

***Ex-vivo*-Studien zum intestinalen Metabolismus von Flavonoiden**

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

vorgelegt von
Samira Labib
aus Casablanca/Marokko

Würzburg 2006

Eingereicht am

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meiner Familie

Publikationsliste

Veröffentlichungen

Labib, S., Erb, A., Kraus, M., Wickert, T., Richling, E., The pig caecum model: A suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids. *Mol. Nutr. Food Res.* **2004**, *48*, 326-332.

Labib, S., Hummel, S., Richling, E., Humpf, H. U., Schreier, P., Use of the pig caecum model to mimic the human intestinal metabolism of hispidulin and related compounds. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 78-86.

Vorträge

Korte, G., Labib, S., Kraus, M., Kavvadias, D., Richling, E., Schreier, P., Flavonoid-Synthesen und Studien zu immunmodulatorischen/neuroprotektiven Effekten von Edukten und Metaboliten. DFG-Verbundforschungsprogramm, Potsdam, 28. November **2003**.

Labib, S., Erb, A., Kraus, M., Wickert, T., Richling, E., Schreier, P., Studien zum Metabolismus ausgewählter Flavonoide im Schweine-Caecum-Modell. Jahrestagung des Regionalverbandes Bayern der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Fachgruppe der GDCH, Erlangen, 07. März **2005**.

Elss, S., Grünewald, L., Feldmeier, P., Stingel, D., Labib, S., Richling, E., Schreier, P., Acide 2-ethylhexanoïque : contaminant chimique dans les aliments conditionnés dans des récipients de verre. Analyse et métabolisme.

Symposium Euro-Magrébin sur les contaminants biologiques, chimiques et la sécurité alimentaire, Fès/Maroc, 7.-9. Septembre **2005**.

Posterbeitrag

Labib, S., Erb, A., Kraus, M., Wickert, T., Schreier, P., Richling, E., Schweine-Caecum –
Ein *ex vivo*-Modell zum Studium der intestinalen Metabolisierung von Flavonoiden.

33. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Bonn, 13.-15. September **2004**.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	KENNTNISSTAND.....	3
2.1	CHEMIE, VORKOMMEN UND AUFNAHME VON FLAVONOIDEN.....	3
2.2	BIOGENESE UND FUNKTION VON FLAVONOIDEN IN PFLANZEN	8
2.3	ERNÄHRUNGSPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON FLAVONOIDEN	10
2.3.1	<i>Antioxidative Eigenschaften</i>	<i>11</i>
2.3.2	<i>Schutz vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen</i>	<i>13</i>
2.3.3	<i>Schutz vor Krebserkrankungen.....</i>	<i>14</i>
2.3.4	<i>Weitere biologische Effekte von Flavonoiden</i>	<i>18</i>
2.4	RESORPTION UND BIOVERFÜGBARKEIT VON FLAVONOIDEN	20
2.5	METABOLISIERUNG VON FLAVONOIDEN UND ROLLE DER DICKDARM- FLORA.....	24
2.5.1	<i>Rolle der Dickdarmflora bei der Metabolisierung von Flavonoiden.....</i>	<i>26</i>
2.5.2	<i>Schweine-Caecum: Modell zur Untersuchung des Metabolismus von Flavonoiden.....</i>	<i>31</i>
3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	35
3.1	ETABLIERUNG EINES <i>EX-VIVO</i> -MODELLS ZUR UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION VON INTESTINALER MIKROFLORA MIT FLAVONOIDEN	35
3.1.1	<i>Einleitung und Aufgabenstellung.....</i>	<i>35</i>
3.1.2	<i>Inkubation mit Schweine-Faeces: Vorversuche zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen intestinaler Mikroflora und Flavonoiden</i>	<i>36</i>
3.1.3	<i>Prüfung metabolischer Kompetenz des Caecum-Inhalts: Enzymaktivitäten... </i>	<i>37</i>
3.1.4	<i>pH-Wert des Caecum-Inhalts</i>	<i>39</i>
3.1.5	<i>Interaktion zwischen Flavonoiden und Schweine-Caecum-Mikroflora</i>	<i>39</i>
3.1.5.1	Transformation von Quercetin 1 durch caecale Mikroflora.....	40
3.1.5.2	Transformation von Chrysin 2 durch caecale Mikroflora.....	45
3.1.5.3	Transformation von Naringenin 3 durch caecale Mikroflora	46
3.1.5.4	Transformation von Hesperetin 4 durch caecale Mikroflora.....	48
3.2	ANWENDUNG DES SCHWEINE-CAECUM-MODELLS: STUDIEN ZUM METABOLISMUS AUSGEWÄHLTER FLAVONOIDE	54
3.2.1	<i>Untersuchungen zum Metabolismus von Hispidulin 5.....</i>	<i>54</i>
3.2.2	<i>Untersuchungen zum Metabolismus von Phloridzin 6, Phloretin 7 und Xanthohumol 8.....</i>	<i>58</i>

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.2.1	Umsetzungen von Phloridzin 6 und Phloretin 7	58
3.2.2.2	Umsetzung von Xanthohumol 8	62
3.2.3	<i>Untersuchungen zum Metabolismus von Baicalein 9</i>	63
3.3	STUDIEN ZUR ABHÄNGIGKEIT DER ABBAURATE DER FLAVONOIDE VON DEREN HYDROXYLIERUNGSGRAD	65
3.3.1	<i>Vergleich der Umsetzungsraten ausgewählter Flavonole</i>	65
3.3.1.1	Abbau von Galangin 10	66
3.3.1.2	Abbau von Kämpferol 11	67
3.3.1.3	Abbau von Quercetin 1	69
3.3.1.4	Vergleich der Abbauraten der Flavonole	69
3.3.2	<i>Vergleich der Umsetzungsraten ausgewählter Flavone</i>	70
3.3.2.1	Abbau von Apigenin 12	71
3.3.2.2	Abbau von Luteolin 13	72
3.3.2.3	Abbau von Chrysin 2	73
3.3.2.4	Vergleich der Abbauraten der Flavone	73
3.3.3	<i>Vergleich der Umsetzungsraten ausgewählter Flavonoide</i>	74
3.3.4	<i>Interpretation der Ergebnisse</i>	76
3.4	STUDIEN ZUR INTERAKTION VON FLAVONOIDEN MIT α -GLUCOSIDASEN	84
3.4.1	<i>Einleitung</i>	84
3.4.2	<i>α-Glucosidase-Aktivität im Caecum-Inhalt</i>	85
3.4.3	<i>Studien zur Hemmung von α-Glucosidase durch Flavonoide</i>	87
4	EXPERIMENTALTEIL	89
4.1	MATERIAL	89
4.1.1	<i>Chemikalien</i>	89
4.1.2	<i>Schweine-Faeces</i>	89
4.1.3	<i>Schweine-Caeci</i>	89
4.1.4	<i>API ZYM Testsystem (Testkit)</i>	90
4.1.5	<i>Saccharose/D-Glucose-UV-Testkit</i>	90
4.1.6	<i>Adsorptionsmaterial</i>	90
4.1.7	<i>Dünnschichtchromatographie (DC)</i>	90
4.2	GERÄTE	91
4.2.1	<i>Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)</i>	91
4.2.2	<i>Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)</i>	91
4.2.3	<i>Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)</i>	92
4.2.4	<i>Sonstige Hilfsmittel</i>	93
4.3	ALLGEMEINE ARBEITSVORSCHRIFTEN	94
4.3.1	<i>Inkubations-Vorversuche mit Schweine-Faeces</i>	94

INHALTSVERZEICHNIS

4.3.1.1	Herstellung des Reduktionspuffers A	94
4.3.1.2	Herstellung der Faecessuspensionen	95
4.3.1.3	Anaerobe Inkubation mit Faecessuspensionen	95
4.3.1.4	Aufarbeitung und Analytik der Inkubationsansätze	95
4.3.2	<i>Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Transformation von Flavonoiden durch Schweine-Caecum-Inhalt</i>	96
4.3.2.1	Überprüfung der Vitalität caecaler Mikroflora	96
4.3.2.2	Überprüfung der enzymatischen Aktivität der caecalen Mikroflora mittels API ZYM-Test	97
4.3.2.3	Bestimmung des pH-Wertes im Caecum-Inhalt	98
4.3.2.4	Herstellung des Reduktionspuffers B	98
4.3.2.5	Vorbereitung der Fermentationsversuche	99
4.3.2.6	Präparation des Inokulums und Inkubationsbedingungen	100
4.3.2.7	Aufarbeitung und Analytik der Inkubationsansätze	101
4.3.2.8	Quantifizierung der Metabolite.....	102
4.3.3	<i>Mehrstufigensynthese von Hispidulin 5</i>	102
4.3.3.1	Synthese von Baustein 1	102
4.3.3.1.1	2,4-Dimethoxy-6-hydroxyacetophenon (1)	102
4.3.3.1.2	2,4-Dihydroxy-6-methoxyacetophenon (2)	103
4.3.3.1.3	4-Benzoyloxy-2-hydroxy-6-methoxyacetophenon (3)	104
4.3.3.1.4	4-Benzoyloxy-3,6-dihydroxy-2-methoxyacetophenon (4) (Elb's Persulfat-Oxidation).....	104
4.3.3.1.5	4-Benzoyloxy-2,3-dimethoxy-6-hydroxyacetophenon (5).....	105
4.3.3.2	Synthese von Baustein 2	106
4.3.3.2.1	4-Benzoyloxybenzoesäure (6).....	106
4.3.3.2.2	4-Benzoyloxybenzoesäurechlorid (7).....	106
4.3.3.3	Kondensations-, Umlagerungs- und Zyklisierungsreaktion zum Flavon.....	107
4.3.3.4	Selektive Demethylierung am C-5 und Entfernung von Schutzgruppen.....	108
4.3.4	<i>Studien zur Interaktion von Flavonoiden mit α-Glucosidase</i>	109
4.3.4.1	Bestimmung der α -Glucosidase-Aktivität im Caecum-Inhalt.....	109
4.3.4.2	Untersuchung zur Hemmung der α -Glucosidase durch Flavonoide	109
4.3.4.2.1	Untersuchungen mit PNP-G als Substrat.....	109
4.3.4.2.2	Untersuchungen mit Saccharose als Substrat	110
4.3.4.2.3	Bestimmung des Glucosegehaltes	111
ZUSAMMENFASSUNG		113
SUMMARY.....		118
LITERATURVERZEICHNIS.....		123
ANHANG		149

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>B.</i>	<i>Bacteroides</i>
bidest.	bidestilliert
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>Collision induced dissociation</i>)
CoA	Coenzym A
d_f	Filmdicke der Trennphasen von Kapillartrennsäulen
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
<i>E.</i>	<i>Eubacterium</i>
Ed./Eds.	Editor/Editoren
et al.	und andere (<i>et alii</i>)
etc.	und so weiter (<i>et cetera</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EtOAc	Ethylacetat
eV	Elektronen-Volt
evtl.	eventuell
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie
GLUT 2	Glucose Transporter 2
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)

Abkürzungen

HRGC	Kapillargaschromatographie (<i>High Resolution Gas Chromatography</i>)
IC ₅₀	Konzentration eines Stoffes, bei der eine 50%-ige Inhibierung einer (biochemischen) Wirkung auftritt (<i>inhibitory concentration at 50%</i>)
i. D.	innerer Durchmesser
KBE	Kolonienbildende Einheit
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
λ	Wellenlänge
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LDL	Lipoprotein geringer Dichte (<i>Low Density Lipoproteins</i>)
m	Meter
M	molar (mol/l)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse/Ladungs-Verhältnis
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
N	Normal
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
NADH	reduzierte Form von NAD ⁺
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	reduzierte Form von NADP ⁺
nm	Nanometer
o.g.	oben gennante

Abkürzungen

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Bufferd Saline</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PNP	<i>p</i> -Nitrophenol
PNP-G	<i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-glucoopyranosid
psi	100 psi = 5170 Torr
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP C-18	Umkehrphase (<i>Reversed Phase</i>) mit C ₁₈ -Alkylresten
s.	siehe
SD	Standardabweichung (<i>Standard Deviation</i>)
SGLT1	Natrium-abhängiger Glucose Transporter 1 (<i>Sodium depend glucose transporter 1</i>)
sp.	Spezies
s.u.	siehe unten
t _R	Retentionszeit
TFA	Trifluoressigsäure
U	Unit (mmol/mg Protein) (Einheit)
u	Masseneinheit
u.a.	unter anderem
UDP	Uridipindiphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1 Einleitung

Die Ernährung hat für die Erhaltung der körperlichen und geistigen Leistungsfähigkeit einen hohen Stellenwert. Pflanzliche Lebensmittel spielen dabei eine ernährungsphysiologisch wichtige Rolle. Sie enthalten eine Reihe von Stoffen, auf deren Zufuhr der Mensch angewiesen ist, wie z. B. Mineralien, Vitamine, ungesättigte Fettsäuren, Ballaststoffe und Sekundärmetabolite. Zu letzteren zählen Polyphenole, die in den letzten Jahren aufgrund potentieller positiver Effekte auf die menschliche Gesundheit zunehmend in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt sind. Unter den Polyphenolen werden insbesondere Flavonoide und deren Wirkqualitäten ausführlich untersucht. Hierbei handelt es sich um eine umfangreiche Stoffgruppe mit bisher mehr als 5000 identifizierten Verbindungen, die aufgrund struktureller Merkmale in Flavonole, Flavone, Flavanone, Isoflavone, Catechine und Anthocyanidine unterteilt werden (vgl. Abschnitt 2.1).

Erste Beachtung für die Gesundheit des Menschen erlangten die Flavonoide schon in den 30er Jahren, als Albert von Szent-Györgyi im Rahmen seiner Untersuchungen zur Ascorbinsäure entdeckte, dass einige ihrer Vertreter die Gefäßpermeabilität beeinflussen (Rusznayk und Szent-Györgyi, 1936). Da er annahm, dass sie gemeinsam mit Vitamin C die Entstehung von Skorbut verhindern können, benannte er sie als Vitamin P (für Permeabilität). Einen endgültigen Beweis blieb er schuldig, und das spekulative Interesse an Flavonoiden erlosch. Erst als sich bei Untersuchungen der letzten Jahre gezeigt hatte, dass reaktive Sauerstoffspezies an der Entstehung von chronischen Erkrankungen wie zum Beispiel Atherosklerose, Polyarthritis und Diabetes sowie an Alterungsprozessen beteiligt sein dürften und man auf der Suche nach nebenwirkungsfreien bzw. -armen Substanzen, die diese abfangen oder ihre Entstehung verhindern können, war, wurden die Flavonoide aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung wieder entdeckt. Heute existiert eine kaum zu überschauende Anzahl an Untersuchungen über positive Effekte von mit der Nahrung aufgenommenen Flavonoiden (wobei Obst, Gemüse sowie Getränke wie Rotwein und Tee die wichtigsten Quellen darstellen) im menschlichen Organismus. So sollen sie beispielsweise antioxidative, antiinflammatorische, antimutagene und chemopräventive Eigenschaften besitzen sowie vor kardiovaskulären Erkrankungen schützen (Middleton *et al.*, 2000; Scalbert *et al.*, 2005).

Voraussetzung für eine Extrapolation dieser vielfältigen, meist *in vitro* erzielten positiven Effekte der Flavonoide auf den menschlichen Körper sind ausreichende Kenntnisse über ihre Bioverfügbarkeit sowie über Faktoren, die diese beeinflussen, wie z.B. Resorption und Metabolisierung. Darmbakterien können zum Beispiel die Bioverfügbarkeit der Flavonoide insofern beeinflussen als sie diese sowie deren Derivate metabolisieren. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass ein großer Anteil der mit der Nahrung aufgenommenen Flavonoide unverändert den Dickdarm erreicht, wo sie in besonderem Maße der Umsetzung durch die intestinale Mikroflora unterliegen (Hollman *et al.*, 1997; Spencer, 2003; Rechner *et al.*, 2004). Auch solche, die resorbiert, zur Leber transportiert und mit der Galle in den Darm sezerniert werden, sind Substrate der Mikroflora (Scalbert *et al.*, 2002).

Bakterielle Metabolite können möglicherweise andere biologische Wirkungen als die ursprünglichen Flavonoide aufweisen, die sie sowohl im Darm als auch im Körper nach Absorption entfalten können. So konnte zum Beispiel die Arbeitsgruppe um Kim zeigen, dass die Abbauprodukte 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und 4-Hydroxyphenylelessigsäure die Blutplättchenaggregation *in vitro* effektiver hemmen als ihre Flavonoid-Vorläufer Quercetin und Rutin (Kim *et al.*, 1998). Da im Dickdarm nicht nur eine Bioaktivierung der Flavonoide, sondern auch eine Verminderung oder sogar eine Inaktivierung ihrer Wirkung erfolgen kann, ist es wichtig, Veränderungen dieser Stoffklasse in diesem Darmbereich durch geeignete Verfahren zu studieren, um gebildete Metabolite zu identifizieren und zu charakterisieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein Modell zu etablieren, anhand dessen die Untersuchung des Ausmaßes der Biotransformation ausgewählter Flavonoide durch Dickdarmbakterien ermöglicht wird, ohne hierzu aufwendige Humanstudien einsetzen zu müssen. Wir wählten das von Seefelder (2002) vorgestellte Modell des Schweine-Caecums aus. Da auch Ausmaß und Geschwindigkeit des Abbaus der Flavonoide die Bioverfügbarkeit bestimmen, bestand eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit darin, Strukturmerkmale, die eine mikrobielle Umsetzung beeinflussen, zu untersuchen.

2 Kenntnisstand

2.1 Chemie, Vorkommen und Aufnahme von Flavonoiden

Flavonoide sind in höheren Pflanzen die mengenmäßig am häufigsten vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Sie gehören neben Phenolsäuren, Lignanen und Stilbenen zur großen Gruppe der pflanzlichen Polyphenole (Harborne, 1994). Flavonoide leiten sich strukturell vom Flavan (2-Phenyl-benzodihydropyran) ab, dessen Struktur aus zwei aromatischen Ringen (A und B) und einem O-heterocyclischen C-Ring besteht. Die einzelnen Kohlenstoffatome und auch das Heteroatom im C-Ring sind dabei fortlaufend nummeriert (Abb. 1).

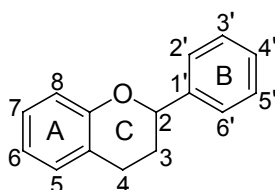


Abb. 1: Flavonoid-Grundstruktur (Flavan).

Je nach Oxidationszustand der Kohlenstoffatome C-2, C-3 und C-4 werden die Flavan-derivate in sechs Unterklassen eingeteilt, d.h. Flavanole (3-Hydroxy-flavane), Flavandiole (3,4-Dihydroxy-flavane, Leukoanthocyanidine), Flavanone (4-Oxo-flavane), Flavone (3-Oxo-flav-2-ene), Flavonole (3-Hydroxy-4-oxo-flav-2-ene) und Flavylumsalze bzw. Anthocyanidine (Abb. 2). Eine besondere Gruppe bilden die Isoflavone, die ein 3-Phenyl-benzodihydropyran Grundgerüst zeigen (Abb. 2).

Innerhalb der jeweiligen Unterklassen können Substitutionen funktioneller Gruppen an verschiedenen Positionen des Grundgerüsts (v. a. am A- und B-Ring) stattfinden, wobei Hydroxylierungen und/oder Methoxylierungen die wichtigsten Modifikationen darstellen. Zudem wird das Spektrum möglicher Derivate v. a. durch die Verbindung mit Zuckern, Sulfat- oder Acetylresten vergrößert, so dass bislang über 5000 verschiedene natürliche Flavonoide bekannt sind (Harborne und Williams, 2000).

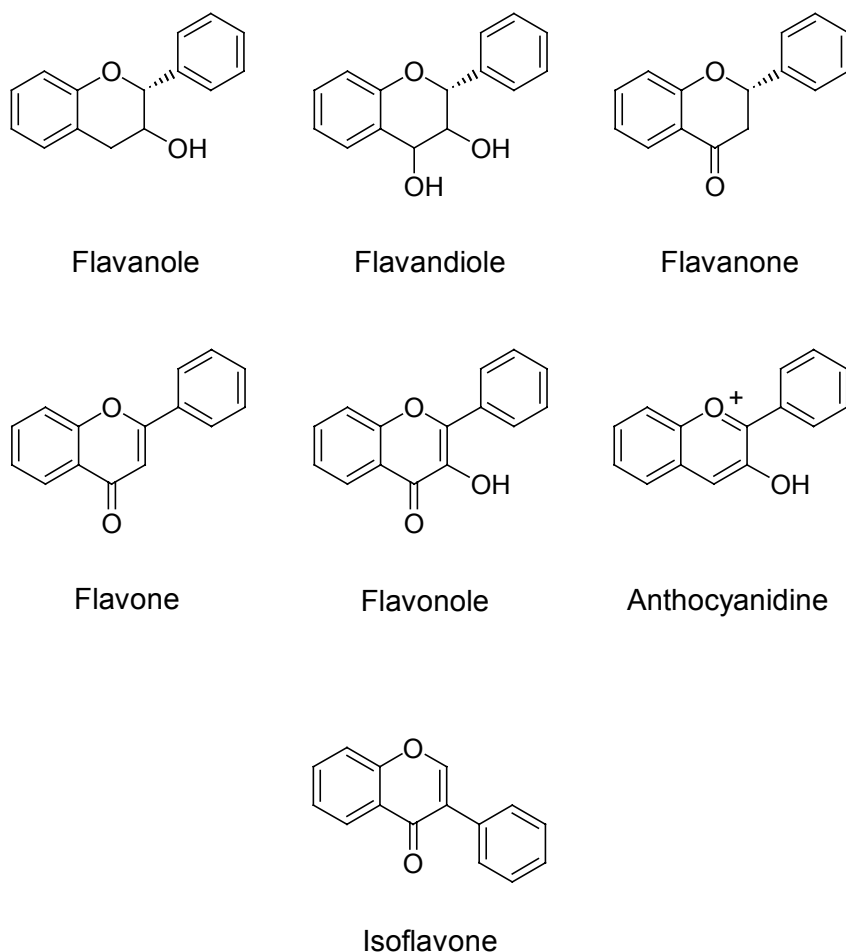


Abb. 2: Strukturmerkmale ausgewählter Flavonoid-Unterklassen.

Im pflanzlichen Gewebe liegen die Flavonoide (mit Ausnahme der Flavanole) hauptsächlich glycosidisch gebunden vor (Harborne, 1994). Die Glycosilierung erhöht ihre Löslichkeit im Pflanzenzellsaft und stabilisiert sie gegenüber Licht und enzymatischen Abbauvorgängen (Salunkhe *et al.*, 1990; Aherne und O'Brien, 2002). Als Zuckerbausteine sind dabei u.a. Glucose, Rhamnose, Galactose, Arabinose und Xylose in Form von Mono-, Di- oder Oligosacchariden meist β -glycosidisch mit dem Aglykon verknüpft (Harborne, 1994). Die Bindung an Zucker erfolgt bei Flavonoid-O-glycosiden bevorzugt in den Positionen 3, 7, 3' und 4' und bei Flavonoid-C-glycosiden fast ausschließlich in den Positionen 6 und 8. Viele Flavonoide sind zusätzlich acyliert, ein Strukturmerkmal, das analytisch genutzt werden kann (Cuyckens und Claeys, 2004).

Als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind Flavonoide zwar in den meisten Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft vertreten, jedoch in einer sehr unterschiedlichen Verteilung (Scalbert

und Williamson, 2000). Zum Beispiel kommen Flavanone fast ausschließlich in Zitrusfrüchten vor (Manach *et al.*, 2004; Erlund, 2004), während Flavone mehr oder weniger charakteristisch für Doldengewächse sind (Böhm *et al.*, 1998). Auch Isoflavone sind nur in bestimmten Lebensmitteln vertreten, dabei weisen ausschließlich Leguminosen wie Sojabohnen hohe Konzentrationen auf (Mazur, 1998; Bravo, 1998; Liggins *et al.*, 2000). Flavonole (Catechine und Epicatechine) sind hauptsächlich in Tee, Rotwein und Obst konzentriert (Arts *et al.*, 2000a; Scalbert und Williamson, 2000; Erlund, 2004). Beerenobst und einige Steinobstsorten sind die wichtigsten pflanzlichen Lebensmittel, in welchen die Anthocyanidine zu finden sind (Herrmann, 1990; Häkkinen *et al.*, 1999). Die gelblich gefärbten Flavonole sind dagegen weit verbreitet in Lebensmitteln, v. a. in Obst und Gemüse (Manach *et al.*, 2004). Gute Nahrungsquellen für Flavonoide sind nach derzeitigem Stand u.a. Zwiebeln, Brokkoli, Aprikosen, Äpfel, Tomaten, Johannisbeeren, Kopfsalat, Tee und Rotwein (Hertog *et al.*, 1992; Herrmann, 1988; 1990; Böhm *et al.*, 1998; 2000; Duthie *et al.*, 2000; Hollman und Arts, 2000). Tabelle 1 zeigt Vorkommen und durchschnittliche Gehalte ausgewählter Flavonoide (Erlund, 2004).

Obwohl derzeit eine große Fülle an Daten zum qualitativen und quantitativen Flavonoidgehalt vieler Pflanzen und Lebensmitteln existiert, sind allgemeingültige Aussagen aufgrund verschiedener Einflussfaktoren erschwert. So unterscheiden sich z. B. Genotypen einer Art durch ihre Fähigkeit zur Bildung bzw. Akkumulation von Flavonoiden, woraus erhebliche Unterschiede der Flavonoidgehalte zwischen den einzelnen Sorten einer Art resultieren. Weiterhin wird der Flavonoidgehalt auch von Umweltbedingungen beeinflusst, wobei insbesondere neben dem Bodentyp die Witterung während der Wachstumsphase eine Rolle spielt. Auch der Zeitpunkt der Ernte und die Lagerungsdauer des Obstes oder Gemüses sind entscheidende Kriterien für den Flavonoidgehalt (Robards und Autolovich, 1997; Böhm *et al.*, 1998; Herrmann, 1993; Pérez-Illarbe *et al.*, 1991; Manach *et al.*, 2004).

Aufgrund dieser Probleme und der Tatsache, dass Flavonoide nicht in Nährstoffdatenbanken enthalten sind – hinzu kommt dass die Menge der aufgenommenen Flavonoide von den Verzehrgeohnheiten der Menschen abhängt – ist die tägliche Aufnahme von Flavonoiden schwer zu bestimmen.

Tabelle 1: Vorkommen und durchschnittlicher Gehalt ausgewählter Flavonoide

Flavonoid	Nahrungsquelle	Gehalt ¹
Flavonol		
Quercetin-3, 4'-glucosid Quercetin-3-glucosid	Zwiebeln	284-486 ²
Quercetin-3-rhamnoglucosid (Rutin)	Schwarztee	10-25 ³
Quercetin-3-galactosid Quercetin-3-rhamnosid Quercetin-3-glucosid	Äpfel	21-72 ²
Quercetin-3-rhamnoglucosid Quercetin-3-rhamnosid Quercetin-3-galactosid Myricetin-3-glucosid	Johannisbeeren	44 ⁴ 71 ⁴
Flavone		
Luteolin-7-apiosylglucosid	Roter Pfeffer	7-14 ²
Flavanone		
Hesperetin-7-rhamnoglucosid (Hesperidin) Naringenin-7-rhamnoglucosid (Narirutin)	Orangensaft	116-201 ⁵ 15-42 ⁵
Naringenin-7-rhamnoglucosid (Naringin) Naringenin-7-rhamnoglucosid (Narirutin)	Grapfruitsaft	68-302 ⁵
Flavanole		
(+)-Catechin (-)-Epicatechin	Äpfel	4-16 ⁶ 67-103 ⁶
(+)-Catechin (-)-Epicatechin	Rotwein	16-53 ⁷ 9-42 ⁷
Anthocyanine		
Cyanidin-3-glucosid Cyanidin-3-rutinosid Delphinidin-3-glucosid Delphinidin-3-rutinosid	Johannisbeeren	760 ⁸ 590 ⁸
Isoflavone		
Genistein-7-glucosid Daidzein-7-glucosid	Sojabohnen	480 ⁹ 330 ⁹

¹Aglykon-Konzentration in mg/kg bzw. mg/l; ²Hertog *et al.*, 1992; ³Hertog *et al.*, 1993a; ⁴Häkkinen *et al.*, 1999; ⁵Mouly *et al.*, 1994; ⁶Arts *et al.*, 2000b; ⁷Arts *et al.*, 2000a; ⁸Nyman und Kumpulainen, 2001; ⁹Mazur *et al.*, 1998.

Auch heute noch wird von vielen Autoren eine frühere Arbeit von Kühnau (1976) zitiert, in der für die Vereinigten Staaten pro Person eine tägliche Gesamtflavonoidzufuhr (Glycoside) von 1 g berechnet wurde. Dabei waren Flavonole, Flavone und Flavanone mit 16%, Anthocyane mit 17%, Catechine mit 20% und Biflavone mit 45% vertreten. Neuere Untersuchungen auf der Grundlage verbesserter Analysenverfahren führten zu einer Schätzung der durchschnittlichen Flavon- und Flavonolaufnahme in den Niederlanden auf 23 mg pro Person und Tag (Hertog *et al.*, 1993b; Hollman und Katan, 1999). In Deutschland hat man in einem bayerischen Teilkollektiv die tägliche Flavonolaufnahme mit ca. 12 mg pro Person berechnet, wobei Quercetin mit 10,3 mg den Hauptanteil ausmachte (Linseisen *et al.*, 1997). In Tabelle 2 sind weitere tägliche Aufnahmen von Flavonolen und Flavonen, die u. a. in epidemiologischen Studien in verschiedenen Ländern ermittelt bzw. zugrunde gelegt wurden, aufgeführt.

Tabelle 2: Geschätzte tägliche Aufnahme in mg/Tag/Person an Flavonolen und Flavonen in verschiedenen Ländern

Land	Tägliche Aufnahme pro Person	Flavonoidquelle
Niederlande	23 ^{1,2} , 33 ³	Tee, Zwiebeln, Äpfel
BRD	11, 5 ⁴	Obst und Gemüse, v. a. Zwiebeln, Tee
Finnland	6 ³ , 0-41 ⁵	Obst und Gemüse, v. a. Beeren
Japan	64 ³ , 17 ⁶	Tee
Italien	27 ³	Rotwein, Obst und Gemüse
USA	13 ³ , 20 ⁷	Zwiebeln, Tee

¹Hertog *et al.*, 1993b; ²Hollman und Katan, 1999; ³Hertog *et al.*, 1995; ⁴Böhm *et al.*, 1998; ⁵Knekt *et al.*, 1996; ⁶Arai *et al.*, 2000; ⁷Rimm *et al.*, 1996

2.2 Biogenese und Funktion von Flavonoiden in Pflanzen

Die Biosynthese der Flavanderivate geht von drei Molekülen Malonyl-CoA (A-Ring) und einer aktivierten Hydroxyzimtsäure (B-Ring und die Kohlenstoffatome 2, 3 und 4 des C-Ringes) aus, die zu einem C₁₅-Zwischenprodukt kondensieren, welches schließlich zu einem primär gebildeten Chalcon reagiert (Abb. 3). Dabei wird Hydroxyzimtsäure, aus der aromatischen Aminosäure Phenylalanin, dem Endprodukt des sogenannten Shikimisäure-Weges hergestellt (Salunkhe *et al.*, 1990). Das zunächst gebildete Chalcon cyclisiert entweder enzymatisch zu Flavanonen oder aber es geht spontan in solche über. Durch verschiedene Oxidationen, Hydroxylierungen und Reduktionen entstehen die unterschiedlichen Flavonoid-Unterklassen (Salunke *et al.*, 1990; Heller und Forkmann, 1994; Shirley 1996).

In Pflanzen erfüllen Flavonoide eine Vielzahl wichtiger Funktionen. Durch ihre charakteristischen Farben wirken Anthocyanidine und Flavonole als visuelle Lockstoffe für Insekten, die für die Bestäubung der Fruchstände unverzichtbar sind (Harborne und Williamson, 2000; Cooper-Driver, 2001). Catechine und andere Flavanole können hingegen auch als Abwehrsystem gegen Schädlinge dienen (Harborne, 1976). Flavonoide wirken ebenfalls als Regulatoren von Wachstums- und Differenzierungsvorgängen in der Zelle (Formica und Regelson, 1995; Brown *et al.*, 2001). Diese Eigenschaft wird auf das Kontrollieren des Auxinspiegels zurückgeführt. So konnte die Arbeitsgruppe um Murphy zeigen, dass Flavonole, wie Quercetin und Kämpferol, ähnlich dem synthetischen Transportinhibitor Naphthylphthalaminsäure (NPA) den Auxintransport inhibieren können (Murphy *et al.*, 2000).

Eine weitere wichtige biologische Eigenschaft der Flavonoide betrifft die Aktivierung der Nodulationsgene in verschiedenen *Rhizobium*-Arten. Rhizobien infizieren Leguminosen wie z. B. *Medicago*, *Glycine* und *Pisum* und tragen zur Bildung von stickstofffixierenden Wurzelknöllchen bei. Die von der Wirtspflanze über die Wurzel abgesonderten Flavonoide funktionieren dabei als Signalstoff, wodurch die Bakterien den Infektionsprozess einleiten. Dabei wird die Expression der bakteriellen Nodulationsgene, die für die Wirt-Symbiont-Signalkette erforderlich sind, induziert (Shirley, 1996; Kneer, 1999).

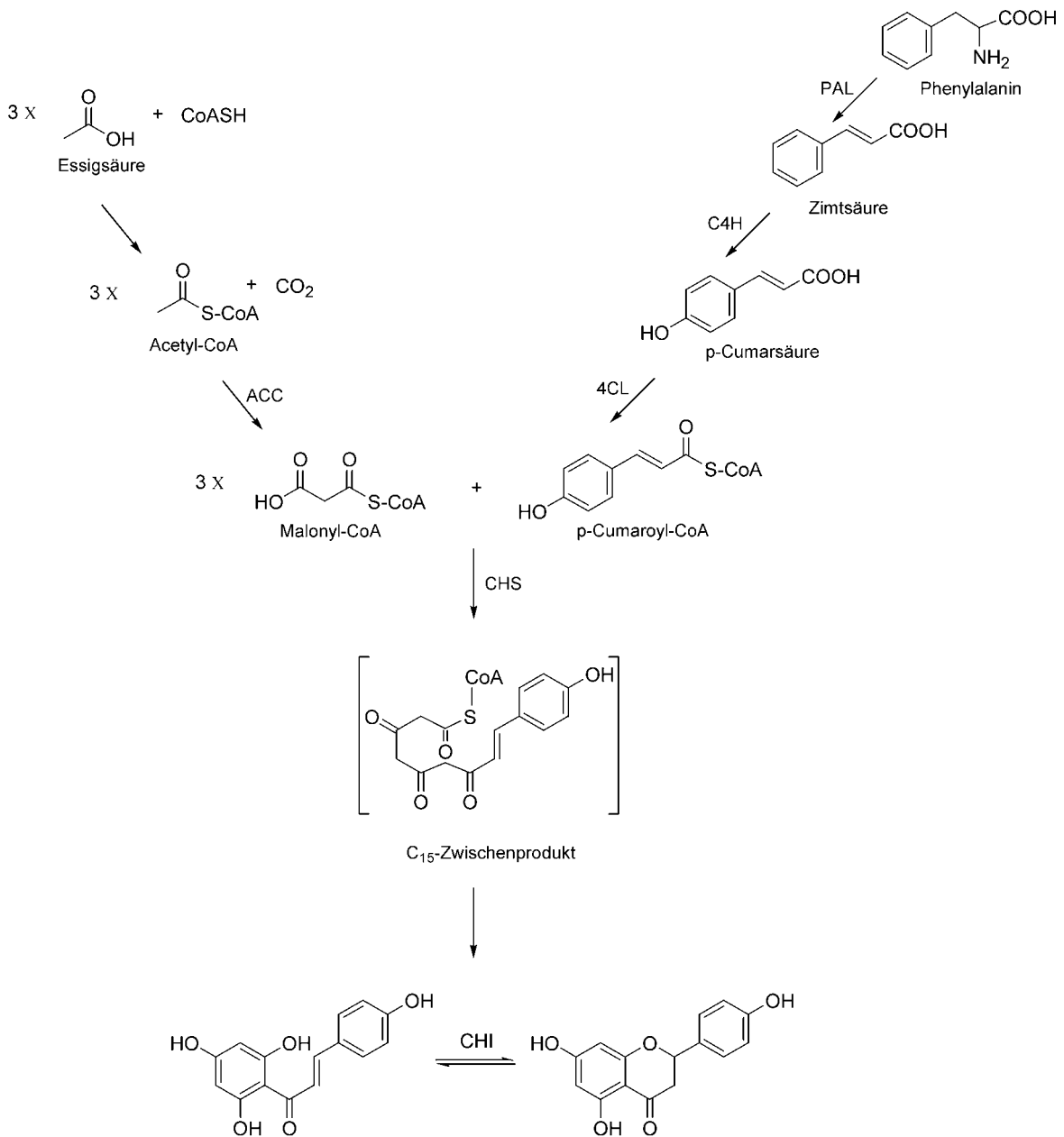


Abb. 3: Biosynthese des Flavanons Naringenin, welches die Ausgangssubstanz aller weiteren Flavonoide darstellt. ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase, PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, C4H: Zimtsäure-4-Hydrolase, 4CL: Cumarat-CoA-Ligase, CHS: Chalconsynthase, CHI: Chalconisomerase. Modifiziert nach Heller und Forkmann (1994).

Des weiteren kommt den Flavonoiden bei der Katalyse der Elektronentransportprozesse in den Photosynthese betreibenden Zellen eine Schlüsselrolle zu (Das, 1994), was sich in ihrer Akkumulation in den äußeren, dem Licht zugewandten Schichten wie Blattepidermis sowie Blüten und Früchten widerspiegelt (Shirley, 1996). Dort können Flavonoide der Pflanze auch zum Schutz vor Schädigung durch intensive UV-Strahlung dienen. Die

Schutzfunktion besteht zum einen in der Absorption der UV-B-Strahlung (Harborne and Williams, 2000), zum anderen in der Wirkung als effektive Antioxidantien (näheres vgl. Abschnitt 2.3.1) in Form von Radikalfängern für UV-induzierte reaktive Sauerstoffspezies (Larson, 1998; Markham *et al.*, 1998; Kondo und Kawashima, 2000). In einigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Pflanzen auf UV-B-Strahlung mit einer vermehrten Synthese von Flavonoiden reagierten (Shirley, 1996; Berhow und Vaughn, 1999; Harborne und Williams, 2000).

2.3 Ernährungswysiologische Bedeutung von Flavonoiden

Die ersten Beobachtungen zur biologischen Wirksamkeit von Flavonoiden stammen bereits aus den 30er Jahren. Damals fand der 1937 mit dem Nobelpreis ausgezeichnete Szent-György, dass eine Mixtur der Flavanone Hesperidin und Eriodictyol zur Abnahme der Kapillarpermeabilität und -fragilität führte und gab den Flavonoiden aufgrund dieser Eigenschaften Vitamin P Charakter (Rusznayk und Szent-György, 1936).

Heute weisen epidemiologische Studien, wie die Zutphen-Elderly-Studie (Hertog *et al.*, 1993c), die Finnish Mobile Clinic-Studie (Knekt *et al.*, 1996; 2002) sowie weitere Untersuchungen (Yochum *et al.*, 1999; Hirvonen *et al.*, 2001; Geleijnse *et al.*, 2002) auf eine negative Korrelation zwischen der Flavonoidaufnahme und dem Risiko für koronare Herzkrankungen hin (Erlund, 2004). Die Ergebnisse epidemiologischer Studien bezüglich einer möglicherweise positiven Wirkung der Flavonoide bei der Prävention von Krebskrankungen sind dagegen weniger klar. Während zwei in den Niederlanden durchgeführte Studien, die Zutphen-Studie (Hertog *et al.*, 1994) und die Niederländische-Kohorten-Studie (Goldbohm *et al.*, 1995), keinen Einfluss der Flavonoide auf die Entstehung von Lungen-, Magen- und Darmkrebs sowie auf die Krebssterblichkeit feststellen konnten, ließen zwei finnische Studien ein reduziertes Risiko für die Erkrankung an Lungenkrebs erkennen (Knekt *et al.*, 1997; Hirvonen, 2001). Auch in einer in Hawaii durchgeführten Fall-Kontroll-Studie mit 582 Lungenkrebspatienten und 582 Kontrollpersonen in der Bevölkerung wurde ein umgekehrter Zusammenhang zwischen dem Lungenkrebsrisiko und der Aufnahme von Flavonoiden beschrieben (Le Marchand *et al.*, 2000). Einer spanischen Fall-Kontroll-Studie zufolge ist dagegen keine Korrelation zwischen der Flavonoidaufnahme und dem Risiko für Lungenkrebs feststellbar (Garcia-Glosas *et al.*, 1998).

Neben epidemiologischen Studien sind es hauptsächlich *in-vitro*- sowie tierexperimentelle Untersuchungen, aus denen physiologische Wirkungen von Flavonoiden abgeleitet werden können. Derzeit existiert eine kaum zu überschauende Anzahl an *in-vitro*-Untersuchungen über positive Effekte von Flavonoiden. Ein kurzer Abriss über die in den letzten Jahren von zahlreichen Arbeitsgruppen intensiv untersuchten Eigenschaften wird im Folgenden gegeben.

2.3.1 Antioxidative Eigenschaften

Der menschliche Körper unterliegt ständig dem Einfluss reaktiver Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies (ROS bzw. RNS), die sowohl endogen bei bestimmten, im Körper ablaufenden Prozessen wie der Zellatmung in den Mitochondrien, bei Entzündungsreaktionen und Durchblutungsstörungen in Phagozyten oder beim Abbau von DNA-Basen, als auch unter dem Einfluss exogener Faktoren wie UV-Strahlung, Chemikalien und Arzneimitteln, kanzerogenen Verbindungen oder Zigarettenrauch entstehen können (Langseth, 1995; Siems *et al.*, 1998; Kohen und Nyska, 2002; Kuhn, 2003). Zu diesen reaktiven Intermediaten zählen freie Radikale, wie zum Beispiel das Hydroxylradikal ($\text{HO}\cdot$), das Superoxidradikalanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und das Stickstoffdioxidradikal ($\text{NOO}\cdot$), aber auch nicht radikalische Verbindungen wie Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid, Ozon oder Peroxynitrit (Halliwell, 1997).

Neben enzymatischen Schutzmechanismen, darunter Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase setzt der Körper auch nicht-enzymatisch wirksame Antioxidantien, wie z. B. β -Carotin, α -Tocopherol und L-Ascorbinsäure zur Beseitigung dieser reaktiven Oxidantien ein (Ji und Leichtwis, 1997; Chandra *et al.*, 2000; Finkel und Holbrook, 2000). Wird das Gleichgewicht zwischen Bildung und Eliminierung der ROS zu Gunsten der Bildung gestört, spricht man von oxidativem Stress (Sies, 1991; Kohen und Nyska, 2002). Zellmembranen, DNA und Proteine sind Zielstrukturen der überschüssigen reaktiven Sauerstoffspezies. Sie werden in Oxidationsreaktionen modifiziert und in ihrer Funktion beeinträchtigt. Oxidativer Stress wird mit zahlreichen Erkrankungen, wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Alzheimer, Katarakt, Parkinson, Diabetes mellitus und auch mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht (Müller, 1992; Halliwell, 1996; Hesecker, 1995; Spector, 1995; Pacifici und Davies, 1991; Zarkovic, 2000).

Eine besondere Rolle bei präventiven Effekten von Flavonoiden im Hinblick auf die Entstehung verschiedener Krankheiten soll deren antioxidative Wirkung spielen, welche bereits mehrfach in *in-vitro*-Studien nachgewiesen wurde (Ariga *et al.*, 1988; Rice-Evans *et al.*, 1996; Bagchi *et al.*, 1997; Hagerman *et al.*, 1998; Plumb *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1999). Aufgrund ihrer niedrigen Redoxpotentiale sind Flavonoide thermodynamisch in der Lage, reaktive Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies durch Abgabe eines Wasserstoffatoms zu reduzieren und damit zu deaktivieren (Abb. 4) (Rekka und Kouronakis, 1991; van Acker *et al.*, 1996; Rice-Evans *et al.*, 1995; Wisemann *et al.*, 1997; Bors *et al.*, 1998; Pietta, 2000). Das als Zwischenstufe auftretende Aroxyradikal ist im Vergleich zu den freien Radikalen weniger reaktiv (Bors *et al.*, 1997) und kann durch Reaktion mit weiteren Radikalen in die stabile Chinon-Struktur übergehen (Abb. 4) (Pietta, 2000; Pannala *et al.*, 2001). Als wesentliche strukturelle Voraussetzungen für diese Radikalfängereigenschaft sind am Flavonoidgrundgerüst angeordnete orthoständige Hydroxylgruppen des B-Ringes und die Doppelbindung zwischen den C-Atomen 2 und 3 des C-Ringes im Zusammenhang mit der Carbonylgruppe am C-Atom 4, welche eine Elektronendelokalisation über das gesamte Ringsystem und damit eine Stabilisierung des Radikals ermöglicht, identifiziert worden. Zusätzliche Hydroxygruppen an den C-Atomen 3 und 5 erhöhen ebenfalls die Stabilität des Flavonoidradikals und somit das Radikalfängerpotential eines Flavonoids (Bors *et al.*, 1990).

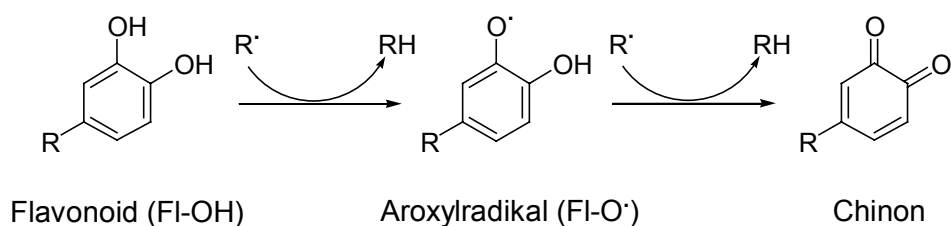


Abb. 4: Deaktivierungsreaktion reaktiver Radikale durch Flavonoide. Modifiziert nach Rice-Evans (2001) und Pietta (2000).

Eine weitere wichtige Eigenschaft des antioxidativen Potentials von Flavonoiden besteht in der Fähigkeit freie zweiwertige Kationen, wie zum Beispiel Cu^{2+} oder Fe^{2+} Ionen, die entweder an sich prooxidativ wirken oder oxidative Prozesse katalysieren bzw. auslösen können (Fenton-Reaktion), zu chelatisieren, wodurch die Lipidperoxidation inhibiert wird. In verschiedenen *in-vitro*- und auch in einigen *in-vivo*-Studien zeigten z. B. Catechin und

Quercetin hohe Affinität, mit Kupfer- bzw. Eisenionen Chelat-Komplexe zu bilden, und sie auf diese Weise in ihrer Eigenschaft als Prooxidans unwirksam zu machen (Afanas'ev *et al.*, 1989; Kozluca *et al.*, 1996; Paganga *et al.*, 1996; Ferrali *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2000; Soczynska-Kordala *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 1998; Mira *et al.*, 2002).

Zusätzlich sind Flavonoide in der Lage, zahlreiche Enzyme, die an der Entstehung von freien Sauerstoffradikalen beteiligt sind, wie z. B. Xanthinoxidase, Proteinkinase C, Cyclooxygenase oder Lipoxygenase zu hemmen (Kandaswami und Middleton, 1994; Cos *et al.*, 1998; Böhm *et al.*, 1998; Pietta 2000). Ferner können Flavonoide wichtige Antioxidantien wie Ascorbinsäure und α -Tocopherol vor Oxidation schützen (Takamura und Ito, 1977; Formica und Regelson, 1995; Hirano *et al.*, 2001) oder bereits oxidiertes Vitamin E bzw. C regenerieren (Kandaswami und Middleton, 1994; Bors *et al.*, 1995; Formica und Regelson, 1995; Miura *et al.*, 2000; Pietta, 2000).

2.3.2 Schutz vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Nach aktuellem Kenntnisstand spielt die oxidative Modifizierung von Low-Density-Lipoproteinen (LDL) – einem Lipoproteinpartikel im Blutplasma – zum Beispiel durch ROS eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der Atherosklerose (Schumacher *et al.*, 1992; Esterbauer und Ramos, 1996; Klatt und Esterbauer, 1996; Esterbauer *et al.*, 1997; Staprans *et al.*, 2005). Flavonoide können durch ihre antioxidative Wirkung die LDL-Teilchen vor Oxidationen schützen und damit Herz-Kreislauf-Erkrankungen vorbeugen (Frankel *et al.*, 1993; Aviram und Fuhrmann, 1998; Da Silva *et al.*, 2000; Chopra *et al.*, 2000). Die Arbeitsgruppe um De Whalley hat z. B. gezeigt, dass eine Reihe von Flavonoiden, u.a. Quercetin, die Oxidation von LDL durch Makrophagen hemmt (De Whalley *et al.*, 1990). Im humanen Plasma wurde *in vitro* ebenfalls die Cu^{2+} induzierte LDL-Oxidation durch Quercetin, Quercetin-3-sulfat, Quercetin-3-glucuronid oder 3'-Methylquercetin inhibiert (Manach *et al.*, 1998). Frankel *et al.* (1993) berichteten ebenfalls von einer bis zu 98%igen Verringerung der Cu^{2+} -abhängigen Oxidation von LDL aus humanem Plasma durch flavonoidreichen Rotwein.

Untersuchungen am Menschen ergaben dagegen ein uneinheitliches Bild. Nach Aufnahme von Quercetin fanden Chopra *et al.* (2000) eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität von LDL, was jedoch den Ergebnissen von McAnlis *et al.* (1999) widerspricht, die in einem

ähnlichen Versuch keine Veränderung beobachten konnten. Fuhrmann *et al.* (1995) und Nigdikar *et al.* (1998) berichteten über eine Verringerung der Anfälligkeit der LDL für Oxidation nach Aufnahme von Rotwein. Allerdings konnte die Arbeitsgruppe um de Rijke diese Ergebnisse bei analoger Indikation nicht bestätigen (de Rijke *et al.*, 1996).

Für eine Reihe von Flavonoiden wurden außerdem antithrombotische Effekte festgestellt (Landolfi *et al.*, 1984; Corvazier und Maclouf, 1985). Diese dürften neben den oben aufgeführten antioxidativen Wirkungen auf eine Inhibierung von Enzymen wie Cyclooxygenase, 5-Lipoxygenase und cAMP-Phosphodiesterase zurückzuführen sein (Gryglewski *et al.*, 1987; Lanza *et al.*, 1987; Moroney *et al.*, 1988). Die Hemmung dieser Enzyme bewirkt eine verstärkte Synthese von Prostaglandin I₂ und eine verminderte Bildung von Thromboxan A₂. Dies hat eine Verringerung der Aggregation der Blutplättchen und damit eine mögliche Vorbeugung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen zur Folge.

2.3.3 Schutz vor Krebserkrankungen

Auch im Rahmen der Krebsforschung gerieten Flavonoide ins Blickfeld, da Ergebnisse zahlreicher *in-vitro*- und tierexperimenteller Untersuchungen darauf hindeuteten, dass eine hohe Aufnahme von Flavonoiden durch Obst und Gemüse mit einem geringeren Risiko, an Magen-, Dickdarm- und Brustkrebs zu erkranken, verbunden sein könnte (Fujiki *et al.*, 1986; Grimmer *et al.*, 1992; Hirano *et al.*, 1994; Jacobasch *et al.*, 2000; Parr und Bolwell, 2000; Watzl und Rechkemmer, 2001a).

Krebs entwickelt sich in verschiedenen Stufen, die im Allgemeinen in die Initiations-, Promotions- und Progressionsphase der Krankheit eingeteilt werden (Abb. 5). Flavonoide können aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Eigenschaften in den verschiedenen Phasen der Krebsentstehung eingreifen und möglicherweise eine chemopräventive Wirkung ausüben (Middleton *et al.*, 2000; zu den Ursachen und Risikofaktoren von Krebserkrankungen weltweit s. Danaei *et al.*, 2005). Diesbezüglich werden mehrere Wirkungsmechanismen diskutiert. Nachfolgend sind einige dieser Wirkprinzipien beschrieben.

Die Oxidation von DNA bewirkt eine Veränderung in ihrer Struktur und in der Genfunktion und somit eine potentielle Entstehung von Krebs. Flavonoide können durch ihre antioxidative Wirkung (vgl. Abschnitt 2.3.1) zum Schutz vor DNA-Schädigung beitragen. So wurde zum Beispiel für Genistein gezeigt, dass dieses Isoflavon eine durch UV-Licht oder

ROS ausgelöste oxidative Veränderung der DNA verhindert. Die Bildung von 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosin (als Marker der DNA-Veränderung) konnte durch Genistein konzentrationsabhängig nahezu vollständig unterdrückt werden (Wei *et al.*, 1996).

Cytochrom-P450-abhängige Monoxygenasen (Phase-I-Enzyme) katalysieren Reaktionen, bei denen Substanzen mit Hydroxygruppen angereichert werden, wodurch die Hydrophilie und damit die Ausscheidung verbessert wird. Als Zwischenprodukte können dabei elektrophile Kanzerogene entstehen, die mit den nukleophilen Zentren in der DNA reagieren können (Depeint *et al.*, 2002). Flavonoide können durch Hemmung dieser Enzyme die Aktivierung von Prokanzerogenen verhindern und schützen auf diese Weise die DNA. In Untersuchungen von Kanazawa *et al.* (1998) wurde zum Beispiel gezeigt, dass eine Reihe von Flavonoiden, darunter Quercetin, starke Inhibierungseffekte auf Cytochrom P1A, ein Isoenzym der Cytochrom-P450 Familie, besitzen. Die Induktion von Phase-II-Enzymen, wie z. B. der Glutathion-S-Transferase, der UDP-Glucuronyltransferase, oder der Chinonreduktase durch Flavonoide führt dahingegen zu einer intensivierten Ausscheidung von Kanzerogenen und damit zu deren verstärkter Detoxifikation. Auf diese Weise können Flavonoide eine Tumor-Initiation verhindern (Talalay, 1989; Talaly *et al.*, 1995; Birth *et al.*, 2001; Depeint *et al.*, 2002).

Eine weitere Möglichkeit, die menschliche DNA zu schützen, bieten Flavonoide, indem sie sich aufgrund struktureller Ähnlichkeit mit den Nukleotiden an ihr anlagern und Bindungsstellen für Kanzerogene maskieren (Dixit und Gold, 1986; Duthie *et al.*, 1999).

Es wird angenommen, dass bis zu 10% aller vorkommenden Krebsfälle auf chronische Entzündungsprozesse, wie z. B. chronische Gastritis oder Pankreatitis, zurückzuführen sind (Gerhäuser, 2001). Flavonoide können an verschiedenen Stellen des Arachidonsäurestoffwechsels, der bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielt, eingreifen und die Bildung von Entzündungsmediatoren unterbinden. Dabei vermag zum Beispiel Quercetin die Phospholipase A₂, die v. a. zur Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden führt, zu hemmen (Welton *et al.*, 1988). Ausgehend von Arachidonsäure werden entweder durch Cyclooxygenasen Prostaglandine oder durch Lipxygenasen Leukotriene gebildet (Kühn *et al.*, 2005; Zhang und Salsmon, 2005). Quercetin und andere Flavonoide weisen inhibitorische Effekte sowohl auf Cyclooxygenasen als auch auf Lipxygenasen auf (Formica und Regelson, 1995; Welton *et al.*, 1988; Schewe *et al.*, 2002).

Bei Kanzerogenesen ist unter anderem die Balance zwischen Zellproliferation und Apoptose (auch programmierter Zelltod genannt) gestört, so dass es zu ungehemmtem Zellwachstum und folglich zur Ausbildung von Tumoren kommt. Flavonoide wirken als effektive Inhibitoren von Enzymen der Signaltransduktion und können so, über die Inaktivierung der Proteinkinase C (Ferriola *et al.*, 1989; Agullo *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1997), der Proteintyrosinkinase (Cunningham *et al.*, 1992; Marcovits *et al.*, 1998), oder der Phosphoinositol-3-Kinase (Agullo *et al.*, 1997; Weber *et al.*, 1997; Gamet-Payrastre *et al.*, 1999) in die Kontrolle der Zellproliferation eingreifen. Auch durch Beeinflussung des Zellzyklus können Flavonoide das Zellwachstum hemmen. So wurde z. B. für eine Reihe von Flavonoiden, u.a. Genistein, Quercetin und Daidzein gezeigt, dass sie an den Kontrollstellen des Zellzyklus (G1/S, G2/M) eingreifen und zum Zellzyklusarrest führen können (Pagliacci *et al.*, 1993; Choi *et al.*, 2001). Weiterhin können Flavonoide durch Verminderung der Expression von Protoonkogenen, wie z. B. *Ki-ras* und *c-myc*, antiproliferative Wirkungen ausüben (Csokay *et al.*, 1997). Einige Flavonoide sind sogar in der Lage, die Differenzierung von Zellen zu fördern (Middleton *et al.*, 2000). So stellten beispielsweise Takahashi und Mitarbeiter fest, dass Quercetin und Genistein die Differenzierung der Leukämie Zelllinie HL-60 auslösen können (Takahashi *et al.*, 1998).

Die Induktion des programmierten Zelltods in Tumorzellen ist ein weiterer, sehr wichtiger Mechanismus, der eine chemopräventive Wirkung der Flavonoide erklären könnte. Zahlreiche *in-vitro*-Studien belegen die Fähigkeit einer Reihe von Flavonoiden, Apoptose in verschiedenen Zelllinien zu fördern (z. B. Tilly *et al.*, 1992; Traganos *et al.*, 1992; Wei *et al.*, 1994; Hirano *et al.*, 1995; Wenzel *et al.*, 2000). Die hierfür zugrunde liegenden Wirkmechanismen scheinen vielfältig zu sein. In der Literatur werden u.a. die Regulation der Expression von Hitzeschock-Proteinen (Wei *et al.*, 1994; Rong *et al.*, 2000), die Freisetzung von Cytochrom C mit resultierender Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 (Wang *et al.*, 1999) sowie die Verminderung der Expression von anti-apoptotischen Faktoren wie zum Beispiel Bcl-2, Bcl-X (L) und NF- κ B beschrieben (Wenzel *et al.*, 2000).

Schließlich besitzen einige Flavonoide die Fähigkeit, am Östrogenrezeptor zu binden und damit dessen Aktivität zu modulieren (Manach *et al.*, 2004). Daneben beeinflussen sie durch Hemmung der Aromatase den Östrogenspiegel (Middleton *et al.*, 2000). Pflanzliche Flavonoide mit einem anti-östrogenen Effekt gelten als potentielle Krebstherapeutika ge-

genüber Brust- und Prostatakrebsformen. Abbildung 5 fasst die Mechanismen der Tumor-Chemoprävention durch Flavonoide zusammen.

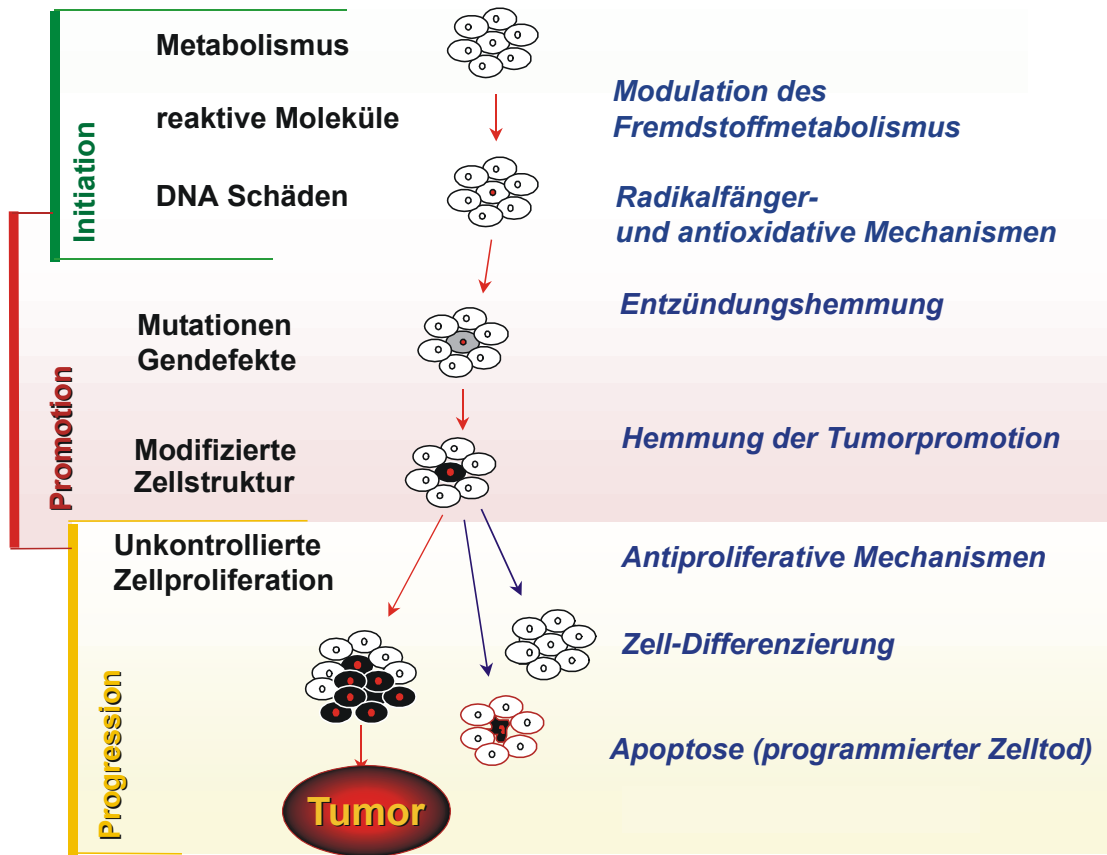


Abb. 5: Stufen zellulärer Kanzerogenese (links) und Wirkmechanismen von Flavonoiden in der Chemoprävention (Schema entnommen aus Gerhäuser, 2001).

2.3.4 Weitere biologische Effekte von Flavonoiden

Für eine Reihe von Flavonoiden wurden antivirale Wirkungen gegenüber unterschiedlichen Virustypen nachgewiesen (Vlietinck *et al.*, 1998; Middleton *et al.*, 2000). So hat man gezeigt, dass Quercetin die Infektiosität von Herpes-simplex-Viren Typ 1, Polio-Viren Typ 1, Parainfluenza-Viren Typ 3 und RS-Viren (Respiratory-Syncytial-Viren) reduziert und die intrazelluläre Replikation dieser Viren vermindert (Kaul *et al.*, 1985). Für das Flavonol 3-Methylkämpferol wurde eine Inhibierung der RNA-Synthese von Polio-Viren nachgewiesen. Flavonoide sollen sogar die Replikation des HIV-Virus beeinflussen (Fesen *et al.*, 1993; Brinkworth *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1994; Middleton *et al.*, 2000). So ist z. B. mit Quercetin in einer Konzentration von 40 μM *in vitro* eine 80%ige Hemmung der HIV-1-Replikation erzielt worden (Gatto *et al.*, 2002).

Auf Bakterien wirkt eine Vielzahl von Flavonoiden wachstumshemmend (Narayana *et al.*, 2001; Cushnie und Lamb, 2005). Beispielsweise zeigten Ammar und Mitarbeiter, dass ein Zusatz von Quercetin und Naringenin in Zahnpasten das Wachstum vieler gramnegativer Erreger sowie von Aktinomyceten in der Mundhöhle vermindert (Ammar *et al.*, 1990). Auch das verminderte Risiko für Harnwegsentzündungen, das in einer Interventionsstudie bei Frauen nach regelmäßigem Konsum von Cranberry-Saft festgestellt wurde, hat man auf die antimikrobielle Wirkung der Saftinhaltsstoffe, d.h. Procyanidine und Anthocyane, zurückgeführt (Avron *et al.*, 1994; Howell *et al.*, 2002).

Eine weitere, wichtige Funktion, die den Flavonoiden, insbesondere der Untergruppe der Flavone, zugeschrieben wird, ist ihre kompetitive Bindung am Benzodiazepinrezeptor und die dadurch mögliche Beeinflussung des Zentralnervensystems. Benzodiazepinrezeptor-Agonisten, wie z. B. Diazepam, wirken anxiolytisch (angstlösend), muskelrelaxierend, antikonvulsiv, hypnotisch und amnestisch (Greenblatt *et al.*, 1983; Martin und Haefely, 1995). Für zahlreiche natürliche und synthetische Flavone wurden an Ratten starke anxiolytische und andere Benzodiazepin-ähnliche Effekte nachgewiesen (Medina *et al.*, 1990; Viola *et al.*, 1994; 1995; Wolfman *et al.*, 1994; 1996; Marder *et al.*, 1995; 1996; Salgueiro *et al.*, 1997). Vergleichbare Wirkungen der Flavone belegten auch Experimente aus unserem Arbeitskreis. So wurde bei *in-vitro*-Untersuchungen im Radiorezeptorassay (*humaner Cortex frontalis*) u.a. das Flavon Hispidulin als hochwirksamer Benzodiazepinrezeptor-Ligand ($\text{IC}_{50} = 1,3 \mu\text{M}$) ermittelt, dessen Wirkung als partiell agonistischer Ligand an

rekombinanten GABA_A-Rezeptoren im *Xenopus laevis* Oozyten-Modell bestätigt wurde. Ferner ist belegt worden, dass Hispidulin *in vivo* (mongolische Wüstenrennmaus) eine mit Diazepam vergleichbare antikonvulsive Wirkung und damit das Potential eines möglichen Antiepileptikums zeigt (Kavvadias *et al.*, 2004).

Schließlich deuten viele *in-vitro*-Studien und einige *in-vivo*-Beobachtungen auf eine immunmodulierende Wirkung der Flavonoide hin (Middleton und Kandaswami, 1992; Formica und Regelson, 1995; Middleton *et al.*, 2000). Dabei wurden abgesehen von biphasischen Effekten bei der Lymphozytenproliferation, d.h. Hemmung bei hoher Konzentration, Stimulation bzw. kein Effekt bei niedriger Konzentration (Brattig *et al.*, 1984; Berg *et al.*, 1988; Formica und Regelson, 1995), bezüglich des Phagozytoseprozesses, Synthese von Zytokinen, Immunglobulinen und Aktivität von natürlichen Killerzellen, ausschließlich immunsuppressive Wirkungen beschrieben (Middleton und Kandaswami, 1992; Formica und Regelson, 1995; Middleton *et al.*, 2000). So zeigte beispielsweise das besonders intensiv untersuchte Quercetin eine starke Hemmwirkung auf die Aktivität der natürlichen Killerzellen und unterdrückte die Antigenstimulation von cytotoxischen T-Lymphocyten (Berg und Daniel, 1988).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Flavonoide aufgrund ihrer vielfältigen positiven Wirkungen, von denen hier nur einige dargestellt wurden, immer mehr mit der Prävention degenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Es muss aber beachtet werden, dass man diese Wirkungen zum überwiegenden Teil anhand von *in-vitro*-Untersuchungen mit entsprechenden Aglykonen ermittelt hat. Effekte wurden dabei zudem meist bei Flavonoidkonzentrationen im mikromolaren Bereich nachgewiesen.

Um die vielfältigen, zumeist positiven Wirkungen der Flavonoide auf den menschlichen Körper übertragen zu können, sind daher Kenntnisse über ihre Bioverfügbarkeit sowie über Faktoren, die diese beeinflussen, wie zum Beispiel Resorption und Metabolismus, eine grundlegende Voraussetzung.

2.4 Resorption und Bioverfügbarkeit von Flavonoiden

Die biologische Aktivität von Flavonoiden hängt vor allem davon ab, wo, wie und in welchem Umfang sie nach ihrer Aufnahme resorbiert und metabolisiert werden. Die Mehrzahl der Untersuchungen zur Resorption und Bioverfügbarkeit von Flavonoiden hat sich mit dem Flavonol Quercetin und einigen seiner Glycoside beschäftigt. In einer der ersten Bioverfügbarkeitsstudien am Menschen konnten Gugler *et al.* (1975) nach Verabreichung von 4 g Quercetin an vier Probanden weder im Blutplasma noch im Urin das intakte Flavonol oder Konjugate desselben detektieren und schlossen daraus auf eine maximale Absorption von < 1%. Sie vertraten auch die Meinung, dass es zu einer umfangreichen Metabolisierung der Substanz im Dickdarm kommt, da nur etwa 53% der applizierten Dosis in den Faeces wiedergefunden wurde. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte nach intravenöser Applikation von 100 mg Quercetin pro Versuchsperson eine Quercetin-Plasmakonzentration von ungefähr 1 µg/ml detektieren; renal wurden 0,65% als freies und 7,4% als konjugiertes Quercetin nachgewiesen. Die Autoren bezweifelten, ob die gemessene Plasmakonzentration für biologische Effekte ausreicht (Gugler *et al.*, 1975).

In neueren Studien fanden Manach *et al.* (1995) bei einem Fütterungsversuch mit Ratten, denen Quercetin oder Rutin (Quercetin-3-rutinosid) in äquimolaren Mengen (16,4 mmol/kg) über einen Zeitraum von 10 Tagen verfüttert wurde, in mit β-Glucuronidase/Sulfatase behandelten Blutplasmaprobeen durchschnittlich 115 µmol/l Flavonol, was ebenfalls auf geringe Absorption hindeutet. Die Arbeitsgruppe war dennoch der Meinung, dass die im Blutplasma ermittelten Konzentrationen biologische Effekte haben können. Sie beriefen sich dabei auf einen von ihnen durchgeführten *in-vitro*-Versuch, in dem gezeigt werden konnte, dass die Cu²⁺-katalysierte Oxidation von humanem LDL durch die Anwesenheit von 0,5 µmol/l Quercetin effektiv inhibiert wurde.

Im Gegensatz dazu kommt eine Untersuchung von Hollman *et al.* (1995) nach oraler Aufnahme von gedünsteten Zwiebeln (enthalten v. a. Quercetinglucoside) durch gesunde Ileostomie-Patienten zu dem Ergebnis, dass 52% der applizierten Dosis resorbiert werden. In der gleichen Studie lag die Resorption nach Applikation des Aglykons Quercetin bei 24%, nach Gabe von Rutin (Quercetin-3-rutinosid) nur bei 17%. Um ihre Ergebnisse zu bestätigen, verglichen die Autoren in einer weiteren Studie an Probanden mit intaktem Dickdarm die Absorption und relative Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Zwiebeln,

Äpfeln (enthalten verschiedene Quercetinglycoside) und Rutin. Dabei wurden die höchste maximale Plasmakonzentration (224 ng/ml) und der kürzeste Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration (0,7 h) nach Einnahme von Zwiebeln beobachtet, gefolgt von Äpfeln (92 ng/ml bei 2,5 h) und Rutin (90 ng/ml bei 9,3 h). Innerhalb von 24 h wurden nur 1,39% der Dosis nach Einnahme der Zwiebeln renal eliminiert, 0,44% nach Einnahme von Äpfeln und 0,35% bei Rutin (Hollman *et al.*, 1997). Aus den erhaltenen Daten schlussfolgerten die Autoren, dass Quercetinglycoside (Zwiebelinhaltsstoffe) aus dem Dünndarm, Rutin und andere Quercetinglycoside (Apfelinhaltsstoffe) hingegen aus dem Dickdarm absorbiert werden, eine Hypothese, die sie in einer weiteren Studie, in der Probanden reines Quercetin-4'-glucosid bzw. Rutin oral aufnahmen, bestätigen konnten. Nach Gabe des Glucosids wurde die maximale Plasmakonzentration schon nach einer halben Stunde, nach Gabe des Glucorhamnosids hingegen erst nach sechs Stunden erreicht. Die dabei gemessene Plasmakonzentration des Glucosids war außerdem 20fach höher als die des Rutins (Hollman *et al.*, 1999). Als Erklärung für die schnelle Absorption von Flavonoidglucosiden schlugen Hollman und Mitarbeiter einen aktiven Transport des Glucosids über den Natrium-abhängigen Glucosetransporter SGLT1 vor (Hollman *et al.*, 1995). Dabei wiesen sie auf eine Untersuchung hin, in der gezeigt werden konnte, dass SGLT1 nicht nur Glucose als solche transportierte, sondern auch Verbindungen, die mit ihr β -glucosidisch verbunden waren (Mizuma *et al.*, 1994).

Die Befunde von Hollman *et al.* (1995) waren Anlass umfangreicher Untersuchungen zur Bedeutung des Dünndarms bei der Resorption von Flavonoidglycosiden, die lange Zeit nur für Aglykone bekannt war (z. B. Gee *et al.*, 1998; 2000; Day *et al.*, 1998; 2000; 2003; Crespy *et al.*, 1999; Walgren *et al.*, 2000a; 2000b; Ader und Bloeck, 2001; Wolffram *et al.*, 2002).

In bisher veröffentlichten Daten werden – neben der zunächst als einzigem Resorptionsweg erkannten Spaltung der Glycoside im Kolon mit anschließender Resorption des Aglykons – zwei Resorptionswege diskutiert (Abb. 6): Zum einen können einige Flavonoidglucoside, wie z. B. Quercetin-4'-glucosid und Quercetin-3-glucosid über den SGLT1 in den Dünndarmenterocyten transportiert werden (Walgren *et al.*, 2000b; Wolffram *et al.*, 2002). Dort werden sie zunächst durch eine unspezifische cytosolische β -Glucosidase hydrolysiert, bevor sie in die im Blutplasma detektierbaren Flavonoidkonjugate metabolisiert werden (Ioku *et al.*, 1998; Day *et al.*, 1998; 2003). Allerdings hat man auch gleich-

zeitig belegt, dass die Effektivität dieses Absorptionsweges zu einem großen Umfang durch das Multi-Drug-Resistance-assoziierten Proteins (MDR2) vermindert werden kann (Walgren *et al.*, 2000a; Walle, 2004). Zum anderen können einige Flavonoidglycoside durch die bürstensaummembranständige Laktase-Phloridzin-Hydrolase (LPH) gespalten werden. Das Aglykon kann dann über Diffusion die Enterocyten passieren (Day *et al.*, 1998; 2000).

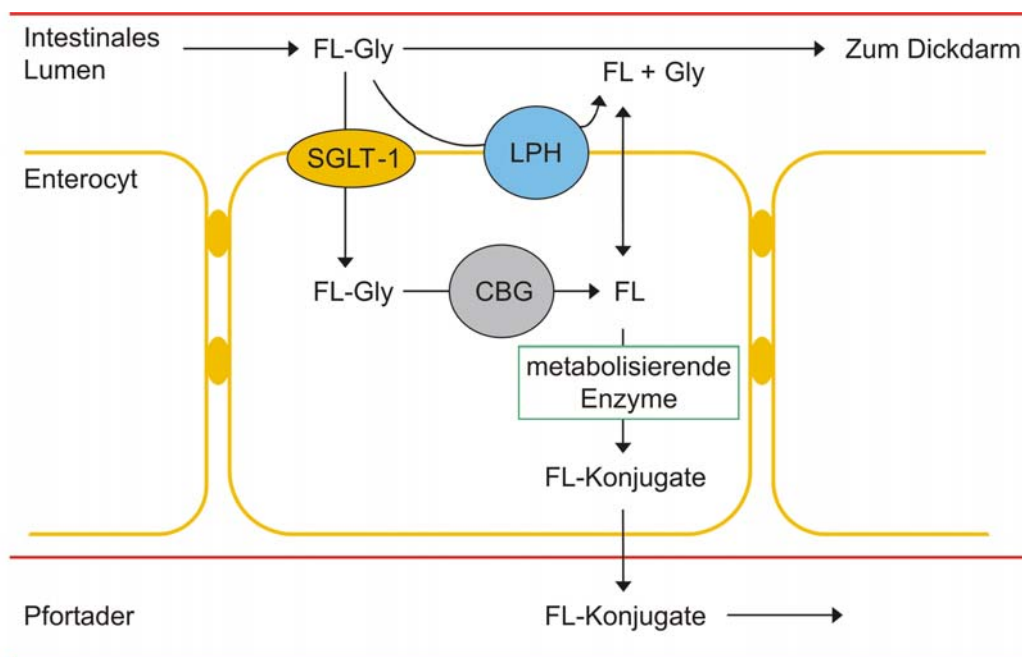


Abb. 6: Schematische Darstellung von Absorptionsmöglichkeiten der Flavonoidglycoside im Dünndarm. FL-Gly: Flavonoidglycosid, SGLT-1: Natriumabhängiger Glucosetransporter, LPH: Laktase-Phloridzin-Hydrolase, CBG: cytosolische β -Glucosidase. Modifiziert nach Day *et al.* (2000) und Gee *et al.* (2000).

Im Gegensatz zu Quercetin werden Effekte der Glycosilierung auf die Absorption der Isoflavone widersprüchlich diskutiert (Manach *et al.*, 2005). In einer Bioverfügbarkeitsstudie am Menschen wiesen Izumi *et al.* (2000) eine schnellere Absorption der Aglykone Genistein und Daidzein im Vergleich zu ihren entsprechenden Monoglucosiden, d.h. Genistin und Daidzin, nach. Auch in verschiedenen *in-vitro*-Untersuchungen hat man eine bessere und umfangreichere Absorption der Aglykone im Vergleich zu den Monoglucosiden gezeigt (Steensma *et al.*, 1999; Murota *et al.*, 2002; Li und Hu, 2002). Die Arbeitsgruppe um Setchell ermittelte hingegen eine höhere Bioverfügbarkeit von Isoflavonglycosiden nach Applikation einer Sojamehlzeit als nach Gabe der jeweiligen Aglykone

(Setchell *et al.*, 2002). Andere Arbeitsgruppen (Richell *et al.*, 2002; Zubik und Myedani, 2003) stellten keine Unterschiede zwischen der Absorptionskinetik von Isoflavonglucosiden und deren Aglykonen fest. Auch Felgines *et al.* (2000) zeigten in einer Bioverfügbarkeitsstudie an Ratten, dass die Flavanone Naringenin und Narigenin-7-glucosid gleiche Absorptionskinetik und Bioverfügbarkeit aufwiesen. Verzögerte Absorption und niedrigere Bioverfügbarkeit wurden jedoch im Falle von Naringenin-7-rutinosid festgestellt (Felgines *et al.*, 2000). Die Autoren waren der Meinung, dass die Absorption des Rutinosids erst im Dickdarm nach Hydrolyse durch bakterielle Enzyme stattfindet. Dort erfolgt zusätzlich der weitere Abbau des Aglykons mit der Folge einer verminderten Bioverfügbarkeit.

Neben Effekten wie Glycosilierung beeinflussen andere Faktoren, wie z. B. applizierte Dosis, Darreichungsform, vorhergehende Diät und Geschlecht die Absorption und damit die Bioverfügbarkeit der Flavonoide (Erlund *et al.*, 2001a; Lesser *et al.*, 2004). So hat man bei Frauen, die Kontrazeptiva einnahmen, die höchsten Plasmakonzentrationen gefunden, während die Absorptionsrate bei Männern noch geringer war als bei Frauen, die keine Kontrazeptiva eingenommen hatten. Die Ursachen für diese Unterschiede sind nicht bekannt (Watzl und Rechkemmer, 2001b). Ferner zeigten sich bei gleichzeitiger protein- und eisenreicher Kost negative Auswirkungen auf die Absorption von Flavonoiden, da diese Komplexe mit den Polyphenolen bildeten (Arts *et al.*, 2002).

Die Bioverfügbarkeit der unterschiedlichen Flavonoide aus deren Unterklassen variiert beträchtlich. In einem Übersichtsartikel verglichen Manach *et al.* (2005) Ergebnisse von 97 Bioverfügbarkeitsstudien am Menschen und stellten dabei fest, dass vor allem die Isoflavone Genistein und Daidzein, aber auch die Flavanone Hesperetin und Naringenin vergleichsweise hohe Bioverfügbarkeiten aufwiesen. Die Anthocyane zeichneten sich in allen Untersuchungen (trotz Verabreichung hoher Mengen) durch eine sehr niedrige Bioverfügbarkeit aus (Manach *et al.*, 2005). Ein Grund für die schlechte Bioverfügbarkeit dieser Stoffklasse könnte nach Auffassung dieser Autoren darin liegen, dass in den Studien nicht alle Metabolite erfasst worden sind.

Die Halbwertszeiten der Flavonoide im Körper variieren ebenfalls beachtlich. Während zum Beispiel Flavanone und Anthocyane Halbwertszeiten von lediglich 1-2 Stunden aufweisen (Manach *et al.*, 2005) und deshalb die Wahrscheinlichkeit für ihre Akkumulation im Plasma nach wiederholter Aufnahme sehr gering ist, wurden für Quercetin und Isoflavone Halbwertszeiten von 11-28 bzw. 4-8 h ermittelt (Manach *et al.*, 2004).

Ein weiterer, die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden stark beeinflussender, wichtiger Faktor ist, wie im Folgenden aufgeführt wird, deren in den unterschiedlichen Darmabschnitten sowie in der Leber stattfindende Metabolisierung.

2.5 Metabolisierung von Flavonoiden und Rolle der Dickdarmflora

Die Metabolisierung der Flavonoide findet hauptsächlich in der Leber, im Dün- und Dickdarm statt (Donovan *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003; Arts *et al.*, 2004; Rechner *et al.*, 2004; Williamson und Manach, 2005). Die Bedeutung der Dünndarmwand als metabolisierendes Organ hat man früh erkannt. Für das Isoflavon Genistein konnte z. B. gezeigt werden, dass die Glucuronidierung hauptsächlich in der Dünndarmwand und nicht in der Leber stattfindet (Sfakianos *et al.*, 1997). Diese Beobachtung wurde durch Perfusionsexperimente mit Rattendünndarm unterstützt. So hat die Arbeitsgruppe um Crespy in einer Absorptionsstudie an Ratten, deren Dünndarm *in situ* mit Rutin- und Quercetinhaltenen Lösungen perfundiert wurde, gezeigt, dass eine intensive Glucuronidierung, Methylierung und Sulfatierung des Aglykons in den Enterocyten stattfand, da diese Konjugate auf der apikalen und basolateralen Seite detektiert wurden und eine Beteiligung der Leber bei der Synthese dieser Verbindungen ausgeschlossen werden konnte. Rutin wurde dagegen weder absorbiert noch metabolisiert (Crespy *et al.*, 1999). Mit Hilfe von intestinalen Mikrosomen konnten die Autoren außerdem die Aktivität einer UDP (Uridipindiphosphat)-Glucuronyltransferase im Dünndarm nachweisen, deren Aktivität höher war als die Aktivität in Lebermikrosomen (Crespy *et al.*, 1999). In einem ähnlichen Versuchsansatz wurde von Spencer und Mitarbeiter die Aktivität einer UDP-Glucuronyltransferase in den Enterocyten des Rattendünndarms bei der Absorption von Flavon- und Flavonolglycosiden und deren Aglykone nachgewiesen (Spencer *et al.*, 1999). Auch im menschlichen Jejunum, Ileum und Kolon wurden spezifische UDP-Glucuronyltransferasen nachgewiesen, die in der Lage waren, verschiedene Flavonoide, u.a. Quercetin, zu glucuronidieren (Cheng *et al.*, 1998; 1999). In einer mit Caco-2-Zellen durchgeführten Studie ist weiterhin gezeigt worden, dass Quercetin und Chrysin eine verstärkte Expression von UDP -Glucuronyltransferase 1A-Isoformen induzierten und somit die Glucuronidierungsrate in den Zellen erhöhen (Galijatovic *et al.*, 2000). Ferner wurde kürzlich gezeigt, dass bei einer Behandlung des Flavons Luteolin mit humanen Dünndarmmikrosomen insgesamt 74% des Substrats glucuronidiert wurden. Im Gegensatz dazu setzten humane Lebermikrosomen nur 27% von Luteolin zu

Glucuroniden um. Während in den Lebermikrosomen überwiegend das 7-O-glucuronid entstand, machten 4'-und 3'-O-glucuronide den größten Anteil der Dünndarmglucuronide aus (Boersma *et al.*, 2002).

Neben der Glucuronidierung deutet eine Mehrzahl von Untersuchungen darauf hin, dass absorbierte Flavonoide bereits im Dünndarm auch einer Methylierung bzw. Sulfatierung unterliegen können (Piskula und Terao, 1998; Manach *et al.*, 1998; Crespy *et al.*, 1999; Kuhnle *et al.*, 2000; Ader *et al.*, 2000; Donovan *et al.*, 2001).

Über die Portalvene gelangen die absorbierten Flavonoide wahrscheinlich direkt zur Leber (Abb. 7). Dort erfolgt ihre weitere Metabolisierung hauptsächlich zu Glucuronsäure-, Methyl- oder Sulfatderivaten (Rice-Evans, 2001; Williamson, 2002; O'Leary *et al.*, 2003). So metabolisierten menschliche Hepatocyten der Zelllinie HepG2 beispielsweise Chrysin zu einer Reihe von Glucuronsäure- und Sulfatderivaten (Galijatovic *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu wurde Quercetin in der gleichen Zelllinie in Isorahmnetin als einzigen Metaboliten umgewandelt (Boulton *et al.*, 1999). Die Arbeitsgruppe um O'Leary untersuchte den Metabolismus von im Dünndarm gebildeten Flavonoidglucuroniden in HepG2-Zelllinien und stellten dabei fest, dass die Glucuronide entweder einer direkten Methylierung oder einer Deglucuronidierung gefolgt von einer Sulfatierung unterlagen (O'Leary *et al.*, 2001; 2003). Weiterhin deuten *in-vitro*-Studien mit Lebermikrosomen auf eine oxidative Metabolisierung von Flavonoiden hin (z. B. Nielson *et al.*, 1998; Tolleson *et al.*, 2002), die möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle *in vivo* – verglichen mit der Konjugation – spielen kann (Otake *et al.*, 2002; Walle, 2004).

Flavonoide, Flavonoidglycoside und Flavonoidmetabolite, wie zum Beispiel Glucuronide, die nicht im Dünndarm absorbiert bzw. über die Galle reseziert werden, gelangen in den Dickdarm (Abb. 7) und unterliegen dort einer intensiven mikrobiellen Verstoffwechslung (Scalbert und Williamson, 2002).

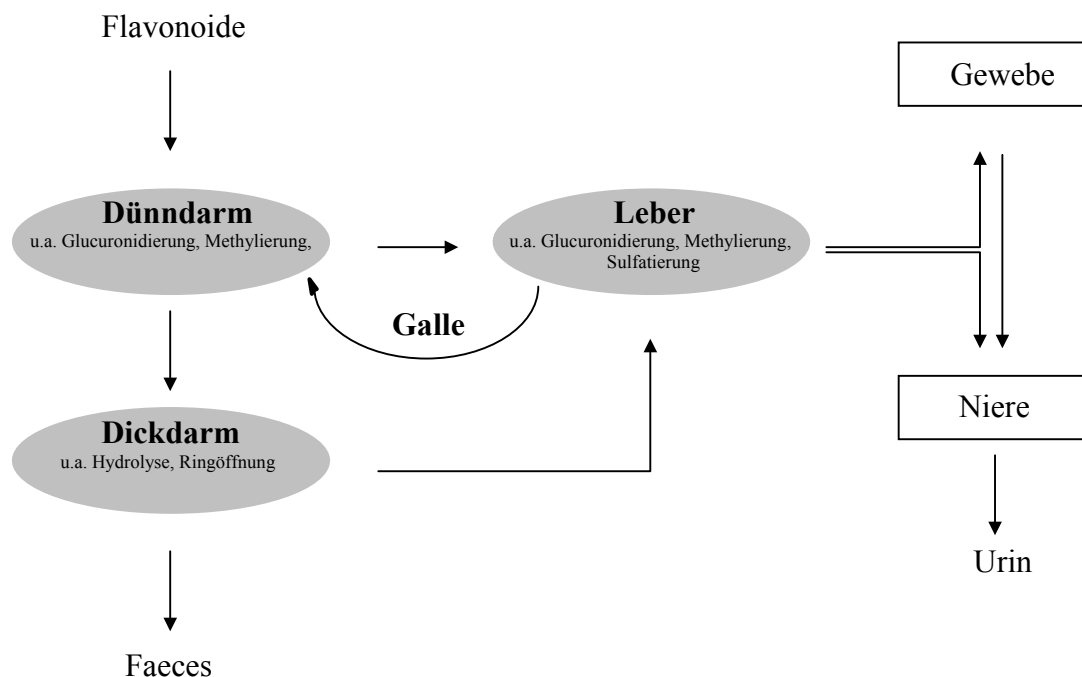


Abb. 7: Mögliche Routen und Metabolisierungen der Flavonoide im Gastrointestinaltrakt; Schema modifiziert nach Scalbert und Williamson (2002) sowie Rice-Evans (2001).

2.5.1 Rolle der Dickdarmflora bei der Metabolisierung von Flavonoiden

Die Mikroflora des menschlichen Gastrointestinaltraktes stellt ein offenes ökologisches System dar, dessen Komplexität für ihre relative Stabilität verantwortlich ist. Bisher sind mit den klassischen mikrobiologischen Methoden mehr als 400 verschiedene Spezies identifiziert worden (Moore und Holdeman, 1974; Finegold *et al.*, 1983). Neuere Studien unter Einsatz molekularbiologischer Methoden, zeigen jedoch, dass die tatsächliche Anzahl viel höher liegt (Doré *et al.*, 1998). Es wird daher geschätzt, dass bislang nur 20% der im Darm vorkommenden Bakterienarten erfasst werden konnten (Suan *et al.*, 1999).

Am intensivsten besiedelt ist der Dickdarm. Dort erreicht die Gesamtzellzahl etwa 10^{11} bis 10^{12} Bakterien pro Gramm Darminhalt und umfasst insbesondere obligate Anaerobier wie *Bacteroides*-Arten, *Eubacterium*, *Bifidobacterium* oder *Clostridium*-Spezies (Finegold *et al.*, 1983; Autenrieth, 2003). Auch fakultative pathogene Mikroorganismen wie *Clostridium difficile* und *Clostridium perfringens* gehören zur normalen Dickdarmflora (Autenrieth, 2003). Ferner befinden sich im Dickdarm auch etwa 10^8 Bakterien pro Gramm Darminhalt, die zu den fakultativen Anaerobiern gehören, vorwiegend *Escherichia coli*

und andere Enterobacteriaceae. Darüber hinaus können auch Hefen, insbesondere *Candida*-Spezies, in Keimzahlen bis etwa 10^3 pro Gramm Darminhalt physiologischerweise im Dickdarm vorkommen (Autenrieth, 2003).

Es ist allgemein anerkannt, dass die intestinale Mikroflora einen tiefgreifenden Einfluss auf die gastrointestinale Funktion und auf die Gesundheit des Menschen hat. So haben die symbiotischen Darmbakterien einen Barriereeffekt gegen pathogene Bakterien und spielen eine bedeutende Rolle in der Ausreifung und Aufrechterhaltung des Immunsystems (Vollaard und Clasener, 1994; Umesaki und Setoyama, 2000; Autenrieth, 2003). Sie sind an der Transformation von Cholesterin, Gallensäuren und Steroiden beteiligt (Hirano *et al.*, 1981; Bokkenheuser, 1993). Zudem wandeln sie nicht verdaute Kohlenhydrate in die Gase CO_2 , H_2 und CH_4 sowie in kurzkettige Fettsäuren um. Letztere werden absorbiert und tragen mit 5 - 10% zur Gesamtenergieversorgung des Menschen bei (Cummings, 1981). Butyrat spielt dabei eine besondere Rolle. Es dient den Kolonocyten als Hauptsubstrat und fördert deren Proliferation. Gleichzeitig hemmt es aber auch die Proliferation von Kolontumorzellen (Jakobasch *et al.*, 1997).

Auch im Hinblick auf den Flavonoidmetabolismus kommt den Dickdarmbakterien eine wichtige Rolle zu. Aufgrund ihres hohen Potentials an Enzymen, u.a. Glycosidasen und Rhamnosidasen, sind sie in der Lage, nicht resorbierte Flavonoidglycoside in die entsprechenden Zuckerkomponenten und Aglykone zu hydrolysieren. Letztere können anschließend resorbiert und so für den Körper verfügbar werden (Bokkenheuser *et al.*, 1987; Hollman und Katan, 1997; Williamson und Manach, 2005). Bokkenheuser *et al.* (1987) konnten für eine Reihe von *Bacteroides*-Arten, wie zum Beispiel *B. distasonis* (α -Rhamnosidase und β -Glucosidase), *B. ovatus* (β -Glucosidase) oder *B. uniformis* (β -Glucosidase), die Fähigkeit zur Deglycosilierung von Flavonoiden nachweisen. Ähnliche Aktivitäten wurden auch für andere Bakterienspezies aus menschlichen Faeces, wie zum Beispiel *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Enterococcus* oder *Streptococcus*, beschrieben (MacDonald *et al.*, 1984; Kim *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 1999). Weiterhin kann die Mikroflora Flavonoidmetabolite wie, z. B. Glucuronide oder Sulfate, die über die Galle ins Darmlumen sezerniert werden, hydrolysieren. Die dabei freigesetzten Aglykone können rückresorbiert werden und im enterohepatischen Kreislauf zirkulieren (Rowland *et al.*, 1988; Scalbert und Williamson, 2000; Walle, 2004). In einer *in-vitro*-Fermentationsstudie mit humanen Faeces hat beispielsweise die Arbeitsgruppe um Aura gezeigt, dass die menschliche Darm-

flora in der Lage war, sowohl Quercetinglycoside als auch ein Gemisch aus Flavonoid-glucuroniden zu dekonjugieren (Aura *et al.*, 2002).

Neben der Hydrolyse der Flavonoide durch die Darmflora spielt der Abbau der Aglykone durch Spaltung des C-Ringes im Flavonoidgerüst unter Bildung von u.a. Phenolcarbonsäuren eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung im Dickdarm und damit in Hinblick auf die Bioverfügbarkeit dieser Stoffklasse.

Die Bedeutung der Darmbakterien für den Abbau von Flavonoiden wurde erstmals von Nakagawa *et al.* (1965) gezeigt. Die Autoren stellten nach gleichzeitiger Gabe von Quercetin und dem Antibiotikum Neomycin an Ratten fest, dass im Gegensatz zur Kontrollgruppe (ohne Gabe des Antibiotikums) keine phenolischen Abbauprodukte im Urin nachweisbar waren. In darauf folgenden Untersuchungen wurde die Aktivität der Mikroflora beim Abbau von Flavonoiden weiter belegt (Griffiths und Barrow, 1972; Griffiths und Smith, 1972; Baba *et al.*, 1983; Winter *et al.*, 1989). Derzeit sind verschiedene Spezies der intestinalen Humanflora, u.a. *Streptococcus* S-2, *Lactobacillus* L-2, *Bifidobacterium* B-9, *Eubacterium* A-44, *Bacteroides* JY-6 und *Clostridium orbiscindens*, bekannt dafür, den C-Ring von Flavonoiden zu spalten (Winter *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1998).

Eubacterium ramulus, ein aus dem menschlichen Darm isoliertes Bakterium, transformierte zum Beispiel Quercetin-3-O-glucosid zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, Acetat und Butyrat bei intermediärer Bildung von Quercetin und Phloroglucin (Schneider *et al.*, 1999). In einem weiteren Versuch konnten Braune *et al.* (2001) bei der Inkubation ruhender Zellen vom gleichen Bakterium mit dem Flavon Luteolin die intermediäre Bildung von Eriodictyol sowie 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure als Endprodukt nachweisen.

In Inkubationsansätzen von Rutin (Quercetin-3-rutinosid) mit Mischkulturen, d.h. *Escherichia coli*, *Bacteroides uniformis* und *Clostridium* sp., konnten Winter und Mitarbeiter zeigen, dass das Rutinosid unter intermediärer Bildung von Quercetin vollständig zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure abgebaut wurde (Winter *et al.*, 1989).

Die Verstoffwechslung der Flavanone durch Mikroorganismen des Gastrointestinaltraktes wurde am Beispiel von Eriocitrin (Eriodictyol-7-O-rutinosid) von Miyake *et al.* (1997) untersucht. Nach Inkubation sowohl mit reinen Kulturen als auch mit humanen Faeces wies die Arbeitsgruppe neben Eriodictyol die Abbauprodukte 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure und Phloroglucin nach. Anhand des zeitlichen Verlaufs des Abbaus von Eriocitrin und der detektierten Metabolite schlugen die Autoren für das Flavanon den in

Abbildung 8 dargestellten Abbaumechanismus vor. Danach wird zuerst aus dem Glycosid das Aglykon Eriodictyol gebildet, welches dann einer Ringspaltung zwischen dem Kohlenstoffatom C-4 und dem A-Ring unterliegt, wobei 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure und Phloroglucin entstehen.

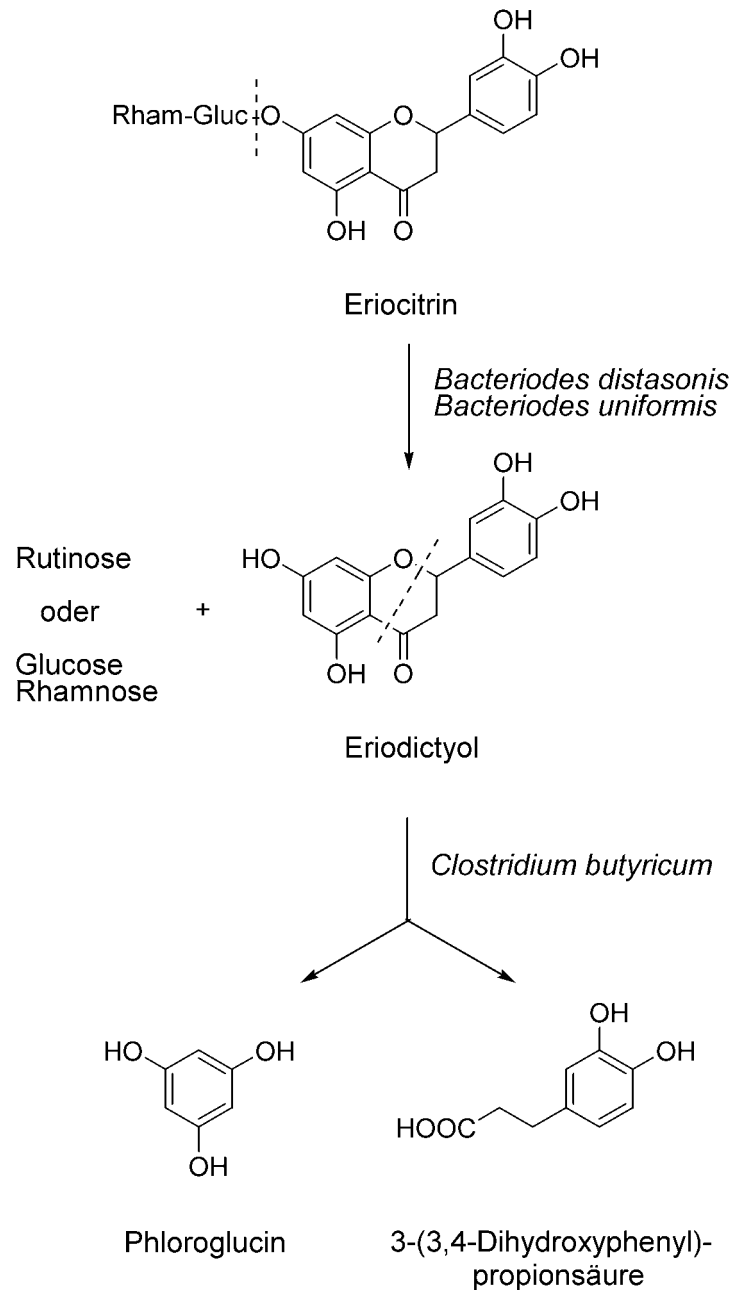


Abb. 8: Postulierter Abbaumechanismus von Eriocitrin (Eriodictyol-7-rutinosid) durch intestinale Bakterien (entnommen aus Miyaka *et al.*, 1997).

Eine Metabolisierung durch Ringöffnung zwischen dem Kohlenstoffatom C-4 und dem A-Ring unter Bildung von Phenylpropionsäuren, wie in dieser Studie nachgewiesen wurde, ist ebenfalls für das Flavanon Naringenin nach Inkubation mit menschlichen Faeces beschrieben worden (Rechner *et al.*, 2004).

Schließlich führten in der Gruppe der Flavanole *in-vitro*-Inkubationen von (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und (-)-Epicatechingallat mit humanen Faeces bzw. mit reinen Bakterienkulturen zur Bildung von verschiedenen δ -Phenyl- γ -valerolactonen, eine Klasse von Metaboliten, die bei anderen Flavonoiden bisher nicht detektiert worden ist (Meselhy *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001).

Die bakteriellen Metabolite können im menschlichen Körper absorbiert und weiter verstoffwechselt werden, worauf einige *in-vivo*-Studien hindeuten (Baba *et al.*, 1983; Gross *et al.*, 1996; Pietta *et al.*, 1997; Rechner *et al.*, 2002; Gonthier *et al.*, 2003). So konnte z. B. in einer Humanstudie nach Aufnahme von grünem Tee das Vorkommen von δ -Phenyl- γ -valerolactonen, deren Bildung durch Aktivitäten der Darmbakterien mehrfach belegt worden ist (Griffiths, 1964; Das und Sothy, 1971; Meselhy *et al.*, 1997; Heilmann und Merfort, 1998b), in Plasma und Urin nachgewiesen werden (Li *et al.*, 2000). Auch Olthof *et al.* (2003) interpretierten ihre Versuchsergebnisse in diesem Sinne. Nach einmaliger oraler Applikation von Rutin (Quercetin-3-rutinosid) an Probanden mit intaktem Dickdarm und an gesunden Ileostomierten wurde nur im Urin der erstgenannten Probanden die Hälfte der applizierten Dosis in Form von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, 3-Methoxy-4-hydroxyphenylelessigsäure und 3-Hydroxyphenylelessigsäure wiedergefunden. Die Autoren vertraten die Ansicht, dass das Glycosid zunächst einer Hydrolyse im Dickdarm unterliegt, wobei Quercetin gebildet wird, das dann unter Bildung von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und 3-Hydroxyphenylelessigsäure weiter abgebaut wird. Die Phenylelessigsäuren werden absorbiert und z. T. in der Leber unter Bildung von 3-Methoxy-4-phenylelessigsäure metabolisiert, bevor sie ausgeschieden werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Studie wurde in Inkubationsversuchen mit humanen Faeces gezeigt, dass Rutin unter Bildung von intermediärem Quercetin zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und 3-Hydroxyphenylelessigsäure abgebaut wurde (Aura *et al.*, 2002).

Bakterielle Metabolite weisen möglicherweise andere biologische Wirkungen als die ursprünglichen Flavonoide auf, die sie sowohl im Darm als auch im Körper nach Absorption entfalten können. So hat z. B. die Arbeitsgruppe um Kim gezeigt, dass die Abbauprodukte 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und 4-Hydroxyphenylelessigsäure die Blutplättchenaggrega-

tion *in vitro* effektiver hemmen als Quercetin und Rutin (Kim *et al.*, 1998). Ein weiteres interessantes Beispiel über die Bioaktivierung von Flavonoiden durch mikrobielle Metabolisierung stellt das Equol dar, dessen Bildungsweg aus dem Isoflavon Daidzein in Abb. 9 schematisch dargestellt ist (Rowland *et al.*, 2003). Man hat belegt, dass Equol stärkere östrogene Effekte als Daidzein besitzt (Setchell *et al.*, 2002). Außerdem hat man festgestellt, dass Equol im Gegensatz zu seinem Prekursor Daidzein, das keinen Effekt auf die Topoisomerase I und II zeigte, diese Enzyme effektiver als das Isoflavon Genistein hemmen konnte (Chang *et al.*, 1995). Die antikanzerogene Wirkung von Daidzein, die in einer vorangegangenen Studie auf die Inhibierung von Topoisomerase II zurückgeführt wurde (Marcovits *et al.*, 1989), kann deshalb *in vivo* möglicherweise durch Equol hervorgerufen werden.

Im Dickdarm kann nicht nur eine Bioaktivierung der Flavonoide, sondern auch eine Verminderung oder sogar eine Inaktivierung ihrer Wirkung erfolgen. Es ist daher wichtig, Veränderungen dieser Stoffklasse in diesem Darmbereich durch geeignete Methoden zu studieren und gebildete Metabolite zu charakterisieren.

2.5.2 Schweine-Caecum: Modell zur Untersuchung des Metabolismus von Flavonoiden

Das Schwein findet bereits seit vielen Jahren als Modelltier in Forschungen über kardiovaskuläre Physiologie, Dermatologie, Toxikologie, Stress und vielen anderen Bereichen Verwendung. In der Ernährungswissenschaft bietet das Schwein verschiedene Vorteile und wird von zahlreichen Autoren (z. B. Dodds 1982; Fleming und Wasileski, 1984; Miller und Ullrey, 1987; Simon 1994; Moughan *et al.*, 1994) als besonders geeignetes Modelltier für Studien über die Ernährung des Menschen beschrieben.

Nach Pond und Houpt (1978) entspricht das Schwein in Hinsicht auf seine nutritiven Anforderungen dem Menschen mehr als jeder andere Nicht-Primat der Spezies der Säugetiere. Auch haben Mensch und Schwein hinsichtlich der Anatomie, der Physiologie und des Metabolismus einen ähnlichen Gastrointestinaltrakt (Moughan *et al.*, 1994, Almond, 1996). Zudem hat man schon in früheren Studien Übereinstimmungen in der Zusammensetzung der bakteriellen Intestinalflora von Mensch und Schwein festgestellt (Donaldson 1968).

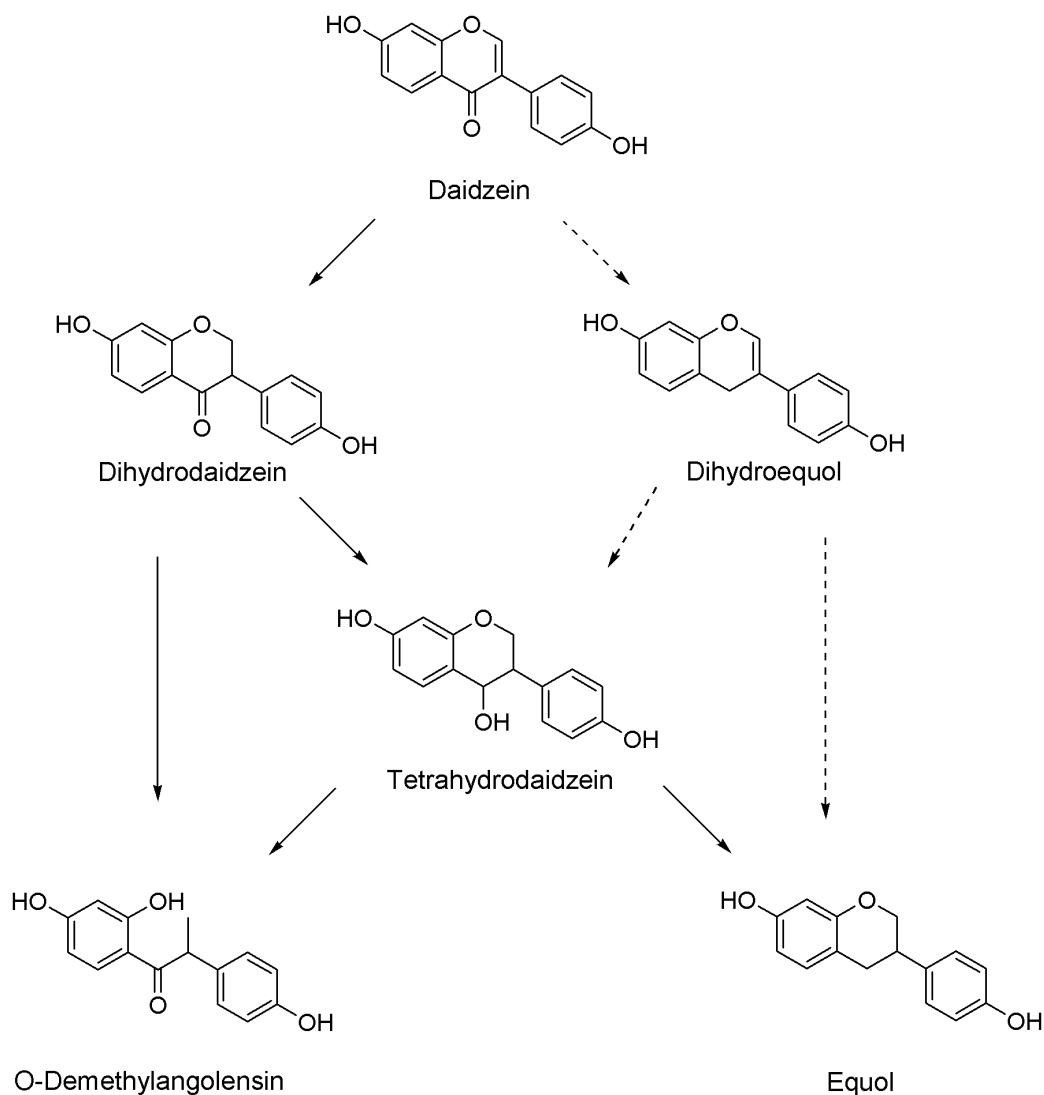


Abb. 9: Metabolisierung von Daidzein beim Menschen (entnommen aus Rowland *et al.*, 2003). Gestrichelte Pfeile symbolisieren postulierte Intermediäre bei der Bildung von Equol bzw. O-Demethylangolensin.

Die häufigsten, im Darmkanal des Schweins ständig anzutreffenden (residenten) Bakteriengattungen sind *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Escherichia* und *Clostridium*. Daneben kommen noch zahlreiche andere Bakteriengattungen wie *Micrococcus*, *Campylobacter* sowie Hefen vor, die teilweise zum transienten Anteil der Darmflora gerechnet werden (Schulze, 1987; Amtsberg, 1984; Gedek, 1989). Dabei verfügt der Dickdarm, wie beim Menschen, über die größte – 10^{12} KBE/g Darminhalt (Gedek, 1987) – und in ihrer Vielfalt umfangreichste Bakterienpopulation (Krüger und Schrödl, 2004).

Der Schweinedickdarm zeigt grundsätzlich die gleiche Gliederung wie beim Menschen. Er setzt sich aus dem Caecum (Blinddarm), dem Kolon (Grimmdarm) und dem Rektum (Mastdarm) zusammen. Das Schweine-Caecum ist ein sackartig ausgeformtes Organ, das bei einer Länge von 30 bis 40 cm ein Fassungsvermögen von maximal 1,5 bis 2,2 Litern besitzt und der Resorption von Wasser und Elektrolyten dient. Im Caecum erfolgt durch Aktivität der dort ansässigen Mikroflora u.a. die Bildung von kurzkettigen Fettsäuren, welche einen großen Einfluss auf die Funktion und Gesundheit des Dickdarmes haben (Binder und Metha, 1989; Rowe und Bayless, 1992; Scheppach, 1994). Aus Untersuchungen von Allison *et al.* (1979) an 14 Wochen alten Ferkeln beträgt die durchschnittliche Konzentration an Mikroorganismen im Caecuminhalt $2,37 \times 10^{10}$ /g Frischsubstanz. Pryde *et al.* (1999) geben eine Konzentration von $5,3 \times 10^{10}$ /g Frischsubstanz bei vier bis fünf Monate alten Schweine an. Dabei sind die kultivierbaren Bakterien vorwiegend strikt anaerob, wie *Bacteriodes*-, *Eubacterien*- oder *Selenomanas*-Arten (Robinson *et al.*, 1981).

Da, wie schon erwähnt, das Verdauungssystem von Mensch und Schwein hohe metabolische Übereinstimmungen zeigt, bietet es sich an, das vergleichsweise leicht verfügbare Schweine-Caecum als Modell für bakterielle Transformation einzusetzen. Zu dieser Vorgehensweise gibt es Hinweise aus der Literatur (Tsukahara *et al.*, 2002), die unterstützt werden von Arbeiten aus dem pharmazeutischen Sektor, in dem sich das Schweine-Caecum-Modell zur Kontrolle einer Arzneimittelwirkung bewährt hat (Sarlikiotis *et al.*, 1992).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Etablierung eines *ex-vivo*-Modells zur Untersuchung der Interaktion von intestinaler Mikroflora mit Flavonoiden

3.1.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Zahlreiche Studien deuten daraufhin, dass ein großer Teil der mit der Nahrung aufgenommenen Flavonoide unverändert den Dickdarm erreicht (Hollman *et al.*, 1997; Scalbert und Williamson, 2000; Spencer, 2003; Rechner *et al.*, 2004), wo sie in besonderem Maße der Umsetzung durch die intestinale Mikroflora unterliegen. Die Aglykone können durch bakterielle Glycosidasen aus den nicht resorbierten Glycosiden freigesetzt und nachfolgend im Dickdarm resorbiert werden und so für den Körper verfügbar sein. Des Weiteren kann eine Freisetzung der als Glucuronide über die Galle ausgeschiedenen Flavonoide erfolgen, die dadurch erneut resorbiert werden und im enterohepatischen Kreislauf zirkulieren können. Neben der Hydrolyse der Flavonoide durch die Darmflora spielt der Abbau der Aglykone durch Spaltung des C-Ringes im Flavonoidgerüst eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung im Dickdarm (Scalbert und Williamson, 2002). Die dabei entstehenden Produkte können andere biologische Eigenschaften als ihre Vorläufer aufweisen (Manach *et al.*, 2004; Manach *et al.*, 2005). Es ist daher wichtig, Metabolisierungsversuche in einem adäquaten System durchzuführen, will man die Veränderung dieser Stoffgruppe im menschlichen Dickdarm abschätzen. Grundlage der durchgeführten Untersuchungen war die Entwicklung eines *ex-vivo*-Modells, mit dessen Hilfe Interaktionen zwischen Flavonoiden und Dickdarmbakterien schnell und zuverlässig erfasst werden können. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde daher Schweine-Caecum im Hinblick auf seine Eignung zum Abbau von Flavonoiden getestet.

3.1.2 Inkubation mit Schweine-Faeces: Vorversuche zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen intestinaler Mikroflora und Flavonoiden

Vorversuche mit Schweine-Faeces dienten insbesondere dazu, die Fähigkeit der Schweine-Mikroflora zum Flavonoidabbau zu bestätigen. Hierzu wurde, wie unter 4.3.1 beschrieben, unter Erhaltung anaerober Bedingungen eine Faeces-Puffer-Suspension mit Rutin (Quercetin-3-rutinosid) versetzt. Das Gemisch wurde anschließend 4, 8 bzw. 24 Stunden bei 37 °C inkubiert, bevor es mittels HPLC-DAD (vgl. Abschnitt 4.2.1) auf die Bildung von Abbauprodukten geprüft wurde. Zur Probenvorbereitung wurden die Inkubationsansätze angesäuert und sofort zentrifugiert; es folgten Membranfiltration des Überstandes und Untersuchung auf Metabolite. Der Rückstand wurde extrahiert, zentrifugiert und auf im Überstand evtl. nicht lösliche Metabolite untersucht. Ferner wurden andere Inkubationsansätze nach beendeter Inkubation sofort schockgefroren, lyophilisiert, extrahiert und auf Metabolite geprüft. Zur Extraktion fand nach Optimierungsversuchen mit verschiedenen Lösungsmitteln (vgl. Abschnitt 4.1.3.4), ein Methanol/Wasser (1% Essigsäure) (70/30; v/v)-Gemisch Verwendung. Bei ersten Experimenten zeigte ein Vergleich keinen entscheidenden Vorteil für eine der beiden Aufarbeitungsmethoden. Um die Analysenzeit zu reduzieren, wurde daher in den folgenden Metabolismusstudien der gesamte Inkubationsansatz lyophilisiert und weiter bearbeitet.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen wurde Rutin durch die Schweine-Faeces-suspension innerhalb von 24 Stunden vollständig umgesetzt. Als Zwischenprodukt trat das Aglykon Quercetin **1** bereits nach vier Stunden Inkubation auf. Seine Identifizierung erfolgte anhand des Vergleiches von HPLC-Retentionszeit und UV-Spektrum mit einer authentischen Referenzsubstanz. Nach acht Stunden Inkubation konnte ein anderer Peak besser detektiert und anhand seiner HPLC-Retentionszeit und UV-Spektrum als 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure **1b** identifiziert werden. In Kontrollansätzen mit deaktivierter Mikroflora sowie in solchen mit Pufferlösung waren jene Peaks, die Quercetin **1** bzw. 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure **1b** zuzuordnen waren, nicht detektierbar. Das intermediäre Auftreten von **1** ist im Einklang mit Literaturdaten (Justesen *et al.*, 2000; Aura *et al.*, 2002). Bei Inkubationen von Rutin mit Human-Faeces-suspensionen wurde ebenfalls die Bildung von 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure **1b** nachgewiesen (Aura *et al.*, 2002; Rechner *et al.*, 2004). Mit den erzielten Ergebnissen konnte zunächst bestätigt werden, dass die Schweine-Mikroflora in der Lage ist, die niedermolekularen Polyphenole umzusetzen.

3.1.3 Prüfung metabolischer Kompetenz des Caecum-Inhalts: Enzymaktivitäten

Vor ihrer Verwendung zur Umsetzung von Flavonoiden wurde die caecale Mikroflora zunächst auf ihre Vitalität und enzymatische Aktivität überprüft. Hierzu wurden Kultivierungsversuche mit dem Inhalt frisch vom Schlachthof geholter Schweine-Caeci unter anaeroben bzw. aeroben Bedingungen gemäß Angaben im Abschnitt 4.3.2.1 durchgeführt. Dabei zeigte sich sowohl auf Schädler-Agarplatten (für anaerobe Bakterien) als auch auf Luria-Bertani-Agarplatten (für aerobe Bakterien) Wachstum. Damit wurde abgesichert, dass der zügige, unter anaerober Atmosphäre gehaltene Transport der Schweine-Caeci vom Schlachthof ins Labor die Lebensfähigkeit der Anaerobier, die den vorwiegenden Anteil in diesem Darmsegment darstellen, gewährleistet. Die enzymatische Aktivität der Darminhalte wurde mit Hilfe des API ZYM-Testsystems untersucht (vgl. Abschnitt 4.3.2.2). Solche standardisierten Testsysteme werden bereits seit vielen Jahren in der Routineanalytik erfolgreich zum Nachweis enzymatischer Aktivitäten in ungereinigten Untersuchungsmaterialien, wie zum Beispiel Geweben, Zellen, biologischen Flüssigkeiten, Mikroorganismen etc., eingesetzt. Bei dem schnell durchzuführenden Test wurden 19 Enzymaktivitäten überprüft. Zur Auswertung dienten Farbreaktionen, die eine An- bzw. Abwesenheit bestimmter Enzyme bestätigen. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die durchgeführten Testreaktionen sowie deren Ergebnisse für den Inhalt vier unterschiedlicher Schweine-Caeci. Wie der Tabelle 3 zu entnehmen ist, waren die wichtigsten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme der intestinalen Mikroflora, wie z. B. β -Glucuronidase, β -Glucosidase und α -Glucosidase (Scheline, 1973; Krishnaiah *et al.*, 2001; Laube *et al.*, 2001), in den Caeci-Inhalten aktiv vertreten. Da die Darminhalte interindividuelle Unterschiede bezüglich des Vorkommens einiger Enzyme zeigten (vgl. Tabelle 3), wurde für die vorgesehenen Metabolismusstudien eine Mischung aus mindestens drei Schweine-Caeci zum Inokulieren verwendet. Dadurch sollte eine durchschnittliche enzymatische Ausstattung gewährleistet werden (Clary *et al.*, 1988; McBurney und Thompson, 1989). Der Test diente weiterhin als Positivkontrolle und wurde parallel zu den Inkubationsexperimenten durchgeführt.

Tabelle 3: Ergebnisse von Enzymtests der Caecum-Inhalte (Auswahl n = 4; C₁-C₄) im kommerziellen API-ZYM-Test

Test	Substrat	Enzym	Ergebnis ¹			
			C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
1	Kontrolle		-	-	-	-
2	2-Naphthylphosphat	Alkaliphosphatase	+	+	+	+
3	2-Naphtylbutyrat	Esterase (C 4)	+	+	+	-
4	2-Naphthylcaprylat	Esterase Lipase(C 8)	-	+	+	+
5	2-Naphtylmyristat	Lipase (C 14)	-	-	-	-
6	L-Leucyl-2-naphthylamid	Leucin Arylamidase	+	+	+	+
7	L-Valyl-2-naphtylamid	Valin Arylamidase	-	+	+	-
8	L-Cystyl-2-naphtylamid	Cystin Arylamidase	-	-	-	-
9	N-Benzoyl-DL-arginin-2-naphtylamid	Trypsin	-	-	-	-
10	N-glutaryl-phenylalanin-2-naphtylamid	α -Chymotrypsin	-	-	-	-
11	2-Naphtylphosphat	Saure Phosphatase	-	+	-	-
12	Naphtol-AS-BI-phosphat	Naphtol-AS-BI-Phosphohydrolase	+	+	+	+
13	6-Br-2-naphtyl- α -D-Glactopyranosid	α -Galactosidase	+	+	+	+
14	2-Naphtyl- β -D-galactopyranosid	β -Galactosidase	+	+	-	+
15	Naphtol-AS-BI-B-D-glucuronid	β -Glucuronidase	+	+	+	+
16	2-Naphtyl- α -D-glucopyranosid	α -Glucosidase	+	+	+	+
17	6-Br-2-naphtyl- β -D-Glucopyranosid	β -Glucosidase	+	+	+	+
18	1-Naphtyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid	N-Acetyl- β -Glucosaminidase	+	+	-	+
19	6-Br-2-naphtyl- α -D-mannopyranosid	α -Mannosidase	+	+	+	+
20	2-Naphtyl- α -L-fucopyranosid	α -Fucosidase	-	+	-	-

¹ Qualitatives Ergebnis, beschreibt den positiven (+) oder negativen (-) Ausgang der Farbreaktion

3.1.4 pH-Wert des Caecum-Inhalts

Pufferlösungen sollen die im Laufe der Fermentationen entstehenden flüchtigen Fettsäuren abpuffern, um den für die Mikroorganismen günstigen pH-Wert aufrechtzuerhalten. Die in Inkubationsexperimenten mit humanen Faeces verwendeten Pufferlösungen wiesen pH-Werte zwischen 6,8 und 7,5 auf (Miyake *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2003; Rechner *et al.*, 2004). Derartige pH-Werte liegen im unteren Bereich des Dickdarmes vor. Um die Verhältnisse im Caecum anzunähern, wurde zunächst der pH-Wert in diesem Darmabschnitt ermittelt und als Richtwert für die Herstellung des im Rahmen dieser Untersuchungen verwendeten reduzierenden Puffers genutzt. Hierzu wurden an unterschiedlichen Tagen drei bis vier Schweine-Caeci – aus frisch geschlachteten Tieren – ins Labor gebracht; sofort – ohne vorherige Verdünnung – erfolgten die pH-Wert Messungen. Der pH-Wert der Darminhalte (n = 20) lag zwischen 5,9 und 6,6. Als Richtwert diente dann ein Mittelwert von 6,3.

3.1.5 Interaktion zwischen Flavonoiden und Schweine-Caecum-Mikroflora

Zur erfolgreichen Etablierung unserer Fermentationsversuche mit Schweine-Caecum und zur Kontrolle ihrer Funktionsfähigkeit wurden zunächst Quercetin (3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavon) **1**, ein hinsichtlich seiner Bioaktivität und Metabolismus bisher ausführlich untersuchtes Flavonol, sowie Vertreter einiger Flavonoid-Unterklassen, d.h. Chrysin (5,7-Dihydroxyflavon) **2**, Naringenin (5,7,4'-Trihydroxyflavanon) **3** und Hesperetin **4** (5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon) als Modellsubstanzen herangezogen (Abb. 10). Zu diesem Zweck wurde der Inhalt frisch vom Schlachthof (unter kontrollierten Bedingungen) bezogener Schweine-Caeci unter anaeroben Bedingungen mit anaerobem Carbonat-Phosphat-Puffer nach Lebet *et al.* (2000) (pH 6,3; 37 °C) verdünnt; nach Homogenisieren und Filtrieren wurde das erhaltene Filtrat als Inokulum verwendet. Aliquote des Inokulums wurden jeweils in mit CO₂ begaste Inkubationsgefäße mit den Zielverbindungen (gelöst in Dimethylsulfoxid) gegeben und die Inkubation bei 37 °C über 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 24 h gehalten. Zu Kontrollzwecken erfolgten Ansätze mit Dimethylsulfoxid und reinem Caecum-Inokulum (Blindansätze) sowie Kontrollversuche mit Flavonoiden und Pufferlösung (Kontrollansätze). Alle Experimente erfolgten in einer speziell dafür entwickelten Anaerobenkammer, die kontinuierlich mit einer N₂/CO₂-Mischung (80:20; v/v) begast wurde. Nach Ablauf der Inkubation wurden die einzelnen Proben lyophilisiert und extrahiert. Die

Identifizierung der Metabolite erfolgte mittels HPLC-DAD anhand des Vergleiches der Retentionszeiten und UV-Spektren der Probenmoleküle mit denen von authentischen Referenzverbindungen. Strukturelle Absicherung erfolgte dann mittels HPLC-MS/MS- und HRGC-MS-Analysen. Der zeitliche Verlauf der mikrobiellen Transformation der Flavonoide wurde mittels HPLC-DAD registriert. Zur Quantifizierung sind Kalibrierungskurven bei einer für die jeweiligen Substrate bzw. Metabolite charakteristischen Wellenlänge aufgenommen worden.

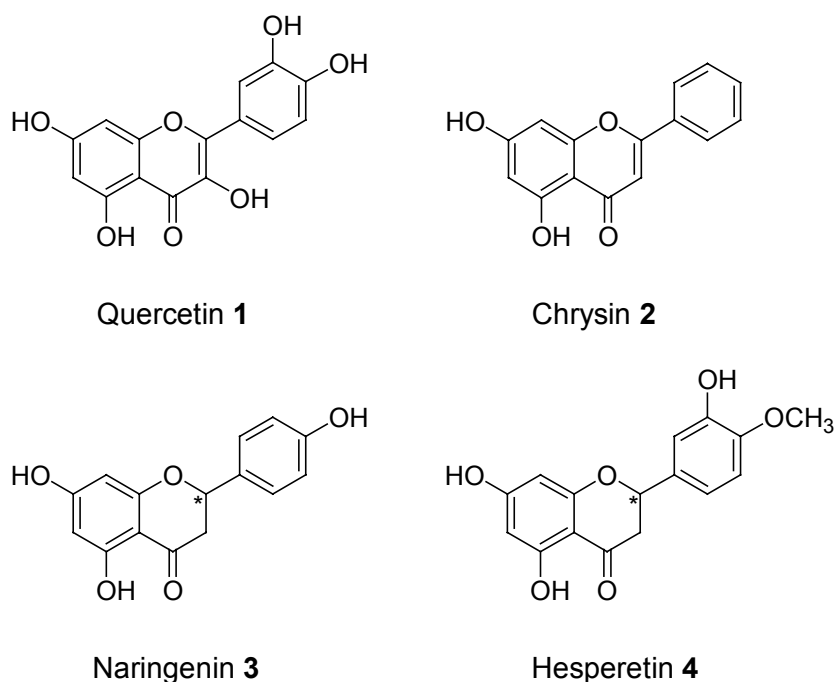


Abb. 10: Strukturformeln der zur Etablierung des Schweine-Caecum-Modells eingesetzten Flavonoide.

3.1.5.1 Transformation von Quercetin 1 durch caecale Mikroflora

Ein vollständiger Abbau von Quercetin **1** (1 mM) durch die Mikroflora des Schweine-Caecums erfolgte nach 24-stündiger Inkubation. Dabei sind mittels HPLC-DAD-Analytik drei Metabolite mit den Retentionszeiten 7,2 **1a**, 10,4 **1b** und 15,3 **1c** min detektiert worden (Abb. 11). In Kontrollansätzen mit Pufferlösung war kein Abbau von Quercetin **1** nachweisbar, die Substanz zeigte unter den Versuchsbedingungen bei 24-stündiger Inkubation chemische Stabilität. Auch in den Blindansätzen waren solche Peaks nicht detektierbar (Daten sind nicht gezeigt). Durch Vergleich der Retentionszeiten sowie der UV-Absorptionsspektren dieser Metabolite mit denen von authentischen Referenzsubstanzen,

wurden sie als Phloroglucin **1a**, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure **1b** und 3,4-Dihydroxytoluol **1c** identifiziert. Durch zusätzliche Analysen mittels HRGC-MS (für Phloroglucin **1a**) bzw. HPLC-ESI_{neg}-MS/MS ist diese Identifizierung bestätigt worden. Die aus den Produktionenspektren der Metabolite erhaltenen Daten waren identisch mit denen authentischer Referenzverbindungen.

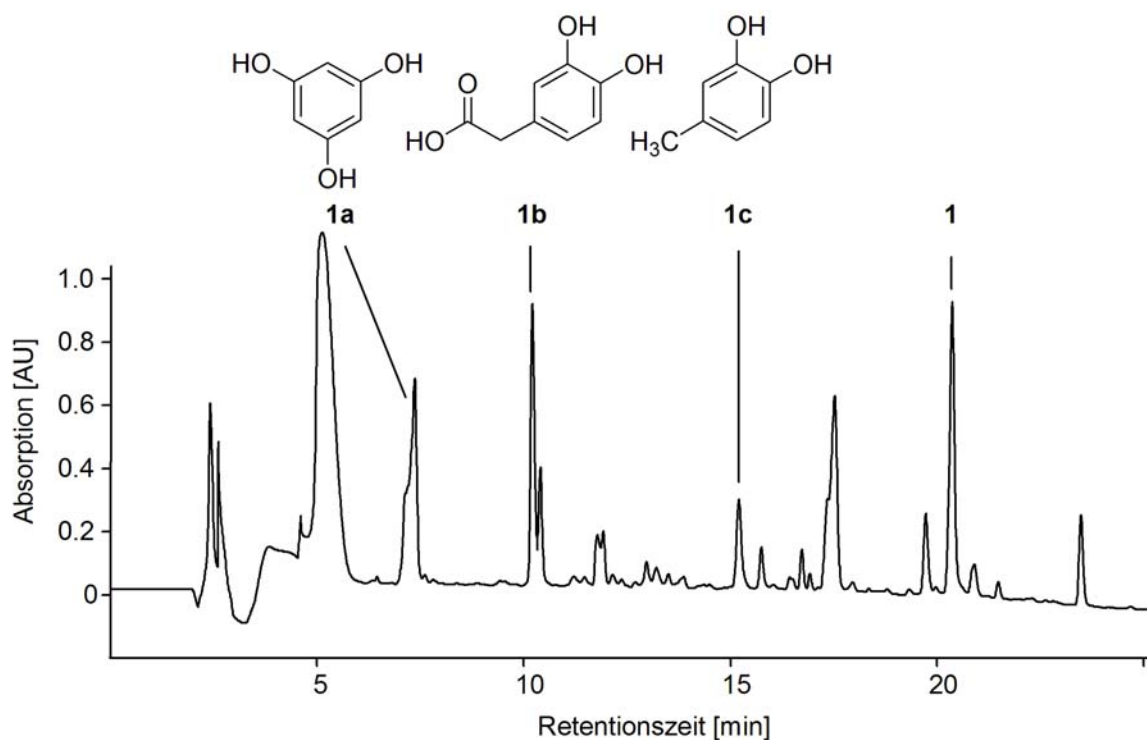


Abb. 11: HPLC-DAD-Analyse einer achtstündigen Inkubationsprobe von Quercetin **1** mit Schweine-Caecum-Mikroflora unter anaeroben Bedingungen. **1a**: Phloroglucin; **1b**: 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure; **1c**: 3,4-Dihydroxytoluol. Unmarkierte Peaks sind Caecum-Inhaltsstoffe.

Trennsäule Eurospher 100 RP C-18; Fließmittel: Wasser/0,05% TFA (v/v) - Acetonitril (MeCN); Gradient: 1% auf 99% MeCN in 40 min; Fluss: 1 ml/min; Detektion bei 210 nm.

Beispielhaft ist der Vergleich der Produktionenspektren von aus Quercetin **1** durch Aktivität caecaler Mikroflora gebildetem Metabolit **1b** und der kommerziell erhältlichen 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure in Abb. 12 dargestellt. Die Produktionenspektren waren gekennzeichnet durch das einfach deprotonierte Molekülion m/z 167 und den für Säuren charakteristischen Verlust von Kohlendioxid, der zur Bildung des Fragmentions m/z 123

fürte. Die Fragmentationen m/z 105 und m/z 95 konnten durch einen zusätzlichen Verlust von Wasser bzw. Kohlenstoffmonooxid entstehen.

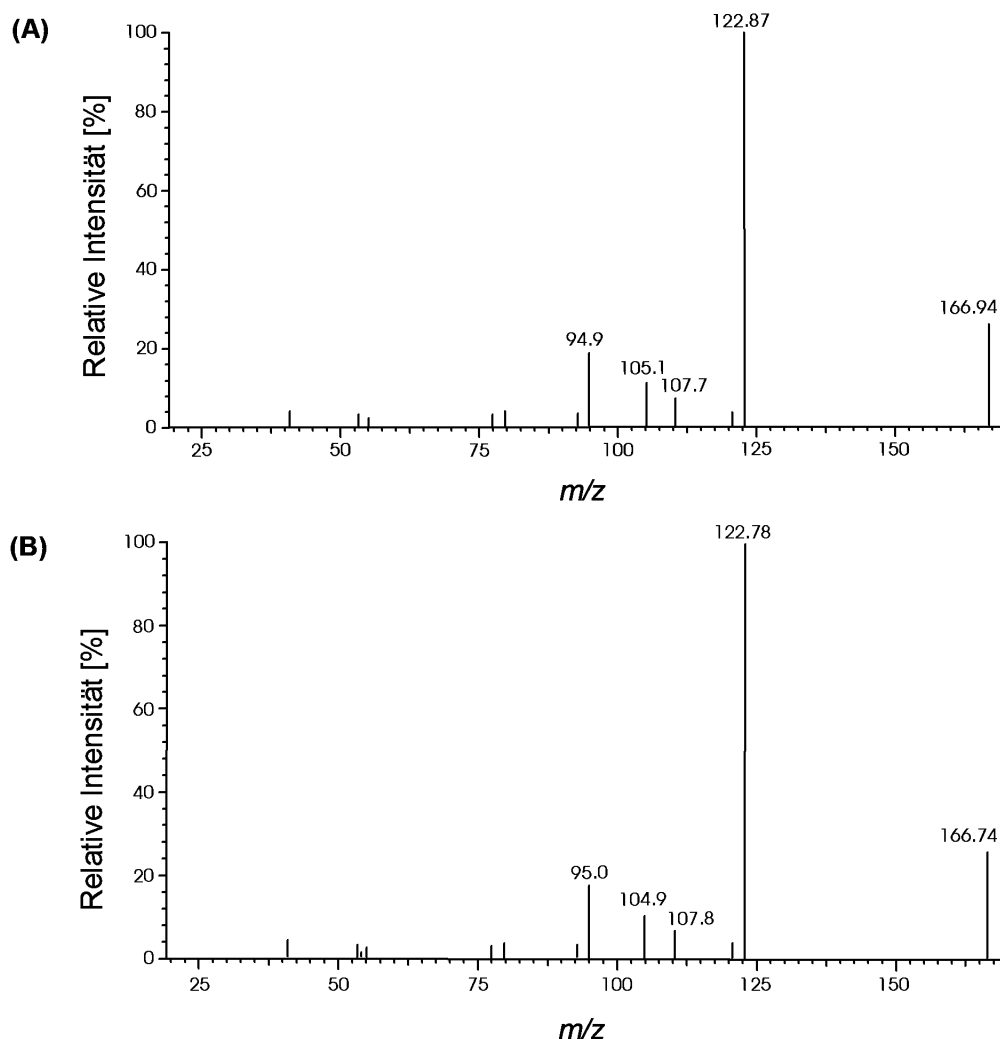


Abb. 12: Vergleich der Produktionenspektren von (A) 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure (authentische Referenzsubstanz) und (B) Quercetinabbauprodukt **1b** nach Stoßaktivierung des deprotonierten Moleküls mit Argon (Kollisionsgasdruck 0,27 Kpa, Kollisionsenergie 40 eV) im negativen Modus.

Der zeitliche Verlauf der mikrobiellen Transformation von Quercetin **1** ist in Abb. 13 dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass der Anteil des Flavonols **1** kontinuierlich während der Inkubation mit Schweine-Caecum abnahm, so dass nach 24 Stunden kein Quercetin **1** mehr detektiert werden konnte. Als Ringspaltungsprodukte waren Phloroglucin **1a** und 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure **1b** schon innerhalb der ersten beiden Stunden gebildet. Nach 10 Stunden Inkubation erreichte deren Konzentration ein Maximum von 0,15 mM für Phloroglucin **1a** und 0,4 mM für 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure **1b**. Während 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure **1b** nach 24 h noch nachweisbar war, zeigten HPLC-DAD-Ana-

lysen die Abwesenheit von Phloroglucin **1a**. Der dritte Metabolit, 3,4-Dihydroxytoluol **1c**, wurde erstmals nach 4 Stunden nachgewiesen; bei gleichzeitiger Abnahme von 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure **1b** stieg sein Anteil kontinuierlich an und erreichte ein Maximum von 0,68 mM nach 24-stündiger Inkubation.

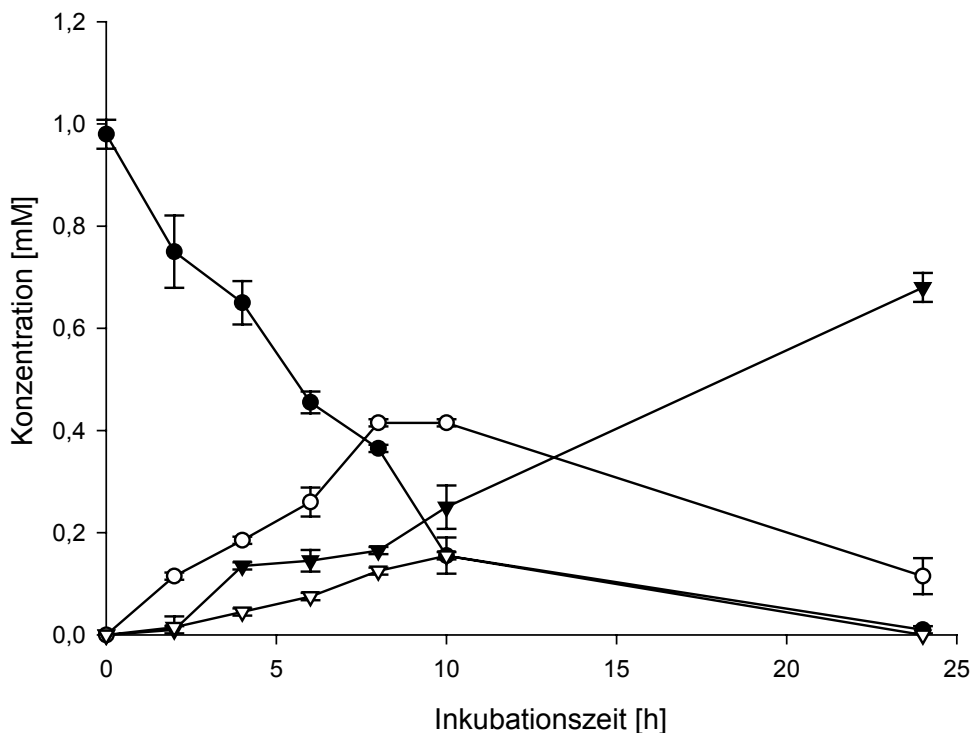


Abb. 13: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von Quercetin **1** durch Schweine-Caecum-Mikroflora. Quercetin **1** (●); Phloroglucin **1a** (▽); 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure **1b** (○); 3,4-Dihydroxytoluol **1c** (▼). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

Die Bildung von 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure **1b** und Phloroglucin **1a** belegt die Fähigkeit der caecalen Mikroflora, das Flavonol Quercetin **1** durch Spaltung des C-Rings abzubauen. Phloroglucin **1a** wurde offensichtlich rasch weiter abgebaut, da **1a** nur intermediär auftrat und die ermittelten Konzentrationen deutlich niedriger als die von **1b** waren (Abb. 13). Die intermediäre Bildung von Phloroglucin **1a** ist in Übereinstimmung mit Literaturergebnissen (Winter *et al.*, 1991; Miyake *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1999; Braune *et al.*, 2001). So konnte z. B. die Arbeitsgruppe um Schneider zeigen, dass die Inkubation von Quercetin-3-O-glucosid mit *Eubacterium ramulus* zur Bildung von 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure **1b**, Acetat und Butyrat sowie zum intermediären Auftreten von Phloroglucin **1a** führte (Schneider *et al.*, 1999). Analog hatte man 3,4-Dihydroxyphenyl-

essigsäure **1b** auch schon früher als spezifischen Metabolit der Umwandlung von Quercetin **1** (bzw. von Quercetinglycosiden) im Dickdarm beschrieben (z. B. Baba *et al.*, 1981; Gross *et al.*, 1996; Graefe, 2000; Schneider *et al.*, 2000; Braune *et al.*, 2001; Aura *et al.*, 2002).

Justesen *et al.* (2000) führten Inkubationsversuche mit humanen Faeces und Quercetin bzw. Rutin durch und wiesen die Bildung von 3,4-Dihydroxytoluol **1c** nach; dies ist ebenfalls in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen. Schließlich ist auch die Bildung von **1c** aus Quercetinglycosiden in Humanstudien gezeigt worden (Baba *et al.*, 1981; Graefe, 2000). Da 3,4-Dihydroxytoluol **1c** im Gegensatz zu Phloroglucin **1a** und 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure **1b** erst nach vierstündiger Inkubation detektiert wurde – hinzu kommt, dass seine Konzentration bei gleichzeitiger Abnahme des Anteils von **1b** zunahm (vgl. Abb. 13) – kann seine Bildung mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Decarboxylierung von **1b** durch caecale Mikroflora zurückgeführt werden. Auf diesen Punkt wird im Abschnitt 3.3.4 näher eingegangen.

Die schnelle Metabolisierung von Phloroglucin **1a** hängt damit zusammen, dass diese Verbindung unter anaeroben Bedingungen, wie sie im Dickdarm herrschen, neben Benzoyl-CoA und Resorcin ein zentrales Intermediat im anaeroben Abbau phenolischer Verbindungen darstellt (Heider und Fuchs, 1997). So ist der Abbau von Phloroglucin **1a** oder die Aktivität einer Phloroglucin-Reduktase für eine Reihe von anaeroben Spezies gezeigt worden (Tsai *et al.*, 1976; Schink und Pfennig, 1982; Krumholz und Bryant, 1986; Haddock und Ferry, 1989; Khanna *et al.*, 1992).

Bei Phloroglucin **1a** sind meta-ständige Hydroxy-Gruppen vorhanden, welche durch die Keto-Enol-Tautomerie die Elektronendichte im Ring verringern und diesen dadurch einem reduktiven Angriff leichter zugänglich machen. Daher kann diese Substanz ohne weiteres von Enzymen mit Elektronendonoren wie beispielsweise NADPH reduziert werden (Haddock und Ferry, 1989; Kluge *et al.*, 1990; Brune und Schink, 1990; Brune und Schink, 1992). Die Öffnung des Ringes erfolgt anschließend über Hydrolasen, der weitere Abbau über eine modifizierte β -Oxidation. Abbildung 14 zeigt beispielsweise den Abbaumechanismus von **1a** durch *Pelobacter acidigallici* und *Eubacterium oxidoreducens* (Heider und Fuchs, 1997).

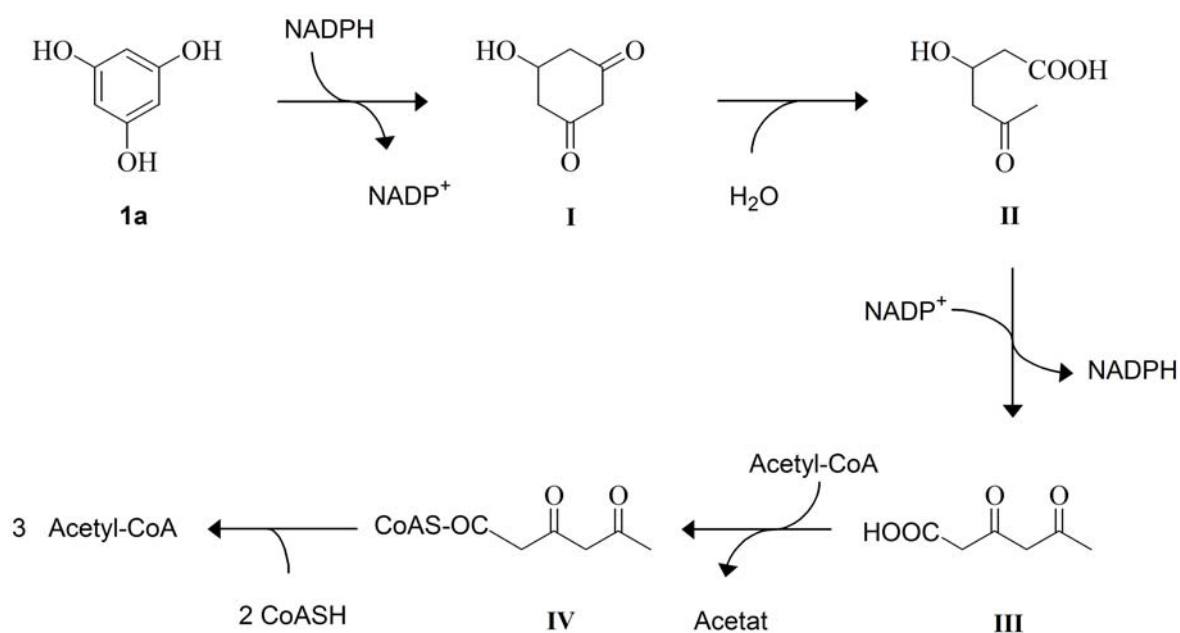


Abb. 14: Abbaumechanismus von Phloroglucin **1a** durch *Pelobacter acidigallici* und *Eubacterium oxidoreducens* unter anaeroben Bedingungen. Die mit römischen Zahlen versehenen Substanzen sind: 1,3-Dioxo-5-hydroxycyclohexan I; 3-Hydroxy-5-oxo-hexansäure II; Triacetat III; Acetacetyl-CoA IV. (entnommen aus Heider und Fuchs, 1997)

3.1.5.2 Transformation von Chrysin 2 durch caecale Mikroflora

Das Flavon Chrysin **2**, ohne Hydroxylierung im B-Ring, war durch die Schweine-Caecum-Mikroflora nicht abzubauen; innerhalb der kontrollierten 24 Stunden wurden keine Metabolite festgestellt. Auch bei Verlängerung der Inkubationsdauer auf 48 bzw. 72 Stunden war keine Konzentrationsabnahme zu beobachten. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Befunden von Griffiths und Smith (1972) überein, die bei Studien mit der Mikroflora aus Ratten-Caecum ebenfalls keinen Abbau von **2** feststellen konnten. Weiterhin fanden Walle und Mitarbeiter in einer Bioverfügbarkeitsstudie am Menschen, denen Chrysin **2** verabreicht worden war, bis zu 95% der applizierten Dosis unverändert in den Faeces wieder (Walle *et al.*, 2001). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Dickdarmbakterien Chrysin **2** nur zu einem sehr geringen Anteil oder überhaupt nicht metabolisiert hatten, was in Analogie zu unseren Ergebnissen steht. Möglicherweise ist das Fehlen von Hydroxygruppen am B-Ring ein Grund der Resistenz von **2** gegen einen mikrobiellen Abbau (Griffiths und Smith, 1972).

3.1.5.3 Transformation von Naringenin **3** durch caecale Mikroflora

Der Abbau von Naringenin **3** (1 mM) durch die caecale Mikroflora erfolgte langsam, so dass nach 24 Stunden Inkubation noch bedeutende Mengen an Naringenin **3** detektierbar waren. Bei den HPLC-DAD-Analysen der Inkubationsproben sind zwei unbekannte Peaks mit den Retentionszeiten 14,4 min **3a** und 20,1 min **3b** detektiert worden (Abb. 15). Diese Peaks waren in den HPLC-DAD-Chromatogrammen der Kontroll- und Blindansätze nicht vorhanden (Daten sind nicht gezeigt). Die entstandenen Metabolite konnten durch Vergleich ihrer Retentionszeiten und UV-Spektren mit denen von authentischen Referenzsubstanzen als 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** und 3-Phenylpropionsäure **3b** identifiziert werden. Die zu erwartenden Molekularmassen von m/z 165 für **3a** und m/z 149 für **3b** wurden mittels HPLC-ESI_{neg}-MS bestätigt. Weiterhin konnten mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS die für **3a** und **3b** charakteristischen Fragmente, d.h. m/z 121, 93, 59 für **3a** und m/z 105, 77 für **3b** bestimmt werden, die mit denen der entsprechenden Referenzverbindungen 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure und 3-Phenylpropionsäure übereinstimmen.

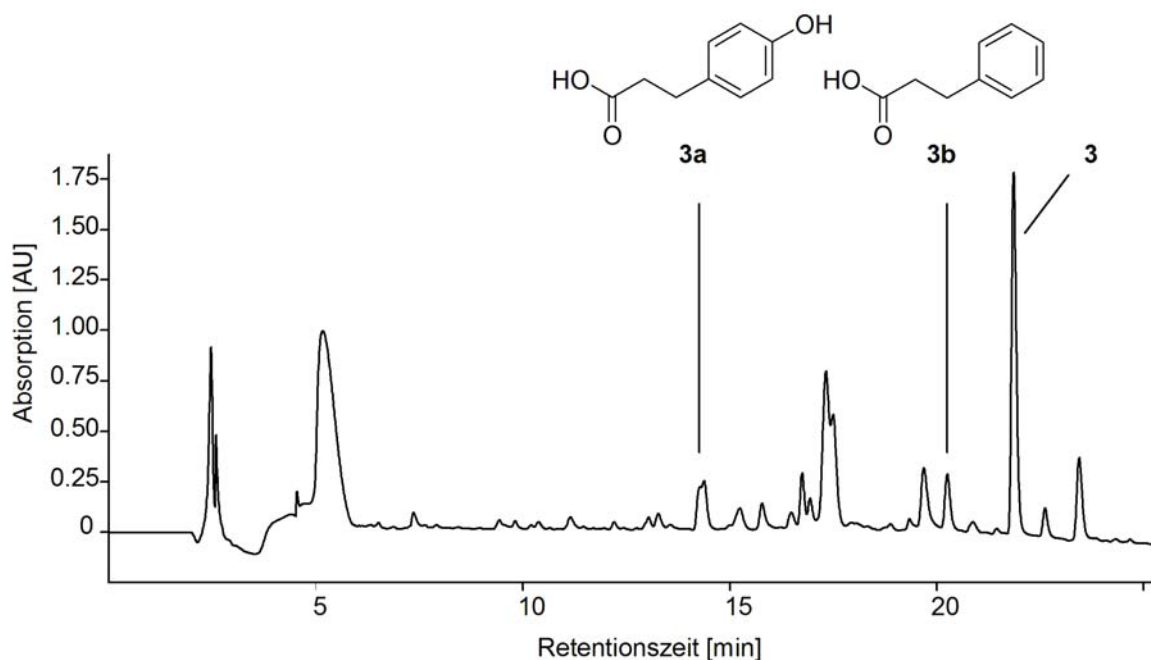


Abb. 15: HPLC-DAD-Analyse einer 24-stündigen Inkubationsprobe von Naringenin **3** mit Schweine-Caecum-Mikroflora unter anoxischen Bedingungen. **3a**: 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure; **3b**: 3-Phenylpropionsäure. Unmarkierte Peaks sind Caecum-Inhaltsstoffe.

Trennsäule Eurospher 100 RP C-18; Fließmittel: Wasser/0,05% TFA (v/v) - Acetonitril (MeCN); Gradient: 1% auf 99% MeCN in 40 min; Fluss: 1 ml/min; Detektion bei 210 nm.

Der zeitliche Verlauf des Abbaus von **3** ist in Abb. 16 gezeigt. Naringenin **3** wurde nur sehr langsam transformiert. Der erste Metabolit, 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a**, war erst nach 6 Stunden Inkubation detektierbar; 3-Phenylpropionsäure **3b** war nach 8 Stunden nachweisbar. Die Anteile an beiden Metaboliten nahmen nur langsam zu. Bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Stunden wurden ein weiterer Abbau von **3**, eine Konzentrationsabnahme von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** und die weitere Bildung von 3-Phenylpropionsäure **3b** festgestellt (Ergebnisse sind nicht gezeigt).

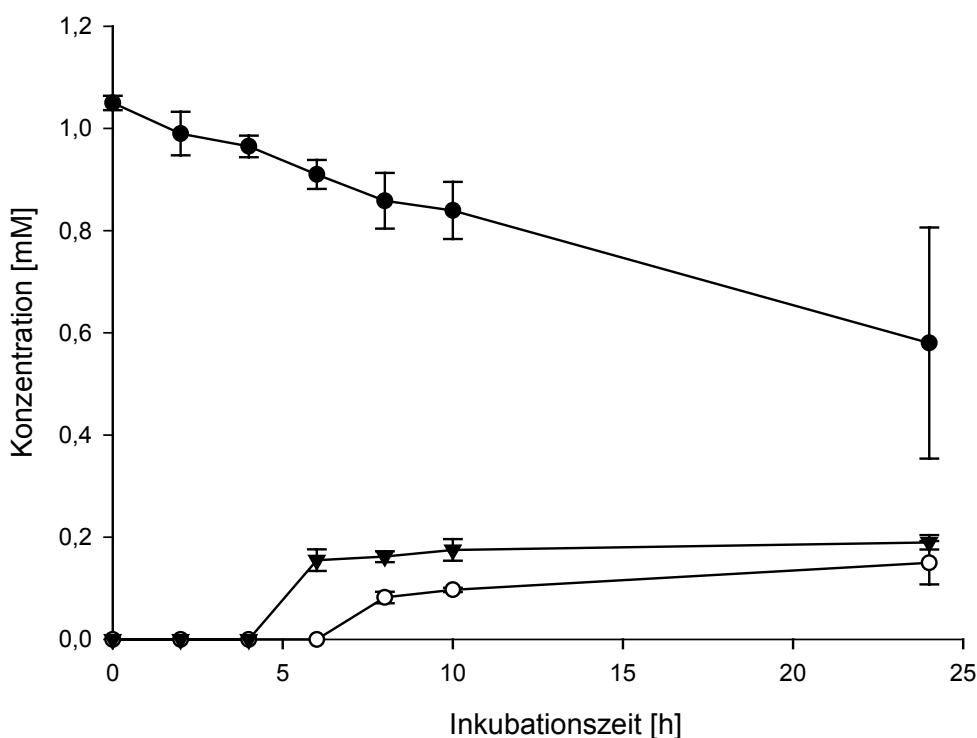


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von Naringenin **3** durch Schweine-Caecum-Mikroflora. Naringenin **3** (●); 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** (▼); 3-Phenylpropionsäure **3b** (○). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

Naringenin **3** wurde im Gegensatz zu Quercetin **1** langsam abgebaut; diesbezüglich lassen sich Übereinstimmungen mit den von Justesen *et al.* (2000) gemachten Beobachtungen feststellen. Nach Inkubation von Rutin (Quercetin-3-rutinosid) bzw. Naringin (Naringenin-7-rutinosid) mit humanen Faeces konnten die Autoren Quercetin **1** nur intermediär detektieren, Naringenin **3** hingegen wurde akkumuliert und nur langsam abgebaut. Die Arbeitsgruppe setzte ebenfalls **1** und **3** als Substrat ein und stellte dabei fest, dass Naringenin **3** im Gegensatz zu Quercetin **1** langsamer abgebaut wurde (Justesen *et al.*, 2000).

Die Dehydroxylierung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** durch humane intestinale Mikroflora ist bekannt (Li *et al.*, 2000). Auch die anderen bei unseren Studien mit **3** erhaltenen Resultate stimmen mit Literaturergebnissen gut überein (Griffiths und Smith, 1972; Kim *et al.*, 1998; Justesen *et al.*, 2000; Rechner *et al.*, 2004). So berichteten kürzlich Rechner *et al.* (2004) über die Bildung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** und 3-Phenylpropionsäure **3b** aus Naringin (Naringenin-7-rutinosid) nach Inkubation mit humaner Faecesflora. Gleichsinnige Ergebnisse hatten bereits früher Griffiths und Smith (1972) bei ihren Studien mit Ratten-Caecum erhalten. Die Bildung von **3a** aus Naringenin **3** oder aus Naringin durch verschiedene Isolate aus humanen Faeces wurde ebenfalls durch Kim *et al.* (1998) beschrieben.

Das aus der Spaltung des C-Ringes von **3** zu erwartende Phloroglucin **1a** (Rao und Cooper, 1997; Justesen *et al.*, 2000; Rechner *et al.*, 2004) konnten wir in unseren Versuchen nicht nachweisen. Ein intermediäres Auftreten von **1a** hat die Arbeitsgruppe um Rechner in ihren Untersuchungen mit Naringin beobachtet (Rechner *et al.*, 2004). Da Naringenin **3**, wie schon erwähnt, nur langsam abgebaut wurde, resultierten nur geringe Mengen an Spaltprodukten. Berücksichtigt man die oben beschriebene schnelle Metabolisierung von Phloroglucin **1a**, so ist davon auszugehen, dass die eventuell akkumulierten (d.h. nicht weiter abgebauten) Konzentrationen an **1a** unterhalb der Nachweisgrenze lagen und deshalb nicht erfasst werden konnten. Mit der gleichen Begründung erklärten Aura *et al.* (2002) das Fehlen von **1a** bei ihren Inkubationsexperimenten.

3.1.5.4 Transformation von Hesperetin 4 durch caecale Mikroflora

Hesperetin **4** (1 mM) wurde durch die intestinale Mikroflora innerhalb von 24 Stunden nahezu vollständig abgebaut. Mittels HPLC-DAD-Analytik gelang der Nachweis von zwei Intermediaten mit den Retentionszeiten 7,2 **1a** und 19,2 **4a** min und einem Endprodukt mit der Retentionszeit 14,9 min **4b** (Abb. 17). In Kontrollen mit Dimethylsulfoxid und Caecum-Inhalt waren vergleichbare Peaks nicht detektierbar. Weiterhin zeigte Hesperetin **4** innerhalb der kontrollierten 24 Stunden chemische Stabilität (Daten sind nicht gezeigt).

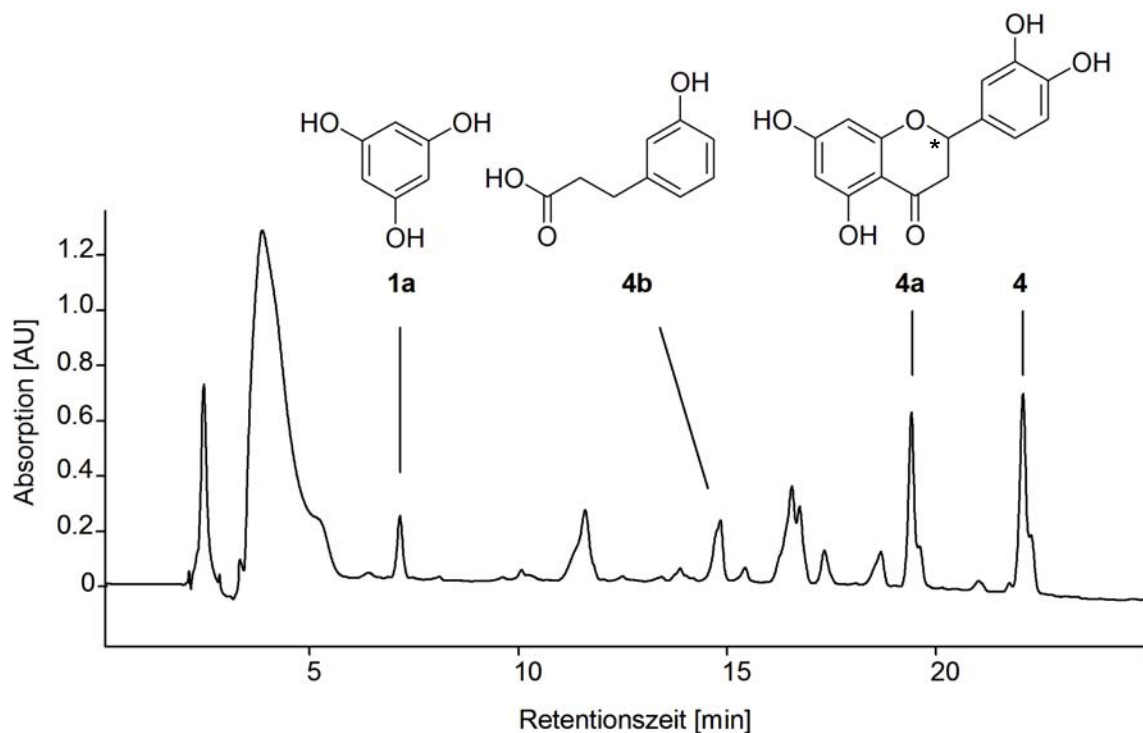


Abb. 17: HPLC-DAD-Analyse eines 8-stündigen Inkubationsansatzes von Hesperetin **4** mit Schweine-Caecum-Mikroflora unter anaeroben Bedingungen. Eriodictyol **4a**, 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure **4b**, Phloroglucin **1a**. Unmarkierte Peaks sind Caecum-Inhaltsstoffe.

Trennsäule Eurospher 100 RP C-18; Fließmittel: Wasser/0,05% TFA (v/v) - Acetonitril (MeCN); Gradient: 1% auf 99% MeCN in 40 min; Fluss: 1 ml/min; Detektion bei 210 nm.

Der Metabolit mit der Retentionszeit 7,2 min **1a** ließ sich wie, oben beschrieben (vgl. Abschnitt 3.1.5.1) als Phloroglucin identifizieren. Ein Vergleich der Retentionszeiten und der UV-Spektren von **4a** und **4b** mit denen von authentischen Referenzen ermöglichte ihre Identifizierung als Eriodictyol und 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure. Die Molekülonen von m/z 185 und m/z 165, die mittels HPLC-ESI_{neg}-MS ermittelt wurden, bestätigten diese Identifizierung. Weiterhin konnte anhand von HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Analysen gezeigt werden, dass die Produktionenspektren von **4a** und **4b**, d.h. m/z 151, 135, 107 bzw. m/z 121, 119, 106 mit denen von authentischen Referenzsubstanzen identisch waren.

Wie aus der Darstellung in Abb. 18 hervorgeht, erfolgte die Transformation von Hesperetin **4** durch die caecale Mikroflora sehr schnell. Als erster Metabolit trat nach zweistündiger Inkubation Eriodictyol **4a** auf. Seine höchste Konzentration (ca. 0,3 mM) erreichte **4a** nach 8 Stunden. Danach war ein langsamer Abfall zu beobachten. Als Ringspaltungsprodukt war 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure **4b** nach 4 Stunden detektierbar. Deren

Konzentration stieg kontinuierlich bei gleichzeitiger Abnahme von Eriodictyol **4a** an und erreichte ein Maximum von ungefähr 0,6 mM nach 24-stündiger Inkubation. Die Metabolisierung von Hesperetin **4** war begleitet vom intermediären Auftreten von Phloroglucin **1a** in niedrigen Konzentrationen (Ergebnisse nicht dargestellt).

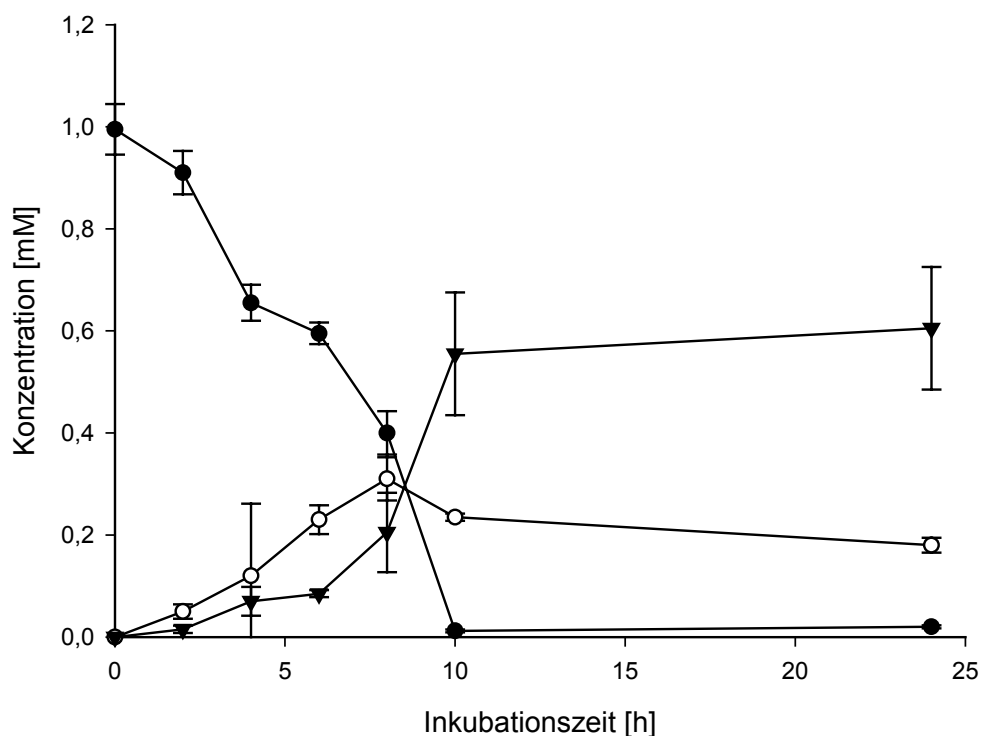


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von Hesperetin **4** durch Schweine-Caecum-Mikroflora. Hesperetin **4** (●); Eriodictyol **4a** (○); 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure **4b** (▼); Phloroglucin **1a** nicht gezeigt ($\leq 0,03$ mM). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

Die Bildung von Eriodictyol **4a** aus Hesperetin **4** belegt O-Demethylase-Aktivität in der Schweine-Caecum-Mikroflora. Es ist bekannt, dass eine Vielzahl von anaeroben aceto-genen Bakterien in der Lage ist, Phenylmethylether unter Spaltung der Etherbindung zu metabolisieren (Bache und Pfennig, 1981; Frazer und Young, 1985; Kreft und Schink, 1994; Heider und Fuchs, 1997). Dabei wird in der Regel nur die Methylgruppe verwertet. Andere Spezies, wie zum Beispiel *Holophage foetida*, sind aber auch in der Lage, den aromatischen Ring abzubauen (Heider und Fuchs, 1997). Die Schlüsselreaktion bei der Verwertung der Methylsubstrate ist die durch O-Demethylasen katalysierte Abspaltung der Methylgruppe von den methoxylierten aromatischen Verbindungen und ihre Übertragung auf Tetrahydrofolat. Dabei sollen Corrinoidproteine eine wichtige Rolle beim Transfer der Methylgruppen spielen (Heider und Fuchs, 1997). Zur Illustration ist in Abbildung 19

beispielhaft eine schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der O-Demethylierung durch *Acetobacterium dehalogenans* wiedergeben (Kaufman *et al.*, 1998) (Erläuterung der einzelnen Schritte siehe Abbildungslegende). Das gebildete Methyltetrafolat wird dann über den Acetyl-CoA-Weg zur Acetatbildung verwendet (Heider und Fuchs, 1997; Hur und Rafii, 2000).

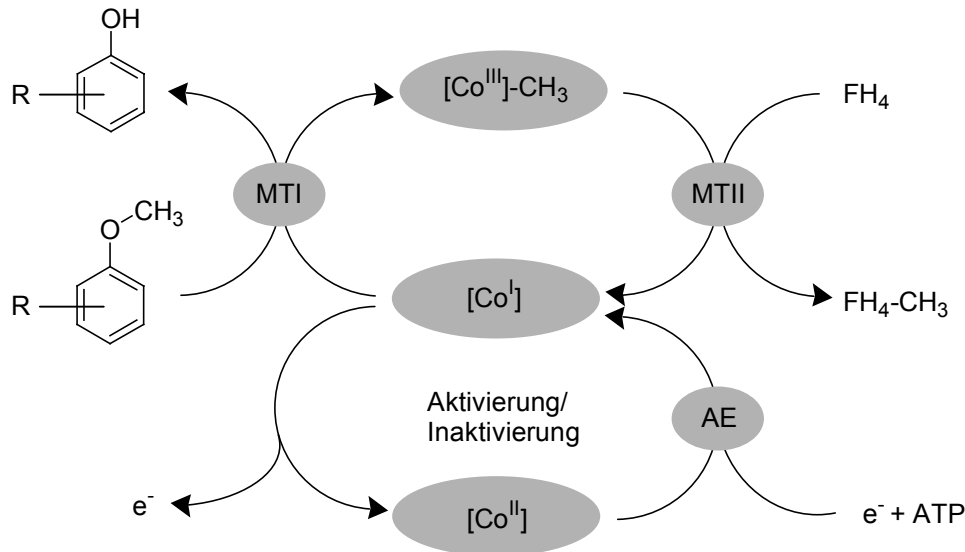


Abb. 19: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der O-Demethylierung durch *Acetobacterium dehalogenans* unter Beteiligung von vier Proteinkomponenten. Die erste Teilreaktion wird durch eine Methyltransferase I (MTI) katalysiert. Dabei wird die Methylgruppe vom Phenylmethylether abgespalten und auf ein Corrinoidprotein in seiner superreduzierten Form übertragen. Die Demethylierung des Methylcobalamin und die Methylierung von Tetrahydrofolat erfolgen durch die Methyltransferase II (MTII). Aufgrund seines sehr negativen Redoxpotentials kann das dabei entstandene Cob(I)alamin im Verlauf mehrerer Reaktionszyklen gelegentlich zu Cob(II)alamin oxidiert werden. Zur Reaktivierung des durch die Autoxidation entstandenen inaktiven Cob(II)alamin-Proteins wird ein aktivierendes Enzym (AE) benötigt, das die Reduktion des inaktiven Cob(II)alamins zum katalytisch aktiven Cob(I)alamin unter ATP-Verbrauch katalysiert. (entnommen aus Kaufman *et al.*, 1998).

Zu den genannten acetogenen Bakterien zählt das häufig aus menschlichen Faeces isolierte, strikt anaerobe *Eubacterium limosum*, dessen Fähigkeit, auf verschiedenen Phenylmethylethern als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen, schon lange bekannt ist (Genthner *et al.*, 1981; DeWeerd *et al.*, 1988). Kürzlich wiesen Hur und Rafii (2000) nach, dass *Eubacterium limosum* auch in der Lage ist, ähnlich wie die Schweine-Caecum-Mikroflora in der vorliegenden Arbeit, die Isoflavone Biochanin A (5,7-Dihydroxy-4'-

methoxyisoflavon) und Formononetin (7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavon) unter Bildung von Genistein bzw. Daidzein zu O-demethylieren. Das Bakterium verwertete nur die Methyl-gruppe; ein weiterer Abbau der freigesetzten Isoflavonoide wurde nicht beobachtet.

Es ist weiterhin bekannt, dass das Vorliegen einer freien bzw. hydrolysierbaren Hydroxy-gruppe an der C-4'-Position des B-Ringes eine Voraussetzung für die Ringöffnung ist (Griffiths und Smith, 1972; Meselhy *et al.*, 1997). Somit war die Bildung von Eriodictyol **4a** aus **4** zu erwarten.

Die nachfolgende Ringöffnung von **4a** resultierte in der Bildung von Phloroglucin **1a** und 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure **4b**. Miyake und Mitarbeiter berichteten ebenfalls über die Bildung von **1a** aus Eriodictyol **4a** nach Inkubation mit intestinaler Mikroflora (Miyaka *et al.*, 1997). 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure **4b** ist als Metabolit von **4** im Kolon bekannt (Hollman und Katan, 1998; Rechner *et al.*, 2002). Auch in früheren Studien hatte man die Bildung von **4b** aus Hesperetin **4** sowie Eriodictyol **4a** nach oraler Aufnahme durch Ratten beobachtet (Boot *et al.*, 1958). Honohan *et al.* (1976) hatten zudem die Entstehung von **4b** aus Hesperetin **4** durch die Mikroflora von Ratten-Caecum beschrieben.

Das Auftreten von 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure aus Eriodictyol **4a**, früher bereits beschrieben (Miyake *et al.*, 1997; Braune *et al.*, 2001), konnten wir bei unseren Studien nicht bestätigen. Auf der Grundlage früherer Experimente, bei denen die Bildung von 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure **4b** aus 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure nach Inkubation mit humaner Faecesflora beobachtet wurde (Peppecorn und Goldman, 1971; Hollman und Katan, 1998; Rechner *et al.*, 2002), ist rasche p-Dehydroxylierung von 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure zu berücksichtigen. Analog zu unseren Beobachtungen ist derartige p-Dehydroxylierung beschrieben worden (Meselhy *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001).

Bei einigen der Wiederholungsversuche zum Metabolismus von **4** durch caecale Mikroflora wurde die Bildung von 3-Phenylpropionsäure **3b** aus **4b** festgestellt (Daten nicht gezeigt). Unterschiede in den Fermentationsendprodukten wurden ebenfalls durch Rechner *et al.* (2004) beschrieben und lassen sich durch interindividuelle Variationen der Enzymausstattung der Schweine-Caeci erklären (Bauer *et al.*, 2004; Rechner *et al.*, 2004).

Fazit

Das Bestreben, mikrobielle Fermentationsvorgänge im Dickdarm nachzuahmen und damit Flavonoidveränderungen zu erfassen, hatte zur Nutzung von Faeces als eine schnell verfügbare Bakterienquelle oder zur Verwendung von Reinkulturen geführt. Einige Autoren berichteten jedoch über eine unterschiedliche bakterielle Besiedlung innerhalb der einzelnen Darmsegmente (Allison *et al.*, 1979; Russel, 1979; Robinson *et al.*, 1981; 1984; Moore *et al.*, 1987; Bauer *et al.*, 2004; Marteau *et al.*, 2001), die sich in Abhängigkeit vom Entnahmeort des Inokulums auf den *in-vitro*-Fermentationsablauf auswirken kann. Sie stellen demzufolge die Anwendbarkeit von Faeces als repräsentativ für die Mikroflora des gesamten Dickdarms in Frage. Auch die Wechselwirkungen, zum Beispiel gegenseitiges Inhibieren, Konkurrenz um Nährstoffe und Wachstumsfaktoren, wie sie im Dickdarm zwischen den mehr als 400 vorkommenden Bakterienarten stattfinden, werden bei Verwendung reiner Isolate zur Inokulation von Flavonoiden nicht berücksichtigt.

Durch die *Valva ileocaecalis* erfolgt der Übertritt des Chymus aus dem terminalen Ileum in das Caecum; dort unterliegen u.a. nicht absorbierte Flavonoide ihren ersten Veränderungen durch Dickdarmbakterien. Da Schwein und Mensch eine große Ähnlichkeit bezüglich der Anatomie und Physiologie des Gastrointestinaltraktes aufweisen (Stevens, 1988; Moughan *et al.*, 1994; Almond, 1996), sollte das vergleichsweise leicht verfügbare Schweine-Caecum die natürliche Situation im Darm widerspiegeln und wurde deshalb im Hinblick auf seine Eignung zum Abbau von Flavonoiden geprüft. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen wandelte die caecale Mikroflora Quercetin **1** in Phloroglucin **1a**, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure **1b** und 3,4-Dihydroxytoluol **1c** um. Chrysin **2** wurde hingegen nicht abgebaut. Das Flavanon Naringenin **3** wurde zu 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** und 3-Phenylpropionsäure **3b** metabolisiert und aus Hesperetin **4** entstanden *via* Eriodictyol **4a** 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3b** und Phloroglucin **1a**.

Berücksichtigt man Literaturdaten (vgl. Abschnitt 3.1.5), so erweitern unsere Ergebnisse die mit *in-vitro*-Systemen bzw. selektiven mikrobiellen Umsetzungen bislang erhaltenen Resultate und belegen somit die Anwendbarkeit von Schweine-Caecum als geeignetes *ex-vivo*-Modell zur Untersuchung des intestinalen Metabolismus von Flavonoiden. Wir dehnten insofern unsere Studien mit weiteren Flavonoiden aus, insbesondere auch unter dem Blickwinkel struktureller Gesichtspunkte. Über die Ergebnisse wird in den nachfolgenden Abschnitten 3.2 und 3.3 berichtet.

3.2 Anwendung des Schweine-Caecum-Modells: Studien zum Metabolismus ausgewählter Flavonoide

3.2.1 Untersuchungen zum Metabolismus von Hispidulin 5

Natürliche Methoxyflavone sind u.a. Bestandteile diverser Nahrungsergänzungsmittel. Ein Vertreter dieser Stoffklasse ist das Hispidulin (5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavon) **5** (Abb. 20), dem eine Reihe chemopräventiv wirksamer Effekte zugesprochen werden. So hat man beispielsweise gezeigt, dass das in Salbeiarten weit verbreitete Flavon **5** zu den Inhibitoren der Lipidperoxidation (Chen *et al.*, 1990) sowie zu den entzündungshemmenden Mitteln (Gil *et al.*, 1994) zählt.

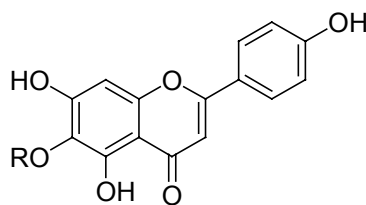


Abb. 20: Hispidulin **5** (R = CH₃) bzw. Scutellarein **5a** (R = H).

In einer vor kurzem veröffentlichten *in-vivo*-Studie stellte man fest, dass die orale Applikation von Hispidulin-7-O-neohesperidosid an zuvor mit 10%iger alkoholischer Lösung behandelten Ratten zur Abnahme der hepatischen Lipidperoxidation sowie zur Aktivitätszunahme der alkoholmetabolisierenden Enzyme führte (Park *et al.*, 2004). Wie bereits erwähnt, ist in unserem Arbeitskreis Hispidulin **5** aus Salbei isoliert und als hochwirksamer Benzodiazepinrezeptor-Ligand charakterisiert worden (Kavvadias *et al.*, 2004).

Da über den Metabolismus dieser viel versprechenden Verbindung bislang keine Daten vorlagen, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, mit dem etablierten Schweine-Caecum-Modell die Biotransformation dieses Bioflavons im Dickdarm zu simulieren. Hierzu wurde Hispidulin **5** in Anlehnung an die in unserem Arbeitskreis erarbeitete Methode (Kavvadias *et al.*, 2004) zunächst in ausreichenden Mengen synthetisiert (vgl. Abschnitt 4.3.9) und gemäß Angaben im Abschnitt 4.3.2.6 mit caecaler Mikroflora inkubiert. Die Identifizie-

rung der Metabolite erfolgte, wie bereits zuvor an anderen Beispielen beschrieben, mittels HPLC-DAD bzw. HPLC-ESI_{neg}-MS/MS.

Transformation von Hispidulin 5 durch die Mikroflora des Schweine-Caecums

Hispidulin **5** (0,5 mM) wurde durch die caecale Mikroflora nahezu vollständig umgesetzt. Dabei wurden anhand von HPLC-DAD-Analysen zwei Metabolite, die nach 14,6 **3a** bzw. 19,4 min **5a** eluierten, detektiert (Daten sind nicht gezeigt). Verbindung **3a** wurde, wie im Abschnitt 3.1.5.3 beschrieben, als 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure identifiziert. Der zweite Metabolit **5a** wurde über den Vergleich seines UV-Spektrums und seiner HPLC-Retentionszeit mit den entsprechenden Daten einer authentischen Referenzverbindung als Scutellarein **5a** (Abb. 20) identifiziert. Die Molmasse von m/z 285 (HPLC-ESI_{neg}-MS) bestätigte diese Identifizierung. Auch das mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS erhaltene Produktionsspektrum von **5a** wies die gleichen charakteristischen Fragmente, m/z 285, 167, 137 und 95, auf wie die Referenz Scutellarein. Hispidulin **5** war in den Pufferlösungen über den kontrollierten Zeitraum von 24 Stunden chemisch stabil. Auch in den Blindansätzen (Inokulum und Lösungsmittel Dimethylsulfoxid) konnte zu keinem Zeitpunkt ein Peak detektiert werden, der einem der beiden Metabolite zuzuordnen war (Daten sind nicht gezeigt).

Der zeitliche Verlauf des Hispidulinabbaus ist in Abbildung 21 dargestellt. Daraus wird erkennbar, dass **5** rasch einer O-Demethylierung unterlag, die zur Bildung von Scutellarein **5a** führte. So war innerhalb von 6 Stunden Inkubation mehr als die Hälfte des Methoxyflavons **5** umgesetzt worden. Im Gegensatz zu dieser schnellen Reaktion verlief der weitere Abbau von **5a** sehr langsam; nur geringe Mengen an 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** waren nach 24-stündiger Inkubation nachweisbar.

Die Bildung von Scutellarein **5a**, aus Hispidulin **5** bestätigt die bereits im Abschnitt 3.1.5.4 nachgewiesene O-Demethylase-Aktivität in der Schweine-Caecum-Mikroflora. Wie schon erwähnt, wurde in ähnlicher Form eine O-Demethylierung von Isoflavonen durch das strikt anaerobe menschliche Darmbakterium, *Eubacterium limosum*, von Hur und Rafii (2000) beschrieben. Das Bakterium war in der Lage, unabhängig von der Position der Methoxygruppe, sowohl Formononetin (5,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavon) als auch Glycitein (7,4'-Dihydroxy-6-methoxyisoflavon) zu O-demethylieren (Hur und Rafii, 2000). Dies ist ebenfalls in Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen. So unter-

lagen sowohl Hesperetin **4** (vgl. Abschnitt 3.1.5.4), welches in der Position C-4' eine Methoxygruppe aufweist, als auch das in der C-6-Position methoxylierte Hispidulin **5** einer O-Demethylierung. Ferner hatten Nielsen *et al.* (2000) gezeigt, dass die 6-Position bei der O-Demethylierung von Tangeretin, einem 5,6,7,8,4'-Pentamethoxyflavon, leicht angegriffen wird.

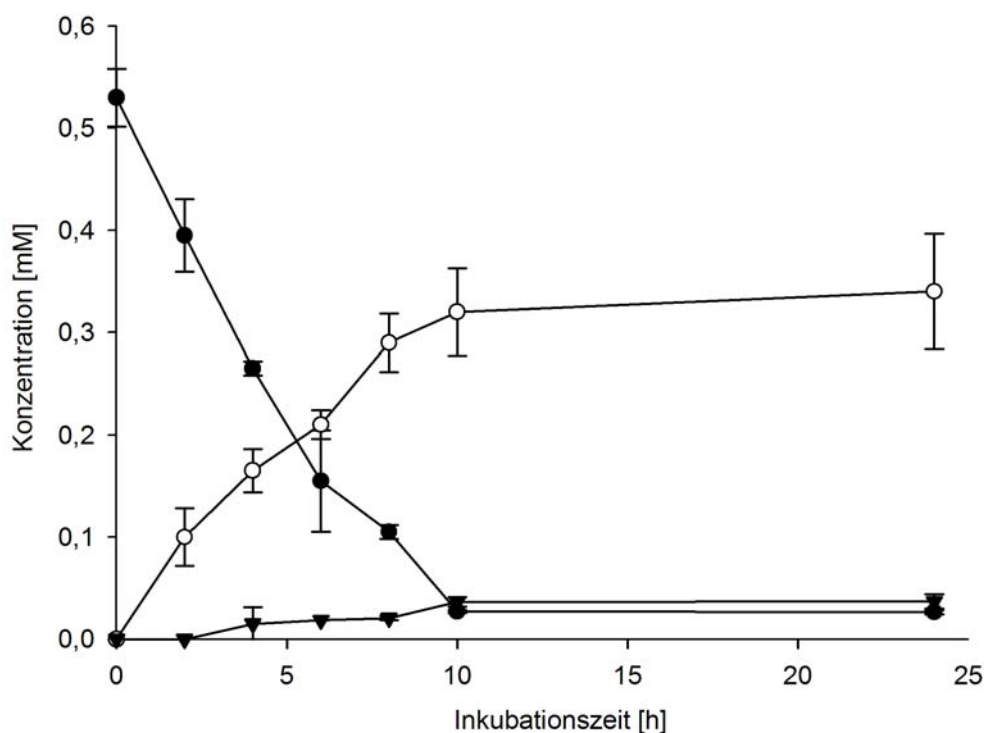


Abb. 21: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von Hispidulin **5** durch Schweine-Caecum-Mikroflora. Hispidulin **5** (●); Scutellarein **5a** (○); 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure **3a** (▼). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

Die Bildung von 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure **3a** aus Scutellarein **5a** war zu erwarten, da bekannt ist, dass bei Flavonen die C-Ringspaltung zwischen C-4 und A-Ring und damit die Bildung von Phenylpropionsäuren (C₆-C₃-Körper) begünstigt ist (Heilmann *et al.*, 1998b).

Das zweite, zumindest theoretisch zu erwartende, Spaltungsprodukt aus dem A-Ring – 1,2,3,5-Tetrahydroxybenzol – konnte in unseren Fermentationsversuchen nicht detektiert werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass 1,2,3,5-Tetrahydroxybenzol von Anaerobiern schnell über Phloroglucin **1a** unter Bildung von Acetyl-Co und CO₂ abgebaut wird (Heider und Fuchs, 1997). Weiterhin wird 1,2,3,5-Tetrahydroxybenzol als Cosubstrat für die Um-

wandlung von Pyrogallol zu Phloroglucin **1a** im anaeroben Milieu gebraucht (Heider und Fuchs, 1997). Da die Spaltung von Scutellarein **5a** sehr langsam stattgefunden hat und somit nur geringe Konzentrationen an 1,2,3,5-Tetrahydroxybenzol zu detektieren gewesen wären, die zudem weiter abgebaut wurden, kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass 1,2,3,5-Tetrahydroxybenzol zwar gebildet wurde, aufgrund niedriger intermediärer Konzentrationen jedoch nicht erfasst worden ist.

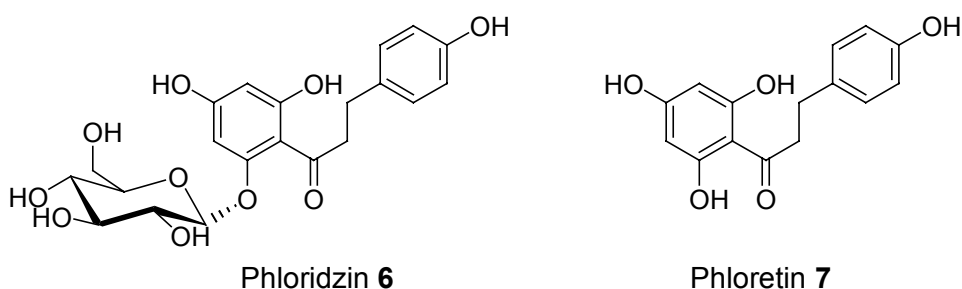
Die beobachtete schnelle O-Demethylierung von Hesperetin **4** und Hispidulin **5** (Abb. 18 und 21) lässt vermuten, dass im Caecum-Inhalt hohe O-Demethylase-Aktivitäten vorhanden sind. Möglicherweise befinden sich in diesem komplexen Habitat auch unterschiedliche Spezies, die in der Lage sind, die Methylgruppen zu verwerten. Auch Hur und Raffi (2000) waren der Annahme, dass im Dickdarm weitere Spezies vorkommen, die ähnliche Aktivität wie *E. limosum* aufweisen, da sie bei ihren *in-vitro*-Experimenten, verglichen mit einem *in-vivo*-Versuch (Davies und Hill, 1989), niedrigere O-Demethylierungsraten ermittelten.

Die Affinität von Scutellarein **5a** zum Benzodiazepinrezeptor ist in der Literatur beschrieben (Hui *et al.*, 2000). Sie ist allerdings mit einem IC_{50} -Wert von 21,0 μ M viel niedriger als die des Vorläufers Hispidulin **5** ($IC_{50} = 1,3 \mu$ M) (Kavvadias *et al.*, 2004). Es ist daher denkbar, dass es durch Metabolisierung *in vivo* zur Verminderung einer durch die Bindung von **5** am Benzodiazepinrezeptor hervorgerufenen Wirkung kommen kann. Auf der anderen Seite können infolge der Bildung von **5a** andere Wirkungen ausgelöst werden. Es ist zum Beispiel bekannt, dass Scutellarein **5a** ein potenter Inhibitor der Histaminfreisetzung in basophilen Leukemia Ratten-Zellen (RBL-2H3) ist (Kawasaki *et al.*, 1994). Das Flavon **5a** zeigt weiterhin antioxidative Eigenschaften (Yokozawa *et al.*, 1997) und ist als effektiver α -Glucosidase-Inhibitor bekannt (Kawabata *et al.*, 2003).

3.2.2 Untersuchungen zum Metabolismus von Phloridzin 6, Phloretin 7 und Xanthohumol 8

3.2.2.1 Umsetzungen von Phloridzin 6 und Phloretin 7

Selten in Früchten zu finden sind die hellgelben Dihydrochalcone. Eine Ausnahme ist u.a. der Apfel, in dem die Hauptvertreter dieser Stoffklasse, d.h. Phloridzin (2'-O-Glucosyl-4',6',4-trihydroxydihydrochalcon) **6** und Phloretin (2',4',6',4-Tetrahydroxydihydrochalcon) **7**, konzentriert sind (Crespy *et al.*, 2002). Phloridzin **6** ist ein Inhibitor des Natrium abhängigen D-Glucosecotransporters 1 (SGLT1) (Alvarado und Crane, 1964) und wird deshalb als antidiabetisch wirksam eingestuft (Rossetti *et al.*, 1987; Dimitrakoudis *et al.*, 1992; Hongu *et al.*, 1998). Auch seinem Aglykon **7** kommt bei der Resorption von Glucose eine nicht zu vernachlässigende Rolle zu. So ist Phloretin **7** in der Lage, der basolateral lokalisierten GLUT2, der Glucose in Richtung des Glucosekonzentrationsgradienten transportiert, zu inhibieren (Kellet und Helliwell, 2000) und auf diese Weise die Resorption von Glucose zu limitieren (Crespy *et al.*, 2002). Insbesondere die selektive Hemmung der DNA-Topoisomerase II macht das Dihydrochalcon **7** in Bezug auf eine mögliche chemopräventive Wirkung attraktiv (Constatinou *et al.*, 1995).



Wie bereits erwähnt, unterliegen Flavonoidglycoside im Dickdarm zunächst einer Hydrolyse, bevor es zur weiteren Metabolisierung kommt (Aura *et al.*, 2002; Rechner *et al.*, 2004). Um die Fähigkeit der Schweine-Caecum-Mikroflora, Flavonoidglycoside zu hydrolysieren, zu bestätigen, wurde Phloridzin **6** ausgewählt und auf seine mikrobielle Deglycosilierung hin untersucht. Weitere Glycoside wurden nicht geprüft, da es das Ziel unserer Arbeit war, die Veränderungen von im Dickdarm freigesetzten Aglykonen zu klären. Parallel zur Umsetzung von Phloridzin **6** wurden zusätzliche Untersuchungen mit dessen Aglykon **7** durchgeführt. Hierzu wurden unter anaeroben Bedingungen die Dihydrochal-

cone **6** und **7** gemäß Angaben im Abschnitt 4.3.2.6 mit caecaler Mikroflora versetzt und über einen Zeitraum von 24 Stunden inkubiert. Im Falle von Phloridzin **6** erfolgten zusätzliche Inkubationsansätze über 10, 20, 30 und 60 min. Der mikrobielle Abbau wurde erneut mittels HPLC-DAD verfolgt.

Bei der HPLC-DAD-Analyse der Inkubationsproben von Phloridzin **6** wurde festgestellt, dass dessen Hydrolyse sehr schnell verlief. Wie aus Abb. 22 deutlich wird, war das freigesetzte Aglykon, Phloretin **7** ($t_R = 21,8$ min), dessen Identifizierung über den Vergleich seines UV-Spektrums und seiner Retentionszeit mit den entsprechenden Daten einer authentischen Referenzverbindung erfolgte, schon nach 10-minütiger Inkubation detektierbar (Abb. 22A) und nach zweistündiger Inkubation war **6** ($t_R = 17$ min) kaum noch nachweisbar (Abb. 22B).

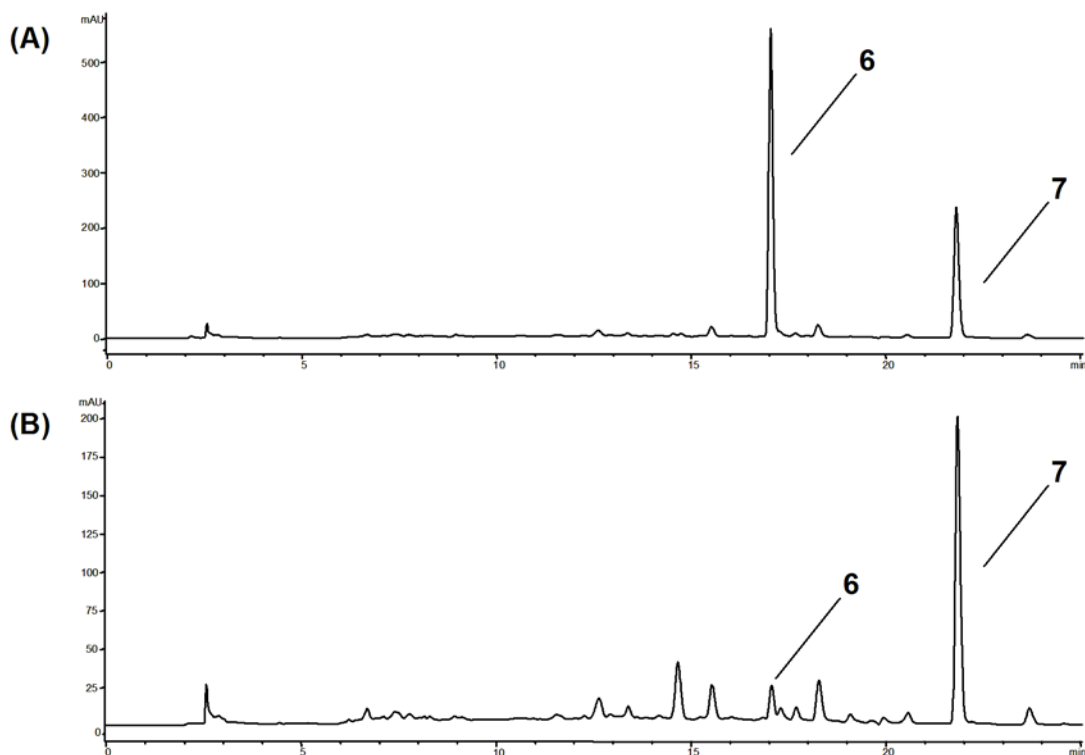


Abb. 22: HPLC-DAD-Analysen ausgewählter Phloridzin-**6**-Inkubationen mit caecaler Mikroflora. Dargestellt sind (A): Phloridzin **6** versetzt mit Inokulum und 10 min bei 37 °C inkubiert und (B): Phloridzin **6** versetzt mit Inokulum und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Trennsäule Eurospher 100 RP C-18; Fließmittel: Wasser/0,05% TFA (v/v) - Acetonitril (MeCN); Gradient: 1% auf 99% MeCN in 40 min; Fluss: 1 ml/min; Detektion bei 285 nm.

HPLC-DAD-Analysen der Blindansätze, welche kein Inokulum, sondern nur das Glycosid **6** und den Carbonat-Phosphat-Puffer enthalten zeigten, dass Phloridzin **6** über die gesamte Inkubationszeit von 24 Stunden chemisch stabil war. Weiterhin war Phloretin **7** in den Blindansätzen (Caecum-Inhalt-Filtrat und Dimethylsulfoxid) nicht nachweisbar (Daten sind nicht gezeigt). Phloretin **7** entstand daher nach Spaltung der β -glucosidischen Bindung in **7** durch die Mikroflora des Schweine-Caecums.

Das freigesetzte Phloretin **7** wurde im Laufe der Inkubation vollständig abgebaut, dabei gelang mittels HPLC-DAD-Analysen die eindeutige Identifizierung von drei Metaboliten: Phloroglucin **1a**, 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** und 3-Phenylpropionsäure **3b**. Die weitere Charakterisierung ihrer chemischen Strukturen erfolgte gemäß Angaben im Abschnitt 3.1.5.1 für **1a** und 3.1.5.3 für **3a** und **3b**.

Auch die HPLC-DAD-Analysen der Inkubationsproben von als solchem eingesetztem Phloretin **7** zeigten seinen vollständigen Abbau und die Bildung der oben genannten Metabolite, d.h. **1a**, **3a** und **3b** (Daten sind nicht gezeigt). Phloretin **7** erwies sich über den kontrollierten Zeitraum von 24 Stunden als chemisch stabil. Die in den Blindansätzen (Inokulum und Dimethylsulfoxid) in sehr geringen Konzentrationen detektierten **3a** und **3b** wurden bei der Quantifizierung berücksichtigt (vgl. Abschnitt 4.3.2.6).

Der Verlauf der mikrobiellen Transformation von Phloretin **7** ist in Abb. 23 dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass der Abbau von **7** sehr rasch erfolgte. Das Dihydrochalcon war nach 6-stündiger Inkubation kaum noch detektierbar. Höhere Anteile an Phloroglucin **1a** und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** wurden schon nach zwei Stunden gefunden. Nach vier Stunden Inkubation war **7** fast quantitativ zu Phloroglucin **1a** abgebaut, welches in Übereinstimmung mit bisherigen Ergebnissen (vgl. Abschnitt 3.1.5) sowie mit Literaturdaten wiederum schnell umgesetzt wurde. 3-Phenylpropionsäure **3b** ist erstmals nach vierstündiger Inkubation detektiert worden. Ihr Anteil nahm bei gleichzeitigem Abbau des Vorläufers, 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a**, kontinuierlich zu.

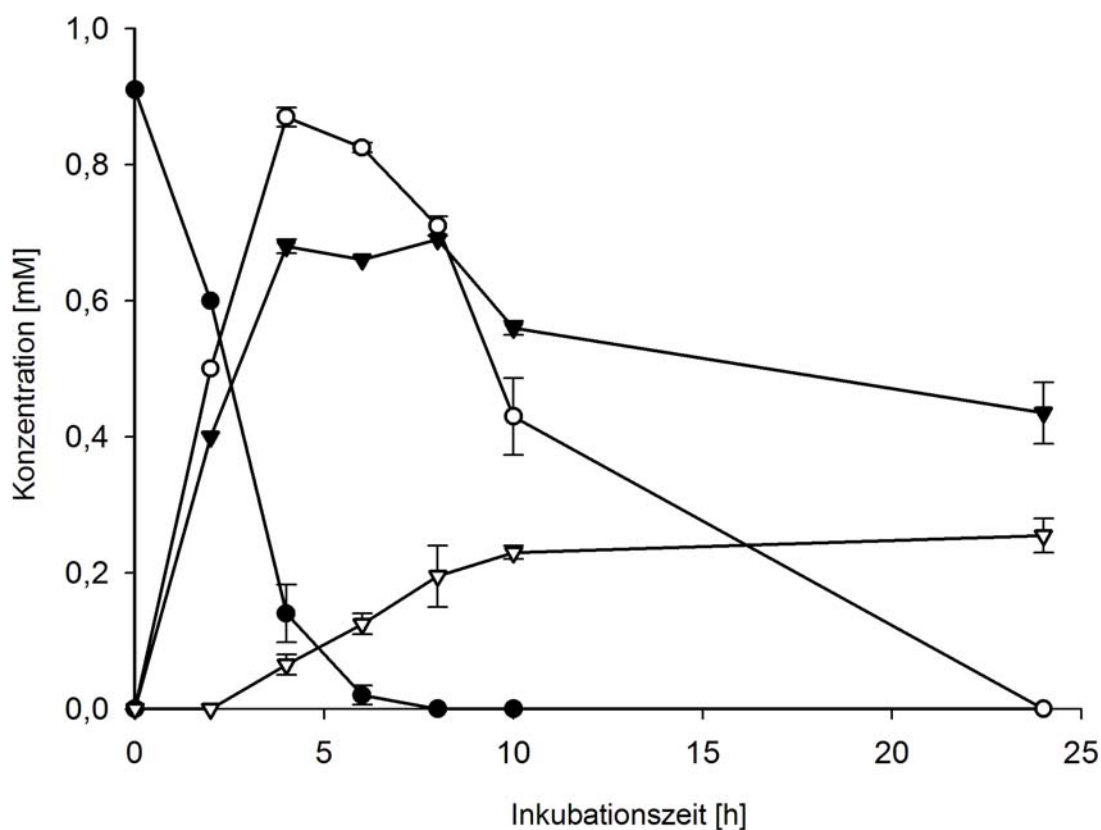


Abb. 23: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von Phloretin **7** durch Schweine-Caecum-Mikroflora. Phloretin **7** (●); Phloroglucin **1a** (○); 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** (▼); 3-Phenylpropionsäure **3b** (▽). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

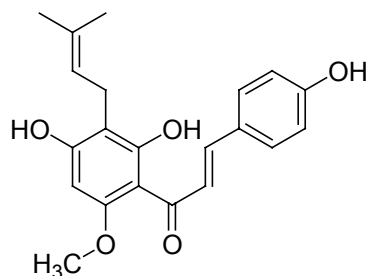
In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen ist die Bildung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** aus Phloretin **7** durch *E. ramulus* beschrieben worden (Schneider, 1999). Allerdings war das Bakterium nicht in der Lage, Phloridzin **6** zu hydrolysieren. In anderen Untersuchungen, bei denen man Phloretin **7** an Ratten appliziert hatte, sind, im Einklang mit unseren Ergebnissen, die Metabolite **1a** und **3a** im Urin nachgewiesen worden (Monge *et al.*, 1984; Crespy *et al.*, 2002).

Wie im Abschnitt 3.1.5.3 festgestellt wurde, wandelte die Schweine-Caecum Mikroflora 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** auch hier in **3b**, das Dehydroxylierungsprodukt, um.

3.2.2.2 Umsetzung von Xanthohumol **8**

Xanthohumol **8**, ein prenyliertes Chalcon aus Hopfen (*Humulus Lupulus* L.), scheint aufgrund seiner potentiellen chemopräventiven Wirksamkeit immer mehr an Bedeutung zu gewinnen. Man hat gezeigt, dass das Chalcon **8** in die Initiations-, Promotions- und Progressionsphase der Krebsentstehung eingreifen kann (Gerhäuser *et al.*, 2002; Pan *et al.*, 2005). Xanthohumol **8** zeigt ferner ein multiformes anti-infektiöser Potential (Gerhäuser, 2005) und beeinflusst auch den endokrinen Stoffwechsel (Schilddrüsen), wie in Zellversuchen belegt worden ist (Radovic *et al.*, 2005).

Die bei Untersuchungen mit Ratten erhaltenen Ergebnisse, deuteten darauf hin, dass nach Aufnahme von Xanthohumol **8** bedeutende Konzentrationen den Dickdarm erreichen (Avula *et al.*, 2004). Deshalb war es interessant, die Interaktion dieser bioaktiven Verbindung mit der intestinalen Mikroflora des Schweine-Caecums zu untersuchen. Hierzu wurde **8** unter anoxischen Bedingungen gemäß Angaben im Abschnitt 4.3.2.6 mit caecaler Mikroflora versetzt und der mikrobielle Abbau über einen Zeitraum von 24 Stunden mittels HPLC-DAD-Analysen verfolgt.



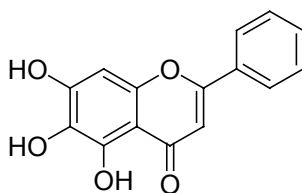
Xanthohumol **8**

Ein Abbau des Chalcon **8** (1 mM) durch intestinale Mikroorganismen war innerhalb von 24 Stunden nicht zu beobachten. Eine Verminderung der Peakfläche von **8** zum Zeichen eines Abbaus war weder in den Kontroll- noch in den Hauptansätzen erkennbar. Auch bei HPLC-ESI_{neg}-MS-Analysen der Inkubationslösungen konnte nur das Chalcon **8** mit der Molekülmasse m/z 333 detektiert werden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden weitere Inkubationen mit unterschiedlichen Konzentrationen an **8** (400 μ M – 900 μ M), wie oben beschrieben, durchgeführt. Auch bei diesen wurde **8** durch die Schweine-Caecum-Mikroflora nicht abgebaut.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie fand man nach Applikation von Xanthohumol **8** an Ratten 89% der verabreichten Dosis unverändert im Faeces wieder (Nookandeh *et al.*, 2004). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass der Anteil der festgestellten Metabolite von Xanthohumol **8** – darunter vorwiegend solche mit modifiziertem Chalcon-Gerüst – nur sehr gering war, und spricht nicht gegen den in der vorliegenden Arbeit erzielten Befund. In der von Nookandeh *et al.* (2004) durchgeführten Studie kam mit 100 mg/kg Körpergewicht eine hohe Dosis zur Anwendung, so dass offensichtlich Komponenten erfassbar wurden, die bei unseren Experimenten aufgrund anderer experimenteller Analysenbedingungen nicht detektierbar waren. Bei weiteren Tierversuchen (Ratte) ergab sich im Übrigen kein Hinweis auf eine Veränderung der Darmflora nach Applikation von **8** (Hanske *et al.*, 2005).

3.2.3 Untersuchungen zum Metabolismus von Baicalein **9**

Die Wurzel des chinesischen Helmkrauts (*Scutellaria baicalensis*) ist ein wichtiger Bestandteil der traditionellen chinesischen Medizin. Eine Reihe von Publikationen beschäftigt sich mit der Bestimmung der biologischen Wirksamkeit ihrer Hauptbestandteile, d.h. von Wogonin (5,7-Dihydroxy-8-methoxyflavon), Baicalin (Baicalein-7-O-glucuronid) und Baicalein **9** (5,6,7-Trihydroxyflavon). Dabei zeigte zum Beispiel Baicalein **9** u.a. anti-inflammatorische (Kimura *et al.*, 1997), antioxidative (Gabrielska *et al.*, 1996; Shieh *et al.*, 2000) und antikanzerogene (Ikemeto *et al.*, 2000) Wirkungen.



Baicalein **9**

Aufgrund dieser Eigenschaften war es interessant, die mikrobielle Veränderung dieses Flavons **9** zu untersuchen. Hierzu wurde Baicalein **9** gemäß Angaben im Abschnitt 4.3.2.6 mit Mikroflora des Schweine-Caecums unter anaeroben Bedingungen versetzt und seine Inkubation über einen Zeitraum von 24 Stunden mittels HPLC-DAD-Analysen verfolgt.

Unter den gewählten Versuchsbedingungen wurde das Flavon Baicalein **9** von der caecalen Mikroflora nicht als Substrat akzeptiert. Innerhalb der kontrollierten 24 Stunden wurden keine Metabolite festgestellt. Auch bei Verlängerung der Inkubationsdauer auf 48 Stunden ließ sich keine Veränderung der Ausgangskonzentration feststellen. In den Kontrollansätzen (Baicalein **9** und Pufferlösungen (pH 6,3; 37 °C)) konnten ebenfalls über einen Zeitraum von 24 Stunden keine chemischen Abbauprodukte festgestellt werden; das Flavon **9** erwies sich unter den Versuchsbedingungen als chemisch stabil.

Griffiths und Smith (1972) stellten bei Inkubationen von Flavononen mit Mikroflora aus Ratten-Caecum fest, dass das Fehlen der Hydroxylierung an Position C-4' zum Ausbleiben der Ringöffnung führte. Demzufolge und im Zusammenhang mit den bei Chrysin **2** vorgelegten Ergebnissen (vgl. Abschnitt 3.1.5.2) ist denkbar, dass die Resistenz von Baicalein **9** gegenüber mikrobiellen Abbau daran liegt, dass **9** keine Hydroxylierung im B-Ring aufweist. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Befunden von Lin *et al.* (2003), die nach Inkubation von **9** mit humanen Faeces dessen Metabolisierung nachweisen konnten. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die eingesetzte Konzentration um etwa 45% vermindert. Die Autoren zeigten weiterhin, dass das Flavon **9** in Pufferlösung (pH 7,5; 37 °C) instabil war, so, dass nach 8 Stunden Inkubation **9** zu circa 55% chemisch abgebaut war. In dieser Studie sind jedoch keine Angaben zu chemischen bzw. bakteriellen Abbauprodukten gemacht worden.

Insbesondere die bei Hispidulin **5** und Baicalein **9** erzielten Ergebnisse forderten weitere Studien heraus, bei denen es u.a. auch um die Klärung der Frage der Abhängigkeit der mikrobiellen Flavonoid-Abbauraten vom Hydroxylierungsgrad der Substrate ging. Die gewählte Strategie und die erzielten Ergebnisse sind im Abschnitt 3.3 beschrieben.

3.3 Studien zur Abhängigkeit der Abbaurate der Flavonoide von deren Hydroxylierungsgrad

Darmbakterien beeinflussen die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden, indem sie diese und deren Derivate nach der Aufnahme mit der Nahrung zu niedermolekularen Abbauprodukten metabolisieren und dadurch ihre Absorption in nativer Form vermindern oder sogar verhindern. Die Wahrscheinlichkeit, intakt resorbiert zu werden, ist für Flavonoide, die langsam abgebaut werden, größer, als für diejenigen, die einer schnellen Metabolisierung unterliegen. In Kapitel 3.1.5 wurde gezeigt, dass Quercetin **1**, welches zwei OH-Gruppen im B-Ring besitzt, sehr schnell, Naringenin **3**, das nur eine OH-Gruppe im B-Ring hat, nur langsam und Chrysin **2**, ohne Hydroxylierung im B-Ring, überhaupt nicht abgebaut wurde. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse und von Hinweisen aus der Literatur, in der u.a. das Vorliegen einer freien bzw. hydrolysierbaren OH-Gruppe an Position C-4' des B-Ringes als Voraussetzung für eine Ringöffnung der Flavonoide beschrieben ist (Griffiths und Smiths, 1972; Wang *et al.*, 2001), sollte in den folgenden Untersuchungen überprüft werden, ob, und wenn ja, inwieweit eine unterschiedliche Anzahl an Hydroxylierungen am B-Ring die Umsetzungsrate der Flavonoide beeinflusst.

3.3.1 Vergleich der Umsetzungsraten ausgewählter Flavonole

Als erste Substratgruppe wurden die Flavonole Galangin (3,5,7-Trihydroxyflavon) **10**, Kämpferol (3,5,7,4'-Tetrahydroxyflavon) **11** und Quercetin **1**, die sich lediglich im Hydroxylierungsgrad des B-Ringes unterscheiden, ausgewählt (Abb. 24). Da bekannt ist, dass die Konzentration der Flavonoide einen Einfluss auf ihre Abbaurate hat (Rechner *et al.*, 2004), wurden die zu untersuchenden Flavonole in jeweils gleicher Konzentration (0,5 mM) zur Inkubation eingesetzt.

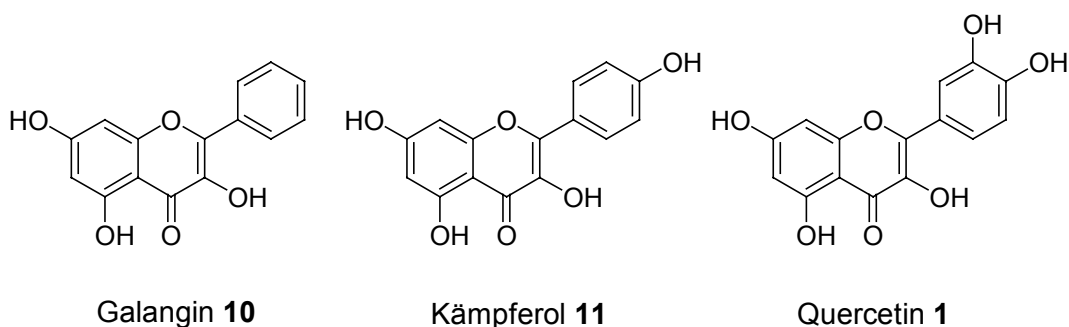


Abb. 24: Strukturformeln der untersuchten Flavonole.

Weiterhin wurde zu ihrer Umsetzung das gleiche Inokulum (Caecum-Inhalts-Filtrat) verwendet, um interindividuelle Variationen, die sich durch divergierende Enzymmuster verschiedener Caeci-Inhalte ergeben könnten (Bauer *et al.*, 2004; Rechner *et al.*, 2004), auszuschalten. Die Flavonole wurden gemäß Angaben im Abschnitt 4.3.2.6 mit caecaler Mikroflora versetzt; die Inkubation wurde bei 37 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden gehalten. Der zeitliche Verlauf des mikrobiellen Abbaus wurde in bewährter Weise mittels HPLC-DAD registriert. Im Folgenden wird zunächst die mikrobielle Transformation der einzelnen Flavonole beschrieben, und danach werden die Umsetzungsraten verglichen.

3.3.1.1 *Abbau von Galangin 10*

Die Inkubation von Galangin **10** mit caecaler Mikroflora führte zu dessen vollständigem Abbau und zur Bildung eines Zwischenproduktes mit der Retentionszeit 7,2 **1a** und eines Endproduktes mit der Retentionszeit von 17,8 min **10a** in unserem HPLC-DAD-System (Trennbedingungen vgl. Abschnitt 4.2.1; Daten sind nicht gezeigt). Das Zwischenprodukt wurde, wie im Abschnitt 3.1.5.1 beschrieben, als Phloroglucin **1a** identifiziert. Anhand eines Vergleichs der Retentionszeit und des UV-Spektrums von **10a** mit denen einer authentischen Referenzsubstanz erfolgte dessen Identifizierung als Phenylelessigsäure. Die Bestätigung seiner chemischen Struktur erfolgte mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS. Das Produktionenspektrum von **10a** war mit dem von authentischer Phenylelessigsäure identisch. Beide Verbindungen wiesen die charakteristischen Fragmente *m/z* 91 und 50 auf. In den Kontrollansätzen (Galangin **10** und Pufferlösung) konnten über einen Zeitraum von 24 Stunden keine chemischen Abbauprodukte von **10** detektiert werden. In den Blindansätzen (Dimethylsulfoxid und reines Inokulum) wurden geringe Konzentrationen an Phenylelessigsäure **10a** nachgewiesen, die bei der Quantifizierung berücksichtigt worden sind (vgl. Abschnitt 4.3.2.6).

Abbildung 25 zeigt den zeitlichen Verlauf des Abbaus von Galangin **10** durch die intestinale Mikroflora. Wie daraus deutlich wird, erfolgte die Degradation von **10** in den ersten 4 Stunden langsam, danach war ein schnellerer Abbau zu beobachten, und am Ende der Inkubation war das Flavonol **10** nicht mehr detektierbar. Nach vier Stunden Inkubation stiegen die Konzentrationen der beiden Metabolite, Phloroglucin **1a** und Phenylelessigsäure **10a** schnell an. Phloroglucin **1a** erreichte dabei ein Maximum von 0,23 mM nach 6 Stunden; für Phenylelessigsäure **10a** wurde ein Maximum von 0,33 mM nach 8 Stunden Inku-

bation beobachtet. Während letztere mit fast dem gleichen Anteil in den 24 Stunden-Inkubationsansätzen vorhanden war, war Phloroglucin **1a** vollständig verschwunden.

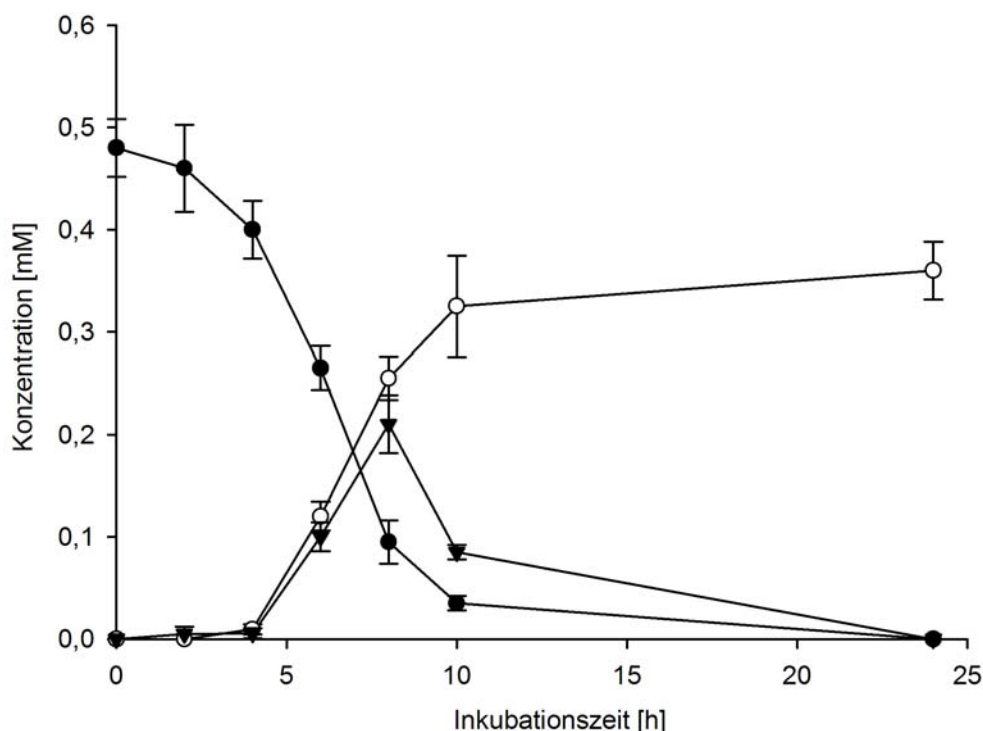


Abb. 25: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von Galangin **10** durch Schweine-Caecum-Mikroflora. Galangin **10** (●); Phloroglucin **1a** (▼); Phenylacetic acid **10a** (○). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

3.3.1.2 Abbau von Kämpferol **11**

Auch Kämpferol **11** wurde durch die Darmbakterien innerhalb von 24 Stunden vollständig umgesetzt. Dabei konnte mittels HPLC-DAD-Analytik (Trennbedingungen sind unter 4.2.1 gegeben) die Bildung von zwei Intermediaten und einem Endprodukt mit den Retentionszeiten 7,2 **1a**, 14,6 **11a** und 19,6 **11b** min nachgewiesen werden (Daten sind nicht gezeigt). Der Metabolit mit der Retentionszeit 7,2 min ist, wie im Abschnitt 3.1.5.1 beschrieben, als Phloroglucin **1a** identifiziert worden. Die Retentionszeit und das UV-Spektrum von **11a** waren mit denen von 4-Hydroxyphenylacetic acid vergleichbar, und die Produktionenspektren beider Verbindungen waren identisch. Als charakteristische Fragmente wurden mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS, m/z 107, 93 und 79 aufgezeichnet. Der letztgenannte Metabolit **11b** ist ebenfalls durch Vergleich seiner Retentionszeit und seines UV-

Spektrums mit denen einer authentischen Referenzsubstanz als 4-Methylphenol identifiziert worden. Mittels HRGC-MS-Analysen erfolgte die Absicherung der chemischen Struktur. Das Produktionenspektrum von **11b**, d.h. (m/z , %): 108 (M^+ , 90), 79 (50), 63 (12), 53 (24), war mit dem von 4-Methylphenol identisch.

Wie in Abbildung 26 ersichtlich ist, erfolgte die Umwandlung von Kämpferol **11** sehr schnell. Die Abbauprodukte **1a** und **11a** waren nach 2 Stunden zwar detektierbar, allerdings in nur sehr geringen Konzentrationen. Die höchste Konzentration von Phloroglucin **1a** wurde nach 6 Stunden Inkubation mit 0,07 mM ermittelt. Danach war **1a** nicht mehr detektierbar. 4-Hydroxyphenyllessigsäure **11a** erreichte ebenfalls nach 6 Stunden Inkubation eine Höchstkonzentration von 0,13 mM. Danach erfolgte ein Konzentrationsabfall, und nach 24 Stunden war **11a** vollständig abgebaut. Die Konzentration des dritten Metabolits, **11b**, der erstmals nach vierstündiger Inkubation detektiert werden konnte, stieg im Verlauf der Inkubation kontinuierlich an und erreichte am Ende der Inkubation ein Maximum von 0,37 mM.

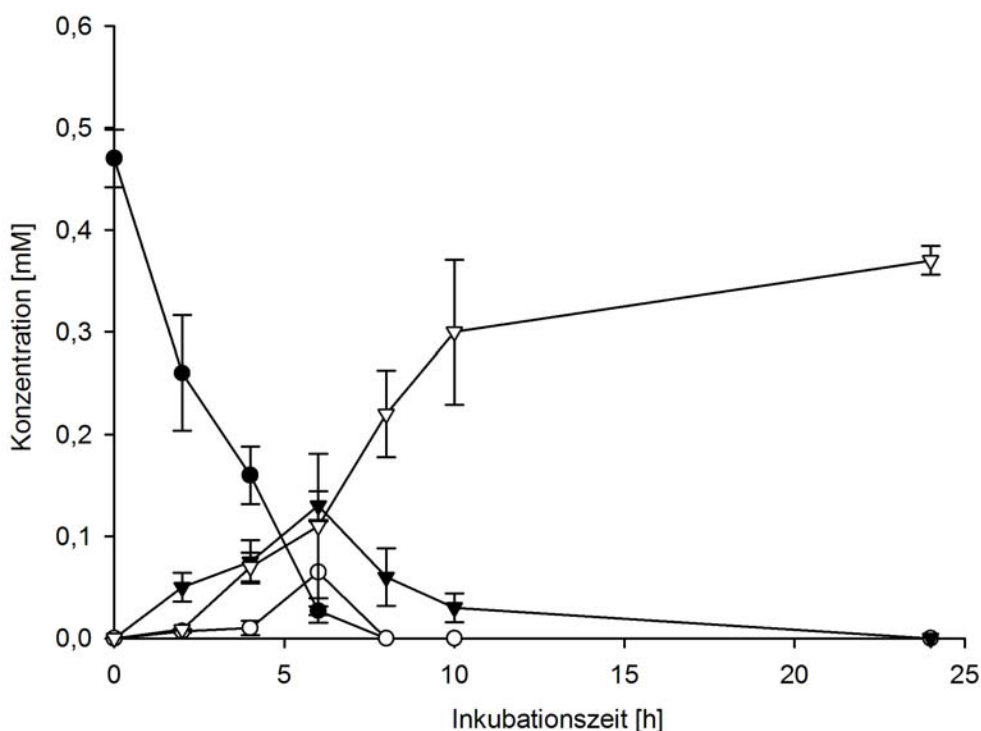


Abb. 26: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von Kämpferol **11** durch Schweine-Caecum-Mikroflora. Kämpferol **11** (●); Phloroglucin **1a** (○); 4-Hydroxyphenyllessigsäure **11a** (▼); 4-Methylphenol **11b** (▽). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

3.3.1.3 Abbau von Quercetin 1

Quercetin **1** wurde durch die Darmflora ebenfalls vollständig abgebaut. Dabei wurden die gleichen Metabolite, d.h. Phloroglucin **1a**, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure **1b** und 3,4-Dihydroxytoluol **1c** (Abb. 27), die unter 3.1.5.1 beschrieben wurden, gebildet.

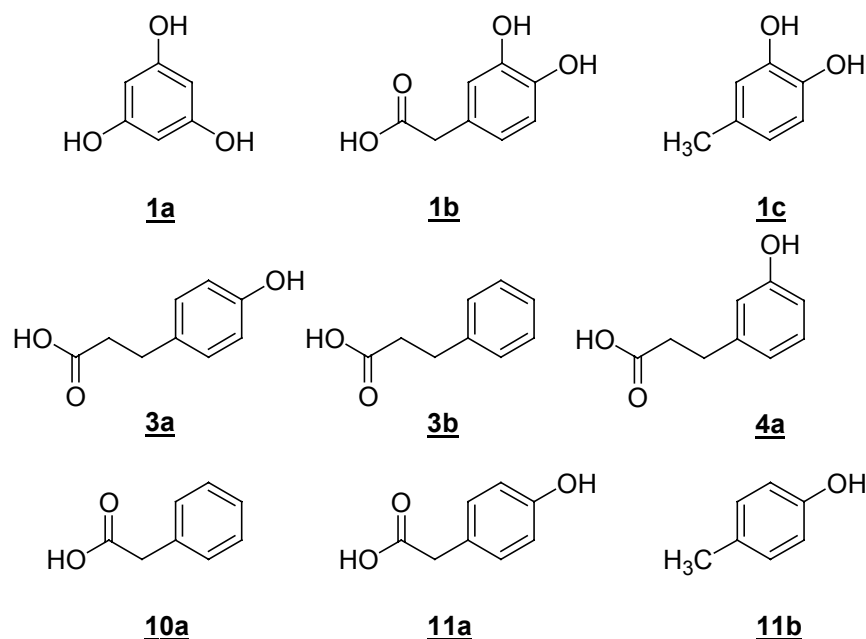


Abb. 27: Strukturformeln der bei der Inkubation von Flavonolen und Flavonen mit caecaler Mikroflora gebildeten Metabolite. **1a** Phloroglucin, **1b** 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, **1c** 3,4-Dihydroxytoluol, **10a** Phenylelessigsäure, **11a** 4-Hydroxyphenylelessigsäure, **11b** 4-Methylphenol, **3a** 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure, **3b** 3-Phenylpropionsäure und **4a** 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure.

3.3.1.4 Vergleich der Abbauraten der Flavonole

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Konzentrations-Zeit-Verläufe von Galangin **10**, Kämpferol **11** und Quercetin **1** in Abb. 28 einander gegenübergestellt. Wie aus Abb. 28 erkennbar ist, war die caecale Mikroflora in der Lage, die Flavonole **11** und **1**, welche eine bzw. zwei Hydroxygruppen am B-Ring aufweisen, sehr schnell abzubauen. So wurden sie schon innerhalb von zwei Stunden fast zur Hälfte umgesetzt, und nach zehnstündiger Inkubation waren sie vollständig abgebaut. Es ist auch gut zu erkennen, dass Kämpferol **11** und Quercetin **1** nahezu mit gleicher Geschwindigkeit umgesetzt wurden. Der Abbau von

Galangin **10**, welches keine Hydroxygruppe am B-Ring besitzt, verlief im Vergleich zu Quercetin **1** und Kämpferol **11** über den gesamten Inkubationszeitraum deutlich langsamer. So wurde **10** nach zwei Stunden Inkubation kaum metabolisiert – 95% der eingesetzten Konzentration an **10** war noch detektierbar – und selbst nach sechs Stunden konnte die Hälfte der bei der Inkubation eingesetzten Menge an Galangin **10** in den Inkubationsansätzen noch detektiert werden.

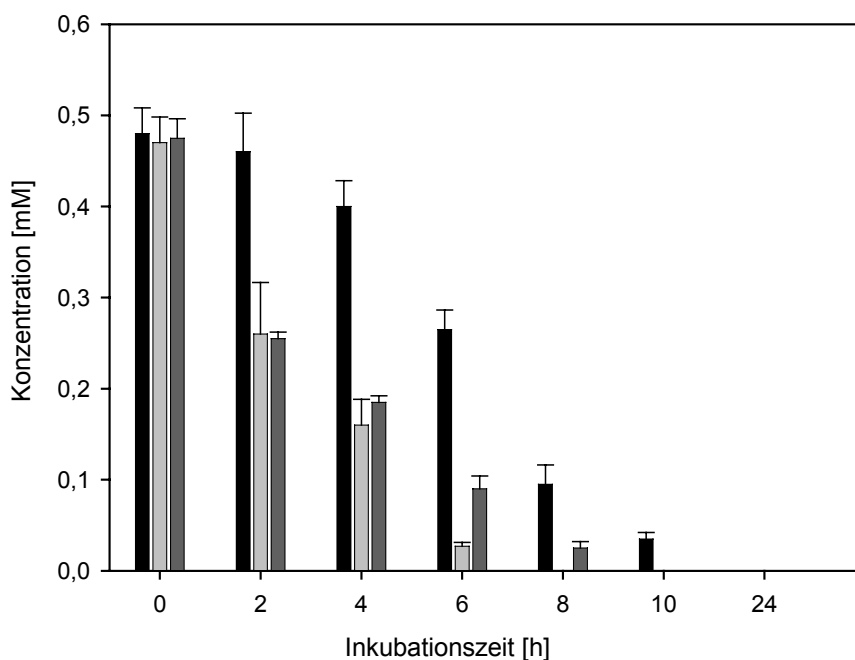


Abb. 28: Jeweiliger Konzentrations-Zeit-Verlauf der Flavonole Galangin **10** (schwarze Balken), Kämpferol **11** (hellgraue Balken) und Quercetin **1** (dunkelgraue Balken) nach Inkubation unter anaeroben Bedingungen mit caecaler Mikroflora. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

3.3.2 Vergleich der Umsatzraten ausgewählter Flavone

Als weitere Substratgruppe dienen die Flavone Chrysin **2**, Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon) **12** und Luteolin (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon) **13**, die sich ebenfalls nur im Hydroxylierungsgrad des B-Rings unterscheiden (Abb. 29). Auch in dieser Versuchsreihe wurden die Flavone in jeweils gleicher Konzentration (0,7 mM) eingesetzt, und es diente erneut caecale Mikroflora aus gleicher Quelle zu ihrer Umsetzung. Die Inkubationen wurden unter anaeroben Bedingungen gemäß Angaben im Abschnitt 4.3.2.6 durchgeführt. Der mikrobielle Abbau wurde mittels HPLC-DAD-Analysen über 24 Stunden verfolgt. Im

Folgenden werden zunächst die mikrobiellen Transformationen der Flavone beschrieben, danach werden ihre Umsetzungsraten verglichen.

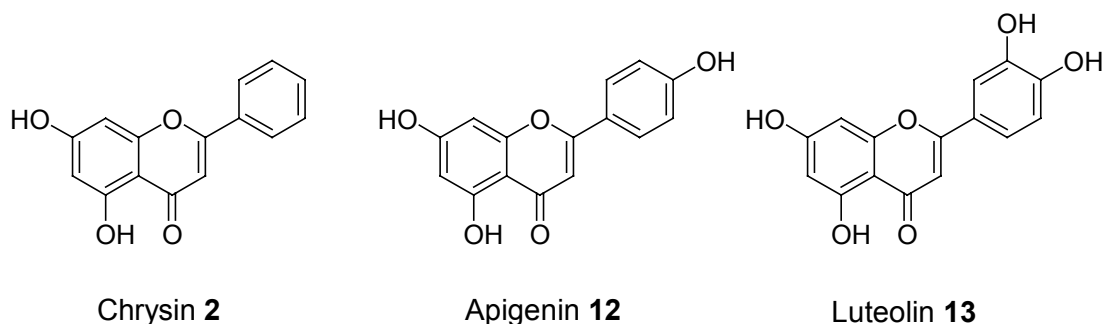


Abb. 29: Strukturformeln der untersuchten Flavone.

3.3.2.1 *Abbau von Apigenin 12*

Die Schweine-Caecum-Mikroflora wandelte Apigenin **12** in zwei Metabolite um. Mittels HPLC-DAD-Analysen gelang die eindeutige Identifizierung von 3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure **3a** und 3-Phenylpropionsäure **3b** (Daten sind nicht gezeigt). Die weitere Charakterisierung ihrer chemischen Strukturen erfolgte wie im Abschnitt 3.1.5.3 beschrieben. In Blind- und Kontrollansätzen waren diese Verbindungen nicht detektierbar.

Den zeitlichen Verlauf des Abbaus von **12** zeigt Abbildung 30. Wie daraus hervorgeht, wurde Apigenin **12** nur langsam transformiert. Das Spaltprodukt **3a** war in geringfügigen Konzentrationen schon nach zweistündiger Inkubation detektierbar. Nach einem langsamen Anstieg seines Anteils (ca. 0,08 mM nach 8 Stunden), nahm seine Konzentration kontinuierlich wieder ab. Die Bildung von 3-Phenylpropionsäure **3b** wurde erst nach 8-stündiger Inkubation nachgewiesen. Ihre Konzentration stieg mit weiterer Inkubationszeit stetig an und erreichte nach 24 Stunden einen Höchstwert von 0,34 mM.

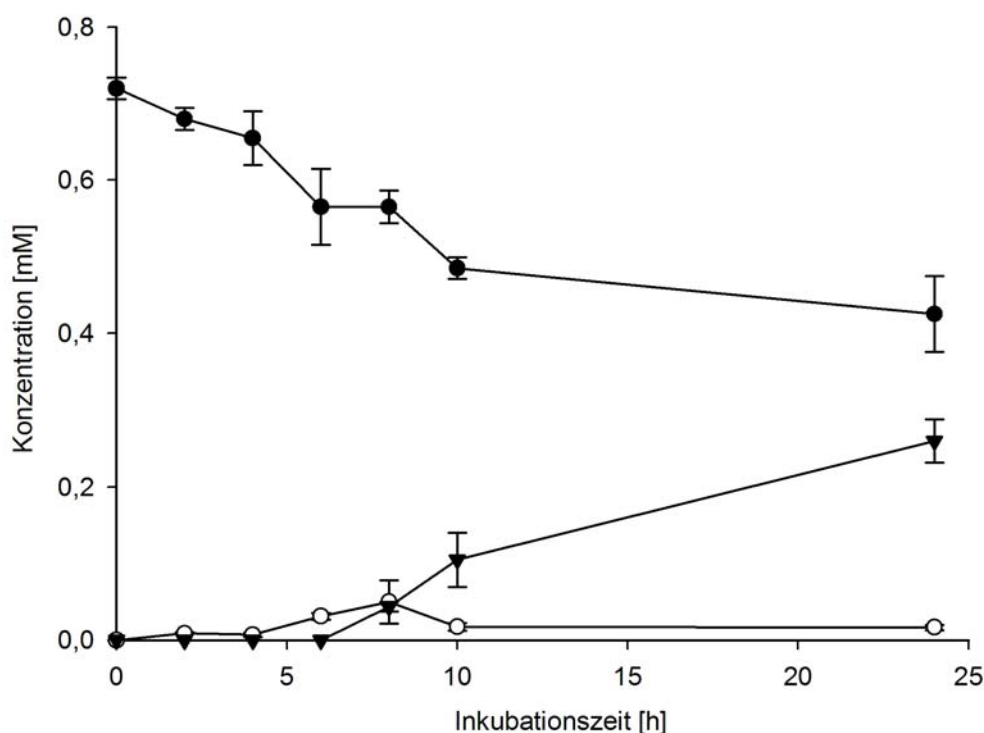


Abb. 30: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von Apigenin **8** nach Inkubation unter anoxischen Bedingungen mit caecaler Mikroflora. Apigenin **8** (●), 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** (○); 3-Phenylpropionsäure **3b** (▼). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

3.3.2.2 Abbau von Luteolin **13**

Luteolin **13** unterlag ebenfalls einem Abbau durch die intestinale Mikroflora. Gleichzeitig wurde mittels HPLC-DAD-Analysen die Bildung von 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure **4b** nachgewiesen (Daten sind nicht gezeigt). Die Absicherung der chemischen Struktur von **4b** erfolgte analog Angaben im Abschnitt 3.1.5.4. In Kontrollansätzen (Luteolin **13** und Pufferlösung) erwies sich das Flavon **13** als chemisch stabil, und in den Blindversuchen wurde **4b** nicht detektiert. Wie der Darstellung in Abb. 31 zu entnehmen ist, erfolgte der Abbau von Luteolin **13** langsam. 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure **4b** wurde erstmals nach vierstündiger Inkubation detektiert. Ihr Anteil stieg kontinuierlich im Laufe der Inkubation und lag nach 24 Stunden bei 0,24 mM.

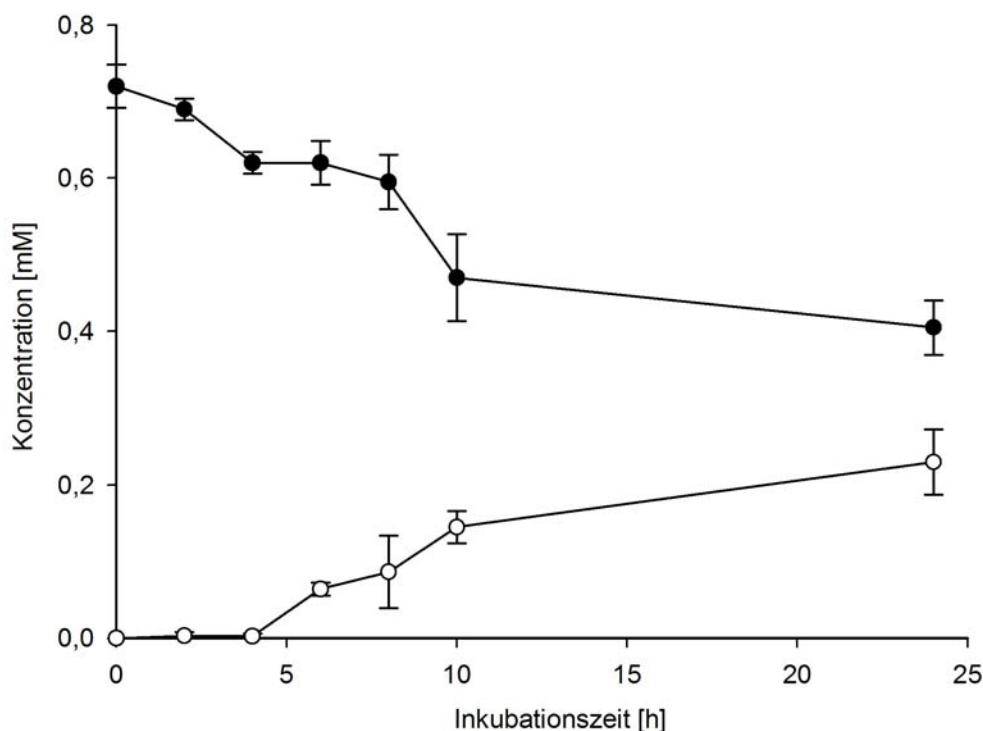


Abb. 31: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von Luteolin **13** nach Inkubation unter anoxischen Bedingungen mit caecaler Mikroflora. Luteolin **13** (●); 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure **4b** (○). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

3.3.2.3 Abbau von Chrysin **1**

Die Schweine-Mikroflora war, in Übereinstimmung mit den im Abschnitt 3.1.5.2 erhaltenen Resultaten, nicht in der Lage, Chrysin **1** – hier mit einer Anfangskonzentration von 0,7 mM – abzubauen.

3.3.2.4 Vergleich der Abbauraten der Flavone

Zur besser vergleichbaren Illustration ist der jeweilige Konzentrations-Zeit-Verlauf der Flavone **1**, **12** und **13** in Abb. 32 einander gegenübergestellt. Daraus wird deutlich, dass die Verstoffwechslung von Apigenin **12** und Luteolin **13** durch die Schweine-Caecum-Mikroflora fast mit der gleichen Geschwindigkeit und in gleichem Ausmaß stattgefunden hat. Die Konzentration der Flavone **12** und **13** verringerte sich dabei nur langsam. So waren nach zwei Stunden Inkubation beide Substrate mit jeweils mehr als 90% der zur Inkubation

eingesetzten Konzentrationen noch nachweisbar. Auch nach zehn Stunden waren sie nur zu einem Drittel umgesetzt, und am Ende der Inkubation war sogar die Hälfte der beiden Verbindungen noch in den Inkubationsansätzen detektierbar. Die Konzentrationen von Chrysin **2** – ohne Hydroxylierung am B-Ring – blieb hingegen, wie auch zu erwarten war, im Vergleich zu Apigenin **12** und Luteolin **13**, welche eine bzw. zwei Hydroxygruppen am B-Ring aufweisen, über den gesamten Zeitraum der Inkubation unverändert.

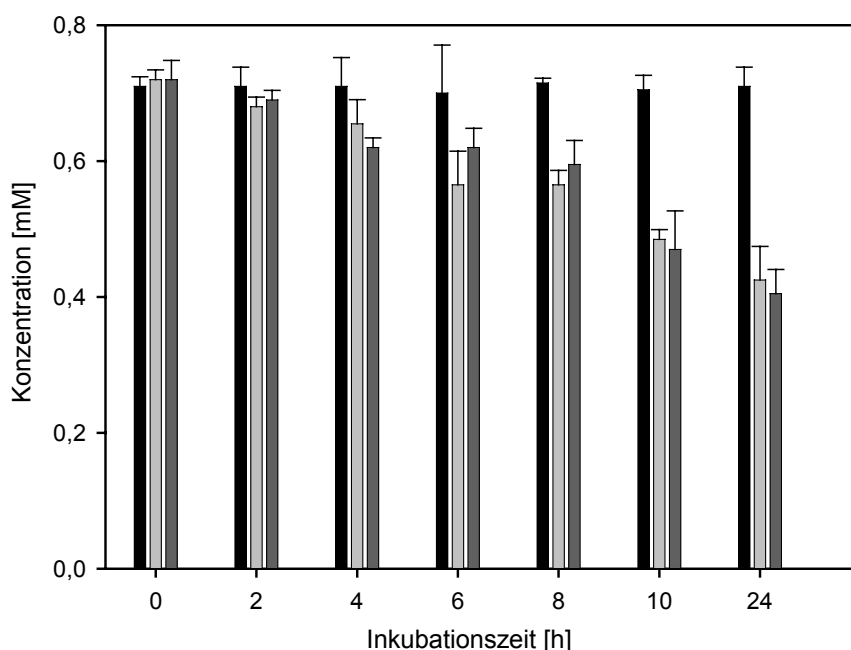


Abb. 32: Jeweiliger Konzentrations-Zeit-Verlauf der Flavone Chrysin **2** (schwarze Balken), Apigenin **12** (hellgraue Balken) und Luteolin **13** (dunkelgraue Balken) nach Inkubation unter anaeroben Bedingungen mit caecaler Mikroflora. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

3.3.3 Vergleich der Umsetzungsraten ausgewählter Flavonoide

Bei der Betrachtung der in den Abschnitten 3.3.1 und 3.3.2 dargelegten Ergebnisse zeigt sich, dass die Schweine-Caecum-Mikroflora in der Lage ist, Flavonole schneller und effizienter abzubauen als Flavone. Da sich letztere nur durch das Fehlen einer Hydroxygruppe am C-3 des heterocyclischen C-Ringes von den Flavonolen unterscheiden, liegt die Annahme nahe, dass das Vorliegen einer Hydroxygruppe in Position C-3 den bakteriellen Abbau von Flavonoiden erleichtert. Da es sich bei den geschilderten Experimenten um zwei unabhängige Versuchsreihen, die mit unterschiedlichen Bakterienquellen durchge-

führt worden sind, handelt, kann allerdings zunächst nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Unterschiede in den Fermentationsgeschwindigkeiten der Flavonole und Flavone auf tierindividuelle Unterschiede zurückzuführen sind. Um unsere Beobachtungen zu bestätigen und einen durch variierende Mikroflorazusammensetzung möglichen Einfluss auf die Abbaurate der Flavonoide auszuschließen, wurden erneut die Flavonoide Chrysin **2**, Galangin **10**, Kämpferol **11** und Apigenin **12** (die Anfangskonzentration betrug jeweils 0,5 mM) gemäß Angaben im Abschnitt 4.3.2.6 mit caecaler Mikroflora gleicher Donoren versetzt und die Inkubation bei 37 °C über 24 Stunden gehalten. Mittels HPLC-DAD-Analysen wurden die Konzentrationsabnahmen der Flavonoide verfolgt.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abb. 33 zusammengefasst. Hierbei wurde zur Verdeutlichung der jeweilige Konzentrations-Zeit-Verlauf der untersuchten Flavonoide paarweise (**2** vs. **10** und **11** vs. **12**) gegenübergestellt. Wie daraus zu erkennen ist, unterlag Chrysin **2** im Gegensatz zu seinem korrespondierendem Flavonol Galangin **6**, welches fast vollständig metabolisiert wurde, keinem Abbau. Apigenin **12** wurde zwar metabolisiert, jedoch – verglichen mit seinem analogen Flavonol Kämpferol **11** – nur sehr langsam und in geringem Umfang. Diese Wiederholungsversuche bestätigten somit unsere vorgängig erzielten Ergebnisse und schließen einen möglichen Effekt durch divergierende Enzymbeschaffenheit auf das Abbauverhalten aus.

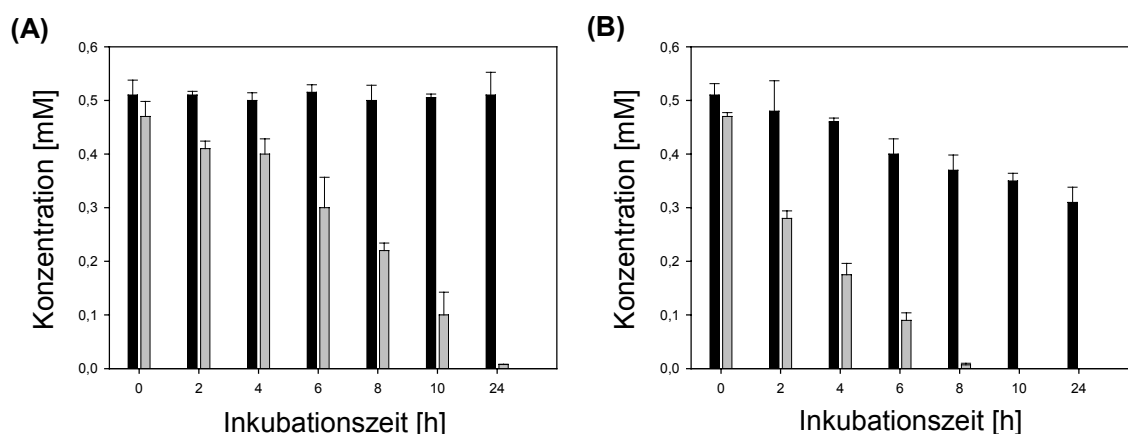


Abb. 33: Jeweiliger Konzentrations-Zeit-Verlauf der Flavonoide: **(A)** Chrysin **2** (schwarze Balken) und Galangin **10** (hellgraue Balken); **(B)** Kämpferol **11** (hellgraue Balken) und Apigenin **12** (schwarze Balken) nach Inkubation unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C mit caecaler Mikroflora gleicher Quelle. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

3.3.4 Interpretation der Ergebnisse

Mikrobielle Transformation der Flavonoide

Erwartungsgemäß transformierte die intestinale Mikroflora Galangin **10** und Kämpferol **11** jeweils durch Spaltung des C-Ringes. Der A-Ring wurde dabei als Phloroglucin **1a** freigesetzt. Dies ist im Einklang mit den für einige Flavonoide bereits postulierten Abbauwegen (Hattori *et al.*, 1988; Winter *et al.*, 1991; Miyaka *et al.*, 1997; Rechner *et al.*, 2004). Sowohl bei den von uns erzielten Ergebnissen (vgl. Abschnitt 3.1.5 bzw. 3.2.2) als auch bei früheren Studien (z.B. Schneider *et al.*, 1999) trat Phloroglucin **1a** jeweils als Intermediat auf.

Als zweites Ringspaltungsprodukt entstanden Phenylelessigsäure **10a** aus Galangin **10** und 4-Hydroxyphenylelessigsäure **11a** aus Kämpferol **11**. Winter *et al.* (1991) und Schneider (1999) berichteten über die Bildung von **11a** aus **11** nach Inkubation mit dem menschlichen Darmbakterium *Clostridium orbiscindens* bzw. *Eubacterium ramulus*. Auch Griffiths und Smith (1972) wiesen in ihren Untersuchungen die Umsetzung von Kämpferol **11** in Gegenwart von Rattendarminhalt zu 4-Hydroxyphenylelessigsäure **11a** nach.

4-Hydroxyphenylelessigsäure **11a** war am Ende der Inkubation im Gegensatz zu Phenylelessigsäure **10a** nicht mehr detektierbar, und als Endprodukt wurde 4-Methylphenol **11b** detektiert.

Es ist bekannt, dass 4-Methylphenol **11b** aus Tyrosin *via* 4-Hydroxyphenylelessigsäure **11a** aufgrund der Aktivität intestinaler Anaerobier gebildet wird (Bakke, 1969; Scheline, 1968; Bone *et al.*, 1976; Curtis und Mettler, 1976; Spoelsta, 1978). Kürzlich haben Selmer und Andrei (2001) das für die Bildung von 4-Methylphenol **11b** verantwortliche Enzym aus *Clostridium difficile*, einem im menschlichen Dickdarm vorkommenden Bakterium, isoliert und charakterisiert. Das gegenüber molekularem Sauerstoff sehr empfindliche Enzym war in der Lage, selektiv nur diejenigen Phenylacetate zu decarboxylieren, welche eine OH-Gruppe in *para*-Position aufwiesen. So führten anaerobe Inkubationen des Enzyms mit 4-Hydroxyphenylelessigsäure **11a** oder 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure **1b** zur Bildung von 4-Methylphenol **11b** bzw. 3,4-Dihydroxytoluol **1c**. Bei der Inkubation des Enzyms mit Phenylelessigsäure **10a** blieb hingegen eine Decarboxylierung aus (Selmer und Andrei, 2001). Weiterhin berichteten Ward und Mitarbeiter über die Fähigkeit eines aus Schweine-Faeces isolierten anaeroben Bakteriums, 4-Methylphenol **11b** aus 4-Hydroxyphenylelessigsäure **11a** zu bilden (Ward *et al.*, 1986). Interessanterweise war das möglicherweise zur Gattung der

Lactobacillus gehörende Bakterium außerdem nur in der Lage, **11a** und 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure **1b** unter Bildung von 4-Methylphenol **11b** bzw. 3,4-Dihydroxytoluol **1c** zu decarboxylieren. Phenylelessigsäure **10a** als Substrat wurde von diesem Bakterium nicht akzeptiert (Ward *et al.*, 1986).

Unsere Ergebnisse stimmen mit diesen Beobachtungen sehr gut überein. Phenylelessigsäure **10a** unterlag, wahrscheinlich aufgrund der gleichen strukturellen Voraussetzungen, d.h. des Fehlens einer Hydroxygruppe in *para*-Position, keiner Decarboxylierung und war auch noch nach 24-stündiger Inkubation in hohen Konzentrationen detektierbar (Abb. 25). 4-Hydroxyphenylelessigsäure **11a** hingegen wurde rasch unter Bildung von 4-Methylphenol **11b** decarboxyliert. Ferner überrascht es auch nicht, dass die bei der Metabolisierung von Quercetin **1** gebildete 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure **1b** unter Bildung von 3,4-Dihydroxytoluol **1c** weiter abgebaut wurde.

Auch die Metabolisierung von Apigenin **12** und Luteolin **13** zu 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** und 3-Phenylpropionsäure **3b** bzw. 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure **4b** ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus der Literatur. So zeigten frühere Untersuchungen von Griffiths und Smith (1972) die Bildung von **3a** aus Apigenin **12** nach Inkubation mit Mikroflora des Ratten-Caecums. Die Säure **3a** wurde in Übereinstimmung mit bisherigen eigenen Beobachtungen sowie mit Literaturergebnissen (Rechner *et al.*, 2004) unter Bildung von **3b** dehydroxyliert.

Braune *et al.* (2001) wiesen in ihren Inkubationsexperimenten mit Luteolin **13** und *E. ramulus* die Bildung von 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure als Metabolit nach. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Säure nicht detektiert werden. Da in früheren Studien die Bildung von 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure **4b** aus 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure nach Inkubation mit humaner Faecesflora beobachtet wurde (Peppecorn und Goldman, 1971; Hollman und Katan, 1998; Rechner *et al.*, 2002), ist davon auszugehen, dass **4b** durch eine rasche *para*-Dehydroxylierung von 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure gebildet wurde. Analog zu unseren Befunden hat man eine derartig schnelle *para*-Dehydroxylierung bereits beschrieben (Meselhy *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001).

Eine Akkumulation von Phloroglucin **1a**, welches aus der C-Ringspaltung von **12** und **13** zu erwarten wäre, wurde nicht beobachtet. Als Erklärung hierfür muss die Tatsache in Betracht gezogen werden, dass aufgrund der langsamen Metabolisierung von **12** und **13** nur

geringe Konzentrationen an **1a** resultieren, die dann sehr schnell weiter abgebaut werden (vgl. auch Kapitel 3.1.5) und damit nicht detektiert werden können.

Es sei abschließend darauf hingewiesen, dass unter anaeroben Bedingungen eine Vielzahl von aromatischen Substanzen, deren Abbau beschrieben ist, über Benzoyl-CoA abgebaut werden (Fuchs *et al.*, 1994; Heider und Fuchs, 1997), bei dem der aromatische Charakter im Vergleich zu Phloroglucin **1a** (vgl. Abschnitt 3.1.5.1) aufgrund der schwächeren elektronenziehenden Effekte des CoA-Thioesters stark ausgeprägt ist. Die Reduktion des Ringes auf der Stufe eines Intermediates mit ausgeprägter Resonanzstabilisierung des Benzolringes stellt, vom energetischen Standpunkt aus gesehen, hohe Anforderungen an ein Enzymsystem. So werden beispielsweise zur Umsetzung von Phenyllessigsäure **10a** (Abb. 34) vier Moleküle ATP verbraucht (Heider und Fuchs, 1997). Dies erklärt deren langsameren Abbau bzw. deren Anreicherung im Medium im Vergleich zu Phloroglucin **1a** in unseren Experimenten. Für 4-Methylphenol **11b** ist ebenfalls ein Abbau über den Benzoyl-CoA-Weg unter anoxischen Bedingungen beschrieben worden (Heider und Fuchs, 1997). Die anderen, in der vorliegenden Arbeit detektierten aromatischen Abbauprodukte können wahrscheinlich auch über den Benzoyl-CoA oder einen vergleichbaren Weg umgesetzt werden.

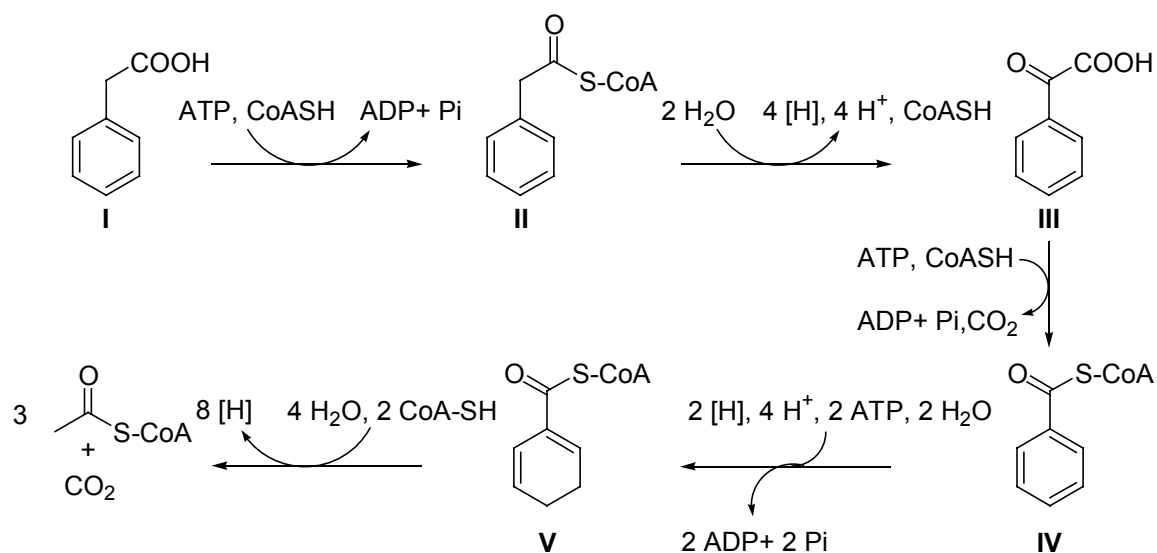


Abb. 34: Anaerober Abbau von Phenyllessigsäure **10a** I über den Benzoyl-CoA-Weg. Phenylacetat-CoA II, Phenylglyoxylat III, Benzoyl-CoA IV und Cyclohexa-1,5-dien-1-carboxyl-CoA V. (modifiziert nach Heider und Fuchs, 1997).

Flavonoidstruktur und Abbaugrad

Wie einleitend schon erwähnt, beeinflusst der bakterielle Abbau die Bioverfügbarkeit der Flavonoide. Literaturergebnisse (Griffiths und Smith, 1972; Lin *et al.*, 2003; Simons *et al.*, 2005) deuten darauf hin, dass Flavonoide in Abhängigkeit von ihrem Substitutionsmuster verschieden schnell von den Darmbakterien umgesetzt werden. Es war daher von Interesse herauszufinden, inwieweit ein Zusammenhang zwischen zunehmender Hydroxylierung des B-Ringes und der Fermentationsgeschwindigkeit von Flavonoiden durch die intestinale Mikroflora besteht. Dazu wurden Flavonole bzw. Flavone ausgewählt, die sich im Hydroxylierungsgrad des B-Ringes unterscheiden und im A-Ring das gleiche Hydroxylierungsmuster (OH-Gruppen in den Positionen C-5 und C-7), welches für eine Ringöffnung günstig ist (Heilmann und Merfort, 1998a; 1998b; Simons *et al.*, 2005), aufweisen.

Die Ergebnisse der Inkubationen von Galangin **10**, welches keine Hydroxygruppen im B-Ring aufweist, und Kämpferol **11** zeigten eindeutig, dass die Einführung einer OH-Gruppe in Position C-4' des B-Ringes, wie bei **11**, den Flavonolabbau signifikant beeinflusst, da die Umsetzung von **11** im Vergleich zu **10** sehr viel schneller erfolgte (Abb. 28). Eine Erhöhung auf zwei Hydroxygruppen, wie bei Quercetin **1**, bewirkte hingegen keine weitere Beschleunigung des Flavonolabbaus. Die Verbindungen **1** und **11** wurden nahezu in gleichem Ausmaß und mit gleicher Geschwindigkeit umgesetzt. Diese Resultate sind in weiteren Versuchen mit ausgewählten Flavonen bestätigt worden. Während Chrysin **2**, welches keine Hydroxygruppe im B-Ring besitzt, keinem Abbau unterlag, führte die Einführung einer OH-Gruppe in Position C-4' des B-Ringes bei Apigenin **12** zu dessen Abbau. Eine zweite Hydroxygruppe, wie bei Luteolin **13**, erbrachte auch hier keine Veränderung in der Umsetzungskinetik. Beide Flavone **12** und **13** wurden mit fast der gleichen Fermentationsgeschwindigkeit und in gleichem Ausmaß umgesetzt (Abb. 32).

Erst kürzlich wurde in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen von Simons *et al.* (2005) gezeigt, dass die Einführung einer OH-Gruppe in Position C-4' des B-Ringes eines Flavonoids (bei vorliegender Hydroxylierung in den Positionen C-5 und C-7) zur Erhöhung seiner Umsetzungsgeschwindigkeit durch humane Faecesflora führte.

Dass eine OH-Funktionalität in Position C-4' des B-Ringes den bakteriellen Abbau der Flavonoide beeinflusst, zeigen auch Befunde von Wang *et al.* (2001). Während (-)-Epigallocatechin bei der Inkubation mit dem Darmbakterium *Eubacterium* sp. SDG-2 einer Ringspaltung unterlag, blieb 4'-O-Methyl(-)-epigallocatechin sogar über eine verlängerte

Inkubationszeit unverändert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die freie Hydroxygruppe in Position C-4' eine wichtige Rolle für die Interaktion der Flavonoide mit dem Enzym, das ihre Ringöffnung katalysiert, spielt, was unsere Befunde auch bekräftigt.

Die Ergebnisse der Inkubation der Flavonole und Flavone (welche sich nur durch eine Hydroxygruppe in Position C-3 des C-Ringes unterscheiden; vgl. Abb. 24 und 29) zeigten weiterhin, dass letztere langsamer und in geringerem Ausmaß im Vergleich zu den Flavonolen umgesetzt wurden (Abb. 28 und 32). Da diese Unterschiede nicht auf tierindividuelle Differenzen in der Beschaffenheit der mikrobiellen Enzyme – wie weitere Inkubationsexperimente von Chrysin **2**, Galangin **10**, Kämpferol **11** und Apigenin **12** mit gleicher Bakterienquelle belegten (vgl. Abschnitt 3.3.3 und Abb. 34) – zurückzuführen sind, kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die Hydroxylierung in Position C-3 eine fördernde Rolle im Abbau von Flavonolen spielt.

Diese Rolle wird besonders anschaulich, wenn man den von Schneider (1999) postulierten Abbaumechanismus von Flavonolen und Flavonen durch das Darmbakterium *Eubacterium ramulus* (Abb. 36) betrachtet. Wie daraus ersichtlich wird, führt die Ringöffnung von Flavonolen (hier am Beispiel von Kämpferol **11**) zur Bildung des Chalcones 2-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-propenon **II**, welches über eine Keto-Enol-Tautomerie mit seiner entsprechenden α -Diketo-Verbindung im Gleichgewicht steht. α -Diketone sind im allgemeinen sehr instabil und können leicht von Hydrolasen abgebaut werden, so dass das Gleichgewicht auf die rechte Seite bzw. zu Gunsten des Flavonolabbaus verschoben wird. Bei den Flavonen (hier am Beispiel von Apigenin **12**) werden aufgrund des Fehlens einer OH-Gruppe in der 3-Position des C-Ringes verständlicherweise keine α -Diketone gebildet. Das gebildete 2',4',6',4-Tetrahydroxychalcon **VII** wird zunächst reduziert (ein Reaktionsschritt, der im Falle von Flavonolen umgangen wird), bevor es einer Hydrolyse unterliegt.

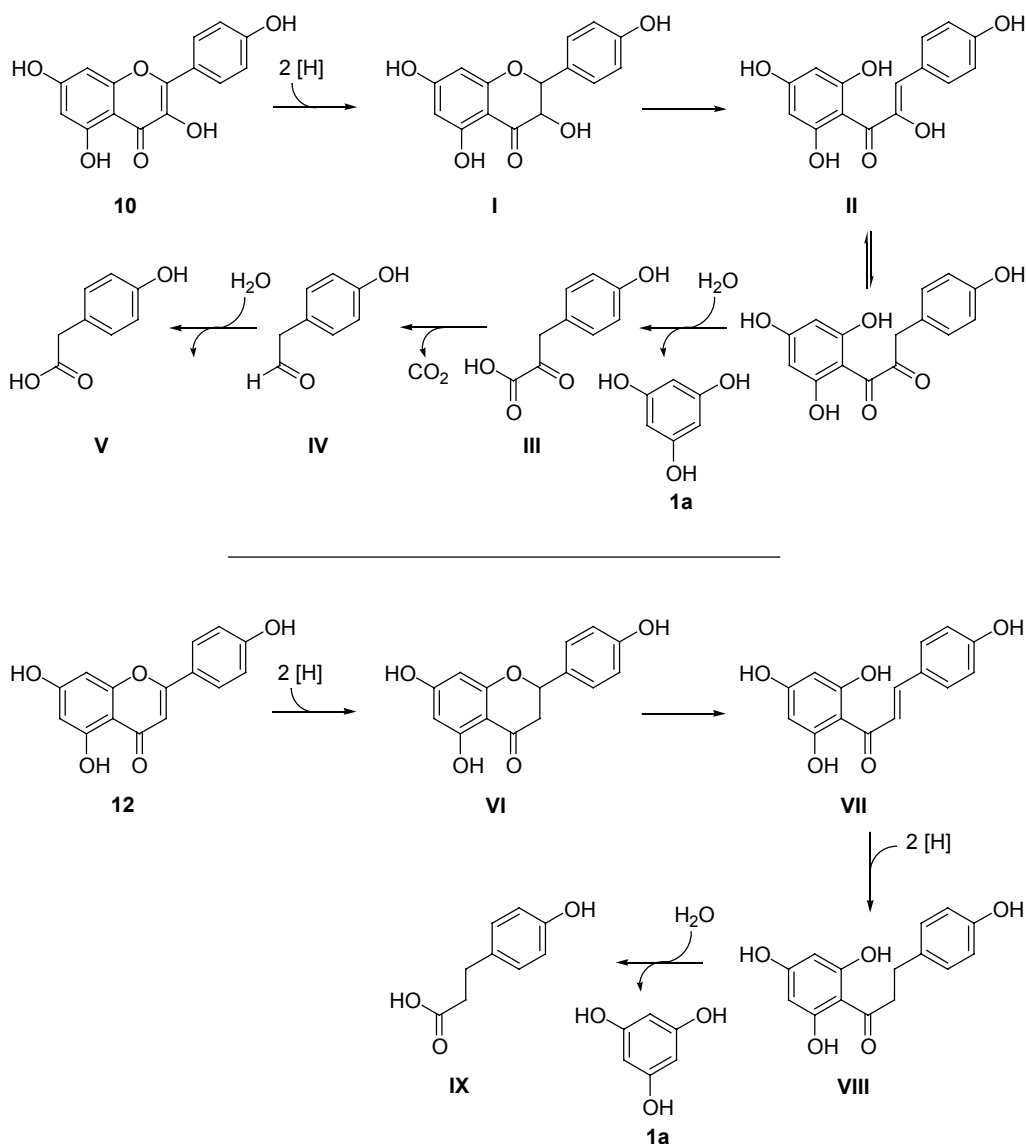


Abb. 35: Postulierter Abbaumechanismus von Flavonolen (am Beispiel von Kämpferol **10**) und Flavonen (am Beispiel von Apigenin **12**) durch *Eubacterium ramulus* **I**: Dihydrokämpferol, **II**: 2-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-propenon bzw. das entsprechende α -Diketon, **1a**: Phloroglucin, **III**: 2-Keto-3-(4-hydroxyphenyl)-propionsäure; **IV**: 4-Hydroxyphenylacetaldehyd, **V**: 4-Hydroxyphenyllessigsäure, **VI**: Naringenin, **VII**: 2',4',6',4-Tetrahydrochalcon; **VIII**: Phloretin; **IX**: 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (entnommen aus Schneider, 1999).

Wird ein ähnlicher Mechanismus für den Abbau der Flavonoide durch die Schweine-Caecum-Mikroflora vorausgesetzt – hierfür spricht die große Übereinstimmung zwischen den in der vorliegenden Arbeit detektierten Metaboliten und den in den Untersuchungen von Schneider (1999) beschriebenen Abbauprodukten – so überrascht die in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den Flavonen beobachtete schnellere Metabolisierung der

Flavonole nicht. Weiterhin ist in der Literatur beschrieben, dass der C-Ring der Flavonole gegenüber mikrobieller Ringöffnung labil ist (Winter *et al.*, 1987; Schneider *et al.*, 1999). Ferner stellten Justesen *et al.* (2000) bei Inkubationen von Quercetin **1** bzw. Naringenin **3** (Verbindung VI in Abb. 35) mit humanen Faeces fest, dass **1** schneller und im Vergleich zu **3** in stärkerem Umfang abgebaut wurde. Unter Berücksichtigung der obigen Ergebnisse, welche gezeigt haben, dass eine zweite Hydroxygruppe im B-Ring (wie bei Quercetin **1** verglichen mit Naringenin **3**) keinen Einfluss auf die Abbaurate der Flavonoide hat, und des in Abbildung 35 postulierten Abbaumechanismus von Flavonolen und Flavonen, stellen die Ergebnisse dieser Studie eine weitere Bestätigung unserer Beobachtungen (dass die Hydroxylierung in Position C-3 eine fördernde Rolle im Abbau von Flavonolen spielt) dar. Unsere Befunde stehen jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen von Simons *et al.* (2005), die nach Inkubation von Naringenin **3**, Kämpferol **11** und Apigenin **12** mit humanen Faeces feststellten, dass diese Flavonoide mit der gleichen Geschwindigkeit abgebaut wurden. Diese Abweichungen lassen sich auf Unterschiede zwischen den in unseren Experimenten und den in der zitierten Studie zur Inkubation eingesetzten Konzentrationen (0,5 mM vs. 0,078 mM) zurückführen. Ein Einfluss der Flavonoidkonzentration auf ihren Abbaugrad ist in der Literatur beschrieben (Rechner *et al.*, 2004).

Interessanterweise zeigen Bioverfügbarkeitsstudien am Menschen, dass nach Aufnahme von Naringenin-7-rutinosid bzw. Quercetin-3-rutinosid die Plasmakonzentrationen des Flavanons **3** höher ist, als die von Flavonol **1** (Manach *et al.*, 2005). Zum einen wird von verschiedenen Arbeitsgruppen angenommen, dass sowohl Naringenin-7-rutinosid als auch Quercetin-3-rutinosid erst im Dickdarm, d.h. nach bakterieller Abspaltung des Zuckeres, absorbiert werden (Manach *et al.*, 1997; Hollman *et al.*, 1999; Erlund *et al.*, 2001b; Olthof *et al.*, 2003). Zum anderen unterscheiden sich die Aglykone **1** und **3** nur geringfügig in ihrer Polarität (Lin *et al.*, 2003), welche bei der Absorption eine wichtige Rolle spielt. Deshalb ist anzunehmen, dass Quercetin **1** nach seiner Freisetzung im Dickdarm einer im Vergleich zu Naringenin **3** schnelleren Metabolisierung unterliegt, mit der Folge einer verringerten Absorption in nativer Form. Dies wiederum spricht für die obigen Beobachtungen.

Zusammenfassend lässt der vorliegende Vergleich den Schluss zu, dass unabhängig von der Flavonoid-Unterklasse eine Hydroxylierung in Position C-4' des B-Ringes den Abbau von Flavonoiden fördert (bei den Flavonen sogar erst ermöglicht) und dass eine zusätzliche

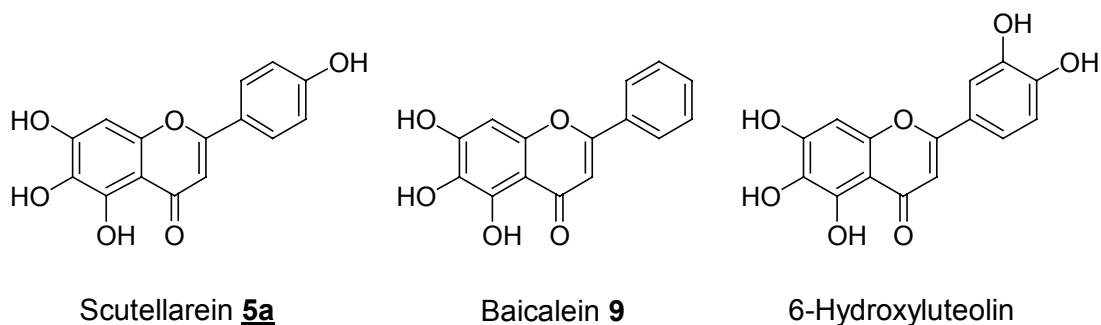
Hydroxylierung des B-Ringes keinerlei Einfluss auf den Abbau hat. Die Ergebnisse dieser Studie lassen weiterhin vermuten, dass die Hydroxylierung in Position C-3 eine fördernde Rolle im Abbau von Flavonolen durch caecale Mikroflora spielt.

3.4 Studien zur Interaktion von Flavonoiden mit α -Glucosidasen

3.4.1 Einleitung

Klinische Studien zeigen, dass eine konsequente Senkung der Blutglucosespiegel beim Diabetiker mikro- und makrovaskuläre Spätschäden verzögert und lebensverlängernd wirkt. Neben der generellen Verminderung der Blutglucosespiegel versucht man, zusätzlich postprandiale Glucosespitzen, die beim Gesunden nicht zu beobachten sind, zu vermeiden. Hemmstoffe der α -Glucosidase sollen die Glucosespitzen abpuffern (Neye, 2000). α -Glucosidasen, d.h. Maltase, Saccharase, Glucoamylase und Isomaltase sind im Epithel der Bürstensaummembran des Dünndarmes lokalisiert und spielen dort eine wichtige Rolle bei der Resorption von Kohlenhydraten (Toda *et al.*, 2001; Abesundara *et al.*, 2004). Wird die Aktivität dieser Enzyme gehemmt, kommt es zur Verzögerung des Abbaus von Oligo- bzw. Disacchariden und der schnellen Absorption von Glucose mit der Folge verminderter postprandialer Glucosespitzen (Puls *et al.*, 1977; Baron, 1998; Kawaba *et al.*, 2003). Eine solche Hemmwirkung zeigt beispielsweise Acarbose, ein Pseudotetrasaccharid aus Kulturen von *Actinoplanes*-Bakterien (Jenkins *et al.*, 1981). Seine antidiabetische Wirkung wurde in mehreren klinischen Studien bestätigt (Neye 2002; Chiasson *et al.*, 2002), und es ist mittlerweile für die Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 in Verbindung mit einer Diät oder mit anderen oralen Antidiabetika zugelassen (Neye, 2002).

Auf der Suche nach natürlichen, nebenwirkungsfreien bzw. -armen α -Glucosidasehemmstoffen hat man auch den Flavonoiden Aufmerksamkeit gewidmet (Watanabe *et al.*, 1997; Nishioka *et al.*, 1998). In vielen *in-vitro*-Untersuchungen jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass einige ihrer Vertreter sogar zu den potentesten Inhibitoren der α -Glucosidase gehören (Nishioka *et al.*, 1998; Matsui *et al.*, 2001; Kawabata *et al.*, 2003; Gao und Kawabata, 2005). So waren beispielsweise die Flavonoide Scutellarein **5a**, Baicalein **9** und 6-Luteolin in der Lage, α -Glucosidase aus Rattendünndarm mit IC_{50} -Werte von 12, 32 bzw. 10 μ M zu hemmen (Kawabata *et al.*, 2003).



In Anbetracht dieser Eigenschaften der Flavonoide und der Tatsache, dass im Schweine-Caecum-Inhalt hohe α -Glucosidase-Aktivitäten enthalten sind, war es interessant zu überprüfen, ob diese Substanzen eine ähnliche Hemmwirkung auf α -Glucosidase aus dem Caecum-Inhalt bewirken. Bei positiven Ergebnissen war vorgesehen, die vergleichsweise leicht verfügbare α -Glucosidase aus dem Caecum-Inhalt dazu zu verwenden, weitere Flavonoide mit potentiell hemmendem Effekt auf menschliche α -Glucosidasen sowie Strukturmerkmale, die jene Aktivität bewirken, zu identifizieren.

3.4.2 α -Glucosidase-Aktivität im Caecum-Inhalt

Die im Caecum-Inhalt nachgewiesene α -Glucosidase (vgl. Abschnitt 3.1.2) wurde zunächst auf ihre Aktivität, *p*-Nitrophenol (PNP) aus *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (PNP-G) freizusetzen, untersucht. Hierzu wurde in Anlehnung an die Methodik von Seefelder (2002) und Sarlikiotis *et al.* (1992) aus dem Inhalt unterschiedlicher Schweine-Caeci jeweils ein Teil entnommen und mit Carbonat-Phosphat-Puffer (pH 6,3) verdünnt, zentrifugiert und als Enzymextrakt verwendet (vgl. Abschnitt 4.3.4.1). Aliquote des Extraktes wurden mit PNP-G (200 μ M) versetzt und für 0, 5, 10, 15, 20, 30 und 60 min bei 37 °C inkubiert. In der gleichen Weise sind Kontrollansätze mit deaktivierter Mikroflora und PNP-G bzw. Blindansätze mit Carbonat-Phosphat-Puffer und PNP-G durchgeführt worden. Das bei der enzymatischen Reaktion freigesetzte PNP wurde nach Extraktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm vermessen und mittels einer externen Eichgerade quantifiziert (vgl. Abschnitt 4.3.4.1). Abbildung 36 zeigt die Aktivität der α -Glucosidase, dargestellt als die Menge an freigesetztem PNP in Aliquoten des Extraktes.

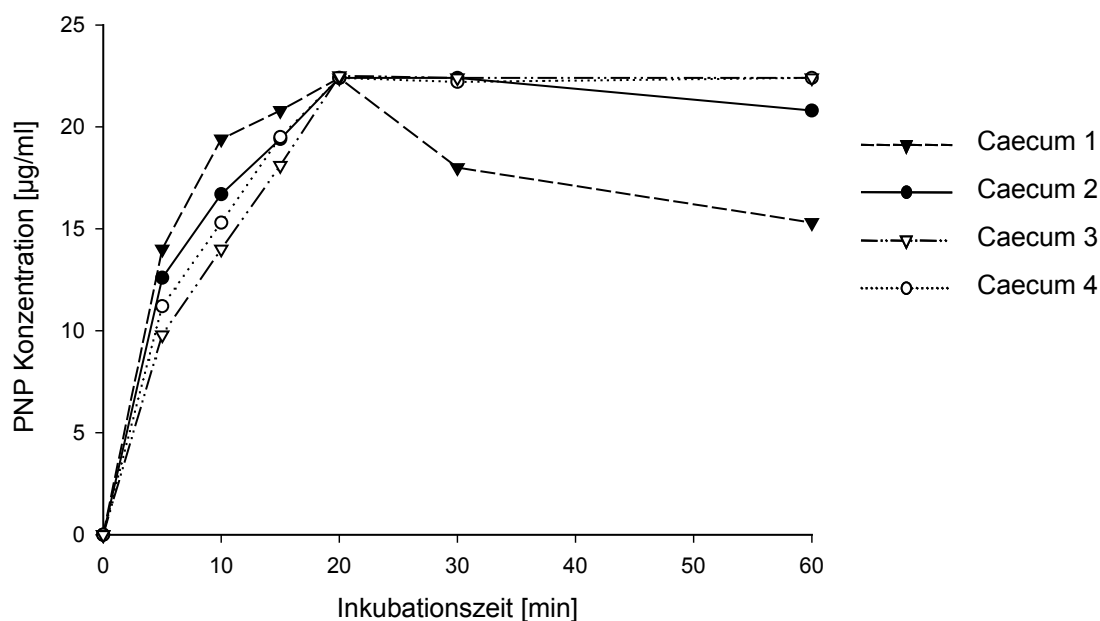


Abb. 36: Bestimmung der α -Glucosidase-Aktivität einzelner Schweine-Caeci nach Inkubation mit *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (PNP-G) über 0, 5, 10, 15, 20, 30 und 60 Minuten bei 37 °C. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert aus zwei unabhängigen Bestimmungen dar.

Wie daraus ersichtlich wird, führte die Inkubation von PNP-G mit dem Enzymextrakt zur sukzessiven Freisetzung von PNP. In Kontroll- und Blindansätzen war die Bildung von PNP nicht zu beobachten (Daten sind nicht gezeigt). PNP erreichte seine höchste Konzentration (22,4 $\mu\text{g/ml}$) nach 20-minütiger Inkubation, danach war in einigen Experimenten – bedingt durch bakteriellen Abbau – ein langsamer Abfall zu beobachten.

In den folgenden Untersuchungen sollte nun überprüft werden, ob der Zusatz ausgewählter Flavonoide zu den Inkubationsansätzen eine partielle bzw. gänzliche Hemmung der Freisetzung von PNP bzw. der α -Glucosidase-Aktivität bewirken kann.

3.4.3 Studien zur Hemmung von α -Glucosidase durch Flavonoide

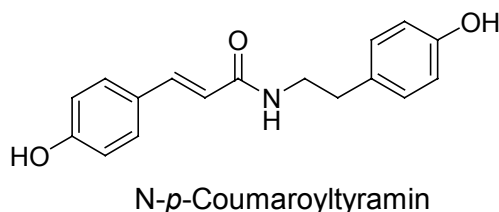
Zur Untersuchung einer potentiellen Hemmung der α -Glucosidase aus Schweine-Caecum durch Flavonoide wurden zunächst die Flavone Scutellarein **5a** und Baicalein **9** ausgewählt, da sie sich bislang als potente Inhibitoren der α -Glucosidase aus Rattendünndarm erwiesen haben (Kawabata *et al.*, 2003). Die Durchführung der Versuche erfolgte gemäß Angaben im Abschnitt 4.3.4.2. Hierbei wurden Aliquote des Enzymextraktes (vgl. Abschnitt 3.4.2) einem Gemisch aus PNP-G (200 μ M) und **5a** bzw. **9** (in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen, d.h. von 10 μ M bis 2 mM) zugesetzt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Das bei der enzymatischen Reaktion freigesetzte PNP wurde analog obiger Vorgehensweise vermessen und quantifiziert. Zu Kontrollzwecken wurden Ansätze mit **5a** bzw. **9** und Enzymextrakt (Blindansätze), sowie mit PNP-G und Enzymextrakt (Kontrollansätze) angefertigt und analog behandelt.

Der Vergleich der Konzentration von freigesetztem PNP in den Experimenten unter Flavonoidzusatz mit der in den Kontrollversuchen ließ keinen Unterschied erkennen. Somit hatte unter den gewählten Versuchsbedingungen weder Scutellarein **5a** noch Baicalein **9** (in den unterschiedlichsten Konzentrationen) einen Effekt auf die Freisetzung von PNP. Die Variation der Konzentration von PNP-G oder der Menge des Enzymextraktes (vgl. Abschnitt 4.3.4.2.1), ließ ebenfalls keine Abnahme der Freisetzung von PNP nach Flavonoidzusatz erkennen. Auch weitere Experimente, in denen als potentieller Hemmstoff das Flavon Luteolin **13** – es soll spezifisch die Untereinheit Maltase hemmen (Matsui *et al.*, 2002) – blieben im Hinblick auf eine erwartete Hemmwirkung erfolglos.

Alternativ wurde ein anderes Substrat als PNP-G auf Hemmung seiner Hydrolyse untersucht. Hierzu wurde in Anlehnung an publizierte Daten (Kawabata *et al.*, 2003) Saccharose ausgewählt. Als potentielle Hemmstoffe dienten erneut die Flavone **5a** und **9**. Die Experimente wurden gemäß Angaben im Abschnitt 4.3.4.2 durchgeführt. Die durch Aktivität der α -Glucosidase freigesetzte Glucose wurde enzymatisch erfasst (vgl. Abschnitt 4.3.4.2.3).

Ein Vergleich der Glucose-Konzentration in den Versuchen mit Flavonoidzusatz mit der in den Kontrollansätzen ergab, genauso wie bei den obigen Experimenten, keinen Unterschied. Durch Variationen der Flavonoid-, der Substrat- oder der Enzymextraktkonzentration (vgl. Abschnitt 4.3.4.2.2), war ebenfalls kein Hemmeffekt von **5a** bzw. von **9** auf die Aktivität der α -Glucosidase festzustellen.

Während in der bereits erwähnten Studie von Kawabata *et al.* (2003) Scutellarein **5a** und Baicalein **9** die katalytische Aktivität der α -Glucosidase aus Rattendünndarm (Wirtseigenes Enzym) so beeinflussten, dass die Freisetzung von Glucose aus Saccharose stark vermindert wurde, hatten sie in unseren Untersuchungen keinen Effekt auf α -Glucosidase aus dem Caecum-Inhalt. Als Ursache hierfür könnte die bakterielle Herkunft der in unseren Studien eingesetzten α -Glucosidase sein. Es liegen Hinweise vor, wonach zahlreiche phenolische Verbindungen inhibitorische Wirkungen auf α -Glucosidasen aus Hefen zeigen, aber keine Effekte auf α -Glucosidasen aus Säugetieren haben (Gao und Kawabata, 2005). So war beispielsweise N-*p*-Coumaroyltyramin an der α -Glucosidase aus Rattendünndarm wirkungslos, während es die α -Glucosidase aus Hefe hemmte (Nishioka *et al.*, 1997).



Diese Unterschiede in der Wirkung von N-*p*-Coumaroyltyramin auf beide Enzyme führten die Autoren darauf zurück, dass zwischen tierischen α -Glucosidasen und solchen aus Hefen große strukturelle Unterschiede bestehen. Weiterführende Studien zur Isolierung und Charakterisierung von α -Glucosidase aus Schweine-Caecum sind daher sinnvoll, um die oben aufgestellte Hypothese zu überprüfen und um die Verwendung dieses Enzyms als Modell für inhibitorische Wirkung der Flavonoide auf α -Glucosidasen aus dem Dünndarm von Säugetieren zu beurteilen.

4 Experimentalteil

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität von den Firmen Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Acros Organic (Geel, Belgien), Lancaster (Frankfurt, Deutschland) Merck (Darmstadt, Deutschland) und Extrasynthèse (Lyon, Frankreich) bezogen. Hispidulin wurde nach Kavvadias *et al.* (2004) synthetisiert. Xanthohumol wurde freundlicherweise von Prof. Dr. H. Becker (Universität Saarbrücken) zur Verfügung gestellt. Lösungsmittel wurden vor der Verwendung über Füllkörperkolonnen rektifiziert. Für HPLC-DAD, HRGC-EI-MS und HPLC-ESI-MS/MS wurden „gradient grade“-Lösungsmitteln von Acros Organics (Geel, Belgien) und Merck (LiChrosolv[®], Deutschland) verwendet. Die Gase Stickstoff und Kohlendioxid lieferte die Firma Linde (Berlin, Deutschland): N₂ (Reinheitsgrad 5.0) und CO₂ (Reinheitsgrad 4.8).

4.1.2 Schweine-Faeces

Der Schweine-Faeces für die Vorversuche zu den Metabolismusstudien stammte von Versuchstieren (Göttinger Minipigs) der Universitätsklinik Würzburg.

4.1.3 Schweine-Caeci

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Schweine-Caeci stammten vom Schlachthof Würzburg. Die für die Fleischproduktion geschlachteten Tiere (Deutsche Schwein-Hybride) waren klinisch gesund und unterlagen ständig ärztlicher Kontrolle. Antibiotika-Behandlungen waren ausgeschlossen. Zum Zeitpunkt der Schlachtung hatten die Schweine ein Gewicht von 120 bis 140 kg und waren im Alter von 3 bis 5 Monaten.

Unmittelbar nach der Schlachtung wurden die Caeci vom restlichen Schweinedarm abgetrennt und sofort zugebunden. Die Blinddärme wurden zusammen mit Anaerocult® A (s. Anmerkung) in einen Anaerobiertopf gestellt und unverzüglich ins Labor transportiert.

Anmerkung: Bei Anaerocult® A handelt es sich um Anaerotest®-Streifen, die Komponenten enthalten, welche Sauerstoff innerhalb kurzer Zeit chemisch vollständig binden und O₂-freies Milieu einschließlich CO₂-Atmosphäre erzeugen. Anaerocult® A sowie der Anaerobiertopf (2,5 Liter) wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

4.1.4 API ZYM Testsystem (Testkit)

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität der caecalen Mikroflora wurde der API ZYM Testkit eingesetzt. Der Testkit wurde von Bio Mérieux (BioMérieux, Nürtingen, Deutschland) bezogen.

4.1.5 Saccharose/D-Glucose- UV-Testkit

Für die Bestimmung von Glucose wurde der Saccharose/D-Glucose-UV-Testkit eingesetzt. Der Testkit wurde von Boehringer (Boehringer, Mannheim, Deutschland) bezogen.

4.1.6 Adsorptionsmaterial

Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0,032-0,063 mm, Merck) als stationäre Phase verwendet.

4.1.7 Dünnschichtchromatographie (DC)

Träger: DC Alufolien-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland).
Detektion: UV bei 254 nm.

4.2 Geräte

4.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

<u>HPLC 1:</u>	Photodiodenarray Hewlett Packard (HPLC-DAD) 1100 Serie
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Serie
Degasser:	On-line Degasser, Anschlüsse für verschiedene Lösungsmittel
Injektor:	Rheodyne 7125, Probenschleifenvolumen 100 µl
Autosampler:	Wisp 710b (Waters, Eschborn, Deutschland)
Trennsäule:	Eurospher 100 C-18, 5 µm Partikelgröße (250 × 4 mm) (Knauer, Berlin, Deutschland)
Fliessmittel:	A: 0,05% Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser B: Acetonitril
Fluss:	1 ml/min
Gradient:	Linear, 1 - 99% B in 40 min dann 5 min bei 99% B halten
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray, DAD, 1100 Serie
Spektralbereich:	200-600 nm

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit Hewlett-Packard ChemStation Software.

4.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

<u>HPLC 2:</u>	Hochdruckgradientenanlage (Applied Biosystems, Bensheim)
Pumpe:	Applied Biosystems 140B Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten
Autosampler:	Spark Holland Triathlon mit µl-Pickup-Modus für automatische Injektion (Emmen, Niederlande)
Injektor:	Rheodyne 8125, Probenschleifenvolumen 5 µl
Trennsäule:	Symmetry C18, 5 µm Partikelgröße (150 × 2,1 mm) (Water, Milford, MA, USA)
Fliessmittel:	A: 0,05% Ameisensäure in Wasser B: Acetonitril

Fluss:	0,2 ml/min
Gradient:	Linear, 5 - 99% B in 30 min dann 5 min bei 99% B halten
MS	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland) mit Finnigan Electrospray Ionisations-Interface (ESI)
ESI-Koppel	
kapillare:	desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm i.D., J & W)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Eingangskapillare:	200 °C
Kapillarspannung:	3,2 bis 3,5 kV
Sheathgas:	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0; 10 Skalenteile
Messbereich:	$m/z = 120 - 900$ im Full Scan Modus
Kollisionsgas:	Argon 5.0; Kollisionsgasdruck 0,27 Pa (2,0 mTorr)
Kollisionsenergie:	20 bis 40 eV

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit DECstation 5000/33 (Digital Equipment, Unterföhring) ICIS 8.1 (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland)

4.2.3 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)

GC:	Fisons Instruments GC 8000 (Fisons, Egelsbach, Deutschland)
Injektor:	Split/Splitless-Injektor (1:20), Temperatur 250 °C
Autosampler:	Fisons AS 800
Trennsäule:	J&W DB-5 (30 m × 0,25 mm i.D.; $d_f = 0,25 \mu\text{m}$) (J&W, Folsom, CA, USA)
Temperatur-	
programm:	60 °C, 5 °C/min, 310 °C (10 min isotherm)
Trägergas:	90 kPa Helium 5.0
MS:	Fisons Instruments MD 800 (Egelsbach, Deutschland)
Ionisation:	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Quellendruck:	1 mPa (10^{-5} mbar)
Multipliiert:	350 V

Massenbereich : 35–450 u

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit einem IBM-kompatiblen Personal-Computer und der Software „*Mass-Lab for Windows*“ bzw. „*X-Calibur*“.

4.2.4 Sonstige Hilfsmittel

Anaerobenkammer: Plexiglaskammer, Gasvolumen ca. 0,25 m³ hergestellt in der Werkstatt der Universität Würzburg, Gasbetrieb: N₂ oder CO₂/N₂ (20/80, v/v)

Waagen: Mettler PL 300, Analysenwaage, Mettler Waagen GmbH, Gießen, Deutschland
Sartorius BP 210 S Analysenwaage, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

Ultraschallbad: Branson 1210, Heinmann, Schwäbisch-Gmünd, Deutschland

Rotavapor: Büchi Rotavapor mit Büchi Vakuum System B-173 und Büchi Vakuum Controller B-720, Büchi, Konstanz, Deutschland

pH-Meter: Labor-pH-Meter, Knick, Berlin, Deutschland

Vortexer: Vortex Genie, Scientific Industries, New York, USA

Zentrifugen: 1. Typ Universal 16R, Rotor 1616 & 1614 (Hettich, Tuttlingen)
2. Microspin 12S (Sorvall[®] Instruments DuPont, 12 000 RPM)
3. RC5C (Sorvall[®] Instruments)

Lyophilisator: Christ Alpha 1-4; 0,1 mbar, Christ, Osterode, Deutschland

UV-Lampe

(für DC): Minuvis, Degussa, Heidelberg, Deutschland
Wellenlänge: 254 und 366 nm

Photometer: UV 2101 PC UV-VIS Scanning Spektralphotometer, Shimadzu, Duisburg, Deutschland

Trockenschrank: Memmert, Modell 400, Memmert, Schwalbach, Deutschland

Autoklav: Wolf Sanoclav, Typ S-MCS, Wolf, Geislingen, Deutschland

Temperatur 121 °C

Autoklavierzeit 16 min

4.3 Allgemeine Arbeitsvorschriften

4.3.1 Inkubations-Vorversuche mit Schweine-Faeces

4.3.1.1 Herstellung des Reduktionspuffers A

Für Fermentationsversuche mit Schweine-Faeces wurde Reduktionspuffer A nach Seefelder (2002) verwendet, dessen Zusammensetzung in Tabelle 4 dargestellt ist.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Reduktionspuffers A

Bestandteile	Konzentration [mmol/l]
1. NaCl	55
2. KCl	20
3. MgCl ₂ x 6H ₂ O	2,5
4. CaCl ₂ x 2H ₂ O	2,5
5. NaHCO ₃	50
6. NaH ₂ PO ₄	1
7. NH ₄ Cl	55
8. Na ₂ SO ₄	20
9. Na ₂ HPO ₄	2,5
10. KH ₂ PO ₄	2,5
11. (NH ₄)HCO ₃	50
12. KHCO ₃	1
13. Mikrolösung*	125 µl
14. Resazurin	1,25 ml (1 mg/ml)
<i>aqua bidest.</i>	ad 1000 ml

* Die Mikrolösung enthielt dabei folgende Salze in 100 ml *aqua bidest.* gelöst:

13,2 g	CaCl ₂ x 2H ₂ O
10,0 g	MnCl ₂ x 4H ₂ O
1,0 g	CoCl ₂ x 6H ₂ O
8,0 g	FeCl ₃ x 6H ₂ O

Die Reduktionslösung bestand aus:

H ₂ O	51,66 ml
1 N NaOH	2,16 ml
Na ₂ S	311,0 mg (frisch aus dem Exsikkator)

4.3.1.2 Herstellung der Faecessuspensionen

Die Präparation der Faecessuspensionen fand in Anlehnung an die Arbeit von Seefelder (2002) statt. Demnach wurde der Reduktionspuffer A zunächst ohne Zusatz der Reduktionslösung hergestellt. Es wurden 8 ml entnommen und in mit CO₂-gefluteten Stuhlröhrchen (Merck, Darmstadt) einpipetiert. Anschließend wurde die Lösung 5 Minuten mit CO₂ begast, bevor 1 ml der frisch hergestellten Reduktionslösung zugesetzt wurde. Das Stuhlröhrchen wurde dicht verschlossen. Ein Farbumschlag des Indikators von rosa nach farblos deutete auf ein anaerobes Milieu hin. In das Stuhlröhrchen wurde anschließend von je drei verschiedenen Schweinen ca. 1 g frisches Faeces eingewogen. Für den Transport der so erhaltenen Faeces-Puffer-Suspensionen ins Labor wurden die Stuhlröhrchen zusammen mit Anaerocult® A in einen Anaerobiertopf gestellt und die Anaerobiose mittels Anaerobier-Indikator-Streifen (Merck, Darmstadt, Deutschland) kontrolliert.

4.3.1.3 Anaerobe Inkubation mit Faecessuspensionen

Fermentationen mit Schweine-Faeces wurden lediglich mit Rutin (Quercetin-3-rutinosid) vorgenommen. Die Inkubationsversuche wurden in mit Drehverschluss verschließbaren 2 ml Plastikgefäßen (Merck, Darmstadt) unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Das anaerobe Milieu wurde in einer anaerobier Glove Box (Merck, Darmstadt, Deutschland), die während des Versuchs mit Stickstoff begast wurde, realisiert. Für die Fermentation wurden Aliquote (600 µl) der Kotsuspension entnommen, mit 600 µl reduzierendem Puffer A verdünnt und mit einer definierten Menge an Rutin (20 µl einer 10 mM Rutinstamm-lösung in Dimethylsulfoxid) versetzt. Danach wurden die fest verschlossenen Proben-gefäße in einen Trockenschrank gestellt und bei 37 °C für 4, 8 und 24 Stunden inkubiert. Als Kontrollen dienten Ansätze mit durch Erhitzen (100 °C für 15 min) deaktivierten Kotsuspensionen bzw. Ansätze ohne Flavonoide.

4.3.1.4 Aufarbeitung und Analytik der Inkubationsansätze

Die Aufarbeitung der Inkubationsansätze erfolgte im wesentlichen nach Braune *et al.* (2001). Hierbei wurden die Proben nach Ablauf der Inkubationszeit mit 20 µl Essigsäure versetzt und bei 10.000 U/min für 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, membranfiltriert (Ratilabo-Spritzenfilter PVDF, 0,45 µm Porengröße, Roth) und

hiervon dann Aliquote (50 µl) zur HPLC-DAD-Analyse (für Geräteparameter und Analysenbedingungen vgl. 4.2.1) eingesetzt. Die Rückstände wurden zweimal mit je 600 µl 70% (v/v) Methanol (in wässriger 1% (v/v) Essigsäure) – Es wurden verschiedene Lösungsmittel (Ethylacetat, Diethylether, Methanol, Dichlormethan bzw. Butanol) und Wasser-Methanol-Gemische getestet, wobei mit 70% (v/v) Methanol (in wässriger 1% (v/v) Essigsäure) die bessere Wiederfindung erzielt wurde – im Ultraschallbad extrahiert und bei 5000 U/min für 10 min zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden membranfiltriert und Aliquote (50 µl) mittels HPLC-DAD (für Geräteparameter und Analysenbedingungen vgl. 4.2.1) analysiert.

Weitere Proben wurden andererseits nach beendeter Inkubation sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, lyophilisiert und zweimal mit je 1 ml 70% (v/v) Methanol (in wässriger 1% (v/v) Essigsäure) im Ultraschallbad extrahiert (auch hier wurden die o.g. Lösungsmittel zur Extraktion getestet und aufgrund der besseren Wiederfindung 70% (v/v) Methanol (in wässriger 1% (v/v) Essigsäure) etabliert) und anschließend bei 5000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt, membranfiltriert (Ratilabo-Spritzenfilter PVDF, 0,45 µm Porengröße, Roth) und Aliquote (50 µl) zur HPLC-DAD-Analyse eingesetzt. Kontrollansätze wurden analog behandelt.

4.3.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Transformation von Flavonoiden durch Schweine-Caecum-Inhalt

4.3.2.1 Überprüfung der Vitalität caecaler Mikroflora

Um sicherzustellen, dass der Transportweg vom Schlachthof ins Labor keine Auswirkungen auf die Vitalität caecaler Mikroflora, v. a. auf anaerobe Bakterien, hatte, wurden Kultivierungsversuche mit dem Inhalt von frisch vom Schlachthof geholten Schweine-Caeci durchgeführt. Zur Anzucht anaerob wachsender Keime fanden Schädler-Agarplatten Verwendung, die wie folgt hergestellt und behandelt wurden: 950 ml *aqua dest.* wurden mit 41,9 ml Schädler-Agar (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg) versetzt und 15 min autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 55 °C wurden 1 ml einer Vitamin K₁-Lösung (0,2 g Vitamin K₁ in 20 ml 96%igem Ethanol gelöst) sowie 50 ml defibriniertes Rinderblut zugesetzt und unter sterilen Bedingungen die Platten gegossen. Nach dem Aushärten wurden die Platten zusammen mit Anaerocult® A in einen Anaerobiertopf gestellt und anaerob vorinkubiert.

Zur Anzüchtung aerober Bakterien wurden Luria-Bertani- (LB-) Agarplatten verwendet. Für ihre Herstellung wurde LB-Medium (Fertigmischung der Firma Life Technologie, Karlsruhe) vor dem Autoklavieren mit 1,5% (w/v) Bacto-Agar (Life Technologie, Karlsruhe) versetzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 50 °C wurden die Platten unter sterilen Bedingungen gegossen und nach dem Aushärten ohne Vorbehandlung verwendet.

Darminhalt-Direktausstrich

Zur Kultivierung wurden jeweils 500 µl steriler PBS-Puffer mittels steriler Eppendorfpipetten auf 4 Schädler-Agarplatten getropft. Eine sterile Öse voll Darminhalt von je 4 verschiedenen Schweine-Caeci wurde in den PBS-Puffer eingerieben und ausgestrichen. Die beimpften Platten wurden unverzüglich in einen Anaerobiertopf mit Anaerocult® A gestellt (zur Kontrolle der Anaerobiose dienten Indikatorstreifen), danach wurden die bestückten Anaerobiertöpfe in einem Brutschrank bei 39 °C drei Tage bebrütet. Die analog beimpften LB-Agarplatten wurden aerob in einem Trockenschrank bei 37 °C für zwei Tage bebrütet.

4.3.2.2 *Überprüfung der enzymatischen Aktivität der caecalen Mikroflora mittels API ZYM-Test*

Das API ZYM-Testsystem dient dem semiquantitativen Nachweis von 19 enzymatischen Aktivitäten und wurde zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität der Schweine-Caeci-Inhalte verwendet. Dazu wurden entsprechend den Herstellerangaben Aliquote (10 ml) vom Darminhalt abgenommen, mit sterilem *aqua bidest.* 1:1 verdünnt und homogenisiert. Diese Suspension wurde verwendet, um die Mikroröhrchen des Testsystems zu beimpfen. Die Durchführung erfolgte in einer Glove box, die während des Versuchs kontinuierlich mit CO₂ begast wurde. Die beimpften Streifen wurden zusammen mit Anaerocult® A in einen Anaerobiertopf gestellt und 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach beendeter Inkubation ließ sich die Reaktion nach Zusatz von vom Hersteller angegebenen Detektionsmitteln (Trihydroxymethylaminomethan und Fast Blue BB) ablesen und entsprechend den Herstellerangaben auswerten.

4.3.2.3 *Bestimmung des pH-Wertes im Caecum-Inhalt*

Die Messung des pH-Wertes im Caecum-Inhalt konnte ohne Verdünnung vorgenommen werden. Die Messungen erfolgten unmittelbar nach der Probengewinnung mit einem digitalen pH-Meter bei 20 °C. Die pH-Elektrode wurde vor der ersten Messung mit Standardlösungen auf pH 4,0 und pH 7,0 geeicht. Es wurden mehrere Schweine-Caeci, die an unterschiedlichen Tagen ins Labor gebracht worden waren, untersucht. Der daraus berechnete Mittelwert diente als Richtwert zur Herstellung der Pufferlösung B.

4.3.2.4 *Herstellung des Reduktionspuffers B*

Für Fermentationsversuche mit Schweine-Caeci-Inhalte wurde ein Carbonat-Phosphat-Puffer (Reduktionspuffer B) nach Lebet *et al.* (1998) verwendet. Die Zusammensetzung des Reduktionspuffers ist in Tabelle 5 dargestellt:

Tabelle 5: Zusammensetzung des Reduktionspuffers B

Bestandteile	Konzentration
NaHCO ₃	9,240 g/l
Na ₂ HPO ₄	7,125 g/l
NaCl	0,470 g/l
KCl	0,450 g/l
Urea	0,400 g/l
CaCl ₂ x 6H ₂ O	0,108 g/l
Na ₂ SO ₄ trocken	0,100 g/l
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,100 g/l
Spurenelementlösung ¹	10 ml/l
Resazurin (1 mg/ml)	1 ml/l
Steriles <i>aqua. bidest.</i>	ad 1000 ml

¹Die Spurenelementlösung enthielt dabei folgende Salze in 1 Liter steriles *aqua bidest.* gelöst:

3,680 g	FeSO ₄ x 7H ₂ O
1,159 g	MnSO ₄ x 1H ₂ O
0,440 g	ZnSO ₄ x 7H ₂ O
0,120 g	CoCl ₂ x 6H ₂ O

0,100 g	NiCl ₂ x 7H ₂ O
0,098 g	CuSO ₄ x 5H ₂ O
0,017 g	Mo ₇ (NH ₄) ₆ O ₂₄ x 4H ₂ O

Spurenelementlösung und Resazurinlösung wurden vor der Zugabe steril filtriert. Der pH-Wert wurde auf genau 6,3 eingestellt. Der Carbonat-Phosphat-Puffer wurde für 40 Minuten mit CO₂ begast. Als reduzierendes Agens wurden 5 ml einer frisch hergestellten, steril filtrierten Cysteinhydrochloridlösung (0,1 g/ml) ohne Unterbrechung des Begasens zugegeben, anschließend wurde der Puffer unter konstantem CO₂-Fluß 30 min im Wasserbad auf 80 °C erhitzt (Lebet *et al.*, 1998). Ein Farbumschlag des Redoxindikators Resazurin von rosa nach farblos wies die Einstellung anaerober Atmosphäre nach.

4.3.2.5 *Vorbereitung der Fermentationsversuche*

Es wurden von den, in den Fermentationsversuchen eingesetzten Flavonoiden, Stammlösungen unterschiedlicher Konzentrationen (s. Tabelle 6) in Dimethylsulfoxid hergestellt. Aus diesen Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen jeweils 20 µl in sterile, gasdichte 10 ml-Kulturröhrchen eingefüllt. Danach wurden die Kulturröhrchen mit Stickstoff begast, luftdicht verschlossen und in die zuvor mit Stickstoff gespülte Anaerobenkammer überführt. Glasgefäße wurden mit Stickstoff begast und mindestens 3 h bei 150 °C gebacken. Alle anderen Materialien und Plastikgefäße wurden nach einer Begasung mit Stickstoff autoklaviert (16 min, 121 °C) und zusammen mit den Glasgefäßen in die Anaerobenkammer überführt. Diese wurde zur Entfernung restlicher Sauerstoffspuren über Nacht mit Stickstoff begast. Am Versuchstag wurden die frisch vom Schlachthof gehaltenen Schweine-Caeci zusammen mit dem auf 37 °C temperierten Reduktionspuffer B in die Anaerobenkammer, die mindestens 3 Stunden vorher mit einem N₂/CO₂-Gasgemisch (80:20; v/v) begast worden war, überführt.

Tabelle 6: Die in den Fermentationsversuchen eingesetzten Flavonoide und ihre Stammlösungskonzentrationen

Flavonoide	Konzentration [mM] der Stammlösungen
Quercetin 1	250 mM bzw. 125 mM
Chrysin 2	250 mM, 175 mM bzw. 125 mM
Naringenin 3	250 mM
Hesperetin 4	250 mM
Hispidulin 5	125 mM
Phloridzin 6	125 mM
Phloretin 7	250 mM
Xanthohumol 8	250 mM, 225 mM, 175 mM, 150 mM, 125 mM bzw. 100 mM
Baicalein 9	250 mM
Galangin 10	250 mM
Kämpferol 11	125 mM
Apigenin 12	125 mM
Luteolin 13	175 mM bzw. 125 mM 175 mM

4.3.2.6 *Präparation des Inokulums und Inkubationsbedingungen*

Von je drei bis vier verschiedenen Schweine-Caeci wurden unter kontinuierlichem Be- gasen mit dem o.g. Gasmisch Aliquote (150 ml) entnommen, in einem Becherglas zusammengepoolt und mit dem gleichen Volumen an reduzierendem Puffer B verdünnt. Nach kurzer Homogenisierung (ca. 2 min) wurden die unlöslichen groben Bestandteile durch Filtration über Glaswolle entfernt und das erhaltene Filtrat als Inokulum (Bakterien- quelle) in den Fermentationsversuchen verwendet. Aliquote des Inokulums (5 ml) wurden jeweils in die Inkubationsgefäße mit den Zielverbindungen gegeben und die Inkubation bei 37 °C über 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 24 h gehalten. Zur Erfassung der Metabolite, die die caecale Mikroflora ohne Zugabe eines Flavonoids evtl. bilden kann, wurden parallel zu den Haupt- ansätzen Inkubationsansätze (Blindansätze) mit Dimethylsulfoxid und reinem Caecum- Inokulum angefertigt. Nach Abzug des Blindwertes - wenn nötig - konnte die Netto- produktion der Metabolite bestimmt werden. Zusätzlich wurden Inkubationsansätze mit

Flavonoiden und Pufferlösung (Kontrollansätze) präpariert. Bei einer chemischen Instabilität des zu untersuchenden Flavonoids ist dies essentiell, um eine Aussage darüber machen zu können, ob der Metabolismus in den Hauptansätzen durch Mikroorganismen oder durch Faktoren wie Temperatur und pH-Wert zustande kommt. Alle Inkubationen (Haupt-, Blind- und Kontrollansätze) wurden als Dreifachbestimmungen ausgeführt und jedes Fermentationsexperiment wurde mindestens einmal wiederholt.

4.3.2.7 *Aufarbeitung und Analytik der Inkubationsansätze*

Zum Stoppen der enzymatischen Reaktion wurden die Proben sofort nach beendeter Inkubationszeit in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefroren und am Lyophilisator gefriergetrocknet. Die sich anschließende Extraktion erfolgte bei Chrysin **2** mit 100% Methanol, bei Hispidulin **5** mit 80% (v/v) Methanol (in wässriger 1% (v/v) Essigsäure) und bei allen anderen Flavonoiden mit 70% (v/v) Methanol (in wässriger 1% (v/v) Essigsäure). Die einzelnen Proben wurden zweimal jeweils mit 2,5 ml Extraktionslösung 15 Minuten im Ultraschallbad extrahiert und anschließend bei 5000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt, membranfiltriert (Ratilabo-Spritzenfilter PVDF, $0,45\text{ }\mu\text{m}$ Porengröße, Roth) und Aliquote zur Analyse eingesetzt. Die Blind- und Kontrollansätze wurden analog behandelt. Für die HPLC-DAD-Untersuchungen wurden jeweils 50 μl des Überstandes injiziert (für Geräteparameter und Analysenbedingungen vgl. 4.2.1). Die Identifizierung der Metabolite erfolgte anhand des Vergleiches der Retentionszeiten und UV-Spektren der Probenmoleküle mit denen von authentischen Referenzverbindungen. Für die HPLC-ESI-MS- bzw. HPLC-ESI-MS/MS-Untersuchungen wurden jeweils 20 μl des Überstands injiziert (für Geräteparameter und Analysenbedingungen vgl. 4.2.2). Die Molekülmassen sowie Ionenspektren der Metabolite wurden mit denen von authentischen Referenzverbindungen verglichen. Zur weiteren Charakterisierung der als Phloroglucin **1a** und 4-Methylphenol **11b** identifizierten Metabolite, aber auch anderer Metabolite, die nur in geringen Anteilen im HPLC-DAD Chromatogramm auftauchten, wurden jeweils die dazugehörigen Peaks im HPLC-DAD semiquantitativ aufgesammelt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt, der Wasseranteil am Lyophilisator getrocknet, der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen und zur HRGC-MS- (für Phloroglucin und 4-Methylphenol) bzw. HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Analyse eingesetzt.

4.3.2.8 Quantifizierung der Metabolite

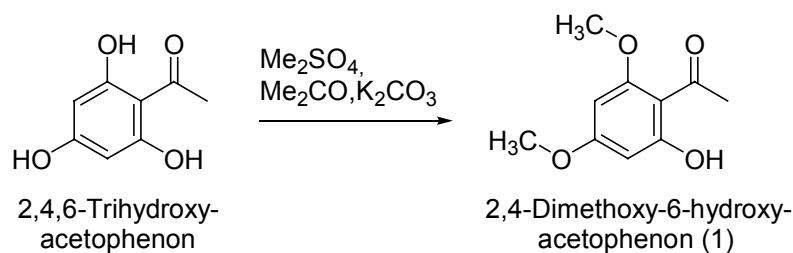
Der zeitliche Verlauf der mikrobiellen Transformation der Flavonoide wurde jeweils mittels HPLC-DAD registriert. Zur Quantifizierung sind Kalibrierungskurven, bei einer für die jeweilige Substanz charakteristischen Wellenlänge, aufgenommen worden. Zur Erstellung der Eichgeraden wurde in gleicher Weise wie zur Herstellung der Inkubationsproben (vgl. 4.3.2.6) vorgegangen. Hierbei wurden 20 µl der Stammlösungen bzw. 20 µl der Verdünnungen der authentischen Referenzverbindungen mit je 5 ml Inokulum versetzt – um die Wiederfindung zu berücksichtigen – und sofort mit Stickstoff bei -196 °C eingefroren und lyophilisiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog 4.3.2.7. Zur Herstellung der Stammlösungen bzw. deren Verdünnungen fand Methanol als Lösungsmittel Verwendung.

4.3.3 Mehrstufensynthese von Hispidulin 5

Die Mehrstufensynthese von Hispidulin (5,7, 4'-Trihydroxy-6-methoxyflavon) erfolgte im wesentlichen nach der Methode von Kavvadias *et al.* (2004).

4.3.3.1 Synthese von Baustein 1

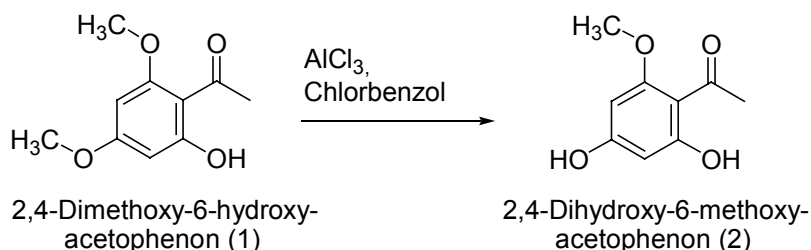
4.3.3.1.1 2,4-Dimethoxy-6-hydroxyacetophenon (1)



25 g (0,134 mol) 2,4,6-Trihydroxyacetophenon-hydrat wurden in 300 ml Aceton gelöst und mit 30 g Kaliumcarbonat versetzt. Das Gemisch wurde im Ölbad bei 65-70 °C erhitzt und portionsweise mit 3 × 5,1 ml Dimethylsulfat in 4 h-Intervallen zugesetzt (insgesamt 15,3 ml; 0,16 mol). Anschließend erfolgte eine Reaktionskontrolle mittels HPLC-DAD (HPLC 1) auf Abschluss der Reaktion. Da noch keine vollständige Umsetzung des Eduktes

erfolgt war, wurde nochmals 1 ml Dimethylsulfat zugegeben und für eine weitere Stunde erhitzt. Danach wurde das Kaliumcarbonat abfiltriert und das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Das erhaltene Rohprodukt wurde durch Säulenchromatographie (12 × 20 cm) an Kieselgel aufgereinigt. Hierzu wurde die Substanz in 50 ml Chloroform/Methanol (1/1, v/v) gelöst und auf die trocken befüllte Säule aufgebracht. Die Elution erfolgte zunächst mit Chloroform, bis die Säule vollständig befeuchtet war. Anschließend wurde mit einem Chloroform/Methanol-Gemisch (95:5, v/v) eluiert und Fraktionen von 100 ml aufgesammelt. Die Elution wurde dünnschichtchromatographisch kontrolliert (Fließmittel: Chloroform). Das nach Abziehen des Elutionsmittels erhaltene Produkt wurde mittels HPLC-DAD und ESI-MS (Loop Injektion) auf Reinheit und Identität überprüft. Die Ausbeute betrug 91%.

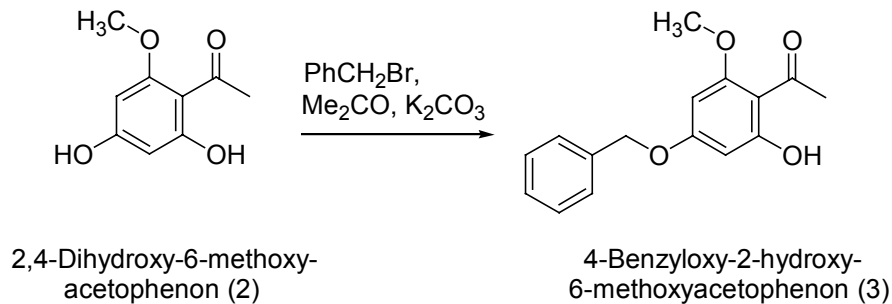
4.3.3.1.2 2,4-Dihydroxy-6-methoxyacetophenon (2)



Aliquote von jeweils 3 g (15,3 mmol) reinem 2,4-Dimethoxy-6-hydroxyacetophenon (1) wurden in je 40 ml trockenem Chlorbenzol gelöst und unter Rückfluss erhitzt. Danach wurden jeweils 3 g wasserfreies Aluminiumchlorid (22,5 mmol) vorsichtig zugegeben und genau 1 h erhitzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand mit 80 ml eiskaltem H₂O/HCl-Gemisch (1:1) versetzt. Der weiße Niederschlag wurde abfiltriert; danach erfolgte eine Reaktionskontrolle mittels HPLC-DAD. Da 2,4-Dihydroxy-6-methoxyacetophenon (2) die Hauptkomponente des weißen Niederschlags darstellte, wurde der Niederschlag in Ethylacetat gelöst, dreimal mit je 100 ml einer wässrigen 10%-iger NaOH-Lösung ausgeschüttelt und nach dem Ansäuern wieder in die organische EtOAc-Phase überführt. Die EtOAc-Phase wurde am Rotationsverdampfer bis zum Ausfallen der ersten Kristalle eingengt. Nach Kühlung über Nacht wurde das

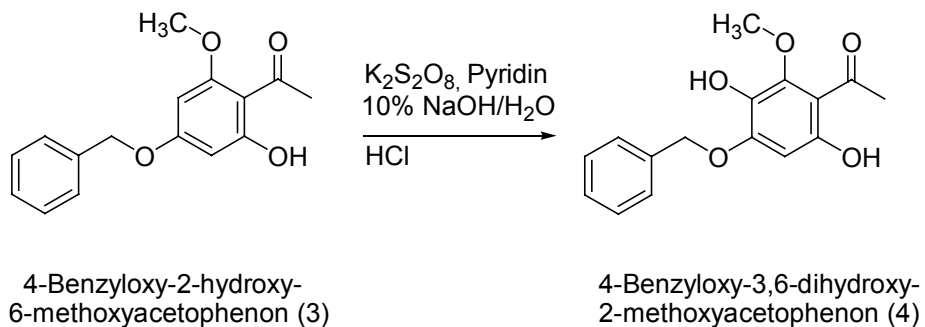
auskristallisierte Produkt abfiltriert, getrocknet und mittels HPLC-DAD und ESI-MS (Loop Injektion) auf Reinheit und Identität überprüft. Die Ausbeute betrug 28-32%.

4.3.3.1.3 4-Benzyloxy-2-hydroxy-6-methoxyacetophenon (3)



1 g (5,5 mmol) 2,4-Dihydroxy-6-methoxyacetophenon wurden in 60 ml über Molsieb gelagertem, trockenem Aceton gelöst und mit 6 g Kaliumcarbonat versetzt. Nach Zugabe von 0,85 ml Benzylbromid (7,1 mmol) wurde das Gemisch über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Nach Abfiltrieren des Kaliumcarbonats wurde das Produkt vom Lösungsmittel befreit und ohne weitere Aufreinigung direkt im nächsten Reaktionsschritt eingesetzt. Ein Aliquot wurde zuvor zur Überprüfung der Identität mittels HPLC-DAD und ESI-MS verwendet. Die Ausbeute betrug 99%.

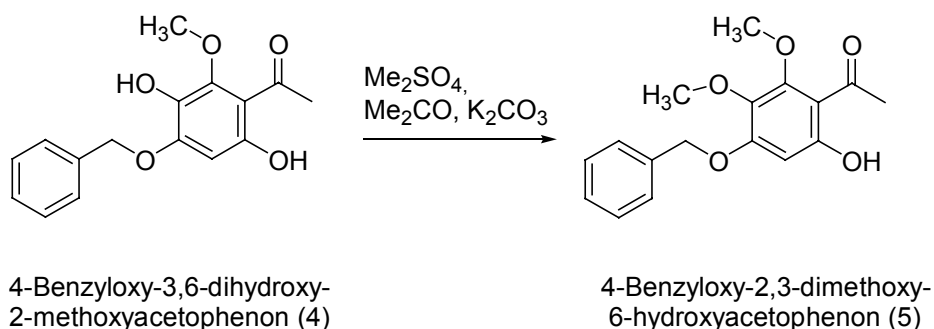
4.3.3.1.4 4-Benzyloxy-3,6-dihydroxy-2-methoxyacetophenon (4) (Elb's Persulfat-Oxidation)



1 g (3,7 mmol) 4-Benzyloxy-2-hydroxy-6-methoxyacetophenon (3) wurde zusammen mit NaOH-Plätzchen (0,74 g; 18,5 mmol) in 7,4 ml Wasser gelöst. Um die Löslichkeit des Eduktes zu verbessern wurde 1 ml Pyridin der Reaktionsmischung zugesetzt. Anschließend

wurde mittels eines Tropftrichters eine wässrige $K_2S_2O_3$ -Lösung (1,1 g in 22 ml H_2O) innerhalb von 4 h hinzugegeben und die Temperatur bei etwa 15 °C gehalten. Danach wurde das Reaktionsgemisch 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die braun gefärbte Reaktionslösung mit 1 M Salzsäure auf pH 5 angesäuert und mit Ether ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wurde durch Zugabe von 4 ml konzentrierter Salzsäure stark angesäuert und mit 30 ml Diethylether für eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Die Etherphase wurde abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das leicht braune, sirupartige Produkt wurde ohne Aufreinigung für die weitere Synthese eingesetzt. Ein Aliquot wurde zuvor zur Überprüfung der Identität mittels HPLC-DAD und ESI-MS (Loop Injektion) verwendet. Die Ausbeute betrug 25%.

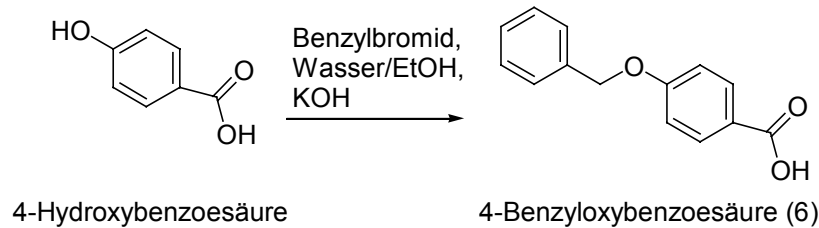
4.3.3.1.5 4-Benzyloxy-2,3-dimethoxy-6-hydroxyacetophenon (5)



1 g (3,5 mmol) 4-Benzyloxy-3,6-dihydroxy-2-methoxyacetophenon (4) wurde mit 1,5 Äquivalenten Dimethylsulfat (0,5 ml; 5,2 mmol) und 5 g Kaliumcarbonat in 50 ml über Molsieb gelagertem, trockenem Aceton über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wurde nach dem Abfiltrieren des Kaliumcarbonats am Rotationsverdampfer abgetrennt. Das erhaltene Rohprodukt wurde säulenchromatographisch ($2,8 \times 42$ cm) an Kieselgel mit Chloroform als Fließmittel aufgereinigt. Das Produkt eluierte bei einem Fließmittelvolumen von etwa 700 ml. Die Elution wurde dünnschichtchromatographisch kontrolliert (Fließmittel: Chloroform). Das nach Abziehen des Elutionsmittels erhaltene Produkt wurde mittels HPLC-DAD und ESI-MS (Loop Injektion) auf Reinheit und Identität überprüft. Die Ausbeute betrug 52%.

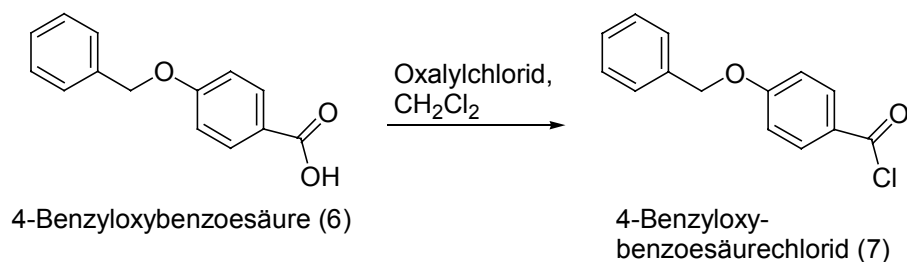
4.3.3.2 Synthese von Baustein 2

4.3.3.2.1 4-Benzyloxybenzoesäure (6)



4,14 g (30 mmol) 4-Hydroxybenzoesäure wurden in einem Wasser/Ethanol-Gemisch (10 ml/30 ml) gelöst, mit einer Lösung von 3,36 g (60 mmol) Kaliumhydroxid in 15 ml Wasser versetzt und solange unter Rückfluss gerührt, bis der Niederschlag verschwunden war. Anschließend wurden 3,9 ml (33 mmol) Benzylbromid zugegeben und die Mischung über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Zu dem gebildeten Niederschlag wurde eine Kaliumhydroxidlösung (1,85 g KOH in 15 ml Wasser) gegeben und für eine Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der gebildete Niederschlag abfiltriert. Das erhaltene Syntheseprodukt wurde danach durch Umkristallisation in Essigsäure aufgereinigt. Über HPLC-DAD und ESI-MS (Loop Injektion) erfolgte die Überprüfung auf Reinheit und Identität. Die Ausbeute betrug 44,5 %.

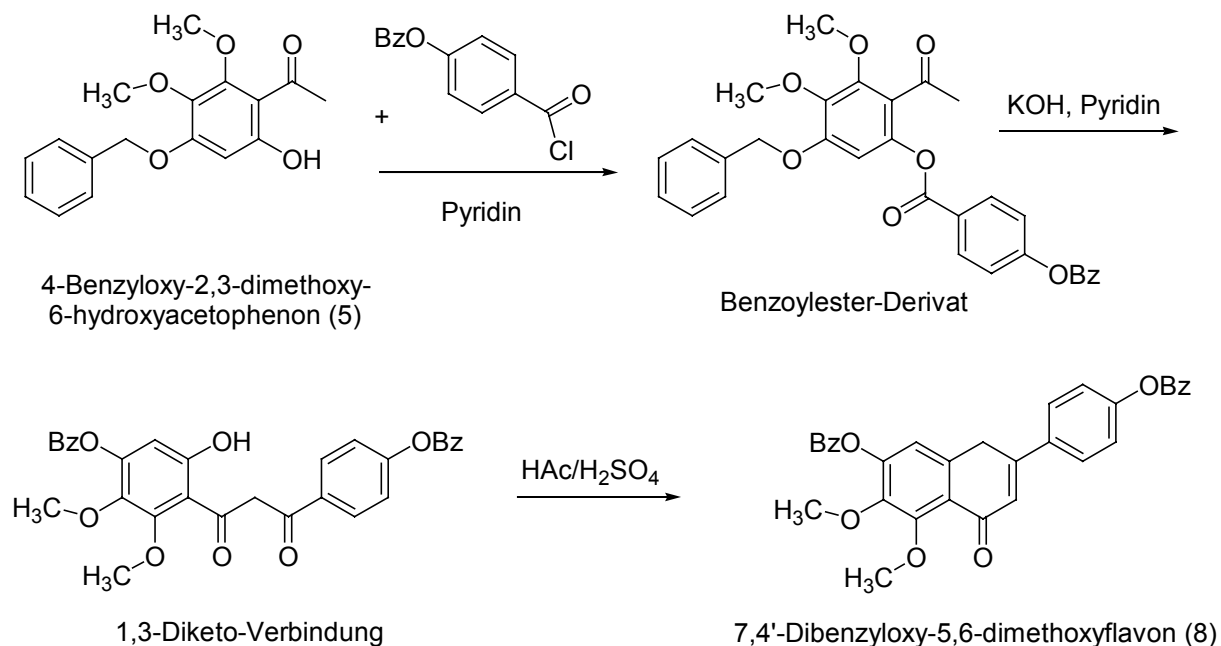
4.3.3.2.2 4-Benzyloxybenzoesäurechlorid (7)



1 g 4-Benzyloxybenzoesäure (6) wurde in 7 ml Dichlormethan suspendiert. Dann wurden vorsichtig 1,2 ml Oxalylchlorid zugegeben und unter Feuchtigkeitsausschluss (CaCl_2 -Trockenrohr) 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach beendeter Reaktion wurden überschüssiges Oxalylchlorid und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt; das Produkt wurde im evakuierten Exsikkator getrocknet. Mittels HPLC-DAD und ESI-MS (Loop

Injektion) wurde das Produkt auf Reinheit und Identität überprüft. Die Ausbeute betrug 95%.

4.3.3.3 Kondensations-, Umlagerungs- und Zyklisierungsreaktion zum Flavon



1 g (3,3 mmol) 4-Benzyloxy-2,3-dimethoxy-6-hydroxyacetophenon (Baustein 1) wurde zusammen mit 0,816 g (3,3 mmol) Benzyloxybenzoesäurechlorid (Baustein 2) in 10 ml trockenem Pyridin gelöst und bei Raumtemperatur gerührt. Die Vollständigkeit der Reaktion wurde mittels HPLC-DAD überprüft. Dies wurde nach 7 h erreicht. Danach wurde die Reaktionslösung auf 80 ml HCl/Eis-Gemisch (3%) gegeben und der gebildete Niederschlag mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Anschließend wurde die organische Phase zweimal mit je 80 ml Wasser sowie 80 ml gesättigter wässriger Na_2CO_3 -Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels wurde der so aufgereinigte Ester erneut in 3,3 ml Pyridin gelöst, mit 1,16 g frisch pulverisiertem Kaliumhydroxid versetzt und vier Stunden bei 60 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung wie oben beschrieben auf HCl/Eis-Gemisch (3%) gegossen und der gebildete Niederschlag mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde nacheinander mit 80 ml 1 M HCl und 80 ml wässriger Na_2CO_3 -Lösung gewaschen, danach wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und das gebildete Diketon in 30 ml Essigsäure gelöst. Anschließend wurden langsam 0,75 ml $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{konz.}}$ zugegeben und

4.3.4 Studien zur Interaktion von Flavonoiden mit α -Glucosidase

4.3.4.1 Bestimmung der α -Glucosidase-Aktivität im Caecum-Inhalt

Die Aktivität der α -Glucosidase wurde über die zeitabhängige Hydrolyse des nahezu farblosen *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosids (PNP-G) zu gelbem *p*-Nitrophenol (PNP), das photometrisch erfasst werden kann, bestimmt. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die Methoden von Seefelder (2002) und Sarlikiotis *et al.* (1992) mit leichten Modifikationen. Hierbei wurde aus dem Caecum-Inhalt ein Teil entnommen und mit Carbonat-Phosphat-Puffer (vgl. 4.3.1) im Verhältnis 1:10 (v/v) verdünnt, 10 Minuten homogenisiert und anschließend bei 10 000 U/min für 15 min zentrifugiert. Der Überstand diente als Enzymextrakt. Aliquote des Überstandes (5 ml) wurden in sterilen 10 ml-Kulturröhrchen, die 30 μ l einer Stammlösung von PNP-G in ausgekochtem *bideest.* Wasser (10,05 mg/ml) enthielten, gegeben und für 0, 5, 10, 15, 20, 30 und 60 min bei 37 °C inkubiert. Parallel zu diesen Ansätzen wurden auch Kontrollansätze mit PNP-G und deaktivierter Mikroflora bzw. Blindansätze mit PNP-G und Carbonat-Phosphat-Puffer angefertigt und analog behandelt. Die enzymatische Reaktion wurde durch Einfrieren der Proben beendet. Zur Quantifizierung des durch die α -Glucosidase freigesetzten PNP's wurden die Proben mit 1 N Salzsäure angesäuert und zweimal mit je 2,5 ml Diethylether ausgeschüttelt. Anschließend setzte man den vereinigten organischen Phasen 5 ml einer 0,5 N Kaliumhydroxidlösung zu und schüttelte erneut aus. Das in der wässrigen Phase enthaltene PNP wurde bei 405 nm am Photometer vermessen. Die Konzentration des PNP's wurde über eine Eichgerade mit bekannten PNP-Konzentrationen in 0,5 N KOH bestimmt. Alle Inkubationen (Haupt-, Kontroll- und Blindansätze) wurden als Zweifachbestimmungen ausgeführt.

4.3.4.2 Untersuchung zur Hemmung der α -Glucosidase durch Flavonoide

4.3.4.2.1 Untersuchungen mit PNP-G als Substrat

Die Flavonoide Scutellarein **5a**, Baicalein **9** und Luteolin **13** wurden auf ihre Fähigkeit, die Hydrolyse von PNP-G durch α -Glucosidase partiell oder gänzlich zu unterbinden, überprüft. Hierzu wurden von diesen Substanzen Stammlösungen unterschiedlicher Konzentrationen (s.u.) in Dimethylsulfoxid hergestellt, daraus jeweils 20 μ l entnommen und in

sterilen 10 ml-Kulturröhrchen eingefüllt. Hinzugefügt wurden jeweils 30 µl einer Stammlösung von PNP-G in ausgekochtem *bide*st. Wasser (10,05 mg/ml) und 5 ml des Enzymsextraktes (dessen Herstellung gemäß 4.3.4.1 erfolgte), die Röhrchen verschlossen und die Proben nach kurzem Mischen für 20 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert (Hauptansätze). Die enzymatische Reaktion wurde durch Einfrieren der Proben beendet. Das weitere Vorgehen erfolgte wie unter 4.3.4.1 beschrieben. Parallel zu diesen Proben wurden Kontrollansätze mit PNP-G und Enzymextrakt bzw. Blindansätze mit Flavonoide und Enzymextrakt angefertigt und analog behandelt. Alle Inkubationen (Haupt-, Kontroll- und Blindansätze) wurden als Zweifachbestimmungen ausgeführt. Die Konzentrationen der Flavonoidstammlösungen betragen 25, 50, 125, 175, 250 und 300 mM für **5a** und **9** bzw. 0,125, 0,3, 0,6 und 0,9 M für **13**.

Neben dieser Versuchsreihe erfolgten, in analoger Vorgehensweise, weitere Experimente wo entweder die Menge des umzusetzenden Subrates PNP-G (0,1; 0,3; 0,5; 0,7 bzw. 0,9 mM, jeweils Endkonzentration) oder die des Enzyms (durch Verdünnung des Enzymsextraktes (1:2, 1:5, 1:10 bzw. 1:20) mit Carbonat-Phosphat-Puffer) variiert wurde. Dabei betrug die Endkonzentration von **5a** bzw. **9** jeweils 500 µM und von **13** jeweils 3,4 mM. Alle Inkubationen (Haupt-, Kontroll- und Blindansätze) wurden als Zweifachbestimmungen ausgeführt.

Nach Abzug des Blindwertes – wenn nötig, d.h. wenn das Flavonoid in der jeweiligen Konzentration bei 405 nm eigene Absorption zeigt – kann die Nettoabsorption des PNP's in den Hauptansätzen bestimmt werden. Eine Hemmung der Aktivität der α -Glucosidase ist dann zu verzeichnen, wenn die Konzentration des freigesetzten *p*-Nitrophenols im Hauptversuch niedriger ist als im Kontrollversuch.

4.3.4.2.2 Untersuchungen mit Saccharose als Substrat

Die Flavonoide Scutellarein **5a** und Baicalein **9** wurden auf ihre Fähigkeit, die Hydrolyse von Saccharose durch α -Glucosidase partiell oder gänzlich zu unterbinden, überprüft. Hierzu wurden von diesen Substanzen Stammlösungen unterschiedlicher Konzentrationen (s.u.) in Dimethylsulfoxid hergestellt, daraus jeweils 20 µl entnommen und in sterilen 10 ml-Kulturröhrchen eingefüllt. Hinzugefügt wurden jeweils 20 µl einer Stammlösung von Saccharose in ausgekochtem *bide*st. Wasser (0,25 M) und 5 ml des Enzymsextraktes (dessen Herstellung gemäß 4.3.4.1 erfolgte), die Röhrchen verschlossen und die Proben nach kurzem Mischen für 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert (Hauptansätze).

Die enzymatische Reaktion wurde durch Einfrieren der Proben beendet. Zur Quantifizierung der freigesetzten Glucose wurden die aufgetauten Proben bei 10 000 U/min für 10 min zentrifugiert, der Überstand mit 0,5 N KOH auf einen pH-Wert von 7-7,5 eingestellt und gemäß 4.3.4.2.3 weiter bearbeitet. Parallel zu diesen Proben wurden Kontrollansätze mit Saccharose und Enzymextrakt bzw. Blindansätze mit Flavonoide und Enzymextrakt angefertigt und analog behandelt. Alle Versuche wurden in Zweifachbestimmungen durchgeführt. Die Konzentrationen der Flavonoidstammlösungen betragen 25, 50, 125, 175, 250 und 300 mM für **5a** bzw. **9**.

Neben dieser Versuchsreihe erfolgten, in analoger Vorgehensweise, weitere Experimente wo entweder die Menge des umzusetzenden Substrates Saccharose (0,2; 0,5; 1,5; 2 bzw. 2,5 mM, jeweils Endkonzentration) oder die des Enzyms (durch Verdünnung des Enzymextraktes (1:2, 1:5, 1:10 bzw. 1:20) mit Carbonat-Phosphat-Puffer) variiert wurde. Dabei betrug die Endkonzentration von **5a** bzw. **9** jeweils 500 μ M. Alle Inkubationen (Haupt-, Kontroll- und Blindansätze) wurden als Zweifachbestimmungen ausgeführt.

4.3.4.2.3 Bestimmung des Glucosegehaltes

Die Bestimmung der D-Glucose erfolgte mit Hilfe des UV-Saccharose/D-Glucose-Tests der Firma Boehringer nach Anleitung des Herstellers. Glucose wird durch Adenin-5'-triphosphat in Gegenwart des Enzyms Hexokinase zu Glucose-6-phosphat (G-6-P) und Adenosin-5'-diphosphat umgesetzt. G-6-P reagiert durch Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase und NADP^+ zu D-Gluconat-6-phosphat und $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der D-Glucose-Menge äquivalent und wird photometrisch bei 340 nm bestimmt.

Der Testansatz in einer Küvette bestand aus: 1,000 ml Lösung **1***, 1,900 ml *bidest.* H_2O und 0,100 ml Probe (nach 4.3.4.2.1 gewonnenem Extrakt) bzw. *bidest.* H_2O (Leerwert). Der Inhalt wurde gemischt und nach 3 Minuten E_1 (Extinktion) bei 340 nm gemessen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,020 ml Lösung **2** (eine 1,1 ml Suspension aus: Hexokinase (ca. 320 U) und Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase (ca. 160 U)) gestartet. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde E_2 bei 340 nm gemessen. Der Glucosegehalt wurde nach folgender Formel berechnet:

$$C_{[g/l]} = \frac{V \times 180,16}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta E$$

V = Testvolumen [3,02 ml]

ε = Extinktionskoeffizient von NADPH [$6,3 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$]

d = Schichtdicke [1 cm]

v = Probenvolumen [0,1 ml]

ΔE = $(E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$

*Lösung 1 wurde durch Lösen eines 7,2 g Pulvergemisches aus Triethanolamin-Puffer (pH 7,6), NADP (ca. 110 mg), ATP (ca. 260 mg) und Magnesiumsulfat in 45 ml *bidest.* H₂O hergestellt.

Zusammenfassung

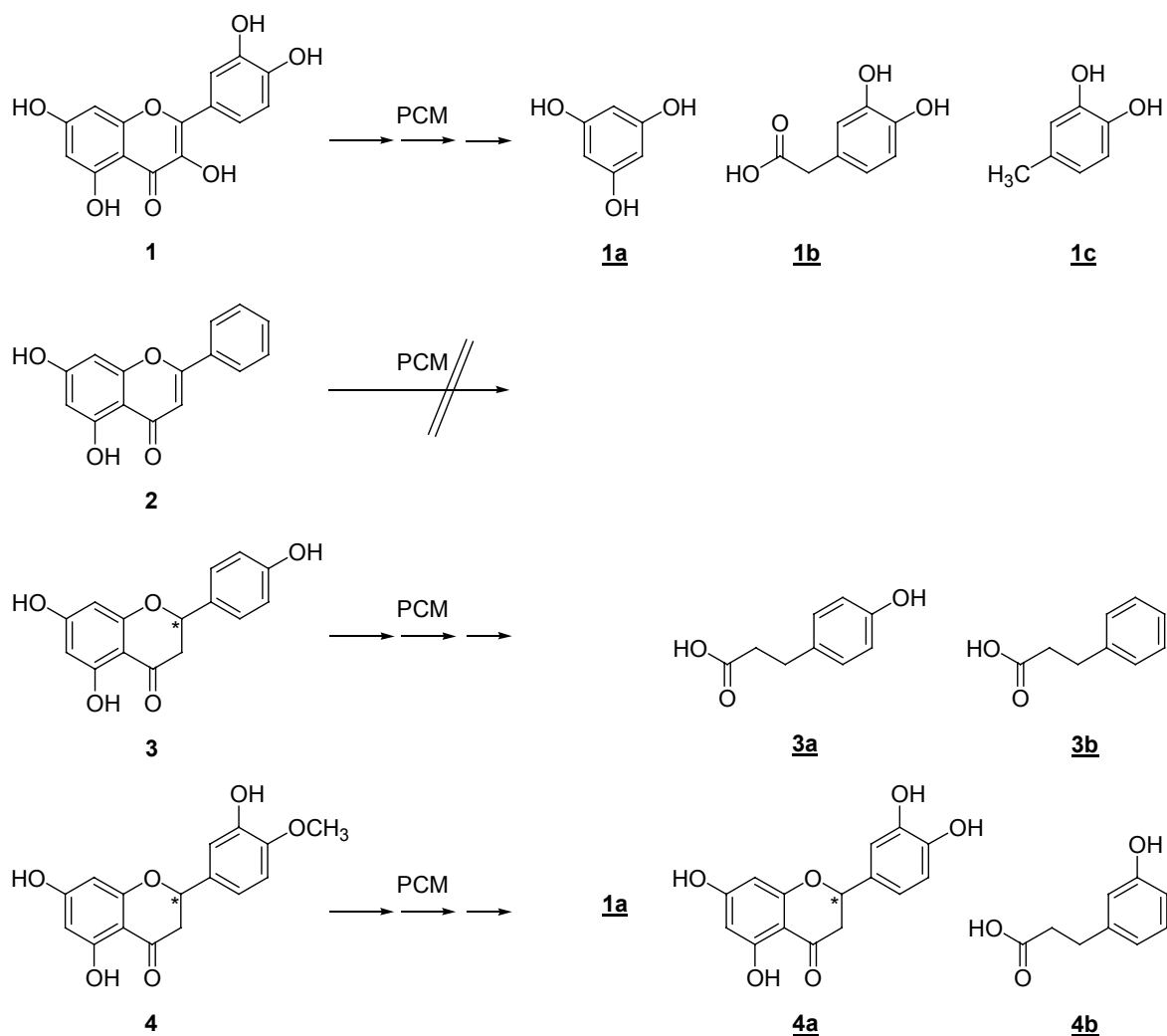
Flavonoide sind pflanzliche Polyphenole, die ubiquitär in höheren Pflanzen verbreitet und ein Bestandteil unserer täglichen Nahrung sind. Sie zeigen antioxidative und eine Reihe weiterer biologischer Aktivitäten und werden deshalb zunehmend mit der Prävention von Erkrankungen in Verbindung gebracht. Es liegen Hinweise vor, wonach ein großer Teil dieser Verbindungen nach Aufnahme mit der Nahrung unverändert den Dickdarm erreicht und dort einer intensiven mikrobiellen Verstoffwechslung unterliegt. Bakterielle Metabolite können möglicherweise andere biologische Wirkungen als ihre Vorläufer aufweisen, die sie sowohl im Darm als auch im Körper nach Absorption entfalten können. Aus diesem Grund ist es notwendig, die Produkte der mikrobiellen Flavonoid-Metabolisierung zu identifizieren und zu charakterisieren.

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, ein Modell zu etablieren, mit dessen Hilfe Interaktionen zwischen Flavonoiden und Dickdarmbakterien schnell und zuverlässig erfasst werden können, ohne hierzu aufwendige Humanstudien einzusetzen. Zu diesem Zweck wurde Schweine-Caecum eingesetzt; Mensch und Schwein weisen eine große Ähnlichkeit hinsichtlich der Anatomie und Physiologie des Gastrointestinaltraktes auf. In einer speziell entwickelten Anaerobenkammer erfolgte unter anoxischen Bedingungen die Inkubation von Modellverbindungen wie Quercetin (3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavon) **1**, ein hinsichtlich seiner Metabolisierung schon ausführlich untersuchtes Flavonol, Chrysin (5,7-Dihydroxyflavon) **2**, Naringenin (5,7,4'-Trihydroxyflavanon) **3** und Hesperetin (5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon) **4** mit dem Caecum-Inhalt. Die Identifizierung und Strukturklärung der im Zeitraum von 24 h gebildeten Metabolite erfolgte mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Diodenarray-Detektion (HPLC-DAD), HPLC-Elektrospray-Ionisierung-Tandemmassenspektrometrie (ESI-MS/MS) und Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS).

Unter den gewählten experimentellen Bedingungen wandelte die Schweine-Caecum-Mikroflora (PCM) **1** in Phloroglucin **1a**, 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure **1b** und 3,4-Dihydroxytoluol **1c** um. Das Flavon **2** wurde hingegen nicht abgebaut. Naringenin **3** wurde zu 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** und 3-Phenylpropionsäure **3b** metabolisiert; aus **4**

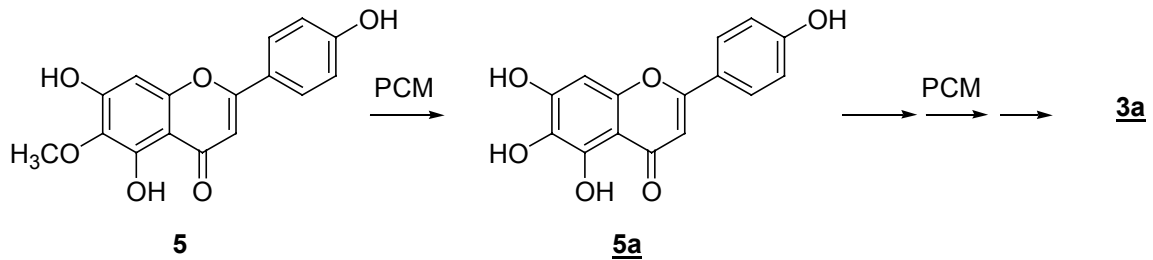
entstanden *via* Eriodictyol **4a** Phloroglucin **1a** und 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure **4b**. Der mittels HPLC-DAD-Analytik untersuchte zeitliche Verlauf des mikrobiellen Abbaus von **1**, **3** und **4** zeigte einen langsamen Abbau von Naringenin **2** im Gegensatz zur schnellen Metabolisierung von Quercetin **1** und Hesperetin **4**.

Die erhaltenen Resultate stimmten mit Literaturergebnissen sehr gut überein und belegten somit die Anwendbarkeit von Schweine-Caecum als geeignetes *ex-vivo*-Modell zur Untersuchung des intestinalen Metabolismus von Flavonoiden.

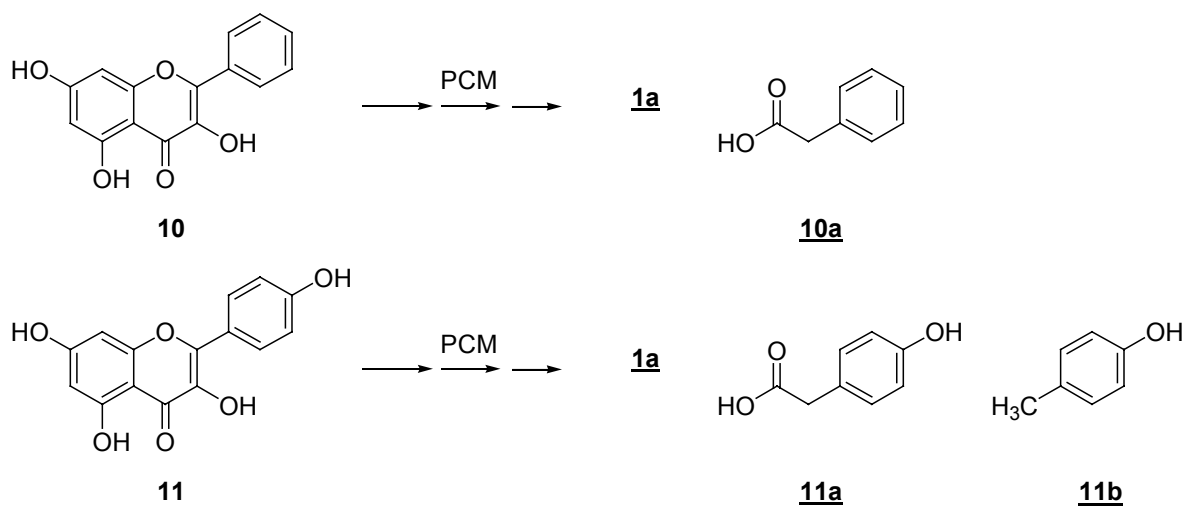


Mit dem entwickelten Modell wurde in weiteren Studien die Biotransformation ausgewählter Flavonoide im Dickdarm simuliert. Neben Ringspaltungen, Hydrolyse, Demethylierungs- und Dehydroxylierungsreaktionen entstanden bevorzugt aromatische Carbonsäuren. So wurde beispielhaft das erstmals auf seine intestinale Metabolisierung untersuchte Hispidulin (5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavon) **5** – ein hoch wirksamer Benzodiazepin-rezeptor-Ligand – durch die Schweine-Caecum-Mikroflora rasch zu Scutellarein **5a** O-de-

methyliert, welches dann langsam zu 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure **3a** weiter abgebaut wurde.



Anhand der beobachteten Abbaukinetik ergab sich der Hinweis, dass Flavonoide in Abhängigkeit von ihrem jeweiligen Substitutionsmuster unterschiedlich schnell von den Darmbakterien umgesetzt werden. Da auch Ausmaß und Geschwindigkeit des Abbaus von Flavonoiden deren Bioverfügbarkeit beeinflussen, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu überprüfen, inwieweit ein Zusammenhang zwischen Hydroxylierungsgrad des B-Ringes von Flavonoiden und deren mikrobiellen Abbaurate besteht. Hierzu wurden Flavonole, d.h. Galangin (3,5,7-Trihydroxyflavon) **10**, Kämpferol (3,5,7,4'-Tetrahydroxyflavon) **11** und erneut Quercetin **1** sowie Flavone, d.h. **2**, Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon) **12** und Luteolin (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon) **13**, die sich jeweils lediglich im Hydroxylierungsgrad des B-Ringes unterscheiden, ausgewählt und als Substrate (in jeweils gleicher Konzentration) für die Umsetzung durch Schweine-Caecum-Mikroflora gleicher Donoren eingesetzt. Der mikrobielle Abbau wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden mittels HPLC-DAD-Analysen verfolgt. Als Abbauprodukte von **10** und **11** ergaben sich:



Ein Vergleich der mikrobiellen Umsatzraten der geprüften Flavonole und Flavone ließ den Schluss zu, dass unabhängig von der Flavonoid-Unterklasse eine Hydroxylierung in Position C-4' des B-Ringes den Abbau von Flavonoiden fördert (bei den Flavonen sogar erst ermöglicht) und dass eine zusätzliche Hydroxylierung des B-Ringes keinerlei Einfluss auf den Abbau hat. Die Ergebnisse dieser Studie lassen weiterhin vermuten, dass die Hydroxylierung in Position C-3 des C-Ringes eine fördernde Rolle im Abbau von Flavonoiden durch caecale Mikroflora spielt. Die in der Abbildung aufgeführte Gegenüberstellung von je zwei Flavonolen und zwei Flavonen ist hierfür ein repräsentatives Beispiel.

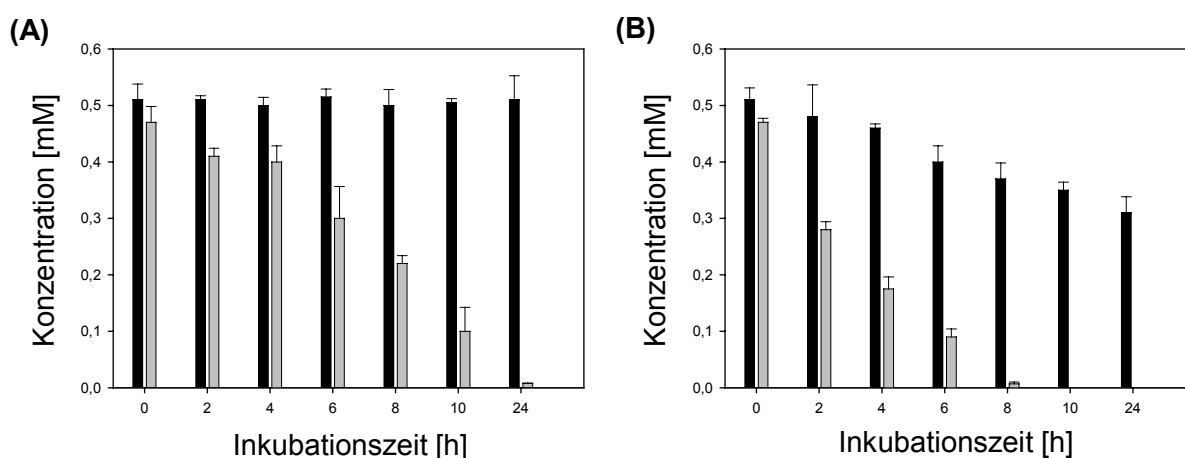
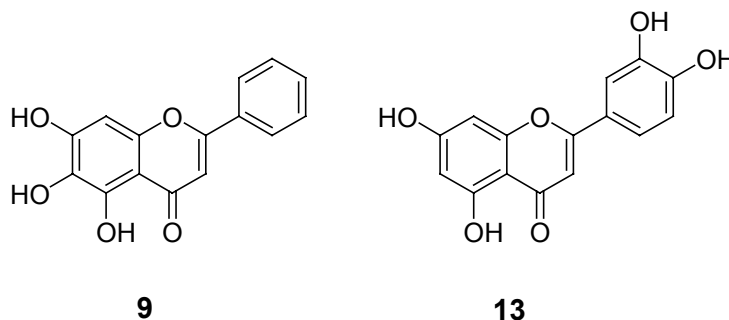


Abb.: Jeweiliger Konzentrations-Zeit-Verlauf der Flavonoide: **(A)** Chrysin **2** (schwarze Balken) und Galangin **10** (hellgraue Balken); **(B)** Apigenin **12** (schwarze Balken) und Kämpferol **11** (hellgraue Balken) nach Inkubation unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C mit caecaler Mikroflora gleicher Quelle. Angegeben sind Mittelwerte \pm SD.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten ferner Untersuchungen zur Interaktion von Flavonoiden mit α -Glucosidase aus Schweine-Caecum. Als potentielle Hemmstoffe kamen die Flavone Scutellarein **5a**, Baicalein **9** und Luteolin **13** zur Verwendung; als Substrate wurden *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid und Saccharose eingesetzt.



Für keines der eingesetzten Flavonoide war ein Einfluss auf die Aktivität der α -Glucosidase festzustellen. Diese Ergebnisse weisen auf strukturelle Unterschiede zwischen bakteriellen α -Glucosidasen und solchen aus dem Dünndarm der Säugetiere hin, bei denen für u. a. **5a** und **9** hohe α -Glucosidase-Inhibitor-Aktivität beschrieben worden ist.

Summary

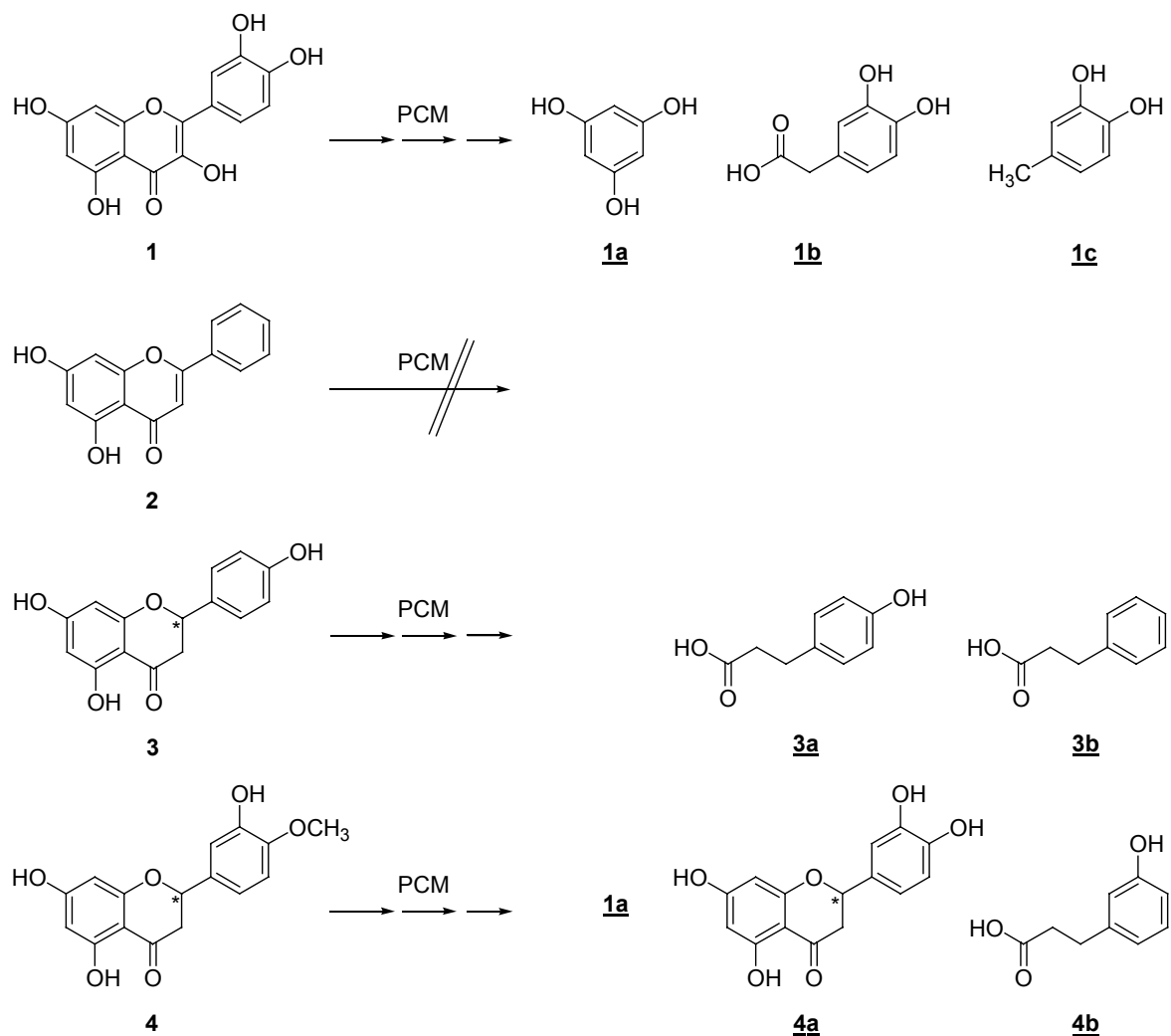
Flavonoids are polyphenols, which occur ubiquitously in higher plants and are a part of our daily diet. They show antioxidative and various other biological activities and are therefore increasingly associated with the prevention of diseases. There are indications that a large part of the ingested flavonoids reach the large intestine unchanged and there undergo an extensive microbial degradation. The bacterial metabolites formed may exhibit biological effects that differ from those of their precursors. Such effects may be triggered in the intestine as well as in the body after absorption. For this reason, it is essential to identify and characterize the products originating from the microbial metabolism of flavonoids.

Hence, the first objective of the present work was to establish a model that allows us to study the interactions between flavonoids and the large intestine bacteria rapidly and reliably without using complex human study. For this purpose the pig caecum was used; human and pig exhibit a large similarity regarding anatomy and physiology of the gastrointestinal tract. In a special developed anaerobic chamber model compounds such as quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone) **1**, a flavonol whose metabolism has already been studied thoroughly, chrysin (5,7-dihydroxyflavone) **2**, naringenin (5,7,4'-trihydroxyflavanone) **3** and hesperetin (5,7,3'-trihydroxy-4'-methoxyflavanone) **4** were incubated under anoxic conditions with the caecum contents. Identification and structural elucidation of the metabolites formed within 24 h of incubation were performed by high-performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD), HPLC-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) and high-resolution gas chromatography-mass spectrometry (HRGC-MS).

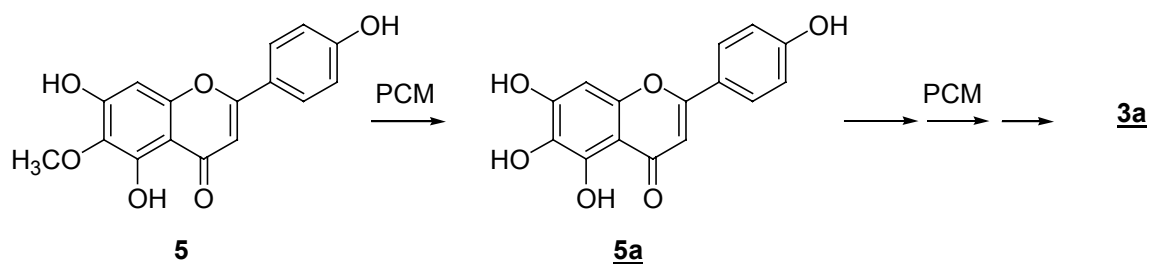
The pig caecal microflora (PCM) converted **1**, under the experimental conditions used, to phloroglucinol **1a**, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid **1b** and 3,4-dihydroxytoluene **1c**. However, the flavon **2** was not degraded. Naringenin **3** was metabolized to 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid **3a** and 3-phenylpropionic acid **3b**. Hesperetin **4** was transformed *via* eriodictyol **4a** to phloroglucinol **1a** and 3-(3-hydroxyphenyl)-propionic acid **4b**. The time course of microbial conversion of **1**, **3** and **4** was determined by HPLC-DAD-analysis, re-

vealing slow degradation of naringenin **3** and rapid transformation of quercetin **1** and hesperetin **4**.

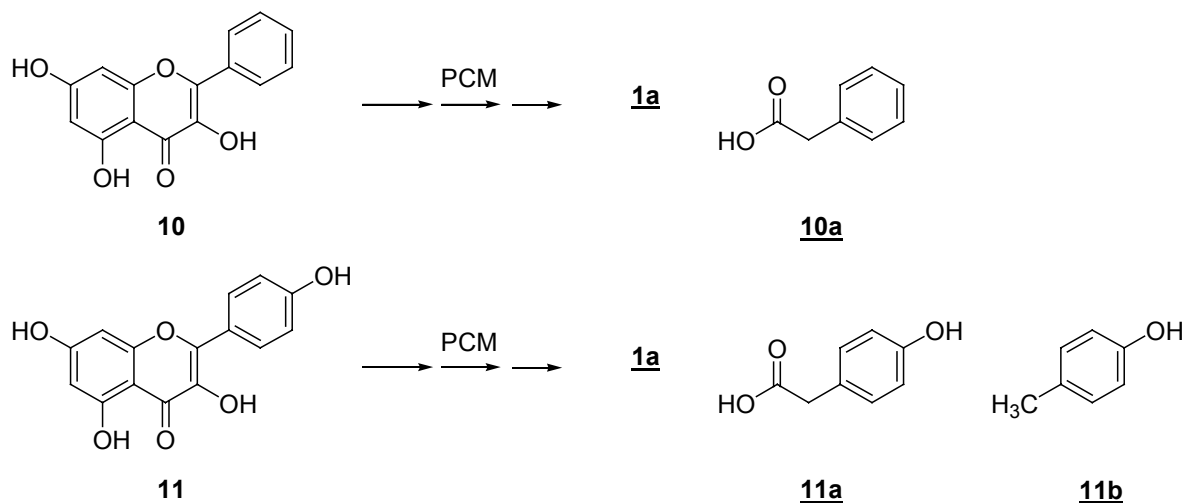
The obtained results are in full agreement with literature data and demonstrate the use of pig caecum as a suitable *ex vivo* model for studying the intestinal metabolism of flavonoids.



In further studies the developed model was used in order to simulate the biotransformation of selected flavonoids in the large intestine. Among ring fission, hydrolysis, demethylation and dehydroxylation reactions the formation of aromatic acids was preferred. For example, hispidulin (5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavone) **5** – a potent ligand of the central human benzodiazepine receptor – was rapidly O-demethylated by the caecal microflora to scutellarein **5a**. The subsequent degradation of **5a** to 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid **3a** proceeded slowly.



The observed degradation kinetics indicated that the time the gut bacteria need to metabolize the flavonoids depends on the flavonoids substitution pattern. Since extent and kinetics of degradation of flavonoids also affect the bioavailability of flavonoids, a further aim of this work was to examine to what extent a correlation between the hydroxylation grad of the B-ring of flavonoids and their microbial degradation rates exist. Therefore, selected flavonols, i.e. galangin (3,5,7-trihydroxyflavone) **10**, kaempferol (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone) **11** and quercetin **1** as well as flavones, i.e. **2**, apigenin (5,7,4'-trihydroxyflavone) **12** and luteolin (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone) **13**, which differ only in their hydroxylation patterns on the B-ring were used (in same concentration, respectively) as substrates for the fermentation by caecal microflora from the same donors, and the microbial degradations were continuously, over 24 h, analyzed by HPLC-DAD. As degradation products of **10** and **11** we detected:



Comparison of the microbial degradation rates of the flavonols and flavones under study led to the conclusion that the presence of a hydroxy group in 4'-position at the B-ring, regardless of the flavonoid subclass, enhances the degradation of flavonoids, and an additional hydroxy group at the B-ring does not affect the degradation degree of flavonoids. In addition, it can be assumed, according to the results of this study, that the presence of a

hydroxy group in 3-position at the C-ring enhances the microbial transformation of flavonoids. In the following figure the pairwise comparison of two flavonols and flavones, respectively, is a representative example for this.

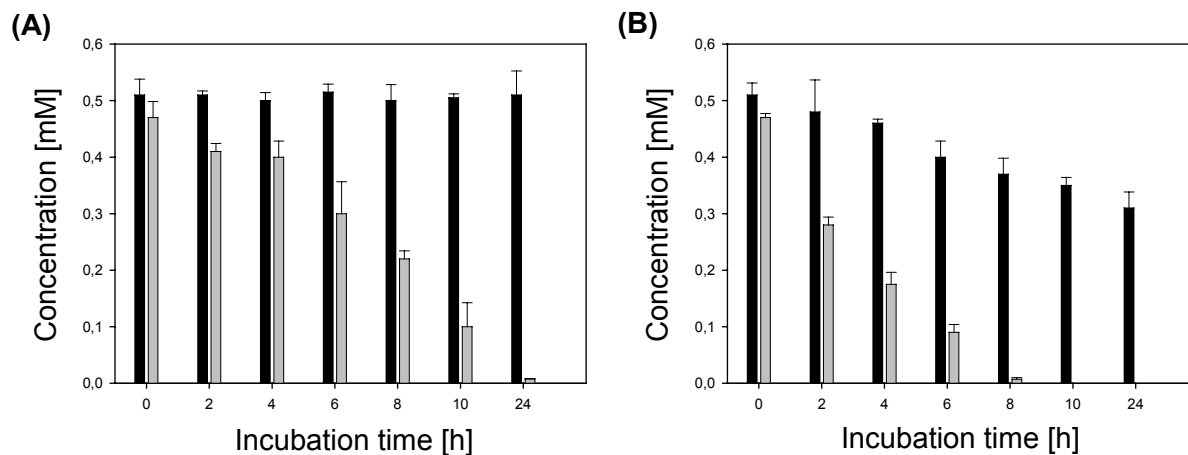
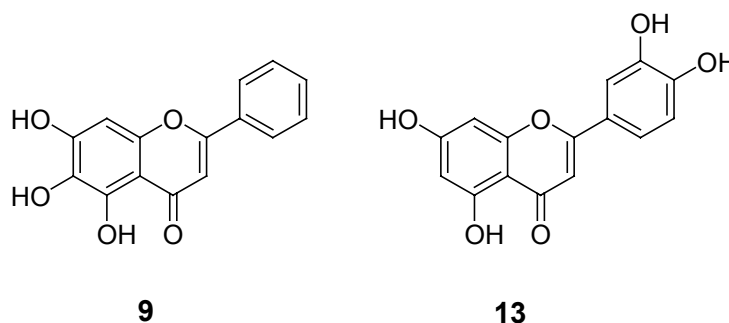


Fig.: Respective concentration time course of flavonoids: (A) chrysin **2** (black bars) and galangin **10** (light grey bars); (B) apigenin **12** (black bars) and kaempferol **11** (light grey bars) after incubation under anaerobic conditions at 37 °C with caecal microflora from the same source. Data are expressed as mean \pm SD.

Furthermore the interactions of flavonoids with α -glucosidase from the pig caecum were investigated in the context of this work. The flavones scutellarein **5a**, baicalein **9** and luteolin **13** were used as potential α -glucosidase inhibitor in these experiments. *p*-Nitrophenyl- α -D-glucoside and sucrose served as substrates.



None of the tested flavonoids showed an inhibitory activity against α -glucosidase from the pig caecum. These results indicate structural differences between bacterial α -glucosidase and mammalian intestinal α -glucosidase, as against rat intestinal α -glucosidase some flavonoids, for example **5a** and **9**, showed a potent inhibitory activity.

Literaturverzeichnis

- Abesundara, K. J. M., Matsui, T., Matsumoto, K., α -Glucosidase inhibitory activity of some Sri Lanka plant extracts, one of which, *cassia auriculata*, exerts a strong antihyperglycemic effect in rats comparable to the therapeutic drug acarbose. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2541-2545.
- Ader, P., Weßmann, A., Wolfram, S., Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Rad. Biol. Med.* **2000**, *28*, 1056-1067.
- Ader, P., Bloeck, M., Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium glucose co-transporter (SGLT1). *Cancer Lett.* **2001**, *162*, 175-180.
- Afanas'ev, I. B., Dorozhko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A., Potapovitch, A. I., Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 1763-1769.
- Agullo, G., Gamet-Payraastre, L., Fernandez, Y., Anciaux, N., Demigné, C., Rémésy, C., Comperative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adeno carcinom cell line (HT29 cells). *Cancer Lett.* **1996**, *105*, 61-70.
- Agullo, G., Gamet-Payraastre, L., Manenti, S., Viala, C., Rémésy, C., Chap, H., Payraastre, B., Relationship between flavonoid structre and inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase; a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 1649-1657.
- Aherne, A., O'Brien, N., Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition.* **2002**, *18*, 75-81.
- Allison, M. J., Robinson, I. M., Bucklin, J. A., Booth, G. D., Comparison of bacterial populations of the pig caecum and colon based upon enumeration with specific energy sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, *37*, 1142-1151.
- Almond, G. W., Research applications using pigs. *Anesthesiology Update.* **1996**, *12*, 707-716.
- Alvarado, F., Crane, R. K., Studies of the mechanism of intestinal absorption of sugars. VII. Phenylglycosides transport and its possible relationship to phloridzin inhibition of the active transport of sugars by the small intestine. *Biochem. Biophys. Acta.* **1964**, *93*, 116-135.
- Amtsberg, G., Die Darmflora des Schweines: Zusammensetzung und Wirkungsmechanismen. *Prakt. Tierarzt.* **1984**, *12*, 1097-1111.
- Arai, Y., Watanabe, S., Kimira, M., Shimoi, K., Mochizuki, R., Kinae, N., Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2243-2250.
- Ariga, T., Koshiyama, I., Fukushima, D., Antioxidative properties of procyanidins B-1 and B-3 from *Azuki Beans* in aqueous systems. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 2717-2722.

- Arts, I. C. W., van de Putte, B., Hollman, P. C. H., Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J. Agric. Food Chem.* **2000a**, *48*, 1752-1757.
- Arts, I. C., van de Putte, B., Hollman, P. C., Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric. Food Chem.* **2000b**, *48*, 1746-1751.
- Arts, M. J., Haenen, G. R., Wilms, L. C., Beetstra, S. A., Heijnen, C. G., Voss, H. P., Bast, A., Interaction between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1184-1187.
- Arts, I. C., Sesink, A. L., Faasen-Peters, M., Hollman, P. C., The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *Br. J. Nutr.* **2004**, *91*, 841-846.
- Aura, A. M., O'Leary, K. A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Puuponen-Pimiä, R., Nuutila, A. M., Oksman-Caldentey, K. M. and Poutanen, K., Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1725-1730.
- Autenrieth, I. B., Die Ökologie der humanen Darmflora: physiologische und pathophysiologische Aspekte. *J. Gastrointest. Hepatol. Erkr.* **2003**, *1*, 14-17.
- Aviram, M., Fuhrman, B., Polyphenolic flavonoids inhibit macrophagenmediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *Atherosclerosis.* **1998**, *137*, S45-S50.
- Avron, J., Monane, M., Gurwitz, J. H., Glynn, R. J., Choodnovskiy, I., Lipsitz, L. A., Reduction of bacteriuria and pyuria after ingestion of cranberry juice. *Jama.* **1994**, *271*, 751-754.
- Avula, B., Ganzera, M., Warnick, J. E., Feltenstein, M. W., Sufka, K. J., Khan, I. A., High-performance liquide chromatographic determination of xanthohumol in rat plasma, urine, and fecal samples, *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, *42*, 378-382.
- Baba, S., Furtura, T., Horie, M., Nakagawa, H., Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVI: Determination of urinary metabolites of rutin in human. *J. Pharm. Sci.* **1981**, *70*, 780-782.
- Baba, S., Furuta, T., Fujioka, M., Goromaru, Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVII: Urinary metabolites of rutin in rats and the role of intestinal microflora in the metabolism of rutin. *J. Pharm. Sci.* **1983**, *72*, 1155-1158.
- Bache, R., Pfennig, N., Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch. Microbiol.* **1981**, *130*, 255-261.
- Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R. L., Bagchi, M., Tran, M. X., Stohs, S. J., Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **1997**, *95*, 179-189.
- Bakke, O. M., Studies on the degradation of tyrosine by rat caecal contents. *Scand. J. Gastroent.* **1969**, *4*, 603-608.
- Baron, A. D., Postprandial hyperglycemia and α -glucosidase inhibitors. *Diabetes Res. Clin. Pr.* **1998**, *40*(Suppl.), S51-S55.

- Bauer, E., Williams, B. A., Bosch, M. W., Voigt, C., Mosenthin, R., Versteegen, M. W., Differences in microbial activity of digesta from three sections of the porcine large intestine according to *in vitro* fermentation of carbohydrate-rich substrates. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 2097-2104.
- Berg, A. U., Baron, D. P., Berg, P. A., Immunoenhancing properties of cyanidanol on responsiveness and function of human peripheral blood T-cells and K-cells. *Int. J. Immunopharmacol.* **1988**, *10*, 387-394.
- Berg, P. A., Daniel, P. T., Effects of flavonoid compounds on the immune response, in: Cody, V., Middleton, E., Harborne, J. B., Beretz, A. (Eds.), *Plant flavonoids in biology and medicine II: Biochemical, cellular, and medicinal properties*, Alan R. Liss, Inc., New York **1998**, pp. 157-171.
- Berhow, M. A., Vaughn, S. F., Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology, in: Dashek, W. V. (Ed.), *Principles and Practices of Plant Ecology*, CRC Press, Inc., Florida **1999**, pp. 425-438.
- Bhattacharya, S., Virani, S., Zavro, M., Haas, G. J., Inhibition of *streptococcus* Mutans and other oral *streptococci* by Hop (*Humulus Lupulus* L.) constituents. *Economic Botany.* **2003**, *57*, 118-125.
- Binder, H. J., Metha, P., Short-chain-fatty acids stimulate active sodium and chloride absorption *in vitro* in the rat distal colon. *Gastroenterology.* **1989**, *96*, 989-996.
- Birt, D. F., Hendrich, S., Wang, W., Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* **2001**, *90*, 157-177.
- Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., Kroke, A., Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen. *Z. Ernährungswiss.* **1998**, *37*, 147-163.
- Böhm, H., Das französische Paradoxon-Gesundheit durch Phenole des Weins? Teil 1: Phenolische Inhaltsstoffe des Weins. *Ernähr. Umsch.* **2000**, *47*, 44-49.
- Boersma, G. M., van der Woude, H., Bogaards, J., Boern, S., Vervoot, J., Cnubben, N. H. P., van Ierse, M. L. P. S., van Bladeren, P. J., Rietjens, I. M. C. M., Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferase. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 662-670.
- Bokkenheuser, V. D., Shackleton, C. H. L., Winter, J., Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochem. J.* **1987**, *248*, 953-956.
- Bokkenheuser, V., The friendly anaerobes. *Clin. Infect. Dis.* **1993**, *16* (Suppl 4), S427-S434.
- Bone, E., Tamm, A., Hill, M., The production of urinary phenols by gut bacteria and their possible role in the causation of large bowel cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **1976**, *29*, 1448-1454.
- Boot, A. N., Jones, F. T., DeEds, F., Metabolic fate of hesperidin, eriodictyol, homoeriodictyol, and diosmin. *J. Biol. Chem.* **1958**, *230*, 661-668.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M., Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods enzymol.* **1990**, *186*, 343-353.

- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M., Structural principles of flavonoid antioxidants, in: Csomós, G., Fehér, J. (Eds.), *Free Radicals and the Liver*, Springer Verlag, Berlin **1992**, pp. 77-95.
- Bors, W., Michel, C., Schikora, S., Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: a pulse radiolysis study. *Free Rad. Biol. Med.* **1995**, *19*, 45-52.
- Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K., Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors.* **1997**, *6*, 399-402.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., The chemistry of flavonoids, in: Rice-Evans, C. A., Packer, L. (Eds.), *Flavonoids in health and disease*, Marcel Dekker, Inc., New York **1998**, pp. 111-136.
- Boulton, D. W., Walle, U. K., Walle, T., Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: Chemical instability and metabolism. *J. Pharm. Pharmacol.* **1999**, *51*, 353-359.
- Brattig, N. W., Diao, G. J., Berg, P. A., Immunoenhancing effect of flavonoid compounds on lymphocyte proliferation and immunoglobulin synthesis. *Int. J. Immunopharmacol.* **1984**, *6*, 205-215.
- Braune, A., Gütschow, M., Engst, W., Blaut, M., Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 5558-5567.
- Bravo, L., Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional Significance. *Nutr. Rev.* **1998**, *56*, 317-333.
- Brinkworth, R. T., Stoermer, M. J., Fairlie, D. P., Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *2*, 631-637.
- Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C., Rice-Evans, C. A., Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* **1998**, *330*, 1173-1178.
- Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tgue, B. W., Peer, W. A., Taiz, L., Muday, G. K., Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 524-535.
- Brune, A., Schink, B., Pyrogallol-to-phloroglucinol conversion and other hydroxyl-transfer reactions catalyzed by cell extracts of *Pelobacter acidigallici*. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 1070-1076.
- Brune, A., Schink, B., Phloroglucinol pathway in the strictly anaerobic *Pelobacter acidigallici*: fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid. *Arch. Microbiol.* **1992**, *157*, 417-424.
- Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S., Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* **2000**, *29*, 323-333.
- Chen, Y. T., Zheng, R. L., Jia, Z. J., Ju, Y., Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free. Radic. Biol. Med.* **1990**, *9*, 19-21.
- Cheng, Z., Radominska-Pandya, A., Tephly, T. R., Cloning and expression of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A8. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *356*, 301-305.

- Cheng, Z., Radomska-Pandya, A., Tephly, T. R., Studie on the substrate specificity of human intestinal UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A8 and 1A10. *Drug Metab. Dispos.* **1999**, *27*, 1165-1170.
- Cheng, I. F., Breen, K., On the ability of four flavonoids, baicalein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals.* **2000**, *13*, 77-83.
- Chiasson, J. L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomized trial. *Lancet.* **2002**, *359*, 2072-2077.
- Choi, J. A., Kim, J. Y., Lee, J. Y., Kang, C. M., Kwon, H. J., Yoo, Y. D., et al., Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. *Int. J. Oncol.* **2001**, *19*, 837-844.
- Chopra, M., Fritzsims, P. E. E., Strain, J. J., Thurnham, D. I., Howard, A. N., Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1162-1170.
- Clary, W. P., Welch, B. L., Booth, G. D., *In vitro* digestion experiments: importance of variation between inocula donors. *J. Wildl. Mgmt.* **1988**, *52*, 358-361.
- Constatino, A., A., Mehta, R., Runyan, C., Rao, K., Vaughan, A., Moon, R., Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity-relationships. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 217-225.
- Cooper-Driver, G., Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry.* **2001**, *56*, 229-236.
- Corvazier, E., Maclouf, J., Interference of some flavonoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs with oxidative metabolism of arachidonic acid by human platelets and neutrophils. *Biochem. Biophys. Acta.* **1985**, *835*, 315-321.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., van Poel, B., Pieters, L., Vlietnick, A. J., Vanden Berghe, D., Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 71-76.
- Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C., Rémésy, C., Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am. J. Physiol.* **1999**, *277*, 120-126.
- Crespy, V., Aprikian, O., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigné, Rémésy, C., Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 3227-3220.
- Csokay, B., Prajda, N., Weber, G., Olah, E., Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci.* **1997**, *60*, 2157-2163.
- Cummings, J. H., Short chain fatty acids in the human colon. *Gut.* **1981**, *22*, 763-779.
- Cunningham, B. D. M., Threadgill, M. D., Groundwater, P. W., Dale, I. L., Hickman, J. A., Synthesis and biological evaluation of a series of flavones designed as inhibitors of protein tyrosine kinases. *Anti-Cancer Drug Des.* **1992**, *7*, 365-384.
- Curtius, H. C., Mettler, M., Studies of the intestinal tyrosine metabolism using stable isotopes and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **1976**, *126*, 569-580.

- Cushnie, T. P. T., Lamb, A. J., Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2005**, *26*, 343-356.
- Cuyckens, F., Claeys, M., Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1-15.
- Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., Ezzati, M., Causes of cancer in the world; comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet.* **2005**, *366*, 1784-1793.
- Das, N. P., Sothy, S. P., Studies on flavonoid metabolism, biliary and urinary excretion of metabolites of (+)-[U-¹⁴C]catechin. *Biochem. J.* **1971**, *125*, 417-423.
- Das, D. K., Naturally occurring flavonoids: structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterisation. In: *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc., New York **1994**, pp. 410-420.
- Da Silva, E. L., Abballa, D. S. P., Terao, J., Inhibitory effect of flavonoids on low-density lipoprotein peroxidation catalysed by mammalian 15-lipoxygenase. *Life.* **2000**, *49*, 298-295.
- Davies, H. L., Hill, J. L., The effect of diet on the metabolism of sheep of the tritiated isoflavones formononetin and biochanin A. *Aust. J. Agric. Res.* **1989**, *40*, 157-163.
- Day, A. J., DuPont, M. S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M. J. C., Morgan, M. R. A., Williamson, G., Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* **1998**, *436*, 71-75.
- Day, A. J., Canada, F. J., Diaz, J. C., Kroon, P. A., Melauchlan, R., Faulds, C. B., Plumb, G. W., Morgan, M. R. A., Williamson, G., Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 166-170.
- Day, A. J., Gee, J. M., DuPont, M. S., Johnson, I. T., Williamson, G., Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase Phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1199-1206.
- Depeint, F., Gee, J. M., Williamson, G., Johnson, I. T., Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc. Nutr. Soc.* **2002**, *61*, 97-103.
- de Rijke, Y. B., Demacker, P. N., Assen, N. A., Sloots, L. M., Katan, M. B., Stalenhoef, A. F., Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *63*, 329-334.
- DeWeerd, K. A., Saxena, A., Nagle, D. P. J., Suflita, J. M., Metabolism of the ¹⁸O-methoxy substituent of 3-methoxybenzoic acid and other unlabeled methoxybenzoic acids by anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1237-1242.
- DeWhalley, C. V., Rankin, S. M., Houlst, J. R. S., Jessup, W., Leake, D. S., Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 1743-1750.
- Dimitrakoudis, D., Vranic, M., Klip, A., Effects of hyperglycemia on glucose transporters of the muscle: use of the renal glucose reabsorption inhibitor phlorizin to control glycemia. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1992**, *3*, 1078-1091.

- Dixit, R., Gold, B., Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, *83*, 8039-8043.
- Dodds, W. J., The pig model for biomedical research. *Fed. Proc.* **1982**, *41*, 247-256.
- Donaldson, R. M., Role of indigenous enteric bacteria in intestinal function and disease, in: Heidel, W. (Ed.), *Handbook of physiology*, Washington D. C. **1968**, pp. 2807-2814.
- Donovan, J. L., Crespy, V., Manach, C., Morand, C., Besson, C., Scalbert, A., Rémésy, C., Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 1753-1757.
- Doré, J., Sghir, G., Hannequart-Gramet, G., Corthier, G., Pochart, P., Design and validation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe for specific detection and quantification of human faecal Bacteriodes population. *System. Appl. Microbiol.* **1998**, *21*, 65-71.
- Duthie, S. J., Dobson, V. L., Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack *in vitro*. *Eur. J. Nutr.* **1999**, *38*, 28-34.
- Duthie, G. G., Duthie, S. J., Kylie, J. A. M., Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr. Res. Rev.* **2000**, *13*, 79-106.
- Erlund, I., Alfthan, G., Maenpaa, J., Aro, A., Tea and coronary heart disease: the flavonoid quercetin is more bioavailable from rutin in women than in men. *Arch. Intern. Med.* **2001a**, *161*, 1919-1920.
- Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, A., Aro, A., Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit. *J. Nutr.* **2001b**, *131*, 235-241.
- Erlund, I., Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res.* **2004**, *24*, 851-874.
- Esterbauer, H., Ramos, P., Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **1996**, *127*, 31-64.
- Esterbauer, H., Schmidt, R., Hayn, M., Relationships among oxidation of low-density-lipoprotein, antioxidant protection, and atherosclerosis. *Adv. Pharmacol.* **1997**, *38*, 425-456.
- Frazer, A. C., Young, L. Y., A gram-negative anaerobic bacterium that utilizes O-methyl substituents of aromatic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, *49*, 1345-1347.
- Felgines, C., Texier, O., Morand, C., Manach, C., Scalbert, A., Régerat, F., Rémésy, C., Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2000**, *279*, G1148-G1154.
- Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M., Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.* **1997**, *416*, 123-129.
- Ferriola, P. C., Cody, V., Middleton, E., Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 1617-1624.
- Fesen, M. R., Kohn, K. W., Leteurtre, F., Pommier, Y., Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1993**, *90*, 2399-2403.

- Finegold, S. M., Sutter, V. L., Matthisen, G. E., Normal indigenous intestinal flora, in: Hentges, D. (Ed.), *Human intestinal microflora in health and disease*, Academic Press, New York **1983**, pp. 3-32.
- Finkel, T., Holbrook, N. J., Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. **2000**, *408*, 239-245.
- Fleming, S. E., Wasilewski, M. M., Using the pig as a tool for studying fermentation in the gut. *Nutr. Rep. Intern.* **1984**, *30*, 825-834.
- Formica, J. V., Regelson, W., Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxic.* **1995**, *33*, 1061-1080.
- Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E., Kinsella, J. E., Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*. **1993**, *341*, 454-457.
- Fuchs, G., Mohamed, M. E., Altenschmidt, U., Koch, J., Lack, A., Brackmann, R., Lochmeyer, C., Oswald, B., Biochemistry of anaerobic biodegradation of aromatic compounds, in: Ratledge, C. (Ed.), *Biochemistry of microbial degradation*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande **1994**, pp. 513-553.
- Fuhrman, B., Lavy, A., Aviram, M., Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *61*, 549-554.
- Fujiki, H., Horiuchi, T., Yamashita, K., Hakii, H., Suganuma, M., Nishino, H., Iwashima, A., Hirata, Y., Sugimura, T., Inhibition of tumor promotion by flavonoids, in: Cody, V., Middleton, E., Harborne, J. B. (Eds.), *Plant flavonoids in biology and medicine; biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships*. Alan R. Liss, Inc., New York **1986**, pp. 429-440.
- Gabrielska, J., Oszmianski, J., Zylka, R., Komorowska, M., Antioxidant activity of flavones from *Scutellaria baicalensis* in lecithin liposomes. *J. Biosci.* **1997**, *52*, 817-823.
- Galijatovic, A., Otake, Y., Walle, U. K., Walle, T., Extensive metabolism of the flavonoid chrysin by human Caco-2 and HepG2 cells. *Xenobiotica*. **1999**, *29*, 1241-1251.
- Galijatovic, A., Walle, U. K., Walle, T., Induction of UDP Glucuronosyl-Transferase by the flavonoids chrysin and quercetin in Caco-2 cells. *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 21-26.
- Gamet-Payrastre, L., Manenti, S., Gratacap, M. P., Tulliez, J., Chap, H., Payrastre, B., Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *Gen. Pharmacol.* **1999**, *32*, 279-286.
- Gao, H., Kawabata, J., α -Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. Part 3: synthesis and evaluation of 2,3,4-trihydroxybenzoyl-containing flavonoid analogs and 6-aminoflavones as α -glucosidase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1661-1671.
- Garcia-Closas, R., Agudo, A., Gonzalez, C. A., Riboli, E., Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Nutr. Cancer*. **1998**, *32*, 154-158.
- Gatto, M. T., Falcocchio, S., Grippa, E., Mazzanti, G., Battinelli, L., Micolosi, G., Lambusta, D., Saso, L., Antimicrobial and anti-lipase activity of Quercetin and its C-2-C-16 3-Oacyl-esters. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 269-272.

- Gedek, B. R., *Mikrobielle Leistungsförderer in der Schweinefütterung*. Verlag Niederösterreichische Landes-Landwirtschaftskammer, Wien **1987**, pp. 13-32.
- Gedek, B., Intestinalflora und Bioregulation. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **1989**, 8, 417-437.
- Gee, J. M., DuPont, M. S., Thodes, M. J. C., Johnson, I. T., Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Rad. Biol. Med.* **1998**, 25, 19-25.
- Gee, J. M., DuPont, M. S., Day, A. J., Plumb, G. W., Williamson, G., Johnson, I. T., Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with hexose transport pathway. *J. Nutr.* **2000**, 130, 2765-2771.
- Geleijnse, J. M., Launer, L. J., van der Kuip, D. A. M., Hofman, A., Witterman, J. C. M., Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study, *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, 75, 880-886.
- Genthner, B. R., Davis, C. L., Bryant, M. P., Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H₂-CO₂-utilizing species. *Appl. Environ. Microbiol.* **1981**, 42, 12-19.
- Gerhäuser, C., Flavonoide und andere pflanzliche Wirkstoffe. *Aktuel. Ernaehr. Med.* **2001**, 26, 137-143.
- Gerhäuser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Elden, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H. - R., Frank, N., Bartsch, H., Becker, H., Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, 1, 959-969.
- Gerhäuser, C., Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of the hop constituents and xanthohumol metabolites. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, 49, 827-832.
- Gil, B., Sanz, M. J., Terencio, M. C., Ferrandiz, M. L., Bustos, G., Paya, M., Gunasegaran, R., Alcaraz, M. J., Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A₂ and inflammatory responses in mice. *Life Sci.* **1994**, 54, 333-338.
- Goldbohm, R. A., van den Brandt, P. A., Hertorg, M. G. L., Brants, H. A. M., van Poppel, G., Flavonoid intake and risk of cancer: a prospective cohort study. *Am. J. Epidemiol.* **1995**, 141, 61.
- Gonthier, M.-P., Rios, L. Y., Verny, M.-A., Révész, C., Scalbert, A., Novel liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry method for the quantification in human urine of microbial aromatic acid metabolites derived from dietary polyphenols. *J. Chromatogr. B.* **2003**, 789, 247-255.
- Graefe, E. U., Relative systemische Verfügbarkeit und Pharmakokinetik von Quercetin und Quercetinglykosiden (Quercetin-4'-O-glucosid und Quercetin-3-O-rhamnoglucosid) im Menschen. *Dissertation*, Universität Würzburg **2000**.
- Greenblatt, D. J., Shader, R. I., Abernethy, D. R., Current status of benzodiazepines. *N. Engl. J. Med.* **1983**, 309, 354-358.
- Griffiths, L. A., Identification on flavonoid metabolism, identification of the metabolites of (+)-Catechin in rat urine. *Biochem. J.* **1964**, 92, 173-179.
- Griffiths, L. A., Barrow, A., Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem. J.* **1972**, 130, 1161-1162.

- Griffiths, L. A., Smith, G. E., Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. Metabolite formation *in vivo* and by the intestinal microflora *in vitro*. *Biochem. J.* **1972**, *128*, 901-911.
- Grimmer, H. R., Parbhoo, V., McGrath, M., Antimutagenicity of polyphenol-rich fractions from sorghum bicolor grain. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, *59*, 251-256.
- Gross, M., Pfeiffer, M., Martini, M., Campbell, D., Salvini, J., Potter, J., The quantification of metabolites of quercetin flavonols in human urine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1996**, *5*, 711-720.
- Gryglewski, R. J., Korbut, R., Robak, J., Swies, J., On the mechanism of anti-thrombotic action of flavonoids. *Biochim. Pharmacol.* **1987**, *36*, 317-322.
- Gugler, R., Leschik, M., Dengler, H. J., Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1975**, *9*, 229-234.
- Haddock, J. D., Ferry, J. G., Purification and properties of phloroglucinol reductase from *Eubacterium oxidoreducens* G-41. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 4423-4427.
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., Riechel, T. L., High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1887-1892.
- Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkänen, H. M., Törrönen, A. R., Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2274-2279.
- Halliwell, B., Antioxidans in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* **1996**, *16*, 33-50.
- Halliwell, B., Antioxidants: the basics-what they are and how to evaluate them, in: Sies, H. (Ed.), *Antioxidants in disease mechanisms and therapy*, Academic Press, San Diego **1997**, pp. 3-20.
- Hanske, L., Hussong, R., Frank, N., Gerhäuser, C., Blaut, M., Braune, A., Xanthohumol does not affect the composition of rat intestinal microbiota. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 868-873.
- Harborne, J. B., in: Goodwin, T. W. (Ed.), *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, Academic Press, London **1976**, pp. 736-779.
- Harborne, J. B. (Ed.), *The flavonoids: Advances in research since 1986*, Chapman & Hall, London **1994**.
- Harborne, J. B., Williams, C. A., Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry.* **2000**, *55*, 481-505.
- Hattori, M., Shu, Y. Z., El-Sedawy, A. I., Namba, T., *et al.*, Metabolism of homoorientin by human intestinal bacteria. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 874-878.
- Heider, J., Fuchs, G., Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 577-596.
- Heilmann, J., Merfort, I., Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden: I. Resorption und Metabolismus von Flavonolen. *Pharm. unserer Zeit.* **1998a**, *27*, 58-65.

- Heilmann, J., Merfort, I., Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden: II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. *Pharm. unserer Zeit*. **1998b**, 27, 173-183.
- Heller, W., Forkaman, G., Biosynthesis of flavonoids, in: Harborne, J. B. (Ed.), *The flavonoids: Advances in research since 1986*, Chapman & Hall, London **1994**. pp. 499-535.
- Herrmann, K., On the occurrence of flavonol and flavone glycoside in vegetables. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1988**, 186, 1-5.
- Herrmann, K., Vorkommen und Gehalte der Flavonoide in Obst. *Erwerbstobstbau*. **1990**, 32, 31-37.
- Herrmann, K., In pflanzlichen Lebensmitteln vorkommende Flavonoide als Antioxidantien. *Gordian*. **1993**, 93, 108-111.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P.C. H., Katan, M. B., Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food. Chem.* **1992**, 40, 2379-2383.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., van de Putte, B., Flavonol and Flavone content of beverages. *J. Agric. Food Chem.* **1993a**, 41, 1242-1246.
- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D., Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr. Cancer*. **1993b**, 20, 21-29.
- Hertog M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D., Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. **1993c**, 342, 1007-1011.
- Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D., Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr. Cancer*. **1994**, 22, 175-184.
- Hertog, M. G. L., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B. S., Toschima, H., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D., Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.* **1995**, 155, 381-386.
- Heseker, H., Antioxidative Vitamine und Katarakte im Alter. *Z. Ernährungswiss.* **1995**, 34, 167-176.
- Hirano, S., Masuda, N., Oda, H., Imamura, T., Transformation of bile acids by mixed microbial cultures from human feces and bile acid transforming activities of isolated bacterial strains. *Microbiol. Immunol.* **1981**, 25, 271-282.
- Hirano, T., Gotoh, M., Oka, K., Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Sci.* **1994**, 55, 1061-1069.
- Hirano, T., Abe, K., Gotoh, M., Oka, K., Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Br. J. Cancer*. **1995**, 72, 1380-1388.

- Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., Kondo, K., Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2001**, *47*, 357-362.
- Hirvonen, T., Pietinen, P., Virtanen, M., Ovaskainen, M. L., Häkkinen, S., Albanes, D., Virtamo, J., Intake of flavonols and flavones and risk of coronary heart disease in male smokers, *Epidemiology.* **2001**, *12*, 62-67.
- Hollman, P. C. H., de Vries, J. H. M., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J. B., Katan, M. B., Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 1276-1282.
- Hollman, P. C. H., Katan, M. B., Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. Pharmacother.* **1997**, *51*, 305-310.
- Hollman, P. C. H., van Trijp, J. M. P., Buysman, M. N. C. P., van der Gaag, M. S., Mengelers, M. J. B., de Vries, J. H. M., Katan, M. B., Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.* **1997**, *418*, 152-156.
- Hollman, P. C. H., Katan, M. B., Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids, in: Rice-Evans, C., Packer, L. (Eds.), *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel Dekker, Inc., New York **1998**, pp 483-522.
- Hollman, P. C. H., Katan, M. B., Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem. Toxicol.* **1999**, *37*, 937-942.
- Hollman, P. C. H., Bijlsman, M. N., van Gameren, Y., Cnossen, E. P., de Vries, J. H., Katan, M. B., The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Rad. Res.* **1999**, *31*, 569-573.
- Hollman, P. C. H., Arts, I. C. W., Flavonols, flavones and flavanols nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1081-1093.
- Hongu, M., Tanaka, T., Funami, N., Saito, K., Arakawa, K., Matsumoto, M., Tsujihara, K., Na(+)-glucose cotransporter inhibitors as antidiabetic agents. II. Synthesis and structure-activity relationships of 4'-dehydroxyphlorizin derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo). **1998**, *46*, 22-33.
- Honohan, T., Hale, R. L., Brown, J. P., Wingard, R. E., Synthesis and metabolic fate of hesperetin-3-¹⁴C. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, *24*, 906-911.
- Howell, A. B., Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2002**, *42*, 273-278.
- Hu, C. Q., Chen, K., Shi, Q., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y. C., Lee, K. H., Anti-Aids agents, 10. Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 42-51.
- Hui, K. M., Wang, X. H., Xue, H., Interaction of flavones from the roots of *Scutellaria baicalensis* with the benzodiazepine site. *Planta med.* **2000**, *66*, 91-93.
- Hur, H. G., Rafii, F., Biotransformation of the isoflavonoids biochanin A, formononetin, and glycitein by *Eubacterium limosum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *192*, 21-25.

- Ikemoto, S., Sugimura, K., Yoshida, N., Yasumoto, R., Wada, S., Yamamoto, K., Kishimoto, T., Antitumor effects of *Scutellariae Radix* and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines. *Urology*. **2000**, *55*, 951-955.
- Ioku, K., Pongpiriyadacha, Y., Takei, Y., Nakatani, N., Terao, J., β -Glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 1428-1431.
- Izumi, T., Piskula, M. K., Osawa, S., Obata, A., Tobe, K., Saito, M., Kataoka, S., Kubota, Y., Kikuchi, M., Soy isoflavone aglycone are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1695-1699.
- Jacobasch, G., Schmiedl, D., Schmehl, K., Darmkrebsprävention durch resistente Stärke?. *Ernährungsumschau*. **1997**, *44*, 369-373.
- Jacobasch, G., Florian, S., Pforte, H., Hempel, J., Schmehl, K., Schmiedl, D., Inhibition of hereditary intestinal carcinoma development by flavonoids, in: Johnson, I. T., Fenwick, G. R. (Eds.), *Dietary Anticarcinogens and antimutagens. Chemical and biological aspects*, Royal Soc. Chem., Cambridg **2000**, pp. 312-323.
- Jenkins, D. J. A., Taylor, R. H., Goff, D. D., Fielden, H., Misiewicz, J. J., Sarson, D. L., Bloom, S. R., Alberti, M. M., Scope and specificity of acarbose in slowing carbohydrate absorption in man. *Diabetes*. **1981**, *30*, 951-954.
- Ji, L. L., Leichtweis, S., Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *Age*. **1997**, *20*, 91-106.
- Justesen, U., Arrigoni, E., Larsen, B. R., Amado, R., Degradation of flavonoid glycosides and aglycones during *in vitro* fermentation with human faecal flora. *Lebensm. -Wiss. u. Technol.* **2000**, *33*, 424-430.
- Kanazawa, K., Yamashita, T., Ashida, H., Danno, G., Antimutagenicity of flavones and flavonols to heterocyclic amines by specific and strong inhibition of the cytochrome P450 1A family. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 970-977.
- Kandaswami, C., Middleton, E., Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1994**, *366*, 351-376.
- Kaufmann, F., Wohlfarth, G., Diekert, G., O-Demethylase from *Acetobacterium dehalogenans*. Cloning, sequencing, and active expression of the gene encoding the corrinoid protein. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *275*, 515-521.
- Kaul, T. M., Middleton, E., Ogra, P. L., Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol.* **1985**, *15*, 71-79.
- Kavvadias, D., Sand, P., Youdim, K. A., Qaiser, M. Z., Rice-Evans, C., Baur, R., Sigel, E., Rausch, W. D., Riederer, P., Schreier, P., The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. *Brit. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 811-820.
- Kawabata, J., Mizuhata, K., Sato, E., Nishioka, T., Aoyama, Y., Takanori, K., 6-Hydroxy-flavonoids as α -glucosidase inhibitors from majoram (*Origanum majorana*) leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 445-447.
- Kawasaki, M., Toyoda, M., Teshima, R., Sawada, J., Hayashi, T., Arisawa, M., Shimizu, M., Morita, N., Inoue, S., Saito, Y., *In vitro* antiallergic activity of flavonoids in histamine

- release assay using rat basophilic leukemia (RB-2H3) cells. *Jpn. J. Food Hyg. Sci.* **1994**, *35*, 497-503.
- Kellett, G. L., Helliwell, P. A., The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem. J.* **2000**, *350*, 155-162.
- Khanna, P., Rajkumar, B., Jothikumar, N., Anoxygenic degradation of aromatic substances by *Rhodospseudomonas palustris*. *Curr. Microbiol.* **1992**, *25*, 63-67.
- Kim, D. H., Jung, E. A., Sohng, I. S., Han, J. A., Kim, T. H., Han, M. J., Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch. Pharm. Res.* **1998**, *21*, 17-23.
- Kim, D. H., Kim, S. Y., Park, S. Y., Han, M. J., Metabolism of quercetin by human intestinal bacteria and its relation to some biological activities. *Biol. Pharm. Bull.* **1999**, *22*, 749-751.
- Kimura, Y., Matsushita, N., Okuda, H., Effects of baicalein isolated from *Scutellaria baicalensis* on interleukin 1 β - and tumor necrosis factor α -induced adhesion molecule expression in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *57*, 63-67.
- Klatt, P., Esterbauer, H., Oxidative hypothesis of atherogenesis. *J. Cardiovasc. Risk.* **1996**, *3*, 346-351.
- Kluge, C., Tschech, A., Fuchs, G., Anaerobic metabolism of resorcylic acids (*m*-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and in a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* **1990**, *155*, 68-74.
- Kneer, R., Poulev, A. A., Olesinski, A., Raskin, I., Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genestein from roots of *Lupinus luteus* L. *J. Exp. Botany.* **1999**, *50*, 1553-1559.
- Knekt, P., Järvinen, R., Reunanen, A., Maatela, J., Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ.* **1996**, *312*, 478-481.
- Knekt, P., Järvinen, R., Seppänen, R., Heliövaara, M., Teppo, L., Pukkala, E., Aromaa, A., Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am. J. Epidemiol.* **1997**, *146*, 223-230.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A., Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 560-568.
- Kohen, R., Nyska, A., Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* **2002**, *30*, 620-650.
- Kondo, N., Kawashima, M., Enhancement of tolerance to oxidative stress in cucumber (*Curcumis sativus* L.) seedlings by UV-B irradiation: possible involvement of phenolic compounds and antioxidative enzymes. *J. Plant Res.* **2000**, *113*, 311-317.
- Kozluca, O., Olcay, E., Sueruecue, S., Gueran, Z., Kulaksiz, T., Ueskent, N., Prevention of doxorubicin induced cardiotoxicity by catechin. *Cancer Lett.* **1996**, *99*, 1-6.
- Kreft, J. U., Schink, B., O-Demethylation by the homoacetogenic anaerobe *Holophaga foetida* studied by a new photometric methylation assay using electrochemically produced cob(I)alamin. *Eur. J. Biochem.* **1994**, *226*, 945-951.

- Krishnaiah, Y. S. R., Seetha, D. A., Nageswara, R. L., Bhaskar, R. P. R., Karthikeyan, R. S., Satyanarayana, V., Guar gum as a carrier for colon specific delivery; influence of metronidazole and tinidazole on *in vitro* release of albendazole from guar gum matrix tablets. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2001**, *4*, 235-243.
- Krüger, M., Schrödl, W., Zur Bedeutung der Magen-Darm-Flora bei landwirtschaftlichen Nutztieren, ihre Regulation und Möglichkeiten der Beeinflussung. *Tierärztl. Umschau.* **2004**, *59*, 41-46.
- Krumholz, L. R., Bryant, M. P., *Eubacterium oxidoreducens* sp. Nov. requiring H₂ or formate to degrade gallate, pyrogallol, phloroglucinol and quercetin. *Arch. Microbiol.* **1986**, *144*, 8-14.
- Kühn, h., Römisch, I., Belkner, J., The role of lipoxygenase isoforms in atherogenesis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 1014-1029.
- Kühnau, J., The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* **1976**, *24*, 117-191.
- Kuhnle, G., Spencer, J. P. E., Schroeter, H., Shenoy, B., Debnam, E. S., Srai, S. K. S., Rice-Evans, C., Hahn, U., Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochem. Biophysic. Res. Com.* **2000**, *277*, 507-512.
- Kuhn, M. A., Oxygen free radicals and antioxidants. *Am J. Nurs.* **2003**, *103*, 58-62.
- Landolfi, R., Mower, R. L., Steiner, M., Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoide. Structure-activity relations. *Biochem. Pharmacol.* **1984**, *33*, 1525-1530.
- Langseth, L., Oxidants, antioxidants and disease prevention, ILSI Press, Brüssel **1995**.
- Lanza, F., Beretz, A., Stierlé, A., Corre, G., Cazenave, J., Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors prevent aggregation of human platelets by raising cyclic AMP and reducing cytoplasmic free calcium mobilization. *Thromb. Res.* **1987**, *45*, 477-484.
- Larson, R. A., The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry.* **1988**, *27*, 969-978.
- Laube, B., Wiebel, F. J., Schwarz, L. R., Ladstetter, B. J., Neues *in-vitro*-Verfahren - Untersuchungen zum enterohepatischen Metabolismus von Fremdstoffen. *BIOforum.* **2001**, *9*, 596-600.
- Lebet, V., Arrigoni, E., Amado, R., Measurement of fermentation products and substrate disappearance during incubation of dietary fibre sources with human faecal flora. *Lebensm.-Wiss. u. Technol.* **1998**, *31*, 473-479.
- Le Marchand, L., Murphy, S. P., Hankin, J. H., Wilkens, L. R., Kolonel, L. N., Intake of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 154-160.
- Lesser, S., Cermak, R., Wolffram, S., Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 1508-1511.
- Li, C., Lee, M. -J., Sheng, S., Meng, X., Prabhu, S., Winnik, B., Huang, B., Yan, S., Ho, C. -T., Yang, C. S., Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 177-184.

- Li, Y., Meselhy, M. R., Wang, L. -Q., Ma, C. -M., Nakamura, N., Hattori, M., Biotransformation of a C-glycosylflavone, abrusin 2"-O-β-D-apioside, by human intestinal bacteria. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 1239-1241.
- Li, Y., Hu, M., Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perfused rat intestinal model. *DMD.* **2002**, *30*, 370-377.
- Liggins, J., Bluck L. J., Runswick, S., Atkinson, C., Coward, W. A., Bingham, S. A., Daidzein and genistein contents of vegetables. *Br. J. Nutr.* **2000**, *84*, 717-725.
- Lin, J. K., Chen, Y. C., Huang, Y. T., Lin-Shiau, S. Y., Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanism of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **1997**, *28-29*:39-48.
- Lin, Y. -T., Hsiu, S. -L., Hou, Y. -C., Chen, H. -Y., Chao, P. -D. L., Degradation of flavonoid aglycones by rabbit, rat and human fecal flora. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 741-751.
- Linseisen, J., Radtke, J., Wolfram, G., Flavonoidzufuhr Erwachsener in einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrstudie. *Z. Ernährungswiss.* **1997**, *36*, 403-412.
- Liu, Y., Dai, Y., Xun, L., Hu, M., Enteric disposition and recycling of flavonoids and ginkgo flavonoids. *J. Altern. Complement. Med.* **2003**, *9*, 631-640.
- Manach, C., Morand, C., Texier, O., Favier, M. L., Agullo, G., Demigné, C., Régéat, F., Rémésy, C., Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 1911-1922.
- Manach, C., Morand, C., Demigné, C., Texier, O., Régéat, F., Rémésy, C., Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS. Lett.* **1997**, *409*, 12-16.
- Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigné, C., Texier, O., Régéat, F., Rémésy, C., Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett.* **1998**, *426*, 331-336.
- 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., Rémésy, C., Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in human. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81(suppl.)*, 230S-242S.
- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Wolfman, C., Waterman, P. G., Medina J. H., Paladini A. C., 6, 3'-Dinitroflavone, a novel high affinity ligand for the benzodiazepine receptors with potent anxiolytic properties. *Bioorganic. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2717-2720.
- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Wolfman, C., Waterman, P. G., Cassels, B. K., Medina J. H., Paladini A. C., 6-Bromoflavone, a high affinity ligand for the central benzodiazepine receptors is a member of a family of active flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1996**, *223*, 384-389.
- Markham, K. R., Tanner, G. J., Caasi-Lit, M., Whitecross, M. I., Nayudu, M., Mitchell, K. A., Possible protective role for 3', 4'-dihydroxyflavones induced by enhanced UV-B in a tolerant rice cultivar. *Phytochemistry.* **1998**, *49*, 1913-1919.

- Markovits, J., Linassier, C., Fosse, P., Couprie, J., Pierre, J., Jacquemin-Sablon, A., Saucier, J. -M., le Pecq, J. -B., Larsen, A. K., Inhibitory effects of the tyrosine kinase inhibitor genistein on mammalian DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 5111-5117.
- Marteau, P., Pochart, P., Doré, J., Béra-Maillet, C., Bernalier, A., Corthier, G., Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 4939-4942.
- Martin, J. R., Haefely, W. E., Drugs used for the treatment of anxiety and sleep disorders, in: Munson, P. L. (Ed.), *Principles of pharmacology*, Chapman & Hall, New York **1995**, pp. 243-278.
- Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., Matsumoto, K., α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. α -Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1952-1956.
- Matsui, T., Kobayashi, M., Hayashida, S., Matsumoto, K., Luteolin, a flavone, does not suppress postprandial glucose absorption through an inhibition of α -glucosidase action. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 689-692.
- Mazur, W. M., Duke, J. A., Wähälä, K., Rasku, S., Adlercreutz, H., Isoflavonoids and lignans in legumes: nutritional and health aspects in the human. *J. Nutr. Biochem.* **1998**, *9*, 193-200.
- McAnlis, G. T., McEnemy, J., Pearce, J., Young, I. S., Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions in man. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1999**, *53*, 92-96.
- McBurney, M. I., Thompson, L. U., Effect of human faecal donors on *in vitro* fermentation variables. *Scand. J. Gastroenterol.* **1989**, *24*, 359-367.
- McDonald, I. A., Bussard, R. G., Hutchison, D. M., Holdeman, L. V., Rutin induced β -glucosidase activity in *Streptococcus faecium* VGH-1 and *Streptococcus* sp. Strain FRP-17 isolated from human feces: Formation of the mutagen, quercetin, from rutin. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *47*, 350-355.
- Medina, J. H., Paladini, A. C., Wolfman, C., Levi de Stein, M., Calvo, D., Diaz, L. E., Pena, C., Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anitconvulsant properties. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 2227-2231.
- Meselhy, M. R., Nakamura, N., Hattori, M., Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 888-893.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 1167-1179.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C., The effect of plant flavonoids on mammalian cells: implication for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 673-651.
- Miller, E. R., Ullrey, D. E., The pig as a model for human nutrition. *Ann. Rev. Nutr.* **1987**, *7*, 361-382.
- Mira, M. L., Fernandez, M. T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M. H., Jennings, K. R., Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Rad. Res.* **2002**, *36*, 1199-1208.

- Mitzuma, T., Ohta, K., Awazu, S., the β -anomeric and glucose preferences of glucose transport carrier for intestinal active absorption of monosaccharide conjugates. *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, *1200*, 117-122.
- Mitzobuchi, S., Sato, Y., A new flavanone with antifungal activity isolated from hops. *Agric. Biol. Chem.* **1984**, *48*, 2771-2775.
- Miura, Y., Chiba, T., Miura, S., Tomita, I., Umegaki, K., Ikeda, M., Tomita, T., Green tea polyphenols (flavan-3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoprotein: an *ex vivo* study in human. *J. Nutr. Biochem.* **2000**, *11*, 216-222.
- Miyaka, Y., Yamamoto, K., Osawa, T., Metabolism of antioxidant in lemon fruit (*Citrus limon* Burm.f.) by human intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3738-3742.
- Monge, P., Solheim, E., Scheline, R. R., Dihydrochalcone metabolism in the rat: phloretin. *Xenobiotica.* **1984**, *14*, 917-924.
- Moore, W. E. C., Holdeman, L. V., Human fecal flora: The normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.* **1974**, *27*, 961-979.
- Moore, W. E. C., Moore, L. V. H., Cato, E. P., Wilkins, T. D., Kornegay, E. T., Effect of high-fiber and high-oil diets on the fecal flora of swine. *Appl. Environ. Microbiol.* **1987**, *53*, 1638-1644.
- Moroney, N., Alcaraz, M., Forder, R., Carey, F., Hoult, R., Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycon flavonoids. *J. Pharm. Pharmacol.* **1988**, *40*, 787-792.
- Moughan, P. J., Cranwell, P. D., Darragh, A. J., Rowan, A. J., The domestic pig as a model animal for studying digestion in humans, in: Souffrant, W. B., Hagemester, H. (Eds.), *Proc. 6th Int. Sympos. Dig. Physiol. in Pigs*, Bad Doberan **1994**, pp. 389-396.
- Mouly, P. P., Arzouyan, C. R., Gaydou, E. M., Estienne, J. M., Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 70-79.
- Müller, K., Freie Radikale: Bedeutung in Pathophysiologie und Therapie. *DAZ.* **1992**, *132*, 1473-1482.
- Murota, K., Shimizu, S., Miyamoto, S., Izumi, T., Obata, A., Kikuci, M., Terao, J., Unique uptake and transport of isoflavone aglycones by human intestinal Caco-2 cells: Comparison of isoflavonoids and flavonoids. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1956-1961.
- Murphy, A., Peer, W. A., Taiz, L., Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta.* **2000**, *211*, 315-324.
- Nakagawa, Y., Shetlar, M. R., Wender, S. H., Urinary products from quercetin in neomycin-treated rats. *Biochim. Biophys. Acta.* **1965**, *97*, 233-241.
- Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R., Krishina, D. R., Bioflavonoids classification, pharmacological, Biochemical effects therapeutic potential. *Indian. J. Pharmacol.* **2001**, *33*, 2-16.
- Neye, H., Gegen postprandiale Glucosespitzen: Glucosidasehemmstoffe. *Pharm. unserer Zeit.* **2002**, *3*, 272-278.

- Nielsen, S. E., Breinholt, V., Justesen, U., Cornett, C., Dragsted, L. O., In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica*. **1998**, *28*, 389-401.
- Nielsen, S. E., Breinholt, V., Cornett, C., Dragsted, L. O., Biotransformation of the citrus flavone tangeretin in rats. Identification of metabolites with intact flavane nucleus. *Food Chem. Toxicol.* **2000**, *38*, 739-746.
- Nigdikar, S. V., Williams, N. R., Griffin, B. A., Howard, A. N., Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low- density lipoproteins to oxidation *in vivo*. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 258-265.
- Nishioka, T., Kawabata, J., Niki, R., Isolation and activity of N-*p*-Coumaroyltyramine an α -glucosidase inhibitor in welsch onion (*Allium fistulosum*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **1997**, *61*, 1138-1141.
- Nishioka, T., Kawabata, J., Aoyama, Y., Baicalein, an α -glucosidase inhibitor from *Scutellaria baicalensis*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1413-1415.
- Nookandeh, A., Frank, N., Steiner, F., Ellinger, R., Schneider, B., Gerhäuser, C., Becker, H., Xanthohumol metabolites in faeces of rats. *Phytochemistry*. **2004**, *65*, 561-570.
- Nyman, N. A., Kumpulainen, J. T., Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4183-4187.
- Ogawa, A., Arai, H., Tanizawa, H., Miyahara, T., Toyo'oka; On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Anal. Chim. Acta.* **1999**, *383*, 221-230.
- O'Leary, K. A., Day, A. J., Needs, P. W., Mellon, F. A., O'Brien, N. M., Williamson, G., Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an *in vitro* hepatic model: the role of human β -glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 479-491.
- O'Leary, K. A., Day, A. J., Needs, P. W., Sly, W. S., O'Brien, N. M., Williamson, G., Flavonoids glucuronides are substrates for human liver beta-glucuronidase. *FEBS Lett.* **2001**, *503*, 103-106.
- Otake, Y., Hsieh, F., Walle, T., Glucuronidation versus oxidation of the flavonoid galangin by human liver microsomes and hepatocytes. *Drug. Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 576-581.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C. H., Buijsman, M. N. C. P., van Amelsvoort, J. M. M., Katan, M. B., Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinosid and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1806-1814.
- Pacifici, R. E., Davies, K. J. A., Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revisited. *Gerontology*. **1991**, *37*, 166-180.
- Paganga, G., Al-Hashim, H., Khodr, H., Scott, B. C., Aruoma, O. I., Hider, R. C., Halliwell, B., Rice-Evans, C. A., Mechanisms of antioxidant activities of quercetin and catechin. *Redox Report.* **1996**, *2*, 359-364.
- Pagliacci, M. C., Spinozzi, F., Migliorati, G., Fumi, G., Smacchia, M., Grignani, F., Riccardi, C., Nicoletti, I., Genistein inhibits tumor cell growth *in vitro* but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: A further pitfall in the use of the MTT assay for evaluation cell growth and survival. *Eur. J. Cancer.* **1993**, *29a*, 1573-1577.

- Pan, L., Becker, H., Gerhäuser, C., Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 837-844.
- Pannala, A. S., Chan, T. S., O'Brien, P. J., Rice-Evans, C. A., Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *282*, 1161-1168.
- Park, J. C., Hur, J. M., Park, J. G., Kim, S. C., Park, J. R., Choi, S. H., Choi, J. W., Effects of methanol extract of *cirsium japonicum* var. *ussuriense* and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 19-24.
- Parr, A. J., Bolwell, G. P., Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 985-1012.
- Peppercorn, M. A., Goldman, P., Caffeic acid metabolism by bacteria of the human gastrointestinal tract. *J. Bacteriol.* **1971**, *108*, 996-1000.
- Pérez-Illzarbe, J., Hernandez, T., Estrella, I., Phenolic compounds in apples: varietal differences. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1991**, *192*, 551-554.
- Pietta, P. G., Gardana, C., Mauri, P. L., Identification of ginkgo biloba flavonol metabolites after oral administration to humans. *J. Chromatogr. B.* **1997**, *693*, 249-255.
- Pietta, P. G., Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035-1042.
- Piskula, M. K., Terao, J., Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 1172-1178.
- Plumb, G. W., de Pasqual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Cheynier, V., Williamson, G., Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effects of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Rad. Res.* **1998**, *29*, 351-358.
- Pond, W. G., Hout, K. A., (Eds.) *The Biology of Pig*. Cornell University Press, Ithaca, New York **1978**.
- Pryde, S. E., Richardson, A. J., Stewart, C. S., Flint, H. J., Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and caecal lumen of a pig. *App. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 5372-5377.
- Puls, W., Keup, U., Krause, H. P., Thomas, G., Hoffmeister, F., Glucosidase inhibition: a new approach to the treatment of diabetes, obesity, and hyperlipoproteinaemia. *Naturwissenschaften.* **1977**, *64*, 536-537.
- Rao, J. R., Cooper, J. E., Rhizobia catabolize *nod* gene-inducing flavonoids via C-ring fission mechanisms. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 5409-5413.
- Radovic, B., Schmutzler, C., Köhrle, J., Xanthohumol stimulates iodide uptake in rat thyroid derived FRTL-5 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 832-836.

- Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P., Rice-Evans, C. A., The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Rad. Biol. Med.* **2002**, *33*, 220-235.
- Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, S. K., Moore, K. P., Rice-Evans, C. A., Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Rad. Biol. Med.* **2004**, *36*, 220-235.
- Rekka, E., Kourounakis, P. N., Effect of hydroxyethyl rutosides and related compounds on lipid peroxidation and free radical scavenging activity. Some structural aspects. *J. Pharm. Pharmacol.* **1991**, *43*, 486-491.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B., The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic. Res.* **1995**, *22*, 375-383.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933-956.
- Rice-Evans, C., Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 797-807.
- Richelle, M., Pridmore, -M. S., Bodenstab, S., Enslin, M., Offord, E. A., Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by β -glycosidase does not alter plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 2587-2592.
- Rimm, E. B., Katan, M. B., Ascherio, A., Stampfer, M. J., Willet, W. C., Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann. Intern. Med.* **1996**, *125*, 384-389.
- Robards, K., Antolovich, M., Analytical chemistry of fruit bioflavonoids - a review. *Analyst.* **1977**, *122*, 11-34.
- Robinson, I. M., Allison, M. J., Bucklin, J. A., Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **1981**, *41*, 950-955.
- Robinson, I. M., Whipp, S. C., Bucklin, J. A., Allison, M. J., Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **1984**, *48*, 964-969.
- Rong, Y., Yang, E. B., Zhang, K., Mack, P., Quercetin-induced apoptosis in the monoblastoid cell line U 937 *in vitro* and the regulation of heat shock proteins expression. *Anticancer Res.* **2000**, *20*, 4339-4345.
- Rossetti, L., Smith, D., Shulman, G. I., Papachristou, D., DeFronzo, R. A., Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J. Clin. Investig.* **1987**, *79*, 1510-1515.
- Rowe, W. A., Bayless, T. M., Colonic short-chain-fatty acids: fuel from the lumen?. *Gastroenterology.* **1992**, *103*, 336-339.
- Rowland, I. R., Interaction of the gut microflora and the host in toxicology. *Toxicol. Pathol.* **1988**, *16*, 147-143.
- Rowland, I., Faughnan, M., Hoey, L., Wähälä, K., Williamson, G., Cassidy, A., Bioavailability of phyto-estrogens. *Br. J. Nutr.* **2003**, *89* (Suppl. 1), S45-S58.

- Russell, E. G., Types and distribution of anaerobic bacteria in the large intestine of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, *37*, 187-193.
- Rusznayk, S., Szent-Györgyi, A., Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature.* **1936**, *138*, 27.
- Salgueiro, J. B., Ardenghi, P., Dias, M., Ferreira, M. B. C., Izquierdo, I., Medina, J. H. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1997**, *58*, 887-891.
- Salunkhe, D. K., Chavan, J. K., Kadam, S. S., Plant phenolics: structure, classification, and biosynthesis, in: Salunkhe, D. K. (Ed.), *Dietary tannins: consequences and remedies*, CRC Press, Inc., Florida **1990**, pp. 469-482.
- Sarlikiotis, A.W., Betzing, J., Wohlschlegel, C., Bauer, K. H., A new *in-vitro* method for testing colon targeting drug delivery systems or excipients. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **1992**, *2*, 62-65.
- Scalbert, A., Williamson, G., Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073S-2085S.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., Rémésy, C., Absorption and metabolism of polyphenols in the gut impact on health. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, *56*, 276-282.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., Saltmarsh M., Polyphenols: Antioxidants and beyond. *Am J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 215S-217S.
- Scheline, R. R., Metabolism of phenolic acids by the rat intestinal microflora. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **1968**, *26*, 189-205.
- Scheline, R. R., Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacol. Rev.* **1973**, *25*, 451-523.
- Scheppach, W., Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut.* **1994**, *Suppl. 1*, S35-S38.
- Schewe, T., Kuhn, H., Sies, H., Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1825-1829.
- Schink, B., Pfennig, N., Fermentation of trihydroxybenzenes by *Pelobacter acidigallici* gen. nov. spec. nov., a strictly anaerobic, non-sporeforming bacterium. *Arch. Microbiol.* **1982**, *133*, 195-201.
- Schneider, H., Schwiertz, A., Collins, M. D., Blaut, M., Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Arch. Microbiol.* **1999**, *171*, 81-91.
- Schneider, H., Simmering, R., Hartmann, L., Pforte, H., Blaut, M., Degradation of quercetin-3-glucoside in gnotobiotic rats associated with human intestinal bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *89*, 1027-1037.
- Schneider, H., Abbau von Flavonoiden durch Mikroorganismen des Gastrointestinaltrakts. *Dissertation*. Universität Potsdam **1999**.
- Schulze, F., Die Gastrointestinalflora des Schweines und ihre Regulationsmechanismen. *Dissertation*, Universität Leipzig **1987**.

- Schumacher, M., Eber, B., Tatber, F., Kaufmann, R., Esterbauer, H., Klein, W., LDL oxidation and coronary atherosclerosis. *Lancet*. **1992**, *340*, 123.
- Seefelder, W., Fumonisine und deren Reaktionsprodukte in Lebensmitteln: Vorkommen, Bedeutung, biologische Aktivität und Metabolismus. *Dissertation*, Universität Würzburg **2002**.
- Selmer, T., Andrei, P. I., p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. A novel glyceryl radical enzyme catalysing the formation of p-cresol. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 1363-1372.
- Setchell, K., Brown, N., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W. T., Wolfe, B. E., Kirschner, A. S., Heubi, J. E., Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides metabolism for bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 447-453.
- Sfakianos, J., Coward, L., Cirk, M., Barnes, S., Intestinal uptake and biliary secretion of the isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.* **1997**, *127*, 1260-1268.
- Shieh, D. E., Liu, L. T., Lin, C. C., Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin. *Anticancer Res.* **2000**, *20*, 2861-2865.
- Shirley, B. W., Flavonoid biosynthesis: 'new' function for an old pathway. *Trends Plant Sci.* **1996**, *1*, 377-382.
- Siems, W. G., Sommerburg, O., Mayer, H., Grune, T., Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Organismus. *Pharm. Z.* **1998**, *143*, 1515-1527.
- Sies, H., Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* **1991**, *91*, 31S-39S.
- Simons, A. L., Renouf, M., Hendrich, S., Murphy, P. A., Human gut microbial degradation of flavonoids: structure-function relationships. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4258-4263.
- Soczynska-Kordal, M., Bakowska, A., Oszmianski, J., Gabrielska, J., Metal ion-flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. *Cell Mol. Biol. Lett.* **2001**, *6*, 277-281.
- Spector, A., Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action, *FASEB J.* **1995**, *9*, 1173-1182.
- Spencer, J. P. E., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E. S., Srai, S. K., Rice-Evans, A. C., The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 224-230.
- Spencer, J. P. E., Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 3255S-3261S.
- Spoelstra, S. F., Degradation of tyrosine in anaerobically stored piggery wastes and in pig feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **1978**, *36*, 631-638.
- Staprans, I., Pan, X. -M., Rapp, J. H., Feingold, K. R., The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 1075-1082.
- Steensma, A., Noteborn, H. P. J. M., van der Jagt, R. C. M., Polaman, T. H. G., Mengelers, M. J. B., Kuiper, H. A., Bioavailability of genistein, daidzein, and their glycosides in intestinal epithelial Caco-2 cells. *Environ. Toxicol.* **1999**, *7*, 209-212.

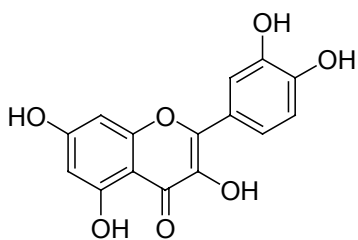
- Stevens, C. E., General characteristics of the digestive System, in: Stevens, C. E. (Ed.), *Comparative physiology of the vertebrate digestive system*, Cambridge University Press, Cambridge **1988**, pp. 1-21.
- Suan, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, I. J., Gibson, G. R., Collins, M. D., Doré, J., Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4799-4807.
- Takahashi, N., Fukui, T., Iwahori, A., Kubo, Y., Hosoe, T., Kawai, K., Induction of differentiation and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL60 cell line by a new type of steroids. *Exp. Cell. Res.* **1998**, *245*, 313-320.
- Takamura, K., Ito, M., Effects of metal ions and flavonoids on the oxidation of ascorbic acid. *Chem. Pharm. Bull.* **1977**, *25*, 3218-3225.
- Talaly, P., Fahey, J. W., Holtzclaw, W. D., Prestera, T., Zhang, Y., Chemoprotection against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol. Lett.* **1995**, *82-83*, 173-179.
- Talaly, P., Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Adv. Enzyme Regul.* **1989**, *28*, 237-250.
- Tilly, J. L., Billig, H., Kowalski, K. I., Hsueh, A. J., Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol. Endocrinol.* **1992**, *6*, 1642-1950.
- Toda, M., Kawabata, J., Kasai, T., Inhibitory effects of ellagi- and gallotannins on rat intestinal α -glucosidase complexes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 542-547.
- Tolleson, W. H., Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Marques, M. M., Roberts, D. W., Metabolism of biochanin A and formononetin by human liver microsomes *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4783-47-90.
- Traganos, F., Ardelt, B., Halko, M., Bruno, S., Darzynkiewicz, Z., Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukemic MOLT-4 and HL-60 cells. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 6200-6208.
- Tsai, C. G., Gates, D. M., Ingledew, W. M., Jones, G. A., Products of anaerobic phloroglucinol degradation. *Can. J. Microbiol.* **1976**, *22*, 159-164.
- Tsukahara, T., Koyama, H., Okada, M., Ushida, K., Stimulation of butyrate production by glucuronic acid in batch culture of pig cecal digesta and identification of butyrate-producing bacteria. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 2229-2234.
- Umesaki, Y., Setoyama, H., Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes Infect.* **2000**, *2*, 1343-1351.
- van Acker, S. A. B. E., de Groot, M. J., van den Berg, D. -J., Tromp, M. N. J. L., den Kelder, G. D. -O, van der Vijgh, W. J. F., Bast, A., Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, *20*, 331-342.
- Viola, H., Wolfman, C., Levi de Stein, M., Wasowski, C., Pena, D., Medina, J. H., Paladini, A. C., Isolation of pharmacologically active benzodiazepine receptor ligands from *Tilia tomentosa* (Tiliaceae). *J. Ethnopharmacol.* **1994**, *44*, 47-53.

- Viola, H., Wasowski, C., Levi de Stein, M., Wolfman, C., Silveira, R., Dajas, F., Medina, J. H., Paladini, A. C., Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med.* **1995**, *61*, 213-216.
- Vlietinck, A. J., De Bruyne, T., Apers, S., Pieters, L. A., Plant derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta Med.* **1998**, *64*, 97-109.
- Vollaard, E. J., Clasener, H. A. L., Colonisation resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38*, 409-414.
- Walgren, R. A., Karnaky, K. J., Jr., Lindenmayer, G. E., Walle, T., Efflux of dietary flavonoid quercetin-4'- β -glucoside across human intestinal Caco-2-cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2000a**, *294*, 830-836.
- Walgren, R. A., Lin, J. -T., 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.* **2000b**, *294*, 837-843.
- Walle, T., Otake, Y., Brubaker, J. A., Walle, U. K., Halushka, P. V., Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2001**, *51*, 143-146.
- Walle, T., Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Rad. Biomed.* **2004**, *36*, 829-837
- Wang, I. K., Lin-Shiau, S. Y., Lin, J. K., Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrom c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells. *Eur. J. Cancer.* **1999**, *35*, 1517-1525.
- Wang, L. Q., Meselhy, R. M., Li, Y., Nakamura, N., Min, B. S., Qin, G. W., Hattori, M., The heterocyclic ring fission and dehydroxylation of catechins and related compounds by *Eubacterium* sp. strain SDG-2, a human intestinal bacterium. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1640-1643.
- Ward, L. A., Johnson, K. A., Robinson, I. M., Yokoyama, M. T., Isolation from swine feces of a bacterium which decarboxylates p-hydroxy-phenylacetic acid to 4-methylphenol (p-cresol). *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *53*, 189-192.
- Watanaba, J., Kawabata, J., Kurihara, H., Niki, R., Isolation and identification of α -glucosidase inhibitors from tochu-cha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 177-178.
- Watzl, B., Rechkemmer, G., Flavonoide. *Ernährungsumschau.* **2001a**, *48*, 499-503.
- Watzl, B., Rechkemmer, G., Validity of dietary assessment. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001b**, *74*, 273-274.
- Weber, G., Shen, F., Prajda, N., Yang, H., Li, W., Yeh, A., Csokay, B., Olah, E., Look, K. Y., Regulation of the signal transduction program by drugs. *Adv. Enzyme Regul.* **1997**, *37*, 35-55.
- Wei, Y. O., Zhao, X., Kariya, Y., Fukata, H., Teshigawara, K., Uchida, A., Induction of apoptosis by quercetin: Involvement of heat shock protein. *Cancer Res.* **1994**, *4*, 4952-4957.
- Wei, H., Cai, Q., Rahn, R. O., Inhibitor of UV light- and Fenton reaction-induced oxidative DNA damage by the soybean isoflavone genistein. *Carcinogenesis.* **1996**, *17*, 73-77.

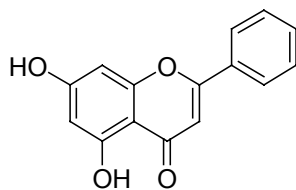
- Welton, A. F., Hurley, J., Will, P., Flavonoids and arachidonic acid metabolism. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1988**, *280*, 301-312.
- Wenzel, U., Kuntz, S., Brendel, M. D., Daniel, H., Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3823-3831.
- Williamson, G., The use of flavonoid aglycones in *in vitro* systems to test biological activities: based on bioavailability data, is this a valid approach? *Phytochemistry Rev.* **2002**, *1*, 215-222.
- Williamson, G., Manach, C., Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81(suppl.)*, 243S-255S.
- Winter, J., Moore, L. H., Dowell, V. R., Bokkenheuser, V. D., C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 1203-1208.
- Winter, J., Popoff, M. R., Grimont, P., Bokkenheuser, V. D., *Clostridium orbiscindens* sp. nov., a human intestinal bacterium capable of cleaving the flavonoid C-ring. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1991**, *41*, 355-357.
- Wiseman, S. A., Balentine, D. A., Frei, B., Antioxidants in tea. *Crit. Rev. Food Sci. Nutri.* **1997**, *37*, 705-718.
- Wolfman, C., Viola, H., Paladini, A., Dajas, F., Medina, J. H., Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *passiflora coerulea*. *Pharm. Biochem. Behav.* **1994**, *47*, 1-4.
- Wolfman, C., Viola, H., Marder, M., Wasowski, C., Ardenghi, P., Izquierdo, I., Paladini, A., Medina, J. H., Anxiolytic properties of 6,3'-dinitroflavone, a highaffinity benzodiazepine receptor ligand. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *318*, 23-30.
- Wolffram, S., Blöck, M., Ader, P., Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 630-635.
- Yochum, L., Kushi, L. H., Meyer, K., Folsom, A. R., Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am. J. Epidemiol.* **1999**, *149*, 943-949.
- Yokozawa, T., Dong, E., Liu, Z. W., Shimizu, M., Antioxidative activity of flavones and Flavonols *in vitro*. *Phytother. Res.* **1997**, *11*, 446-449.
- Zarkovic, N., Freie Radikale: Mechanismen der Tumorentstehung, *Pharm. Z.* **2000**, *145*, 239-245.
- Zhang, W., Salomon, R. G., Oxidized phospholipids, isolevuglandins, and atherosclerosis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 1050-1062.
- Zubik, L., Meydani, M., Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in american women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 1459-1465.

Anhang

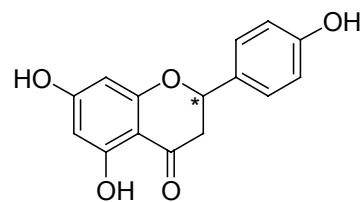
In der folgenden Übersicht sind die wesentlichen der in dieser Arbeit aufgeführten Verbindungen zusammengefasst.



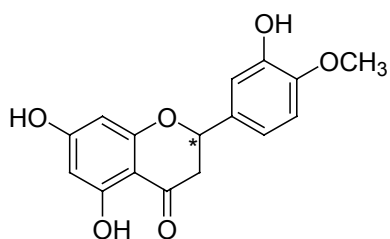
Quercetin **1**



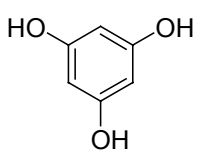
Chrysin **2**



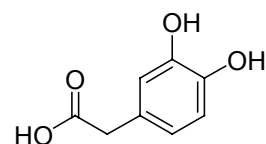
Naringenin **3**



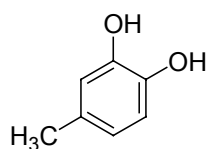
Hesperetin **4**



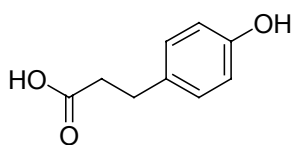
Phloroglucin **1a**



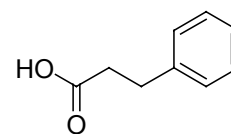
3,4-Dihydroxyphenylacetic acid **1b**



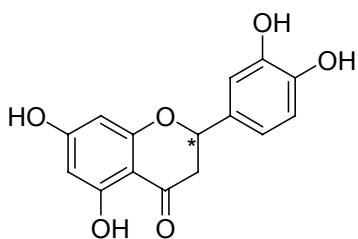
3,4-Dihydroxytoluol **1c**



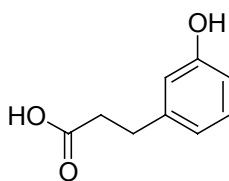
3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid **3a**



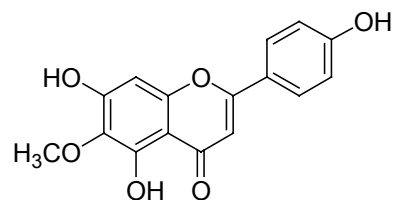
3-phenylpropionic acid **3b**



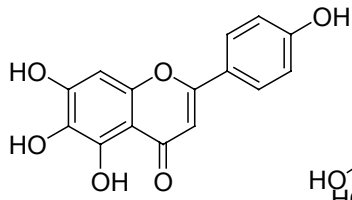
Eriodictyol **4a**



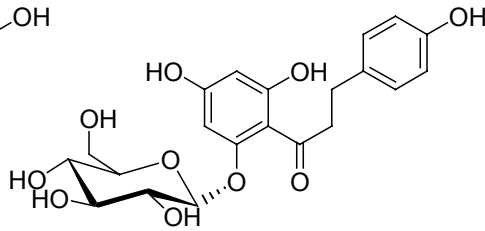
3-(3-Hydroxyphenyl)propionic acid **4b**



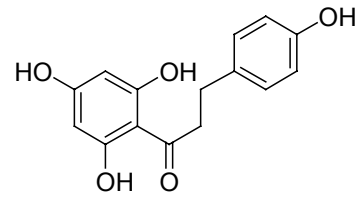
Hispidulin **5**



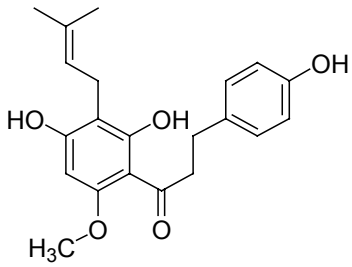
Scutellarein **5a**



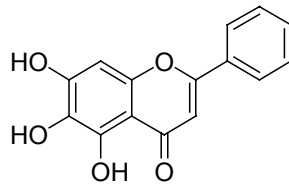
Phloridzin **6**



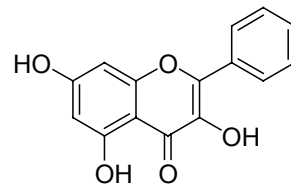
Phloretin **7**



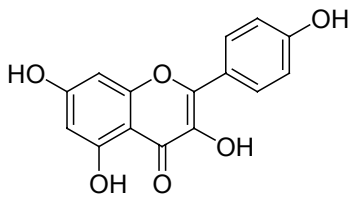
Xanthohumol **8**



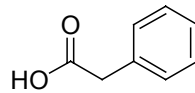
Baicalein **9**



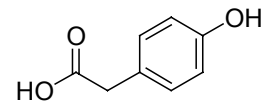
Galangin **10**



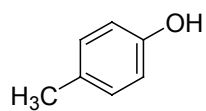
Kämpferol **11**



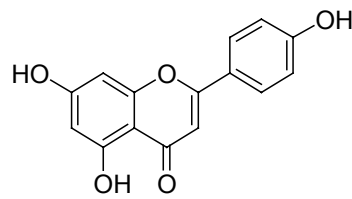
Phenylacetic acid **10a**



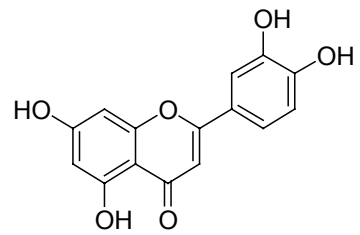
4-Hydroxyphenylacetic acid **11a**



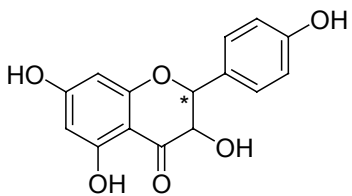
4-Methylphenol **11b**



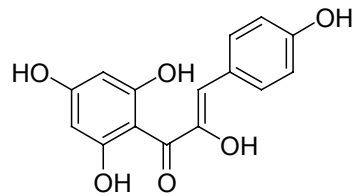
Apigenin **12**



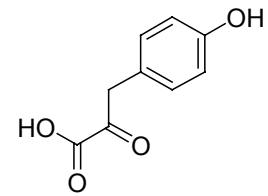
Luteolin **13**



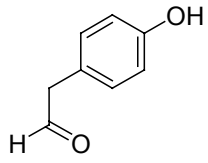
Dihydrokämpferol **I**



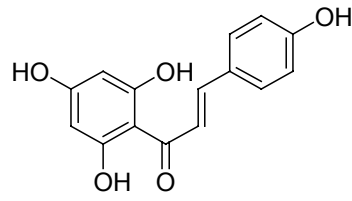
2-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)propenone **II**



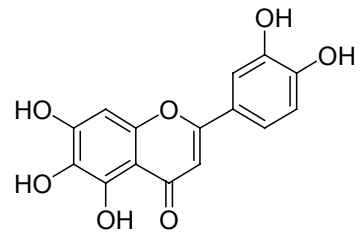
2-Keto-3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid **III**



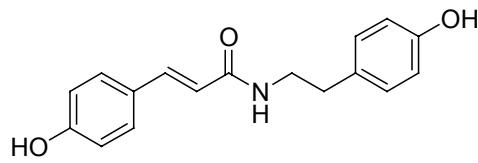
4-Hydroxyphenyl
acetaldehyd **IV**



2',4',6',4-Tetrahydroxychalcon **VIII**



6-Hydroxyluteolin



N-*p*-Coumaroyltyramin

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Schreier durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. P. Schreier gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die kompetente wissenschaftliche Betreuung und das entgegengebrachte Vertrauen sowie für die Unterstützung, die er mir stets in jeglicher Hinsicht gewährt hat.

Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Humpf vom Institut für Lebensmittelchemie der Universität Münster danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Armin Mosandl vom Institut für Lebensmittelchemie der Universität Frankfurt danke ich ebenfalls herzlich für seine Bereitschaft, als Drittprüfer an meinem Promotionskolloquium mitzuwirken.

Bei Frau Dr. Elke Richling möchte ich mich für die hilfreichen Diskussionen und die wertvollen Tips bedanken.

Frau Dr. Ursula Rdest gilt mein Dank für die Hilfsbereitschaft sowie für die Möglichkeit, die Kultivierungsversuche am Institut für Mikrobiologie der Universität Würzburg durchführen zu können.

Für das Engagement und die tatkräftige Mitarbeit im Rahmen ihres Fortgeschrittenen-Praktikums danke ich Sylvia Hummel und Annette Erb.

Weiterhin möchte ich mich bei allen ehemaligen und jetzigen Kolleginnen und Kollegen des Arbeitskreises für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Besonders zu nennen sind hierbei Anke Meisner, Thomas Wickert, Gabriele Korte, Dominique Kavvadias und Michael Kraus.

Allen Korrekturlesern dieser Arbeit bin ich für die fachlichen und grammatikalischen Verbesserungsvorschläge dankbar.

Für die finanzielle Unterstützung gilt mein Dank der FRUIT-Stiftung, Heidelberg.

Nicht zuletzt möchte ich einen besonderen Dank meiner Familie aussprechen, die mich stets und auf unschätzbare Weise unterstützt hat.

Lebenslauf

Name	Samira Labib
Anschrift	Sudermannstr. 37 60431 Frankfurt
Geburtsdatum	10. Oktober 1972
Geburtsort	Casablanca/Marokko
Staatsangehörigkeit	marokkanisch
1984 - 1991	Ibnou-El-Aouam-Gymnasium in Casablanca/Marokko
07/1991	Abitur
1991 - 1993	Grundstudium der Physik und Chemie an der Hassan II Universität Casablanca/Marokko
1995 - 2000	Studium der Lebensmittelchemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt/Main
06/1998	Vorexamen für Lebensmittelchemiker
10/2000	Erstes Staatsexamen für Lebensmittelchemiker
11/2000 - 04/2001	Berufspraktikum an der Goldwell GmbH in Darmstadt, Abteilung Kosmetikrecht/ Forschung & Entwicklung
05/2001 - 10/2001	Berufspraktikum am Staatlichen Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Nordhessen in Kassel
12/2001	Zweites Staatsexamen für Lebensmittelchemiker
seit 05/2002	Promotion am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „*Ex-vivo*-Studien zum intestinalen Metabolismus von Flavonoiden“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

.....
Samira Labib