

**Synthese von ^{14}C -markierten
Anthocyanidinen und Studien zur
intestinalen Verfügbarkeit von Anthocyanen
aus Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.)**

DISSERTATION

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

vorgelegt von

Michael Kraus

aus Pfändhausen
(Landkreis Schweinfurt)

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:

Wer kämpft kann verlieren,
wer nicht kämpft, hat schon verloren

Bertolt Brecht

Meinen Eltern
und Cindy

Publikationsliste

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

1. Publikationen:

M. Kraus, E. Richling, P. Schreier, Synthesis of [4-¹⁴C]-pelargonidin chloride and [4-¹⁴C]-delphinidin chloride. *J. Label. Compd. Radiopharm.* Publ. angenommen.

E. Richling, M. Appel, F. Heckel, K. Kahle, **M. Kraus**, C. Preston, W. Hümmer, P. Schreier, Flavor authenticity studies isotope ratio mass spectrometry – perspectives and limits. ACS Symposium Series, im Druck.

K. Kahle, **M. Kraus**, W. Scheppach, M. Ackermann, F. Ridder, E. Richling, (2006) Studies on apple and blueberry fruit constituents: Do the polyphenols reach the colon? *Mol. Nutr. Food Res.* **50**, 418-423.

K. Kahle, **M. Kraus**, W. Scheppach, E. Richling, (2006) Intestinale Metabolisierung von Polyphenolen – Eine Verzehrstudie mit Ileostomie-Patienten. *Lebensmittelchemie*, **60** (1), 9.

K. Kahle, **M. Kraus**, W. Scheppach, E. Richling, (2005) Colonic availability of apple polyphenols – a study in ileostomy subjects. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 1143-1150.

C. Preston, E. Richling, K. Kahle, **M. Kraus**, W. Hümmer, M. Appel, F. Heckel, P. Schreier, Ester synthesis: Authenticity assessment by stable isotope analysis. In: State-of-the-Art in Flavour Chemistry and Biology. DFA, Garching, 2005.

S. Labib, A. Erb, **M. Kraus**, T. Wickert, P. Schreier, E. Richling, (2005) Schweine-Caecum – Ein *ex-vivo*-Modell zum Studium der intestinalen Metabolisierung von Flavonoiden. *Lebensmittelchemie* **59**, 38.

K. Kahle, **M. Kraus**, E. Richling, (2005) Polyphenol profiles of apple juices. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 797-806.

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

2. Posterbeiträge:

25th Anniversary Conference. Chair of Food Chemistry - Link between Chemistry, Biology, and Medicine, Würzburg (Oktober 2005)

Titel: „Colonic availability of fruit derived polyphenols for the prevention of inflammatory bowel diseases (IBD)“ K. Kahle, **M. Kraus**, W. Scheppach, E. Richling

Lebensmittelchemikertag 2004, Bonn (Oktober 2004)

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

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von Dezember 2002 bis Juni 2005 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Peter Schreier. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, den großzügigen Freiraum auch innerhalb des Themengebietes, das entgegengebrachte Vertrauen und die stetige Diskussionsbereitschaft zum Fortgang der Arbeit.

Der DFG danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des FlavoNet.

Bei allen Mitarbeitern des Arbeitskreises, insbesondere den „Keller-Kindern“ Dr. Elke Richling, Kathrin Kahle, Wolfgang Hümmer und Bastian Knaup, bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die besondere Arbeitsatmosphäre sowie die stetige Hilfsbereitschaft.

Prof. Dr. Scheppach und seinem Team, insbesondere Antje Volk, Gerda Dusel und Ines Holub aus der Gastroenterologie der Medizinischen Klinik der Universität, danke ich für die Durchführung der Studien mit Ileostomie-Patienten und der damit verbundenen Betreuung der Probanden. Dank auch den Probanden für die Teilnahme an der Studie. Mein spezieller Dank geht an dieser Stelle an Frau Ott-Hartusch.

Für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen des Fortgeschrittenen-Praktikums bedanke ich mich bei Ellen Biskup, Friederike Ridder und Matthias Ackermann.

Ein herzliches Dankeschön gilt der GC/MS-Crew insbesondere Dr. Frank Heckel und seinem Nachfolger Michael Kempf für die Arbeiten im GC-Labor.

Bei Dr. Anagnostis Valotis, anfangs noch im Arbeitskreis Prof. Dr. Högger (Klinische Pharmazie) tätig, bedanke ich mich für stetige Hilfsbereitschaft insbesondere bei Fragen, die beim Umgang mit radioaktiven Materialien auftraten.

Ebenso danke ich Frau Dr. Rdest vom Institut für Mikrobiologie der Universität Würzburg für die Nutzung des Radionuklidlabors.

Dr. Radim Vičik und Dr. Uli Käppler danke ich für die Aufnahme von NMR-Spektren, für die Hilfe bei deren Auswertung und für die gute Freundschaft in den letzten Jahren.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Frank Heckel, Dr. Marcus Taupp und Bastian Knaup für die enge Freundschaft während der gemeinsamen Zeit.

Dank auch an den Arbeitskreis Prof. Dr. Högger, insbesondere Dr. „Noti“ Anagnostis Valotis, Dr. Meike Timmermann, Dr. „Tänscha“ Tanja Grimm, „Rosi“ Roswitha Skrabala, Matthias Freiwald und Nicole Rauschert für die schöne Zeit und ihre Hilfsbereitschaft.

Den Korrekturlesern dieser Arbeit danke ich für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Ein besonderer Dank gilt an dieser Stelle meiner Freundin Cindy für ihre ausdauernden Hilfen bei Korrekturen und ihre Geduld. Danke!!!

Mein ganz spezieller Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium erst ermöglichten und mich jederzeit in allen Bereichen tatkräftig unterstützen. Ohne sie wäre ich nicht an der Stelle angekommen, an der ich jetzt bin. Vielen Dank für Alles!!!

Erläuterungen

- Alle in dieser Arbeit verwendeten Substanzen sind mit fettgedruckten arabischen Lettern durchnummeriert.
- Auf die Nummerierung einmalig genannter Verbindungen (z. B. Reagenzien in Synthesen) wurde verzichtet.
- Literaturverweise sind unter Aufführung von maximal den beiden erstgenannten Autoren und des Erscheinungsjahres in Klammern angegeben und im Literaturverzeichnis vollständig hinterlegt.
- Gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen sind im Text mit dem Zusatz „®“ oder „TM“ versehen.

Abkürzungsverzeichnis

[4- ¹⁴ C]-Dp-Chlorid	[4- ¹⁴ C]-Delphinidinchlorid
[4- ¹⁴ C]-Pg-Chlorid	[4- ¹⁴ C]-Pelargonidinchlorid
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonsäure
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
Cy-3- <i>O</i> -ara	Cyanidin-3- <i>O</i> -arabinosid
Cy-3,5- <i>O</i> -diglc	Cyanidin-3,5- <i>O</i> -diglucosid
Cy-3- <i>O</i> -gal	Cyanidin-3- <i>O</i> -galactosid
Cy-3- <i>O</i> -glc	Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid
Cy-3- <i>O</i> -glu	Cyanidin-3- <i>O</i> -glucuronid
Cy-3- <i>O</i> -rha	Cyanidin-3- <i>O</i> -rhamnosid
Cy-3- <i>O</i> -rut	Cyanidin-3- <i>O</i> -rutinosid
Cy-3- <i>O</i> -sam	Cyanidin-3- <i>O</i> -sambiosid
Cy-3- <i>O</i> -soph	Cyanidin-3- <i>O</i> -sophorosid
Cy-Chlorid	Cyanidinchlorid
<i>d</i>	Duplett
<i>d_f</i>	Filmdicke von Trennphasen
δ	Chemische Verschiebung delta
DC	Dünnschichtchromatographie
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrrolin- <i>N</i> -oxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Dp-3- <i>O</i> -ara	Delphinidin-3- <i>O</i> -arabinosid
Dp-3- <i>O</i> -gal	Delphinidin-3- <i>O</i> -galactosid
Dp-3- <i>O</i> -glc	Delphinidin-3- <i>O</i> -glucosid
Dp-Chlorid	Delphinidinchlorid
EI	Elektronenstoßionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)

Fa.	Firma
FG	Frischgewicht
FRAP	Ferric Reducing Activity of Plasma bzw. Ferric Reducing Antioxidant Power
GC	Gaschromatographie
ggf.	gegebenenfalls
g/d	Gramm pro Tag
GSH	Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion in Form eines Dimers
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HPLC-DAD	Hochleistungsflüssigchromatographie-Diodenarraydetektor
HPLC-MS(MS)	Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie
HRGC/MS	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie
IC ₅₀	inhibitory concentration at 50% (50 %ige Inhibierung)
i.D.	Innendurchmesser
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>J</i>	Kopplungskonstante
KbE	Koloniebildende Einheit
KG	Körpergewicht
LC	Flüssigchromatographie
LDL	Low Density Lipoprotein
M	molar, mol/l
<i>m</i>	Multipllett
MGD	<i>N</i> -Methyl-D-glucamindithiocarbamat
mg/d	Milligramm pro Tag
mol	Mol
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
MS	Massenspektrometrie
Mv-3- <i>O</i> -ara	Malvidin-3- <i>O</i> -arabinosid
Mv-3,5- <i>O</i> -diglc	Malvidin-3,5- <i>O</i> -diglucosid
Mv-3- <i>O</i> -gal	Malvidin-3- <i>O</i> -galactosid

Mv-3- <i>O</i> -glc	Malvidin-3- <i>O</i> -glucosid
Mv-Chlorid	Malvidinchlorid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Kernresonanzspektroskopie
NOC-7	1-Hydroxy-2-oxo-3-(<i>N</i> -methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazin
NO [•]	Stickstoffmonooxid
n. b.	nicht bekannt
OH [•]	Hydroxylradikal
O ₂ ^{•-}	Superoxidradikalanion
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
p.a.	pro analysis
Pg-Chlorid	Pelargonidinchlorid
Pg-3- <i>O</i> -glc	Pelargonidin-3- <i>O</i> -glucosid
pH	pH-Wert
Pn-3- <i>O</i> -ara	Peonidin-3- <i>O</i> -arabinosid
Pn-3- <i>O</i> -gal	Peonidin-3- <i>O</i> -galactosid
Pn-3- <i>O</i> -glc	Peonidin-3- <i>O</i> -glucosid
Pn-Chlorid	Peonidinchlorid
ppm	parts per million oder chemische Verschiebung in Hertz
Pt-3- <i>O</i> -ara	Petunidin -3- <i>O</i> -arabinosid
Pt-3- <i>O</i> -gal	Petunidin -3- <i>O</i> -galactosid
Pt-3- <i>O</i> -glc	Petunidin -3- <i>O</i> -glucosid
Pt-Chlorid	Petunidinchlorid
<i>q</i>	Quartett
<i>s</i>	Singulett
SOD	Superoxid-Dismutase
sog.	sogenannte(r,s)
<i>s</i>	Standardabweichung
<i>t</i>	Triplett
Tab.	Tabelle
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TFA	Trifluoressigsäure
TPTZ	Tripyridyltriazin

t_R	Retentionszeit
Trolox	(±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
u	Masseneinheit
u.a.	unter anderem
upm / rpm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG	7
SUMMARY.....	11
EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	17
1 KENNTNISSTAND.....	21
1.1 Polyphenole.....	21
1.1.1 Klassifizierung der Polyphenole	21
1.1.1.1 Phenolcarbonsäuren	21
1.1.1.2 Lignane.....	22
1.1.1.3 Stilbene.....	23
1.1.1.4 Flavonoide.....	23
1.1.2 Biosynthese von Flavonoiden	29
1.2 Die Anthocyane	31
1.2.1 Allgemeines	31
1.2.2 Anthocyane: Farbe und pH-Abhängigkeit	34
1.2.3 Stabilität von Anthocyanidinen	36
1.2.4 Bildung von Komplexen.....	37
1.2.5 Copigmentierung von Anthocyanen	37
1.3 Synthesewege für Anthocyanidine.....	39
1.4 Vorkommen von Anthocyanen in der Natur	40
1.5 Die Heidelbeere	43
1.5.1 Taxonomie der Heidelbeere.....	43
1.5.2 Die Wildheidelbeere	44
1.5.3 Die Kulturheidelbeere.....	45
1.6 Anthocyane – ihre physiologischen Eigenschaften.....	46

1.6.1	Entstehung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies und ihre Wirkungen auf den Organismus.....	46
1.6.2	Antioxidative Wirkung der Anthocyane	49
1.6.2.1	Schutz vor koronaren Herzerkrankungen	51
1.6.2.2	Schutz vor Krebserkrankungen	52
1.6.2.3	Antiinflammatorische Eigenschaften.....	54
1.6.2.4	Sonstige potentiell chemopräventive Eigenschaften	55
1.6.3	Systeme zur Messung der antioxidativen Aktivität.....	56
1.7	Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Anthocyanen	58
1.7.1	Aufnahme durch die Nahrung.....	58
1.7.2	Absorptions- und Verteilungsmechanismen von Anthocyanen	58
1.7.3	Bioverfügbarkeit von Anthocyanen	61
1.7.4	Metabolisierung von Anthocyanen	63
1.8	Colostoma und Ileostoma	67
2	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	75
2.1	Synthese von Anthocyanidinen	75
2.1.1	Strategie	75
2.1.2	Synthese von 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd.....	75
2.1.3	Synthese von Pelargonidinchlorid (Pg-Chlorid)	76
2.1.4	Synthese von Cyanidinchlorid (Cy-Chlorid).....	78
2.1.5	Synthese von Peonidinchlorid (Pn-Chlorid)	79
2.1.6	Synthese von Delphinidinchlorid (Dp-Chlorid).....	80
2.1.7	Synthese und ¹⁴ C-Markierung von Pelargonidin- und Delphinidinchlorid	82
2.1.7.1	Synthese von [Formyl- ¹⁴ C]-Trihydroxybenzaldehyd	82
2.1.7.2	Synthese von [Formyl- ¹⁴ C]-2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd	83
2.1.7.3	Synthese von [4- ¹⁴ C]-Pelargonidinchlorid.....	83
2.1.7.4	Synthese von [4- ¹⁴ C]-Delphinidinchlorid.....	84
2.2	Isolierung von Anthocyanen aus Wildheidelbeeren	85
2.2.1	Gewinnung eines Rohextrakts	85
2.2.2	LC-Reinigung an XAD-7	86
2.2.3	Isolierung von Anthocyanen mittels HPLC	86
2.2.4	Identifizierung der isolierten Anthocyane mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS	87
2.2.5	¹ H-NMR-Analytik der isolierten Anthocyane.....	90
2.2.6	Zuordnung der isolierten Anthocyane.....	92

2.3	Quantifizierung von Anthocyanen.....	93
2.3.1	Entwicklung einer HPLC-Methode zur Quantifizierung von Anthocyanen	93
2.3.2	Kalibrierung der Anthocyane zur Quantifizierung	93
2.4	Anthocyanprofile von Wild- und Kulturheidelbeeren.....	95
2.5	Intestinale Verfügbarkeit von Anthocyanen.....	98
2.5.1	Interventionsstudie mit Ileostomie-Probanden	98
2.5.2	Zeitlicher und prozentualer Austritt von Anthocyanen in den Ileostomabeutel nach Heidelbeerverzehr	101
2.6	Stabilität von Anthocyanidinen bei pH 7.4	108
2.7	Stabilität von Anthocyanen im Dünndarm	110
2.8	Enzymaktivität im Dünndarminhalt - Ergebnisse des apiZYM®-Tests	115
3	EXPERIMENTELLER TEIL.....	119
3.1	Material.....	119
3.1.1	Chemikalien.....	119
3.1.2	Dünnschichtchromatographie	119
3.1.3	Säulenchromatographie (SC).....	120
3.2	Geräte.....	120
3.2.1	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	120
3.2.2	Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)	125
3.2.3	High Resolution Gas Chromatographie Massenspektrometrie (HR-GC/MS)	127
3.2.4	Flüssigszintillationszähler (Liquid-Scintillation-Counting; LSC)	128
3.2.5	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	128
3.2.6	Sauerstoffmessung.....	129
3.2.7	Sonstige Geräte.....	129
3.3	Methoden	130
3.3.1	Mehrstufigensynthesen von Anthocyanidinen.....	130
3.3.1.1	Synthese von 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd.....	130
3.3.1.2	Synthese von Pelargonidinchlorid (Pg-Chlorid).....	131
3.3.1.2.1	Synthese von ω-Chlor-4-hydroxyacetophenon.....	131
3.3.1.2.2	Synthese von ω-Acetoxy-4-hydroxyacetophenon	132
3.3.1.2.3	Synthese von ω,4-Diacetoxyacetophenon	133
3.3.1.2.4	Synthese von Pelargonidinchlorid	133

3.3.1.3	Synthese von Cyanidinchlorid (Cy-Chlorid).....	135
3.3.1.3.1	Synthese von ω -Chlor-3,4-dihydroxyacetophenon.....	135
3.3.1.3.2	Synthese von ω ,3,4-Triacetoxyacetophenon.....	135
3.3.1.3.3	Synthese von Cyanidinchlorid.....	136
3.3.1.4	Synthese von Peonidinchlorid (Pn-Chlorid).....	137
3.3.1.4.1	Synthese von ω -Chloro-4-hydroxy-3-methoxyacetophenon.....	137
3.3.1.4.2	Synthese von ω -Acetoxy-4-hydroxy-3-methoxyacetophenon.....	138
3.3.1.4.3	Synthese von ω ,4-Diacetoxy-3-methoxyacetophenon.....	139
3.3.1.4.4	Synthese von Peonidinchlorid.....	139
3.3.1.5	Synthese von Delphinidinchlorid (Dp-Chlorid).....	140
3.3.1.5.1	Synthese von Triacetoxybenzoesäure.....	140
3.3.1.5.2	Synthese von 3,4,5-Triacetoxybenzoesäurechlorid.....	141
3.3.1.5.3	Synthese von ω -Azo-3,4,5-triacetoxyacetophenon.....	142
3.3.1.5.4	Synthese von ω -Chlor-3,4,5-triacetoxyacetophenon.....	142
3.3.1.5.5	Synthese von ω ,3,4,5-Tetraacetoxyacetophenon.....	143
3.3.1.5.6	Synthese von Delphinidinchlorid.....	144
3.3.1.6	4- ¹⁴ C-Markierung von Pelargonidin- und Delphinidinchlorid.....	145
3.3.1.6.1	Synthese von [Formyl- ¹⁴ C]-2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd.....	145
3.3.1.6.2	Synthese von [Formyl- ¹⁴ C]-2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd.....	146
3.3.1.6.3	Synthese von [4- ¹⁴ C]-Pelargonidinchlorid.....	146
3.3.1.6.4	Synthese von [4- ¹⁴ C]-Delphinidinchlorid.....	147
3.3.1.6.5	Messung der spezifischen Aktivität.....	147
3.3.2	Isolierung von Anthocyanen aus Wildheidelbeeren.....	148
3.3.2.1	Gewinnung des Rohextraktes aus Wildheidelbeeren.....	148
3.3.2.2	LC an XAD-7.....	148
3.3.2.3	Isolierung authentischer Anthocyane.....	149
3.3.2.3.1	Isolierung mittels analytischer HPLC.....	149
3.3.2.4	Identifizierung authentischer Anthocyane.....	150
3.3.2.4.1	¹ H-NMR.....	150
3.3.2.4.2	HPLC-DAD.....	150
3.3.2.4.3	HPLC-ESI _{pos} -MS/MS.....	150
3.3.3	Quantifizierung von Anthocyanen in Heidelbeeren.....	151
3.3.3.1	Erstellung von Kalibriergeraden.....	151
3.3.3.2	Quantifizierung der Anthocyane in der Wildheidelbeere.....	152
3.3.3.2.1	Extraktion.....	152
3.3.3.2.2	Quantifizierung der Anthocyane.....	152
3.3.3.3	Quantifizierung der Anthocyane in der Zuchtheidelbeere.....	153
3.3.4	Intestinale Verfügbarkeit von Anthocyanen.....	153
3.3.4.1	Probanden.....	153

3.3.4.2	Studiendesign	153
3.3.4.3	Probennahme	154
3.3.4.4	Wiederfindung der Anthocyane im Ileostomabeutel nach Probenvorbereitung	154
3.3.4.5	Quantifizierung der Anthocyane im Ileostomabeutelinhalt	155
3.3.4.5.1	Extraktion	155
3.3.4.5.2	Quantifizierung	155
3.3.5	Stabilität von Anthocyanen im Dünndarmausfluss	156
3.3.5.1	Inkubation	156
3.3.5.2	Extraktion	157
3.3.5.3	Quantifizierung	158
3.3.6	Enzymaktivität des Ileostomabeutelinhaltes	158
3.3.6.1	Probennahme	158
3.3.6.2	Durchführung des apiZym [®] -Tests	158
3.3.7	Stabilität von Anthocyanidinen bei pH 7.4	159
3.3.7.1	Inkubation bei pH 7.4	159
3.3.7.2	Quantifizierung	159
STRUKTURMATRIX		161
LITERATURVERZEICHNIS		165

Zusammenfassung

Der Ernährung wird eine wichtige Rolle bei der Entstehung von entzündlichen und bösartigen Erkrankungen des Darmtraktes zugesprochen. So ist bekannt, dass fettreiche Ernährung mit hohem Fleischverzehr das Auftreten derartiger Krankheiten begünstigt. Auf der anderen Seite weiß man, dass sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Polyphenole und Flavonoide sowohl *in vitro* als auch im Tierversuch chemopräventive Effekte zeigen. Besondere Bedeutung scheint den Anthocyanen zuzukommen. Dabei ist bislang ungeklärt, wie hoch der Anteil an Anthocyanen nach dem Verzehr von z. B. Früchten ist, der in den Dickdarm gelangt. Es war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, diese Fragestellung an Hand eines einschlägigen Beispiels, d.h. der Anthocyane aus Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.), zu beantworten. Wir führten hierzu eine Interventionsstudie mit Ileostomie-Probanden durch.

Nach polyphenolfreier Ernährung über 24 Stunden verzehrten fünf Probanden je 300 g Wildheidelbeeren. Der Ileostoma-Ausfluss wurde danach in zeitlichen Abständen gesammelt, sofort tiefgefroren und nach extraktiver Probenaufarbeitung mittels HPLC-DAD und HPLC-ESI_{pos}-MS/MS untersucht. Quantitative Bestimmungen erfolgten via HPLC-DAD, wobei die jeweilige Kalibrierung mit eigens aus Heidelbeeren isolierten authentischen Anthocyanreferenzen durchgeführt wurde.

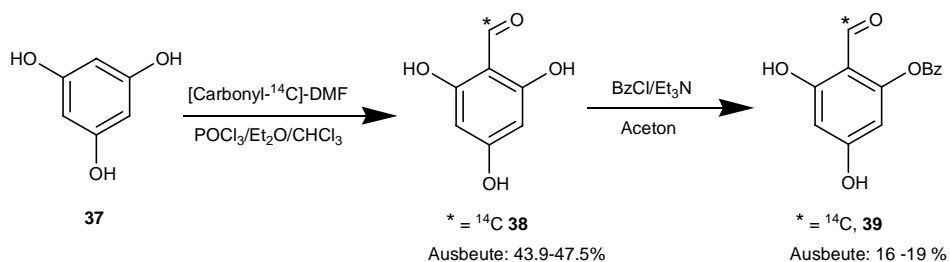
Durchschnittlich sind 46 % der aufgenommenen Anthocyanmenge im Ileostoma-Ausfluss wieder gefunden worden. Der ausgeschiedene Anteil war abhängig von der Struktur des Aglycons und des jeweiligen Zuckerrestes. Malvidin-3-*O*-arabinosid (Mv-3-*O*-ara) (**42**) wurde zu 85.1% der aufgenommenen Menge im Dünndarmausfluss detektiert, Cyanidin-3-*O*-glucosid (Cy-3-*O*-glc) (**6**) hingegen nur zu 28.3%. Das Maximum der Ausscheidung lag zwischen zwei und vier Stunden. Insgesamt war erkennbar, dass Glucoside am stärksten metabolisiert oder aufgenommen wurden. Stabiler waren die Galactoside; Arabinoside [ausgenommen Delphinidin-3-*O*-arabinosid (**12**)] zeigten die größte Stabilität. Diese Tendenz wurde in Modellversuchen, bei denen verschiedene Anthocyane mit polyphenolfreiem Dünndarmausfluss inkubiert wurden, bestätigt. Stabilitätsuntersuchungen der freien Aglycone ergaben Abhängigkeiten vom Substitutionsmuster der

Anthocyanidine am B-Ring; methoxylierte Strukturen erwiesen sich weitaus stabiler als hydroxylierte.

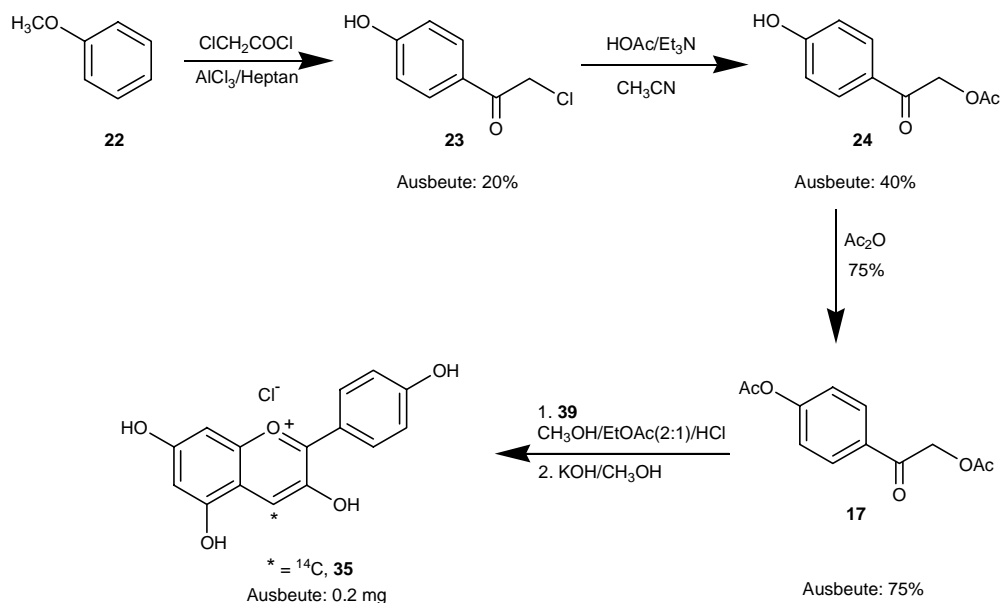
Zusammenfassend ist erstmals festzustellen, dass ein beachtlicher Teil der applizierten Anthocyane unter physiologischen Umständen in den Dickdarm gelangt und dort zur Prävention von Darmerkrankungen beitragen könnte.

Da aber auf Grund der gewonnenen Ergebnisse auch ein beachtlicher Teil der Anthocyane nicht wieder gefunden wurde und aus der Literatur bekannt ist, dass sich nur sehr geringe Mengen im Urin nachweisen lassen, stellt sich die Frage über den Verbleib dieser Anthocyananteile.

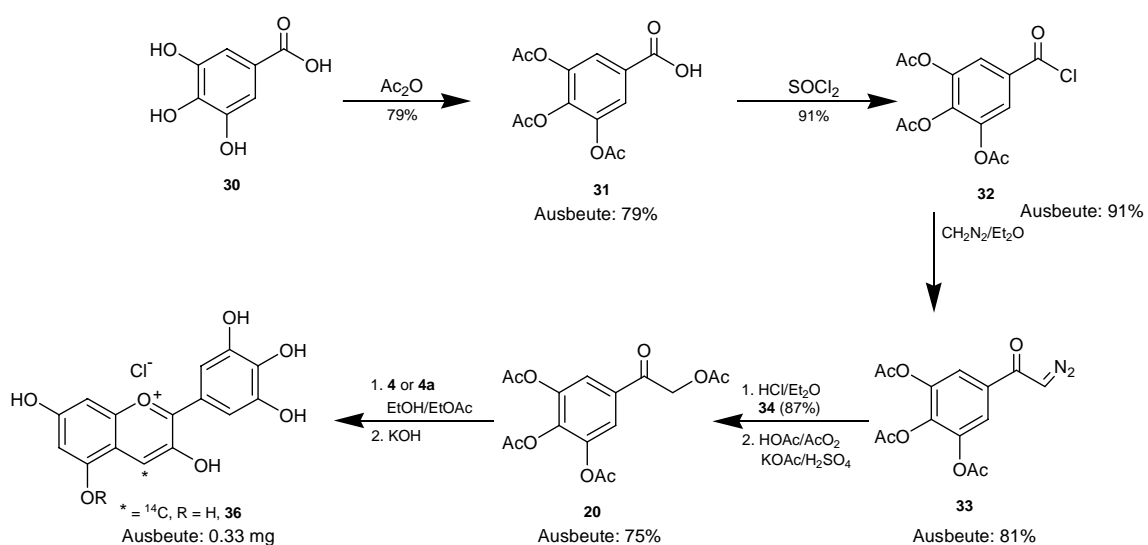
Eine Strategie, dieses Problem experimentell anzugehen, beruht in der Anwendung markierter Substrate, z. B. ^{14}C -markierter Anthocyanidine. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden demzufolge $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ -Pelargonidinchlorid (**35**) und $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ -Delphinidinchlorid (**36**) (auf Grundlage entsprechender nicht markierter Versuche) synthetisiert. Beide Synthesen gingen von 1,3,5-Trihydroxybenzol (**37**) aus. In einer Vilsmeier-Reaktion wurde mittels $[\text{Formyl-}^{14}\text{C}]$ -dimethylformamid markierter 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd (**38**) gewonnen. Nach Benzoylierung erhielt man den für die weiteren Schritte benötigten, radioaktiv markierten Baustein 2-Benzoyl-4,6-dihydroxybenzaldehyd (**39**).



$[4\text{-}^{14}\text{C}]$ -Pelargonidinchlorid (**35**) erhielt man durch Kondensation von $[\text{Formyl-}^{14}\text{C}]$ -2-benzoyl-4,6-dihydroxybenzaldehyd (**39**) mit ω ,4-Diacetoxyacetophenon (**17**), welches ausgehend von Methoxybenzol (**22**) in einer dreistufigen Synthese gewonnen wurde.



[4-¹⁴C]-Delphinidinchlorid (**36**) wurde durch Kondensation von 2-Benzoyl-4,6-dihydroxybenzaldehyd (**39**) mit ω,3,4,5-Tetraacetoxyacetophenon (**20**) erhalten. Die Synthese des Intermediates (**20**) erfolgte ausgehend von 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure (**30**) via 3,4,5-Triacetoxybenzoesäure (**31**), deren Acylchlorid (**32**), anschließender Umsetzung zum Diazoketon (**33**) und Gewinnung von ω,3,4,5-Tetraacetoxyacetophenon (**20**), aus dem [4-¹⁴C]-Delphinidinchlorid in zwei Schritten zugänglich war.



Mit der damit erstmals gewährleisteten Bereitstellung ^{14}C -markierter Anthocyanidine ist der Weg für zukünftige Tierversuche zur Ermittlung der Verteilung von Anthocyanidinen im Körper geebnet.

Summary

Nutrition is supposed to play an essential role in the pathogenesis of inflammatory and malignant diseases of the gastrointestinal tract. It is well known that fat-rich nutrition favors the occurrence of such diseases.

On the other hand, it is known that secondary plant components such as polyphenols and flavonoids show both *in vitro* and *in vivo* chemopreventive effects. Anthocyanins seem to be of particular importance. It is still unknown how many anthocyanins reach the colon after consumption, e.g., of fruits. One of the aims of this work was to answer this question by means of a relevant example, i.e. anthocyanins from blueberry fruit (*Vaccinium myrtillus* L.). For this purpose, we performed an intervention study with ileostomy patients.

After a polyphenol free diet over a period of 24 hours five test subjects were each given 300 g of wild blueberries. The ileostomy discharge was collected in different intervals, immediately frozen and analyzed after extractive sample processing by means of HPLC-DAD analysis. The samples were quantified via HPLC-DAD, whereby the respective calibration was accomplished with authentic anthocyanin references isolated from blueberries.

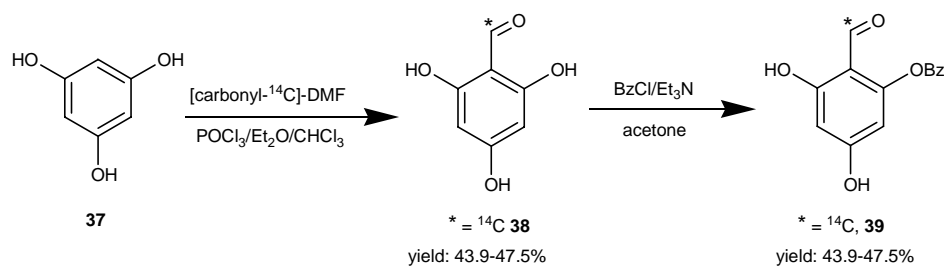
In average 46% of the anthocyanins were retrieved in the ileostomy discharge. The excreted amount depended on the structure of the aglycons and the respective sugar residue. In the ileostomy discharge 85.1 % of malvidin-3-*O*-arabinoside (Mv-3-*O*-ara) (**42**) was detected but only 28.3% cyanidin-3-*O*-glucoside (Cy-3-*O*-glc) (**6**). The maximum of the excretion was between two and four hours. Altogether it was to be observed that glucosides were metabolized or absorbed most of all. The galactosides were more stable. Arabinosides [excluding delphinidin-3-*O*-arabinoside (**12**)] showed the greatest stability. This tendency was confirmed in model reaction systems for which isolated anthocyanins were incubated with polyphenol free ileostomy discharge.

The stability of the available aglycones depended on the substitution pattern of the B-ring of the anthocyanidins. Methoxylated anthocyanins showed a by far greater stability than hydroxylated.

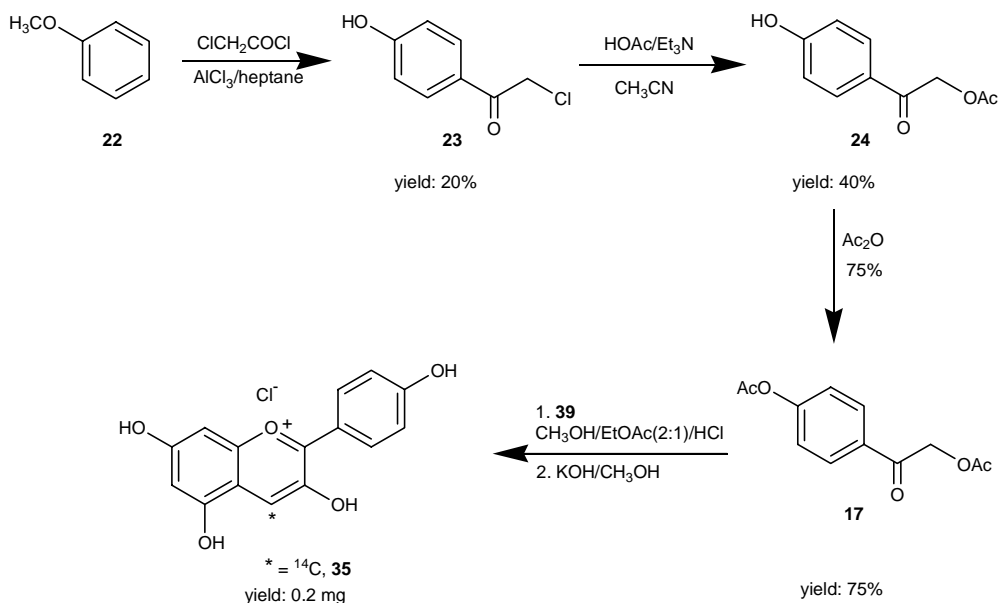
Summarizing, it is shown for the first time that a considerable part of the consumed anthocyanins reach the colon under physiological circumstances and could aid in the prevention of diseases of the colon.

As however, due to the obtained results a considerable part of the anthocyanins was not retrieved and it is known from literature that only very small quantities were found in urine, the question remains about the fate of the rest of the anthocyanidins.

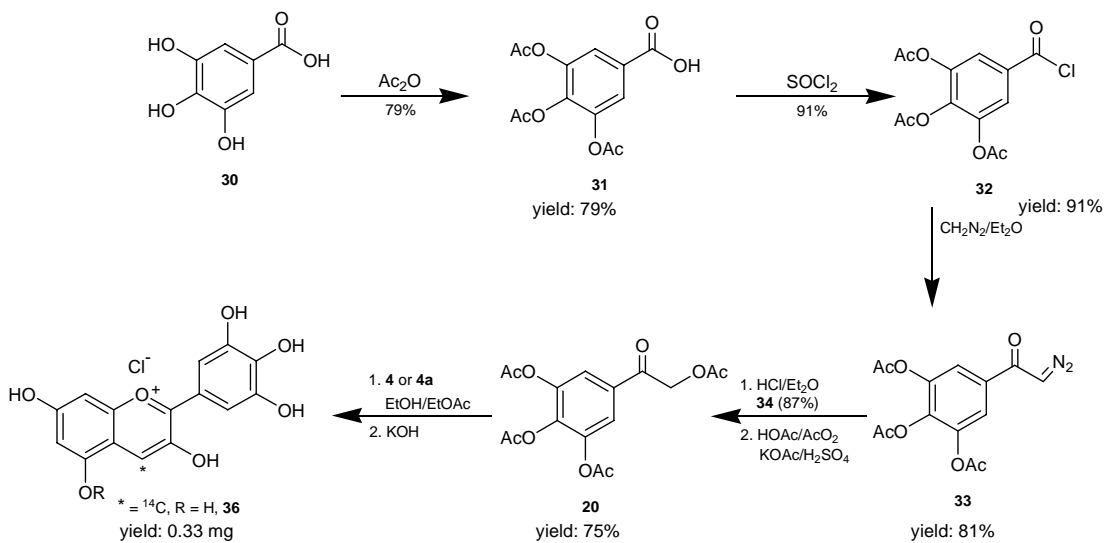
A strategy to approach this problem experimentally is based in the application of marked substrates, e.g. ^{14}C -labelled anthocyanidins. In the range of the work at hand [^{14}C]-pelargonidin chloride (**35**) and [^{14}C]-delphinidin chloride (**36**) were synthesized on the basis of the corresponding non-marked synthesis. Both syntheses begin on the basis of 1,3,5-trihydroxybenzole (**37**). With a Vilsmeier reaction with [formyl- ^{14}C]-dimethylformamide labelled 2,4,6-trihydroxybenzaldehyd (**38**) was prepared. After benzylation, the for the next steps needed radioactive labelled [formyl- ^{14}C]-2-benzoyl-4,6-dihydroxybenzaldehyd (**39**) was obtained.



[^{14}C]-Pelargonidinchlorid (**35**) was received by condensation of ω ,4-Diacetoxyacetophenone (**17**) synthesized from methoxybenzol in a three step synthesis (**22**) with [formyl- ^{14}C]-2-benzoyl 4,6-dihydroxybenzaldehyd (**39**). The yield of (**35**) was 0.2 mg with a specific activity of 33.6 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$.



[4-¹⁴C]-Delphinidin chloride (**35**) (0.33 mg with a specific activity of 30.4 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) was obtained by condensation of 3,4,5-tetraacetoxyacetophenone (**20**) with [formyl-¹⁴C]-2-benzoyl 4,6-dihydroxybenzaldehyde (**39**). The synthesis of the intermediate (**20**) from which (**35**) was prepared in two steps starting from 3,4,5-trihydroxybenzoic acid via 3,4,5-triacetoxybenzoic acid (**31**), its acid chloride (**32**) with subsequent reaction to the diazoketone (**33**) and yielding of ω ,3,4,5-triacetoxy acetophenone (**20**).



In synthesizing ^{14}C -labelled anthocyanidins for the first time the way for future animal experiments for the determination of the distribution of anthocyanidins in the body was opened.

Einleitung und Zielsetzung

Einleitung und Zielsetzung

Der Mensch nimmt über Obst, Gemüse und Cerealien eine Vielzahl an Polyphenolen auf. Dem darin enthaltenen Anthocyananteil werden viele gesundheitsfördernde Eigenschaften wie antioxidative, anticancerogene, antiinflammatorische oder antiarteriosklerotische Wirkungen, zugeschrieben (Talavera *et al.*, 2004). Es ist auch bekannt, dass anthocyanreiche Nahrung präventive Effekte im Mundraum (Han *et al.*, 2005), bei bösartigen Veränderungen des Ösophagus (Kresty *et al.*, 2001) und des Colons (Harris *et al.*, 2001, He *et al.*, 2005) besitzt. Die Suche nach potentiell aktiven Substanzen in Bezug auf die Prävention dieser Erkrankungen ist von großer Bedeutung.

Älteren Angaben zufolge liegt die tägliche Aufnahme an Anthocyanen bei 180 – 215 mg/d in den USA. Neuere Studien gehen von 82 mg/d in Finnland und 75-150 mg/d in Dänemark aus (Kühnau, 1976, Dragsted *et al.*, 1996, Clifford, 2000, Heinonen, 2001). Eine aktuelle Publikation geht von einer Aufnahme 12.5 mg/d in den USA aus (Wu *et al.*, 2006a).

Modellstudien zeigten, dass Anthocyane im Kolon sehr schnell deglycosyliert werden. Dabei werden Moleküle geringer Molekülmasse, wie z. B. die Protocatechusäure oder Syringasäure, gebildet (Nielsen *et al.*, 2003, Aura, 2004, Keppler und Humpf, 2005).

Ungeklärt ist die Frage, wie viele Anthocyane eigentlich in den Dickdarm gelangen und dort chemopräventiv wirken können. Bisher wurde immer nur Fäzes vom Menschen oder von Versuchstieren, wie z. B. der Ratte, untersucht und eine Bestandsaufnahme der mit dem Stuhl ausgeschiedenen Anthocyane durchgeführt. Dies lässt aber keine Aussage darüber zu, wie hoch die Konzentrationen im Dickdarm vor einer Biotransformation bzw. Biodegradation sind.

Jüngst wurden neue Resultate über die Menge an Anthocyanen, die bei Ratten den Dickdarm erreicht, publiziert (He *et al.*, 2005). Bisher sind keine Daten über die Verfügbarkeit von Anthocyanen im menschlichen Dickdarm bekannt; es liegen nur Daten über die Verfügbarkeit von Quercetin und Chlorogensäure, für die Studien mit Ileostomie-Probanden durchgeführt wurden, vor (Hollman *et al.*, 1995, Walle *et al.*, 2000, Olthof *et al.*, 2001, Zheng *et al.*, 2003). Jüngst ist aus unserem Arbeitskreis die Verfügbarkeit von Apfelpolyphenolen im humanen Dickdarm berichtet worden; auch hier wurde auf Ileostomie-Probanden zurückgegriffen (Kahle *et al.*, 2005)

Anhand von Studien mit Ileostomie-Probanden erhält man einen sehr guten Einblick darüber, welche Mengen an Anthocyanen den Dünndarm passieren und welche der einzelnen Anthocyane am stabilsten im Bereich des Dünndarms sind. Gibt es Unterschiede in Bezug auf das Aglycon oder auf die Glycosylierung? Wie hoch ist die Konzentration im Dickdarm nach dem Konsum von anthocyanhaltigen Lebensmitteln? Liegen die Anthocyane in einer Größenordnung vor, in der man ihnen überhaupt eine Wirkung oder positive Effekte auf die Darmgesundheit zuweisen kann? Diese Fragen zu beantworten, wird in dieser Arbeit versucht, indem eine Studie mit Ileostomie-Probanden, die Wildheidelbeeren verzehrten, durchgeführt wurde.

Neben der Verfügbarkeit von Anthocyanen im Dickdarm ist es weiterhin interessant in Erfahrung zu bringen, wie sich diese Verbindungen nach ihrer Aufnahme im Körper verteilen. Bisher wurden im Fäzes, im Urin und im Plasma von Mensch und Ratte nur sehr geringe Mengen der verabreichten Dosis wieder gefunden. Daher stellt sich die Frage, wo der restliche, sehr große Anteil verbleibt. Eine Strategie, dieses Problem experimentell anzugehen, beruht in der Anwendung markierter Substrate, z. B. ^{14}C -markierter Anthocyanidine. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden demzufolge Methoden zur Synthese von Anthocyanidinen etabliert. Im Anschluss daran folgte die Gewinnung von radioaktiv markiertem Delphinidin- und Pelargonidinchlorid. Damit sind die Grundlagen für zukünftige tierexperimentelle Studien gelegt.

Kenntnisstand

1 Kenntnisstand

1.1 Polyphenole

1.1.1 Klassifizierung der Polyphenole

Zu den in der Natur vorkommenden Polyphenolen, auch Pflanzenphenole genannt, zählen mehrere tausend Verbindungen. Man unterteilt sie in Phenolcarbonsäuren, Lignane, Stilbene und Flavonoide (Kühnau, 1976).

1.1.1.1 Phenolcarbonsäuren

Zu den Phenolcarbonsäuren zählt man Benzoesäure- und Zimtsäurederivate. Als Grundgerüst besitzen diese Verbindungen ein C₆-C₁- bzw. C₆-C₃-Gerüst (Manach *et al.*, 2004, Kühnau, 1976). Als Beispiele für die Gruppe der Benzoesäurederivate sind Protocatechusäure, *p*-Hydroxybenzoesäure, Gallussäure, Vanillinsäure oder auch Syringasäure zu nennen (Abbildung 1-1).

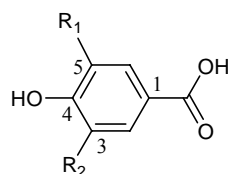


Abbildung 1-1: Struktur von *p*-Hydroxybenzoesäuren (R₁/R₂=H: *p*-Hydroxybenzoesäure; R₁=OH, R₂=H: Protocatechusäure; R₁=OH, R₂=OH: Gallussäure; R₁=OCH₃, R₂=H: Vanillinsäure; R₁=OCH₃, R₂=OCH₃: Syringasäure)

FrISCHE Teeblätter enthalten ca. 4.5 g/kg an Gallussäure (Tomas-Barberan und Clifford, 2000a). Gallussäure ist eine physiologisch aktive Substanz; sie besitzt antioxidative, entzündungshemmende, antimutagene und antikarzinogene Wirkung (Shahrzad und Bitsch, 1998). Des Weiteren kommen Hydroxybenzoesäuren als Komponenten in komplexeren Strukturen vor. Zu nennen sind hierfür hydrolysierbare Tannine, wie z. B. Gal-
lotannine in Mangos, Erdbeeren, Himbeeren und Schwarzbeeren (Clifford, 2000).

Für die Untergruppe der Hydroxyzimtsäurederivate sind v. a. *p*-Coumarsäure, Kaffeesäure, Zimtsäure und Ferulasäure anzuführen. Sie unterscheiden sich lediglich im Vorhandensein von Hydroxyl- oder Methoxygruppen in Position 4 und/oder 5 (Abbildung 1-2).

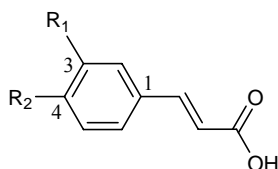


Abbildung 1-2: Struktur von *p*-Hydroxyzimtsäuren ($R_1/R_2=H$: Zimtsäure; $R_1=H$, $R_2=OH$: *p*-Coumarsäure; $R_1=OH$, $R_2=OH$: Kaffeesäure; $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$: Ferulasäure)

Hydroxyzimtsäuren sind in der Natur verbreiteter als Hydroxybenzoesäuren. Auch ihnen werden biologische Effekte wie antioxidative, antimikrobielle und entzündungshemmende Wirkungen zugeschrieben (Kaehkoenen *et al.*, 2001). Sie liegen meist gebunden, d. h. entweder glycosyliert oder in Form von Estern mit Chinasäure, Shikimisäure oder Weinsäure vor. Eine wichtige Verbindung ist Chlorogensäure, die aus Kaffeesäure und Chinasäure besteht (Clifford, 1999). Die höchsten Gehalte an Chlorogensäure in Früchten erreichen Blaubeere, Kiwi, Pflaume, Kirsche und Apfel, mit Gehalten von 0.5 – 2.0 g/kg Frischgewicht (Machaix *et al.*, 1990). Kaffeesäure ist die in Früchten am häufigsten vorkommende phenolische Säure. Sie macht ca. 75 – 100% des gesamten Hydroxyzimtsäureanteils in Früchten aus. In Getreide stellt die Ferulasäure den Hauptanteil. In Weizenkörnern sind 0.8 - 2.0 g/kg Trockengewicht enthalten (Krygier *et al.*, 1982, Lempereur *et al.*, 1997).

1.1.1.2 Lignane

Bei Lignanen sind zwei Phenylpropan-Einheiten miteinander verknüpft. Daraus ergibt sich ein C₆-C₃-C₃-C₆-Gerüst. In der Nahrung stellt die Linse eine der größten Lignanquellen dar. Sie enthält u. a. Secoisolariciresinol (Abbildung 1-3) in einer Menge von bis zu 3.7 g/kg Trockengewicht; dies entspricht ungefähr der 1000-fachen Menge des Lignan-Anteils in Getreide und Früchten (Thompson *et al.*, 1991, Adlercreutz und Ma-

zur, 1997). Den Lignan-Verbindungen werden u. a. phytoöstrogene Wirkungen zugeschrieben (Cassidy *et al.*, 2000).

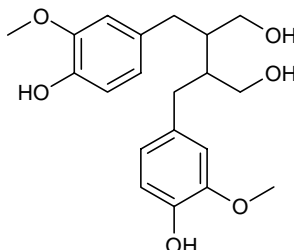


Abbildung 1-3: Struktur des in Linsensamen vorkommenden Secoisolariciresinol.

1.1.1.3 Stilbene

Als ein typischer Vertreter der Stilbene ist Resveratrol zu nennen (Abbildung 1-4), das in Rotwein als freies Aglycon in Mengen von 0.3 – 7.0 mg/L und glycosidisch gebunden in Mengen von 15 mg/L vorliegt. Resveratrol zeigt anticancerogene, antiinflammatorische und anti-aging Effekte. Auch in Hinsicht auf Gefäßveränderungen zeigt Resveratrol positive Effekte. Die Substanz ist daher, auch in Bezug auf Metabolismus und Bioverfügbarkeit, ausführlich untersucht worden (Bertelli *et al.*, 1998, Bhat und Pezzuto, 2002, Vitrac *et al.*, 2002, De la Lastra und Villegas, 2005, Delmas *et al.*, 2005, Le Corre *et al.*, 2005, Ulrich *et al.*, 2005, Wenzel und Somoza, 2005).

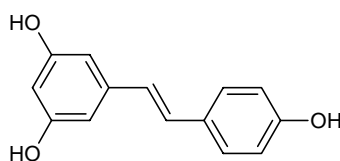


Abbildung 1-4: Struktur von Resveratrol.

1.1.1.4 Flavonoide

Die Gruppe der Flavonoide lässt sich in mehrere Gruppen unterteilen und umfasst über 4000 Verbindungen (Cren-Ollive *et al.*, 2000). Man unterscheidet Flavone, Flavanone,

Flavanonole, Flavonole, Flavandiole (Leukoanthocyanidine), Flavan-3-ole, Isoflavone und Anthocyanidine. Allen gemeinsam ist die Grundstruktur des Flavans (2-Phenylbenzodihydropyran). Diese besteht aus einer C₆-C₃-C₆-Struktur und beinhaltet zwei aromatische Ringe, die über drei Kohlenstoffatome und ein Sauerstoffatom (heterocyclisches System) aneinander gebunden sind. Die beiden aromatischen Ringe bezeichnet man mit A und B, das heterocyclische System mit C (Kühnau, 1976). Abbildung 1-5 zeigt die Grundstruktur der einzelnen Flavonoidgruppen. Zur Biosynthese sind fast alle höheren Pflanzen befähigt, Tiere hingegen können das Grundgerüst nicht synthetisieren.

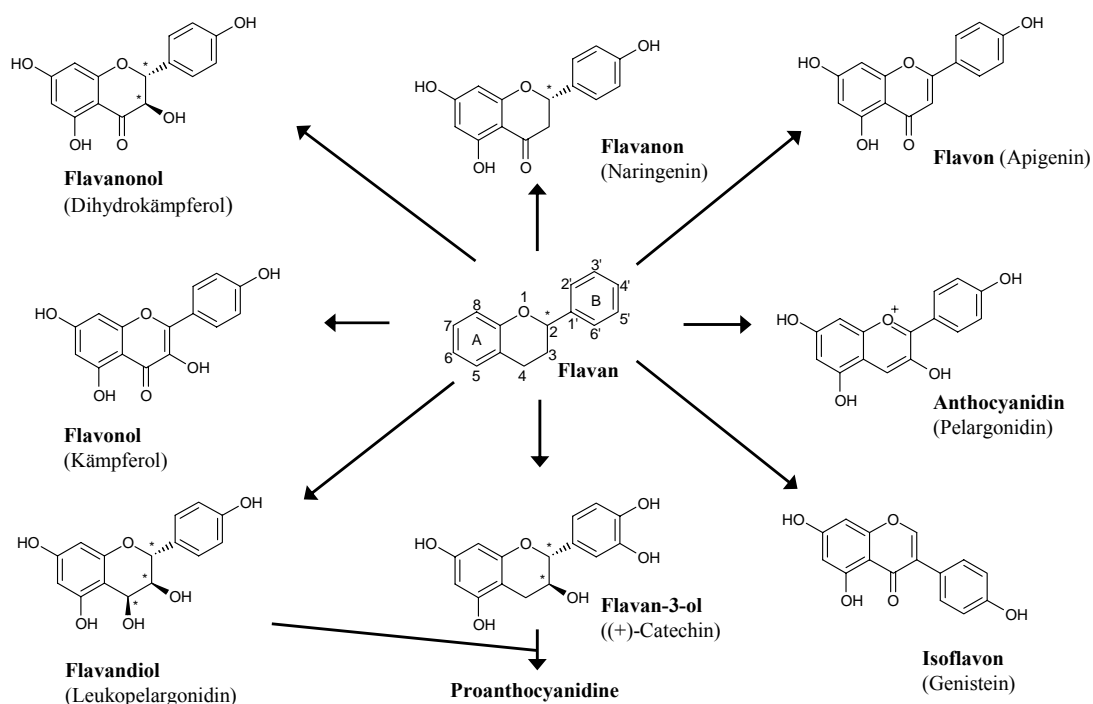


Abbildung 1-5 Übersicht über die verschiedenen Gruppen der Flavonoid-Familie

Die Aufnahme von Flavonoiden wird gemäß älteren Literaturangaben in den westlichen Ländern auf 0.5-1.0 g/d geschätzt (Kühnau, 1976, Pierpoint, 1986). Nach Kühnau unterteilt sich diese Menge in 16% Flavonole, Flavone und Flavanone, 17% Anthocyanine, 20% Catechine und 45% ‚Biflavone‘ (Kühnau, 1976). Andere Studien gehen von nur 75 - 150 mg/d aus (Dragsted *et al.*, 1996). Eine Studie aus den Niederlanden nennt einen Verzehr von 23 mg Flavonoiden am Tag (Hertog *et al.*, 1993, Cao und Prior, 1999a). Neueren Literaturquellen zufolge liegt die tägliche Aufnahme zwischen 20 mg in den

Vereinigten Staaten, Dänemark und Finnland und mehr als 70 mg in Holland (Beecher, 2003).

Am reichsten an Flavonoiden ist die Zwiebel. Sie beinhaltet bis zu 1.2 g/kg Flavonole. Dies ist die am weitesten verbreitetste Untergruppe der Flavonoide in der Nahrung, von der Kämpferol und Quercetin die wichtigsten Vertreter sind (Abbildung 1-6). Sie kommen meistens in Konzentrationen von ca. 15-30 mg/kg vor.

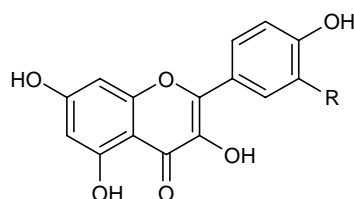


Abbildung 1-6: Struktur von Kämpferol (R = H) und Quercetin (R = OH)

Auch reich an Flavonolen sind Brokkoli und Heidelbeeren mit einem Gehalt von bis zu 160 bzw. 100 mg/kg. In Rotwein sind bis zu 30 mg/L und in Tee bis zu 45 mg/L enthalten (Manach *et al.*, 2004). Die Flavonole sind meist mit Glucose oder Rhamnose verknüpft. Aber auch Zucker wie Galactose, Arabinose, Xylose oder auch Glucuronsäure sind nicht selten. Oftmals kommen in Früchten zwischen fünf und zehn verschiedene Flavonolglycoside nebeneinander vor (Machaix *et al.*, 1990). Die Konzentration innerhalb einer Frucht oder auch in den Blättern (z. B. von Kohl) kann sehr stark schwanken, abhängig davon, wie stark das entsprechende Gewebe dem Sonnenlicht ausgesetzt wurde (Herrmann, 1976, Price *et al.*, 1995). Die tägliche Flavonol-Aufnahme wurde in den USA, Dänemark und Holland auf ca. 20-25 mg geschätzt (Hertog *et al.*, 1993, Justesen *et al.*, 1997, Sampson *et al.*, 2002). In Italien geht man von einer durchschnittlichen Aufnahme von 35 mg/d aus (Pietta *et al.*, 1996).

Im Vergleich zu Flavonolen ist die Konzentration von Flavonen in Früchten und Gemüse viel geringer. Die wichtigsten Verbindungen sind die Glycoside von Apigenin und Luteolin (Abbildung 1-7). Diese werden hauptsächlich durch Sellerie oder Petersilie aufgenommen.

In Hirse oder Weizen sind auch C-Glycoside von Flavonen zu finden (Manach *et al.*, 2004). Ein gut untersuchtes Flavon stellt das Hispidulin dar, welches u. a. in Salbei (*Salvia officinalis* L.) zu finden ist (Abbildung 1-8). Dieses Flavon bindet im Gehirn am

GABA_A-Rezeptor und besitzt eine antikonvulsive, anxiolytische und antiepileptische Wirkung. Durch Gabe von ¹⁴C-markiertem Hispidulin an Ratten wurde nachgewiesen, dass dieses Flavon die Blut-Hirn-Schranke passiert (Kavvadias *et al.*, 2004).

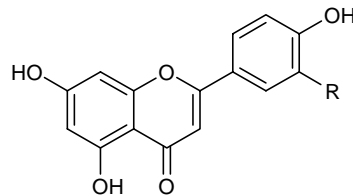


Abbildung 1-7: Struktur von Apigenin (R = H) und Luteolin (R = OH)

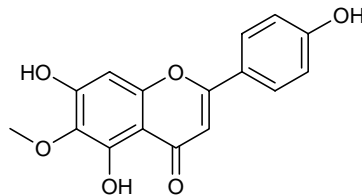


Abbildung 1-8: Struktur von Hispidulin

Flavanone kommen in hoher Konzentration v. a. in Zitrusfrüchten vor. Als wichtigste Verbindungen sind Naringenin in Grapefruit, Hesperetin in Orangen und Eriodictyol in Zitronen zu nennen (Abbildung 1-9).

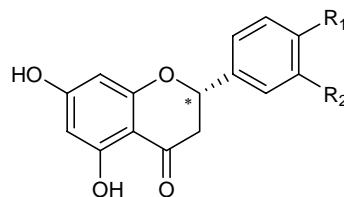


Abbildung 1-9: Struktur von Naringenin (R₁ = OH, R₂ = H), Eriodictyol (R₁ = OH, R₂ = OH) und Hesperetin (R₁ = OCH₃, R₂ = OH)

Diese Substanzen kommen in der Natur generell nur glycosidisch mit einem Disaccharid (z. B. Neohesperidose oder Rutinose) an Position 7 verbunden vor. Beispielsweise enthält Orangensaft zwischen 200 und 600 mg/L Hesperidin, das ist das 7-Rutinosid des Hesperetins (Tomas-Barberan und Clifford, 2000b). In Finnland wird die tägliche Aufnahme von Hesperetin mit 28.3 mg/d angegeben (Kumpulainen, 2001). In Regionen wie

Südeuropa, in denen Zitrusfrüchte angebaut werden, liegt die Aufnahme überdurchschnittlich hoch, da dort auch mehr Zitrusfrüchte verzehrt werden (Manach *et al.*, 2004).

Eine weitere Gruppe der Flavonoide stellen die Flavan-3-ole dar. Die wichtigsten Flavan-3-ole sind die Catechine (+)-Catechin und (-)-Epicatechin (Abbildung 1-10) sowie ihre Gallate, wie Gallocatechin, Galloepicatechin und Galloepicatechingallat.

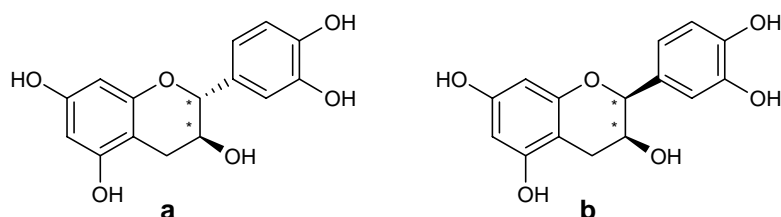


Abbildung 1-10: Struktur von (+)-Catechin [2R, 3S] **a** und (-)-Epicatechin **b** [2S, 3S]

Diese Substanzen kommen v. a. in Tee, aber auch in Trauben und Leguminosensaaten vor. Weitere wichtige Quellen sind Schokolade sowie Rotwein mit einem Gehalt von bis zu 300 mg/L (Manach *et al.*, 2004). Ein Aufgussbeutel mit grünem Tee beinhaltet bis zu 200 mg Catechine (Lakenbrink *et al.*, 2000), während der Gehalt in schwarzem Tee geringer ist, da die bei der Teefermentation ablaufende Oxidation die Entstehung von komplexen Verbindungen bewirkt (Belitz und Grosch, 2001). Im Gegensatz zu anderen Flavonoiden kommen die Catechine nicht als Glycoside gebunden in der Natur vor (Manach *et al.*, 2004).

Des Weiteren existieren dimere, oligomere und polymere Formen der Catechine, die Proanthocyanidine, welche auch unter dem Begriff ‚kondensierte Tannine‘ bekannt sind (Abbildung 1-11).

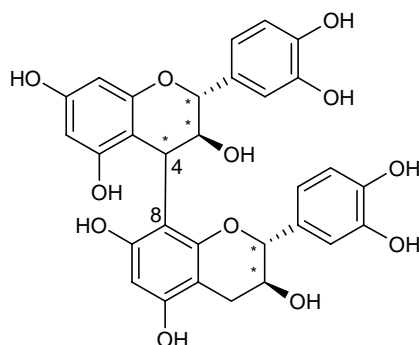


Abbildung 1-11: Struktur von Proanthocyanidin B₂

Dabei sind die Monomere über C-C-Bindungen zwischen C4 und C8 (C6) miteinander verknüpft. In Mostäpfeln liegt der Polymerisationsgrad zwischen vier und elf (Guyot *et al.*, 1998). Kondensierte Tannine sind bei vielen Früchten und Gemüse für den astringierenden Geschmack verantwortlich. Dies beruht auf der Komplexbildung dieser Polymere mit Speichelproteinen. Diese Tatsache ist auch für den bitteren Geschmack von Schokolade verantwortlich (Santos-Buelga und Scalbert, 2000).

Die tägliche Aufnahme von Catechinen und Proanthocyanidinen (Dimere und Trimere) liegt in Spanien bei 18-30 mg/d. Die Hauptquellen sind hierbei Äpfel, Birnen, Trauben und Rotwein. Die Aufnahme von höher polymerisierten Proanthocyanidinen wird auf mehrere Hundert Milligramm geschätzt, jedoch sind in diesem Bereich noch keine genauen Daten verfügbar (Manach *et al.*, 2004).

Eine wichtige Substanzgruppe aus der Familie der Flavonoide sind die Anthocyane. Die Aufnahme an Anthocyanen durch die Nahrung ist höher als bei allen anderen Flavonoiden (Cao und Prior, 1999a, Talavera *et al.*, 2005). Ältere Angaben gehen davon aus, dass die tägliche Aufnahme in den USA im Sommer bei 215 mg/d und im Winter bei 180 mg/d liegt (Kühnau, 1976, Clifford, 2000). Eine neuere Publikation geht von nur 12.5 mg/d in den USA aus (Wu *et al.*, 2006a). In Finnland, einem Gebiet in dem große Mengen an Beeren verzehrt werden, werden täglich 82 mg aufgenommen (Heinonen, 2001). Eine andere Studie aus Dänemark geht von einer Aufnahme von 75-150 mg/d aus (Dragsted *et al.*, 1996). Weltweit schätzt man die Menge, die allein durch blaue Trauben von den Menschen aufgenommen werden, auf 10000 Tonnen pro Jahr (Clifford, 2000).

Isoflavone werden ausgehend vom Naringenin von manchen Pflanzen über verschiedene Biosyntheseschritte gebildet (Fleschhut, 2004). Die Sojabohne ist der wichtigste Lieferant für Isoflavone. Sie beinhaltet Genistein, Daizein und Glycitein, die jeweils glycosidisch gebunden vorliegen. Isoflavone besitzen strukturelle Ähnlichkeit zu Estrogenen. Durch das Vorhandensein von Hydroxylgruppen in Position 7 und 4' besteht eine Strukturanalogie zu Estradiol. Daher besitzen diese Verbindungen die Eigenschaft am Estrogenrezeptor binden zu können. Man bezeichnet sie daher als Phytoestrogene. Sojabohnen können 580 - 3800 mg/kg FG und Sojamilch 30 - 175 mg/L Isoflavone enthalten (Manach *et al.*, 2004). Die tägliche Aufnahme an Isoflavonen liegt in den asiatischen Ländern bei 25-40 mg/d. Der Höchstwert liegt bei 100 mg/d (Adlercreutz *et al.*, 1991,

Coward *et al.*, 1993, Kimira M *et al.*, 1998). In Europa spielen Isoflavone eine untergeordnete Rolle in der Ernährung, da nur wenig Soja aufgenommen wird. Daher liegt die Aufnahme bei nur wenigen mg pro Tag (Manach *et al.*, 2004).

1.1.2 Biosynthese von Flavonoiden

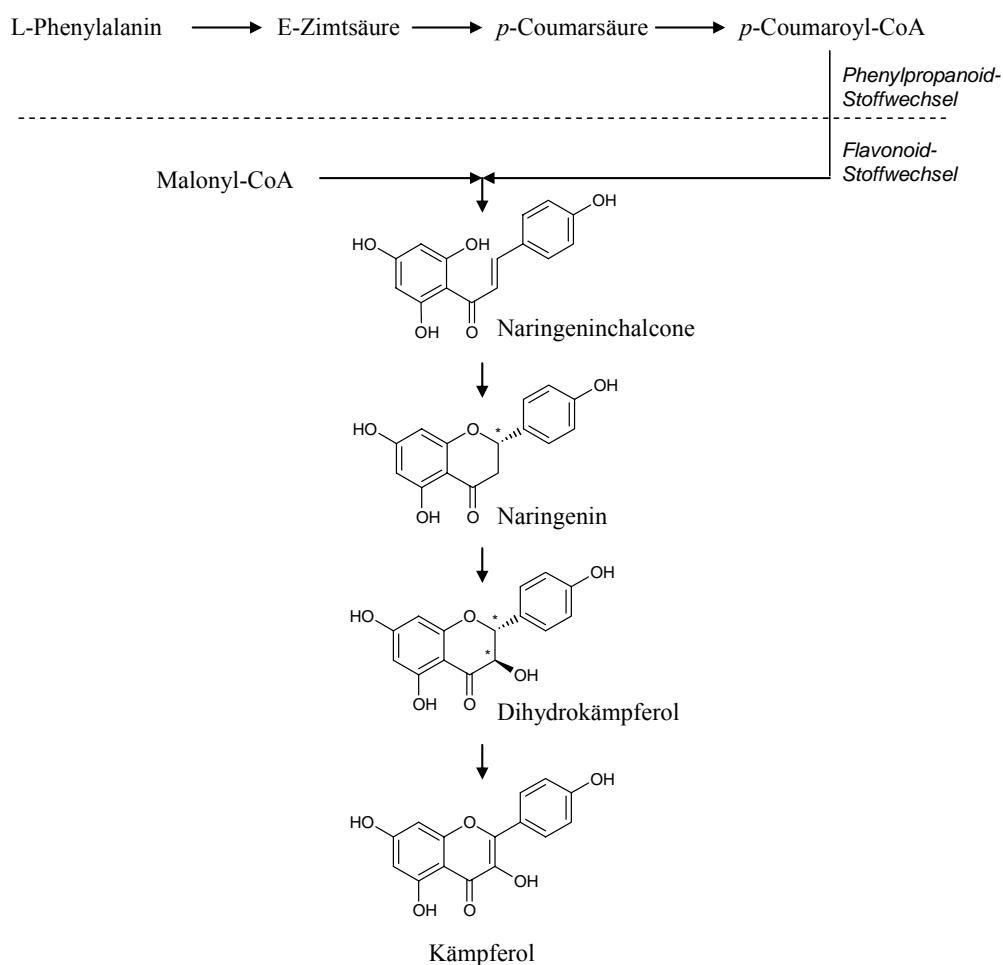


Abbildung 1-12: Biosynthese von Flavonoiden ausgehend von L-Phenylalanin in Heidelbeeren (nach Jaakola *et al.*, 2002)

Die Biosynthese der Flavonoide beginnt im Phenylpropanoid-Stoffwechsel. Abbildung 1-12 zeigt die Biosynthese bis zum Kämpferol im Falle der Heidelbeere. Ausgehend von der Aminosäure L-Phenylalanin wird durch das Enzym Phenylalanin-Amin-Lyase E-Zimtsäure hergestellt. Eine Zimtsäure-4-Hydroxylase bildet daraus p-Coumarsäure. Im folgenden Schritt wird durch eine 4-Coumaroyl-CoA-Ligase p-Coumaroyl-CoA

synthetisiert, welches in den Flavonoid-Stoffwechsel eingeht. Eine Chalconsynthase erzeugt daraus mit Malonyl-CoA, welches aus Acetyl-CoA gebildet wird, das Naringenchalcon. Das Flavon Naringenin entsteht durch das Einwirken einer Chalcon-Isomerase, welches im Folgenden durch eine Flavon-3-hydroxylase zu Dihydrokämpferol hydroxyliert wird. Ausgehend vom Dihydrokämpferol werden alle in der Heidelbeere vorkommenden Anthocyane und weitere Flavonoide hergestellt (Abbildung 1-13).

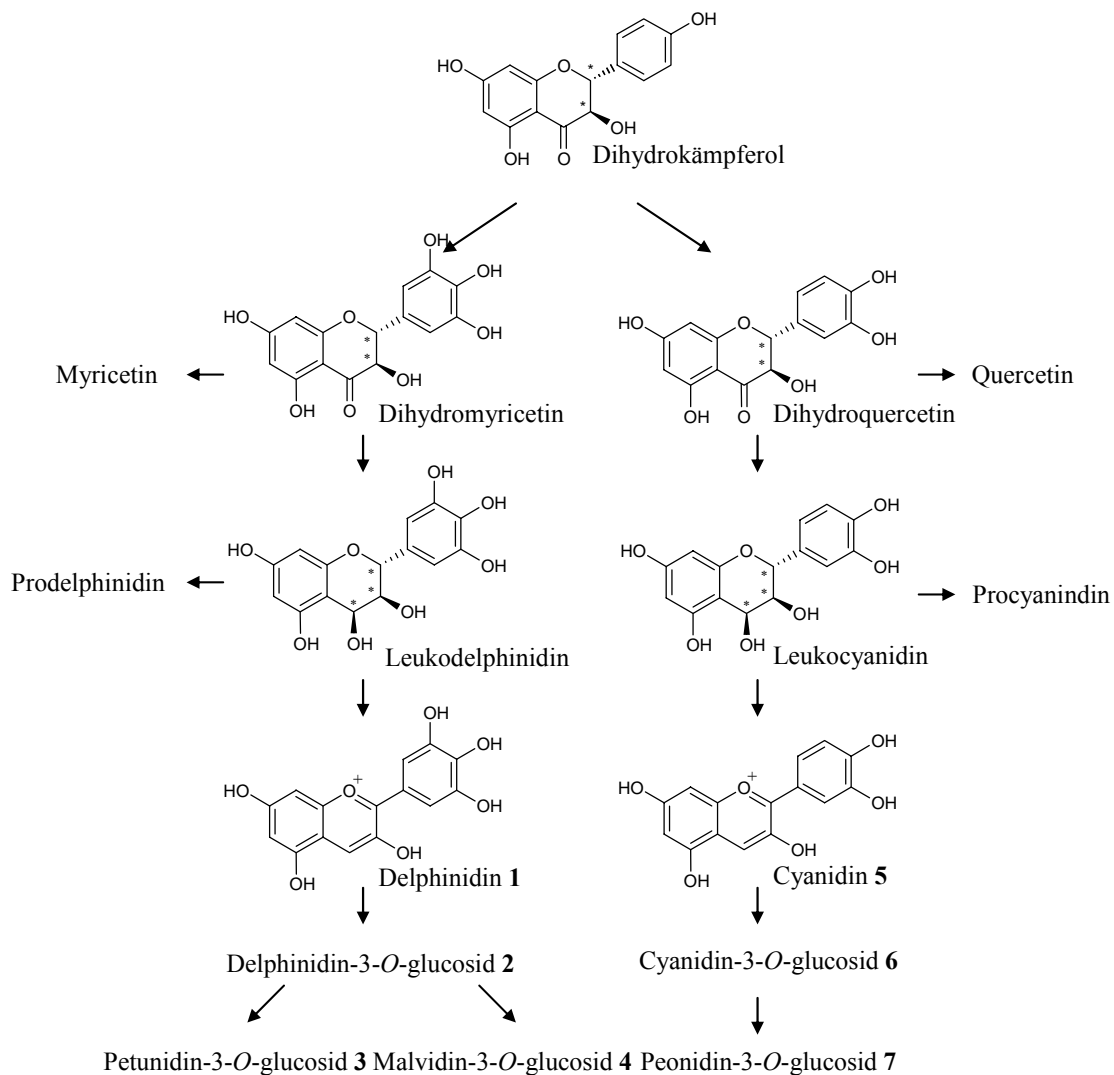


Abbildung 1-13: Biosynthese von Anthocyanen in der Heidelbeere ausgehend vom Dihydrokämpferol (nach Jaakola *et al.*, 2002)

Durch Hydroxylierung in 3'-Position durch eine Flavon-3'-hydroxylase wird Dihydroquercetin gebildet. Davon ausgehend entsteht Quercetin. Dihydromyricetin wird durch eine Flavon-3',5'-hydroxylase synthetisiert, woraus enzymatisch Myricetin entstehen

kann. Eine Dihydroflavonol-4-reduktase formt daraus entweder Leukocyanidin oder Leukodelphinidin. Aus den beiden ‚Leuko‘-Zwischenprodukten können durch eine Leukoanthocyanidinreduktase die jeweiligen Proanthocyanidine hergestellt werden. Cyanidinchlorid (Cy-Chlorid) **5** bzw. Delphinidinchlorid (Dp-Chlorid) **1** werden von einer Anthocyanidin-Synthase gebildet.

Die Glucosylierung wird von einer UDP-Glc-Flavonoid-3-*O*-Glucosyltransferase vorgenommen. Die methylierten Anthocyane, wie Peonidin-3-*O*-glucosid (Pn-3-*O*-glc) **7**, Petunidin-3-*O*-glucosid (Pt-3-*O*-glc) **3** oder Malvidin-3-*O*-glucosid (Mv-3-*O*-glc) **4**, werden durch Übertragen von Methylgruppen gebildet. Entsprechend werden die Galactoside und Arabinoside synthetisiert (Cooper-Driver, 2001, Jaakola *et al.*, 2002).

1.2 Die Anthocyane

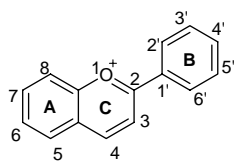
1.2.1 Allgemeines

Die Anthocyane sind, wie in Abschnitt 1.1.1.4 erläutert, eine Untergruppe der Flavonoide (Watzl *et al.*, 2002a). Sie bilden mit über 500 Verbindungen die größte Gruppe an wasserlöslichen Pigmenten im Pflanzenreich (Cooney *et al.*, 2004). Anthocyane ist der Überbegriff für die Anthocyanidine (Aglycone) und die Anthocyanine (Glycoside) (Watzl *et al.*, 2002a). In der Umgangssprache setzt man den Begriff Anthocyan gleich mit Anthocyanin. Anthocyane weisen eine positive Ladung am C-Ring auf (Flavyliumkation) und unterscheiden sich dadurch von anderen Flavonoiden. In der Pflanze ist Chlorid meist das Gegenion zum Flavyliumkation. Man spricht daher bei den Salzen von Flavyliumchloriden (Merken und Beecher, 2000).

Gemeinsam ist den Anthocyanidinen eine OH-Gruppe in Position 3 des C-Rings (Watzl *et al.*, 2002a). Die sechs wichtigsten in der Natur vorkommenden Aglycone variieren im Hydroxy- und Methoxy-Substitutionsmuster des B-Ringes. Diese sind das Dp-Chlorid **1**, das Cy-Chlorid **5**, das Peonidinchlorid (Pn-Chlorid) **8**, das Pelargonidinchlorid (Pg-Chlorid) **9**, das Malvidinchlorid (Mv-Chlorid) **10** und das Petunidinchlorid (Pt-Chlorid) **11** (Watzl *et al.*, 2002a, Cooney *et al.*, 2004). Tabelle 1-1 gibt das jeweilige Substitutionsmuster sowie die Farbe bei pH 1-3 im wässrigem Milieu wieder.

Tabelle 1-1: Übersicht über die sechs am häufigsten in der Natur vorkommenden Anthocyanidine (nach Watzl *et al.*, 2002a)

		Position							Farbe im pH-Bereich 1-3
		3	5	6	7	3'	4'	5'	
Cy-Chlorid	5	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Rot
Dp-Chlorid	1	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Violett
Mv-Chlorid	10	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Violett
Pg-Chlorid	9	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Orange
Pn-Chlorid	8	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Rot
Pt-Chlorid	11	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Violett



Anthocyane liegen in der Pflanze glycosidisch gebunden vor. Die Glycosylierung gilt als Voraussetzung für die Stabilität des Anthocyaninmoleküls (Watzl *et al.*, 2002a). Als Zuckerreste kommen v. a. Glucose, Galactose und Arabinose vor, aber auch Rhamnose oder Xylose sind nicht selten. Die Zucker sind meist in Position 3 oder in den Positionen 3 und 5 am Aglycon gebunden (3-*O*-Glycoside bzw. 3,5-*O*-Diglycoside). Beispiele hierfür sind Mv-3-*O*-glc **4** bzw. Cyanidin-3,5-diglucosid (Cy-3,5-*O*-diglc) (Abbildung 1-14).

Des Weiteren kommen als Zuckerreste auch Di-, Tri- oder Tetrasaccharide vor (Goiffon *et al.*, 1999, Clifford, 2000). Anthocyanidine liegen in selteneren Fällen auch an den Positionen 3 und 7 glycosyliert vor (Harborne und Williams, 2001, Murkovic, 2001), und auch eine Glycosylierung in Position 4' ist möglich (Fossen *et al.*, 2003).

Die Zuckerreste können auch acyliert sein. Bekannt sind Veresterungen der Zucker mit aliphatischen Säuren, wie Essig-, Oxal-, Propion-, Bernstein-, oder Malonsäure, sowie mit aromatischen Säuren, wie *p*-Hydroxybenzoe-, Ferula-, *p*-Coumar-, Sinapin- oder Kaffeesäure. Gefunden wurden diese Verbindungen z. B. in schwarzen Johannisbeeren, roten Zwiebeln, rotem Rettich oder Rotkohl (Slimestad und Solheim, 2002, Wu und Prior, 2005). In schwarzen Johannisbeeren kommt beispielsweise ein mit *p*-Cou-

marisäure acyliertes Anthocyan, das Cyanidin-3-*O*-(6''-*p*-coumaroylglucosid), vor (Abbildung 1-15) (Slimestad und Solheim, 2002).

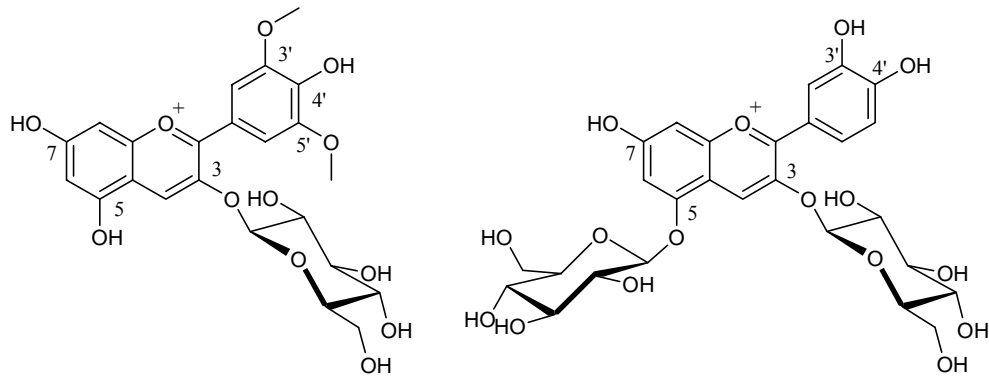


Abbildung 1-14: Struktur von Mv-3-*O*-glc 4 (links), das u. a. in Rotwein vorkommt und von Cy-3,5-*O*-diglc (rechts), einem Anthocyan, das in größeren Mengen in Holunderbeeren vorliegt.

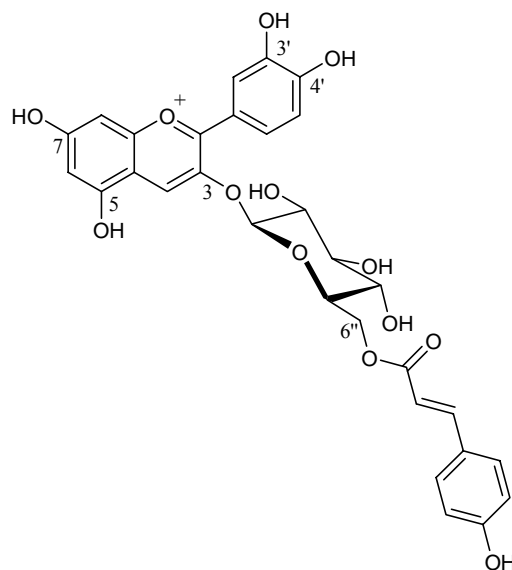


Abbildung 1-15: Struktur von Cyanidin-3-*O*-(6''-*p*-coumaroylglucosid), einem acylierten Anthocyan, identifiziert in schwarzen Johannisbeeren (*Ribes nigrum* L.) (Slimestad und Solheim, 2002)

Weiterhin sind auch Anthocyanidine, bei denen in Position 3 die Hydroxylgruppe fehlt, bekannt. Als Beispiel sind Apigeninidin oder Luteolinidin zu nennen. Es gibt aber auch solche, die eine weitere Hydroxylgruppe in Position 6 besitzen (6-Hydroxycyanidin, Aurantinidin) oder in 5- oder 7-Position methoxyliert vorliegen (Capensinidin, Europi-

nidin, Rosinidin, 5-Methylcyanidin). Diese Verbindungen kommen meist nur in Blütenblättern vor (Murkovic, 2001, Kong *et al.*, 2003, Tatsuzawa *et al.*, 2003). Mittlerweile wurden 5- oder 7-methoxylierte bzw. 3-dehydroxylierte Verbindungen auch in Sorghum-Arten identifiziert (Abbildung 1-16) (Wu und Prior, 2005).

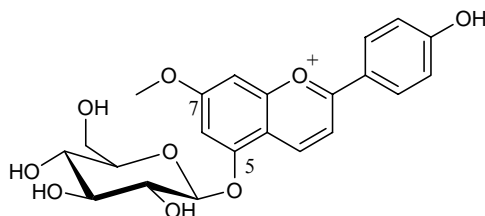


Abbildung 1-16: Struktur von 7-Methoxyapigeninidin-5-O-glucosid aus Sorghum-Arten (Wu und Prior, 2005)

1.2.2 Anthocyane: Farbe und pH-Abhängigkeit

Die Farbe der Anthocyane ist durch ein Absorptionsmaximum im visuellen Bereich bei 560–465 nm bedingt (Abbildung 1-17, Tabelle 1-1).

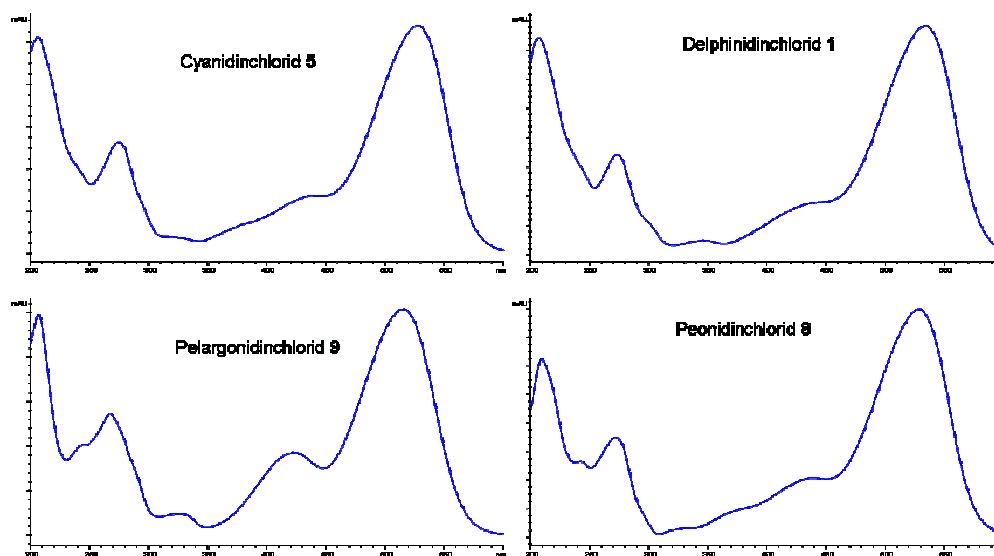


Abbildung 1-17: Absorptionsspektren verschiedener Anthocyanidine

Die Lage der Absorptionsmaxima ist von der Substitution am B-Ring abhängig. Mit zunehmender Hydroxylierung verschiebt sich das Absorptionsmaximum stärker zu hö-

heren Wellenlängen (Rotverschiebung, bathochromer Effekt). Eine Glycosylierung oder Methylierung dagegen bewirkt eine Blauverschiebung (hypsochromer Effekt) (Markakis, 1974, Giusti *et al.*, 1999, Merken und Beecher, 2000).

Des Weiteren ist die Farbe von der Struktur und dem pH-Wert abhängig, bei dem die Anthocyane im wässrigen Milieu vorliegen (Abbildung 1-18).

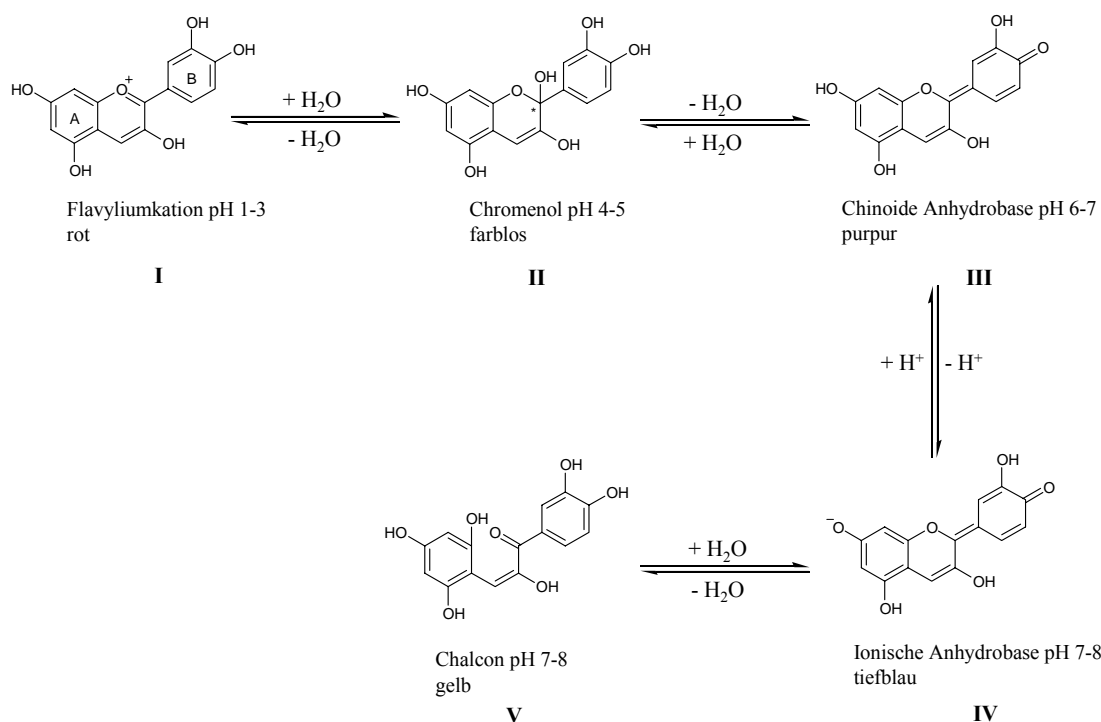


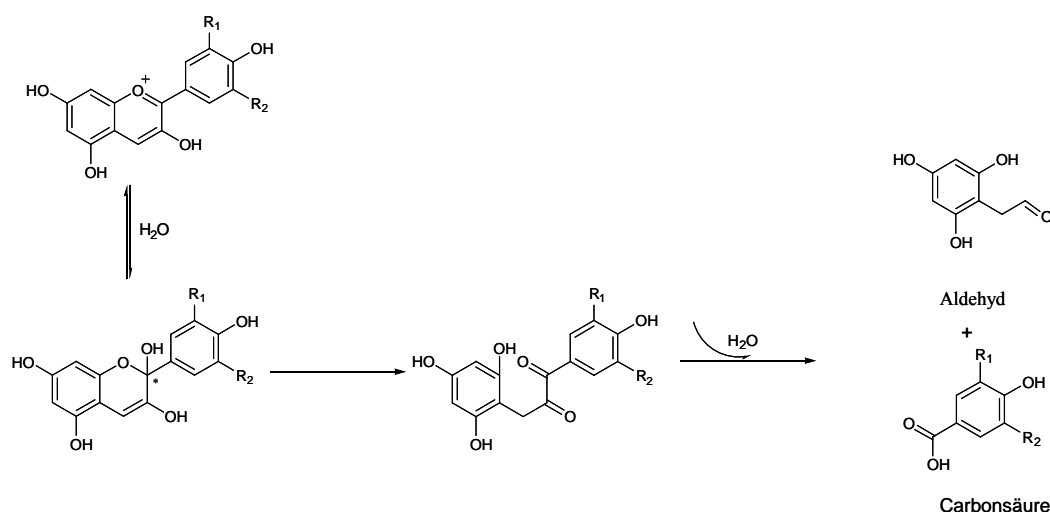
Abbildung 1-18: pH-Abhängigkeit von Anthocyanidinen am Beispiel von Cy-Chlorid 5 (nach Belitz und Grosch, 2001)

Bei niedrigen pH-Werten (pH 1-3) sind die Verbindungen auf Grund des mesomeriestabilisierten Benzopyrylium-Flavyliumkations rot gefärbt (Struktur **I**). Nur in diesem pH-Bereich ist das Flavyliumkation stabil. Mit steigendem pH-Wert (pH 4-5) geht es in die farblose Carbinolbase (Chromenol) über (Struktur **II**). Dies geschieht durch Anlagerung eines Hydroxid-Anions in 2-Position. Im pH-Bereich 6-7 erfolgt durch Wasserabspaltung die Bildung der chinoiden (purpurfarbenen) und ionischen (tiefblau) Anhydrobasen und eine Farbvertiefung (Strukturen **III** und **IV**). Bei pH 7-8 geht die Anhydrobase unter Ringöffnung in das gelbe Chalcon über (Struktur **V**). Der Farbumschlag tritt bei den einzelnen Anthocyanen bei unterschiedlichen pH-Werten ein (Jurd, 1972, Brouillard und Delaporte, 1977, Harborne, 1988, Mazza und Miniati, 1993, Lapidot *et al.*, 1999,

Belitz und Grosch, 2001, Aura, 2004). In der Pflanze liegen die Anthocyane im leicht sauren Zellsaft entweder als Flavyliumsalz oder als Pseudobase (Chromenol) vor (Kühnau, 1976).

1.2.3 Stabilität von Anthocyanidinen

Die Stabilität der Anthocyanidine hängt v. a. vom pH-Wert ab. Bei höheren pH-Werten zerfallen diese Substanzen. Die allgemein akzeptierte Vorstellung über den Zerfallsweg ist in Abbildung 1-19 dargestellt (Markakis, 1974, Clifford, 2000, Seeram *et al.*, 2001). Nach einer Anlagerung von Wasser geht das Anthocyanidin ab pH 7 in die Chalconstruktur über. Diese lagert sich über eine Keto-Enol-Tautomerie in ein α -Diketon um.



Anthocyanidin	Carbonsäure	R ₁	R ₂
Pg-Chlorid 9	p-OH-Benzoesäure	H	H
Cy-Chlorid 5	Protocatechusäure	OH	H
Dp-Chlorid 1	Gallussäure	OH	OH
Mv-Chlorid 10	Syringasäure	OCH ₃	OCH ₃
Pn-Chlorid 8	Vanillinsäure	OCH ₃	H
Pt-Chlorid 11	3-Methoxy-4,5-hydroxybenzoesäure	OCH ₃	OH

Abbildung 1-19: Zerfall und Zerfallsprodukte von Anthocyanidinen; pH > 7 (nach Jurd, 1972, Markakis, 1974, Clifford, 2000)

Dieses ist instabil und zerfällt rasch in einen Aldehyd, 2,4,6-Trihydroxyphenylacetaldehyd, und ein Benzoesäurederivat (Abbildung 1-19).

Liegt das Anthocyanidin in Position 3 glycosyliert vor, erhöht dies die Stabilität (Clifford, 2000). Eine weitere Stabilisierung bewirken Acylierungen am Zuckerrest (Bridle und Timberlake, 1997). Des Weiteren ist der Zerfall von der Temperatur abhängig. Mit steigender Temperatur und höherem pH-Wert nimmt die Geschwindigkeit zu (Jurd, 1972).

Die beim Zerfall entstehende Carbonsäure ist charakteristisch für das jeweilige Anthocyanidin, wobei die Reste am Aromaten denen am B-Ring des ursprünglichen Anthocyanins entsprechen. Der entstehende Aldehyd ist bei Dp-Chlorid **1**, Cy-Chlorid **5**, Pg-Chlorid **9**, Pn-Chlorid **8**, Mv-Chlorid **10** und Pt-Chlorid **11** jeweils gleich.

1.2.4 Bildung von Komplexen

Auf Grund ihrer Struktur sind Anthocyane befähigt, mit Metallionen wie Al^{3+} und Fe^{3+} -Chelatkomplexe zu bilden (Goto *et al.*, 1986). Dies führt zu einer Blauverschiebung (hypsochromer Effekt) (Harborne, 1988). Die Bildung solcher Metallkomplexe wird auch in der Natur beobachtet. So wurden aus den Blütenblättern der Tagblume (*Commelina communis*) Metalloanthocyane isoliert, die Calcium- oder Eisenionen beinhalten. Auch in den Blütenblättern der Kornblume (*Centaurea cyanus*) hat man solche Metalloanthocyane gefunden. Blüten der Hortensie (*Hydrangea*) besitzen Metalloanthocyane mit Aluminium als Metallion (Cooper-Driver, 2001). Ein supramolekularer Anthocyanin-Metallkomplex mit Magnesium wurde in den Blütenblättern von Salbei (*Salvia patens*) identifiziert (Tadao Kondo, 2001).

1.2.5 Copigmentierung von Anthocyanen

Die Copigmentierung ist seit mittlerweile über neunzig Jahren bekannt. Sie ist ein sehr wirkungsvoller Mechanismus zur Stabilisierung der Farbe und kommt v. a. in den höheren Pflanzen vor (Dimitrić Marković *et al.*, 2005). Neben einer höheren Stabilität des Anthocyanmoleküls bewirkt eine inter- oder intramolekulare Copigmentierung eine

Verstärkung der Farbtintensität (hyperchromer Effekt). Außerdem erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen (bathochromer Effekt) (Asen *et al.*, 1972, Malien-Aubert *et al.*, 2001, Eiro und Heinonen, 2002, Schwarz *et al.*, 2005). Die Wechselwirkungen beruhen dabei auf schwachen π - π -Interaktionen zwischen aromatischen Kernen; dies bezeichnet man als intermolekulare Copigmentierung. Eine solche entsteht, wenn durch kovalente Bindung eines Moleküls an das Anthocyan das Absorptionsmaximum verstärkt oder verschoben wird. Dies ist z. B. bei acylierten Anthocyanen der Fall. Auch eine kovalente Verknüpfung mit Flavonen kann vorkommen (Mazza und Brouillard, 1990, Dangles *et al.*, 1993, Figueiredo *et al.*, 1996, Bloor und Falshaw, 2000, Fossen *et al.*, 2000, Cooper-Driver, 2001, Eiro und Heinonen, 2002).

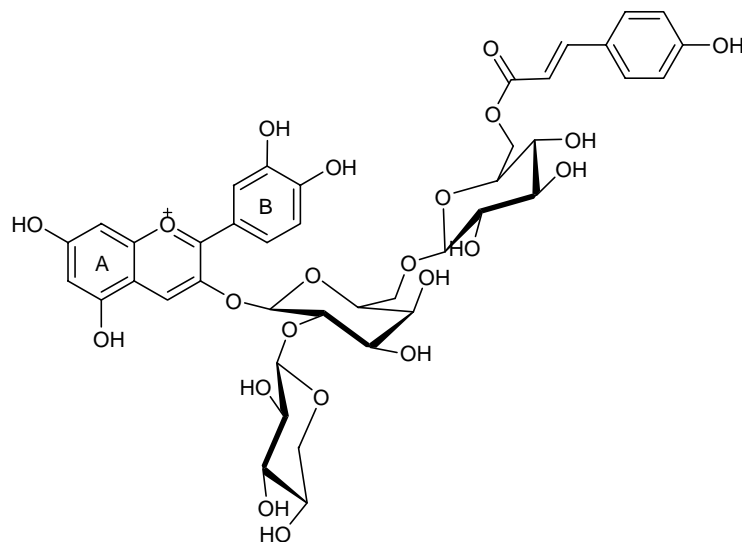


Abbildung 1-20: Ein copigmentiertes Anthocyan: Cyanidin-3-*O*-(2''-*O*- β -xylopyranosyl-6''-*O*-(6-*O*-((*E*)-coumaroyl)- β -glucopyranosyl))- β -galactosid (Eiro und Heinonen, 2002)

Als Copigmente können verschiedene Moleküle fungieren. So besitzen Polyphenole, organische Säuren, Alkaloide, Aminosäuren aber auch selbst die DNA die Eigenschaft mit Anthocyanen zu interagieren (Mazza und Brouillard, 1987, 1990, Cooper-Driver, 2001). Dabei erhöht sich die Stabilität des Flavylumions, indem das Gleichgewicht von der Carbinolbase in Richtung des Flavylumsalzes verschoben wird. Dadurch findet ein Zerfall des Moleküls nicht so leicht statt (Malien-Aubert *et al.*, 2001, Fossen *et al.*,

2004). In Abbildung 1-20 ist als Beispiel ein copigmentiertes Anthocyan dargestellt, welches am Zuckerrest coumaryliert vorliegt.

1.3 Synthesewege für Anthocyanidine

Die Synthese von Verbindungen mit Pyrylium-Struktur ist seit dem frühen 20. Jahrhundert bekannt. 1922 veröffentlichten Pratt und Robinson die erste Synthesevorschrift für Pyryliumsalze des Anthocyanidintyps (Pratt und Robinson, 1922). Bis 1935 folgten weitere Publikationen dieser Arbeitsgruppe, in denen die Darstellung von verschiedenen Anthocyanen beschrieben ist. Im Allgemeinen gehen die verschiedenen Synthesen von zwei Verbindungen aus, die miteinander in gesättigter HCl-Gasatmosphäre unter Wasserabspaltung kondensiert werden. Verwendet werden 2-Acylbenzaldehyd-Derivate, die im Anthocyanidin den A-Ring darstellen und unterschiedlich substituierte Acetophenone, um Anthocyanidine mit verschiedenen Substitutionsmustern am B-Ring zu erhalten. Soll der B-Ring des Anthocyanidins Hydroxylgruppen tragen, werden acetyl-geschützte Hydroxyacetophenone eingesetzt. Eine Hydroxylgruppe in 3-Position eines Anthocyanidins wird erhalten, indem ein ω -Acetoxyacetophenon verwendet wird; fehlt die Acetoxy-Gruppe, erhält man 3-Desoxyanthocyanidine. Für Anthocyanidine, die eine Hydroxylierung in 5- und 7-Position besitzen, gebraucht man 2-Benzoyloxy-4,6-benzaldehyd. Dabei werden nach der Kondensation beider Komponenten 5-Benzoylanthocyanidine erhalten. Die Benzoylgruppe des jeweiligen Anthocyanidins wird im Alkalischen abgespalten. Dieser Schritt muss, auf Grund der geringen Stabilität der Anthocyanidine im Alkalischen, vorsichtig durchgeführt werden (Pratt und Robinson, 1925a).

Die Schwierigkeit bei der Synthese dieser Verbindungen liegt in der Darstellung des jeweiligen Acetophenons. Die Synthesen gehen meist von einfachen Phenolen, wie z. B. Catechol bei Cy-Chlorid **5**, aus. Diese setzt man mit Chloracetylchlorid und AlCl_3 in einer Fries-Umlagerung um. Das Chlor, eine gute Abgangsgruppe, kann leicht durch Acetat substituiert werden. Soll ein 3-Desoxyanthocyanidin hergestellt werden, genügt die Umsetzung mit Acetylchlorid.

Eine andere Möglichkeit zur Synthese von Acetophenonen geht von Phenolcarbonsäuren aus, die in Form ihres Säurechlorids aktiviert werden und leicht mit Diazomethan

abreagieren. Ausgehend vom ω -Azoacetophenon ist ω -Acetoxyacetophenon leicht zugänglich. Diese Methode kann sehr gut für die Synthese von Dp-Chlorid **1** verwendet werden (Pratt und Robinson, 1924, Pratt und Robinson, 1925a, Pratt und Robinson, 1925b, Nolan *et al.*, 1926, Murakami und Robinson, 1928, Robertson und Robinson, 1928, Robertson *et al.*, 1928, Charlesworth und Robinson, 1934).

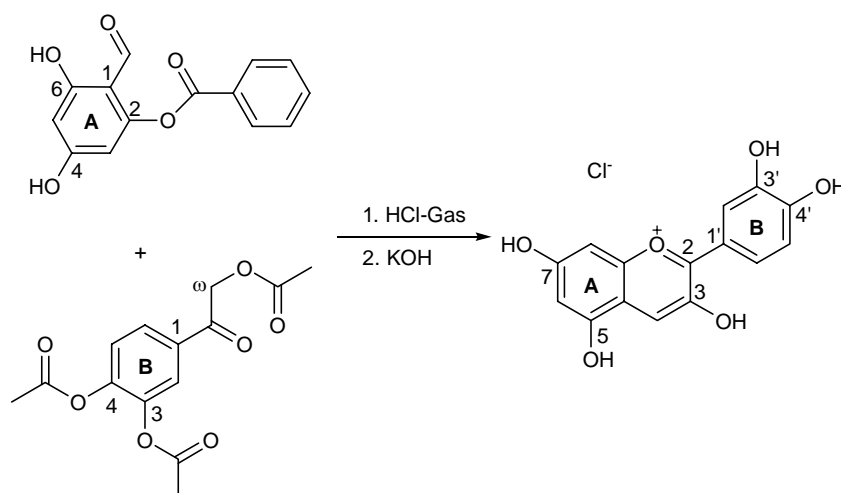


Abbildung 1-21: Synthesemöglichkeit von Anthocyanidinen dargestellt am Beispiel von Cy-Chlorid **5** (Pratt und Robinson, 1925a)

Eine Abwandlung dieser Methode beschreibt ein Patent. Hier wird das Säurechlorid mit einem Grignardprodukt aus Magnesium und Diethylmalonat umgesetzt und reagiert nach Abspalten der Ethylreste zum Acetophenon. Nach Halogenierung mit Brom wird dieses wiederum mit Acetat zum ω -Acetoxyacetophenon substituiert (Gabetta und Giorgi, 1990).

1.4 Vorkommen von Anthocyanen in der Natur

Die Anthocyane liegen in der Natur ubiquitär vor. Cyandin-3-*O*-glucosid (Cy-3-*O*-glc) **6** ist das in der Natur am häufigsten vorkommende Anthocyan (Kühnau, 1976). Das am weitesten verbreitete Anthocyanidin stellt Cy-Chlorid **5** dar. In unserer täglichen Nahrung kommen Anthocyane in Gehalten bis zu 10 g/kg Frischgewicht vor. Sehr hohe Anteile besitzen Heidelbeeren, Holunderbeeren, die Früchte der Aronia, sowie Brom-

beeren. Auch Schwarze Johannisbeeren enthalten große Mengen an Anthocyanen. Die in der Literatur angegebenen Gehalte, schwanken zum Teil sehr stark. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Anteil an diesen farbgebenden Substanzen stark vom Reifegrad, der Lagerung, von genetischen Faktoren und von den Nährstoffbedingungen der Pflanze abhängt. Auch spielen Witterungsbedingungen und der Bodentyp am Standort der Pflanze eine Rolle. Ebenso ausschlaggebend für die Analysenergebnisse ist die zur Quantifizierung verwendete Methode (Mazza und Miniati, 1993, Prior *et al.*, 1998, Jeppsson, 2000). In Tabelle 1-2 wird ein Überblick über die Gehalte von Anthocyanen in verschiedenen Nahrungsmitteln gegeben. Oftmals werden die quantifizierten Mengen an Anthocyanen in Form von Cy-3-O-glc-Äquivalenten angegeben. Diese Auswertung muss jedoch kritisch betrachtet werden, da die einzelnen Anthocyane unterschiedliche Absorptionsmaxima aufweisen und somit nicht die tatsächlichen Werte vorliegen. Nachfolgend wird auf die Anthocyanzusammensetzung von Heidelbeeren näher eingegangen.

Tabelle 1-2: Anthocyanengehalte von verschiedener Früchten, Gemüse und Rotwein

Nahrungsquelle	Hauptanthocyane	mg/100g FG	Literatur
Aronia	Cy-3-O-gal 15 Cy-3-O-glc 6 Cy-3-O-ara 14	200-1000 800 1480	Clifford, 2000, Watzl <i>et al.</i> , 2002a Mazza und Miniati, 1993 Wu et al., 2004a
Auberginen	Cy-3-O-rut, Dp-3-O-glc 2 Dp-3-O-rut	750	Clifford, 2000, Watzl <i>et al.</i> , 2002a
Brombeere	Cy-3-O-glc 6	115 83-326 80-230	Clifford, 2000, Watzl <i>et al.</i> , 2002a Mazza und Miniati, 1993 Moyer et al., 2002
Erdbeere	Pg-3-O-glc	23.8	Nyman und Kumpulainen, 2001

Nahrungsquelle	Hauptanthocyane	mg/100g FG	Literatur	
Heidelbeere	Cy-3-O-ara	14	230	Jurd, 1972
	Cy-3-O-gal	15	100-370	Murkovic, 2001
	Cy-3-O-glc	6	25-495	Mazza und Miniati, 1993
	Dp-3-O-ara	12	300-698	Clifford, 2000, Watzl <i>et al.</i> ,
	Dp-3-O-gal	13	83-420	2002a
	Dp-3-O-glc	2	599.7	Kaehkoenen <i>et al.</i> , 2003
	Mv-3-O-glc	4	360	Nyman und Kumpulainen, 2001
	Pt-3-O-glc	3	73-515 12-197	Moyer <i>et al.</i> , 2002 Sellappan <i>et al.</i> , 2002
Himbeere	Cy-3-O-glc	6	10-60	Clifford, 2000, Watzl <i>et al.</i> ,
	Cy-3-O-rut		20-60	2002a
	Cy-3-O-sam		52-230	Mazza und Miniati, 1993 Moyer <i>et al.</i> , 2002
Holunderbeere	Cy-3-O-glc	6	1374.4	Wu <i>et al.</i> , 2004a
Preiselbeere	Cy-3-O-ara	14	68.2	Kaehkoenen <i>et al.</i> , 2003
	Cy-3-O-gal	15		
Rhabarber	n. b.		0-200	Clifford, 2000, Watzl <i>et al.</i> ,
				2002a
Blaue Weintrauben	Mv-3-O-glc	4	100-320	Lapidot <i>et al.</i> , 1998
	sortenabh.		30-750	Clifford, 2000
Rote Zwiebeln	Cy-3,5-O-diglc		10-20	Murkovic, 2001
			9-21	Wang <i>et al.</i> , 1997
	Cy-3-O-glc	6	0-25	Clifford, 2000, Watzl <i>et al.</i> ,
	Cy-3-O-soph		15	2002a Mazza und Miniati, 1993
Rotkohl	Acetylierte Anthocyane		25	Clifford, 2000, Watzl <i>et al.</i> ,
				2002a

Nahrungsquelle	Hauptanthocyane	mg/100g FG	Literatur
Sauerkirschen	Cy-3-O-glc Cy-3-O-rut	6 35	Mazza und Miniati, 1993
Schwarze Johannisbeere	Cy-3-O-rut, Dp-3-O-rut Dp-3-O-glc	2 235.6 130-400 135	Kaehkoenen et al., 2003 Clifford, 2000, Watzl <i>et al.</i> , 2002a Nyman und Kumpulainen, 2001
Süßkirschen	Cy-3-O-glc Cy-3-O-rut	6 350-450 2-450	Mazza und Miniati, 1993 Clifford, 2000, Watzl <i>et al.</i> , 2002a

1.5 Die Heidelbeere

1.5.1 Taxonomie der Heidelbeere

Die Heidelbeeren (*Vaccinium*) sind eine Gattung aus der Familie der Heidekrautgewächse (*Ericaceae*) mit etwa 100-150 Arten. Tabelle 1-3 gibt einen Überblick über die Taxonomie der Heidelbeere. Umgangssprachlich ist mit ‚Heidelbeere‘ oft die Blaubeere gemeint. In Österreich und in Teilen Bayerns werden die Heidelbeeren auch als Schwarzbeeren bezeichnet. In Tirol sind sie als Mostbeeren, in der Eifel als ‚Moppeln‘ und im Raum der Lüneburger Heide als ‚Bickbeere‘ bekannt. Allgemein wird zwischen Wild- und Kulturheidelbeere unterschieden (Franke, 1997).

Tabelle 1-3: Taxonomie der Heidelbeere

Abteilung:	Blütenpflanzen (<i>Magnoliophyta</i>)
Klasse:	Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige (<i>Rosopsida</i>)
Unterklasse:	Asterähnliche (<i>Asteridae</i>)
Ordnung:	Heidekrautartige (<i>Ericales</i>)
Familie:	Heidekrautgewächse (<i>Ericaceae</i>)
Gattung:	Heidelbeeren (<i>Vaccinium</i>)
Art	Blaubeere

1.5.2 Die Wildheidelbeere

Die Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.) (Abbildung 1-22) ist auch unter den oben genannten Synonymen bekannt. Die Halbsträucher werden ca. 20 – 50 cm hoch und erreichen ein Alter von bis zu 30 Jahren. Sie wachsen v. a. auf feucht-sauren Standorten wie den Böden der Heide, des Moors oder des Nadelwaldes und sind weitgehend in den gemäßigten Breiten der nördlichen Hemisphäre zu finden. Die Vermehrung findet vegetativ oder durch Ausläufer statt. Dadurch kann eine einzige Pflanze bis zu 1000 m² bedecken. Die Farbstoffe, die Anthocyane, befinden sich in der Schale sowie im Fruchtfleisch. Die Früchte haben eine rundlich abgeplattete Form, werden bis zu 1 cm groß und hängen einzeln am Heidelbeerstrauch. Die Beeren sind mittlerweile ein teures Obst geworden und werden in Deutschland auf Grund des hohen Arbeitsaufwandes weniger gewerblich gesammelt. Die Früchte werden vornehmlich aus Österreich oder dem Balkan importiert. Die Haupterntezeit liegt im Zeitraum Juli bis September. Verzehrt werden die stark färbenden Früchte roh, gezuckert, eingemacht oder als Beimischung zu Joghurt. Getrocknete Beeren werden bei Durchfallerkrankungen verwendet (Franke, 1997). In der Volksmedizin werden die Früchte auch zur Linderung bei Morbus Crohn eingesetzt (Blaschek *et al.*, 2005)



Abbildung 1-22: Beeren und Strauch der Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.)

1.5.3 Die Kulturheidelbeere

Die Kulturheidelbeere (*Vaccinium corymbosum*), auch unter dem Synonym ‚Zucht Heidelbeere‘ oder ‚Amerikanische Heidelbeere‘ bekannt, ist neben der Preiselbeere die wirtschaftlich wichtigste Ericaceae-Spezies. Im Gegensatz zur Wildheidelbeere handelt es sich nicht um Halbsträucher, sondern um Sträucher, die bis zu 2 m (in Ausnahmen bis 4 m) hoch werden können. Die Kulturheidelbeere benötigt humusreiches, saures Erdreich sowie einen sonnigen bis halbschattigen Standort und gedeiht besonders auf Moorböden. Die Sträucher können bis zu 70 Jahre alt werden. Die Kulturheidelbeere wurde seit 1950 weltweit verbreitet. Angebaut wird die Kulturform hauptsächlich in den USA (in den südlichen und östlichen Staaten, v. a. in Kalifornien). Sie wird auch in Deutschland, Frankreich, Spanien, Niederlanden, Polen, Österreich, Neuseeland und Chile kultiviert. Allein in den USA werden bis zu 100.000 Tonnen pro Jahr geerntet. Im Gegensatz zur Wildheidelbeere befinden sich die farbgebenden Anthocyane nur in der Schale der Kulturheidelbeere und nicht im Fruchtfleisch. Die Früchte werden ca. doppelt so groß wie die der Wildheidelbeere und wachsen traubenartig am Strauch (Abbildung 1-23) (Franke, 1997).



Abbildung 1-23: Beeren und Strauch der Kulturheidelbeere (*Vaccinium corymbosum*)

1.6 Anthocyane – ihre physiologischen Eigenschaften

Bei Erkrankungen wie Morbus Crohn, Katarakt, Gelenkentzündungen wie Arthritis sowie bei koronaren Herzerkrankungen wird die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) diskutiert. Auch die Entstehung von Krebs wird mitunter mit der Einwirkung von radikalischen Sauerstoffspezies auf die DNA in Verbindung gebracht (Fleischhut, 2004). Den Anthocyanen werden auf Grund ihrer phenolischen Struktur und der daraus resultierenden Radikalfängeraktivität antioxidative Wirkungen zugesprochen (Kong *et al.*, 2003, Talavera *et al.*, 2004). Dies wird im Folgenden näher erläutert.

1.6.1 Entstehung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies und ihre Wirkungen auf den Organismus

Bei vielen biochemischen Prozessen in der Zelle entstehen aus dem für den Organismus lebensnotwendigen Sauerstoff in den Zellen ROS und RNS (Abbildung 1-24).

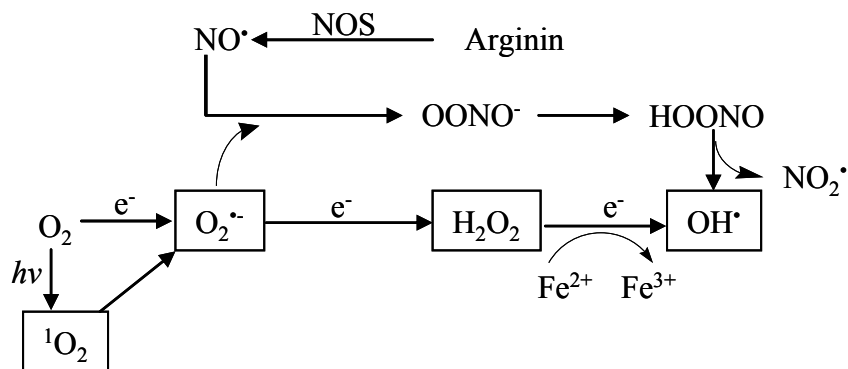


Abbildung 1-24: Entstehung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNS) (nach Reiter *et al.*, 2002)

Ein geringer Teil des der Zelle zur Verfügung stehenden Sauerstoffs wird durch Übertragung eines Elektrons zu einem Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$). Auch kann Sauerstoff nach Anregung zum Singulett-Sauerstoff (1O_2) zu $O_2^{\cdot-}$ reagieren. $O_2^{\cdot-}$ wird eine geringe

Reaktivität zugeschrieben, so dass es nur geringen Schaden im Organismus verursacht. Reagiert $O_2^{\cdot-}$ mit Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}), das durch eine Stickstoffmonoxid-Synthase aus der Aminosäure Arginin gebildet wird, entsteht Peroxynitrit, das zu einem reaktiven Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}) und Stickstoffdioxid (NO_2^{\cdot}) zerfallen kann. $O_2^{\cdot-}$ wird durch eine Superoxid-Dismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) abgefangen. Bei Anwesenheit von Übergangsmetallionen, wie z. B. Fe^{2+} , wird H_2O_2 zu OH^{\cdot} abgebaut (Reiter *et al.*, 2002).

Der Körper besitzt verschiedene Schutzmechanismen, um solche reaktiven Verbindungen abzufangen. Man kann sie in nichtenzymatische Antioxidantien und enzymatische Systeme unterteilen. Zu den erstgenannten gehören z. B. Vitamin C, Glutathion oder auch Vitamin E. Diese Substanzen können oxidiert werden und fangen Radikale ab. Die schon erwähnte SOD, Glutathion-Peroxidase und Katalase sind wichtige Enzymsysteme zur Inaktivierung von Radikalen im Körper. SOD katalysiert die Inaktivierung von Superoxid-Radikalen, indem das Enzym die Umwandlung in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff bewirkt. Dabei entstehendes Wasserstoffperoxid kann im Anschluss durch Katalase abgebaut werden (Abbildung 1-25).

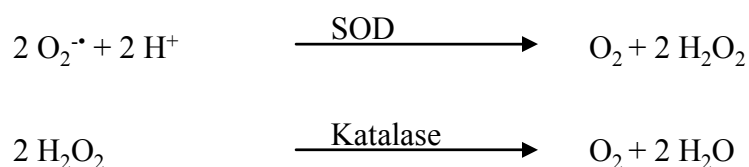


Abbildung 1-25: Abfangen von Superoxid-Radikalanionen durch SOD und Katalase

Die Glutathion-Peroxidase trägt auch zur Entstörung von Wasserstoffperoxid bei. Dabei überträgt das Enzym Wasserstoff von Glutathion (GSH) auf Wasserstoffperoxid. Es entsteht Wasser und oxidiertes GSH in Form eines Dimers (GSSG) (Abbildung 1-26) (Buschmann, 2002).

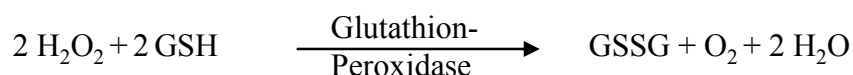


Abbildung 1-26: Abbau von Wasserstoffperoxid durch Glutathion-Peroxidase

Gewinnen reaktive Sauerstoffspezies in der Zelle im Vergleich zu den Antioxidantien Überhand, spricht man von oxidativem Stress. Folgen davon können Entzündungen und degenerative Erkrankungen sein. Dazu gehören auch Krebserkrankungen, die v. a. durch DNA-Strangbrüche, sowie Basen- und Nucleotid-Modifikationen verursacht werden. Diese entstehen besonders in den Sequenzen mit hohem Anteil an Guanosin durch die Einwirkung von ROS und RNS (Bennett, 2001). Weiterhin zu nennen sind koronare Herzerkrankungen, die v. a. auf die Oxidation von Biopolymeren, wie LDL, zurück zu führen sind. Diese beruht auf der Reaktion von freien Radikalen, die z. B. aus Peroxynitrit entstehen, mit den Lipiden (Abbildung 1-27), dem Cholesterin und dem Proteinanteil. Diese Veränderungen führen zu einer verstärkten Ablagerung von oxidiertem LDL an den Gefäßwänden und Entstehung von Arteriosklerose (Herpfer, 1998, Ichiyanagi *et al.*, 2004a).

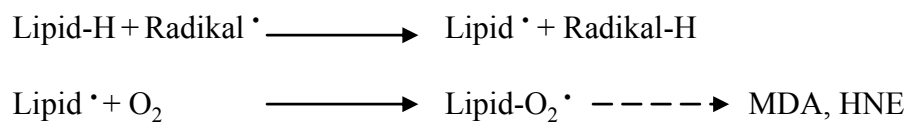


Abbildung 1-27: Lipidperoxidation und Zerfall des Lipoperoxids zu Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (HNE)

Bei der Oxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren im LDL entstehen als Sekundärprodukte reaktive Verbindungen wie Malondialdehyd (MDA) oder 4-Hydroxynonenal (4-HNE). MDA ist durch das Vorhandensein zweier Carbonylgruppen an der Quervernetzung von Proteinen beteiligt. Dies wird durch die Bildung von Schiff'schen Basen zwischen MDA und zwei ϵ -Aminogruppen, z. B. von Lysin, bewirkt (Abbildung 1-28).

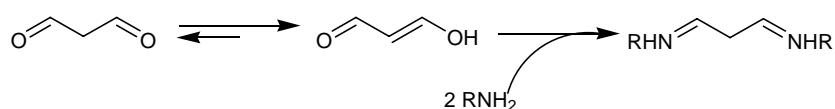


Abbildung 1-28: Quervernetzung von Proteinen durch die Bildung von Schiff'schen Basen mit Malondialdehyd (MDA)

4-HNE bildet v. a. in einer Michael-Addition mit ϵ -Aminogruppen von Lysin, mit Imidazol-Resten von Histidin oder auch mit Sulfhydryl-Gruppen von Cystein in Proteinen Addukte (Gardner, 1979, Stadtman und Berlett, 1997)

1.6.2 Antioxidative Wirkung der Anthocyane

Allgemein werden mit der antioxidativen Aktivität von Verbindungen verschiedene Effekte wie z.B. die antiinflammatorische (entzündungshemmende) Wirkung in Zusammenhang gebracht (Wang *et al.*, 1997, Tsuda *et al.*, 1998, Mazza *et al.*, 2002, Wang und Mazza, 2002, Youdim *et al.*, 2002). Eine anticancerogene Wirkung wird diskutiert (Kamei *et al.*, 1995, Kang *et al.*, 2003, Katsube *et al.*, 2003). Die Blutplättchenaggregation konnte *in vitro* inhibiert werden (Morazzoni und Magistretti, 1990).

Die antioxidative Wirkung von Polyphenolen und damit auch der Anthocyane beruht auf dem Transfer von Elektronen oder Wasserstoffatomen von Hydroxylgruppen auf die reaktiven Sauerstoffspezies bzw. Radikale (Kong *et al.*, 2003). Damit kann z.B. die Lipidperoxidation sowie die Bildung von weiteren reaktiven Sauerstoffspezies oder eine Proteinoxidation verhindert werden (Ramirez-Tortosa *et al.*, 2001, Katsube *et al.*, 2003, Viljanen *et al.*, 2004). Die Polyphenole der Heidelbeere sollen ein sehr großes Potential zur Verhinderung von Protein- und Lipidoxidation besitzen (Viljanen *et al.*, 2004). LDL weist spezifische Bindungsstellen für Kupfer auf, das eine Oxidation katalysieren kann. Binden Anthocyane an LDL, kann diese Oxidation verhindert werden (Satue-Gracia *et al.*, 1997). Eine weitere wichtige Eigenschaft der Anthocyane ist die Fähigkeit, an oxidativen Prozessen beteiligte Metallionen zu komplexieren. (Sarma *et al.*, 1997). Kommt es zur Oxidation eines Anthocyan durch ein Radikal, kann das entstehende Radikal über das konjugierte π -Elektronensystem des Anthocyan delokalisiert und stabilisiert werden; eine Radikalkettenreaktion wird damit unterbunden (Abbildung 1-29). Anthocyane gelten daher als Radikalfänger, was in mehreren *in vivo*- und *in vitro*-Studien bewiesen wurde (Tsuda *et al.*, 2003).

Tsuda *et al.* gehen davon aus, dass Anthocyane und deren Metabolite zur antioxidativen Aktivität im Blutplasma beitragen könnten. Nach der Applikation von Cy-3-O-glc **6** ermittelte man **6** in einer Konzentration von $0.31 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$. Der Metabolit Protocatechusäure wurde mit $2.56 \pm 0.26 \mu\text{mol/L}$ bestimmt. Die Ergebnisse deuten an, dass die

Metaboliten eher zum antioxidativen Status im Plasma beitragen als das Anthocyan selbst (Tsuda *et al.*, 1999). Eine Studie von Nielsen *et al.*, die mit WHHL-Kaninchen (**W**atanabe **h**eritable **h**yper**l**ipidemic rabbit, Kaninchen mit Hypercholesterinämie) durchgeführt wurde, zeigte, dass die aufgenommenen Anthocyane keinen Effekt in Bezug auf die antioxidative Kapazität von Plasma haben (Nielsen *et al.*, 2003). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Wang *et al.*. Die Autoren testeten 14 verschiedene Anthocyane, mit Pg-Chlorid **9**, Pn-Chlorid **8**, Mv-Chlorid **10**, Dp-Chlorid **1** und Cy-Chlorid **5** als Aglycon, auf ihre Radikalfängerkapazität. Es zeigte sich, dass Cy-3-O-glc **6** die höchste antioxidative Radikalfängerkapazität von allen getesteten Anthocyanen besitzt (Wang *et al.*, 1997). **6** kommt in größeren Mengen auch in der Heidelbeere vor (Kaehkoenen *et al.*, 2003). Die Polyphenole der Heidelbeere zeigten eine hohe antioxidative Kapazität und stellen daher eine reiche Quelle für Antioxidantien dar (Sellappan *et al.*, 2002).

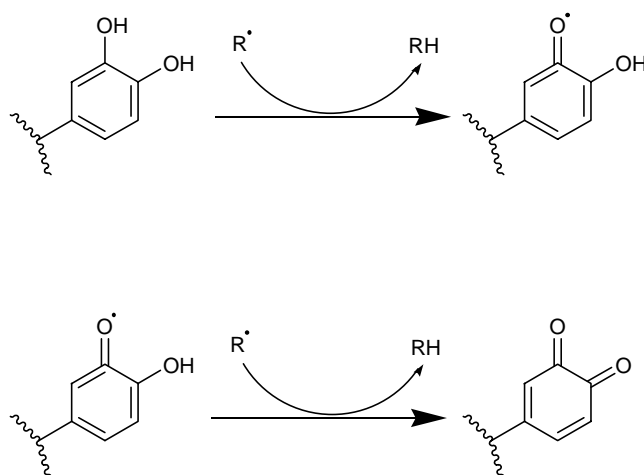


Abbildung 1-29: Prinzip antioxidativer Wirkung bei Flavonoiden (nach Pietta, 2000)

Somit zeigte sich, dass die Anthocyane als auch ihre Metabolite vermutlich zur antioxidativen Wirkung und damit zur Vermeidung von oxidativen Schäden im menschlichen Organismus beitragen könnten.

1.6.2.1 Schutz vor koronaren Herzerkrankungen

Phenolische Bestandteile aus Früchten oder Gemüse werden mit einer verminderten Entstehung von koronaren Herzerkrankungen in Zusammenhang gebracht (Goldberg *et al.*, 1995, Paganga und Rice-Evans, 1997, Liu *et al.*, 2001, Katsube *et al.*, 2003). Hier auf wiesen epidemiologische Studien hin (Criqui und Ringel, 1994). Für die potentiell chemopräventive Wirksamkeit wird der Gehalt an Flavonoiden in der Nahrung als wichtiger Faktor angesehen (Hertog *et al.*, 1993, Hertog *et al.*, 1995). Das Risiko, an einer koronaren Herzerkrankung zu erkranken, soll durch eine vasoprotektive Aktivität (Schutz der Gefäßwände) durch Polyphenole gemindert werden (Lietti *et al.*, 1976, Renaud und de Lorgeril, 1992). Sie sollen auch eine Änderung der arteriellen Blutgefäßspannung bewirken (Colantuoni *et al.*, 1991).

Verschiedene Studien zeigten, dass Anthocyane und phenolische Verbindungen aus Beeren eine antioxidative Wirkung *in vitro* in Bezug auf die Oxidation von LDL und Liposomen besitzen (Heinonen *et al.*, 1998). Der Konsum von Rotwein und seine potentiell positiven Einflüsse auf die Verhinderung koronarer Herzerkrankungen, propagiert als sog. „French Paradoxon“, steht oft in der Diskussion. Es wird berichtet, dass der Konsum von Rotwein und der damit verbundene Anstieg der Konzentration von phenolischen Substanzen im Blut keinen Einfluss auf die Entstehung von oxidiertem LDL aufwies (Caccetta *et al.*, 2000). Andere Arbeiten belegten, dass Polyphenole aus Rotwein, und damit auch Anthocyane, einen protektiven Effekt auf die Entstehung von Arteriosklerose und die damit korrelierten koronaren Herzerkrankungen haben. Beispielsweise konnte durch die Rotweinpolyphenole die Proliferation von glatten Muskelzellen (smooth muscle cell, SMC) und deren zellvermittelte Oxidation herabreguliert werden. Leider konnte damit keine Aussage getroffen werden, zu welchem Anteil Anthocyane oder das viel diskutierte Resveratrol beteiligt waren (Rifici *et al.*, 1999, Iijima *et al.*, 2000).

Prooxidative Effekte der Anthocyane wurden ebenfalls beobachtet. Sie sind stark von den Bedingungen abhängig, unter denen diese *in vitro*-Versuche durchgeführt wurden. Bei der Interpretation solcher Ergebnisse müssen demnach auch die Versuchsbedingungen berücksichtigt werden (Satue-Gracia *et al.*, 1997, Abuja *et al.*, 1998). Ichiyangi *et al.* untersuchten zwölf Anthocyane aus Heidelbeeren in Bezug auf die Verhinderung der

Entstehung von Peroxynitrit, das bei der Bildung von oxidiertem LDL beteiligt sein soll. Bis auf die Glycoside von Dp-Chlorid **1** zeigten alle Anthocyane eine geringe antioxidative Wirkung (Ichiyanagi *et al.*, 2004a).

1.6.2.2 Schutz vor Krebserkrankungen

Anthocyane sollen zum chemopräventiven Potential von Obst und Gemüse gegenüber Krebserkrankungen beitragen. Hinweise stützen sich vorwiegend auf Ergebnisse von *in vitro*-Studien.

In Versuchen, bei denen man DNA vom Kalbsthymus mit Anthocyanen inkubierte, also copigmentierte, wiesen sowohl die DNA, als auch das Anthocyan eine wesentlich höhere Stabilität gegen OH[•]-Radikale auf, als wenn sie separat getestet wurden. Man führt dies darauf zurück, dass es dabei zu einer Stabilisierung von triple-helikalen Komplexen kommt (Mas *et al.*, 2000). Cy-Chlorid **5** und Cy-3-O-glc **6** schützen laut Acquaviva *et al.* außerdem die DNA vor Strangbrüchen (Acquaviva *et al.*, 2003). Polyphenolextrakte aus Boysenbeeren und schwarzen Johannisbeeren zeigten bei der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y neuroprotektive Aktivität bei H₂O₂-induzierter Toxizität. Auch bei promeolytischen HL-60-Zellen wurden protektive Effekte *in vitro* beobachtet. Sowohl die Anthocyane, als auch die Nichtanthocyan-Fractionen waren in der Lage, die Zellen vor H₂O₂-induzierter Zelltoxizität zu schützen (Ghosh *et al.*, 2006). Fimognari *et al.* beobachtete bei humanen Leukämie-Zelllinien (HL-60 und Jurkat) eine durch Cy-3-O-glc **6** induzierte Apoptose (Fimognari *et al.*, 2004). Anthocyane besitzen im Vergleich zu anderen Polyphenolen wie Flavonole oder Flavanone eine viel größere Fähigkeit, K562 Leukämie-Zellen oder humane Kolon-Adenokarzinom-Zellen HCT-15 am Wachstum zu hindern (Kamei *et al.*, 1995). Eine Arbeit von Katsube *et al.* zeigt, dass Ethanol-Extrakte von verschiedenen Beeren das Wachstum von humanen Leukämiezellen HL60 (promeolytischen Leukämiezellen) und humanen Kolonkrebszellen HCT116 *in vitro* hemmten; am effektivsten in der Wachstumsinhibierung zeigte sich ein Extrakt aus Wildheidelbeeren. Er zeigte die größte Radikalfängerkapazität in Bezug auf das 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazylradikal. Reines Dp-Chlorid **1** und Mv-Chlorid **10** sowie deren aus Heidelbeeren isolierten Glycoside induzierten in HL60-Leukämiezellen Apoptose. HCT116-Zellen wurden lediglich durch Dp-Chlorid **1** und seinen aus Heidelbeeren

isolierten Glycoside im Wachstum gehemmt, nicht aber durch Mv-Chlorid **10** und dessen Zuckerkonjugate (Katsube *et al.*, 2003).

Koide *et al.* zeigten, dass Balb/C-Mäuse (immunkompetente Inzuchtmäuse), die an syn-genetischen Meth A Tumoren (Meth A Fibrosarkomen) litten, durch den Verzehr von Anthocyanfraktionen aus roten Sojabohnen sowie roten Bohnen eine längere Lebensdauer aufwiesen (Koide *et al.*, 1997). Auch konnte gezeigt werden, dass die Aglycone Cy-Chlorid **5** und Dp-Chlorid **1** bei *in vitro*-Studien eine wachstumshemmende Wirkung im mikromolaren Bereich auf humane Tumorzellen besitzen (Meiers *et al.*, 2001).

Entzündliche Erkrankungen des Darmtraktes (inflammatory bowel diseases, IBD) und kolorektaler Krebs sind die bedeutendsten degenerativen Erkrankungen des Verdauungssystems in den westlichen Ländern. Gemäß Han *et al.* soll eine anthocyanreiche Nahrung präventive Effekte gegenüber IBD besitzen (Han *et al.*, 2005). Weiterhin soll eine anthocyanreiche Ernährung präventive Effekte bei bösartigen Veränderungen des Ösophagus (Speiseröhre) (Kresty *et al.*, 2001) und des Colon zeigen (Harris *et al.*, 2001, He *et al.*, 2005). Yi *et al.* publizierten, dass Anthocyane aus der Heidelbeere die Proliferation von HT-29- und Caco-2-Zellen sehr stark hemmen. Auch wurde nachgewiesen, dass Anthocyane aus Heidelbeeren Apoptose induzieren, was bedeutet, dass Heidelbeeren das Darmkrebsrisiko vermindern könnten (Yi *et al.*, 2005)

Habermayer wies *in vitro* nach, dass bestimmte Anthocyanidine (Dp-Chlorid **1** und Cy-Chlorid **5**) potente Hemmstoffe humaner Topoisomerasen sind. Bei Topoisomerasen handelt es sich um Enzyme im Zellkern, die an der Replikation der DNA beteiligt sind. Dp-Chlorid **1** und Cy-Chlorid **5** wirken ab einer Konzentration von 5 µmol jedoch nicht wie klassische Topoisomerasegifte wie z. B. Camptothecin oder Etoposid, über die Stabilisierung des kovalenten Topoisomerase-DNA-Komplexes, sondern stellen rein katalytische Inhibitoren dar. **1** und **5** könnten möglicherweise sogar eine Schutzfunktion vor mit der Nahrung aufgenommenen Topoisomerase I-Giften besitzen, da sie am isolierten Enzym die Stabilisierung des Cleavable Complex der Topoisomerase I durch Camptothecin effektiv verhindern (Habermayer, 2005). Die genannten Anthocyanidine könnten daher eine gewisse Schutzfunktion vor der Entstehung von Krebs haben.

1.6.2.3 Antiinflammatorische Eigenschaften

Anthocyane werden auch entzündungshemmende Wirkungen zugesprochen. Chronische Entzündungsprozesse werden mit der Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO[•]) in Verbindung gebracht. Anthocyane zeigten einen inhibierenden Effekt auf die Bildung von NO[•] (Wang und Mazza, 2002, Kong *et al.*, 2003).

Da sich Süßkirschen lindernd auf die Schmerzen bei Arthritis und Gicht auswirken sollen, ging man davon aus, dass die Anthocyane antiinflammatorisch wirksam sein könnten. Drei Anthocyane und das Aglycon Cy-Chlorid **5** aus Kirschen wurden *in vitro* an den Enzymsystemen Endoperoxid-Hydrogen-Synthase 1 und 2 getestet. Die Glycoside zeigten nur sehr geringe inhibitorische Effekte bei hohen Konzentrationen (300 µM). Nur das freie Aglycon **5** zeigte eine signifikante Inhibierung beider Enzymsysteme mit IC₅₀-Werten von 90 und 60 µM. Aspirin, im Vergleich dazu, liegt bei 1050 µM (Wang *et al.*, 1999). Wang und Mazza bewiesen, dass Anthocyane und anthocyanreiche Extrakte die Produktion des Tumornekrosefaktors TNF-α induzieren und als Regulator der Immunantwort in aktivierten Makrophagen agieren (Wang und Mazza, 2002).

In vivo-Studien mit Ratten, bei denen mittels Carrageen eine Lungenentzündung induziert wurde, zeigten geringere Entzündungserscheinungen nach Gabe von Anthocyanen aus Brombeeren (Rossi *et al.*, 2003).

Anthocyane von Aronia (*Aronia melanocarpa*) wirken nach Valcheva-Kumanova *et al.* hemmend bei Magenschleimhautschäden. Die Autoren induzierten diese Schäden durch Gabe von Indomethacin an Ratten und beobachteten vier Stunden nach Gabe der Substanz den Malondialdehydanteil im Plasma und in der Magenmucosa. Sie zeigten, dass die Indomethacin-induzierten Magenschleimhautschäden in Verbindung mit oxidativem Stress stehen. Dies wurde durch die beobachtete Anhäufung von MDA untermauert. Die Gabe von Aronia-Saft scheint einen Anstieg der Magenschleimproduktion und eine Beeinflussung der oxidativen Stressentwicklung bewirkt zu haben, was durch eine verminderte Bildung von MDA im Plasma und der Magenmucosa bewiesen wurde (Valcheva-Kuzmanova *et al.*, 2005)

1.6.2.4 Sonstige potentiell chemopräventive Eigenschaften

In einer Placebo-kontrollierten Studie wurde nach Konsum von isolierten Anthocyanen aus Schwarzen Johannisbeeren eine Verbesserung der Adaption der Augen an die Dunkelheit und ein Rückgang von Ermüdungserscheinungen und subjektiven ophthalmologischen Beschwerden nach Überbeanspruchung beobachtet (Nakaishi *et al.*, 2000). Matsumoto und Mitarbeiter stellten fest, dass bestimmte Anthocyane Effekte auf die Regeneration von Rhodopsin haben. Man fand heraus, dass die Cyanidinglycoside Cy-3-O-glucose 6 und Cy-3-O-rhamnosid (Cy-3-O-rha) im Gegensatz zu ihren Dp-Analoga die Regeneration von Rhodopsin beschleunigen konnten (Matsumoto *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu anderen Studien, die diese Effekte nicht belegten (Levy und Glovinsky, 1998, Zadok *et al.*, 1999, Muth *et al.*, 2000).

Den Anthocyanen wird auch eine antibakterielle Wirkung nachgesagt. Bisher ging man davon aus, dass diese im Zusammenhang mit deren Phytoalexin-Wirkung steht. Sie beruht auf der Änderung der Zellwandpermeabilität und der Denaturierung und Bindung an lebenswichtige Enzyme von Bakterien, Pilzen und Viren (Scalbert, 1991). Antibakterielle Effekte von Beeren sind bereits aus der Volksmedizin bekannt. Beispielsweise werden Extrakten der Moosbeere und des Holunders eine lindernde Wirkung bei Harnwegserkrankungen zugeschrieben. Es wird vermutet, dass für die antibakterielle Wirkung die Anthocyane verantwortlich sind (Avorn *et al.*, 1994, Kontiokari *et al.*, 2001).

Auch Saft, Extrakten oder Kapseln aus Preiselbeeren werden schon lange nützliche Effekte bei der Vorbeugung vor Harnwegsinfektionen nachgesagt (Raz *et al.*, 2004). Bereits 1984 publizierte Sobota, dass Preiselbeersaft die Adhärenz von *E. coli* stark verringert (Sobota, 1984). Bisher wurden aktive Fraktionen, die die Polyphenole Phlorizin und Prunin enthielten, identifiziert (Turner *et al.*, 2005). Erkenntnisse, ob auch Anthocyane involviert waren, liegen noch nicht vor. Howell ging davon aus, dass nicht die Anthocyane, sondern Proanthocyanidine zur Wirkung beitragen (Howell, 2002).

Auch antivirale Effekte sind beschrieben. Beispielsweise zeigten Fruchtextrikte aus Trauben, Himbeeren, Erdbeeren und Heidelbeeren in Untersuchungen eine stark hemmende Wirkung auf Polioviren (Konowalchuk und Speirs, 1976). Extrakte aus Holunderbeeren und Schwarzen Johannisbeeren zeigten eine antivirale Aktivität gegen Influenza A und B, sowie gegen Herpesviren 1 und 2. Der Effekt wird auf eine Inaktivie-

rung der Viren, auf eine Verhinderung deren Adhäsion an Zellen oder einer Verhinderung der viralen Freisetzung aus der Zelle zurückgeführt (Tengherdy, 1978, Knox *et al.*, 1998, Suzutani *et al.*, 2003, Zakay-Rones *et al.*, 2004). Diese Effekte wurden auch der Anthocyanfraktion eines Johannisbeerextraktes zugeordnet (Knox *et al.*, 2001).

In Arbeiten von Matsui *et al.* wird eine antidiabetische Wirkung beschrieben (Matsui *et al.*, 2001b, Matsui *et al.*, 2001a, Matsui *et al.*, 2002). Bestätigt wurden diese Ergebnisse von Tsuda *et al.* durch Studien mit Mäusen. Ferner wurde angegeben, dass Anthocyane auch eine schützende Wirkung vor Fettleibigkeit besitzen könnten (Tsuda *et al.*, 2003).

Es finden sich schließlich auch Hinweise auf immunmodulatorische Effekte von Anthocyanen aus Rotwein, wie z. B. die Erhöhung der NK-Zahl (natürliche Killerzellen) in Lymphozytenkulturen aus Raucherblut. Dies wurde jedoch für die akute Aufnahme moderater Mengen von Rotwein bei gesunden Probanden nicht bestätigt (Gasiorowski *et al.*, 2000, Watzl *et al.*, 2002b, Fleschhut, 2004).

1.6.3 Systeme zur Messung der antioxidativen Aktivität

Zur Messung der antioxidativen Eigenschaften von Substanzen werden verschiedene Messsysteme verwendet. Gängig ist der sog. TEAC-Assay (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay) von Miller *et al.* (Miller *et al.*, 1993). Dieses Verfahren beruht auf einer photometrischen Bestimmung der Verhinderung einer Radikalbildungsreaktion aus ABTS (Diammoniumsalz von 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonsäure) (Abbildung 1-30) durch ein Antioxidans. Hierbei wird Trolox (\pm -6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carbonsäure) als stark antioxidativ wirksame Bezugsgröße verwendet.

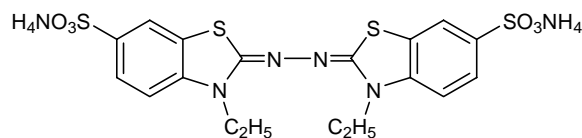


Abbildung 1-30 Struktur des Diammoniumsalzes von 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS)

Bei diesem Messsystem ist jedoch die Interpretation der Ergebnisse erschwert, da das zu untersuchende Antioxidans auch mit anderen Komponenten reagieren kann (Re *et al.*, 1999).

Der von Benzie und Stain entwickelte und von Pulido *et al.* modifizierte FRAP-Assay (**Ferric Reducing Activity of Plasma Assay** bzw. **Ferric Reducing Antioxidant Power Assay**) beruht auf einer Fe^{3+} -reduzierenden Aktivität von antioxidativ wirkenden Substanzen, die im $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -Tripyridyltriazin(TPTZ)-Redoxsystem durch einen farbigen Eisenkomplex sichtbar gemacht und bei 585 nm photometrisch detektiert wird (Abbildung 1-31). Als Bezugsgrößen werden stark antioxidativ wirksame Substanzen wie Ascorbinsäure oder Trolox vermessen (Benzie und Strain, 1996, Pulido *et al.*, 2000).

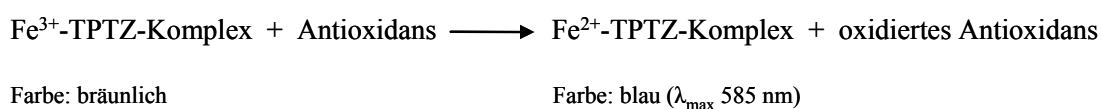


Abbildung 1-31: Prinzip des **Ferric Reducing Activity of Plasma-Assay** (FRAP-Assay)

Ein drittes System zur Messung der antioxidativen Kapazität einer Substanz stellt der ORAC-Assay (**Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay**) dar. Dabei handelt es sich um eine fluorimetrische Bestimmungsmethode, mit der die Reaktivität einer antioxidativ wirkenden Substanz gegenüber Peroxyradikalen bestimmt wird (Cao *et al.*, 1993, Cao und Prior, 1999b). R-Phycoerythrin wird als fluoreszierendes Indikatorprotein eingesetzt. Nachteilig wirken sich die Photolabilität und chargenabhängige Fluoreszenzeigenschaften des Indikatorproteins sowie dessen Wechselwirkungen mit Polyphenolen und Proteinen aus. Aus diesem Grund verwendeten Ou *et al.* Fluorescein als weiteren Fluoreszenzfarbstoff (Ou *et al.*, 2001).

Zur Messung der Radikalfängerkapazität wird außerdem die ESR-Technik (**E**lectron **S**pin **R**esonance) verwendet. Dabei wird 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-*N*-oxid (DMPO) und *N*-Methyl-D-glucamindithiocarbamat (MGD) als „Spin trap“ verwendet, um kurzlebige Radikale nachweisen zu können. DMPO wird für OH^{\bullet} - und $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Radikale und MGD für NO^{\bullet} -Radikale verwendet. OH^{\bullet} -Radikale werden mittels des sog. ‚Fenton’s-Reagenz‘, bestehend aus H_2O_2 und Fe^{2+} -Ionen, freigesetzt. $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Radikale wurden durch ein Hypo-

xanthin-Xanthin-Oxidase-System generiert. NO[•]-Radikale erhält man aus 1-Hydroxy-2-oxo-3-(*N*-methyl-3-aminopropyl)-3-methyl-1-triazin (NOC-7). Je nach antioxidativer Aktivität der verwendeten Substanz wird die Bildung der Radikale vermindert (Noda *et al.*, 2002).

1.7 Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Anthocyanen

1.7.1 Aufnahme durch die Nahrung

Im Gegensatz zu anderen Flavonoiden ist die Aufnahme von Anthocyanen durch die Nahrung weitaus höher (Cao und Prior, 1999a, Talavera *et al.*, 2005). Den täglichen Verzehr von Anthocyanen schätzt man in den USA auf 180 – 215 mg (Kühnau, 1976). Eine Studie aus dem Jahr 1991 besagt, dass die bayerische Bevölkerung nur durchschnittlich 2.7 mg Anthocyane am Tag über die Nahrung aufnimmt (Watzl *et al.*, 2002a). Diese großen Schwankungen sind u. a. durch die stark unterschiedlichen Verzehrsgewohnheiten in verschiedenen Regionen der Welt begründet. Eine Studie aus Dänemark geht von einer Aufnahme von 75-150 mg/d aus (Dragsted *et al.*, 1996). In Finnland, eine Region, in der große Mengen an Beeren verzehrt werden, liegt die tägliche Aufnahme bei 82 mg (Heinonen, 2001). Von der Jahreszeit abhängig, kann die Menge an aufgenommenen Anthocyanen mehrere Hundert mg/d erreichen. Man schätzt, dass in Deutschland ca. 10% der Bevölkerung keine Anthocyane mit der Nahrung aufnehmen (Watzl *et al.*, 2002a).

1.7.2 Absorptions- und Verteilungsmechanismen von Anthocyanen

Über die Absorption von Flavonoiden und speziell über Anthocyane aus Nahrung war lange Zeit sehr wenig bekannt. Die Theorie, dass Flavonoide vor der Resorption erst durch die intestinale Darmflora gespalten werden müssen, konnte durch Studien mit Quercetinglucosid, das besser absorbiert wird als sein Aglycon, relativiert werden (Hollman *et al.*, 1995, Morand *et al.*, 2000b, 2000a). Da Anthocyane in geringer Menge in unmetabolisierter Form im Blut und Urin nach Aufnahme über die Nahrung nach-

weisbar sind, kann auf eine direkte Resorption in glycosylierter Form geschlossen werden (Miyazawa *et al.*, 1999, Murkovic *et al.*, 2001, Felgines *et al.*, 2002).

Als Ort für die Resorption der Anthocyane wird der Magen sowie der Dünndarm postuliert. Dies wurde in Studien bewiesen, in denen man Ratten betäubte, den Bauchraum öffnete und in den Magen eine Anthocyanlösung injizierte. In bestimmten Zeitintervallen wurden aus der Pfortader und dem Herzen der Ratte Blutproben entnommen. Bereits nach sechs Minuten konnten im Pfortaderblut Anthocyane nachgewiesen werden. Die Konzentrationen waren größer als im systemischen Blut der Ratten, so dass von einer Resorption der Anthocyane über den Magen ausgegangen werden kann (Passamonti *et al.*, 2003). Zum gleichen Ergebnis kam man auch bei Versuchen mit anästhesierten Ratten (Talavera *et al.*, 2003).

Die Fähigkeit der Anthocyane, die Magenmucosa zu passieren, und die Möglichkeit eines Bilitranslokase vermittelten Mechanismus (Membrancarrier in der Leberplasmamembran und in den Epithelzellen der Magenmucosa), könnte die Basis für eine schnelle Kinetik der Verfügbarkeit von Anthocyanen im Plasma, sowohl für Ratten als auch im Menschen, sein. Passamonti *et al.* fanden Konzentrationen von Anthocyanen im Pfortaderblut, die nahe an der Halbsättigung der Bilitranslokase liegen und somit eine relevante Rolle bei der Aufnahme in die Leber spielen könnte (Miyazawa *et al.*, 1999, Tsuda *et al.*, 1999, Bub *et al.*, 2001, Milbury *et al.*, 2002, Passamonti *et al.*, 2002, Passamonti *et al.*, 2003).

Ein sehr gutes Modell zum Nachweis, dass Anthocyane die Dünndarmwand unverändert passieren können, verwendeten Andlauer *et al.*. Sie entfernten der Ratte den Dünndarm und spülten diesen nach Präparation in einer Perfusionskammer vasculär mit einem synthetischen Perfusionsmittel, um ihn mit Sauerstoff zu versorgen und den Blutstrom zu simulieren. Luminal wurde der Darm zuerst mit Bicarbonatpuffer und anschließend mit einer Cy-3-O-glc-Lösung gespült. Der Übergang von Anthocyanen von luminal nach basolateral konnte so ermittelt werden. Dieser lag bei $4.3\% \pm 3.2$. Bei Zugabe von 5% Ethanol zum Perfusat verringerte sich die Absorptionsrate nicht signifikant auf $2.9\% \pm 1.8$ (Andlauer *et al.*, 2003). Erst kürzlich wurde eine Arbeit unter Verwendung der Ussingkammer veröffentlicht. Nach Präparation von jejunalem Gewebe von Mäusen lag die Absorptionsrate hier bei $55.3\% \pm 7.6$. Das Duodenum-Gewebe der Maus zeigte mit $10.4\% \pm 7.6$ das geringste Absorptionsvermögen (Matuschek *et al.*,

2006). Auch Talavera *et al.* publizierten, dass Anthocyane über den Dünndarm effektiv absorbiert werden. Dabei wurden das Jejunum und das Ileum von anästhesierten Ratten mit einer Anthocyanlösung aus Brombeeren *in situ* gespült. In der Aorta sowie der Mesenterialader konnte anschließend natives Cy-3-O-glc **6** nachgewiesen werden. Methylierte und glucuronidierte Metabolite wurden identifiziert. Untersuchungen ergaben, dass Cy-3-O-glc **6** und seine Metabolite rasch in der Gallenflüssigkeit erscheinen (Talavera *et al.*, 2004).

Anthocyane wurden außer in der Leber auch im Nierengewebe und im Gehirn von Ratten gefunden (Talavera *et al.*, 2005). Aus einer weiteren Studie ist bekannt, dass diese Verbindungen die Blut-Hirn-Schranke passieren können (Youdim *et al.*, 2003). Zum gleichen Ergebnis kam die Gruppe um Passamonti. Sie applizierten in den Magen von anästhesierten männlichen Wistar-Ratten 10 min eine definierte Anthocyanlösung, entnahmen anschließend 3-4 mL systemisches Blut und entfernten das Gehirn. Im Plasma ermittelten sie 176.4 ± 50.5 ng/mL und im Gehirn 192.2 ± 57.5 ng/g Anthocyane (Passamonti *et al.*, 2005).

Humanstudien zeigten, dass bei der Aufnahme von Quercetinglucosiden im Dünndarm der Na⁺-abhängige Glucose-Cotransporter (SLGT-1) aktiv beteiligt ist (Hollman *et al.*, 1995, Hollman *et al.*, 1999, Gee *et al.*, 2000, Walgren *et al.*, 2000, Andlauer und Fürst, 2003). Es liegt daher nahe, dass dieser Carriermechanismus auch bei der Resorption der Anthocyane eine Rolle spielt (Clifford, 2000, Matsumoto *et al.*, 2001). Diese Annahme wurde durch die Arbeit von Mülleder *et al.* untermauert. Die Autoren untersuchten den Effekt, den Zucker auf die Resorption von Anthocyanen in die Blutbahn hat. Dabei wurde festgestellt, dass erhöhte Mengen an Saccharose, die zu einer Sättigung des Zuckertransporters führten, die Aufnahme von Anthocyanen verringerten (Mülleder *et al.*, 2002). Dies unterstützt die Aussagen von Hollman *et al.*, dass intestinale Zuckercarrier eine Rolle bei der Absorption von Flavonoiden und damit Anthocyanen spielen (Hollman *et al.*, 1995)

1.7.3 Bioverfügbarkeit von Anthocyanen

Die Bioverfügbarkeit von Substanzen hängt v. a. davon ab, wo und wie diese absorbiert bzw. in welchem Umfang sie aufgenommen und metabolisiert werden.

Sehr früh erkannte man, dass nach Aufnahme von Anthocyanen der Urin pigmentiert war (Horwitt, 1933). Mittlerweile gibt es zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen einige Studien, die meistens mit Ratten als Versuchstieren durchgeführt wurden. In den vergangenen Jahren sind Arbeiten zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen im Menschen erschienen, wobei den Probanden bei diesen Untersuchungen meistens Lebensmittelextrakte verabreicht wurden. Hier hat man die Anthocyan-Konzentrationen in Urin und Blut (Plasma, Serum) sowie im Fäzes bestimmt. Morazzoni *et al.* fanden als absolute Bioverfügbarkeit bei Ratten nach oraler Gabe von 400 mg/kg KG eines Anthocyanextraktes aus Heidelbeeren nur 1.2% der verabreichten Anthocyanmenge. Dabei wurde die maximale Plasma-Konzentration 15 min nach Aufnahme erreicht; sie lag bei 2–3 µg/mL. Innerhalb von zwei Stunden war eine schnelle Abnahme zu beobachten, wobei jedoch kein hepatischer „first-pass-Effekt“ auftrat (Morazzoni *et al.*, 1991). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Miyazawa *et al.*. Sie beobachteten nach oraler Gabe von 320 mg/kg Körpergewicht von Cy-3-O-glc **6** und 40 mg/kg von Cy-3,5-O-diglc an Ratten bereits nach 15 min ein Maximum der Plasmakonzentration. Insgesamt lag die Menge der aufgenommenen Anthocyane im Plasma bei 1% der ursprünglichen Dosis (Miyazawa *et al.*, 1999).

Nach Verfütterung von Anthocyanen aus Brombeeren an Ratten lag nach drei Stunden die Plasmakonzentration bei 0.36 ± 0.02 µmol/L. Dabei konnte pro Gramm Jejunum 605 ± 71 nmol Anthocyan detektiert werden. Im Gehirn der getöteten Ratten fand man größere Mengen Anthocyane (0.21 ± 0.05 nmol/g) als im Plasma (0.15 ± 0.02 nmol/mL) (Talavera *et al.*, 2005). In den ermittelten Konzentrationsbereichen könnten Anthocyane, die eine hohe antioxidative Aktivität besitzen, ihre Wirkung gegenüber oxidativen Schäden, die für zahlreiche neurologische Funktionsstörungen verantwortlich sind, ausüben (Wang *et al.*, 1997, Joseph *et al.*, 2000, Amorini *et al.*, 2001). In dieser Studie wurden über den Urin $0.19 \pm 0.02\%$ der Anthocyane wieder ausgeschieden (Talavera *et al.*, 2005). Dies bestätigte die Analysenergebnisse, die bereits von Felgines *et al* publiziert worden waren. Hier fand man nach Verfütterung von Anthocyanen aus

Brombeeren, Cy-3-O-glc **6** und Mv-3-O-glc **4**, an Ratten im Urin die intakten Anthocyane wieder. Insgesamt wurde eine Menge von ca. 0.26% Cy-3-O-glc **6** und dessen Methylierungsprodukt sowie 0.67% Mv-3-O-glc **4** im Urin ermittelt. (Felgines *et al.*, 2002).

Wu *et al.* stellten außerdem fest, dass Anthocyane abhängig von der Zuckerkonjugation und vom Aglycon unterschiedlich in von der Muttermilch entwöhnten Ferkeln absorbiert werden (Wu *et al.*, 2005). In einer weiteren Studie dieser Autoren wurde dies bestätigt. Nach der Fütterung von Ferkeln mit gefriergetrockneten schwarzen Himbeeren fanden Wu *et al.*, abhängig vom Zuckerrest, unterschiedliche Mengen an Cyanidinglycosiden im Gastrointestinaltrakt wieder. Diese Mengen korrelierten linear mit der Ausscheidung über den Urin (Wu *et al.*, 2006b).

Bei Interventionsstudien mit Menschen wurden 30 min nach Gabe von gleichzeitig 2.7 mg/kg KG Cy-3-O-glc **6** und 0.25 mg/kg KG Cy-3,5-O-diglc, durchschnittlich 1 µg/L Cy-3-O-glc **6** und Spuren Cy-3,5-O-diglc im Plasma gefunden (Miyazawa *et al.*, 1999).

Nach dem Konsum von Anthocyanen aus Holunderbeersaft zeigte sich, dass der menschliche Körper bereits in der ersten Stunde nach dem Verzehr Anthocyane unverändert mit dem Urin ausscheidet. Das Maximum der Ausscheidung lag bei 3 bis 4 Stunden (Murkovic *et al.*, 2001). Ebenfalls wurden Delphinidin-3-O-rutinosid (Dp-3-O-rut), Delphinidin-3-O-glucosid (Dp-3-O-glc) **2**, Cyanidin-3-O-rutinosid (Cy-3-O-rut) und Cy-3-O-glc **6** im Plasma und Urin vom Menschen unmetabolisiert wieder gefunden. Im Urin konnte man dabei acht Stunden lang $0.11\% \pm 0.05$ der applizierten Anthocyane nachweisen. Das Maximum im Plasma lag zwischen 1.25 und 1.75 Stunden nach dem Anthocyan-Verzehr (Matsumoto *et al.*, 2001).

Milbury *et al.* ermittelten nach dem Verzehr von Anthocyanen aus Holunderbeeren die Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik der Anthocyane im Menschen. Die Anthocyane konnten sowohl im Plasma als auch im Urin detektiert werden. Die Eliminierung der Anthocyane aus dem Plasma schien einer Kinetik erster Ordnung zu unterliegen, wobei die meisten Anthocyane innerhalb von vier Stunden ausgeschieden wurden (Milbury *et al.*, 2002).

Auch Cao und Prior (1999a) fanden nach dem Konsum von Holunderbeerenextrakt bereits nach 30 min die intakten, unmetabolisierten Anthocyane im humanen Blut. Nach dem Verzehr von gefriergetrocknetem Heidelbeerpulver zeigte die Gruppe um Mazza *et*

al. (2002), dass nach drei Stunden 0.002 bis 0.003% der verabreichten Anthocyane im menschlichen Blutserum zu finden waren, was für eine sehr schlechte Absorption spricht. Dabei wiesen sie 19 von 25 Anthocyanen im Blutserum nach. Trotz der geringen Aufnahmemenge wurde dabei ein ernährungsinduzierter Anstieg des *ex vivo*-antioxidativen Status beobachtet.

Die Gruppe um Bub *et al.* beobachtete in einer Studie mit sechs Probanden nach der Aufnahme von Traubensaft sowie normalem und entalkoholisierendem Rotwein, dass 0.03% der aufgenommenen Anthocyane in Urin und Plasma unabhängig von der Anwesenheit des Alkohols nachweisbar waren (Bub *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse wurden von Andlauer und Mitarbeitern bestätigt (Andlauer *et al.*, 2003); geringe Bioverfügbarkeit fanden auch Lapidot *et al.* (Lapidot *et al.*, 1998). Im Allgemeinen sind Anthocyane demzufolge schlecht bioverfügbar.

1.7.4 Metabolisierung von Anthocyanen

Neben der Bioverfügbarkeit wurde der Metabolismus von Anthocyanen in zahlreichen Arbeiten untersucht.

Nach Verfütterung der Brombeeranthocyane Cy-3-*O*-glc **6** und Mv-3-*O*-glc **4** an Ratten fand man im Urin die intakten Anthocyane, jedoch weder freies Aglycon noch Metabolite. Interessanterweise konnte man Pn-3-*O*-glc **7** im Urin detektieren, so dass eine Methylierung anzunehmen ist (Felgines *et al.*, 2002). **7** wurde von der Gruppe um Miyazawa als Metabolit von Cy-3-*O*-glc **6** ermittelt (Miyazawa *et al.*, 1999). Bereits nach 20 min war der Metabolit **7** in der Galle nachweisbar, und das Aglycon wurde sowohl im Plasma als auch im Jejunum detektiert (Talavera *et al.*, 2003, Talavera *et al.*, 2005). Ähnliche Ergebnisse wurden schon zuvor von Tsuda *et al.* ermittelt, die im Plasma von Ratten, denen oral **6** verabreicht worden war, das intakte Anthocyan nachweisen konnten. Außerdem fanden sie achtmal mehr Protocatechusäure als Anthocyan im Plasma. In Leber und Niere wiesen sie eine methylierte Form von **6**, im Jejunum **6**, freies Cy-Chlorid **5** und Protocatechusäure nach. Es ist anzunehmen, dass β -Glucosidasen am Abbau beteiligt sind. Da aber nur geringe Mengen von Cy-Chlorid **5** im Darm freigesetzt wurden, hat man von dieser Annahme abgesehen (Tsuda *et al.*, 1999). Nemeth *et*

al. haben aus humaner Mucosa des Jejunums Glucosidasen (Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) und cytosolische β -Glucosidase (CBG)), die Flavonoidglycoside effizient hydrolysieren, isoliert. Anthocyane gelten jedoch nicht als Substrate für LPH und CBG und daher sollten ihrer Meinung nach die Anthocyane erst im Dickdarm metabolisiert werden (Nemeth *et al.*, 2003). Dies könnte mitunter ein Grund sein, warum im Blutplasma kein freies Aglycon nachweisbar ist. Die Erkenntnis, dass Flavonoidglycoside durch LPH gespalten werden, war bereits durch Arbeiten von Day *et al.* bekannt. Diese Autoren bewiesen, dass LPH im Bürstensaum des Dünndarms Glycoside von Isoflavonoiden und Flavonoiden spaltet (Day *et al.*, 1998, Day *et al.*, 2000). Es könnte jedoch vorkommen, dass sich auf Grund der Instabilität der Anthocyanidine bei den vorherrschenden pH-Bedingungen die β -Glucosidaseaktivität schlecht ermitteln lässt. Der physiologische pH-Wert erklärt auch die geringen Mengen an freiem Aglycon im Jejunum (Talavera *et al.*, 2005). Fleischhut stellte fest, dass Anthocyaninglucoside nur sehr langsam von der β -Glucosidase gespalten, dafür aber wesentlich leichter von β -Glucuronidase hydrolysiert werden können (Fleischhut, 2004).

Kay *et al.* führten Studien über Anthocyanmetabolite im humanen Urin und Serum durch, bei denen die Probanden 20 g Apfelbeerextrakt mit definiertem Anthocyangehalt konsumiert hatten. Im Urin wurden Glucuronidkonjugate als methylierte und oxidierte Derivate von Cy-3-*O*-glc **6**, sowie Cyanidin-3-*O*-glucuronid (Cy-3-*O*-glu **6**) nachgewiesen. Demzufolge könnte es sein, dass die biologischen Effekte durch Anthocyane und auch deren Metabolite zustande kommen (Kay *et al.*, 2004). Gleiche Ergebnisse wurden von Felgines *et al.* publiziert, nachdem Probanden Brombeeren verzehrt hatten (Felgines *et al.*, 2005). Eine weitere Humanstudie wurde von Cooney *et al.* durchgeführt, wobei man einen Boysenbeerextrakt verzehrte. Im Urin wurden auch hier die intakten Anthocyane und ihre Methylierungsprodukte nachgewiesen. Mittels LC-ESI-MS wurden Monoglucuronide von Cy-Chlorid **5**, Pg-Chlorid **9** und Pn-Chlorid **8** identifiziert (Cooney *et al.*, 2004). Nach dem Konsum von Erdbeeren wies man im Urin sowohl Glucuronide, als auch Sulfate nach. Detektiert wurden Sulfo- und Glucuronsäurekonjugate von **9** (Felgines *et al.*, 2003).

Nach der Verabreichung von Dp-3-*O*-glc **2** an Ratten fand man im Blutplasma bereits nach 15 min einen Metaboliten von **2**, der als 4'-*O*-Methyldelphinidin-3-*O*-glucosid identifiziert wurde. Daher liegt die Vermutung nahe, dass **2**, das am B-Ring eine Pyro-

gallolstruktur besitzt, ähnlich metabolisiert wird wie andere Flavonoide, so z. B. Epigallocatechin, welches ebenfalls am B-Ring zum 4'-Methylderivat metabolisiert wird. Epigallocatechin besitzt in Bezug auf den B-Ring Struktur analogie zum Delphinidin **1** (Ichiyanagi *et al.*, 2004b).

In einer Studie mit Ferkeln, denen man Brombeeren verabreicht hatte, fand man, dass das enthaltene Pelargonidin-3-*O*-glucosid (Pg-3-*O*-glc) in anderer Weise als die Cyanidinglycoside (Cy-3-*O*-glc **6** und Cy-3-*O*-rutinosid) metabolisiert wird. Von Pg-3-*O*-glc wies man Urin lediglich das Monoglucuronid und keine Methylierungsprodukte nach. Die Cyanidinglycoside wurden hier zu Glucuroniden oder zu Glucosidglucuroniden metabolisiert. Als weitere Metabolite wurden Isopeonidin- und Peonidinglycoside sowie deren Glucuronide gefunden. Außerdem wurde Peonidin-3-glucosidglucuronid im Urin detektiert. Im Plasma fand man lediglich die beiden Cyanidinglycoside und ein Cyanidinglucuronid (Wu *et al.*, 2004b).

Neben der Bildung von Glucuroniden, Sulfaten oder methylierten Produkten wird angenommen, dass der mikrobielle Metabolismus bei den Anthocyanen eine wichtige Rolle spielt. Diese Metabolisierung, bekannt von den Flavonoiden, läuft hauptsächlich im Dickdarm mit seiner großen Anzahl an Bakterien ab. Durch die Ringspaltung bei den Flavonoiden entstehen aromatische Säuren wie die Benzoesäure, Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyphenyllessigsäuren. Diese können wiederum resorbiert und damit in die Blutbahn aufgenommen, metabolisiert und ausgeschieden werden (Scheline, 1968, Clifford, 2000).

Im Fäzes von Ratten fand man nach Gabe von Anthocyanen aus Brombeeren nur noch geringe Mengen von den verabreichten Glycosiden sowie Cy-Chlorid **5**, wofür der Abbau durch die Mikroflora verantwortlich gemacht wurde (Felgines *et al.*, 2002). Fleschhut berichtete, dass nach Gabe von Cy-3-*O*-glc **6** an Ratten in deren Fäzes auch freies Aglycon nachgewiesen wurde (Fleschhut, 2004). Eine neuere Arbeit beschreibt die *ex vivo*-Metabolisierung von verschiedenen Anthocyanen (Anthocyanidinmonoglycosiden und -diglycosiden) durch Schweinecaecum. Es handelte sich um Glycoside der Anthocyanidine Cy-Chlorid **5**, Mv-Chlorid **10** und Pn-Chlorid **8**. Im Falle von Malvidin-3,5-*O*-diglucosid (Mv-3,5-*O*-diglc) kam es zunächst zu einer Deglycosylierung zu Mv-3-*O*-glc **4**, welches im Anschluss daran zum freien Aglycon gespalten wurde. Im weiteren Verlauf erfolgte der caecale Abbau zu 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzoesäure (Syringa-

säure) und 1,3,5-Trihydroxybenzaldehyd (Phloroglucinaldehyd). 1,3,5-Trihydroxybenzaldehyd selbst wurde durch den Caecum-Inhalt weiter zur 1,3,5-Trihydroxybenzoesäure oxidiert. Anthocyane von Pn-Chlorid **8** wurden zu Vanillinsäure und 1,3,5-Trihydroxybenzaldehyd abgebaut. Entstandene Metabolite, wie Syringasäure und Vanillinsäure, wurden durch die Mikroflora weiter zu Gallussäure bzw. Protocatechusäure abgebaut (Keppler und Humpf, 2005).

Ex vivo-Studien zur Metabolisierung von Anthocyanen mit menschlichem Caecum-Inhalt ergaben, dass sich durch die Darmmikroflora aus Cyanidinglycosiden nach Deglycosylierung und Ringspaltung Protocatechusäure bildete (Aura, 2004). Cy-Chlorid **5** wurde, wie von Aura (2004) beschrieben, zu Protocatechusäure und 1,3,5-Trihydroxybenzaldehyd abgebaut. Analoge, von Labib *et al.* durchgeführte *ex-vivo*-Studien zur Metabolisierung von Flavonoiden mit Schweine-Caecum belegen, dass die Flavonoide durch die Mikroflora strukturabhängig mit unterschiedlicher Reaktionskinetik zu einer Reihe phenolischer Verbindungen abgebaut werden (Labib *et al.*, 2004, Labib *et al.*, 2006). Demzufolge stellt sich die Frage, in wieweit an den postulierten chemopräventiven Effekten der Anthocyane auch deren Metabolite beteiligt sein könnten. Phenolcarbonsäuren werden, wie gezeigt wurde, durch die Mikroflora im Dickdarm gebildet und können dort leicht absorbiert werden (Deprez *et al.*, 2000, Rechner *et al.*, 2002, Gonthier *et al.*, 2003). Gallussäure beispielsweise ist eine physiologisch aktive Substanz; sie besitzt antioxidative, entzündungshemmende, antimutagene und antikarzinogene Wirkung (Shahrzad und Bitsch, 1998). Auch andere Metabolite, die eine reduzierende phenolische Gruppe besitzen, sollen z. B. vor oxidativem Stress in den Geweben schützen können (Gonthier *et al.*, 2003).

Von Bedeutung ist v. a. die Klärung der Frage, wie viel der verzehrten Anthocyanmenge eigentlich in den Dickdarm gelangt und dort chemopräventiv wirken kann. Bis jetzt waren keine Daten über die Verfügbarkeit von Anthocyanen im menschlichen Dickdarm bekannt. Bisher gab es nur entsprechende Daten von Quercetin und Chlorogensäure im Kolon: Ileostomie-Patienten (siehe Kapitel 1.8) verzehrten die Substanzen, und deren Gehalt im Ileostomabeutel wurde ermittelt (Hollman *et al.*, 1995, Walle *et al.*, 2000, Olthof *et al.*, 2001, Zheng *et al.*, 2003). Jüngst wurden aktuelle Daten über die Menge an Anthocyanen, die nach dem Verzehr von Früchten den Dickdarm von Ratten erreichten, publiziert. He *et al.* beschrieben, dass die Anthocyanverteilung im Fäzes

vergleichbar mit der im Caecum war, nachdem Ratten Anthocyane der Apfelbeere, der Heidelbeere oder von roten Trauben appliziert worden waren. Bemerkenswert ist, dass die Stabilität der Anthocyane im Gastrointestinaltrakt stark davon abhängig ist, mit welchem Zuckerrest das Aglycon konjugiert war. Eine sehr hohe Stabilität unter physiologischen Bedingungen wiesen Anthocyane auf, die mit Xylose oder Arabinose konjugiert waren. Galactoside erwiesen sich als weniger stabil als Arabinoside oder Xyloside. Die geringste Stabilität zeigten die Glucoside. Weiterhin wurde beobachtet, dass eine Copigmentierung mit p-Coumarsäure die Stabilität weiter erhöht. Lag Diglucosylierung vor, erhöhte sich die Stabilität um 36% gegenüber dem analogen Monoglucosid. Die Autoren gehen davon aus, dass auf Grund der hohen Stabilität der Anthocyanidinpentoside im Darm, diese eine Hauptrolle in Bezug auf die ‚health benefit‘-Wirkung von Anthocyanen im Dickdarm spielen (He *et al.*, 2005).

Eine weitere Arbeit über die Verfügbarkeit und den Metabolismus von Polyphenolen im humanen Dickdarm wurde jüngst von Kahle *et al.* veröffentlicht. Auch hier hat man eine Studie mit Ileostomie-Patienten durchgeführt. Die Probanden konsumierten naturtrüben Apfelsaft, um zu ermitteln, welche Mengen an Apfelpolyphenolen den Dünndarm passieren und den Dickdarm erreichen (Kahle *et al.*, 2005). Bemerkenswert war auch hier der von der Art der Glycosylierung abhängige Anteil der Flavonoide. So konnten die im Apfelsaft enthaltenen Quercetinglucosid, - galactosid und xylosid im Ileostomabeutel nicht mehr gefunden werden. Dagegen passierten bis zu 10% Rhamnoside und Arabinoside den Dünndarm unmetabolisiert.

1.8 Colostoma und Ileostoma

Wie zuvor bereits erwähnt, kann man durch Studien mit Probanden, die einen künstlichen Darmausgang besitzen, einen Zugang zur intestinalen Verfügbarkeit von verschiedenen Substanzen finden. In dieser Arbeit wurde die intestinale Verfügbarkeit von Anthocyanen im Menschen untersucht.

Der künstliche Darmausgang wird auch als Stoma (griech.: Mund, Öffnung) bezeichnet. In der Medizin ist Stoma ein Sammelbegriff für einen stuhlableitenden künstlichen Aus-

gang. Dies kann ein Dickdarm- (Colostoma) oder ein Dünndarmanusgang (Ileostoma) sein.

Ein Ileo- bzw. Colostoma ist nötig, wenn der Darm aufgrund einer Erkrankung chirurgisch behandelt werden muss oder bestimmte Darmbereiche aufgrund von Entzündungen von der Stuhlpassage ausgeschlossen werden sollen. Dies kann z.B. bei Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder der adenomatösen Polyposie der Fall sein (siehe Tabelle 1-4). Bei einem medizinischen Eingriff wird ein Teil des Darms mit einer Öffnung im Bauch verbunden, durch die der Stuhl abfließen kann.

Tabelle 1-4: Übersicht über verschiedene Darmerkrankungen

<i>Erkrankung</i>	<i>Betroffener Darmbereich</i>	<i>Pathogenese</i>	<i>Literatur</i>
Morbus Crohn	<ul style="list-style-type: none"> - Gesamter Gastrointestinaltrakt - Gleichzeitiges Auftreten an verschiedenen Orten des Darmes - Beteiligung aller Darmwandschichten 	<ul style="list-style-type: none"> - Geschwür, chronische Entzündung - Bauchschmerzen - Diarrhöe, meist ohne Blutungen - Fistelleiten - Entzündete Darmhautfalten - Malabsorption 	Stein <i>et al.</i> , 1999b
Colitis ulcerosa	<ul style="list-style-type: none"> - Kolorektale Schleimhaut - Gelegentlich auch terminales Ileum 	<ul style="list-style-type: none"> - Adenomatöse Schwellungen - Berührungsempfindlichkeit der Darmschleimhaut - Schleimhautödeme - Darmblutungen - Mögliche Entstehung von Karzinomen 	Stein <i>et al.</i> , 1999a
Adenomatöse Polyposie	<ul style="list-style-type: none"> - Kolonschleimhaut 	<ul style="list-style-type: none"> - Kolonpolypen mit adenomatösen und karzinomatösen Anteilen - Entstehung von kolorektalen Karzinomen 	Sahm und Caspary, 1999

Operativ eingesetzte Stomatypen können das endständige Ileo- bzw. Colostoma und das doppeläufige Ileo- bzw. Colostoma sein. Beim doppeläufigen Stoma gibt es eine zu-

führende und eine abführende Schlinge zur Bauchdecke. Sinn und Zweck ist dabei die Entlastung des noch vorhandenen Darms. Dies gilt sowohl für doppelläufige Dünndarm- als auch doppelläufige Dickdarmstomata (Abbildung 1-32 und Abbildung 1-33).

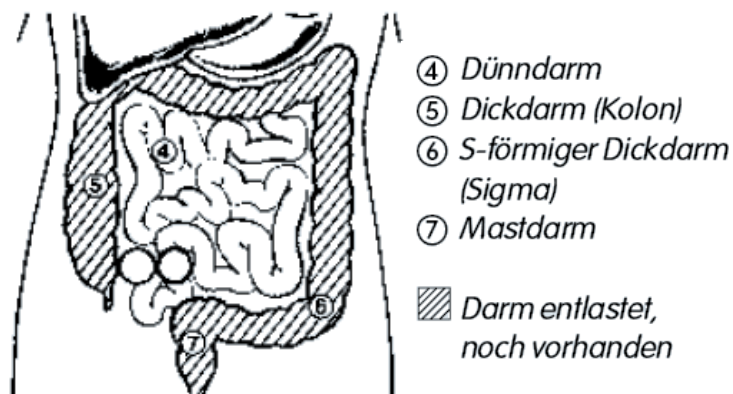


Abbildung 1-32: Darstellung eines doppelläufigen Dünndarm-Ileostomas (Schürmann, 2001)

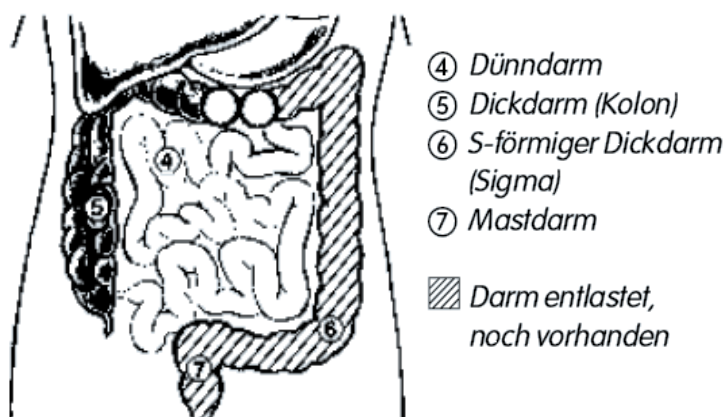


Abbildung 1-33: Darstellung eines doppelläufigen Dickdarm-Ileostomas (Schürmann, 2001)

Für den Begriff endständiger (terminaler) Colostoma wird oftmals auch die Bezeichnung der „AP“ für ‚Anus praeter naturalis‘ (künstlicher Darmausgang) verwendet.

Ein endständiges Ileostoma wird notwendig, wenn der gesamte Dickdarm auf Grund einer Erkrankung operativ entfernt werden muss oder ebenfalls eine Entlastung des

noch vorhandenen Dickdarms erzielt werden soll. Abbildung 1-34 zeigt eine schematische Darstellung eines endständigen Dünndarmileostoma.

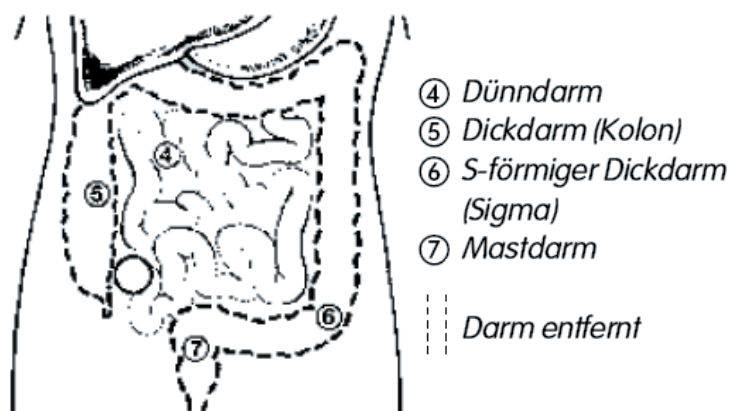


Abbildung 1-34: Darstellung eines endständigen Dünndarmileostomas (Schürmann, 2001)

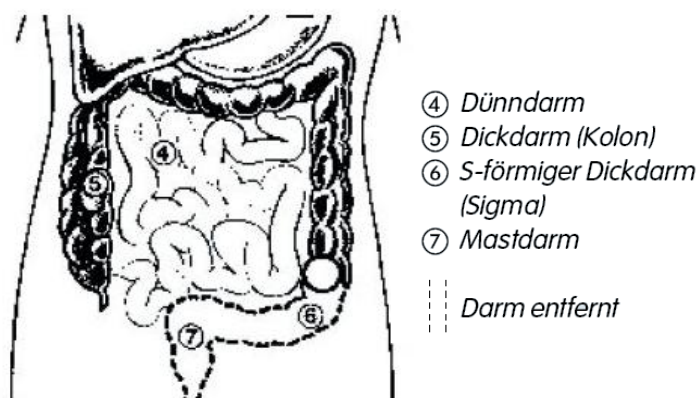


Abbildung 1-35: Darstellung eines endständigen Dickdarmileostomas (Schürmann, 2001)

Das endständige Colostoma wird notwendig, wenn nur ein Teil des Dickdarms, der erkrankt ist, entfernt werden muss oder bei entzündlichen Darmerkrankungen entlastet werden soll. Zu diesem Zweck wird der Dickdarm durch die Bauchdecke nach Außen verlegt (Abbildung 1-35) (Schürmann, 2001).

Die folgenden Abbildungen zeigen ein Stoma und die Anbringung eines Beutels, mit dem der ausfließende Darminhalt aufgefangen wird. Zuerst wird eine Art „Halterung“

auf die Bauchdecke angebracht und an dieser der Beutel aufgeklebt (Abbildung 1-36 und 2-36).



Abbildung 1-36: Utensilien zum Anbringen eines Stomabeutels



Abbildung 1-37: Anbringung eines Ileostomabeutels

Ergebnisse und Diskussion

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Synthese von Anthocyanidinen

2.1.1 Strategie

Die Synthese von Anthocyanidinen erfolgte in allen Fällen über die Zusammenführung von zwei Bausteinen: 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** stellte im Endprodukt den A-Ring dar; die B-Ringkomponente wurde durch unterschiedlich derivatisiertes ω -Acetoxyacetophenon eingeführt. Durch Kondensation der Bausteine unter HCl-Gasatmosphäre und Abspaltung der Schutzgruppe im Alkalischen wurde das jeweilige Anthocyanidin dargestellt (Abbildung 2-1).

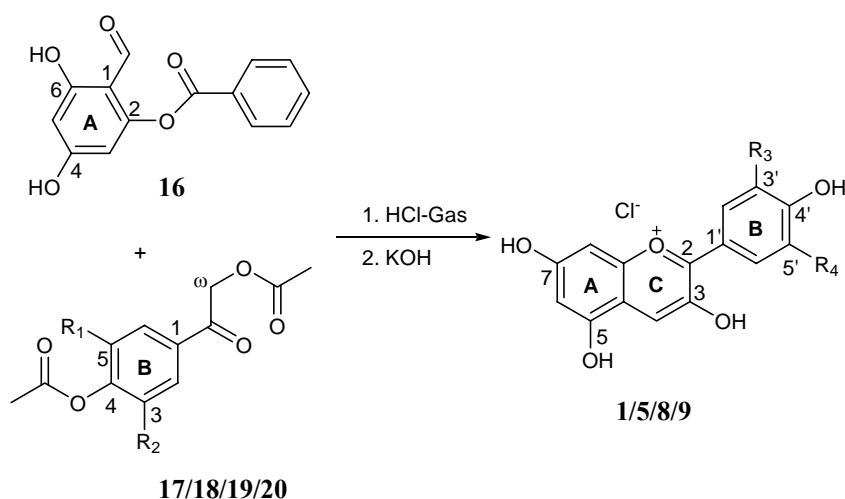


Abbildung 2-1: Allgemeiner Syntheseweg von Anthocyanidinen: Abhängig vom Substitutionsmuster von ω -Acetoxyacetophenon gelangt man zu den Verbindungen Cy-Chlorid **5** ($R_1 = \text{OAcetyl}$, $R_2 = \text{H}$ **18**; $R_{3'} = \text{OH}$, $R_{4'} = \text{H}$ **5**), Dp-Chlorid **1** ($R_1 = \text{OAcetyl}$, $R_2 = \text{OAcetyl}$ **20**; $R_{3'} = \text{OH}$, $R_{4'} = \text{OH}$ **1**), Pg-Chlorid **9** ($R_1/R_2 = \text{H}$ **17**; $R_{3'}/R_{4'} = \text{H}$ **9**) und Pn-Chlorid **8** ($R_1 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{H}$ **19**; $R_{3'} = \text{OMe}$, $R_{4'} = \text{H}$ **8**).

2.1.2 Synthese von 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd

2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** wurde ausgehend von 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd (Phloroglucinaldehyd) **21** und Benzoylchlorid nach Pols and Wilkins

(1971) synthetisiert (Abbildung 2-2). Der Aldehyd **16** wurde nach LC-Trennung an Kieselgel in einer Ausbeute von 21% erhalten.

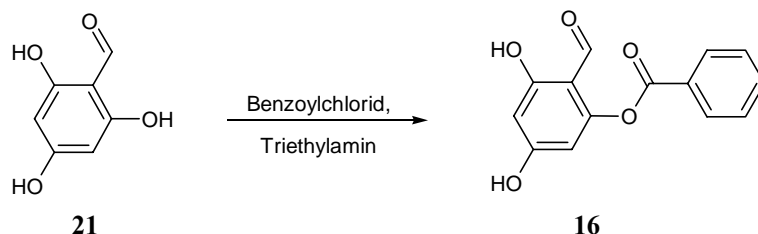


Abbildung 2-2: Darstellung von 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** aus Phloroglucinaldehyd **21** und Benzoylchlorid

2.1.3 Synthese von Pelargonidinchlorid (Pg-Chlorid)

Die Darstellung von Pg-Chlorid **9** begann mit der Synthese von ω ,4-Diacetoxyacetophenon **17**. Hierfür wurden viele verschiedene Wege versucht. Anfangs war die Darstellung von **17** ausgehend von 4-Hydroxybenzoesäure geplant, aus dem ein Acetophenon in Anlehnung an Literaturangaben dargestellt werden sollte. Dieses sollte in einer Radikalreaktion zu einem ω -Bromacetophenon umgewandelt werden, woraus schließlich **17** gewonnen werden sollte (Gabetta und Giorgi, 1990). Dieser Weg schlug, wie die Synthese des Acetophenons über die Barbier-Reaktion (Aurell *et al.*, 1995), fehl. Die Darstellung von **17** gelang schließlich gemäß dem in Abbildung 2-3 aufgeführten Syntheseweg ausgehend von Methoxybenzol (Anisol) **22**.

Im ersten Schritt wurde Anisol **22** einer Fries-Umlagerung mit Chloracetylchlorid in Anwesenheit von AlCl_3 unterzogen. Man erhielt als Zwischenprodukt ω -Chloro-4-hydroxyacetophenon **23** in einer Ausbeute von 20%. Das Chloratom in ω -Position wurde anschließend in einer nucleophilen Substitution durch Acetat ersetzt (Zhang *et al.*, 1999), und man erhielt ω -Acetoxy-4-hydroxyacetophenon **24** in einer Ausbeute von 40%. Im dritten und letzten Schritt dieser Synthesefolge wurde **24** durch Einführen einer Acetylgruppe als Schutzgruppe in para-Position zu ω ,4-Diacetoxyacetophenon **17** in einer Ausbeute von 75% umgesetzt.

Die Darstellung von Pg-Chlorid **9** gelang durch Kondensation von **17** mit 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** in gesättigter HCl-Gasatmosphäre. Nach 24 Stunden

wurde das noch geschützte Benzoylpelargonidinchlorid abgetrennt und das feinkristalline Pulver mit Ether gewaschen, sowie getrocknet.

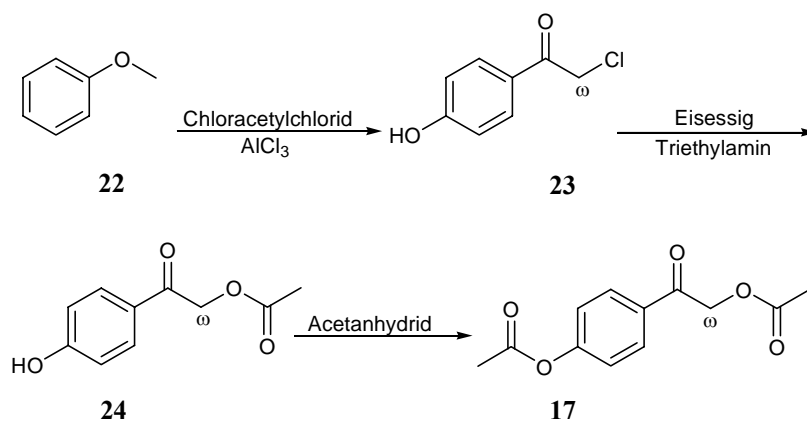


Abbildung 2-3: Darstellung von ω,4-Diacetoxyacetophenon **17** ausgehend von Methoxybenzol **22**.

Die Abspaltung der Schutzgruppe erfolgte unter alkalischen Bedingungen und Kühlung. Nach Zugabe von konzentrierter Salzsäure kristallisierte Pg-Chlorid **9** in feinen Kristallen aus. Die Umkristallisierung erfolgte durch Umwandlung in das Pikrinsäuresalz. Nach Lösen in methanolischer Salzsäure und Zugabe von Ether kristallisierte das Chlorid wieder. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Auf diese Weise wurde Pg-Chlorid **9** in einer Ausbeute von 40% erhalten. Die Reinheit von **9** wurde mittels HPLC-DAD (HPLC-System 1) bestimmt und lag bei > 95%.

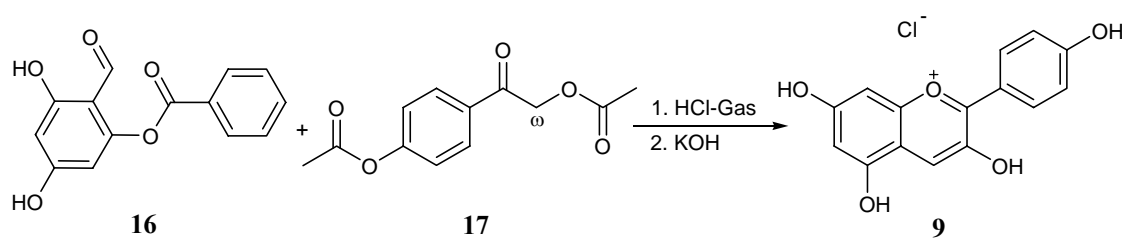


Abbildung 2-4: Kondensation von ω,4-Diacetoxyacetophenon **17** und 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** zu Pg-Chlorid **9**

2.1.4 Synthese von Cyanidinchlorid (Cy-Chlorid)

Die Synthese von Cy-Chlorid **5** ging von 1,2-Dihydroxybenzol (Catechol) **25** aus (Abbildung 2-5). Dabei wurde **25** mit Chloracetylchlorid in einer Fries-Umlagerung zu ω -Chlor-3,4-dihydroxyacetophenon **26** umgesetzt, das nach dem Zersetzen mit Eiswasser und Umkristallisieren in einer Ausbeute von 59% gewonnen wurde. In der zweiten Stufe wurde zuerst die Hydroxylgruppe von **26** durch Erhitzen mit Acetanhydrid in Form eines Acetylestere geschützt. Nach Zugabe von Essigsäure und Kaliumacetat wurde das Chloratom in einer S_N-Reaktion durch Acetat substituiert. Nach Umkristallisieren lag die Ausbeute an ω ,3,4-Triacetoxyacetophenon **18** bei 70%.

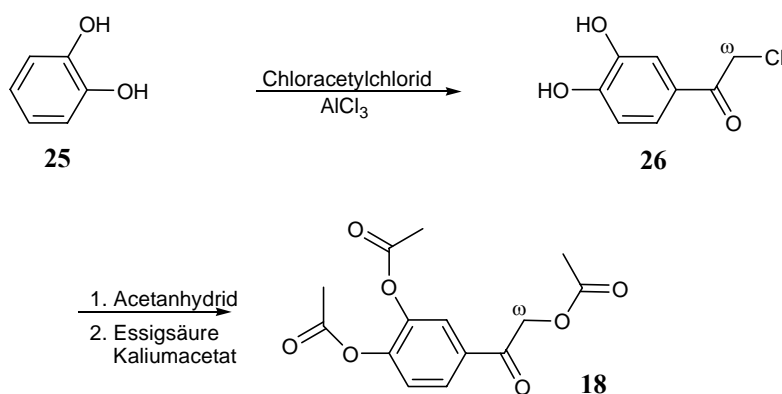


Abbildung 2-5: Syntheseweg für ω ,3,4-Triacetoxyacetophenon **18** aus 1,2-Dihydroxybenzol **25**

Die Synthese von Cy-Chlorid **5** erfolgte nach Kondensation von 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** und **18** in HCl-Gasatmosphäre (Abbildung 2-6).

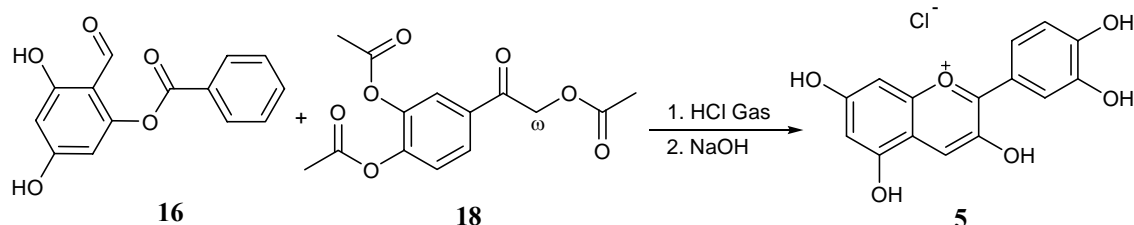


Abbildung 2-6: Kondensation von ω ,3,4-Triacetoxyacetophenon **18** und 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** zu Cy-Chlorid **5**

Dabei kristallisierte 5-Benzoylcyanidinchlorid aus, wurde abzentrifugiert und im Anschluss mit einer ethanolischen Natriumhydroxidlösung entschützt. Nach Zugabe von konzentrierter Salzsäure kristallisierte **5** über Nacht in feinen Nadeln aus. Zur Umkristallisation wurde es in das Pikrat und anschließend wieder in das Chlorid überführt. Nach zweimaliger Durchführung dieses Reinigungsprozesses wurde **5** in einer Ausbeute von 52% gewonnen. Die Reinheit von **9** wurde mittels HPLC-DAD (HPLC-System 1) bestimmt und lag bei > 95%.

2.1.5 Synthese von Peonidinchlorid (Pn-Chlorid)

Die Synthese von Pn-Chlorid **8** ging von 1,2-Dimethoxybenzol (Veratrol) **27** aus. In der ersten Stufe erfolgte auch hier eine Fries-Umlagerung nach Umsetzen mit Chloracetylchlorid. In Anwesenheit von AlCl_3 wurde zuerst eine Methylgruppe abgespalten, und es bildete sich intermediär ein Ester mit dem Chloracetylchlorid. Nach Zugabe einer zweiten äquimolaren Menge AlCl_3 lagerte sich der Ester in das ω -Chlor-4-hydroxy-3-methoxyacetophenon **28** um. Die Ausbeute lag bei 27%. Im zweiten Schritt wurde das Chloratom in einer S_N -Reaktion durch Acetat ersetzt. Die Ausbeute an ω -Acetoxy-4-hydroxy-3-methoxyacetophenon **29** lag nach Umkristallisieren aus heißem Wasser bei 25%. Durch die Umsetzung von **29** mit Essigsäureanhydrid entstand ω ,4-Di-acetoxy-3-methoxyacetophenon **19**, das nach Umkristallisieren aus heißem Wasser in einer Ausbeute von 28% erhalten wurde (Abbildung 2-7).

Die Synthese von Pn-Chlorid **8** erfolgte durch Kondensation von ω ,4-Diacetoxy-3-methoxyacetophenon **19** mit 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** in wasserfreier Atmosphäre von HCl-Gas (Abbildung 2-8). Dabei entstand das geschützte 5-Benzoylpeonidinchlorid, welches in feinen Nadeln ausfiel. Nach dem Trocknen an der Luft wurde die Schutzgruppe in ethanolischer Lösung abgespalten und durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure **8** gewonnen. Zum Schluss wurde, nach zweimaligem Umkristallisieren als Pikrat, **8** in einer Ausbeute von 48% erhalten. Die Reinheit von **9** wurde mittels HPLC-DAD (HPLC-System 1) bestimmt und lag bei > 95%.

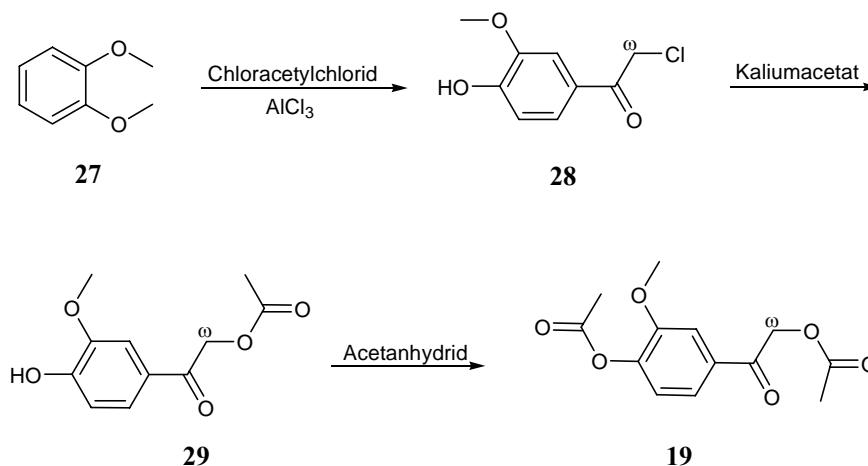


Abbildung 2-7: Synthese von $\omega,4$ -Diacetoxy-3-methoxyacetophenon **19** aus 1,2-Dimethoxybenzol **27**

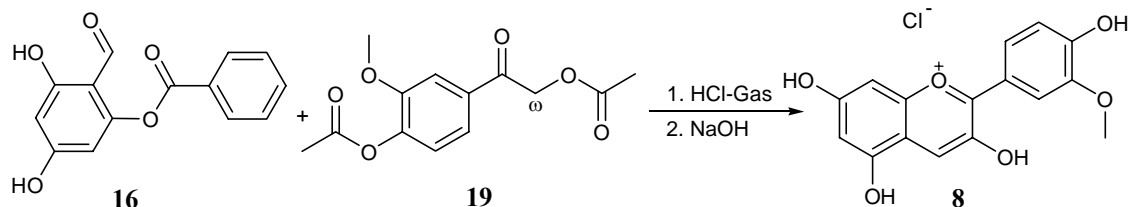


Abbildung 2-8: Kondensation von $\omega,4$ -Diacetoxy-3-methoxyacetophenon **19** und 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** zu Pn-Chlorid **8**

2.1.6 Synthese von Delphinidinchlorid (Dp-Chlorid)

Zur Synthese von Dp-Chlorid **1** wurde wiederum 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** verwendet. In Abbildung 2-9 ist der Syntheseweg für $\omega,3,4,5$ -Tetraacetoxyacetophenon **20** beschrieben. In der ersten Stufe wurde 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure (Gallussäure) **30** mit Acetanhydrid acetyliert. Dadurch erhielt man 3,4,5-Triacetoxybenzoesäure **31** in einer Ausbeute von 79%. Anschließend wurde die geschützte Gallussäure **31** in das korrespondierende Säurechlorid **32** überführt. Hier lag die Ausbeute bei 91%. In einer Arndt-Eistert-Reaktion wurde Chlor durch Diazomethan substituiert und dadurch ω -Azo-3,4,5-triacetoxyacetophenon **33** in einer Ausbeute von 81% erhalten. Das Produkt **33** sollte direkt durch Eisessig in $\omega,3,4,5$ -Tetraacetoxyacetophenon **20** umgesetzt werden, jedoch war dieser Syntheseweg nicht erfolgreich, da

sich **20** nur in Spuren bildete. Deshalb wurde die Azogruppe zuerst mit Hydrogenchlorid (gelöst in absolutem Diethylether) umgesetzt. ω -Chlor-3,4,5-triacetoxyacetophenon **34** wurde in einer Ausbeute von 87% erhalten. Mit Kaliumacetat wurde **34** einer nucleophilen Substitution unterworfen und **20** mit 75% Ausbeute erhalten.

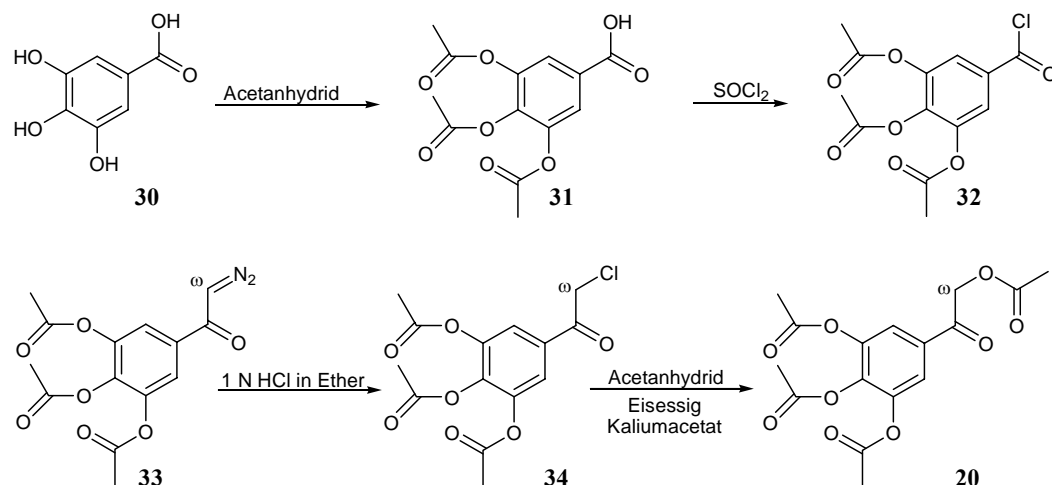


Abbildung 2-9: Syntheseweg für $\omega,3,4,5$ -Tetraacetoxyacetophenon **20** aus 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure **30**

In gesättigter Atmosphäre von HCl-Gas wurde **20** mit 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** zu 5-Benzoyldelphinidinchlorid umgesetzt. Das Abspalten der Schutzgruppe erfolgte mit wässrigem Kaliumhydroxid (Abbildung 2-10). Nach dem Kristallisieren aus Ethanol durch Zugabe von Salzsäure wurde Dp-Chlorid **1** in einer Ausbeute von 42% gewonnen. Die Reinheit von **9** wurde mittels HPLC-DAD (HPLC-System 1) bestimmt und lag bei > 95%.

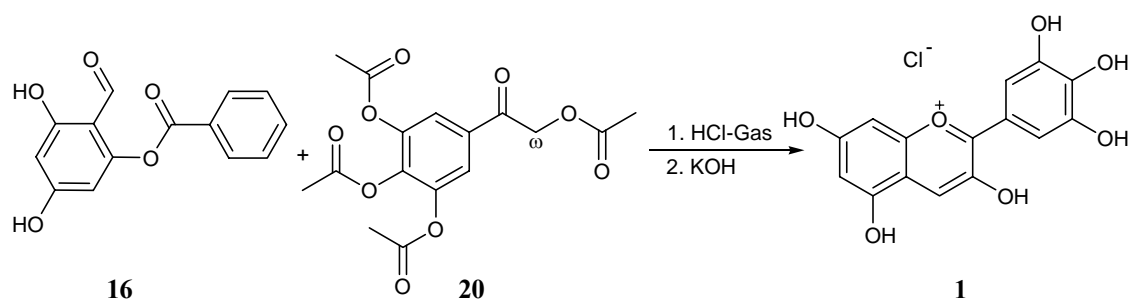


Abbildung 2-10: Kondensation von $\omega,3,4,5$ -Tetraacetoxyacetophenon **20** und 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** zu Dp-Chlorid **1**

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch die Etablierung verschiedener Anthocyanidinsynthesen eine Möglichkeit geschaffen wurde, Anthocyanidine in größeren Mengen für verschiedene Untersuchungen zu erhalten. Weiterhin ermöglichen diese Synthesewege nachfolgende Darstellungen radioaktiv markierter Anthocyanidine.

2.1.7 Synthese und ^{14}C -Markierung von Pelargonidin- und Delphinidinchlorid

Ursprünglich war vorgesehen, die ^{14}C -Markierung von Pg-Chlorid **9** in Position 2 durchzuführen. Man hätte dabei von [Carboxy- ^{14}C]-*p*-Hydroxybenzoesäure ausgehen müssen; diese Substanz war jedoch nicht mehr kommerziell erhältlich. Des Weiteren scheiterte die Synthese von ω ,4-Diacetoxyacetophenon **17** ausgehend von *p*-Hydroxyacetophenon, das aus der 4-Hydroxybenzoesäure gebildet werden sollte. Daher schien eine radioaktive Markierung in Position 4 realisierbar. Daraus ergab sich, dass der Baustein für den A-Ring an der Carbonylgruppe radioaktiv markiert werden musste. Ein wesentlicher Vorteil, der für die Markierung der A-Ring-Komponente sprach, war die Verwendbarkeit für weitere Markierungen von Anthocyanidinen. So war es möglich, mit der gleichen Methode auch Dp-Chlorid **1** radioaktiv zu markieren.

2.1.7.1 Synthese von [Formyl- ^{14}C]-Trihydroxybenzaldehyd

Ausgehend von 1,3,5-Trihydroxybenzol (Phloroglucin) **37** wurde [Formyl- ^{14}C]-2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd **38** dargestellt. **37** wurde in einer Vilsmeier-Reaktion mit [Formyl- ^{14}C]-Dimethylformamid ([Formyl- ^{14}C]-DMF) umgesetzt (Abbildung 2-11). Der radioaktiv markierte Aldehyd **38** wurde mittels RP18-Hochleistungsflüssigchromatographie (RP18-HPLC) isoliert. Die Ausbeuten lagen bei zwei Ansätzen zwischen 43.9% und 47.5%.

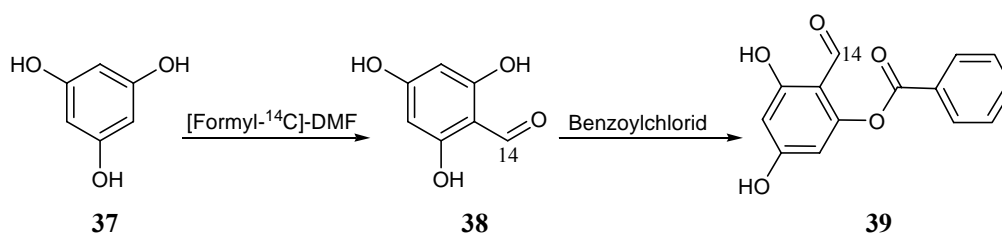


Abbildung 2-11: Radioaktive Markierung von 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **39** ausgehend von 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd **37**

2.1.7.2 Synthese von [Formyl-¹⁴C]-2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd

Im darauf folgenden Schritt wurde [Formyl-¹⁴C]-2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd **38** mit Benzoylchlorid umgesetzt, woraus [Formyl-¹⁴C]-2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **39** resultierte. Dabei entstand ein Gemisch bestehend aus mono- und dibenzoyliertem 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd. Auf Grund der geringen Mengen fand die Trennung wiederum mittels RP18-HPLC statt. Die Ausbeuten lagen bei 18.9% beim ersten und 16.2% beim zweiten Syntheseansatz.

2.1.7.3 Synthese von [4-¹⁴C]-Pelargonidinchlorid

Radioaktiv markiertes Pg-Chlorid **35** wurde in der gleichen Weise synthetisiert wie das unmarkierte (vgl. 2.1.3). So fand auch hier die Kondensation von [Formyl-¹⁴C]-2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **39** mit ω,4-Diacetoxyacetophenon **17** zu [4-¹⁴C]-Pelargonidinchlorid ([4-¹⁴C]-Pg-Chlorid) **35** in gesättigter HCl-Gasatmosphäre statt (Abbildung 2-12). Das geschützte Anthocyanidin wurde, wie bereits beschrieben, entschützt und über RP18-HPLC aufgereinigt. Man erhielt 0.2 mg reines [4-¹⁴C]-Pg-Chlorid **35** mit einer spezifischen Aktivität von 33.6 μCi/mmol.

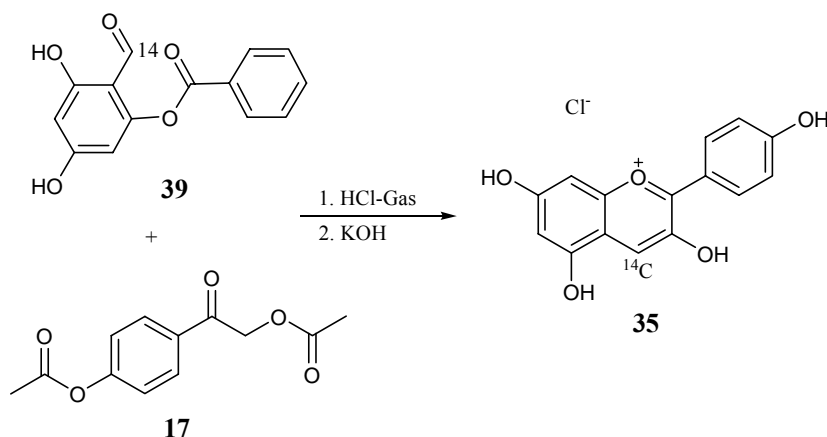


Abbildung 2-12: Kondensation von [Formyl-¹⁴C]-2-benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **39** mit ω,4-Diacetoxyacetophenon **17** zu [4-¹⁴C]-Pg-Chlorid **35**

2.1.7.4 Synthese von [4-¹⁴C]-Delphinidinchlorid

[4-¹⁴C]-Delphinidinchlorid ([4-¹⁴C]-Dp-Chlorid) **36** wurde wie [4-¹⁴C]-Pg-Chlorid ausgehend von [Formyl-¹⁴C]-2-benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **39** als Komponente für den A-Ring synthetisiert. Die Kondensation der beiden Bausteine zu [4-¹⁴C]-Dp-Chlorid **36** fand wiederum in gesättigter Atmosphäre aus HCl-Gas statt (Abbildung 2-13).

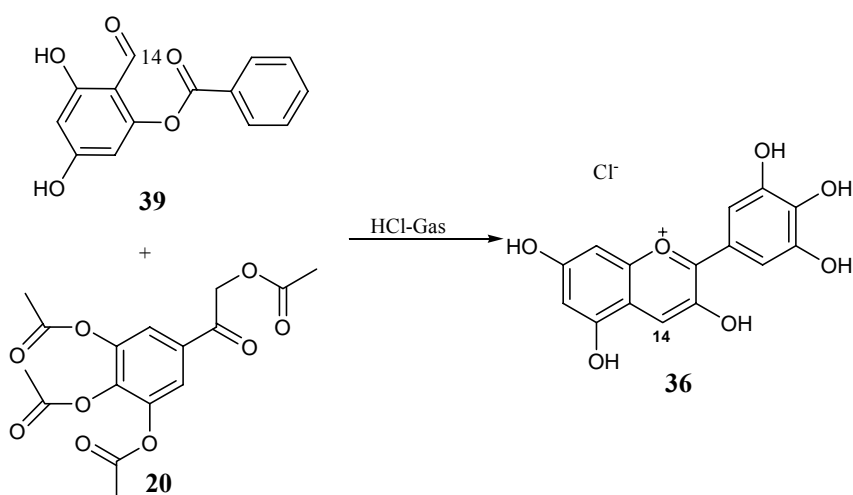


Abbildung 2-13: Kondensation von [Formyl-¹⁴C]-benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **39** mit ω,3,4,5-Tetraacetoxyacetophenon **20** zu [4-¹⁴C]-Dp-Chlorid **36**

Mit den hier erstmals beschriebenen Methoden zur Darstellung ^{14}C -markierter Anthocyanidine wird der Wissenschaft ein Instrument in die Hand gegeben, mit dem in Zukunft gezielt *in vivo*-Studien zur Aufnahme und Verteilung von Anthocyanidinen durchgeführt werden können.

2.2 Isolierung von Anthocyanen aus Wildheidelbeeren

Auch die Isolierung von Anthocyanen aus Früchten stellt einen sehr guten Zugang für authentische Referenzen dar. Um Anthocyane quantifizieren zu können, werden die Reinsubstanzen zur Kalibrierung benötigt. Kommerziell sind nur wenige Anthocyane zu hohen Preisen erhältlich, so dass außer den vorgängig geschilderten Möglichkeiten zur aufwendigen Synthese eine Isolierung aus anthocyanreichen pflanzlichen Geweben eine bevorzugte Alternative darstellt. Wir verwendeten zur Anthocyan-Isolierung frische Wildheidelbeeren.

2.2.1 Gewinnung eines Rohextrakts

Aus erntefrischen Wildheidelbeeren wurde zunächst ein Rohextrakt hergestellt. Dazu wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. Die Methode nach Kalt *et al.* (2001) ergab eine Rohextraktausbeute von 11.1%, die nach Kaehkoenen *et al.* (2003) 12.4%. Die Unterschiede der beiden Methoden lagen in der Zusammensetzung des Extraktionsgemisches: Bei erstgenannter setzte sich dieses aus Methanol, Wasser und Ameisensäure (87/12/1 (v/v)), bei zweitgenannter aus Acetonitil, Wasser und Ameisensäure (49/50/1 (v/v)) zusammen. Auf Grund der hohen Polarität des Extraktionsgemisches lösten sich bei der Methode nach Kaehkoenen *et al.* vermutlich mehr der in der Frucht enthaltenen Zucker und organischen Säuren, wodurch sich der erhöhte Extraktanteil gegenüber der Methode nach Kalt *et al.* erklären lässt.

2.2.2 LC-Reinigung an XAD-7

Zur LC-Aufreinigung wurde XAD-7 verwendet, wobei sich Zucker, Aminosäuren und aliphatische Säuren durch Anwendung von 2%iger wässriger Ameisensäure eluieren ließen. Die Methoden nach Kaehkoenen *et al.* (2003) und Kalt *et al.* (2001) lieferten eine ähnliche Ausbeute in Bezug auf die angereicherten Anthocyane. Man erhielt eine mit Anthocyanen angereicherte Polyphenolfraktion von 1.5% bzw. 1.3% bezogen auf die ursprünglich eingesetzte Menge an Wildheidelbeeren.

2.2.3 Isolierung von Anthocyanen mittels HPLC

Zur Isolierung einzelner Anthocyane aus dem Rohextrakt versprach eine Trennung der Anthocyane mittels halbpräparativer HPLC Erfolg. Anfangs wurde eine Analyse mit einer Eurospher100 RP18 250 x 8 mm versucht. Als geeigneter erwies sich die Verwendung einer Eurospher100 RP18-Säule in der Dimension 250 x 4 mm. Es gelang, eine geeignete Trennmethode mit dieser Säule zu entwickeln, mit der 14 Anthocyanfraktionen erhalten wurden (Abbildung 2-14).

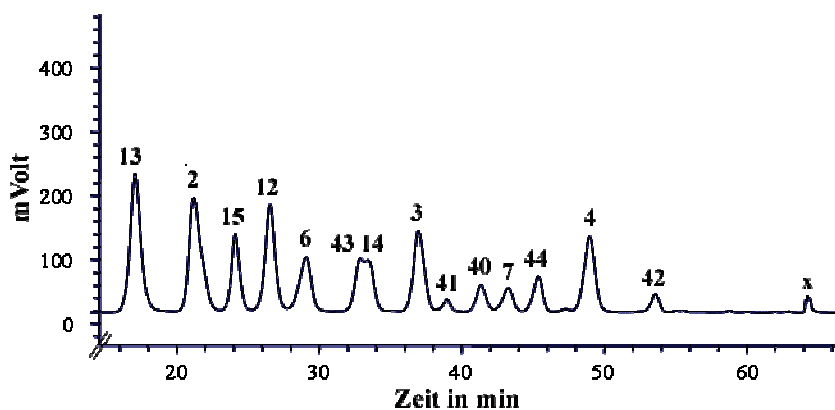


Abbildung 2-14: Trennung von Heidelbeeranthocyanen mittels HPLC an Eurospher100 RP-18 (250 x 4 mm): Dp-3-O-gal **13**, Dp-3-O-glu **2**, Cy-3-O-gal **15**, Dp-3-O-ara **12**, Cy-3-O-glc **6**, Pt-3-O-gal **43**, Cy-3-O-ara **14**, Pt-3-O-glc **3**, Pn-3-O-gal **41**, Pt-3-O-ara **40**, Pn-3-O-glc **7**, Mv-3-O-gal **44**, Mv-3-O-glu **4** und Mv-3-O-ara **42**, Bedingungen siehe (HPLC-System 4)

Die Substanzen **43** und **14** konnten nur angetrennt werden. Die jeweiligen Verbindungen wurden als einzelne Fraktionen gesammelt. Injiziert wurde das an XAD-7 isolierte Polyphenolisolat. Nach insgesamt 150 Injektionen von je 80 µL einer Lösung mit der Konzentration von 10 mg/mL XAD-7-Extrakt wurden insgesamt 14 Fraktionen isoliert. Die erhaltene Trennung steht in guter Übereinstimmung mit den Trennungen, welche von anderen Gruppen bereits publiziert worden waren (Goiffon *et al.*, 1999, Dugo *et al.*, 2001, Mazza *et al.*, 2002, Kaehkoenen *et al.*, 2003, Talavera *et al.*, 2004, Faria *et al.*, 2005).

Die Fraktionen mit den beiden Substanzen **43** und **14** wurden gesammelt und nach schonendem Einengen im Vakuum und anschließendem Lyophilisieren erneut, aber dieses Mal über eine Zorbax SB-C8-Säule (150 x 4.6 mm), mittels HPLC aufgetrennt (Abbildung 2-15). Die einzelnen Fraktionen wurden schonend im Vakuum eingengt und im Anschluss lyophilisiert. Die Identifizierungen erfolgten an Hand von Literaturdaten, Retentionszeiten, Absorptionsspektren, Massenspektren und ¹H-NMR-Analytik.

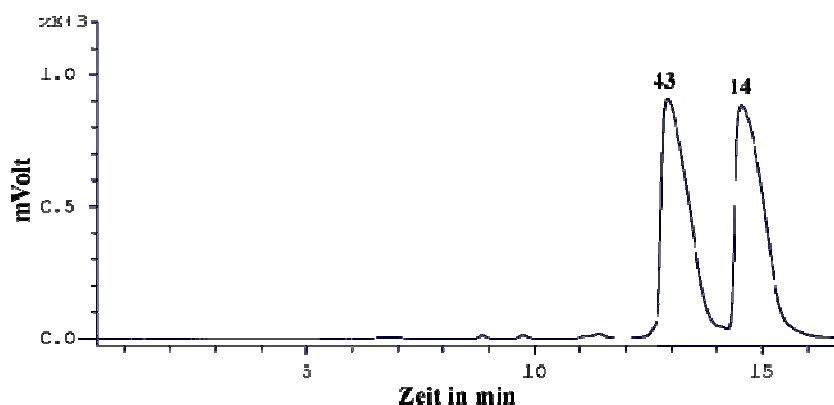


Abbildung 2-15: HPLC-Trennung der mittels HPLC an Eurospher100 RP-18 erhaltenen Fraktion mit den Substanzen **43** und **14** (Pt-3-O-gal und Cy-3-O-ara), (vgl. Abbildung 2-14) an einer Zorbax SB-C8-Säule (150 x 4.6 mm) (Bedingungen siehe 3.2.1, HPLC-System 6)

2.2.4 Identifizierung der isolierten Anthocyane mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS

Die Zuordnung der Substanzen und die Reinheitsprüfung erfolgten zunächst mittels HPLC-DAD (HPLC-System 7) anhand von Retentionszeiten und ihres Absorptions-

spektren. Alle Substanzen wiesen eine Reinheit von mehr als 96% auf. Weiterhin erfolgte die Identifizierung über HPLC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 und HPLC-MS-System 2).

Anhand der Elutionsreihenfolge, der Absorptionsspektren und von Literaturdaten wurden die einzelnen Substanzen bereits zugeordnet. Durch die Kopplung von HPLC-DAD mit dem Tandemmassenspektrometer wurde den einzelnen Peaks im HPLC-Chromatogramm eine Molekülmasse zugeordnet (Abbildung 2-16).

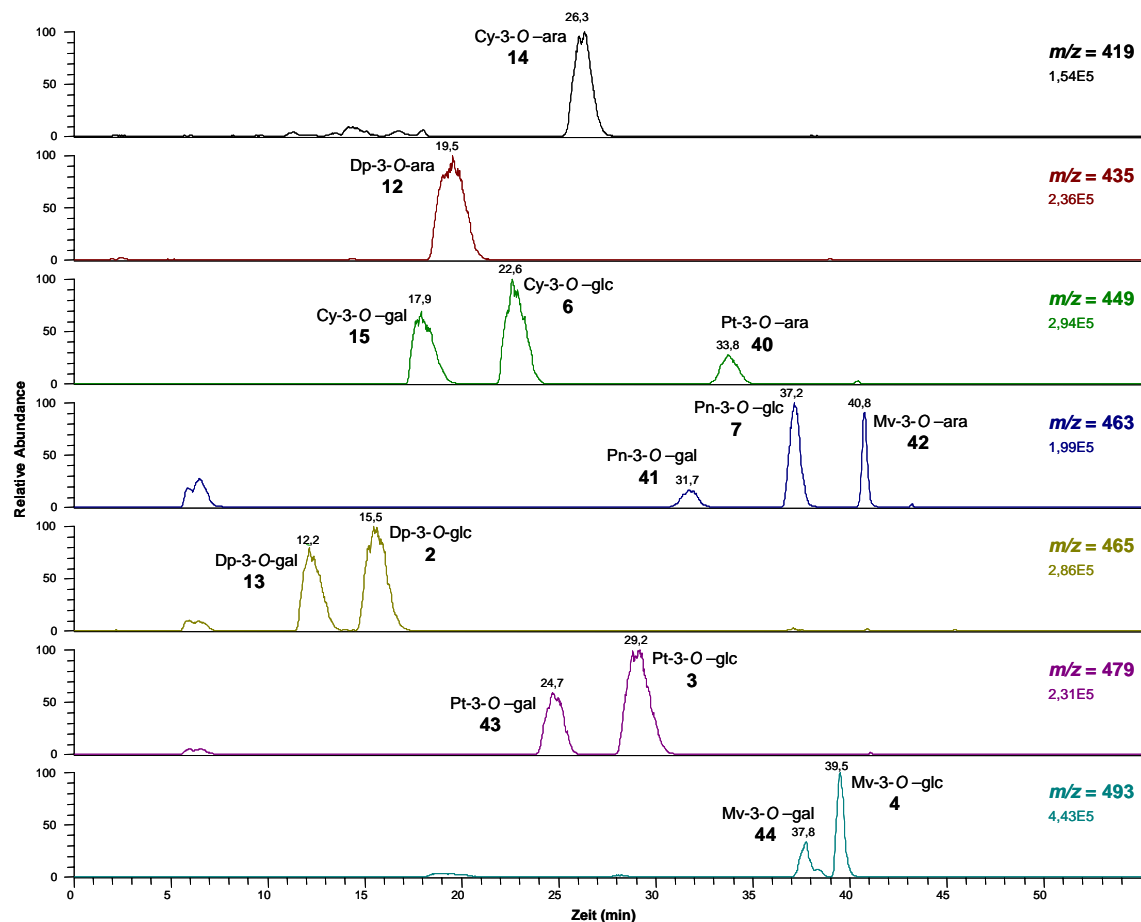


Abbildung 2-16: HPLC-ESI_{pos}-MS-Chromatogramm eines Wildheidelbeerextrakts. Abgebildet sind die Anthocyane, die aus Wildheidelbeeren isoliert wurden (Bedingungen siehe 3.2.2, HPLC-MS-System 2).

Das Chromatogramm steht in guter Übereinstimmung mit dem von Dugo et al. veröffentlichten (Dugo *et al.*, 2001). Eine weitere Absicherung der einzelnen Substanzen fand durch die Aufnahme von HPLC-MS/MS-Spektren statt (HPLC-MS-System 1).

Aufgrund der LC-MS(MS)-Daten wurden v. a. die Aglycone der Anthocyane eindeutig zugeordnet. Außerdem wurde durch MS-Spektren zwischen Hexose- und Pentose-Konjugation unterschieden. Lag eine glycosidische Bindung zu einer Hexose vor, ergab sich ein Massenverlust von 162 u; handelte es sich um eine Pentose, so betrug die Differenz 132 u.

Tabelle 2-1: LC-ESI_{pos}-MS/MS-Daten der isolierten Heidelbeeranthocyane bei einer Stoßenergie von -20 eV. Die Retentionszeit bezieht sich auf die in Abbildung 2-16. (Bedingungen: siehe 3.2.2, HPLC-MS-System 1)

t_R in min	Elternion m/z⁺	Tochterion m/z⁺	Massendifferenz in u	Aglycon	Substanz
12.2	465.1	302.9	162	Delphinidin	13
15.5	465.1	302.9	162	Delphinidin	2
17.9	449.0	286.9	162	Cyanidin	15
19.5	435.0	302.9	132	Delphinidin	12
22.6	449.0	286.9	162	Cyanidin	6
24.7	479.1	316.9	162	Petunidin	43
26.3	419.0	286.9	132	Cyanidin	14
29.2	479.0	317.0	162	Petunidin	3
31.7	463.3	301.0	162	Peonidin	41
33.8	449.1	317.0	132	Petunidin	40
37.2	463.1	300.9	162	Peonidin	7
37.8	493.1	331.0	162	Malvidin	44
39.5	493.1	331.0	162	Malvidin	4
40.8	463.0	330.9	132	Malvidin	42

Die Fraktion „x“ (t_R = 64.5 min; Abbildung 2-14) zeigte bei der Reinheitsüberprüfung eine Auftrennung und ein diffuses Massenspektrum, so dass davon auszugehen war, dass es sich um eine Mischung aus unterschiedlichen Anthocyanen handelte, wie z. B. acetylierte Anthocyane (Mazza *et al.*, 2002). Da es sich dabei um Minorkomponenten handelte wurde die Fraktion verworfen.

Mittels LC-MS/MS konnte nicht zwischen Glucose- und Galactose-Konjugation unterschieden werden, da das Glucosid und das Galactosid eines Anthocyanidins die gleichen MS-Fragmente zeigen. Daher musste weiterhin die Struktur mittels ¹H-NMR auf-

geklärt werden. Dies erfolgte für alle Substanzen mit Ausnahme von Substanz **41** (Abbildung 2-14), da diese nicht in ausreichender Menge vorlag.

2.2.5 ¹H-NMR-Analytik der isolierten Anthocyane

Aufgrund der Tatsache, dass mittels Massenspektren nur das Aglycon zugeordnet und nur zwischen Hexose und Pentose unterschieden wurde, mussten die isolierten Substanzen mittels ¹H-NMR-Analytik charakterisiert werden. Um ein Glucosid und ein Galactosid der Anthocyane im NMR-Spektrum voneinander zu unterscheiden, wurden von zwei käuflichen Referenzen (Cy-3-*O*-glc **6** und Cyanidin-3-*O*-galactosid (Cy-3-*O*-gal) **15**) NMR-Spektren aufgenommen. Da als Lösungsmittel 2% DCl in D₂O verwendet wurde, wurden die Wasserstoffatome der Hydroxylgruppen sehr schnell durch Deuterium ersetzt und waren somit im NMR-Spektrum nicht mehr sichtbar. Glucoside zeigten bei δ 4.00-3.40 charakteristische, überlagerte Signale der C-gebundenen Wasserstoffe und Galactoside im Bereich δ 4.00-3.70 mit einer Intensität von jeweils 7H. Arabinoside waren an überlagerten Signalen mit der Intensität von 6H im Bereich δ 4.10-3.70 erkennbar. Auf Grund der erhaltenen NMR-Daten konnte eindeutig zwischen Glucose, Galactose und Arabinose als Zuckerrest unterschieden werden. In Tabelle 2-2 sind die NMR-Daten der einzelnen isolierten Anthocyane aufgeführt. Die Retentionszeiten beziehen sich auf Abbildung 2-16.

Tabelle 2-2: ¹H-NMR-Charakterisierung der isolierten Anthocyane (2% DCl in D₂O, 400 MHz)

t_R in min	NMR-Daten	Substanz
12.2	δ 8.27 (ar, s, 1H), 8.12 (ar, s, 1H), 6.87 (ar, s, 2H), 5.07 (CH, s, 1H), 3.98-3.70 (überlagert 7 H)	Dp-3- <i>O</i> -gal 13
15.5	δ 8.12 (ar, s, 1H), 7.94 (ar, s, 1H), 6.56 (ar, s, 2H), 4.96 (CH, s, 1H), 3.98-3.42 (überlagert, 7H)	Dp-3- <i>O</i> -glc 2
17.9	δ 8.25 (ar, s, 1H), 8.12 (ar, s, 1H), 7.36 (ar, s, 1H), 7.07 (ar, s, 1H), 6.37 (ar, s, 1H), 5.02 (ar, s, 1 H), 4.02-3.72 (überlagert, 7H)	Cy-3- <i>O</i> -gal 15

t_R in min	NMR-Daten	Substanz	
19.5	δ 8.17 (ar, s, 1 H), 7.85 (ar, s, 1 H), 6.55 (CH, s, 2 H), 4.96 (ar, s, 1 H), 4.10-3.68 (überlagert 6 H)	Dp-3-O-ara	12
22.6	δ 8.16 (ar, s, 1H), 8.08 (ar, s, 1H), 7.31 (ar, s, 1H), 7.02 (ar, s, 1H), 5.01 (CH, s, 1H), 3.93-3.39 (überlagert, 7H)	Cy-3-O-glc	6
24.7	δ 8.16 (überlagert, ar, s, 2H), 6.89 (ar, s, 1H), 6.71 (ar, s, 1H), 5.11 (CH, s, 1H), 4.01-3.72 (überlagert 7H), 3.45 (CH ₃ , s, 3H)	Pt-3-O-gal	43
26.3	δ 8.20 (ar, s, 1H), 8.15 (ar, s, 1H), 7.37 (ar, s, 1H), 7.07 (ar, s, 1H), 6.37 (ar, s, 1H), 5.02 (CH, s, 1H), 4.08-3.71 (überlagert, 6H)	Cy-3-O-ara	14
29.2	δ 8.13 (ar, s, 1 H), 7.97 (ar, s, 1 H), 6.97 (ar, s, 1H), 6.64 (ar, s, 1H), 6.37 (ar, s, 1H), 5.07 (CH, s, 1H), 4.0-3.40 (überlagert, 7H), 3.34 (CH ₃ , s, 3H)	Pt-3-O-glc	3
33.8	δ 8.15 (ar, s, 1H), 7.98 (ar, s, 1H), 6.99 (ar, s, 1H), 6.62 (ar, s, 1H), 6.39 (ar, s, 1H), 5.04 (CH, s, 1H), 4.07-3.69 (überlagert 6H), 3.34 (CH ₃ , s, 3H)	Pt-3-O-ara	40
37.2	δ 8.37 (ar, s, 1H), 8.12 (ar, s, 1H), 7.61 (ar, s, 1H), 7.33 (ar, s, 1H), 6.58 (ar, s, 1H), 5.16 (CH, s, 1H), δ 3.94-3.42 (überlagert, 7H), 3.59 (CH ₃ , s, 3H)	Pn-3-O-glc	7
37.8	δ 8.38 (ar, s, 1H), 8.12 (ar, s, 1H), 7.12 (ar, s, 2H), 5.16 (CH, s, 1H), 4.00-3.69 (überlagert, 7H), 3.65 (CH ₃ , s, 6H)	Mv-3-O-gal	44
39.5	δ 8.31 (ar, s, 1H), 8.13 (ar, s, 1H), 7.03 (ar, s, 2 H), 5.19 (ar, s, 1H), 3.94-3.38 (überlagert, 7H), 3.62 (CH ₃ , s, 6H)	Mv-3-O-glc	4
40.8	δ 8.31 (ar, s, 1H), 8.13 (ar, s, 1H), 7.19 (ar, s, 2H), 5.10 (ar, s, 1H), 4.05-3.72 (überlagert, 6H), 3.69 (CH ₃ , s, 6H)	Mv-3-O-ara	42

Auf Grund des Austauschs der Protonen an den Hydroxygruppen durch Deuterium wurden die Proben nach der Messung zuerst gefriergetrocknet und schließlich wieder in verdünnter Salzsäure aufgenommen, um den Austausch rückgängig zu machen. Anschließend wurde ein zweites Mal gefriergetrocknet.

2.2.6 Zuordnung der isolierten Anthocyane

Mittels HPLC, HPLC-MS/MS und Literaturdaten wurden die isolierten Anthocyane eindeutig identifiziert (Tabelle 2-3). Die Daten, die bei der Strukturaufklärung gewonnen wurden, standen in gutem Einklang mit den Literaturdaten (Goiffon *et al.*, 1999, Prior *et al.*, 2001, Jaakola *et al.*, 2002, Kaehkoenen *et al.*, 2003, Faria *et al.*, 2005, Wu und Prior, 2005). Zur eindeutigen Zuordnung der Zuckerreste wurde (wie in Kapitel 2.2.5 gezeigt) auch $^1\text{H-NMR}$ durchgeführt.

Peonidin-3-*O*-galactosid (Pn-3-*O*-gal) **41** wurde nur in einer sehr geringen Menge isoliert und stellt laut Literatur nur eine Minorkomponente in der Wildheidelbeere dar (Kaehkoenen *et al.*, 2003). Von dieser Substanz konnte daher kein $^1\text{H-NMR}$ aufgenommen werden.

Tabelle 2-3: Zusammenfassung der mittels Tandemmassenspektrometrie und $^1\text{H-NMR}$ gewonnenen Daten (t_{R} bezieht sich auf Abbildung 2-16)

t_{R} in min	m/z^+	m (Aglycon)	$^1\text{H-NMR}$	Anthocyan		Auswaage
12.2	465.1	302.9	Galactose	Dp-3- <i>O</i> -gal	13	8.5 mg
15.5	465.0	302.9	Glucose	Dp-3- <i>O</i> -glc	2	8.1 mg
17.9	449.0	286.9	Galactose	Cy-3- <i>O</i> -gal	15	4.4 mg
19.5	435.0	302.9	Arabinose	Dp-3- <i>O</i> -ara	12	5.9 mg
22.6	449.0	286.9	Glucose	Cy-3- <i>O</i> -glc	6	4.2 mg
24.7	479.1	316.9	Galactose	Pt-3- <i>O</i> -gal	43	3.2 mg
26.3	419.0	286.9	Arabinose	Cy-3- <i>O</i> -ara	14	2.8 mg
29.2	479.0	316.9	Glucose	Pt-3- <i>O</i> -glc	3	5.9 mg
31.7	463.3	301.0	---	Pn-3- <i>O</i> -gal	41	0.2 mg
33.8	449.1	317.0	Arabinose	Pt-3- <i>O</i> -ara	40	4.6 mg
37.2	463.1	300.9	Glucose	Pn-3- <i>O</i> -glc	7	3.6 mg
37.8	493.1	331.0	Galactose	Mv-3- <i>O</i> -gal	44	4.3 mg
39.5	493.1	331.0	Glucose	Mv-3- <i>O</i> -glc	4	6.3 mg
40.8	463.0	330.9	Arabinose	Mv-3- <i>O</i> -ara	42	3.2 mg

* $^1\text{H-NMR}$ -Aufnahme nicht möglich, da die isolierte Substanzmenge zu gering war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 14 Anthocyane der Heidelbeere mittels verschiedener Analysensysteme eindeutig identifiziert wurden. Weiterhin wurden hiervon

13 in ausreichender Menge isoliert, um eine Quantifizierung von Anthocyanen aus Heidelbeeren mittels authentischer Anthocyane zu ermöglichen. Außerdem standen durch die Isolierung Reinsubstanzen (>96%) für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

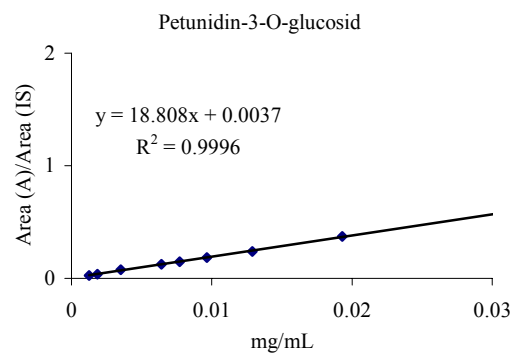
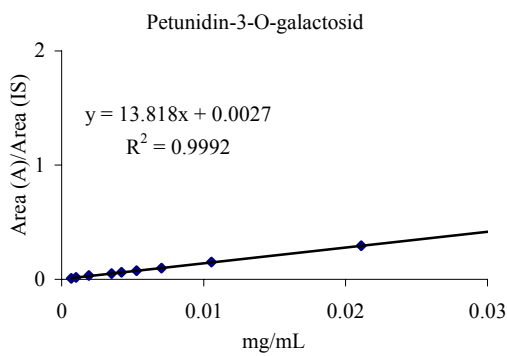
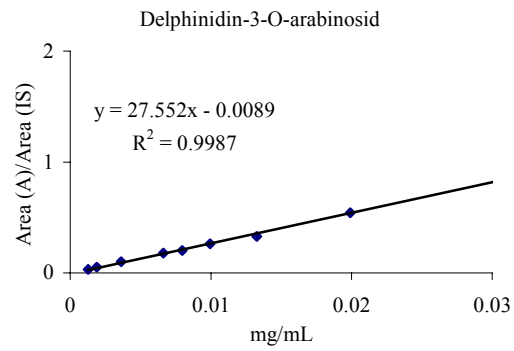
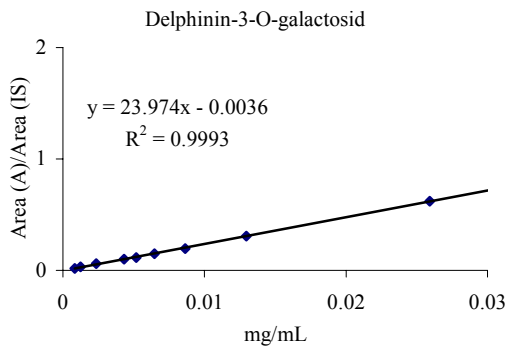
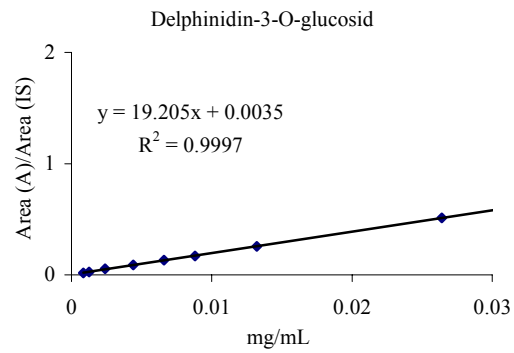
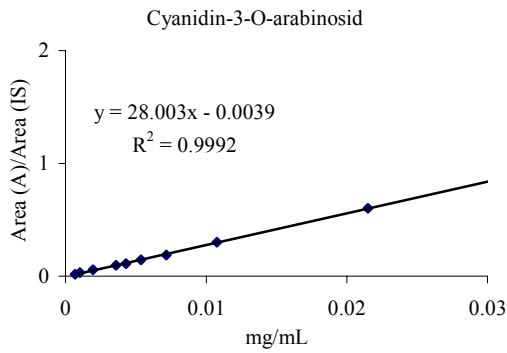
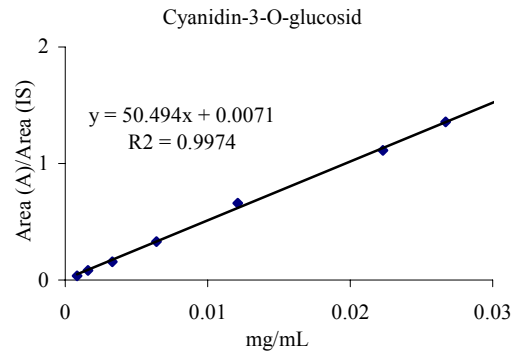
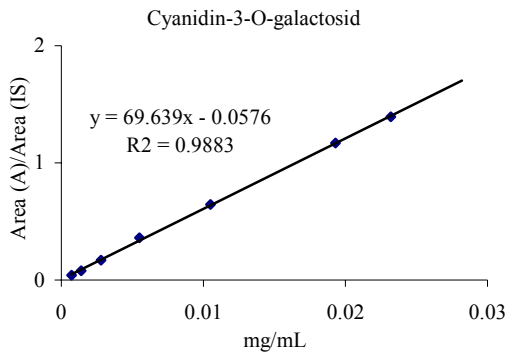
2.3 Quantifizierung von Anthocyanen

2.3.1 Entwicklung einer HPLC-Methode zur Quantifizierung von Anthocyanen

Zur chromatographischen Trennung mit dem Ziel der Quantifizierung der Anthocyane aus Heidelbeeren wurden verschiedene Trennsäulen getestet. Da es sich um sehr polare organische Verbindungen handelt, musste ein spezieller Gradient aus Wasser-Ameisensäure mit Acetonitril gewählt werden. Es zeigte sich, dass Trennung und Quantifizierung an einer Agilent Zorbax SB-C8 im Vergleich zu verschiedenen C18-Säulen am besten geeignet waren. Wichtig bei der Trennung von Anthocyanen ist ein hoher Ameisensäureanteil im Eluent Wasser, da sonst eine Basislinientrennung nicht erreicht wird und die Retentionszeiten stark schwanken.

2.3.2 Kalibrierung der Anthocyane zur Quantifizierung

Die Quantifizierung der Anthocyane erfolgte anhand von 13 Kalibriergeraden mit internem Standard, 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure, die mit den zuvor isolierten authentischen Anthocyanen erstellt wurden. Lediglich Pn-3-*O*-gal **41** musste als Pn-3-*O*-glc-Äquivalent quantifiziert werden, da **41** nur in Spuren in der Heidelbeere vorkommt und daher nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung stand. Die folgenden Abbildungen zeigen die Kalibriergeraden für die einzelnen Anthocyane. Hierfür wurde jeweils der Quotient aus Area_(Anthocyan) und Area_(Standard) auf der y-Achse gegen die Konzentration aufgetragen.



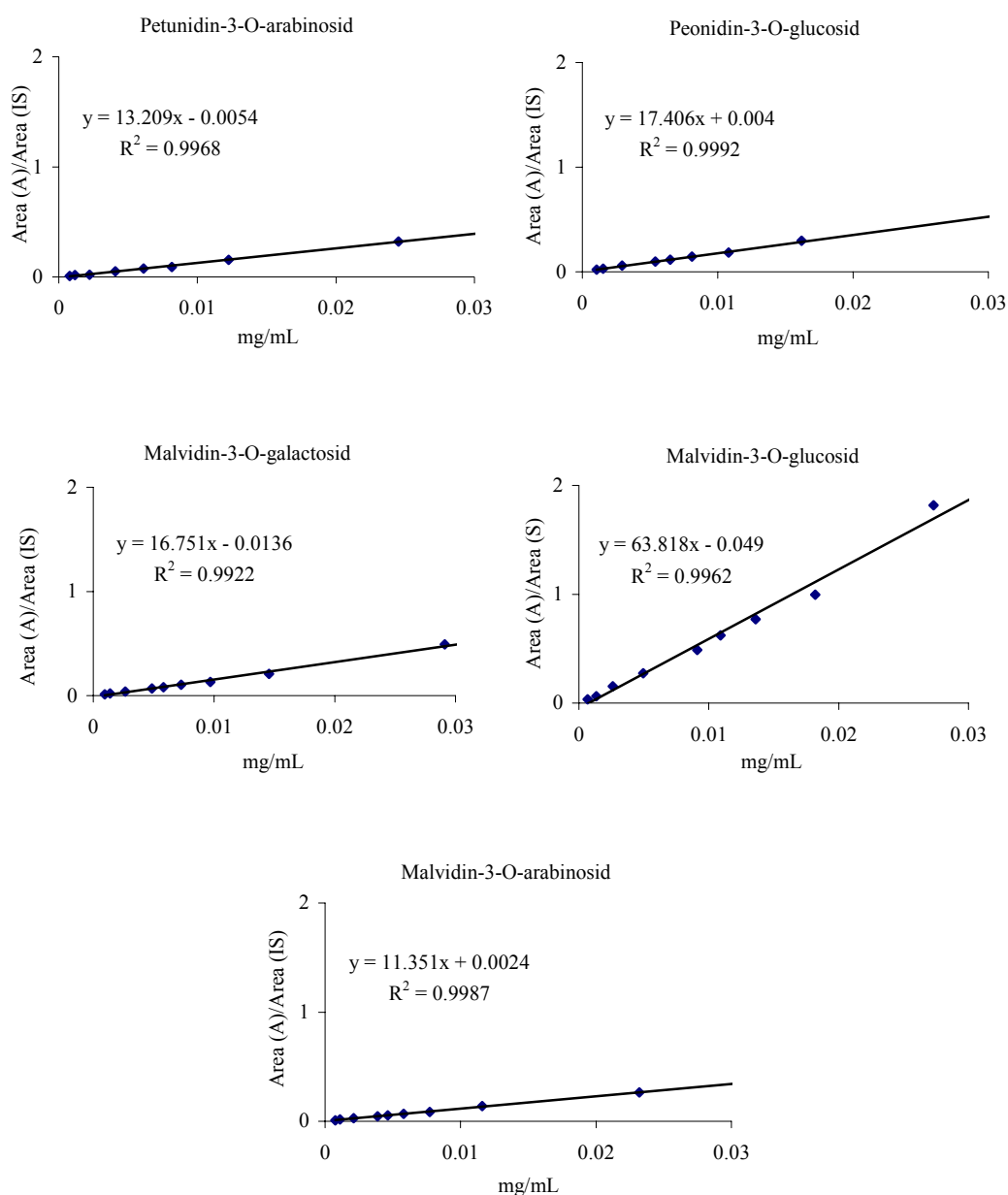


Abbildung 2-17: Kalibriergeraden mit internem Standard (3,4,5-Trimethoxyzimtsäure) zur Quantifizierung von Anthocyanen in Heidelbeeren (Bedingungen 3.2.1, HPLC-System 7)

2.4 Anthocyanprofile von Wild- und Kulturheidelbeeren

Nach erfolgreicher Methodenentwicklung zur quantitativen Analyse (siehe 3.3.3) von Heidelbeeranthocyanen, wurde das Anthocyanprofil von Wildheidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.) (Herkunftsland Deutschland) mit dem der Kulturheidelbeeren (*Vaccinium*

corymbosum L.) (Herkunftsland Deutschland) verglichen (Abbildung 2-18). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2-4 dargestellt. Der Gesamtanthocyangehalt lag bei den Wildheidelbeeren bei 7834 mg/kg, bei den Kulturheidelbeeren bei lediglich 365 mg/kg.

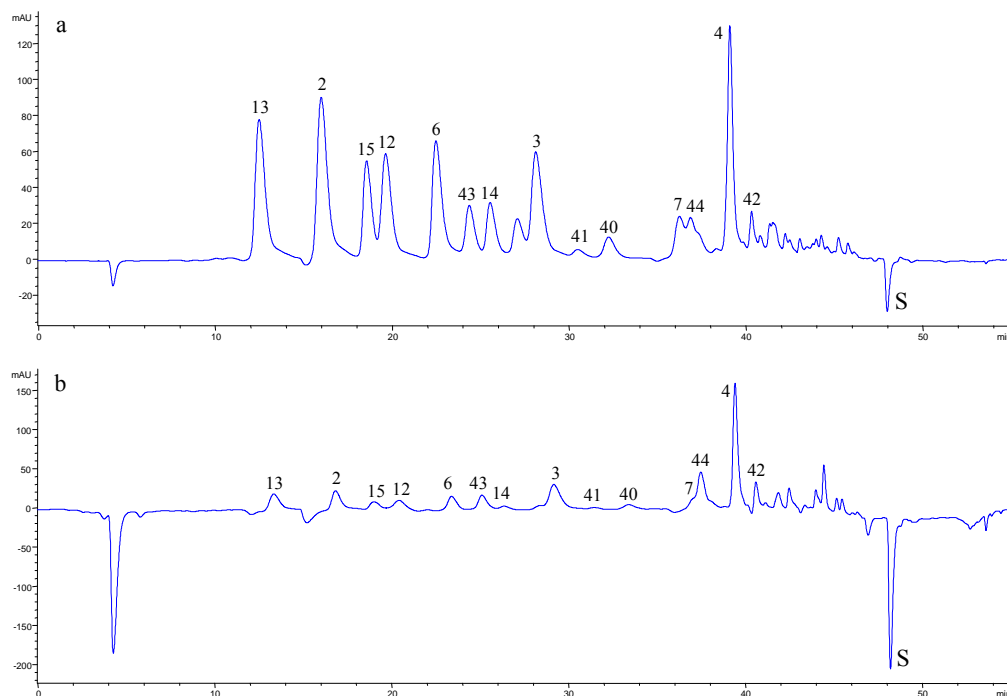


Abbildung 2-18: Anthocyanprofil eines Extraktes aus 5 g Wildheidelbeeren **a** (4-fach verdünnt) und 5 g Kulturheidelbeeren **b** (2-fach verdünnt) (S = Standard 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure, Bedingungen: vgl. 3.2.1, HPLC-System 7) (Nummerierung siehe Tabelle 2-4)

Die Daten stehen in guter Übereinstimmung mit den Angaben von Clifford (2000). Dieser Autor berichtete über Gehalte im Bereich 0.82 bis 4.2 g/kg in Heidelbeeren (Clifford, 2000). Andere Gruppen publizierten Gehalte von 0.25 bis 5.0 g/kg FG (Manach *et al.*, 2004). Kaehkoenen *et al.* (2003) fanden in Wildheidelbeeren 5997 mg/kg. Mazza und Miniati (1993) berichteten von 3000-6980 mg/kg. Im Vergleich zu Literaturangaben konnten in den untersuchten Wildheidelbeeren höhere Anthocyangehalte ermittelt werden. Dies kann damit erklärt werden, dass hier zur Quantifizierung authentische Anthocyane verwendet wurden. Andere Gruppen berechneten die Anthocyane als Cy-3-*O*-glc-Äquivalente (Kaehkoenen *et al.*, 2003). Wie man sehr gut an den Kalibriergeraden (Abbildung 2-17) erkennen kann, absorbieren die einzelnen Anthocy-

ane sehr unterschiedlich bei 520 nm. Die Kalibriergeraden unterscheiden sich teilweise sehr stark in ihrer Steigung. Daher ist es sinnvoll, jedes Anthocyan mittels authentischer Referenz getrennt zu bestimmen.

Die gefundenen Anthocyanmengen in der Kulturheidelbeere waren sehr viel geringer als die in der Wildheidelbeere. Dies steht in gutem Einklang mit Daten anderer Autoren. Mazza und Miniati (1993) ermittelten Anthocyangehalte von 250-4950 mg/kg. Die Gruppe um Sellapan ermittelten Gehalte von 841 mg/kg, berechnet als Cy-3-O-Äquivalente (Sellappan *et al.*, 2002).

Tabelle 2-4: Anthocyangehalte von Wild- und Kulturheidelbeeren [mg/kg Frischgewicht (FG)]

Anthocyan \ Art	Art	Wildheidelbeere mg/kg FG $\pm s$	Kulturheidelbeere mg/kg FG $\pm s$
Dp-3-O-glc	2	1663 \pm 151	38.8 \pm 3.4
Dp-3-O-gal	13	1222 \pm 64	29.4 \pm 1.7
Pt-3-O-glc	3	1119 \pm 83	60.6 \pm 1.2
Dp-3-O-ara	12	695 \pm 13	17.4 \pm 0.6
Pt-3-O-gal	43	536 \pm 36	34.7 \pm 1.4
Cy-3-O-glc	6	414 \pm 32	9.3 \pm 0.4
Mv-3-O-gal	44	384 \pm 63	65.7 \pm 5.2
Pn-3-O-glc	7	363 \pm 13	13.5 \pm 4.1
Mv-3-O-glc	4	354 \pm 29	39.4 \pm 1.0
Pt-3-O-ara	40	326 \pm 22	18.2 \pm 2.7
Cy-3-O-ara	14	291 \pm 20	4.3 \pm 0.5
Cy-3-O-gal	15	255 \pm 22	7.2 \pm 0.1
Mv-3-O-ara	42	189 \pm 27	25.9 \pm 5.0
Pn-3-O-gal *	41	24 \pm 2	0.7 \pm 0.2
Gesamtmenge		7834	365

*Quantifiziert als Pn-3-O-glc-Äquivalente

Als die mengenmäßig überwiegenden Anthocyane wurden die Delphinidinglycoside in den Wildheidelbeeren bestimmt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kaehkoenen *et al.* (2003). Bei diesen Studien waren Dp-3-O-gal **13**, Dp-3-O-glu **2** und Dp-3-O-ara **12** auch die dominierenden Anthocyane. Prior und seine Mitarbeiter

beschrieben, dass Mv-3-O-glc **4**, Malvidin-3-O-arabinosid (Mv-3-O-ara) **42** und Pt-3-O-glc **3** als mengenmäßig überwiegende Anthocyane in der Heidelbeere vorkommen (Prior *et al.*, 2001). In der Zuchtheidelbeere war Malvidin-3-O-galactosid (Mv-3-O-gal) **44** das mengenmäßig vorherrschende Anthocyan.

Zusätzlich zu den in Tabelle 2-4 aufgeführten Anthocyanen wurden noch weitere, sehr kleine Peaks in den Fruchtexttrakten detektiert, die aber auf Grund ihrer geringen Konzentration vernachlässigbar sind. Im Vergleich zu den in Tabelle 2-4 aufgeführten Anthocyanen, macht dieser Anteil 2.4% der integrierten Gesamtfläche aus. Laut Literatur sollte es sich dabei um bisher nicht identifizierte acetylierte und coumarylierte Anthocyane handeln (Mazza *et al.*, 2002). Freie Aglycone wurden im HPLC-ESI_{pos}-MS-Chromatogramm (HPLC-MS-System 2) nicht identifiziert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch die Verwendung authentischer Anthocyanreferenzen zur Quantifizierung, im Gegensatz zu anderen Autoren (Kaehkoenen *et al.*, 2003), weitaus höhere Mengen Anthocyane in Heidelbeeren ermittelt wurden. Dies ist mit der unterschiedlichen Absorptionsrate der Anthocyane bei 520 nm zu erklären. Die in der Kulturheidelbeere gefundenen Anthocyanmengen sind um ca. den Faktor 20 geringer als die in der Wildheidelbeere. Dies steht in gutem Einklang mit den Daten anderer Autoren (Sellappan *et al.*, 2002). Weiterhin sind in Übereinstimmung mit Kaehkoenen *et al.* (2003) die Delphinidinglycoside als die mengenmäßig überwiegenden Anthocyane der Wildheidelbeere identifiziert worden.

2.5 Intestinale Verfügbarkeit von Anthocyanen

2.5.1 Interventionsstudie mit Ileostomie-Probanden

Dem Verzehr von Heidelbeeren werden in Bezug auf die Darmgesundheit positive Effekte zugeschrieben. Die in Heidelbeeren enthaltenen Anthocyane sollen bei der Linderung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und der Prävention von Dickdarmkrebs eine Rolle spielen (Harris *et al.*, 2001, Kresty *et al.*, 2001, Han *et al.*, 2005). Von großer Bedeutung ist es daher zu ermitteln, wie viele der mittels Heidelbeeren konsumierten Anthocyane den Dünndarm passieren und in den Dickdarm gelangen und dort

präventiv wirken können. Bisher sind lediglich Daten darüber vorhanden, welche Mengen Anthocyane mit dem Kot von Ratten wieder ausgeschieden werden bzw. welche Mengen im caecalen Inhalt vorliegen (Felgines *et al.*, 2002, He *et al.*, 2005).

Um der Klärung dieser Frage näher zu kommen, ist der Einsatz von Probanden mit einem terminalen Ileostoma ein geeignetes Vorgehen. Bei diesen Menschen, ist das Ende des Dünndarms durch die Bauchdecke nach Außen verlegt, der Dünndarm jedoch unverändert (vgl. 1.8). Die nach Anthocyan-Verzehr im Ileostomaausfluss ermittelte Menge an Anthocyanen entspricht somit dem Anteil, der auch unter normalen Umständen in den Dickdarm gelangen würde.

In der von uns durchgeführten Studie wurden von fünf Ileostomie-Probanden jeweils 300 g zerkleinerte Wildheidelbeeren (entsprechend 2350 mg Anthocyane) verzehrt. Die Ileostoma-Beutel, in die der Dünndarminhalt floss, wurden zu den Zeitpunkten 0, 0.5, 1, 2, 4, 5, 6 und 8 Stunden nach dem Verzehr abgenommen und sofort tiefgefroren. Nach Gefriertrocknung des Inhaltes wurde das Lyophilisat homogenisiert, gewogen, ein Aliquot extrahiert und mittels HPLC-DAD quantifiziert. Die Auswaagen nach dem Gefriertrocknen werden in Tabelle 2-5 dargestellt.

Tabelle 2-5: Auswaagen der Ileostomabeutelinhalte nach dem Gefriertrocknen [in g]

Auswaagen Ileostomabeutelinhalte in g								
	0 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	5 h	6 h	8 h
Proband 1	5.72	2.55	8.77	5.47	7.44	8.26	2.60	6.44
Proband 2	0,08	4.01	5.60	27.95	7.46	10.82	5.01	8.17
Proband 3	0.96	1.47	5.39	4.41	7.22	13.10	0.82	1.25
Proband 4	1.34	3.51	10.73	7.92	5.83	12.17	0.00	14.80
Proband 5	0.26	3.18	9.99	6.84	12.51	4.10	2.23	2.11

Entgegen Literaturangaben (He *et al.*, 2005) war nach Durchführung der Studie bei 6-monatiger Lagerung bei -24 °C kein Verlust an Anthocyanen feststellbar.

Da Anthocyane auf Grund ihrer positiven Ladung und ihres Zuckerrestes eine hohe Affinität zu anderen polaren Bestandteilen des Nahrungsbreis besitzen und um die Voll-

ständigkeit der Extraktion zu überprüfen, wurde die Wiederfindungsrate für die einzelnen Anthocyane ermittelt. Diese wurde durch Zugabe einer definierten Anthocyanmenge zu einem polyphenolfreien Ileostomabeutelinhalt bestimmt. Die Wiederfindungsraten lagen dabei im Bereich von 85.2% bis 99.1% (Tabelle 2-6).

Tabelle 2-6: Wiederfindungsraten der Anthocyane aus Ileostomabeutelinhalt nach Probenvorbereitung und HPLC-DAD-Analytik

Anthocyan	Wiederfindung in %	s in %
Cy-3- <i>O</i> -ara 14	90.5	6.5
Cy-3- <i>O</i> -gal 15	85.8	5.2
Cy-3- <i>O</i> -glu 6	90.9	6.2
Dp-3- <i>O</i> -ara 12	90.6	6.2
Dp-3- <i>O</i> -gal 13	97.2	6.8
Dp-3- <i>O</i> -glu 2	96.8	7.1
Mv-3- <i>O</i> -ara 42	99.1	6.8
Mv-3- <i>O</i> -gal 44	86.9	4.7
Mv-3- <i>O</i> -glu 4	96.4	5.7
Pn-3- <i>O</i> -gal 41	85.2	8.3
Pn-3- <i>O</i> -glc 7	86.3	5.4
Pt-3- <i>O</i> -ara 40	97.5	9.0
Pt-3- <i>O</i> -gal 43	90.7	8.4
Pt-3- <i>O</i> -glc 3	93.4	7.1

Die Quantifizierung der Anthocyane aus Ileostomabeutelinhalt erfolgte, wie auch bei der Quantifizierung der Anthocyane aus Heidelbeeren, mittels HPLC-DAD direkt nach Extraktion. Die Anthocyane wurden bei 520 nm und der Standard (3,4,5-Trimethoxyzimtsäure) bei 280 nm bestimmt (HPLC-System 7). Abbildung 2-19 zeigt das HPLC-Elutionsprofil des Dünndarmausflusses einer Probandin zwei Stunden nach Heidelbeerverzehr.

Die Identifizierung der einzelnen zu quantifizierenden Anthocyane im Dünndarminhalt erfolgte über die Retentionszeit, den Vergleich der UV/VIS-Spektren und der HPLC-ESI-MS/MS-Fragmentierungsmuster mit denen der Referenzsubstanzen.

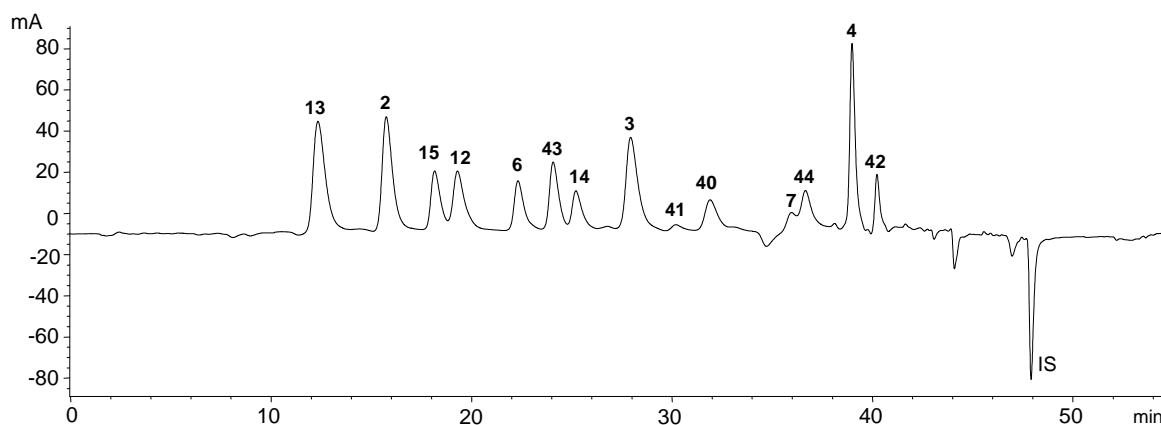


Abbildung 2-19: HPLC-Elutionsprofil des Ileostomabeutelinhaltes einer Probandin zwei Stunden nach dem Konsum von Wildheidelbeeren bei 520 nm. IS = interner Standard (3,4,5-Trimethoxyzimtsäure). Dp-3-O-gal **13**, Dp-3-O-glu **2**, Cy-3-O-gal **15**, Dp-3-O-ara **12**, Cy-3-O-glc **6**, Pt-3-O-gal **43**, Cy-3-O-ara **14**, Pt-3-O-glc **3**, Pn-3-O-gal **41**, Pt-3-O-ara **40**, Pn-3-O-glc **7**, Mv-3-O-gal **44**, Mv-3-O-glu **4** und Mv-3-O-ara **42** (Bedingungen: vgl. 3.2.1 HPLC-System 7).

2.5.2 Zeitlicher und prozentualer Austritt von Anthocyanen in den Ileostomabeutel nach Heidelbeerverzehr

Der zeitliche Austritt von Anthocyanen in den Ileostomabeutel über einen Zeitraum von acht Stunden ist in Abbildung 2-20 für jeden der fünf Ileostomie-Probanden dargestellt. Es zeigte sich, dass kein einheitliches Maximum beim Austritt der Anthocyane in die Ileostomabeutel auftrat. Im Mittel ergab sich ein Plateau zwischen einer und vier Stunden. Hierbei zeigten zwei Probanden sehr unterschiedliche Ausscheidungsmaxima (Abbildung 2-20). Proband 4 wies höchste Gehalte im Ileostomabeutel bei 1 h auf, wogegen Proband 3 nach vier bis fünf Stunden die höchsten Anthocyangehalte ausschied. Durchschnittlich wurden $46 \pm 15\%$ der mittels Heidelbeeren verzehrten Anthocyane mit dem Ileostomaausfluss wieder ausgeschieden.

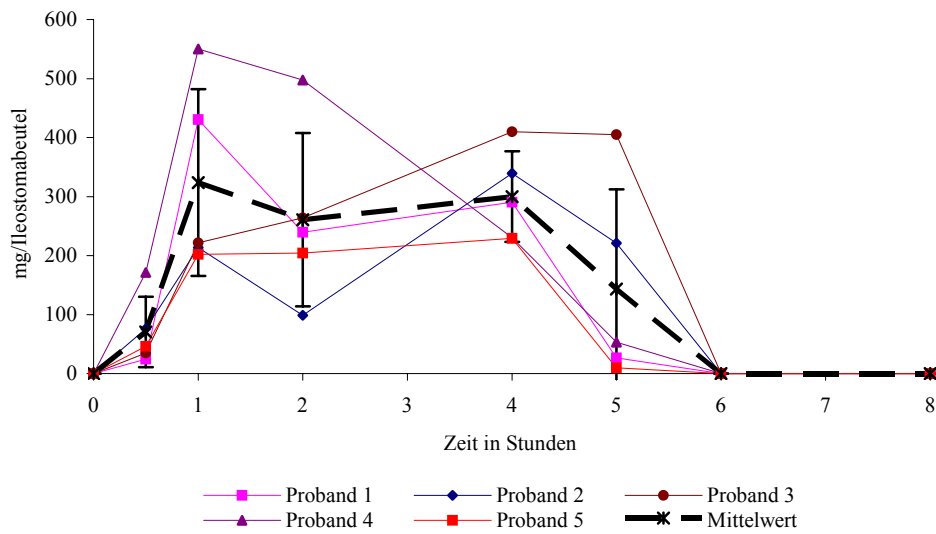


Abbildung 2-20: Ausscheidungsprofil der Anthocyane [mg/Ileostomabeutel] im Ileostomabeutel von fünf Probanden

Der detaillierte Verlauf der Ausscheidung für jedes einzelne Anthocyan über acht Stunden wird in den Abbildung 2-21 und 2-22 gezeigt.

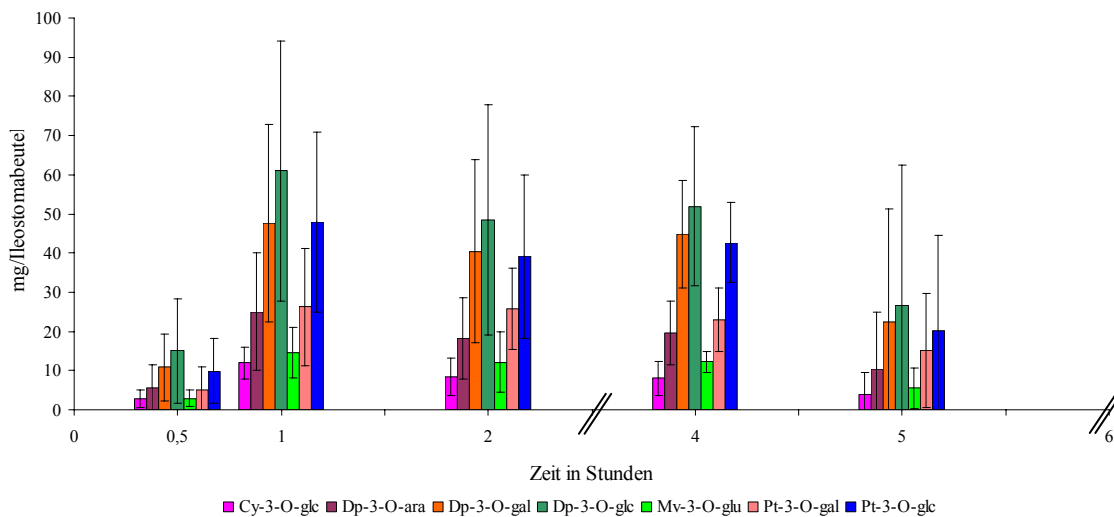


Abbildung 2-21: Zeitliche Ausscheidung der einzelnen Anthocyane (fünf Probanden) [mg/Ileostomabeutel]

Für Dp-3-O-gal **13**, Dp-3-O-glc **2**, Cy-3-O-glc **6**, Pt-3-O-glc **3**, Mv-3-O-glc **4**, Dp-3-O-ara **12**, und Petunidin-3-O-galactosid (Pt-3-O-gal) **43** wurde ein Ausscheidungs-

maximum bei einer Stunde beobachtet (Abbildung 2-21). Demgegenüber zeigten die Anthocyane Cy-3-*O*-gal **15**, Cyanidin-3-*O*-arabinosid (Cy-3-*O*-ara) **14**, Petunidin-3-*O*-arabinosid (Pt-3-*O*-ara) **40**, Pn-3-*O*-glc **7**, Mv-3-*O*-gal **44**, und Mv-3-*O*-ara **42** ein Ausscheidungsmaximum zwischen einer und vier Stunden

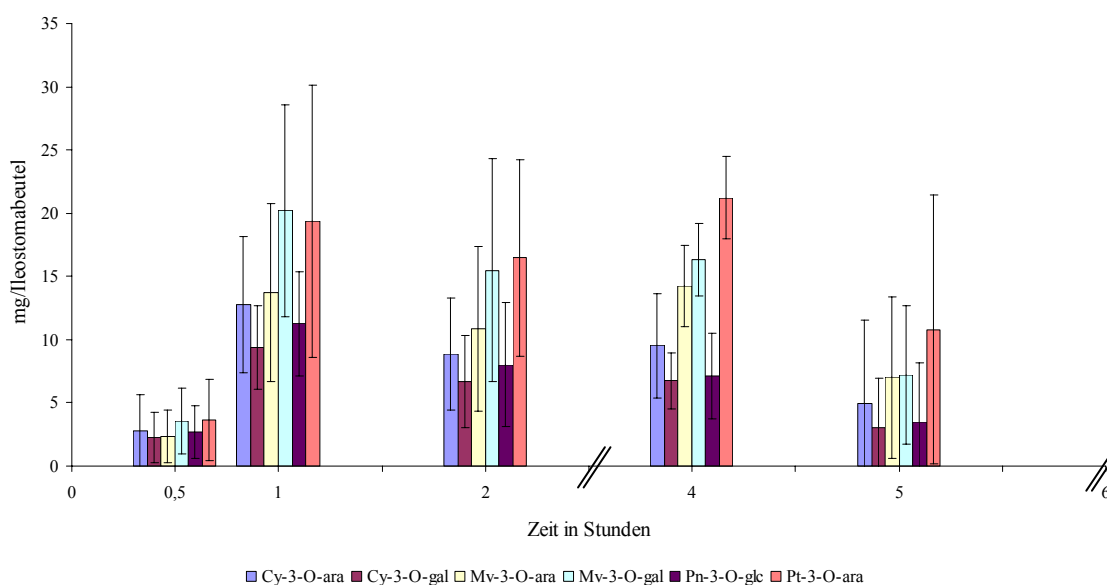


Abbildung 2-22: Zeitliche Ausscheidung der einzelnen Anthocyane (fünf Probanden) [mg/Ileostomabeutel]

Die mit den Heidelbeeren verzehrten Anthocyane konnten sechs Stunden nach dem Verzehr in den Ileostomabeuteln nicht mehr nachgewiesen werden.

Vergleicht man die Mengen an Anthocyanen im Ileostomainhalt mit den durch die Heidelbeeren aufgenommenen, so erkennt man starke Unterschiede in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster am B-Ring der Anthocyanidine bzw. des Zuckerrestes. Bei der Interpretation der Ergebnisse dürfen jedoch die großen Standardabweichungen nicht vernachlässigt werden. Diese sind darauf zurück zu führen, dass neben individuellen Schwankungen die geringe Anzahl der Probanden ($n = 5$) eine wesentliche Rolle spielte.

Im Ileostomabeutelinhalt wurden zwischen 28.3 und 85% der verzehrten Anthocyane wieder nachgewiesen. Im Einzelnen sind Ergebnisse in Abbildung 2-23 und Abbildung 2-24 dargestellt. Pt-3-*O*-gal **43** und Pt-3-*O*-glc **3** wurden zu 59.1% bzw. 47.5% in Bezug auf die verabreichte Menge in den Ileostomabeuteln detektiert. Dagegen wurden 45.3%

und 40.7% von Dp-3-O-gal **13** und Dp-3-O-glc **2** ermittelt. Cy-3-O-glc **6** und Dp-3-O-ara **12** wurden vermutlich metabolisiert und/oder absorbiert, da beide Substanzen nur zu 28.3% bzw. 37.8% in den Beuteln nachweisbar waren. Mv-3-O-glc **4** wurde mit 42.8% im Vergleich zur eingesetzten Anthocyanmenge ermittelt.

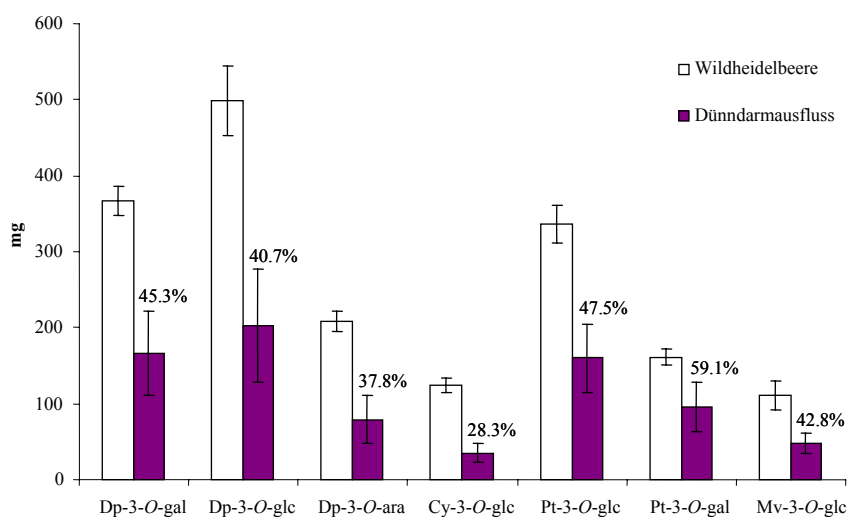


Abbildung 2-23: Im Ileostomaausfluss ermittelte Anthocyanengehalte im Vergleich zur applizierten Menge [mg]

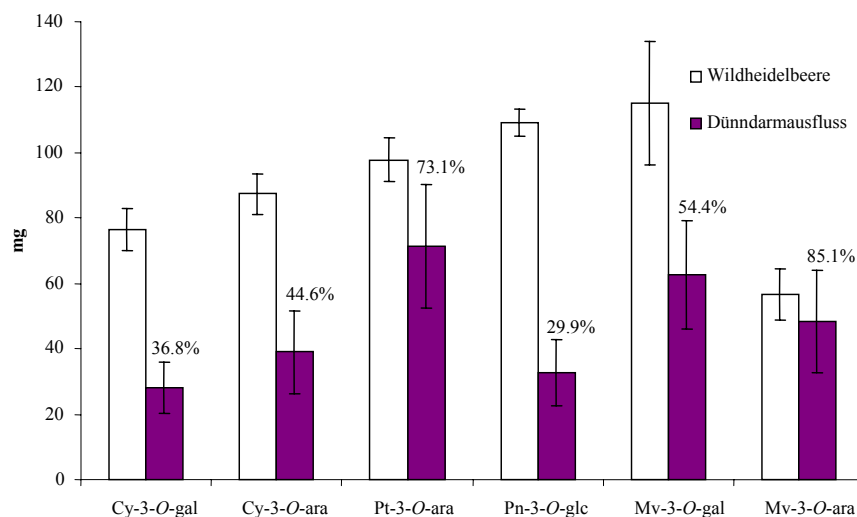


Abbildung 2-24: Im Ileostomaausfluss ermittelte Anthocyanengehalte im Vergleich zur applizierten Menge [mg]

Bemerkenswerterweise wurden Anthocyane, die mit Arabinose konjugiert sind, wie z. B. Mv-3-O-ara **42** und Pt-3-O-ara **40**, zu wesentlich größeren Mengen (85.1% und 73.1%) im Ileostomabeutel ermittelt als andere Glycoside wie Pn-3-O-glc **7** und Cy-3-O-gal **15** mit nur 29.9 und 36.8% der verzehrten Menge. Es muss davon ausgegangen werden, dass die letztgenannten Glycoside zu einem größeren Anteil metabolisiert oder absorbiert worden sind.

Mv-3-O-gal **44** und Cy-3-O-ara **14** wurden mit 54.4% bzw. 44.2% der aufgenommenen Anthocyane ermittelt. Betrachtet man die Anteile von den Malvidin-, Petunidin- und Cyanidinglycosiden, die in den Ileostomabeuteln wieder gefunden wurden, so lässt sich eine Abhängigkeit vom Zuckerrest, der an das Anthocyanaglycon gebunden ist, deutlich erkennen. Glucoside wurden zu höheren Anteilen metabolisiert oder absorbiert als Galactoside. Arabinoside hingegen wurden in den größten Anteilen in der Ileostomaflüssigkeit nachgewiesen.

Im Gegensatz dazu waren die Verhältnisse von Delphinidinglycosiden, die das Ende des Dünndarms erreicht hatten, im Vergleich zu allen anderen Anthocyanglycosiden verschieden. Im Vergleich zu den Glucosiden von Malvidin, Petunidin und Cyanidin wurde Dp-3-O-glu **2** nicht zu höheren Anteilen absorbiert und/oder metabolisiert. Betrachtet man die Malvidin- oder Petuninglycoside, so werden diese weniger stark absorbiert und/oder metabolisiert als die Glycoside von Delphinidin **1** oder Cyanidin **5**.

McGhie *et al.* (2002) und Wu *et al.* (2003) beschrieben Unterschiede in den Ausscheidungsraten von Anthocyanen über den Urin und damit eine unterschiedliche Aufnahme in die Blutbahn. Die Ausscheidung der Anthocyane war abhängig vom Zuckeranteil und der Natur des Aglycons. Diese Feststellung steht in Übereinstimmung mit den neu gewonnenen Daten aus unserer Studie mit Ileostomie-Probanden.

Wie erwähnt, berichtete die Gruppe um He von unterschiedlichen Stabilitäten der Anthocyanidinglucoside sowie -galactoside und -arabinoside im Gastrointestinaltrakt von Ratten. Es zeigte sich, dass Glucoside rapide abgebaut wurden und Arabinoside weitgehend stabil waren (He *et al.*, 2005). Die Autoren zogen daraus die Schlussfolgerung, dass Glycoside, bestehend aus einer Pentose und einem Anthocyanidin, eine wichtige Rolle in der Prävention von kolorektalem Krebs spielen könnten. Weiterhin wurde in dieser Publikation von einem Zusammenhang zwischen dem Anthocyanengehalt im Fäzes und einem geringeren Auftreten von Aberrant Crypti Foci (ACF) als ein frühes

Stadium von Dickdarmkrebs in Ratten berichtet (Takayama *et al.*, 1998, He *et al.*, 2005). Keppler und Humpf publizierten ebenfalls unterschiedliche, vom Zuckerrest abhängige Abbauraten durch die intestinale Mikroflora (Keppler und Humpf, 2005). Von einer unterschiedlichen Absorption bzw. Wiederfindung, abhängig vom Zuckerrest eines Anthocyanidinglycosids im Gastrointestinaltrakt von Ferkeln, berichtete die Gruppe um Wu. Die Autoren stellten in ihren Untersuchungen fest, dass Anthocyane abhängig von der Zuckerkonjugation und vom Aglycon unterschiedlich in von der Muttermilch entwöhnten Ferkeln absorbiert und metabolisiert werden (Wu *et al.*, 2005). In einer weiteren Studie wurde dies bestätigt. Nach Fütterung von Ferkeln mit gefriergetrockneten schwarzen Himbeeren fanden Wu *et al.*, abhängig vom Zuckerrest, unterschiedliche Mengen an Cyanidinglycosiden im Gastrointestinaltrakt wieder (Wu *et al.*, 2006b). Auch hier zeigte sich, dass die Konjugation mit Glucose auf einen stärkeren Abbau im Dünndarm schließen lässt.

Die in unserer Studie in Bezug auf die Absorption ermittelten Unterschiede könnten mit der Tatsache erklärt werden, dass Glucoside im Vergleich zu Galactosiden oder Arabinosiden unterschiedlich stark über den Na⁺-abhängigen Glucosetransporter (SLGT1) aufgenommen werden oder dass die β -Glucosidase-Aktivität abhängig vom Zuckeranteil variiert. Einige Hypothesen diskutieren die Deglycosylierung von Flavonoiden aus der Nahrung durch humane β -Glucosidasen, wie die Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) auf der luminalen Seite der Bürstensaummembran, und die cytosolische β -Glucosidase (CBG) im Dünndarm als limitierenden Faktor für die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden (Nemeth *et al.*, 2003). Dagegen wurden Anthocyane von verschiedenen Gruppen nicht als Substrate für eine β -Glucosidase gesehen. Nemeth *et al.* gehen davon aus, dass Anthocyane erst im Dickdarm gespalten werden (Tsuda *et al.*, 1999, Nemeth *et al.*, 2003). Für eine Deglycosylierung durch Enzyme spricht die Tatsache, dass der Dünndarminhalt β -Glucosidase- und β -Glucuronidase-Aktivität besitzt (vgl. Kapitel 2.8). Nach Fleischhut werden Anthocyanidinglucoside nur sehr langsam von β -Glucosidase gespalten, aber sehr schnell durch β -Glucuronidase (Fleischhut, 2004). Diese Tatsache würde die geringen Mengen an Anthocyanidinglucosiden im Ileostomabeutelinhalt erklären.

Studien haben gezeigt, dass die Absorption von intakten Flavonolglycosiden über den SLGT1 zur Fähigkeit beiträgt, Anthocyanidine in der glycosylierten Form aufzunehmen

(Clifford, 2000). Müllleder berichtete von einer geringeren Ausscheidung von Anthocyanen über den Urin und damit geringeren Aufnahmeraten von Cy-3-O-glu **6** bei der Anwesenheit von Saccharose in der Nahrung, d.h. dass das SGLT1-Transportsystem durch den Zucker gesättigt wird und sich damit die Resorption des Anthocyanins verringert (Müllleder *et al.*, 2001). Dies würde für eine Aufnahme der intakten Anthocyane über den SGLT1 sprechen. Zusätzlich wird der Magen als Ort für eine Absorption von Anthocyanen ebenfalls diskutiert (Passamonti *et al.*, 2003).

Neben der Enzymaktivität kann auch die Darmflora einen Einfluss auf die wieder gefundene Menge an Anthocyanen haben. Wie bekannt ist, können Anthocyane durch die Dickdarmflora abgebaut werden. Dies wurde von Keppler und Humpf, 2005 publiziert. Durchschnittlich wurden im Dünndarm mittels Enterosan-Test[®] (L&S AG, Bad Bocklet) von Ileostomie-Probanden 10^9 KbE/g an Aerobier und Anaerobier bestimmt.

Neuere Publikationen gehen jedoch von höheren Absorptionsraten aus, als man bisher bestimmt hatte. Andlauer *et al.* bewiesen in einem sehr schlüssigen Modell, dass größere Mengen Anthocyane die Dünndarmwand passieren können. Sie entfernten dem Versuchstier den Dünndarm und spülten ihn in einer Perfusionskammer nach Präparation vasculär mit einem synthetischen Perfusionsmittel um ihn mit Sauerstoff zu versorgen und um einen Blutstrom zu simulieren. Luminal wurde der Darm zuerst mit einem Bicarbonatpuffer und anschließend mit einer Cy-3-O-glc-Lösung gespült. Der Übergang von Anthocyanen wurde so sehr gut ermittelt (Andlauer *et al.*, 2003). Erst kürzlich wurde eine Arbeit, in der eine Ussingkammer verwendet wurde, veröffentlicht. Man stellte fest, dass bei Verwendung von jejunalem Gewebe von Mäusen die Absorptionsrate bei $55.3\% \pm 7.6$ liegt. Das Gewebe vom Duodenum der Maus zeigte mit $10.4\% \pm 7.6$ das geringste Absorptionsvermögen (Matuschek *et al.*, 2006). Es ist davon auszugehen, dass die Absorptionsraten beim Menschen um einiges höher liegen könnten als bisher vermutet und die Anthocyane in weitaus größeren Mengen in die Blutbahn aufgenommen wurden. Möglicherweise liegen die Anthocyane dort an Protein gebunden vor und werden deshalb bisher nicht analytisch erfasst. Dafür spricht z. B. die Erkenntnis, dass Anthocyane an LDL im Blut binden und zudem die Anlagerung von Kupferionen verhindern können (Satue-Gracia *et al.*, 1997).

Im Dünndarm könnte es zu einer Deglycosylierung und zu raschem Zerfall über die Spaltung des C-Ringes kommen. Die Absorption könnte niedrig sein, und der Zerfall

bzw. die Metabolisierung muss in Betracht gezogen werden. Hierfür wurden Inkubationen mit Ileostomabeutelinhalt durchgeführt (vgl. Kapitel 2.7).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit durchschnittlich $46 \pm 15\%$ ein größerer Teil der konsumierten Anthocyane im Ileostomaausfluss wieder gefunden wurde. Das Maximum der Ausscheidung lag zwischen zwei und vier Stunden. Die ausgeschiedene Menge wies eine Abhängigkeit von der Struktur des Aglycons und des jeweiligen Zuckerrestes auf. Auffällig war der Trend, dass von Arabinosiden (Ausnahme: Dp-3-O-ara **12**) die größten Mengen im Dünndarmausfluss wieder gefunden wurden. Die geringsten Mengen wurden von den Glucosiden im Ileostomabeutel ermittelt. Auch eine Methylierung des Aglycons am B-Ring steigert die Stabilität des Anthocyanins. Diese Daten stehen in gutem Einklang mit den Daten von Keppler und Humpf (2005) und He *et al.* (2005). Von Mv-3-O-ara **42** wurden durchschnittlich 85.1% wieder gefunden; im Gegensatz dazu nur 28.3% von Cy-3-O-glc **6**.

Die in den Ileostomabeuteln gefundenen Substanzen würden unter physiologischen Umständen den Dickdarm erreichen und dort zur Prävention von entzündlichen Darmkrankungen (inflammatory bowel diseases; IBD) und malignen gastrointestinalen Erkrankungen beitragen, wobei man anmerken muss, dass die für den eigentlichen positiven Gesundheitseffekt verantwortlichen Substanzen bisher noch nicht identifiziert worden sind.

Ferner ist noch immer nicht klar, ob Anthocyane oder Anthocyanidine absorbiert worden sind oder eine Konjugation/Metabolisierung stattgefunden hat. Weiterhin ist nach einem Deglycosylierungsschritt der Zerfall der Aglycone möglich.

2.6 Stabilität von Anthocyanidinen bei pH 7.4

Für den Fall der Deglycosylierung im Dünndarm wäre es wichtig zu wissen, wie stabil das freigesetzte Aglycon unter den dort vorherrschenden pH-Bedingungen ist. Daher wurde von uns eine Stabilitätsüberprüfung bei pH 7.4 durchgeführt; dies ist der durchschnittliche im Ileum vorherrschende pH-Wert (Vaupel und Ewe, 1997). Für die Studie standen vier Anthocyanidine (Aglycone) zur Verfügung: Pn-Chlorid **8**, Cy-Chlorid **5**,

Dp-Chlorid **1** und Mv-Chlorid **10**, deren Glycoside in hohen Anteilen in den Heidelbeeren vorkommen.

Verwendet wurde eine Phosphatpufferlösung, die mit HCl auf den physiologischen pH-Wert von 7.4 eingestellt wurde. Des Weiteren wurde der Phosphatpuffer durch Erhitzen unter Rückfluss sauerstofffrei gemacht, um die anaeroben Bedingungen im Darm zu simulieren. Der Sauerstoffgehalt, gemessen mit einer Sauerstoffelektrode, lag dabei <1 ppm.

Die Quantifizierung der Anthocyanidine erfolgte mittels HPLC-DAD nach Zusatz von 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure als Standard. Zur Berechnung wurde der Quotient aus Area (Anthocyanidin) und Area (Standard) gebildet. Die erhaltenen Werte wurden in Bezug zu dem bei 0 h gesetzt und daraus die Zerfallskurve ermittelt. In Abbildung 2-25 sind die entsprechenden Zerfallskurven nach Inkubation dargestellt.

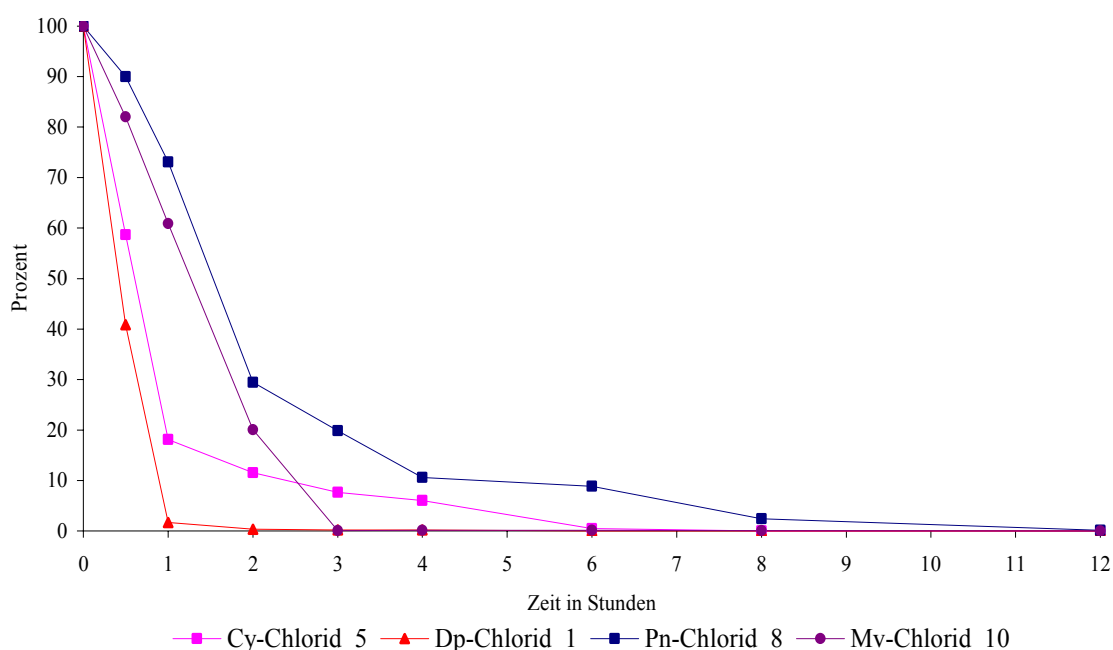


Abbildung 2-25: Zerfallskurven von Cy-Chlorid **5**, Dp-Chlorid **1**, Pn-Chlorid **8** und Mv-Chlorid **10** nach Inkubation mit sauerstofffreiem Phosphatpuffer bei pH 7.4 über zwölf Stunden

Den raschesten Abbau zeigte Dp-Chlorid **1**. In ähnlicher Geschwindigkeit zerfiel Cy-Chlorid **5**, das sich von Dp-Chlorid **1** nur durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe am B-Ring unterscheidet. Bereits nach einer Stunde war Dp-Chlorid **1** nahezu nicht mehr

nachweisbar. Auch Cy-Chlorid **5** war zu diesem Zeitpunkt nur noch zu sehr kleinen Anteilen vorhanden. Am stabilsten erwiesen sich die Anthocyanidine wie Pn-Chlorid **8**, die am B-Ring auch Methoxygruppen tragen. Dabei zeigte **8** eine geringfügig höhere Stabilität als Mv-Chlorid **11**. Zwischen 0 und 2 h wiesen die beiden Substanzen eine ähnliche Zerfallsgeschwindigkeit auf. Nach einer Stunde waren jeweils noch mehr als 60% des eingesetzten Mv-Chlorids **10** vorhanden. Im Vergleich dazu war nach einer Stunde bei Cy-Chlorid **5** weniger als 20% zu ermitteln – Dp-Chlorid **1** war fast vollständig abgebaut. Die Anthocyanidine Cy-Chlorid **5** und Dp-Chlorid **1** tragen am B-Ring nur Hydroxylgruppen, wogegen Pn-Chlorid **8** und Mv-Chlorid **10** am B-Ring außer Hydroxylgruppen auch Methoxygruppen aufweisen. Eine Methoxylierung erhöht folglich die Stabilität eines Anthocyanidins.

2.7 Stabilität von Anthocyanen im Dünndarm

Wie die aus der Studie mit Ileostomie-Probanden erhaltenen Ergebnisse zeigen, werden Anthocyane im Dünndarm in Abhängigkeit vom Aglycon und vom Zuckerkonjugat zu unterschiedlichen Anteilen metabolisiert oder absorbiert. Um zu ermitteln, in wie weit Anthocyane im pH-Bereich des Dünndarms stabil sind bzw. wie stark der Dünndarminhalt mit seinen Enzymaktivitäten und mikrobieller Aktivität an der Metabolisierung oder dem Abbau der Anthocyane beteiligt sind, wurden authentische Anthocyane mit frischem Ileostomabeutelinhalt inkubiert. Dies erfolgte mittels anaerobem Phosphat-Carbonat-Puffer in Anlehnung an Lebet *et al.* (1998) jedoch bei pH 7.4 (vgl. 3.3.5.1); dies ist der durchschnittliche im Ileum vorherrschende pH-Wert (Vaupel und Ewe, 1997). Die Inkubationslösungen wurden nach dem Gefriertrocknen extrahiert und quantifiziert. Die Auswertung der Daten erfolgte, indem der Quotient aus $\text{Area}_{(\text{Anthocyan})}$ und $\text{Area}_{(\text{Standard})}$ gebildet wurde. Die erhaltenen Werte wurden in Bezug zu dem bei 0 h gesetzt und daraus die Zerfallskurve ermittelt.

Parallel wurde jeweils ein Kontrollversuch „K“ mitgeführt. Hierfür wurde das jeweilige Anthocyan ohne Ileostomabeutelinhalt in Pufferlösung für acht Stunden inkubiert. Dadurch erhielt man eine Aussage über den chemischen Abbau bei pH 7.4 über acht Stun-

den. In den Abbildungen 2-26 bis 2-30 sind die zeitlichen Verläufe des Abbaus für die einzelnen Anthocyane dargestellt.

In unserer Studie über den Verbleib von Anthocyanen nach Verzehr von Heidelbeeren zeigte sich, dass Arabinoside (Ausnahme: Dp-3-O-ara **14**) gefolgt von den Galactosiden während der Passage des Dünndarms am stabilsten waren. Glucoside waren am instabilsten. Weiterhin waren die im Ileostomaausfluss ermittelten Anthocyanmengen abhängig vom jeweiligen Aglycon. Der Trend, dass die Stabilität der Anthocyane in der Reihenfolge vom Arabinosid über das Galactosid hin zum Glucosid abnimmt, lässt sich ebenfalls aus den folgenden Grafiken erkennen. Betrachtet man die Cyanidinglycoside, so waren nach acht Stunden noch 12.6% von Cy-3-O-ara **14** vorhanden (Abbildung 2-26). Das Galactosid wies man noch zu 2.1% und das Glucosid nur noch zu 0.8% nach. Deutlicher wird der Unterschied bei den Inkubationszeiten von zwei bzw. vier Stunden. Diese Zeitpunkte entsprechen der Realität am besten, da nach vier Stunden bereits der größte Teil der Anthocyane den Dünndarm passiert hatte. Die Hauptausscheidung der Anthocyane lag zwischen zwei bis vier Stunden nach dem Verzehr. Betrachtet man die Grafik der Cyanidinglycoside (Abbildung 2-26), so erkennt man, dass die Werte der Kontrolle „K“ zwar über denen des Acht-Stundenwertes des Hauptversuches lagen, aber dennoch ein drastischer chemischer Abbau stattgefunden hatte. Lediglich 22 – 35% der jeweiligen Anthocyanmengen sind bei Inkubation mit Puffer bestimmt worden.

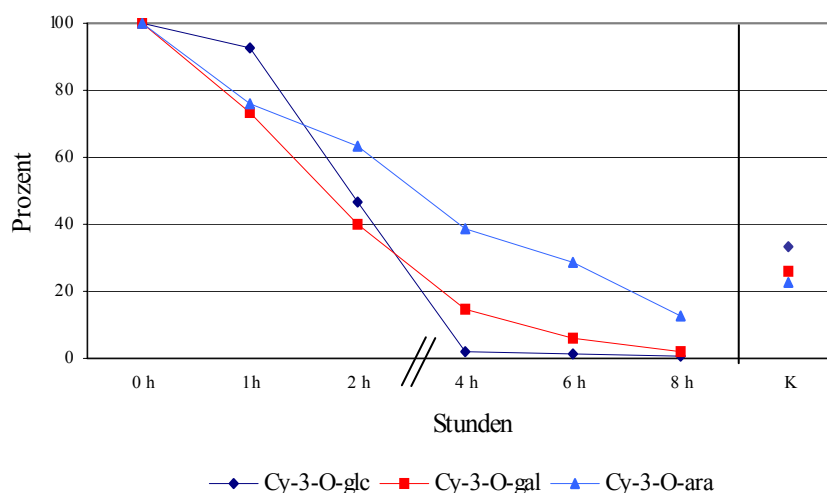


Abbildung 2-26: Inkubation von Cyanidinglycosiden mit Ileostomabeutelinhalt bei pH 7.4 für 0, 1, 2, 4, 6, 8 Stunden: Abbaukurven von Cy-3-O-ara **14**, Cy-3-O-gal **15** und Cy-3-O-glc **6**

Die Delphinidinglycoside zeigten ähnliche Eigenschaften wie die Cyanidinglycoside. Da sich Cy-Chlorid **5** und Dp-Chlorid **1** nur durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe am B-Ring unterscheiden, war mit einer ähnlichen Stabilität der Anthocyane zu rechnen. Auch hier war das Arabinosid am stabilsten, gefolgt vom Galactosid und dem Glucosid. Die Ergebnisse bestätigen die aus der Studie mit den Ileostomie-Probanden, bei der das Dp-3-O-ara **12** am instabilsten war, nicht. Die Delphinidinglycoside wurden dabei im Bereich von 37,8 bis 45,3% im Ileostomabeutel wiedergefunden (Abbildung 2-27). Möglicherweise wird das Dp-3-O-ara **12** gegenüber den anderen beiden Delphinidinglycosiden im Dünndarm stärker resorbiert.

Die chemisch bedingten Abbauraten (Versuchsreihe „K“) entsprachen mit 26 - 30% in etwa den bei den Cyanidinglycosiden festgestellten.

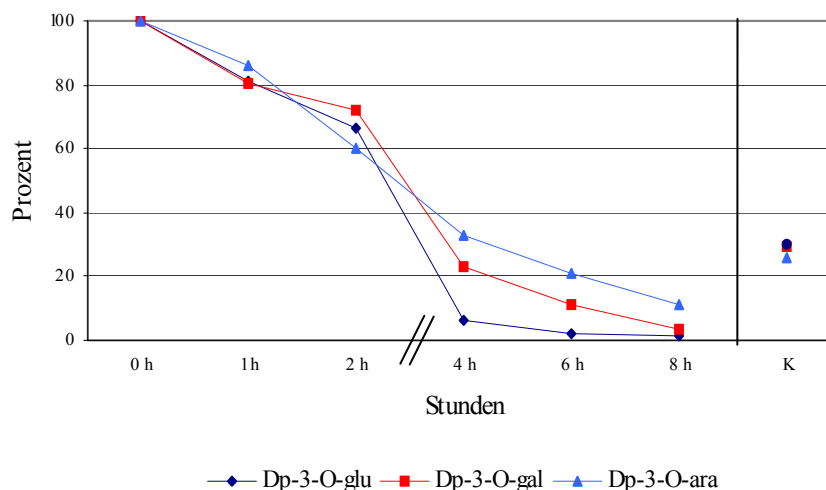


Abbildung 2-27: Inkubation von Delphinidinglycosiden mit Ileostomabeutelinhalt bei pH 7,4 für 0, 1, 2, 4, 6, 8 Stunden: Abbaukurven von Dp-3-O-ara **12**, Dp-3-O-gal **13** und Dp-3-O-glc **1**

Betrachtet man die Stabilitätskurven der Petunidin- und Malvidinglycoside, zeigt sich, dass diese auf Grund ihrer methoxylierten Struktur eine größere Stabilität besitzen. (Abbildung 2-28 und Abbildung 2-29). Auffallend war in dieser Versuchsreihe die vergleichsweise hohe chemische Stabilität von Malvidinglycosiden; 60% der eingesetzten Menge sind in den „K“-Versuchsreihen wieder gefunden worden, während der chemische Abbau von Petunidinglycosiden dem der Cyanidinglycoside entsprach. Dies könn-

te durch die ähnliche Struktur des B-Rings von Petunidin und Cyanidin erklärt werden. Petunidin besitzt wie auch Cyanidin **5** am B-Ring zwei vicinale Hydroxylgruppen, wodurch eine leichtere Oxidation möglich ist.

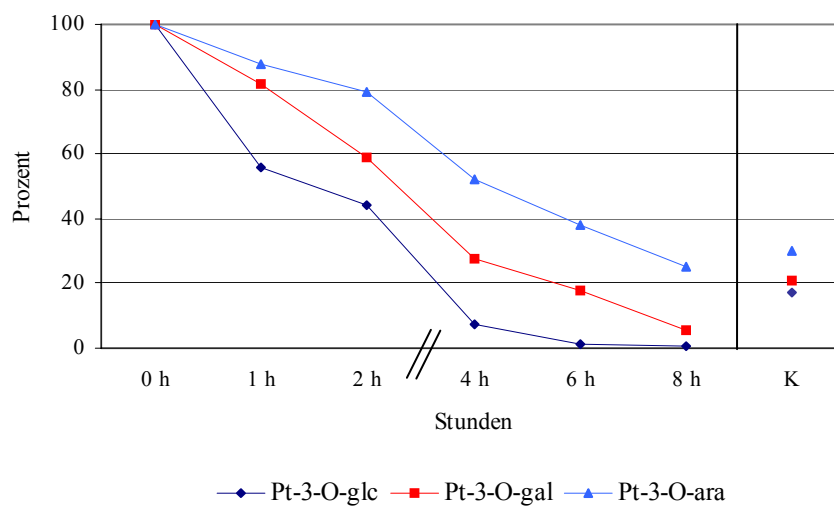


Abbildung 2-28: Inkubation von Petuninglycosiden mit Ileostomabeutelinhalt bei pH 7.4 für 0, 1, 2, 4, 6, 8 Stunden: Abbaukurven von Pt-3-O-ara **40**, Pt-3-O-gal **43** und Pt-3-O-glc **3**

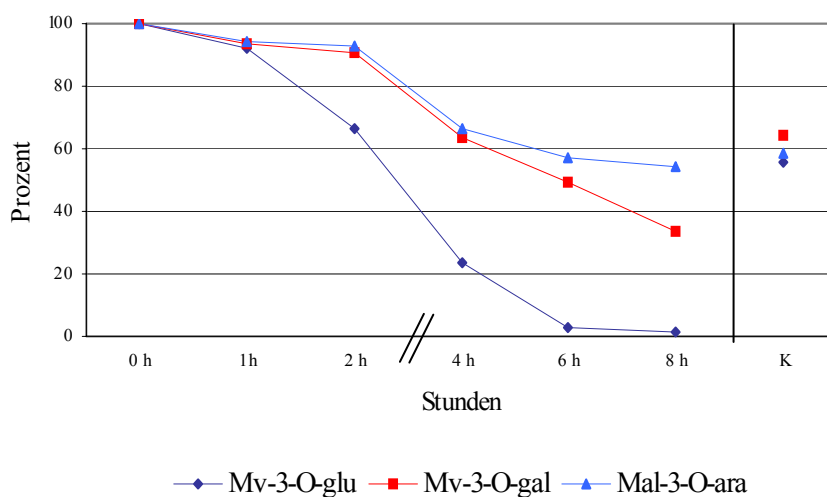


Abbildung 2-29: Inkubation von Malvinglycosiden mit Ileostomabeutelinhalt bei pH 7.4 für 0, 1, 2, 4, 6, 8 Stunden: Abbaukurven von Mv-3-O-ara **42**, Mv-3-O-gal **44** und Mv-3-O-glc **4**

Von den Peonidinglycosiden stand lediglich Pn-3-O-glu **7** in ausreichenden Mengen zur Verfügung. Das Ergebnis der Stabilitätsstudie dieses Anthocyans ist vergleichbar mit allen anderen Glucosiden. Auch hier war die Verbindung nach sechs Stunden fast vollständig abgebaut (Abbildung 2-30). Im Blindversuch (Versuch „K“) wurden ca. 47% der eingesetzten Menge wieder gefunden.

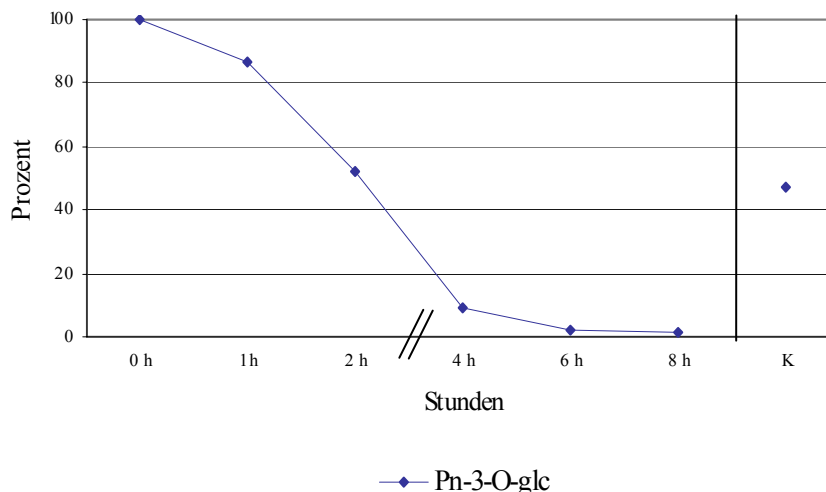


Abbildung 2-30: Inkubation von Pn-3-O-glc **7** mit Ileostomabeutelininhalt bei pH 7.4 für 0, 1, 2, 4, 6, 8 Stunden

Die erzielten Ergebnisse belegen eine unterschiedliche Stabilität der Anthocyane in Abhängigkeit vom Zuckerrest und Aglycon. Ähnliche Resultate sind von Wu *et al.* (2006) veröffentlicht worden. Die Autoren berichten von unterschiedlichen Stabilitäten der Glycoside abhängig vom Zuckerrest. Nachdem sie Ferkel mit gefriergetrockneten schwarzen Himbeeren gefüttert hatten, fanden sie im Gastrointestinaltrakt von den Glucosiden die geringsten Mengen wieder. Auch die Gruppe um He ermittelte unterschiedliche Stabilitäten der Glycoside in Abhängigkeit vom Zuckerrest. Arabinoside und Xyloside zeigten sich am stabilsten, gefolgt von den Galactosiden und Glucosiden (He *et al.*, 2005).

Die Chemische Stabilität der Anthocyane ist bedingt durch ihre Struktur (Kapitel 1.2.3). Bei erhöhten pH-Werten, wie sie auch hier vorlagen, zerfallen Anthocyane. Bei den Fragmenten handelt es sich um eine niedermolekulare Phenolcarbonsäure und einen Aldehyd (Jurd, 1972, Markakis, 1974, Clifford, 2000). Aber auch höhermolekulare

Kondensationsprodukte stehen in der Diskussion und müssen noch weiter verfolgt werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Ergebnisse dieser Stabilitätsuntersuchungen im Einklang mit den erhaltenen Daten aus der Studie mit Ileostomie-Probanden (vgl. Kapitel 2.5) stehen. Auch hier wurde festgestellt, dass Arabinoside gegenüber Galactosiden und Glucosiden im Dünndarminhalt weitaus stabiler sind. Ebenso steigerte eine Methoxylierung am B-Ring des Aglycons die Stabilität. Dies steht in gutem Einklang mit den Daten von Keppler und Humpf (2005) und He *et al.* 2005.

2.8 Enzymaktivität im Dünndarminhalt - Ergebnisse des apiZYM[®]-Tests

Im für die Inkubationen mit Anthocyanen verwendeten Ileostomabeutelinhalt, wurden verschiedene Enzymaktivitäten mittels **apiZYM[®]**-Assay kontrolliert.



Abbildung 2-31: **apiZYM[®]**-Teststreifen nach Inkubation mit Ileostomabeutelinhalt

Im **apiZYM[®]**-Assay (n=3) (Abbildung 2-31) zeigte der Dünndarmausfluss eine hohe Aktivität an α -Glucosidase (**p**), β -Glucuronidase (**o**) und β -Galactosidase (**n**) neben Esterase(**d**)- und Phosphatase(**k**)-Aktivität. β -Glucosidase (**q**) wurde nur bei einem Probanden detektiert. (Tabelle 2-7). Die β -Glucuronidase-Aktivität ist insofern interessant als sie eine höhere Affinität zu Anthocyanidinglucosiden besitzen soll als β -Glucosidase (Fleischhut, 2004). Die hohe Aktivität dieses Enzyms könnte der Grund für die unterschiedlichen Mengen an Glucosid, Galactosid und Arabinosid bei unseren Studien mit Ileostomie-Probanden sein.

Tabelle 2-7: Enzymaktivitäten des Ileostomabeutelinhalts von drei Probanden (apiZYM[®]-Test). Als Kontrollwert wurde ein Teststreifen mit demineralisiertem Wasser mitgeführt.

Enzym	Nr.	Proband 1	Proband 2	Proband 3	Kontrolle
Kontrolle	a	-	-	-	-
alkalische Phosphatase	b	+	+	+	-
Esterase C4	c	-	-	-	-
Esterase Lipase C8	d	+	+	+	-
Lipase C14	e	-	-	-	-
Leucin Arylamidase	f	+	+	+	-
Valin Arylamidase	g	+	+	+	-
Cystin Arylamidase	h	-	-	-	-
Trypsin	i	+	+	+	-
α -Chymotrypsin	j	-	-	-	-
Saure Phosphatase	k	+	+	+	-
Naphthol-AS-Biphosphohydrolase	l	+	+	+	(+)
α -Galactosidase	m	-	-	-	-
β -Galactosidase	n	+	+	+	-
β -Glucuronidase	o	+	+	+	-
α -Glucosidase	p	+	+	+	-
β -Glucosidase	q	-	-	+	-
N-Acetyl- β -Glucosamidase	r	+	+	+	-
α -Mannosidase	s	-	-	-	-
α -Fucosidase	t	-	-	-	-

+ : positiv - : negativ (+): schwach positiv

Experimenteller Teil

3 Experimenteller Teil

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Roth und Merck bezogen. Für die radioaktive Markierung von Pg-Chlorid **9** und Dp-Chlorid **1** wurden jeweils 250 μCi [Carbonyl- ^{14}C]-Dimethylformamid (^{14}C -DMF) mit einer spezifischen Aktivität von 53 bzw. 50 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ von American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO, USA) erworben. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Endprodukte aus den Radiosynthesen, wurde Rotiszint Ecoplus[®] (Roth, Karlsruhe, Deutschland) als Szintillationscocktail verwendet. Mv-3-*O*-glc **4**, Cy-3-*O*-glc **6** und Cy-3-*O*-gal **15** wurden von Extrasynthese (Z.I. Lyon Nord, Frankreich) gekauft. Lösungsmittel für Extraktionen, Aufarbeitungen, sowie Isolierungen wurden zusätzlich über Füllkörperkolonnen rektifiziert. Lösungsmittel, die bei den Synthesen Anwendung fanden, wurden über Molsieb (5 Å) gelagert. Für HPLC/DAD- und LC-ESI-MS(MS)-Experimente wurden ‚HPLC-grade‘-Lösungsmittel von Fisher Scientific (Loughborough, UK) und Merck (LiChrosolv[®], Deutschland) verwendet. Falls nicht anders vermerkt, wurde Wasser aus der hauseigenen Millipore[™]-Aufbereitungsanlage (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) verwendet.

3.1.2 Dünnschichtchromatographie

Analytische DC 1	DC-Alufolien-Fertigplatten Kieselgel 60 F ₂₅₄ , 20 x 20 cm (Merck, Deutschland)
Analytische DC 2	DC-Polygram [®] SIL G/UV ₂₅₄ -Fertigfolien Kieselgel mit Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 0,2 mm, 4 x 8 cm (Macherey-Nagel, Deutschland)

3.1.3 Säulenchromatographie (SC)

SC 1	Kieselgel 60 (0,063 - 0,2 mm, Merck), 35 x 5.5 cm
SC 2	Amberlite XAD-7, 500 g (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 35 x 4 cm

3.2 Geräte

3.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC-System 1:

Gerät:	Analytische HPLC von Hewlett Packard, Series 1100 (Waldbronn, Deutschland)
Pumpe:	Hewlett Packard 1100 Series HPLC Pumpe (Waldbronn, Deutschland)
Detektor:	Hewlett Packard 1100 Series Diodenarraydetektor (Waldbronn, Deutschland)
Autosampler:	Wisp 710b (Waters, Eschborn, Deutschland)
Pumpensteuerung:	Hewlett Packard Chemstation™ Software (Waldbronn, Deutschland)
Injektionsvolumen:	20 µL
Trennsäule:	Knauer Eurospher100 C18; 250 x 4 mm; 5 µm Partikelgröße (Knauer, Berlin, Deutschland)
Fluss:	1.0 mL/min
Eluenten:	0.1% Ameisensäure/Wasser (A) (v/v), Acetonitril (B)
Gradient:	1-99% B in 40 min

HPLC-System 2:

Gerät:	Knauer Hochdruckgradientensystem (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpe:	2 Knauer HPLC 64 Pumpen mit analytischem Pumpenkopf (Knauer, Berlin, Deutschland)
Injektion:	Rheodyne Six-Port Injektionsventil mit 100 µL Probenschleife
Detektor:	Knauer UV-VIS-Detektor (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpensteuerung:	Knauer HPLC-Analyse Version 1.42C (Knauer, Berlin, Deutschland)
Injektionsvolumen:	25 µl
Trennsäule:	Knauer Eurospher100 C18; 250 x 4 mm; 5 µm Partikelgröße (Knauer, Berlin, Deutschland)
Fluss:	1.0 mL/min
Eluenten:	0.1% TFA/Wasser (A) (v/v), Acetonitril (B)
Gradient:	1-99% (B) in 40 min

HPLC-System 3:

Gerät:	Knauer Niederdruckgradientensystem (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpe:	Knauer Well Chrom K1001 (Knauer, Berlin, Deutschland)
Injektor:	Rheodyne Six-Port Injektionsventil mit 1 mL Probenschleife
Detektor:	Knauer UV-VIS-Detektor (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpensteuerung:	Knauer HPLC Software (Knauer, Berlin, Deutschland)
Injektionsvolumen:	80 µL
Trennsäule:	Knauer Eurospher100 C18; 250 x 16 mm; 5 µm Partikelgröße (Knauer, Berlin, Deutschland)
Fluss:	12 mL/min
Eluenten:	10% Ameisensäure/Wasser (A) (v/v), Acetonitril (B)

Gradient:	0 min 2% (B), 1 min 5% (B), 3 min 5% (B), 6 min 6% (B), 8 min 6% (B), 30 min 10% (B), 45 min 20% (B), 46 min 99% (B), 50 min 99% (B)
-----------	--

HPLC-System 4:

Gerät:	Knauer Niederdruckgradientensystem (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpe:	Knauer 42051 (Knauer, Berlin, Deutschland)
Injektor:	Rheodyne Six-Port Injektionsventil mit 100 µL Probenschleife
Detektor:	Knauer UV-VIS-Detektor (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpensteuerung:	EuroChrom 2000 Software (Knauer, Berlin, Deutschland)
Injektionsvolumen:	80 µL
Trennsäule:	Knauer Eurospher100 C18; 250 x 4 mm; 5 µm Partikelgröße (Knauer, Berlin, Deutschland)
Fluss:	1.1 mL/min
Eluent:	10% Ameisensäure/Wasser (A) (v/v), Acetonitril (B)
Gradient:	0 min 2% (B), 1 min 5% (B), 3 min 5% (B), 6 min 6% (B), 8 min 6% (B), 30 min 10% (B), 45 min 20% (B), 46 min 99% (B), 50 min 99% (B)

HPLC-System 5:

Gerät:	Knauer Hochdruckgradientensystem (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpe:	2 x Knauer HPLC 64 Pumpe mit analytischem Pumpenkopf (Knauer, Berlin, Deutschland)
Injektor:	Rheodyne Six-Port Injektionsventil mit 100 µL Probenschleife
Detektor:	Knauer UV-VIS-Detektor (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpensteuerung:	Knauer HPLC-Analyse Version 1.42C (Knauer, Berlin, Deutschland)

Injektionsvolumen:	80 µL
Trennsäule:	Knauer Eurospher100 C18; 250 x 4 mm; 5 µm Partikelgröße (Knauer, Berlin, Deutschland)
Fluss:	1.1 mL/min
Eluent	10% Ameisensäure/Wasser (A), Acetonitril (B)
Gradient	0 min 2% (B), 1 min 5% (B), 3 min 5% (B), 6 min 6% (B), 8 min 6% (B), 30 min 10% (B), 45 min 20% (B), 46 min 99% (B), 50 min 99% (B)

HPLC-System 6

Gerät:	Knauer Niederdruckgradientensystem (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpe:	Knauer 42051 (Knauer, Berlin, Deutschland)
Injektor:	Rheodyne Six-Port Injektionsventil mit 100 µL Probenschleife
Detektor:	Knauer UV-VIS-Detektor (Knauer, Berlin, Deutschland)
Pumpensteuerung:	EuroChrom 2000 Software (Knauer, Berlin, Deutschland)
Injektionsvolumen:	80 µL
Trennsäule:	Agilent Zorbax SB-C8 mit Vorsäule; 150 x 4.6 mm; 3.5 µm Partikelgröße (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Fluss:	1 mL/min
Eluent:	10% Ameisensäure/Wasser (A) (v/v), Acetonitril (B)
Gradient:	Isokratisch, (A):(B) = 94:6 (v/v)

HPLC-System 7:

Gerät:	Analytische HPLC von Hewlett Packard, Series 1100 (Waldbronn, Deutschland)
Pumpe:	Hewlett Packard 1100 Series binäre HPLC Pumpe (Waldbronn, Deutschland)

Detektor:	Hewlett Packard 1100 Series Diodenarraydetektor (Waldbronn, Deutschland)
Autosampler:	Wisp 710b (Waters, Eschborn, Germany)
Pumpensteuerung:	Hewlett Packard Chemstation™ Software (Waldbronn, Deutschland)
Injektionsvolumen:	20 µL
Trennsäule:	Agilent Zorbax™ SB-C8; 150 x 2.1 mm, 3.5 µm Partikelgröße (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Fluss:	350 µL/min
Eluent:	10 % Ameisensäure/Wasser (A) (v/v), Acetonitril (B)
Gradient:	0 min 2% (B), 3 min 2% (B), 17 min 5% (B), 28 min 6% (B), 35 min 15% (B), 45 min 30% (B), 50 min 99% (B), 55 min 99% (B)

HPLC-System 8:

Gerät:	Analytische HPLC von Hewlett Packard, Series 1100 (Waldbronn, Deutschland)
Pumpe:	Hewlett Packard 1100 Series HPLC Pumpe (Waldbronn, Deutschland)
Detektor:	Hewlett Packard 1100 Series Diodenarraydetektor (Waldbronn, Deutschland)
Autosampler:	Wisp 710b (Waters, Eschborn, Germany)
Pumpensteuerung:	Hewlett Packard Chemstation™ Software (Waldbronn, Deutschland)
Injektionsvolumen:	50 µL
Trennsäule:	Agilent Zorbax™ SB-C8; 150 x 2.1 mm; 3.5 µm Partikelgröße (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Fluss:	350 µL/min
Eluent:	0.1% Ameisensäure/Wasser (A) (v/v), Acetonitril (B)
Gradient:	0 min 0% (B), 10 min 0% (B), 50 min 50% (B), 63 min 99% (B), 72 min 99% (B), 75 min 0% (B), 80 min 0%

3.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie- Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

HPLC-MS-System 1

HPLC:	
Gerät:	Hochdruckgradientenanlage (BAI, Bensheim, Germany)
Pumpe:	Applied Biosystems 140B für binäre Hochdruckgradienten (BAI, Bensheim, Germany)
Autosampler:	Triathlon im μL -Pickup-Modus (Spark, Holland)
Injektor:	Rheodyne 8125 mit 20 μL -Probenschleife
Injektionsvolumen:	5 μL
Fluss:	200 $\mu\text{L}/\text{min}$
Eluent:	0.1% Ameisensäure/Wasser (A) (v/v), Acetonitril (B)
Gradient:	Isokratisch 50% (A)
Tandemmassenspektrometer:	
MS:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland) mit Finnigan Electrospray-Ionisations-Interface (ESI)
ESI-Koppelkapillare:	deaktivierte Fused Silica Kapillare, 50 μm i.d. (J & W, Scientific, Folsom, CA, USA)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur (20°C)
Einlasskapillare	200 °C
ESI-Kapillarenspannung:	3.2 kV
Sheathgas:	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0 (10 Skalenteile)
Messbereich:	$m/z = 150 - 1000$ u

Stossaktivierung:	Argon 5.0; Druck in der Stosszelle: 2.0 mTorr
Multiplierspannung:	1300 V für ESI MS, 2000 V ESI-MS/MS
Datensystem:	ICIS 8.1 Data System (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland) auf DECstation, 5000/33 (Digital Equipment, Unterföhring, Deutschland)
Datenauswertung:	Xcalibur™ Software Version 1.2 (Thermo Electron, Dreieich, Deutschland) (nach Konvertierung)

HPLC-MS-System 2

HPLC:

Gerät	Analytische HPLC von Hewlett Packard, Series 1100 (Waldbronn, Deutschland)
Pumpe:	Hewlett Packard 1100 Series HPLC Pumpe (Waldbronn, Deutschland)
Detektor:	Hewlett Packard 1100 Series Diodenarraydetektor (Waldbronn, Deutschland)
Autosampler:	Wisp 710b (Waters, Eschborn, Germany).
Pumpensteuerung:	Hewlett Packard Chemstation Software (Waldbronn, Deutschland)
Injektionsvolumen:	20 µL
Trennsäule:	Agilent Zorbax™ SB-C8; 150 x 2.1 mm; 3,5 µm Partikelgröße (Agilent, Waldbronn, Deutschland)
Fluss:	350 µL/min
Eluent:	10 % Ameisensäure/Wasser (A) (v/v), Acetonitril (B)
Gradient:	0 min 2% (B), 3 min 2% (B), 17 min 5% (B), 28 min 6% (B), 35 min 15% (B), 45 min 30% (B), 50 min 99% (B), 55 min 99% (B),

Tandemmassenspektrometer:

MS:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Electro-spray-Ionisations-Interface (ESI)
ESI-Koppelkapillare:	Deaktivierte Fused Silica Kapillare 50 µm i.D. (J & W, Scientific, Folsom, CA, USA)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Einlasskapillare	200 °C
ESI-Kapillarenspannung:	3.2 kV
Sheathgas:	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0 (10 Skalenteile)
Messbereich:	$m/z = 150 - 1000$
Stossaktivierung:	Argon 5.0; Druck in der Stosszelle: 2.0 mTorr
Multiplierspannung	1300 V für ESI MS, 2000 V ESI.MS/MS
Datensystem:	ICIS 8.1 Data System (Finnigan MAT, Bremen) auf DEC-station 5000/33 (Digital Equipment, Unterföhring, Deutschland)
Datenauswertung:	Xcalibur™ Software Version 1.2 (Thermo Electron, Dreieich, Deutschland) (nach Konvertierung)

3.2.3 High Resolution Gas Chromatographie Massenspektrometrie (HR-GC/MS)

Gerät:	Fisons Instruments GC 8060 (Thermo Electron, Dreieich, Deutschland)
Injektor:	Split/Splitless Injektor (1:20), Temperatur 250 °C
Autosampler:	Fisons AS 800
Trennsäule:	HP5 (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)

Temperaturprogramm:	60 °C, 5 °C/min, 300 °C, 10 min isotherm
Trägergas:	2.0 mL/min Helium 5.0, konstanter Druck
Gerät:	Fisons Instruments MD 800 (Thermo Electron, Dreieich, Deutschland)
Ionisation:	Elektronenstossionisation (EI), 70 eV
Temperatur:	Ionenquelle 220 °C, Transferkapillare 300 °C
Quellendruck:	$1 \cdot 10^{-5}$ mbar
Multipliiert:	350 V
Massenbereich:	$m/z = 38 - 450$ u
Datenaufnahme und Datenauswertung:	Xcalibur (Version 1.2) (Thermo Electron, Dreieich, Deutschland)

3.2.4 Flüssigszintillationszähler (Liquid-Scintillation-Counting; LSC)

Gerät:	Rackbeta 1214 (LKB, Wallac, Freiburg, Deutschland)
Photomultiplier:	10 °C
Messkammer:	10 °C
Messzeiten:	10 min
LSC-Vials:	15 ml (Packard Bioscience, Billerica, MA, USA)
Software:	Ultra-Term [®] Software (Wallac, Freiburg, Deutschland)

3.2.5 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Gerät:	Bruker Avance 400 Spektrometer (Bruker, Rheinstetten, Germany)
Standard:	Tetramethylsilan (TMS) $\delta = 0.00$ ppm oder das jeweilige NMR-Lösungsmittel

Lösungsmittel:	CDCl ₃ , d ₆ -DMSO, d ₄ -MeOD, 2% DCl in D ₂ O
----------------	--

Die chemische Verschiebung δ ist in ppm angegeben. Als interner Standard diente bei ¹H-NMR-Spektren das Tetramethylsilan [$\delta(\text{TMS}) = 0.0 \text{ ppm}$] bzw. die Resonanzsignale der Restprotonen des eingesetzten deuterierten Lösungsmittels [$\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26 \text{ ppm}$, $\delta(\text{d}_6\text{-DMSO}) = 2.50 \text{ ppm}$, $\delta(\text{D}_2\text{O}) = 4.79 \text{ ppm}$, $\delta(\text{d}_4\text{-MeOD}) = 4.84 \text{ ppm}$].

Die Multiplizität der Signale wird in folgenden Abkürzungen wiedergegeben: *s* = Singulett, *d* = Dublett, *t* = Triplett, *q* = Quartett und *m* = Multipllett. Die Kopplungskonstanten *J* sind in Hertz (Hz) angegeben.

Die Datenauswertung erfolgte mittels Mestre-C 4.4.1.0 Software.

3.2.6 Sauerstoffmessung

Sauerstoffelektrode:	Hansatech GB Sauerstoffelektrode (Bachhofer Laborgeräte, Reutlingen, Deutschland)
----------------------	---

3.2.7 Sonstige Geräte

Ultraschallbad:	Transsonic 460 (Elma, Singen, Deutschland)
Vortexwe:	Vortex Genie (Scientific Industries, NY, USA)
Zentrifugen:	Hettich EBA12; Einsätze 1115&1412 1614 (Hettich, Tuttlingen, Deutschland) Hettich Universal 16R, Rotor 1616 & 1614 (Hettich, Tuttlingen, Deutschland)
Rotavapor:	Büchi Vakuum System B-173, Vakuum Controller B-720, Büchi-Rotavapor (Büchi, Konstanz, Deutschland)
Mixstab:	Braun Mixstab
pH-Meter	Knick Digital-pH-Meter (Knick, Berlin, Deutschland)
Ultra Turax [®] :	Ultra Turrax T25 (8000 bis 24000 min ⁻¹) IKA [®] -Labortechnik (Jahnke & Kunkel, Staufen, Deutschland)

Waagen:	Mettler PL300 (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland) Mettler AT 21 Comparator (Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland) Sartorius BP210S (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
UV-Lampe (für DC):	Minuvius, KW 254 nm, LW 366 nm (Desaga, Wiesloch, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage:	Christ-alpha 1-4 (Christ, Osterode, Deutschland) Vakuum: 0.063 mbar Temperatur im Eiskondensator: -49 °C

3.3 Methoden

3.3.1 Mehrstufensynthesen von Anthocyanidinen

3.3.1.1 Synthese von 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd

Zur Darstellung von 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** wurden 10 g (0.065 mol) 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd (Phloroglucinaldehyd) **21** in 150 mL trockenem Aceton gelöst und die Lösung unter Stickstoffatmosphäre auf 0°C abgekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 g (0.049 mol) Triethylamin und 6.8 g (0.048 mol) Benzoylchlorid – jeweils gelöst in 30 mL trockenem Aceton – über zwei getrennte Tropftrichter binnen 30 min mit gleicher Geschwindigkeit. Im Anschluss wurde der Syntheseansatz noch 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Das sich abscheidende Triethylaminhydrochlorid wurde abfiltriert und verworfen. Nach Zugabe von 50 g Kieselgel 60 (0.063 – 0.2 mm) wurde das Lösungsmittel am Rotavapor entfernt. Das trockene, gelbe Pulver wurde anschließend auf eine mit Benzol vorkonditionierte Säule (3.1.3, SC 1) aufgetragen und mit 1 L Benzol (Fraktion 1) eluiert. Es folgte die säulenchromatographische Trennung mit 1 L einer Mischung aus Chloroform und Benzol (1:1) (Fraktion 2). Anschließend Elution mit 2 L einer Mischung aus Chloroform und Ethylacetat (1:1) ergab Fraktion 3 (Pols und Wilkins, 1971). Die einzelnen Fraktionen wurden mittels DC 1 (8.1.2) (Fließmittel: Chloroform) und HPLC-DAD (8.1.2, HPLC-System 1)

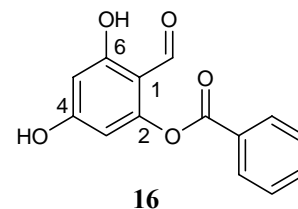
auf ihre Reinheit überprüft. In Fraktion 2 wurde 2,4-Dibenzoyloxy-6-hydroxybenzaldehyd identifiziert. Fraktion 3 enthielt den gewünschten 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxy-benzaldehyd **16**.

Ausbeute: 21%, 3.6 g

$t_R = 26.3$ min (8.1.2, HPLC-System 1)

λ_{max} : 236, 284 nm

$M = 258$ g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: δ 6.27 (ar, *d*, 2.1 Hz, 2H), 6.32 (ar, *d*, 2.1 Hz, 2H), 7.59 (ar, *t*, 7.6 Hz, 1H), 7.74 (ar, *t*, 7.4 Hz, 1H), 8.11 (ar, *d*, 7.2 Hz, 1H), 10.00 (CHO, *s*, 1H), 11.01 (OH, *s*, 1H), 11.38 (OH, *s*, 1H)

ESI_{neg}-LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [20 eV]): m/z (%) 257.0 (100), 213.0 (20), 187.0 (58), 169.0 (16), 145.0 (13), 143.0 (24), 119.0 (19), 111.1 (24)

3.3.1.2 Synthese von Pelargonidinchlorid (Pg-Chlorid)

3.3.1.2.1 Synthese von ω -Chlor-4-hydroxyacetophenon

30 g (0.28 mol) Methoxybenzol (Anisol) **22** und 36 g (0.32 mol) Chloracetylchlorid wurden in 500 mL n-Heptan gelöst. Innerhalb von 30 min wurden nach und nach 45 g (0.34 mol) wasserfreies Aluminiumchlorid hinzugegeben; anschließend erwärmte man über 90 min auf 35 °C. Im Verlauf von weiteren 30 min wurden nochmals 45 g (0.34 mol) Aluminiumchlorid zugegeben, und die Temperatur wurde für weitere zweieinhalb Stunden bei 35 °C gehalten. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wurde der Rückstand vorsichtig mit Eis zersetzt. Nachdem dieser sich weitgehend gelöst hatte, wurden 200 mL konzentrierte Salzsäure zugegeben; die Lösung wurde im Eisbad gekühlt und dreimal mit je 250 mL Ether extrahiert. Die vereinigten Phasen wurden mit 200 mL 15%iger Ammoniumcarbonatlösung entsäuert. Im Anschluss wurde die Etherschicht fünfmal mit je 250 mL 10%iger Natriumcarbonatlösung extrahiert. Durch Ansäuern der wässrigen Phase, mehrmaliges Ausschütteln mit insgesamt ca. 500 mL Ether

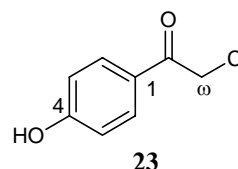
und anschließendes Abdestillieren des Lösungsmittels wurde eine gelbe, ölige Substanz gewonnen. Durch Zugabe von ca. 10 mL 25%igem Ethanol kristallisierte die Substanz zu einem Feststoff mit leicht gelber Farbe (Allewelt und Day, 1941).

Ausbeute: 20%, 9.5 g

$t_R = 17.4$ min (HPLC-System 1)

λ_{\max} : 222, 282 nm

$M = 170$ g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: 5.02 (CH_2 , *s*, 2H), 6.84 (*ar*, *d*, 8.8 Hz, 2H), 7.84 (*ar*, *d*, 8.7 Hz, 2H), 10.48 (OH, *s*, 1H)

ESI $_{\text{neg}}$ -LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [20 eV]): m/z (%) 168.7 (100), 132.7 (52), 126.8 (7), 122.9 (27), 104.8 (32), 77.0 (15), 58.6 (4), 34.9 (93)

3.3.1.2.2 Synthese von ω -Acetoxy-4-hydroxyacetophenon

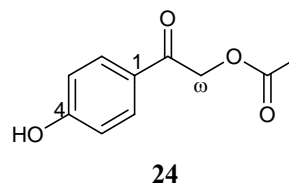
Eine Lösung von 10 g (0.06 mol) ω -Chlor-4-hydroxyacetophenon **23** und 7.7 mL Eisessig in 100 mL trockenem Acetonitril wurde bei 0 °C langsam mit 11.2 g (0.11 mol) Triethylamin versetzt. Anschließend erhitze man für 3 Stunden unter Rückfluss, verdünnte im Anschluss mit Ether auf ca. 200 mL und extrahierte die organische Phase mit je 100 mL verdünnter Salzsäure, Wasser und zuletzt mit einer Kochsalzlösung. Man trocknete die organische Phase mit Natriumsulfat, entfernte das Lösungsmittel und kristallisierte aus Wasser um. 4.5 g ω -Acetoxy-4-hydroxyacetophenon **24** wurden nach dem Gefriertrocknen erhalten (Zhang *et al.*, 1999)

Ausbeute: 40%, 4.5 g

$t_R = 21.9$ min (HPLC-System 1)

λ_{\max} : 220, 280 nm

$M = 194$ g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: δ 2.15 (CH₃, *s*, 3H), 5.40 (CH₂, *s*, 2H), 7.13 (ar, *d*, 8.8 Hz, 2H), 7.91 (ar, *d*, 8.8 Hz, 2H), 10.31 (OH, *s*, 1 H)

ESI_{neg}-LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [20 eV]): *m/z* (%) 192.9 (12), 150.9 (100), 132.8 (9), 122.7 (14), 106.8 (12), 104.8 (21), 58.8 (35)

3.3.1.2.3 Synthese von ω ,4-Diacetoxyacetophenon

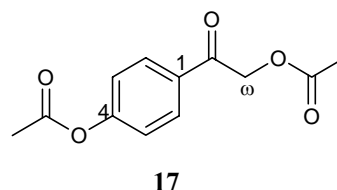
4.9 g (0.025 mol) ω -Acetoxy-4-hydroxyacetophenon **24** wurden in 20 mL Acetanhydrid für zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Danach wurde die Reaktionsmischung in 100 mL siedendes Wasser gegossen und noch einmal kurz zum Sieden gebracht. Der beim Erkalten ausfallende, kristalline Feststoff wurde abgesaugt und gefriergetrocknet (Freudenberg und Hubner, 1952).

Ausbeute: 75%, 4.0 g

t_R = 21.4 min (HPLC-System 1)

λ_{max} : 250 nm

M = 236 g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: δ 2.15 (CH₃, *s*, 3H), 2.31 (CH₃, *s*, 3H), 5.46 (CH₂, *s*, 2H), 7.33 (ar, *d*, 8.8 Hz, 2H), 8.03 (ar, *d*, 8.8 Hz, 2H)

ESI_{neg}-LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [-24 eV]): *m/z* (%) 237 (7), 194.9 (60), 152.8 (100), 134.7 (13), 106.8 (8)

3.3.1.2.4 Synthese von Pelargonidinchlorid

2.03 g (7.86 mmol) 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** und 2.03 g (8.6 mmol) ω ,4-Diacetoxyacetophenon **17** wurden in 30 mL einer Mischung aus Methanol und Essigsäureethylester (2:1) gelöst. Über eine Kapillare wurde für eine Stunde trockenes

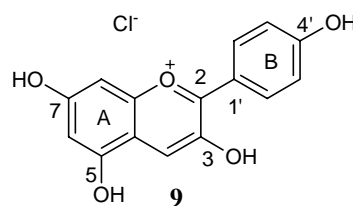
HCl-Gas, das aus Natriumchlorid und Schwefelsäure generiert wurde, eingeleitet. Die gesättigte Lösung verfärbte sich dabei tiefrot. Die Mischung wurde anschließend für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die sich bei der Reaktion abscheidenden Kristalle wurden am folgenden Tag durch Zentrifugieren abgetrennt. Der violett schimmernde Rückstand, 5-Benzoylpelargonidinchlorid, wurde mit wenigen mL Diethylether gewaschen und getrocknet. Im Anschluss wurde das feinkristalline Pulver in 30 mL einer basischen Lösung aus Methanol und Wasser (0.25 g Kaliumhydroxid in 5 mL Methanol/Wasser 1:1) in Eiskühlung suspendiert und für eine Stunde bei 0 - 4 °C gerührt. Die blaue Lösung wurde danach mit 16.5 mL konzentrierter Salzsäure angesäuert. An dieser Stelle wechselte die Farbe wieder von blau nach rot. Pg-Chlorid **9** kristallisierte in bräunlich schimmernden Kristallen, die nach Zentrifugieren gewonnen wurden. Zum Umkristallisieren wurde das Anthocyanidin in das Pikrinsäuresalz überführt. Hierfür wurde die Substanz in möglichst wenig 1%iger HCl in 50% Ethanol gelöst. Die Pikrinsäure wurde in Wasser und Ethanol 1:1 gelöst (gesättigte Lösung). Beide Lösungen wurden für eine kurze Zeit auf 60 °C erwärmt und vereinigt. Über Nacht kristallisierte das Pikrinsäuresalz bei -24 °C aus. Die abgeschiedenen Kristalle wurden zentrifugiert, mit ca. 10 ml Ether gewaschen und im Anschluss getrocknet. Zur Regenerierung des Chlorids wurde das Pikrat in möglichst geringer Menge methanolischer HCl gelöst. Durch Zugabe der ca. 6-fachen Menge an trockenem Diethylether kristallisierte **9** in Form seines Chlorids in feinen Kristallen aus. Der Umkristallisationsprozess wurde ein zweites Mal in der beschriebenen Weise wiederholt (Robertson *et al.*, 1928).

Ausbeute: 40%, 976 mg

$t_R = 16.4$ min (HPLC-System 1)

λ_{max} : 268, 326, 422, 515 nm

$M = 306$ g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: δ 6.86 (ar, *d*, 1.8 Hz, 1H), 6.97 (ar, *d*, 1.4 Hz, 1H), 7.11 (ar, *d*, 9.1 Hz, 2H), 8.54 (ar, *d*, 9.1 Hz, 2H), 8.84 (CH, *s*, 1H), 11.31 (OH, *s*, 1H), 12.14 (OH, *s*, 1H), 12.20 (OH, *s*, 1H), 12.35 (OH, *s*, 1H)

ESI_{neg}-LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [-35 eV]): *m/z* (%) 270.9 (93), 196.8 (19), 168.9 (17), 158.9 (8), 152.9 (8), 144.8 (16), 140.7 (19), 120.8 (100), 92.9 (10)

3.3.1.3 Synthese von Cyanidinchlorid (Cy-Chlorid)

3.3.1.3.1 Synthese von ω-Chlor-3,4-dihydroxyacetophenon

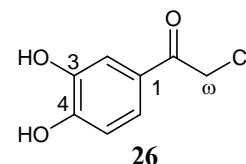
Die Synthese des Acetophenons **26** zur Darstellung von Cy-Chlorid **5** erfolgte über 1,2-Dihydroxybenzol (Catechol) **25**. Hierfür wurden 20 g (0.18 mol) **25** zusammen mit 20 g Chloracetylchlorid (0.18 mol) und 15 g (0.01 mol) Phosphoroxychlorid in 80 mL wasserfreiem Benzol gelöst. Bei 60 °C wurde der Ansatz für 24 Stunden unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Während dieser Zeit erfolgte ein Farbumschlag von farblos nach violett; im Kolben setzte sich ein Niederschlag ab. Nach Abkühlen und Dekantieren wurden ca. 50 mL Eiswasser hinzugefügt. An dieser Stelle präzipitierte das Produkt. Die Umkristallisation erfolgte aus Wasser (Johnson und Gatewood, 1929).

Ausbeute: 59%, 19.9 g

$t_R = 15.9$ min (HPLC-System 1)

λ_{\max} : 232, 280, 310 nm

$M = 186$ g/mol



¹H-NMR: DMSO-d₆, 400 MHz: δ 5.00 (CH₂, *s*, 2H), 6.89 (ar, *d*, 8.3 Hz, 1H), 7.38 (ar, *dd*, 8.3 und 2.0 Hz, 1H), 7.47 (ar, *d*, 2.0 Hz, 1H), 9.42 (OH, *s*, 1H), 10.02 (OH, *s*, 1H)

ESI_{neg}-LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [15 eV]): *m/z* (%) 185.3 (15), 148.7 (16), 121.1 (100), 93.4 (15), 35.6 (43)

3.3.1.3.2 Synthese von ω,3,4-Triacetoxyacetophenon

In Anlehnung an Gabetta und Giorgi (1990) wurden 5 g (27 mmol) ω-Chlor-3,4-dihydroxy-acetophenon **26** mit 12.5 mL Essigsäureanhydrid und vier Tropfen Schwe-

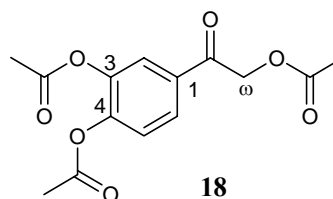
felsäure versetzt und unter Rückfluss und Rühren für zwei Stunden auf 50 °C erwärmt. Es folgte die Zugabe von weiteren 20 mL Essigsäureanhydrid und 7.9 g (81 mmol) wasserfreiem Kaliumacetat. Dann wurde für weitere drei Stunden auf 100 °C erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurde diese auf Eis gegossen. Die ausgefallene Substanz wurde gefriergetrocknet und im Anschluss aus Essigsäureethylester und Cyclohexan umkristallisiert.

Ausbeute: 70%, 5.5 g

$t_R = 22.2$ min (HPLC-System 1)

λ_{\max} : 248 nm

$M = 294$ g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: δ 2.15 (CH_3 , *s*, 3H), 2.31 (2 CH_3 , 2 *s* überlagert, 6H), 5.45 (CH_2 , *s*, 2H), 7.49 (ar, *d*, 8.4 Hz, 1H), 7.87 (ar, *d*, 2.0 Hz, 1H), 7.94 (ar, *dd*, 8.4 und 2.0 Hz, 1H)

ESI $_{\text{neg}}$ -LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [-13 eV]): m/z (%) 295.1 (4), 253.0 (89), 210.1 (100), 168.9 (6)

3.3.1.3.3 Synthese von Cyanidinchlorid

0.5 g (1.94 mmol) 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** und 0.7 g (2.4 mmol) ω ,3,4-Triacetoxyacetophenon wurden zur Kondensation von Cy-Chlorid **5** in 10 mL Ethylacetat und 4 mL Ethanol p. a. gelöst. Innerhalb einer Stunde wurde die eisgekühlte Lösung mit trockenem HCl-Gas gesättigt, das aus Natriumchlorid und Schwefelsäure generiert wurde. Die rote Lösung wurde im Anschluss für 70 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, die dabei abgeschiedenen Kristalle (5-Benzoylcyanidinchlorid) durch Zentrifugieren vom Lösungsmittel abgetrennt und mit 5 mL Ether gewaschen. Die feinen Kristalle wurden schließlich zum Abspalten der Benzoylschutzgruppe mit 8%iger ethanolischer Natriumhydroxidlösung (Ethanol : Wasser = 3 : 2) unter Eiskühlung in Lösung gebracht und für weitere drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Cy-Chlorid

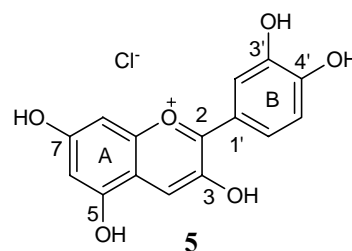
5 wurde durch die Zugabe von 18 mL konzentrierter Salzsäure (15 Minuten auf 60 °C) erhalten. Im Gefrierschrank kristallisierte Cy-Chlorid **5** aus. Nach Zentrifugation und Waschen des Niederschlags mit ca. 5 mL Diethylether wurde Cy-Chlorid **5** über das Pikrinsäuresalz umkristallisiert. Die Umkristallisation erfolgte, wie beim Pg-Chlorid **9** beschrieben (Robertson und Robinson, 1928).

Ausbeute: 52%, 323 mg

$t_R = 15.4$ min (HPLC-System 1)

λ_{max} : 276, 528 nm

$M = 322.5$ g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: δ 6.85 (ar, *d*, 1.8 Hz, 1H), 6.93 (ar, *d*, 1.4 Hz, 1H), 7.07 (ar, *dd*, 8.7 und 1.4 Hz, 1H), 8.05 (ar, *d*, 2.3 Hz, 1H), 8.09 (ar, *dd*, 8.6 und 2.3 Hz, 1H), 8.85 (CH, *d*, 5,1 Hz, 1H), 9.90 (OH, *s*, 1H), 10.92 (OH, *s*, 1H), 12.20 (OH, *s*, 2H), 12.42 (OH, *s*, 1H)

ESI_{neg}-LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [-20 eV]): m/z (%) 287 (39), 241.0 (18), 213.2 (62), 185.1 (17), 157.0 (17), 137.1 (100), 128.0 (17), 121.1 (27), 108.9 (30), 81.2 (13), 68.9 (22)

3.3.1.4 Synthese von Peonidinchlorid (Pn-Chlorid)

3.3.1.4.1 Synthese von ω -Chloro-4-hydroxy-3-methoxyacetophenon

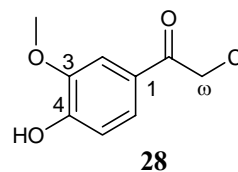
40 g (0.29 mol) Dimethoxybenzol (Veratrol) **27** wurden in 200 mL Kohlenstoffdisulfid (CS_2) gelöst und schrittweise mit 40 g (0.30 mol) Aluminiumchlorid versetzt. Nach und nach wurden 34 g (0.30 mol) Chloracetylchlorid zugesetzt. Nach beendeter Reaktion wurden nochmals 40 g Aluminiumchlorid in kleinen Mengen zugegeben. Nach Dekantieren erhielt man eine dunkle, viskose Masse, die anschließend mit 25 mL Eiswasser und 25 mL verdünnter Salzsäure zersetzt wurde. Dabei fiel **28** aus. Es wurde zuerst aus Ethanol und anschließend aus Benzol umkristallisiert (Pratt und Robinson, 1923).

Ausbeute: 27%, 15.7 g

$t_R = 19.5$ min (HPLC-System 1)

λ_{\max} : 232, 280, 308 nm

$M = 200$ g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: δ 3.83 (CH_3 , *s*, 3H), 5.07 (CH_2 , *s*, 2H), 6.89 (ar, *d*, 8.3 Hz, 1H), 7.47 (ar, *d*, 2.0 Hz, 1H), 7.53 (ar, *dd*, 8.3 und 2.0 Hz, 1H), 10.15 (OH, *s*, 1H)

ESI_{neg}-LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [15 eV]): m/z (%) 198.8 (100), 183.5 (5), 163.0 (56), 147.8 (10), 135.2 (5), 116.7 (8), 34.8 (4)

3.3.1.4.2 Synthese von ω -Acetoxy-4-hydroxy-3-methoxyacetophenon

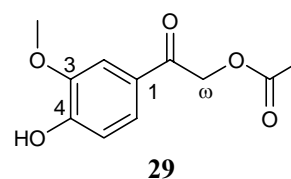
10.3 g (52 mmol) ω -Chlor-4-hydroxy-3-methoxyacetophenon **28** und 7.6 g (78 mmol) Kaliumacetat wurden mit 100 mL Ethanol p. a. versetzt und unter Rückfluss für zwei Stunden erhitzt. Nach Filtrieren und Abziehen des Lösungsmittels wurde der ölige Rückstand gefriergetrocknet und im Anschluss die trockene Substanz aus heissem Wasser umkristallisiert (Pratt und Robinson, 1923).

Ausbeute: 25%, 2.9 g

$t_R = 17.4$ min (HPLC-System 1)

λ_{\max} : 230, 278, 306 nm

$M = 224$ g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: δ 2.14 (CH_3 , *s*, 3H), 3.83 (CH_3 , *s*, 3H), 5.39 (CH_2 , *s*, 2H), 6.89 (ar, *d*, 8.3 Hz, 1H), 7.44 (ar, *d*, 1.9 Hz, 1H), 7.52 (ar, *dd*, 8.3 und 2.0 Hz, 1H), 10.12 (OH, *s*, 1H)

ESI_{neg}-LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [20 eV]): m/z (%) 222.9 (17), 207.9 (100), 180.9 (50), 165.8 (20), 162.8 (8), 147.8 (12), 134.8 (10), 58.8 (21)

3.3.1.4.3 Synthese von ω ,4-Diacetoxy-3-methoxyacetophenon

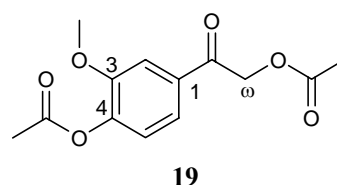
2.5 g (12.5 mmol) ω -Acetoxy-4-hydroxy-3-methoxyacetophenon **29** und 12 mL Essigsäureanhydrid wurden für die Synthese von ω ,4-Diacetoxy-3-methoxyacetophenon **19** für drei Stunden unter Rückfluss bei 100 °C gekocht. Der Ansatz wurde anschließend auf ca. 50 g Eis gegossen. **19** kristallisierte als weißes Präzipitat, das aus heißem Wasser umkristallisiert wurde, aus (Freudenberg und Hubner, 1952).

Ausbeute: 28%, 830 mg

$t_R = 22.2$ min (HPLC-System 1)

$\lambda_{max} = 250$ nm

$M = 266$ g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: δ 2.16 (CH_3 , *s*, 3H), 2.30 (CH_3 , *s*, 3H), 3.77 (CH_3 , *s*, 3H), 5.49 (CH_2 , *s*, 2H), 7.30 (ar, *d*, 8.1 Hz, 1H), 7.60 (ar, *d*, 1.8 Hz, 1H), 7.52 (ar, *dd*, 8.1 und 1.9 Hz, 1H), 10.12 (OH, *s*, 1H)

ESI $_{neg}$ -LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [-10 eV]): m/z (%) 266.9 (23), 224.9 (100), 182.9 (12)

3.3.1.4.4 Synthese von Peonidinchlorid

0.5 g (1.94 mmol) 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** und 0.57 g (2.13 mmol) ω ,4-Diacetoxy-3-methoxyacetophenon **19** wurden gemäß der in Kapitel 3.3.1.3.3 angegebenen Vorschrift in 12 mL Essigsäureethylester gelöst. Auch hier wurde unter Eiskühlung trockenes HCl-Gas für eine Stunde über eine Kapillare eingeleitet. Die gesättigte Lösung wurde noch 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und die abgeschiedenen Kristalle (5-Benzoylpeonidinchlorid) durch Zentrifugieren abgetrennt und getrocknet. Das Abspalten der Schutzgruppe erfolgte mit 8%iger ethanolischer Natriumhydroxidlösung (Wasser : Ethanol = 2 : 3). Hierfür wurde das 5-Benzoylpeonidinchlorid auf Eis mit 15 mL der ethanolischen Lösung suspendiert und dann für drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Pn-Chlorid **8** wurde durch Zugabe von 13 mL konzentrierter

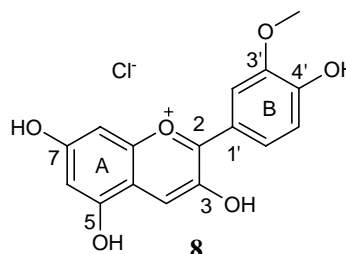
Salzsäure und 15-minütiges Erhitzen auf 60 °C gewonnen. Das Salz kristallisierte innerhalb von 12 Stunden in der Kälte aus. Das Umkristallisieren erfolgte, wie in Kapitel 3.3.1.2.4 beschrieben, über das entsprechende Pikrinsäuresalz (Murakami und Robinson, 1928, Robertson *et al.*, 1928).

Ausbeute: 48%, 308 mg

$t_R = 17.7$ min (HPLC-System 1)

λ_{max} : 274, 440, 528 nm

$M = 336.5$ g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: δ 3.92 (CH_3 , *s*, 3H), 6.84 (*ar*, *s*, 1H), 7.02 (*ar*, *s*, 1H), 7.13 (*ar*, *d*, 8.7 Hz, 1H), 8.01 (*ar*, *d*, 2.1 Hz, 1H), 8.29 (*ar*, *dd*, 8.7 und 2.1 Hz, 1H), 8.79 (*CH*, *d*, 4.0 Hz, 1H), 11.05 (*OH*, *s*, 1H), 12.08 (*OH*, *s*, 2H), 12.32 (*OH*, *s*, 1H)

ESI $_{neg}$ -LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [-25 eV]): m/z (%) 301.0 (15), 286.1 (54), 258.0 (39), 257.1 (33), 243.3 (14), 241.0 (15), 230.1 (44), 229.1 (88), 213.0 (23), 201.0 (100), 186.9 (14), 105.4 (24), 101.1 (30)

3.3.1.5 Synthese von Delphinidinchlorid (Dp-Chlorid)

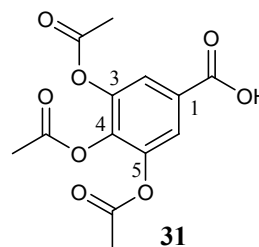
3.3.1.5.1 Synthese von Triacetoxybenzoesäure

50.0 g (0.3 mol) 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure (Gallussäure) **30** wurden für drei Stunden bei 110 °C mit 200 mL Essigsäureanhydrid unter Rückfluss erhitzt. Um anschließend das überschüssige Essigsäureanhydrid zu entfernen, wurde die Lösung in 1 L heißes Wasser gegeben und kurz aufgekocht. Nach Abkühlen kristallisierte die acetylierte Gallussäure **31** in weißen Kristallen aus. Diese wurden abgesaugt, mit ca. 100 mL Wasser gewaschen und gefriergetrocknet (Freudenberg und Hubner, 1952).

Ausbeute: 79%, 62 g

$t_R = 20.1$ min (HPLC-System 1)

λ_{max} : 232, 274 nm



M = 296 g/mol

$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: δ 2.30 (CH_3 , s, 6H), 2.33 (CH_3 , s, 3H), 7.75 (ar, s, 2H), 13.38 (COOH , s, 1 H)

ESI $_{\text{neg}}$ -LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [20 eV]): m/z (%) 296.1 (3), 251.8 (50), 209.7 (100), 168.0 (36), 166.7 (79), 149.4 (5), 125.0 (5), 59.0 (8)

3.3.1.5.2 Synthese von 3,4,5-Triacetoxybenzoesäurechlorid

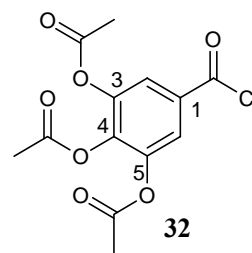
25.0 g (0.084 mol) 3,4,5-Triacetoxybenzoesäure **31** wurden mit 30 mL Thionylchlorid (SOCl_2) unter Rückfluss bei einer Temperatur von 85 °C für eine Stunde erhitzt. Das überschüssige Thionylchlorid wurde im Vakuum schonend entfernt. Der trockene Rückstand wurde zerkleinert und mit ca. 40 mL wasserfreiem Diethylether gewaschen. Dieses Rohprodukt wurde im Anschluss aus Xylol umkristallisiert. Nach dem Gefrier-trocknen erhielt man 3,4,5-Triacetoxybenzoesäurechlorid **32** als weißes Pulver (Freudenberg und Hubner, 1952).

Ausbeute: 91%, 23.8 g

t_R = 24.3 min (HPLC-System 1)

λ_{max} : 234, 276 nm

M = 314.5 g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , MHz: δ 2.31 (CH_3 , s, 6H), 2.32 (CH_3 , s, 3H), 7.89 (ar, s, 2H)

GC-MS (70 eV): m/z (%) 314.2 (6), 279.1 (12), 268.1 (34), 240.2 (16), 237.1 (18), 227.2 (19), 226.1 (71), 209.1 (22), 195.1 (13), 185.2 (28), 184 (99), 153.1 (51), 152.1 (19), 125.1 (16), 59.1 (11), 43.3 (100)

3.3.1.5.3 Synthese von ω -Azo-3,4,5-triacetoxyacetophenon

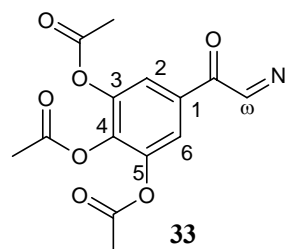
Zur Synthese von ω -Diazo-3,4,5-triacetoxyacetophenon **33** wurde 3,4,5-Triacetoxybenzoesäurechlorid **32** einer Arndt-Eistert-Reaktion mit Diazomethan unterzogen. Diazomethan wurde aus einer Lösung von DiazaldTM in Diethylether generiert. Hierzu wurden 13.6 g (0,063 mol) DiazaldTM in Anwesenheit von 13 g Kaliumhydroxid (gelöst in 13 mL Wasser und 45 mL Ethanol) zu Diazomethan umgesetzt und in eine auf -10 °C gekühlte Vorlage abdestilliert. Zur Umsetzung mit Diazomethan wurden 5 g (0.016 mol) **32**, gelöst in 12 mL Chloroform, auf -10 °C gekühlt. Innerhalb von 30 min wurde diese Lösung nach und nach langsam in die etherische Diazomethan-Lösung gegeben. Das sich bildende **33** fiel in Form eines gelben feinkristallinen Pulvers aus. Das Syntheseprodukt wurde abgesaugt und mit 10 mL wasserfreiem Diethylether (über Molsieb getrocknet, 5Å) gewaschen (Bradley *et al.*, 1930).

Ausbeute: 81%, 4.2 g

$t_R = 22.2$ min (HPLC-System 1)

λ_{max} : 252, 300 nm

$M = 321$ g/mol



¹H-NMR: CDCl₃, 400 MHz: δ 2.30 (CH₃, s, 6H), 2.31 (CH₃, s, 3H), 5.83 (CH, s, 1H), 7.52 (ar, s, 2H)

MS-Daten: Eine Aufnahme war auf Grund der Instabilität dieser Azoverbindung nicht möglich

3.3.1.5.4 Synthese von ω -Chlor-3,4,5-triacetoxyacetophenon

Für die Synthese von ω -Chlor-3,4,5-triacetoxyacetophenon **34** wurden 3.0 g (9.77 mmol) ω -Diazo-3,4,5-triacetoxyacetophenon **33** in 16 mL Dioxan gelöst. Die Lösung kühlte man auf 10 °C. Nach Zugabe von 12 mL einer 1 N HCl-Lösung, gelöst in Diethylether, wurde der Ansatz für 30 min bei 10 °C gerührt. Nach einer starken Stick-

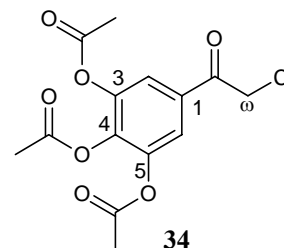
stoffentwicklung wurde das Lösungsmittel schonend entfernt. Der leicht gelbe Rückstand wurde in wenig Dichlormethan gelöst, mit 20 mL Wasser gewaschen, die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Der Rückstand wurde in möglichst wenig einer Mischung aus Essigsäureethylester und Petrolether (1:1, v/v) gelöst. Beim Verdünnen der Lösung mit Petrolether fiel **34** in feinen Kristallen aus (Kraft *et al.*, 2005).

Ausbeute: 87%, 2.6 g

$t_R = 24.8$ min (HPLC-System 1)

λ_{\max} : 250 nm

$M = 329$ g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: δ 2.32 (CH₃, *s*, 6H), 2.34 (CH₃, *s*, 3H), 5.17 (CH₂, *s*, 2H), 7.87 (ar, *s*, 2H)

ESI_{neg}-LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [-20 eV]): m/z (%) 329.9 (7), 287.7 (12), 245.8 (100), 203.8 (30)

3.3.1.5.5 Synthese von ω ,3,4,5-Tetraacetoxyacetophenon

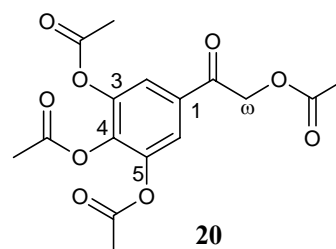
1.0 g (5.4 mmol) ω -Chlor-3,4,5-triacetoxyacetophenon **34**, 3.9 mL (41 mmol) Essigsäureanhydrid, 2 μL konzentrierte Schwefelsäure, 3.9 mL (68 mmol) Eisessig und 1.53 g (15.4 mmol) Kaliumacetat wurden für drei Stunden unter Rückfluss erhitzt und anschließend in Eiswasser gegossen. Das Präzipitat wurde abfiltriert und aus Essigsäureethylester/Cyclohexan (1:1) umkristallisiert (Gabetta und Giorgi, 1990).

Ausbeute: 75%, 0.8 g

$t_R = 23.7$ min (HPLC-System 1)

λ_{\max} : 248 nm

$M = 352$ g/mol



$^1\text{H-NMR}$: DMSO- d_6 , 400 MHz: δ 2.15 (CH₃, s, 3H), 2.32 (CH₃, s, 6H), 2.35 (CH₃, s, 3H), 5.43 (CH₂, s, 2H), 7.85 (ar, s, 2H)

ESI_{neg}-LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [-20 eV]): m/z (%) 353.1 (4), 310.8 (7), 268.9 (100), 226.9 (27)

3.3.1.5.6 Synthese von Delphinidinchlorid

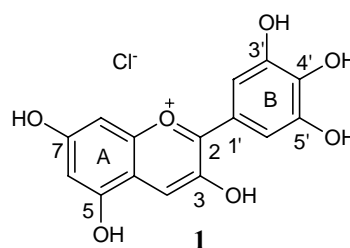
0.25 g (0.71 mmol) ω ,3,4,5-Tetraacetoxyacetophenon **20** und 0.2 g (0.78 mmol) 2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **16** wurden zur Synthese von Dp-Chlorid **1** in 5 mL absolutem Ethanol und 5 mL Essigsäureethylester p. a. unter Argonatmosphäre gelöst. Trockenes HCl-Gas, generiert aus Natriumchlorid und Schwefelsäure, wurde für eine Stunde in die Lösung eingeleitet, um eine mit HCl-Gas gesättigte Lösung zu erhalten. Nach 24 Stunden wurde das bräunlich auskristallisierte 5-Benzoyldelphinidinchlorid durch Zentrifugieren der Lösung gewonnen. Die Abspaltung der Schutzgruppe wurde in gewohnter Manier durch Zugabe von 2.5 mL 10 %iger Natriumhydroxidlösung bei 0 - 4 °C durchgeführt. Dabei war zu beachten, dass die NaOH-Lösung zuvor mit Stickstoff entgast wurde. Nach 15 Minuten bei 0 - 4 °C ließ man die Lösung bei Raumtemperatur für vier Stunden stehen. Im Anschluss wurden 5 mL Ethanol und 5 mL konzentrierte Salzsäure hinzugeben und der Ansatz für vier Tage bei 4 °C stehen gelassen. Danach wurden nochmals 10 mL der Salzsäure zugesetzt und die Lösung verblieb noch weitere 2 Tage bei 4 °C. Innerhalb dieser Zeit kristallisierte **1** aus. Die Kristalle wurden mit ca. 3 mL Diethylether gewaschen und anschließend in möglichst wenig methanolischer HCl, die durch Einleiten von HCl-Gas in Methanol hergestellt wurde, gelöst. Nach Zugabe von Diethylether kristallisierte **1** in feinen Kristallen aus (Bradley *et al.*, 1930).

Ausbeute: 42%, 220 mg

t_R = 15.0 min (HPLC-System 1)

λ_{max} : 274, 347, 534 nm

M = 338.5 g/mol



$^1\text{H-NMR}$: Methanol- d_4 , 400 MHz: δ 5.90 (ar, *d*, 2.2 Hz, 1H), 5.94 (ar, *d*, 2.2 Hz, 1H), 6.14 (CH, *s*, 1H), 6.62 (ar, *s*, 2H)

ESI_{neg}-LC-MS/MS (HPLC-MS-System 1 [-25 eV]): *m/z* (%) 303.0 (66), 257.0 (31), 229.0 (100), 201.0 (24), 173.0 (36), 163.2 (12), 153.0 (42), 149.8 (15), 148.9 (11), 145.0 (22), 127.1 (17), 125.0 (20), 121.0 (22), 107.1 (10), 79.1 (11), 69.1 (10)

3.3.1.6 $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Markierung von Pelargonidin- und Delphinidinchlorid

3.3.1.6.1 Synthese von [Formyl- ^{14}C]-2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd

Zur Darstellung von [Formyl- ^{14}C]-2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd wurden 30 mg (0.24 mmol) 1,3,5-Trihydroxybenzol (Phloroglucinol) **37** in 1.5 mL eines Lösungsmittelgemisches, bestehend aus wasserfreiem Diethylether und Chloroform (2:1), gelöst. Anschließend wurden die erworbene Menge von 250 μCi [Formyl- ^{14}C]-Dimethylformamid und 18.1 μL (0.21 mmol) unmarkiertes Dimethylformamid unter Eiskühlung und Rühren hinzugefügt. Nachdem sich die Substanz gelöst hatte, wurden weiterhin 22 μL Phosphoroxychlorid (POCl_3) langsam zugetropft. Im Anschluss wurde eine Stickstoffatmosphäre erzeugt und der Ansatz für eine Stunde gerührt. Anschließend musste die Lösung noch für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen. Danach wurden weitere 11 μL Phosphoroxychlorid hinzu gegeben und unter Lichtschutz und einer inerten Atmosphäre aus Stickstoff die Lösung für vier Stunden in einem geschlossenen System auf 60 °C erhitzt. Dann wurde das Lösungsmittel durch Einblasen von Stickstoff entfernt und der Rückstand unter Ultraschall mit Eis zersetzt. Die wässrige Lösung wurde mit 1 N NaOH auf pH 6 eingestellt und lyophilisiert. Den Rückstand löste man in 4 mL Methanol unter Behandlung mit Ultraschall. Zum Aufreinigen der Reaktionsprodukte wurde der Überstand mittels RP18-HPLC (HPLC-System 2) aufgereinigt. Das radioaktiv markierte 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd **38** wurde bei 280 nm detektiert und aufgesammelt. Bei der ersten Synthese (Pelargonidin-Synthese) wurden 15.9 mg und bei der zweiten (Delphinidin-Synthese) 17.4 mg isoliert.

Ausbeuten: 44 bzw. 47.5%,
15.9 bzw. 17.4 mg

3.3.1.6.2 Synthese von [Formyl-¹⁴C]-2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd

Das gewonnene [Formyl-¹⁴C]-2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd **38** wurde jeweils in 700 μ L über Molsieb getrocknetem Aceton gelöst, mit Eis gekühlt und portionsweise mit 9 μ L (zweiter Ansatz: 9.9 μ L) auf Molsieb gelagertem Triethylamin und 7.5 μ L (8.2 μ L) Benzoylchlorid versetzt. Die Lösung wurde im Anschluss unter einer Atmosphäre aus Stickstoff für eine Stunde bei 0 - 4 °C gerührt. Wie auch bei der voran gegangenen Synthese wurde das Lösungsmittel mit einem Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand zur Aufreinigung über eine RP18-HPLC (HPLC-System 2) in 2 mL Methanol gelöst. Es wurden 5.0 mg bzw. 4.7 mg [Formyl-¹⁴C]-2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **39** gewonnen.

Ausbeute: 18.9 bzw. 16.2%,
5.0 bzw. 4.7 mg

3.3.1.6.3 Synthese von [4-¹⁴C]-Pelargonidinchlorid

5 mg [Formyl-¹⁴C]-2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **39** (erste Synthese) und 5 mg ω ,4-Diacetoxyacetophenon **17** (molares Verhältnis: 1: 1.10) wurden in 500 μ L einer Mischung aus Methanol und Essigsäureethylester (2 : 1) gelöst. Über eine Kapillare wurde für eine Stunde unter Eiskühlung trockenes HCl-Gas, das aus Natriumchlorid und Schwefelsäure gewonnen wurde, eingeleitet. Anschließend ließ man die Mischung für 24 Stunden bei Raumtemperatur reagieren. Nachdem das Lösungsmittel entfernt worden war, wurde der Rückstand in 80 μ L einer basischen Methanol-Wasser-Lösung (0,25 g Kaliumhydroxid in 5 mL Methanol/Wasser 1:1) unter Eiskühlung gelöst und für eine Stunde bei einer Temperatur von 0 - 4 °C gerührt. Die tiefblaue Lösung wurde anschließend mit 51 μ L konzentrierter Salzsäure angesäuert, wodurch die Farbe wieder nach tiefrot umschlug. Nach dem Gefriertrocknen wurde der Rückstand in saurem Me-

thanol aufgenommen, über eine RP18-HPLC (HPLC-System 2) aufgereinigt und das [4-¹⁴C]-Pg-Chlorid **35** aufgesammelt. **35** wurde dabei bei 520 nm detektiert. Die Ausbeute mit einer spezifischen Aktivität von 33.6 µCi/mg war 0.2 mg.

3.3.1.6.4 Synthese von [4-¹⁴C]-Delphinidinchlorid

4.7 mg (0.018 mmol) [Formyl-¹⁴C]-2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd **39** und 7.1 mg (0.020 mmol) ω,3,4,5-Tetraacetoxyacetophenon **20** wurden in 100 µL Ethanol and 100 µL Essigsäureethylester gelöst. Unter Eiskühlung wurde die Mischung für eine Stunde mit HCl-Gas, das wiederum aus Natriumchlorid generiert wurde, gesättigt. Die Lösung ließ man 24 Stunden bei Raumtemperatur reagieren. An dieser Stelle wurde entstandenes [4-¹⁴C]-5-Benzoyldelphinidinchlorid schon weitgehend zu [4-¹⁴C]-Dp-Chlorid **36** entschützt. Nachdem das Lösungsmittelgemisch entfernt worden war, wurde der Rückstand in 1 mL methanolischer HCl gelöst und über RP18-HPLC aufgereinigt. Dabei wurde auch das restliche [4-¹⁴C]-5-Benzoyldelphinidinchlorid isoliert. [4-¹⁴C]-5-Benzoyldelphinidinchlorid wurde im Anschluss mit 10 µL entgaster 10%iger Natriumhydroxidlösung und 100 µL Ethanol bei 0 °C versetzt. Die Lösung stand dann unter einer inerten Atmosphäre für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µL konzentrierter Salzsäure gestoppt. Die Lösung stand im Anschluss vier Tage bei 4 °C. Die Aufreinigung erfolgte dann wiederum über RP18-HPLC (HPLC-System 2), wobei das restliche [4-¹⁴C]-Dp-Chlorid **36** isoliert wurde. Insgesamt wurden 0.33 mg **36** mit einer spezifischen Aktivität von 30.4 µCi/mg erhalten.

3.3.1.6.5 Messung der spezifischen Aktivität

Die Messung der spezifischen Aktivität der Syntheseprodukte erfolgte über Flüssigszintillationszählung. Hierfür wurden jeweils die gesamten Ausbeuten an [4-¹⁴C]-Pg-Chlorid **35** und [4-¹⁴C]-Dp-Chlorid **36** in genau 2 mL Ethanol gelöst. Davon wurden jeweils dreimal 20 µL in Polyethylenbehälter (Packard Bioscience, Billerica, MA, USA) gegeben und mit 5 mL Szintillationsflüssigkeit Rotiszint Ecoplus[®] (Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Anschließend wurde die Aktivität am Szintillationszähler Rack-

beta 1214 LKB Pharmacia (Wallac, Freiburg, Deutschland) vermessen und die spezifische Aktivität errechnet.

3.3.2 Isolierung von Anthocyanen aus Wildheidelbeeren

3.3.2.1 Gewinnung des Rohextraktes aus Wildheidelbeeren

600 g Wildheidelbeeren wurden mit einem UltraTurax[®] zerkleinert und die pürierten Früchte in zwei Teile zu je 300 g aufgeteilt. Die Extraktion der Polyphenole erfolgte mit zwei unterschiedlichen Methoden. Für die erste wurde ein Lösungsmittelgemisch nach Kalt *et al.* mit der Zusammensetzung Methanol, Wasser und Ameisensäure (87/12/1 (v/v/v)), bei der zweiten Methode ein Lösemittelgemisch nach Kaehkoenen *et al.* bestehend aus Acetonitril, Wasser und Ameisensäure (49/50/1 (v/v/v)) verwendet. Die beiden Methoden wurden insofern abgewandelt, als statt mit Trifluoressigsäure mit Ameisensäure angesäuert wurde (Kalt *et al.*, 2001, Kaehkoenen *et al.*, 2003).

Extrahiert wurden die zerkleinerten Früchte zunächst mit je 300 mL des jeweiligen Lösungsmittelgemisches für 30 min im Ultraschallbad. Nach Abfiltrieren wurde der Rückstand erneut unter gleichen Bedingungen behandelt. Der dritte Extraktionsschritt erfolgte dann mit 400 mL Lösungsmittel. Die Extraktionslösung wurde über Nacht bei 4 °C belassen. Nach 12-stündiger Einwirkzeit wurden alle Fraktionen vereinigt und danach wurde das organische Lösungsmittel schonend bei 35 °C am Rotavapor abgezogen. Der restliche Wasseranteil wurde durch Gefriertrocknen entfernt, der trockene Rohextrakt wurde ausgewogen und bis zur weiteren Aufreinigung bei -24 °C aufbewahrt.

3.3.2.2 LC an XAD-7

Die Abtrennung der Anthocyane aus dem Rohextrakt erfolgte durch LC an XAD-7 Adsorberharz. Verwendet wurde hierfür die mit 500 g XAD-7 gefüllte Säule (3.1.3, SC 2). Vom ersten Rohextrakt (nach Kalt *et al.*, 2001) wurden jeweils 7 g und vom zweiten Rohextrakt (nach Kaehkoenen *et al.*, 2003) jeweils 19 g auf eine mit 2%iger Ameisensäure in Wasser vorkonditionierte Säule aufgetragen. Zunächst wurde mit 1 L 2%iger Ameisensäure in Wasser gewaschen, um Substanzen wie Zucker, kurzkettige aliphati-

sche Säuren und dergleichen zu entfernen. Man ließ das Wasser komplett durch die Säule laufen und eluierte im Anschluss mit einer Mischung aus Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (49/49/2 (v/v/v)). Dies geschah solange, bis sich keine rot gefärbte Lösung mehr im Eluat befand (Kaehkoenen *et al.*, 2003). Andere adsorbierte Substanzen wurden von der Säule entfernt, indem mit ca. 500 mL 2%iger Ameisensäure in Acetonitril gespült wurde. Anschließend wurde die Säule mit 1 L 2%iger Ameisensäure in Wasser wieder konditioniert. Das organische Lösungsmittel der erhaltenen anthocyanhaltigen Fraktion wurde schonend im Vakuum bei 35 °C entfernt. Die übrige wässrige Lösung wurde gefriergetrocknet und die entsprechende Trockenmasse ermittelt. Diese lag, bezogen auf die eingesetzte Menge Heidelbeeren bei 1.3 bzw. 1.5%.

3.3.2.3 Isolierung authentischer Anthocyane

3.3.2.3.1 Isolierung mittels analytischer HPLC

0.2 g der gefriergetrockneten anthocyanhaltigen Fraktion aus 3.3.2.2 wurden in 10 mL 10%iger Ameisensäure gelöst. Von dieser Lösung wurden jeweils 50-60 µL entnommen und über HPLC (3.2.1, HPLC-System 4 und 5) analysiert. Insgesamt wurde ca. 150-mal injiziert. Dabei wurden 14 Fraktionen mit bis zu 300 ml Endvolumen gesammelt, das Lösungsmittel schonend im Vakuum bei maximal 35 °C entfernt und der wässrige Rückstand bei -80 °C aufbewahrt. Die einzelnen Fraktionen wurden gefriergetrocknet und die Auswaage ermittelt (siehe Tabelle 2-3).

Da in einer der 14 Fraktionen zwei Anthocyane enthalten waren (Abbildung 2-14), wurde diese über eine weitere HPLC-Trennung separiert. Hierfür wurde das HPLC-System 6 (3.2.1) verwendet, mit dem diese Substanzen Basislinien-getrennt wurden (Abbildung 2-15). Diese beiden Fraktionen wurden ebenfalls schonend eingengt, gefriergetrocknet und bei -80 °C aufbewahrt.

3.3.2.4 Identifizierung authentischer Anthocyane

3.3.2.4.1 $^1\text{H-NMR}$

Die isolierten Anthocyane wurden in einem NMR-Röhrchen mit 1 mL DCI (2%ig in D_2O) gelöst. An einem Bruker Avance 400 wurden $^1\text{H-NMR}$ -Spektren erhalten. Die Proben wurden nach dem Vermessen sofort wieder gefriergetrocknet, in verdünnter HCl aufgenommen und anschließend erneut gefriergetrocknet.

3.3.2.4.2 HPLC-DAD

Der Reinheitsgrad der isolierten Anthocyane wurde mittels HPLC-DAD (3.2.1, HPLC-System 7) bei 520 nm bestimmt.

3.3.2.4.3 HPLC-ESI_{pos}-MS/MS

Die Molekülmasse der isolierten Reinsubstanzen wurde im ESI_{pos}-Modus als $[\text{M}^+]$ -Molekülion mit dem TSQ 7000 Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen Deutschland), ausgestattet mit einem ESI-Interface (Finnigan MAT, Bremen Deutschland) und verbunden mit einer Applied Biosystems 140b Pumpe (BAI, Bensheim, Deutschland), bestimmt (HPLC-MS-System 1)). Die Datenaufnahme erfolgte mit einer DEC 5000/33 (Digital Equipment, Unterföhring, Deutschland) über MAT ICIS 8.1 Software. Als mobile Phase wurde isokratisch (50%) 0.1% Ameisensäure/Wasser (A) und Acetonitril (B) mit einer Flussrate von 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ verwendet. Die Kapillarspannung wurde auf 3.2 kV gesetzt und die Temperatur der beheizten Kapillare lag bei 200 °C. Stickstoff diente jeweils als Sheats- und Hilfsgas (70 psi bzw. 10 Skalenteile). Injiziert wurde jeweils 1 μl . Die Proben wurden zuerst im ‚Fullscan‘-Modus im Scanbereich $m/z = 120 - 1000$ u und einer Scandauer von 1 s vermessen und im Anschluss das Produktionenspektrum des Molekülions bei einer Stoßenergie von -20 eV und einem Argondruck von 2.0 mTorr generiert. Nach Konvertierung der Rohdaten mit Xcalibur™ (Version 1.2), wurde mit der Software Xcalibur™ (Version 1.2) ausgewertet.

3.3.3 Quantifizierung von Anthocyanen in Heidelbeeren

3.3.3.1 Erstellung von Kalibriergeraden

Von drei käuflich erworbenen Anthocyanen, Cy-3-*O*-glc **6**, Cy-3-*O*-gal **15** und Mv-3-*O*-glu **4**, wurden jeweils 1 mg auf 1 µg genau eingewogen und in einem 5 mL-Messkolben in 10%iger Ameisensäure gelöst. Aus diesen Lösungen wurden mit 10%iger Ameisensäure folgende Verdünnungen hergestellt: 1:1; 1:2; 1:3; 1:4; 1:5; 1:10; 1:20; 1:40 und 1:80. Diese Verdünnungen wurden für die Messung mittels HPLC-DAD (3.2.1, HPLC-System 7) mit der Standardlösung 1:1 verdünnt: 5.1 mg 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure (Standard) wurden daher in 5 mL Methanol gelöst und mit 0.1%iger Ameisensäure auf 100 mL aufgefüllt. Zusätzlich wurden die unverdünnten Lösungen der Anthocyane 1:1 mit dem Standard verdünnt. Daraus ergab sich ein Konzentrationsbereich für die Kalibrierung der Anthocyane von 0.67 µg/mL bis 66.8 µg/mL. Alle Verdünnungen wurden mit HPLC-DAD (HPLC-System 7) bei 520 nm (λ_{\max} Anthocyane) und bei 280 nm (λ_{\max} Standard) vermessen.

Die Kalibriergeraden wurden unter Verwendung der Konzentrationen der Anthocyane und dem Flächenverhältnis $\text{Area}_{(\text{Anthocyan})}/\text{Area}_{(\text{Standard})}$ erstellt.

Für die weiteren Kalibriergeraden wurden von jedem authentischen, aus Heidelbeeren isolierten Anthocyan 200 bis 300 µg genau eingewogen und mit 10%iger Ameisensäure im 5 mL-Messkolben aufgefüllt. Mit 10%iger Ameisensäure wurden folgende Verdünnungen hergestellt: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:20 und 1:30. Für die Messung wurden die Verdünnungen und die unverdünnten Lösungen der Anthocyane nochmals 1:1 mit der Standardlösung (3,4,5-Trimethoxyzimtsäure, 0.05 mg/mL) verdünnt. Daraus ergaben sich Konzentrationen für die einzelnen Anthocyane von 0.68 µg/mL bis 39.8 µg/mL. Alle Verdünnungen wurden mit HPLC-System 7 (3.2.1) bei 520 nm (λ_{\max} Anthocyane) und bei 280 nm (λ_{\max} Standard) vermessen.

Die Kalibriergeraden wurden wiederum unter Verwendung der Konzentrationen der Anthocyane und dem Verhältnis $\text{Area}_{(\text{Anthocyan})}/\text{Area}_{(\text{Standard})}$ erstellt.

Die Bestimmungsgrenze lag bei 0.35 µg/ml und die Nachweisgrenze bei einem Signal/Rausverhältnis von 3 : 1 bei 0.2 µg/ml.

3.3.3.2 Quantifizierung der Anthocyane in der Wildheidelbeere

Es wurden 2 kg Wildheidelbeeren mit einem Pürierstab zerkleinert. Davon wurden 5 x 300 g für die Probanden-Studie separiert. Die restlichen 500 g wurden für die Quantifizierung der Anthocyane mit einem Ultra Turrax[®] zerkleinert.

3.3.3.2.1 Extraktion

Die Extraktion der Anthocyane erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Felgines *et al.* (2002). Hierfür wurden zweimal 5 g homogenes Heidelbeerpüree aus 3.3.3.2 in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und 12 x mit je 5 mL 0.5 M HCl in Methanol extrahiert. Jede Extraktion beinhaltete vor der Zentrifugation eine 10-minütige Behandlung mit Ultraschall. Im Anschluss folgte die Zentrifugation für 6 Minuten bei 5000 rpm (Universal 16R 1614, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Die jeweiligen Überstände wurden vereinigt. Bei einer Temperatur von 35 °C wurde das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen und der Rückstand gefriergetrocknet. Den wasserfreien Rückstand löste man unter Ultraschall in 10%iger Ameisensäure in 500 µL-Schritten, überführte in einen 10 mL-Messkolben und füllte anschließend mit 10%iger Ameisensäure auf.

3.3.3.2.2 Quantifizierung der Anthocyane

Für die Quantifizierung der Anthocyane wurden 100 µL des Extraktes 1:1 mit 10%iger Ameisensäure verdünnt. 100 µL dieser Verdünnung wurden dann 1:1 mit der Standardlösung (3,4,5-Trimethoxyzimtsäure, 0.05 mg/mL in 5% Methanol) versetzt (Verdünnungsfaktor = 4).

Die Verdünnungen wurden mit dem HPLC-System 7 (3.2.1) bei den Wellenlängen 520 nm (λ_{\max} Anthocyane) und 280 nm (λ_{\max} Standard) dreifach vermessen. Zur Auswertung wurde für jede Substanz, die quantifiziert wurde, aus $Area_{(\text{Anthocyan})}$ und $Area_{(\text{Standard})}$ der Quotient gebildet. Anschließend berechnete man die Konzentrationen der einzelnen Anthocyane in mg/mL über die Kalibriergeraden.

3.3.3.3 Quantifizierung der Anthocyane in der Zuchtheidelbeere

Die Extraktion der Anthocyane aus Zuchtheidelbeeren erfolgte analog der Anthocyane in Wildheidelbeeren.

Zur Quantifizierung wurde dreimal eine 1:1 Verdünnung mit Standard (Verdünnungsfaktor = 2) am HPLC-System 7 (3.2.1) bei 520 nm (λ_{\max} Anthocyane) und bei 280 nm (λ_{\max} Standard) vermessen. Die Auswertung fand analog der Quantifizierung der Anthocyane aus der Wildheidelbeere statt.

3.3.4 Intestinale Verfügbarkeit von Anthocyanen

3.3.4.1 Probanden

An der Studie nahmen fünf weibliche Probanden teil. Das Alter der Testpersonen lag zwischen 23 und 47 Jahren. Das Durchschnittsalter der Personen betrug somit 35 Jahre. Alle Probanden besaßen ein endständiges Ileostoma. Das Ileostoma musste bei vier Probanden auf Grund einer Erkrankung des Darmes durch Morbus Crohn und bei einer Probandin durch familiäre adenomatöse Polyposie gelegt werden.

3.3.4.2 Studiendesign

Die Probanden hielten 24 h vor Beginn der Studie eine polyphenol- und anthocyanfreie Diät ein. Nach einer nächtlichen Fastenperiode von zehn Stunden verzehrten sie 300 g zerkleinerte Wildheidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.) mit 100 g Weihenstephaner[®] Magermilchjogurt (0.1 % Fett) innerhalb von 15 Minuten. Vier Stunden später erhielten sie eine leichte polyphenolfreie Mahlzeit.

3.3.4.3 Probennahme

Die Ileostomabeutel wurden kurz vor Beginn der Studie und 0,5, 1, 2, 4, 5, 6, 8 Stunden nach Verzehr der Heidelbeeren ausgewechselt. Die Ileostomabeutel wurden sofort bei -24 °C tiefgefroren, gewogen und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde ausgewogen und bis zur Aufarbeitung bei -24 °C gelagert (Tabelle 2-5).

3.3.4.4 Wiederfindung der Anthocyane im Ileostomabeutel nach Proben- vorbereitung

Vor Quantifizierung der Beutelinhalte, wurde die Wiederfindung nach Probenvorbereitung bestimmt. Hierfür wurde anthocyanfreier Ileostomabeutelinhalt, der kurz zuvor von einer Probandin nach einer 24-stündigen polyphenolfreien Ernährung abgenommen wurde, mit einer definierten Menge Heidelbeeranthocyane versetzt ($n = 3$, 2 g Ileostomabeutelinhalt wurden mit 400 μL 10%iger Ameisensäure angesäuert und mit 1 mL Heidelbeerextrakt (52 mg/5 mL in 10%iger Ameisensäure) versetzt). Die Proben wurden homogenisiert, mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Proben wurden zehnmal mit je 2 mL 0,5 M Salzsäure in Methanol extrahiert. Dabei wurden sie für 10 Minuten mit Ultraschall behandelt und anschließend 6 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert (modifiziert nach Felgines *et al.*, 2002). Der Überstand wurde in Spitzkolben überführt, das Lösungsmittel bei einer Temperatur von 35 °C im Vakuum entfernt und der Rückstand anschließend gefriergetrocknet. Die Proben wurden mit 10%iger Ameisensäure in 200 μL -Schritten in einen 5 mL-Messkolben überführt und anschließend mit 10%iger Ameisensäure auf 5 mL definiert aufgefüllt. Zur besseren Löslichkeit des Rückstandes wurden in mehreren Schritten insgesamt 8% Methanol ($\hat{=}$ 400 μL) zugegeben, durch Ultraschall in Lösung gebracht und in den Messkolben überführt. Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC-DAD (3.2.1, HPLC-System 7). Es wurde dreimal eine 1:1-Verdünnung mit einer Standardlösung (3,4,5-Trimethoxyzimtsäure, 0,05 mg/mL in 5% Methanol) hergestellt. Je 20 μL Probe wurde bei 520 nm (λ_{max} Anthocyane) und bei 280 nm (λ_{max} Standard) vermessen. Für die Auswertung ermittelte man für jede Substanz das Verhältnis $\text{Area}_{(\text{Anthocyan Ileosto-}}$

mabeutelinhalt)/Area (Standard). Parallel wurde ein ‚Blindwert‘ bestehend aus 2 g frischem Ileostomabeutelinhalt wie zuvor beschrieben behandelt und per HPLC-DAD vermessen.

Um zu ermitteln, welche Anthocyanmengen wieder gefunden werden, wurde 1 mL oben verwendete Anthocyanstammlösung mit 10%iger Ameisensäure und Methanol (Endkonzentration 8%) auf 5 mL aufgefüllt. Die Quantifizierung wurde analog durchgeführt. Der erhaltene Wert entspricht der 100%igen Wiederfindung für dieses Anthocyan. Die Wiederfindungen wurden dann in Bezug darauf berechnet.

3.3.4.5 Quantifizierung der Anthocyane im Ileostomabeutelinhalt

3.3.4.5.1 Extraktion

Die Extraktion des Ileostomabeutelinhalts erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Felgines *et al.* (2002). Die gefriergetrockneten Proben wurden mit Mörser und Pistill homogenisiert bzw. zerkleinert. Ein Aliquot von 200 mg wurde in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen und die Probe im Anschluss 10-mal mit je 2 mL HCl (0.5 M in Methanol) extrahiert. Jeder Extraktionsschritt beinhaltete Schütteln und 10-minütiges Behandeln mit Ultraschall. Anschließend wurde für sechs Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in einem Spitzkolben vereinigt, das Lösungsmittel bei einer Temperatur von 35 °C im Vakuum entfernt und am Ende gefriergetrocknet. Die lyophilisierten Proben wurden mit 10%iger Ameisensäure in 200 µL-Schritten in einen 5 mL-Messkolben überführt und anschließend mit 10%iger Ameisensäure aufgefüllt. Zum Lösen des Rückstands wurden in mehreren Schritten insgesamt 8% Methanol (400 µL) zugegeben. Der Rückstand wurde unter Einwirkung von Ultraschall in Lösung gebracht und auch in den Messkolben überführt.

3.3.4.5.2 Quantifizierung

Proben, die eine zu große Menge an Anthocyanen beinhalteten, wurden 1:1 mit 10%iger Ameisensäure verdünnt; alle anderen Proben wurden direkt vermessen. Zur Quantifizierung wurden 100 µL jeder Probe bzw. ihrer Verdünnung mit 100 µL Standardlösung

(3,4,5-Trimethoxyzimtsäure in 5% Methanol, 0.05 mg/mL) versetzt und mit dem HPLC-System 7 (3.2.1.) bei 520 nm (λ_{\max} Anthocyane) und bei 280 nm (λ_{\max} Standard) vermessen. Die Quantifizierung wurde für jede Probe dreifach durchgeführt. Für die Auswertung wurde für jeden Peak das Verhältnis $\text{Area}_{(\text{Anthocyan Ileostomabeutelinhalt})} / \text{Area}_{(\text{Standard})}$ ermittelt und an Hand der Kalibriergeraden und den Verdünnungsfaktoren die Konzentrationen berechnet.

3.3.5 Stabilität von Anthocyanen im Dünndarmlauf

3.3.5.1 Inkubation

Die Inkubation wurde mit 13, aus Heidelbeeren isolierten, Anthocyanen durchgeführt. Hierfür wurde jeweils 1 mg der entsprechenden Verbindung genau eingewogen und mit 370 μL Dimethylsulfoxid eine Stammlösung hergestellt. Davon wurden je 50 μL entnommen und in Inkubationsröhrchen gegeben. Insgesamt wurden von jedem Anthocyan sieben Inkubationsröhrchen befüllt. Der enthaltene Sauerstoff wurde mittels Argon verdrängt.

Beim verwendeten Puffer handelte es sich um einen Carbonat-Phosphat-Puffer mit pH 7.4 nach Lebet *et al.*, 1998. Die Zusammensetzung des Puffers wird in Tabelle 3-1 angegeben. Es wurde eine Spurenelementlösung hergestellt und davon 10 mL in die Pufferlösung gegeben. Der Puffer wurde im Anschluss für 30 min auf 80 °C erwärmt und anschließend unter einem Stickstoffstrom abgekühlt. Die Zugabe von 0.5 g Cysteinhydrochlorid in 5 mL Wasser unter weiterem Begasen mit Stickstoff bewirkte das Umschlagen des Indikators Resazurin von blau nach schwach rosa bis farblos (Lebet *et al.*, 1998).

Der frische, luftdicht verschlossene Dünndarminhalt wurde aus dem Ileostomabeutel in einer sog. ‚Anaerobenkammer‘ unter einer Stickstoff-Kohlendioxid-Atmosphäre (80:20 (v/v)) mit der gleichen Menge Puffer angeschlämmt. Im Anschluss wurde die Lösung über Glaswolle filtriert. Man erhielt das sog. ‚Inokulum‘. In sechs Inkubationsröhrchen wurden je 3 mL des Inokulums gegeben, fest verschlossen und homogenisiert. Parallel dazu wurde je eine Probe jedes Anthocyan mit 3 mL Puffer versetzt; zusätzlich auch 50 μL Dimethylsulfoxid mit 3 mL Puffer als Blindprobe. Die Inkubation erfolgte bei

allen Anthocyanen für 0, 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden im Trockenschrank bei 37 °C. Die Inkubationsröhrchen, die ausschließlich Puffer und Anthocyanlösung ohne Dünndarminhalt enthielten, wurden für je acht Stunden inkubiert. Nach der entsprechenden Zeit wurde durch Gefrieren mit flüssigem Stickstoff der Anthocyan-Abbau gestoppt und die Proben bei -24 °C bis zur Extraktion aufbewahrt. Parallel zur Inkubation wurde mit dem Dünndarminhalt die Enzymaktivität mittels **apiZym**[®]-Test durchgeführt.

Tabelle 3-1: Zusammensetzung des Puffers (pH 7.4) in Anlehnung an Lebet *et al.*, 1998

Spurenelement-Lösung		Pufferlösung	
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	3680 mg/L	NaHCO ₃	9.240 g/L
MnSO ₄ x H ₂ O	1159 mg/L	Na ₂ PO ₄ x 12 H ₂ O	7.125 g/L
ZnSO ₄ x H ₂ O	440 mg/L	NaCl	0.470 g/L
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	120 mg/L	KCl	0.450 g/L
NiCl ₂	100 mg/L	Harnstoff	0.400 g/L
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	98 mg/L	CaCl ₂ x 6 H ₂ O	0.108 g/L
Mo ₇ (NH ₄) ₆ O ₂₄ x H ₂ O	17 mg/L	Na ₂ SO ₄ (wasserfrei)	0.100 g/L
		MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0.100 g/L
		Spurenelementlösung	10 mL/L
		Resazurin (1 mg/mL)	1 mL/L

3.3.5.2 Extraktion

Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und gefriergetrocknet. Der trockene Rückstand wurde 3-mal mit jeweils genau 1 mL 0.5 M HCl in Methanol extrahiert. Die jeweiligen Extrakte wurden nach dem Zentrifugieren vereinigt. Im Anschluss wurde im Stickstoffstrom das Methanol entfernt und der Rückstand mit 3 mL 10%iger Ameisensäure in Wasser unter Ultraschall gelöst. Der Überstand wurde direkt zur Quantifizierung herangezogen.

3.3.5.3 Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte mit HPLC-System 7 (3.2.1). Dazu wurde der Überstand 1:1 mit der Standardlösung (0.05 mg/mL 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure in 5% Methanol) verdünnt. Von dieser Lösung wurden je 20 μL in das HPLC-DAD-System injiziert. Die Auswertung erfolgte, indem man das Verhältnis von Fläche_(Anthocyan) zu Fläche_(Standard) bildete. Der ermittelte Quotient beim Zeitpunkt 0 h wurde bei allen verwendeten Anthocyanen gleich 100% gesetzt. Darauf bezogen, wurden die prozentualen Werte von 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden berechnet.

3.3.6 Enzymaktivität des Ileostomabeutelinhaltes

3.3.6.1 Probennahme

Die Entnahme der Proben für die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte in einer ‚Anaerobenkammer‘ unter einer Atmosphäre aus Stickstoff und Kohlendioxid (80/20, v/v).

3.3.6.2 Durchführung des apiZym[®]-Tests

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten des Ileostomabeutelinhaltes erfolgte mittels apiZym[®]-Tests der Fa. BioMerieux (Nürtingen, Deutschland). Die entnommene Probe wurde 1:1 mit sterilem Wasser verdünnt und zentrifugiert. In jede Lasche des vorbereiteten Teststreifens wurden 65 μL Überstand pipettiert. Parallel dazu wurde ein Teststreifen nur mit sterilem Wasser versehen. Die Teststreifen wurden für vier Stunden bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach Zugabe der Lösungen ZymA und ZymB wurden die Teststreifen für 10 min unter einer starken Lichtquelle bestrahlt und anschließend gemäß Anleitung ausgewertet.

3.3.7 Stabilität von Anthocyanidinen bei pH 7.4

3.3.7.1 Inkubation bei pH 7.4

Zur Überprüfung der Stabilität der Aglycone standen die Anthocyanidine Cy-Chlorid **5**, Dp-Chlorid **1**, Mv-Chlorid **10** und Pn-Chlorid **8** zur Verfügung. 2.5 mg des jeweiligen Anthocyanidins wurden in ein luftdicht verschließbares 5 mL Inkubationsröhrchen eingewogen. Dieses wurde anschließend in eine mit Stickstoff und Kohlendioxid geflutete Anaerobenkammer (80:20 (v/v)) eingebracht, die während des Versuchs weiter beflutet wurde. Die Proben wurden in je 20 µL DMSO gelöst und mit 4.98 mL eines mit HCl auf pH 7.4 eingestellten 0.1 M Phosphatpuffers (Na₂HPO₄) versetzt. Dieser wurde für 30 Minuten in Argonatmosphäre unter Rückfluss gekocht, um den Sauerstoffgehalt auf unter 1 ppm zu bringen. Der Sauerstoffgehalt wurde mit einer Sauerstoffelektrode überprüft, indem ca. 3 mL des Puffers in die Messzelle der Sauerstoffelektrode eingebracht wurden.

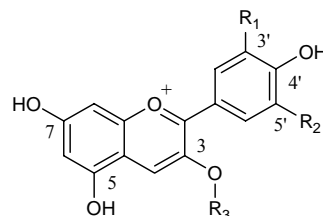
In der Anaerobenkammer wurden die so vorbereiteten Proben homogenisiert und im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 und 12 Stunden wurden nach erneutem Homogenisieren jeweils 490 µL der Probe entnommen, zu 10 µL konzentrierter Salzsäure zugegeben, vermischt und sofort auf Trockeneis eingefroren, um die Reaktion abzubrechen. Als ‚Blindwert‘ wurde ein Röhrchen mit 4% DMSO in oben genanntem Puffer für 12 Stunden inkubiert.

3.3.7.2 Quantifizierung

Die tiefgefrorenen Proben aus Kapitel 3.3.7.1 wurden aufgetaut, 95 µL Probe entnommen, mit der gleichen Menge Standardlösung (3,4,5-Trimethoxyzimtsäure, 0.05 mg/mL in Methanol) und 10 µL DMSO versetzt und mittels HPLC-DAD (HPLC-System 8) vermessen. Die Auswertung erfolgte, wie unter 3.3.5.3 beschrieben

Strukturmatrix

Anthocyane	Nr.	
Cy-Chlorid	5	$R_1=OH; R_2=H; R_3=H$
Cy-3-O-ara	14	$R_1=OH; R_2=H; R_3=Arabinose$
Cy-3-O-gal	15	$R_1=OH; R_2=H; R_3=Galactose$
Cy-3-O-glc	6	$R_1=OH; R_2=H; R_3=Glucose$
Dp-Chlorid	1	$R_1=OH; R_2=OH; R_3=H$
Dp-3-O-ara	12	$R_1=OH; R_2=OH; R_3=Arabinose$
Dp-3-O-gal	13	$R_1=OH; R_2=OH; R_3=Galactose$
Dp-3-O-glc	2	$R_1=OH; R_2=OH; R_3=Glucose$
Mv-Chlorid	10	$R_1=OH; R_2=H; R_3=H$
Mv-3-O-ara	42	$R_1=OCH_3; R_2=OCH_3; R_3=Arabinose$
Mv-3-O-gal	44	$R_1=OCH_3; R_2=OCH_3; R_3=Galactose$
Mv-3-O-glc	4	$R_1=OCH_3; R_2=OCH_3; R_3=Glucose$
Pg-Chlorid	9	$R_1=H; R_2=H; R_3=H$
Pn-Chlorid	8	$R_1=OCH_3; R_2=H; R_3=H$
Pn-3-O-gal	41	$R_1=OCH_3; R_2=H; R_3=Galactose$
Pn-3-O-glc	7	$R_1=OCH_3; R_2=H; R_3=Glucose$
Pt-Chlorid	11	$R_1=OCH_3; R_2=OH; R_3=H$
Pt-3-O-ara	40	$R_1=OCH_3; R_2=OH; R_3=Arabinose$
Pt-3-O-gal	43	$R_1=OCH_3; R_2=OH; R_3=Galactose$
Pt-3-O-glc	3	$R_1=OCH_3; R_2=OH; R_3=Glucose$

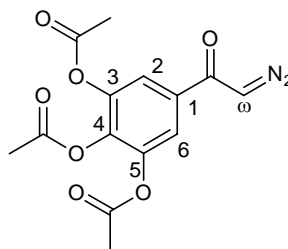


Synthesen	Nr.	
ω -Acetoxy-4-hydroxy-acetophenon	24	
ω -Acetoxy-4-hydroxy-3-methoxyacetophenon	29	

Synthesen

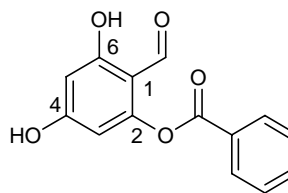
ω -Azo-3,4,5-triacet-
oxyacetophenon

33



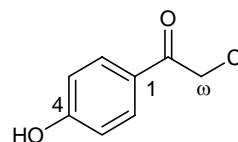
2-Benzoylphloro-
glucinaldehyd

16



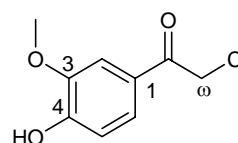
ω -Chor-4-hydroxy-
acetophenon

23



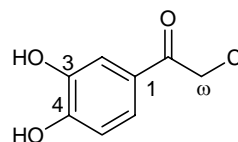
ω -Chor-4-hydroxy-3-
methoxyacetophenon

28



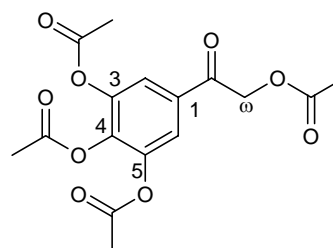
ω -Chor-3,4-dihydroxy-
acetophenon

26



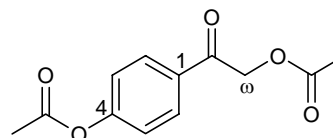
ω -Chor-3,4,5-triacet-
oxyacetophenon

20



ω ,4-Diacetoxy-
acetophenon

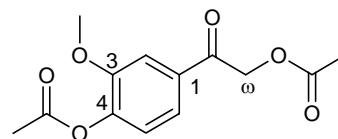
17



Synthesen

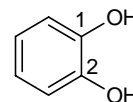
ω ,4-Diacetoxy-3-methoxyacetophenon

19



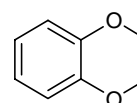
1,2-Dihydroxybenzol
(Catechol)

25



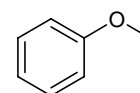
1,2-Dimethoxybenzol

27



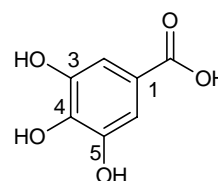
Methoxybenzol

22



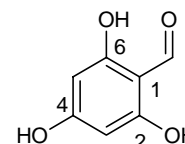
3,4,5-Trihydroxybenzoesäure

30



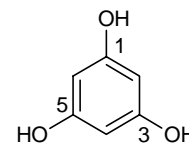
2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd

21



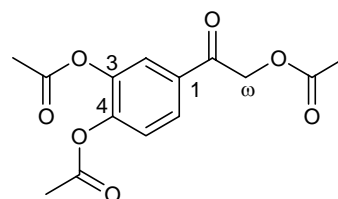
1,3,5-Trihydroxybenzol

37



ω ,3,4-Triacetoxyacetophenon

18



Synthesen

3,4,5-Triacetoxychloracetophenon	34	
3,4,5-Triacetoxybenzoesäure	31	
3,4,5-Triacetoxybenzoesäurechlorid	32	

Radionucleidsynthesen

[Formyl- ¹⁴ C]-2-Benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyd	39		
[Formyl- ¹⁴ C]-2,4,6-trihydroxybenzaldehyd	38		
[4- ¹⁴ C]-Delphinidin [4- ¹⁴ C]-Pelargonidin	36 35	R ₁ =OH; R ₂ =OH R ₁ =H; R ₂ =H	

Literaturverzeichnis

- Abuja PM; Murkovic M; Pfannhauser W, Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density lipoprotein oxidation; *J Agric Food Chem* 1998; **46**: 4091-4096.
- Acquaviva R; Russo A; Galvano F; Galvano G; Barcellona ML; Li Volti G; Vanella A, Cyanidin and cyanidin 3-O-beta-D-glucoside as DNA cleavage protectors and antioxidants; *Cell Biol Toxicol* 2003; **19**: 243-252.
- Adlercreutz H; Honjo H; Higashi A; Fotsis T; Hamalainen E; Hasegawa T; Okada H, Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet; *Am J Clin Nutr* 1991; **54**: 1093-1100.
- Adlercreutz H; Mazur W, Phytoestrogens and Western diseases; *Ann Med* 1997; **29**: 95-120.
- Allewelt AL; Day AR, Preparation of some amino ketones and amino alcohols containing the ac-tetrahydro- β -naphthylamine, tetrahydroisoquinoline, or β -phenylethylamine nucleus; *J Org Chem* 1941; **6**: 384-400.
- Amorini AM; Fazzina G; Lazzarino G; Tavazzi B; Di Pierro D; Santucci R; Sinibaldi F; Galvano F; Galvano G, Activity and mechanism of the antioxidant properties of cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside; *Free Radic Res* 2001; **35**: 953-966.
- Andlauer W; Fürst P, Absorption and metabolism of phenolic phytochemicals in the isolated rat small intestine with spectral reference to isoflavones and anthocyanins - a review; *Pol J Food Nutr Sci* 2003; **12/53**: 117-127.
- Andlauer W; Stumpf C; Frank K; Fuerst P, Absorption and metabolism of anthocyanin cyanidin-3-glucoside in the isolated rat small intestine is not influenced by ethanol; *Eur J Nutr* 2003; **42**: 217-223.
- Asen S; Stewart RN; Norris KH, Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color; *Phytochemistry* 1972; **11**: 1139-1144.
- Aura A-M, In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora; *Eur J Nutr* 2004, 133-142.
- Aurell MJ; Danhui Y; Einhorn C; Luche JL, A direct access to ketones from lithium carboxylates via the sonochemical Barbier reaction; *Synlett* 1995; 459-460.

- Avorn J; Monane M; Gurwitz JH; Glynn RJ; Choodnovskiy I; Lipsitz LA, Reduction of bacteriuria and pyuria after ingestion of cranberry juice; *JAMA* 1994; **271**: 751-754.
- Beecher GR, Overview of dietary favonoids: nomenclature, occurrence and intake; *J Nutr* 2003; **133**: 3248-3254.
- Belitz HD; Grosch W, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie.*, 5. Auflage. Springer-Verlag, Heidelberg, 2001.
- Bennett MR, Reactive oxygen species and death: oxidative DNA damage in atherosclerosis; *Circ Res* 2001; **88**: 648-650.
- Benzie IFF; Strain JJ, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay; *Anal Biochem* 1996; **239**: 70-76.
- Bertelli A; Bertelli AAE; Gozzini A; Giovannini L, Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity; *Drugs Exp Clin Res* 1998; **24**: 133-138.
- Bhat KP; Pezzuto JM, Cancer chemopreventive activity of resveratrol; *Ann N Y Acad Sci* 2002; **957**: 210-229.
- Blaschek W; Ebel S; Hackenthal E; Holzgrabe U; Keller K; Reichling J; Schulz V, *Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe*, Springer Verlag Heidelberg, 2005.
- Bloor SJ; Falshaw R, Covalently linked anthocyanin-flavonol pigments from blue Agapanthus flowers; *Phytochemistry* 2000; **53**: 575-579.
- Bradley W; Robinson R; Schwarzenbach G, Synthesis of pyrylium salts of anthocyanidin type. XIX. Synthesis of delphinidin chloride not involving a demethylation process and synthesis of hirsutidin chloride and of delphinidin chloride 3'-methyl ether, possibly identical with petunidin chloride; *J Chem Soc, Abstracts* 1930; 793-817.
- Bridle P; Timberlake CF, Anthocyanins as natural food colours-selected aspects; *Food Chemistry* 1997; **58**: 103-109.
- Brouillard R; Delaporte B, Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside; *J Am Chem Soc* 1977; **99**: 8461-8468.
- Bub A; Watzl B; Heeb D; Rechkemmer G; Briviba K, Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice; *Eur J Nutr* 2001; **40**: 113-120.
- Buschmann P. Stand der Flavonoidforschung zu Beginn des 21. Jahrhunderts. Dissertation, Universität Graz, Graz, 2002.

- Caccetta RA-A; Croft KD; Beilin LJ; Puddey IB, Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability; *Am J Clin Nutr* 2000; **71**: 67-74.
- Cao G; Alessio HM; Cutler RG, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants; *Free Radic Biol Med* 1993; **14**: 303-311.
- Cao G; Prior RL, Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract; *Clin Chem* 1999a; **45**: 574-576.
- Cao G; Prior RL, Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples; *Methods Enzymol* 1999b; **299**: 50-62.
- Cassidy A; Hanley B; Lamuela-Raventos RM, Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health; *J Sci Food Agric* 2000; **80**: 1044-1062.
- Charlesworth EH; Robinson R, Synthesis of pyrylium salts of anthocyanidin type. XXI. The 6-hydroxy derivatives of the chief anthocyanidins; *J Chem Soc, Abstracts* 1934; 1619-1624.
- Clifford MN, Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden; *J Sci Food Agric* 1999; **79**: 362-372.
- Clifford MN, Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden; *J Sci Food Agric* 2000; **80**: 1063-1072.
- Colantuoni A; Bertuglia S; Magistretti MJ; Donato L, Effects of *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides on arterial vasomotion; *Arzneim-Forsch* 1991; **41**: 905-909.
- Cooney JM; Jensen DJ; McGhie TK, LC-MS identification of anthocyanins in boysenberry extract and anthocyanin metabolites in human urine following dosing; *J Sci Food Agric* 2004; **84**: 237-245.
- Cooper-Driver GA, Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins; *Phytochemistry* 2001; **56**: 229-236.
- Coward L; Barnes NC; Setchell KDR; Barnes S, Genistein, daidzein, and their *beta*-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from american and asian diets; *J Agric Food Chem* 1993; **41**: 1961-1967.
- Cren-Ollive C; Depréz S; Lebrun S; Ceddeville B; Rolando C, Characterization of methylation site of monomethylflavan-3-ols by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry; *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000; **14**: 2312-2319.
- Criqui MH; Ringel BL, Does diet or alcohol explain the french paradox? *The Lancet* 1994; **344**: 1719-1723.

- Dangles O; Saito N; Brouillard R, Anthocyanin intramolecular copigment effect; *Phytochemistry* 1993; **34**: 119-124.
- Day AJ; Canada FJ; Diaz JC; Kroon PA; McLauchlan R; Faulds CB; Plumb GW; Morgan MRA; Williamson G, Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase; *FEBS Letters* 2000; **468**: 166-170.
- Day AJ; DuPont MS; Ridley S; Rhodes M; Rhodes MJC; Morgan MRA; Williamson G, Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity; *FEBS Letters* 1998; **436**: 71-75.
- De la Lastra CA; Villegas I, Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications; *Mol Nutr Food Res* 2005; **49**: 405-430.
- Delmas D; Jannin B; Latruffe N, Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing; *Mol Nutr Food Res* 2005; **49**: 377-395.
- Deprez S; Brezillon C; Rabot S; Philippe C; Mila I; Lapiere C; Scalbert A, Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-Molecular-weight phenolic acids; *J Nutr* 2000; **130**: 2733-2738.
- Dimitrić Marković JM; Baranac JM; Brdarić TP, Electronic and infrared vibrational analysis of cyanidin–quercetin copigment complex; *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2005; **62**: 673-680.
- Dragsted LO; Knuthsen P; Nielsen SE; Strube M; Justesen U In: *Polyphenols in Danish foods and their possible health effects*, Proceedings of the Symposium on polyphenols and anthocyanins as food colorants and antioxidants, 1996; Pfannhauser, W, Ed. 35-44.
- Dugo P; Mondello L; Errante G; Zappia G; Dugo G, Identification of anthocyanins in berries by narrow-bore high-performance liquid chromatography with electrospray ionization detection; *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 3987-3992.
- Eiro MJ; Heinonen M, Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation; *J Agric Food Chem* 2002; **50**: 7461-7466.
- Faria A; Oliveira J; Neves P; Gameiro P; Santos-Buelga C; deFreitas V; Mateus N, Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts; *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 6896-6902.
- Felgines C; Talavera S; Gonthier M-P; Texier O; Scalbert A; Lamaison J-L; Remesy C, Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans; *J Nutr* 2003; **133**: 1296-1301.

- Felgines C; Talavera S; Texier O; Gil-Izquierdo A; Lamaison JL; Remesy C, Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans; *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 7721-7727.
- Felgines C; Texier O; Besson C; Fraisse D; Lamaison J-L; Remesy C, Blackberry anthocyanins are slightly bioavailable in rats; *J Nutr* 2002; **132**: 1249-1253.
- Figueiredo P; Elhabiri M; Toki K; Saito N; Dangles O; Brouillard R, New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry* 1996; **41**: 301-308.
- Fimognari C; Berti F; Nusse M; Cantelli-Forti G; Hrelia P, Induction of apoptosis in two human leukemia cell lines as well as differentiation in human promyelocytic cells by cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside; *Biochem Pharmacol* 2004; **67**: 2047-2056.
- Fleschhut J. Untersuchungen zum Metabolismus, zur Bioverfügbarkeit und zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen. Dissertation, Universität Karlsruhe, Karlsruhe, 2004.
- Fossen T; Rayyan S; Andersen OM, Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols; *Phytochemistry* 2004; **65**: 1421-1428.
- Fossen T; Slimestad R; Andersen OM, Anthocyanins with 4'-glucosidation from red onion, *Allium cepa*; *Phytochemistry* 2003; **64**: 1367-1374.
- Fossen T; Slimestad R; Ovstedal DO; Andersen OM, Covalent anthocyanin-flavonol complexes from flowers of chive, *Allium schoenoprasum*; *Phytochemistry* 2000; **54**: 317-323.
- Franke W, *Nutzpflanzenkunde*, 6. Auflage. Thieme Verlag Stuttgart - New York 1997.
- Freudenberg K; Hubner HH, Hydroxycinnamyl alcohols and their dehydrogenation polymers; *Chem Ber* 1952; **85**: 1181-1191.
- Gabetta B; Giorgi R, Preparation of delphinidin chloride. In (IdB Holding S.p.A., Italy). European Patent Application, 1990; p 13 pp.
- Gardner HW, Lipid hydroperoxide reactivity with protein and amino acids: a review; *J Agric Food Chem* 1979; **27**: 220-229.
- Gasiorowski K; Brokos B; Tabaka H, Evaluation of the immunomodulatory activity of four compounds exerting antimutagenic effects on human lymphocytes in vitro; *Cell Mol Biol Let* 2000; **5**: 469-481.

- Gee JM; DuPont MS; Day AJ; Plumb GW; Williamson G; Johnson IT, Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway; *J Nutr* 2000; **130**: 2765-2771.
- Ghosh D; McGhie TK; Zhang J; Adaim A; Skinner M, Effects of anthocyanins and other phenolics of boysenberry and blackcurrant as inhibitors of oxidative stress and damage to cellular DNA in SH-SY5Y and HL-60 cells; *J Sci Food Agric* 2006; **86**: 678-686.
- Giusti MM; Rodriguez-Saona LE; Wrolstad RE, Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins; *J Agric Food Chem* 1999; **47**: 4631-4637.
- Goiffon J-P; Mouly PP; Gaydou EM, Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography; *Anal Chim Acta* 1999; **382**: 39-50.
- Goldberg DM; Hahn SE; Parkes JG, Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality; *Clin Chim Acta* 1995; **237**: 155-187.
- Gonthier M-P; Cheynier V; Donovan JL; Manach C; Morand C; Mila I; Lapierre C; Remesy C; Scalbert A, Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols; *J Nutr* 2003; **133**: 461-467.
- Goto T; Tamura H; Kawai T; Hoshino T; Haranda N; Kondo T, Chemistry of metallo-anthocyanins; *Ann N Y Acad Sci* 1986; **471**: 155-172.
- Guyot S; Marnet N; Laraba D; Sanoner P; Drilleau JF, Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a french cider apple variety (*malus domestica* var. kermerrien); *J Agric Food Chem* 1998; **46**: 1698-1705.
- Habermeyer M. Wirkmechanistische Untersuchungen zur Beeinflussung humaner Topoisomerasen durch Anthocyanidine, sowie Einfluss der Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) auf die Wirkung von Topoisomerasegiften. Dissertation, Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, 2005.
- Han C; Ding H; Casto B; Stoner GD; D'Ambrosio SM, Inhibition of the growth of pre-malignant and malignant human oral cell lines by extracts and components of black raspberries; *Nutr Cancer* 2005; **51**: 207-217.
- Harborne JB, *The flavonoids: recent advances*. Academic Press: London, 1988; p 299-343.
- Harborne JB; Williams CA, Anthocyanidins and other flavonoids; *Nat Prod Rep* 2001; **18**: 310-333.

- Harris GK; Gupta A; Nines RG; Kresty LA; Habib SG; Frankel WL; LaPerle K; Galaher DD; Schwartz SJ; Stoner GD, Effects of lyophilized black raspberries on azoxymethane-induced colon cancer and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in the fischer 344 rat; *Nutr Cancer* 2001; **40**: 125-133.
- He J; Magnuson BA; Giusti MM, Analysis of anthocyanins in rat intestinal contents-impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion; *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 2859-2866.
- Heinonen IM; Meyer AS; Frankel EN, Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation; *J Agric Food Chem* 1998; **46**: 4107-4112.
- Heinonen M In: *Anthocyanin as dietary antioxidants*, Third international conference on natural antioxidants and anticarcinogenes in food, health and disease (NAHD), Helsinki, Finland, June 6-9, 2001; Voutilainen, S; Salonen, JT, eds. Helsinki: Kuopion Yliopisto, Finland.
- Herpfer IS. Einfluß von Pteridinen auf redox-sensitive biochemische Vorgänge. Dissertation, Universität Innsbruck, Innsbruck, 1998.
- Herrmann K, Flavonols and flavones in food plants: a review; *J Food Technol* 1976; **11**: 433-448.
- Hertog MG; Kromhout D; Aravanis C; Blackburn H; Buzina R; Fidanza F; Giampaoli S; Jansen A; Menotti A; Nedeljkovic S, Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study; *Arch Intern Med* 1995; **155**: 381-386.
- Hertog MGL; Hollman PCH; Katan MB; Kromhout D, Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands; *Nutr Cancer* 1993; **20**: 21-29.
- Hollman PC; Bijsman MN; van Gameren Y; Cnossen EP; de Vries JH; Katan MB, The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man; *Free Radic Res* 1999; **31**: 569-573.
- Hollman PC; de Vries JH; van Leeuwen SD; Mengelers MJ; Katan MB, Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers; *Am J Clin Nutr* 1995; **62**: 1276-1282.
- Horwitt M, Observations on behavior of the anthocyanin pigment from Concord grapes in the animal body; *Proc Soc Exp Biol Med* 1933; **30**: 949-951.
- Howell AB, Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health; *Crit Rev Food Sci Nutr* 2002; **42**: 273-278.

- Ichihyanagi T; Hatano Y; Matsuo S; Konishi T, Simultaneous comparison of relative reactivities of twelve major anthocyanins in bilberry towards reactive nitrogen species; *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2004a; **52**: 1312-1315.
- Ichihyanagi T; Rahman MM; Kashiwada Y; Ikeshiro Y; Shida Y; Hatano Y; Matsumoto H; Hirayama M; Tsuda T; Konishi T, Absorption and metabolism of delphinidin 3-O-beta-glucopyranoside in rats; *Free Radic Biol Med* 2004b; **36**: 930-937.
- Iijima K; Yoshizumi M; Hashimoto M; Kim S; Eto M; Ako J; Liang Y-Q; Sudoh N; Hosoda K; Nakahara K; Toba K; Ouchi Y, Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene; *Circulation* 2000; **101**: 805-811.
- Jaakola L; Määttä K; Pirtillä AM; Törrönen R; Kärenlampi S; Hohtola A, Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development; *Plant Physiol* 2002; **130**: 729-739.
- Jeppsson N, The effects of fertilizer rate on vegetative growth, yield and fruit quality, with special respect to pigments, in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) cv. 'Viking'; *Scientia Horticulturae* 2000; **83**: 127-137.
- Johnson TB; Gatewood E, Synthesis of 4-(3,4-dihydroxyphenyl)thiazoles; *J Am Chem Soc* 1929; **51**: 1815-1819.
- Joseph JA; Denisova NA; Bielinski D; Fisher DR; Shukitt-Hale B, Oxidative stress protection and vulnerability in aging: putative nutritional implications for intervention; *Mech Ageing Dev* 2000; **116**: 141-153.
- Jurd L, Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments; *Adv Food Res Suppl* 1972; 123-142.
- Justesen U; Knuthsen P; Leth T, Determination of plant polyphenols in danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection; *Cancer Lett (Shannon, Irel)* 1997; **114**: 165-167.
- Kaehkoenen MP; Heinaemaeki J; Ollilainen V; Heinonen M, Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities; *J Sci Food Agric* 2003; **83**: 1403-1411.
- Kaehkoenen MP; Hopia AI; Heinonen M, Berry phenolics and their antioxidant activity; *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 4076-4082.
- Kahle K; Kraus M; Scheppach W; Richling E, Colonic availability of apple polyphenols - a study in ileostomy subjects; *Mol Nutr Food Res* 2005; **49**: 1143-1150.

- Kalt W; Ryan DAJ; Duy JC; Prior RL; Ehlenfeldt MK; Vander Kloet SP, Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* Section *cyanococcus* spp.); *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 4761-4767.
- Kamei H; Kojima T; Hasegawa M; Koide T; Umeda T; Yukawa T; Terabe K, Suppression of tumor cell growth by anthocyanins *in vitro*; *Cancer Invest* 1995; **13**: 590-594.
- Kang SY; Seeram NP; Nair MG; Bourquin LD, Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells.; *Cancer Lett* 2003; **194**: 13-19.
- Katsube N; Iwashita K; Tsushida T; Yamaki K; Kobori M, Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins; *J Agric Food Chem* 2003; **51**: 68-75.
- Kavvadias D; Sand P; Youdim KA; Qaiser MZ; 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; *Br J Pharmacol* 2004; **142**: 811-820.
- Kay CD; Mazza G; Holub BJ; Wang J, Anthocyanin metabolites in human urine and serum; *Br J Nutr* 2004; **91**: 933-942.
- Keppler K; Humpf H-U, Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora; *Bioorg Med Chem* 2005; **13**: 5195-5205.
- Kimira M; Arai Y; Shimoi K; S. W, Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods; *J Epidemiol* 1998; **8**: 168-175.
- Knox YM; Hayashi K; Suzutani T; Ogasawara M; Yoshida I; Shiina R; Tsukui A; Terahara N; Azuma M, Activity of anthocyanins from fruit extract of *ribes nigrum* L. against influenza A and B viruses.; *Acta Virol* 2001; **45**: 209-215.
- Knox YM; Suzutani T; Yoshida I; Shibaki T; Ogasawara M; Azuma M, Antiviral activity of Kurokarin extracts; *Food Processing* 1998; **33**: 21-23.
- Koide T; Hashimoto Y; Kamei H; Kojima T; Hasegawa M; Terabe K, Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans *in vitro* and *in vivo*; *Cancer Biother Radiopharm* 1997; **12**: 277-280.
- Kong J-M; Chia L-S; Goh N-K; Chia T-F; Brouillard R, Analysis and biological activities of anthocyanins; *Phytochemistry* 2003; **64**: 923-933.
- Konowalchuk J; Speirs JI, Virus inactivation by grapes and wines; *Appl Environ Microbiol* 1976; **32**: 757-763.

- Kontiokari T; Sundqvist K; Nuutinen M; Pokka T; Koskela M; Uhari M, Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women; *Br Med J* 2001; **322**: 1571-1576.
- Kraft TFB; Schmidt BM; Yousef GG; Knight CTG; Cuendet M; Kang Y-H; Pezzuto JM; Seigler DS; Lila MA, Chemopreventive potential of wild lowbush blueberry fruits in multiple stages of carcinogenesis; *J Food Scie* 2005; **70**: 159-166.
- Kresty LA; Morse MA; Morgan C; Carlton PS; Lu J; Gupta A; Blackwood M; Stoner GD, Chemoprevention of esophageal tumorigenesis by dietary administration of lyophilized black raspberries; *Cancer Res* 2001; **61**: 6112-6119.
- Krygier K; Sosulski F; Hogge L, Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure; *J Agric Food Chem* 1982; **80**: 337-340.
- Kühnau J, The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition; *World Rev Nutr Diet* 1976; **24**: 117-191.
- Kumpulainen JT In: *Intake of flavonoids, phenolic acids and lignans in various populations*, Third international conference on natural antioxidants and anticancerogens in food, health and disease (NAHD), Helsinki, Finland, June 6-9, 2001; Voutilainen, S; Salonen, JT, eds. Helsinki: Kuopion Yliopisto, Finland: 24.
- 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.
- Lakenbrink C; Lapczynski S; Maiwald B; Engelhardt UH, Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages; *J Agric Food Chem* 2000; **48**: 2848-2852.
- Lapidot T; Harel S; Akiri B; Granit R; Kanner J, pH-Dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants; *J Agric Food Chem* 1999; **47**: 67-70.
- Lapidot T; Harel S; Granit R; Kanner J, Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine; *J Agric Food Chem* 1998; **46**: 4297-4302.
- Le Corre L; Delort NCL; Bignon Y-J; Bernard-Gallon DJ, Resveratrol and breast cancer chemoprevention: Molecular mechanisms; *Mol Nutr Food Res* 2005; **49**: 462-471.
- 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 Technol* 1998; **31**: 473-479.

- Lempereur I; Rouau X; Abecassis J, Genetic and agronomic variation in arabinoxylan and ferulic acid contents of durum wheat (*Triticum durum* L.) grain and its milling fractions; *J Cereal Sci* 1997; **25**: 103-110.
- Levy Y; Glovinsky Y, The effect of anthocyanosides on night vision; *Eye* 1998; **12**: 967-969.
- Lietti A; Cristoni A; Picci M, Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. I. Vasoprotective and antiinflammatory activity; *Arzneim-Forsch* 1976; **26**: 829-832.
- Liu S; Lee IM; Ajani U; Cole SR; Buring JE; Manson JE, Intake of vegetables rich in carotenoids and risk of coronary heart disease in men: The Physicians' Health Study; *Int J Epidemiol* 2001; **30**: 130-135.
- Machaix J-J; Fleuriet A; Billot J, *Fruit phenolics*, CRC press Boca Raton, FL, 1990.
- Malien-Aubert C; Dangles O; Amiot MJ, Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. protective effects by intra- and intermolecular copigmentation; *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 170-176.
- Manach C; Scalbert A; Morand C; Remesy C; Jimenez L, Polyphenols: food sources and bioavailability; *Am J Clin Nutr* 2004; **79**: 727-747.
- Markakis P, Anthocyanins and their stability in foods; *CRC Crit Rev Food Technol* 1974; **4**: 437-456.
- Mas T; Susperregui J; Berke B, DNA-triplex stabilization property of natural anthocyanins; *Phytochemistry* 2000; **53**: 679-687.
- Matsui T; Ebuchi S; Kobayashi M; Fukui K, Sugita, K.; Terahara N; Matsumoto K, Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action; *J Agric Food Chem* 2002; **50**: 7244-7248.
- Matsui T; Ueda T; Oki T; Sugita K; Terahara N; Matsumoto K, *alpha*-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. survey of natural pigments with potent inhibitory activity; *J Agric Food Chem* 2001a; **49**: 1948-1951.
- Matsui T; Ueda T; Oki T; Sugita K; Terahara N; Matsumoto K, Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins; *J Agric Food Chem* 2001b; **49**: 1952-1956.
- Matsumoto H; Inaba H; Kishi M; Tominaga S; Hirayama M; Tsuda T, Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms; *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 1546-1551.

- Matsumoto H; Nakamura Y; Tachibanaki S; Kawamura S; Hirayama M, Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin; *J Agric Food Chem* 2003; **51**: 3560-3563.
- Matuschek MC; Hendriks WH; McGhie TK; Reynolds GW, The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice; *J Nutr Biochem* 2006; **17**: 31-36.
- Mazza G; Brouillard R, Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products; *Food Chem* 1987; **25**: 207-225.
- Mazza G; Brouillard R, The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous solutions; *Phytochemistry* 1990; **29**: 1097-1102.
- Mazza G; Kay CD; Cottrell T; Holub BJ, Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects; *J Agric Food Chem* 2002; **50**: 7731-7737.
- Mazza G; Miniati E, *Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains*, CRC Press Boca Raton, FL, 1993.
- Meiers S; Kemeny M; Weyand U; Gutspar R; von Angerer E; Marko D, The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor; *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 958-962.
- Merken HM; Beecher GR, Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review; *J Agric Food Chem* 2000; **48**: 577-599.
- Milbury PE; Cao G; Prior RL; Blumberg J, Bioavailability of elderberry anthocyanins; *Mech Ageing Dev* 2002; **123**: 997-1006.
- Miller NJ; Rice-Evans C; Davies MJ; Gopinathan V; Milner A, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates; *Clinl Sci (London, England: 1979)* 1993; **84**: 407-412.
- Miyazawa T; Nakagawa K; Kudo M; Muraishi K; Someya K, Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans; *J Agric Food Chem* 1999; **47**: 1083-1091.
- Morand C; Manach C; Crespy V; Remesy C, Quercetin 3-O-b-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma; *Free Radic Res* 2000a; **33**: 667-676.
- Morand C; Manach C; Crespy V; Remesy C, Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model; *Biofactors* 2000b; **12**: 169-174.
- Morazzoni P; Livio S; Scilingo A; Malandrino S, Vaccinium myrtillus anthocyanosides pharmacokinetics in rats; *Arzneim-Forsch* 1991; **41**: 128-131.

- Morazzoni P; Magistretti MJ, Activity of Myrtocyan, an anthocyanoside complex from *vaccinium myrtillus* (VMA), on platelet aggregation and adhesiveness; *Fitoterapia* 1990; **61**: 13-21.
- Moyer RA; Hummer KE; Finn CE; Frei B; Wrolstad RE, Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *vaccinium*, *rubus*, and *ribes*; *J Agric Food Chem* 2002; **50**: 519-525.
- Mülleder U; Murkovic M; Pfannhauser W, *Metabolism of cyanidin glycosides of elderberry*. Royal Society of Chemistry: London, 2001; Vol. 269, 421-425.
- Mülleder U; Murkovic M; Pfannhauser W, Urinary excretion of cyanidin glycosides; *J Biochem Biophys Methods* 2002; **53**: 61-66.
- Murakami S; Robinson R, Synthesis of pyrylium salts of anthocyanidin type. XVII. Synthesis of peonidin chloride by means of O-benzoylphloroglucinaldehyde; *J Chem Soc, Abstracts* 1928; 1537-1541.
- Murkovic M, Anthocyane und ihre Wirkung; *ERNO* 2001; **2**: 230-237.
- Murkovic M; Mülleder U; Adam U; Pfannhauser W, Detection of anthocyanins from elderberry juice in human urine; *J Sci Food Agric* 2001; **81**: 934-937.
- Muth ER; Laurent JM; Jasper P, The effect of bilberry nutritional supplementation on night visual acuity and contrast sensitivity; *Altern Med Rev* 2000; **5**: 164-173.
- Nakaishi H; Matsumoto H; Tominaga S; Hirayama M, Effects of black current anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans; *Altern Med Rev* 2000; **5**: 553-562.
- Nemeth K; Plumb GW; Berrin J-G; Juge N; Jacob R; Naim HY; Williamson G; Swallow DM; Kroon PA, Deglycosylation by small intestinal epithelial cell *beta*-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans; *Eur J Nutr* 2003; **42**: 29-42.
- Nielsen ILF; Dragsted LO; Ravn-Haren G; Freese R; Rasmussen SE, Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits; *J Agric Food Chem* 2003; **51**: 2813-2820.
- Noda Y; Kaneyuki T; Mori A; Packer L, Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin; *J Agric Food Chem* 2002; **50**: 166-171.
- Nolan TJ; Pratt DD; Robinson R, Synthesis of pyrylium salts of anthocyanidin type. XI. A synthesis of peonidin chloride; *J Chem Soc, Abstracts* 1926; 1968-1971.

- Nyman NA; Kumpulainen JT, Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography; *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 4183-4187.
- Olthof MR; Hollman PCH; Katan MB, Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans; *J Nutr* 2001; **131**: 66-71.
- Ou B; Hampsch-Woodill M; Prior RL, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe; *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 4619-4626.
- Paganga G; Rice-Evans CA, The identification of flavonoids as glycosides in human plasma; *FEBS Letters* 1997; **401**: 78-82.
- Passamonti S; Vrhovsek U; Mattivi F, The interaction of anthocyanins with bilitranslocase; *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **296**: 631-636.
- Passamonti S; Vrhovsek U; Vanzo A; Mattivi F, The stomach as a site for anthocyanins absorption from food; *FEBS Letters* 2003; **544**: 210-213.
- Passamonti S; Vrhovsek U; Vanzo A; Mattivi F, Fast access of some grape pigments to the brain; *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 7029-7034.
- Pierpoint WS, Flavonoids in the human diet; *Prog Clin Biol Res* 1986; **213**: 125-140.
- Pietta P, Flavonoids as antioxidants; *J Nat Prod* 2000; **63**: 1035-1042.
- Pietta P; Simonetti P; C R; al. e In: *Dietary flavonoids and oxidative stress*, Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention, Cambridge, 1996; Kumpulainen, JT; Salonen, JT, eds. London: Royal Society of Chemistry: 249-255.
- Pols M; Wilkins CK, Improved preparation of 2-benzoyloxy-4,6-dihydroxybenzaldehyde; *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 1971; **746**: 214-215.
- Pratt DD; Robinson R, Synthesis of pyrylium salts of the anthocyanidin type; *J Chem Soc, Abstracts* 1922; **121**: 1577-1585.
- Pratt DD; Robinson R, Synthesis of pyrylium salts of anthocyanidin type. II; *J Chem Soc, Abstracts* 1923; **123**: 745-758.
- Pratt DD; Robinson R, Synthesis of pyrylium salts of anthocyanidin type. III. a new synthesis of pelargonidin chloride; *J Chem Soc, Abstracts* 1924; **125**: 188-199.
- Pratt DD; Robinson R, Synthesis of pyrylium salts of anthocyanidin type. V. the synthesis of cyanidin chloride and of delphinidin chloride; *J Chem Soc, Abstracts* 1925a; **127**: 166-175.

- Pratt DD; Robinson R, Synthesis of pyrylium salts of anthocyanidin type. VI. polyhydroxyflavylium salts related to chrysin, apigenin, lotoflavin, luteolin, galangin, flsetin and morin; *J Chem Soc, Abstracts* 1925b; **127**: 1128-1138.
- Price SF; Breen PJ; Valladao M; Watson B, Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine; *Am J Enol Vitc* 1995; **46**: 187-194.
- Prior RL; Cao G; Martin A; Sofic E; McEwen J; O'Brien C; Lischner N; Ehlenfeldt M; Kalt W; Krewer G; Mainland CM, Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* Species; *J Agric Food Chem* 1998; **46**: 2686-2693.
- Prior RL; Lazarus SA; Cao G; Muccitelli H; Hammerstone JF, Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* Spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry; *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 1270-1276.
- Pulido R; Bravo L; Saura-Calixto F, Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay; *J Agric Food Chem* 2000; **48**: 3396-3402.
- Ramirez-Tortosa C; Andersen OM; Gardner PT; Morrice PC; Wood SG; Duthie SJ; Collins AR; Duthie GG, Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats; *Free Radic Biol Med* 2001; **31**: 1033-1037.
- Raz R; Chazan B; Dan M, Cranberry juice and urinary tract infection; *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 1413-1419.
- Re R; Pellegrini N; Proteggente A; Pannala A; Yang M; Rice-Evans C, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay; *Free Radic Biol Med* 1999; **26**: 1231-1237.
- Rechner AR; Kuhnle G; Bremner P; Hubbard GP; Moore KP; Rice-Evans CA, The metabolic fate of dietary polyphenols in humans; *Free Radic Biol Med* 2002; **33**: 220-235.
- Reiter RJ; Tan D-x; Burkhardt S, Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin; *Mech Ageing Dev* 2002; **123**: 1007-1019.
- Renaud S; de Lorgeril M, Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease; *The Lancet* 1992; **339**: 1523-1526.
- Rifici VA; Stephan EM; Schneider SH; Khachadurian AK, Red wine Inhibits the cell-mediated oxidation of LDL and HDL; *J Am Coll Nutr* 1999; **18**: 137-143.

- Robertson A; Robinson R, Synthesis of pyrylium salts of anthocyanidin type. XV. the synthesis of cyanidin chloride by means of O-benzoylphloroglucinaldehyde; *J Chem Soc, Abstracts* 1928; 1526-1532.
- Robertson A; Robinson R; Sugiura J, Synthesis of pyrylium salts of anthocyanidin type. XVI. synthesis of pelargonidin chloride by means of O-benzoylphloroglucinaldehyde; *J Chem Soc, Abstracts* 1928; 1533-1537.
- Rossi A; Serraino I; Dugo P; Di Paola R; Mondello L; Genovese T; Morabito D; Dugo G; Sautebin L; Caputi AP; Cuzzocrea S, Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation; *Free Radic Res* 2003; **37**: 891-900.
- Sahm SW; Caspary WF, Polypen und gutartige Tumoren des Dickdarms. In *Darmkrankheiten*, Caspary, WF; Stein, J, Eds. Springer: Berlin, 1999; pp 531-544.
- Sampson L; Rimm E; Hollman PCH; de Vries JHM; Katan MB, Flavonol and flavone intakes in US health professionals; *J Am Diet Assoc* 2002; **102**: 1414-1420.
- Santos-Buelga C; Scalbert A, Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health; *J Sci Food Agric* 2000; **80**: 1094-1117.
- Sarma AD; Sreelakshimi Y; Sharma R, Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation; *Phytochemistry* 1997; **45**: 671-674.
- Satue-Gracia MT; Heinonen M; Frankel EN, Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems; *J Agric Food Chem* 1997; **45**: 3362-3367.
- Scalbert A, Antimicrobial properties of tannins; *Phytochemistry* 1991; **30**: 3875-3883.
- Scheline RR, The metabolism of drugs and other organic compounds by the intestinal microflora; *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1968; **26**: 332-342.
- Schürmann G, Bauchredner – Stoma bei Crohn und Colitis; *DCCV-Journal* 2001; **1**: 12-18.
- Schwarz M; Picazo-Bacete JJ; Winterhalter P; Hermosin-Gutierrez I, Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments; *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 8372-8381.
- Seeram NP; Bourquin LD; Nair MG, Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities; *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 4924-4929.
- Sellappan S; Akoh CC; Krewer G, Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries; *J Agric Food Chem* 2002; **50**: 2432-2438.

- Shahzad S; Bitsch I, Determination of gallic acid and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography; *J of Chromatogr B: Biomedical Sciences and Applications* 1998; **705**: 87-95.
- Slimestad R; Solheim H, Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum* L.); *J Agric Food Chem* 2002; **50**: 3228-3231.
- Sobota AE, Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potencial use for the traetment of urinary tract infections; *J Urol* 1984; **131**: 1013-1016.
- Stadtman ER; Berlett BS, Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease; *Chem Res Toxicol* 1997; **10**: 485-494.
- Stein J; Markowiec F; Starlinger RM; Caspary WF, Colitis ulcerosa. In *Darmkrankheiten*, Caspary, WF; Stein, J, Eds. Springer: Berlin, 1999a; pp 465-490.
- Stein J; Markowiec F; Starlinger RM; Caspary WF, Morbus Crohn. In *Darmkrankheiten*, Caspary, WF; Stein, J, Eds. Springer: Berlin, 1999b; pp 439-464.
- Suzutani T; Ogasawara M; Yoshida I; Azuma M; Knox YM, Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L.; *Phytother Res* 2003; **17**: 609-613.
- Tadao Kondo K-iOKY, Chiral molecular recognition on formation of a metalloanthocyanin: a supramolecular metal complex pigment from blue flowers of *Salvia patens*; *Angewandte Chemie International Edition* 2001; **40**: 894-897.
- Takayama T; Katsuki S; Takahashi Y; Ohi M; Nojiri S; Sakamaki S; Kato J; Kogawa K; Miyake H; Niitsu Y, Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer; *N Engl J Med* 1998; **339**: 1277-1284.
- Talavera S; Felgines C; Texier O; Besson C; Gil-Izquierdo A; Lamaison JL; Remesy C, Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain; *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 3902-3908.
- Talavera S; Felgines C; Texier O; Besson C; Lamaison J-L; Remesy C, Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats; *J Nutr* 2003; **133**: 4178-4182.
- Talavera S; Felgines C; Texier O; Besson C; Manach C; Lamaison J-L; Remesy C, Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats; *J Nutr* 2004; **134**: 2275-2279.
- Tatsuzawa F; Saito N; Murata N; Shinoda K; Shigihara A; Honda T, 6-Hydroxypelargonidin glycosides in the orange-red flowers of *Alstroemeria*; *Phytochemistry* 2003; **62**: 1239-1242.
- Tengherdy T, Accelerated remission of episodes of Herpes labialis in response to a bioflavonoid-ascorbate supplement; *Nutr Rev* 1978; **36**: 300-301.

- Thompson LU; Robb P; Serraino M; Cheung F, Mammalian lignan production from various foods; *Nutr Cancer* 1991; **16**: 43-52.
- Tomas-Barberan FA; Clifford MN, Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden; *J Sci Food Agric* 2000a; **80**: 1024-1032.
- Tomas-Barberan FA; Clifford MN, Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden; *J Sci Food Agric* 2000b; **80**: 1073-1080.
- Tsuda T; Horio F; Osawa T, Dietary cyanidin 3-O-*beta*-D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats; *Lipids* 1998; **33**: 583-588.
- Tsuda T; Horio F; Osawa T, Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-*beta*-glucoside in rats; *FEBS Letters* 1999; **449**: 179-182.
- Tsuda T; Horio F; Uchida K; Aoki H; Osawa T, Dietary Cyanidin 3-O-*beta*-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice; *J Nutr* 2003; **133**: 2125-2130.
- Turner A; Chen SN; Joike MK; Pendland SL; Pauli GF; Farnsworth NR, Inhibition of uropathogenic *Escherichia coli* by cranberry juice: a new antiadherence assay; *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 8940-8947.
- Ulrich S; Wolter F; Stein JM, Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis; *Mol Nutr Food Res* 2005; **49**: 452-461.
- Valcheva-Kuzmanova S; Marazova K; Krasnaliev I; Galunska B; Borisova P; Belcheva A, Effect of Aronia melanocarpa fruit juice on indomethacin-induced gastric mucosal damage and oxidative stress in rats; *Exp Toxicol Pathol* 2005; **56**: 385-392.
- Vaupel P; Ewe K, Funktionen des Magen-Darm-Kanals. In *Physiologie des Menschen*, Schmidt, RF; Thews, G, Eds. Springer: Berlin, 1997; Vol. 27, 806.
- Viljanen K; Kylli P; Kivikari R; Heinonen M, Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics; *J Agric Food Chem* 2004; **52**: 7419-7424.
- Vitrac X; Moni JP; Vercauteren J; Deffieux G; Mérillon JM, Direct liquid chromatography analysis of resveratrol derivatives and flavanols in wines with absorbance and fluorescence detection; 2002; **458**: 103-110.
- Walgren RA; Lin J-T; Kinne RKH; Walle T, Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-*beta* -glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1; *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **294**: 837-843.
- Walle T; Otake Y; Walle UK; Wilson FA, Quercetin Glucosides Are Completely Hydrolyzed in Ileostomy Patients before Absorption; *J. Nutr.* 2000; **130**: 2658-2661.

- Wang H; Cao G; Prior RL, Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins; *J Agric Food Chem* 1997; **45**: 304-309.
- Wang H; Nair MG; Chang Y-C; Booren AM; Gray JI; Dewitt DL, Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycone, cyanidin, from tart cherries; *J Nat Prod* 1999; **62**: 294-296.
- Wang J; Mazza G, Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor α in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages; *J Agric Food Chem* 2002; **50**: 4183-4189.
- Watzl B; Briviba K; Rechkemmer G, Anthocyane; *Ernaehrungs-Umschau* 2002a; **49**: 148-150.
- Watzl B; Bub A; Briviba K; Rechkemmer G, Acute intake of moderate amounts of red wine or alcohol has no effect on the immune system of healthy men; *Eur J Nutr* 2002b; **41**: 264-270.
- Wenzel E; Somoza V, Metabolism and bioavailability of *trans*-resveratrol; *Mol Nutr Food Res* 2005; **49**: 472-481.
- Wu X; Beecher GR; Holden JM; Haytowitz DB; Gebhardt SE; Prior RL, Concentrations of anthocyanins in common foods in the united states and estimation of normal consumption; *J Agric Food Chem* 2006a; **54**: 4069-4075.
- Wu X; Gu L; Prior RL; McKay S, Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of *Ribes*, *Aronia*, and *Sambucus* and their antioxidant capacity; *J Agric Food Chem* 2004a; **52**: 7846-7856.
- Wu X; Pittman HE, III; McKay S; Prior RL, Aglycones and Sugar Moieties Alter Anthocyanin Absorption and Metabolism after Berry Consumption in Weanling Pigs; *J. Nutr.* 2005; **135**: 2417-2424.
- Wu X; Pittman HE; Prior RL, Fate of anthocyanins and antioxidant capacity in contents of the gastrointestinal tract of weanling pigs following black raspberry consumption; *J Agric Food Chem* 2006b; **54**: 583-589.
- Wu X; Pittman HE; Prior Ronald L, Pelargonidin is absorbed and metabolized differently than cyanidin after marionberry consumption in pigs; *J Nutr* 2004b; **134**: 2603-2610.
- Wu X; Prior RL, Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the united states: vegetables, nuts, and grain; *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 3101-3113.

- Yi W; Fischer J; Krewer G; Akoh CC, Phenolic compounds from blueberries can Inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis; *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 7320-7329.
- Youdim KA; Dobbie MS; Kuhnle G; Proteggente AR; Abbott NJ; Rice-Evans C, Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: *in vitro* studies; *J Neurochem* 2003; **85**: 180-192.
- Youdim KA; McDonald J; Kalt W; Joseph JA, Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults; *J Nutr Biochem* 2002; **13**: 282-288.
- Zadok D; Levy Y; Glovinsky Y, The effect of anthocyanosides in a multiple oral dose on night vision; *Eye* 1999; **13**: 734-736.
- Zakay-Rones Z; Thom E; Wollan T; Wadstein J, Randomized study of the efficacy and safety of oral elderberry extract in the treatment of influenza A and B virus infections; *J Int Med Res* 2004; **32**: 132-140.
- Zhang K; Corrie JET; Munasinghe VRN; Wan P, Mechanism of photosolvolytic rearrangement of p-hydroxyphenacyl esters: evidence for excited-state intramolecular proton transfer as the primary photochemical step; *J Am Chem Soc* 1999; **121**: 5625-5632.
- Zheng Y; Wang CY; Wang SY; Zheng W, Effect of high-oxygen atmospheres on blueberry phenolics, anthocyanins, and antioxidant capacity; *J Agric Food Chem* 2003; **51**: 7162-7169.

Lebenslauf

Name: Kraus
Vorname: Michael Heinrich
Geburtsdatum: 04.12.1977
Geburtsort: Schweinfurt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Bekenntnis: römisch-katholisch
Anschrift: Winkelmahdstraße 10, 86391 Stadtbergen-Leitershofen

Vater: Gerhard Kraus, Landmaschinenmechaniker
Mutter: Ruth Kraus, geb. Schuster, Fleischerfachverkäuferin

Schulbildung: 09/1984-07/1988: Grundschule Dittelbrunn
09/1988-06/1997: Walther-Rathenau-Gymnasium,
Schweinfurt

Wehrdienst: 09/1997-06/1998: 4./Panzerartilleriebatalion 355,
Wildflecken i. d. Rhön

Studium: 10/1998-10/2002 Studium der Lebensmittelchemie an der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
10/2000 Vorexamen
10/2002 Erste Staatsprüfung
12/2005 Berufspraktikum am Bayerischen Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Erlangen
05/2006 Zweite Staatsprüfung

Promotion: 12/2002-06/2005: Promotion am Lehrstuhl für Lebensmittel-
chemie der Universität Würzburg

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

„Synthese von ^{14}C -markierten Anthocyanidinen und Studien zur intestinalen Verfügbarkeit von Anthocyanen aus Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.)“

selbständig 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

(Michael Kraus)