

**Studien zum Verhalten von Anthocyanen aus
Heidelbeeren im Humanstoffwechsel –
Stabilisierung und Bindung durch Proteine**

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

vorgelegt von
Matthias Ackermann
aus Werneck

Würzburg 2010

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:

FÜR KATRIN UND HANNES

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von Dezember 2005 bis Januar 2009 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Peter Schreier, dem ich außer für die Überlassung des interessanten Themas auch für das entgegengebrachte Vertrauen und den großen Freiraum, den er mir gelassen hat, danke.

Weiterer Dank gebührt Prof. Dr. Elke Richling für die intensive Betreuung der Arbeit in der Anfangsphase, die zahlreichen Ideen, die anregenden Diskussionen, die immer gut gemeinten Tips. Danke, dass Du dir auch nach deinem Wechsel nach Kaiserslautern immer Zeit für mich genommen hast.

Außerdem möchte ich mich bei allen Partnern ausserhalb des Arbeitskreises für die gute Zusammenarbeit bedanken. Besonderer Dank geht an Prof. Dr. Hans-Ulrich Humpf und Anne Fischbeck für die Hilfe bei den CD-Messungen, an Prof. Dr. Christoph A. Sotriffer für die Durchführung der Berechnung der Bindungsstellen sowie an Katrin Plochmann und die Mitarbeiter des Instituts für Virologie und Immunbiologie für die Blutentnahmen.

Ein großes Dankeschön geht an Peggy Schmidt, Steffi Müller, Fabian Oberle, Maria Weidner und Anne-Marie Orth, die mich im Rahmen Ihres Fortgeschrittenenpraktikums tatkräftig und voller Elan unterstützt haben. Besonders bedanken möchte ich mich außer für eure selbständige gute Arbeit und eure Eigeninitiative auch für die netten Gespräche. Außerdem danke ich allen Studierenden, die im Rahmen des Praktikums Versuche für mich durchgeführt haben oder mir anderweitig bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben

Ein weiteres Dankeschön geht an Dr. Wolfgang Hümmer und Dr. Katrin Kahle für die glücklicherweise nie endende Hilfe bei fachlichen wie auch allen übrigen Problemen.

Mein Dank gilt allen Freiwilligen, die durch Ihre bereitwillige Teilnahme an den Studien wesentlich zur Arbeit beigetragen haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Michael Kempf für die gute Zusammenarbeit bei der Betreuung des 1. und 2. Semesters bedanken.

Dem Arbeitskreis danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit, die fachlichen Diskussionen und die mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Danke auch an alle Korrekturleser, die sich durch diese Arbeit gekämpft haben.

Weiterhin möchte ich danken...

...Katrin, Christina, Sandra, Tina, Michael und natürlich Wolfgang für die Freundschaften, die in diesen Jahren entstanden sind und die hoffentlich auch über die zum Teil sehr weiten Entfernungen halten werden. Vielen Dank für euer offenes Ohr bei all den Dingen, über die ich dringend mal reden wollte; Danke für die schönen Stunden mit den vielen getrunkenen Biere und gegessenen Pizzen. Danke für die tolle Zeit.

...Meinen Eltern, die mich bei allem was ich bisher gemacht habe, immer unterstützt haben und auf deren Unterstützung ich mich auch in Zukunft immer verlassen kann.

...Katrin und Hannes, dass ihr so seid, wie ihr seid, und dass ihr endlich wieder bei mir seid.

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen	V
Erläuterungen	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	XI
Summary	XIII
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Kenntnisstand	3
2.1 Heidelbeeren.....	3
2.2 Anthocyane	4
2.2.1 Chemische und ernährungsphysiologische Einordnung	4
2.2.1.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.....	4
2.2.1.2 Polyphenole	4
2.2.1.3 Flavonoide.....	5
2.2.1.4 Anthocyane	6
2.2.2 Biosynthese und Funktion von Anthocyanen in Pflanzen	8
2.2.3 Ernährungsphysiologische Bedeutung von Polyphenolen	9
2.2.3.1 Antioxidative Eigenschaften	9
2.2.3.2 Antiinflammatorische Eigenschaften von Anthocyanen	10
2.2.3.3 Polyphenole und Krebs	11
2.2.3.4 Anthocyane und Herz-Kreislaufkrankungen	13
2.2.3.5 Weitere gesundheitsfördernde Eigenschaften von Anthocyanen	14
2.2.4 Anthocyanprofil der Heidelbeere.....	14
2.3 Physiologie des Menschen: Die Verdauung (Auszüge).....	15
2.3.1 Die Mundhöhle	16
2.3.2 Der Magen	17
2.3.3 Das Pankreas.....	18
2.3.4 Die Leber und die Galle	19
2.3.5 Der Darm.....	21
2.3.5.1 Der Dünndarm.....	21
2.3.5.2 Der Dickdarm	21
2.3.5.3 Die Darmflora	22
2.3.6 Die Nieren und der Urin	23
2.3.7 Das Blut und das humane Serumalbumin.....	24
2.4 Bioverfügbarkeit von Anthocyanen und anderen Polyphenolen	27

2.4.1	Digestion und Absorption von mit der Nahrung aufgenommenen Anthocyanen.....	29
2.4.2	Metabolismus, Verteilung und Eliminierung der Anthocyane im humanen Organismus	32
3	Ergebnisse und Diskussion.....	37
3.1	Bestimmung des Anthocyangehaltes von Heidelbeeren	37
3.2	Studien zur Verfügbarkeit von Anthocyanen: Strategie	41
3.2.1	<i>Ex vivo</i> -Inkubationen mit Speichel.....	42
3.2.2	<i>In vitro</i> -Inkubationen mit simuliertem Magensaft	46
3.2.3	<i>In vitro</i> -Inkubationen mit simuliertem Duodenalsaft.....	48
3.2.4	Metabolisierung der Anthocyane im Dün- und Dickdarm	49
3.2.5	pH-Stabilität und Abbau von Anthocyanidinen bei pH 7,4	52
3.2.5.1	Studienaufbau.....	52
3.2.5.2	Ergebnisse der Stabilitätsstudien	52
3.2.6	Humane Interventionsstudie zum Verbleib der Anthocyane und deren Metabolite im Urin nach Heidelbeerverzehr.....	54
3.2.6.1	Probenvorbereitung und Analytik.....	54
3.2.6.2	Bilanzierung von Anthocyanen im Urin.....	56
3.2.6.3	Identifizierung von Anthocyanmetaboliten im Urin.....	58
3.3	Studien zum Verhalten von Anthocyanen in proteinhaltiger Lösung	59
3.3.1	Blut und Serumfraktionierung	59
3.3.1.1	Versuchsdurchführung und Analytik.....	59
3.3.1.2	Identifizierung der Bindungspartner	61
3.3.2	Bestimmung der Bindungsstelle und Bindungsparameter von Anthocyanen an HSA	61
3.3.2.1	Veränderungen in der Sekundärstruktur des HSA-Moleküls durch Anthocyane	62
3.3.2.2	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Anthocyan-HSA-Bindung ...	64
3.3.2.3	Untersuchung der Bindungsstelle mittels „molecular modelling“	66
3.3.3	Einfluß der Proteinbindung auf die Stabilität von Anthocyanen.....	69
3.3.3.1	Einfluß von Blutproteinen auf die Anthocyanstabilität.....	69
3.3.3.2	Identifizierung anderer mit Anthocyanen wechselwirkender Proteine	73
3.3.3.3	Stabilisierung der Anthocyane im Lebensmittel.....	75
4	Material und Methoden.....	77
4.1	Material	77
4.1.1	Chemikalien	77
4.1.2	Untersuchungsmaterial.....	77

4.1.3	Verbrauchsmaterial	77
4.1.4	Säulenchromatographie (SC).....	77
4.1.5	Festphasenextraktion (SPE)	78
4.1.6	Mikrofiltration.....	78
4.2	Geräte	78
4.2.1	Hochleistungsflüssigchromatographie	78
4.2.2	Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)	81
4.2.3	Sonstige Geräte	82
4.3	Methoden	82
4.3.1	Extraktion und Isolierung der Anthocyane aus Heidelbeeren	82
4.3.1.1	Extraktion	82
4.3.1.2	Isolierung der einzelnen Anthocyane	83
4.3.1.3	Identifizierung der erhaltenen Reinstoffe	83
4.3.1.4	Erstellen einer Anthocyanstammlösung zum Einsatz bei Inkubationen.....	83
4.3.2	<i>Ex vivo</i> Inkubation mit Speichel	84
4.3.2.1	Probanden.....	84
4.3.2.2	Studiendesign	84
4.3.2.3	Probenaufarbeitung und Analytik	84
4.3.3	<i>In vitro</i> Inkubation mit simuliertem Magensaft.....	85
4.3.3.1	Studiendesign	85
4.3.3.2	Probenaufarbeitung und Analytik.....	85
4.3.4	<i>In vitro</i> Inkubation mit simuliertem Duodenalsaft	86
4.3.4.1	Studiendesign	86
4.3.4.2	Probenaufarbeitung und Analytik	87
4.3.5	<i>Ex vivo</i> Inkubation mit Dünn- und Dickdarminhalt.....	87
4.3.5.1	Studiendesign	87
4.3.5.2	Probenaufarbeitung und Analytik.....	88
4.3.6	Chemische Stabilität von Anthocyanidinen (pH 7,4).....	88
4.3.6.1	Inkubation in anaeroben Phosphatpuffer	88
4.3.6.2	Probenaufarbeitung und Analytik	88
4.3.6.3	Synthese von Phloroglucinessigsäure	89
4.3.7	Humane Interventionsstudie zur Kontrolle von Heidelbeeranthocyanen im Urin.....	89
4.3.7.1	Ethikantrag	89
4.3.7.2	Probanden.....	89
4.3.7.3	Studiendesign	89

4.3.7.4	Probenaufarbeitung	90
4.3.7.5	Analytik	90
4.3.7.5.1	Kalibriergeraden	90
4.3.7.5.2	Quantifizierung.....	91
4.3.8	Versuche zur Ermittlung der bindungsrelevanten Proteine im Humanblut ...	91
4.3.8.1	Fraktionierungsversuche von mit Anthocyanen versetztem Humanblut.....	91
4.3.8.2	Fraktionierungsversuche von mit Anthocyanen versetztem Humanserum...	92
4.3.8.3	Analytik	92
4.3.9	Studien zur Bindung von Anthocyanen an humanem Serum Albumin	92
4.3.9.1	Überprüfung des Einflusses der Proteine auf die Anthocyanstabilität durch nasschemische Inkubation	92
4.3.9.1.1	Studiendesign	92
4.3.9.1.2	Analytik	93
4.3.9.2	Versuche zur Aufklärung der Bindung von Anthocyanen an HSA.....	93
4.3.9.2.1	Circular Dichroismus Spektroskopie	93
4.3.9.2.2	Fluoreszenz-Spektroskopie	94
4.3.9.2.3	Molecular Modelling.....	94
4.3.10	Studien zum Nachweis von Stabilisierung der Anthocyane durch Proteininteraktionen.....	95
4.3.10.1	Versuche zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Anthocyanen mit Rinderserumalbumin.....	95
4.3.10.2	Versuche zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Anthocyanen mit humanem Hämoglobin.....	95
4.3.10.3	Versuche zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Anthocyanen mit Ovalbumin.....	96
4.3.10.4	Versuche zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Anthocyanen mit Lactalbumin	96
5	Strukturmatrix	97
6	Literatur	105
7	Anhang	119

Veröffentlichungen

ORIGINALPUBLIKATIONEN

Kahle, Kathrin; Kraus, Michael; Scheppach, Wolfgang; Ackermann, Matthias, Ridder, Friederike; Richling, Elke. Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Mol. Nutr. Food Chem.* **2006**, 50, 418-423.

Ackermann, Matthias; Weidner, Maria; Orth, Anne-Marie; Schmidt, Peggy; Kahle, Kathrin; Hümmer, Wolfgang; Fischbeck, Anne; Humpf, Hans-Ulrich; Sottriffer, Christoph A.; Richling, Elke; Schreier, Peter. Binding of anthocyanins to human serum albumine – investigation of stabilisation effects by spectroscopic methods and molecular modelling. *in preparation*

Kahle, Kathrin; Kempf, Michael; Schreier, Peter; Scheppach, Wolfgang; Schrenk, Dieter; Kautenburger, Tanja; Hecker, Dorothee; Huemmer, Wolfgang; Ackermann, Matthias; Richling, Elke. Transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *Eur. J. Nutr.*, *submitted*

POSTERBEITRÄGE

Hümmer, Wolfgang; Fischer, Maria; Dreiseitel, Andrea; Klimo, Karin; Gerhäuser, Clarissa; Will, Frank; Dietrich, Helmut; Ackermann, Matthias; Kahle, Kathrin; Schreier, Peter; Richling, Elke. 'Structure-activity guided' identification of chemopreventive apple polyphenols. 1th International Symposium on Nutrition and Intestinal Health, Kaiserslautern, 28. Februar-1. März 2007.

Erläuterungen

Die in der vorliegenden Dissertation relevanten chemischen Strukturen sind mit fettgedruckten arabischen Zahlen chronologisch nach Nennung im Text durchnummeriert. Die unter Abschnitt 5 aufgeführte Strukturmatrix fasst die Verbindungen im Überblick zusammen.

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

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

Abkürzungsverzeichnis

Acy	Anthocyanidin
Acy-gly	Anthocyan
amu	atomare Masseneinheit (<i>atomic mass unit</i>)
ara	Arabinosid
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (<i>area under curve</i>)
bidest.	bidestilliert
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
Caco-2	humane Kolonkrebszelllinie
CBG	cytosolische β -Glucosidase
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CHI	Chalkonisomerase
CHS	Chalkonsynthase
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>collision induced dissociation</i>)
cm	Zentimeter
C_{\max}	maximale Konzentration
CoA	Coenzym A
COX	Cyclooxygenase
Cy	Cyanidin
Δ	delta; Unterschied
Da	Dalton
DAD	Diodenarray-Detektion
d. h.	das heißt
dL	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure (auch Erbgut)
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dp	Delphinidin
E	Emission
Ed./Eds.	Editor/Editoren
ESI	Elektrospray-Ionisierung

<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
evtl.	eventuell
eV	Elektronenvolt
FDA	Amerikanische Gesundheitsbehörde (<i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
FG	Frischgewicht
g	Gramm
G	Erdbeschleunigung
gal	Galaktosid
ggf.	gegebenenfalls
glc	Glukosid
glu	Glukoronid
gly	Glykosid
h	Stunde(n)
Hb	Hämoglobin
HDL	<i>High Density</i> Lipoprotein
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
HPLC-MS/MS	Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie
HSA	humanes Serumalbumin
Hz	Hertz
IC 50	halbmaximale inhibitorische Konzentration
I.D.	Innendurchmesser
i. d. R.	in der Regel
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
λ	Wellenlänge
L	Liter
LC	Flüssigchromatographie
LDL	<i>Low Density</i> Lipoprotein
LOX	Lipoxygenase
LPH	Lactat-Phloridzin-Hydrolase
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
m	Meter

M	Molar (mol/L)
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
Mio.	Million(en)
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mM	Millimolar (mmol/L)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
Mv	Malvidin
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
[M-H] ⁻	deprotoniertes Molekülion
NF-κB	nukleärer Transkriptionsfaktor
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
o. g.	oben genannte
p. a.	<i>pro analysis</i>
Pg	Pelargonidin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Pn	Peonidin
PPO	Polyphenoloxidase
ppm	<i>parts per million</i>
psi	Druckeinheit; 100 psi = 5170 Torr
Pt	Petunidin
RNS	reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
s.	siehe
SC	Säulenchromatographie
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SGLT-1	natriumabhängiger intestinaler D-Glucosetransporter
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)

SRM	spezifisches Messsystem der LC-MS/MS (<i>single reaction monitoring</i>)
s. o.	siehe oben
t	Tonnen
t_{\max}	Zeitpunkt der maximalen Anthocyankonzentration
t_R	Retentionszeit
$t_{1/2}$	Eliminationshalbwertszeit
TK	Tiefkühlung, tiefgekühlt
u	atomare Masseneinheit (<i>unified mass unit</i>)
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Identifizierung und Strukturaufklärung von Anthocyanen und ihrer Metabolite erfolgten mit Hilfe der mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Diodenarray-Detektion-Elektrospray-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-DAD-ESI-MS/MS). Quantitative Analysen wurden via HPLC-DAD durchgeführt. Die hierzu erforderlichen Referenzverbindungen wurden mittels präparativer HPLC aus Heidelbeeren isoliert (Reinheit zwischen 85,8% und 99,4%). Der Gehalt an Anthocyanen in den untersuchten Heidelbeerfrüchten lag bei 6 g/kg Frischgewicht. Bezüglich der mengenmäßigen Verteilung dominierten Delphinidin- und Cyanidinglykoside vor den Glykosiden von Malvidin, Petunidin und Peonidin. Als konjugierte Zuckerreste kamen vor allem Glukose und Galaktose vor, der Gehalt an Arabinosiden war weit geringer.

Bei oraler Aufnahme erfolgt ein erster Kontakt der Anthocyane mit Speichel. Daher wurde dessen Wirkung auf die Heidelbeeranthocyane in *ex vivo*-Studien über einen (unphysiologisch langen) Zeitraum von bis zu 30 Minuten untersucht. Dabei konnte wurde insbesondere der Einfluß des pH-Wertes auf die Stabilität der Anthocyane aufgezeigt werden.

Zur Simulation des Verhaltens von Anthocyanen im Magen wurden die einzelnen Heidelbeeranthocyane mit künstlichem Magensaft (pH 1,81) über vier Stunden inkubiert. Hier erwiesen sich alle untersuchten Verbindungen als stabil.

Die anschließend von uns mit simuliertem Duodenalsekret (pH 7,2) über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführten Studien zeigten, dass die Anthocyane unterschiedlich starken Modifizierungen unterlagen. Unter den schwach alkalischen Bedingungen wurden vor allem die Glykoside des Delphinidins schnell abgebaut, aber auch die übrigen Anthocyane erwiesen sich unter diesen Bedingungen als nicht stabil; nach 24 h war kein Anthocyan mehr nachweisbar.

Um die Metabolisierungsvorgänge der Anthocyane im Dün- und Dickdarm zu untersuchen, wurden *ex vivo*-Inkubationen jeweils mit frischem Ileo- bzw. Kolostoma-beutelinhalt durchgeführt. Während die Abbaugeschwindigkeit in der ilealen Flüssigkeit vor allem von der pH-Stabilität des Aglykons abhängig war, konnten in der Dickdarmflüssigkeit einzig die Arabinoside nach einer Stunde noch alle in geringen Konzentrationen identifiziert werden. Die meisten Glukoside und Galaktoside waren zu diesem Zeitpunkt schon vollständig abgebaut.

Da im Darm von einer hydrolytischen Spaltung der Anthocyane in Anthocyanidin und Zucker ausgegangen wird, wurde die Metabolisierung von Anthocyanidinen unter physiologischen pH-Bedingungen untersucht. Neben der jeweiligen Spaltung in das Benzoesäurederivat des B-Ringes sowie Phloroglucinessigsäure traten verschiedene Polymerisierungsprodukte auf, deren Strukturen nicht aufgeklärt werden konnten.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die renale Ausscheidung von Anthocyanen bei Ileostomieprobanden nach oraler Applikation von 300 g Heidelbeeren über einen Zeitraum von acht Stunden untersucht. Es zeigte sich, dass ein Stoma des terminalen Ileums keinen Einfluss auf die Absorption und Metabolisierung der Anthocyane hatte. Die Bilanzierung der Anthocyane im Urin erfolgte als Äquivalente von Malvidin-3-O-glukosid, da nicht alle Anthocyanmetabolite zur Verfügung standen. Der Zeitpunkt der maximalen renalen Anthocyanausscheidung sowie die Menge der ausgeschiedenen Anthocyane waren starken interindividuellen Schwankungen unterworfen. Das Ausscheidungsmaximum (t_{\max}) lag zwischen 0,5 und zwei Stunden. Bei der ausgeschiedenen Menge wurden Werte zwischen 0,007% und 0.019% der aufgenommenen Anthocyane ermittelt.

Aufgrund der literaturbekannten Unterschiede zwischen den in Serum und Urin gefunden Anthocyanmengen ist davon auszugehen, dass es nach Anthocyanverzehr zu Interaktionen mit Proteinen in Blut oder Geweben kommt. Mittels Blutfraktionierung wurde das humane Serumalbumin (HSA) als wichtigster Bindungspartner der Anthocyane im Blut identifiziert. Anhand spektroskopischer Methoden war es möglich, die Bindungsparameter zu berechnen. Als Bindungsort wurde der hydrophile Eingang der lipophilen Warfarin-Bindungstasche in der Subdomäne IIA des HSA-Moleküls mittels "molecular modelling" identifiziert. Nasschemische Untersuchungen ergaben, dass die Bindung der Anthocyane an HSA diese vor ihrem pH-abhängigen Abbau schützt. Eine signifikante Herabsetzung der chemischen Abbaugeschwindigkeit konnte auch für bovines Serumalbumin beobachtet werden. Diese Erkenntnis ließ sich auf andere, mit dem HSA-Molekül nicht strukturell verwandte lebensmittelrelevante Albumine übertragen. So zeigten Anthocyane große Stabilität in Milch und Eiklar, wobei die Stabilisierung auf eine Wechselwirkung mit den Proteinen Laktalbumin und Ovalbumin zurückgeführt werden konnte.

Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse hinsichtlich Absorption, Metabolisierung und systemischer Verfügbarkeit im menschlichen Organismus leisten einen Beitrag zum besseren Verständnis der Wirkungen von Anthocyanen. Die neuen Erkenntnisse der Proteinbindung sind vor allem für die Bewertung der Verfügbarkeit der Anthocyane in humanem Gewebe relevant.

Summary

Identification and structural analysis of anthocyanins and their metabolites was conducted by High-Performance-Liquid-Chromatography-Diode-Array-Detection-Electrospray-Tandem-Mass-Spectrometry (HPLC-DAD-ESI-MS/MS). Quantitative analyses were realized via HPLC-DAD. The required reference compounds were isolated by preparative HPLC from blueberries (purity from 85.8% to 99.4%). The content of anthocyanins in the analysed blueberries was approximately 6 g/kg. Regarding the quantitative distribution, delphinidin and cyaniding glycosides dominated, followed by malvidin, petunidin and peonidin glycosides. Regarding the conjugated sugar rests, glucose and galactose were most abundant with the content of arabinosides being much lower.

When ingested orally the anthocyanins first come into contact with saliva. For this reason the effect of saliva on blueberry anthocyanins was analysed in *ex vivo* studies over a (unphysiologically long) period of up to 30 minutes. With this study, in particular, the influence of the pH-value on the stability of the anthocyanins was shown.

For the simulation of the behaviour of anthocyanins in the stomach, the individual blueberry anthocyanins were incubated for four hours with artificial gastric juice (pH 1.81). Under these conditions all analysed components were found to be stable.

The subsequent studies with simulated duodenal fluid (pH 7.2) over a period of 24 hours revealed, that the anthocyanins were modified differently. Under the weak alkaline conditions, especially the delphinidin glycosides were degraded quickly, but the other anthocyanins were also not stable under these conditions; no anthocyan was detectable after 24 hours.

To analyse the metabolism processes of anthocyanins in the small and large intestines, *ex vivo* incubations of fresh ileostoma and colostoma bag contents were conducted. Whilst the degradation rates of the anthocyanins in the ileal liquid were dependent on the pH stability of the aglycons, only the arabinosides were detectable in small concentrations after one hour in the large intestine (colostoma incubations). Most of the glucosides and galactosides were degraded completely at this timepoint.

As it is supposed that the anthocyanins are cleaved in the colon, the metabolism of anthocyanidins under physiological pH-values were analysed. Next to the respective cleavage into the benzoic acid derivative of the B-ring and phloroglucin acetic acid,

different polymerisation products were found, whose structure could not be determined.

In a further trial the renal excretion of anthocyanins in ileostoma patients after oral application of 300 g blueberries over a period of eight hours was determined. It was shown that the ileostoma handicap had no influence on the absorption and metabolism of anthocyanins. The quantification of anthocyanins in the urine samples were calculated as malvidin-3-O-glucoside equivalents, as not all anthocyan metabolites were available. The point of time of the maximum renal anthocyan excretion as well the amount of excreted anthocyanins underwent strong interindividual variations. The highest excretion (t_{max}) was between 0.5 and two hours. Values of 0.007% and 0.019% of the anthocyan uptake were recovered in the excreted material.

Due to the differences known from literature between the amounts of anthocyanins found in serum and urine, it has to be assumed that there are interactions with proteins in the blood or tissue after anthocyan consumption. By fractionating blood, the human serum albumin (HSA) was identified as the most important binding partner for anthocyanins in blood. Using spectroscopic methods it was possible to calculate the binding parameters. With 'molecular modelling' the hydrophilic entrance of the lipophilic warfarin binding pocket in the subdomain IIA of the HSA molecule was identified as binding position. Chemical analyses showed that the binding of anthocyanins to HSA protected these from their pH-dependent degradation. A significant lowering of the chemical degradation velocity could also be observed for bovine serum albumin. This knowledge could be related to other, not structurally related food relevant albumins. Anthocyanins showed thus a large stability in milk and egg white, where the stabilising effect could be related to interactions with the proteins lactalbumin and ovalbumin.

The novel information provided by this work regarding absorption, metabolism and systematic availability in the human organism leads to a better understanding of the effects of anthocyanins. The data of protein binding is particularly relevant for the assessment of the availability of anthocyanins in human tissues.

1 Einleitung und Zielsetzung

Anthocyane sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Sie kommen in nahezu allen roten, blauen und schwarzen Beeren wie beispielsweise Weintrauben, Holunderbeeren, Erdbeeren, Himbeeren, Johannisbeeren und Heidelbeeren vor. Daneben enthalten auch andere Lebensmittel wie Wein, Fruchtsäfte, Auberginen oder Rotkohl größere Mengen an Anthocyanen (Clifford 2000). Aufgrund ihrer weiten Verbreitung dürfte die tägliche Aufnahme der Anthocyane mit der Nahrung höher als bei anderen Flavonoiden sein. In den USA wird die tägliche Pro-Kopf-Dosis auf 180 bis 250 mg geschätzt, wohingegen man bei den übrigen Flavonoiden von 20 bis 25 mg täglich ausgeht (Hertog *et al.* 1993). Ungefähr die Hälfte der natürlich vorkommenden Anthocyane sind Glykoside des Cyanidins. Andere wichtige Aglykone (Strukturen siehe Abbildung 1.1) sind Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin, Peonidin und Petunidin, welche in aller Regel in Position 3 und/oder 7 mit Arabinose, Glukose oder Galaktose glykosiliert sind (Zhang *et al.* 2005).

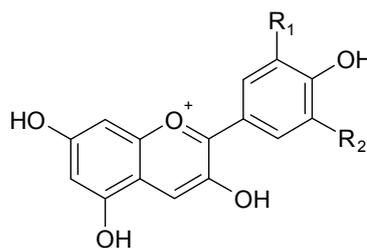


Abbildung 1.1: Struktur von Anthocyanidinen ($R_1/R_2=H$: Pelargonidin; $R_1=OH$, $R_2=H$: Cyanidin; $R_1/R_2=OH$: Delphinidin; $R_1=OCH_3$, $R_2=H$: Peonidin; $R_1=OCH_3$, $R_2=OH$: Petunidin; $R_1/R_2=OCH_3$: Malvidin).

In der Literatur wurden viele positive Effekte von Anthocyanen auf die menschliche Gesundheit beschrieben. Eine Reihe von *in vitro*-Studien zeigten, dass Anthocyane als Antioxidantien in der Lage sind, freie Radikale abzufangen (Wang *et al.* 1997). Außerdem wurden positive Wirkungen auf koronare Herzerkrankungen nachgewiesen (Tsuda *et al.* 1996, Satué-Gracia *et al.* 1997). Epidemiologische Studien wiesen auf ein vermindertes Krebsrisiko bei Personen mit hoher täglicher Anthocyanaufnahme hin (Adlercreutz 1998, Almendingen *et al.* 2004). *In vitro*-Studien zeigten des Weiteren positive Effekte von Anthocyanen auf nahezu alle bekannten Tumorzellen (Cooke *et al.* 2005).

Die Verfügbarkeit von Anthocyanen im Dickdarm nach dem Verzehr von Heidelbeeren ist von Kahle *et al.* (2006) untersucht worden. Daneben liegen auch Informationen über das Vorkommen von Anthocyanen im Blut bzw. deren Ausscheidung über den Urin vor (Clifford 2000, McGhie und Walton 2007). Für einige Anthocyane bzw. Anthocyanextrakte wurde bereits das Verhalten in verschiedenen humanen Körperflüssigkeiten untersucht

(Pérez-Vicente *et al.* 2002, Bermúdez-Sonto *et al.* 2006, Mc Dougall *et al.* 2007, Knaup 2008, Wiese *et al.* 2009). Diese Einzeluntersuchungen durch eine Gesamtanalyse zu ergänzen, war das Ziel der vorliegenden Arbeit. Hierzu war das Verhalten der Anthocyane im Gastrointestinaltrakt (Speichel, Magensaft, Duodenalsekret, Dünn- und Dickdarminhalt) mittels *ex vivo*- und *in vitro*-Studien am Beispiel von Heidelbeer-Anthocyanen zu untersuchen. Außerdem erfolgten Studien zur Verfügbarkeit der Anthocyane im systemischen Blut sowie zur renalen Exkretion.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden die Wechselwirkungen zwischen Anthocyanen und Proteinen untersucht, da es aus früheren Studien Hinweise auf Interaktionen von Anthocyanen mit Proteinen gab. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit durch spektroskopische Methoden sowie 'molecular modelling' die Bindung verschiedener Anthocyane an humanes Serumalbumin (HSA) untersucht. Außerdem wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Wechselwirkungen von Anthocyanen mit Proteinen wie HSA, BSA, Hämoglobin, Ovalbumin oder Laktalbumin die Stabilität der Anthocyane unter verschiedenen pH-Bedingungen beeinflussen.

2 Kenntnisstand

2.1 Heidelbeeren

Die Heidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.) gehört zur Familie der Heidekrautgewächse (*Ericaceae*). Neben der in Europa und Asien ursprünglich heimischen Heidelbeere oder Blaubeere gehören der Gattung unter anderem auch die Preiselbeere (*Vaccinium vitis-idaea* L.), die Rauschbeere (*Vaccinium uliginosum* L.) sowie die in Nordamerika heimischen Arten „northern highbush blueberry“ (*Vaccinium corymbosum* L.) und „low-bush blueberry“ (*Vaccinium augustifolium*) an. Bei der in heimischen Gärten und Supermärkten weit verbreiteten Kulturheidelbeere handelt es sich zumeist um Züchtungen oder Kreuzungen der beiden letztgenannten Arten. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die Taxonomie der Heidelbeere (Franke *et al.* 2007).

Tabelle 2.1: Taxonomie der Heidelbeere.

Abteilung	Bedecktsamer (<i>Magnoliophyta</i>)
Klasse	Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige (<i>Rosopsida</i>)
Unterklasse	Asternähnliche (<i>Asteridae</i>)
Ordnung	Heidekrautartige (<i>Ericales</i>)
Familie	Heidekrautgewächse (<i>Ericaceae</i>)
Gattung	Heidelbeeren (<i>Vaccinium</i>)
Art	Heidelbeere (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)

Der zehn bis 60 Zentimeter hohe Zwergstrauch wächst vor allem in Kiefern und Fichtenwäldern von der Ebene bis ins Gebirge. Die Früchte der Heidelbeere erreichen zur Erntezeit von Juli bis September einen Durchmesser von bis zu einem Zentimeter und sind schwarzblau gefärbt und gereift (Häupler und Muer 2007). Sie sind abgeplattet rund geformt und bestehen u. a. zu 85% aus Wasser, zu 6% aus Zucker, zu 5% aus Ballaststoffen, zu 1,4% aus Fruchtsäuren (vor allem Äpfelsäure) und beinhalten bis zu 0,7% Anthocyane (Souci *et al.* 2004).

Die Vermehrung der Heidelbeersträucher erfolgt in der Natur sowohl durch Samen als auch vegetativ durch unterirdische Ausläufer.

In Deutschland spielt das gewerbliche Sammeln von Heidelbeeren aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes keine Rolle mehr. Die Früchte werden tiefgefroren, getrocknet oder als Konserven aus Österreich, Polen oder dem Balkan importiert (Franke *et al.* 2007).

2.2 Anthocyane

2.2.1 Chemische und ernährungsphysiologische Einordnung

2.2.1.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Alle Pflanzeninhaltsstoffe werden aufgrund ihrer Funktion im pflanzlichen Stoffwechsel in primäre und sekundäre Stoffe eingeteilt. Primäre Pflanzenstoffe wie Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Vitamine, Mineralstoffe und Wasser sind am Energiestoffwechsel sowie am Aufbau der Zellen beteiligt. Die im Sekundärstoffwechsel gebildeten Pflanzenstoffe bestehen aus einer Fülle chemisch sehr unterschiedlicher Verbindungen. Sie kommen nur in geringen Mengen vor und liefern keine Energie. Meist sind sie biologisch aktiv und werden von der Pflanze u. a. als Abwehrstoffe gegenüber Schädlingen und Krankheiten, als Wachstumsregulatoren sowie als Lock- und Duftstoffe synthetisiert. Ihre tägliche Aufnahme mit der menschlichen Nahrung ist individuell sehr unterschiedlich und wird bei einer gemischten Kost auf ungefähr 1,5 g geschätzt (Watzl und Leitzmann 1999).

Bis Ende der 1980er Jahre galten die sekundären Pflanzenstoffe wie beispielsweise Polyphenole als unverdaulich oder nicht resorbierbar. Man versuchte deshalb durch Züchtung den Anteil dieser Substanzen in den Nahrungspflanzen zu verringern. Seitdem hat jedoch eine Neubewertung deren gesundheitlicher Bedeutung stattgefunden. Mittlerweile werden ihnen vielfältige gesundheitsfördernde Wirkungen zugeschrieben. So sollen sie u. a. antikanzerogene, antimikrobielle, antioxidative, antithrombotische, immunmodulatorische, entzündungshemmende, blutdruckbeeinflussende, blutglucosebeeinflussende Eigenschaften aufweisen (Watzl und Leitzmann 1999, Scalbert *et al.* 2005a, Scalbert *et al.* 2005b).

2.2.1.2 Polyphenole

Zur Gruppe der Pflanzenpolyphenole zählt man mehrere tausend Verbindungen. Sie werden in vier Gruppen unterteilt: Phenolcarbonsäuren, Lignane, Stilbene und Flavanoide. Unter den Phenolcarbonsäuren sind vor allem hydroxylierte Derivate der Benzoe- und Zimtsäure zu nennen, wobei letztere mengenmäßig vorherrschen. In der Natur kommen sie in nahezu allen Pflanzen vor allem glykosiliert oder mit organischen Säuren wie China-, Shikimi- und Weinsäure verestert vor.

Lignane hingegen bestehen aus zwei Phenylpropaneinheiten. Daraus ergibt sich ein C₆-C₃-C₃-C₆-Gerüst; Hauptlieferant in der humanen Ernährung ist die Linse.

Der bekannteste Vertreter der Stilbene ist das Resveratrol, das in Weintrauben und daraus hergestellten Produkten vorkommt, und ein C₆-C₂-C₆-Gerüst besitzt. Neben vielen

anderen Effekten wird es auch für das sogenannte „French Paradoxon“, welches sich als Schlagwort für die im Vergleich mit nördlicheren Regionen geringere Häufigkeit von Herz-Kreislauf-Erkrankungen im südlichen Frankreich eingebürgert hat, verantwortlich gemacht (Simini 2000, Ferrires 2004).

2.2.1.3 Flavonoide

Mit mehr als 9000 Verbindungen sind die Flavonoide die in höheren Pflanzen mengenmäßig am häufigsten vorkommenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Diese Gruppe steht derzeit im Focus der Forschung, was daran zu erkennen ist, dass allein in den Jahren von 1999 bis 2004 mehr als 450 neue Flavonoide in der Literatur beschrieben wurden (Williams und Grayer 2004).

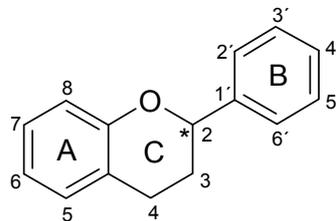


Abbildung 2.1: Grundstruktur der Flavonoide (2-Phenylbenzodihydropyran).

Das C₆-C₃-C₆-Grundgerüst der Flavonoide ist das Flavan (2-Phenylbenzodihydropyran), welches aus zwei aromatischen Ringen A und B und einem heterozyklischen C-Ring besteht. Die Nummerierung der einzelnen Kohlenstoffatome ist fortlaufend (siehe Abbildung 2.1).

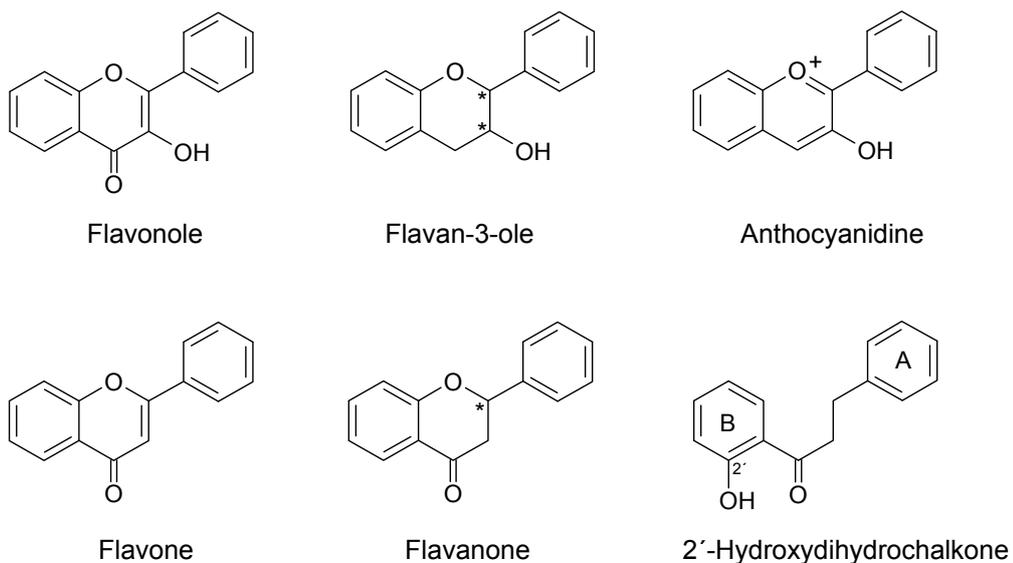


Abbildung 2.2: Strukturmerkmale ausgewählter Flavonoidunterklassen.

Basierend auf dem Oxidations- und dem Sättigungsgrad der Kohlenstoffatome im C-Ring werden die Flavonoide in weitere Untergruppen eingeteilt. Wichtige Untergruppen sind die Flavonole (3-Hydroxy-4-oxoflav-2-ene), die Flavan-3-ole (3-Hydroxyflavane) und deren Polymere die Proanthocyanidine (ohne Abbildung), die Anthocyanidine, die Flavone (3-Oxoflav-2-ene), die Flavanone (4-Oxoflavane) sowie aus der Gruppe der Chalkone die Dihydrochalkone (Abbildung 2.2, He und Giusti 2010).

In der Heidelbeere kommen verschiedene Vertreter dieser Gruppen vor. Neben Flavonolen wie dem Quercetin, phenolischen Säuren wie Kaffee-, Protocatechur- und Vanilinsäure kommen auch verschiedene Anthocyane und Proanthocyane vor (Koli *et al.* 2010). Da in der vorliegenden Arbeit ausschliesslich mit Anthocyanidinen und deren Glykosiden, den Anthocyanen, gearbeitet wurde, sollen diese nun näher vorgestellt werden.

2.2.1.4 Anthocyane

Die Anthocyane bilden mit über 500 Verbindungen die größte Gruppe an wasserlöslichen Pigmenten im Pflanzenreich (Cooney *et al.* 2004). Der Name leitet sich von *anthos* (griech. Blüte) und *kyanos* (griech. blaue Farbe) her. Im deutschen Sprachgebrauch bezeichnet man Anthocyanidinglykoside als Anthocyane. Diese weisen bei sehr niedrigen pH-Werten eine positive Ladung am Sauerstoffatom des C-Rings auf (Flavyliumkation), was sie von allen anderen Flavonoiden unterscheidet. In der Pflanze ist Chlorid meist das Gegenion zum Flavyliumkation. Man spricht daher bei den Salzen von Flavyliumchloriden.

Anthocyane unterscheiden sich zum einen im Substitutionsmuster des B-Ringes sowie in den verschiedenen Glykosilierungen des A- und C-Ringes (vgl. Abbildung 1.1). Der Zuckerrest ist bei den Anthocyanen einiger Pflanzen auch mit Hydroxyzimtsäuren, Essig-, Oxal- oder Malonsäure acyliert.

Am häufigsten kommen in der Natur die Anthocyane vor, die Pelargonidin, Cyanidin, Peonidin, Delphinidin, Petunidin oder Malvidin als Aglykon (Anthocyanidinbestandteil des Anthocyan) tragen. Als Zuckerrest treten vor allem die Monosaccharide Glukose, Galaktose und Arabinose sowie das Disaccharid Rutinose (6-O- α -L-Rhamnosyl-D-glucose) auf (Clifford 2000, Kowalczyk *et al.* 2003).

Anthocyane kommen in Gehalten bis zu 10 g/kg Frischgewicht in der täglichen Nahrung vor. Sehr hohe Anteile besitzen Heidelbeeren, Holunderbeeren, die Früchte der Aronia sowie Brombeeren. Bei den Gemüsen ist vor allem die Schale der Aubergine zu nennen, in der hohe Gehalte an Anthocyanen gefunden werden. Bei der Aufnahme von Anthocyanen mit der Nahrung spielt vor allem die rote Weintraube eine große Rolle, da große Mengen an roten Trauben, vor allem in Form von Wein, konsumiert werden.

Die Aufnahme der Anthocyane durch die Nahrung ist höher als diejenige anderer Flavonoide (Talavera *et al.* 2005). Die Menge schwankt individuell stark, da sie sehr von den Vorlieben in der Ernährung abhängig ist. In der Literatur wird von einer täglichen Aufnahme von 12,5 mg bis zu 250 mg in den USA (Hertog *et al.* 1993, Wu *et al.* 2006) angegeben. Die für Europa ermittelten Werte weichen nicht so stark voneinander ab und werden mit 75 bis 150 mg/Tag angegeben (Dragsted *et al.* 1996, Heinonen 2007).

Die Anthocyane sind tiefrot bis blau gefärbt. Mit zunehmendem Grad der Hydroxylierung kommt es zu einer Blau-, zunehmende Glycosylierung und Methylierung führen zu einer Rotverschiebung. Außerdem wird die Farbe durch die Anwesenheit von komplexbildenden Kationen und durch den pH-Wert beeinflusst. Die pH-Wert abhängige Farb- und Strukturänderungen sind in Abbildung 2.3 dargestellt.

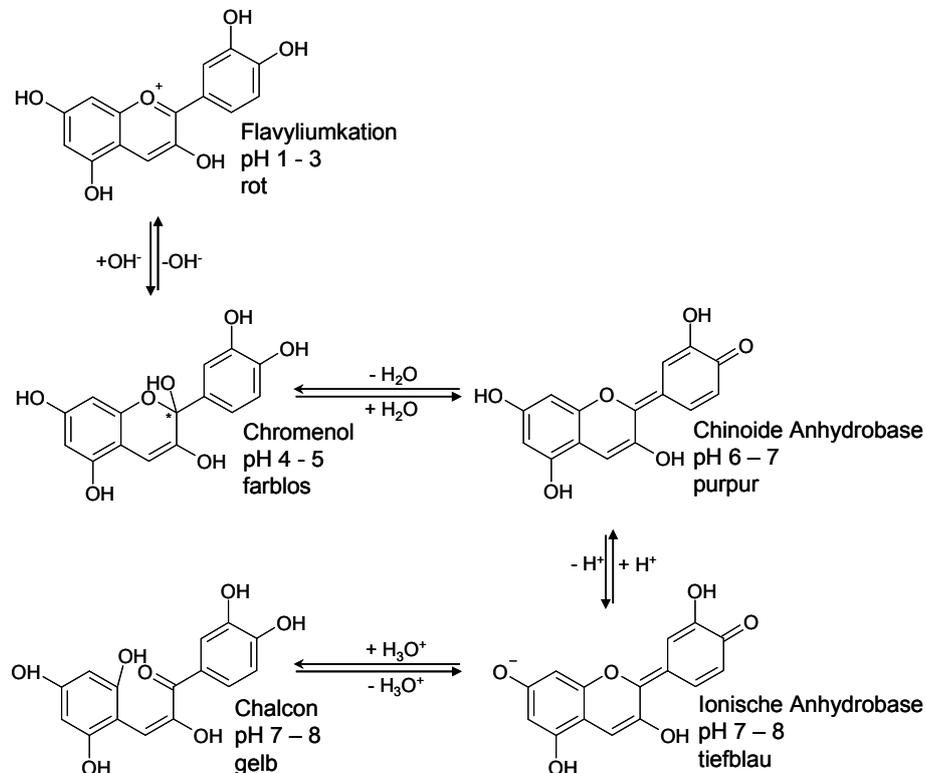


Abbildung 2.3: pH-Abhängigkeit der Struktur und Farbe von Cyanidin als Beispiel für die übrigen Anthocyanidine (Belitz *et al.* 2001).

Die im Neutralen und Alkalischen entstehenden Strukturen sind hochgradig instabil und zerfallen oder polymerisieren. Außer durch die Acidität wird die Stabilität auch durch das Vorkommen von Kationen, die Temperatur und die Anwesenheit von Proteinen beeinflusst (Viljanen 2005). Der genaue Mechanismus des Abbaus von Anthocyanen im wässrigen alkalischen Medium wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Weitgehende Anerkennung fand die in Abbildung 2.4 dargestellte Molekülsplaltung (Jurd 1972). Nach neueren Erkenntnissen ist der Abbau zu einfachen phenolischen Säuren und zu Phloroglucin-

acetaldehyd aber nur für einen geringen Teil der Anthocyanmenge zutreffend (Ichiyanagi *et al.* 2007).

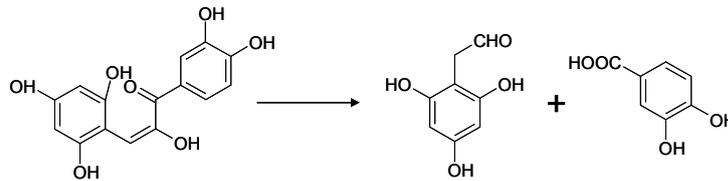


Abbildung 2.4: Abbau von Cyanidin ausgehend von der Chalconform in Phloroglucinacetaldehyd und Protocatechursäure (nach Jurd 1972).

Einen größeren Anteil scheinen polymere Produkte zu haben, die allerdings bis heute nicht charakterisiert wurden. Aufgrund der strukturellen Unkenntnis der Produkte sind auch der Mechanismus des Abbaus sowie die Wirkung der Abbauprodukte auf den humanen Organismus unklar. Bislang wurden nur molare Massen sowie Fragmentierungsmuster von Dimeren publiziert (Fleischhut *et al.* 2006).

2.2.2 Biosynthese und Funktion von Anthocyanen in Pflanzen

Die Biosynthese von Anthocyanen findet, wie die Biogenese aller Polyphenole, im Cytoplasma der Zelle unter Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums statt (Fritsch und Grisebach 1975). Zunächst wird Phenylalanin in Gegenwart der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase zu *trans*-Zimtsäure desaminiert (Schuster und Retey 1995). Aus dieser entstehen durch sequentielle enzymatische Hydroxylierungs- und Methylierungsreaktionen die Hydroxyzimtsäuren wie z.B. die *p*-Cumarsäure. Diese ist zentraler Baustein der Flavonoidbiosynthese, da sie als Coenzym A-Ester unter Katalyse der Chalkonsynthase mit drei Malonyl-CoA-Einheiten zum Naringeninchalkon kondensiert. Dieses wird mittels Chalkonisomerase in (2S)-Naringenin überführt. Hieraus entstehen durch verschiedene Oxidations-, Hydroxylierungs- und Reduktionsvorgänge neben den Anthocyanen auch die unterschiedlichen übrigen Flavonoidunterklassen (Saito *et al.* 1999, Jaakola *et al.* 2002)

Anthocyane haben in der Pflanze im Wesentlichen drei Hauptaufgaben. Genau wie andere Flavonoide schützen sie die Pflanze vor oxidativem Stress, indem sie freie Radikale, insbesondere radikale Sauerstoffspezies abfangen können. Des Weiteren schützen sie die Proteine und die DNA der Pflanze vor ultravioletter Strahlung, die Proteine und DNA schädigen könnte. Vor allem aber dienen die Anthocyane der Fortpflanzung, da die Verbindungen aufgrund ihrer intensiven Färbung pollensammelnde Insekten anlocken, welche die Fruchtblände bestäuben. Außerdem locken stark gefärbte Früchte Tiere an, die nach dem Verzehr die unverdaulichen Samen von der „Mutter-

pflanze“ entfernt ausscheiden und so zur Verbreitung der Art beitragen (Harborne und Williams 2000, Kondo und Kawashima 2000).

2.2.3 Ernährungsphysiologische Bedeutung von Polyphenolen

Vor allem in den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts zeigten epidemiologische Studien protektive Effekte von Obst und Gemüse bei der Prävention von Krebserkrankungen (Steinmetz und Potter 1991, Steinmetz und Potter 1996) sowie kardiovaskulären Erkrankungen (Serdula *et al.* 1996, Ness und Powles 1997). Diese Wirkungen werden sekundären Pflanzenstoffen, insbesondere den Anthocyanen und anderen Polyphenolen, zugeschrieben. Aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften sollen die Polyphenole oxidative Schäden an Biomolekülen wie DNA, Lipiden und Proteinen verhindern, auf welche die oben genannten Erkrankungen häufig zurückgeführt werden. In den Medien wurde vor allem das „French Paradoxon“ diskutiert, d.h. der Widerspruch, dass in Südfrankreich trotz eines im Vergleich zu den Bewohnern anderer Staaten hohen Verzehrs an gesättigten Fettsäuren seltener über koronare Herzerkrankungen berichtet wurde. Dies hat man u. a. auf den hohen pro Kopf Verbrauch von Rotwein zurückgeführt. Als potentiell verantwortliche Inhaltsstoffe des Rotweins werden neben Resveratrol vor allem Anthocyane und Proanthocyanidine vermutet (Ferreiros 2004, Simini 2000). Im Folgenden wird auf verschiedene gesundheitsförderliche Wirkungen der Anthocyane näher eingegangen.

2.2.3.1 Antioxidative Eigenschaften

Der menschliche Organismus unterliegt ständig dem Einfluss reaktiver Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies (reactive oxygen/nitrogen species, ROS bzw. RNS). Diese werden zum einen dem Körper exogen durch Zigarettenrauch, UV-Strahlung und Chemikalien zugeführt (Kohen und Nyska 2002), zum anderen sind sie aber auch das Produkt normaler Zellaktivität. Sie werden in den Phagozyten bei immunologischen Vorgängen zur Abwehr von Mikroorganismen freigesetzt oder entstehen in den Mitochondrien bei der Zellatmung bzw. beim Abbau von DNA-Basen. Auch aktive Cytochrom-P450 Enzyme tragen zur zelleigenen ROS- und RNS-Bildung bei (Sies 1991, Kohen und Nyska 2002). Zu den reaktiven Verbindungen zählen zum einen freie Radikale wie das Hydroxylradikal, das Stickstoffdioxidradikal oder das Superoxidradikalanion, zum anderen aber auch nichtradikalische Verbindungen wie Wasserstoffperoxid, Singulett-Sauerstoff oder Peroxynitrit, die im weiteren Verlauf Radikale freisetzen können (Eisenbrand und Metzler 2005). So bildet sich aus Wasserstoffperoxid unter Einwirkung von körpereigenen, redoxaktiven Metallionen, wie zum Beispiel Eisen oder Kupferionen, ein Hydroxylanion

und ein Hydroxylradikal, von denen letzteres die wichtigste und reaktivste Sauerstoffspezies im menschlichen Organismus darstellt (Sies 1991).

Entstehende Radikale werden zumeist durch zelleigene antioxidative Abwehrmechanismen deaktiviert. Dies kann durch eine Reihe von Enzymen wie Superoxid-dismutase, Glutathionperoxidase oder Katalase erfolgen. Aber auch nichtenzymatische Systeme bauen freie Radikale ab. Hierzu zählen niedermolekulare Substanzen, die entweder im Körper synthetisiert werden (Glutathion, Harnsäure u. a.) oder über die Nahrung in den Körper gelangen (Tocopherole, Ascorbinsäure, Carotinoide) (Finkel und Holbrook 2000). Bei einem Übergewicht prooxidativer Prozesse spricht man von oxidativem Stress, bei dem es zu oxidativen Schädigungen von DNA, Proteinen und Zellmembranlipiden kommen kann. Dies wird für viele Erkrankungen wie Herz-Kreislauf-erkrankungen, Parkinson, Krebs, entzündliche Darmerkrankungen, Diabetes und Alzheimer, welche alle aktuell im wissenschaftlichen Fokus stehen, verantwortlich gemacht (Aruoma 1999, Halliwell 1996, Behl und Moosmann 2002, LeWitt und Taylor 2008, Nizamutdinova *et al.* 2009).

Auch mit der Nahrung zugeführte Polyphenole besitzen die Fähigkeit, durch Abgabe von Wasserstoffatomen aus den phenolischen Hydroxylgruppen radikalische Sauerstoff- und Stickstoffspezies abzufangen. Dies stellt den Schwerpunkt ihrer antioxidativen Aktivitäten dar. Das intermediär auftretende Polyphenolradikal ist im Vergleich zu den freien Radikalen weit weniger aktiv (Bors *et al.* 1997) und kann durch Reaktion mit weiteren Radikalen in die stabile Chinonstruktur übergehen (Pietta 2000). Außerdem besitzen viele Polyphenole orthoständige Hydroxygruppen, mit denen sie in der Lage sind, Metallionen zu komplexieren. Die geringere Konzentration von freien Metallionen führt dazu, dass beispielsweise Wasserstoffperoxidmoleküle langsamer zu Hydroxidradikalen abgebaut werden und so verstärkt mittels Katalase zu Sauerstoff und Wasser umgesetzt werden können (Belitz *et al.* 2001).

Die Eigenschaft, freie Radikale abzufangen, besitzen grundsätzlich alle Flavonoide. Allerdings gibt es verschiedene strukturelle Voraussetzungen, die diese Eigenschaft verstärken. Hier sind vor allem orthoständige Hydroxygruppen am B-Ring, eine Doppelbindung zwischen C2 und C3, eine freie Hydroxygruppe an C3, sowie eine Carbonylgruppe an C4 zu nennen. Nur die Flavonole erfüllen alle diese Strukturvoraussetzungen. Anthocyane, denen die Carbonylgruppe am C-Ring fehlt, haben ein sehr viel kleineres antioxidatives Potential (Yamada *et al.* 1999).

2.2.3.2 Antiinflammatorische Eigenschaften von Anthocyanen

Eine Entzündung des Gewebes ist die Antwort des Organismus auf einen schädigenden Reiz, um Schäden zu reparieren. Bei der Art des auslösenden Reizes unterscheidet man

zwischen den physikalischen Reizen wie Strahlung, extreme Temperatur, Druck, Fremdkörper oder Verletzungen, den chemischen Reizen wie Allergene, Toxine, Säuren oder Laugen und biologischen Reizen wie Viren, Bakterien oder Pilzen. Das Gewebe reagiert auf die Reizung mit Adrenalinausschüttung, was zunächst zu einer kurzen Unterversorgung mit Blut führt, die aber schnell in eine lokale Überversorgung übergeht. Die Permeabilität der Gefäßwände wird hormonell erhöht, so dass Plasmaproteine in das Gewebe einströmen können. Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten nehmen den Fremdkörper dann auf. Auf molekularer Ebene sind hier besonders der Transkriptionsfaktor NF- κ B, der durch virale und bakterielle Reize aktiviert wird, und die Cyclooxygenase 2 (COX-2), die für die Prostaglandinbildung verantwortlich ist, zu nennen. Die Konzentration dieser beiden Faktoren ist bei Entzündungen stark erhöht (Koolman und Röhm 1998, Löffler und Petrides 1998).

In zahlreichen *in vitro*-Tests hat man gezeigt, dass Anthocyane in der Lage sind, die vermehrte Ausschüttung dieser beiden Entzündungsproteine zu unterbinden (Mulabagal *et al.* 2009). Außerdem wurden die verschiedensten Interleukine, die ebenfalls eine wichtige Rolle bei Entzündungen spielen, gehemmt. (Wang und Stoner 2008)

2.2.3.3 Polyphenole und Krebs

Epidemiologische Studien zeigten, dass bei Personen mit einem hohen Konsum an Obst und Gemüse das Risiko, an Krebs zu erkranken, sank (Steinmetz und Potter 1991, Steinmetz und Potter 1996). Aus diesen Daten wurde die These entwickelt, dass nicht-nutritive Inhaltsstoffe der Lebensmittel für diesen vorbeugenden Effekt verantwortlich seien. Antikarzinogene Effekte von Anthocyanen sind sowohl in tierexperimentellen Untersuchungen als auch *in vitro* nachgewiesen worden (Wang und Stoner 2008). Die Substanzen können aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Eigenschaften in alle drei Phasen der Krebsentstehung eingreifen und so eine möglicherweise präventive Wirkung ausüben (Wang und Stoner 2008, Gerhäuser 2008, Thomasset *et al.* 2009).

Krebs bezeichnet im deutschen Sprachgebrauch bösartige Tumore. Diese entstehen, wenn während der Zellteilung der genetische Code der Zelle nicht korrekt übertragen wird. Heute geht man davon aus, dass zunächst ein angeborener oder durch Mutation entstandener Fehler in einem der „Wächtergene“ dafür verantwortlich ist. Diese Gene überwachen das Kopieren der DNA und leiten, falls es zu Veränderungen in der Abfolge der Basenpaare kommt, entweder eine Reparatur oder den programmierten Zelltod der betroffenen Zelle ein. Wenn diese Mechanismen versagen, können die unkorrekt kopierten Basen zu einem beschleunigten Zellwachstum führen und so einen Tumor bilden. Im weiteren Verlauf der Krankheit kann es dann zu einer Metastasierung kommen, das heißt die Zellen beginnen, sich auch in anderen Geweben anzusiedeln und dort

unkontrolliert weiterzuwachsen. Zwar versucht das Immunsystem, unkontrolliert wachsende Zellen abzutöten, allerdings werden die dem normalen Gewebe gleichenden Zellen von der körpereigenen Immunabwehr oft nicht erkannt (Koolman und Röhm 1998).

Anthocyane können an mehreren Stellen der Krebsentstehung und des Tumorwachstums wirken. Wie bereits oben beschrieben, haben Anthocyane antiinflammatorische und antioxidative Wirkungen. Somit können sie der Krebsentstehung, die oft durch Entzündungen oder oxidativen Stress verursacht wird, vorbeugen (Prior und Wu 2006). Kritisch zu sehen ist nach Ansicht der Gruppe um Shih, dass Anthocyane den durch Wasserstoffperoxid induzierten programmierten Zelltod verhindert, was die Selbstverteidigung der Zellen gegenüber durch oxidativem Stress verursachten DNA Schäden verhindert (Shih *et al.* 2007).

Auch auf bereits bestehende Krebszellen haben Anthocyane positive Effekte. So wurde in *in vitro*-Testsystemen bewiesen, dass Anthocyane die Zellproliferation erheblich hemmen können. Anthocyanidine zeigten hier einen noch weitaus größeren Effekt als die Glykoside. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass nur Krebszellen im Wachstum gehemmt wurden, auf das Wachstum normaler Gewebezellen hatten Anthocyane keinen Einfluß (Wang und Stoner 2008).

Des Weiteren ergaben *in vitro*-Tests, dass Anthocyane in der Lage sind, die Ausbildung eigener Blutgefäße von Tumoren zu verhindern. Diese neuen Gefäße sind ein entscheidender Faktor für das Tumorwachstum und die Metastasierung, da das erkrankte Gewebe durch eigene Blutgefäße besser mit Sauerstoff und Energie versorgt wird. Ebenso wurde die Durchlässigkeit der Zellmembranen von nicht erkrankten Zellen durch Anthocyane für Tumorgewebe verringert, was ein Einwachsen von erkranktem Gewebe in den gesunden Zellverband verhindert. Ein mit gesundem Gewebe fest verwachsener Tumor ist kaum noch operabel. Auch konnten Antocyanextrakte bei vielen Krebszelllinien den programmierten Zelltod wiederherstellen. Dieses Verteidigungsinstrument der Zelle lässt Zellen bei Mutationen, die nicht durch sonstige Mechanismen korrigiert werden können, absterben (Wang und Stoner 2008). Die genauen Mechanismen konnten nur selten aufgeklärt werden.

Bei den bislang durchgeführten Tierversuchen konnten zwar häufig positive Effekte auf den Krankheitsverlauf gezeigt werden, allerdings steht auch hier eine genaue Aufklärung der Mechanismen noch aus. Für die Studien wurden entweder Tiere verwendet, bei denen eine Krebserkrankung z.B. durch das Verabreichen carcinogener Substanzen ausgelöst wurde, oder die eine genetische Veranlagung für gewisse Krebserkrankungen trugen. Im Experiment hat man gezeigt, dass ein Anthocyanextrakt aus der schwarzen Himbeere, der Ratten mit Speiseröhrenkrebs verabreicht wurde, die Tumorzahl um

ungefähr 45% verringerte (Stoner *et al.* 2007). Ausserdem gibt es Studien, bei denen mittels Antocyanange Darmkrebs bei Tieren eingedämmt werden konnte (Wang und Stoner 2008). Dass diese Angaben aber kritisch gesehen werden müssen, wird an einer Studie von Kang und seinen Mitarbeitern deutlich. Hier wurde die Nahrung von APC (Min) Mäusen, bei denen genetisch verschiedene Darmkrebsarten ausgelöst werden, mit bis zu 3 g/kg Anthocyanen angereichert. Diese Kost konnte die Rate von Blinddarmkarzinomen zwar signifikant um 74% senken, die Anzahl der Dünndarntumore wurde aber nur um 30% und die der Kolonkarzinome nur um 17% reduziert. Die Daten der Dünn- und Dickdarntumore waren allerdings nicht signifikant und könnten genausgut zufällig gewesen sein (Kang *et al.* 2003). Bei Hautkrebs ließ sich sowohl das Auftreten als auch (bei erkrankten Tieren) der Fortschritt der Krankheit vermindern. Bei Lungenkrebs wurden durch das Verabreichen von Anthocyanen das Wachstum und die Metastasierung signifikant gehemmt (Wang und Stoner 2008). Erste Humanstudien zeigten, dass die genannten Effekte jedoch nur zum Teil auf den Menschen übertragbar sind. So ergab beispielsweise eine Supplementierung von Patienten mit Anthocyanen während der Chemotherapie keinen Effekt (Bode *et al.* 1999). Außerdem konnten Anthocyane weder das Risiko an Krebs zu erkranken senken, noch den Tumor in seinem Wachstum hindern (Bosetti *et al.* 2006, Rossi *et al.* 2007). Allerdings berichtete die Gruppe um Wang, dass eine Supplementierung von Darmkrebspatienten mit 60 g getrockneten schwarzen Himbeeren pro Tag die Proliferationsrate der Krebszellen verringerte und den programmierten Zelltod einleitete, wohingegen die getrockneten Früchte keinen Einfluss auf das Wachstum der gesunden Darmzellen hatten (Wang *et al.* 2007). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass eine positive Wirkung bei humanen Krebserkrankungen zwar nicht bewiesen ist, eine Schädigung durch Supplementierung mit Anthocyanen allerdings ausgeschlossen werden kann.

2.2.3.4 Anthocyane und Herz-Kreislaufkrankungen

Die antioxidativen Eigenschaften haben hinsichtlich möglicher protektiver Effekte für koronare Herz-Kreislaufkrankungen ein starkes Interesse erfahren. Epidemiologische Hinweise auf einen risikosenkenden Effekt durch den gemäßigten Verzehr von Rotwein wurden kontrovers diskutiert (Simini 2000, Ferrieres 2004). Die wichtigsten Gründe hierfür werden heute in der verringerten Koagulation der Blutplättchen sowie in einer höheren Durchflussrate von „high-density lipoprotein“ (HDL), welches Cholesterin zum Abbau in die Leber zurücktransportiert und so Arteriosklerose verhindert, gesehen. Für ein vermindertes Atherosklerose-Risiko könnten auch weitere Eigenschaften der Anthocyane, wie das Verhindern von Lipoprotein-oxidation, das Abfangen freier Radikale oder auch die Modulation des Eikosanoid-Metabolismus verantwortlich gemacht werden (Mazza 2008).

In einer Studie von Burns *et al.* hat man die gefäßerweiternden Eigenschaften von Rotwein auf dessen Anthocyangehalt zurückgeführt (Burns *et al.* 2000), während andere Gruppen davon ausgehen, dass neben den Anthocyanen vor allem auch die polymeren Proanthocyanidine einen Einfluß auf die Gefäßerweiterung haben (Andriambelason *et al.* 1998).

2.2.3.5 Weitere gesundheitsfördernde Eigenschaften von Anthocyanen

Neben den oben genannten Effekten zeigen Anthocyane noch weitere positive Eigenschaften auf den humanen Organismus. Hier sind neben den Auswirkungen auf das Sehverhalten vor allem antibakterielle, antivirale und neuroprotektive Effekte zu nennen (Tirupula *et al.* 2010, Krikorian *et al.* 2010). Die antibakterielle Eigenschaft ist lange bekannt; so werden Cranberries in der Naturheilkunde sehr häufig zur Prävention und Therapie von Harnwegsinfektionen eingesetzt (Sobota 1984). In einer Interventionsstudie mit Frauen zeigte sich, dass der Urin nach dem Verzehr von 0,5 L Cranberrysaft die bakterielle Adhärenz von *Escherichia coli*, die Voraussetzung für eine Infektion ist, auf Harnwegsepithelien unterdrückt. Als Wirkstoffe wurden die darin enthaltenen Proanthocyanidine und Anthocyane angenommen (Howell 2002). Eine solche Wirkung wurde auch bei Heidelbeeren nachgewiesen (Schmidt *et al.* 2004). Daneben zeigten Anthocyane bei *in vitro*-Experimenten antibakterielle Eigenschaften sowohl gegenüber grampositiven Bakterien wie *Staphylococcus aureus* und *Bacillus cereus*, als auch gegenüber gramnegativen Mikroorganismen wie *Escherichia coli*. Allerdings konnten bei *Salmonella typhi* Anthocyane das Bakterienwachstum nicht hemmen (Kermanshahi *et al.* 2002).

Bei den antiviralen Effekten ist vor allem die Wirkung auf Inflenzaviren genauer untersucht worden. Hierbei wurden in *in vitro*-Testsystemen IC50-Werte, welche die Konzentration eines Stoffes angeben, bei dem ein Virus halbmaximal gehemmt wird, für einen Anthocyanextrakt aus rotfleischigen Kartoffeln auf den Inflenzavirus A von 48 µg/mL und auf Inflenzavirus B von 54 µg/ml ermittelt (Hayashi *et al.* 2003).

Die beschriebenen positiven Effekte auf das Sehverhalten bzw. die neuroprotektiven Effekte werden vor allem auf die im Abschnitt 2.3.3.1 beschriebenen antioxidativen Eigenschaften zurückgeführt. Sie werden aus diesem Grund an dieser Stelle nicht näher erläutert (Matsumoto *et al.* 2003, Tarozzi *et al.* 2007, He und Giusti 2010).

2.2.4 Anthocyanprofil der Heidelbeere

Wildheidelbeeren sind für ihren hohen Gehalt an Anthocyanen bekannt. Die genaue Höhe ist abhängig von der Sorte, vom Reifezustand der Beeren und von den klimatischen Bedingungen. Aus diesem Grund schwanken die in der Literatur angegebenen Werte zwischen 3,8 g und 6,0 g Anthocyan, bezogen auf ein Kilogramm frische Früchte. In der

Heidelbeere hat man die 3-O- β -D-Glukopyranoside, die 3-O- β -D-Galaktopyranoside und die 3-O- α -L-Arabinopyranoside der Anthocyanidine Cyanidin, Delphinidin, Peonidin, Petunidin und Malvidin nachgewiesen. Insgesamt sind es also 15 verschiedene Anthocyane, deren Gehalte nicht gleichmäßig verteilt sind. Glukoside dominieren mit geringem Abstand vor Galaktosiden; Arabinoside sind nur in viel geringerem Umfang vorhanden. Als Aglykone überwiegen Delphinidin und Cyanidin, wobei auch hier Sorten- und Umwelteinflüsse eine Rolle bei der Verteilung spielen (Ichiyanagi *et al.* 2004, Kähkönen *et al.* 2003, Ogawa *et al.* 2008).

2.3 Physiologie des Menschen: Die Verdauung (Auszüge)

Die Bestandteile der Nahrung können im Allgemeinen in der zugeführten Form nicht vom Organismus aufgenommen werden. Aufgabe der Verdauungsvorgänge im Magen-Darm-Trakt ist es daher, die Nahrungsstoffe zu einer für die anschließende Absorption im Dünndarm geeigneten Form abzubauen. Die Enzyme des Magen-Darm-Traktes spalten die hochmolekularen Verbindungen hydrolytisch in ihre monomeren Bausteine. Diese werden von den Zellen der Dünndarmschleimhaut (Mukosa) absorbiert und gelangen so in die Blutbahn bzw. das Lymphsystem, von wo aus sie über den gesamten Organismus verteilt werden (Löffler und Petrides 1998).

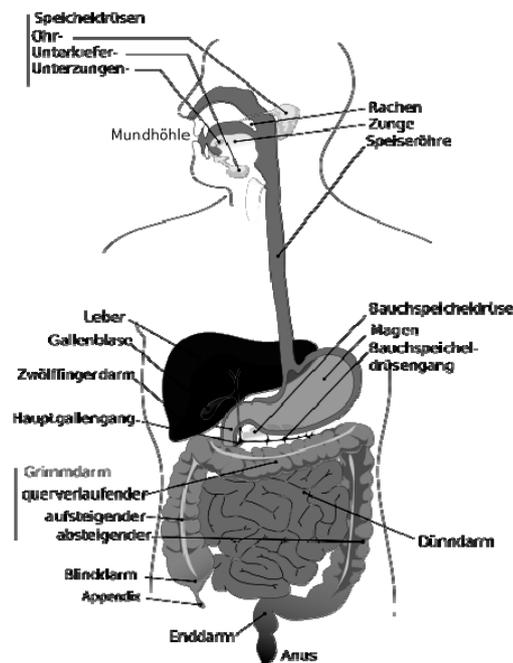


Abbildung 2.5: Übersicht über den menschlichen Verdauungstrakt (Kahle 2008).

Wie aus Abbildung 2.5 zu ersehen ist, gelangt die Nahrung zunächst über die Mundhöhle und die Speiseröhre in den Magen. Von dort wird sie portionsweise in den Dünndarm abgegeben. Im ersten Abschnitt des Dünndarms, dem sogenannten Zwölffingerdarm

(Duodenum), wird der Speisebrei mit den Drüsensekreten der Leber (Gallensaft) und der Bauchspeicheldrüse (Pankreasflüssigkeit) vermischt. Vom Darm werden Nährstoffe, Salze und Wasser ins Blut aufgenommen, und der Rest des Speisebreies wird, zusammen mit Stoffwechselprodukten, über den Enddarm ausgeschieden. Des Weiteren werden Stoffwechselprodukte auch renal, d.h. über den Urin, exkretiert. Hier werden durch die Nieren wasserlösliche Schadstoffe und wasserlösliche Metabolite von wasserunlöslichen Substanzen aus dem Blut gefiltert und verlassen über Blase und Harnleiter den Organismus.

2.3.1 Die Mundhöhle

In den drei großen Mundspeicheldrüsen wird der Speichel (pH-Wert ca. 7) produziert. Je nach Menge und Art der aufgenommenen Nahrung wird pro Tag etwa 1,0 bis 1,5 L Speichelsekret in den Mundraum abgegeben. Obwohl der Speichelfluss nicht hormonell kontrolliert wird, kann er zwischen 0,1 mL/min und etwa 4 mL pro Minute nach maximaler Stimulation variieren (Silbernagl und Despopoulos 2003). Die Speichelproduktion wird durch einen Reflex ausgelöst. Reize sind vor allem Geruch und Geschmack der Speisen sowie der Kauvorgang. Der überwiegende Teil der Speichelsekretion steht unter vegetativer Kontrolle. Sympathikus und Parasympathikus hemmen bzw. aktivieren sie (Faller 1999).

Der Speichel erleichtert das Sprechen, spielt eine wichtige Rolle bei der Geschmackswahrnehmung und leistet auch einen wichtigen Beitrag zur Zahngesundheit (Silbernagl und Despopoulos 2003).

Die Hauptaufgabe des Speichels besteht darin, durch seinen hohen Wassergehalt von 99,5% die trockenen Nahrungsbestandteile während des Kauaktes schluckfähig zu machen. Desweiteren enthält Speichel Proteine wie z.B. Ptyalin, Muzine, Lysozym und Immunoglobulin A. Ptyalin ist eine α -Amylase, die die α -1,4-glycosidischen Bindungen der mit der Nahrung aufgenommenen Kohlenhydratpolymere hydrolysiert. Da das pH-Optimum des Enzyms bei 6,7 liegt und es bei pH-Werten unter 4 schnell inaktiviert wird, kann es bei sehr sauren Lebensmitteln gar nicht und sonst nur im Mund-Rachen-Bereich wirksam sein, da im Magen saure Bedingungen vorherrschen (Löffler und Petrides 1998).

Allerdings reicht bereits eine Hydrolyse von nur 0,1% aller glycosidischen Bindungen in Stärke aus, um deren Partikelgröße um den Faktor 100 zu verringern (Rehner und Daniel 2002). Dadurch kommt es zu einer deutlichen Senkung der Viskosität des Speisebreis, was das Abschlucken erleichtert. Infolge ihrer geringen Aktivität und der kurzen Verweilzeit der Speise in der Mundhöhle spielt Ptyalin nur eine untergeordnete Rolle bei der Verdauung.

Die Muzine sind Glycoproteine mit einem Kohlenhydratanteil von etwa 50%. Sie dienen der Einschleimung der Nahrung, die dadurch gleitfähiger wird und so leichter durch die Speiseröhre transportiert werden kann (Bansil *et al.* 1995).

Immunoglobulin A und Lysozym sind Substanzen, welche Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien angreifen und so den menschlichen Organismus vor körperfremden Mikroorganismen schützen (Horn *et al.* 2005).

Über die sich an die Mundhöhle anschließende Speiseröhre, welche aus einem 25 bis 30 cm langen Muskelschlauch besteht und für die Verdauung keine Rolle spielt, gelangt der Speisebrei in den Magen.

2.3.2 Der Magen

Der Magen dient als Hohlorgan vor allem der vorübergehenden Speicherung der abgeschluckten Nahrung, um sie nach Durchmischung portionsweise in das Duodenum (Zwölffingerdarm) zu entleeren. Außerdem können einige wenige Substanzen, wie beispielsweise die Anthocyane, bereits dort durch die Magenwand absorbiert werden (Bub *et al.* 2001, Passamonti *et al.* 2002, Passamont *et al.* 2005). Das Volumen des Magens beträgt im nüchternen Zustand circa 1,2 L bis 1,6 L. Die Durchmischung des Mageninhalts erfolgt durch Kontraktionen, die vom unteren Korpusbereich ausgehen und im Abstand von etwa 20 Sekunden auftreten. Wenn der Pylorus (Magenpförtner) geschlossen ist, führen die wellenförmigen Bewegungen zu einer Durchmischung des Speisebreis. Dabei wird die Nahrung zermahlen, mit dem Magensaft vermischt und angedaut. Außerdem werden die Nahrungsfette emulgiert.

Wird der Pylorus geöffnet, kommt es aufgrund der kräftigen Kontraktionen zu einer schnellen Entleerung, die sofort wieder einen Verschluss des Pylorus nach sich zieht (Silbernagl und Despopoulos 2003).

Die Nahrung bleibt so lange im Magen, bis sie eine Teilchengröße kleiner 1 mm Durchmesser erreicht hat und fließt dann in den Zwölffingerdarm ab. Die Halbwertszeit der Nahrung im Magen beträgt bei Wasser zehn bis 20 Minuten. Sie erhöht sich für feste Nahrung je nach deren Zusammensetzung auf eine bis vier Stunden, wobei zuerst Kohlenhydrate, dann Proteine und zuletzt Fette abgegeben werden. Die Magenentleerung wird sowohl hormonell als auch vegetativ reguliert (Moore *et al.* 1981, Schmidt *et al.* 2005). Die in der Magenschleimhaut gelegenen Magendrüsen produzieren täglich etwa 2 bis 4 L Magensaft, dessen Bestandteile von verschiedenen sekretorischen Zellen der Magenschleimhaut gebildet werden. Die wichtigsten Inhaltsstoffe des Magensaftes sind neben der für den niedrigen pH-Wert verantwortlichen Salzsäure vor allem die Protease Pepsin und das Glycoprotein Muzin, das den Magen vor Selbstverdauung schützt (Horn *et al.* 2005).

Produktion und Abgabe der Salzsäure sind sehr genau reguliert, um einerseits angebotene Nährstoffe bestmöglich aufzuschließen und um andererseits zu verhindern, dass eine zu starke Säureproduktion bei Nüchternheit zur Schleimhautschädigung führt. Die Signale zur Steigerung der Magensaftproduktion werden vor allem vom vegetativen Nervensystem erzeugt und an die Magenschleimhaut weitergeleitet. Auch das im Magen gebildete Hormon Gastrin ist indirekt an der Magensaftproduktion beteiligt. Dieses wird vor allem bei proteinreicher Nahrung und bei Dehnung des Magens produziert (Löffler und Petrides 1998).

Der pH-Wert im Magen ist im nüchternen Zustand aufgrund der produzierten Salzsäure mit 0,8 bis 2,5 sehr niedrig. Nach Nahrungsaufnahme steigt der pH-Wert in Abhängigkeit von der Pufferkapazität der aufgenommenen Nahrung auf 4,5 bis 6,5. Nach etwa 30 bis 60 Minuten erreicht der pH wieder den Ausgangswert des nüchternen Magens. Der niedrige pH trägt zur Denaturierung der Nahrungsproteine bei und wirkt bakterizid. Die Protease Pepsin ist mit einem pH-Optimum von 1,8 an die Bedingungen im Magen angepasst und spaltet die Proteine in Polypeptide mit Molekülmassen von 600 bis 3000 Dalton (Löffler und Petrides 1998, Rehner und Daniel 2002).

Der Speisebrei wird durch die Kontraktionen der Magenmuskulatur schubweise in den Zwölffingerdarm (Duodenum) befördert und mischt sich dort mit dem duodenalen Verdauungssaft, einer Mischung aus den Sekreten der Schleimhaut (Mukosa) und den Brunner-Drüsen des Duodenums, der Gallenflüssigkeit und dem Pankreassekret.

2.3.3 Das Pankreas

Das Pankreas (Bauchspeicheldrüse; Abbildung 2.6) des Menschen ist ein 70 bis 100 g schweres und 15 bis 20 cm langgestrecktes Organ, das vor allem für die Produktion und Abgabe von Verdauungsfaktoren in das Duodenum zuständig ist. Außerdem beherbergt es die endokrinen Langerhans-Inselzellen, deren Hormone Insulin, Glukagon und Somastatin den Kohlenhydratstoffwechsel steuern (Vay *et al.* 1993).

Im Pankreasgang sammelt sich das Sekret aus allen Drüsenabschnitten und leitet es zum absteigenden Teil des Duodenums, wo er in der Vaterpapille endet. Der Gallengang zieht ebenfalls durch das Pankreas und mündet gemeinsam mit dem Pankreasgang oder nahe diesem in das Duodenum. Zusätzliche Ausführungsgänge der beiden Organe sind möglich (Vay *et al.* 1993).

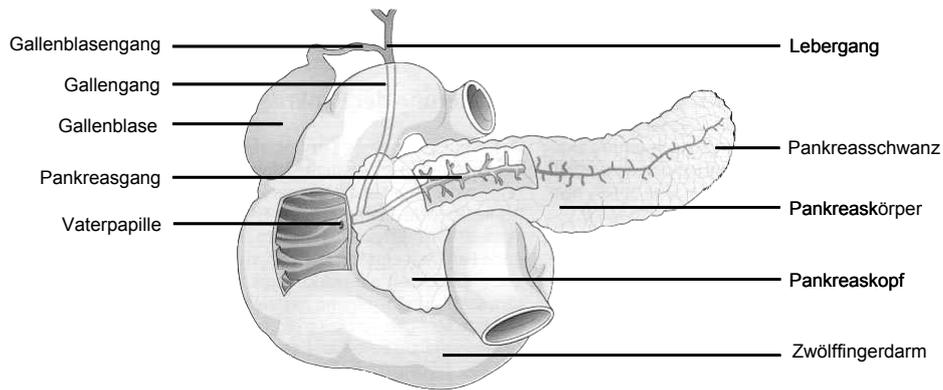


Abbildung 2.6: Aufbau und Lage des Pankreas (modifiziert nach Schwegler 1998). Über einen gemeinsamen Ausführungsgang münden Gallen- und Pankreasgang in den Zwölffingerdarm

In Abhängigkeit der Nahrungszufuhr produziert das Pankreas pro Tag etwa 3 L Pankreassaft. Unter seinen Bestandteilen ist der hohe Hydrogencarbonatgehalt von besonderer Bedeutung. Dieser verleiht dem Pankreassaft seinen typischen alkalischen pH-Wert von 7,5 bis 8,8 und trägt maßgeblich zur Neutralisierung (pH 6,0 bis 7,0) des sauren Speisebreis (Chymus) aus dem Magen bei (Rehner und Daniel 2002).

Daneben sind im Pankreassaft Enzyme enthalten, deren pH-Optimum zwischen 7 und 8 liegt, und die für die Verdauung unentbehrlich sind. Hierbei sind vor allem Enzyme zur Proteinspaltung (Proteasen) wie Trypsin, Chymotrypsin, Carboxypeptidase A und B sowie die Elastase zu nennen. (Silbernagl und Despopoulos 2003).

Die Pankreasamylase, die in ihren Eigenschaften dem Ptyalin im Mund entspricht, dient der Kohlenhydratspaltung. Die entstandenen, unterschiedlich großen Bruchstücke von Stärke und Glycogen werden anschließend von den Enzymen des Dünndarmepithels weiter abgebaut.

Der Fettverdauung dient die Pankreaslipase, die bevorzugt die hydrolytische Abspaltung der in 1- und 3-Positionen stehenden Fettsäuren aus den Triacylglycerinen katalysiert. Hauptprodukte sind Monoacylglyceride und Fettsäuren. Desweiteren ist die Cholesterinesterase zu nennen, die Cholesterinester hydrolysiert. Für die Verdauung von Nukleinsäuren enthält der Pankreassaft noch Ribonukleasen und Desoxyribonukleasen (Löffler und Petrides 1998).

2.3.4 Die Leber und die Galle

Die Leber ist das wichtigste Stoffwechselorgan des Organismus. In den Hepatozyten, die ungefähr 65% der Zellmasse ausmachen, laufen die meisten Metabolisierungsreaktionen ab. Vor allem für den Kohlenhydratstoffwechsel ist die Leber wichtig, da sie das wichtigste Glycogenspeicherorgan des Organismus darstellt. Außerdem verrichtet sie wichtige

Funktionen im Eiweiß- und Fettstoffwechsel, indem sie am Auf-, Um- und Abbau von Lipiden und Proteinen beteiligt ist. Auch an der Produktion zahlreicher Blutbestandteile wie den Gerinnungsfaktoren oder Albumin ist die Leber beteiligt. Desweiteren spielt sie bei der Speicherung von Vitaminen und Spurenelementen eine wichtige Rolle (Löffler und Petrides 1998).

Die Leber ist für die Entgiftung und Ausscheidung zahlreicher, meist lipophiler Substanzen verantwortlich. Derartige Verbindungen können körpereigene, sogenannte Endobiotika wie Bilirubin oder Steroidhormone sein oder es handelt sich um Xenobiotika, also körperfremde Substanzen wie z.B. Pharmazeutika, Konservierungsmittel oder Alkohol. Die hierfür notwendige Biotransformation ist in zwei Phasen gegliedert. In Phase I wird den Verbindungen durch oxidative, evtl. auch durch reduktive Reaktionen eine reaktive Gruppe wie -OH, -NH₂, -SH oder -COOH eingeführt. In Phase II erfolgt die Konjugation der gebildeten reaktiven Gruppen mit polaren oder stark geladenen Substanzen, wie zum Beispiel Glukuronsäure oder Sulfat, zu ausreichend wasserlöslichen Verbindungen. Daneben kommt es auch zur Acetylierung mit Acetyl-CoA, zur Konjugation mit Glutathion zu Mercaptursäuren sowie zu Methylierungen. Die entstandenen Konjugate werden entweder über das Blut zu den Nieren transportiert, wo sie mit dem Harn ausgeschieden werden, oder sie gelangen über die in der Leber ebenfalls produzierte Gallenflüssigkeit in den Darm, wo sie mit dem Fäzes den Körper verlassen (Löffler und Petrides 1998, Horn *et al.* 2005).

Die Gallenblase ist ein etwa 10 cm langer Hohlraum mit einer dünnen Wandung und von 50 bis 70 mL Fassungsvermögen. Der 3 bis 4 cm lange Gallenblasengang (*Ductus cysticus*) verbindet die Gallenblase mit dem ableitenden Gallengang (*Ductus chole-dochus*) und dem zuleitenden Lebergang (*Ductus hepaticus*), der die in der Leber gebildete Gallenflüssigkeit in das Speicherorgan Gallenblase einleitet (vgl. Abbildung 2.6). Im Bereich der Mündung des Gallengangs in den Zwölffingerdarm ist die Wand verstärkt und wirkt zwischen den Mahlzeiten als Schließmuskel, so dass die von der Leber abgegebene Gallenflüssigkeit in die Gallenblase umgeleitet wird. Dort wird die Gallenflüssigkeit auf zehn Prozent ihres Volumens eingedickt und gespeichert. Wird die Galle zur Fettverdauung benötigt, erschlaffen die Muskeln, die Gallenblase zieht sich zusammen und die eingedickte Gallenflüssigkeit gelangt portionsweise in das Duodenum (Schwegler 1998, Miller 2004).

Der pH-Wert der Gallenflüssigkeit in der Gallenblase liegt zwischen 6,9 und 7,7, derjenige der Lebergalle beträgt 7,1. Die Bedeutung der Gallenflüssigkeit bei den Verdauungsvorgängen liegt in ihrem hohen Gehalt an Gallensäuren, deren Anwesenheit eine Voraussetzung der für die Lipidabsorption notwendigen Mizellenbildung ist. Außerdem regulieren sie die Cholesterinbiosynthese (Coleman 1987, Boyer *et al.* 1992).

2.3.5 Der Darm

2.3.5.1 Der Dünndarm

Der Dünndarm beginnt jenseits des Magens und endet an der Dickdarmklappe, die den Übergang zum Dickdarm darstellt. In Abhängigkeit des Kontraktionszustands ist er 3 bis 5 m lang und wird in drei Abschnitte gegliedert. Den ersten Abschnitt stellt der 25 bis 50 cm lange Zwölffingerdarm (Duodenum) dar. In ihn münden die Ausführungsgänge der beiden großen Bauchdrüsen Pankreas und Leber, d.h. Gallen- und Bauchspeicheldrüsensekret kommen im Duodenum mit dem Speisebrei in Kontakt. Das Jejunum (Leerdarm) und das Ileum (Krummdarm) bilden die folgenden Abschnitte, die ohne deutliche Trennungslinie ineinander übergehen (Schwegler 1998).

Der Dünndarm ist mit Bauchfell überzogen. Nach innen folgen eine Längsmuskelschicht, eine Ringmuskelschicht, die Submukosa und schließlich die Mukosa, die von Epithelzellen bedeckt ist. Durch eine extrem starke Auffaltung des Epithels wird die für die Absorption von Nährstoffen verfügbare Oberfläche auf mehr als 100 m² vergrößert. Daran beteiligt sind die Falten (3-fache Vergrößerung), die gleichzeitig die Passage des Speisebreis verlangsamen, die Zotten (7- bis 14-fache Vergrößerung) und der Bürstensaum an der luminalen Seite der Endothelzellen (15- bis 40-fache Vergrößerung) (Silbernagl und Despopoulos 2003).

Das Duodenum besitzt die ausgeprägtesten Falten und Zotten. Vom Jejunum zum Ileum nehmen sowohl Anzahl als auch Höhe der Falten ab; auch die Zottenanzahl sinkt zunehmend.

Der Dünndarm ist der Ort der eigentlichen Verdauung und der Aufnahme von Nahrungsbestandteilen (Absorption). Der Zwölffingerdarm weist hierbei die höchste Stoffwechselrate aller Darmabschnitte auf. Ein Großteil der zerlegten Kohlenhydrate und Proteine tritt bereits in diesem Abschnitt aus dem Darmlumen in die Blutbahn über. Fette passieren erst im Ileum die Darmwand in das Pfortaderblut, was den Verdauungsenzymen aus Pankreas und Galle mehr Zeit gibt, um die im Vergleich zu Kohlehydraten und Proteinen schwerer abbaubaren Nahrungsfette zu zerlegen (Löffler und Petrides 1998, Horn *et al.* 2005). Neben der Durchmischung des Speisebreis bewirken die Darmbewegungen, dass dieser mit einer Geschwindigkeit von 1 cm/min zum Dickdarm transportiert wird (Schwegler 1998).

2.3.5.2 Der Dickdarm

Der Dickdarm ist vom Dünndarm durch die Dickdarmklappe getrennt. Er ist etwa 1,5 bis 1,8 m lang und besteht aus Caecum (Blinddarm), Kolon (Grimmdarm) und Rektum (Mastdarm). Am unteren Ende des Caecums beginnt der Wurmfortsatz. Das Kolon, mit

etwa 1 m Länge der größte Dickdarmabschnitt, umgibt den Dünndarm wie einen Rahmen (s. Abbildung 2.5). Das sich anschließende, 15 cm lange Rektum endet unterhalb des Analkanals mit dem Anus, welcher den Kanal mit Hilfe des Schließmuskels verschließt. Daneben ist ein Teil der Beckenbodenmuskulatur am Verschlussmechanismus beteiligt (Schwegler 1998).

Die Schleimhaut des Dickdarms weist eine wesentlich geringere Oberflächenvergrößerung als die Dünndarmschleimhaut auf. Ein Teil der oberflächlichen Zellen dient, wie die Zellen des Dünndarms, der Absorption (Silbernagl und Despopoulos 2003).

Hauptfunktionen des Dickdarms sind die Speicherung des Darminhalts und die Absorption von Wasser und Elektrolyten. Durch diesen werden etwa 0,5 bis 1,5 L pro Tag auf 0,1 bis 0,2 L eingedickt (Löffler und Petrides 1998).

Täglich werden 60 bis 80 g Fäzes ausgeschieden. Dieser besteht zu 76% aus Wasser und zu jeweils 8% aus Darmepithelzellen, Bakterien sowie unverdaulichen Nahrungsresten (Silbernagl und Despopoulos 2003).

2.3.5.3 Die Darmflora

Der Begriff Darmflora wird für die Gesamtheit der Mikroorganismen im Darm verwendet (Löffler und Petrides 1998), sollte aber in Zukunft durch Darmmikrobiota ersetzt werden, da Bakterien heute nicht mehr dem Pflanzenreich zugeordnet werden. Die Bakterienanzahl im Darm eines gesunden Erwachsenen liegt bei ungefähr 10^{12} bis 10^{13} . Molekulare Analysen der 16S- ribosomalen DNA haben die bisherigen Schätzungen von 200 bis 300 Keimarten auf bis zu 36000 ansteigen lassen (Frank *et al.* 2007). Die Keimzahl, wie auch die Zahl der Bakterienarten, steigt vom Magen, der trotz des niedrigen pH-Wertes nicht keimfrei ist, über Zwölffingerdarm, Dünndarm und Dickdarm stetig an. Während im Dünndarm fakultative Anaerobier dominieren, sind es im Dickdarm die obligaten Anaerobier. Die Darmflora des Einzelnen zeigt eine gewisse Konstanz, während die Zusammensetzung zwischen einzelnen Individuen stark schwanken kann. Derartige interindividuelle Unterschiede betreffen nur selten die Hauptspezies, sondern die Begleitflora, also Arten, die nicht regelmäßig oder nur in geringen Keimzahlen auftreten. Beispiele hierfür sind die Bakterienklassen der Streptokokken, Staphylokokken oder Clostridien (Mitsuoka und Ohno 1977).

Die Darmbakterien sind für den Menschen von großer Bedeutung. Sie fördern sowohl Stoffwechsel als auch Durchblutung der Darmmukosa, regen die Darmmobilität an, erhöhen die Aktivität der intestinalen Immunabwehr, und stellen eine Barriere gegenüber Fremdkeimen dar (Sonnenborn und Greinwald 1991, Umesaki und Setoyama 2000). Daneben bauen die Bakterien im Dickdarm unverdauliche Nahrungsreste ab und produzieren dabei unter anderem Butyrat, das dem Darmepithel als Energiequelle dient

und dem positive Effekte bei Darmerkrankungen zugesprochen werden (Wolin und Miller 1983).

2.3.6 Die Nieren und der Urin

Die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und Wasser ist die Hauptaufgabe der Nieren. Außerdem regeln sie das Volumen und die Osmolarität der Körperflüssigkeiten sowie den Elektrolythaushalt und das Säure-Base-Gleichgewicht (Burton 1980).

Die Bildung des Urins erfolgt in den Zellen der Niere (Nephronen) und lässt sich in zwei Abschnitte einteilen. Im ersten Schritt werden durch Ultrafiltration des Blutplasmas circa 180 L Primärharn pro Tag erzeugt, dessen Ionenzusammensetzung der des Plasmas entspricht. Bei der anschließend erfolgenden Resorption bestimmter Stoffe wie Ionen, Glucose, Aminosäuren und Vitaminen sowie von Wasser kommt es zu einer starken Konzentrierung. Der entstandene Sekundärharn weist ein Volumen von 0,5 bis 2,0 L auf. Der Harn wird über die Nierenbecken und den Harnleiter in die Blase geleitet, von wo aus er schließlich über die Harnröhre ausgeschieden wird.

Volumen und Zusammensetzung des Urins schwanken in Abhängigkeit der Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme, der Flüssigkeitsabnahme durch Schweiß, Stuhl und Atmung, sowie in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Körpergewicht (Hesse *et al.* 1986). Insbesondere die Ausscheidung von stickstoffhaltigen Verbindungen erfolgt über den Urin. Mit einer Tagesausscheidung von 20 bis 35 g liegt der Harnstoff an erster Stelle. Er wird in der Leber aus Ammoniak (der beim Proteinabbau anfällt) und Hydrogencarbonat gebildet und stellt das Endprodukt der Ammoniakentgiftung beim Menschen dar. Zur Bildung von 30 g Harnstoff werden 70 g Protein benötigt. Bei Entzündungsreaktionen oder *Diabetes mellitus* und damit verbundenem erhöhten Proteinabbau nimmt die Harnstoffausscheidung zu, bei länger dauerndem Hunger oder geringer Proteinaufnahme hingegen nimmt sie ab.

Harnsäure ist das Endprodukt des Purinstoffwechsels. Eine erhöhte Harnsäureausscheidung (Norm 0,3 bis 2,0 g/Tag) begünstigt die Bildung von Uratsteinen z.B. in den Nieren (Silbernagl und Despopoulos 2003). Kreatinin, von dem täglich 1,0 bis 1,5 g im Endharn nachweisbar sind, entsteht in Muskel- und Nervenzellen aus Kreatin, das ebenfalls in geringen Mengen mit dem Urin ausgeschieden wird.

Normalerweise werden über den Harn nicht mehr als 0,2 g Glucose pro Tag ausgeschieden. Ein Nachweis von Glucose im Urin deutet meist auf *Diabetes mellitus* oder eine Schwangerschaft hin. Beides kann auch zu erhöhten Gehalten an Ketonkörpern (normalerweise < 3 g) führen. Proteine können bis zu einer Molekularmasse von 65 kDa im Urin mit einem Gehalt von bis zu 150 mg pro Tag ausgeschieden werden. Auch 1 bis

3 g/d freie Aminosäuren wurden im normalen Urin ermittelt. (Koolman und Röhm 1998, Rupprecht 2004).

Weitere organische Bestandteile des Urins sind Vitamine, Oxalate, Konjugate der Biotransformation in der Leber wie Glukuronide und Sulfate, Aminosäurederivate sowie Hormone und deren Metabolite. Die gelbe Farbe des Urins entsteht durch Pigmente aus dem Hämoglobinabbau, den Urochromen, die ebenfalls mit dem Urin ausgeschieden werden. Bekanntestes Beispiel hierfür ist das Bilirubin. An anorganischen Bestandteilen finden sich im Urin die Kationen Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Ammonium (NH_4^+), Calcium (Ca^{2+}) und Magnesium (Mg^{2+}) sowie die Anionen Chlorid (Cl^-), Sulfat (SO_4^{2-}) und Hydrogenphosphat (HPO_4^{2-}), wobei Natrium und Chlorid mehr als die Hälfte der Salzmenge ausmacht. Die genaue Zusammensetzung ist nahrungsabhängig. Auch der pH-Wert des Urins schwankt zwischen 4,8 bei der Aufnahme tierischer Lebensmittel, während große Mengen pflanzlicher Lebensmittel den pH-Wert auf bis zu 7,5 ansteigen lassen kann (Koolman und Röhm 1998).

2.3.7 Das Blut und das humane Serumalbumin

Hauptaufgabe des Blutes ist es, Energie, Sauerstoff, Hormone, und Stoffwechselprodukte im Organismus zu verteilen und von den produzierenden Geweben an die Zielgewebe zu bringen. In Arterien, Kapillaren und Venen eines Erwachsenen zirkulieren in Abhängigkeit von Körpergröße und Lebensalter etwa 4,5 bis 6 L Blut. Der pH-Wert des Blutes liegt bei 7,4 und wird durch verschiedene Puffersysteme konstant gehalten. Die Zusammensetzung des Blutes ist in Abbildung 2.7 schematisch dargestellt.

Dieses setzt sich zu 45% aus Blutzellen und 55% aus Plasma zusammen. Die zellulären Anteile lassen sich in Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Leukozyten (weiße Blutkörperchen) und Thrombozyten (Blutplättchen) untergliedern. Ein Großteil der Blutzellen wird im Knochenmark gebildet. Der prozentuale Anteil der Blutzellen am Blutvolumen wird als Hämatokrit bezeichnet. Das klare, gelbliche Plasma besteht zu 90% aus Wasser, 8% aus Proteinen und 2% aus gelösten Salzen sowie organischen Verbindungen (Hormone, Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren, u. a.). Für die Farbe ist das aus dem Hämoglobinabbau stammende Bilirubin verantwortlich. Werden dem Plasma Fibrinogen und weitere gerinnungsaktive Proteine entzogen, erhält man das etwas dünnflüssigere Serum mit 91% Wasser, 7% Proteine, 2% gelöste Salze und organische Verbindungen (Rehner und Daniel 2002).

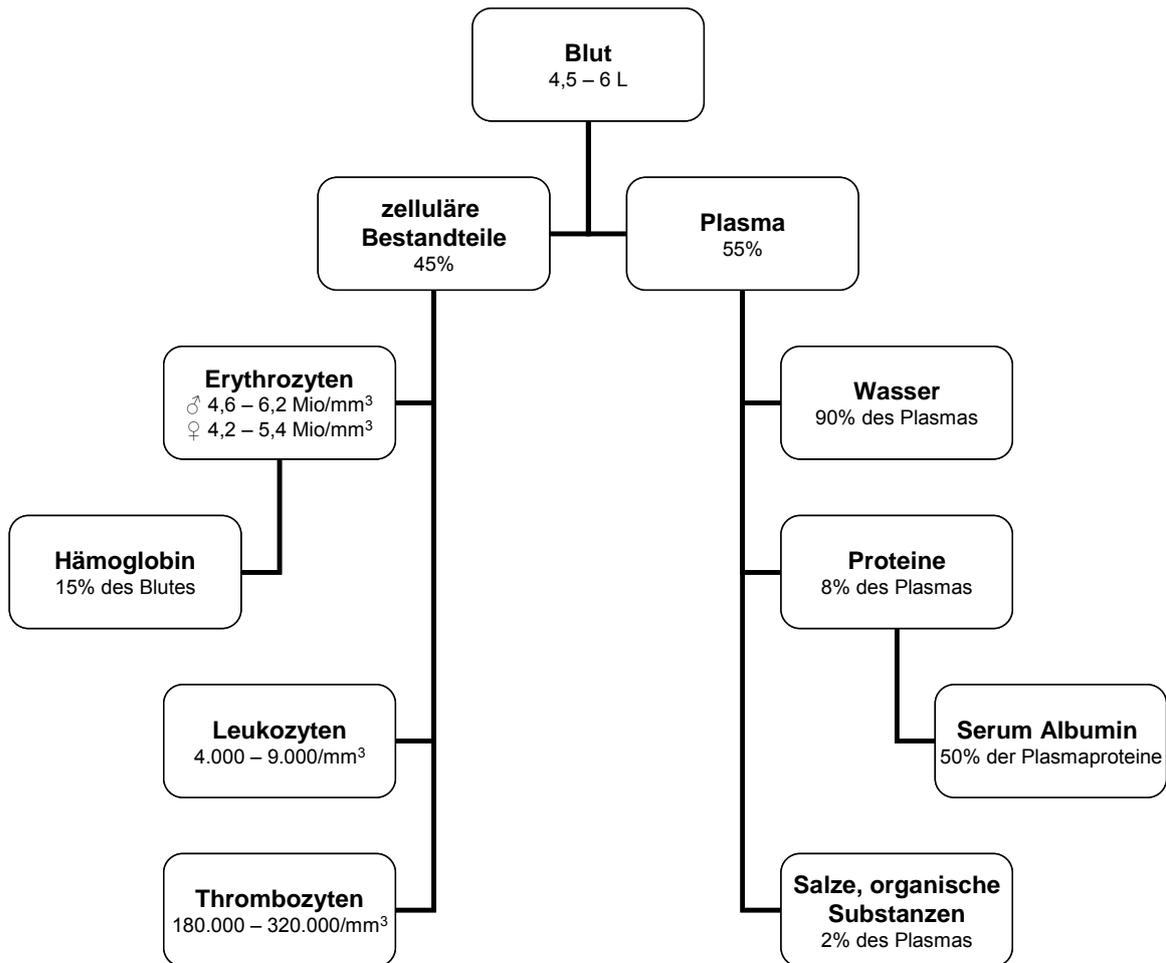


Abbildung 2.7: Zusammensetzung des Humanblutes (nach Rehner und Daniel 2002)

Das Blut hat vielfältige Funktionen, die in unmittelbarem Zusammenhang mit seinen Bestandteilen und dem Gefäßsystem stehen. Die Gefäße haben eine allgemeine Verteilerfunktion, ihre Aufgaben sind die Wärmeregulation und die Stoffverteilung. Die Blutbestandteile haben hingegen meist sehr spezifische Funktionen.

Unter den zellulären Bestandteilen machen die Erythrozyten mit 99% den Hauptanteil der Blutzellen aus. Sie dienen mit dem zentral in der Zelle gelegenen Hämoglobinanteil, der 90% der Trockenmasse sowie ungefähr ein Drittel der Gesamtmasse ausmacht, vor allem dem Sauerstofftransport von der Lunge in die übrigen Organe des Organismus. Auch in den Körperzellen entstandenes Kohlendioxid, das Endprodukt des oxidativen Stoffwechsels, wird an die endständigen Aminogruppen des Hämoglobins zur Lunge gebunden transportiert. Der größere Teil des CO_2 wird jedoch in den Erythrozyten durch die Carboanhydrase zu Hydrogencarbonat abgebaut, das anschließend im Austausch mit Chloridionen zurück in das Plasma diffundiert und zu den Lungen gelangt, wo es schließlich abgeatmet wird. Daneben ist das Hämoglobin der Erythrozyten an der Pufferung zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes von Blut beteiligt (Rehner und Daniel 2002).

Die Leukozyten machen im Blut den kleinsten Teil der zellulären Bestandteile aus. Ihre Aufgabe ist die Immunabwehr im Organismus.

Die Thrombozyten sind an den Prozessen der Blutstillung und Blutgerinnung beteiligt. Unmittelbar nach einer Verletzung kommt es durch Kontraktion zu einer Gefäßverengung, wodurch die blutende Wunde verkleinert wird. Durch Anlagerung von Thrombozyten entsteht ein Adhäsionstropf, die Blutung wird gestillt.

Neben den zellulären Bestandteilen besteht das Blut aus dem flüssigen Plasma. Dieses setzt sich aus Wasser, Proteinen und Salzen zusammen (vgl. Abbildung 2.7) Die Proteine des Plasmas werden nach ihrer Beweglichkeit im elektrischen Feld in fünf Gruppen eingeteilt: die Albumine (35 - 40 g/L Plasma), die α_1 -Globuline (3 - 6 g/L Plasma), die α_2 -Globuline (4 - 9 g/L Plasma), die β -Globuline (6 - 11 g/L Plasma) und die γ -Globuline (13 - 17 g/L Plasma). Die wichtigste Funktion der Plasmaproteine ist die Aufrechterhaltung eines konstanten Plasmavolumens. Des Weiteren dienen sie dem Transport von wasserunlöslichen Substanzen, Metallen, Hormonen, Arzneimitteln und Vitaminen. Auch an der Blutgerinnung und der anschließenden Fibrinolyse sind die Proteine beteiligt. Ferner wirken sie an der Abwehr von Infektionen mit (Löffler und Petrides 1998).

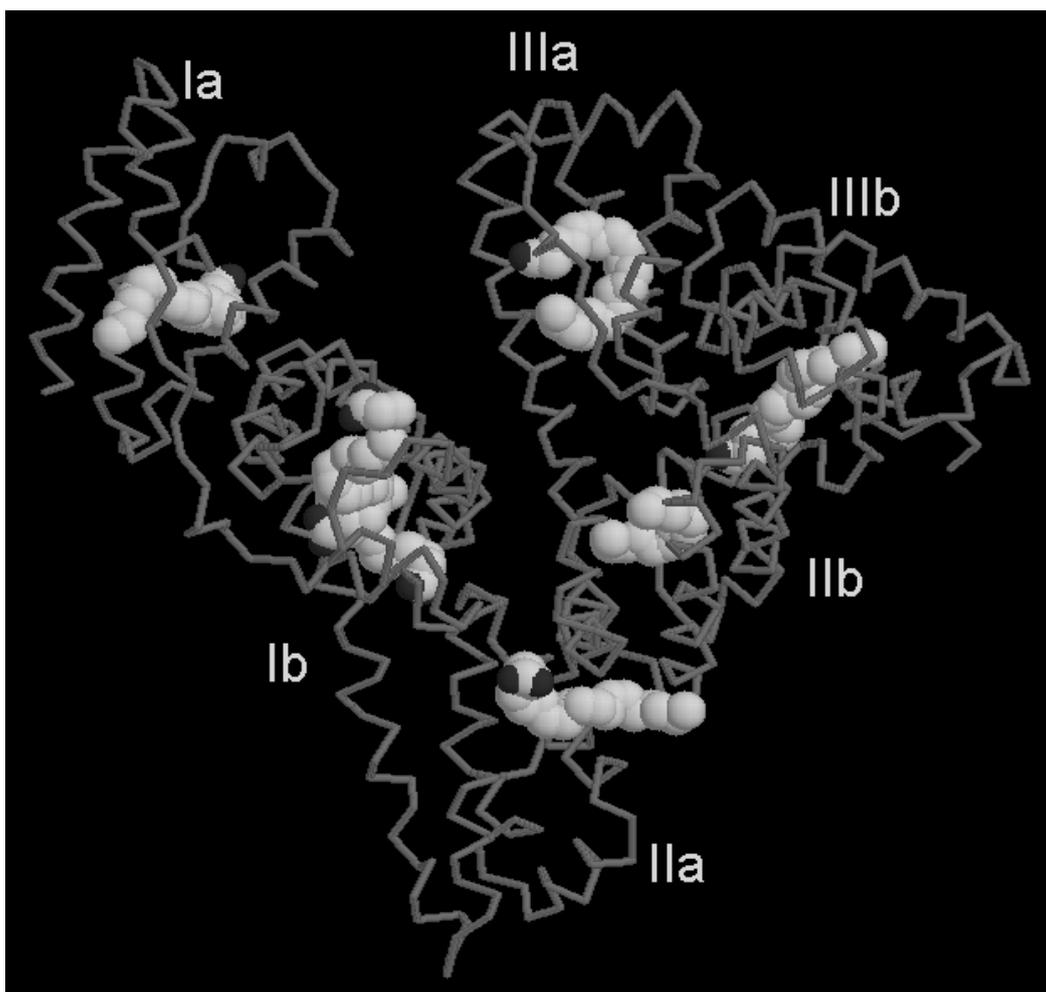


Abbildung 2.8: Struktur und Domänen des humanen Serumalbumins (Yamasaki *et al.* 1999, Wikimedia 2010)

Das Serumalbumin (Human Serum Albumin, HSA) stellt rund 60% der Plasmaproteinmenge dar und ist somit das am häufigsten vorkommende Protein im Plasma. Die durchschnittliche Konzentration der Albumine im Blutplasma beträgt 45 g/L. Die Synthese von HSA erfolgt in der Leber (0,2 g/Tag), und die Halbwertszeit im Körper liegt bei zehn bis 15 Tagen. Die Molekularmasse von HSA beträgt 67 kD (Horn *et al.* 2005). Abbildung 2.8 zeigt die Primärstruktur von HSA, welches aus 585 Aminosäuren aufgebaut, 17 Disulfidbrücken und einen freien Cysteinrest beinhaltet (Sugio *et al.* 1999). Die wichtigen physiologischen Aufgaben, die von HSA übernommen werden, sind die Erhaltung der Blutpufferung, die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks und vor allem der Transport wasserunlöslicher Stoffe im Blut. Zu diesen gehören neben endogenen Substanzen wie Bilirubin oder Fettsäuren auch eine Vielzahl von Arzneistoffen, die über HSA an ihren Wirkort im Körper transportiert werden. Außerdem besitzt HSA eine hohe Affinität für Metalle wie Cu^{2+} und Zn^{2+} (Sugio *et al.* 1999; Horn *et al.* 2005).

Das HSA-Molekül lässt sich in drei homologe Domänen (I, II und III) einteilen (vgl. Abbildung 2.8). Jede Domäne gliedert sich wiederum in zwei Subdomänen, die mit a und b bezeichnet werden. Jede Domäne besteht aus zehn α -Helix-Einheiten, von denen die ersten 6 Helices der Subdomäne a und die übrigen der Subdomäne b zugeordnet werden. Eine lang gezogene Schleife verbindet die Subdomänen miteinander. Die zu transportierenden Stoffe wie Ionen, Pharmazeutika oder Fettsäuren besetzen verschiedene Bindungsstellen (Kragh-Hansen 1981). Insgesamt sind sechs Bindungsstellen im Albuminmolekül bekannt. Die Bindungsstellen I und II werden von kleinen Molekülen besetzt, darunter Pharmazeutika wie Warfarin und Ibuprofen, aber auch Polyphenole wie Quercetin (Zsila *et al.* 2003, Carter und Ho 1994). Die freien Fettsäuren lagern sich an Bindungsstelle III und IV an und werden auf diese Art durch den Organismus transportiert. Die beiden letzten Bindungsregionen V und VI dienen der Beförderung von Ionen (Kragh-Hansen 1981, Carter und Ho 1994).

2.4 Bioverfügbarkeit von Anthocyanen und anderen Polyphenolen

Der Begriff „Bioverfügbarkeit“ kommt ursprünglich aus der Pharmakologie und bezeichnet Geschwindigkeit, Form und Ausmaß, mit denen der eingesetzte Wirkstoff absorbiert wird und am Wirkort vorliegt (Gugeler und Klotz 2000). In der modernen Ernährungsphysiologie wird der Begriff der Bioverfügbarkeit verwendet, um das Ausmaß und die Geschwindigkeit, mit der Lebensmittelinhaltsstoffe nach Aufnahme mit der Nahrung in den Gastrointestinaltrakt und nach Resorption an ihren Wirkort gelangen, zu beschreiben. In dieser Arbeit wird der Begriff im Sinne zuletzt genannter Definition verwendet.

Die Bioverfügbarkeit ist die Grundvoraussetzung für den Effekt des Wirkstoffs im menschlichen Organismus. So ist es nicht möglich, die Ergebnisse von *in vitro*-Beobachtungen

auf *in vivo*-Testsysteme zu übertragen, ohne zu wissen, ob z.B. ein Naturstoff (oder evtl. dessen Metabolite) absorbiert wird und so überhaupt den Wirkort erreichen kann.

Oftmals werden Tests auch mit Reinsubstanzen, meist sogar mit den in der Natur nicht vorkommenden und sehr instabilen Aglyconen, durchgeführt. Wechselwirkungen mit anderen im Lebensmittel vorliegenden Substanzen können auf diese Weise nicht berücksichtigt werden, obwohl diese grundsätzlich bekannt sind (Viljanen 2005).

Von anderen Polyphenolen weiß man, dass viele der in der Leber oder im Darm entstandenen Metabolite, welche im Blut nachgewiesen werden können, eine völlig andere biologische Aktivität als ihre Ausgangssubstanz besitzen (Manach *et al.* 2004). Beispielsweise bildet die Darmflora von nur etwa einem Drittel der Bevölkerung aus Daidzein, einem Isoflavon der Sojabohne, dessen Metabolit Equol. Dieses weist stärkere physiologische Eigenschaften als das ursprüngliche Daidzein auf. Aus diesem Grund ist es nicht möglich, genau vorherzusagen, ob das nativ vorkommende Daidzein oder dessen Metabolit Equol für die anticancerogenen Eigenschaften *in vivo* verantwortlich ist (Marcovits *et al.* 1989, Setchell *et al.* 2002).

Auch können Ergebnisse aus Tierexperimenten nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden, da sich die Organismen schon in der Anatomie unterscheiden können. Während der Mensch eine Gallenblase besitzt, ist diese bei Ratten nicht vorhanden (Pietta *et al.* 1997, Manach *et al.* 2004). Daneben haben Ratten im Gegensatz zum Menschen eine größere Anzahl von Bakterien im Magen, die einen höheren mikrobiellen Abbau bereits vor Erreichen des Dünndarms bedingen kann (Williamson *et al.* 2000). So beobachteten z.B. Pietta und Mitarbeiter (1997) Unterschiede im Flavonoidmetabolismus zwischen Mensch und Ratte, die auf die oben genannte Unterschiede zurückgeführt werden können.

Anthocyane, die unter den Polyphenolen am häufigsten in der menschlichen Nahrung vorkommen (Kapitel 2.2.1.4), besitzen nach Literaturangaben nicht zwingend eine hohe Aktivität im Körper, da sie schlecht im Darm absorbiert werden, einer hohen Metabolisierungs- oder Eliminierungsrate unterliegen und bei den im Organismus herrschenden Bedingungen (Temperatur, pH-Wert) chemisch instabil sind (Cao und Prior 1999, Bub *et al.* 2001, Keppler und Humpf 2005, Woodward *et al.* 2009, Nurmi *et al.* 2009).

Weitere Kenntnisse über die Bioverfügbarkeit der Anthocyane und deren Metabolisierung sind daher unabdingbar, um Effekte zu verstehen, ob und wie Anthocyane im menschlichen Organismus wirken können und um letztendlich die aktiven Substanzen zu identifizieren. Im Folgenden wird ein Überblick über die bisher erlangten Erkenntnisse hinsichtlich Digestion, Absorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination von Anthocyanen gegeben.

2.4.1 Digestion und Absorption von mit der Nahrung aufgenommenen Anthocyanen

Mit der Nahrung aufgenommene Anthocyane gelangen zunächst in die Mundhöhle, wo der Zellverband durch das Kauen mechanisch zerstört wird. Zerkleinerung ist bei vielen Speisen schon während deren Zubereitung (z.B. durch das Mixen von Früchten) erfolgt und bleibt deshalb in dieser Arbeit unberücksichtigt. Berücksichtigt werden muss jedoch die Tatsache, dass Anthocyane im Mundraum zunächst mit Speichel in Kontakt kommen. Die Wirkung von Anthocyanen auf die Speichelproteine insgesamt sowie auf eines der wichtigsten Enzyme im Speichel, die humane Speichel- α -Amylase, ist bereits untersucht worden. Hierbei hat man mittels Fluoreszenzspektroskopie für Cyanidin-3-O-glukosid Bindungsparameter von Anthocyanen an Speichel und α -Amylase ermittelt. Die Bindungskonstanten von Speichel ($37.4 \pm 0.9 \times 10^3$ L/mol) sowie von α -Amylase ($35.6 \pm 0.6 \times 10^3$ L/mol) waren sehr ähnlich, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die α -Amylase als wichtigstes Enzym des Speichels auch hauptsächlich für die Anthocyanbindung verantwortlich ist. Die Messungen wurden unter physiologischen Bedingungen bei 37 °C und einem pH-Wert von 7,0 durchgeführt (Wiese *et al.* 2009).

Der Effekt, den die oben beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Anthocyane und Speichelproteinen auf die Anthocyane haben, wurde bisher noch nicht untersucht und sollte in dieser Arbeit näher betrachtet werden. Für manche Flavonoide ist bekannt, dass es solche Effekte gibt. So wurde am Beispiel der Quercetinglykoside nachgewiesen, dass für die Deglukosylierung Enzyme der bakteriellen Mundflora sowie von im Mund vorliegenden abgelösten Epithelzellen verantwortlich sind (Walle *et al.* 2005). Nach dem Kauen kommen die mit der Nahrung aufgenommenen Anthocyane, (bzw. die entstandenen Anthocyan-Protein-Komplexe) durch den Schluckprozess über die Speiseröhre in den Magen.

Von Flavonoidglycosiden (Hollman und Katan 1999, Bermudéz-Soto *et al.* 2007) sowie monomeren Flavan-3-ole (Spencer *et al.* 2000) ist bekannt, dass sie im sauren Milieu des Magensaftes stabil sind und keiner Hydrolyse durch Enzyme oder dem Milieu unterliegen. Auch bei Anthocyanen, deren chemisch stabilste Form das im Sauren gebildete Flavyliumkation ist, spricht viel für eine hohe Stabilität im Magen. Zwar stehen Untersuchungen mit Inkubationen verschiedener Anthocyanreinstoffe noch aus, doch wurde der Einfluss von simulierter Magensäure auf Anthocyane bereits am Beispiel verschiedener anthocyanhaltiger Fruchtsäfte ermittelt. Bei der Analyse eines mit Magensaft versetzten Aroniasaftes konnte, ebenso wie bei einem Granatapfelsaft, nach einiger Zeit sogar ein Anstieg der gemessenen Anthocyankonzentration gezeigt werden. Dies wurde mit einem durch den im Vergleich zum Saft geringeren pH-Wert und einer damit gestiegenen Flavyliumionenkonzentration begründet (Pérez-Vicente *et al.* 2002, Soto *et al.*

2007). Bei einer weiteren, mit schwarzem Johannisbeersaft durchgeführten Studie konnte man zeigen, dass die Enzyme des Magens keinerlei Einfluss auf die Stabilität der Anthocyane hatten. Alle im Saft vorkommenden Anthocyane zeigten sich in der Studie stabil im sauren Magenmilieu (Uzunović und Vranić 2008). Der Magen wird auch als Ort für die Resorption der Anthocyane postuliert. Indizien hierfür lieferten Studien, 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 eine Resorption der Anthocyane über den Magen postuliert wurde (Passamonti *et al.* 2003, Talavera *et al.* 2003).

Die Fähigkeit der Anthocyane, die Magenmucosa zu passieren, sowie die Möglichkeit eines Bilitranslokase vermittelten „Membran Carrier“-Mechanismus könnten die Basis für eine schnelle Verfügbarkeit von Anthocyanen im Plasma, sowohl bei Ratten als auch im Menschen, sein. Ein Indiz hierfür ist auch, dass bei einer Studie Konzentrationen von Anthocyanen im Pfortaderblut gefunden wurden, die nahe an der Halbsättigung der Bilitranslokase lagen und somit eine relevante Rolle des Enzyms bei der Aufnahme in die Leber andeuteten (Bub *et al.* 2001, Passamonti *et al.* 2002, Passamonti *et al.* 2005).

In soweit kann also davon ausgegangen werden, dass ein Teil der Anthocyane schon im Magen resorbiert wird, der überwiegende Teil aber ohne chemische Veränderungen weiter in den Dünndarm gelangt.

Im Dünndarm muss aufgrund des pH-Wertes davon ausgegangen werden, dass sich die Aglykone der Anthocyane von der Flavylumionenstruktur hin zu den anderen möglichen Strukturen wie chinoider Base, ionischer Base, Carbinol Pseudobase und Chalkon umlagern. In der Literatur wird die Carbinolbase als wahrscheinlichste Form für das schwach alkalische Milieu des Darms beschrieben (Timberlake 1980). Dies muss berücksichtigt werden, da hier ein Molekül mit (im Vergleich zum Anthocyan des Mageninhaltes) geänderten Eigenschaften vorliegt. Aus diesem Grund ist neben einem veränderten Transportmechanismus ins Blut auch von einer geringeren Stabilität der Moleküle auszugehen (Jurd 1972). Schließlich wird ein Teil der aufgenommenen Anthocyane, der in der instabilen Chalkonstruktur vorliegt, einem chemischen Abbau unterliegen (Abbildung 2.4/Kapitel 2.2.1.4).

Der Nachweis, dass Anthocyane die Dünndarmwand unverändert passieren können, wurde bereits durch eine Studie erbracht, in der ein Rattendarm in einer Perfusionskammer vascular mit einem Perfusionsmittel gespült wurde, um ihn mit Sauerstoff zu versorgen. Luminal wurde eine Anthocyanlösung am Gewebe entlang geleitet. 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).

Außerdem hat man unter Verwendung einer Ussingkammer das Absorptionsvermögen verschiedener Bereiche des Mäusedarms untersucht. Nach Präparation von jejunalem Gewebe lag die Absorptionsrate hier bei $55.3\% \pm 7.6$, wohingegen das Duodenum-Gewebe mit $10.4\% \pm 7.6$ ein weitaus geringeres Absorptionsvermögen zeigte (Matuschek *et al.* 2006). Eine weitere Studie mit Anthocyanen aus Brombeeren zeigte, 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 ließ sich anschließend natives Cy-3-O-glc nachweisen; außerdem hat man methylierte und glucuronidierte Metabolite identifiziert (Talavera *et al.* 2004).

Allerdings wird im Magen und Dünndarm nicht die gesamte aufgenommene Anthocyanmenge resorbiert. So hat man gezeigt, dass ein großer Anteil der Anthocyane unmetabolisiert mit den übrigen nicht resorbierten Nahrungsbestandteilen in den Dickdarm gelangt. Nach Aufnahme von 300 g Wildheidelbeeren durch Personen, die einen künstlichen Ausgang am Ende des Dünndarms (Ileostoma) besitzen, wurden (abhängig von der Anthocyanstruktur) zwischen 28,3% und 85,1% der aufgenommenen Anthocyane am Ende des Dünndarms wiedergefunden. Es zeigte sich, dass vor allem Arabinoside in den Dickdarm gelangen, während Galaktoside und vor allem Glukoside resorbiert oder abgebaut wurden. Bezüglich der Aglykone kann gesagt werden, dass vor allem methylierte Verbindungen den Magen sowie den Dünndarm passierten, während diejenigen ohne Methoxygruppen abgebaut, metabolisiert oder resorbiert wurden (Kahle *et al.* 2006, Kraus *et al.* 2010).

Da eine Verfügbarkeit der Anthocyane im Dickdarm durch diese Studie bewiesen ist, kann davon ausgegangen werden, dass sie dort auch wirksam werden können. Allerdings ist noch nicht geklärt, was mit den Anthocyanen im Kolon passiert, da viele Studien zeigten, dass Testpersonen und Versuchstiere Anthocyane nicht in nennenswerten Mengen über den Fäces ausscheiden. Nur bei sehr hoher Anthocyanaufnahme konnten (neben den aufgenommenen Anthocyanen) auch geringe Mengen an freiem Aglykon in den Fäcesproben gefunden werden (Bub *et al.* 2001, Felgines *et al.* 2002, Fleischhut 2004, Keppler und Humpf 2005). Der Verbleib der übrigen Anthocyanmenge ist bisher weitgehend ungeklärt.

2.4.2 Metabolismus, Verteilung und Eliminierung der Anthocyane im humanen Organismus

Zur Klärung potentieller Bioaktivität ist die Kenntnis der Biotransformation von Anthocyanen in Dünndarm und Leber sowie ihrer absorbierten Metabolite aus dem Dickdarm zwingend erforderlich. Die möglichen Routen und Metabolisierungen der Anthocyane im Gastrointestinaltrakt sind in Abbildung 2.9 schematisch dargestellt, allerdings ist im Vergleich zu anderen Polyphenolen über den genauen Aufnahmemechanismus und die Metabolisierung der Anthocyane weniger bekannt. Auch bei Anthocyanen ist, genau wie bei anderen Flavonoiden, von einer Konjugation der Hydroxylgruppen mit Glucuronsäure, Sulfat und/oder Glycin bzw. O-Methylierung auszugehen (Stahl *et al.* 2002).

Bis vor einigen Jahren vermutete man, dass Anthocyane im Speichel oder Dünndarm durch Glykosidasen gespalten werden und nur die Aglykone durch die Darmepithelzellen resorbiert werden können. Erst vor ungefähr zehn Jahren hat man den Nachweis erbracht, dass Anthocyane nicht nur als Anthocyanidine sondern auch als Glykoside resorbiert werden können (Galvano *et al.* 2004).

In der Dünndarmmukosa und der Leber werden die phenolischen Substanzen (zu denen die Anthocyane gehören) methyliert, sulfatiert und glucuronidiert. Diese Konjugationen finden enzymatisch statt und sind abhängig von der Verteilung und der Spezifität der entsprechenden Enzyme (Scalbert und Williamson 2000). Studien an isoliertem Rattendünndarm haben gezeigt, dass bereits beim Transfer von der mukosalen zur serosalen Seite ein ausgeprägter Metabolismus bei vielen Flavonoiden in den Enterozyten stattfinden kann (Spencer *et al.* 2001).

Die Methylierung wird durch Catechol-O-methyltransferase katalysiert. Die Methylgruppe wird dabei vom S-Adenosyl-L-methionin auf die Anthocyane mit ortho-Diol-Struktur, wie beispielsweise Cyanidin oder Delphinidin, übertragen. Für Cyanidin ist dieser Mechanismus im Menschen nachgewiesen worden (Wu *et al.* 2002). Die Aktivität des Enzyms ist in Leber und Niere am höchsten, allerdings wurde es auch im Dünndarm von Ratten nachgewiesen. Eine Sulfatierung von Anthocyanen und Anthocyanidinen durch Sulfotransferasen, welche den eine Sulfatgruppe von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat auf eine Hydroxylgruppe übertragen, geschieht fast ausschließlich in der Leber (Tilgmann und Ullmanen 1996, Piskula und Terao 1998). Außerdem gibt es die Möglichkeit, dass Anthocyane durch UDP-Glukuronosyltransferasen, die in vielen Geweben an der Membran des endoplasmatischen Retikulums gebunden sind, glucuronidiert werden. Für viele andere Flavonoide wurde allerdings gezeigt, dass die in der Dünndarmmucosa gebildeten Glukuronide nicht ins Blut, sondern zu einem Großteil ins Darmlumen abgegeben werden, was deren Absorptionsrate vermindert (Crespy *et al.*

1999, Andlauer *et al.* 2000). Die weitere Metabolisierung sowie die Bioaktivität der Glucuronide ist nicht geklärt.

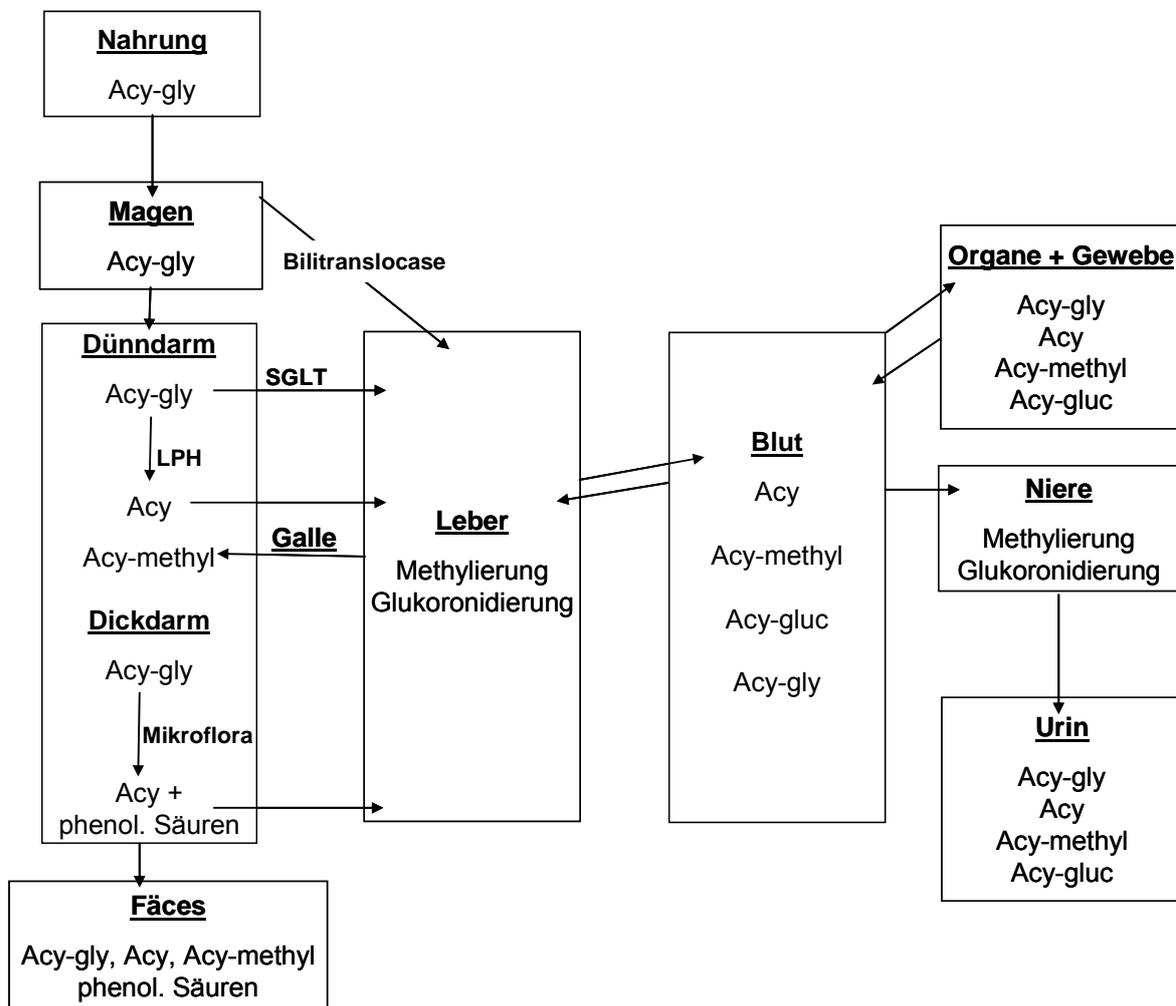


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Absorption und des Metabolismus von Anthocyanen modifiziert nach McGhie und Walton (2007). Acy-Gly = Anthocyan, Acy = Anthocyanidin; Acy-methyl = methylierter Anthocyanmetabolit; Acy-glu = glucuronidierter Anthocyanmetabolit; SGLT = natriumabhängiger Glucosetransporter; LPH= Lactase-Phloridzinhydrolase

Hinsichtlich des Magens gibt es Hinweise, dass die Resorption vor allem durch den Anionentransporter der Magenschleimhaut, die Bilitranslocase, vorgenommen wird (McGhie und Walton 2007). Im Dünndarm wurde neben der passiven Diffusion lange Zeit vor allem der natriumabhängige Glukosetransporter (SLGT-1) in der Darmmucosa für den Übergang der Anthocyane aus dem Darmlumen ins Blut verantwortlich gemacht (McGhie und Walton 2007). Allerdings konnte in einer Tierstudie mit Ratten bei der ein Anthocyanextrakt aus Blutorangen mit und ohne Glukose gefüttert wurde, gezeigt werden, dass Glukose keinen Einfluß auf die Resorption im Dünndarm hat. Somit scheint der natriumabhängige Glukosetransporter nicht der alleinige Resorbtiionsweg durch die Darmwand zu sein (Felgines *et al.* 2008). Beim Menschen scheint der SLGT-1

Transporter allerdings eine bedeutende Rolle in der Resorption zu spielen. Hierfür sprechen die Ergebnisse einer Humanstudie aus dem Jahr 2002, bei welcher die Testpersonen Anthocyanextrakte mit verschiedenen Mengen Saccharose aufnahmen. Hier zeigte sich, dass Anthocyane sehr viel langsamer ins Blut aufgenommen wurden, sobald der Zuckergehalt so hoch wurde, dass er den SGLT-1 Transporter überlastete (Mülleider *et al.* 2002). Aber auch der Glukosetransporter 2 ist an der Aufnahme der Anthocyane beteiligt (Faria *et al.* 2009). Aus den Anthocyanen wird im Dünndarm bzw. im Dickdarm durch Glykosidaseaktivität jedoch auch das Aglykon freigesetzt, was dann ohne Hilfe des natriumabhängigen Glukosetransporters durch die Mucosa diffundieren kann (McGhie und Walton 2007).

Von den über den Magen-Darm-Trakt aufgenommenen Anthocyanen ließen sich bisher im Blut nur sehr geringe Anteile der aufgenommenen Mengen nachweisen. Obwohl in mehreren Humanstudien bis zu 3,5 g Anthocyan pro Person aufgenommen wurden, lag die im Plasma gemessene Anthocyankonzentration bei max. 300 µg/L. Insgesamt zeigen die verschiedenen Studien, dass sehr große Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen bestehen (Kay 2006, McGhie und Walton 2007). Im humanen Blut wurden bei einer Interventionsstudie mit Aroniaextrakt neben den aufgenommenen Anthocyanen auch deren Glukuronide, verschiedene mono- und dimethylierte Verbindungen, das mono- und dimethylierte Glukuronid und zwei unbekannte Substanzen nachgewiesen (Kay *et al.* 2004).

Durch den Blutkreislauf können die Anthocyane in die Zielgewebe gelangen, in welchen sie z.B. antioxidativ wirken können. Hierbei ist wie bei Arzneistoffen auch zu beachten, ob die Anthocyane mit dem Blut in irgendeiner Weise wechselwirken. Von Warfarin, einem hydroxyliertem Coumarin das als Vitamin K Antagonist aber auch als Rattengift eingesetzt wird, ist beispielsweise bekannt, dass es zu über 99% an das Plasmaprotein HSA bindet. Für Polyphenole sind bisher nur Studien mit Quercetin bekannt. Hier zeigte sich, dass auch dieses Flavonol ähnlich starke Bindungen (99%) mit HSA eingeht (Boulton *et al.* 1998). Diese Bindung hat Konsequenzen hinsichtlich des Grades der Verfügbarkeit in den Geweben. Ist die Bindung zu stark, wird der Ligand nicht an die Gewebe abgegeben. Außerdem ist aus Literaturdaten bisher nicht klar, ob der Ligand seine Eigenschaften in der proteingebundenen Form behält. Für Quercetin konnte aber gezeigt werden, dass die antioxidativen Effekte auch in der gebundenen Form beibehalten werden (Dangles *et al.* 1999).

Anthocyane hat man außer in der Leber auch in Niere und Gehirn identifiziert. Ein Hinweis, dass Anthocyane die Blut-Hirn-Schranke überwinden können, wurde bereits 2003 durch *in vitro*-Tests von Youdim *et al.* erbracht. Dies wurde von weiteren Arbeitsgruppen *in vivo* bestätigt, wobei keine Abhängigkeit der Konzentration im Gehirn von derjenigen im

Plasma hergeleitet werden konnte (Youdim *et al.* 2003, Talavera *et al.* 2005, Passamonti *et al.* 2005).

Die Ausscheidung der Anthocyane bzw. ihrer Metabolite erfolgt wie bei anderen Polyphenolen über die Niere und den Urin sowie über die Galle. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass kleinere, leicht wasserlösliche Verbindungen über den Urin, größere (>300 Da) über die Galle ausgeschieden werden (Hollman *et al.* 1995). Dementsprechend sollten ausschließlich Anthocyanidine im Urin zu finden sein, da Anthocyane oder andere Konjugate über die Galle ausgeschieden werden sollten. Dies ist aber nicht der Fall, sondern man hat vor allem intakte Anthocyane sowie methylierte, glucuronidierte, sulfatierte und hydroxylierte Verbindungen in Urinproben erfasst (Kay *et al.* 2003). In der Summe wurden aber nie mehr als 1% der verabreichten Menge an Anthocyanen, Anthocyanidinen und deren Glucuroniden und Sulfaten ermittelt. Der Fäces ist bis auf wenige Ausnahmen, bei denen sehr große Mengen an Anthocyanen verabreicht wurden, frei von Anthocyanen, da diese offensichtlich durch die Mikroflora des Kolons abgebaut werden. Inkubationen von Anthocyanen mit Schweinecaecum zeigten, dass die Anthocyane zunächst deglykosiliert und dann im C-Ring zu phenolischen Säuren und Phloroglucinacetaldehyd gespalten werden (Keppler und Humpf 2005). Diese Metabolisierungsprodukte werden dann entweder über den Fäces ausgeschieden oder durch die Dickdarmmucosa resorbiert (McGhie und Walton 2007). Über das Ausmaß der fäkalen Ausscheidung von Anthocyanen und Metaboliten gibt es in der Literatur verschiedene Angaben. Während manche Studien im Fäces keine Anthocyane und deren Metabolite nachweisen (Bub *et al.* 2001) werden in anderen Studien sowohl Anthocyane in kleinen Mengen als auch deren Metabolite gefunden (Felgines *et al.* 2002). So wurde Protocatechursäure, die phenolische Säure des B-Ringes als Hauptmetabolit (28% des verabreichten Cyanidinglykosides wurde metabolisiert und fäkal als Protocatechursäure ausgeschieden) im Menschen postuliert (Vitaglione *et al.* 2007). Neuere Studien widerlegen diese Aussage (Ichiyanagi *et al.* 2007) zum Teil, andere stützen sie (Azzini *et al.* 2010, Nurmi *et al.* 2010). Die widersprüchliche Datenlage deutet zum einen auf sehr große individuelle Unterschiede hin, zeigt aber auch, dass weitere Studien notwendig sind, um die Bioverfügbarkeit und die Metabolisierung der Anthocyane im humanen Organismus zu verstehen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Bestimmung des Anthocyangehaltes von Heidelbeeren

Die Identifizierung der einzelnen Heidelbeeranthocyane erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Diodenarray-Detektion in der Kopplung mit einem Elektrospray-Tandemmassenspektrometer (HPLC-DAD-ESI-MS/MS). Quantifizierungen erfolgten mittels HPLC-DAD anhand eines Standards (3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure) (Geräteparameter und -bedingungen siehe Abschnitt 4.2.1 und 4.2.2). Die Anthocyane wurden bei einer Wellenlänge von 520 nm und der Quantifizierungsstandard bei einer Wellenlänge von 304 nm detektiert.

Durch geeignete Gradientenentwicklung (Parameter siehe Abschnitt 4.2.1) sind in den von uns untersuchten Heidelbeeren 14 verschiedene Anthocyane chromatographisch getrennt (vgl. Abbildung 3.1) und identifiziert worden.

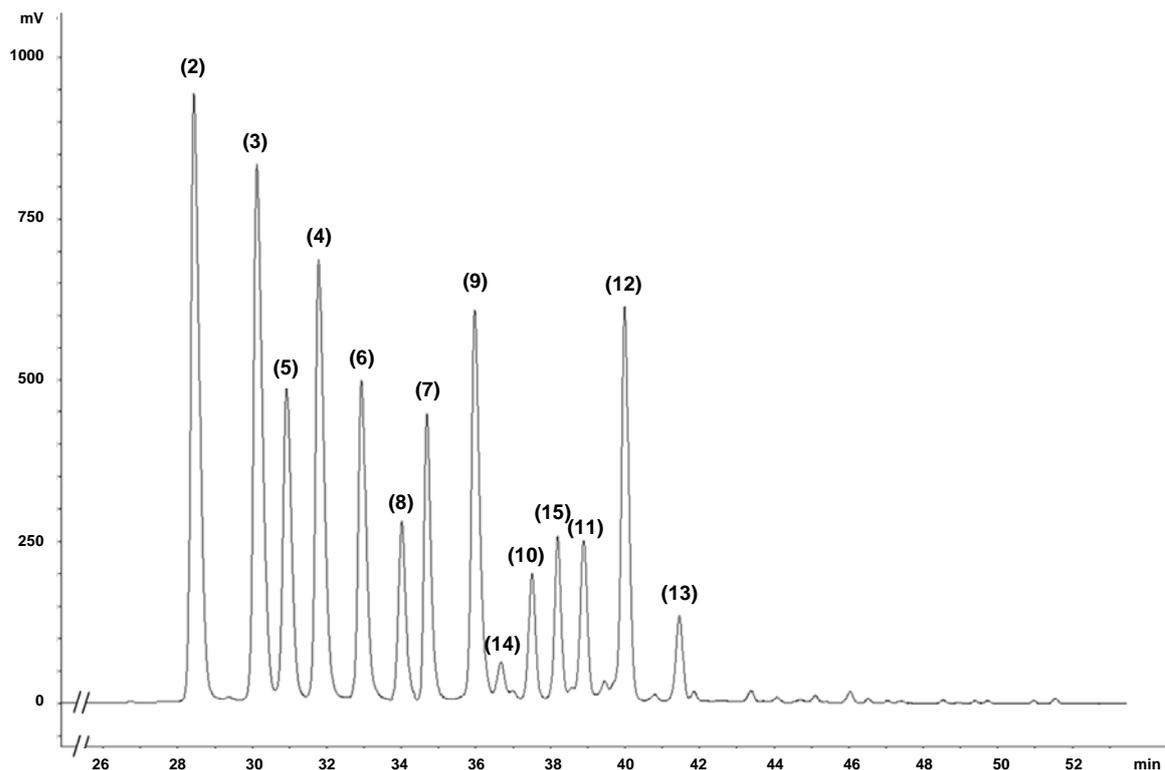


Abbildung 3.1: HPLC-Chromatogram eines Heidelbeer-Anthocyanextraktes bei 520 nm (experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.2.1); die Strukturformeln der einzelnen Verbindungen sind in Kapitel 5 dargestellt.

Die strukturelle Absicherung der einzelnen Anthocyane (Kapitel 5) erfolgte mittels HPLC-ESI-MS/MS. Die eingesetzte Ionisierungstechnik der Elektrospray-Ionisierung (ESI) besitzt den Vorteil, dass die Analyten weitgehend zerstörungsfrei ionisiert und intakte Pseudomolekülonen zur Ermittlung der Molekülmasse herangezogen werden (Gross

2004). Hierbei war zu beachten, dass die zur quantitativen Überführung der Anthocyane in die Form des Flavyliumkations (vgl. Abbildung 2.2) nötige Säurekonzentration sowohl bei der Verwendung von 10%iger Ameisensäure als auch bei dem alternativ in der Literatur verwendeten TFA das Massenspektrometer schädigt. Aus diesem Grund wurde bei den Experimenten mit Massenanalyse nur 2,5%ige Ameisensäure verwendet (HPLC-System 3 Kapitel 4.4.2). Diese Versuchsreihen dienen allerdings lediglich der Strukturabsicherung; eine Quantifizierung war aufgrund des nicht vollständigen Übergangs der Anthocyane in die kationische Struktur nicht möglich.

Die Messungen können grundsätzlich sowohl im positiven als auch im negativen Modus durchgeführt werden. Aufgrund der kationischen Struktur der Anthocyane im sauren Milieu bietet sich aber der positive Modus an. In Produktionenexperimenten lassen sich die Precursornionen unter Stoßaktivierung fragmentieren, wodurch weitere Informationen zur Struktur des ursprünglichen Moleküls zugänglich sind. Hierbei wird der Zucker abgestoßen, so dass die Masse des Aglykons gemessen werden kann. Auf diese Weise ließen sich die Massen der Anthocyane und der jeweiligen Aglykone bestimmen. Durch die Bildung der Differenz der beiden Massen konnte ermittelt werden, ob es sich beim glykosidisch gebundenen Zucker um eine Hexose oder eine Pentose handelte. Die Entscheidung, um welchen Zuckerrest es sich genau handelte, wurde durch Abgleich der Retentionszeiten mit Literaturdaten erreicht, da bereits bekannt war, dass Galaktoside bei der verwendeten Umkehrphasenanalytik (RP-HPLC) immer vor den Glukosiden eluieren. Außerdem waren aus der Literatur die Bindungsstellen der Zucker an das Aglykon sowie deren Konstitution bekannt (Kähkönen *et al.* 2003, Ichyanagi *et al.* 2004, Kraus *et al.* 2010).

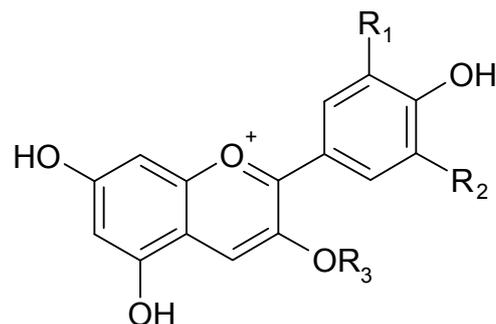


Abbildung 3.2: Grundstruktur der Anthocyane in der Heidelbeere (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1 fasst die Retentionszeiten sowie die Fragmentierung und das Substitutionsmuster der in den von uns verwendeten Heidelbeeren gefundenen Anthocyane zusammen. Die Heidelbeeranthyocyane sind in 3-Position am C-Ring glykosiliert und unterscheiden sich neben dem Zuckerrest noch im Substitutionsmuster des B-Ringes (vgl. Anthocyangrundstruktur Abbildung 3.2). Von den in der Literatur beschriebenen 15 Anthocyanen, den 3-O-Arabinosiden, 3-O-Galaktosiden und 3-O-Glukosiden der Antho-

cyanidine Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Peonidin und Petunidin kam nur das Peonidin 3-O-arabinosid in den von uns untersuchten Heidelbeeren nicht vor.

Tabelle 3.1: Retentionszeiten, Bezeichnungen, Massendaten und Gehalte der in Heidelbeeren gefundenen Anthocyane (experimentelle Bedingungen siehe Abschnitt 4.2.1)

RT [min]	Anthocyan (Nummer) vgl. Kapitel 5 sowie Abbildung 3.1	R ₁	R ₂	R ₃	MS/MS (m/z)	Gehalt /kg FG
28,4	Delphinidin-3-O-β-D-galaktopyranosid (2)	OH	OH	Gal	465,1; 303,0	927 mg
30,0	Delphinidin-3-O-β-D-glukopyranosid (3)	OH	OH	Glc	465,0; 302,9	854 mg
31,8	Delphinidin-3-O-α-L-arabinofuranosid (4)	OH	OH	Ara	435,0; 302,9	684 mg
30,9	Cyanidin-3-O-β-D-galaktopyranosid (5)	OH	H	Gal	449,1; 286,9	477 mg
33,0	Cyanidin-3-O-β-D-glukopyranosid (6)	OH	H	Glc	449,1; 287,0	476 mg
34,8	Cyanidin-3-O-α-L-arabinofuranosid (7)	OH	H	Ara	419,0; 286,9	371 mg
34,0	Petunidin-3-O-β-D-galaktopyranosid (8)	OH	OCH ₃	Gal	479,1; 316,9	252 mg
36,1	Petunidin-3-O-β-D-glukopyranosid (9)	OH	OCH ₃	Glc	479,0; 317,0	574 mg
37,5	Petunidin-3-O-α-L-arabinofuranosid (10)	OH	OCH ₃	Ara	449,1; 317,0	166 mg
38,9	Malvidin-3-O-β-D-galaktopyranosid (11)	OCH ₃	OCH ₃	Gal	493,1; 331,0	223 mg
40,1	Malvidin-3-O-β-D-glukopyranosid (12)	OCH ₃	OCH ₃	Glc	493,1; 330,9	542 mg
41,6	Malvidin-3-O-α-L-arabinofuranosid (13)	OCH ₃	OCH ₃	Ara	463,0; 330,9	127 mg
36,7	Peonidin-3-O-β-D-galaktopyranosid (14)	OCH ₃	H	Gal	463,0; 301,0	75 mg
38,2	Peonidin-3-O-β-D-glukopyranosid (15)	OCH ₃	H	Glc	463,1; 301,0	227 mg

Zur Durchführung exakter Analysen ist es grundsätzlich nötig, authentisches Referenzmaterial in geeigneter Reinheit zu besitzen. Die Bereitstellung ist bei Naturstoffen oft schwierig, da viele Verbindungen nicht kommerziell zu beziehen sind. Dies galt im vorliegenden Fall vor allem für die Arabinoside der Anthocyanidine. Aus diesem Grund wurden von uns die Anthocyane aus (tiefgefrorenen) Heidelbeeren extrahiert, der Extrakt mittels Säulenchromatographie an Amberlite® XAD7 (SC1, siehe Kapitel 4.1.4) von Säuren, Zucker und anderen Polyphenolen gereinigt und die Anthocyane mittels präparativer HPLC (Geräteparameter: siehe HPLC System 1) gewonnen. Da sich zwei Anthocyane, Cyanidin-3-O-arabinosid und Petunidin-3-O-galaktosid, an dem bei der präparativen HPLC verwendeten C18-Material nicht trennen ließen, wurde die erhaltene Mischfraktion an einer analytischen C8-HPLC-Säule getrennt (HPLC System 2).

Tabelle 3.2 zeigt die Auswaagen der isolierten Verbindungen, die aufgrund unterschiedlicher Gehalte in den Beeren zwischen 2,8 mg für Peonidin-3-O-galaktosid und 11,2 mg für Cyanidin-3-O-glukosid lagen. Reinheiten zwischen 85,8% (für Peonidin-3-O-glukosid) und 99,4% (für Cyanidin-3-O-galaktosid) wurden erreicht (vgl. Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Isolierte Mengen und Reinheit der mittels präparativer HPLC isolierten Heidelbeer-anthocyane

Anthocyan	Auswaage [mg]	Reinheit [%]
Delphinidin-3-O-galaktosid	8,3	95,4
Delphinidin-3-O-glukosid	10,6	96,0
Delphinidin-3-O-arabinosid	9,3	89,0
Cyanidin-3-O-galaktosid	7,9	99,4
Cyanidin-3-O-glukosid	11,2	89,9
Cyanidin-3-O-arabinosid	4,1	97,4
Petunidin-3-O-galaktosid	4,0	98,7
Petunidin-3-O-glukosid	7,9	93,9
Petunidin-3-O-arabinosid	3,6	88,0
Malvidin-3-O-galaktosid	6,1	87,9
Malvidin-3-O-glukosid	8,4	90,3
Malvidin-3-O-arabinosid	5,3	97,8
Peonidin-3-O-galaktosid	2,8	86,7
Peonidin-3-O-glukosid	3,7	85,8

Mit Hilfe der isolierten Referenzsubstanzen ließen sich Kalibriergeraden erstellen, welche zur Quantifizierung der Anthocyane genutzt wurden. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der einzelnen Substanzen lagen zwischen 2,6 und 3,4 ng bzw. zwischen 5,5 und 5,9 ng, wobei ein Signal/Rauschverhältnis von 3:1 für die Nachweisgrenze und 5:1 für die Bestimmungsgrenze zugrunde gelegt worden ist (Coleman *et al.* 2001). Die Nachweisgrenze ist definiert als die kleinste Konzentration einer Verbindung, die mit einem Analyseverfahren noch detektiert werden kann. Die Bestimmungsgrenze legt den untersten Wert fest, bei dem noch reproduzierbar quantifiziert werden kann.

Als Quantifizierungsstandard diente die in der Natur nicht vorkommende 3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure. Die Anthocyangehalte der verwendeten Heidelbeeren wurden mittels HPLC-DAD (HPLC System 3/Kapitel 4.2.1) bestimmt und sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Der Gesamtanthocyangehalt betrug 6,0 g/kg. Die untersuchte Heidelbeercharge wurde für alle dieser Arbeit zugrundeliegenden Studien verwendet. Einzige Ausnahme ist die Bestimmung des Anthocyangehaltes im Urin, da die Urinproben aus einer früheren Interventionsstudie mit Ileosomiepatienten stammten. Die Ergebnisse dieser Studie wurden bereits veröffentlicht (Kahle *et al.* 2006, Kraus 2006, Kraus *et al.* 2010). Die hier verwendeten Heidelbeeren hatten mit 7,8 g/kg einen sehr hohen Anthocyangehalt.

Die Gehalte der einzelnen Anthocyane schwankten, wie aus der Literatur bekannt, zwischen 927 mg/kg bei Delphinidin-3-O-galaktosid und 75 mg/kg bei Peonidin-3-O-galaktosid. Im Vergleich zu Literaturangaben war der Gesamtgehalt sehr hoch. Die in der Literatur angegebenen Werte schwanken zwischen 0,12 g/kg und 7,83 g/kg (Jurd 1972, Clifford 2000, Sellappan et al. 2002, Kähkönen et al. 2003, Kraus 2006). Diese Variationen sind dadurch begründet, dass neben Wildheidelbeeren mit hohen Anthocyangehalten auch Kulturheidelbeeren mit weit geringeren Gehalten an sekundären Pflanzenstoffen untersucht wurden. Auch Sorte sowie der Reifegrad der Beeren beeinflussen den Anthocyangehalt der Heidelbeeren.

3.2 Studien zur Verfügbarkeit von Anthocyanen: Strategie

Das antioxidative Potential der Anthocyane sowie ihre daraus abgeleiteten gesundheitsfördernden Wirkungen wie antikanzerogene, antivirale, antiallergene, antiinflammatorische und immunstimulierende Eigenschaften sind abhängig von Absorption, Metabolisierung und Verteilung dieser Substanzen im Körper sowie deren Ausscheidung aus dem Körper nach oraler Aufnahme. Aufgrund dessen ist das Interesse an der biologischen Verfügbarkeit dieser phenolischen Substanzen gestiegen, und entsprechende Untersuchungen sind gegenwärtig Schwerpunkt zahlreicher Studien. Forschungsarbeiten der letzten Jahre waren der Aufnahme der Anthocyane und deren Verstoffwechslung im humanen Gastrointestinaltrakt gewidmet, die in Abhängigkeit der einzelnen Substanz und/oder der Lebensmittelmatrix stark variieren (Keppler und Humpf 2005, Kraus 2006, McGhie und Walton 2007, Knaup 2008).

Die Ergebnisse der überwiegenden Zahl von Studien zur Bioverfügbarkeit sind jedoch kritisch zu bewerten, da entweder unphysiologisch hohe Konzentrationen der einzelnen Anthocyane verwendet und/oder die Untersuchungen mit Anthocyanidinen, die so in der Natur nicht vorliegen, durchgeführt wurden. Außerdem wird häufig auf eine exakte Quantifizierung verzichtet und die Anthocyankonzentration als Äquivalente des Anthocyan angegeben, das den jeweiligen Autoren zur Verfügung stand. Humanstudien zur Verfügbarkeit von Anthocyanen zeigten nicht zuletzt aus diesen genannten Gründen widersprüchliche Ergebnisse.

Insgesamt ist die Absorption von Anthocyanen nach Aufnahme physiologischer Konzentrationen sehr gering, ihre Plasmakonzentrationen bewegen sich im nM- bis unteren µM-Bereich (McGhie und Walton 2007). In den peripheren Geweben ist die Bioverfügbarkeit von mit der Nahrung aufgenommenen Polyphenolen aufgrund einer hohen intestinalen und biliären Sekretion der Konjugate verringert (Silberberg *et al.* 2006). Der Hauptteil der mit der Nahrung aufgenommenen Anthocyane und ihrer Metabolite verbleibt daher im Darmlumen, in dem, abhängig von der aufgenommenen Menge, sehr hohe Konzen-

trationen vorliegen können (Kahle *et al.* 2006). Die präventiven Effekte der Verbindungen sind deshalb vor allem in Dünn- und Dickdarm von Bedeutung, wobei gezeigt wurde, dass die Anthocyane in diesen Milieus zum Teil rasch abgebaut werden (Keppler und Humpf 2005, Kraus 2006). Um geeignete Aussagen zur Wirksamkeit von Anthocyanen aus der Nahrung im gesamten Darmtrakt treffen zu können, ist die Kenntnis ihrer individuellen Stabilitäten in den verschiedenen Bereichen des Gastrointestinaltraktes unerlässlich. Eine Interventionsstudie zur Verfügbarkeit von Anthocyanen im Dickdarm lag aus unserem Arbeitskreis bereits vor (Kahle *et al.* 2006). Ebenso war von unserer Gruppe die Stabilität von Anthocyanen im humanen Dünn- und Dickdarm bereits untersucht worden (Kraus 2006, Knaup 2008) und wurde demzufolge im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur noch stichprobenartig überprüft. Um die Erkenntnisse zu vervollständigen, wurde nunmehr eine Reihe von Modelluntersuchungen durchgeführt. Hierbei wurden die Anthocyane unter aeroben Bedingungen mit Speichel, simuliertem Magensaft und simuliertem Duodenalsaft inkubiert. Diesen humanen Körperflüssigkeiten wurde hinsichtlich ihrer Fähigkeit, mit Anthocyanen zu interagieren und sie zu metabolisieren, bisher kaum Beachtung geschenkt. Für diese Experimente wurde eine Mischung aus Anthocyanen der Heidelbeere verwendet. Die eine Aufstellung der Anthocyanzusammensetzung dieser Lösung ist in Tabelle 7.8 (Anhang) dargestellt. Außerdem wurde die renale Elimination im Rahmen einer Humanstudie untersucht.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit erfolgt die Darstellung der Ergebnisse in der Reihenfolge, in welcher die Polyphenole nach oraler Aufnahme den Magen-Darm-Trakt passieren.

3.2.1 *Ex vivo*-Inkubationen mit Speichel

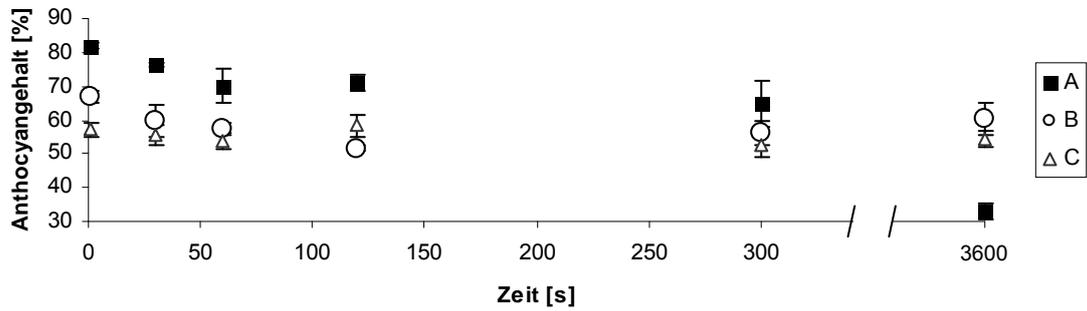
Um zu überprüfen, ob der Speichel einen Einfluß auf die Zusammensetzung der Anthocyane aus Heidelbeeren hat, wurden *ex vivo*-Inkubationen mit verschiedenen Anthocyanen unter aeroben Bedingungen durchgeführt (Bedingungen siehe Kapitel 4.3.2; Konzentrationen der Anthocyane siehe Tabelle 7.8 im Anhang). Zu diesem Zweck wurde der Speichel mehrerer Probanden homogenisiert, mit Wasser verdünnt und in drei Ansätze aliquotiert. Bei Ansatz A wurden durch Zentrifugation aus Speichelsekret zelluläre Bestandteile entfernt, so dass das Inokulum (Inkubationslösung) nur gelöste, niedermolekulare Proteinen enthielt (Hirota *et al.* 2001, Yang *et al.* 1999). Ansatz B, bei dem im Speichelsekret noch abgelöste Epithelzellen, Bakterienzellen und geringe Mengen an Leukozyten vorhanden waren (Yamamoto *et al.* 1991, al-Essa *et al.* 1994, Yang *et al.* 1999, Hirota *et al.* 2001), wurde direkt für die Inkubationsversuche eingesetzt. Zur Überprüfung des oralen Bakterieneinflusses auf die Stabilität der Anthocyane wurde Ansatz C mit Penicillin/Streptomycin-Antibiotikum versetzt und das Gemisch als Inokulum

verwendet. Aliquote der Inokuli A bis C wurden in parallelen Ansätzen jeweils in Inkubationsgefäße gegeben, die bereits Anthocyane enthielten. Die Inkubationen wurden bei 37 °C durchgeführt. Zu Kontrollzwecken erfolgten Ansätze ohne Anthocyane (Blindwerte) sowie Versuche ohne Inokulum (Kontrollwerte). Nach Ablauf der Inkubation wurden die einzelnen Proben gefriergetrocknet und extrahiert. Die Identifizierung und Quantifizierung (Durchführung siehe 4.3.2.3) der Substanzen erfolgte mittels HPLC-DAD anhand des Vergleichs von Retentionszeiten und UV-Spektren der Probenmoleküle mit denen authentischer Referenzverbindungen. Der zeitliche Verlauf der Anthocyankonzentrationen während der Inkubationen wurde mittels HPLC-DAD registriert. Zur Quantifizierung sind Kalibriergeraden unter Verwendung eines Standards (3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure) bei einer für die jeweiligen Substrate charakteristischen Wellenlänge aufgenommen worden.

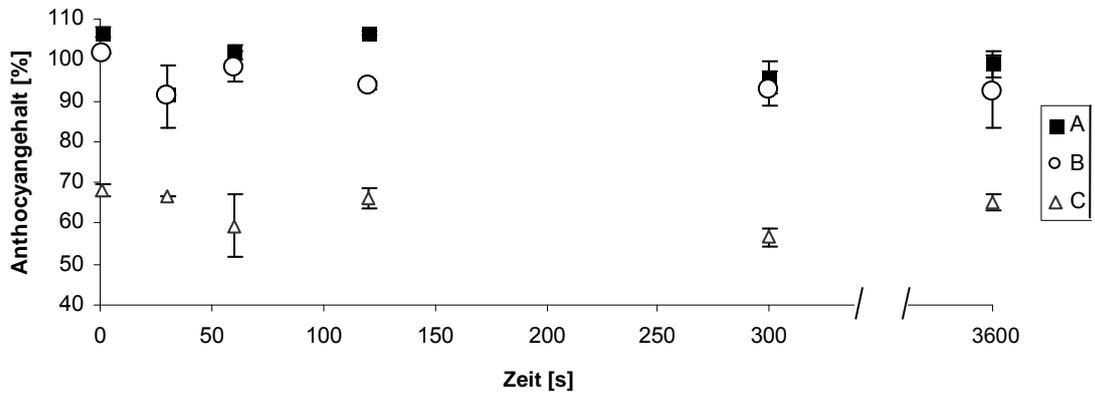
In den Versuchsansätzen A (Speichel zentrifugiert) lag die Wiederfindung im Bereich von 77,7% bis 108,6%, bezogen auf die eingesetzte Menge des jeweiligen Anthocyan (genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 7.8). Aufgrund besserer Vergleichbarkeit sind alle Anthocyankonzentrationen in Prozent angegeben. Besonders bei den Glykosiden des Delphinidins war die Wiederfindung bei diesem Versuchsansatz (A) mit Werten zwischen 77,7% und 82,5% sehr gering. Als Erklärung für dieses dürfte die bekannte hohe chemische Instabilität der Verbindungen dienen. Zu berücksichtigen ist schließlich, dass beim Anfangswert (s. o.; siehe Tabellen 7.1 bis 7.3 im Anhang) aufgrund der Probenaufarbeitung eine gewisse Zeit vergangen ist. In dieser Versuchsreihe war bei den Glykosiden des Delphinidins ein Abbau eindeutig erkennbar, die anderen geprüften Anthocyane erwiesen sich als sehr viel stabiler (vgl. Abb. 3.3a sowie Rohdatentabelle 7.1 aller untersuchten Anthocyane im Anhang). Dies kann mit der hohen pH-abhängigen chemischen Instabilität der Delphinidinglykoside begründet werden.

In der Versuchsreihe B, bei welcher der gesamte Speichel als Inokulum verwendet wurde, ermittelte man etwas geringere Wiederfindungsraten als im Versuchsansatz A. Sie lagen zu Beginn der Inkubation bei 64,5% bis 102,2%. Auch hier zeigten genau wie beim zentrifugierten Inokulum (Versuchsansatz A) die Delphinidinglykoside geringere Wiederfindungsraten. Die erhaltenen Abbaukurven zeigen, dass sich tendenziell die Anthocyane etwas langsamer abbauen als in der zell- und bakterienfreien Inkubationslösung A (Abb. 3.3). Die Epithelzellen und die Bakterien fördern also keinesfalls die Metabolisierung der Anthocyane, wie dies für andere Polyphenole publiziert ist (Walle *et al.* 2005, Kahle 2008).

(a)



(b)



(c)



Abbildung 3.3: Anthocyanengehalt (in % bezogen auf die eingesetzte Anthocyanmenge) nach Inkubations von Anthocyanen ($n=2$) mit Speichelsekret (0 s - 3600 s). Ansatz A (■) nach Zentrifugation, Ansatz B (○) direkt und Ansatz C (△) bei Zugabe von Penicilin-Streptomycin-Antibiotikum. Repräsentative Darstellung des Verhaltens der Anthocyane (a) Delphinidin-3-O-galaktosid, (b) Cyanidin-3-O-glukosid und (c) Petunidin-3-O-arabinosid.

Im Versuchsansatz C, der neben dem Speichelsekret auch Antibiotika enthielt, war signifikant kein Abbau der Anthocyane im Versuchszeitraum festgestellt. Die Abnahme im Anthocyanengehalt vom Beginn der Inkubation bis zum letzten Messwert nach einer Stunde lag im unteren einstelligen Prozentbereich (vgl. Abb. 3.3 sowie Tabelle 7.3). In diesem Inkubationsmedium war die Wiederfindung mit nur 44,1% bis 68,1% sehr gering. Die Ursache dürfte in Wechselwirkungen zwischen Antibiotika und Anthocyanen zu suchen sein.

Aufgrund der in der Versuchsreihe A erzielten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass der Anthocyanabbau unter diesen Versuchsbedingungen nur von der chemischen Instabilität der Anthocyane im neutralen Milieu abhängig ist. Hierauf deutet auch der im Vergleich zu den übrigen Anthocyanen rasche Zerfall der Delphinidinglykoside hin (Abb. 3.3), da sowohl das Aglykon Delphinidin als auch seine Glykoside in der Literatur als sehr instabil beschrieben sind (Kraus 2006). Die niedrige Wiederfindung dieser Verbindungen ist entweder mit einer höheren Bindungsaffinität zu den Proteinen des Inkubationsmediums oder aber auf einen sehr schnellen Zerfall vor der Zugabe des Mediums (vortemperieren) zu erklären.

Sowohl für die Epithelzellen, als auch für Bakterien und Speichelsekret hat man Glukosidaseaktivität nachgewiesen (Mahler und Chauncey 1957, Nishioka *et al.* 1981, Walle *et al.* 2005). Allerdings scheint diesen Ergebnissen zufolge keines der im Speichel vorhandenen Enzyme die Anthocyanidinglykoside zu spalten. Eine Spaltung der glykosidischen Bindung durch α -Amylase, wie sie in der Literatur für Phloretin-, Quercetin- und Genisteinglykoside beschrieben ist (Walle *et al.* 2005, Kahle 2008), wurde bei den untersuchten Anthocyanen nicht beobachtet. Neuere Studien zeigten, dass es zu einer Wechselwirkung zwischen humaner Speichelamylase und Anthocyanen kommt. Hier wurden die Anthocyane nicht als Substrate für das Enzym eingesetzt, sondern zur Enzymhemmung (Wiese *et al.* 2009, Soares *et al.* 2007). Diese Studien belegen, dass es zu Wechselwirkungen bis hin zu einer Bindung zwischen Speichelamylase und Anthocyanen kommt. Diese Wechselwirkungen können eventuell einen stabilisierenden Einfluss auf das Anthocyanmolekül haben, da es sich durch Bindung an ein Protein/Enzym dem chemischen Abbau entziehen kann (Viljanen 2005).

In vivo beeinflusst die Lebensmittelmatrix, mit der die Polyphenole aufgenommen werden, deren Abbau in der Mundhöhle. Erfolgt die Aufnahme in flüssiger Form, ist der Zugang für Enzyme der Mundflora erleichtert, bei der Aufnahme von fester Nahrung ist ein umfassendes Kauen erforderlich (Walle *et al.* 2005). Es muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass die Verweildauer von flüssigen Lebensmitteln in der Mundhöhle extrem kurz ist und auch feste Nahrung in der Regel bereits nach wenigen Sekunden geschluckt wird. Außerdem wird der für den Abbau der Anthocyane wichtige pH-Wert durch große Mengen

an Speisen und Getränken sehr stark verändert, da die Pufferkapazität des Speichels nur sehr gering ist (Abbildung 3.4) und die Nahrung, insbesondere anthocyanreiche Fruchtsäfte, einen sehr niedrigen pH-Wert haben. Zwar zeigt Abbildung 3.4 eine nahezu optimale Pufferkurve, allerdings kann der pH-Wert von 20 mL Speichel, wie aus der Grafik zu erkennen ist, mit nur 0,2 mmol Protonen auf pH 4 gesenkt werden. Nimmt man bei anthocyanhaltigen Früchten einen Säuregehalt von 2% an und geht von Äpfelsäure aus, so wären in einem Gramm Frucht bereits 0,3 mmol Protonenäquivalente enthalten. Eine Pufferung des Speisebreies durch den Speichel ist also vernachlässigbar, da nicht davon ausgegangen werden kann, dass sich zum einen 20 mL Speichel im Mundraum befinden und zum anderen, dass nur ein Gramm Frucht verspeist wird. Nach dem Schluckprozess erfolgt außerdem eine rasche Inaktivierung der Enzyme in der sauren Umgebung des Magens.

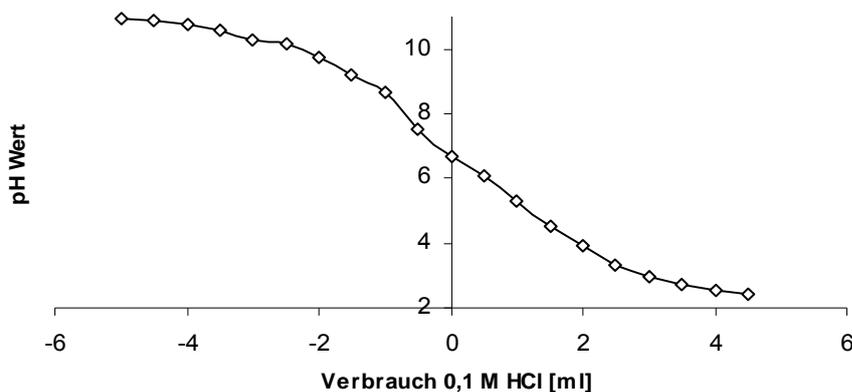


Abbildung 3.4: Titration von 20 mL mit 5 mL 0,1 M NaOH versetztem Speichel mit 0,1 M Salzsäure

Darüber hinaus spielen interindividuelle Unterschiede bei der Enzymzusammensetzung im Speichel eine Rolle, die entweder genetisch bedingt sind oder durch Umweltfaktoren hervorgerufen werden können (Walle *et al.* 2005). Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass es bei einigen Menschen aufgrund der genetischen Voraussetzungen doch zu einer Hydrolyse und so zu einem schnelleren Abbau der Anthocyane im Mundraum kommen könnte.

3.2.2 *In vitro*-Inkubationen mit simuliertem Magensaft

Um die Stabilität von Anthocyanen im sauren Milieu des Magens zu überprüfen, auch hier wurde eine aus der Heidelbeere mittels Festphase extrahierte Anthocyanmischung verwendet. Die Anthocyane wurden in Konzentrationen zwischen 0,02 und 0,11 mg/mL eingesetzt (vgl. Tabelle 7.8 im Anhang). Als Inkubationsmedium diente künstlicher

Magensaft (pH 1,81; mit Pepsin) zur Simulation der Bedingungen im Magen (Kahle 2008). Die Proben wurden jeweils für 0, 20, 40 Minuten, 1, 1,5, 2 und 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Anthocyane (Blindwert) bzw. Anthocyane ohne simulierten Magensaft (Kontrollwert). Der Reaktionsstopp erfolgte jeweils durch sofortiges Einfrieren mit flüssigem Stickstoff. Die Proben wurden anschließend gefriergetrocknet und nach Extraktion mittels HPLC-DAD analysiert. Die Quantifizierung erfolgte anhand entsprechender Kalibriergeraden unter Verwendung eines Standards (3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure).

Für die Arabinoside, Galaktoside und Glukoside der Aglykone Delphinidin, Cyanidin, Petunidin und Malvidin wurden Stabilitätskurven erstellt. Die Konzentration der Anthocyane zu Beginn der Inkubation wurde gleich 100% gesetzt. Alle untersuchten Anthocyane erwiesen sich im Inkubationszeitraum als stabil. Am Ende der Inkubationszeit (nach 4 Stunden) lagen noch zwischen 93,3% und 103,3% bezogen auf die Anfangskonzentration vor. In Abbildung 3.5 sind als repräsentative Beispiele Delphinidin-3-O-galaktosid, Cyanidin-3-O-glukosid und Petunidin-3-O-arabinosid aufgeführt. Auf die graphische Darstellung aller Ergebnisse wurde aufgrund übereinstimmender Ergebnisse verzichtet; die Einzeldaten sind in Tabelle 7.4 zusammengestellt.



Abbildung 3.5: Stabilität von Anthocyanen in simuliertem Magensaft über vier Stunden am Beispiel von Delphinidin-3-O-galaktosid (■), Cyanidin-3-O-glukosid (○) und Petunidin-3-O-arabinosid (△).

Ein zwischenzeitlicher Anstieg des Anthocyanengehalts auf bis zu 110% ist nicht nur mit Schwankungen in der Messmethodik zu erklären, sondern wurde auch schon früher in der Literatur beschrieben (Pérez-Vicente *et al.* 2002). Eine Erklärung für dieses Phänomen dürfte die vollständige Umwandlung der Anthocyanstrukturen in die Struktur des Flavyliumkations sein. Dieses zeigt ein Absorptionsmaximum bei ca. 520 nm.

Die Stabilität der Anthocyane im sauren Milieu des Magens ist für Extrakte anderer Pflanzen wie Granatapfel oder Rotkohl bekannt (Pérez-Vicente *et al.* 2002, McDougall *et*

al. 2007). *In vivo* ist ebenfalls von der Stabilität der Anthocyane im Magen auszugehen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Anthocyane im Lebensmittel meist mit anderen Nahrungsbestandteilen aufgenommen werden, so dass die Bedingungen im Magen nicht exakt simuliert werden können. Besonders bei der Aufnahme größerer Mengen ist aufgrund des puffernden Charakters der Nahrung (z.B. Proteine) mit einem Anstieg des für die Anthocyanstabilität wichtigen pH-Wertes zu rechnen.

3.2.3 *In vitro*-Inkubationen mit simuliertem Duodenalsaft

Zur Prüfung der Stabilität von in Heidelbeeren enthaltenen Anthocyanen in Gegenwart des neutralen bis leicht alkalischen Duodenalsaftes wurden *in vitro*-Inkubationen unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Als Inokulum diente künstlicher Duodenalsaft (pH $7,2 \pm 0,1$; mit Pankreatin), zur Simulation der Bedingungen des Duodenums während der Inkubationen. Die Anthocyane wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, wobei Probenahmen nach 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 24 Stunden erfolgten. Zur Kontrolle wurden Versuchsreihen ohne Anthocyane bzw. ohne simulierten Duodenalsaft durchgeführt. Die Reaktion wurde jeweils durch sofortiges Einfrieren mit flüssigem Stickstoff gestoppt. Die Proben wurden gefriergetrocknet und nach Extraktion zur HPLC-DAD -Analytik eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte anhand entsprechender Kalibriergeraden unter Verwendung eines Standards (3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure).

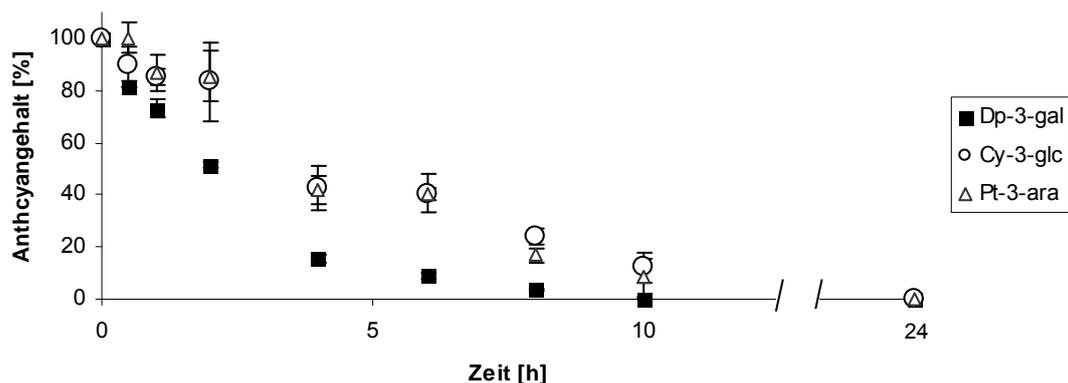


Abbildung 3.6: Stabilität von Anthocyanen nach Inkubation mit Duodenalsaftsimulans am Beispiel von Delphinidin-3-O-galaktosid (■), Cyanidin-3-O-glukosid (○) und Petunitin-3-O-arabinosid (Δ).

Wie bei der vorausgegangenen Inkubation mit simuliertem Magensaft wurde eine Mischung aus zwölf Anthocyanen, die aus Heidelbeeren isoliert worden waren, eingesetzt und die Konzentration für die einzelnen Anthocyane zu Beginn der Inkubation zur besseren Vergleichbarkeit auf 100% festgesetzt (Konzentrationen siehe Tabelle 7.8). Bereits

bei der ersten Messung nach 30 min war bei acht der inkubierten Anthocyane ein Abbau feststellbar. Lediglich die Glykoside des Petunidins sowie Cyanidin-3-O-arabinosid erwiesen sich zu diesem Zeitpunkt als stabil (vgl. Kapitel 7). Wie bei den in Abbildung 3.6 repräsentativ gezeigten Anthocyanen zu sehen ist, lagen nach zehn Stunden die Restgehalte bei allen Anthocyanen unter 12%; die Delphinidinglykoside waren zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig abgebaut. Am Ende der Inkubation war in der Inkubationslösung kein Anthocyan mehr nachweisbar.

Interessanterweise zeigten Kontrolluntersuchungen mit Pufferlösung (pH $7,2 \pm 0,1$) ohne Pankreatin und Gallensalze ähnliche Resultate für die genannten Anthocyane, wie sie bei den Inkubationen mit enzymhaltigem künstlichen Duodenalsaft erhalten wurden (Daten sind nicht gezeigt), so dass die beobachteten Effekte auf die physiko-chemischen Bedingungen (neutraler bis leicht alkalischer pH) zurückzuführen sind. In Analogie zu den Inkubationen mit simuliertem Magensaft kommt es durch die Anwesenheit von Pankreatin zu Wechselwirkungen mit den Anthocyanen, die deren verminderte Verfügbarkeit im Duodenum bedingen. Ähnliches wurde in der Literatur bereits für Aroniaextrakte (Bermúdez-Soto. *et al.* 2006), Anthocyane aus Rotkohl (McDougall *et al.* 2007) und Granatapfel (Pérez-Vicente *et al.* 2002) gezeigt.

Generell gilt es zu beachten, dass Lebensmittel einen puffernden Effekt über einen längeren Zeitraum ausüben können und somit die Abbaurate empfindlicher Verbindungen wie z.B. der Anthocyane verringert sein kann. Bermúdez-Soto. *et al.* (2006) zeigten, dass bei der Inkubation von Aroniasaft einige Polyphenole einem geringeren Abbau durch simulierten Duodenalsaft unterlagen als bei einer Inkubation der Reinsubstanzen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Anthocyane die Mundhöhle und den Magen unbeschadet überstehen. Sobald sie aber in den Dünndarm gelangen, unterliegen sie aber aufgrund der geringen Acidität des Gallen- und Bauchspeicheldrüsensekretes einem Abbau. Der entscheidende Faktor hierfür ist somit der pH-Wert des Duodenums.

3.2.4 Metabolisierung der Anthocyane im Dün- und Dickdarm

Aufgrund der oben genannten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass im Humanstoffwechsel die aufgenommenen Anthocyane nahezu vollständig und unverändert den Magen verlassen und ein gewisser Teil im Zwölffingerdarm abgebaut wird; der überwiegende Teil erreicht den Leerdarm. Im neutralen bis leicht alkalischen Milieu des Dünndarms sind die Anthocyane nicht stabil. Allerdings hat man kürzlich in einer humanen Interventionsstudie gezeigt, dass ungefähr 50% der Anthocyane, die mit einer Portion Heidelbeeren aufgenommen wurden, unbeschadet den Dickdarm erreichten. Dabei traten große strukturabhängige Unterschiede in der Abbaugeschwindigkeit der einzelnen Anthocyane auf. So hat man für Cyanidin-3-O-glukosid nur 28,3%, von

Malvidin-3-O-arabinosid aber mehr als 85% am Ausgang des Dünndarms wiedergefunden (Kahle *et al.* 2006, Kraus *et al.* 2010). Über den Verbleib der metabolisierten oder absorbierten Anthocyane liegen keine Angaben vor. Der zeitliche Verlauf des Abbaus von Anthocyanen im Ileum wurde von Kraus (2006) und Knaup (2008) beschrieben. Allerdings fehlen auch hier, wie nahezu überall in der Literatur, Angaben zu den Metaboliten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir unter Verwendung von Ileo- und Kolostomieflüssigkeit zunächst den langsamen Abbau der Anthocyane im Dünndarm bestätigen. Es zeigten sich Halbwertszeiten der Anthocyane im Dünndarminhalt von 1,9 bis 4,6 Stunden, wobei sich eindeutige Trends ergaben: Die Glykoside des Aglykons Delphinidin waren weit instabiler als die Glykoside der methylierten Aglykone Petunidin und Malvidin. Noch stärker war der Einfluß der Zuckerkonjugation auf die Stabilität: Im Gegensatz zu den von Knaup (2008) vorgelegten Untersuchungsergebnissen beobachteten wir in unseren Studien, dass α -L-Arabinoside viel langsamer metabolisiert wurden als β -gebundenen Galaktoside. Die β -D-Glukoside wurden am schnellsten abgebaut. Dies ist auf starke β -Glukosidaseaktivität zurückzuführen, welche in der Literatur vielfach beschrieben ist (Kraus 2006, Knaup 2008, Kahle 2008). In Abbildung 3.7 sind die Abbaukurven repräsentativer Heidelbeeranthocyane bei Inkubation mit Dünndarminhalt dargestellt.

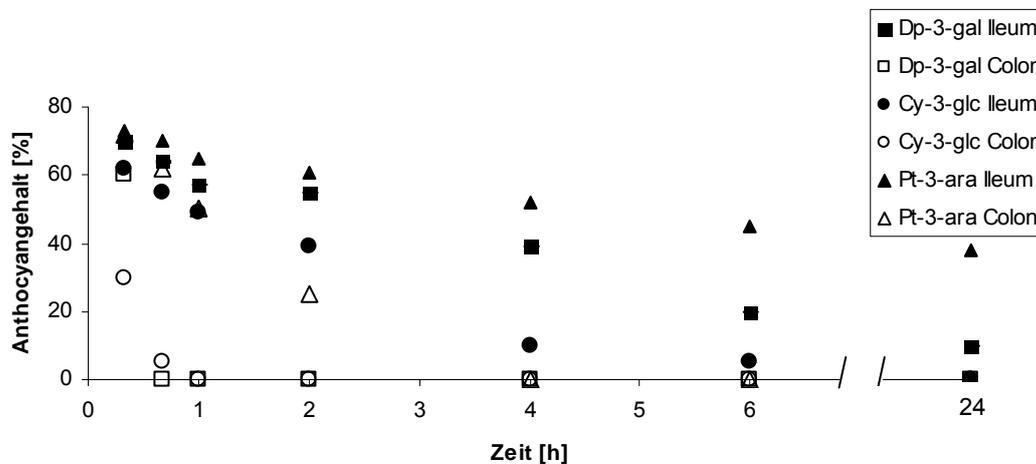


Abbildung 3.7: Stabilität ausgewählter Anthocyane (Delphinidin-3-O-galaktosid, Cyanidin-3-O-glukosid und Petunidin-3-O-arabinosid) bei *ex vivo*-Inkubation mit Dün- und Dickdarminhalt (Ileo- und Kolostomieinhalt) über einen Zeitraum von 24 h.

Im Dickdarm werden die Anthocyane, die den Dünndarm unbeschadet passiert haben, rasch metabolisiert. Dies hatten bereits von Knaup (2008) mit Kolonflüssigkeit durchgeführte *ex vivo*-Inkubationen von Heidelbeeranthocyanen gezeigt. Die ermittelten Hydrolyseraten (der Autor geht von einer hydrolytischen Abspaltung des Zuckerrestes aus) lagen bei 18% bis 30%. Eine weitere Studie zu diesem Thema ist bereits früher von Keppler und Humpf (2005) veröffentlicht worden. In diesem Fall wurde nicht mit humanem Dickdarminhalt, sondern mit Schweinezäkum inkubiert. Innerhalb der ersten Stunde sind

dabei bei allen eingesetzten Anthocyanen mindestens 90% der eingesetzten Anthocyanmenge metabolisiert worden. Außerdem wurden die bereits seit 1972 (Jurd 1972) bekannten Metabolite Phloroglucinacetaldehyd sowie die phenolische Carbonsäure des jeweiligen B-Rings nachgewiesen. Das Maximum der Konzentration der Metabolite lag für alle eingesetzten Anthocyane im Bereich von 20 μM und wurde nach einer bis vier Stunden erreicht (bei einer Anfangsanthocyankonzentration von 100 μM). Die Spaltung der Anthocyane in A- und B-Ring scheint also nicht der einzige Abbauweg zu sein. Eigene Inkubationen zeigten ebenfalls einen sehr raschen Abbau der Anthocyane in Dickdarmflüssigkeit. Bereits nach 40 Minuten waren einige Anthocyane vollständig abgebaut. Im Gegensatz zur Dünndarmflüssigkeit zeigte das Aglykon keinen Einfluß auf die Abbaurate. Bei den Zuckerresten war in diesen Fällen auch kein Unterschied zwischen Galaktosiden und Glukosiden festzustellen. Einzig die Arabinoside waren nach einer Stunde noch alle nachweisbar. Nach zwei Stunden waren nur noch Spuren von zwei Anthocyanen zu finden, während nach sechs Stunden alle Proben anthocyanfrei waren. Die Ergebnisse stimmen insofern gut mit den aus dem Schweinemodell bekannten Daten (Keppler und Humpf 2005) überein.

Abbildung 3.7 zeigt auch den raschen Abbau der Anthocyane mit Kolostomabeutelinhalt. Es wird deutlich, dass Arabinoside verglichen mit anderen Glykosiden die höchste Stabilität zeigen. Außerdem ist offensichtlich, dass im Gegensatz zum Dünndarm im Dickdarm die Anthocyane innerhalb weniger Stunden komplett abgebaut wurden.

Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Anthocyane im Dün- und Dickdarm zunächst von Glykosidasen, wie beispielsweise der cytosolischen β -Glukosidase (CBG) (Daniels *et al.* 1981) oder der Laktase-Phlorizin Hydrolase (LPH) (Dahlqvist und Borgstöm 1961), in Aglykon und freien Zucker gespalten werden. Die LPH kommt außerhalb der Bürstensaummembran vor und ist in der Lage, Flavonoide wie z.B. Glykoside von Quercetin, Genistein und Daidzein vor der Absorption zu hydrolysieren (Day *et al.* 2000). Für Anthocyane ist eine solche Spaltung bisher allerdings noch nicht untersucht worden. Von Keppler und Humpf (2005) wurde eine β -D-Glukosidaseaktivität gemessen, die auf die intestinale Mikroflora zurückzuführen ist. Es kann also davon ausgegangen werden, dass zumindest ein Teil der Anthocyane in Zucker und Aglykon gespalten wird. Die Reaktionen, die das sehr instabile Aglykon im neutralen bis leicht alkalischen Umfeld eingeht, sollten deshalb genauer untersucht werden.

3.2.5 pH-Stabilität und Abbau von Anthocyanidinen bei pH 7,4

3.2.5.1 Studienaufbau

Um die im Darm herrschenden Bedingungen zu simulieren, das Testsystem aber von störenden Substanzen und aufwendigen Probenaufarbeitungen zu befreien, wurde ein Phosphatpuffer auf pH 7,4 eingestellt und dann unter Argonstrom für 30 min am Rückfluss erhitzt, um den Sauerstoff zu eliminieren. Der gemessene Sauerstoffgehalt lag bei den Inkubationen unter 1 ppm. Das Inkubationsmedium wurde dann in eine mit Stickstoff und CO₂ geflutete Inkubationskammer verbracht und zum in DMSO gelösten Cyanidin gegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgten Probennahmen und deren Analyse. Da die erhaltenen Abbaukinetiken denen bereits früher von Kraus (2006) beschriebenen entsprachen, wird hier auf eine erneute Darstellung verzichtet.

3.2.5.2 Ergebnisse der Stabilitätsstudien

Ziel der Inkubationen war es, möglichst viele bisher unbekannte Abbauprodukte zu identifizieren. Erste Anzeichen, dass neben der Spaltung des C-Ringes noch andere Abbauewege möglich sind, zeigte Fleschhut *et al.* (2006) auf. Es wurde belegt, dass sich neben der Spaltung von Cyanidin in Protocatechusäure und Phloroglucinacetaldehyd, welche bereits früher von Jurd (1972) beschrieben worden waren, auch höhermolekulare Verbindungen bilden. Allerdings sind nur Daten von Molekülmassen mit den zugehörigen LC-MS/MS-Spektren vorgelegt worden. Eine Strukturaufklärung steht noch aus. In der Literatur wird davon ausgegangen, dass derartige höhermolekulare Verbindungen nur entstehen, wenn eine gewisse Anthocyanidinkonzentration (200 µM) überschritten wird. Bei geringeren Konzentrationen (50 µM) wird von einem Abbau in die phenolische Säure des B-Ringes und Phloroglucinacetaldehyd ausgegangen (Fleschhut 2004).

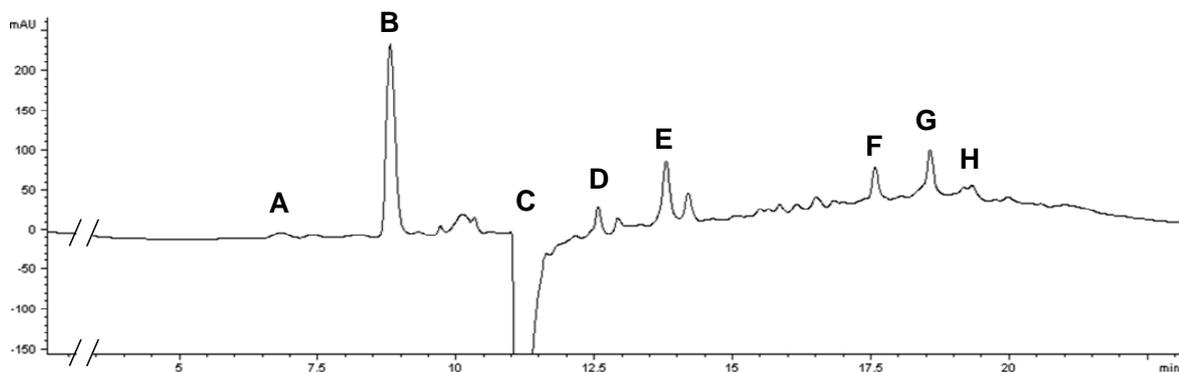


Abbildung 3.8: HPLC-DAD Chromatogramm der in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) über 8 h inkubierten Cyanidinlösung (Gehalt 2 mg/mL) bei 280 nm (Referenzwellenlänge 500 nm). Die mittels MS (-ESI) detektierbaren Verbindungen sind mit den Buchstaben A – H gekennzeichnet.

In der von uns durchgeführten Stabilitätsstudie sind ebenfalls polymere Verbindungen mit den literaturbekannten Molekülmassen gefunden worden. Abbildung 3.8 zeigt ein HPLC-

DAD-Chromatogramm (280 nm) einer bei pH 7,4 und 37 °C über 8 h inkubierten Cyanidinlösung.

Die Masse/Ladungsverhältnisse (m/z) der jeweiligen Verbindungen wurden mit 183 (A), 153 (B), 285 (C), 585 (D), 303 (E), 587 (F und G) und 601 (H) bestimmt. Einfach gestaltete sich die Identifizierung von Peak B, der aufgrund der Massendaten und der bereits genannten Literatur (Jurd 1972) als Protocatechusäure identifiziert wurde. Der (im Chromatogramm negativ dargestellte) Peak C wurde aufgrund des UV/VIS-Spektrums dem nicht abgebauten Cyanidin zugeordnet. Da Peak E sich nur durch eine Wasseranlagerung von C unterscheidet, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um nicht zum Flavylumkation zurückgelagerte Reste der Chalkon- und/oder Chromenolstruktur handelt. Für Peak A wiesen Literaturdaten, Retentionszeit und UV-Spektrum auf Phloroglucinacetaldehyd hin. Jedoch ließ sich diese Vermutung durch die Bestimmung der molaren Masse nicht bestätigen. Diese war im Vergleich zum vermuteten Aldehyd um 16 u erhöht, was auf die aus dem Aldehyd durch Oxidation entstandene Säure hindeutete. Diese war kommerziell nicht verfügbar, weshalb versucht wurde, sie durch Synthese aus 2,4,6-Trihydroxyacetophenon zu gewinnen (vgl. 4.3.6.3, Mujahid Alam und Adapa 2003). Durch die dreifache Hydroxylierung des Ringes kam es jedoch schnell zu Polymerisationsreaktionen, welche die Ausbeute des Syntheseproduktes sehr verringerten. Es standen schließlich nur noch Spuren von Phloroglucinessigsäure zur Verfügung, welche sich nicht von den Polymeren trennen ließen. Eine Analyse mittels HPLC-DAD-MS/MS zeigte aber, dass die synthetisierte Verbindung in Retentionszeit, UV-Spektrum und MS/MS (Abspaltung von CO₂) mit Peak A übereinstimmte.

Für die Entstehung der höhermolekularen Verbindungen D, F, G und H sind zwei Wege denkbar. Zum einen könnte man sich die Dimerisierung zweier Anthocyanidinmoleküle, welche durch die Verlagerung der positiven Ladung vom Sauerstoff auf das Kohlenstoffatom 4 des C-Ringes und damit einen elektrophilen Angriff auf ein weiteres Anthocyanmolekül (in Chromenol- oder Chalkonform) möglich wäre, vorstellen. Für Verbindung H müsste die Verknüpfung zweier Chalkone angenommen werden. Allerdings sind solche Reaktionen aufgrund der Anthocyanstruktur bei pH 7,4 nicht sehr wahrscheinlich. Außerdem müsste das Produkt, um auf die geforderten Masse/Ladungs-Verhältnisse zu kommen, noch eine (im Fall von Peak D sogar zwei) C-C Verknüpfung(en) durch Oxidation ausbilden. Falls dies erfolgt wäre, so würde sich eine genaue Bestimmung der Verknüfungspositionen sehr schwierig gestalten. Neben dieser Option wäre auch die Verknüpfung der beiden entstandenen organischen Säuren (bei Cyanidin Protocatechu- und Phloroglucinessigsäure) mit der Anhydrobase des Anthocyanidins, welche bei pH 7,4 in großem Anteil vorliegt, über Esterbindungen denkbar. Dies würde die Massen der Verbindungen F und G darstellen. Solche Reaktionen sind zwar aus den Alterungs-

prozessen von Rotwein bekannt, können aber aufgrund der veränderten Bedingung (pH-Wert, Temperatur) nicht einfach übertragen werden (Sun *et al.* 2007, Sun *et al.* 2010). Mehrfache Versuche, die Verbindungen mittels Säulenchromatographie bzw. präparativer HPLC zu isolieren, um sie dann mittels NMR zu identifizieren, scheiterten. Dies dürfte mit der Spaltung und Umlagerung solcher Verbindungen an Kieselgel zu erklären sein, wie sie für die Isolierung und Analytik von Proanthocyanidinen in der Literatur beschrieben sind (Hümmer und Schreier 2008).

3.2.6 Humane Interventionsstudie zum Verbleib der Anthocyane und deren Metabolite im Urin nach Heidelbeerverzehr

Zur Erfassung der intestinalen und endogenen Anthocyanmetabolite sowie zur Überprüfung der Bioverfügbarkeit wurde der Urin, welcher im Rahmen einer Interventionsstudie zur Bioverfügbarkeit von Heidelbeeranthocyanen im Dünndarm und Dickdarm gewonnen worden war, analysiert. Außerhalb der Urinstudie erhaltene Ergebnisse obiger Versuchsreihe wurden bereits veröffentlicht (Kraus 2005; Kahle *et al.* 2006). Bei der Interventionsstudie hatte man Probanden gebeten, vor, sowie 0,5, 1, 2, 4, 6 und 8 h nach dem Verzehr von Heidelbeeren (300 g) Urinproben abzugeben. Neben der Entwicklung einer geeigneten Probenaufarbeitungsmethode zur Extraktion von Anthocyanen und deren Metabolite aus Urin war neben der Identifizierung der Metabolite auch die Entwicklung einer ausreichend selektiven und empfindlichen analytischen Messmethode erforderlich.

3.2.6.1 Probenvorbereitung und Analytik

Die Etablierung der Anthocyananalytik erfolgte in polyphenolfreiem Humanurin, welcher mit einer Mischung aus Heidelbeeranthocyanen versetzt wurde. Die Konzentration der Anthocyane betrug jeweils 0,1 $\mu\text{mol}/5\text{ mL}$. Um einen gegebenenfalls chemisch bedingten Abbau zu erfassen, wurden neben dem Urin auch Anthocyane in Puffer unter exakt gleichen pH-Bedingungen nach den gleichen Methoden aufgearbeitet.

Ein Problem ergab sich bei der Lagerung der Urinproben. Durch das Gefrieren und Auftauen bildete sich ein rotbraun gefärbter Bodenkörper. Im Überstand waren kaum mehr Anthocyane zu detektieren. Da die Homogenität der Suspension sowie eine vollständige Extraktion der Schwebstoffe mittels SPE nicht sichergestellt werden konnten, wurde versucht, die durch Kälte gebildeten Schwebstoffe in der Hitze wieder zu lösen. Dies gelang durch ein kurzes Erhitzen der Urinprobe am Rückfluskkühler auf 100 °C. Der zunächst befürchtete Abbau der Anthocyane durch die Temperaturerhöhung blieb aus,

und die Wiederfindungsraten nach der Aufarbeitung änderten sich nicht. Der Verlust durch das Erhitzen wurde mit 0,2% bis 2,3% berechnet.

Urin enthält eine Vielzahl an nichtphenolischen Substanzen, welche die Analyse der Heidelbeeranthocyane und ihrer Metabolite stören. Daher ist eine Probenvorbereitung erforderlich, bei der unerwünschte Komponenten entfernt werden und gleichzeitig eine Konzentrierung der Analyten erreicht wird. Mittels Festphasenextraktion („solid phase extraction“, SPE) wurden die besten Wiederfindungen der Anthocyane bei einem gleichzeitig hohem Grad an Aufreinigung erreicht. Im weiteren Verlauf der Methodenoptimierung wurden verschiedene Konditionierungs-, Wasch- und Elutionslösungen sowie verschiedene Volumina getestet. Die Überprüfung unterschiedlicher SPE-Kartuschen rundete die Ausarbeitung der Festphasenextraktion ab.

Zur Quantifizierung ist es nötig, genau zu wissen, wie viel der einzelne Proband zu jedem Zeitpunkt ausgeschieden hat. Da sich dies schwer bestimmen lässt, wurden die Urinproben auf 100 mL bzw. 250 mL aufgefüllt. Somit war es möglich, zur weiteren Analyse ein Aliquot zu entnehmen.

Die entwickelte SPE-Methode bestand schließlich in der Aktivierung und Vorkonditionierung von Oasis[®] C18 Kartuschen mit jeweils 7 mL Methanol und 7 mL einer 0,1 M wässrigen Oxalsäure. Nach Probenaufgabe (20% des abgegebenen Urins) wurden störende Substanzen mit wässrig saurerer Lösung ausgewaschen. Nach dem vollständigen Trockenlaufen der Säule wurden die Anthocyane und deren Metabolite mit methanolischer Salzsäurelösung eluiert. Das Lösungsmittel wurde mit Stickstoff schonend entfernt und der Rückstand bei -80°C unter Argon-Atmosphäre bis zur weiteren Analyse gelagert. Zur Analyse wurden die Proben gelöst und mittels HPLC-DAD vermessen. Die ermittelten Wiederfindungen lagen für die geprüften Anthocyane zwischen 94,3% und 97,2%.

Da die bei der Studie verwendeten Heidelbeeren neben Anthocyanen noch eine Vielzahl anderer Polyphenole (vor allem Chlorogensäuren und Procyanidine) enthalten, die in der vorliegenden Arbeit aber nicht näher untersucht wurden, sind bei den Abbauprodukten nur solche identifiziert worden, bei welchen sicher nachweisbar war, dass sie sich von Anthocyanen herleiten. Dies sind vor allem die Phase-II-Metaboliten von Anthocyanen wie Glukuronide und Sulfate. Da sich diese mittels HPLC nicht von den Glukosiden trennen ließen, erfolgte ihr Nachweis mittels Kopplung mit der Massenspektrometrie (HPLC-DAD-MS/MS) im „single reaction modus“ (SRM). Diese Technik erlaubt zwar eine gesicherte Identifizierung, allerdings sind Quantifizierungen nur möglich, wenn ein mehrfach isotopenmarkierter Standard vorhanden ist. Obwohl dies nicht der Fall war, wurde neben der Identifizierung auch eine relative Quantifizierung der Abbauprodukte zueinander erreicht, da im positiven Messmodus bei saurem pH davon ausgegangen werden kann,

dass alle Aglykone kationisch vorliegen. Eine Gesamtquantifizierung erfolgte mittels HPLC-DAD als Summenparameter in Malvidin-3-O-glukosid-Äquivalenten.

3.2.6.2 Bilanzierung von Anthocyanen im Urin

Da nicht für alle Metabolisierungsprodukte (vor allem Anthocyanglukuronide) geeignetes Referenzmaterial zur Verfügung stand, wurden die Anthocyane sowie ihre Metabolite als Summenparameter erfasst und als Äquivalente des Önins (Malvidin-3-O-glukosid) quantifiziert. Ein solches Vorgehen ist aufgrund der unzureichenden kommerziellen Verfügbarkeit von Anthocyanen durchaus üblich; in der Literatur wird zumeist als Kurumanin-Äquivalente quantifiziert (Mazza et al. 2002, Matsumoto et al. 2007). Einzelne Arbeitsgruppen versuchten jedoch, wenn die Referenzen nicht zur Verfügung standen, als Äquivalent zur Quantifizierung einen Stoff zu verwenden, welcher von der molaren Masse dem gefundenen Stoff sehr ähnlich ist und auch das gleiche oder ein ähnliches Aglykon besaß (Bitsch et al. 2004).

Da der mit Abstand größte Peak im Chromatogramm sich in der Retentionszeit und UV/VIS-Spektrum nur gering von Önin unterschied, wurde dieses Anthocyan als Äquivalent zur Quantifizierung eingesetzt. Die zur Studie eingesetzten Früchte hatten einen Anthocyan-gehalt von 7,8 g/kg Frischgewicht (FW). Hiervon überwogen mit 45,7% die Delphinid- glykoside deutlich vor den Petunidinglykosiden (25,3%). Cyanidin- und Malvidinglykoside folgten gleichauf mit 12,3% und 11,8% vor den nur in gerinen Mengen (4,9%) vorkommenden Peonidinglykosiden (Kraus 2006). In der Studie wurden 300 g Heidel- beeren pro Proband verzehrt, was einer Anthocyanaufnahme von 2,35 g entspricht (Kahle et al. 2006). Die renale Ausscheidung lag bei drei von vier Probanden zwischen 0,42 mg und 0,44 mg Anthocyane und Anthocyanmethabolite (berechnet als Öninäquivalente). Nur Proband 2 zeigte mit einer Gesamtausscheidung von nur 0,16 mg starke Abweichungen. Einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der Ausscheidung gibt Abbildung 3.9.

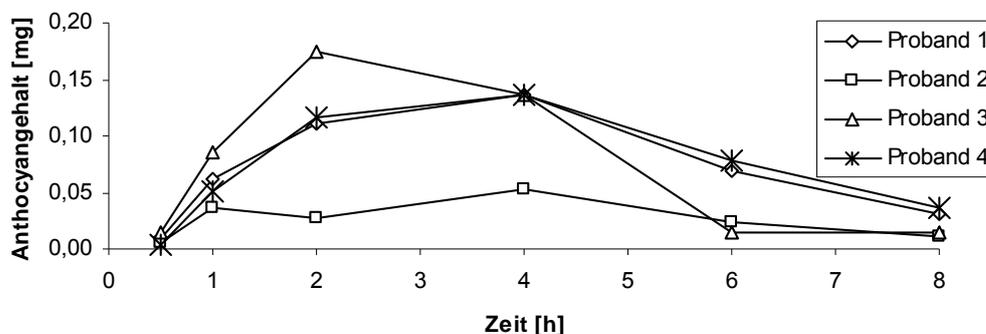


Abbildung 3.9: Renale Ausscheidung von Heidelbeer-Anthocyanen bei Aufnahme von 2,35 g Anthocyanen (4 Probanden; Gesamtanthocyanengehalte der Urinproben als Öninäquivalente)

Wie aus Abbildung 3.9 ersichtlich ist, traten große individuelle Unterschiede im Verlauf der Ausscheidung von Anthocyanen auf. Wie aus der in Abbildung 3.10 gewählten Darstellung hervorgeht, lag der Zeitpunkt der maximalen renalen Ausscheidung bei fast allen Probanden (außer Proband 3) nicht bei circa vier Stunden, sondern zwischen 0,5 und zwei Stunden.

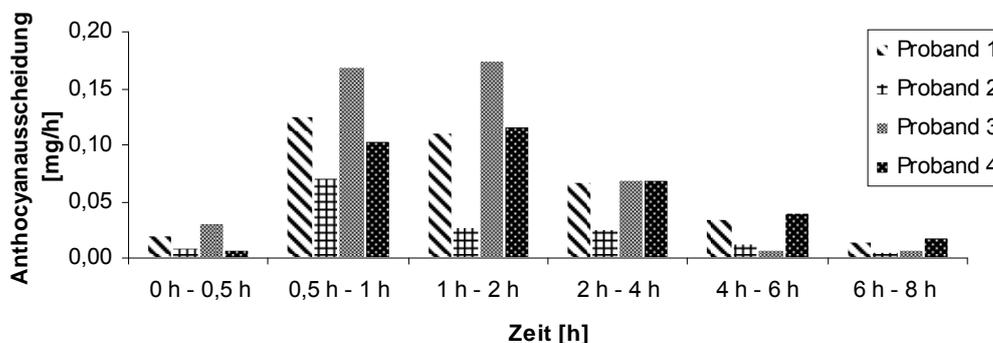


Abbildung 3.10: Renale Ausscheidung in mg/h von Heidelbeer-Anthocyanen bei Aufnahme von 2,35 g Anthocyanen (4 Probanden; Gesamtanthocyanengehalte der Urinproben als Öinäquivalente)

Im Vergleich mit Literaturangaben lag der Anteil der über den Urin ausgeschiedenen Anthocyane mit 0,007% bis 0,019% eher am unteren Ende des in der Literatur bekannten Prozentsatzes. In den meisten Studien hatte man 0,02% bis 0,16% der aufgenommenen Dosis im Urin wiedergefunden. Es gibt in der Literatur jedoch auch Angaben von bis zu 5,1% (McGhie und Walton 2007). Schließlich fällt beim genauen Studium der Literatur auf, dass besonders bei der Gabe großer Anthocyan-Mengen der Anteil der renal ausgeschiedenen Anthocyane geringer war. Hier ist vor allem eine Verzehrsstudie mit Holunderbeeren zu nennen, bei der nach Aufnahme von 1,9 g Anthocyanen innerhalb der folgenden sechs Stunden nur 0,003% bis 0,012% der aufgenommenen Anthocyane renal ausgeschieden wurden (Mülleider et al. 2002). Hier waren sowohl die verabreichte Anthocyanmenge, als auch die Applikationsform und die Ausscheidungsrate im Urin mit dem von uns durchgeführten Versuchsaufbau vergleichbar. Dies lässt erkennen, dass das Handicap eines endständigen Ileostomas, wie es die von uns ausgewählten Probanden besaßen, keinen Einfluß auf die Anthocyanresorption hat, da die Anthocyane vor allem im Magen und oberen Dünndarmbereich resorbiert werden.

Hingewiesen sei nochmals auf die großen individuellen Unterschiede die bei genauerer Betrachtung der Originalchromatogramme deutlich werden. Während beispielsweise Proband 1 zu Beginn vor allem Delphinidinaddukte ausschied, wurde der Anteil der methylierten Verbindungen über den Beobachtungszeitraum immer größer. Bei Proband 3 blieben dagegen die Verhältnisse der Anthocyane untereinander gleich. Exakte Quantifizierungen sind leider aufgrund des angesprochenen fehlenden Referenzmaterials nicht

möglich. Derartige individuellen Unterschiede hat man auch in der Literatur öfters beobachtet (Clifford 2000, McGhie und Walton 2007, Kahle 2008)

3.2.6.3 Identifizierung von Anthocyanmetaboliten im Urin

Wie bereits erwähnt (Kapitel 3.2.6.2), gab es bei der Quantifizierung der einzelnen Anthocyane mittels HPLC-DAD Probleme, da neben den in der Heidelbeere vorkommenden Anthocyanen auch anthocyanähnliche Addukte vorlagen, welche mit den Anthocyanen bei der gewählten Analysenmethode coeluierten. Neben dem Abbau der Anthocyane zu phenolischen Säuren und Laktonen hat der Organismus die Möglichkeit, sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe über Phase-II-Reaktionen in der Leber zu metabolisieren. Diese Reaktion dient dem Organismus zur Erhöhung der Hydrophilie und dem damit verbundenen schnelleren Ausscheiden der aufgenommenen Substanzen. In aller Regel werden Xenobiotika oder auch Polyphenole mit Sulfatresten oder Glukuronsäure konjugiert (Kahle 2008). Auf eine Analyse aller möglichen Abbauprodukte wurde verzichtet, da die im Probenmaterial vorliegenden phenolischen Säuren und Laktone nicht nur aus den Anthocyanen, sondern auch aus anderen Flavonoiden der Heidelbeere stammen könnten. Zur Durchführung einer umfassenden Quantifizierung aller Abbauprodukte eines Anthocyanins ist es unbedingt notwendig, reine Anthocyane aufzunehmen und keine ganzen Früchte, Säfte oder Polyphenolextrakte, da hier die Metabolite nicht einem bestimmten Ausgangsstoff zugeordnet werden können. Bei Studien mit ganzen Früchten können einzig die durch Phase-II-Reaktionen entstandenen Produkte direkt auf das Anthocyan bzw. Anthocyanidin zurückgeführt werden. In der Literatur sind bislang nur Glukuronide, nicht aber Sulfate der Anthocyanidine beschrieben (Bub et al. 2001, Wu et al. 2002, McGhie und Walton 2007).

Auch bei den von uns untersuchten Urinproben konnten Glukuronide aller in den Anthocyanen vorkommenden Anthocyanidine mittels HPLC-MS/MS im SRM-Modus nachgewiesen werden. Der Verlust des Glukuronsäurerestes verursacht im Massenspektrum einen Massenverlust von 176 u. Allerdings waren die Glukuronide nicht so verteilt, wie es aufgrund der Anthocyanzusammensetzung anzunehmen gewesen wäre. Es kam im Vergleich zur Zusammensetzung der Anthocyane aus der Frucht zu einer Anreicherung von methylierten Verbindungen. Besonders eine einfach und zweifach methylierte Form von Delphinidin ist in großen Mengen (relativ zu den unmethylierten Verbindungen) nachgewiesen worden. Hierbei könnte es sich um Petunidin bzw. Malvidin handeln, allerdings könnte es sich auch um andere Methylierungsprodukte der Leber handeln, wie sie beispielsweise durch Methylierung des Delphinidins oder Petunidins am A-Ring entstanden sein könnten. Eine Quantifizierung der Glukuronide war aufgrund fehlenden Referenzmaterials nicht möglich.

3.3 Studien zum Verhalten von Anthocyanen in proteinhaltiger Lösung

Sowohl aus den eigenen als auch aus Literaturarbeiten als auch aus denen der Literatur (McGhie und Walton 2007) war bekannt, dass die über den Urin ausgeschiedene Menge an Anthocyanen bzw. Anthocyanmetaboliten den im Blut erfasste Anthocyanengehalt weit überstieg. So fanden Bub *et al.* (2001) in einer Humanstudie mit dem Anthocyan Malvidin-3-O-glukosid aus Rotwein im Blut nur 0,004% der aufgenommenen 68 mg Anthocyan wieder, wohingegen in derselben Studie 0,03%, also das 7,5 fache, renal ausgeschieden wurde. Als Erklärung könnte entweder eine sehr langsame Aufnahme der Anthocyane dienen, oder eine Bindung an Gewebe- oder Blutbestandteile, wodurch sich die Anthocyane der Analytik entziehen könnten. Von einer langsamen Resorption ist nicht auszugehen, da der Zeitpunkt der maximalen Anthocyankonzentration im Serum in der Literatur mit 0,75 bis 2 h bereits sehr früh nach der Anthocyanaufnahme gemessen wurde (Mc Ghie und Walton 2007). Nur in Ausnahmefällen war in der Literatur t_{\max} mit bis zu 4 Stunden etwas höher, was vor allem durch die Applikationsform in den Studien zu begründen war. Insgesamt kann die langsame Aufnahme in Kombination mit einer raschen Ausscheidung nicht der Grund sein, warum im Blut weit weniger Anthocyan bestimmt wurden als im Urin. Als plausible Erklärungsmöglichkeit für dieses Phänomen kommt die Bindung der Anthocyane an Organe und Gewebe in Frage, wobei das Blut auch als „flüssiges Organ“ (Löffler und Petrides 1998) angesehen werden kann. Für das wohl am besten erforschte Flavonoid, Quercetin, gibt es in der Literatur sogar Hinweise auf eine kovalente Bindung an menschliches Serumalbumin (Kaldas *et al.* 2005). Aus diesem Grund wurde von uns untersucht, ob es bei Anthocyanen zu einer ähnlichen Bindung an Blutbestandteile kommt und, wenn dies der Fall ist, welche daran beteiligt sind.

3.3.1 Blut und Serumfraktionierung

3.3.1.1 Versuchsdurchführung und Analytik

Die verwendeten Eigenblutproben wurden zu Beginn des Versuchs durch geschultes Personal des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg entnommen. Durch Zugabe von Citrat wurde das Gerinnen der Blutproben verhindert. Daneben wurden dieselben Versuche auch mit Serum durchgeführt. Das Vollblut wurde mit Anthocyanen versetzt; durch Zentrifugation erfolgte die Trennung der Zellfraktionen vom Plasma. Bei den Versuchen, in denen mit Serum gearbeitet wurde, entfiel dieser Schritt. Die Zellfraktion wurde sofort schockgefroren und nach Gefriertrocknung

sauer/methanolisch extrahiert (Kapitel 4.3.8). Der Anthocyangehalt im Extrakt wurde dann jeweils mittels HPLC-DAD bestimmt.

Außerdem wurde das Serum/Plasma einer modifizierten Fraktionierung nach Cohn (1945) unterzogen (siehe Abbildung 3.11).

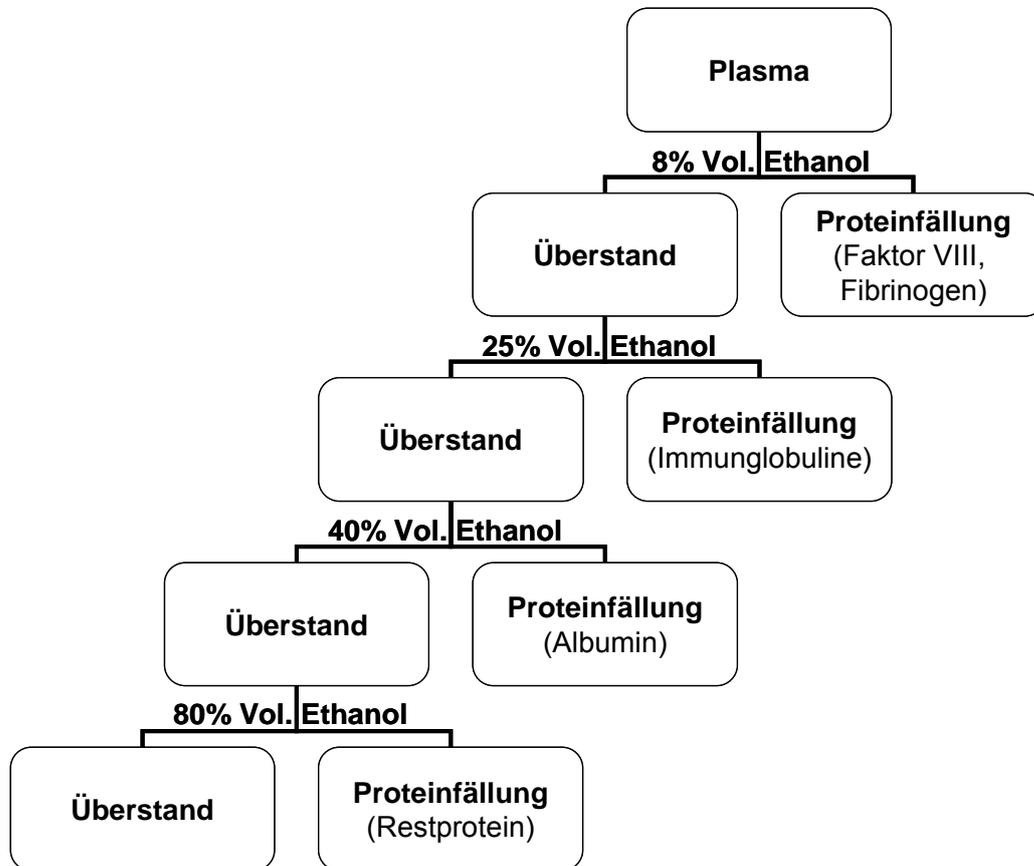


Abbildung 3.11: Plasma- bzw. Serumfraktionierung modifiziert nach Cohn (1945)

Hierbei werden durch eine allmähliche Steigerung des Ethanolgehaltes verschiedene Proteine fraktioniert gefällt und abgetrennt. Die separierten Proteine wurden ebenfalls schockgefroren, lyophilisiert, analog der Zellfraktion extrahiert und analysiert. Zusätzlich zu den in der Literatur angegebenen Fraktionen wurde noch eine bei 80% Ethanolzusatz erhaltene Proteinfraction eingefügt (vgl. Abbildung 3.11), um eventuell im Überstand der 40% Ethanolbehandlung verbliebene Proteine zu fällen (vgl. 4.3.9). Neben allen Rückständen wurde auch der jeweils verbliebene Überstand nach schonenden Entfernen des organischen Lösemittels (im Vakuum bei 40°C) gefriergetrocknet und nach der Extraktion analysiert. Zusätzlich wurde auch eine Blutprobe ohne weitere Behandlung lyophilisiert und einer Extraktion unterworfen, um festzustellen, ob sich im Blut eventuell schon Anthocyane oder mit Anthocyanen coeluerende Stoffe befinden.

3.3.1.2 Identifizierung der Bindungspartner

Aufgrund der Färbung des Serums durch Anthocyane gestaltete sich eine Trennung von Serum und Zellfraktion sehr schwierig. Aus diesem Grund war es unvermeidbar, dass geringe Mengen (von 4,1 bis zu 9,3%) der Anthocyane in der Zellfraktion erfaßt wurden. Die Gesamtwiederfindung der Anthocyane lag bei ca. 70% der eingesetzten Menge. Über den Verbleib der übrigen 30% lassen sich nur Vermutungen anstellen. Neben irreversibler Bindung an Bestandteile des Serums oder der Zellen kommt auch ein chemischer Zerfall (vgl. Kapitel 2.3.1.4) in Betracht.

In der Literatur wurde die Möglichkeit der Bindung von Anthocyanen an Blutzellen bislang nicht diskutiert. Bei allen durchgeführten Studien zur Analyse von Anthocyanen im Blut wurde immer nur die flüssige Fraktion, entweder Serum oder Plasma, untersucht (Clifford 2000, Bub *et al.* 2001, Kay *et al.* 2004, McGhie und Walton 2007).

Aus diesem Grund wurde durch eine Plasmafraktionierung nach Cohn (1945) versucht, die Proteine des Plasmas fraktioniert zu fällen. Durch den Einbau einer weiteren Fraktionierungsstufe bei 80% Ethanol sollte gewährleistet werden, dass der verbleibende Überstand proteinfrei war. Nur die erhaltenen Fraktionen bei 40% und 80% Lösemittelbehandlung waren nach Ansäuern rot gefärbt. Die HPLC-DAD Analytik bestätigte das Ergebnis, da nur in diesen beiden Fraktionen Anthocyane gefunden wurden. Einzig bei der Zugabe größerer Mengen von Anthocyanen konnten diese in allen Fraktionen, vor allem aber in den Albuminfraktionen (40% und 80% Ethanolfällung) nachgewiesen werden. Des Weiteren fiel auf, dass in der 80%igen Ethanolfraktion in allen Fällen mehr Anthocyan ermittelt wurde als in der 40% Fraktion. Da nach Cohn (1945) das Albumin das Protein im Serum ist, welches als letztes ausfällt, ist davon auszugehen, dass es sich in beiden Fraktionen um humanes Serumalbumin (HSA) handelt. Die Vermutung, dass das HSA durch die Anthocyane etwas unempfindlicher gegenüber Denaturierung durch Ethanol könnte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht belegt werden. Insgesamt bleibt aber festzustellen, dass das humane Serumalbumin als einziger Bindungspartner der Anthocyane identifiziert werden konnte. Diese Bindung war weiter zu untersuchen, da eine stabile Bindung der Anthocyane an HSA bei schonender Aufarbeitung die gebundenen Anthocyane der Analytik entziehen und so zu einer fehlerhaften Anthocyanbilanzierung im humanen Blut beitragen könnte.

3.3.2 Bestimmung der Bindungsstelle und Bindungsparameter von Anthocyanen an HSA

Nach der Kenntnis einer Wechselwirkung zwischen Proteinen und Anthocyanen lag es aus oben genannten Gründen nahe, diese Interaktionen genauer zu untersuchen. Hierzu

wurden neben verschiedenen spektroskopischen Methoden auch die Möglichkeiten eines „modellings“ genutzt. Ziel der Experimente war es, neben den Bindungsparametern wie Bindungskonstante und freie Energie auch den genauen Ort der Anthocyanbindung an Serumalbumin zu identifizieren. Für einige andere Polyphenole liegen in der Literatur bereits Daten vor. Das in dieser Beziehung am besten erforschte Flavonoid ist Quercetin. Für diese Verbindung ist bekannt, dass sie im Plasma zu über 99% an HSA gebunden vorliegt (Boulton *et al.* 1998). Über die Art der Bindung gibt es im Schrifttum verschiedene Meinungen. Kaldas *et al.* (2005) deuten Ergebnisse von Experimenten mit radioaktiv markiertem Quercetin, welches vor der Trennung der Plasmaproteine mittels Gelelektrophorese in Humanblut gegeben wurde, als Beweis für eine kovalente Bindung. Andere Autoren gehen hingegen von hydrophoben Wechselwirkungen und van der Waals-Kräften aus, welche für die Bindung verantwortlich sein könnten (Zsila *et al.* 2003, Rawel *et al.* 2006). Durch geringe Abweichungen in pH-Wert, Temperatur und Bestimmungsmethode unterscheiden sich die berechneten Bindungskonstanten von Quercetin an humanem Serumalbumin sehr stark. So erhielten Rawel und Mitarbeiter (2006) methodenabhängig Bindungskonstanten zwischen $37,0 \times 10^4$ und $52,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, Zsila *et al.* (2003) beschrieben dagegen bei leicht verändertem pH-Wert weit geringere Bindungskonstanten ($1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$).

3.3.2.1 Veränderungen in der Sekundärstruktur des HSA-Moleküls durch Anthocyane

Es gibt verschiedene Methoden, um die Veränderungen in der Sekundärstruktur von Proteinen durch einen Liganden nachzuweisen. Neben der nasschemischen Analyse der freien Aminogruppen werden vor allem spektroskopische Analysemethoden angewandt. Am weitesten verbreitet ist die Messung mittels Circular dichroismus (CD) Spektroskopie. Daneben sind aber auch Raman- (Hang *et al.* 2006) und infrarotspektroskopische (Tang *et al.* 2006) Methoden beschrieben. Bei der CD-Spektroskopie kommt es je nach Bindungspartner zu verschiedenen Beobachtungen. Bei den meisten Liganden verändert sich das Spektrum im Bereich von 200 bis 250 nm. In aller Regel kommt es durch den Liganden zu einer Abschwächung des starken negativen Signals in diesem Bereich. Dieses Phänomen ist bekannt und wird durch eine Abnahme des α -helikalen Anteils in der Sekundärstruktur verursacht. Dieser tritt in aller Regel erst auf, wenn die Ligandenkonzentration die Proteinkonzentration übersteigt. Im Bereich der Polyphenole sind solche Beobachtungen für Epigallocatechingallat (EGCG) (Maiti *et al.* 2006) und für Resveratrol (N'soukpoé-Kossi *et al.* 2006) beschrieben. Während bei EGCG bereits ein Verhältnis Ligand: HSA von 3:1 ausreichte, um Unterschiede im Spektrum zu zeigen, bedurfte es bei Resveratrol eines zwanzigfachen Überschusses an Ligand.

Neben diesen proteinspezifischen Veränderungen im Spektrum wurden aber auch ligandenspezifische Veränderungen im CD-Signal nachgewiesen. Im Bereich der Polyphenole ist hier vor allem der HSA-Quercetin-Komplex zu nennen, welcher bereits bei Konzentration unterhalb der Äquimolarität spezifische Signale im Bereich von 300 bis 400 nm zeigt. Über die Herkunft dieser Signale wird bisher nur spekuliert (Zsila *et al.* 2003). Für andere chemische Verbindungsklassen sind auch Veränderungen im Spektrum bei noch höheren Wellenlängen (650 nm) beschrieben (Zang *et al.* 2007).

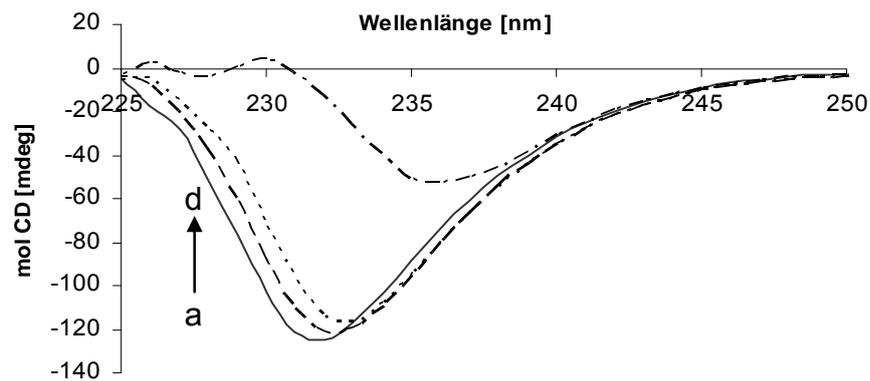


Abbildung 3.12: CD-Spektrum einer 0,08%igen HSA-Lösung mit einem Verhältnis von HSA- zu Malvidin-3-O-galaktosid-Molekülen von 0 (a), 0,1, 0,5, und 25 (d)

Solche sehr spezifischen Signale konnten in den von uns durchgeführten CD-Messungen mit Anthocyanen (siehe 4.3.10.2.1) nicht festgestellt werden. Hierbei wurde nur die bereits erwähnte Verringerung des helikalen Anteils nachgewiesen. Abbildung 3.12 zeigt neben der Verringerung des negativen Signals bei 230 nm auch eine signifikante Rotverschiebung bei zunehmender Anthocyankonzentration in der Lösung. Hervorzuheben ist, dass dieses Phänomen schon weit unterhalb der Äquimolarität auftrat. Das bedeutet, dass Anthocyane bereits einen Einfluß auf die Sekundärstruktur des HSA-Moleküls haben, wenn diese nicht im Überschuß vorliegen.

Allerdings gilt diese Aussage nur für *in vitro*-Systeme; ein zehnfacher Überschuß an Protein ist *in vivo* unwahrscheinlich, da Literaturangaben von einer Serumkonzentration von HSA von 0,6 mM ausgehen, bei Anthocyanen aber nur Konzentrationen bis zu 0,12 μ M erfasst wurden (McGhie und Walton 2007). Somit ist *in vivo* nicht von einer Änderung in der Sekundärstruktur auszugehen. Dennoch wurden von uns mit den durchgeführten Messungen Interaktionen zwischen Anthocyanen und Serumalbumin *in vitro* bestätigt.

3.3.2.2 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Anthocyan-HSA-Bindung

Um die Bindung der Anthocyane an Serumalbumin näher beschreiben zu können, wurde mit der Fluoreszenzspektroskopie eine weitere Methode zur Ermittlung wichtiger Bindungsparameter eingesetzt. Hierbei wurde eine vorgelegte Serumalbuminlösung zunächst spektroskopisch vermessen und dieses Vorgehen nach Zugabe von Anthocyan in 12,5 μM Schritten wiederholt (Durchführung siehe 4.3.9.2.2). Eine solche Titration wurde für zwölf Heidelbeeranthocyane durchgeführt. Bei den erhaltenen Spektren zeigte sich, dass die durch den Tryptophanrest des Proteins erzeugte Fluoreszenz durch die Zugabe von Anthocyan gequencht wird. Daraus folgt, dass das Anthocyan in unmittelbarer Umgebung des fluoreszierenden Restes die Umgebung verändert. Demzufolge kann entweder auf eine direkte Interaktion zwischen Anthocyan und Tryptophan oder auf eine vom Liganden veränderte Sekundärstruktur im Bereich des Fluorophors geschlossen werden. Als Fluorophore sind in Proteinen neben Tryptophan auch noch Tyrosin und Phenylalanin zu berücksichtigen. Letzteres zeigt allerdings bei der gewählten Anregungswellenlänge von 280 nm keine Fluoreszenz im Messbereich 300 nm bis 420 nm. Da der Anteil von Tyrosin an der Fluoreszenz im Vergleich zu der des Tryptophans sehr gering ist, kann dieser ebenfalls vernachlässigt werden (Tang *et al.* 2007). Insgesamt liegt im gesamten HSA-Molekül nur ein einziger Tryptophanrest vor. Dieser befindet sich, wie in Kapitel 2.3.7 erläutert und in Abbildung 2.8 dargestellt, in der hydrophoben Tasche der Subdomäne IIA, welche auch als Warfarin-Bindungsstelle bezeichnet wird (Carter und Ho 1994).

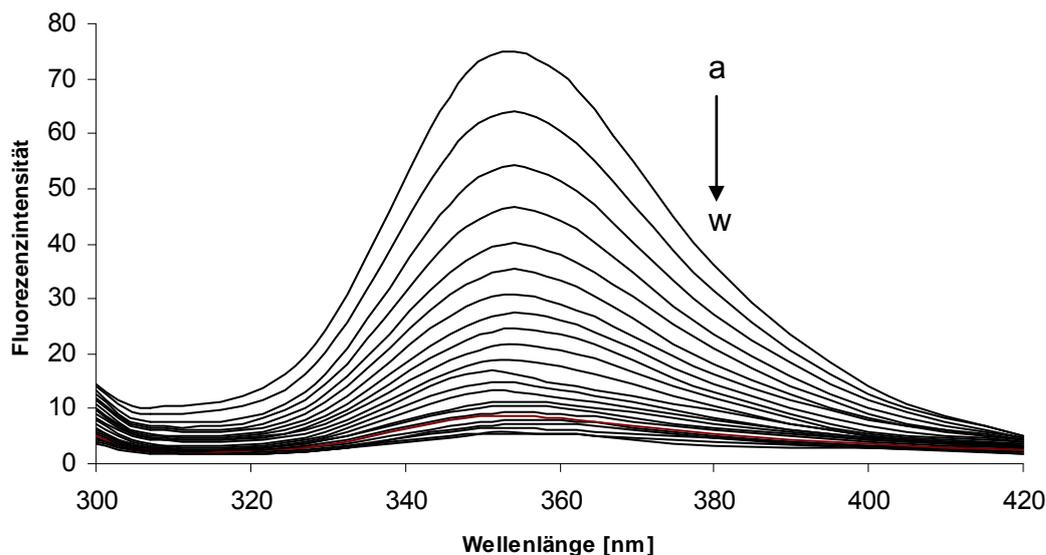


Abbildung 3.13: Fluoreszenzspektren einer 0,9 μM HSA-Lösung mit einer Konzentration von 0 (a) bis 275 μM (w) Malvidin-3-O-galaktosid in 22 Schritten bei 23 $^{\circ}\text{C}$. Die Konzentration an Anthocyan wurde jeweils um 12,5 μM erhöht.

Ein Quenching der Fluoreszenz deutet also auf eine Bindung im Bereich der Warfarin-Bindungsstelle hin. Für alle Anthocyane ergaben sich typische Spektren, welche zeigen, dass die Fluoreszenzintensität abnimmt, wenn die Anthocyankonzentration steigt.

Die bei der Titration einer 0,9 μM HSA-Lösung mit Malvidin-3-O-galaktosid erhaltenen Spektren sind als repräsentatives Beispiel in Abbildung 3.13 dargestellt. Auf die Darstellung der übrigen Spektren wurde verzichtet, da sie einen identischen Verlauf zeigten. Die aus den Fluoreszenzspektren berechneten Bindungskonstanten sind für alle untersuchten Anthocyane in Tabelle 3.3 dargestellt. Über die modifizierte Stern-Volmer-Gleichung lässt sich aus der Fluoreszenz der reinen HSA-Lösung (F), der mit Anthocyan versetzten Proteinlösung (F_0) sowie der Konzentration des quenchenden Anthocyan ($[Q]$) und der über alle Konzentrationen aufsummierten maximalen Fluoreszenzintensität des HSA-Moleküls (f) die Bindungskonstante K , welche die Bindung des Anthocyan an HSA beschreibt, ermitteln.

$$\frac{F_0}{F_0 - F} = \frac{1}{fK[Q]} + \frac{1}{f}$$

Die Bindungskonstante kann graphisch ermittelt werden, wenn $F_0/F_0 - F$ gegen $1/[Q]$ aufgetragen wird, da dann die Steigung der Regressionsgeraden den Wert $1/fK$ und der Achsenabschnitt den Wert $1/f$ annimmt. Somit konnten für alle untersuchten Anthocyane Bindungskonstanten ermittelt werden, welche in Tabelle 3.3 zusammengefasst sind. Aus diesen Konstanten lässt die Gibbs freie Energie durch die van't Hoff'sche Gleichung $\Delta G = -RT \ln K$ berechnen. Auch diese Daten sind der Tabelle 3.3 zu entnehmen.

Tabelle 3.3: Bindungskonstanten und Gibbs freie Energie von 12 Heidelbeeranthocyanen und der Gehalt an Anthocyan (in %) nach 4 Stunden im Puffer und in 4%iger HSA-Lösung

Anthocyan	Quenching-/ Bindungs- konstante K	Gibbs freie Energie (23°C)	Anthocyan- gehalt im Puffer (4 h)	Anthocyan- gehalt in HSA- Lösung (4 h)
	$[\text{M}^{-1}]$	$[\text{kJ/mol}]$	$[\%]$	$[\%]$
Cy-3-O-ara	12,13	-23,14	21,19±2,65	55,50±2,33
Cy-3-O-gal	23,42	-24,76	17,57±0,95	64,80±4,24
Cy-3-O-glc	4,28	-20,58	12,79±0,16	51,26±0,28
Dp-3-O-ara	19,50	-24,31	2,63±0,07	44,38±2,02
Dp-3-O-gal	10,63	-22,82	1,44±0,18	44,13±0,63
Dp-3-O-glc	22,53	-24,67	4,71±0,08	48,58±1,01
Mv-3-O-ara	5,17	-21,04	11,98±0,25	54,39±2,78
Mv-3-O-gal	26,19	-25,04	12,97±0,35	56,38±1,58
Mv-3-O-glc	11,16	-22,94	14,93±0,82	56,29±0,93
Pt-3-O-ara	7,52	-21,97	3,72±0,79	47,43±1,41
Pt-3-O-gal	11,34	-22,98	12,09±2,72	48,92±4,69
Pt-3-O-glc	9,62	-22,57	9,70±0,20	40,99±0,98

Es ergaben sich keine Abhängigkeiten der Bindungsparameter von der Struktur des Anthocyans. Weder über die Struktur des Aglykons noch über diejenige des Zuckerrestes ließen sich Aussagen über die Bindungsenergie oder die Bindungskonstante treffen. Insgesamt konnten für Anthocyane die für Polyphenole typischen, relativ schwachen Bindungskonstanten an HSA ermittelt werden. Man kann davon ausgehen, dass die Bindung durch van der Waals-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen und nicht durch eine kovalente Bindung zustande kommt (Wiese *et al.* 2009).

In der Literatur erfolgt eine Einteilung der nicht kovalenten Bindungen anhand ihrer Bindungskonstante in sehr starke und normale nicht kovalente Bindungen (N'soukpoé–Kossi *et al.* 2006). Als sehr starke Bindungen werden Wechselwirkungen mit Liganden bezeichnet, deren Bindungskonstante 10^6 überschreitet. Hierzu werden vor allem die *in vivo* natürlich vorkommenden Bindungen von Bilirubin, Hämin oder der Fettsäuren Palmitinsäure, Linolsäure und Ölsäure an HSA gezählt, deren Bindungskonstanten zwischen $1,3 \times 10^7$ und $1,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ liegen (Kragh-Hansen 1981). Polyphenole zählen nicht zu dieser Gruppe, da ihre Bindungskonstanten kleiner sind. So wurde für Resveratrol eine Bindungskonstante von $2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (N'soukpoé–Kossi *et al.* 2006) ermittelt. Für Epigallocatechingallat wurden temperaturabhängig Konstanten zwischen $3,8 \times 10^4$ und $7,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Maiti *et al.* 2006) berechnet. Bei dem in der Literatur häufig wegen seiner guten Verfügbarkeit verwendeten Flavonoid Quercetin wurde neben der Fluoreszenzmethode auch mittels Ultrazentrifugation eine Bindungskonstante ermittelt. Diese lag mit $1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Boulton *et al.* 1997) in einem ähnlichen Bereich wie die von Rawel *et al.* (2006) fluorimetrisch ermittelte $3,7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; andere Autoren kamen aber, wie bereits erwähnt, mit der gleichen Methode auf einen weit geringeren Wert von $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (Zsila *et al.* 2003).

Die in dieser Arbeit ermittelten Assoziationskonstanten liegen also im unteren Bereich der für Polyphenole üblichen Werte. Das Warfarinmolekül als namensgebende Substanz für die Bindungsstelle hat selbst eine Bindungskonstante im Bereich von $1,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Kragh-Hansen 1981).

3.3.2.3 Untersuchung der Bindungsstelle mittels „molecular modelling“

In fast allen Arbeiten wird davon ausgegangen, dass die Polyphenole an oder in der Warfarin-Bindungsstelle binden, da nur in diesem Fall die Bestimmung der Bindungsparameter mittels Fluoreszenzspektroskopie möglich ist. Die geeignetste Methode zur Überprüfung dieses Postulates bzw. zur Auffindung der wahrscheinlichsten Bindungsstelle ist das „molecular modelling“. Diese theoretische Methode ist in der Pharmazie weit verbreitet, um eine Vielzahl von Molekülen zu prüfen und dabei festzustellen, welches

große Wechselwirkungen mit einem gewünschten Zielmolekül eingehen kann. So kann beispielsweise berechnet werden, welche Verbindung sich strukturell am besten im aktiven Zentrum eines Enzyms lokalisiert, um dieses zu blockieren, oder, welche Wechselwirkungen zwischen Arzneimitteln und den Carriern im Blut, wie beispielsweise HSA, ausgebildet werden.

Im Gegensatz zu den bisher untersuchten Polyphenolen ist die Struktur von Anthocyanen sehr stark vom pH-Wert abhängig (vgl. Abb. 2.6). Beim physiologischen pH-Wert von 7,4 liegt das Gleichgewicht auf der Seite der ionischen Anhydrobase und des Chalkons, es liegen aber immer noch gewisse Anteile an chinoider Anhydrobase und Chromenolstrukturen vor (Timberlake 1980). Da eine Verschiebung des Gleichgewichtes durch die bevorzugte Bindung einer Grenzstruktur angenommen werden muss, wurden in unseren Untersuchungen die Wechselwirkungen von HSA mit allen vier genannten Strukturen berechnet. Für das Chromenol wurden beide Stereoisomere berücksichtigt. Die Berechnungen wurden für die Anthocyane mit der größten und der kleinsten Bindungskonstante (Malvidin-3-O-galaktosid und Cyanidin-3-O-glukosid; vgl. Tabelle 3.3) durchgeführt. Als Proteinstruktur wurde im Gegensatz zu Literaturangaben, bei denen man die Kristallstruktur von HSA (Proteindatabank (PDB) 1AO6) verwendet hat (Zsila *et al.* 2003, Maiti *et al.* 2006), den Berechnungen die Struktur des HSA-Warfarin-Komplexes (PDB 1HA2) zugrunde gelegt, aus dem der Ligand herausgerechnet wurde. Um die Richtigkeit der Methode zu überprüfen, wurde zunächst in 20 unabhängigen Testläufen Warfarin wieder als Ligand eingesetzt. In 18 dieser Läufe wurde das Molekül wieder an die in der Kristallstruktur gemessene Stelle positioniert. Daneben wurde aber auch noch eine zweite Bindungsstelle für Warfarin identifiziert, welche in unmittelbarer Nähe zum eigentlichen Bindungsort zwischen den Aminosäuren Trp 214, Arg 218, Glu 450, and Asp 451 lokalisiert ist.

Da aber der Ligand auch an dieser Stelle mit dem Tryptophanrest interagieren kann, ist auch hier von einem Quenchen der Fluoreszenz durch den Liganden auszugehen (vgl. Kapitel 3.3.2.2).

Aus den fünf geprüften Anthocyanrenzstrukturen stellten sich die chinoide und die ionische Base schnell als wahrscheinlichste Bindungsformen heraus, da nur diese beiden eine feste Bindung zeigten. Es ergab sich, dass die chinoide Base sogar mit noch größerer Wahrscheinlichkeit in den Experimenten die Bindungsstelle des HSA-Moleküls erreicht und somit als vorrangiger Bindungspartner zu bezeichnen ist. Lokalisiert ist die Bindungsstelle in unmittelbarer Nähe zur Warfarin-Bindungsstelle, ohne aber mit dieser zu überlappen.

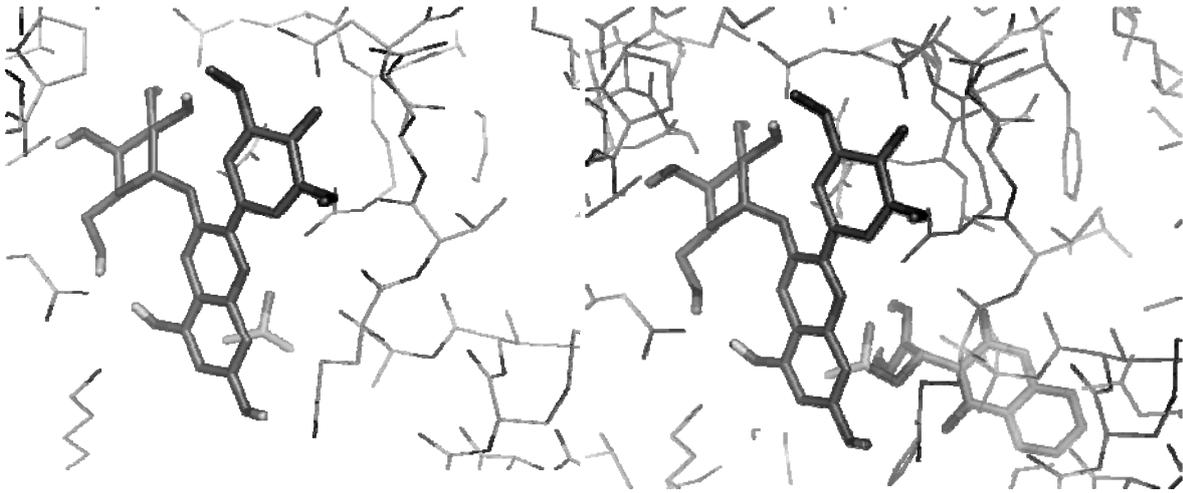


Abbildung 3.14: Modell der Warfarin-Bindungstasche mit der Lage des Warfarinmoleküls (heller) tief in der Tasche und des Anthocyanmoleküls am Eingang der Tasche.

Abbildung 3.14 zeigt das Warfarin- und das Anthocyanmolekül in der hydrophoben Tasche der Bindungsstelle I in der Subdomäne IIA. Während das Warfarinmolekül weit in die Tasche hineinragt, bleibt das Anthocyanmolekül mit seinem Zuckerrest am polaren Eingang, während der A-Ring in die Tasche eintaucht. Try 214 markiert mit den Wechselwirkungen mit dem A-Ring des Anthocyans den Boden der Bindungsstelle. Die beiden Argininreste (218 und 222) interagieren auf der einen Seite, die Reste Glu 450 und Asp 451 auf der anderen. Weitere Wechselwirkungen wurden mit Lys 195, Gln 221, Pro 447 sowie mit der Kette von Glu 292 bis Asn 295 beobachtet (vgl. Abbildung 3.15).

Im Gegensatz zur für die chinoiden Base beschriebenen, deckt sich die Bindungsstelle der ionischen Base mit der des Warfarins, zeigt allerdings eine andere Orientierung. Da Ergebnisse nasschemischer Versuche (vgl. Kapitel 3.3.3.1) allerdings gegen diese Position als wichtigste Bindungsstelle sprechen, ist davon auszugehen, dass die oben beschriebene Bindungsstelle der chinoiden Base eine höhere Relevanz besitzt und somit die ionische Base an der Warfarin-Bindungsstelle nur eine untergeordnete Rolle spielt.

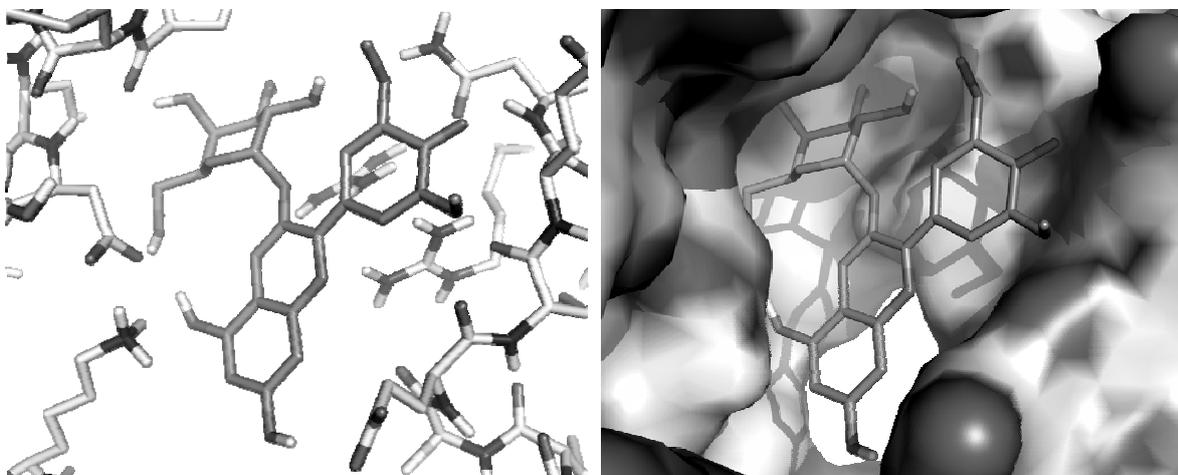


Abbildung 3.15: Model der Bindungsstelle von Malvidin-3-O-galaktosid im HSA Molekül

Die Anthocyanbindungsstelle deckt sich in großen Teilen mit den für andere Polyphenole in der Literatur beschriebenen Bindungsstellen, d.h. für Quercetin (Zsila *et al.* 2003) und für Epigallocatechingallat (Maiti *et al.* 2006), und kann somit als Flavonoidbindungsstelle bezeichnet werden.

Neben Malvidin-3-O-galaktosid wurde auch Cyanidin-3-O-glukosid (als schwächster Bindungspartner der Fluorezenztitration) in die Berechnungen mit einbezogen; dabei sind sehr ähnliche Ergebnisse erhalten worden. Auch hier konnten die chinoide und die ionische Base als wahrscheinlichste Bindungspartner identifiziert werden. Auch die Anlagerung erfolgte an den gleichen Bindungsstellen. Die unterschiedlich hohen Bindungskonstanten ließen sich mit diesen Berechnungen nicht erklären. Es zeigte sich jedoch, dass die verschiedenen Anthocyane gleiche Bindungseigenschaften aufweisen.

3.3.3 Einfluß der Proteinbindung auf die Stabilität von Anthocyanen

3.3.3.1 Einfluß von Blutproteinen auf die Anthocyanstabilität

Nachdem die genauen Bindungsparameter bekannt waren, stellte sich die Frage, wie sich die Bindung der Anthocyane an HSA im Blut auf die Anthocyane auswirkt. Hierzu wurden Anthocyane mit HSA-Lösung versetzt. Die so erhaltenen Lösungen wurden für verschiedene Zeiträume bei physiologischen pH- und Temperaturbedingungen über mehrere Stunden inkubiert. Für den Abbruch der Reaktion wurden verschiedene Verfahren geprüft. Die Zugabe von starker Säure, welche das Anthocyan in die kationische Form überführt und das Protein denaturiert, war die erste Möglichkeit, den Reaktionsabbruch vorzunehmen (sauere Aufarbeitung). So konnten in den Überständen neben den in der Inkubationslösung frei vorliegenden Anthocyanen auch jene quantifiziert werden, welche durch die Denaturierung freigesetzt wurden. Die zweite Möglichkeit, den Reaktionsabbruch durchzuführen, war die Abtrennung des intakten HSA-Anthocyan-Komplexes mittels Mikrofiltration (neutrale Aufarbeitung bei pH 7,4). Hierbei wurde der Protein-Liganden-Komplex nicht zerstört, so dass nur ungebundene Anthocyane im Filtrat nachweisbar waren. Diese mussten vor der Analyse durch Säurezugabe stabilisiert werden. Als Vergleich wurde eine Messreihe ohne Protein angesetzt. Hier wurden die Anthocyane nach Beendigung der Inkubationsdauer durch Ansäuern der Lösung in die kationische, stabile Form überführt. Alle Proben wurden mittels HPLC-DAD analysiert. Die am Beispiel von Delphinidin-3-O-arabinosid erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

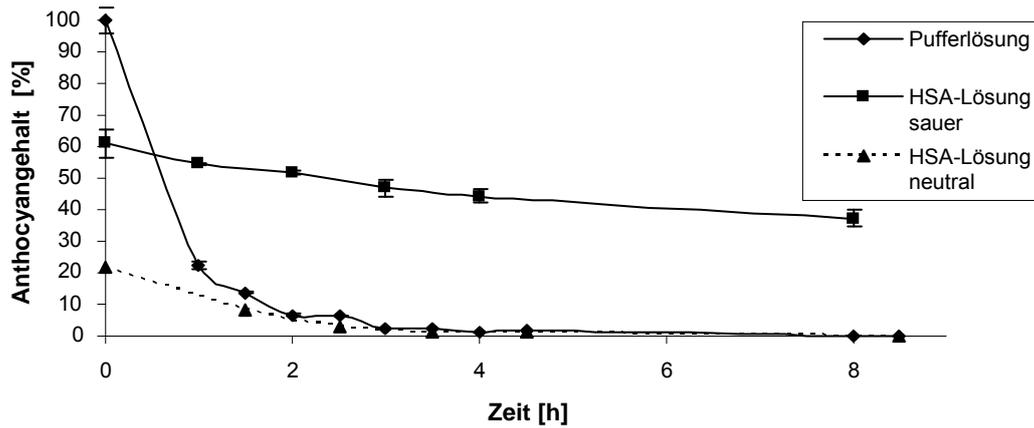


Abbildung 3.16: Vergleich der Gehalte an Delphinidin-3-O-arabinosid nach verschiedener Inkubationsdauer (bis zu 8,5 h) in Phosphatpuffer und 4%iger HSA-Lösung. Der Inkubationsabbruch wurde sowohl sauer (durch Proteindenaturierung) als auch neutral (durch Mikrofiltration) durchgeführt.

Durch die Abtrennung des Protein-Ligand-Komplexes aus der Lösung konnte der an das Protein gebundene Anteil der Anthocyane ermittelt werden. Dieser betrug für die zwölf aus Heidelbeeren isolierten Anthocyane zwischen 70,4% und 84,2% (tabellarische Aufstellung siehe Tabelle 7.7). Dies sind im Vergleich zu anderen Liganden eher geringe Werte, da beispielsweise Warfarin (als der am besten beschriebene Ligand dieser Bindungsstelle) konzentrationsunabhängig bis fast zur Äquimolarität zu 99,5% an das Protein bindet (Rehse *et al.* 1981). Auch für das Flavanol Quercetin sind ähnlich hohe Bindungsraten an humanes Serumalbumin bekannt; in der Literatur werden Raten von 98,2% bis 99,7% genannt (Boulton *et al.* 1998). Dagegen sind die Wechselwirkungen von Quercetin mit anderen Plasmaproteinen, wie zum Beispiel dem α_1 -sauren Glykoprotein, mit einer Bindungsrate von unter 40%, gering (Boulton *et al.* 1998).

Leider wurden auch nach Säuredenaturierung nicht 100% der eingesetzten Anthocyane wiedergefunden; es waren zwischen 55,1% und 76,8% (tabellarische Aufstellung siehe Tabelle 7.7) der eingesetzten Anthocyane extrahier- und analysierbar. Ein nicht unerheblicher Teil der Anthocyane blieb an das denaturierte Protein gebunden und entzog sich so der Analytik. Es ist aber davon auszugehen, dass es sich bei Anthocyanen ähnlich verhält wie bei Warfarin und der prozentuale Anteil der freien Moleküle über die Konzentrationen sich nicht verändert, und es somit nur zu einer absoluten, nicht aber zu einer relativen Verschiebung der Abbaukurven und somit der Ergebnisse kommt (Rehse *et al.* 1981).

In Abbildung 3.16 ist am Beispiel von Delphinidin-3-O-arabinosid zu erkennen, dass sich der Abbau bei Anwesenheit von Serumalbumin sehr stark verlangsamt. Nach einiger Zeit kreuzt der Graph der in der Pufferlösung gelagerten Anthocyane den in der HSA-Lösung bei saurer Aufarbeitung erhaltenen. Insgesamt wurden über die gesamte Inkubationsdauer bei keinem Anthocyan in Proteinlösung mehr als 30% abgebaut, wohingegen der Verlust der Anthocyane durch Abbau in Pufferlösung zu bis zu 100% betrug.

Besonders deutlich wird der stabilisierende Effekt des humanen Serumalbumins auch beim Vergleich der nach vier Stunden bestimmten Restanthocyangehalte, welche für die HSA-Lösung zwischen 41,0% und 64,8% lagen, wohingegen in der Pufferlösung nur noch 1,4% bis 21,2% wiedergefunden werden konnten (vgl. Tabelle 3.3). Bei der Betrachtung dieser Werte muss berücksichtigt werden, dass zu den hohen gemessenen Werten in der Proteinlösung aufgrund der geringeren Wiederfindung noch einige Prozent addiert werden müssten. Da sich dies aber nicht zuverlässig angeben lässt, wurde auf eine Einberechnung der Wiederfindung verzichtet. Auch so wird der stabilisierende Effekt der Proteine auf die Anthocyane sehr deutlich.

Die Proteinbindung könnte auch eine Erklärung dafür sein, warum selbst nach vielen Stunden noch Anthocyane im Blut detektiert werden. Zwar liegt durch die schnelle Anthocyanresorption im Magen und oberen Dünndarmabschnitt der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration schon sehr früh (nach ca. einer Stunde), aber es werden über einen Zeitraum von 24 Stunden Anthocyane im Blut und Urin nachgewiesen (McGhie und Walton 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit geben den Hinweis, dass die Anthocyane als chinoide oder ionische Basen an das Serumalbumin gebunden vorliegen und aus diesem Grunde sich das Gleichgewicht mit dem instabilen Chinon (Timberlake 1980) weit auf die Seite der chinoiden Base verschiebt, was das Anthocyan vor einem raschen Abbau bewahrt. Könnte sich das Gleichgewicht für die gesamte, resorbierte Anthocyanmenge, und nicht nur der geringe Anteil des frei im Plasma vorliegenden Anthocyan einstellen, wären die Anthocyane bereits nach wenigen Stunden bei pH 7,4 abgebaut (siehe Puffer in Abbildung 3.16). Die Bindung an HSA trägt also sehr stark zur Stabilisierung der Anthocyane im Blut bei. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass es auch zu Wechselwirkungen mit anderen Geweben kommt. Dies ist umso wahrscheinlicher als bekanntlich eine weit größere Menge Anthocyane und Metabolite im Urin als im Blut detektiert werden. Es scheint sich also auch hier wieder ein Gleichgewicht zwischen den an HSA und in den Geweben gebundenen Anthocyanen einzustellen. Durch eine Bindung an Gewebe wird gewährleistet, dass die Anthocyane auch an den gewünschten Wirkorten ankommen, dort gebunden werden können und ihre (z.B. antioxidativen) Wirkungen entfalten könnten.

Neben humanem Serumalbumin wurde von uns auch Rinderserumalbumin (BSA) auf seinen Einfluß auf Anthocyane untersucht. Hierzu wurde eine Anthocyanmischung in einer 2%igen BSA-Lösung für eine und drei Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde, wie auch schon bei HSA, die Reaktion durch Säuredenaturierung gestoppt. Der Gehalt der im Überstand vorliegenden freien Anthocyane wurde mittels HPLC-DAD bestimmt. Die ermittelten Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel[®] statistisch ausgewertet. Es wurde berechnet, inwieweit die in der Proteinlösung ermittelten

Gehalte gegenüber den Gehalten an Anthocyanen im Puffer signifikant erhöht waren. Wie bei solchen Bestimmungen üblich, wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% für das erste Signifikanzniveau (*) zugelassen; lag diese unter 1% gelten die Unterschiede als hoch signifikant (**) und bei unter 0,1% als höchst signifikant (***).

Tabelle 3.4: Anthocyanengehalte (in % bezogen auf die eingesetzte Anthocyankonzentration) in 2%iger BSA-Lösung und Puffer (pH 7,4) nach einer bzw. drei Stunden Inkubation sowie die berechneten Signifikanzen (Δ) der Gehaltsunterschiede

Anthocyan	Gehalt [%] nach 1 h			Gehalt [%] nach 3 h		
	ohne BSA	mit BSA	Δ	ohne BSA	mit BSA	Δ
Dp-3-O-gal	67,0 \pm 2,6	81,2 \pm 3,2	**	24,0 \pm 0,7	32,9 \pm 1,1	***
Dp-3-O-glc	65,0 \pm 2,4	76,9 \pm 3,0	**	21,1 \pm 0,5	29,5 \pm 0,9	***
Dp-3-O-ara	67,0 \pm 2,6	77,7 \pm 3,1	*	22,3 \pm 0,7	30,5 \pm 1,0	***
Cy-3-O-gal	84,7 \pm 3,1	95,9 \pm 3,5	*	64,0 \pm 1,9	72,6 \pm 2,4	*
Cy-3-O-glc	83,4 \pm 3,2	94,1 \pm 3,8	*	61,9 \pm 2,2	71,4 \pm 2,2	**
Cy-3-O-ara	82,4 \pm 6,7	76,2 \pm 6,3		66,0 \pm 4,6	60,7 \pm 4,3	
Pt-3-O-gal	79,0 \pm 3,3	91,1 \pm 3,6	*	53,9 \pm 1,6	63,7 \pm 2,4	**
Pt-3-O-glc	74,1 \pm 3,0	84,8 \pm 3,2	*	43,4 \pm 1,5	53,9 \pm 2,2	***
Pt-3-O-ara	68,9 \pm 3,5	83,8 \pm 1,6	*	39,2 \pm 1,4	50,2 \pm 1,0	***
Mv-3-O-gal	76,0 \pm 4,3	84,8 \pm 4,0		59,3 \pm 2,1	65,5 \pm 3,1	
Mv-3-O-glc	75,3 \pm 3,2	92,0 \pm 3,6	**	55,5 \pm 1,6	69,9 \pm 3,1	***
Mv-3-O-ara	76,1 \pm 2,8	93,1 \pm 2,6	***	55,6 \pm 1,9	68,4 \pm 1,5	***
Pn-3-O-glc	76,0 \pm 4,3	91,4 \pm 2,0	**	55,4 \pm 2,0	73,3 \pm 3,6	***

Bereits nach einer Stunde lagen die Gehalte für sechs Anthocyane signifikant, für vier Anthocyane hochsignifikant und für eines sogar höchstsignifikant höher in der Proteinlösung im Vergleich zur Pufferlösung vor. Dieser Trend wurde nach 3 Stunden Inkubationszeit noch stärker (vgl. Tabelle 3.4). Hier waren bereits acht der dreizehn Anthocyane durch die BSA-Lösung höchst signifikant stabilisiert worden. Lediglich bei zwei untersuchten Anthocyanen konnten in der BSA-Lösung keine signifikant höheren Anthocyanengehalte ermittelt werden. Da bovines Serumalbumin sehr ähnlich aufgebaut ist wie sein humanes Analogon, überrascht dieses Ergebnis nicht (Kosa *et al.* 1997). Trotzdem gibt es Beispiele, bei denen Pharmazeutika sehr verschiedene Bindungseigenschaften gegenüber humanem Serumalbumin und BSA zeigten (Kosa *et al.* 1997, Zlotos *et al.* 1998). Auf eine Bestimmung der Bindungsparameter durch Fluoreszenztitration wurde verzichtet. Sie wird zwar in der Literatur erwähnt (Rawel *et al.* 2006), da BSA aber im Gegensatz zu HSA zwei Tryptophanreste besitzt, sind die Ergebnisse jedoch

mit großer Vorsicht zu beurteilen, da beide Reste fluoreszieren und so eine Wechselwirkung nicht genau zugeordnet werden kann.

Bindungsstudien wurden von uns zusätzlich mit Hämoglobin durchgeführt, da vermutet wurde, dass alle Proteine einen Einfluß auf Anthocyane zeigen. Dies wurde jedoch experimentell widerlegt. Hämoglobin geht demnach keine Wechselwirkungen mit Anthocyanen ein und hat aus diesem Grund auch keinen Einfluss auf deren Stabilität. Dieses Ergebnis hatte auch schon die Blutfraktionierung (vgl. Kapitel 3.3.1) vermuten lassen, da sich das humane Hämoglobin in den Erythrocyten befindet und bei der Fraktionierung keine nennenswerten Anthocyanengehalte in der Zellfraktion detektiert wurden. Es scheint also nur zu Wechselwirkungen zu kommen, wenn die Proteine eine geeignete Bindungsstelle besitzen, mit welcher das Polyphenol interagieren kann. Im Blut scheint dies vor allem das Serumalbumin zu sein, dessen Einfluss auf die Stabilität noch weit größer sein dürfte als die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, da das Protein aufgrund seines hohen Vorkommens und der geringen Bioverfügbarkeit der Anthocyane in extremem Überschuss vorliegt.

Auch die Frage, ob ein Großteil der HSA-Moleküle nicht durch den Transport exo- und endokriner Substanzen wie Fettsäuren, Hormone, Ionen und Arzneimittel blockiert wird, wurde experimentell negativ beantwortet. Hierzu wurden die Proteine zunächst mit der fünffachen Konzentration an Hemmstoffen (Palmitat, Ibuprofen und Warfarin) vorinkubiert. Nach Zugabe der Anthocyane wurde für vier Stunden bei pH 7,4 und 37 °C inkubiert und die Anthocyanengehalte mit denen ohne Blockierung der Bindungsstellen durch oben genannte Hemmstoffe verglichen. Es zeigte sich kein Einfluss der zugesetzten Liganden auf den zeitlichen Verlauf des Anthocyanabbaus. Die untersuchten Substanzen erreichten also keine Blockade der Bindungsstelle. Als Nebenbeobachtung aus diesem Versuch viel auf, dass Warfarin sich bei saurer Denaturierung der Proteine zu gut 25% von den Proteinen löste, wohingegen es gemäß der Literatur an nativen Proteinen zu über 99% gebunden war (Rehse *et al.* 1981). Anthocyane dagegen wurden zu einem viel höheren Anteil durch die Denaturierung freigesetzt. Dies kann daran liegen, dass sich die Warfarin-Bindungstasche bei der Denaturierung durch Säure verschließt und die Warfarinmoleküle die viel weiter im Inneren der Tasche sitzen, somit mit weit geringerer Wahrscheinlichkeit diese verlassen können, als die am Eingang der hydrophoben Tasche befindlichen Anthocyane (vgl. Abbildung 3.14).

3.3.3.2 Identifizierung anderer mit Anthocyanen wechselwirkender Proteine

Nachdem der Einfluß der Proteinbindung von Serumproteinen auf die Anthocyane untersucht worden war, lag die Vermutung nahe, dass auch andere Proteine solche Eigenschaften haben könnten. Dies könnte vor allem auch in der Lebensmitteltechnologie

von Vorteil sein, da durch einen höheren Proteingehalt im Lebensmittel sowohl die Farbe als auch die positiven physiologischen Eigenschaften der Anthocyane erhalten werden könnten. Da bei den bisherigen Versuchen vor allem mit Albuminen positive Ergebnisse erzielt worden waren, wurden lebensmittelrelevante Albumine untersucht. Dies sind vor allem das im Eiklar enthaltene Ovalbumin und das in der Milch enthaltene Laktalbumin. Diese Proteine weisen zu den untersuchten Serumalbuminen keinerlei strukturelle Homologien auf. Zur Prüfung, ob auch diese Proteine eine anthocyanstabilisierende Wirkung zeigen, wurde eine Stammlösung aus Heidelbeeranthocyanen in 2%igen Proteinlösungen bei pH 7,4 und 37 °C inkubiert (vgl. 4.3.10). Nach Säuredenaturierung wurde der jeweilige Überstand mittels HPLC-DAD untersucht und die Anthocyane (Quantifizierungsstandard 3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure) quantifiziert. Da nur die relativen Abbauraten untersucht werden sollten, wurden die Anthocyanengehalte zu Beginn der Inkubation willkürlich gleich 100% gesetzt.

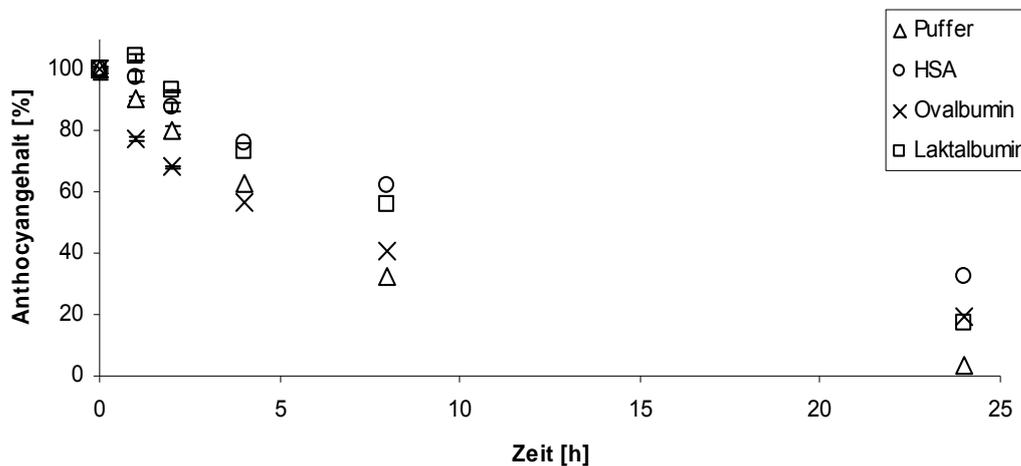


Abbildung 3.17: Zeitlicher Verlauf des Abbaus von Malvidin-3-O-glukosid in verschiedenen Inkubationsmedien bei pH 7,4 und 37 °C (Bedingungen siehe Kapitel 4.3.10)

Wie in Abbildung 3.17 am repräsentativen Beispiel von Malvidin-3-O-glukosid erkennbar ist, führten alle untersuchten Proteine zu einer Anthocyanstabilisierung. Während in Puffer nach 24 h fast keine Anthocyane mehr nachweisbar waren, lagen bei den beiden lebensmittelrelevanten Proteinen noch ungefähr 20% des Ausgangsgehaltes vor. Am Höchsten war aber der Gehalt in der HSA-Lösung (ebenfalls 2%ig); dieser lag bei fast 40% der Ausgangskonzentration.

Der Unterschied der Effekte zwischen Ovalbumin und Laktalbumin ist weit größer als es in Abbildung 3.17 scheint. Es war nämlich zu beachten, dass die molare Masse von HSA bei 67 kDa, die von Ovalbumin bei 43 kDa und die von Laktalbumin bei 14 kDa liegt. Somit ist die molare Konzentration von Laktalbumin ca. dreimal so hoch ist wie die von Ovalbumin; d.h. der molare Effekt auf die Anthocyane ist bei Ovalbumin viel stärker ausgeprägt als bei Laktalbumin.

3.3.3.3 Stabilisierung der Anthocyane im Lebensmittel

Um zu prüfen, ob die Anthocyane auch im Lebensmittel stabilisiert werden, wurden weitere Versuche durchgeführt. Als Lebensmittel mit hoher Laktalbuminkonzentration wurde Milch ausgewählt. Für die Versuche wurde entrahmte Milch verwendet, um durch Fett bedingte Probleme bei der Probenaufarbeitung auszuschalten. Die entrahmte Milch wurde direkt als Inkubationsmedium eingesetzt. Daneben wurde zur Kontrolle auch eine 4%ige Laktalbuminlösung verwendet. Zunächst wurde als Anthocyan Cyanin (Cyanidin-3,7-O-diglukosid) eingesetzt. Allerdings erwies sich das Anthocyan bei dem pH-Wert der Milch (6,4) als sehr stabil und wurden auch in Puffer nach acht Stunden Inkubation nur zu ca. 20% abgebaut.

Da in dieser Versuchsreihe die Wiederfindung bei nur 80% lag, waren mit diesem Anthocyan keine Aussagen über eine Stabilisierung zu treffen. Daher wurden die Versuche mit einem der instabilsten Anthocyane (Delphinidin-3-O-arabinosid) wiederholt. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in Abbildung 3.18 graphisch dargestellt. Es wird deutlich, dass der Anthocyangehalt (bei einer sehr geringen Wiederfindung von nur 57%) über den kompletten Inkubationszeitraum konstant war.

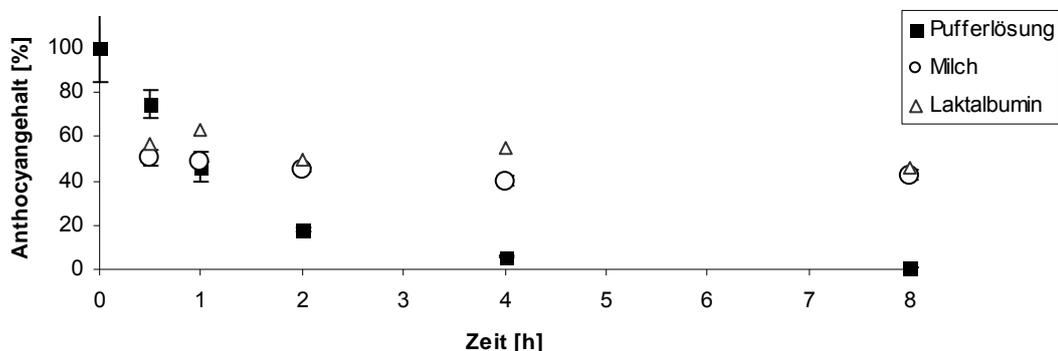


Abbildung 3.18: Abbau von Delphinidin-3-O-glukosid in Pufferlösung, entrahmter Milch und Laktalbuminlösung (alle pH 6,4) über einen Beobachtungszeitraum von acht Stunden (Bedingungen siehe Kapitel 4.3.10)

Ein ähnlich beeindruckendes Ergebnis lieferte auch die Inkubation mit verdünntem Eiklar. Aufgrund des hohen pH-Wertes von 9,2 der von uns verwendeten Eier wurde hier auf das schon oben genannte Cyanin als Anthocyan zurückgegriffen (bei einem so hohen pH-Wert würden instabile Anthocyane wie beispielsweise die Delphinidinglykoside bereits innerhalb der ersten Stunde abgebaut). Abbildung 3.19 zeigt den Verlauf des Cyanin-gehaltes über eine acht Stunden Inkubation in 0,1 molarem Phosphatpuffer, verdünntem Eiklar und 4%iger Ovalbuminlösung (alle pH 9,2).

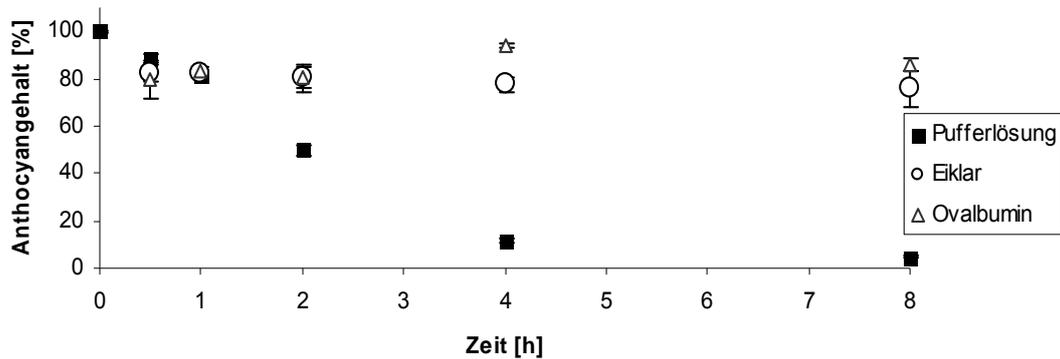


Abbildung 3.19: Abbau von Cyanin (Cyanidin-3,7-O-diglucosid) in verdünntem Eiklar, Pufferlösung und Ovalbuminlösung (alle pH 9,2) über einen Beobachtungszeitraum von acht Stunden (Bedingungen siehe Kapitel 4.3.10)

Auch in diesem Fall erwies sich das Anthocyan über den gesamten Inkubationszeitraum als stabil. Die Wiederfindung lag, wie oben bereits erwähnt, bei 80%. Es waren keine Unterschiede zwischen der Inkubation mit Eiklar und Proteinlösung festzustellen. Somit haben auch hier, wie schon am Beispiel der Milch gezeigt, die übrigen Inhaltsstoffe im Lebensmittel keinen Einfluß auf die Anthocyanstabilität.

Zwar hat man im Lebensmittel genauere Untersuchungen zur Interaktion von Polyphenolen aus Beeren (darunter auch Anthocyane) mit Fetten und Proteinen sowie in besonderer Weise deren Wirkung auf die Proteinoxidation und Protein-Lipid-Wechselwirkungen untersucht (Vilijanen 2005), allerdings ist eine solche Stabilisierung (wie oben gezeigt) bisher nicht beobachtet worden. Dies dürfte daran liegen, dass bei den genannten Studien mehr auf das Verhalten der Proteine und Fette geachtet wurde und weniger auf das der Anthocyane.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals erfolgreich gezeigt werden, dass Anthocyane durch Wechselwirkungen mit Proteinen im neutralen bis alkalischen Milieu signifikant langsamer abgebaut werden wie in Pufferlösung. Die Bindung an das Plasmaprotein HSA wurde außerdem durch nasschemische, spektroskopische Methoden sowie mittels „*molecular modelling*“ genau charakterisiert.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p. a.-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe), Fluka (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Extrasynthèse (Lyon, Frankreich), BD Bioscience (Heidelberg) und Gruessing (Filsum), bezogen. Das Penicillin/Streptomycin-Antibiotikum lieferte die Biochrom AG (Berlin). Lösungsmittel wurden vor der Verwendung über Füllkörperkolonnen rektifiziert. Wasser wurde aus der hauseigenen Millipore™-Aufbereitungsanlage gewonnen (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Für HPLC-DAD- und HPLC-MS(MS)-Analysen wurden ‚gradient grade‘-Lösungsmittel von Acros Organics (Geel, Belgien) und Merck (LiChrosolv®, Darmstadt) verwendet. Reinstgase wurden von den Firmen Linde (Berlin) und Messer Griesheim (Frankfurt) bezogen.

4.1.2 Untersuchungsmaterial

Die verwendeten Wildheidelbeeren wurden als Tiefkühlware über den lokalen Großhandel bezogen. Die benötigten Eier und die Milch wurden im lokalen Einzelhandel erworben. Alle Materialien stammten aus konventioneller Erzeugung

4.1.3 Verbrauchsmaterial

Alle Verbrauchsmaterialien wurden bei den Firmen Roth (Karlsruhe), Fisher-Scientific (Ulm) und Hartenstein (Würzburg) erworben. HPLC-Zubehör wurde von Wicom (Heppenheim) bezogen.

4.1.4 Säulenchromatographie (SC)

SC 1

Trennsäule: 35 x 5,5 cm I.D.
Füllmaterial: Amberlite® XAD-7 (Sigma-Aldrich, Steinheim)

SC 2

Trennsäule: 35 x 4 cm I.D.
Füllmaterial: Davisil® (Sigma-Aldrich, Steinheim)

SC 3

Trennsäule: 35 x 4 cm I.D.
 Füllmaterial: Silica Gel 100 C₁₈ - RP(Sigma-Aldrich, Steinheim)

4.1.5 Festphasenextraktion (SPE)

Für die Festphasenextraktion wurden Oasis[®] C18 ec Kartuschen (3cc, 60 mg Adsorbens) der Firma Waters (Milford, USA) verwendet. Das hierbei verwendete Umkehrphasenmaterial ist im Bereich von pH 0 bis pH 14 stabil.

4.1.6 Mikrofiltration

Zur Mikrofiltration wurden Mikrokonzentratoren Milipore[™] Microcon YM-10 (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) verwendet. Bei dieser Filtrationsart werden durch Zentrifugalkraft alle Moleküle mit einer Molmasse unter 10 kDa durch eine Membran gepresst. Schwerere Verbindungen bleiben als Rückstand auf der Membran.

4.2 Geräte**4.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie**HPLC-System 1

Gerät: Knauer Well Chrom K1001 System
 Pumpen: 2 Knauer HPLC Pump 64 mit präparativen Pumpenkopf
 Injektor: Rheodyne Six-Port Injektionsventil
 Trennsäule: Knauer Eurospher[®] C18 (5 µm Partikelgröße, 250 x 16 mm I.D. Berlin)
 Fließmittel: A: 10% Ameisensäure in Reinstwasser
 B: Acetonitril
 Fluß: 16 mL/min
 Gradient:

t [min]	0	30	50	70	75
B [%]	1	9	10	15	99

 Detektor: Knauer Variable Wavelength Monitor
 Wellenlänge: 520 nm

HPLC-System 2

Gerät:	Knauer Well Chrom K1001 System
Pumpen:	2 Knauer HPLC Pump 64 mit präparativen Pumpenkopf
Injektor:	Rheodyne Six-Port Injektionsventil
Trennsäule:	Agilent ZORBAX™ SB-C8 (3,5 µm Partikelgröße, 150 x 4,6 mm I.D., Böblingen)
Fließmittel:	A: 10% Ameisensäure in Reinstwasser B: Acetonitril
Fluß:	1,3 mL/min
Gradient:	isokratisch 6% B
Detektor:	Knauer Variable Wavelength Monitor
Wellenlänge:	520 nm

HPLC-System 3

Gerät:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series (Waldbronn)																
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Waldbronn)																
Autosampller:	Wisp 712b (Waters, Eschborn) mit automatischer Injektion																
Trennsäule:	Agilent ZORBAX™ SB-C8 (3,5 µm Partikelgröße, 150 x 4,6 mm I.D., Böblingen)																
Fließmittel:	A: 2,5% Ameisensäure in Reinstwasser B: Acetonitril																
Fluß:	1 mL/min																
Gradient:	<table border="1"> <tr> <td>t [min]</td> <td>0</td> <td>3</td> <td>17</td> <td>28</td> <td>35</td> <td>45</td> <td>70</td> </tr> <tr> <td>B [%]</td> <td>2</td> <td>2</td> <td>5</td> <td>6</td> <td>15</td> <td>20</td> <td>99</td> </tr> </table>	t [min]	0	3	17	28	35	45	70	B [%]	2	2	5	6	15	20	99
t [min]	0	3	17	28	35	45	70										
B [%]	2	2	5	6	15	20	99										
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray, DAD, 1100 Series (Waldbronn)																
Spektralbereich:	200 - 600 nm																

An dieses System wurde bei Bedarf nach einem ¼ Split ein Massenspektrometer angekoppelt. Bei MS Analysen wurde allerdings als Eluent A 2,5%ige Ameisensäure verwendet (siehe 4.2.2).

HPLC-System 4

Gerät:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series (Waldbronn)
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Waldbronn)
Autosampller:	Wisp 712b (Waters, Eschborn) mit automatischer Injektion

Trennsäule: Agilent ZORBAX™ SB-C8 (3,5 µm Partikelgröße, 150 x 4,6 mm I.D., Böblingen)

Fließmittel: A: 10% Ameisensäure in Reinstwasser
B: Acetonitril

Fluß: 1 mL/min

Gradient:

t [min]	0	3	17	28	35	45	50	52
B [%]	2	2	5	6	15	20	25	99

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

Spektralbereich: 200 - 600 nm

HPLC-System 5

Gerät: Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series (Waldbronn)

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

Autosampler: Wisp 712b (Waters, Eschborn) mit automatischer Injektion

Trennsäule: Eurochrom Nucleosil-120 C18 (3 µm 125 x 4.6 mm I.D., Knauer, Berlin)

Fließmittel: A: 10% Ameisensäure in Reinstwasser
B: Acetonitril

Fluß: 1 mL/min

Gradient:

t [min]	0	15	25	30
B [%]	5	40	60	99

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

Spektralbereich: 200 - 600 nm

HPLC-System 6

Gerät: Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series (Waldbronn)

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

Autosampler: Wisp 712b (Waters, Eschborn) mit automatischer Injektion

Trennsäule: Gemini® C18 Trennsäule (3 µm Partikelgröße, 150 x 2 mm I.D., Phenomenex, Aschaffenburg)

Fließmittel: A: 0,1% Ameisensäure in Reinstwasser
B: Acetonitril

Fluß: 1 mL/min

Gradient:

t [min]	0	25	30
B [%]	5	40	99

Detektor: Hewlett Packard Photodiodenarray, DAD, 1100 Series (Waldbronn)
Spektralbereich: 200 - 600 nm

An dieses System wurde bei Bedarf ein Massenspektrometer angekoppelt (vgl. 4.2.2).

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte bei den analytischen HPLC-Systemen (System 3 – System 6) mit Hewlett Packard ChemStation[®] Software.

4.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie- Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

Bei der Analyse unbekannter Verbindungen wurde das Massenspektrometer hinter das verwendete HPLC-DAD System (System 3 und System 6) gekoppelt.

Massenspektrometer

Gerät: Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Electrospray Ionisations-Interface (ESI)

ESI-Kapillare: desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm I.D.) (J&W Scientific, Folsom, CA, USA)

Ionenquelle: Atmosphärendruck, Raumtemperatur

Eingangskapillare: 250°C

Kapillarspannung: 3,2 kV

Sheathgas: Stickstoff 5.0 (70 psi)

Hilfsgas: Stickstoff 5.0 (10 L/min)

Messbereich: m/z 130 - 1000 (Full Scan Modus)

Kollisionsgas: Argon 5.0, Kollisionsgasdruck 0,27 Pa (2,0 mTorr)

Kollisionsenergie: 15 bis 35 eV

Multiplierspannung: 1 350 V für ESI-MS, 1 650 V für ESI-MS/MS

Die Datenaufnahme erfolgte mit ICIS 8.1 Data System (Finnigan MAT, Bremen) auf DECstation 5000/33 (Digital Equipment, Unterföhring). Die Datenauswertung erfolgte mit Xcalibur[™] Software Version 1.2 (Thermo Electron, Dreieich) nach Konvertierung.

4.2.3 Sonstige Geräte

Anaerobkammer:	Plexiglaskammer, Gasvolumen ca. 0,25 m ³ , hergestellt in der Werkstatt des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg; Gasbetrieb CO ₂ /N ₂ (80/20, v/v)
CD-Spektrometer:	JASCO Spektropolarimeter J-600 (Gross-Umstadt)
Fluorimeter:	Shimadzu Spektralfluorophotometer RF-540 (Duisburg)
Gefriertrocknungs- apparat:	Christ Alpha1-4; 0,063 mbar (Christ, Osterode)
Magnetrührer:	IKAMAG [®] RH (IKA Labortechnik, Staufen)
Photometer:	Spectronic Genesys TM 2 PC UV-VIS-Spectrophotometer (Spectronic Instruments, NY, USA)
pH-Meter:	Labor-pH-Meter (Knick, Berlin)
Rotavapor:	Büchi Vakuum System B-173, Vakuum Controller B-720, Büchi-Rotavapor (Konstanz)
Trockenschrank:	Memmert, Modell 400 (Schwabach)
Ultraschallbad:	Branson 1210 (G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd)
Ultra Turax [®] :	Ultra Turrax T25 (8000 bis 24000 min ⁻¹) IKA [®] -Labortechnik (Jahnke & Kunkel, Staufen, Deutschland)
Vortexer:	Vortex Genie (Scientific Industries, NY, USA)
Waagen:	Mettler PL 300 Analysenwaage (Mettler-Toledo, Gießen); Mettler AT 21 Comparator (Mettler-Toledo, Gießen); Sartorius BP 210 S Analysenwaage (Sartorius AG, Göttingen)
Wasserbad:	Heidolph Instruments (Schwabach)
Kühlzentrifuge:	Typ Universal 16R, Rotor 1616 & 1614 (Hettich, Tuttlingen)
Zentrifuge:	EBA12, Hettich Zentrifugen (Hettich, Tuttlingen)

4.3 Methoden

4.3.1 Extraktion und Isolierung der Anthocyane aus Heidelbeeren

4.3.1.1 Extraktion

Etwa 1 kg TK Heidelbeeren wurden nach dem Auftauen mittels Ultra Turax[®] fein zerkleinert, mit 500 mL 0,1 M Ameisensäure versetzt und filtriert. Die so erhaltene Lösung wurde portionsweise auf eine mit 2%iger Ameisensäure vorkonditionierte, mit XAD 7 Material gefüllte Glassäule (SC1, vgl. 4.1.4) gegeben. Nach dem Auswaschen der Zucker und organischen Säuren mit 500 mL 2%iger Ameisensäure wurde die trockeneluierte Säule mit 2% Ameisensäure in 50%igem wässrigem Acetonitril versetzt, geschüttelt, und

solange Eluiert, bis die ausfließende Lösung nicht mehr rot gefärbt war. Die übrigen organischen Bestandteile, wie z.B. Polyphenole, die noch auf der Säule verblieben waren, wurden mit 100% Acetonitril eluiert und verworfen. Der rot gefärbten Anthocyanfraktion hat man zunächst unter Vakuum das Lösemittel entzogen, bevor sie tiefgefroren und lyophilisiert wurde.

4.3.1.2 Isolierung der einzelnen Anthocyane

Von dem erhaltenen Extrakt (siehe 4.3.1.1) wurden 200 mg in 10 mL 10%iger Ameisensäure gelöst. Von dieser Lösung wurden wiederholt 0,1 mL mittels präparativer HPLC (System 1, siehe 4.2.1) getrennt. Von den in 50 Läufen erhaltenen 13 Fraktionen wurde das enthaltene organische Lösemittel schonend im Vakuum entfernt bevor diese gefriergetrocknet werden konnten. Da die Trennung von Petunidin 3-O-galaktosid und Cyanindin 3-O-arabinsid auf einer präparativen C18 Phase nicht möglich war, wurde der erhaltene Feststoff der Sammelfraktion erneut in 200 µL 10%iger Ameisensäure gelöst und mittels analytischer HPLC (System 2, siehe 4.2.1) präparativ aufgetrennt. Hierfür wurden 20 Läufe bei einem Injektionsvolumen von 10 µL benötigt. Die Trocknung der Fraktionen erfolgte analog zur Trocknung der durch präparative HPLC gewonnenen Fraktionen.

4.3.1.3 Identifizierung der erhaltenen Reinstoffe

Je ein Körnchen der durch Trocknung erhaltenen Pulver (siehe 4.3.1.2) wurde in je 200 µL 10 %iger Ameisensäure gelöst mittels HPLC-DAD-MS/MS (HPLC System 3, siehe 4.2.1) analysiert. Die Zuordnung der Fraktionen erfolgte über den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit Literaturdaten (Ichiyanagi et al. 2004, Kraus 2006).

4.3.1.4 Erstellen einer Anthocyanstammlösung zum Einsatz bei Inkubationen

Von dem aus TK-Heidelbeeren hergestellten Extrakt (siehe 4.3.1.1) wurden 500 mg entnommen und in 10 mL Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Diese Stammlösung wurde für die Inkubationen mit Speichel, simuliertem Magen- und Duodenalsaft, sowie mit Dünn und Dickdarminhalt verwendet. Die Stammlösung wurde 1:100 mit 10%iger Ameisensäure verdünnt und nach Zusatz von 20% 0,05 molarer 3,4,5-Trimethoxyzimtsäurelösung (in Methanol) mittels HPLC-DAD (HPLC-System 4) quantifiziert. Die Konzentrationen der einzelnen Anthocyane in der Stammlösung sind in Tabelle 7.8 (Anhang) dargestellt.

4.3.2 *Ex vivo* Inkubation mit Speichel

4.3.2.1 Probanden

Fünf gesunde Probanden (einer männlich, vier weiblich) im Alter von 24 bis 28 Jahren nahmen an der Studie teil. Alle waren normalgewichtig, der Body-Mass-Index (BMI) lag zwischen 20,4 und 25,0 kg/m². Keiner der Teilnehmer hatte bekannte Zahnschädigungen oder wurde innerhalb der letzten vier Wochen vor Studienbeginn mit Antibiotika behandelt.

4.3.2.2 Studiendesign

Die Probanden ernährten sich 24 Stunden vor Studienbeginn polyphenolfrei. Sie erschienen am Morgen des Studientages nüchtern und ohne sich seit dem Abend zuvor noch einmal die Zähne geputzt zu haben. Der in einem 250 mL Becherglas gesammelte Speichel aller fünf Studienteilnehmer (pH 6,8) wurde zur Verringerung der Viskosität mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1 verdünnt. Das Gemisch wurde geschüttelt (Walle *et al.* 2005) und anschließend aliquotiert (Ansätze A, B, C). Ansatz A wurde bei 5 000 rpm (2700 x G) für 10 Minuten zentrifugiert und der erhaltene Überstand als Inkubationsmedium verwendet. Ansatz C wurde mit 1% Penicillin/Streptomycin-Antibiotikum versetzt, wohingegen Ansatz B direkt als Medium eingesetzt wurde. Alle drei Ansätze wurden für 5 Minuten bei 37 °C im Trockenschrank vorinkubiert. Die weitere Versuchsanordnung wurde für alle drei Ansätze analog durchgeführt.

Die Inkubationsversuche wurden in sterilen, mit Eindrückstopfen verschließbaren 13 mL Plastikgefäßen (100 x 16 mm PP; Sarstedt, Nümbrecht) durchgeführt. In diese wurden 20 µL einer Anthocyanstammlösung (Herstellung der Lösung siehe 4.3.1.4) vorgelegt. Um sicherzugehen, dass durch die Verwendung einer Anthocyanmischung keine unerwünschten Effekte auftraten, wurde der Versuch mit einem isolierten Anthocyan (Cy-3-O-glc, 5 mg/mL in DMSO) wiederholt. Die Gefäße wurden mit Stickstoff begast und ebenfalls für 5 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurden 1,0 mL verdünnter Speichel hinzugegeben, die Gefäße fest verschlossen und nach kurzem Schütteln bei 37 °C für 0, 0,5, 1, 2, 5 und 60 Minuten im Trockenschrank inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Anthocyane (Vorlage von 20 µL Dimethylsulfoxid; Blindwert) bzw. ohne Speichel (Zugabe von destilliertem Wasser). Die Reaktion wurde durch Einfrieren mit flüssigem Stickstoff gestoppt und die Proben anschließend gefriergetrocknet.

4.3.2.3 Probenaufarbeitung und Analytik

Die Aufarbeitung der Inkubationsansätze erfolgte im Wesentlichen nach Labib (2006). Die gefriergetrockneten Proben wurden 3-mal mit je 1,25 mL 1%iger Salzsäure in einem

Methanol/DMSO Gemisch (3/1 (v/v)) extrahiert, wobei jeder Extraktionsschritt Schütteln und 10-minütiges Behandeln mit Ultraschall beinhaltet. Anschließend wurde bei 5 000 rpm (2700 x G) für 10 Minuten zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden membranfiltriert (Rotilabo-Spritzenfilter PVDF, 0,45 µm Porengröße; Roth, Karlsruhe) eingeeengt, auf 2 mL aufgefüllt und nach Zugabe von 0,5 mL des Quantifizierungsstandards (0,05 M 3,4,5-Trimethoxyzimtsäurelösung in Methanol) mittels HPLC-System 4 (vgl. 4.2.1), bei der Wiederholung mit Cy-3-glc mittels HPLC-System 5 (siehe 4.2.1), analysiert.

4.3.3 *In vitro* Inkubation mit simuliertem Magensaft

4.3.3.1 Studiendesign

Die bei der humanen Verdauung von Lebensmitteln im Magen vorherrschenden Bedingungen wurden durch Inkubationen mit künstlichem Magensaft simuliert (modifiziert nach Gillatt *et al.* 1985, Kahle 2008). Zur Herstellung von 500 mL simuliertem Magensaft wurden 2,10 g Natriumchlorid (70 mM), 1,87 g Kaliumchlorid (50 mM) und 0,69 g Pepsin (0,14 mM) in 300 mL destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wurde mit einigen Tropfen Salzsäure auf 1,81 eingestellt. Die Lösung wurde in einen 500 mL Messkolben überführt, mit Salzsäure (pH 1,81) bis zur Marke aufgefüllt und im Trockenschrank bei 37 °C vorinkubiert.

Die Inkubationsversuche erfolgten in sterilen, mit Eindrückstopfen verschließbaren 13 mL Plastikgefäßen (100 x 16 mm PP; Sarstedt, Nümbrecht). In diese wurde eine definierte Menge einer Anthocyanmischung (20 µL der Anthocyanstammllösung; Herstellung siehe 4.3.1.2; Zusammensetzung siehe Tabelle 7.8) vorgelegt. Die Gefäße wurden mit Stickstoff begast und für 5 Minuten bei 37°C im Trockenschrank vorinkubiert. Nach Zugabe von 1,25 mL simuliertem Magensaft wurden die Gefäße fest verschlossen, kurz geschüttelt und anschließend bei 37°C für 0 Stunden, 20 Minuten, 40 Minuten, 1 Stunde, 1,5 Stunden, 2 Stunden und 4 Stunden im Trockenschrank bei 37°C inkubiert. Für jede Substanz wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne Anthocyane (Vorlage von 20 µL Dimethylsulfoxid; Blindwert) bzw. ohne simulierten Magensaft (Zugabe Salzsäure mit pH 1,81). Ein Reaktionsstopp erfolgte durch Einfrieren mit flüssigem Stickstoff. Die Proben wurden danach gefriergetrocknet.

4.3.3.2 Probenaufarbeitung und Analytik

Die Aufarbeitung der Inkubationsansätze sowie die Quantifizierung erfolgte wie bei den Proben der Speichelinkubation (4.3.2.3). Die gefriergetrockneten Proben wurden 3-mal mit je 1,25 mL 1%iger Salzsäure in einem Methanol/DMSO Gemisch (3/1 (v/v)) extrahiert,

wobei jeder Extraktionsschritt Schütteln und 10-minütiges Behandeln mit Ultraschall beinhaltet. Anschließend wurde bei 5 000 rpm (2700 x g) für 10 Minuten zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden membranfiltriert (Rotilabo-Spritzenfilter PVDF, 0,45 µm Porengröße; Roth, Karlsruhe) eingengt, auf 2 mL aufgefüllt und nach Zugabe von 0,5 mL des Quantifizierungsstandards (0,05 M 3,4,5-Trimethoxyzimtsäurelösung in Methanol) mittels HPLC-System 4 (vgl. 4.2.1) analysiert

4.3.4 *In vitro* Inkubation mit simuliertem Duodenalsaft

4.3.4.1 Studiendesign

Die Bedingungen der intestinalen Verdauung bei der humanen Verdauung von Lebensmitteln wurden durch Inkubationen mit künstlichem Duodenalsaft simuliert. Zur Herstellung von 500 mL simuliertem Duodenalsaft wurden 1,0 g Pankreatin und 6,0 g Gallenextrakt (Glycin- und Taurinkonjugate der Hyodeoxycholsäuresalzes und anderer Gallensalze) in einen 500 mL Messkolben eingewogen und in 300 mL 0,1 mM Natriumhydrogencarbonat im Ultraschallbad gelöst. Der Messkolben wurde mit 0,1 mM Natriumhydrogencarbonat aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung durch Filtration (MN 615 ¼ Faltenfilter, Ø 150 mm; Macherey-Nagel, Düren) von den unlöslichen Bestandteilen getrennt (Glahn *et al.* 1998, Kahle 2008). Das Filtrat wurde im Trockenschrank auf 37 °C erwärmt.

Die Inkubationsversuche wurden in sterilen, mittels Eindrückstopfen verschließbaren 13 mL Plastikgefäßen (100 x 16 mm PP; Sarstedt, Nümbrecht) durchgeführt. In diese wurde eine definierte Menge einer Anthocyanmischung (20 µL der Anthocyanstamm-lösung; Herstellung siehe 4.3.1.2; Zusammensetzung siehe Tabelle 7.8) sowie 4,98 mL destilliertes Wasser (Endvolumen 5 mL) vorgelegt. Die Gefäße wurden mit Stickstoff begast und für 5 Minuten ebenfalls bei 37 °C im Trockenschrank vorinkubiert. Nach Zugabe von 1,25 mL simuliertem Duodenalsaft wurde der pH-Wert jedes Inkubationsansatzes mit einigen Tropfen Salzsäure auf $7,2 \pm 0,1$ eingestellt. Anschließend wurden 1,25 mL einer Lösung aus Natriumchlorid (60 mM) und Kaliumchlorid (2,3 mM) zugegeben (Endvolumen 7,5 mL). Die Gefäße wurden fest verschlossen, kurz geschüttelt und bei 37 °C für 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 24 Stunden im Trockenschrank inkubiert. Es erfolgte eine Doppelbestimmung. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Anthocyane (Vorlage von 20 µL Dimethylsulfoxid; Blindwert) bzw. ohne simulierten Duodenalsaft (Zugabe von destilliertem Wasser mit pH $7,2 \pm 0,1$). Durch Einfrieren mit flüssigem Stickstoff wurde die Reaktion gestoppt und die Proben anschließend am Lyophilisator gefriergetrocknet.

4.3.4.2 Probenaufarbeitung und Analytik

Die Aufarbeitung der Inkubations- und Kontrollansätze, sowie deren Analytik erfolgte wie bei den Proben der Speichelinkubation (4.3.2.3). Die gefriergetrockneten Proben wurden 3-mal mit je 1,25 mL 1%iger Salzsäure in einem Methanol/DMSO Gemisch (3/1 (v/v)) extrahiert, wobei jeder Extraktionsschritt Schütteln und 10-minütiges Behandeln mit Ultraschall beinhaltet. Anschließend wurde bei 5 000 rpm (2700 x g) für 10 Minuten zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden membranfiltriert (Rotilabo-Spritzenfilter PVDF, 0,45 µm Porengröße; Roth, Karlsruhe) eingengt, auf 2 mL aufgefüllt und nach Zugabe von 0,5 mL des Quantifizierungsstandards (0,05 M 3,4,5-Trimethoxyzimtsäurelösung in Methanol) mittels HPLC-System 4 (vgl. 4.2.1) analysiert.

4.3.5 *Ex vivo* Inkubation mit Dünn- und Dickdarminhalt

4.3.5.1 Studiendesign

Die Kolo- und Ileostomabeutel wurden von vier weiblichen Probandinnen im Alter von 30 bis 39 Jahren bereitgestellt. Alle besaßen das Stoma schon seit mindestens fünf Jahren und wurden 4 Wochen vor der Studie nicht mit Antibiotika behandelt und ernährten sich 24 h vor der Studie polyphenolfrei. Die Beutelinhalte wurden mit Aerokult® (Merk, Darmstadt) anaerob angeliefert, vermischt und unter aneroben Bedingungen mit der gleichen Menge des auf den gleichen pH-Wert wie die Darmflüssigkeit eingestellten Reduktionspuffer (Phosphat-Carbonat Puffer) versetzt. Die Zusammensetzung des Puffers wurde aus der Literatur entnommen (Lebet *et al.* 1998, Kahle 2008). Die verwendeten Glasgefäße wurden zuvor für mindestens 3 Stunden bei 150°C im Trockenschrank gebacken. Die Puffer-Darminhalt-Suspension wurde von den festen Bestandteilen durch Filtration befreit. Die erhaltenen Lösungen, auch als Inokulum bezeichnet, wurden für die Inkubationen als Medium und Bakterienquelle verwendet.

Die Inkubationsversuche wurden in sterilen, mittels Eindrückstopfen verschließbaren 13 mL Plastikgefäßen (100 x 16 mm PP; Sarstedt, Nümbrecht) durchgeführt. In diese wurden 20 µL der Anthocyanstammlösung (Herstellung siehe 4.3.1.4; Zusammensetzung und Konzentrationen während der Inkubation siehe Tabelle 7.8) vorgelegt und mit auf 37 °C vorgewärmten Inokulum versetzt. Die Gefäße wurden mit Stickstoff begast und für 5 Minuten bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Die Gefäße wurden fest verschlossen, kurz geschüttelt und bei 37 °C für 0, 0,33, 0,67, 1, 2, 4, 6, 8, und 24 Stunden im Trockenschrank inkubiert. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Anthocyane (Vorlage von 20 µL Dimethylsulfoxid; Blindwert) bzw. ohne Inokulum (Zugabe von destilliertem Wasser). Durch Einfrieren mit flüssigem Stickstoff wurde die Reaktion gestoppt und die Proben anschließend gefriergetrocknet.

4.3.5.2 Probenaufarbeitung und Analytik

Die Aufarbeitung der Inkubations- und Kontrollansätze, sowie deren Analytik erfolgte wie bei den Proben der Speichelinkubation (4.3.2.3). Die gefriergetrockneten Proben wurden 3-mal mit je 1,25 mL 1%iger Salzsäure in einem Methanol/DMSO Gemisch (3/1 (v/v)) extrahiert, wobei jeder Extraktionsschritt Schütteln und 10-minütiges Behandeln mit Ultraschall beinhaltet. Anschließend wurde bei 5 000 rpm (2700 x g) für 10 Minuten zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden membranfiltriert (Rotilabo-Spritzenfilter PVDF, 0,45 µm Porengröße; Roth, Karlsruhe) eingengt, auf 2 mL aufgefüllt und nach Zugabe von 0,5 mL des Quantifizierungsstandards (0,05 M 3,4,5-Trimethoxyzimtsäurelösung in Methanol) mittels HPLC-System 4 (vgl. 4.2.1) analysiert.

4.3.6 Chemische Stabilität von Anthocyanidinen (pH 7,4)

4.3.6.1 Inkubation in anaeroben Phosphatpuffer

Für die Inkubationen wurde eine 0,1 M di-Natriumhydrogenphosphat Lösung mit Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt. Vor der Inkubation wurde das so erhaltene Puffersystem unter Rückfluss erhitzt. Hierbei wurde das System mit Argon begast. Nach 30 Minuten wurde der Rundkolben verschlossen und zum Erkalten in eine Anaerobenkammer verbracht. Nach dem Abkühlen wurde die Sauerstoffkonzentration mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode (Hansatech GB Sauerstoffelektrode; Bachhofer Laborgeräte, Reutlingen, Deutschland) auf < 1 ppm bestimmt. 10 mg Anthocyanidin (Cyanidin; Synthese siehe Kraus 2006) wurden in sterilen, mit Eindrückstopfen verschließbaren 13 mL Plastikgefäßen (100 x 16 mm PP; Sarstedt, Nümbrecht) mit wenigen Tropfen DMSO gelöst und mit 5 mL Puffer versetzt. Das verschlossene Gefäß wurde für 8 Stunden bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde den Proben je 0,5 mL konzentrierte 37%ige Salzsäure zugesetzt um sie anzusäuern und so die Reaktion abubrechen. Danach wurden die Proben zur Zwischenlagerung bei -20°C tiefgefroren.

4.3.6.2 Probenaufarbeitung und Analytik

Die angesäuerten Proben (vgl. 4.3.6.1) wurden nach dem Auftauen geschüttelt um evtl. entstandenen Niederschlag zu lösen. Danach wurden sie mittels Rotilabo-Spritzenfilter (PVDF, 0,45 µm Porengröße; Roth, Karlsruhe) membranfiltriert und mit Hilfe von HPLC-DAD-MS und HPLC-DAD-MS/MS (HPLC System 6, Injektionsvolumen 100 µL siehe 4.2.1) analysiert.

4.3.6.3 Synthese von Phloroglucinessigsäure

In Anlehnung an Mujahid Alam und Adapa (2003) wurden in einem Dreihalskolben 5 g Morpholin und 1 g 2,4,6-Trihydroxyacetophenon bei Raumtemperatur für 30 min gerührt, um das Phenol zu lösen. Danach wurde das Gemisch mit Hilfe eines Ölbadens unter Rückfluss für 7 h auf 130 °C erhitzt. Durch einen Tropftrichter wurden 10 mL 30%ige NaOH zugesetzt und die Temperatur für weitere 8 h auf 120 °C gehalten. Am Ende wurde der Reaktionsmischung beim Erkalten solange konzentrierte HCl zugesetzt, bis die Lösung leicht sauer (pH 4-5) ist. Der Versuch, das Reaktionsprodukt durch Auswaschen mit Wasser von den Polymerisierungsprodukten zu trennen, misslang. Das Reaktionsprodukt enthielt nur Spuren der zu synthetisierenden Verbindung. Diese wurden mittels HPLC-DAD-MS/MS (System 6, siehe 4.2.1) identifiziert.

4.3.7 Humane Interventionsstudie zur Kontrolle von Heidelbeeranthocyanen im Urin

4.3.7.1 Ethikantrag

Die Humanstudie wurde vom Ethikkomitee der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg genehmigt. Alle Teilnehmer wurden über die Studie aufgeklärt und haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben.

4.3.7.2 Probanden

Von vier der fünf weibliche Probanden im Alter von 23 bis 47 Jahren, die an der Studie teilnahmen wurden Urinproben abgegeben. Alle besaßen ein endständiges Ileostoma aufgrund einer Erkrankung an Morbus Crohn.

4.3.7.3 Studiendesign

Am Vortag der Studie hielten die Probanden eine polyphenol- und anthocyanfreie Diät ein. Am Studientag erschienen die Probanden nüchtern. Zu Beginn der Studie verzehrten sie 300 g zerkleinerte Wildheidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.) (Anthocyangehalt 7,8 g/kg FW; vgl. Kapitel 3.1) mit 100 g Weihenstephaner® Magermilchjogurt (0.1 % Fett) innerhalb von 15 Minuten. Vier Stunden später erhielten sie eine leichte polyphenolfreie Mahlzeit. Zur Erfassung der Metabolite, welche im Urin ohne Zugabe eines Polyphenols vorlagen, wurde dieser vor der Heidelbeeraufnahme abgegeben (Blindwert). Nach Heidelbeerverzehr urinierten die Probanden nach 0,5, 1, 2, 4, 6, und 8 Stunden. Die Proben (pH zwischen 5,2 und 6,3) wurden mit konzentrierter Salzsäure auf pH 4 bis 5 angesäuert und bis zur Aufarbeitung bei -24°C gelagert.

4.3.7.4 Probenaufarbeitung

Die ein Aliquot der aufgetauten Früchte (5 g; Anthocyangehalt 7,8 g/kg FW) wurden zunächst zerkleinert und mit 1%iger Salzsäure in Methanol/DMSO (3:1 (v/v)) solange extrahiert (zwölf mal), bis der Rückstand nicht mehr rot gefärbt war. Anschließend wurde mit Wasser auf 100 mL aufgefüllt und nach Zusatz von 100 µL des Quantifizierungsstandards (0,05 M 3,4,5-Trimethoxyzimtsäurelösung in Methanol) zu 400 µL der Extraktlösung direkt zur HPLC-Analyse HPLC System 4 (vgl. 4.2.1; Injektionsvolumen 20 µL) eingesetzt.

Die Urinproben wurden zunächst kurz im Rundkolben am Rückfluss zum Sieden erhitzt, um den durch das Gefrieren entstandenen Niederschlag zu lösen. Je nach Menge des vorhandenen Urins wurde dieser im Messkolben mit destilliertem Wasser auf 100 mL bzw. 250 mL aufgefüllt. Hiervon wurde 20% (20 mL bzw. 50 mL) entnommen, mit der doppelten Menge 0,1 M Oxalsäure versetzt und auf eine zuvor mit 1%iger Salzsäure (in MeOH) gewaschene und mit 0,1 M Oxalsäure vorkonditionierte SPE-Kartusche (vgl. 4.1.5) aufgegeben, mit 0,1 M Oxalsäure (10 mL) gewaschen und die Anthocyane anschließend mit 8 mL 1%iger HCl in Methanol extrahiert. Das Lösemittel wurde anschließend bei einer Temperatur von 35 °C schonend unter Stickstoffstrom abgeblasen. Der Rückstand wurde in 150 µL 50%igem (v/v) Methanol (in wässriger 10% (v/v) Ameisensäure) aufgenommen, durch Ultraschall in Lösung gebracht und über Spritzenfilter (Rotilabo-Spritzenfilter, PVDF, 0,22 µm Porengröße; Roth, Karlsruhe) membranfiltriert. Nach dem Versetzen mit Standard (0,05 M 3,4,5-Trimethoxyzimtsäurelösung in Methanol) im Verhältnis 4:1 wurde die Lösung zur HPLC-Analytik verwendet.

4.3.7.5 Analytik

4.3.7.5.1 Kalibriergeraden

Die aus Heidelbeeren isolierten Referenzsubstanz Malvidin-3-O-glykosid (Önin) wurden auf 0,01 mg genau eingewogen und Kalibrierlösungen der Konzentrationen 0,005 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL und 0,05 mg/mL erstellt. Diese wurden mit 20% Standard (0,05 M 3,4,5-Trimethoxyzimtsäurelösung in Methanol) versetzt und zur HPLC-Analyse mit HPLC-System 4 (siehe 4.2.1) eingesetzt. Der Quotient aus Area (Anthocyan)/Area (Standard) wird gegen die Konzentration des Anthocyan aufgetragen. Mit Hilfe von Microsoft Excel[®] wurden Geraden durch die erhaltenen Punkte gelegt und die Geradengleichung berechnet.

4.3.7.5.2 Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC-DAD (System 4, siehe 4.2.1). Für die Analyse wurden die aufgearbeiteten Proben vermessen. Die Quantifizierung erfolgte anhand der erstellten Kalibriergeraden anhand des Quotienten aus Area (Anthocyan)/Area (Standard). Da das Volumen des Urins in Abhängigkeit der Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme, der extrarenalen Flüssigkeitsabnahme wie Schweiß oder Atmung sowie in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Körpergewicht schwankt, wurde der absolute Anthocyangehalt im Urin bestimmt. Hierdurch ließ sich die prozentuale Anthocyanausscheidung als Quotient von ausgeschiedenem zu aufgenommenem Anthocyan ermitteln. Da nicht alle Anthocyane und deren Metabolite im Urin verfügbar waren, wurde sowohl der Anthocyangehalt der Heidelbeeren, als auch der in den Urinproben, als Ökinäquivalente berechnet.

4.3.8 Versuche zur Ermittlung der bindungsrelevanten Proteine im Humanblut

4.3.8.1 Fraktionierungsversuche von mit Anthocyanen versetztem Humanblut

Zu Versuchsbeginn wurden einer weiblichen, 24 Jahre alten Probandin von geschultem Fachpersonal des Universitätsklinikums Würzburg mehrere 7,5 mL S-Monovetten® (92 x 15,3 mm; Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) insgesamt 45 mL Blut entnommen; 30 mL mit wurde Monovetten entnommen, welche Citrat zur Gerinnungshemmung enthielten. Sofort nach der Blutentnahme, wurden die Proben mit einer 17,7 mM Cyaninlösung (in DMSO) versetzt. Je zwei 7,5 mL Proben mit und ohne Gerinnungshemmer wurden mit Anthocyanen (gelöst in wenigen Tropfen DMSO) versetzt, so dass sich eine Anthocyankonzentration in den Blutproben von 0,11 mM ergab. Außerdem wurden die beiden übrigen Blutproben, die Gerinnungshemmer enthielten, so mit Anthocyanen versetzt, dass sich Konzentrationen von 0,011 mM und 0,55 mM ergaben.

Je eine Probe mit und ohne Gerinnungshemmer wurde zur Bestimmung der Anthocyankonzentration sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend lyophilisiert. Die übrigen vier Proben wurden bei 3500 U/min (1900 x G) zentrifugiert, um die zellulären Bestandteile vom Plasma/Serum zu trennen. Die Zellen wurden sofort mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefrostet und gefriergetrocknet. Das Plasma wurde einer leicht abgewandelten Fraktionierung nach Cohn unterworfen (Cohn 1945). Hierbei wurden die Proteine zunächst mit einem Ethanolanteil von 8%, dann 25%, 40% und 80% gefällt. Alle Fraktionen wurden getrocknet. Der Lösung, welche 80% Alkohol enthielt, wurde zunächst schonend im Vakuum das Lösemittel entzogen, bevor diese ebenfalls lyophilisiert wurde.

Alle Lyophilisate wurden zunächst mit 0,5 mL einer 0,05 M 3,4,5-Trimethoxyzimtsäurelösung (in Methanol) versetzt und dann fünfmal mit 5 mL 0,5%iger Ameisensäure (in Methanol) extrahiert. Die Lösungen wurden vereinigt, bei 40 °C unter Stickstoffstrom abgeblasen, in 2 mL 1%iger Ameisensäure in 50%igem Methanol aufgenommen, membranfiltriert und mittels HPLC vermessen.

Zur Kontrolle wurden die gleichen Mengen Anthocyan, welche dem Blut zugesetzt wurden, auch direkt mit Standard (s.o.) versetzt und vermessen.

4.3.8.2 Fraktionierungsversuche von mit Anthocyanen versetztem Humanserum

Die leicht modifizierte Cohn Fraktionierung (Cohn 1945) wurde noch einmal mit Humanserum wiederholt. Hierfür wurde anthocyanfreies Humanserum (Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes, München) mit Cyanin in oben genannten Konzentrationen (siehe 4.3.8.1), sowie mit Delphinidin-3-O-arabinosid in den Konzentrationen 0,026 mM, 0,052 mM und 0,26 mM versetzt und analog 4.3.8.1 fraktioniert, extrahiert und vermessen.

4.3.8.3 Analytik

Die Detektion der Anthocyane erfolgte bei 520 nm, die des Standards (3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure) bei 304 nm. Das Flächenverhältnis Anthocyan/Standard der Proben, die kein Protein enthielten wurde auf 100% festgesetzt und die Verhältnisse aller anderen Proben wurden darauf bezogen.

4.3.9 Studien zur Bindung von Anthocyanen an humanem Serum Albumin

4.3.9.1 Überprüfung des Einflusses der Proteine auf die Anthocyanstabilität durch nasschemische Inkubation

4.3.9.1.1 Studiendesign

Für die Inkubationsversuche wurden zunächst zwölf selbst aus Heidelbeeren extrahierte Anthocyanstandards (siehe 4.3.1) genau abgewogen und jeweils mit DMSO so aufgefüllt, dass eine 4 mM Lösung erhalten wurde. Zu 25 µL dieser Anthocyanlösung wurden dann je 500 µL 4%ige HSA Lösung (4 g HSA in 100 g 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat und auf pH 7,4 eingestellt) gegeben, geschüttelt und für 0, 1, 2, 3, 4, und 8 Stunden im

Trockenschrank bei 37 °C inkubiert. Zum Abbruch der Inkubationszeit wurden bei einem ersten Ansatz 25 µL konzentrierte Schwefelsäure zugegeben, die die Anthocyane stabilisierte und die Proteine denaturierte. Die Proteine konnten so durch Zentrifugation abgetrennt werden und der erhaltene Überstand wurde nach Membranfiltration (Rotilabo-Spritzenfilter, PVDF, 0,22 µm Porengröße; Roth, Karlsruhe) im Verhältnis 4:1 mit einer 0,05 M 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure-Lösung in Acetonitril versetzt und mittels HPLC-DAD (HPLC System 5) analysiert. Bei einem zweiten Ansatz wurden die Proteine am Ende der Inkubation mittels Mikrofiltration (Microcon YM 10, Millipore S.A. Molsheim, Frankreich) abgetrennt, 200 µL des Filtrats mit 10 µL Schwefelsäure angesäuert und nach Zusatz des Standards zur HPLC-Analytik (s.o.) eingesetzt. Um die chemische Stabilität der Anthocyane zu ermitteln wurde der Versuch auch ohne Protein durchgeführt. Außerdem wurde Ansatz 1 mit Malvidin-3-O-glukosid noch zweimal wiederholt, wobei die Proteinlösung einmal mit Warfarin und einmal mit Ibuprofen im fünffachen molaren Überschuss 20 min vorinkubiert wurden, um die Bindungsstellen zu belegen. Sämtliche Versuche wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.3.9.1.2 Analytik

Die erhaltenen Proben wurden mittels HPLC-DAD (HPLC System 5) vermessen. Der Gehalt an Anthocyanen wurde über die Flächen bei 520 nm bestimmt, der des Standards bei 304 nm. Der Quotient aus Fläche Anthocyan und Fläche Standard der Proben bei 0 h in Puffer wurde zur bessern Vergleichbarkeit gleich 100% gesetzt. Der Gehalt an Anthocyan zu den übrigen Zeitpunkten sowie in den Proteinlösungen wurde auf den 0 h Wert im Puffer bezogen und in Prozent angegeben. Aus den in der Doppelbestimmung erhaltenen Daten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

4.3.9.2 Versuche zur Aufklärung der Bindung von Anthocyanen an HSA

4.3.9.2.1 Circular Dichroismus Spektroskopie

Eine 10 mm x 10 mm Quarzglasküvette wurde mit 2 mL 0,08%iger HSA Lösung (0,08 g HSA in 100 g 0,1 M NaH₂PO₄ Lösung, auf pH 7,4 eingestellt) gefüllt. Die Lösung wurde mittels CD-Spektrometer vermessen und dann mit 4 mM Malvidin-3-O-Galaktosid (in Phosphatpuffer) in den Verhältnissen 0,1, 0,5 und 25 ([Ligand]/[Protein]) vermessen. Das CD-Spektrum wurde im Bereich von 200 nm bis 300 nm aufgenommen. Eine Volumenänderung durch die Zugabe der Anthocyanlösung wurde bei der Auswertung berücksichtigt. Die Erhaltenen Messwerte wurden nach Umrechnung in auf die enthaltene Stoffmenge an Ligand als molares CD-Signal [mdeg] angegeben.

4.3.9.2.2 Fluoreszenz-Spektroskopie

Eine 10 mm x 10 mm Quarzglasküvette wurde mit 2 mL 0,9 μ M HSA Lösung (0,1 M Natriumdihydrogenphosphat Lösung, pH 7,4) gefüllt. Nach der Anregung bei 280 nm wurde das Spektrum im Bereich von 300 nm bis 420 nm aufgenommen. Danach wurde die Lösung mit 4 mM Anthocyanlösung (in DMSO) titriert, wobei je 10 μ L zugesetzt wurden. Nach jeder Anthocyanzugabe wurde umgerührt und danach sofort vermessen. Dieser Versuch wurde mit den Arabinosiden, Glukosiden und Galaktosiden der Anthocyanidine Cyanidin, Delphinidin, Malvidin und Petunidin durchgeführt. Für weitergehende Berechnungen von Bindungskonstante und Gibb's freier Energie wurde die Emission im Maximum bei 345 nm verwendet (Tang *et al.* 2007). Die Volumenzunahme durch die Titration wurde bei der Berechnung berücksichtigt.

4.3.9.2.3 Molecular Modelling

Die Berechnungen möglicher Bindungsstellen für Anthocyane an HSA wurden mittels AutoDock (Morris *et al.* 1998) ausgeführt. Hierfür wurde aus der Proteindatenbank (Berman *et al.* 2000) die Struktur 1HA2 entnommen, die den HSA-Warfarin-Komplex darstellt (Petitpas *et al.* 2001). Da dieser Struktur elf Seitenketten fehlen, wurden diese mittels MOLOC (MOLOC) eingefügt, und mit Hilfe von MOLOC MAB auf die entsprechende Größe angepasst (Gerber und Mueller 1995). Vor den Berechnungen wurden dann alle Wassermoleküle aus der der Datenbank entnommenen Struktur herausgenommen und polare Wasserstoffatome mit der PROTONATE Funktion des AMPER Programmes ergänzt (Case *et al.* 1999). Bei Histidinresten wurde ein Proton an ND2 angehängt. Nach Abschluß der Arbeiten an der Proteinstruktur durch Veränderungen mittels AMBER und durch die AutoDock Lösungsparameter, wurde mit Hilfe der AutoDock Empirical free energy Funktion das Affinitätsraster bestimmt, welches für die Bindungsstellenberechnung benötigt wird. Die Rasterung wurde mit dem Programm AutoGrid durchgeführt, wobei der Rasterabstand auf 0,375 Å festgelegt wurde. Um zu gewährleisten, dass der gesamte Bindungsbereich voll erfasst wird, wurde ein Ausschnitt von 22 Å x 20 Å x 22 Å festgelegt, in dessen Mitte die Warfarinbindungsstelle liegt.

Als Liganden wurden Malvidin-3-O-galactosid und Cyanidin-3-O-glucosid eingesetzt. Alle bei einem pH-Wert von 7,4 denkbaren Strukturen wurden mit Sybyl 8.0 konstruiert (Sybyl 8.0). Für Strukturen mit mehreren Steriozentren wurden alle möglichen Isomere berechnet und verwendet. Außerdem wurden die Ligandenstrukturen mittels Tripos Kraftfeld verkleinert und die Gasteiger-Marsili Ladungen festgesetzt (Clark *et al.* 1989, Gasteiger und Marsili 1980). Bei den Strukturen wurden durch Kalkulation mit AutoTors zwischen neun und 16 drehbare Bindungen definiert.

Als Suchparameter für die Bindungsstellen wurde bei AutoDock 3.0 Lamarcks Genetischer Algorithmus verwendet (Morris *et al.* 1998). Für jeden zu untersuchenden Liganden wurden 20 unabhängige Testläufe durchgeführt. Die wahrscheinlichsten Bindungsstellen sowie die Lage der Anthocyane in diesen wurden graphisch dargestellt.

4.3.10 Studien zum Nachweis von Stabilisierung der Anthocyane durch Proteininteraktionen

4.3.10.1 Versuche zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Anthocyanen mit Rinderserumalbumin

Aus einer aus Heidelbeeren extrahierten Anthocyanmischung (siehe 4.3.1) wurde eine Anthocyanstammlösung (in DMSO) mit einem Gehalt von 20 mg/mL hergestellt. Außerdem wurde eine 2%ige BSA Lösung (in 0,1 M Phosphatpuffer) sowie ein 0,1 M Phosphatpuffer auf pH 7,4 eingestellt. In sterilen, mit Eindrückstopfen verschließbaren 13 mL Plastikgefäßen (100 x 16 mm PP; Sarstedt, Nümbrecht) wurden 100 µL der Anthocyanstammlösung mit 5 mL BSA Lösung bzw. Phosphatpuffer versetzt und für 0, 1 und 3 Stunden im Trockenschrank bei 37 °C inkubiert. Der Inkubationsabbruch erfolgte durch ansäuern mit 100 µL konzentrierter Salzsäure und bei proteinhaltigen Proben eine anschließende Mikrofiltration (Microcon YM 10, Millipore S.A. Molsheim, Frankreich). Die Proben wurden dann im Verhältnis 4:1 mit einer 0,05 M 3,4,5 Trimethoxyzimtsäurelösung versetzt und mittels HPLC-DAD (HPLC System 4, siehe 4.2.1) analysiert. Die Auswertung erfolgte analog 4.3.9.1.2.

4.3.10.2 Versuche zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Anthocyanen mit humanem Hämoglobin

Aus einem Anthocyanmisch (siehe 4.3.1) wurde eine Stammlösung in DMSO hergestellt (siehe 4.3.10.1). In einem Eppendorffcap wurden dann 25 µL der Stammlösung mit 500 µL einer 3%igen Hämoglobinlösung (in 0,1 M Natriumhydrogenphosphatpuffer, pH 7,4), bzw. reinem Puffer versetzt. Anschließend wurden die Proben im Trockenschrank 37 °C für 0, 1, 2, 3, 4 und 8 Stunden inkubiert. Jeder Versuch erfolgte als Doppelbestimmung. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Proben mit 50 µL konzentrierter H₂SO₄ angesäuert, um die Anthocyane zu stabilisieren, und das Protein zu denaturieren. Danach wurde bei 14000 U/min zentrifugiert, membranfiltriert (Rotilabo-Spritzenfilter, PVDF, 0,22 µm Porengröße; Roth, Karlsruhe), im Verhältnis 4:1 mit Standard (0,05 M 3,4,5-Trimethoxyzimtsäurelösung) versetzt und mittels HPLC-DAD (System 4, vgl. 4.2.1) vermessen. Die Auswertung wurde analog 4.3.9.1.2 durchgeführt.

4.3.10.3 Versuche zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Anthocyanen mit Ovalbumin

Im lokalen Lebensmitteleinzelhandel wurden 10 Eier erworben und das Eiweiß vom Dotter getrennt. Der pH-Wert des Eiklars wurde mit 9,2 bestimmt, was darauf hindeutet, dass die Eier nicht legefrisch waren. Das Eiklar wurde im Verhältnis 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt und als Inkubationsmedium verwendet. Desweiteren wurde eine 2%ige sowie eine 4%ige Ovalbuminlösung in 0,1 M Phosphatpuffer hergestellt und auf pH 9,2 eingestellt. Als Anthocyan wurde Cyanin eingesetzt. Eine 0,6 mM Stammlösung des Anthocyan in DMSO wurde hergestellt. Von dieser wurden 25 µL mit 500 µL Inkubationsmedium (Eiklar, Proteinlösung oder Puffer) versetzt, und für 0, 1, 2, 4 und 8 Stunden bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zum Reaktionsabbruch wurden 50 µL konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt und vom denaturieren Protein abzentrifugiert. Die Lösung wurde dann (analog 4.3.10.2) mit Standard versetzt, mittels HPLC-DAD vermessen und ausgewertet.

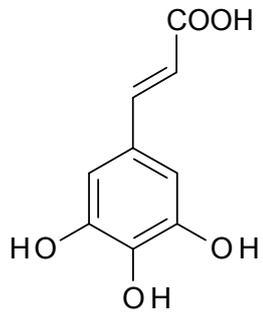
4.3.10.4 Versuche zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Anthocyanen mit Lactalbumin

Im lokalen Lebensmitteleinzelhandel wurde 1 L Milch (Optiwell frische Milch 0,1% Fett; Campina, Heilbronn) erworben. Der pH-Wert wurde mit 6,4 bestimmt. Aufgrund des niedrigen Fettgehaltes konnte diese direkt als Inkubationsmedium verwendet werden und musste nicht entfettet werden, um z.B. mittels HPLC vermessen zu werden. Des Weiteren wurde eine 2%ige sowie eine 4%ige Lactalbuminlösung in 0,1 M Phosphatpuffer hergestellt und auf einen pH-Wert von 6,4 eingestellt. Als Anthocyan wurde neben Cyanin auch Delphinidin-3-O-arabinosid eingesetzt. Von beiden Anthocyanen wurde eine 0,6 mM Stammlösung in DMSO hergestellt. Von dieser wurden 25 µL mit 500 µL Inkubationsmedium (Milch, Proteinlösung oder Puffer) versetzt, und für 0, 1, 2, 4 und 8 Stunden bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zum Reaktionsabbruch wurden 50 µL konzentrierte Schwefelsäure zugesetzt und vom denaturieren Protein abzentrifugiert. Die Lösung wurde dann (analog 4.3.10.2) mit Standard versetzt, mittels HPLC-DAD vermessen und ausgewertet.

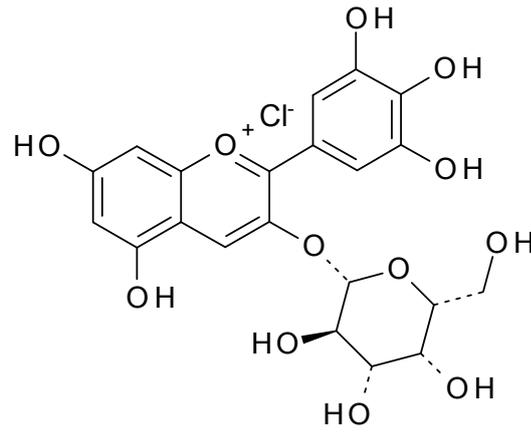
5 Strukturmatrix

Strukturformeln ausgewählter Polyphenole, chronologisch geordnet nach Nennung im Text. Chiralitätszentren sind mit * gekennzeichnet.

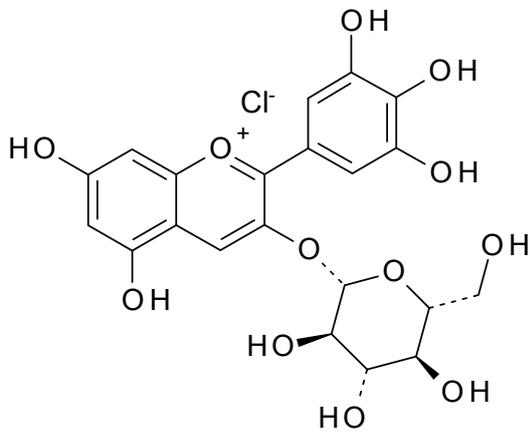
Nr.	Substanz	Nr.	Substanz
(1)	3,4,5- <i>trans</i> -Trimethoxyzimtsäure	(11c)	Ionische Anhydrobase von (11)
(2)	Delphinidin-3- <i>O</i> - β -D-galactosid	(11d)	Chalconstruktur von (11)
(3)	Delphinidin-3- <i>O</i> - β -D-glucosid	(12)	Malvidin-3- <i>O</i> - β -D-glucosid
(4)	Delphinidin-3- <i>O</i> - α -L-arabinosid	(13)	Malvidin-3- <i>O</i> - α -L-arabinosid
(5)	Cyanidin-3- <i>O</i> - β -D-galactosid	(14)	Peonidin-3- <i>O</i> - β -D-galactosid
(6)	Cyanidin-3- <i>O</i> - β -D-glucosid	(15)	Peonidin-3- <i>O</i> - β -D-glucosid
(6a)	Chromenolstruktur von (6)	(16)	Cyanidin
(6b)	Chinoide Anhydrobase von (6)	(17)	Delphinidin
(6c)	Ionische Anhydrobase von (6)	(18)	Malvidin
(6d)	Chalconstruktur von (6)	(19)	Peonidin
(7)	Cyanidin-3- <i>O</i> - α -L-arabinosid	(20)	Petunidin
(8)	Petunidin-3- <i>O</i> - β -D-galactosid	(21)	Peonidin-3- <i>O</i> - α -L-arabinosid
(9)	Petunidin-3- <i>O</i> - β -D-glucosid	(22)	Phloroglucinessigsäure
(10)	Petunidin-3- <i>O</i> - α -L-arabinosid	(23)	Protocatechursäure
(11)	Malvidin-3- <i>O</i> - β -D-galactosid	(24)	2,4,6-Trihydroxyacetophenon
(11a)	Chromenolstruktur von (11)	(25)	Cyanidin-3,7- <i>O</i> - β -D-glucosid
(11b)	Chinoide Anhydrobase von (11)		(Trivialname: Cyanin)



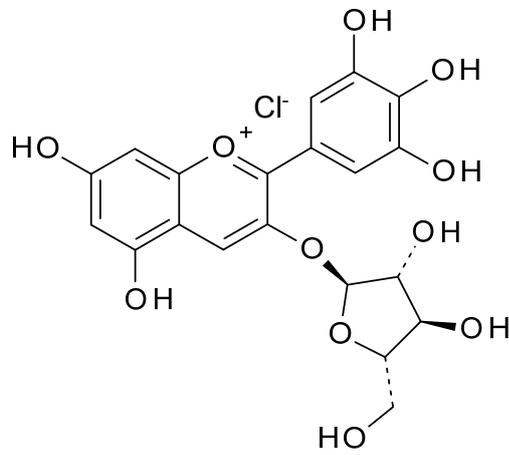
(1)



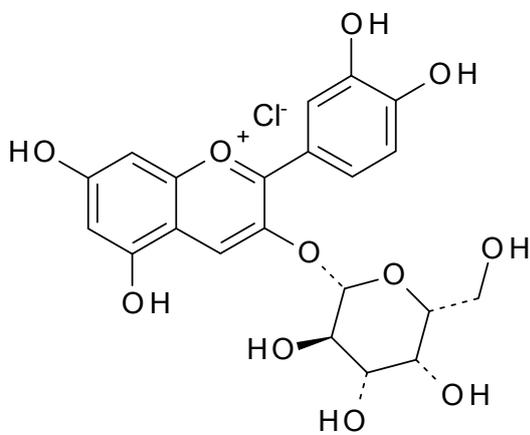
(2)



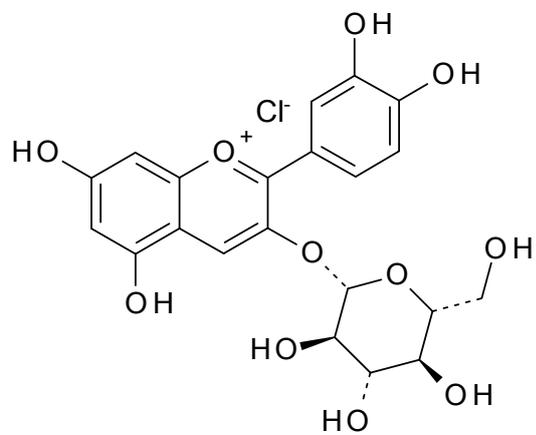
(3)



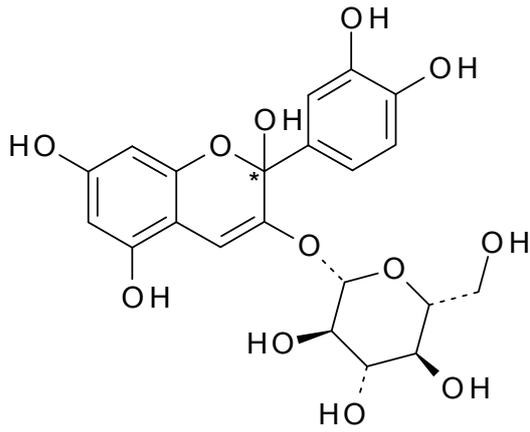
(4)



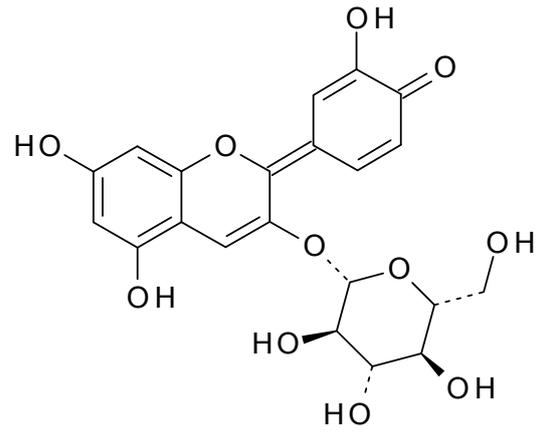
(5)



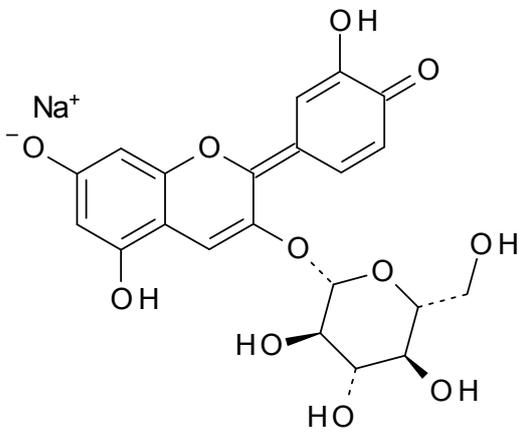
(6)



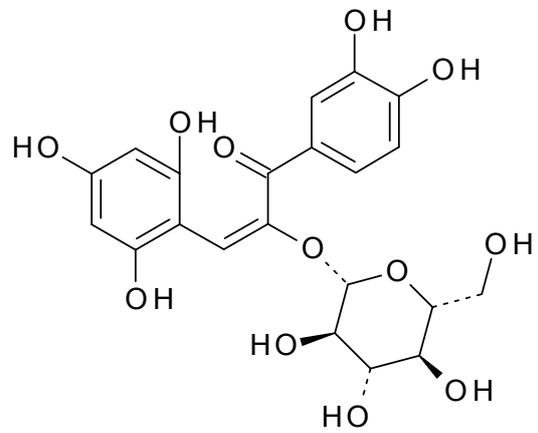
(6a)



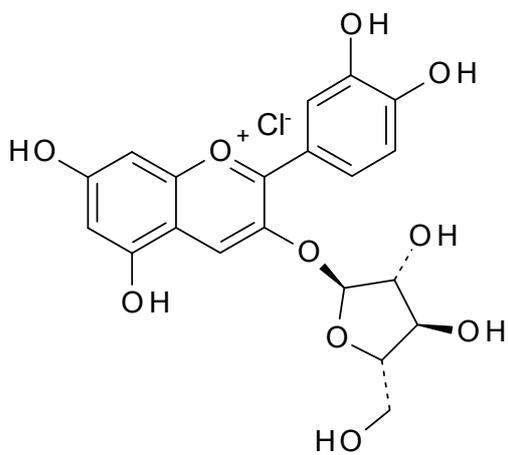
(6b)



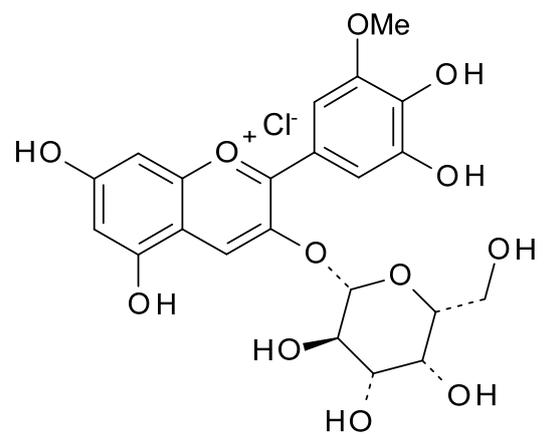
(6c)



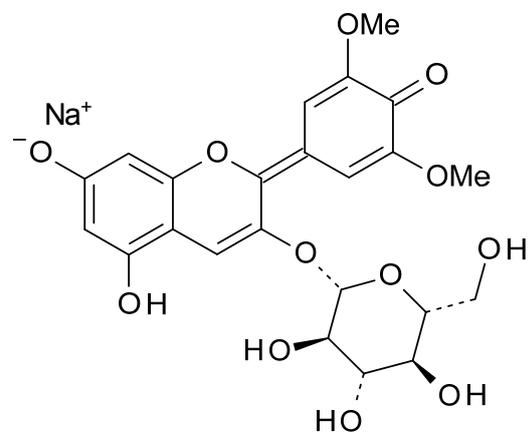
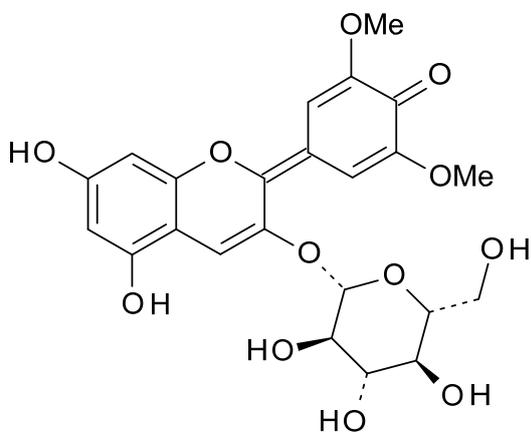
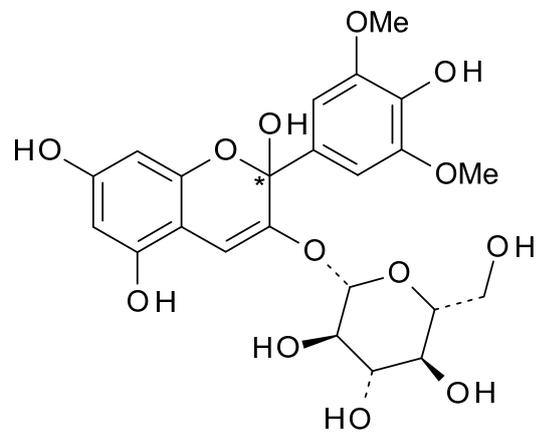
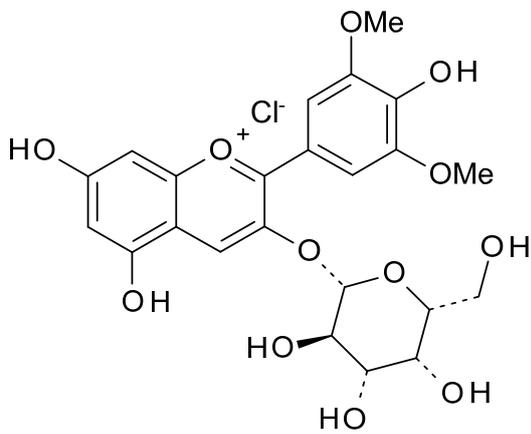
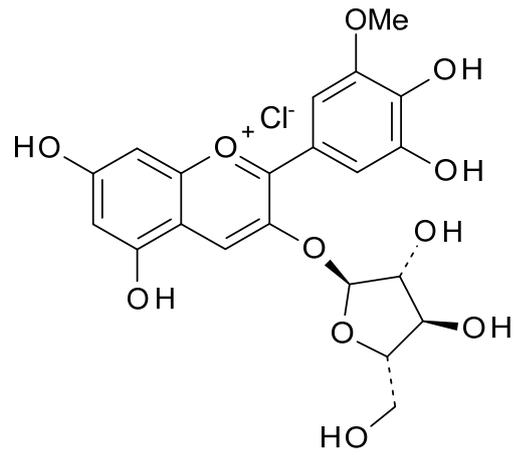
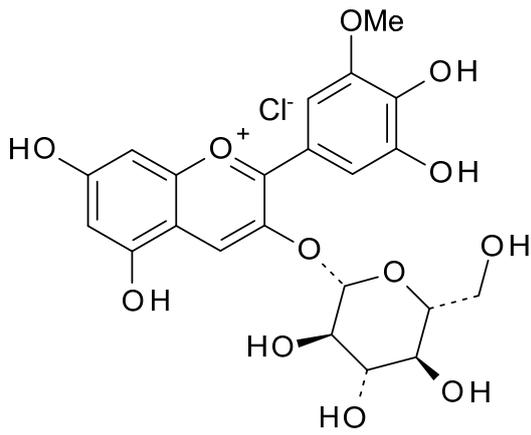
(6d)

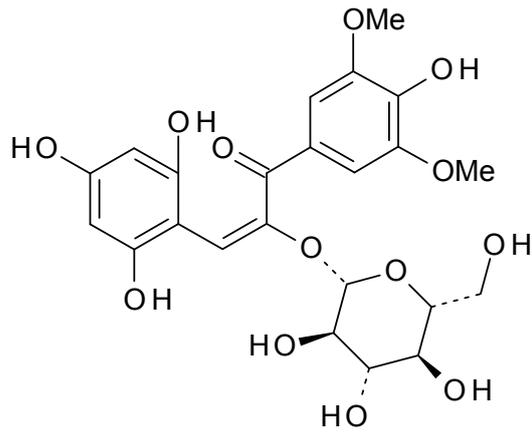


(7)

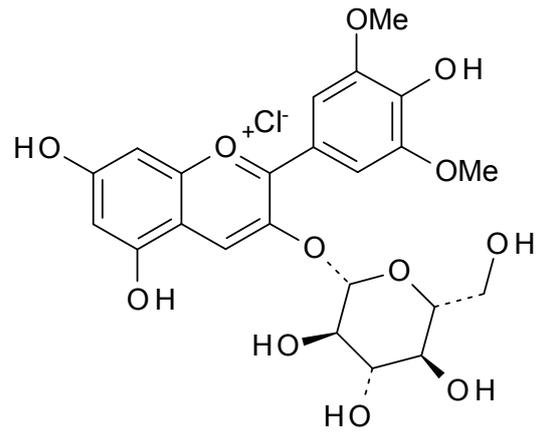


(8)

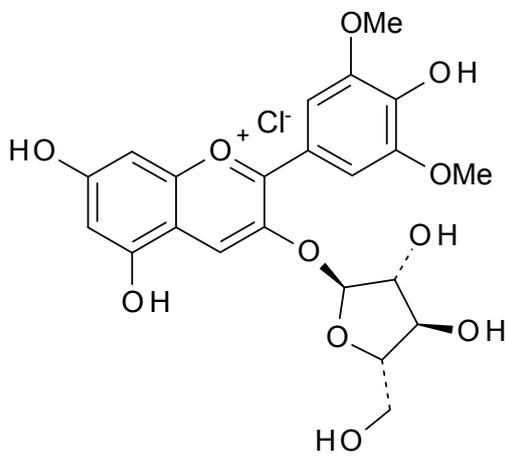




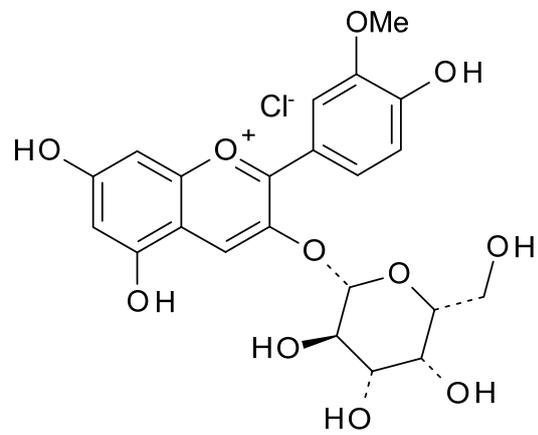
(11d)



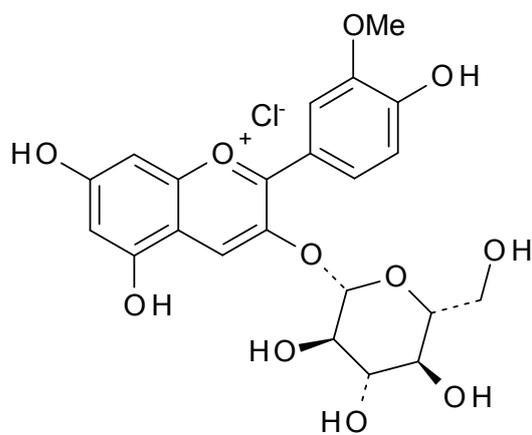
(12)



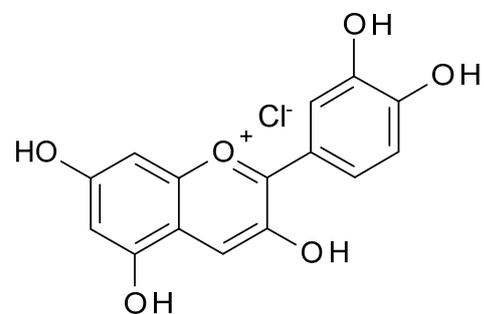
(13)



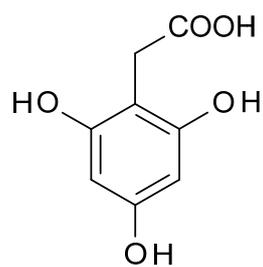
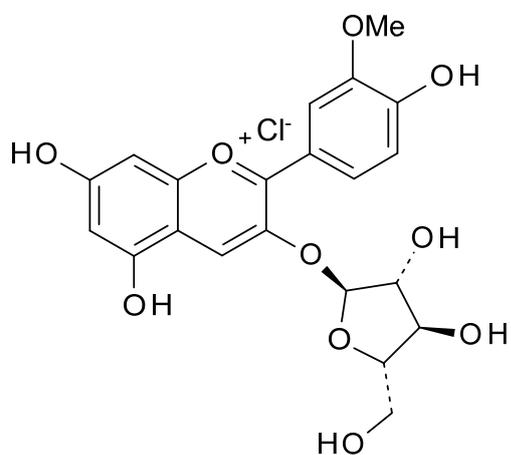
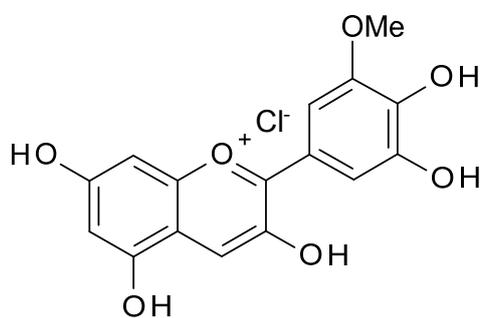
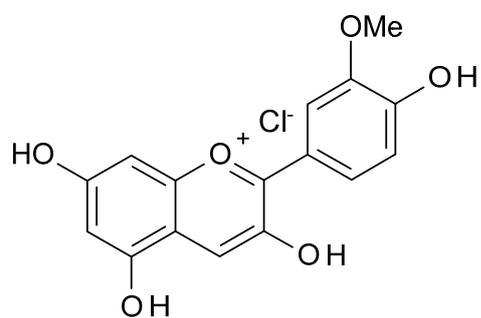
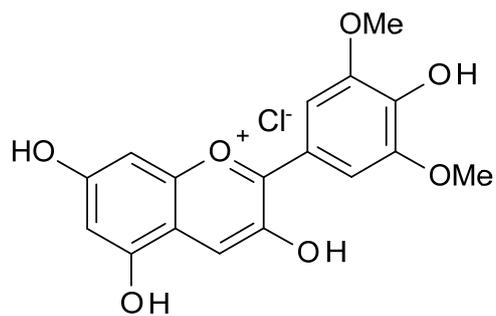
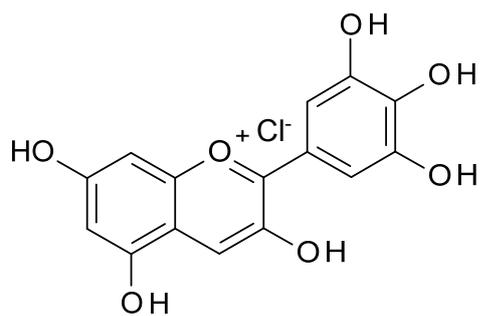
(14)

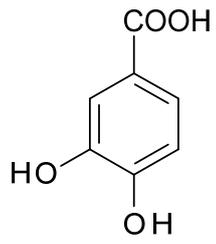


(15)

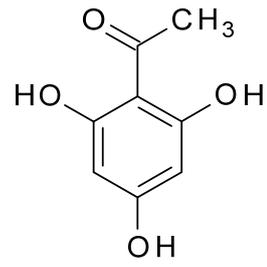


(16)

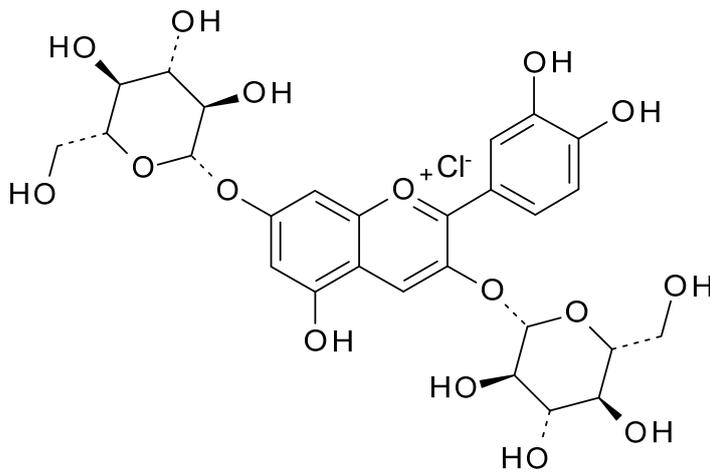




(23)



(24)



(25)

6 Literatur

- Adlercreutz, H., Epidemiology of phytoestrogens, *Baillieres Clin. Endocrinol Metab.* **1998**, *12*, 605-623
- Al-Essa, L., Niwa, M., Kohno, K., Tsurumi, K. A proposal for purification of salivary polymorphonuclear leukocytes by combination of nylon mesh filtration and density-gradient method: a validation by superoxide- and cyclic AMP-generating responses. *Life Sci.* **1994**, *55*, PL333-PL338.
- Almendingen, K., Hofstad, B., Vatn, M.H., Dietary habits and growth and recurrence of colorectal adenomas: results from a three-year endoscopic follow-up study, *Nutr. Cancer.* **2004**, *49*, 131-138.
- Andlauer, W., Kolb, J., Furst, P. Absorption and metabolism of genistin in the isolated rat small intestine. *FEBS Lett.* **2000**, *475*, 127-130.
- 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.
- Andriambelason, E., Magnier, C., Haan-Archipoff, G., Lobstein, A., Anton, R., *et al.* Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 2324-2333.
- Aruoma, O. I. Antioxidant actions of plant foods: use of oxidative DNA damage as a tool for studying antioxidant efficacy. *Free Radic. Res.* **1999**, *30*, 419-427
- Azzini, E., Viatglione, P., Intirre, F., Napolitano, A., *et. al.* Bioavailability of strawberry antioxidants in human subjects. **2010**, *21*, 1-9.
- Behl, C.; Moosmann, B. Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 182-191
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 5. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2001
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., Bourne, P. E., The protein data Bank, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 235-242.
- Bermudéz-Soto, M. J. Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chem.* **2007**, *102*, 865-874.
- Bitsch, R., Netzel, M., Sonntag, S., Strass, G., Frank, T., Bitsch, I. Urinary excretion of cyanidin glycosides in healthy humans after elderberry ingestion. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**, *5*, 343-345.
- Bode, U., Hasan, C., Hülsmann, B., Fleischhack, G. Recancostat compositum therapy does not progression in young cancer patients. *Klin. Padiatr.* **1999**, *211*, 353-355.
- Borges, G., Roowi, S., Rouanet, J.-M., Duthie, G. G., Lean, M. E. J., Crozier, A. The bioavailability of raspberry anthocyanins and ellagitannins in rats. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2007**, *51*, 714-725.

- Bors, W.; Michel, C.; Stettmaier, K. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors* **1997**, *6*, 399-402.
- Bosetti, C., Bravi, F., Talamani, R., Parpinel, M., Gnagnarella, P., *et al.* Flavonoids and prostate cancer risk: a study in Italy. *Nutr. Cancer*. **2006**, *56*, 123-127.
- Boulton, D. W., Walle, K., Walle, T. Extensive Binding of the bioflavonoid Quercetin to human plasma proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, *50*, 243-249.
- Boyer, J. L., Graf, J., Meier, P. J. Hepatic transport systems regulating pH, cell volume, and bile secretion. *Annu. Rev. Physiol.* **1992**, *54*, 415-438.
- Bub, A., Watzl, B., Heeb, D., Rechkemmer, G., Briviba, K. Malvidin-3-glucoside bio-availability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *Eur. J. Nutr.* **2001**, *40*, 113-120.
- Burns, J., Gardner, P. T., O'Neil, J., Crawford, S., Morecroft, I., *et al.* Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 220-230.
- Cao, G., Prior, R. L. Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of elderberry extract. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 474-576.
- Carter, D. C., Ho, J. X., Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem.* **1994**, *45*, 153-203.
- Case, D. A., Pearlman, D. A., Caldwell, J. W., Cheatham III, T. E., Ross, W. S., Simmerling, C. L., Darden, T. A., Merz, K. M., Stanton, R. V., Cheng, A. L., Vincent, J. J., Crowley, M., Tsui, V., Radmer, R. J., Duan, Y., Pitera, J., Massova, I., Seibel, G. L., Singh, U. C., Weiner, P. K., Kollman, P. A. AMBER 6, University of California, San Francisco, **1999**.
- Clark, M., Cramer, R. D. I., Van Opdenbosch, N., Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field, *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 928-1012.
- Clifford, M. N. Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1063-1072.
- Cohn, E. J., Fractionation of proteins from plasma. Patent No. US 2390074, Date **1945**1204.
- Coleman, J.; Wrzosek, T.; Roman, R.; Peterson, J.; McAllister, P. Setting system suitability criteria for detectability in high-performance liquid chromatography methods using signal-to noise ratio statistical tolerance intervals. *J. Chromatogr. A* **2001**, *917*, 23-27.
- Coleman, R. Bile salts and biliary lipids. *Biochem. Soc. Trans.* **1987**, *15*, 68S-80S.
- Cooke, D., Steward, W. P., Gescher, A. J., Marczylo, T. Anthocyanins from fruits and vegetables - Does bright color signal cancer chemopreventive activity? *Eur. J. Cancer.* **2005**, *41*, 1931-1940.
- Cooney, J. M., Jensen, D. J.; McGhie, T. K. LC-MS identification of anthocyanins in boysenberry extract and anthocyanin metabolites in human urine following dosing. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 237-245.

- Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C., Remesy, C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am. J. Physiol.* **1999**, *277*, 120-126.
- Dahlqvist, A., Borgström, B. Digestion and absorption of disaccharides in man. *Biochem. J.* **1961**, *81*, 411-418.
- Dangles, O., Dufour, C., Bret, S. Flavonol-serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. *J. Chem. Soc.* **1999**, *2*, 737-744.
- Daniels, L. P., Goyle, P. J., Chiao, Y. B., Glew, R.H., Labow, R.S. Purification and characterization of a cytosolic broad specificity beta-glucosidase from human liver. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 13004-12013.
- Darias-Martin, J., Martin-Luis, B., Carrillo-López, M., Lamuela-Raventós, R., Diaz-Romero, C., Boulton, R. Effect of caffeic acid on the color of red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2062-2067.
- Day, A. J., Canada, F. J., Diaz, J. C., Kroon, P. A., Mclauchlan, R., *et al.* Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* **2000**, *468*, 166-170.
- del Alamo, M., Bernal, J. L., Gómez-Cordovés, C. Behavior of monosaccharides, phenolic compounds, and color of red wines aged in used oak barrels and in the bottle. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4613-4618.
- Dragsted, L. O., Knuthsen, P., Nielsen, S. E., Strube, M. Justesen, U. Polyphenols in danish foods and their possible health effects. In *Proceedings of the Symposium on polyphenols and anthocyanins as food colorants and antioxidants*, Pfannhauser, W., Ed. 1996; pp. 35-44.
- Eisenbrand, G., Metzler, M. *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*, Wiley, VCH: Weinheim, 2005.
- Faria, A., Pestana, D., Azevedo, J., Martel, F., *et al.* Absorption of anthocyanins through intestinal epithelial cells – putative involvement of GLUT2. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 1430-1437.
- Faller, A., *Der Körper des Menschen*. 13. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 1999.
- Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Fraisse, D., Lamaison, J.-L., Remesy, C. Black-berry anthocyanins are slightly bioavailable in rats. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1249-1253.
- Ferrires, J. The French Paradox; lessons for other countries. *Heart* **2004**, *90*, 107-111
- Finkel, T., Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and biology of ageing. *Nature.* **2000**, *408*, 239-247.
- Fleischhut, J. Untersuchungen zum Metabolismus, zur Bioverfügbarkeit und zur anti-oxidativen Wirkung von Anthocyanen. Dissertation, Universität Karlsruhe, Karlsruhe, 2004.
- Fleischhut, J., Kratzer, F., Reckemmer, G., Kulling, S. E. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur. J. Nutr.* **2006**, *45*, 7-18.

- Frank, D. N., St Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., Pace, N. R. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2007**, *104*, 13780-13785
- Frank, T., Netzel, M., Strass, G., Bitsch, R., Bitsch, I. Bioavailability of anthocyanins-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. *Can. J Physiol. Pharmacol.* **2003**, *81*, 423-435.
- Franke, W., Lieberei, R., Reisdorff, C. *Nutzpflanzenkunde*, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 2007.
- Fritsch, H., Griesebach, H. Biosynthesis of cyanidin in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 2437-2442.
- Gasteiger, J., Marsili, M., Iterative partial equilization of orbital electronegativity – a rapid access to atomic charges, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3219-3228.
- Gerber P. R., Mueller K. MAB, a generally applicable molecular force field for structure modeling in medicinal chemistry, *J. Comp.-Aided Molec. Design* **1995**, *9*, 251-268.
- Gerhäuser, C. Cancer chemopreventive potential of apples, apple juice, and apple components. *Planta Med.* **2008**, *74*, 1608-1624.
- Gillatt, P. N., Palmer, R. C., Smith, P. L. R., Walters, C. L., Reed, P. I. Susceptibilities of drugs to nitrosation under simulated gastric conditions. *Food Chem. Toxic.* **1985**, *23*, 849-855.
- Gómez-Miguez, M., González-Manzano, S., Escribano-Bailón, M. T., Heredia, F. J., Santos-Buelga, C. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucosid. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 5422-5429.
- Gross, J. H. *Mass spectrometry*, Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, 2004.
- Gugeler, N., Klotz, U. *Einführung in die Pharmakokinetik*, 2. Auflage, Govi-Verlag: Eschborn, 2000.
- Häupler, R., Muer, T. *Bildatlas der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands*, 2. Auflage, Ulmer Eugen Verlag: Stuttgart, 2007.
- Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* **1996**, *16*, 33-50.
- Harborne, J. B., Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*. **2000**, *55*, 481-505.
- Hayashi, K., Mori, M., Knox, Y. M., Suzutan, T., Ogasawara, M., *et al.* Anti influenza virus activity of a red-fleshed potato anthocyanin. *Food Sci. and Technol. Res.* **2003**, *9*, 242-244.
- He, J., Giusti, M. M. Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2010**, *1*, 163-187.
- He, W., Li, Y., Xue, C., Hu, Z., Chen, X., Sheng, F. Effect of Chinese medicine alpinetin on the structure of human serum albumin. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1837-1845.
- Heinonen, M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics – a Finnish perspective. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 684-691.

- Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D., Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr. Cancer* **1993**, *20*, 21-29.
- Hesse, A., Classen, A., Knoll, M., Timmermann, F., Vahlensieck, W. Dependence of urine composition on the age and sex of healthy subjects. *Clin. Chim. Acta* **1986**, *160*, 79-86.
- Hirota, S., Nishioka, T., Shimoda, T., Miura, K., Ansai, T., Takahama, U. Quercetin glucosides are hydrolyzed to quercetin in human oral cavity to participate in peroxidase-dependent scavenging of hydrogen peroxide. *Food Sci. Technol. Res.* **2001**, *7*, 239-245.
- Hollman, P. C. H., de Vries, J. H. M., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J. B., Katan, M. B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 1276-1282.
- Hollman, P. C., Katan, M. B. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. *Free Radic. Res.* **1999**, *31*, S75-S80.
- Horn, F., Moc, I., Schneider, N., Grillhösl, C., Berghold, S., Lindenmeier, G., *Biochemie des Menschen*, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2005.
- Howell, A. B. Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2002**, *42*, 273-278.
- Huang, C.-Y., Balakrishnan, G., Spiro, T. G. Protein secondary structure from deep-UV-resonance raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.*, **2006**, *37*, 277-282.
- Hümmer, W., Schreier, P. Analysis of proanthocyanidins, *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 1381-1398.
- Ichiyanagi, 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.* **2004**, *52*, 1312-1315.
- Ichiyanagi, T., Rahman, M. M., Hatano, Y., Konishi, T., Ikeshiro, Y. Protocatechuric acid is not the major metabolite in rat blood plasma after oral administration of cyanidin 3-O- β -D-glucopyranoside. *Food Chem.* **2007**, *105*, 1032-1039.
- Jaakola, K., Määttä, K., Pirtillä, A. M., Törrönen, R., Kärenlampi, S., Hohtola, A. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 729-739.
- Jurd, L., Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments. *Adv. Food Res. Suppl.* **1972**, *4*, 123-142.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Heinonen, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4076-4082.
- Kähkönen, M. P., Heinämäki, J., Ollinainen, V., Heinonen, M. Berry anthocyanins: isolation, identification, and antioxidant activities. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 1403-1411.
- Kahle, K. Polyphenole aus Apfelsaft: Studien zur Verfügbarkeit im Humanstoffwechsel. Dissertation, Universität Würzburg, Würzburg, 2008.

- Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., Ackermann, M., Ridder, F., Richling, E. Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 418-423.
- Kaldas, M. I., Walle, U. K., van der Woude, H., McMillan, J. M., Walle, T. Covalent binding of the flavonoid quercetin to human serum albumin. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4194-4197.
- Kang, S. Y., Seeram, N. P., Nair, M. G., Bourquin, L. D. Tart Cherry Anthocyanins inhibit tumor development in Apc(Min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Lett.* **2003**, *194*, 13-19.
- Kay, C. D., Mazza, G., Holub, B. J., Wang, J. Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *Br. J. Nutr.* **2004**, *91*, 933-942.
- Kay, C. D. Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutr. Res. Rev.* **2006**, *19*, 137-146.
- Keppler, K.; Humpf, H. U. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5195-5205.
- Kermanshahi, K. R., Moatar, F., Sarami, F. S. Antimicrobial effects of anthocyanin of *Morus nigra* L. on some food poisoning bacteria. *Majallha Ulum Danishgah.* **2002**, *9* 26-37.
- Knaup, B. *In vitro*- und *ex vivo* Studien zum humanen intestinalen Metabolismus und zur Lipoxygense-hemmenden Eigenschaften ausgewählter sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe. Dissertation, Universität Würzburg, Würzburg 2008.
- Kohen, R., Nyska, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* **2002**, *6*, 620-650.
- Koli, R., Erlund, I., Jula, A., Marniemi, J., Mattila, P., Alfthan, G. Bioavailability of various polyphenols from a diet containing moderate amounts of berries. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3927-3932.
- Kondo, N., Kawashima, M. Enhancement of tolerance to oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by UV-B irradiation: possible involvement of phenolic compounds and antioxidative enzymes. *J. Plant Res.* **2000**, *113*, 311-317.
- Koolman, J., Röhm, K. H., *Taschenatlas der Biochemie*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 1998.
- Kosa, T., Maruyama, T., Otagiri, M., Species differences of serum albumin: Drug binding sites. *Pharm. Res.* **1997**, *14*, 1607-1612.
- Kowaczyk, E., Krzesinski, P., Kura, M., Szmigiel, B., Blaszczyk, J. Anthocyanins in medicine. *Pol. J. Pharmacol.* **2003**, *55*, 699-702.
- Kragh-Hansen, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumine. *Pharmacol. Rev.* **1981**, *33*, 17-53.
- Kraus, M. Synthese von ¹⁴C-markierten Anthocyanidinen und Studien zur intestinalen Verfügbarkeit von Anthocyanen aus Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.). Dissertation, Universität Würzburg, Würzburg, 2006.

- Kraus, M., Kahle, K., Ridder, F., Schantz, M., Scheppach, W., Schreier, P., Richling, E. Colonic availability of bilberry anthocyanins in humans. In: Flavor and health benefits of small berries, (M. Quian und A. Rimando, eds.) ACS Symposium Series, 2010
- Krikorian, R., Shidler, M. D., Nash, T.A., Kalt, W., *et. al.* Blueberry supplementation improves memory in older adults. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3996-4000.
- Labib, S. *Ex-vivo*-Studien zum intestinalen Metabolismus von Flavonoiden. Dissertation, Universität Würzburg, 2006.
- Lebet, V., Arrigoni, E., Amadò, 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.
- LeWitt, P. A., Taylor, D. C. Protection against Parkinson's disease progression: clinical experience. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 210-225.
- Li, D., Zhu, J., Jin, J., Yao, X. Studies on the binding of nevodensin to human serum albumin by molecular spectroscopy and modelling, *J. Mol. Struct.* **2007**, *40*, 846, 34-41.
- Löffler, G.; Petrides, P. E., *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 1998.
- Mahler, J. R.; Chauncey, H. H. Lipolytic and estrolytic activity of saliva and salivary organisms. *J. Dent. Res.* **1957**, *36*, 338-342.
- Maiti, T. K., Ghosh, K. S., Dasgupta, S. Interactions of (-) Epigallocatechin-3-gallate with human serum albumin: fluorescence, fourier transform infrared, circular dichroism, and docking studies. *Proteins*, **2006**, *64*, 355-362.
- Manach, C., Donovan, J. L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic. Res.* **2004**, *38*, 771-785.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727-747.
- 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.
- Matsumoto, H., Ito, K., Yonekura, K., Tsuda, T., Ichiyanagi, T., Hirayama, M., Konishi, T. Enhanced absorption of anthocyanins after oral administration of phytic acid in rats and humans. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2489-2496.
- Matuschek, M. C., Hendriks, W. H., McGhie, T. K., Reynolds, G. W. The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. *J. Nutr. Biochem.* **2006**, *17*, 31-36.
- Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T., Holub, B. J. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7731-7737.
- Mazza, G. J. Anthocyanins and heart health. *Ann. Ist. Super. Santita.* **2007**, *43*, 369-374.
- McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., Stewart, D. Anthocyanins from red cabbage – stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochem.* **2007**, *68*, 1285-1294.

- McGhie, T. K., Walton, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 702-713.
- Milbury, P. E., Cao, G., Prior, R. L., Blumberg, J. Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mech. Ageing Dev.* **2002**, *123*, 997-1006.
- Miller, L. J. Gallbladder and biliary secretion. *Encyclopedia of Endocrine Diseases* **2004**, *2*, 94-96.
- Mitsuoka, T., Ohno, K. Die Faekalflora bei Menschen. V. Mitteilung: Die Schwankungen in der Zusammensetzung der Faekalflora gesunder Erwachsener. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A.* **1977**, *238*, 228-236.
- MOLOC, Molecular Design Software, Gerber Molecular Design. <http://www.moloc.ch> .
- Moore, J. G., Christian, P. E., Coleman, R. E. Gastric emptying of varying meal weight and composition in man. *Dig. Dis. Sci.* **1981**, *26*, 16-22.
- Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K., Olson, A. J., Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function, *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639-1662.
- Mülleder, U., Murkovic, M., Pfannhauser, W. Urinary excretion of cyanidin glycosides; *J Biochem. Biophys. Methods.* **2002**, *53*, 61-66.
- Mujahid Alam, M., Adapa, S. R. A facile synthesis of phenylacetic acids via willgerodt-kindler reaction under PTC condition, *Synthetic Comm.* **2003**, *33*, 59-63
- Mulabagal, V., Lang, G. A., DeWitt, D. L., Dalavoy, S. S., Nair, M. G. Anthocyanin content, lipid peroxidation and enzyme inhibitory activities of sweet and sour cherries. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1239-1246.
- Mullen, W., Edwards, C. A., Serafini, M., Crozier, A. Bioavailability of pelargonidin-3-O-glucoside and its metabolites in humans following the ingestion of strawberries with and without cream. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 713-719.
- Nishioka, H., Nishi, K., Kyokane, K. Human saliva inactivates mutagenicity of carcinogens. *Mutat. Res.* **1981**, *85*, 323-333.
- Nizamutdinova, I. T., Jin, Y. C., Chung, J. I., Shin, S. C., Lee, S. J., Seo, H. G., Lee, J. H., Chang, K. C., Kim, H. J. The anti-diabetic effect of anthocyanins in streptozotocin-induced diabetic rats through glucose transporter 4 regulation and prevention of insulin resistance and pancreatic apoptosis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 1419-1429.
- N'soukpoé-Kossi, C. N., St-Louis, C., Beauregard, M., Subirade, M., Carpentier, R., Hotchandani, S., Tajmir-Riahi, H. A. Resveratrol binding to human serum albumin. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2006**, *24*, 277-283.
- Nurmi, T., Mursu, J., Heinonen, M., Nurmi, A., Hiltunen, R., Voutilainen, S. Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 2274-2281.
- Ogawa, K., Sakakibara, H., Iwata, R., Ishii, T., Sato, T. Anthocyanin composition and anti-oxidant activity of the Crowberry (*Empetrum nigrum*) and other berries. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4457-4462.

- 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.
- Pérez-Vicente, A., Gil-Izquierdo, A., García-Viguera, C. In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 2308-2312.
- Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Twine, S., East, M., Curry, S., Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 22804-22809.
- Pietta, P. G., Gardana, C., Mauri, P. L. Identification of ginkgo biloba flavonol metabolites after oral administration to humans. *J. Chromatogr. B* **1997**, 693, 249-255.
- Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63, 1035-1042.
- Piskula, M. K., Terao, J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.* **1998**, 128, 1172-1178.
- Prior, R. L., Wu, X. Anthocyanins: structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radic. Res.* **2006**, 40, 1014-1028.
- Rawel, H. M., Frey, S. K., Meidner, K., Kroll, J., Schweigert, F. G., Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching the intrinsic tryptophan fluorescence. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, 50, 705-713.
- Rehner, G., Daniel, H. *Biochemie der Ernährung*. 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, 2002.
- Rehse, K., Rothe, M., Kinawi, A. Eiweißbindung von Warfarin. *Arch. Pharm.* **1981**, 314, 1046-1052.
- Rossi, M., Garavello, W., Talamo, R., Negri, E., Bosetti, C., et al. Flavonoids and the risk of oral and pharyngeal cancer: a case-control study from Italy. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2007**, 16, 1621-1625.
- Rupprecht, H. D. Differential diagnostics of proteinuria. *MMW Fortschr. Med.* **2004**, 146, 41-45.
- Saito, K., Kobayashi, M., Gong, Z., Tanaka, Y., Yamazaki, M. Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens*. *Plant J.* **1999**, 17, 181-189.
- Satué-Gracia, M., Heinonen, M., Frankel, E. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3362-3367.
- Scalbert, A., Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, 130, 2073S-2085S.

- Scalbert, A., Johnson, I. T., Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005a**, *81*, 215S-217S.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical review. *Food Sci. Nutr.* **2005b**, *45*, 287-306.
- Schmidt, B. M., Howell, A. B., McEniry, B., Knight, C. T., Seigler, D., Erdmann, J. W., Lila, M. A. Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6433-6442.
- Schmidt, R. F., Lang, F., Thews, G. *Physiologie des Menschen*, 29. Auflage, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York, 2005.
- Schuster, B., Rétey, J. The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8433-8437.
- Schwegler, J. S. *Der Mensch - Anatomie und Physiologie*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 1998.
- Sellappan, S., Akoh, C. C., Krewer, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2432-2438.
- Serdula, M. K., Byers, T., Mokdad, A. H., Simoes, E., Mendlein, J. M., Coates, R. J. The association between fruit and vegetable intake and chronic disease risk factors. *Epidemiology* **1996**, *7*, 161-165.
- Setchell, K., Brown, N., Zimmer-Nechemias, L., Brashear, W. T., Wolfe, B. E., Kirschner, A. S., Heubi, J. E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides metabolism for bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 447-453.
- Shih, P. H., Yeh, C. T., Yen, G. C. Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress induced apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9427-9435.
- Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* **1991**, *91*, 31S-38S.
- Silberberg, M., Morand, C., Mathevon, T., Besson, C., Manach, C., Scalbert, A., Rémésy, C. The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *Eur. J. Nutr.* **2006**, *45*, 88-96.
- Silbernagl, S., Despopoulos, A. *Taschenatlas der Physiologie*, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 2003.
- Simini, B. Serge Renaud: from French Paradox to cretan miracle. *Lancet* **2000**, *355*, 48.
- Singh, U. C., Weiner, P. K., Kollman, P. A. AMBER 6, University of California, San Francisco, **1999**.
- Soares, S., Mateus, N., De Freitas, V. Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary α -amylase (HSA) by fluorescence quenching. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 6726-6735.

- Sobota, A. E. Inhibition of bacterial adherence by cranberry juice: potential use for the treatment of urinary tract infections. *J. Urol.* **1984**, *131*, 1013-1016.
- Sonnenborn, U., Greinwald, R. *Beziehungen zwischen Wirtsorganismus und Darmflora*, Schattauer: Stuttgart, New York, 1991.
- Souci, S. W., Fachmann, W., Kraut, H. Der kleine Souci/Fachmann/Kraut. Lebensmittel-tabelle für die Praxis, 3. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 2004.
- Spencer, J. P. E., Chaudry, F., Pannala, A. S., Srail, S. K., Debnam, E., Rice-Evans, C. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *272*, 236-241.
- Spencer, J. P. E., Schroeter, H., Rechner, A., Rice-Evans, C. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antiox. Redox Signal.* **2001**, *3*, 1023-1040.
- Spencer, J. P. E. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 3255S-3261S.
- Stahl, W., van den Berg, H., Arthur, J., Bast, A., *et al.* Bioavailability and metabolism. *Mol. Aspects Med.* **2002**, *23*, 39-100.
- Steinmetz, K. A., Potter, J. D. Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control* **1991**, *2*, 325-357.
- Steinmetz, K. A., Potter, J. D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* **1996**, *10*, 1027-1039.
- Stoner, G. D., Wang, L. S., Chen, T. Chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *224*, 337-349.
- Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* **1999**, *12*, 439-446.
- Sun, B., Santos, C. P., Leandro, M. C., De Freitas, V., Spranger, M. I. High-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of new products formed by the reaction between flavanols and malvidin 3-glucoside in the presence of acetaldehyde. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 2227-2236.
- Sun, B., Fernandes, T. A., Spranger, M. I. A new class of anthocyanin-procyanin condensation products detected in red wine by electrospray ionisation multi-stage mass spectrometry analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24*, 254-260.
- Sybyl 8.0, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144 USA.
- 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.

- Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J. L., Rémésy, C. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3902-3908.
- Tang, J., Luan F., Chen X. Binding analysis of glycyrrhetic acid to human serum albumine: fluorescence spectroscopy, FTIR, and molecular modelling. *Bioorg. Medic. Chem.* **2006**, *14*, 3210-3217.
- Tang, J., Lian, N., Chenglu, B., Li, W. Analysis of eupatilin-human serum albumin interactions by means of spectroscopic and computational modelling. *J. Pharm Pharmacol.* **2007**, *59*, 637-643.
- Tarozzi, A., Morroni, F., Hrelia, S., Angeloni, C., Marchesi, A., *et al.* Neuroprotective effects of anthocyanins and their in vivo metabolites in SH-SY5Y cells. *Neurosci. Letters.* **2007**, *424*, 36-40.
- Tilgmann, C., Ulmanen, I. Purification methods of mammalian catechol-O-methyltransferases. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **1996**, *684*, 147-161.
- Timberlake, C. F. Anthocyanins-occurrence, extraction and chemistry. *Food Chem.* **1980**, *5*, 69-80.
- Tirupula, K. C., Balem, F., Yanamala, N., Klein-Seetharaman, J. pH-dependent interactions of rhodopsin with cyanidin-3-glucoside. 2 functional aspects. *Phytochem. Phytobiol.* **2009**, *85*, 463-470.
- Thomasset, S., Teller, N., Cai, H., Marko, D., Berry, D. P., Steward, W.P., Gescher, A.J. Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs? *Cancer Chemother Pharmacol.* **2009**, *64*, 201-211.
- Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., Osawa, T. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L., *Biochem Pharmacol.* **1996**, *52*, 1033-1039.
- Umesaki, Y.; Setoyama, H. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes Infect.* **2000**, *2*, 1343-1351.
- Uzunović, A., Vranić, E. Stability of anthocyanins from commercial black currant juice under simulated gastrointestinal digestion. *Bosn J Basic Med Sci.* **2008**, *8*, 254-258.
- Vay, L. W., Go, M. D., Eugene, P., Dianagno, M. D. *The pancreas – biology, pathophysiology and disease*, 2. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, 1993.
- Viljanen, K., Kivikari, R., Heinonen, M. Protein-lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1104-1111.
- Viljanen, K., Kyllili, P., Hubbermann, E.-M., Schwarz, K., Heinonen, M. Anthocyanin antioxidant activity and partition behavior in whey protein emulsion. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2022-2027.
- Viljanen, K., Protein oxidation and protein-lipid interactions in different food models in the presence of berry phenolics. Helsinki, Yliopistopaino, 2005.

- Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A., Scalfi, L., Fogliano, V. Protocatechuric acid is the major human metabolite of cyaniding glucosides. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 2043-2048.
- Walle, T., Brownig, A. M., Steed, L. L., Reed, S. G., Walle, U. K. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 48-52.
- Wang, Q.; Ris, H. B.; Altermatt, H. J.; Reynolds, B.; Stewart, J. C. M.; Bonnet, R.; Lim, C. K. Determination of 5,10,15,20-tetra-(m-hydroxyphenyl) chlorin in tissues by high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **1993**, *7*, 155-157.
- Wang, H., Coa, G., Prior, R. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins, *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 304-309.
- Wang, L. S., Sardo, C., Rocha, C. M., McIntyre, C. M., Frankel, M., *et al.* Effect of freeze-dried black raspberries on human colorectal cancer lesions. AACR Special Conference in Cancer Research. 2007.
- Wang, L., Stoner, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.* **2008**, *269*, 281-290.
- Watzl, B., Leitzmann, C. *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*, 2. Auflage, Hippokrates Verlag GmbH: Stuttgart, 1999.
- Wiese, S., Gärtner, S., Rawel, H. M., Winterhalter, P., Kulling, S. E. Protein interactions with cyanidin-3-glucoside and its influence on α -amylase activity. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 33-40.
- Williams, C. A.; Grayer, R. J. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 539-573.
- Williamson, G.; Day, A. J.; Plumb, G. W.; Couteau, D. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 16-22.
- Wikimedia commons. *This image has been released into the public domain by its author.*
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d8/Serum_Albumin_@RasMol.png,
abgerufen am 23.09.2010
- Wolin, M. J., Miller, T. L. *Carbohydrate fermentation*. In *Human intestinal microflora in health and disease*. Hentges, D. J. (Ed.) Academic Press Inc., New York, 1983.
- Woodward, G., Kroon, P., Cassidy, A., Kay, C, Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5271-5278.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R. L. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4069-4075.
- Wu, X., Cao, G., Prior, R. L. Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1865-1871.
- Yamada, K., Shoji, K., Mori, M., Ueyama, T., Matsuo, N., Oka, S., *et al.* Structure –activity relationship of polyphenols on inhibition of chimica mediator release from rat peritoneal exudate cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **1999**, *35*, 169-174.

- Yamamoto, M.; Saeki, K.; Utsumi, K. Isolation of human salivary polymorphonuclear leukocytes and their stimulation-coupled responses. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, *289*, 76-82.
- Yamasaki, K., Maruyama, T., Yoshimoto, K., Tsutsumi, Y., Narazaki, R., Fukuhara, A., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M., Interactive binding to the two principal ligand binding sites of human serum albumin: effect of the neutral-to-base transition. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1432*, 313-323.
- Yang, C. S.; Lee, M. J.; Chen, L. Human salivary tea catechin levels and catechin esterase activities: implication in human cancer prevention studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1999**, *8*, 83-89.
- Youdim, K. A., Dobbie, M. S., Kuhnle, G., Proteggente, A. R., Abbott, N. J., *et al.* Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: *in vitro* studies. *J. Neurochem.* **2003**, *85*, 180-192.
- Zhang, Y., Vareed, S. K., Nair, M. G. Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruit and vegetables, *Life Sci.* **2005**, *76*, 1465-1472.
- Zhang, Y., Du, H., Tang, Y., Xu, G., Yan, W. Spectroscopic investigation on the interaction of J-aggregate with human serum albumin. *Biophys. Chem.*, **2007**, *128*, 197-203
- Zlotos, G., Oehlmann, M., Nickel, P., Holzgrabe, U., Determination of protein binding of gyrase inhibitors by means of continuous ultrafiltration. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *18*, 847-858.
- Zsila, F., Bikádi, Z., Simonyi, M., Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 447-456.

7 Anhang

Tabelle 7.1: Anthocyangehalte [%] und Abbauraten [$\Delta\%/min$] nach Inkubation über 3600 s mit verdünntem zentrifugiertem Speichel

	0 s	30 s	60 s	120 s	300 s	3600 s	$\Delta\%/min^*$
Dp-3-O-gal	81,9 \pm 1,0	76,5 \pm 0,5	70,1 \pm 4,9	71,2 \pm 2,4	65,0 \pm 6,8	33,1 \pm 2,5	0,81
Dp-3-O-glc	82,5 \pm 0,1	77,4 \pm 0,7	66,3 \pm 7,2	74,9 \pm 0,1	64,4 \pm 4,8	33,7 \pm 5,1	0,81
Dp-3-O-ara	77,7 \pm 0,4	68,2 \pm 0,8	61,0 \pm 4,7	69,7 \pm 6,6	69,6 \pm 2,9	32,5 \pm 1,3	0,75
Cy-3-O-gal	97,6 \pm 0,9	96,0 \pm 1,7	89,9 \pm 0,4	85,8 \pm 4,0	76,6 \pm 6,9	80,0 \pm 4,7	0,29
Cy-3-O-glc	106,7 \pm 1,2	92,0 \pm 0,6	101,9 \pm 1,6	106,6 \pm 0,4	95,8 \pm 3,9	98,9 \pm 3,2	0,13
Cy-3-O-ara	105,6 \pm 5,5	93,5 \pm 0,3	90,4 \pm 4,0	98,3 \pm 0,3	94,7 \pm 1,4	96,3 \pm 0,5	0,16
Pt-3-O-gal	108,6 \pm 2,5	73,5 \pm 0,3	88,2 \pm 2,7	100,3 \pm 1,6	92,2 \pm 2,7	90,7 \pm 2,8	0,30
Pt-3-O-glc	98,4 \pm 6,2	95,3 \pm 1,8	86,9 \pm 3,2	95,3 \pm 3,6	91,7 \pm 2,7	73,3 \pm 2,7	0,42
Pt-3-O-ara	99,2 \pm 0,7	86,4 \pm 4,3	92,9 \pm 1,8	101,1 \pm 0,1	96,3 \pm 1,4	83,7 \pm 1,1	0,26
Mv-3-O-gal	101,4 \pm 0,1	107,5 \pm 2,4	98,6 \pm 0,3	98,4 \pm 0,6	90,8 \pm 1,3	96,8 \pm 0,9	0,08
Mv-3-O-glc	102,1 \pm 0,6	101,8 \pm 0,8	99,3 \pm 0,5	99,0 \pm 1,4	91,5 \pm 2,0	92,9 \pm 1,4	0,15
Mv-3-O-ara	96,5 \pm 0,0	97,3 \pm 0,4	96,3 \pm 0,4	92,6 \pm 1,2	82,6 \pm 0,6	86,2 \pm 0,2	0,17

*ermittelt über die gesamte Inkubationsdauer

Tabelle 7.2: Anthocyangehalte [%]und Abbauraten [$\Delta\%/min$] nach Inkubation über 3600 s mit verdünntem Speichel

	0 s	30 s	60 s	120 s	300 s	3600 s	$\Delta\%/min^*$
Dp-3-O-gal	66,7 \pm 1,9	59,5 \pm 4,7	57,3 33,1	\pm 2,5 \pm 0,8	56,3 \pm 3,6	60,5 \pm 4,8	0,10
Dp-3-O-glc	64,6 \pm 2,8	53,7 \pm 2,8	56,3 33,7	\pm 5,1 \pm 2,3	56,8 \pm 6,1	48,6 \pm 6,8	0,27
Dp-3-O-ara	64,9 \pm 3,9	48,7 \pm 0,4	57,8 32,5	\pm 1,3 \pm 0,4	59,1 \pm 1,4	61,7 \pm 8,2	0,05
Cy-3-O-gal	84,0 \pm 5,4	81,3 \pm 4,9	82,2 80,0	\pm 4,7 \pm 3,7	70,6 \pm 4,2	74,7 \pm 7,9	0,16
Cy-3-O-glc	101,7 \pm 0,2	91,1 \pm 7,6	98,4 98,9	\pm 3,2 \pm 0,9	92,9 \pm 4,1	92,2 \pm 8,7	0,16
Cy-3-O-ara	102,2 \pm 2,4	87,0 \pm 5,7	95,9 96,3	\pm 0,5 \pm 0,9	82,4 \pm 0,4	86,8 \pm 5,1	0,27
Pt-3-O-gal	85,7 \pm 4,2	78,9 \pm 4,2	90,1 90,7	\pm 2,8 \pm 0,3	86,8 \pm 9,1	79,5 \pm 5,2	0,10
Pt-3-O-glc	95,5 \pm 5,4	75,4 \pm 6,2	89,7 73,3	\pm 2,7 \pm 1,6	79,0 \pm 7,2	78,8 \pm 7,6	0,28
Pt-3-O-ara	97,1 \pm 0,2	83,3 \pm 2,4	94,7 83,7	\pm 1,1 \pm 0,3	80,2 \pm 8,1	78,8 \pm 3,0	0,31
Mv-3-O-gal	98,7 \pm 0,8	87,9 \pm 4,4	97,7 96,8	\pm 0,9 \pm 1,1	87,9 \pm 2,0	90,4 \pm 4,8	0,14
Mv-3-O-glc	98,8 \pm 2,2	85,3 \pm 7,0	98,2 92,9	\pm 1,4 \pm 1,3	88,1 \pm 2,8	92,7 \pm 8,5	0,10
Mv-3-O-ara	93,6 \pm 0,8	78,9 \pm 1,1	90,5 86,2	\pm 0,2 \pm 0,5	82,6 \pm 0,0	80,3 \pm 1,7	0,22

*ermittelt über die gesamte Inkubationsdauer

Tabelle 7.3: Anthocyangehalte [%]und Abbauraten [$\Delta\%/min$] nach Inkubation über 3600 s mit verdünntem Speichel nach Zusatz von Antibiotikum

	0 s	30 s	60 s	120 s	300 s	3600 s	$\Delta\%/min^*$
Dp-3-O-gal	57,1 \pm 2,0	55,5 \pm 2,8	53,7 \pm 2,5	58,4 \pm 3,3	52,7 \pm 3,5	54,6 \pm 2,4	0,04
Dp-3-O-glc	52,9 \pm 2,8	52,2 \pm 1,7	47,9 \pm 8,7	52,4 \pm 4,2	47,9 \pm 4,1	50,3 \pm 3,6	0,04
Dp-3-O-ara	48,5 \pm 1,0	47,7 \pm 1,2	45,1 \pm 5,0	51,8 \pm 1,7	45,0 \pm 4,6	47,5 \pm 1,8	0,02
Cy-3-O-gal	54,9 \pm 0,5	54,6 \pm 1,7	49,5 \pm 8,0	53,0 \pm 2,5	47,1 \pm 2,4	51,1 \pm 0,0	0,06
Cy-3-O-glc	68,1 \pm 1,4	66,5 \pm 1,3	59,4 \pm 7,7	66,1 \pm 2,5	56,7 \pm 2,1	65,2 \pm 2,0	0,05
Cy-3-O-ara	66,6 \pm 0,7	66,4 \pm 2,3	56,5 \pm 5,7	59,9 \pm 3,1	54,5 \pm 0,8	62,4 \pm 0,6	0,07
Pt-3-O-gal	55,5 \pm 1,5	55,2 \pm 2,5	50,4 \pm 2,2	68,4 \pm 1,0	56,7 \pm 1,4	57,3 \pm 3,3	0,00
Pt-3-O-glc	49,2 \pm 1,3	46,1 \pm 2,1	44,0 \pm 3,3	49,2 \pm 1,8	41,4 \pm 3,5	47,9 \pm 2,3	0,02
Pt-3-O-ara	49,3 \pm 0,7	45,0 \pm 1,6	44,6 \pm 0,7	50,1 \pm 0,8	45,5 \pm 1,3	50,1 \pm 0,7	0,00
Mv-3-O-gal	53,2 \pm 0,6	51,4 \pm 0,1	46,5 \pm 5,7	49,8 \pm 0,9	42,7 \pm 1,8	53,1 \pm 1,7	0,00
Mv-3-O-glc	44,1 \pm 1,4	42,8 \pm 0,5	38,3 \pm 6,9	41,6 \pm 2,1	35,6 \pm 2,3	44,3 \pm 1,6	0,00
Mv-3-O-ara	44,5 \pm 0,6	40,7 \pm 0,4	37,2 \pm 1,0	42,8 \pm 0,5	37,6 \pm 0,5	45,8 \pm 0,5	0,00

*ermittelt über die gesamte Inkubationsdauer

Tabelle 7.4: Anthocyangehalte [%] und Abbauraten [$\Delta\%/min$] nach Inkubation über 240 min mit Magensaftsimulans (pH 1,81)

	0 min*	20 min	40 min	60 min	90 min	120 min	240 min	$\Delta\%/min^{**}$
Dp-3-O-gal	100,0 \pm 6,8	104,1 \pm 6,1	99,8 \pm 0,4	101,7 \pm 2,5	93,2 \pm 1,1	95,7 \pm 4,8	93,3 \pm 0,9	0,03
Dp-3-O-glc	100,0 \pm 6,4	104,8 \pm 6,5	100,2 \pm 0,0	101,3 \pm 1,9	92,1 \pm 0,3	95,9 \pm 5,4	94,5 \pm 0,8	0,02
Dp-3-O-ara	100,0 \pm 6,3	105,0 \pm 6,5	100,2 \pm 0,1	101,6 \pm 1,8	92,5 \pm 0,3	96,2 \pm 5,2	94,8 \pm 1,1	0,02
Cy-3-O-gal	100,0 \pm 6,0	105,0 \pm 6,1	100,2 \pm 0,7	102,4 \pm 1,5	94,2 \pm 0,5	98,3 \pm 4,9	97,7 \pm 1,5	0,01
Cy-3-O-glc	100,0 \pm 6,1	104,9 \pm 6,3	100,7 \pm 0,1	102,0 \pm 1,7	93,3 \pm 0,4	97,3 \pm 5,4	96,7 \pm 1,1	0,01
Cy-3-O-ara	100,0 \pm 5,9	104,6 \pm 6,3	100,2 \pm 0,1	101,7 \pm 2,2	92,6 \pm 0,2	97,6 \pm 5,4	97,0 \pm 1,1	0,01
Pt-3-O-gal	100,0 \pm 5,7	104,9 \pm 6,3	99,5 \pm 0,1	101,5 \pm 2,3	92,3 \pm 0,1	96,3 \pm 5,9	95,0 \pm 0,3	0,02
Pt-3-O-glc	100,0 \pm 6,1	104,8 \pm 6,4	100,5 \pm 0,1	101,7 \pm 1,8	92,9 \pm 0,5	97,1 \pm 5,0	96,7 \pm 1,6	0,01
Pt-3-O-ara	100,0 \pm 6,1	104,7 \pm 6,1	104,9 \pm 1,4	102,6 \pm 1,3	94,5 \pm 1,1	98,5 \pm 4,3	98,5 \pm 1,9	0,01
Mv-3-O-gal	100,0 \pm 2,7	112,2 \pm 6,6	101,1 \pm 3,1	109,8 \pm 1,5	100,9 \pm 0,8	103,9 \pm 4,8	103,3 \pm 1,0	0,00
Mv-3-O-glc	100,0 \pm 6,1	105,4 \pm 6,3	101,5 \pm 0,3	102,7 \pm 1,6	94,3 \pm 0,7	98,5 \pm 4,9	98,1 \pm 1,5	0,01
Mv-3-O-ara	100,0 \pm 0,0	110,0 \pm 6,0	94,8 \pm 1,2	105,2 \pm 0,4	92,6 \pm 0,5	95,9 \pm 5,2	96,6 \pm 4,7	0,01

*bei 0 min normiert auf 100%

**ermittelt über die gesamte Inkubationsdauer

Tabelle 7.5: Anthocyangehalte [%] und Abbauraten [$\Delta\%/min$] nach Inkubation über 24 h mit simuliertem Duodenalsaft (pH 7,2)

	0 h*	0,5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	24 h	$\Delta\%/min^{**}$
Dp-3-O-gal	100,0 \pm 1,2	81,4 \pm 0,2	73,1 \pm 3,4	51,5 \pm 1,2	15,6 \pm 1,8	9,0 \pm 0,8	3,6 \pm 0,4	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,35
Dp-3-O-glc	100,0 \pm 2,1	82,6 \pm 0,9	75,7 \pm 5,2	57,2 \pm 0,5	16,1 \pm 3,0	5,6 \pm 1,4	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,35
Dp-3-O-ara	100,0 \pm 3,1	81,6 \pm 2,0	72,9 \pm 6,8	58,9 \pm 3,7	8,0 \pm 0,2	3,0 \pm 0,6	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,38
Cy-3-O-gal	100,0 \pm 2,8	74,2 \pm 1,7	76,9 \pm 7,8	73,8 \pm 1,0	25,5 \pm 1,7	21,7 \pm 2,8	13,6 \pm 1,4	7,1 \pm 2,8	0,0 \pm 0,0	0,31
Cy-3-O-glc	100,0 \pm 5,2	90,2 \pm 6,8	85,3 \pm 2,8	83,5 \pm 9,0	42,8 \pm 8,7	40,6 \pm 7,6	24,1 \pm 3,3	12,2 \pm 5,7	0,0 \pm 0,0	0,24
Cy-3-O-ara	100,0 \pm 3,8	97,1 \pm 9,4	88,8 \pm 9,6	84,8 \pm 8,8	62,3 \pm 2,0	57,7 \pm 8,2	30,7 \pm 4,0	13,0 \pm 5,7	0,0 \pm 0,0	0,16
Pt-3-O-gal	100,0 \pm 2,9	99,1 \pm 8,7	90,8 \pm 4,1	87,0 \pm 9,4	39,1 \pm 4,0	37,5 \pm 4,7	12,4 \pm 4,0	3,8 \pm 3,6	0,0 \pm 0,0	0,25
Pt-3-O-glc	100,0 \pm 3,3	94,7 \pm 9,6	97,7 \pm 5,5	87,3 \pm 5,2	40,4 \pm 4,8	38,6 \pm 2,9	14,0 \pm 2,5	4,5 \pm 3,7	0,0 \pm 0,0	0,25
Pt-3-O-ara	100,0 \pm 6,3	100,2 \pm 5,7	86,8 \pm 6,9	85,3 \pm 9,7	41,8 \pm 5,7	40,4 \pm 2,1	16,9 \pm 2,8	8,2 \pm 7,6	0,0 \pm 0,0	0,24
Mv-3-O-gal	100,0 \pm 3,6	80,6 \pm 6,6	81,0 \pm 5,7	75,7 \pm 8,9	56,5 \pm 6,2	50,1 \pm 7,9	31,4 \pm 1,9	19,1 \pm 8,0	0,0 \pm 0,0	0,18
Mv-3-O-glc	100,0 \pm 0,2	81,0 \pm 1,4	82,9 \pm 4,0	86,9 \pm 9,9	54,5 \pm 9,0	50,1 \pm 4,6	32,6 \pm 2,5	19,2 \pm 8,3	0,0 \pm 0,0	0,19
Mv-3-O-ara	100,0 \pm 1,2	42,5 \pm 5,5	62,9 \pm 9,2	60,1 \pm 8,3	25,1 \pm 7,2	27,6 \pm 0,2	22,6 \pm 3,9	6,5 \pm 4,4	0,0 \pm 0,0	0,31

*bei 0 min normiert auf 100%

**ermittelt nach 4 h Inkubation

Tabelle 7.6: Anthocyangehalt der Urinproben aus der durchgeführten Ileostomastudie sowie die Ausscheidungsraten der Probanden über einen Zeitraum von 8 h

	0,5 h		1 h		2 h		4 h		6 h		8 h	
	mg/Probe	mg/h										
Proband 1	0,010	0,020	0,063	0,125	0,110	0,110	0,136	0,068	0,069	0,035	0,031	0,015
Proband 2	0,005	0,010	0,036	0,071	0,028	0,028	0,052	0,026	0,024	0,012	0,011	0,005
Proband 3	0,015	0,031	0,085	0,170	0,174	0,174	0,137	0,068	0,015	0,008	0,015	0,008
Proband 4	0,004	0,008	0,051	0,103	0,117	0,117	0,137	0,068	0,079	0,039	0,036	0,018

Tabelle 7.7: Wiederfindung der Anthocyane in 4%iger HSA-Lösung (pH 7,4) bei saurer und neutraler Aufarbeitung [%]

	Dp-3-O-			Cy-3-O-			Pt-3-O-			Mv-3-O-		
	gal	glc	ara									
Saure Aufarbeitung	58,3	55,1	62,3	69,1	66,2	60,9	71,2	76,8	70,9	73,5	68,8	72,1
Neutrale Aufarbeitung	15,8	17,2	20,9	29,2	20,1	25,5	22,6	25,3	19,0	24,2	28,3	29,6
Gebundenes Anthocyan	84,2	82,8	79,1	70,8	79,9	74,5	77,4	74,7	81,0	75,8	72,7	70,4

Tabelle 7.8: Konzentration der Anthocyane in der bei Inkubationen verwendeten Stammlösung [mg/mL] sowie während der durchgeführten Inkubationen

	Dp-3-O-			Cy-3-O-			Pt-3-O-			Mv-3-O-		
	gal	glc	ara									
Konzentration der Stammlösung in [mg/mL]	7,0	6,4	5,1	3,6	3,6	2,8	1,9	4,3	1,3	1,7	4,1	1,0
Konzentration bei der Speichelinkubation [mg/mL]	0,14	0,13	0,10	0,07	0,07	0,05	0,04	0,08	0,03	0,03	0,08	0,02
Konzentration bei der Magensaftinkubation [mg/mL]	0,11	0,10	0,08	0,06	0,06	0,04	0,03	0,07	0,02	0,03	0,07	0,02
Konzentration bei den Duodenalsaftinkubation Sowie bei den Inkubationen mit Darmflüssigkeiten [mg/dL]	2,8	2,6	2,0	1,4	1,4	1,1	0,8	1,7	0,5	0,7	1,6	0,4