3-position to a glucose molecule in its cyclic Haworth projection. The glucose has hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6.</p>
(3)	Delphinidin-3-O-arabinosid	 <p>The structure shows a delphinidin cation linked at the 3-position to an arabinose molecule in its cyclic Haworth projection. The arabinose has hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C5.</p>
(4)	Cyanidin-3-O-galactosid	 <p>The structure shows a cyanidin cation (a 3,5-dihydroxyflavylium ion) linked at the 3-position to a galactose molecule in its cyclic Haworth projection. The galactose has hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6.</p>

(5)	Cyanidin-3-O-glucosid	 <p>The structure shows a cyanidin cation (a flavylium ion) with a glucose molecule attached to its 3-position. The glucose is in its cyclic pyranose form. The cyanidin core consists of a central oxygen atom with a positive charge, bonded to two benzene rings. One ring has hydroxyl groups at the 5 and 7 positions, and the other has hydroxyl groups at the 2 and 4 positions. The glucose is attached to the 3-position of the second ring.</p>
(6)	Cyanidin-3-O-arabinosid	 <p>The structure is similar to Cyanidin-3-O-glucosid, but the glucose is replaced by an arabinose molecule. The arabinose is in its cyclic furanose form.</p>
(7)	Petunidin-3-O-galactosid	 <p>The structure shows a petunidin cation (a flavylium ion) with a galactose molecule attached to its 3-position. The galactose is in its cyclic pyranose form. The petunidin core is similar to cyanidin but has a methoxy group (-OCH₃) at the 4-position of the second ring.</p>
(8)	Petunidin-3-O-glucosid	 <p>The structure is similar to Petunidin-3-O-galactosid, but the galactose is replaced by a glucose molecule. The glucose is in its cyclic pyranose form.</p>

(9)	Petunidin-3-O-arabinosid	 <p>The structure shows a central flavanone core (petunidin) with a positive charge on the oxygen atom. It is substituted with a 3-O-arabinopyranoside group at the 3-position. The arabinose sugar is in its pyranose form, with hydroxyl groups at C2, C3, and C4, and a methoxy group at C5. The petunidin core has hydroxyl groups at C5 and C7, and a methoxy group at C8.</p>
(10)	Peonidin-3-O-galactosid	 <p>The structure shows a central flavanone core (peonidin) with a positive charge on the oxygen atom. It is substituted with a 3-O-galactopyranoside group at the 3-position. The galactose sugar is in its pyranose form, with hydroxyl groups at C2, C3, and C6, and a methoxy group at C5. The peonidin core has hydroxyl groups at C5 and C7, and a methoxy group at C8.</p>
(11)	Peonidin-3-O-glucosid	 <p>The structure shows a central flavanone core (peonidin) with a positive charge on the oxygen atom. It is substituted with a 3-O-glucopyranoside group at the 3-position. The glucose sugar is in its pyranose form, with hydroxyl groups at C2, C3, and C6, and a methoxy group at C5. The peonidin core has hydroxyl groups at C5 and C7, and a methoxy group at C8.</p>
(12)	Peonidin-3-O-arabinosid	 <p>The structure shows a central flavanone core (peonidin) with a positive charge on the oxygen atom. It is substituted with a 3-O-arabinopyranoside group at the 3-position. The arabinose sugar is in its pyranose form, with hydroxyl groups at C2, C3, and C4, and a methoxy group at C5. The peonidin core has hydroxyl groups at C5 and C7, and a methoxy group at C8.</p>

(13)	Malvidin-3-O-galactosid	 <p>The structure shows a malvidin cation (a 3,5,7-trihydroxyflavylium ion) linked at the C3 position to a galactose molecule in its cyclic pyranose form. The galactose has hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6, and a hydroxymethyl group at C5.</p>
(14)	Malvidin-3-O-glucosid	 <p>The structure shows a malvidin cation linked at the C3 position to a glucose molecule in its cyclic pyranose form. The glucose has hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6, and a hydroxymethyl group at C5.</p>
(15)	Malvidin-3-O-arabinosid	 <p>The structure shows a malvidin cation linked at the C3 position to an arabinose molecule in its cyclic furanose form. The arabinose has hydroxyl groups at C2, C3, and C4, and a hydroxymethyl group at C5.</p>
(16)	Gallussäure	 <p>The structure is a benzene ring with a carboxylic acid group (-COOH) at position 1 and hydroxyl groups (-OH) at positions 2, 3, and 4.</p>
(17)	Protocatechusäure	 <p>The structure is a benzene ring with a carboxylic acid group (-COOH) at position 1 and hydroxyl groups (-OH) at positions 2 and 3.</p>
(18)	Syringasäure	 <p>The structure is a benzene ring with a carboxylic acid group (-COOH) at position 1, a hydroxyl group (-OH) at position 2, a methoxy group (-OCH₃) at position 3, and a methyl group (-CH₃) at position 4.</p>

(19)	Chlorogensäure	
(20)	Kaffeesäure	
(21)	<i>p</i> -Cumarsäure	
(22)	Quercetin-3-O-galactosid	
(23)	Quercetin-3-O-glucosid	
(24)	Quercetin-3-O-rhamnosid	

(25)	Quercetin-3-O-rutinosid	 <p>The structure shows a quercetin aglycone (a flavon-3-ol) with a rutinose disaccharide attached to the 3-OH group. The rutinose is composed of a glucose unit and a rhamnose unit linked by an alpha-1,6-glycosidic bond. The quercetin core has hydroxyl groups at positions 5, 7, and 3', and a 3,4-dihydroxyphenyl group at position 2'.</p>
(26)	Quercetin	 <p>The structure shows the quercetin aglycone, a flavon-3-ol with hydroxyl groups at positions 5, 7, and 3', and a 3,4-dihydroxyphenyl group at position 2'.</p>
(27)	Myricetin	 <p>The structure shows myricetin, a flavon-3-ol with hydroxyl groups at positions 5, 7, 3', and 4', and a 2,4,6-trihydroxyphenyl group at position 2'.</p>
(28)	(-)-Epicatechin	 <p>The structure shows (-)-epicatechin, a flavan-3-ol with hydroxyl groups at positions 5, 7, and 2', and a 3,4-dihydroxyphenyl group at position 2. The C2-C3 bond is in the trans configuration.</p>
(29)	HMF	 <p>The structure shows 5-hydroxymethylfurfural (HMF), a furan ring with a hydroxymethyl group at position 5 and an aldehyde group at position 2.</p>

6 Literatur

- Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I., Dewhirst, F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 5721-5732.
- Abby, K., Skrede, G., Wrolstad, R.E. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4032-4040.
- Adams, J.B. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glucosides of cyanidin I. In acidified aqueous solution at 100 °C. *J. Sci. Food Agric.* **1973**, *24*, 747-762.
- Adlercreutz, H. Lignans and human health. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2007**, *44*, 483-525.
- Afaq, F., Saleem, M., Krueger, C.G., Reed, J.D., Mukhtar, H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappa B pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *Int. J. Cancer.* **2005**, *113*, 423-433.
- Al-Farsi, M., Alasalvar, C., Morris, A., Baron, M., Shahidi, F. Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7592-7599.
- Alizyme, "COLAL-PRED ", 2010, <http://www.alizyme.co.uk/alizyme/products/colalpred> (Zugriff am 03.02.2010).
- Amarowicz, R., Carle, R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G., Piskula, M.K. Influence of post harvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*.
- Anderson, J.W., Smith, B.M., Gustafson, N.J. Health benefits and practical aspects of high-fiber diets. *Am. J. Clin. Nutr.* **1994**, *59*, S1242-S1247.
- Andreasen, M.F., Kroon, P.A., Williams, G., Garcia-Conesa, M.-T. Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*.
- Antonin, K.H., Saano, V., Bieck, P., Hastewell, J., Fox, R., Lowe, P., Mackay, M. Colonic absorption of human calcitonin in man. *Clin. Sci.* **1992**, *83*, 627-631.
- Aron, P.M., Kennedy, J.A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 79-104.
- Arts, I.H.C., van der Putte, B., Hollman, P.C.H. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods and processed foods. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1746-1751.
- Asami, D.K., Hong, Y.J., Barrett, D.M., Mitchell, A.E. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1237-1241.

- Asen, S., Stewart, R.N., Norris, K.H. Copigmentation of anthocyanins in plant-tissues and its effects on color. *Phytochemistry*. **1972**, *11*, 1139-1146.
- Ashford, M., Fell, J., Attwood, D. An in vivo investigation into the suitability of pH-dependent polymers for colonic targeting. *Int. J. Pharm.* **1993**, *95*, 193-199.
- Ashford, M., Fell, J., Attwood, D., Sharma, H., Woodhead, P. Studies on pectin formulations for colonic drug-delivery. *J. Control. Release*. **1994**, *30*, 225-232.
- Attoe, E.L., von Elbe, J.H. Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. *J. Food Sci.* **1981**, *46*, 1934-1137.
- Aura, A.M., Martin-Lopez, P., O'leary, K.A., Williamson, G., Oksman-Caldentey, K.M., Poutanen, K., Santos-Buelga, C. In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur. J. Nutr.* **2005**, *44*, 133-142.
- Autenrieth, I.B. Die Ökologie der humanen Darmflora: physiologische und pathophysiologische Aspekte. *J. Gastroenterol. Hepatol. Erkr.* **2003**, *1*, 14-17.
- Avila, M., Hidalgo, M., Sanchez-Moreno, C., Pelaez, C., Requena, T., de Pascual-Teresa, S. Bioconversion of anthocyanin glycosides by Bifidobacteria and Lactobacillus. *Food Res. Int.* **2009**, *42*, 1453-1461.
- Ayaz, F.A., Hayirlioglu-Ayaz, S., Gruz, J., Novak, O., Strnad, M. Separation, characterization, and quantitation of phenolic acids in a little-known blueberry (*Vaccinium arctostaphylos* L.) fruit by HPLC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8116-8122.
- Ayaz, F.A., Kadioglu, A., Acar, C., Turna, I. Effect of fruit maturation on sugar and organic acid composition in two blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* and *V. myrtillus*) native to Turkey. *N. Z. J. Crop. Hort.* **2001**, *29*, 137-141.
- Baj, A., Bombardelli, E., Gabetta, B., Martinelli, E.M. Qualitative and quantitative evaluation of *Vaccinium-myrtillus* anthocyanins by high-resolution gas-chromatography and high-performance liquid-chromatography. *J. Chromatogr.* **1983**, *279*, 365-372.
- Bakowska-Barczak, A.M., Kolodziejczyk, P. Evaluation of saskatoon berry (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) cultivars for their polyphenol content, antioxidant properties, and storage stability. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9933-9940.
- Begum, A.N., Nicolle, C., Mila, I., Lapierre, C., Nagano, K., Fukushima, K., Heinonen, S.M., Adlercreutz, H., Remesy, C., Scalbert, A. Dietary lignins are precursors of mammalian lignans in rats. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 120-127.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (Eds.), Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Berlin, Springer Verlag, 2008.
- Bellincontro, A., De Santis, D., Botondi, R., Villa, I., Mencarelli, F. Different postharvest dehydration rates affect quality characteristics and volatile compounds of Malvasia, Trebbiano and Sangiovese grapes for wine production. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 1791-1800.
- Bermudez-Soto, M.J., Tomas-Barberan, F.A., Garcia-Conesa, M.T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chem.* **2007**, *102*, 865-874.

- Berrin, J.G., McLauchlan, W.R., Needs, P., Williamson, G., Puigserver, A., Kroon, P.A., Juge, N. Functional expression of human liver cytosolic β -glucosidase in *Picia pastoris*. *FEBS J.* **2002**, *269*, 249-258.
- Blaschek, W., Ebel, S., Hackenthal, F., Holzgrabe, U., Keller, K., Reichling, J., Schulz, V. (Eds.), *Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*. Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 2006.
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G. New method for quantitative-determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **1973**, *54*, 484-489.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2003**, *54*, 519-546.
- Bonerz, D., Wurth, K., Dietrich, H., Will, F. Analytical characterization and the impact of ageing on anthocyanin composition and degradation in juices from five sour cherry cultivars. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *224*, 355-364.
- Borges, G., Roowi, S., Rouanet, J.M., Duthie, G.G., Lean, M.E.J., Crozier, A. The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 714-725.
- Bosetti, C., Bravi, F., Talamini, R., Parpinel, M., Gnagnarella, P., Negri, E., Montella, M., Lagiou, P., Franceschi, S., La Vecchia, C. Flavonoids and prostate cancer risk: A study in Italy. *Nutrition and Cancer - an International Journal.* **2006**, *56*, 123-127.
- Bourgeois, S., Gernet, M., Pradeau, D., Andremont, A., Fattal, E. Evaluation of critical formulation parameters influencing the bioactivity of β -lactamases entrapped in pectin beads. *Int. J. Pharm.* **2006**, *324*, 2-9.
- Bourgeois, S., Harveys, R., Fattal, E. Polymer colon drug delivery systems and their applications to peptides, proteins and nucleic acids. *American Journal of Drug Delivery.* **2005**, *3*, 171-204.
- Braccini, I., Pérez, S. Molecular basis for Ca^{2+} -induced gelation in alginates and pectins: The egg box model revisited. *Biomacromolecules.* **2001**, *2*, 1089-1096.
- Brand, W., van der Wel, A.I., Rein, M.J., Barron, d., Williamson, G., van Bladeren, P.J., Rietjens, M.C.M. Metabolism and transport of the citrus flavonoids hesperitin in caco-2 cell monolayers. *Drug Metab. Dispos.* **2008**, *36*, 1794-1802.
- Brandenberger, H.R., Widmer, F. A new multinozzle encapsulation/immobilisation system to produce uniform beads of alginate. *J. Biotechnol.* **1998**, *63*, 73-80.
- Brannon-Peppas, L. Recent advances on the use of biodegradable microparticles and nanoparticles in controlled drug-delivery. *Int. J. Pharm.* **1995**, *116*, 1-9.
- Brenneisen, R., Steinegger, E. Analysis of the polyphenols of fruits from *vaccinium myrtillus* L. (*Ericaceae*). *Pharm. Acta Helv.* **1981a**, *56*, 180-185.
- Brenneisen, R., Steinegger, E. Quantitative comparison of polyphenols in fruits of *vaccinium myrtillus* L. of various degrees of ripeness. *Pharm. Acta Helv.* **1981b**, *56*, 341-343.

- Brouillard, R. The chemistry of anthocyanin pigments. 7. Origin of the exceptional color stability of the zebrina anthocyanin. *Phytochemistry*. **1981**, *20*, 143-145.
- Brouillard, R. The in vivo expression of anthocyanins in color plants. *Phytochemistry*. **1983**, *22*, 1311-1323.
- Brouillard, R., Delaporte, B. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton-transfer, hydration and tautomerisation reactions of malvidin 3-glucoside. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8461-8468.
- Brouillard, R., Delaporte, B., Dubois, J.E. Chemistry of anthocyanin pigments. 3. Relaxation amplitudes in pH-jump experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 6202-6205.
- Brouillard, R., Dubois, J.E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1359-1364.
- Brouillard, R., Iacobucci, G.A., Sweeny, J.G. The chemistry of anthocyanin pigments. 9. UV-visible spectrophotometric detection of the acidity constants of apigenin and three related 3-deoxyflavylium salts. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7587-7590.
- Buch, K., Penning, M., Waechtersbach, E., Maskos, M., Langguth, P. Investigation of various shellac grades: additional analysis of identity. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**, *35*, 694-703.
- Cabrita, L., Fossen, F., Andersen, O.M. Colour and stability of the six common anthocyanidin-3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chem.* **2000**, *68*, 101-107.
- Camuesco, D., Comalada, M., Rodriguez-Cabezas, M.E., Nieto, A., Lorente, M.D., Concha, A., Zarzuelo, A., Galvez, J. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *143*, 908-918.
- Cao, G.H., Russell, R.M., Lischner, N., Prior, R.L. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 2383-2390.
- Castaneda-Ovando, A., Pacheco-Hernandes, L., Paez-Hernandes, E., Rodrigues, J.A., Galan-Vidal, C.A. Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chem.* **2009**, *113*, 859-871.
- Cemeroglu, B., Velioglu, S., Isik, S. Degradation kinetics of anthocyanins in sour cherry juice and concentrate. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 1216-1218.
- Cermak, R., Durazzo, A., Maiani, G., Böhm, V., Kammerer, D., Carle, R., Wiczowski, W., Piskula, M.K., Galensa, R. The influence of postharvest processing and storage of foodstuff on the bioavailability of flavonoids and phenolic acids. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*.
- Champagne, C.P., Fustier, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 184-190.

- Chan, W.A., Boswell, C.D., Zhang, Z. Comparison of the release profiles of a water soluble drug carried by Eudragit-coated capsules in different in-vitro dissolution liquids. *Powder Technol.* **2001**, *119*, 26-32.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., Jones, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions. *J. Microbiol. Methods.* **2004**, *56*, 27-35.
- Cheminant, A., Brouillard, R. PMR investigation of 3-O-(β -D-glucosyl)malvidin structural transformations in aqueous solutions. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4457-4460.
- Chen, C.H., Hsu, H.J., Huang, Y.J., Lin, C.J. Interaction of flavonoids and intestinal facilitated glucose transporters. *Planta Med.* **2007**, *73*, 348-354.
- Chen, L., Subirade, M. Elaboration and characterization of soy/zein protein microspheres for controlled nutraceutical delivery. *Biomacromolecules.* **2009**, *10*.
- Chen, P.N., Chu, S.C., Chiou, H.L., Chiang, C.L., Yang, S.F., Hsieh, Y.S. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. *Nutrition and Cancer - an International Journal.* **2005**, *53*, 232-243.
- Cheng, X.X., Turton, R. The prediction of variability occurring in fluidized bed coating equipment. I. The measurement of particle circulation rates in a bottom-spray fluidized bed coater. *Pharm. Dev. Technol.* **2000**, *5*, 311-322.
- Cho, M.J., Howard, L., Prior, R.L., Clark, J.R. Flavonoid glycosides and antioxidant capacity of various blackberry, blueberry and red grape genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 1771-1782.
- Chourasia, M.K., Jain, S.K. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2003**, *6*, 33-66.
- Christensen, F.N., Bertelsen, P. Qualitative description of the Wurster-based fluid-bed coating process. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1997**, *23*, 451-463.
- Ciftci, K. Alternative approaches to the treatment of colon cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1996**, *42*, 160-170.
- Clifford, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 362-372.
- Clifford, M.N. Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **2000**, *80*, 1063-1072.
- Cole, G., Hogan, J., Aulton, M. (Eds.), Pharmaceutical coating technology. London, Taylor and Francis, 1995.
- Cooke, D., Schwarz, M., Boocock, C., Winterhalter, P., Steward, W.P., Gescher, A.J., Marczylo, T.H. Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the Apc^{min} mouse model of intestinal carcinogenesis - Relationship with tissue anthocyanin level. *Int. J. Cancer.* **2006**, *119*, 2213-2220.

- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., Remesy, C. Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 2109-2114.
- Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., Remesy, C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 618-621.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1001-1043.
- Cummings, J.H., Southgate, D.A.T., Branch, W.J., Wiggins, H.S., Houston, H., Jenkins, D.J.A., Jivraj, T., Hill, M.J. Digestion of pectin in the human gut and its effect on calcium-absorption and large bowel function. *Br. J. Nutr.* **1979**, *41*, 477-485.
- Daayf, F., Lattanzio, V. (Eds.), Recent advances in polyphenol research, Wiley-Blackwell, 2006.
- Dangles, O., Saito, N., Brouillard, R. Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry*. **1993**, *34*, 119-124.
- Day, A.J., Canada, F.J., Diaz, J.C., Kroon, P.A., McLauchlan, W.R., Faulds, C.B., Plaumb, G.W., Morgan, M.R.A., Williamson, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of phlorizin hydrolase. *FEBS Letter.* **2000**, *468*, 166-170.
- de Ancos, B., Ibanez, E., Reglero, G., Cano, M.P. Frozen storage effects on anthocyanins and volatile compounds of raspberry fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 873-879.
- Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R., Paredes-Lopez, O. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**, *40*, 173-289.
- DeMedina, F.S., Galvez, J., Romero, J.A., Zarzuelo, A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *278*, 771-779.
- DeVries, J.W. On defining dietary fiber. *Proc. Nutr. Soc.* **2003**, *62*, 37-43.
- Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), Plant Biochemistry. London, Academic Press, 1997.
- Dixit, R., Puthli, S. Fluidization Technologies: Aerodynamic Principles and Process Engineering. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 3933-3960.
- Dongowski, G., Lorenz, A., Anger, H. Degradation of pectins with different degrees of esterification by *Bacteroides thetaiotaomicron* isolated from human gut flora. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 1321-1327.
- Donovan, J.L., Crespy, V., Manach, C., Morand, C., Besson, C., Scalbert, A., Remesy, C. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 1753-1757.
- Dreiseitel, A., Oosterhuis, B., Vukman, K.V., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Hajak, G., Sand, P.G. Berry anthocyanins and anthocyanidins exhibit distinct

- affinities for the efflux transporters BCRP and MDR1. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *158*, 1942-1950.
- Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Rogler, G., Piberger, H., Hajak, G., Sand, P.G. Inhibition of proteasome activity by anthocyanins and anthocyanidins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *372*, 57-61.
- Dupuis, G., Chambin, O., Genelot, C., Champion, D., Pourcelot, Y. Colonic drug delivery: Influence of cross-linking agent on pectin beads properties and role of the shell capsule type. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2006**, *32*, 847-855.
- Elisia, I., Kitts, D.D. Anthocyanins inhibit peroxy radical-induced apoptosis in Caco-2 cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2008**, *312*, 139-145.
- Elson, C.O., Sartor, R.B., Tennyson, G.S., Riddell, R.H. Experimental-models of inflammatory bowel-disease. *Gastroenterology.* **1995**, *109*, 1344-1367.
- Englyst, H.N., Cummings, J.H. Improved method for measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists.* **1988**, *71*, 808-814.
- Escribano-Bailon, M.T., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C. Anthocyanins in cereals. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1054*, 129-141.
- Falany, C.N. Sulfation and sulfotransferases. 3. Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J.* **1997**, *11*, 206-216.
- Fallingborg, J. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Dan. Med. Bull.* **1999**, *46*, 183-196.
- Faria, A., Pestana, D., Azevedo, J., Martel, F., de Freitas, V., Azevedo, I., Mateus, N., Calhau, C. Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells - Putative involvement of GLUT2. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 1430-1437.
- Felgines, C., Talavera, S., Gonthier, M.P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J.L., Remesy, C. Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1296-1301.
- Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Vitaglione, P., Lamaison, J.L., Fogliano, V., Scalbert, A., Vanella, L., Galvano, F. Influence of glucose on cyanidin 3-glucoside absorption in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 959-964.
- Ferreira, D., Guyot, S., Marnet, N., Delgadillo, I., Renard, C., Coimbra, M.A. Composition of phenolic compounds in a Portuguese pear (*Pyrus communis* L. var. S. Bartolomeu) and changes after sun-drying. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4537-4544.
- Fiedler, H.P. (Ed.) Lexikon der Hilfsstoffe. Aulendorf, Ed. Cantor, 2002.
- Figueiredo, P., Elhabiri, M., Toki, K., Saito, N., Dangles, O., Brouillard, R. New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry.* **1996**, *41*, 301-308.
- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., Kulling, S.E. Stability and biotransformations of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur. J. Nutr.* **2006**, *45*, 7-18.

- Foo, L.Y., Lu, Y.R., Howell, A.B., Vorsa, N. A-type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1225-1228.
- Foo, L.Y., Porter, L.J. The structure of tannins of some edible fruits. *J. Sci. Food Agric.* **1981**, *32*, 711-716.
- Forester, S.C., Waterhouse, A.L. Identification of Cabernet Sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9299-9304.
- Förmer, P., Theurer, C., Müller, A., Schmidt, P.C. Visualization and analysis of the release mechanism of shellac coated ascorbic acid pellets. *Pharmazie.* **2006**, *61*, 1005-1008.
- Frank, K., Schuchmann, H.P. Verkapselung von Anthocyanen in submikronen Emulsionstropfen: Wechselwirkungen zwischen bioaktiven Inhaltsstoffen und Hilfsstoffen der Formulierung. *Chem. Ing. Tech.* **2009**, *81*, 1164-1165.
- Franke, W. (Ed.) Nutzpflanzenkunde. Stuttgart, Thieme Verlag, 1997.
- Frankel, E.N., Bosanek, C.A., Meyer, A.S., Silliman, K., Kirk, L.L. Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 834-838.
- Freire, C., Podczek, F., Ferreira, D., Veiga, F., Sousa, J., Pena, A. Assessment of the in-vivo drug release from pellets film-coated with a dispersion of high amylose starch and ethylcellulose for potential colon delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *62*, 55-61.
- Friess, W. Collagen - biomaterial for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1998**, *45*, 113-136.
- Gao, L., Mazza, G. Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics in blueberries. *J. Food Sci.* **1994**, *59*, 1057-1059.
- Garrone, R., Huc, A., Junqua, S. Fine-structure and physicochemical studies on collagen of marine sponge *chondrosia-reniformis* nardo. *J. Ultrastruct. Res.* **1975**, *52*, 261-275.
- Gaudio, E., Taddei, G., Vetuschi, A., Sferra, R., Frieri, G., Ricciardi, G., Caprilli, R. Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats - Clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig. Dis. Sci.* **1999**, *44*, 1458-1475.
- Giusti, M.M., Rodriguez-Saona, L.E., Wrolstad, R.E. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4631-4637.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. Acylated antocyanins from edible sources and their application in food systems. *Biochemical Engineering Journal.* **2003**, *14*, 217-225.
- Glavez, J., Rodrigues-Cabezas, M.E., Zarzuelo, A. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 601-608.

- Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Najman, K., Drzewieck, J., Cvikrova, M., Martincova, O., Katrich, E., Trakhtenberg, S. Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4418-4426.
- Goto, T., Kondo, T. Structure and molecular stacking of anthocyanins - flower color variation. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 17-33.
- Graff, J., Brinch, K., Madsen, J.L. Gastrointestinal mean transit times in young and middle-age healthy subjects. *Clin. Physiol.* **2000**, *21*, 253-259.
- Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letter.* **1973**, *32*, 195-198.
- Gu, L.W., Kelm, M., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Cunningham, D., Vannozzi, S., Prior, R.L. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4852-4860.
- Gu, L.W., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R.L. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 613-617.
- Guignon, B., Duquenoy, A., Dumoulin, E.D. Fluid bed encapsulation of particles: Principles and practice. *Drying Technol.* **2002**, *20*, 419-447.
- Guyot, S., Marnet, N., Sanoner, P., Drilleau, J.F., Flavonoids and Other Polyphenols. Direct thiolysis on crude apple materials for high-performance liquid chromatography characterization and quantification of polyphenols in cider apple tissues and juices. San Diego, Academic Press Inc, 2001.
- Haas, P.A. Formation of uniform liquide drops by application of vibration to laminar jets. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1993**, *31*, 959-967.
- Hagiwara, A., Mayashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridine (PhIP) associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.* **2001**, *171*, 17-25.
- Hagiwara, A., Yoshino, H., Ichihara, T., Kawabe, M., Tamano, S., Aoki, H., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T. Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *J. Toxicol. Sci.* **2002**, *27*, 57-68.
- Harper, K.A. Structural changes of flavylum salts. *Aust. J. Chem.* **1968**, *21*, 221-227.
- Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. *Nutr. Res.* **2008**, *28*, 198-207.

- He, J., Magnuson, A.B., Giusti, M.M. Analysis of anthocyanins in rat Intestinal contents - impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2858-2866.
- He, J., Wallace, T.C., Keatley, K.E., Failla, M.L., Giusti, M.M. Stability of black raspberry anthocyanins in the digestive tract lumen and transport efficiency into gastric and small intestinal tissues in the rat. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3141-3148.
- Hebden, J., Wilson, C., RC, S. Regional differences in quinine absorption from the undisturbed human colon assessed using a time release delivery system. *Pharma. Res.* **1999**, *16*, 1087-1092.
- Hegi, G. (Ed.) *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*. München, Carl Hauser Verlag, 1957/58.
- Heinemann, S., Ehrlich, H., Douglas, T., Heinemann, C., Worch, H., Schatton, W., Hanke, T. Ultrastructural studies on the collagen of the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo. *Biomacromolecules.* **2007**, *8*, 3452-3457.
- Heinonen, I.M., Meyer, A.S., Frankel, E.N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 4107-4112.
- Heinonen, M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics - a Finnish perspective. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 684-691.
- Hellstrom, J.K., Mattila, P.H. HPLC determination of extractable and unextractable proanthocyanidins in plant materials. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7617-7624.
- Hilz, H., Bakx, E.J., Schols, H.A., Voragen, A.G.J. Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries - characterisation in berries, juice, and press cake. *Carbohydr. Polym.* **2005**, *59*, 477-488.
- Hollands, W., Brett, G.M., Dainty, J.R., Teucher, B., Kroon, P.A. Urinary excretion of strawberry anthocyanins is dose dependent for physiological oral doses of fresh fruit. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 1097-1105.
- Hoshino, T. Anthocyanin self-aggregates. 6. An approximate estimate of self-association constants and the self-stacking of conformation of malvin quinonoidal bases studied by H-2-NMR. *Phytochemistry.* **1991**, *30*, 2049-2055.
- Hoshino, T. Anthocyanin self-aggregates. 7. Self-association of flavylum cations of anthocyanidin 3,5-diglucosides studied by circular-dichroism and 1-H-NMR. *Phytochemistry.* **1992**, *31*, 647-653.
- Hoshino, T., Matsumoto, U., Goto, T. Evidences of the self-association of anthocyanins. 1. Circular-dichroism of cyanin anhydrobase. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1751-1754.
- Hoshino, T., Matsumoto, U., Goto, T. Evidence for the self-association of anthocyanins. 2. Self-association of some anthocyanins in neutral aqueous solution. *Phytochemistry.* **1981**, *20*, 1971-1976.

- Hoshino, T., Matsumoto, U., Goto, T., Harada, N. Evidence for the self-association of anthocyanins. 4. PMR spectroscopic evidence for the vertical stacking of anthocyanin molecules. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 433-436.
- Hotamisligil, G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* **2006**, 444, 860-867.
- Hou, D.X., Yanagita, T., Uto, T., Masuzaki, S., Fujii, M. Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: Structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, 70, 417-425.
- Houbiers, C., Lima, J.C., Macanita, A.L., Santos, H. Color stabilization of malvidin 3-glucoside: Self-aggregation of the flavylum cation and copigmentation with the Z-chalcone form. *J. Phys. Chem. B.* **1998**, 102, 3578-3585.
- Hrazdina, G. Reactions of anthocyanidin-3,5-diglucosides - formation of 3,5-di-(O-beta-glucosyl)-7-hydroxy coumarin. *Phytochemistry.* **1971**, 10, 1125-&.
- Hrazdina, G., Borzell, A.J., Robinson, W.B. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides. *Am. J. Enol. Vitic.* **1970**, 21, 201-204.
- Huber, R., von Ditfurth, A., Amann, F., Güthlin, c., Rostock, M., Trittler, R., Kümmerer, K., Merfort, I. Tormentil for active ulcerative colitis. *J. Clin. Gastroenterol.* **2007**, 41, 834-838.
- Hulst, A.C., Tramper, J., van't Riet, K., Westerbeek, J.M.M. A new technique for the production of immobilized biocatalyst in large quantities. *Biotechnol. Bioeng.* **1985**, 17, 870-876.
- Hümmer, W. Analyse potentiell chemopräventiv wirksamer Inhaltsstoffe von Apfelsaft. Dissertation, Universität Würzburg, 2009.
- Husoy, T., Haugen, M., Murkovic, M., Jobstl, D., Stolen, L.H., Bjellaas, T., Ronningborg, C., Glatt, H., Alexander, J. Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, 46, 3697-3702.
- Ichianagi, T., Rahman, M.M., Kashiwada, Y., Ikeshiro, Y., Shida, Y., Hatano, Y., Matsumoto, H., Hirayama, M., Tsuda, T., Konishi, T. Absorption and metabolism of delphinidin 3-O-beta-D-glucopyranoside in rats. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, 36, 930-937.
- Ichianagi, T., Shida, Y., Rahman, M.M., Sekiya, M., Hatano, Y., Matsumoto, H., Hirayama, M., Konishi, T., Ikeshiro, Y. Effect on both aglycone and sugar moiety towards phase II metabolism of anthocyanins. *Food Chem.* **2008**, 110, 493-500.
- Imhoff, J.M., Garrone, R. Solubilization and characterization of chondrosia-reniformis sponge collagen. *Connect. Tissue Res.* **1983**, 11, 193-197.
- Iyer, C., Kailasapathy, K., Peiris, P. Evaluation of survival and release of encapsulated bacteria in ex vivo porcine gastrointestinal contents using a green fluorescent protein gene-labelled E-coli. *Food Sci. Technol.* **2004**, 37, 639-642.

- Jorgensen, J.R., Fitch, M.D., Mortensen, P.B., Fleming, S.E. In vivo absorption of medium-chain fatty acids by the rat colon exceeds that of short-chain fatty acids. *Gastroenterology*. **2001**, *120*, 1152-1161.
- Jurd, L. Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments. *Advances in Food research, Supplement 3. The chemistry of plant pigments*. **1972**, 123-142.
- Kader, F., Haluk, J.P., Nicolas, J.P., Metche, M. Degradation of cyanidin 3-glucoside by blueberry polyphenol oxidase: Kinetic studies and mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3060-3065.
- Kader, F., Nicolas, J.P., Metche, M. Degradation of pelargonidin 3-glucoside in the presence of chlorogenic acid and blueberry polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 517-522.
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M., Metche, M. Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L). Partial purification and characterisation of blueberry polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* **1997a**, *73*, 513-516.
- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M., Metche, M. Mechanism of browning in fresh highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L). Role of blueberry polyphenol oxidase, chlorogenic acid and anthocyanins. *J. Sci. Food Agric.* **1997b**, *74*, 31-34.
- Kähkönen, M.P., Heinämäki, J., Ollilainen, V., Heinonen, M. Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 1403-1411.
- Kähkönen, M.P., Hopia, A.I., Heinonen, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4076-4082.
- Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., Ackermann, M., Ridder, F., Richling, E. Studies on apple and blueberry fruit constituents: Do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 418-423.
- Kalt, W., McDonald, J.E. Chemical composition of lowbush blueberry cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **1996**, *121*, 142-146.
- Kammerer, D., Carle, R., Schieber, A. Quantification of anthocyanin in black carrot extracts (*Daucus carota* ssp sativus var. atrorubens Alef.) and evaluation of their colour properties. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219*, 479-486.
- Kang, S.Y., Seeram, N.P., Nair, M.G., Bourquin, L.D. Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Lett.* **2003**, *194*, 13-19.
- Kangatharalingam, N., Pierce, M.L., Bayles, M.B., Essenberg, M. Epidermal anthocyanin production as an indicator of bacterial blight resistance in cotton. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2002**, *61*, 189-195.
- Kararli, T.T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology and biochemistry of humans and commonly used laboratory-animals. *Biopharm. Drug Dispos.* **1995**, *16*, 351-380.

- Karawajczyk, A., Dran, V., Medic, N., Oboh, G., Passamonti, S., Novic, M. Properties of flavonoids influencing the binding to bilitranslocase investigated by neural network modelling. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *73*, 308-320.
- Kay, C.D. Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutr. Res. Rev.* **2006**, *19*, 137-146.
- Kay, C.D., Kroon, P.A., Cassidy, A. The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, S92-S101.
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 268-274.
- Keppler, K., Humpf, H.U. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5195-5205.
- Kern, S.M., Bennett, R.N., Needs, P.W., Mellon, F.A., Kroon, P.A., Garcia-Conesa, M.-T. Characterization of metabolites of hydroxycinnamates in the in vitro model of human small intestinal epithelium caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7884-7891.
- Kim, D.O., Heo, H.J., Kim, Y.J., Yang, H.S., Lee, C.Y. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9921-9927.
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* **2004**, *96*, 229-245.
- Kirca, A., Cemeroglu, B. Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chem.* **2003**, *81*, 583-587.
- Kirca, A., Ozkan, M., Cemeroglu, B. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chem.* **2007**, *101*, 212-218.
- Knaup, B. In vitro- und ex vivo-Studien zum humanen intestinalen Metabolismus und zu Lipoxygenase-hemmenden Eigenschaften ausgewählter sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe. Dissertation, Universität Würzburg, 2008.
- Knaup, B., Kahle, K., Erk, T., Valotis, A., Schreier, P., Richling, E. Human intestinal hydrolysis of phenol glycosides - a study with quercetin and p-nitrophenol glycosides using ileostomy fluid. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 1423-1429.
- Knaup, B., Kempf, M., Fuchs, J., Valotis, A., Kahle, K., Oehme, A., Richling, E., Schreier, P. Model experiments mimicking the human intestinal transit and metabolism of D-galacturonic acid and amidated pectin. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 840-848.
- Knaup, B., Oehme, A., Valotis, A., Schreier, P. Anthocyanins as lipoxygenase inhibitors. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 617-624.
- Kobayashi, S., Konishi, Y. Transepithelial transport of flavanone in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *368*, 23-29.

- Kondo, T., Yoshida, K., Nakagawa, A., Kawai, T., Tamura, H., Goto, T. Structural basis of blue-color development in flower petals from commelina-communis. *Nature*. **1992**, 358, 515-518.
- Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. **2003**, 64, 923-933.
- Konishi, Y., Zhao, Z.H., Shimizu, M. Phenolic acids are absorbed from the rat stomach with different absorption rates. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 7539-7543.
- Koponen, J.M., M, H.A., S, A., Kontakanen, H., Buchert, J., S, P.K., R, T.A. Characterization and fate of black currant and bilberry flavonols in enzyme-aided processing. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 3136-3144.
- Kosaraju, S.L. Colon targeted delivery systems: Review of polysaccharides for encapsulation and delivery. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, 45, 251-258.
- Köster, U. Massenbilanzierung einer Wirbelschichtgranulierung. Dissertation, Universität Würzburg, 2001.
- Kotra, G., Daniel, H. Flavonoid glycosides are not transported by the human Na⁺/Glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but efficiently inhibit electrogenic glucose uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, 322, 829-835.
- Kraus, M. Synthese von ¹⁴C-markierten Anthocyanidinen und Studien zur intestinalen Verfügbarkeit von Anthocyanen aus Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.). Dissertation, Universität Würzburg, 2006.
- Kroh, L.W. Caramelisation in food and beverages. *Food Chem.* **1994**, 51, 373-379.
- Lafay, S., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Scalbert, A. Absorption and metabolism of caffeic acid and chlorogenic acid in the small intestine of rats. *Br. J. Nutr.* **2006**, 96, 39-46.
- Lakkis, J.M. (Ed.) Encapsulation and controlled release technologies in food systems. Oxford, Blackwell Publishing Ltd., 2007.
- Lätti, A.K., Kainulainen, P.S., Hayirlioglu-Ayaz, S., Ayaz, F.A., Riihinen, K.R. Characterization of Anthocyanins in Caucasian Blueberries (*Vaccinium arctostaphylos* L.) Native to Turkey. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 5244-5249.
- Lätti, A.K., Riihinen, K.R., Kainulainen, P.S. Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 190-196.
- Ledl, F., Schleicher, E. New aspects of the maillard reaction in foods and in the human body. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 565-594.
- Leitao, D.P.S., Polizello, A.C.M., Ito, I.Y., Spadaro, A.C.C. Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. *J. Med. Food.* **2005**, 8, 36-40.
- Lewis, N.G., Yamamoto, E. Lignin - occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1990**, 41, 455-496.

- Limmatvapirat, S., Nunthanid, J., Luangtana-anan, M., Puttipipatkachorn, S. Effect of alkali treatment on properties of native shellac and stability of hydrolyzed shellac. *Pharm. Dev. Technol.* **2005**, *10*, 41-46.
- Lin, J.K., Lin, C.L., Liang, Y.C., Lin-Shiau, S.Y., Juan, I.M. Survey of catechins, gallic acid, and methylxanthines in green, oolong, pu-erh, and black teas. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3635-3642.
- Lin, Y.K., Liu, D.C. Comparison of physical-chemical properties of type I collagen from different species. *Food Chem.* **2006**, *99*, 244-251.
- Link, K.C., Schlunder, E.U. Fluidized bed spray granulation - Investigation of the coating process on a single sphere. *Chem. Eng. Process.* **1997**, *36*, 443-457.
- Liu, L., Fishman, M.L., Kost, J., Hicks, K.B. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials.* **2003**, *24*, 3333-3343.
- Liu, L.S., Fishman, M.L., Hicks, K.B., Kende, M., Ruthel, G. Pectin/zein beads for potential colon-specific drug delivery: Synthesis and in vitro evaluation. *Drug Deliv.* **2006**, *13*, 417-423.
- Loeb, H., Vandenplas, Y., Wursch, P., Guesry, P. Tannin-rich carob pod for the treatment of acute-onset diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1989**, *8*, 480-485.
- Löffler, G., Petrides, P.E., Heinrich, P.C. (Eds.), *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Springer Verlag, 2007.
- Lohachoopol, V., Szrednicki, G., Craske, J. The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, 248-252.
- Lootens, D., Capel, F., Durand, D., Nicolai, T., Boulenguer, P., Langendorff, V. Influence of pH, Ca concentration, temperature and amidation on the gelation of low methoxyl pectin. *Food Hydrocolloids.* **2003**, *17*, 237-244.
- Maa, Y.F., Nguyen, P.A., Hsu, C.C. Spray-coating of rhDNase on lactose: Effect of system design, operational parameters and protein formulation. *Int. J. Pharm.* **1996**, *144*, 47-59.
- Määttä-Riihinen, K.R., Kahkonen, M.P., Torronen, A.R., Heinonen, I.M. Catechins and procyanidins in berries of *Vaccinium* species and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8485-8491.
- Määttä-Riihinen, K.R., Kamal-Eldin, A., Mattila, P.H., Gonzalez-Paramas, A.M., Törrönen, A.R. Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4477-4486.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S. Flavour encapsulation and controlled release - a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2006**, *41*, 1-21.
- Maestrelli, F., Cirri, M., Corti, G., Mennini, N., Mura, P. Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *69*, 508-518.

- Maestro, A., Terdoslavich, M., Vanzo, A., Kuku, A., Tramer, F., Nicolin, V., Micali, F., Decorti, G., Passamonti, S. Expression of bilitranslocase in the vascular endothelium and its function as a flavonoid transporter. *Cardiovasc. Res.* **2010**, *85*, 175-183.
- Malien-Aubert, C., Dangles, O., Amiot, M.J. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 170-176.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 230S-242S.
- Markham, K.R., Gould, K.S., Winefield, C.S., Mitchell, K.A., Bloor, S.J., Boase, M.R. Anthocyanic vacuolar inclusions - their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry.* **2000**, *55*, 327-336.
- Marlett, J.A. Content and composition of dietary fiber in 117 frequently consumed foods. *J. Am. Diet. Assoc.* **1992**, *92*, 175-186.
- Marlett, J.A., Vollendorf, N.W. Dietary fiber content and composition of different forms of fruits. *Food Chem.* **1994**, *51*, 39-44.
- Matissek, R., Steiner, G., Lebensmittelanalytik. Berlin, Springer Verlag, 2006.
- Mazza, G., Brouillard, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem.* **1987**, *25*, 207-225.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., Ewert, B. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4009-4017.
- Mazza, G., Kay, C.D. Bioactivity, absorption and metabolism of anthocyanins. *Recent advances in polyphenol research.* **2008**, *1*, 228-262.
- Mazza, G., Kay, C.D., Cottrell, T., Holub, B.J. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7731-7737.
- Mazza, G., Miniati, E. (Eds.), Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Boca Raton, CRC Press, 1993.
- McConnell, E.L., Basit, A.W., Murdan, S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J. Pharm. Pharmacol.* **2008a**, *60*, 63-70.
- McConnell, E.L., Short, M.D., Basit, A.W. An *in vivo* comparison of intestinal pH and bacteria as physiological trigger mechanisms for colonic targeting in man. *J. Control. Release.* **2008b**, *130*, 154-160.

- McDougall, G.J., Dobson, P., Smith, P., Blake, A., Stewart, D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *J. Agric. Food Chem.* **2005a**, 53, 5896-5904.
- McDougall, G.J., Fyffe, S., Dobson, P., Stewart, D. Anthocyanins from red wine - Their stability under simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry.* **2005b**, 66, 2540-2548.
- McDougall, G.J., Fyffe, S., Dobson, P., Stewart, D. Anthocyanins from red cabbage - stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry.* **2007**, 68, 1285-1294.
- McGhie, T.K., Walton, M.C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, 51, 702-713.
- Meissner, Y., Lamprecht, A. Alternative drug delivery approaches for the therapy of inflammatory bowel disease. *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 2878-2891.
- Merken, H.M., Beecher, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 577-599.
- Michalczyk, M., Macura, R., Matuszak, I. The effect of air-drying, freeze-drying and storage on the quality and antioxidant activity of some selected berries. *J. Food Process. Preserv.* **2009**, 33, 11-21.
- Milbury, P.E., Cao, G.H., Prior, R.L., Blumberg, J. Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mech. Ageing Dev.* **2002**, 123, 997-1006.
- Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., Someya, K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1083-1091.
- Mohamed, F., van der Walle, C.F. Engineering biodegradable polyester particles with specific drug targeting and drug release properties. *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 71-87.
- Molan, A.L., Lila, M.A., Mawson, J., De, S. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the prebiotic activity of water-soluble blueberry extracts. *World J. Microbiol. Biotechnolgy.* **2009**, 25, 1243-1249.
- Moll, K.J., Moll, M. (Eds.), Anatomie. München, Urban & Fischer Verlag, 2005.
- Moncada, M.C., Moura, S., Melo, M.J., Roque, A., Lodeiro, C., Pina, F. Complexation of aluminum(III) by anthocyanins and synthetic flavylum salts - A source for blue and purple color. *Inorg. Chim. Acta.* **2003**, 356, 51-61.
- Mongeau, R., Brassard, R. A comparison of three methods for analyzing dietary fiber in 38 foods. *J. Food Comp. Anal.* **1989**, 2, 189-199.
- Mongeau, R., Brooks, S.P.J. (Eds.), Chemistry and analysis of lignin. New York, Marcel Dekker, 2001.
- Mortensen, P.B., Clausen, M.R. Short-chain fatty acids in the human colon: Relation to gastrointestinal health and disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **1996**, 31, 132-148.

- Munoz-Espada, A.C., Wood, K.V., Bordelon, B., Watkins, B.A. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6779-6786.
- Muratore, G., Licciardello, F., Restuccia, C., Puglisi, M.L., Giudici, P. Role of different factors affecting the formation of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde in heated grape must. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 860-863.
- Murkovic, M., Pichler, N. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 842-846.
- Nadian, A., Lindblom, L. Studies on the development of a microencapsulated delivery system for norbormide, a species-specific acute rodenticide. *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 63-68.
- Nakamura, T., Sakaeda, T., Ohmoto, N., Tamura, T., Aoyama, N., Shirakawa, T., Kamigaki, T., Kim, K.I., Kim, S.R., Kuroda, Y., Matsuo, M., Kasuga, M., Okumura, K. Real-time quantitative polymerase chain reaction for MDR1, MRP1, MRP2, and CYP3A-mRNA levels in Caco-2 cell lines, human duodenal enterocytes, normal colorectal tissues, and colorectal adenocarcinomas. *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 4-6.
- Narayan, M.S., Naidu, K.A., Ravishankar, G.A., Srinivas, L., Venkataraman, L.V. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* **1999**, *60*, 1-4.
- Nemeth, K., Plumb, G.W., Berrin, J.G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H.Y., Williamson, G., Swallow, D.M., Kroon, P.A. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur. J. Nutr.* **2003**, *42*, 29-42.
- Nicklas, M., Schatton, W., Heinemann, S., Hanke, T., Kreuter, J. Enteric coating derived from marine sponge collagen. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2009**, *35*, 1384-1388.
- Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A., Deloire, A. Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, *53*, 261-267.
- Olsen, K.W. Batch fluid-bed processing equipment a design overview part I. *Pharm. Technol.* **1989**, *13*, 34, 36, 38, 40, 44, 46.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C.H., Buijsman, M.N.C.P., van Amelsvoort, J.M.M., Katan, M.B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1806-1814.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 66-71.
- Osman, N., Adawi, D., Ahrne, S., Jeppsson, B., Molin, G. Probiotics and blueberry attenuate the severity of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis. *Dig. Dis. Sci.* **2008**, *53*, 2464-2473.

- Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, K.V., Reddy, A.R. Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry*. **1997**, *46*, 499-502.
- Passamonti, S., Terdoslavich, M., Franca, R., Vanzo, A., Tramer, F., Braidot, E., Petrusa, E., Vianello, A. Bioavailability of flavonoids: A review of their membrane transport and the function of bilitranslocase in animal and plant organisms. *Curr. Drug Metab.* **2009**, *10*, 369-394.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Mattivi, F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *296*, 631-636.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., Mattivi, F. The stomach as a side for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letter.* **2003**, *544*, 210-213.
- Pawar, A.P., Gadhe, A.R., Venkatachalam, P., Sher, P., Mahadik, K.R. Effect of core and surface cross-linking on the entrapment of metronidazole in pectin beads. *Acta Pharmaceut.* **2008**, *58*, 75-85.
- Pearnchob, N., Dashevsky, A., Bodmeier, R. Improvement in the disintegration of shellac-coated soft gelatine capsules in simulated intestinal fluid. *J. Control. Release.* **2004**, *94*, 313-321.
- Pearnchob, N., Dashevsky, A., Siepman, J., Bodmeier, R. Shellac used as coating material for solid pharmaceutical dosage forms: understanding the effects of formulation and processing variables. *STP Pharma Sciences.* **2003a**, *13*, 387-396.
- Pearnchob, N., Siepman, J., Bodmeier, R. Pharmaceutical application of shellac: Moisture-protective and taste-masking coatings and extended-release matrix tablets. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2003b**, *29*, 925-938.
- Penning, M. Schellack - ein "nachwachsender" Rohstoff mit interessanten Eigenschaften und Anwendungen. *Seifen - Öle- Fette - Wachse.* **1990**, *6*, 221-224.
- Penning, M. Aqueous shellac solutions for controlled release coatings. *Royal Society of Chemistry Special Publication; Chemical aspects of drug delivery systems.* **1996**, *178*, 146-154.
- Piberger, H. Der Einfluss von getrockneten Heidelbeeren und deren Anthocyanen auf die Colitis. Dissertation, Universität Regensburg, 2009.
- Pietta, P.-G. Flavonoid Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035-1042.
- Piffaut, B., Kader, F., Girardin, M., Metche, M. Comparative degradation pathways of malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments. *Food Chem.* **1994**, *50*, 115-120.
- Pilaczynska-Szczesniak, L., Skarpanska-Steinborn, A., Deskur, E., Basta, P., Horoszkiewicz-Hassan, M. The influence of chokeberry juice supplementation on the reduction of oxidative stress resulting from an incremental rowing ergometer exercise. *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* **2005**, *15*, 48-58.
- Pillay, V., Fassihi, R. In vitro release modulation from crosslinked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract - I. Comparison of pH-

- responsive drug release and associated kinetics. *J. Control. Release.* **1999**, *59*, 229-242.
- Pina, F. Thermodynamics and kinetics of flavylum salts. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1998**, *94*, 2109-2116.
- Powers, J.J., Somaatmadja, D., Pratt, D.E., Hamdy, M.K. Anthocyanins. 2. Action of anthocyanin pigments and related compounds on the growth of certain microorganisms. *Food Technol.* **1960**, *14*, 626-632.
- Pratt, D.E., Powers, J.J., Somaatmadja, D. Anthocyanins. 1. The influence of strawberry and grape anthocyanins on the growth of certain bacteria. *Food Res.* **1960**, *25*, 26-33.
- Prior, R.L., Lazarus, S.A., Cao, G., Muccitelli, H., Hammerstone, J.F. Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium Spp.*) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1270-1276.
- Prior, R.L., Wu, X.L. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Res.* **2006**, *40*, 1014-1028.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Alakomi, H.-L., Oksman-Caldentey, K.-M. The action of berry polyphenols against human intestinal pathogens. *BioFactors.* **2005**, *23*, 243-251.
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., Kahkonen, M., Heinonen, M., Maatta-Riihinen, K., Oksman-Caldentey, K.M. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *98*, 991-1000.
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *90*, 494-507.
- Qussi, B., Suess, W.G. Investigation of the effect of various shellac coating compositions containing different water-soluble polymers on in vitro drug release. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2005**, *31*, 99-108.
- Qussi, B., Suess, W.G. The influence of different plasticizers and polymers on the mechanical and thermal properties, porosity and drug permeability of free shellac films. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2006**, *32*, 403-412.
- Rada-Mendoza, M., Olano, A., Villamiel, M. Determination of hydroxymethylfurfural in commercial jams and in fruit-based infant foods. *Food Chem.* **2002**, *79*, 513-516.
- Ramirez-Coronel, M.A.N., Marnet, N., Kolli, V.S.K., Roussos, S., Guyot, S., Augur, C. Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1344-1349.
- Ramirez-Tortosa, C., Andersen, O.M., Gardner, P.T., Morrice, P.C., Wood, S.G., Duthie, S.J., Collins, A.R., Duthie, G.G. Anthocyanin-rich extract decreases

- indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 1033-1037.
- Ravi, V., Siddaramaiah, Pramod Kumar, T.M. Influence of natural polymer coating on novel colon targeting drug delivery system. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 2131-2136.
- Rayleigh, L. On the stability of jets. *Proc. London Math. Soc.* **1878**, *10*, 4-13.
- Raynal, J., Moutounet, M., Souquet, J.M. Intervention of phenolic-compounds in plum technology. 1. changed during drying. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37*, 1046-1050.
- Reiter, R.J., Tan, D., Burkhardt, S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech. Ageing Dev.* **2002**, *123*, 1007-1019.
- Rhodes, C.T., Porter, S.C. Coatings for controlled-release drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 1139-1154.
- RiceEvans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933-956.
- Riihinen, K., Jaakola, L., Karenlampi, S., Hohtola, A. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and 'northblue' blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chem.* **2008**, *110*, 156-160.
- Rossi, A., Serraino, I., Dugo, P., Di Paola, R., Mondello, L., Genovese, T., Morabito, D., Dugo, G., Sautebin, L., Caputi, A.P., Cuzzocrea, S. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. *Free Radical Res.* **2003**, *37*, 891-900.
- Rossi, M., Garavello, W., Talamini, R., Negri, E., Bosetti, C., Dal Maso, L., Lagiou, P., Tavani, A., Polesel, J., Barzan, L., Ramazzotti, V., Franceschi, S., La Vecchia, C. Flavonoids and the risk of oral and pharyngeal cancer: A case-control study from Italy. *Cancer Epidem Biomar.* **2007**, *16*, 1621-1625.
- Rubinstein, A., Radai, R., Ezra, M., Pathak, S., Rokem, J.S. In vitro evaluation of calcium pectinate - a potential colon-specific drug delivery carrier. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 258-263.
- Rufian-Henares, J.A., Garcia-Villanova, B., Guerra-Hernandez, E. Occurrence of furosine and hydroxymethylfurfural as markers of thermal damage in dehydrated vegetables. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *228*, 249-256.
- Rumpunen, K., Henriksen, K. Phytochemical and morphological characterization of seventy-one cultivars and selections of culinary rhubarb (*Rheum spp.*). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology.* **1999**, *74*, 13-18.
- Saarivirta, M., Kreula, M. The contents of water-insoluble dietary fiber in finish berries and mushrooms. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1979**, *169*, 88-89.
- Sadilova, E., Carle, R., Stintzing, F.C. Thermal degradation of anthocyanins and its impact on color and in vitro antioxidant capacity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 1461-1471.

- Sadilova, E., Stintzing, F.C., Carle, R. Anthocyanins, colour and antioxidant properties of eggplant (*Solanum melongena* L.) and violet pepper (*Capsicum annuum* L.) peel extracts. *Z. Naturforsch. [C]*. **2006**, *61*, 527-535.
- Saito, D., Nakaji, S., Fukuda, S., Shimoyama, T., Sakamoto, J., Sugawara, K. Comparison of the amount of pectin in the human terminal ileum with the amount of orally administered pectin. *Nutrition*. **2005**, *21*, 914-919.
- Salyers, A.A., West, S.E.H., Vercellotti, J.R., Wilkins, T.D. Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* **1977**, *34*, 529-533.
- Santos-Buelga, C., Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1094-1117.
- Sarni, P., Fulcrand, H., Souillol, V., Souquet, J.M., Cheynier, V. Mechanisms of anthocyanidin degradation in grape must-like model solutions. *J. Sci. Food Agric.* **1995**, *69*, 385-391.
- Saura-Calixto, F., Goni, I., Manas, E., Abia, R. Klason lignin, condensed tannins and resistant protein as dietary fiber constituents - determination in grape pomaces. *Food Chem.* **1991**, *39*, 299-309.
- Scalbert, A., Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073S-2085S.
- Schwegler, J.S. (Ed.) *Der Mensch Anatomie und Physiologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1998.
- Seeram, N.P., Bourquin, L.D., Nair, M.G. Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4924-4929.
- Selma, M.V., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6485-6501.
- Serp, D., Cantana, E., Heinzen, C., von Stockar, U., Marison, I.W. Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *70*, 41-53.
- Severin, I., Dumont, C., Jondeau-Cabaton, A., Graillot, V., Chagnon, M.C. Genotoxic activities of the food contaminant 5-hydroxymethylfurfural using different in vitro bioassays. *Toxicol. Lett.* **2010**, *192*, 189-194.
- Shafiur Rahman, M. (Ed.) *Handbook of food preservation*. Boca Raton, CRC Press, 2007.
- Shapiro, H., Singer, P., Halpern, Z., Bruck, R. Polyphenols in the treatment of inflammatory bowel disease and acute pancreatitis. *Gut*. **2007**, *56*, 426-435.
- Shina, V.R., Kumria, R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *Int. J. Pharm.* **2001**, *224*, 19-38.
- Sies, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 1058-1071.

- Silbernagl, S., Despopoulos, A. (Eds.), Taschenatlas Physiologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2003.
- Sinha, V.R., Kumria, R. Microbially triggered drug delivery to the colon. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *18*, 3-18.
- Slimestad, R., Torskangerpoll, K., Nateland, H.S., Johannessen, T., Giske, N.H. Flavonoides from black chokeberries, *Aronia melanocarpa*. *J. Food Comp. Anal.* **2005**, *18*, 61-68.
- Souci, S., Fachmann, W., Kraut, H., Food composition and nutrition tables. Boca Raton, CRC Press, 2000.
- Specht, F., Saugestad, M., Waller, T., B.W., M. The application of shellac as an acidic polymer for enteric coating. *Pharm. Technol. Eur.* **1998**, *10*, 20-28.
- Spencer, J.P.E. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 3255S-3261S.
- Spencer, J.P.E., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E.S., Srai, S.K., Rice-Evans, C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 224-230.
- Sriamornsak, P. Investigation of pectin as a carrier for oral delivery of proteins using calcium pectinate gel beads. *Int. J. Pharm.* **1998**, *169*, 212-220.
- Sriamornsak, P., Nunthanid, J. Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: I. Preparation and in vitro release studies. *Int. J. Pharm.* **1998**, *160*, 207-212.
- Sriamornsak, P., Prakongpan, S., Puttipipatkachorn, S., Kennedy, R.A. Development of sustained release theophylline pellets coated with calcium pectinate. *J. Control. Release.* **1997**, *47*, 221-232.
- Steinert, R.E., Ditscheid, B., Netzel, M., Jahreis, G. Absorption of black currant anthocyanins by monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells mounted in Ussing type chambers. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4995-5001.
- Stonerook, M.J., Tefend, K.S., Sharma, H.M., Peck, O.C., Wood, J.D. Fecal short-chain fatty acids associated with inflammation in cotton-top tamarin model for idiopathic colitis. *Dig. Dis. Sci.* **1996**, *41*, 1618-1624.
- Swatschek, D., Schatton, W., Kellermann, J., Müller, W.E.G., Kreuter, J. Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2002**, *53*, 107-113.
- Takeda, K., Yanagisawa, M., Kifune, T., Kinoshita, T., Timberlake, C.F. A blue pigment complex in flowers of *slavia patens*. *Phytochemistry.* **1994**, *35*, 1167-1169.
- Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, J.L., Remesy, C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 4178-4182.

- Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Manach, C., Lamaison, J.L., Remesy, C. Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 2275-2279.
- Taruscio, T.G., Barney, D.L., Exon, J. Content and profile of flavonoids and phenolic acids compounds in conjunction with the antioxidant capacity for a variety of northwest *vaccinium* berries. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3169-3176.
- Teunou, E., Poncelet, D. Batch and continuous fluid bed coating - review and state of the art. *J. Food Eng.* **2002**, *53*, 325-340.
- Thakur, B.R., Singh, R.K., Handa, A.K. Chemistry and uses of pectin - A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1997**, *37*, 47-73.
- Tian, X.J., Yang, X.D., Wang, K., Yang, X.W. The efflux of flavonoids morin, isorhamnetin-3-O-rutinoside and diosmetin-7-O-beta-D-xylopyranosyl-(1-6)-beta-D-glucopyranoside in the human intestinal cell line Caco-2. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 1721-1728.
- Tilgmann, C., Ulmanen, I. Purification methods of mammalian catechol-O-methyltransferases. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1996**, *684*, 147-161.
- Timberlake, C.F. Anthocyanins - occurrence, extraction and chemistry. *Food Chem.* **1980**, *5*, 69-80.
- Tomas-Barberan, F.A., Clifford, M.N. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1024-1032.
- Torskangerpoll, K., Borge, K.J., Andersen, O.M., Saethre, L.J. Color and substitution pattern in anthocyanidins. A combined quantum chemical-chemometrical study. *Spectrochim. Acta, Part A.* **1999**, *55*, 761-771.
- Trenkrog, T., Müller, B.W., Specht, F.M., Seifert, J. Enteric coated insulin pellets: development, drug release and *in vivo* evaluation. *Eur. J. Pharm. Sci.* **1996**, *4*, 323-329.
- Tseng, K.C., Chang, H.M., Wu, J.S.B. Degradation kinetics of anthocyanin in ethanolic solutions. *J. Food Process. Preserv.* **2006**, *30*, 503-514.
- Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi, S.W., Kawakishi, S., Osawa, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-beta-D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2407-2410.
- U.S. Food and Drug Administration, Federal Food, Drug and Cosmetic Act, 2004, Chapter V, 505.
- van den Mooter, G. Colon drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2006**, *3*, 111-125.
- Vinas, P., Campillo, N., Cordoba, M.H., Candela, M.E. Simultaneous liquid-chromatographic analysis of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde and methyl anthranilate in honey. *Food Chem.* **1992**, *44*, 67-72.
- Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Gallo, A., Scalfi, L., Fogliano, V. Protocatechuic Acid is the major human metabolite of cyanidin-glucoside. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 2043-2048.

- Wade, A., Weller, P.J. (Eds.), Handbook of pharmaceutical excipients. Washington DC, American Pharmaceutical Association, 1994.
- Wakerly, Z., Fell, J., Attwood, D., Parkins, D. Studies on amidated pectins as potential carriers in colonic drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 622-625.
- Walgren, R.A., Lin, J.-R., Kinne, R.K.-H., Walle, T. Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'- β -glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000**, *294*, 837-843.
- Walton, M.C., McGhie, T.K., Reynolds, G.W., Hendriks, W.H. The flavonol quercetin-3-glucoside inhibits cyanidin-3-glucoside absorption in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4913-4920.
- Wang, L.S., Hecht, S.S., Carmella, S.G., Yu, N.X., Larue, B., Henry, C., McIntyre, C., Rocha, C., Lechner, J.F., Stoner, G.D. Anthocyanins in Black Raspberries Prevent Esophageal Tumors in Rats. *Cancer Prev. Res.* **2009**, *2*, 84-93.
- Wang, L.S., Sardo, C., Rocha, C.M., McIntyre, C.M., Frankel, W., Arnold, M., Martin, E., Lecher, J.F., Stoner, G.D. Effect of freeze-dried black raspberries on human colorectal cancer lesions. *AACR Special Conference in Cancer Research, Advances in colon Cancer Research.* **2007**, B31.
- Wang, L.S., Stoner, G.D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 281-290.
- Wang, S.Y., Lin, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 140-146.
- Watanabe, H., Yashiro, T., Tohjo, Y., Konishi, Y. Non-involvement of the human monocarboxylic acid transporter I (MCT1) in the transport of phenolic acid. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry.* **2006**, *70*, 1928-1933.
- Watzl, B., Briviba, K., Rechkemmer, G. Anthocyane. *Ernährungs-Umschau.* **2002**, *49*, 148-150.
- Watzl, B., Leitzmann, C. (Eds.), Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Stuttgart, Thieme Verlag, 2005.
- Wawer, I., Wolniak, M., Paradowska, K. Solid state NMR study of dietary fiber powders from aronia, bilberry, black currant and apple. *Solid State Nucl. Magn. Reson.* **2006**, *30*, 106-113.
- Weber, C. Zum Zerfall eines Flüssigkeitsstrahles. *Z. angew. Math. Mech.* **1931**, *11*, 136-154.
- Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J.-P., Kulling, S., Ruefer, C., Johannes, C., Janzowski, C. An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnol. J.* **2006**, *1*, 388-397.
- Welch, C.R., Wu, Q., Simon, J.E. Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Curr. Anal. Chem.* **2008**, *4*, 75-101.

- Werlein, H.D., Kutemeyer, C., Schatton, G., Hubbermann, E.M., Schwarz, K. Influence of elderberry and blackcurrant concentrates on the growth of microorganisms. *Food Control*. **2005**, *16*, 729-733.
- Werner, S.R.L., Jones, J.R., Paterson, A.H.J., Archer, R.H., Pearce, D.L. Air-suspension particle coating in food industry: Part II - micro level process approach. *Powder Technol.* **2007**, *171*, 34-45.
- Wilding, I. Site-specific drug delivery in the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems*. **2000**, *17*, 557-620.
- Williams, C.A., Grayer, R.J. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 539-573.
- Wise, d. (Ed.) Handbook of pharmaceutical controlled release technology. New York, Marcel Dekker, 2000.
- Wrolstad, R.E., Heatherb, D. Anthocyanin pigments of rhubarb canada red. *J. Food Sci.* **1968**, *33*, 592-&.
- Wu, X., Gu, L., Prior, R.L., McKay, S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of ribes, aronia, and sambucus and their antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2004a**, *52*, 7846-7856.
- Wu, X.L., Pittman, H.E., McKay, S., Prior, R.L. Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism after berry consumption in weanling pigs. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2417-2424.
- Wu, X.L., Pittman, H.E., Prior, R.L. Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyanidin after marionberry consumption in pigs. *J. Nutr.* **2004b**, *134*, 2603-2610.
- Wu, X.L., Pittman, H.E., Prior, R.L. Fate of anthocyanins and antioxidant capacity in contents of the gastrointestinal tract of weanling pigs following black raspberry consumption. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 583-589.
- Wu, X.L., Prior, R.L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquide chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the united states: Vegetables, nuts, grains. *J. Agric. Food Chem.* **2005a**, *53*, 3101-3113.
- Wu, X.L., Prior, R.L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: Fruits and Berries. *J. Agric. Food Chem.* **2005b**, *53*, 2589-2599.
- Wurster, D.E. Air-suspension technique of coating drug particles - a preliminary report. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1959**, *48*, 451-454.
- Xiong, S., Melton, D.L., Easteal, A.J., Siew, D. Stability and antioxidant activity of black currant anthocyanins in solution and encapsulation in glucan gel. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6210-6208.
- Xue, J., Zhang, Z. Preparation and Characterization of calcium-shellac spheres as a carrier of carbamide peroxide. *J. Microencapsulation.* **2008**, *25*, 523-530.

- Yang, F., Wang, K., He, Z.M. Two new plate nozzles for the production of alginate microspheres. *Int. J. Pharm.* **2005**, *298*, 206-210.
- Yang, L., Chu, S.C., Fix, J.A. Colon-specific drug delivery: new approaches and in vitro/in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* **2002**, *235*, 1-15.
- Yi, W., Akoh, C.C., Fischer, J., Krewer, G. Absorption of anthocyanins from blueberry extracts by Caco-2 human intestinal cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5651-5658.
- Yoshida, K., Kondo, T., Gotoh, T. Unusually stable monoacylated anthocyanin from purple yam *dioscorea alata*. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5579-5580.
- Youan, B.B.C. Chronopharmaceutics: gimmick or clinically relevant approach to drug delivery? *J. Control. Release.* **2004**, *98*, 337-353.
- Zadernowski, R., Naczek, M., Nesterowicz, J. Phenolic acids profiles in some small berries. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *2005*, 2118-2124.
- Zhang, J., Ji, W., Chen, X., Qi, X. Mimic study on the controlled release of grape polyphenols from chitosan-sodium alginate microcapsules. *Shipin Kexue.* **2004**, *25*, 102-104.
- Zhang, X.M., Chan, C.C., Stamp, D., Minkin, S., Archer, M.C., Bruce, W.R. Initiation and promotion of colonic aberrant crypt foci in rats by 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in thermolyzed sucrose. *Carcinogenesis.* **1993**, *14*, 773-775.
- Zhao, X.Y., Zhang, C., Guigas, C., Ma, Y., Corrales, M., Tauscher, B., Hu, X.S. Composition, antimicrobial activity, and antiproliferative capacity of anthocyanin extracts of purple corn (*Zea mays* L.) from China. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *228*, 759-765.
- Zheng, W., Wang, S.Y. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 502-509.
- ZZuIV, Verordnung über die Zulassung von Zusatzstoffen zu Lebensmitteln zu technologischen Zwecken (Zusatzstoff-Zulassungsverordnung - ZZuIV) in der Fassung von 29.01.1998 (BGBl. I S. 230,230), zuletzt geändert durch Artikel 3 der Verordnung vom 30. September 2008 (BGBl. I S. 1911).

7 Anhang

Tabelle 7-1: Mittels HPLD-DAD ermittelte Gehalte der Polyphenole in getrockneten Heidelbeeren (mg/100 g TM). MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.2.2.

	Gehalt mg/100 g TM	
	MW	SD
Gallussäure (16)	7,6	0,1
Protocatechusäure (17)	73,2	0,9
Syringasäure (18)	13,6	0,1
Chlorogensäure (19)	147	5
Kaffeesäure (20)	4,4	0,1
<i>p</i> -Cumarsäure (21)	15,1	0,2
Quer-3-gal (22)	8,3	0,2
Quer-3-glc (23)	7,4	0,4
Quer-3-rha (24)	7,2	0,2
Quercetin (26)	2,1	0,1

Tabelle 7-2: Gehalte an Nährwertbestandteilen sowie Asche, organische Säuren und Polyphenolen in getrockneten Heidelbeeren (g/100 g TM). MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung, n.n. - nicht nachweisbar. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.2.3.

	Gehalt (g/100 g TM)	
	MW	SD
Protein	6,2	0,1
Fett	5,2	0,2
Glucose	10,4	0,2
Fructose	11,7	0,3
Saccharose	n.n.	n.n.
Zitronensäure	3,59	0,02
Äpfelsäure	0,27	0,01
Ascorbinsäure	n.n.	n.n.
Asche	1,97	0,03
Monomere Polyphenole	0,67	0,05
Kond. Gerbstoffe	2,2	0,1
Lösliche Ballaststoffe	9	1
Unlösliche Ballaststoffe	35	1

Tabelle 7-3: Monosaccharid-Zusammensetzung des ethanolunlöslichen Rückstands (EUR) aus getrockneten Heidelbeeren (g/100 g EUR). Gehalt EUR: 50g/100 g TM. Uronsäure als Galacturonsäure-Äquivalente. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung, n.b. - nicht bestimmt. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.2.5.

	Gehalt (g/100 g EUR)	
	MW	SD
Glucose	16,0	0,6
Galactose	1,69	0,05
Mannose	10,7	0,03
Rhamnose	n.b.	n.b.
Fucose	n.b.	n.b.
Xylose	11,6	0,4
Arabinose	1,7	0,1
Uronsäure	9,4	0,4

Tabelle 7-4: Zusammensetzung des ethanolunlöslichen Rückstands (EUR) aus getrockneten Heidelbeeren (g/100 g EUR). Gehalt EUR: 50g/100 g TM. Uronsäure als Galacturonsäure-Äquivalente. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung, n.b. - nicht bestimmt. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.2.5.

	Gehalt (g/100 g EUR)	
	MW	SD
Neutralzucker	27	1
Uronsäure	8,5	0,4
Klason-Lignin	36	6
Kond. Gerbstoffe	3,8	0,2
Protein	10,5	-

Tabelle 7-5: HPLC-UV/Vis ermittelte Anthocyanengehalte in Heidelbeeren (mg/100 g TM) nach Gefriertrocknung (lyo) sowie Trocknung bei 30°C, 50°C und 70°C. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung, n.b. - nicht bestimmt. 4.3.3.

	lyo		30°C		50°C		70°C	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
mg/100 g TM								
Dp-3-gal (1)	700	14	807	5	103	2	13,7	0,6
Dp-3-glc (2)	40,9	0,9	17,9	0,1	5,0	0,2	2,7	0,1
Dp-3-ara (3)	375	11	352	1	55,6	0,6	7,5	0,5
Cy-3-gal (4)	102	3	79	3	17,5	0,2	4,1	0,4
Cy-3-glc (5)	15,3	0,5	8,3	0,4	3,3	0,3	2,41	0,05
Cy-3-ara(6), Pt-3-gal (7)	396	8	528	3	74	2	10,4	0,8
Pt-3-glc (9)	38,9	0,7	19,7	0,6	5,0	0,1	2,9	0,1
Pt-3-ara (10)	538	13	614	8	97	2	13	1
Pn-3-glc (11)	19	5	n.b.		5,3	0,9	3,0	0,4
Pn-3-ara (12)	19	5	n.b.		7,2	0,5	1,4	0,2
Mv-3-gal (13)	1510	31	2611	37	309	3	39	2
Mv-3-glc (14)	102,6	0,7	60	1	14,9	0,3	8,3	0,7
Mv-3-ara	1880	62	2450	54	339	2	54	4

Tabelle 7-6: HPLC-DAD ermittelte Polyphenol-Gehalte in Heidelbeeren (mg/100 g TM) nach Gefriertrocknung (lyo) sowie Trocknung bei 30°C, 50°C und 70°C. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung, n.n. - nicht nachweisbar. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.3.

	lyo		30°C		50°C		70°C	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
mg/100 g TM								
Gallusäure (16)	0,53	0,01	0,16	0,02	2,31	0,01	5,87	0,05
Protocatechussäure (17)	n.n.		n.n.		1,99	0,05	3,23	0,04
Syringasäure (18)	0,92	0,07	2,54	0,18	9,38	0,22	9,9	0,1
Chlorogensäure (19)	674	17	483	45	158	7	312	9
Kaffeesäure (20)	2,9	0,3	1,46	0,9	0,76	0,02	2,22	0,01
Quer-3-gal (22)	29	1	32	3	20	1	30,0	0,1
Quer-3-glc (23)	9	1	9,2	0,7	5,0	0,1	6,76	0,02
Quer-3-rha (24)	47,6	0,4	84	3	30	1	18,8	0,4
Quer-3-rut (25)	4,09	0,01	3,87	0,02	3,22	0,02	3,69	0,01
Quercetin (26)	6,0	0,1	3,99	0,05	3,7	0,9	8,4	0,2

Tabelle 7-7: Daten zur Anthocyan-Freisetzung aus mit Schellack gecoateten APK (P4BSch) während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomabeutelinhalt. Mittels HPLC-DAD ermitteltes Peakflächenverhältnis F_{Peak}/F_{STD} im Überstand zu definierten Zeitpunkten (0 h bis 7 h) sowie nach vollständiger Anthocyanextraktion aus dem Material (100 %). Anthocyan-Freisetzung AFS (%), zur Berechnung siehe Abschnitt 4.3.8.5.6. Weitere enthaltene Anthocyane aufgrund fehlender Peaktrennung (Cy-3-ara, Pt-3-gal) oder geringem Gehalt (Pn-3-gal, Pn-3-ara) nicht bestimmt. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Zeit (h)	Dp-3-gal				Dp-3-glc				Dp-3-ara			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,001	0,001	1,1	0,1	0,002	0,002	1,3	0,1	0,001	0,001	1,2	0,4
1	0,001	0,002	2,2	0,9	0,002	0,004	2,1	1,2	0,001	0,003	2,1	1,5
2	0,001	0,006	7,8	0,9	0,011	0,010	7,6	0,4	0,006	0,005	7,3	0,7
3	0,007	0,011	13,3	1,2	0,020	0,018	13,7	1,0	0,011	0,008	12,0	2,1
3,5	0,005	0,004	18,0	0,6	0,005	0,007	18,1	1,6	0,003	0,003	15,8	1,3
4	0,008	0,010	24,0	0,0	0,012	0,014	23,0	0,3	0,006	0,007	19,6	1,2
5	0,010	0,013	27,1	0,8	0,014	0,017	25,1	0,3	0,006	0,007	19,6	1,5
7	0,012	0,015	29,0	1,3	0,011	0,016	24,5	1,5	0,003	0,005	17,3	0,7
100%	0,084				0,137				0,080			
Zeit (h)	Cy-3-gal				Cy-3-glc				Pt-3-glc			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,002	0,002	2,0	0,4	0,004	0,003	2,0	0,4	0,002	0,002	1,6	0,2
1	0,005	0,004	4,5	0,3	0,008	0,008	4,5	0,4	0,004	0,003	3,0	0,7
2	0,011	0,010	10,3	0,3	0,020	0,018	10,7	0,6	0,010	0,011	8,9	0,8
3	0,019	0,016	17,2	2,2	0,033	0,028	17,3	2,0	0,016	0,018	14,3	1,6
3,5	0,005	0,007	23,0	0,5	0,007	0,011	22,4	0,7	0,008	0,005	19,7	0,2
4	0,011	0,012	28,7	1,1	0,016	0,019	27,2	0,9	0,017	0,015	27,7	0,6
5	0,011	0,013	28,9	0,7	0,014	0,016	25,9	1,0	0,025	0,021	33,5	0,9
7	0,006	0,009	24,8	0,5	0,007	0,009	21,8	1,1	0,034	0,023	38,2	5,3
100%	0,101				0,176				0,119			
Zeit (h)	Pt-3-gal				Pn-3-glc				Mv-3-gal			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,000	0,000	0,0	0,0	0,002	0,002	3,0	0,1	0,001	0,001	1,9	0,4
1	0,001	0,000	1,5	2,2	0,004	0,005	6,2	1,2	0,003	0,002	4,4	0,3
2	0,003	0,003	8,4	0,6	0,010	0,011	14,6	1,5	0,006	0,006	10,5	0,3
3	0,004	0,005	12,4	1,7	0,016	0,019	23,6	3,2	0,010	0,009	16,8	2,2
3,5	0,004	0,004	24,2	0,6	0,007	0,005	31,2	1,4	0,003	0,004	23,4	0,5
4	0,007	0,006	30,7	1,1	0,013	0,011	39,7	1,5	0,008	0,010	33,2	1,1
5	0,009	0,008	37,2	0,5	0,013	0,011	40,5	1,4	0,012	0,013	39,8	0,7
7	0,014	0,009	46,1	7,8	0,010	0,007	35,2	0,3	0,013	0,021	48,2	0,5
100%	0,035				0,086				0,054			
Zeit (h)	Mv-3-glc				Mv-3-ara							
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)					
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD				
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0				
0,5	0,003	0,003	1,8	0,2	0,000	0,000	0,0	0,0				
1	0,007	0,006	4,3	0,3	0,001	0,001	4,1	0,8				
2	0,017	0,015	10,2	0,7	0,003	0,003	9,6	0,4				
3	0,028	0,024	16,7	1,8	0,005	0,005	16,2	1,4				
3,5	0,008	0,010	22,7	0,8	0,001	0,002	21,9	0,0				
4	0,021	0,025	31,4	0,3	0,004	0,005	30,9	0,9				
5	0,029	0,036	37,7	1,5	0,007	0,007	39,0	0,8				
7	0,034	0,052	44,4	6,5	0,008	0,012	54,8	6,5				
100%	0,156				0,031							

Tabelle 7-8: Daten zur Anthocyan-Freisetzung aus zeinhaltigen APK (P4BZ) während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomabeutelinhalt. Mittels HPLC-DAD ermitteltes Peakflächenverhältnis $F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$ im Überstand zu definierten Zeitpunkten (0 h bis 7 h) sowie nach vollständiger Anthocyanextraktion aus dem Material (100 %). Anthocyan-Freisetzung AFS (%), zur Berechnung siehe Abschnitt 4.3.8.5.6. Weitere enthaltene Anthocyane aufgrund fehlender Peaktrennung (Cy-3-ara, Pt-3-gal) oder geringem Gehalt (Pn-3-gal, Pn-3-ara) nicht bestimmt. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Zeit (h)	Dp-3-gal				Dp-3-glc				Dp-3-ara			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,002	1,2	1,7	0,001	0,000	1,7	0,2	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,030	0,020	39,6	11	0,049	0,032	42,4	12	0,024	0,014	34,9	13
1	0,037	0,031	54,0	7,5	0,059	0,049	56,6	7,6	0,030	0,024	50,3	8,8
2	0,044	0,041	67,1	3,7	0,069	0,067	71,1	1,4	0,036	0,033	64,7	4,5
3	0,041	0,044	67,2	2,8	0,063	0,069	69,5	4,2	0,035	0,036	66,3	2,3
3,5	0,003	0,000	69,6	0,6	0,005	0,005	74,3	5,5	0,002	0,005	72,7	5,5
4	0,003	0,003	71,8	2,9	0,004	0,004	74,6	4,4	0,002	0,002	71,5	2,2
5	0,000	0,003	72,0	3,0	0,002	0,002	72,5	3,6	0,000	0,001	70,6	4,2
7	0,000	0,003	69,2	5,6	0,003	0,003	70,9	6,1	0,000	0,000	67,9	2,3
100%	0,063				0,095				0,054			
Zeit (h)	Cy-3-gal				Cy-3-glc				Pt-3-glc			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,001	0,002	2,3	0,9	0,002	0,000	0,9	1,2	0,000	0,001	0,7	0,9
0,5	0,045	0,031	50,7	13	0,077	0,056	53,2	12	0,029	0,045	44,1	14
1	0,052	0,042	63,2	10	0,090	0,076	66,7	7,8	0,046	0,055	60,2	8,3
2	0,054	0,052	71,3	1,6	0,092	0,090	73,1	0,9	0,060	0,060	71,5	0,3
3	0,050	0,052	69,6	4,0	0,088	0,090	71,6	2,2	0,059	0,058	69,9	1,3
3,5	0,005	0,005	75,0	5,1	0,006	0,006	76,4	1,3	0,007	0,005	77,1	1,6
4	0,003	0,003	74,5	3,6	0,004	0,005	75,3	1,7	0,005	0,006	76,6	1,2
5	0,004	0,002	70,9	5,8	0,003	0,003	73,7	0,8	0,005	0,005	75,7	0,2
7	0,000	0,000	69,6	4,0	0,000	0,000	72,3	0,9	0,005	0,004	75,5	0,9
100%	0,074				0,125				0,084			
Zeit (h)	Pt-3-ara				Pn-3-glc				Mv-3-gal			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,002	1,1	1,6	0,001	0,002	3,3	0,8
0,5	0,007	0,011	37,1	12	0,034	0,046	56,3	12	0,027	0,019	55,5	13
1	0,012	0,015	54,4	8,3	0,046	0,051	68,0	4,9	0,031	0,028	69,4	4,6
2	0,015	0,017	65,4	4,1	0,051	0,052	72,7	0,5	0,031	0,031	74,5	0,1
3	0,015	0,015	63,3	0,4	0,050	0,049	70,0	0,7	0,031	0,031	73,7	1,3
3,5	0,004	0,004	80,6	0,2	0,004	0,003	75,0	2,3	0,002	0,003	79,9	2,4
4	0,004	0,003	77,0	1,9	0,003	0,003	74,8	0,6	0,004	0,003	81,9	0,3
5	0,004	0,003	77,0	1,9	0,003	0,002	73,4	1,2	0,002	0,003	79,8	1,9
7	0,004	0,003	77,2	1,8	0,001	0,001	71,6	0,4	0,003	0,003	80,2	1,9
100%	0,024				0,071				0,042			
Zeit (h)	Mv-3-glc				Mv-3-ara							
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)					
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD				
0	0,003	0,001	1,6	1,2	0,000	0,001	3,5	7,5				
0,5	0,072	0,052	55,8	12	0,012	0,009	52,5	8,6				
1	0,080	0,071	67,4	5,7	0,014	0,013	65,5	3,6				
2	0,081	0,080	72,6	0,8	0,015	0,015	73,8	0,1				
3	0,077	0,080	70,3	1,9	0,017	0,015	78,6	6,0				
3,5	0,004	0,006	74,9	2,9	0,001	0,002	85,8	5,1				
4	0,007	0,006	76,0	1,5	0,000	0,002	82,8	0,0				
5	0,006	0,006	75,9	2,1	0,000	0,002	83,3	5,1				
7	0,006	0,006	75,3	1,9	0,002	0,002	87,4	2,6				
100%	0,111				0,020							

Tabelle 7-9: Daten zur Anthocyan-Freisetzung aus lyophilisierten APK (P4BL) während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomabeutelinhalt. Mittels HPLC-DAD ermitteltes Peakflächenverhältnis $F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$ im Überstand zu definierten Zeitpunkten (0 h bis 7 h) sowie nach vollständiger Anthocyanextraktion aus dem Material (100 %). Anthocyan-Freisetzung AFS (%), zur Berechnung siehe Abschnitt 4.3.8.5.6. Weitere enthaltene Anthocyane aufgrund fehlender Peaktrennung (Cy-3-ara, Pt-3-gal) oder geringem Gehalt (Pn-3-gal, Pn-3-ara) nicht bestimmt. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Zeit (h)	Dp-3-gal				Dp-3-glc				Dp-3-ara			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,010	0,010	11,7	0,1	0,017	0,018	13,8	0,3	0,009	0,009	12,1	0,0
0,5	0,027	0,031	35,3	3,7	0,045	0,057	40,6	6,3	0,024	0,026	33,2	2,4
1	0,044	0,052	58,0	7,0	0,074	0,084	62,6	5,5	0,038	0,042	53,6	4,3
2	0,060	0,059	72,0	1,1	0,097	0,095	76,4	0,9	0,053	0,051	69,4	1,4
3	0,064	0,060	75,2	3,0	0,105	0,101	82,0	2,5	0,060	0,053	76,3	6,6
3,5	0,006	0,008	83,2	1,2	0,007	0,010	89,1	0,9	0,004	0,006	83,2	4,3
4	0,005	0,007	82,4	1,6	0,006	0,009	88,1	0,7	0,003	0,006	82,1	4,3
5	0,004	0,003	79,6	3,5	0,003	0,004	85,4	2,3	0,002	0,002	79,1	6,5
7	0,002	0,000	76,6	4,8	0,004	0,000	83,1	3,9	0,000	0,000	76,3	6,6
100%	0,082				0,126				0,075			

Zeit (h)	Cy-3-gal				Cy-3-glc				Pt-3-glc			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,015	0,016	16,7	0,8	0,029	0,029	17,6	0,0	0,016	0,017	17,6	0,2
0,5	0,042	0,051	49,9	6,5	0,076	0,088	50,3	5,0	0,052	0,045	51,9	5,4
1	0,061	0,071	71,0	7,1	0,115	0,129	74,6	6,0	0,073	0,067	74,4	4,6
2	0,073	0,075	79,6	1,5	0,133	0,135	81,7	0,7	0,076	0,075	80,0	0,7
3	0,078	0,075	82,0	2,0	0,137	0,132	82,3	1,9	0,074	0,076	79,2	1,3
3,5	0,006	0,008	89,3	0,5	0,000	0,012	85,9	3,3	0,007	0,006	86,0	1,2
4	0,005	0,006	88,0	0,8	0,006	0,008	86,5	1,0	0,006	0,005	85,1	1,1
5	0,003	0,003	84,9	2,0	0,002	0,003	84,0	1,5	0,003	0,003	82,3	1,8
7	0,000	0,000	82,0	2,0	0,000	0,000	82,3	1,9	0,000	0,000	79,2	1,3
100%	0,093				0,164				0,094			

Zeit (h)	Pt-3-ara				Pn-3-glc				Mv-3-gal			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,009	0,010	16,1	0,9	0,027	0,027	19,1	0,0	0,005	0,005	16,3	0,0
0,5	0,027	0,028	47,4	2,1	0,066	0,077	51,7	5,8	0,013	0,015	43,6	5,6
1	0,038	0,041	68,0	3,6	0,101	0,111	76,5	5,0	0,018	0,021	61,6	7,0
2	0,043	0,043	74,1	1,0	0,111	0,120	83,1	4,3	0,025	0,023	74,6	4,6
3	0,043	0,042	73,6	1,6	0,114	0,110	80,8	2,2	0,025	0,023	74,5	4,0
3,5	0,005	0,005	82,1	1,4	0,009	0,012	89,1	0,2	0,003	0,004	84,2	1,4
4	0,005	0,005	81,8	1,1	0,010	0,011	88,5	1,0	0,004	0,004	86,9	3,7
5	0,005	0,004	80,9	2,4	0,009	0,010	87,9	1,3	0,004	0,003	85,4	6,2
7	0,003	0,003	79,3	1,5	0,008	0,009	87,1	1,3	0,003	0,003	83,3	3,4
100%	0,058				0,139				0,032			

Zeit (h)	Mv-3-glc				Mv-3-ara			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,018	0,016	14,8	1,3	0,005	0,004	15,2	1,8
0,5	0,052	0,043	41,4	5,3	0,012	0,011	35,1	1,9
1	0,080	0,070	65,8	5,8	0,018	0,017	55,5	3,8
2	0,089	0,088	77,4	0,9	0,022	0,022	70,4	0,9
3	0,088	0,093	79,5	2,9	0,023	0,026	78,4	6,4
3,5	0,012	0,012	90,0	2,5	0,007	0,005	96,6	2,8
4	0,012	0,008	88,3	0,0	0,006	0,005	95,6	5,3
5	0,010	0,007	87,2	1,3	0,005	0,004	92,8	5,1
7	0,008	0,006	85,5	1,8	0,004	0,004	90,5	6,3
100%	0,114				0,032			

Tabelle 7-10: Daten zur Anthocyan-Freisetzung aus bei Raumtemperatur APK (P4BRT) während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomabeutelinhalt. Mittels HPLC-DAD ermitteltes Peakflächenverhältnis $F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$ im Überstand zu definierten Zeitpunkten (0 h bis 7 h) sowie nach vollständiger Anthocyanextraktion aus dem Material (100 %). Anthocyan-Freisetzung AFS (%), zur Berechnung siehe Abschnitt 4.3.8.5.6. Weitere enthaltene Anthocyane aufgrund fehlender Peaktrennung (Cy-3-ara, Pt-3-gal) oder geringem Gehalt (Pn-3-gal, Pn-3-ara) nicht bestimmt. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Zeit (h)	Dp-3-gal				Dp-3-glc				Dp-3-ara			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,001	0,001	1,1	0,2	0,002	0,002	1,1	0,0	0,001	0,001	1,2	0,0
0,5	0,020	0,015	19,9	3,9	0,035	0,025	21,1	4,6	0,016	0,014	18,7	1,4
1	0,032	0,031	35,4	0,9	0,055	0,051	37,4	1,7	0,028	0,025	32,7	2,3
2	0,048	0,053	56,1	3,6	0,081	0,085	58,8	2,0	0,043	0,046	53,9	2,4
3	0,064	0,061	69,6	1,9	0,102	0,095	69,7	3,5	0,057	0,056	69,1	1,0
3,5	0,004	0,007	75,6	0,1	0,007	0,009	75,5	2,3	0,004	0,006	75,1	0,4
4	0,004	0,006	74,8	0,3	0,005	0,007	74,0	2,4	0,003	0,004	73,2	0,3
5	0,003	0,004	73,5	0,6	0,003	0,005	72,3	2,5	0,002	0,003	71,6	0,2
7	0,002	0,003	70,2	1,2	0,001	0,002	70,9	3,3	0,000	0,000	69,1	1,0
100%	0,090				0,142				0,082			

Zeit (h)	Cy-3-gal				Cy-3-glc				Pt-3-glc			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,002	0,002	2,1	0,1	0,004	0,004	2,0	0,1	0,003	0,003	3,0	0,2
0,5	0,033	0,025	27,8	5,2	0,061	0,045	28,6	5,9	0,026	0,036	29,5	6,6
1	0,051	0,047	46,6	2,6	0,090	0,085	47,3	1,9	0,052	0,053	49,9	0,8
2	0,069	0,070	66,0	0,5	0,117	0,126	65,3	3,3	0,072	0,069	66,9	1,8
3	0,078	0,072	71,8	4,1	0,136	0,130	71,4	2,2	0,073	0,078	71,3	3,4
3,5	0,006	0,006	77,3	3,7	0,007	0,011	76,3	0,7	0,007	0,004	76,5	1,9
4	0,003	0,005	75,8	2,9	0,004	0,007	74,6	1,0	0,006	0,003	75,5	1,6
5	0,002	0,003	73,8	3,4	0,003	0,003	73,3	1,5	0,003	0,002	73,8	2,6
7	0,000	0,000	71,8	4,1	0,000	0,000	71,4	2,2	0,000	0,001	71,8	4,1
100%	0,105				0,186				0,105			

Zeit (h)	Pt-3-ara				Pn-3-glc				Mv-3-gal			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,002	0,002	2,8	0,0	0,004	0,004	2,4	0,0	0,001	0,000	1,3	1,9
0,5	0,019	0,015	27,9	4,9	0,055	0,045	30,4	4,4	0,009	0,009	29,4	0,7
1	0,030	0,030	48,3	0,1	0,081	0,075	47,5	2,7	0,015	0,014	45,3	1,1
2	0,040	0,042	66,5	2,3	0,107	0,105	64,6	0,5	0,019	0,022	64,4	8,2
3	0,045	0,043	71,6	2,4	0,121	0,110	70,6	4,6	0,023	0,023	72,4	1,0
3,5	0,003	0,005	77,8	0,1	0,007	0,010	75,8	3,1	0,002	0,004	80,2	4,4
4	0,003	0,005	77,7	0,5	0,007	0,011	75,9	2,8	0,002	0,004	80,8	5,2
5	0,003	0,004	77,2	0,8	0,007	0,011	75,9	2,8	0,002	0,003	81,1	4,4
7	0,003	0,004	77,6	0,7	0,006	0,009	75,2	3,1	0,002	0,002	79,8	1,1
100%	0,062				0,164				0,032			

Zeit (h)	Mv-3-glc				Mv-3-ara			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,002	0,000	0,8	1,1	0,000	0,002	3,3	4,6
0,5	0,026	0,032	23,1	3,7	0,007	0,008	20,6	3,3
1	0,050	0,050	40,0	0,2	0,012	0,012	33,6	0,0
2	0,077	0,073	59,7	2,7	0,020	0,028	52,3	2,8
3	0,088	0,091	71,4	1,5	0,024	0,026	67,4	3,3
3,5	0,010	0,007	77,9	0,1	0,005	0,003	79,2	0,8
4	0,010	0,006	77,8	1,2	0,005	0,003	78,2	2,2
5	0,010	0,006	77,5	1,0	0,004	0,002	76,5	0,7
7	0,006	0,005	75,8	0,5	0,006	0,003	79,2	2,5
100%	0,126				0,037			

Tabelle 7-11: Daten zur Anthocyan-Freisetzung aus Anthocyan-Kollagen-Kugeln KB während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomabeutelinhalt. Mittels HPLC-DAD ermitteltes Peakflächenverhältnis F_{Peak}/F_{STD} im Überstand zu definierten Zeitpunkten (0 h bis 7 h) sowie nach vollständiger Anthocyanextraktion aus dem Material (100 %). Anthocyan-Freisetzung AFS (%), zur Berechnung siehe Abschnitt 4.3.8.5.6. Weitere enthaltene Anthocyane aufgrund fehlender Peaktrennung (Cy-3-ara, Pt-3-gal) oder geringem Gehalt (Pn-3-gal, Pn-3-ara) nicht bestimmt. MW - Mittelwert, SD -Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Zeit (h)	Dp-3-gal				Dp-3-glc				Dp-3-ara			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,002	0,002	0,9	0,1	0,003	0,002	0,9	0,1	0,002	0,002	1,0	0,1
0,5	0,042	0,039	21,9	0,9	0,065	0,062	22,2	0,7	0,035	0,034	19,4	0,8
1	0,049	0,055	29,2	1,1	0,075	0,087	30,5	3,2	0,043	0,047	27,2	1,8
2	0,067	0,077	41,8	4,1	0,103	0,118	41,6	4,0	0,058	0,068	37,9	4,4
3	0,075	0,087	46,8	4,7	0,115	0,133	46,6	4,8	0,065	0,077	42,8	5,0
3,5	0,000	0,000	46,8	4,7	0,000	0,000	46,6	4,8	0,000	0,000	42,8	5,0
4	0,014	0,018	55,5	6,2	0,021	0,025	54,8	5,9	0,011	0,015	50,2	6,4
5	0,026	0,031	62,0	6,5	0,039	0,044	61,2	6,2	0,020	0,024	55,0	6,7
7	0,020	0,022	58,2	5,2	0,029	0,033	57,4	5,7	0,014	0,015	51,0	5,5
100%	0,185				0,285				0,178			
Zeit (h)	Cy-3-gal				Cy-3-glc				Pt-3-glc			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,004	0,003	1,2	0,2	0,006	0,005	1,3	0,1	0,003	0,003	1,0	0,0
0,5	0,068	0,066	26,1	0,5	0,119	0,116	25,7	0,5	0,068	0,064	22,7	1,1
1	0,080	0,090	35,7	3,2	0,140	0,162	34,1	1,8	0,077	0,090	29,9	1,8
2	0,106	0,124	48,1	5,4	0,189	0,217	45,9	2,2	0,105	0,121	40,2	2,2
3	0,190	0,138	53,1	6,8	0,205	0,240	50,3	3,0	0,115	0,137	44,9	3,2
3,5	0,000	0,000	53,1	6,8	0,000	0,000	50,3	3,0	0,000	0,000	44,9	3,2
4	0,022	0,026	62,5	7,9	0,036	0,281	58,8	3,9	0,030	0,033	55,8	4,0
5	0,037	0,042	68,6	8,2	0,056	0,027	63,5	4,4	0,047	0,050	61,7	4,0
7	0,027	0,030	64,1	7,6	0,037	0,017	58,6	3,4	0,033	0,034	56,6	3,5
100%	0,255				0,457				0,290			
Zeit (h)	Pt-3-ara				Pn-3-glc				Mv-3-gal			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,002	0,002	0,9	0,1	0,004	0,004	1,1	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,039	0,037	23,5	0,8	0,098	0,097	24,6	0,0	0,018	0,018	21,6	0,2
1	0,045	0,052	32,3	1,6	0,113	0,132	31,9	1,9	0,022	0,026	29,1	2,0
2	0,062	0,070	42,2	1,6	0,153	0,176	42,8	2,1	0,029	0,035	38,9	3,0
3	0,069	0,081	48,0	3,1	0,169	0,208	48,9	4,8	0,031	0,038	41,9	4,1
3,5	0,000	0,000	48,0	3,1	0,000	0,000	48,9	4,8	0,000	0,000	41,9	4,1
4	0,019	0,020	60,1	3,5	0,050	0,054	62,0	5,5	0,010	0,010	53,7	4,5
5	0,035	0,035	69,6	3,4	0,088	0,095	72,0	6,1	0,019	0,020	64,8	5,3
7	0,029	0,030	66,3	3,4	0,072	0,075	67,4	5,4	0,018	0,018	63,1	4,3
100%	0,162				0,397				0,085			
Zeit (h)	Mv-3-glc				Mv-3-ara							
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)					
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD				
0	0,003	0,003	1,0	0,1	0,000	0,000	0,0	0,0				
0,5	0,067	0,063	22,4	0,8	0,019	0,017	19,8	1,6				
1	0,077	0,088	29,5	1,4	0,021	0,025	26,4	1,9				
2	0,106	0,122	40,6	2,1	0,029	0,033	36,7	1,5				
3	0,116	0,138	45,3	3,3	0,032	0,039	41,6	3,9				
3,5	0,000	0,000	45,3	3,3	0,000	0,000	41,6	3,9				
4	0,029	0,032	56,0	4,0	0,009	0,011	52,8	5,3				
5	0,054	0,060	65,0	4,8	0,019	0,019	62,6	3,9				
7	0,044	0,047	61,0	4,2	0,017	0,017	61,0	4,2				
100%	0,290				0,089							

Tabelle 7-12: Daten zur Anthocyan-Freisetzung aus Anthocyan-Kollagen-Pektin-Kugeln P3KB während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomabeutelinhalt. Mittels HPLC-DAD ermitteltes Peakflächenverhältnis F_{Peak}/F_{STD} im Überstand zu definierten Zeitpunkten (0 h bis 7 h) sowie nach vollständiger Anthocyanextraktion aus dem Material (100 %). Anthocyan-Freisetzung AFS (%), zur Berechnung siehe Abschnitt 4.3.8.5.6. Weitere enthaltene Anthocyane aufgrund fehlender Peaktrennung (Cy-3-ara, Pt-3-gal) oder geringem Gehalt (Pn-3-gal, Pn-3-ara) nicht bestimmt. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Zeit (h)	Dp-3-gal				Dp-3-glc				Dp-3-ara			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,001	0,000	0,7	1,0	0,001	0,002	1,2	0,2	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,032	0,027	31,8	3,5	0,046	0,043	29,2	1,6	0,024	0,022	26,2	1,7
1	0,039	0,041	43,7	1,5	0,065	0,067	43,4	1,0	0,035	0,037	40,6	2,0
2	0,051	0,052	56,3	0,7	0,085	0,084	55,6	0,1	0,047	0,050	54,4	2,2
3	0,052	0,051	56,3	0,6	0,086	0,087	56,8	0,5	0,050	0,050	56,4	0,2
3,5	0,000	0,000	56,3	0,6	0,004	0,003	59,1	0,2	0,002	0,002	59,0	0,3
4	0,003	0,002	59,0	1,0	0,005	0,003	59,3	0,2	0,002	0,002	58,7	0,2
5	0,002	0,002	58,8	0,8	0,004	0,003	59,0	0,2	0,003	0,002	68,8	0,8
7	0,002	0,002	58,8	0,7	0,002	0,002	57,9	0,4	0,001	0,000	57,1	1,2
100%	0,092				0,152				0,089			
Zeit (h)	Cy-3-gal				Cy-3-glc				Pt-3-glc			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,002	0,002	2,2	0,2	0,003	0,003	1,9	0,0	0,002	0,000	1,3	1,8
0,5	0,039	0,037	42,1	1,4	0,070	0,066	42,9	1,9	0,042	0,039	48,1	2,1
1	0,050	0,051	56,2	1,3	0,089	0,089	56,2	0,1	0,053	0,052	62,0	0,1
2	0,057	0,057	63,6	0,3	0,103	0,102	64,7	0,3	0,059	0,057	68,2	1,7
3	0,057	0,057	63,4	0,1	0,102	0,102	64,4	0,1	0,057	0,057	67,2	0,6
3,5	0,003	0,002	66,2	0,4	0,005	0,004	67,5	0,4	0,000	0,000	67,2	0,6
4	0,003	0,002	66,0	0,6	0,005	0,004	67,2	0,3	0,006	0,006	74,3	0,8
5	0,002	0,002	65,6	0,5	0,004	0,003	66,5	0,4	0,006	0,005	73,6	1,4
7	0,000	0,000	63,4	0,1	0,002	0,002	65,6	0,0	0,004	0,004	71,8	0,8
100%	0,090				0,158				0,085			
Zeit (h)	Pt-3-ara				Pn-3-glc				Mv-3-gal			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,002	0,000	1,4	1,9	0,003	0,003	2,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,027	0,026	46,7	1,7	0,068	0,067	45,4	0,7	0,013	0,012	38,4	0,9
1	0,035	0,036	62,0	0,1	0,089	0,092	61,0	1,4	0,018	0,018	54,6	1,2
2	0,041	0,040	71,0	1,9	0,103	0,105	70,3	1,1	0,021	0,022	66,4	1,7
3	0,041	0,039	70,0	1,5	0,102	0,105	69,5	1,3	0,021	0,021	64,7	0,0
3,5	0,002	0,002	73,7	1,7	0,010	0,009	76,1	0,7	0,000	0,000	64,7	0,0
4	0,002	0,002	73,6	2,4	0,011	0,009	76,2	0,5	0,001	0,000	66,4	2,5
5	0,002	0,002	72,9	1,6	0,009	0,008	75,2	0,9	0,002	0,001	69,7	1,6
7	0,001	0,000	71,1	3,1	0,005	0,005	73,0	1,2	0,000	0,000	64,7	0,0
100%	0,057				0,148				0,033			
Zeit (h)	Mv-3-glc				Mv-3-ara							
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)					
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD				
0	0,002	0,000	0,7	1,0	0,000	0,000	0,0	0,0				
0,5	0,046	0,043	35,2	1,7	0,012	0,012	30,0	0,7				
1	0,063	0,065	50,4	1,1	0,018	0,018	45,0	0,6				
2	0,078	0,079	61,9	0,4	0,024	0,023	58,8	0,4				
3	0,078	0,078	61,3	0,1	0,024	0,024	59,9	1,2				
3,5	0,000	0,000	61,3	0,1	0,000	0,000	59,9	1,2				
4	0,005	0,004	65,0	0,7	0,002	0,002	65,0	1,2				
5	0,005	0,004	65,1	0,4	0,003	0,002	66,0	2,3				
7	0,005	0,004	64,8	0,4	0,003	0,002	65,7	2,0				
100%	0,127				0,040							

Tabelle 7-13: Daten zur Anthocyan-Freisetzung aus ungecoateten APK P4BG während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomabeutelinhalt. Mittels HPLC-DAD ermitteltes Peakflächenverhältnis F_{Peak}/F_{STD} im Überstand zu definierten Zeitpunkten (0 h bis 7 h) sowie nach vollständiger Anthocyanextraktion aus dem Material (100 %). Weitere enthaltene Anthocyane aufgrund fehlender Peaktrennung (Cy-3-ara, Pt-3-gal) oder geringem Gehalt (Pn-3-gal, Pn-3-ara) nicht bestimmt. Anthocyan-Freisetzung AFS (%), zur Berechnung siehe Abschnitt 4.3.8.5.6. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Zeit (h)	Dp-3-gal				Dp-3-glc				Dp-3-ara			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,009	0,004	1,6	1,0	0,011	0,005	1,6	1,0	0,008	0,003	1,4	1,0
0,5	0,168	0,124	36,0	7,6	0,209	0,152	37,1	8,4	0,148	0,105	33,4	8,0
1	0,225	0,223	55,2	0,4	0,277	0,276	56,9	0,2	0,196	0,197	51,9	0,2
2	0,232	0,214	54,9	3,1	0,285	0,258	55,9	3,9	0,205	0,189	51,9	3,0
3	0,264	0,272	65,9	1,4	0,319	0,329	66,7	1,5	0,236	0,244	63,2	1,4
3,5	0,012	0,013	69,1	1,5	0,015	0,015	69,9	1,5	0,009	0,009	65,6	1,5
4	0,023	0,027	72,1	2,2	0,026	0,031	72,6	2,3	0,018	0,021	68,3	2,1
5	0,021	0,020	71,0	1,3	0,024	0,024	71,7	1,4	0,015	0,013	66,9	1,2
7	0,004	0,005	67,0	1,7	0,005	0,007	67,9	1,7	0,003	0,005	64,3	1,7
100%	0,406				0,485				0,379			
Zeit (h)	Cy-3-gal				Cy-3-glc				Pt-3-glc			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,009	0,005	2,5	1,0	0,014	0,008	2,5	0,9	0,003	0,004	2,3	0,8
0,5	0,148	0,108	46,7	11	0,250	0,191	49,0	9,4	0,066	0,086	49,3	9,3
1	0,185	0,194	69,2	2,3	0,314	0,321	70,6	1,2	0,109	0,106	69,9	1,3
2	0,187	0,178	66,7	2,3	0,317	0,298	68,5	3,0	0,099	0,107	67,5	3,7
3	0,196	0,202	72,6	1,6	0,331	0,344	75,1	2,1	0,114	0,111	73,3	1,1
3,5	0,007	0,007	75,0	1,6	0,010	0,011	77,5	2,2	0,005	0,004	76,3	1,3
4	0,008	0,013	76,4	3,0	0,017	0,019	79,0	2,3	0,008	0,007	78,1	1,5
5	0,009	0,009	76,0	1,6	0,012	0,012	77,7	1,9	0,007	0,006	77,4	1,4
7	0,001	0,002	73,2	1,9	0,003	0,003	75,7	2,1	0,003	0,002	74,7	1,7
100%	0,274				0,450				0,153			
Zeit (h)	Pt-3-ara				Pn-3-glc				Mv-3-gal			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,003	0,002	2,1	0,6	0,008	0,004	2,4	1,0	0,001	0,000	2,7	0,3
0,5	0,061	0,047	47,0	8,9	0,146	0,110	48,6	9,5	0,026	0,021	48,3	7,1
1	0,075	0,080	67,2	2,6	0,177	0,183	68,4	1,8	0,030	0,036	67,3	9,5
2	0,079	0,073	66,1	3,8	0,180	0,169	66,5	3,0	0,032	0,034	67,8	3,6
3	0,083	0,086	73,1	1,7	0,189	0,201	74,1	3,3	0,038	0,036	75,1	3,3
3,5	0,004	0,005	76,9	2,4	0,006	0,008	76,8	3,7	0,001	0,002	78,7	2,3
4	0,006	0,008	79,2	2,4	0,013	0,016	79,6	4,2	0,004	0,004	83,6	3,6
5	0,008	0,008	80,1	2,0	0,015	0,017	80,1	3,6	0,005	0,004	84,4	3,4
7	0,005	0,008	78,1	2,6	0,012	0,015	79,3	4,1	0,004	0,005	84,1	2,2
100%	0,115				0,263				0,049			
Zeit (h)	Mv-3-glc				Mv-3-ara							
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)					
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD				
0	0,003	0,007	1,8	0,9	0,001	0,002	1,8	0,5				
0,5	0,099	0,138	39,1	9,2	0,032	0,042	36,4	7,1				
1	0,178	0,178	58,7	0,0	0,054	0,054	53,4	0,2				
2	0,169	0,183	58,1	3,4	0,051	0,058	53,9	4,6				
3	0,211	0,203	68,2	1,8	0,065	0,065	64,6	0,2				
3,5	0,010	0,009	71,4	2,0	0,007	0,005	70,5	1,1				
4	0,022	0,011	73,6	4,4	0,012	0,011	75,8	0,7				
5	0,022	0,021	75,3	1,9	0,011	0,009	74,8	1,6				
7	0,014	0,012	72,5	2,3	0,009	0,006	72,0	1,8				
100%	0,303				0,101							

Tabelle 7-14: Daten zur Anthocyan-Freisetzung aus ungecoateten APK P4BGwSch19 während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomabeutelinhalt. Mittels HPLC-DAD ermitteltes Peakflächenverhältnis $F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$ im Überstand zu definierten Zeitpunkten (0 h bis 7 h) sowie nach vollständiger Anthocyanextraktion aus dem Material (100 %). Anthocyan-Freisetzung AFS (%), zur Berechnung siehe Abschnitt 4.3.8.5.6. Weitere enthaltene Anthocyane aufgrund fehlender Peaktrennung (Cy-3-ara, Pt-3-gal) oder geringem Gehalt (Pn-3-gal, Pn-3-ara) nicht bestimmt. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Zeit (h)	Dp-3-gal				Dp-3-glc				Dp-3-ara			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,007	0,006	1,9	0,1	0,007	0,007	1,8	0,1	0,006	0,005	1,7	0,0
1	0,020	0,020	5,9	0,1	0,025	0,024	6,0	0,3	0,018	0,018	5,5	0,0
2	0,024	0,039	9,2	3,1	0,029	0,048	9,4	3,3	0,021	0,035	8,7	3,0
3	0,054	0,047	14,7	1,5	0,066	0,056	15,0	1,8	0,047	0,042	13,8	1,2
3,5	0,003	0,004	15,7	1,2	0,007	0,005	16,0	1,5	0,002	0,003	14,6	0,9
4	0,006	0,009	16,8	0,9	0,003	0,009	17,0	1,3	0,004	0,006	15,4	0,8
5	0,010	0,009	17,5	1,7	0,014	0,013	18,4	1,9	0,009	0,009	16,6	1,2
7	0,008	0,002	16,1	2,6	0,008	0,009	16,5	2,6	0,005	0,004	15,3	1,5
100%	0,342				0,408				0,320			
Zeit (h)	Cy-3-gal				Cy-3-glc				Pt-3-glc			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,006	0,008	3,0	0,5	0,010	0,013	3,0	0,4	0,004	0,003	2,8	0,5
1	0,017	0,019	7,7	0,5	0,028	0,032	7,9	0,9	0,011	0,009	7,7	1,1
2	0,020	0,034	11,8	4,1	0,035	0,058	12,3	4,3	0,019	0,011	11,8	4,0
3	0,043	0,040	18,8	0,7	0,072	0,068	18,6	0,6	0,022	0,024	18,2	1,2
3,5	0,002	0,003	19,1	0,4	0,005	0,007	20,1	0,3	0,002	0,002	19,8	1,1
4	0,004	0,005	19,8	0,4	0,008	0,010	21,0	0,2	0,003	0,004	21,1	1,7
5	0,008	0,008	21,6	0,8	0,012	0,012	21,7	0,5	0,004	0,005	21,6	1,6
7	0,004	0,002	19,4	1,3	0,005	0,003	19,6	1,1	0,001	0,003	19,7	2,1
100%	0,231				0,379				0,128			
Zeit (h)	Pt-3-ara				Pn-3-glc				Mv-3-gal			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,002	0,003	2,6	0,3	0,005	0,007	2,8	0,4	0,002	0,001	3,5	1,1
1	0,007	0,008	7,5	0,8	0,016	0,017	7,4	0,6	0,003	0,004	8,1	1,0
2	0,008	0,014	11,6	4,2	0,018	0,033	11,7	4,4	0,004	0,007	13,7	5,4
3	0,018	0,016	17,7	1,4	0,042	0,038	18,1	1,2	0,007	0,008	18,6	1,8
3,5	0,002	0,001	19,3	1,5	0,002	0,003	19,4	1,0	0,000	0,001	19,8	3,5
4	0,003	0,003	20,9	1,5	0,005	0,007	20,8	0,6	0,001	0,001	21,5	1,8
5	0,005	0,004	22,4	1,9	0,009	0,011	22,6	0,8	0,002	0,002	24,2	2,3
7	0,006	0,002	22,2	4,3	0,013	0,005	22,3	3,8	0,003	0,001	24,4	1,5
100%	0,095				0,221				0,041			
Zeit (h)	Mv-3-glc				Mv-3-ara							
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)					
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD				
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0				
0,5	0,006	0,005	2,2	0,3	0,002	0,002	2,4	0,1				
1	0,017	0,016	6,3	0,3	0,005	0,005	6,2	0,3				
2	0,032	0,019	9,9	3,6	0,009	0,006	9,2	2,8				
3	0,039	0,042	15,8	0,9	0,012	0,013	14,8	0,4				
3,5	0,004	0,002	16,9	0,5	0,003	0,000	16,6	2,2				
4	0,007	0,005	19,3	0,1	0,004	0,004	21,1	2,3				
5	0,011	0,011	23,5	0,1	0,004	0,003	25,5	2,9				
7	0,005	0,013	27,0	2,2	0,002	0,005	29,5	0,6				
100%	0,258				0,085							

Tabelle 7-15: Daten zur Anthocyan-Freisetzung aus ungecoateten APK P4BGwSch15 während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomabeutelinhalt. Mittels HPLC-DAD ermitteltes Peakflächenverhältnis F_{Peak}/F_{STD} im Überstand zu definierten Zeitpunkten (0 h bis 7 h) sowie nach vollständiger Anthocyanextraktion aus dem Material (100 %). Anthocyan-Freisetzung AFS (%), zur Berechnung siehe Abschnitt 4.3.8.5.6. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Zeit (h)	Dp-3-gal				Dp-3-glc				Dp-3-ara			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,017	0,015	4,4	0,3	0,020	0,019	4,6	0,2	0,014	0,013	4,1	0,1
1	0,031	0,065	13,5	6,9	0,037	0,078	13,6	6,9	0,027	0,058	12,9	6,7
2	0,078	0,106	26,0	5,7	0,094	0,129	26,5	5,8	0,068	0,093	24,4	5,3
3	0,093	0,154	35,0	12	0,113	0,187	35,7	12	0,082	0,140	33,6	12
3,5	0,009	0,010	37,6	13	0,010	0,013	38,5	13	0,007	0,007	35,7	12
4	0,017	0,020	40,2	13	0,021	0,023	40,9	13	0,013	0,015	37,8	13
5	0,020	0,017	40,3	12	0,025	0,021	41,2	12	0,015	0,013	37,7	12
7	0,015	0,007	38,1	11	0,015	0,008	38,4	11	0,007	0,004	35,4	12
100%	0,352				0,421				0,331			
Zeit (h)	Cy-3-gal				Cy-3-glc				Pt-3-glc			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,014	0,018	6,7	1,2	0,023	0,029	6,6	1,0	0,008	0,010	6,9	1,3
1	0,036	0,051	18,2	4,3	0,061	0,087	18,8	4,7	0,020	0,029	18,4	4,6
2	0,064	0,083	31,0	5,7	0,108	0,141	31,6	5,9	0,036	0,047	30,9	5,9
3	0,076	0,116	40,2	12	0,127	0,199	41,4	13	0,043	0,064	39,8	11
3,5	0,006	0,008	43,1	13	0,011	0,009	44,0	13	0,004	0,003	42,3	11
4	0,011	0,010	44,7	12	0,017	0,017	45,7	13	0,007	0,006	47,0	11
5	0,014	0,010	45,1	11	0,022	0,014	46,0	12	0,009	0,006	52,7	8,6
7	0,006	0,004	42,1	11	0,006	0,004	42,6	13	0,004	0,002	55,1	7,4
100%	0,238				0,395				0,133			
Zeit (h)	Pt-3-ara				Pn-3-glc				Mv-3-gal			
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,006	0,008	7,0	1,1	0,012	0,015	5,9	0,9	0,003	0,003	7,0	0,9
1	0,014	0,021	17,4	4,5	0,033	0,047	17,0	4,4	0,007	0,011	20,4	5,7
2	0,025	0,033	29,0	5,9	0,060	0,080	29,6	6,0	0,013	0,018	35,5	7,9
3	0,030	0,043	36,4	9,1	0,072	0,102	36,8	8,9	0,016	0,024	45,8	13
3,5	0,003	0,003	39,5	8,9	0,007	0,006	39,7	8,6	0,001	0,002	49,5	14
4	0,006	0,006	42,3	9,2	0,012	0,014	42,5	9,7	0,003	0,004	53,8	14
5	0,010	0,008	45,1	7,5	0,021	0,017	44,9	7,9	0,004	0,005	57,1	13
7	0,013	0,007	46,3	5,4	0,028	0,017	46,4	5,5	0,008	0,005	61,7	8,1
100%	0,100				0,236				0,043			
Zeit (h)	Mv-3-glc				Mv-3-ara							
	F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)		F_{Peak}/F_{STD}		AFS (%)					
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD				
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0				
0,5	0,014	0,014	5,2	0,2	0,004	0,004	4,4	0,3				
1	0,027	0,048	14,3	5,7	0,008	0,016	13,6	5,7				
2	0,062	0,080	26,9	4,8	0,017	0,025	24,2	6,5				
3	0,073	0,125	37,4	14	0,023	0,032	30,7	7,3				
3,5	0,008	0,008	40,5	14	0,004	0,002	34,1	5,4				
4	0,014	0,017	46,5	15	0,004	0,007	40,5	7,9				
5	0,024	0,022	55,0	14	0,006	0,006	47,0	7,5				
7	0,028	0,014	62,9	11	0,010	0,007	56,7	4,6				
100%	0,265				0,088							

Tabelle 7-16: Daten zur Anthocyan-Freisetzung aus ungecoateten APK P4BGwSch8 während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomabeutelinhalt. Mittels HPLC-DAD ermitteltes Peakflächenverhältnis $F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$ im Überstand zu definierten Zeitpunkten (0 h bis 7 h) sowie nach vollständiger Anthocyanextraktion aus dem Material (100 %). Anthocyan-Freisetzung AFS (%), zur Berechnung siehe Abschnitt 4.3.8.5.6. Weitere enthaltene Anthocyane aufgrund fehlender Peaktrennung (Cy-3-ara, Pt-3-gal) oder geringem Gehalt (Pn-3-gal, Pn-3-ara) n.b. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung. n.b. - nicht bestimmt. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Zeit (h)	Dp-3-gal				Dp-3-glc				Dp-3-ara			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,121	0,116	31,0	0,8	0,147	0,142	31,7	0,8	0,104	0,100	28,5	0,8
1	0,163	0,180	44,9	3,2	0,197	0,220	46,0	3,6	0,142	0,157	41,9	2,9
2	n.b.	0,240	62,9	-	n.b.	0,297	65,3	-	n.b.	0,212	59,3	-
3	0,248	0,273	68,3	4,7	0,307	0,336	72,2	4,6	0,222	0,245	65,4	4,6
3,5	0,031	0,029	76,2	4,5	0,033	0,032	77,9	4,5	0,022	0,019	71,0	4,0
4	0,041	0,042	79,2	5,0	0,045	0,048	81,0	5,1	0,029	0,031	73,8	5,1
5	0,028	0,028	75,7	4,8	0,031	0,034	77,8	5,1	0,020	0,020	71,0	4,6
7	0,006	0,004	69,6	4,4	0,010	0,009	72,9	4,4	0,005	0,005	66,7	4,5
100%	0,381				0,454				0,357			
Zeit (h)	Cy-3-gal				Cy-3-glc				Pt-3-glc			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,100	0,099	38,7	0,3	0,171	0,172	40,0	0,1	0,056	0,056	39,0	0,0
1	0,134	0,150	55,5	4,4	0,231	0,253	56,5	3,6	0,078	0,084	56,4	3,1
2	n.b.	0,190	74,2	-	n.b.	0,328	76,5	-	n.b.	0,106	74,0	-
3	0,190	0,209	77,6	5,2	0,312	0,353	78,6	5,3	0,106	0,114	76,6	3,7
3,5	0,014	0,005	83,3	5,6	0,023	0,022	83,7	5,1	0,009	0,009	83,0	3,5
4	0,018	0,015	84,9	5,5	0,028	0,027	85,0	5,1	0,010	0,011	83,9	4,3
5	0,011	0,019	82,4	5,6	0,016	0,017	82,4	5,4	0,009	0,009	82,8	3,5
7	0,002	0,013	78,0	4,6	0,003	0,002	79,3	5,1	0,002	0,002	78,8	3,7
100%	0,256				0,429				0,286			
Zeit (h)	Pt-3-ara				Pn-3-glc				Mv-3-gal			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,040	0,040	37,0	0,1	0,098	0,093	38,0	1,2	0,021	0,020	40,0	1,5
1	0,056	0,060	54,0	2,6	0,131	0,138	53,7	2,2	0,028	0,032	57,3	4,5
2	n.b.	0,074	69,2	-	n.b.	0,177	70,6	-	n.b.	0,041	78,0	-
3	0,079	0,082	75,1	2,0	0,181	0,194	74,6	3,7	0,042	0,045	83,3	3,1
3,5	0,008	0,009	83,0	2,5	0,017	0,018	81,6	3,8	0,005	0,005	92,9	2,4
4	0,011	0,012	85,9	2,9	0,026	0,027	85,1	4,0	0,007	0,007	96,9	2,6
5	0,012	0,013	87,0	2,9	0,024	0,027	84,9	4,6	0,008	0,009	99,8	3,6
7	0,006	0,005	80,5	1,3	0,020	0,018	82,4	3,1	0,008	0,006	97,3	0,7
100%	0,107				0,251				0,052			
Zeit (h)	Mv-3-glc				Mv-3-ara							
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)					
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD				
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0				
0,5	0,094	0,095	32,9	0,3	0,031	0,026	29,5	3,1				
1	0,128	0,142	47,2	3,3	0,041	0,041	42,4	0,5				
2	n.b.	0,186	64,9	-	n.b.	0,053	54,5	-				
3	0,188	0,212	70,0	5,9	0,062	0,059	62,4	2,6				
3,5	0,022	0,025	71,5	6,5	0,012	0,007	72,1	5,8				
4	0,035	0,039	83,0	6,9	0,014	0,011	75,4	5,2				
5	0,031	0,037	81,8	7,3	0,015	0,010	74,9	6,4				
7	0,020	0,019	76,8	5,8	0,012	0,007	72,3	6,1				
100%	0,286				0,097							

Tabelle 7-17: Daten zur Anthocyan-Freisetzung aus mit Schellack/HPMC gecoateten APK HPMC15 während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomabeutelinhalt. Mittels HPLC-DAD ermitteltes Peakflächenverhältnis $F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$ im Überstand zu definierten Zeitpunkten (0 h bis 7 h) sowie nach vollständiger Anthocyanextraktion aus dem Material (100 %). Anthocyan-Freisetzung AFS (%), zur Berechnung siehe Abschnitt 4.3.8.5.6. Weitere enthaltene Anthocyane aufgrund fehlender Peaktrennung (Cy-3-ara, Pt-3-gal) oder geringem Gehalt (Pn-3-gal, Pn-3-ara, Pt-3-ara, Mv-3-ara) nicht bestimmt. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

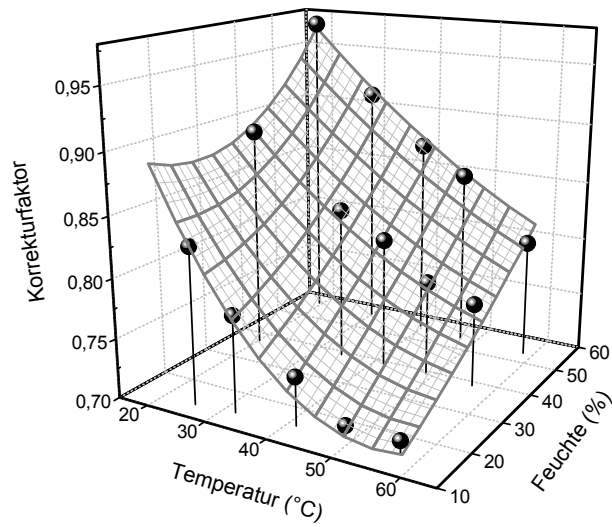
Zeit (h)	Dp-3-gal				Dp-3-glc				Dp-3-ara			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,001	0,000	0,2	0,3	0,001	0,000	0,2	0,3	0,001	0,000	0,3	0,4
1	0,003	0,002	1,4	0,3	0,003	0,003	1,2	0,0	0,002	0,002	1,2	0,1
2	0,005	0,005	3,1	0,1	0,007	0,006	2,9	0,1	0,004	0,004	2,9	0,3
3	0,008	0,007	4,8	0,7	0,011	0,010	4,9	0,4	0,007	0,006	4,3	0,6
3,5	0,002	0,001	5,8	1,2	0,003	0,002	5,9	0,8	0,002	0,000	5,0	1,5
4	0,004	0,002	6,6	1,8	0,006	0,002	6,6	1,6	0,003	0,000	5,5	2,2
5	0,007	0,004	8,2	1,9	0,009	0,006	8,2	1,5	0,005	0,003	7,2	1,5
7	0,012	0,012	12,1	1,0	0,016	0,015	12,0	1,0	0,008	0,008	10,3	0,6
100%	0,161				0,220				0,142			
Zeit (h)	Cy-3-gal				Cy-3-glc				Pn-3-glc			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,001	0,000	0,3	0,4	0,001	0,000	0,0	0,3	0,000	0,001	0,3	0,4
1	0,001	0,002	1,6	0,2	0,002	0,003	1,4	0,2	0,002	0,002	1,3	0,1
2	0,004	0,004	3,5	0,2	0,007	0,007	3,7	0,1	0,005	0,004	3,1	0,1
3	0,006	0,005	5,0	1,0	0,011	0,009	5,5	0,7	0,006	0,007	4,7	0,5
3,5	0,001	0,000	5,7	1,9	0,004	0,002	7,2	1,2	0,000	0,002	5,4	1,4
4	0,004	0,001	7,3	2,5	0,006	0,002	7,8	2,2	0,002	0,004	6,8	1,6
5	0,005	0,003	8,6	2,3	0,008	0,005	9,0	1,7	0,005	0,007	8,7	1,7
7	0,010	0,007	13,1	2,5	0,014	0,011	12,4	1,9	0,011	0,012	12,6	1,1
100%	0,106				0,182				0,146			
Zeit (h)	Mv-3-gal				Mv-3-glc				Pt-3-glc			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,001	0,000	0,5	0,8	0,001	0,000	0,2	0,3	0,000	0,001	0,3	0,4
1	0,002	0,000	1,3	1,8	0,002	0,002	1,2	0,0	0,002	0,002	1,3	0,1
2	0,002	0,001	2,9	1,2	0,005	0,005	3,3	0,0	0,005	0,004	3,2	0,1
3	0,004	0,003	5,5	0,9	0,008	0,007	5,3	0,5	0,006	0,007	4,7	0,5
3,5	0,001	0,000	5,9	2,1	0,002	0,002	6,7	0,3	0,000	0,002	5,4	1,4
4	0,003	0,000	7,2	3,9	0,004	0,003	7,7	1,3	0,002	0,004	6,8	1,6
5	0,004	0,002	9,9	3,3	0,003	0,006	10,1	1,0	0,005	0,007	8,7	1,7
7	0,007	0,006	14,4	1,8	0,013	0,015	14,5	0,1	0,011	0,012	12,6	1,1
100%	0,065				0,144				0,146			

Tabelle 7-18: Daten zur Anthocyan-Freisetzung aus mit Schellack/HPMC gecoateten APK HPMC5 während Inkubation in Magensaftsimulanz und Ileostomabeutelinhalt. Mittels HPLC-DAD ermitteltes Peakflächenverhältnis $F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$ im Überstand zu definierten Zeitpunkten (0 h bis 7 h) sowie nach vollständiger Anthocyanextraktion aus dem Material (100 %). Anthocyan-Freisetzung AFS (%), zur Berechnung siehe Abschnitt 4.3.8.5.6. Weitere enthaltene Anthocyane aufgrund fehlender Peaktrennung (Cy-3-ara, Pt-3-gal) oder geringem Gehalt (Pn-3-gal, Pn-3-ara, Pt-3-ara, Mv-3-ara) nicht bestimmt. MW - Mittelwert, SD - Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.8.5.

Zeit (h)	Dp-3-gal				Dp-3-glc				Dp-3-ara			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
1	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
2	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
3	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
3,5	0,001	0,002	0,7	0,3	0,000	0,001	0,2	0,3	0,000	0,001	0,2	0,3
4	0,001	0,003	1,0	0,7	0,000	0,004	0,6	0,9	0,000	0,002	0,4	0,6
5	0,002	0,004	1,1	0,7	0,002	0,005	1,2	0,6	0,001	0,002	0,9	0,5
7	0,002	0,004	1,3	0,7	0,002	0,005	1,2	0,7	0,001	0,003	1,1	0,6
100%	0,223				0,306				0,197			
Zeit (h)	Cy-3-gal				Cy-3-glc				Pn-3-glc			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
1	0,000	0,001	0,4	0,5	0,000	0,002	0,3	0,5	0,000	0,000	0,0	0,0
2	0,001	0,002	1,1	0,7	0,001	0,004	1,1	0,8	0,000	0,000	0,0	0,0
3	0,002	0,004	1,9	0,8	0,004	0,007	2,0	0,8	0,000	0,000	0,0	0,0
3,5	0,000	0,001	2,2	1,3	0,003	0,004	3,3	1,0	0,002	0,002	1,0	0,2
4	0,000	0,002	2,6	1,8	0,003	0,006	3,7	1,6	0,004	0,002	1,5	0,5
5	0,001	0,003	3,1	1,5	0,003	0,005	3,6	1,5	0,005	0,002	1,7	1,0
7	0,001	0,002	3,1	1,4	0,003	0,002	2,9	0,7	0,005	0,002	1,7	1,0
100%	0,147				0,257				0,204			
Zeit (h)	Mv-3-gal				Mv-3-glc				Pt-3-glc			
	$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)		$F_{\text{Peak}}/F_{\text{STD}}$		AFS (%)	
	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD	1	2	MW	SD
0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
0,5	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0	0,000	0,000	0,0	0,0
1	0,000	0,001	0,5	0,8	0,000	0,001	0,4	0,5	0,000	0,000	0,0	0,0
2	0,001	0,002	1,4	0,7	0,001	0,003	1,2	0,6	0,000	0,000	0,0	0,0
3	0,002	0,002	2,3	0,4	0,003	0,005	2,0	0,7	0,000	0,000	0,0	0,0
3,5	0,000	0,001	2,7	0,8	0,002	0,001	2,8	0,6	0,002	0,002	1,0	0,2
4	0,000	0,002	3,4	1,9	0,002	0,004	3,5	1,5	0,002	0,004	1,5	0,5
5	0,001	0,002	3,9	1,6	0,002	0,005	3,9	2,0	0,002	0,005	1,7	1,0
7	0,001	0,003	4,3	1,9	0,002	0,016	4,1	2,1	0,002	0,005	1,7	1,0
100%	0,088				0,197				0,204			

Tabelle 7-19: Daten zur Kalibrierung der Feuchtesensoren. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.7.2.3.

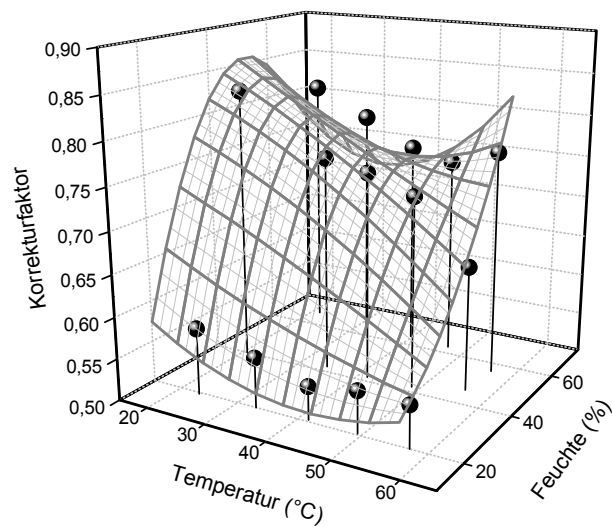
	Frischlufffeuchtesenor		Ablufffeuchtesenor	
	Temperatur	angezeigte rel.	Temperatur	angezeigte rel.
	T (°C)	Feuchte H (%)	T (°C)	Feuchte H (%)
LiCl ₂	25,7	13,6	23,5	19,5
	32,0	14,4	33,1	20,0
	41,4	15,2	41,5	20,6
	48,9	15,6	49,3	20,4
	57,1	15,5	57,3	20,4
MgCl ₂	20,1	37,2	20,6	40,0
	34,3	38,9	34,3	42,1
	41,7	39,0	41,5	41,7
	48,7	39,1	48,8	42,1
	56,5	38,7	56,0	45,9
Mg(NO ₃) ₂	19,4	56,3	21,3	66,5
	29,8	56,3	30,9	65,6
	39,5	55,6	39,7	64,3
	47,4	54,1	46,8	63,1
	58,4	53,5	56,5	56,3



$$k = 1,34275 - 0,02608T - 0,01715H + 2,52265 \cdot 10^{-4}T^2 + 2,21567 \cdot 10^{-4}H^2 + 8,35473 \cdot 10^{-4}TH - 8,76985 \cdot 10^{-6}T^2H - 8,64043 \cdot 10^{-6}TH^2 + 8,62501 \cdot 10^{-8}T^2H^2$$

$$r^2 = 0,99031$$

Abb. 7-1: Polynomischen Model zur Ermittlung der Korrekturfunktion für den Frischluftfeuchtesenor.



$$k = 0,68891 - 0,0362T + 0,00119H + 5,8127 \cdot 10^{-4}T^2 + 8,40671 \cdot 10^{-5}H^2 + 0,00185TH - 3,26147 \cdot 10^{-5}T^2H - 2,43328 \cdot 10^{-5}TH^2 + 4,20656 \cdot 10^{-7}T^2H^2$$

$$r^2 = 0,94547$$

Abb. 7-2: Polynomischen Model zur Ermittlung der Korrekturfunktion für den Abluftfeuchtesenor.

Tabelle 7-20: Darmlänge (cm) bei Untersuchung von APK im murinen Modell der chronischen DSS-Colitis. n.b. - nicht bestimmt. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.9.

Probe	P4B10GwSch19	Placebo P4GwSch19	Kontrolle
	Darmlänge (cm)		
1	10,7	10,0	10,6
2	14,3	11,8	11,0
3	11,8	10,9	10,7
4	10,8	9,8	9,5
5	11,7	11,5	10,0
6	10,6	11,8	10,6
7	n.b	10,7	10,7
8	n.b	9,0	10,9
9	n.b	10,5	9,6
10	n.b	8,2	10,8

Tabelle 7-21: Histologischer Score (cm) bei Untersuchung von APK im murinen Modell der chronischen DSS-Colitis. n.b. - nicht bestimmt. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.9.

Probe	P4B10GwSch19	Placebo P4GwSch19	Kontrolle
	Histologischer Score		
1	6,5	6,0	7,5
2	4,5	4,0	4,5
3	5,0	4,0	6,5
4	5,0	5,5	3,5
5	5,0	5,0	6,0
6	6,0	6,0	7,0
7	n.b	6,5	5,5
8	n.b	7,5	7,5
9	n.b	4,0	6,0
10	n.b	5,5	4,0

Tabelle 7-22: IFN γ (pg/mL) bei Untersuchung von APK im murinen Modell der chronischen DSS-Colitis. n.b. - nicht bestimmt. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.9.

Probe	P4B10GwSch19	Placebo P4GwSch19	Kontrolle
	IFN γ (pg/mL)		
1	14142	15336	25279
2	14239	36554	26894
3	9403	16820	11727
4	9499	34624	14911
5	6358	17612	8918
6	8695	8555	31638
7	n.b.	22874	20038
8	n.b.	36528	5655
9	n.b.	26975	12489
10	n.b.	13174	9786

Tabelle 7-23: IL6 (pg/mL) bei Untersuchung von APK im murinen Modell der chronischen DSS-Colitis. n.b. - nicht bestimmt. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.9.

Probe	P4B10GwSch19	Placebo P4GwSch19	Kontrolle
	IL6 (pg/mL)		
1	736	643	745
2	801	1037	1061
3	770	916	748
4	645	1069	624
5	611	471	497
6	553	496	1067
7	n.b.	828	698
8	n.b.	1389	398
9	n.b.	973	490
10	n.b.	944	566

Tabelle 7-24: Prozentualer Anteil der einzelnen Anthocyane am Gesamtanthocyangehalt (%) in mit Schellack gecoateten APK P4BGwSch19 und in Mausfaeces nach Gabe von mit Schellack gecoateten APK P4BGwSch19. MW - Mittelwert. SD - Standardabweichung. Experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.3.9.4.

	Mausfaeces		P4BGwSch19	
	MW	SD	MW	SD
Anteil am Gesamtanthocyangehalt (%)				
Dp-3-gal (1)	6,6	0,2	10,20	0,02
Dp-3-glc (2)	3,8	0,1	10,89	0,01
Dp-3-ara (3)	14,8	0,1	7,97	0,03
Cy-3-gal (4)	3,9	0,1	6,88	0,01
Cy-3-glc (5)	4,0	0,2	16,52	0,06
Cy-3-ara (6), Pt-3-gal (7)	11,5	0,2	9,07	0,01
Pt-3-glc (8)	4,1	0,1	6,94	0,06
Pt-3-ara (9)	16,2	0,3	6,1	0,3
Pn-3-glc (11)	2,5	0,4	6,36	0,04
Pn-3-ara (12)	2,5	0,2	0,89	0,01
Mv-3-gal (13)	4,6	0,1	4,90	0,03
Mv-3-glc (14)	3,1	0,1	6,67	0,03
Mv-3-ara (15)	21,1	0,2	5,09	0,01