

*In vitro*- und *ex vivo*- Studien zum  
humanen intestinalen Metabolismus und  
zu Lipoxygenase-hemmenden Eigenschaften  
ausgewählter sekundärer  
Pflanzeninhaltsstoffe

**DISSERTATION**

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

vorgelegt von  
**Bastian Knaup**  
aus Hirschfeld

Würzburg 2008

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: .....

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

**Herrn Prof. Dr. Peter Schreier**

am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie  
des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt



*„Wissenschaftler sind Beamte, die abends um sechs Uhr  
ihre Probleme vergessen können. Forscher können das nicht.“*

*Adolf Butenandt*



*Meiner Familie  
und Stephanie*





## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von Juli 2005 bis Juli 2008 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Schreier. Ihm danke ich für die Überlassung des Themas und das stets offene und vertrauensvolle Verhältnis. Die Arbeitsbedingungen im AK waren meinem wissenschaftlichen und charakterlichen Fortschritt stets dienlich. Vielen Dank!

Für ihre bereitwillige und erfolgreiche Mitarbeit im Rahmen des Fortgeschrittenen-Praktikums danke ich den Herren Thomas Erk und Jan Fuchs.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei den Herren Dres. Fritz Lembke und Frank Heckel von Tetra Pak GmbH – Packaging Technology, Food Safety & Quality, Stuttgart, für Ihre wertvollen Tipps sowie für die Messungen der anaeroben Keimzahlen.

Claudia „Claudi“ Freitag danke ich für die schöne und lustige Zeit in unserem gemeinsamen Büro. Die Diskussionen über Leben, Beruf und all die anderen wichtigen Dinge werde ich sehr vermissen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rice (Rutgers, University of New Jersey, USA), Herrn Prof. Dr. Becker (Universität des Saarlandes, Saarbrücken) und Frau Dr. Kavvadias (Universität Würzburg) für die Bereitstellung von  $\delta$ -(3',4',5'-Trihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton,  $\delta$ -(3',4'-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton, Quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinosid, Quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-xylosid und Hispidulin.

Dem BMBF danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des BMBF-Projekts 01EA0502.

Danke auch den Probanden für die Bereitstellung der Ileo- und Kolostomabeutelinhalte. Mein spezieller Dank geht an dieser Stelle an Frau Ott-Hartusch.

Nicht vergessen möchte ich die tolle Besetzung der Instituts-Werkstatt mit Matthias Völker, Karl Vollmuth und Georg Walter.

Allen Kollegen, Doktorandinnen und Doktoranden sowie den Laborantinnen danke ich für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit, die stets angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die jederzeit entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Besonders möchte ich Frank Heckel, Michael Kraus, Marcus Taupp und Anagnostis Valotis nennen und ihnen für alle fachlichen und sonstigen Diskussionen sowie für unsere Freundschaft danken.

Zuletzt möchte ich den Personen danken, die zwar keinen wissenschaftlichen Einfluss auf die Arbeit hatten, ohne deren Liebe, Vertrauen und Geduld diese Arbeit jedoch niemals zu Stande gekommen wäre. Danke Mama, Papa, Lisa und Stephanie.

## Publikationen

### *Originalpublikationen:*

Knaup, B., Kahle, K., Erk, T., Valotis, A., Scheppach, W., Schreier, P., Richling, E. Human intestinal hydrolysis of phenol glycosides - a study with quercetin and *p*-nitrophenol glycosides using ileostomy fluid. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 1423-1429.

Knaup, B., Kempf, M., Fuchs, J., Valotis, A., Kahle, K., Oehme, A., Richling, E., Schreier, P. Model experiments mimicking the human intestinal transit of D-galacturonic acid and amidated pectin. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 840-848.

Knaup, B., Oehme, A., Valotis, A., Schreier, P. Anthocyanins as lipoxygenase inhibitors. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, im Druck.

---

Veeriah, S., Hofmann, T., Gleis, M., Dietrich, H., Will, F., Schreier, P., Knaup, B., Pool-Zobel, B. L. Apple polyphenols and products formed in the gut differently inhibit survival of human cell lines derived from colon adenoma (LT97) and carcinoma (HT29). *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2892-2900.

Kahle, K., Knaup, B., Erk, T., Schreier, P., Richling, E. Hydrolyse von Phenolglycosiden im menschlichen Gastrointestinaltrakt – Eine Studie mit Quercetin- und *p*-Nitrophenylglycosiden. *Lebensmittelchemie* **2007**, *61*, 145-174.

Bellion, P., Hofmann, T., Pool-Zobel, B-L., Will, F., Dietrich, H., Knaup, B., Richling, E., Baum, M., Eisenbrand, G., Janzowski, C. Antioxidant effectiveness of phenolic apple juice extracts and their gut fermentation products in the human colon carcinoma cell Line Caco-2. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, im Druck.

Joseph, B., Mertins, S., Stoll, R., Müller-Altrock, S., Knaup, B., Taupp, M., Schreier, P., Goebel, W. The effect of XAD-4 on the metabolism of *Listeria monocytogenes* and its impact on the activation of PrfA, the central regulator of listerial virulence. In Vorbereitung.

### *Posterbeiträge:*

Knaup, B., Kahle, K., Schreier, P., Richling, E. Structural changes of apple-polyphenols by the intestinal microflora. *NutIntest* **2007**, Kaiserslautern.

Knaup, B., Kahle, K., Kempf, M., Valotis, A., Fuchs, J., Erk, T., Richling, E., Scheppach, W., Schreier, P. Studies of the intestinal transit and metabolism of plant constituents using an *ex vivo* ileo-/ colostoma model. *Food Chemistry & Toxicology - Cornerstones of Life Sciences in Chemistry* **2007**, Kaiserslautern.

Erk, T., Kahle, K., Knaup, B., Schreier, P., Valotis, A., Richling, E. Rolle der intestinalen Mikroflora bei der Metabolisierung von Phenolglycosiden. *Food Chemistry & Toxicology – Cornerstones of Life Sciences in Chemistry* **2007**, Kaiserslautern.

Richling, E., Kahle, K., Knaup, B., Erk, T., Valotis, A., Schreier, P. Studien zur Verfügbarkeit von Phenolglycosiden im menschlichen Intestinaltrakt. *36. Deutscher Lebensmittelchemikertag* **2007**, Erlangen-Nürnberg.

Kahle, K., Huemmer, W., Knaup, B., Erk, T., Scheppach, W., Schreier, P., Richling, E. Intestinal metabolism of apple polyphenols – a study with ileostomy subjects. *3<sup>rd</sup> International Conference on Polyphenols and Health (ICPH)* **2007**, Tokyo.

## Erläuterungen

- Alle in dieser Arbeit für metabolische Umsetzungen und enzymatische Versuche verwendeten Verbindungen sind mit fettgedruckten arabischen Zahlen durchnummeriert. Eine Strukturmatrix (im Anhang) gibt einen strukturellen Überblick.
- Auf die Nummerierung einmalig genannter Verbindungen (z. B. Reagenzien) wurde verzichtet.
- Gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen sind im Text mit dem Zusatz <sup>®</sup> bzw. <sup>™</sup> versehen.



## Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
Acy	Anthocyanidin
Acy-Gluc	glucuronidierter Anthocyanmetabolit
Acy-Gly	Anthocyanglycosid
Acy-methyl	methylierter Anthocyanmetabolit
ANOVA	„analysis of variance“
AP	amidiertes Pektin
ara	Arabinose
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	„Brain Heart Infusion Agar“
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
cAMP	cytosolisches Adenosinmonophosphat
CBG	cytosolische $\beta$ -Glucosidase
CLP	„coactosine-like protein“
COX	Cyclooxygenase
cPLA <sub>2</sub>	cytosolische Phospholipase A <sub>2</sub>
CRP	„C-reactive protein“
Cy	Cyanidin
Cy3ara	Cy-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinosid
Cy3gal	Cy-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactosid
Cy3glc	Cy-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid
CYP	Cytochrom P450
DA	Amidierungsgrad
DE	Veresterungsgrad
D-GalA	D-Galacturonsäure
d	Tag
d <sub>f</sub>	Filmdicke von Trennphasen
d.h.	das heisst
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
Dp	Delphinidin
Dp3ara	Dp-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinosid
Dp3gal	Dp-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactosid
Dp3glc	Dp-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid
DTT	Dithiothreitol
D3-MeOH	Methanol, dreifach deuteriert
ed. bzw. eds.	„editor“ bzw. „editors“
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et alii</i> )
etc.	<i>et cetera</i>
ERK	„extracellular-signal regulated kinases“

---

FLAP	„five-lipoxygenase-activating protein“
FL-OH	Flavonoid
FL-O <sup>•</sup>	Aroxylradikal
GC	Gaschromatographie
GC-FID	GC-Flammenionisations-Detektion
griech.	griechisch
gal	Galactose
glc	Glucose
5-, 12- bzw. 15-HETE	5-, 12- bzw. 15-Hydroxyeicosatetraen
HIV	„human immunodeficiency virus“
13-HODE	13-Hydroxyoctadecadiensäure
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraen
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HPLC-DAD	HPLC-Diodenarray-Detektion
HPLC-ESI-MS/MS	HPLC-Elektrospray-Ionisierung-Tandemmassenspektrometrie
HS-SPME-GC/MS	Headspace solid-phase microextraction Gaschromatographie/Massenspektrometrie
HV	hochverestert
I	Inhibitorkonzentration
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IS	interner Standard
KbE/g	kolonienbildende Einheiten/g
K <sub>i</sub>	Inhibierungskonstante
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LDL	„low-density lipoprotein“
LOOH	Fettsäurehydroperoxid
LOQ	„limit of quantitation“
LOX	Lipoxygenase
LPH	Lactase-Phloridzinhydrolase
LTA4	Leukotrien A4
LTC4	Leukotrien C4
LTD4	Leukotrien D4
LTE4	Leukotrien E4
LTs	Leukotriene
M	molar, mol/l
MeOH	Methanol
Me <sup>+</sup>	Metallion
MK-2/3	„mitogen-activated protein kinase-2/3“
Mv	Malvidin
Mv3ara	Mv-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinosid
Mv3gal	Mv-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactosid
Mv3glc	Mv-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid
<i>m/z</i>	Masse/Ladungsverhältnis
n.b.	nicht bestimmt
NDGA	Nordihydroguarensäure



## Abkürzungen

---

NF $\kappa$ B	„nuclear factor $\kappa$ B”
NH <sub>2</sub>	Amidierung
Nr.	Nummer
NSAIDs	“non-steroidal anti-inflammatory drugs”
NV	niedrigverestert
OCH <sub>3</sub>	Methylierung
<i>o</i> -	<i>ortho</i>
P	Phosphat
<i>p</i> -	<i>para</i>
p.a.	pro analysis
PA	Proanthocyanidine
PAKs	polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	„phosphate buffered saline“
PDB	“Protein Data Base”
PG	Prostaglandin
pH	pH-Wert
PKA	Proteinkinase A
Pn	Peonidin
Pn3ara	Pn-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinosid
Pn3gal	Pn-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactosid
Pn3glc	Pn-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid
<i>p</i> -Np	<i>p</i> -Nitrophenol
<i>p</i> -Npara	<i>p</i> -Np- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinosid
<i>p</i> -Npgal	<i>p</i> -Np- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactosid
<i>p</i> -Npglc	<i>p</i> -Np- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid
<i>p</i> -Nprha	<i>p</i> -Np- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnosid
<i>p</i> -Npxyl	<i>p</i> -Np- <i>O</i> - $\beta$ -D-xylosid
PPAR $\gamma$	„peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ ”
Pt	Petunidin
Pt3ara	Pt-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinosid
Pt3gal	Pt-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactosid
Pt3glc	Pt-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid
Q	Quercetin
Q3ara	Q-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-arabinosid
Q3gal	Q-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactosid
Q3glc	Q-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid
Q3rha	Q-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnosid
Q3xyl	Q-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-xylosid
rha	Rhamnose
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S	Substratkonzentration
s.	siehe
SCFA	kurzkettige Fettsäuren

SD	Standardabweichung („standard deviation“)
SGLT	natriumabhängiger Glucosetransporter
sog.	sogenannt
SRS-A	„slow reacting substances of anaphylaxis“
TNF- $\alpha$	„tumor necrosis factor- $\alpha$ “
TRIS	Tris(hydroxyl-methyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
v	Umsetzungsrate
$v$	Geschwindigkeit einer Reaktion
vgl.	vergleiche
$V_{\max}$	maximale Geschwindigkeit
vs.	versus (gegen)
$v/v$	Volumen pro Volumen
XAD-7	Amberlite Polymerharz
xyl	Xylose
z.B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>V</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>XI</b>
<b>EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>A. KENNTNISSTAND .....</b>	<b>7</b>
<b>1 POLYPHENOLE .....</b>	<b>9</b>
1.1 EINTEILUNG UND NATÜRLICHE QUELLEN .....	9
1.1.1 <i>Phenolcarbonsäuren</i> .....	9
1.1.2 <i>Lignane</i> .....	11
1.1.3 <i>Stilbene</i> .....	11
1.1.4 <i>Flavonoide</i> .....	12
1.2 AUFNAHME VON POLYPHENOLEN MIT DER NAHRUNG .....	19
1.3 VERFÜGBARKEIT UND METABOLISMUS .....	21
1.3.1 <i>Mundhöhle und Magen</i> .....	21
1.3.2 <i>Dünndarm</i> .....	23
1.3.3 <i>Dickdarm</i> .....	24
1.3.4 <i>Konjugation der absorbierten Metabolite</i> .....	24
1.3.5 <i>Plasmatransport</i> .....	25
1.3.6 <i>Aufnahme in das Gewebe</i> .....	26
1.3.7 <i>Ausscheidung</i> .....	26
1.4 BIOLOGISCHE EFFEKTE VON POLYPHENOLEN .....	27
1.4.1 <i>Antioxidative Effekte</i> .....	27
1.4.2 <i>Polyphenole und gastrointestinale Erkrankungen</i> .....	30
1.4.3 <i>Wechselwirkung mit Enzymsystemen</i> .....	32
<b>2 D-GALACTURONSÄURE UND PEKTIN.....</b>	<b>35</b>
2.1 D-GALACTURONSÄURE .....	35
2.2 PEKTIN .....	36
2.2.1 <i>Allgemeines</i> .....	36
2.2.2 <i>Struktur</i> .....	36
2.2.3 <i>Vorkommen</i> .....	37
2.2.4 <i>Funktionen</i> .....	37
2.2.5 <i>Gewinnung</i> .....	38
2.2.6 <i>Gelbildungseigenschaften</i> .....	38
2.2.7 <i>Verwendung</i> .....	39
2.2.8 <i>Metabolismus</i> .....	39
2.2.9 <i>Biologische Effekte</i> .....	40
<b>3 LIPOXYGENASE (LOX).....</b>	<b>41</b>
3.1 DIE LOX-FAMILIE.....	41
3.1.1 <i>Vorkommen</i> .....	41
3.1.2 <i>Nomenklatur</i> .....	42
3.2 LOX-KATALYSE .....	42
3.2.1 <i>Enzymstruktur</i> .....	42
3.2.2 <i>Mechanismus der LOX-Katalyse</i> .....	44
3.3 ÜBERNAHME DES SUBSTRATS .....	47
3.3.1 <i>Einfluss der Proteinstruktur</i> .....	47
3.3.2 <i>5-LOX und five-LOX-activating Protein (FLAP)</i> .....	47
3.4 DIE ROLLE DER LOX UND IHRER PRODUKTE <i>IN VIVO</i> .....	49
3.4.1 <i>Pathophysiologische Bedeutung der 5-LOX</i> .....	52

3.4.2	<i>Pathophysiologische Bedeutung der 12-LOX</i> .....	52
3.4.3	<i>Pathophysiologische Bedeutung der 15-LOX</i> .....	53
3.5	POLYPHENOLE ALS LOX-INHIBITOREN.....	53
<b>4</b>	<b>ILEO- UND KOLOSTOMA</b> .....	<b>55</b>
<b>B.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>61</b>
<b>1</b>	<b>PRÜFUNG AUF METABOLISCHE KOMPETENZ DER VERWENDETEN ILEO- UND KOLOSTOMABEUTELINHALTE</b> .....	<b>63</b>
1.1	SYSTEM ZUM NACHWEIS VON ENZYMAKTIVITÄTEN.....	63
1.2	BESTIMMUNG DER ANAEROBEN GESAMTKEIMZAHL.....	65
<b>2</b>	<b>UNTERSUCHUNG DES METABOLISMUS VON SEKUNDÄREN PFLANZENINHALTSSTOFFEN MIT VERSCHIEDENEN MODELLSYSTEMEN</b> .....	<b>65</b>
2.1	INKUBATION VON APFELINHALTSSTOFFEN MIT ILEO- UND KOLOSTOMABEUTELINHALTEN.....	65
2.1.1	<i>Einfluss des Zuckerrests, der Aglyconstruktur und der Mikroflorakonzentration auf die Hydrolyse von Phenolglycosiden im menschlichen Dünndarm</i> .....	65
2.1.2	<i>Inkubation der gegen ilealen Abbau resistenten Verbindungen mit Kolostomabeutelinhalten</i> .....	70
2.2	EINFLUSS DES ZUCKERRESTS UND DER AGLYCONSTRUKTUR AUF DIE HYDROLYSE VON HEIDELBEERANTHOCYANEN IM MENSCHLICHEN DÜNN- UND DICKDARM.....	72
2.3	METABOLISMUS VON D-GALACTURONSÄURE UND AMIDIERTEM PEKTIN.....	75
<b>3</b>	<b>LOX-HEMMUNG DURCH SEKUNDÄRE PFLANZENINHALTSSTOFFE</b> .....	<b>82</b>
3.1	FLAVONOIDE UND DEREN INTESTINALE METABOLITE ALS SOJA LOX-1 INHIBITOREN.....	82
3.2	ANTHOCYANE ALS LOX-INHIBITOREN.....	85
3.2.1	<i>Soja LOX-1</i> .....	85
3.2.2	<i>5-LOX aus menschlichen neutrophilen Granulozyten</i> .....	87
<b>C.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>93</b>
<b>1</b>	<b>PRÜFUNG AUF METABOLISCHE KOMPETENZ DER VERWENDETEN ILEO- UND KOLOSTOMABEUTELINHALTE</b> .....	<b>95</b>
<b>2</b>	<b>UNTERSUCHUNG DES METABOLISMUS VON SEKUNDÄREN PFLANZENINHALTSSTOFFEN MIT VERSCHIEDENEN MODELLSYSTEMEN</b> .....	<b>96</b>
2.1	INKUBATION VON APFELINHALTSSTOFFEN MIT ILEO- UND KOLOSTOMABEUTELINHALTEN.....	96
2.1.1	<i>Einfluss des Zuckerrests, der Aglyconstruktur und der Mikroflorakonzentration auf die Hydrolyse von Phenolglycosiden im menschlichen Dünndarm</i> .....	96
2.1.2	<i>Inkubation der gegen ilealen Abbau resistenten Verbindungen mit Kolostomabeutelinhalten</i> .....	99
2.2	EINFLUSS DES ZUCKERRESTS UND DER AGLYCONSTRUKTUR AUF DIE HYDROLYSE VON HEIDELBEERANTHOCYANEN IM MENSCHLICHEN DÜNN- UND DICKDARM.....	101
2.3	METABOLISMUS VON D-GALACTURONSÄURE UND AMIDIERTEM PEKTIN.....	103
<b>3</b>	<b>LOX-HEMMUNG DURCH SEKUNDÄRE PFLANZENINHALTSSTOFFE</b> .....	<b>106</b>
3.1	FLAVONOIDE UND DEREN INTESTINALE METABOLITE ALS SOJA LOX-1 INHIBITOREN.....	107
3.2	ANTHOCYANE ALS LOX-INHIBITOREN.....	109
<b>D.</b>	<b>STRUKTURMATRIX</b> .....	<b>113</b>
<b>E.</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b> .....	<b>119</b>
<b>1</b>	<b>PRÜFUNG AUF METABOLISCHE KOMPETENZ DER VERWENDETEN ILEO- UND KOLOSTOMABEUTELINHALTE</b> .....	<b>121</b>
1.1	SYSTEM ZUM NACHWEIS VON ENZYMAKTIVITÄTEN.....	121
1.1.1	<i>Verwendete Substanzen</i> .....	121

---

1.1.2	<i>Prinzip</i> .....	121
1.1.3	<i>Testdurchführung</i> .....	121
1.1.4	<i>Verwendete Geräte</i> .....	122
1.2	BESTIMMUNG DER ANAEROBEN GESAMTKEIMZAHL.....	122
1.2.1	<i>Material und Methoden</i> .....	123
1.3	SPEICHEL-, ILEO- UND KOLOSTOMAPROBANDEN.....	123
1.4	VORBEREITUNG DER MODELLSYSTEME ZUR UNTERSUCHUNG DES METABOLISMUS VON SEKUNDÄREN PFLANZENINHALTSSTOFFEN.....	124
1.4.1	<i>Vorbereitung des Speichels</i> .....	124
1.4.2	<i>Herstellung des künstlichen Magensafts</i> .....	124
1.4.3	<i>Gewinnung des Inokulums</i> .....	125
<b>2</b>	<b>UNTERSUCHUNG DES METABOLISMUS VON SEKUNDÄREN PFLANZENIN- HALTSSTOFFEN MIT VERSCHIEDENEN MODELLSYSTEMEN.....</b>	<b>127</b>
2.1	INKUBATION VON APFELINHALTSSTOFFEN MIT ILEO- UND KOLOSTOMABEUTELINHALTEN .....	127
2.1.1	<i>Einfluss des Zuckerrests, der Aglyconstruktur und der Mikroflorakonzentration auf die Hydrolyse von Phenolglycosiden im menschlichen Dünndarm</i> .....	127
2.1.2	<i>Inkubation der gegen ilealen Abbau resistenten Verbindungen mit Kolostomabeutel- inhalten</i> .....	131
2.2	EINFLUSS DES ZUCKERRESTS UND DER AGLYCONSTRUKTUR AUF DIE HYDROLYSE VON HEIDELBEERANTHOCYANEN IM MENSCHLICHEN DÜNN- UND DICKDARM .....	135
2.2.1	<i>Verwendete Substanzen</i> .....	135
2.2.2	<i>Inkubationsbedingungen</i> .....	135
2.2.3	<i>Probenaufarbeitung</i> .....	136
2.2.4	<i>HPLC-DAD-Analytik</i> .....	136
2.2.5	<i>Verwendete Geräte</i> .....	137
2.3	METABOLISMUS VON D-GALACTURONSÄURE UND AMIDIERTEM PEKTIN.....	138
2.3.1	<i>Verwendete Substanzen</i> .....	138
2.3.2	<i>Inkubationsbedingungen</i> .....	138
2.3.3	<i>Probenaufarbeitung</i> .....	141
2.3.4	<i>Probenmessungen</i> .....	142
<b>3</b>	<b>LOX-HEMMUNG DURCH SEKUNDÄRE PFLANZENINHALTSSTOFFE.....</b>	<b>146</b>
3.1	FLAVONOIDE UND DEREN INTESTINALE METABOLITE ALS SOJA LOX-1 INHIBITOREN.....	146
3.1.1	<i>Verwendete Substanzen</i> .....	146
3.1.2	<i>Soja LOX-1 Assay</i> .....	147
3.1.3	<i>Verwendete Geräte</i> .....	147
3.2	ANTHOCYANE ALS LIPOXYGENASE-INHIBITOREN .....	148
3.2.1	<i>Verwendete Substanzen</i> .....	148
3.2.2	<i>Extraktion und Isolierung der Anthocyane</i> .....	148
3.2.3	<i>Präparative HPLC/ UV-VIS Fraktionierung</i> .....	150
3.2.4	<i>HPLC-DAD-Analytik</i> .....	151
3.2.5	<i>HPLC-ESI-MS/MS</i> .....	152
3.2.6	<i>Isolierung der 5-LOX aus humanen neutrophilen Granulozyten</i> .....	153
3.2.7	<i>Proteinbestimmung nach Lowry</i> .....	155
3.2.8	<i>Enzymassays</i> .....	156
	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>161</b>



# **Zusammenfassung**

---





Um eine Verbindung zwischen den bereits bekannten *in vitro*-Effekten und der bislang weitgehend ungeklärten *in vivo*-Situation zu knüpfen, wurden der *intestinale Metabolismus* sowie die *Lipoxygenase-hemmenden Eigenschaften* von ausgewählten sekundären Pflanzeninhaltsstoffen mit verschiedenen Modellsystemen untersucht. Folgende kamen zur Anwendung:

*intestinaler Metabolismus*

- menschlicher Speichel
- künstlicher Magensaft
- Ileostomabeutelinhalt
- Kolostomabeutelinhalt

*Lipoxygenase-hemmende Eigenschaften*

- Soja Lipoxygenase-1
- 5-Lipoxygenase aus humanen neutrophilen Granulozyten

Die *ex vivo*-Modellsysteme (Ileo- und Kolostomabeutelinhalte, 5-Lipoxygenase aus menschlichen neutrophilen Granulozyten) wurden speziell auf metabolische Kompetenz beziehungsweise Zellvitalität überprüft. Die verwendeten Darminhalte wiesen ein breites Spektrum an Enzymaktivitäten und angemessene Zahlen anaerober kolonienbildender Einheiten auf. Nach Isolierung der neutrophilen Granulozyten aus peripherem Humanblut erwiesen sich sowohl Zellvitalität (> 90% lebende Zellen) als auch Zellkonzentration (> 5000 Zellen/  $\mu$ l) für unsere Studien als geeignet. Mit diesen sorgfältig geprüften Modellsystemen wurden folgende Anwendungen untersucht:

- I. Einfluss des Zuckerrests, der Aglyconstruktur und der Mikroflorakonzentration auf die Hydrolyse von Phenolglycosiden im menschlichen Dünndarm
- II. Inkubation der gegen ileale Hydrolyse/Abbau resistenten Verbindungen mit Kolostomabeutelinhalten
- III. Einfluss des Zuckerrests und der Aglyconstruktur auf die Hydrolyse von Heidelbeeranthocyanen im menschlichen Dün- und Dickdarm
- IV. Metabolismus von D-Galacturonsäure und amidiertem Pektin
- V. Flavonoide und deren intestinale Metabolite als Soja Lipoxygenase-1-Inhibitoren

VI. Anthocyane als Lipoxygenase-Inhibitoren: Studien mit Soja Lipoxygenase-1 sowie 5-Lipoxygenase aus menschlichen neutrophilen Granulozyten

Hierzu wurden Quercetin- und *p*-Nitrophenolglycoside (hier: 3-*O*- $\beta$ -D-Glucoside, 3-*O*- $\beta$ -D-Galactoside, 3-*O*- $\alpha$ -L-Arabinoside, 3-*O*- $\beta$ -D-Xyloside und 3-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnoside), anthocyanreicher Heidelbeerextrakt, D-Galacturonsäure und amidiertes Pektin unter anaeroben Bedingungen bei 37°C für 24 beziehungsweise 10 h mit Ileostomabeutelinhalten von gesunden Probanden inkubiert. Zusätzlich wurden Quercetin, Quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid, Chlorogensäure, Procyanidin B<sub>2</sub>, (-)-Epicatechin, Phloretin, D-Galacturonsäure und amidiertes Pektin unter anaeroben Bedingungen bei 37°C für 24 h mit Kolostomabeutelinhalten von gesunden Probanden inkubiert. Die Substrate und Metabolite wurden mittels Hochdruckflüssigchromatographie-Diodenarray-Detektion (HPLC-DAD) und HPLC-Elektrospray-Ionisierung-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS) identifiziert. Die Gehalte von D-Galacturonsäure und amidierten Pektin wurden nach Carbazolreaktion photometrisch bestimmt. Methanol wurde via Headspace Solid-phase Microextraction Gaschromatographie/Massenspektrometrie (HS-SPME-GC/MS) gemessen; die Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) erfolgte mittels GC-Flammenionisations-Detektion (GC-FID). Die Enzymversuche wurden spektrophotometrisch ausgewertet, wobei die Bildung des Hydroperoxidprodukts bei 234 nm beziehungsweise 236 nm verfolgt wurde.

I. Unter den untersuchten Quercetinglycosiden wies das 3-*O*- $\beta$ -D-Glucosid mit 0,22  $\mu\text{mol/h}$  die höchste Hydrolyserate auf, gefolgt vom 3-*O*- $\beta$ -D-Galactosid, dem 3-*O*- $\beta$ -D-Xylosid und dem 3-*O*- $\alpha$ -L-Arabinosid (0,04, die beiden letztgenannten je 0,03  $\mu\text{mol/h}$ ). Quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnosid erwies sich während der gesamten Inkubationsdauer als stabil. Die *p*-Nitrophenolglycoside wurden schneller als die entsprechenden Quercetinglycoside hydrolysiert. Die Hydrolyserate nahm in folgender Reihenfolge ab: 3-*O*- $\beta$ -D-Glucosid (0,41  $\mu\text{mol/h}$ ) > 3-*O*- $\beta$ -D-Galactosid (0,21  $\mu\text{mol/h}$ ) > 3-*O*- $\beta$ -D-Xylosid (0,12  $\mu\text{mol/h}$ ) > 3-*O*- $\alpha$ -L-Arabinosid (0,09  $\mu\text{mol/h}$ ) > 3-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnosid (0,06  $\mu\text{mol/h}$ ). Mit Quercetin 3-*O*- $\beta$ -D-glucosid als repräsentativem Beispiel wurden linear steigende Hydrolyseraten von 75 bis 2500  $\mu\text{l}$

- Ileostomabeutelinhalt (entsprechend einem Mikrofloragehalt von log 0,69 bis 21,9 kolonienbildende Einheiten) beobachtet. Studien mit Antibiotikumzusatz zeigten keine hydrolytischen Vorgänge. Diese Resultate bewiesen, dass die Hydrolyse von Phenolglycosiden im menschlichen Dünndarm von der Zuckereinheit, der Aglyconstruktur sowie der Mikroflora abhängt.
- II. Die Inkubation der ileal stabilen Verbindungen mit Kolostomabeutelinhalt führte zu bereits beschriebenen Abbauprodukten. Aus Quercetin wurden Phloroglucin, 3,4-Dihydroxy-phenyllessigsäure und 3,4-Dihydroxy-methylbrenzcatechin erhalten. Quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnosid wurde zum Aglycon hydrolysiert, Chlorogensäure in Kaffee- und Chinasäure gespalten; Procyanidin B<sub>2</sub> unterlag einem teilweisen Abbau zu (-)-Epicatechin, welches nachfolgend zu  $\delta$ -(3',4',5'-Trihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton und Dihydrokaffeesäure umgewandelt wurde. Phloretin wurde zu Phloroglucin und *p*-Hydroxy-dihydrozimtsäure abgebaut.
- III. Die im Verlauf der Inkubationen mit Ileo- und Kolostomabeutelinhalten ermittelten Hydrolyseraten der Heidelbeeranthocyane variierten von 1,2 bis 66%/h beziehungsweise 2 bis 32%/h. Die ileale Hydrolyse der unmethylierten Anthocyanine (Delphinidin- und Cyanidinglycoside) verlief schneller (33-61%/h) als die der methylierten (Petunidin-, Peonidin und Malvidinglycoside) (3,7-15,5%/h; Ausnahme: Peonidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid). Die mit Kolostomabeutelinhalt gemessene Hydrolysegeschwindigkeit war für unmethylierte (18,4-29%/h) und methylierte Anthocyane (18,1-30%/h) gleich schnell.
- IV. D-Galacturonsäure und amidiertes Pektin wurden im Verlauf der Inkubationen mit Ileo- und Kolostomabeutelinhalten in unterschiedlichem Maße abgebaut. Verbunden mit einem Pektinabbau trat erwartungsgemäß Methanol auf. D-Galacturonsäure wurde zu kurzkettigen Fettsäuren abgebaut.
- V. Die Inhibierung von Soja Lipoxygenase-1 mit Flavan-3-olen war abhängig von der stereochemischen Konfiguration an C3 (*S* war effektiver als *R*). Die entsprechenden intestinalen Metaboliten (hier  $\delta$ -Di- und Trihydroxyphenyl- $\gamma$ -valerolactone) zeigten kaum inhibitorische Aktivität. Die untersuchten Flavonole inhibierten Lipoxygenase in Abhängigkeit vom Hydroxylierungsgrad in folgender Reihenfolge: Scutellarein (tetrahydroxy) > Luteolin (tetrahydroxy) > Apigenin (trihydroxy)

xy). Neben dem vernachlässigbaren Einfluss der Doppelbindung zwischen C2 und C3, der Methylierung einer Hydroxygruppe und der Stellung des B-Rings war der Effekt der Aglyconstruktur und des Zuckerrests erheblich. Hier erwiesen sich die Quercetinglycoside (3-*O*- $\beta$ -D-glucosid, 3-*O*- $\beta$ -D-galactosid und 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnosid) effizienter als die entsprechenden *p*-Nitrophenolglycoside; die Inhibierungskapazität nahm zuckerabhängig wie folgt zu: 3-*O*- $\beta$ -D-Galactosid > 3-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnosid > 3-*O*- $\beta$ -D-Glucosid.

VI. Das Inhibierungspotential von Delphinidin-, Cyanidin-, Peonidin- und Malvidinglycosiden, (3-*O*- $\beta$ -D-Glucoside, 3-*O*- $\beta$ -D-Galactoside und 3-*O*- $\alpha$ -L-Arabinoside) und deren Aglyconen wurde mit Soja Lipoxygenase-1 und 5-Lipoxygenase aus humanen neutrophilen Granulozyten untersucht. Die bestimmten IC<sub>50</sub>-Werte reichten vom sub- $\mu$ M- bis zu hohen, nicht mehr meßbaren Bereichen (Malvidin und entsprechende Glycoside). Mit IC<sub>50</sub>-Werten von 0,43  $\mu$ M und 0,49  $\mu$ M waren Delphinidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid und Delphinidin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid die effektivsten Soja Lipoxygenase-1 Inhibitoren; ihr großes Inhibierungspotential wurde durch die bei der 5-Lipoxygenase-Inhibierung erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte (2,15  $\mu$ M beziehungsweise 6,9  $\mu$ M) bestätigt. Der unkompetitive Mechanismus der Inhibierung wurde durch Experimente mit Soja Lipoxygenase-1 und Peonidin bestimmt.

Zusammenfassend belegen diese repräsentativen Beispiele, dass die benutzten *in vitro*- und *ex vivo*-Modellsysteme hilfreiche Werkzeuge sind, um gezielt den humanen intestinalen Metabolismus und mögliche antiinflammatorische Eigenschaften verschiedener physiologisch aktiver Verbindungen zu untersuchen.

## **Summary**

---



To develop a link between the already known *in vitro* effects of various secondary plant constituents and the still unclear *in vivo* situation, both the *intestinal metabolism* and the *lipoxygenase-inhibitory properties* of selected secondary plant constituents were studied with various model systems. The following were applied:

*intestinal metabolism*

- human saliva
- simulated gastric juice
- human ileostomy fluid
- human colostomy fluid

*lipoxygenase-inhibitory properties*

- soybean lipoxygenase-1
- human neutrophil granulocyte  
5-lipoxygenase

The *ex vivo* model systems (i.e. ileostomy and colostomy fluids, human neutrophil granulocyte 5-lipoxygenase) were particularly checked for metabolic competence and cell viability, respectively. The screened intestinal fluids showed a broad range of enzymatic activities and proper counts of anaerobic colony forming units. After isolation of neutrophil granulocytes from human peripheral blood, the cell vitality (> 90% viable cells) and cell concentration (> 5000 cells/  $\mu$ l) were adequate for our studies. With these carefully proved model systems, the following applications were performed:

- I. Influence of sugar moiety, aglycon structure and microflora concentration on the human ileal hydrolysis of phenol glycosides
- II. Incubation of compounds resistant to ileal hydrolysis/degradation with human colostomy fluids
- III. Influence of sugar moiety and aglycon structure on the hydrolysis of bilberry anthocyanins in the small and large intestine of humans
- IV. The metabolism of D-galacturonic acid and amidated pectin
- V. Flavonoids and corresponding intestinal metabolites as soybean lipoxygenase-1 inhibitors
- VI. Anthocyanins as lipoxygenase inhibitors: studies with both soybean lipoxygenase-1 and human neutrophil granulocyte 5-lipoxygenase

Thus quercetin and *p*-nitrophenol glycosides (i.e. 3-*O*- $\beta$ -D-glucosides, 3-*O*- $\beta$ -D-galactosides, 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinosides, 3-*O*- $\beta$ -D-xylosides and 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnosides), anthocyanin-rich bilberry extract, D-galacturonic acid and amidated pectin were incubated under anaerobic conditions at 37°C for 24 and 10 h, respectively, with ileostomy fluids from healthy volunteers. In addition, quercetin, quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnoside, chlorogenic acid, procyanidin B<sub>2</sub>, (-)-epicatechin, phloretin, D-galacturonic acid and amidated pectin were incubated under anaerobic conditions at 37°C for 24 h with colostomy fluids from healthy volunteers. The substrates and metabolites were identified by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and HPLC-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). The contents of D-Galacturonic acid and amidated pectin were determined photometrically after carbazole reaction. Methanol was measured via headspace solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry (HS-SPME-GC/MS) and short chain fatty acids (SCFA) were determined by GC-flame ionisation detection (GC-FID). The enzyme assays were analyzed spectrophotometrically, monitoring the appearance of hydroperoxide products at 234 nm and 236 nm, respectively.

- I. Among the quercetin glycosides under study, the 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside showed with 0.22  $\mu\text{mol/h}$  the highest hydrolysis rate, followed by the 3-*O*- $\beta$ -D-galactoside, the 3-*O*- $\beta$ -D-xyloside and the 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinoside (0.04, the two last named 0.03  $\mu\text{mol/h}$ ). Quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnoside was found to be stable over the entire incubation period. The *p*-nitrophenol glycosides were hydrolyzed faster than the corresponding quercetin glycosides. The hydrolysis rate decreased in the following order: 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside (0.41  $\mu\text{mol/h}$ ) > 3-*O*- $\beta$ -D-galactoside (0.21  $\mu\text{mol/h}$ ) > 3-*O*- $\beta$ -D-xyloside (0.12  $\mu\text{mol/h}$ ) > 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinoside (0.09  $\mu\text{mol/h}$ ) > 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnoside (0.06  $\mu\text{mol/h}$ ). Using quercetin 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside as a representative example, linear hydrolysis rates were observed from 75 to 2500  $\mu\text{l}$  ileostomy fluid (corresponds to a microflora content with log 0.69 up to 21.9 colony forming units). Studies with addition of antibiotics did not reveal any hydrolysis. These results demonstrated, that the human ileal hydrolysis of phenol glycosides depends on the sugar moiety and the aglycon structure as well as the microflora.



- 
- II. The incubation of ileal stable compounds with colostomy fluid led to already described degradation products. From Quercetin phloroglucinol, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 3,4-dihydroxy-toluene were obtained. Quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnoside was hydrolyzed to its aglycon, chlorogenic acid was cleaved to caffeic acid and quinic acid; procyanidin B<sub>2</sub> partially underwent a degradation to (-)-epicatechin, which itself was subsequently transformed to  $\delta$ -(3',4',5'-trihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolactone and dihydrocaffeic acid. Phloretin was degraded to phloroglucinol and *p*-hydroxy-dihydrocinnamic acid.
- III. The hydrolysis rates of bilberry anthocyanins determined during the course of incubations with ileostomy and colostomy fluids varied from 1.2-66%/h and 2-32%/h, respectively. The ileal hydrolysis of unmethylated anthocyanins (delphinidin- and cyanidin glycosides) proceeded faster (33-61%/h) than that of the methylated anthocyanins (petunidin-, peonidin and malvidin glycosides) (3.7-15.5%/h; exception: Peonidin 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside). The colonic hydrolysis of unmethylated (18.4-29%/h) and methylated anthocyanins (18.1-30%/h) was nearly the same.
- IV. D-Galacturonic acid and amidated pectin were degraded during the incubation with ileostomy and colostomy fluids at different degrees. Associated with a degradation of pectin, methanol expectably appeared. D-Galacturonic acid was decomposed to SCFA.
- V. The inhibition of soybean lipoxygenase-1 with flavan-3-ols was dependent on the stereochemistry at C3 (*S* more effective than *R*). The corresponding intestinal metabolites (i.e.  $\delta$ -Di- and Trihydroxyphenyl- $\gamma$ -valerolactones) showed considerably less inhibitory activity. The tested flavonols inhibited lipoxygenase dependent on the degree of hydroxylation in the following order: scutellarein (tetrahydroxy) > luteolin (tetrahydroxy) > apigenin (trihydroxy). Beside the negligible influence of the double bond between C2 and C3, methylation of a hydroxyl group, and orientation of the B-ring, the effect of aglycon-structure and sugar moiety was marked. For this the quercetin glycosides (i.e. 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside, 3-*O*- $\beta$ -D-galactoside and 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnoside) were proved to be more effective than the corresponding *p*-

Np-glycosides; the inhibition capacity increased sugar-dependent as follows: 3-*O*- $\beta$ -D-galactoside > 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnoside > 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside.

VI. The inhibitory potential of delphinidin, cyanidin, peonidin and malvidin glycosides (3-*O*- $\beta$ -D-glucosides, 3-*O*- $\beta$ -D-galactosides and 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinosides) as well as their aglycons was checked by using soybean lipoxygenase-1 and the human neutrophil granulocyte 5-lipoxygenase. The determined IC<sub>50</sub> values extended from the sub- $\mu$ M to high, non-measurable levels (malvidin and its glycosides). With IC<sub>50</sub> values of 0.43  $\mu$ M and 0.49  $\mu$ M delphinidin 3-*O*- $\beta$ -D-glucoside and Delphinidin 3-*O*- $\beta$ -D-galactoside were found to be the most effective lipoxygenase-1 inhibitors; their strong inhibitory potential was also reflected by the IC<sub>50</sub> values determined for these anthocyanins in the 5-lipoxygenase inhibition (2.15  $\mu$ M and 6.9  $\mu$ M, respectively). As to the mechanism of inhibition, experiments carried out with soybean lipoxygenase-1 revealed the uncompetitive type.

In conclusion, these representative examples verified, that the used *in vitro* and *ex vivo* model systems are useful tools to study the human intestinal metabolism and anti-inflammatory properties of various physiologically active compounds.

# **Einleitung und Problemstellung**

---



Pflanzliche Gewebe beinhalten eine große Zahl an chemischen Verbindungen, welche sich in primäre und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe unterteilen lassen. Bei den letztgenannten handelt es sich um Stoffe, die nicht unmittelbar am Energiestoffwechsel der Pflanze beteiligt sind, sondern unter anderem folgende Funktionen im Sekundärstoffwechsel übernehmen (Singh *et al.* 2003):

- Abwehr gegen Pathogene, z.B. Iridoide, Cannabinoide
- Abwehr gegen Herbivore, z.B. Tannine, Iridoide, Phytosteroide, Pyrethroide, Alkaloide, Cannabinoide
- Schutz vor UV-Strahlung, z.B. Carotinoide, Flavonoide, Anthocyane
- Anlockung von Bestäubern und Samenverbreitern, z. B. Monoterpene
- Verdunstungsschutz, z.B. Suberin, Cutin
- mechanische Festigung, z.B. Lignine, Pektin.

Daneben sind sie wesentlich für Farbe und Geschmack von insbesondere Früchten und deren Verarbeitungsprodukten verantwortlich (Harborne *et al.* 1998).

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe werden in der Medizin auch als Phytamine (*Phyto* = griech. Pflanze) bezeichnet, da man einigen von ihnen positive Effekte auf die menschliche Gesundheit zuspricht. Hierzu zählen unter anderem die *Pektine* und *Flavonoide*, zwei strukturell und funktionell unterschiedliche Stoffgruppen (Harborne *et al.* 1998) (vgl. nachfolgende Abschnitte 1 und 2).

*Pektine* werden vom Menschen über Pflanzen und Früchte beziehungsweise deren Verarbeitungsprodukte (auch in modifizierter Anwendungsform als amidiertes Pektin) wie z.B. Obstgelees, Marmeladen und Konfitüre täglich aufgenommen. Der ernährungsphysiologische Nutzen der Pektine besteht im Wesentlichen in ihrer Funktion als Ballaststoffe. Des Weiteren werden Pektin in jüngerer Zeit zahlreiche gesundheitsfördernde Effekte wie z. B. Senkung des Serum-Cholesterolspiegels zugeschrieben (Lim *et al.* 2005). Pektin soweit bekannt, soll die genannten Wirkungen nur als Makromolekül entfalten (Dongowski *et al.* 2000). Dementsprechend hat man den intestinalen Metabolismus von Pektin bereits in zahlreichen Studien untersucht (Dongow-

ski und Lorenz 1998; Dongowski *et al.* 2000; Dongowski *et al.* 2002; Saito *et al.* 2005). Im Gegensatz dazu gibt es nahezu keine Informationen über die Verstoffwechselung von amidiertem Pektin und seinem Monomer D-Galacturonsäure (Gulfi *et al.* 2006).

Weit stärker als die Pektine sind die *Flavonoide*, eine Untergruppe der Polyphenole, in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt, da ihnen zahlreiche physiologische Eigenschaften zugesprochen werden, die von antioxidativen bis hin zu antiinflammatorischen Wirkungen reichen (Watzl und Leitzmann 1995). Obwohl diese Effekte bisher in nur wenigen Humanstudien nachgewiesen werden konnten, ist in den letzten Jahren der Markt für freiverkäufliche Nahrungsergänzungsmittel, die Flavonoide als Reinstoffe oder in Form konzentrierter Pflanzenextrakte enthalten, und somit auch deren tägliche Zufuhr stark gestiegen.

Trotz der Vielzahl positiver *in vitro*-Effekte ist die *in vivo*-Situation der Wirkung von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen weitgehend ungeklärt (Scalbert und Williamson 2000). Ob sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Flavonoide und Pektine gesundheitsfördernde Wirkungen im Körper entfalten, hängt dabei nicht nur von der regelmäßigen Aufnahme durch die Nahrung, sondern insbesondere auch von der Verfügbarkeit der Substanzen im Organismus ab. Letztere ist wiederum abhängig von der chemischen Struktur der Stoffe, der Effektivität der Resorption und vor allem auch von der Metabolisierung, für die unter anderem die Mikroorganismen des Intestinums verantwortlich sind (Manach *et al.* 2004).

Um der *in vivo*-Situation nahe zu kommen, sind in jüngster Vergangenheit verschiedene Modellsysteme zum Studium des Metabolismus durch die intestinale Mikroflora entwickelt worden. Die Inkubation mit Einzelstämmen (Dongowski *et al.* 2000; Blaut *et al.* 2003), definierten Mischkulturen (Dongowski *et al.* 2000) oder Fäzesproben (Dongowski und Lorenz 1998) wird der Situation im menschlichen Körper jedoch aus vielerlei Gründen nicht gerecht, und Tierstudien (Labib *et al.* 2004; Keppler *et al.*

2006) lassen je nach verwendetem Tiermodell nur begrenzte Rückschlüsse auf den Metabolismus im Menschen zu.

Um eine Verbindung zwischen den bereits bekannten *in vitro*-Effekten von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und der bislang weitgehend ungeklärten *in vivo*-Situation zu knüpfen, wurden im Rahmen dieser Arbeit der *intestinale Metabolismus* sowie die *Lipoxygenase-hemmenden Eigenschaften* von Polyphenolen, D-Galacturonsäure und amidiertem Pektin mit verschiedenen *in vitro*- und *ex vivo*-Modellsystemen untersucht. Zur Anwendung kamen:

*intestinaler Metabolismus*

- menschlicher Speichel
- künstlicher Magensaft
- Ileostomabeutelinhalt
- Kolostomabeutelinhalt

*Lipoxygenase-hemmende Eigenschaften*

- Soja Lipoxygenase-1
- 5-Lipoxygenase aus humanen neutrophilen Granulozyten

Nach einem Einblick in den aktuellen Kenntnisstand wird nachfolgend über die bei diesen Studien erhaltenen Ergebnisse berichtet.





## **A. Kenntnisstand**

---



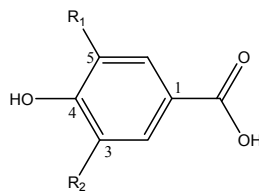
# 1 Polyphenole

## 1.1 Einteilung und natürliche Quellen

Phenolcarbonsäuren, Stilbene, Lignane und Flavonoide bilden die Klasse der Polyphenole, die als Sekundärmetabolite in höheren Pflanzen weit verbreitet sind (Scalbert und Williamson 2000). Im Folgenden werden die Strukturen und natürlichen Quellen der einzelnen Unterklassen kurz erläutert.

### 1.1.1 Phenolcarbonsäuren

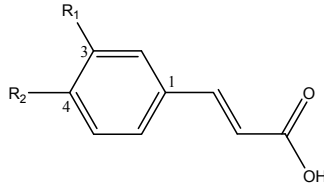
Die Phenolcarbonsäuren werden in zwei Klassen unterteilt: Benzoessäure- und Zimtsäure-Derivate. Als Grundgerüst besitzen diese Verbindungen ein C6-C1- bzw. C6-C3-Gerüst. Bekannte Vertreter der Benzoessäurederivate sind Protocatechusäure und Gallussäure (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Struktur von *p*-Hydroxybenzoensäuren. R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H: Protocatechusäure; R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=OH: Gallussäure.

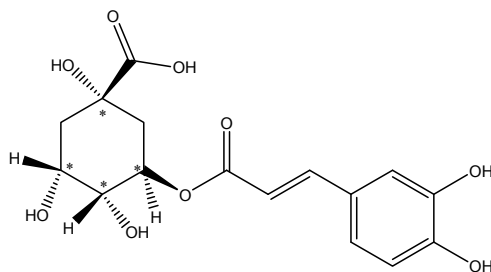
Der Gehalt an Benzoessäurederivaten in Pflanzen ist mit Ausnahme von wenigen roten Früchten, Tee, Rettich und Zwiebeln (ca. 10-50 mg/kg Frischgewicht) sehr gering (Shahidi und Naczk 1995). Tee stellt mit bis zu 4,5 g/kg Frischgewicht eine wichtige Quelle für Gallussäure dar (Tomas-Barberan und Clifford 2000). Des Weiteren sind Hydroxybenzoensäuren Bestandteile der komplexen Tannine (Gallotannine, z.B. in Mangos und Ellagitannine z.B. in Erdbeeren, Himbeeren und Brombeeren) (Clifford und Scalbert 2000).

Die Hydroxyzimtsäuren (Abbildung 2), deren bekannteste Vertreter *p*-Coumar-, Kaffee- und Ferulasäure weiter verbreitet als die *p*-Hydroxybenzoesäuren sind, kommen in der Natur überwiegend in gebundener Form, d.h. glycosyliert bzw. mit China-, Shikimi- oder Weinsäure verestert, vor.



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

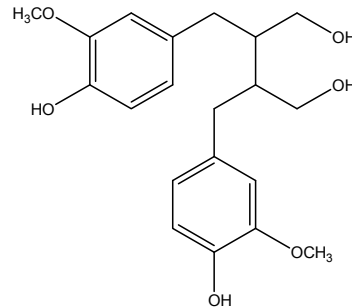
Heidelbeeren, Kiwis, Pflaumen, Kirschen und Äpfel enthalten 0,5-2 g Hydroxyzimtsäuren/kg Frischgewicht (Macheix *et al.* 1990). Ferulasäure liegt im Getreide hauptsächlich mit Arabinoxylanen und Hemicellulosen verestert vor und stellt dort mit  $\sim$  0,8-2 g/kg Trockengewicht etwa 90% der Gesamtpolyphenole. Kaffeesäure ist, sowohl frei als auch verestert, die am weitesten verbreitete Phenolcarbonsäure und macht zwischen 75% und 100% des gesamten Hydroxyzimtsäuregehalts der meisten Früchte aus. Durch Veresterung von Kaffee- und Chinasäure entsteht Chlorogensäure (Abbildung 3), welche in vielen Früchten und in Kaffee (1 Tasse Kaffeegetränk enthält 70-350 mg) zu finden ist (Clifford 1999).



**Abbildung 3:** Struktur von Chlorogensäure.

### 1.1.2 Lignane

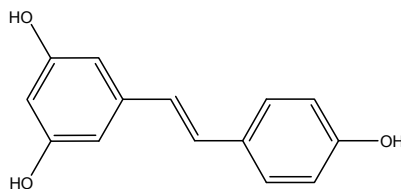
Lignane bestehen aus zwei Phenylpropan-Einheiten. Als Hauptvertreter der Lignane in der täglichen Ernährung ist Secoisolariciresinol zu erwähnen (Abbildung 4), das mit bis zu 3,7 g/kg Trockengewicht in Linsen vorkommt. Getreide, Früchte und Gemüse enthalten geringere Anteile an Lignanen (Adlercreutz und Mazur 1997).



**Abbildung 4:** Struktur von Secoisolariciresinol.

### 1.1.3 Stilbene

Stilbene sind nur in geringen Mengen in der Nahrung des Menschen enthalten. Resveratrol, als bekanntester Vertreter, wird im Zusammenhang mit vielfältigen protektiven (u.a. antioxidativen, antiinflammatorischen und antikanzerogenen) Effekten diskutiert, kommt aber nur in geringen Mengen vor allem in Rotwein (bis zu 6,8 mg/l) vor. Daneben erreicht Piceid (*trans*-Resveratrol-3-*O*-D-glucosid) im Rotwein Gehalte bis zu 50,8 mg/l (Wenzel und Somoza 2005).

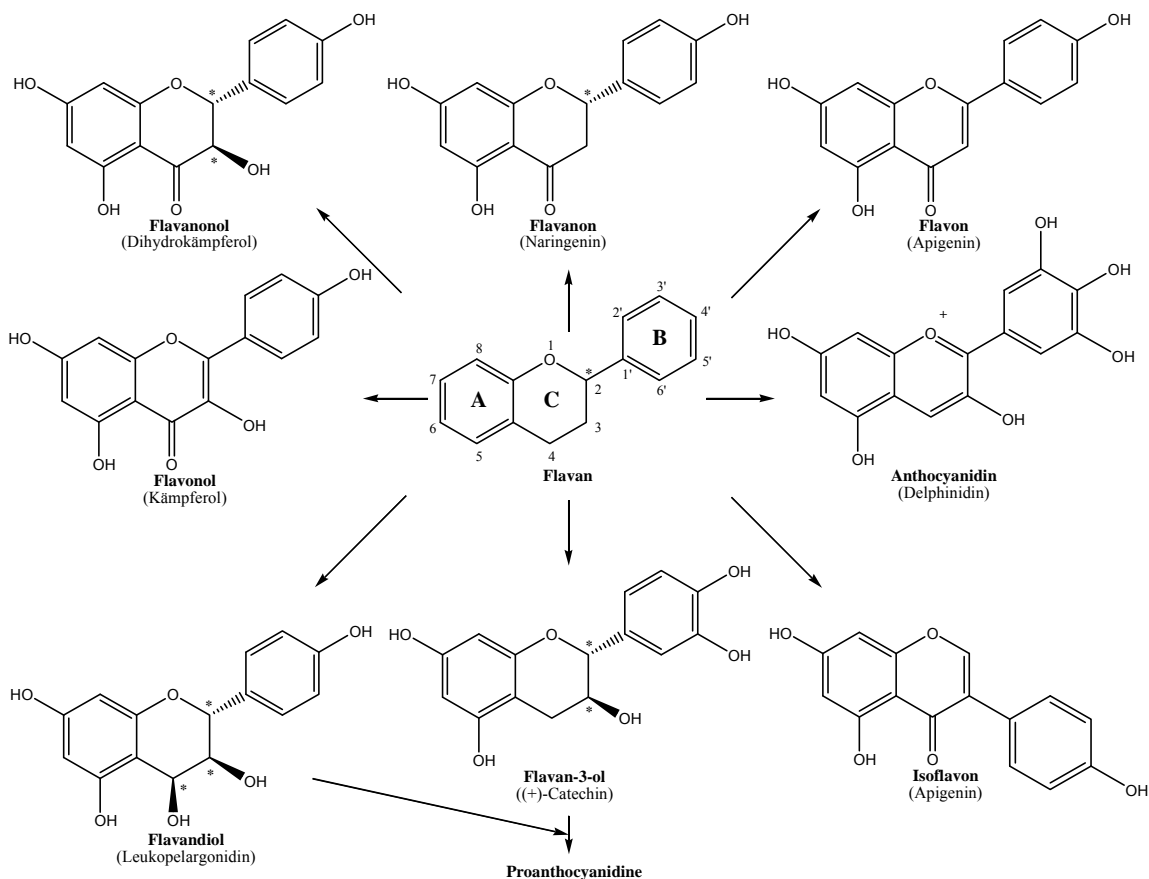


**Abbildung 5:** Struktur von Resveratrol.

### 1.1.4 Flavonoide

Die Flavonoide sind die bekannteste und bislang am besten untersuchte Gruppe der Polyphenole. Ihr Name leitet sich vom lateinischen *flavus* für „gelb“ ab.

Das Grundgerüst der Flavonoide besteht aus zwei aromatischen (A und B) und einem *O*-heterocyclischen Ring und entspricht somit strukturell dem Flavan (= 2-Phenylchroman) (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Übersicht über die verschiedenen Gruppen der Flavonoid-Familie.

Zur Biosynthese sind fast alle höheren Pflanzen befähigt, Tiere hingegen können das Grundgerüst nicht synthetisieren. Je nach Oxidationszustand der Kohlenstoffatome C-2, C-3 und C-4 werden verschiedene Flavonoidklassen unterschieden: Flavanole (3-

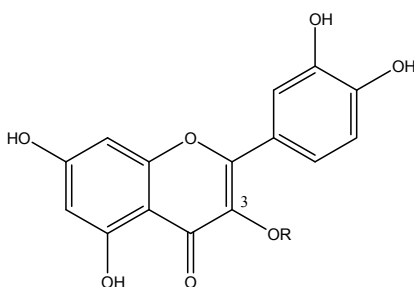
Hydroxy-flavane), Flavandiole (3,4-Dihydroxy-flavane), Flavanone (4-Oxo-flavane), Flavone (3-Oxo-flav-2-ene), Flavonole (3-Hydroxy-4-oxo-flav-2-ene), Isoflavone sowie Flavylumsalze bzw. Anthocyanidine (Abbildung 6). Eine weitere Gruppe bilden die Chalone, welche mit ihrem offenen C-Ring eine Vorstufe der Flavanone in der Biosynthese der Flavanderivate darstellen (Harborne 1994).

Über 5000 verschiedene natürliche Flavonoide sind derzeit bekannt (Harborne und Williams 2000). Ihre große Vielfalt ergibt sich durch Substitution mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen.

Im Folgenden wird ein Überblick über natürlich vorkommende Strukturen, deren Quellen und entsprechende Gehalte ausgewählter Flavonoide gegeben.

#### 1.1.4.1 Flavonole

Flavonole und insbesondere die Hauptvertreter Quercetin und Kaempferol kommen in einer Vielzahl von Pflanzen vor. Im Allgemeinen weisen sie Gehalte von ~ 15-30 mg/kg Frischgewicht auf.



**Abbildung 7:** Struktur von Quercetin und seinen Glycosiden. R=H: Quercetin, R=glc: Quercetin-3-O-β-D-glucosid, R=gal: Quercetin-3-O-β-D-galactosid, R=ara: Quercetin-3-O-α-L-arabinosid, R=xyl: Quercetin-3-O-β-D-xylosid und R=rha: Quercetin 3-O-α-L-rhamnosid.

Zu den reichhaltigsten Quellen gehören Zwiebeln (bis zu 1,2 g/kg Frischgewicht), gefolgt von Kohl, Lauch, Broccoli und Heidelbeeren. Auch in Rotwein und Tee sind sie (bis zu 45 mg Flavonole/l) enthalten. Flavonole, vor allem Quercetin, liegen üblicherweise in glycosylierter Form vor, wobei die Zuckerart von der jeweiligen

Pflanzenspezies abhängt (Macheix *et al.* 1990). So enthalten Zwiebeln vor allem Quercetinglucoside, während in Äpfeln Quercetingalactoside, -rhamnoside, -arabinoside und in Tee Quercetinrutinoside überwiegen (Abbildung 7) (Robards *et al.* 1999; Hollman und Arts 2000).

#### **1.1.4.2 Flavone**

Flavone (Abbildung 6) sind im Vergleich zu Flavonolen in Früchten und Gemüse weniger verbreitet als Flavonole. Ihre Hauptvertreter sind die Glycoside von Luteolin und Apigenin, zu deren wichtigsten verzehrbaren Quellen Petersilie und Sellerie (~ 240-1850 bzw. ~ 20-140 mg Flavone/kg Frischgewicht) zählen. In Getreidearten wie Hirse und Weizen sind Flavone in Form von C-C-Glycosiden enthalten (King 1962; Feng *et al.* 1988; Sartelet *et al.* 1996). Des Weiteren enthält das ätherische Öl von Zitrusfrüchten bis zu 6,5 g/l der hydrophoben polymethoxylierten Flavone Tangeretin, Nobiletin und Sinensetin (Shahidi und Naczki 1995).

#### **1.1.4.3 Flavanone**

In der Nahrung dienen neben Tomaten und aromatischen Pflanzen wie z.B. Minze vor allem Zitrusfrüchte als Quellen für Flavanone (Abbildung 6). Zu den bekanntesten Aglyconen zählen Naringenin in Grapefruit, Hesperetin in Orangen und Eriodictyol in Limonen. Flavanone sind üblicherweise an Position C7 entweder mit Neohesperidose (bitterer Geschmack, z.B. Naringin in Grapefruit) oder Rutinose (ohne Geschmack) verbunden. In Orangensaft sind 200-600 mg Hesperidin/l zu finden (Tomas-Barberan und Clifford 2000). Da die festen Anteile der Zitrusfrucht, vor allem das Albedo und die Membranen, sehr hohe Flavanonkonzentrationen aufweisen, kann die ganze Frucht im Vergleich zum Saft die fünffache Menge Flavanon enthalten.

#### **1.1.4.4 Isoflavone**

Da Isoflavone aufgrund ihrer OH-Gruppen in 7- und 4'-Position (Abbildung 6) strukturelle Ähnlichkeit zu Estrogenen aufweisen, können sie an Estrogenrezeptoren binden; daher werden sie der Klasse der Phytoestrogene zugeordnet. Isoflavone kommen



vor allem in Leguminosen vor. Soja bzw. Sojaprodukte stellen die Isoflavon-Hauptquellen in der menschlichen Ernährung dar. Zu den wichtigsten Isoflavonen zählen Genistein, Daidzein und Glycitein, die häufig im Verhältnis 1:1:0,2 zueinander auftreten. In der Natur kommen Isoflavone in den folgenden Formen vor: als Aglycon, 7-O-Glucosid, 6''-O-Acetyl-7-O-glucosid und 6''-O-Malonyl-7-O-glucosid (Coward *et al.* 1998). Die 6''-O-Malonylglucosid-Derivate haben einen bitteren und astringierenden Geschmack, sind hitzeinstabil und werden während der Produktion von Sojamilch häufig hydrolysiert (Kudou *et al.* 1991). Isoflavonglycoside werden im Verlauf der Herstellung der Sojaprodukte Miso und Tempeh zu den entsprechenden Aglyconen abgebaut, welche extrem hitzestabil sind. Der Isoflavongehalt von Soja und Sojaprodukten variiert stark in Abhängigkeit von geographischer Herkunft, Anbaubedingungen und Verarbeitung der Rohstoffe. Sojabohnen enthalten zwischen 580 und 3800 mg Isoflavone/kg Frischgewicht, Sojamilch dagegen lediglich 30-175 mg/L (Reinli und Block 1996; Cassidy *et al.* 2000).

#### 1.1.4.5 Flavan-3-ole

Flavan-3-ole (Abbildung 6) kommen sowohl in monomerer (Catechine) als auch in polymerer Form (Proanthocyanidine, s. Abschnitt 1.1.4.6) vor. In Früchten sind monomere Flavan-3-ole weit verbreitet. Aprikosen und Rotwein weisen z.B. Gehalte von 250 mg/kg Frischgewicht bzw. 300 mg/l auf. Die mit Abstand höchsten Mengen an Flavan-3-olen sind jedoch in grünem Tee und Schokolade zu finden. Ein Aufguß grünen Tees hat dabei bis zu 200 mg Catechin (Lakenbrink *et al.* 2000), schwarzer Tee hingegen enthält weniger Monomere, da diese während der Fermentation der Teeblätter zu Theaflavinen (Dimer) und Thearubigenen (Polymer) kondensiert werden. Catechin und Epicatechin sind die Hauptvertreter der Flavan-3-ole in Früchten, während Gallocatechin, Epigallocatechin und Epigallocatechingallat hauptsächlich in Leguminosensamen, Traubenkernen und vor allem in Tee (Arts *et al.* 2000a; 2000b) vorkommen. Im Gegensatz zu den anderen Flavonoidklassen liegen die Flavan-3-ole in der Nahrung in nicht-glycosylierter Form vor.

#### 1.1.4.6 Proanthocyanidine

Proanthocyanidine, auch bekannt als kondensierte Tannine, sind Dimere, Oligomere bzw. Polymere der Catechine. Die einzelnen Catechineinheiten sind zwischen C4 und C8 (oder C4 und C6) miteinander verbunden, und der mittlere Polymerisationsgrad variiert beispielsweise in Mostäpfeln zwischen 4 und 11 Catechineinheiten (Guyot *et al.* 1998). Da sie Komplexe mit Speichelproteinen bilden, sind kondensierte Tannine für den astringierenden Charakter von Früchten (u.a. Trauben, Pfirsich, Äpfel und Beeren), Getränken (u.a. Wein, Tee und Bier) und für den bitteren Geschmack von Schokolade (Santos-Buelga und Scalbert 2000) verantwortlich. Aufgrund der großen Strukturvariabilität der Proanthocyanidine ist es schwierig, deren Gehalt in der Nahrung zu bestimmen. Jüngste Daten bezüglich Procyanidingehalten in Nahrungsmitteln liegen aus unserem Arbeitskreis für aus klaren (28,4-49%) und trüben Apfelsäften (48,3-60.6%) gewonnene Extrakte vor (Huemmer *et al.* 2008).

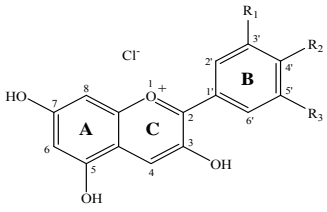
#### 1.1.4.7 Anthocyane

Da die Gruppe der Anthocyane in der vorliegenden Arbeit mehrfach bezüglich Metabolismus und Aktivität untersucht wurde, wird auf deren Strukturen, Substitutionsmuster und resultierende farbgebende Eigenschaften im Folgenden näher eingegangen.

Der Überbegriff Anthocyane umfasst die Untergruppen der Anthocyanidine (Aglycone) und Anthocyanine (Glycoside), deren gemeinsames Strukturmerkmal eine positive Ladung am C-Ring darstellt (Flavyliumkation). In Pflanzen liegt das Flavyliumkation der Anthocyane vor allem als Chlorid vor; man spricht daher bei resultierenden Salzen von Flavyliumchloriden (Merken und Beecher 2000). Eine weitere strukturelle Gemeinsamkeit unter den Anthocyanidinen ist durch die Hydroxylierung des C-Rings in 3-Position gegeben (Watzl *et al.* 2002a). Die sechs wichtigsten in der Natur vorkommenden Aglycone (Delphinidin-, Cyanidin-, Pelargonidin-, Malvidin-, Petunidin-, Peonidin-Chlorid) variieren im Hydroxy- und Methoxy-Substitutionsmuster des B-Ringes. In Tabelle 1 sind das jeweilige Substitutionsmuster sowie die ent-

sprechende Farbgebung der Verbindungen bei pH 1-3 in wässrigem Milieu aufgeföhrt.

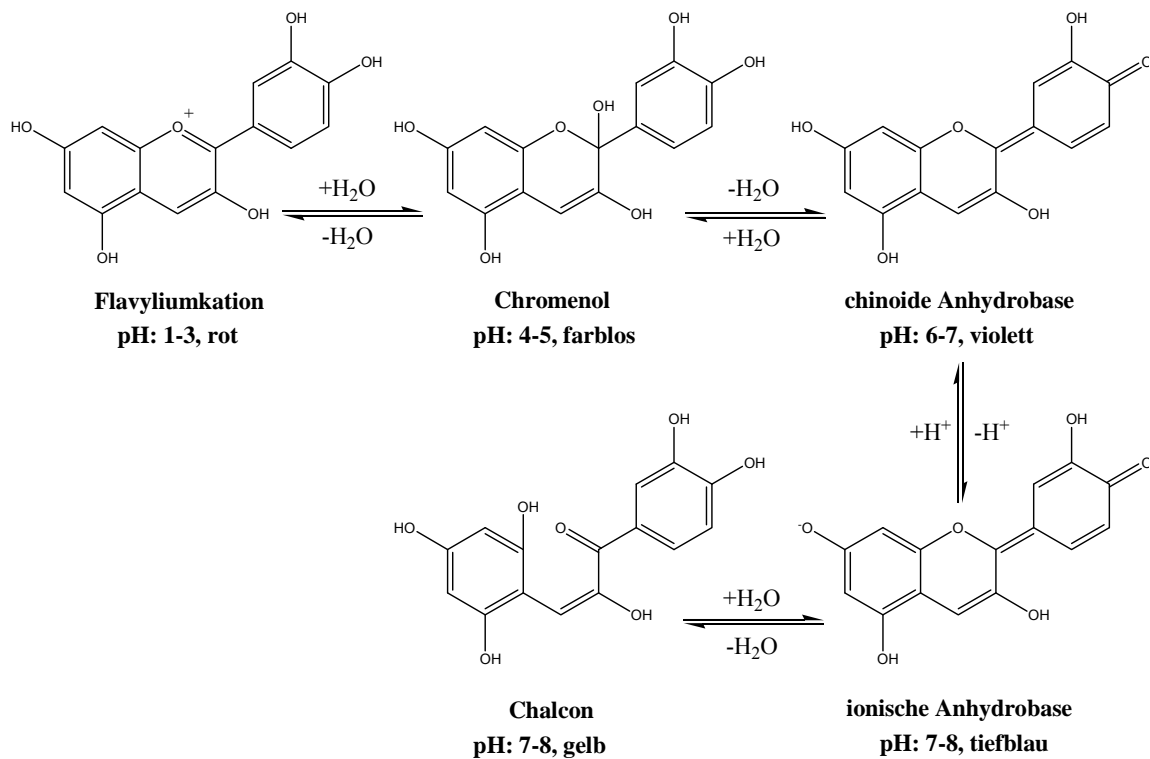
**Tabelle 1:** Übersicht über die sechs am häufigsten in der Natur vorkommenden Anthocyanidine, angelehnt an Watzl *et al.* (2002a).

	Substituent			Farbe im pH-Bereich 1 bis 3
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
<b>Delphinidin</b>	OH	OH	OH	violett
<b>Cyanidin</b>	OH	OH	H	rot
<b>Pelargonidin</b>	H	OH	H	orange
<b>Malvidin</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	violett
<b>Petunidin</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	violett
<b>Peonidin</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	rot

Im Allgemeinen kommen Anthocyane in der Pflanze als 3-Monoside, 3-Bioside, 3-Trioside, 3,5-Diglycoside und zu einem geringeren Anteil als 3,7-Diglycoside vor. Der Zuckerrest variiert dabei von Glucose, Galactose, Rhamnose, Arabinose bis zu Xylose und beeinflusst die Stabilität des Anthocyaninmoleküls. Weiterhin können die Zuckerreste mit aliphatischen Säuren wie Essig-, Oxal-, Propion-, Bernstein-, oder Malonsäure sowie mit aromatischen Säuren wie *p*-Hydroxybenzoe-, Ferula-, *p*-Coumar-, Sinapin- oder Kaffeesäure verestert sein. Gefunden wurden derartige acylierte Anthocyanine u.a. in schwarzen Johannisbeeren, roten Zwiebeln, rotem Rettich und Rotkohl (Slimestad und Solheim 2002; Wu und Prior 2005).

Anthocyane sind farbgebende Komponenten vieler Frucht- und Gemüsearten und spielen daher vor allem auch in der Lebensmitteltechnologie eine wichtige Rolle (Watzl *et al.* 2002a; McGhie und Walton 2007). Die Farbe der Anthocyane ist durch

ein Absorptionsmaximum im visuellen Bereich bei 560-465 nm bedingt, welches von der Substitution am B-Ring abhängt. Mit zunehmender Hydroxylierung verschiebt sich das Absorptionsmaximum stärker zu höheren Wellenlängen (Rotverschiebung, bathochromer Effekt), eine Glycosylierung oder Methylierung dagegen bewirkt eine Blauverschiebung (hypsochromer Effekt) (Markakis 1974; Giusti *et al.* 1999; Merken und Beecher 2000). Des Weiteren ist die Farbe vom pH-Wert abhängig; bei niedrigen pH-Werten (pH 1-3) sind die Verbindungen auf Grund des mesomeriestabilisierten Benzopyrylium-Flavyliumkations rot gefärbt. Mit steigendem pH-Wert (pH 4-5) geht das Kation in die farblose Carbinolbase (Chromenol) über, und im pH-Bereich 6-7 erfolgt durch die Bildung der chinoiden (violett) und ionischen (tiefblau) Anhydrobasen eine Farbvertiefung. Bei pH 7-8 geht die Anhydrobase unter Ringöffnung in das gelbe Chalcon über (Abbildung 8). In der Pflanze liegen die Anthocyane im leicht sauren Zellsaft entweder als Flavyliumsalz oder als Pseudobase (Chromenol) vor (Kuehnau 1976).

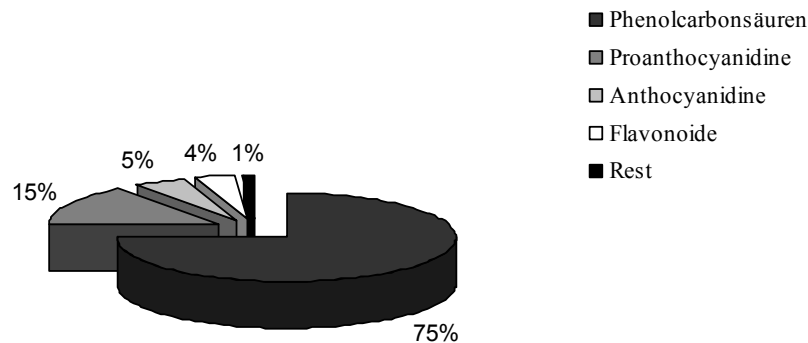


**Abbildung 8:** Strukturelle pH-Abhängigkeit von Anthocyanidinen am Beispiel von Cyanidin-Chlorid nach Belitz und Grosch (2001).

Cyanidinderivate sind die in der Nahrung am weitesten verbreiteten Anthocyane. Die Gehalte in Nahrungsmitteln sind proportional zur resultierenden Färbung und erreichen bis zu 2-4 g/kg Frischgewicht in schwarzen Johannisbeeren oder Brombeeren. Heidelbeeren können sogar bis zu 5 g Anthocyane/kg Frischgewicht enthalten. Anthocyane kommen vor allem in der Fruchthaut und vereinzelt im Fruchtfleisch vor; die Gehalte steigen während der Fruchtreifung. Bei der Rotweinherstellung können durch Maischegärung der Trauben bis zu 350 mg Anthocyane/l in das Produkt gelangen (Clifford 2000; Es-Safi *et al.* 2002).

## 1.2 Aufnahme von Polyphenolen mit der Nahrung

Die tägliche Polyphenolaufnahme hängt stark von den Ernährungsgewohnheiten und -vorlieben ab. Infolgedessen gibt es nur wenige zuverlässige Daten zur gesamten täglichen Aufnahme von Polyphenolen durch die Nahrung; der von Kuehnau (1976) ermittelte Wert von 1 g/d wird auch heute noch als Referenz verwendet. Im Lauf der Zeit wurden detailliertere Studien über die Zufuhr der einzelnen Polyphenolklassen durchgeführt; Tabelle 2 gibt einen Überblick über die aktuelle Situation in Finnland. Der Referenzwert von 1 g/d (Kuehnau 1976) wurde dabei mit 863 mg/d annähernd bestätigt. Zu den am meisten zugeführten Polyphenolgruppen gehörten Phenolcarbonsäuren (75% der Gesamtpolyphenolzufuhr) und Proanthocyanidine (15%), während Anthocyanidine (5%) und andere Flavonoide (4%) einen geringeren prozentualen Anteil aufwiesen (Abbildung 9).



**Abbildung 9:** Tägliche Zufuhr der Hauptpolyphenolgruppen nach Ovaskainen *et al.* (2008). Rest: Ellagttannine, Isoflavone, Lignane.

**Tabelle 2:** Aufnahme von Polyphenolen mit der Nahrung (FINDIET2002)<sup>1</sup> nach Ovaskainen *et al.* (2008).

	Frauen	Männer	Durchschnitt
		mg/d	
<b>Phenolcarbonsäuren, total<sup>2</sup></b>	571 ± 297	725 ± 414	641 ± 363
Kaffeesäure	359 ± 271	487 ± 368	417 ± 325
Ferulasäure	103 ± 47	139 ± 67	120 ± 60
Gallussäure	36 ± 59	29 ± 55	33 ± 57
<i>p</i> -Coumarsäure	15 ± 6,5	17 ± 8,5	16 ± 7,5
Sinapinsäure	10 ± 5,3	12 ± 7,6	11 ± 6,6
<b>Anthocyanidine, total<sup>3</sup></b>	53 ± 76	43 ± 82	47 ± 79
Cyanidin	25 ± 31	21 ± 32	23 ± 32
Delphinidin	14 ± 25	12 ± 29	13 ± 27
<b>Flavonoide, total</b>	37 ± 44	27 ± 43	33 ± 43
Flavonole <sup>4</sup>	5,8 ± 4,6	5,0 ± 5,1	5,4 ± 4,9
Flavanone <sup>5</sup>	31 ± 43	22 ± 42	27 ± 43
<b>Proanthocyanidine (PA), total</b>	139 ± 121	115 ± 118	128 ± 120
PA Monomere <sup>6</sup>	13 ± 13	10 ± 13	12 ± 13
PA Dimere	14 ± 14	12 ± 14	13 ± 14
PA Trimere	12 ± 14	10 ± 13	11 ± 13
PA, Oligomere (4-6)	22 ± 26	18 ± 25	20 ± 25
PA, Oligomere (7-10)	6 ± 8	5 ± 8	6 ± 8
PA, >10 Polymere	24 ± 28	17 ± 24	21 ± 27
PA, gebunden	49 ± 48	42 ± 51	46 ± 50
Ellagitannine	15 ± 43	8 ± 28	12 ± 37
Isoflavone <sup>7</sup>	1,0 ± 4,8	0,8 ± 2,6	0,9 ± 3,9
Lignane <sup>8</sup>	1,4 ± 7,5	0,4 ± 2,1	0,9 ± 5,7
Polyphenole, total	817 ± 368	919 ± 458	863 ± 415

<sup>1</sup>Mittelwerte ± SD, n = 2007 (1095 Frauen und 912 Männer).<sup>2</sup>Enthält noch zusätzlich Protocatechur-, Vanillin-, *p*-Hydroxybenzoe- und Syringasäure.<sup>3</sup>Enthält noch zusätzlich Pelargonidin, Petunidin, Peonidin und Malvidin.<sup>4</sup>Isorhamnetin, Kämpferol, Myricetin und Quercetin.<sup>5</sup>Eriodictyol, Hesperetin und Naringenin.<sup>6</sup>PA Monomer = Epicatechin, Catechin (= Flavan-3-ole).<sup>7</sup>Biochanin A, Daidzein, Genistein, Glycitein und Formononetin.<sup>8</sup>Matairesinol und Secoisolariciresinol.

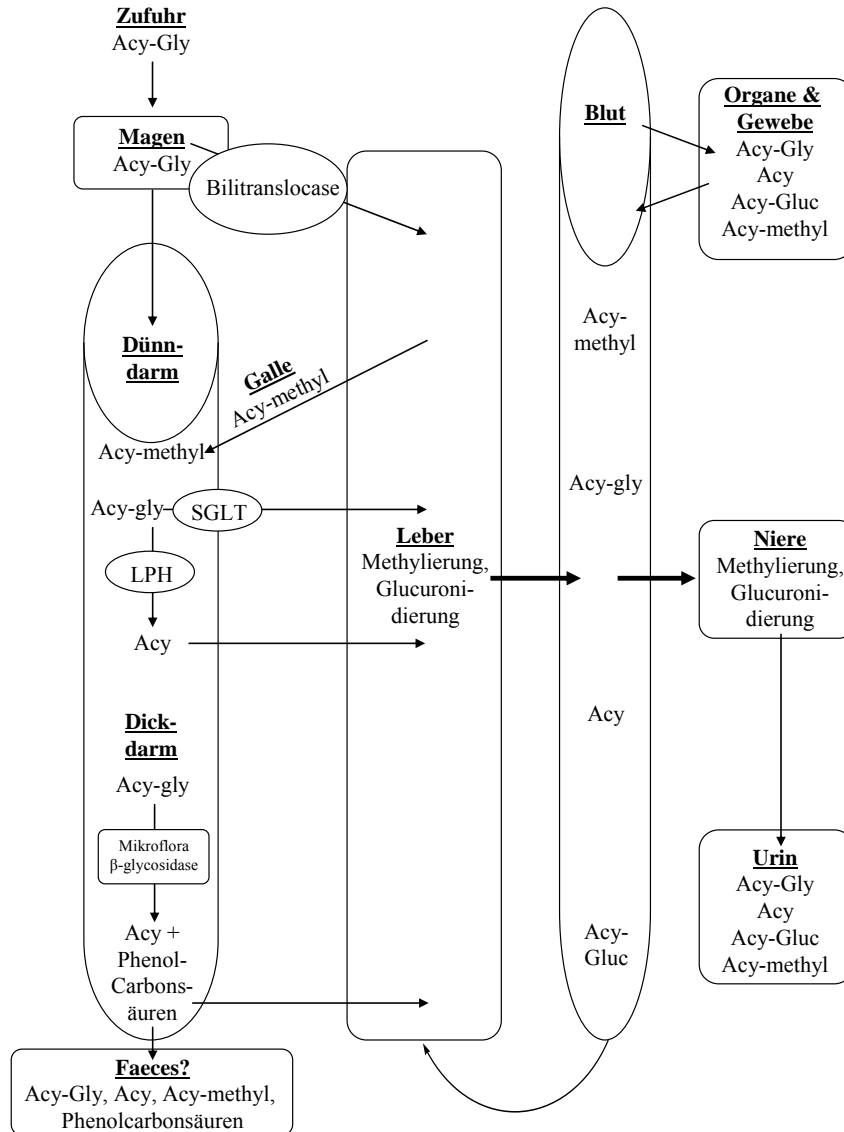
### 1.3 Verfügbarkeit und Metabolismus

Die gesundheitlichen Effekte von Polyphenolen hängen neben der Menge der Zufuhr auch von deren Verfügbarkeit am jeweiligen Zielort ab. Diese wird von der Absorption, dem Metabolismus und der Ausscheidung bestimmt; diese Parameter variieren bei den einzelnen Polyphenolen stark. Des Weiteren können die in Darm und Leber entstandenen und im Blut und Zielorganen vorkommenden Polyphenolmetabolite in ihrer Aktivität von den entsprechenden Ausgangsverbindungen abweichen (Manach *et al.* 2004). Der allgemeine Metabolismus der Polyphenole ist exemplarisch anhand der Metabolisierung von Anthocyanen in Abbildung 10 dargestellt (McGhie und Walton 2007).

#### 1.3.1 Mundhöhle und Magen

Über den Metabolismus von Polyphenolen in der Mundhöhle gibt es kaum Informationen. Lediglich eine Studie beschreibt die Hydrolyse u.a. von Quercetin-4'-glucosid und Genistein-7-glucosid durch menschlichen Speichel unter Freisetzung der Aglycone Quercetin und Genistein. Die Untersuchung weiterer Flavonoidglycoside belegte, dass vom Speichel nur Glucosekonjugate gespalten werden (Walle *et al.* 2005).

Man geht davon aus, dass Anthocyane im Gegensatz zu den anderen Flavonoiden unter Beteiligung der Bilitranslocase in Form der Glycoside teilweise schon im Magen absorbiert werden (Abbildung 10). Aufgrund dessen lässt sich das Vorhandensein intakter Anthocyanglycoside als Hauptform im zirkulatorischen System und deren Ausscheidung im Urin erklären. Das Fehlen der Aglycone könnte jedoch auch auf deren Instabilität unter physiologischen Bedingungen zurückzuführen sein. Das Vorkommen von Glycosiden als Hauptform im zirkulatorischen System wurde bisher für andere Flavonoide noch nicht beobachtet (McGhie und Walton 2007).



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Absorption und des Metabolismus von Anthocyanen modifiziert nach McGhie und Walton (2007). Acy-Gly = Anthocyan glycosid, Acy = Anthocyanidin; Acy-methyl = methylierter Anthocyanmetabolit; Acy-Gluc = glucuronidierter Anthocyanmetabolit; SGLT = natriumabhängiger Glucosetransporter; LPH = Lactase-Phloridzinhydrolase.

Die bereits im Magen absorbierten Anthocyane werden zum Teil in der Leber methyliert bzw. glucuronidiert (first-pass Metabolismus) und gelangen anschließend ins Blut bzw. im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufs über die Galle in den Dünndarm (McGhie und Walton 2007).

Über den Metabolismus der anderen Flavonoidklassen im Magen ist wenig bekannt (Manach *et al.* 2004; McGhie und Walton 2007). Experimente mit Ratten



zeigten, dass die Aglycone Quercetin und Daidzein im Magen absorbiert wurden, jedoch nicht ihre Glycoside (Piskula *et al.* 1999; Crespy *et al.* 2002). Der Großteil der Polyphenolglycoside erwies sich gegenüber saurer Hydrolyse als resistent, passierte den Magen und erreichte über den Zwölffingerdarm den Dünndarm (Gee *et al.* 1998).

### 1.3.2 Dünndarm

Aglycone und Glucoside werden nach der Magenpassage im Dünndarm absorbiert (Manach *et al.* 1995; Hollman *et al.* 1997). Aufgrund einer größeren Austauschfläche bzw. Dichte von Transportsystemen finden im Dünndarm mehr absorptive Vorgänge als im Dickdarm statt. Quercetinglucoside werden im Dünndarm sogar besser absorbiert als ihre Aglycone (Hollman *et al.* 1995; Morand *et al.* 2000). Der dieser gesteigerten Effizienz zugrunde liegende Mechanismus basiert auf einem natrium-abhängigen Glucosetransporter (SGLT) zum Transfer der Glucoside in die Enterozyten und anschließender zellulärer Hydrolyse durch eine cytosolische  $\beta$ -Glucosidase (CBG) (Hollman *et al.* 1995; Day *et al.* 1998). Des Weiteren wird bei der Absorption von Flavonoiden auch der Lactase-Phloridzinhydrolase (LPH), einer Glucosidase der Bürstensaummembran des Dünndarms, eine wichtige Rolle zugesprochen. Sie katalysiert nachweislich die extrazelluläre Hydrolyse von Glucosiden, gefolgt von passiver Diffusion des Aglycons durch die Bürstensaummembran (Day *et al.* 2000).

Rhamnoside, aber auch Arabinoside und Xyloside zeigten im Dünndarm gegen Absorption und Metabolismus durch die Mikroflora erhöhte Resistenz (Manach *et al.* 1995; Hollman *et al.* 1997). Diesen Effekt bestätigte eine in unserem Arbeitskreis vor kurzem durchgeführte Studie mit Ileostomaprobanden, in welcher nach Einnahme von Apfelsaft und Heidelbeeren in Abhängigkeit vom Zuckerrest unterschiedliche Gehalte an Quercetinglycosiden und Anthocyanen im Dünndarminhalt wiedergefunden wurden (Kahle *et al.* 2006). Die Absorption der Anthocyane im Dünndarm ist noch ungeklärt, aber die oben dargestellten Mechanismen (SGLT, LPH) werden auch für sie diskutiert. Die im Dünndarm absorbierten Verbindungen werden zum Teil in der Leber methyliert bzw. glucuronidiert (first-pass Metabolismus) und gelangen anschließend ins Blut bzw. im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufs über die Galle wieder

zurück in den Dünndarm. Nicht im Dünndarm absorbierte Polyphenole gelangen in den Dickdarm.

### 1.3.3 Dickdarm

Die Polyphenolkonzentrationen im Dickdarm können mehrere  $\mu\text{M}$  betragen (Scalbert und Williamson 2000); Polyphenole wurden neben Carotinoiden als die einzigen im Dickdarm vorkommenden Antioxidantien angesehen. Die Mikroflora des Dickdarms hydrolysiert vorhandene Polyphenolglycoside und baut die entstehenden Aglycone zu einer Reihe aromatischer Säuren ab (Kuehnau 1976; Scheline 1991). Die Aglycone werden dabei durch Öffnung des Heterozyklus an verschiedenen Positionen gespalten. Aus Flavonolen entstehen dabei vor allem Hydroxyphenylelessigsäuren, aus Flavonen und Flavanonen Hydroxyphenylpropionsäuren, aus Flavanolen Phenylvalerolactone und Hydroxyphenylsäuren, und aus Anthocyanen werden verschiedene Phenolcarbonsäuren sowie entsprechende Aldehyde gebildet (Manach *et al.* 2004; Keppler und Humpf 2005). Die Metabolite können weiter zu Benzoesäurederivaten abgebaut werden. Die entstandenen mikrobiellen Endprodukte werden absorbiert und in der Leber mit Glycin, Glucuronsäure oder Sulfat konjugiert. Die Metabolismuswege sind in Tiermodellen ausführlich untersucht worden; der Einfluss der chemischen Struktur auf den Abbau ist bekannt. Beispielsweise werden Verbindungen, deren Hydroxylgruppe in Position 5, 7 oder 4' konjugiert ist, nicht gespalten (Griffiths und Smith 1972). Humanstudien sind jedoch seltener, und individuelle Unterschiede, Einfluss der Mikroflora und Bedeutung der Ernährung auf die Produktion der mikrobiellen Metabolite müssen noch genauer untersucht werden.

### 1.3.4 Konjugation der absorbierten Metabolite

Nach Absorption und kurzem Transport im Blut (s. Abschnitt 1.3.5) werden Polyphenole vor allem in Leber und Niere methyliert, sulfatiert oder glucuronidiert. Die Methylierung wird von der Catechol-*O*-methyltransferase katalysiert. Dabei erfolgt der Transfer einer Methylgruppe vom S-Adenosyl-L-methionin auf Polyphenole mit einer *o*-Diphenol-(Catechol) Struktur. Diese Reaktion ist für Quercetin, Catechin,

Kaffeensäure, Luteolin, Cyanidin und Peonidin im Menschen gezeigt (Wu *et al.* 2002). Die Catechol-*O*-methyltransferase-Aktivität ist in Leber und Niere am höchsten und wurde auch im Dünndarm von Ratten nachgewiesen (Tilgmann und Ulmanen 1996; Piskula und Terao 1998; Donovan *et al.* 2001). Sulfotransferasen katalysieren den Transfer einer Sulfatgruppe von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat auf Hydroxylgruppen von verschiedensten Substraten (Steroide, Gallensäuren, Polyphenole, etc.) fast ausschließlich in der Leber (Falany 1997; Piskula und Terao 1998). UDP-Glucuronosyltransferasen sind membrangebundene Enzyme, die im endoplasmatischen Retikulum vieler Gewebe lokalisiert sind. Sie katalysieren den Transfer einer Glucuronsäure-Einheit von UDP-Glucuronsäure auf u.a Steroide, Gallensäuren und Polyphenole. Die Polyphenole werden vermutlich in den Enterozyten glucuronidiert, bevor sie in der Leber weiter konjugiert werden (Sfakianos *et al.* 1997; Spencer *et al.* 1999; Crespy *et al.* 2001; Boersma *et al.* 2002). Der größte Teil der in der Dünndarmmucosa gebildeten Flavonoidglucuronide wird jedoch zurück ins Darmlumen sekretiert, wodurch deren Absorptionsrate vermindert wird (Crespy *et al.* 1999; Andlauer *et al.* 2000). Die weitere Metabolisierung der Glucuronide in der Leber ist noch nicht geklärt. Vermutlich erfolgt nach Methylierung des Catecholrests die Deglucuronidierung und Sulfatierung an Position C3'.

### 1.3.5 Plasmatransport

Polyphenole und deren Metabolite liegen im Blut nicht in freier Form vor. *In vitro*-Inkubationen von Quercetin und dessen Metaboliten mit menschlichem Plasma zeigten, dass Quercetin stark an Plasmaproteine bindet (99%) (Boulton *et al.* 1998). Für die Bindung ist vor allem Serumalbumin verantwortlich. Der Grad der Bindung hat Konsequenzen für die Verfügbarkeit der Polyphenole und entsprechender Metabolite in Zellen und Geweben (Boulton *et al.* 1998). Der Effekt einer Sulfatierung oder Glucuronidierung auf die Bindung an Albumin ist noch nicht geklärt. Ein Einfluß der Position der Konjugation wird diskutiert. Es ist allgemein anerkannt, dass der Grad der zellulären Aufnahme proportional zur ungebundenen Konzentration der Metabolite ist. Der Effekt der Albuminbindung auf die biologische Aktivität von Polyphenolen ist noch unzureichend untersucht (Manach *et al.* 2004). Es stellt sich daher

die Frage, ob der proteingebundene Ligand noch über eine biologische Aktivität verfügt oder ob Polyphenole nur in ungebundener Form aktiv sind. Dangles *et al.* (1999) zeigten, dass der Catecholrest des albumingebundenen Quercetins für oxidierende Verbindungen wie Perjodat verfügbar bleibt.

### 1.3.6 Aufnahme in das Gewebe

Daten über Konzentration und Aktivität der Polyphenole in menschlichen Geweben sind bislang noch limitiert. Bei Studien an Ratten und Mäusen wurden Polyphenole u.a. in Gehirn, Herz, Niere, Milz, Pankreas und Prostata detektiert (Ueno *et al.* 1983; Suganuma *et al.* 1998; Youdim *et al.* 2000; Datla *et al.* 2001; Abd El Mohsen *et al.* 2002; Mullen, Graf *et al.* 2002; Vitrac *et al.* 2003). Die Konzentrationen in diesen Geweben variierten von 30 bis 3000 ng Aglyconäquivalent/g Gewebe in Abhängigkeit von der verabreichten Dosis und dem untersuchten Gewebe. Die wenigen Studien zeigen zum Einen, dass die Plasmakonzentrationen nicht direkt mit den Konzentrationen in den Zielgeweben korrelieren, und zum Anderen, dass die Verteilung zwischen Blut und Gewebe von Polyphenol zu Polyphenol unterschiedlich ist.

### 1.3.7 Ausscheidung

Die Eliminierung der Polyphenolmetabolite erfolgt über die Galle und den Urin. Mehrfach konjugierte Metabolite werden vor allem über die Galle ausgeschieden, während die Ausscheidung kleinerer Konjugate wie z.B. Monosulfate vornehmlich über den Urin erfolgt (Crespy *et al.* 2003). Die Ausscheidung von Polyphenolen über die Galle ist bisher nur in Ratten untersucht worden (Sfakianos *et al.* 1997; Kohri *et al.* 2001). Aufgrund der bei Ratten fehlenden Gallenblase ist eine Übertragung auf den Menschen nicht gewährleistet. Für Flavanone und Isoflavone betrug die Plasmakonzentration 4-30% bzw. 16-66% der zugeführten Menge, während Anthocyane und Flavonole mit 0,005-0,1% bzw. 0,3-1,4% der Zufuhr wesentlich geringere Plasmakonzentrationen aufwiesen (Manach *et al.* 2004). Diese geringen Werte könnten mit einer Ausscheidung über die Galle oder intensiven Metabolisierung der Verbindungen einhergehen. Da die Halbwertszeiten für den Verbleib von Anthocyanen und Flavono-

nolen im Plasma bei ca. 2 h liegen, kann eine Aufrechterhaltung hoher Konzentration der Polyphenolmetaboliten im Plasma nur mit einem dauerhaften Konsum von polyphenolhaltigen Produkten erreicht werden (Manach *et al.* 2004).

## 1.4 Biologische Effekte von Polyphenolen

Die protektiven Effekte von Polyphenolen in höheren Pflanzen (u.a. Fraßschutz, Schutz vor UV-Strahlung) sind schon seit langem bekannt. Das Interesse an den Wirkungen der Polyphenole im Menschen ist seit dem Phänomen des „French Paradoxons“ (geringes Herzinfarkttrisiko trotz hoher Zufuhr an gesättigten Fettsäuren) (Renaud und Delorgeril 1992), welches mit hohem Rotweinverzehr in Zusammenhang gebracht wird, gestiegen. Infolgedessen wurden die biologischen Effekte von Polyphenolen u.a. *in vitro* mit isolierten Enzymen, kultivierten Zellen oder Geweben untersucht. Sehr wenig ist über die *in vivo*-Situation und die Wirkungen der entsprechenden Metabolite bekannt (Manach *et al.* 2004).

In letzter Zeit wurden die protektiven Effekte von Polyphenolen vermehrt mit dem Schutz vor durch oxidativen Stress bedingten Krankheiten, wie kardiovaskulären Erkrankungen, Alzheimer sowie entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung gebracht (Dryden *et al.* 2006). Als Grundlage für die protektiven Effekte geht man meist von den antioxidativen Wirkungen der Polyphenole aus (Pietta 2000).

Im Folgenden werden die antioxidativen Effekte, die Rolle von Polyphenolen bezüglich gastrointestinaler Erkrankungen und die Wechselwirkung mit Enzymsystemen kurz dargestellt.

### 1.4.1 Antioxidative Effekte

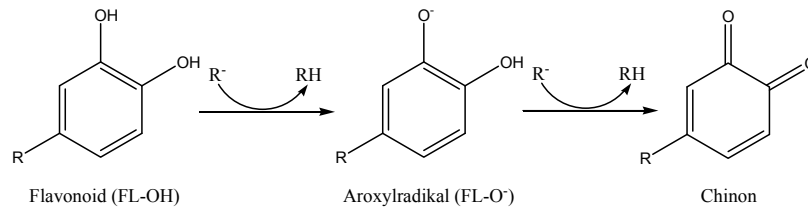
Der menschliche Körper unterliegt ständig dem Einfluss reaktiver Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies (ROS bzw. RNS), die sowohl endogen als auch exogen entstehen können. Endogene Reaktanden werden bei bestimmten, im Körper ablaufenden Prozessen wie Zellatmung, Entzündungsreaktionen oder Abbau von DNA-Basen gebildet.

Exogen entstehen ROS bzw. RNS unter dem Einfluss von Faktoren wie UV-Strahlung, Chemikalien oder Zigarettenrauch (Kohen und Nyska 2002; Kuhn Merrily 2003). Zu diesen reaktiven Intermediaten zählen freie Radikale (u.a. das Hydroxylradikal), das Superoxidradikalanion, das Stickstoffdioxidradikal aber auch nicht radikalische Verbindungen wie Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid, Ozon und Peroxynitrit (Halliwell 1997).

Der Körper des Menschen setzt enzymatische (Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase) und nichtenzymatische (Antioxidantien wie z.B.  $\beta$ -Carotin,  $\alpha$ -Tocopherol und L-Ascorbinsäure) Schutzmechanismen zur Beseitigung der reaktiven Oxidantien ein (Chandra *et al.* 2000; Finkel und Holbrook 2000). Wird das Gleichgewicht zwischen Bildung und Eliminierung der ROS zu Gunsten der Bildung verschoben, spricht man von oxidativem Stress (Sies 1991). Zellmembranen, DNA und Proteine sind Zielstrukturen der überschüssigen reaktiven Sauerstoffspezies und werden in Oxidationsreaktionen modifiziert und somit in ihrer Funktion beeinträchtigt. Oxidativer Stress wird bereits seit Jahren mit zahlreichen Erkrankungen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Alzheimer und entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung gebracht (Spector 1995; Halliwell 1996).

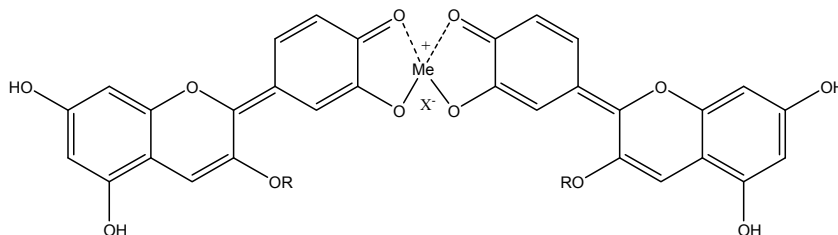
Wie bereits erwähnt, wird die Mehrzahl der gesundheitsfördernden Effekte von Polyphenolen auf deren antioxidative Eigenschaften zurückgeführt (Rice-Evans *et al.* 1996; Bagchi *et al.* 1997; Hagerman *et al.* 1998; Plumb *et al.* 1998). Aufgrund ihrer niedrigen Redoxpotentiale sind vor allem die Flavonoide in der Lage, reaktive ROS bzw. RNS durch Abgabe eines Wasserstoffatoms zu reduzieren und damit zu deaktivieren (Abbildung 11) (Rice-Evans *et al.* 1995; van Acker *et al.* 1996; Bors *et al.* 1998; Pietta 2000). Das intermediäre Aroxyradikal kann durch Abfangen weiterer Radikale in die stabile Chinon-Struktur übergehen (Abbildung 11) (Pietta 2000). Wesentliche strukturelle Voraussetzungen für die Radikalfängereigenschaft am Flavonoidgrundgerüst sind nach aktuellem Kenntnisstand orthoständige Hydroxylgruppen am B-Ring, eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 und eine Carbonylgruppe an C4. Das Zusammenspiel dieser Strukturelemente ermöglicht eine Elek-

tronendelokalisierung über das gesamte Ringsystem und damit eine Stabilisierung des Radikals. Zusätzliche Hydroxylgruppen an C3 und C5 erhöhen die Stabilität des Flavonoidradikals und somit das Radikalfängerpotential (Butkovic *et al.* 2004).



**Abbildung 11:** Deaktivierungsreaktion reaktiver Radikale durch Flavonoide, Schema modifiziert nach Pietta (2000) und Rice-Evans (2001).

Flavonoide inaktivieren neben ROS und RNS auch metallische Prooxidantien wie Eisen- und Kupferionen durch Bildung von stabilen Flavonoid-Chelatkomplexen (Abbildung 12) (Noda *et al.* 2002). Dadurch erfolgt u.a. die Inhibierung der Lipidperoxidation und der Lipoxygenasereaktion. Eine Verringerung der Lipidperoxidation und der Oxidation von Low-Density Lipoproteinen (LDL) wurde *in vitro* (Satue-Gracia *et al.* 1997; Noda *et al.* 2002) und *in vivo* (da Silva *et al.* 1998) beobachtet.



**Abbildung 12:** Flavonoid-Chelatkomplex mit Metallionen (Me<sup>+</sup>) nach Belitz und Grosch (2001).

Sowohl Catechin als auch Quercetin wiesen *in vitro* und *in vivo* hohe Affinität zur Bildung von Kupfer- bzw. Eisen-Chelatkomplexe auf (Brown *et al.* 1998; Cheng und Breen 2000; Soczynska-Kordala *et al.* 2001; Mira *et al.* 2002).

## 1.4.2 Polyphenole und gastrointestinale Erkrankungen

Der Verdauungstrakt ist anfällig für Krankheiten wie akuter Durchfall, Magengeschwüre, entzündliche Darmerkrankungen (*Morbus Crohn*, *Colitis ulcerosa*) und Krebs bzw. Krebsvorstufen. Polyphenole sollten u.a. aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften im Intestinaltrakt präventiv oder gegebenenfalls auch therapeutisch gegen die genannten Krankheiten einsetzbar sein (Dryden *et al.* 2005).

### 1.4.2.1 Akuter Durchfall

Ein Polyphenolextrakt aus Äpfeln inhibierte dosisabhängig eine mit Choleratoxin induzierte Diarrhö (Saito *et al.* 2002). Der geprüfte Extrakt, der vor allem hochpolymere Catechine enthielt, verminderte effektiv die Flüssigkeitssekretion. Diese Beobachtung bestätigte die Ergebnisse eines klinischen Versuchs, bei dem Patienten mit akuter Diarrhö tanninreiches Pulver aus Schalen von Früchten des Johanniskrautbaums (21,2% Polyphenole) verabreicht bekamen. (Loeb *et al.* 1989). Nach Aufnahme des Pulvers kam es 1.5 d früher als bei den Kontrollgruppen zum Stillstand der Diarrhö. Eine Vielzahl anderer gegen Diarrhö benutzter Formulierungen wurde auf aktive Komponenten untersucht, und Polyphenole wurden in diesem Zusammenhang wiederholt als aktive Moleküle identifiziert (Abdulrahman *et al.* 2004; Agbor Gabriel, *et al.* 2004).

### 1.4.2.2 Magengeschwür

*Helicobacter pylori* kann Magengeschwüre und in seltenen Fällen auch Magenkrebs verursachen. Während der *Helicobacter pylori*-Infektion kommt es zu oxidativem Stress und somit zur Schädigung der Magenschleimhaut (Lee *et al.* 2004). Zur Behandlung einer solchen Infektion werden im Allgemeinen Protonenpumpen-Inhibitoren, kombiniert mit Antibiotika eingesetzt. Die Behandlungsmethoden sind jedoch noch lückenhaft, weshalb weiterhin nach Alternativen gesucht wird. Aufgrund der antioxidativen und antiinflammatorischen Eigenschaften von Teepolyphenolen untersuchten Lee *et al.* (2004) die Effekte des Teeinhaltsstoffes Epigallocatechingallat.



Dazu wurden menschliche Magenkrebszellen mit *Helicobacter pylori* inkubiert. Bereits eine Vorbehandlung mit niedrigen Dosen Epigallocatechingallat verhinderte u.a. bakteriell induzierte Cytotoxizität, DNA-Schädigung und Apoptose.

#### 1.4.2.3 Entzündliche Darmerkrankungen

Sowohl Darmmucosazellen als auch aktivierte Neutrophile produzieren während der Entstehung von entzündlichen Darmerkrankungen (z.B. *Colitis ulcerosa*) freie Radikale (Dryden *et al.* 2005). Um diese Reaktionen zu verhindern, wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt.

Mazzon *et al.* (2005) untersuchten die Wirkung eines polyphenolreichen Tee-Extrakts auf eine mit 6-Dinitrobenzolsulfonsäure induzierte *Colitis ulcerosa* im Dickdarm von Ratten. Die Anwendung des Extrakts reduzierte dabei nachweislich den TNF („tumor necrosis factor“- $\alpha$ -Anteil und führte zu einem Anstieg des Hämoxxygenase-1-Gehalts, verbunden mit einer Linderung der entzündlichen Prozesse im Dickdarm.

Der Effekt von (-)-Epigallocatechin-3-gallat auf NF („nuclear factor“- $\kappa$ B in einer intestinalen Epithelzelllinie wurde von Yang *et al.* (2001) untersucht. (-)-Epigallocatechin-3-gallat inhibierte dosisabhängig die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und wirkte somit antiinflammatorisch.

In einer weiteren Tierstudie wurde *Colitis ulcerosa* induziert und mit Polyphenolen aus grünem Tee behandelt (Oz *et al.* 2005). Folgende Parameter verbesserten sich durch die Behandlung: Histologie des Dickdarms, Körpergewicht und Hämatokritwert. Zusätzlich waren ausgewählte Entzündungsmarker im Serum (Serumamyloid A und TNF- $\alpha$ ) der behandelten Tiere signifikant niedriger als in den unbehandelten Kontrollgruppen. Diese exemplarischen Studien zeigen, dass oral verabreichte, antioxidativ wirksame Substanzen wie Polyphenole positive Effekte auf Entzündungen der gastrointestinale Mucosa haben können.

#### 1.4.2.4 Krebserkrankungen des Verdauungstraktes

Darmkrebs ist in Deutschland die zweithäufigste Krebserkrankung, an der mehr als 6% der Bevölkerung erkranken. Man geht davon aus, dass in den westlichen Industrieländern Ernährungsfaktoren bei der Entstehung von Krebs mit eine Rolle spielen können (Ju *et al.* 2003). So erhöht eine fettreiche Ernährung das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken u.a. durch Veränderungen des Arachidonsäuremetabolismus und Begünstigung entzündlicher Darmerkrankungen (s. Abschnitt A 1.4.2.3). Infolge dieser Prozesse kommt es vermehrt zu oxidativem Stress, der durch eine erhöhte Zufuhr von Antioxidantien beeinflusst werden kann. Tatsächlich ergaben epidemiologische Studien Hinweise auf protektive Effekte infolge einer polyphenolreichen Diät. Ji *et al.* (1997) führten eine entsprechende Studie über die Wirksamkeit eines erhöhten Konsums an grünem Tee auf Pankreasenzyme und Darmkrebs in China durch. Die Höhe des Konsums korrelierte invers mit dem Auftreten von Pankreas- und Darmkrebs. Diese Beobachtung wurde durch verschiedene Tierstudien bestätigt. Nach Azoxymethan-induziertem Kolonkrebs und nachfolgender Zufuhr von grünem Tee wurden sowohl in der Kolonmucosa als auch den Tumoren von Ratten Phospholipase A<sub>2</sub>-Aktivität, Cyclooxygenase-2-Expression, Lipooxygenaseaktivität und das Auftreten anormaler Kryptenherde („aberrant crypt foci“: früheste mikroskopisch fassbare Läsionen im Kolon und Rektum) untersucht (Ju *et al.* 2003). Nach Gabe von grünem Tee erfolgte eine Reduktion der Phospholipase A<sub>2</sub>- und 5-Lipooxygenase-Aktivität, womit eine Abnahme des Leukotrien B<sub>4</sub>-Anteils um 90% verbunden war. Auch die Zahl der „aberrant crypt foci“ nahm aufgrund des Teekonsums ab.

#### 1.4.3 Wechselwirkung mit Enzymsystemen

Im vorangegangenen Abschnitt sind bereits Beispiele aufgeführt, bei denen Polyphenole nachweislich im Humanstoffwechsel wichtige Enzyme beeinflussten. Einen Überblick über die Hemmung einer weiteren Reihe von Enzymen durch Flavonoide gibt Tabelle 3. Besonders hervorzuheben wegen ihrer Bedeutung im humanen Organismus sind Wechselwirkungen mit der Cytochrom P450 (CYP)-Enzymfamilie (Phase-I Enzyme), den Phase-II Enzymen und der Cyclooxygenase (COX) bzw. Lipooxyge-

nase (LOX). Die Wechselwirkung der drei erstgenannten Enzyme mit Flavonoiden wird im Folgenden kurz erläutert; auf Interaktionen von Polyphenolen mit LOX wird im Abschnitt A 3.5 näher eingegangen.

**Tabelle 3:** Hemmung von Enzymen durch Flavonoide, modifiziert nach Middleton *et al.* (2000).

Enzym	Flavonoid
Proteintyrosinkinase	Genistein, Quercetin
Proteinkinase C	Fisetin, Quercetin, Luteolin
Phospholipase A2	Quercetin
Lipoxygenase	sh. 3.5
Cyclooxygenase	Prodelphinidin B-4 3'-O-gallat, Quercetin
Xanthinoxidase	Quercetin, Luteolin
Topoisomerasen	Genistein, Fisetin, Quercetin
RNA- und DNA-Polymerasen	Quercetin, Kaempferol, Fisetin, Chrysin
Amylasen	Quercetin
Malatdehydrogenase	Quercetin
Lactatdehydrogenase	Quercetin
Pyruvatkinase	Quercetin
Alkohol- und Aldehyddehydrogenase	Daidzein
Ornithindecaboxylase	Quercetin
Histidin- und DOPA-Decarboxylase	Quercetin, (+)-Catechin
Reverse Transkriptasen	Quercetin, Baicalein, Myricetin
HIV-1-Proteinase	Myricetin, Morin, Quercetin, Fisetin
HIV-1-Integrase	Quercetin
Hyaluronidase	Kaempferol
ATPase	Quercetin
Adenylatzyklase	Chrysin, Apigenin
Gluthation-S-Transferase	Quercetin
CYP-Familie	u.a. Naringenin, Baicalein, Galangin

CYP P450-Enzyme sind als Phase-I Enzyme am Metabolismus vieler Xenobiotika beteiligt. Dabei können sie reaktive Sauerstoffverbindungen freisetzen und in Sekundärreaktionen z.B. polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) oder Nitrosamine zu genotoxischen Verbindungen aktivieren. Flavonoide inhibieren CYP-Enzyme direkt, fangen reaktive O<sub>2</sub>-Verbindungen ab und zeigen so antimutagene Wirkung (Moon *et al.* 2006). Darüber hinaus hemmen Flavone (Chrysin, Baicalein und Galangin), Flavanone (Naringenin) und Isoflavone (Genistein und Biochanin A) Aromatase CYP 19 und verringern dadurch die Estrogenbiosynthese – ein bei der Entwicklung von Brust- und Prostatakrebs zu diskutierender Effekt (Moon *et al.* 2006). Allerdings kann auch eine Aktivierung von CYP-Enzymen und somit eine erhöhte

Freisetzung von reaktiven Sauerstoffverbindungen kann durch Flavonoide erfolgen, was am Beispiel von Flavonen, Flavanonen und CYP 1A bzw. CYP 2B in Ratten gezeigt worden ist (Siess *et al.* 1996).

Weitere Beispiele für die Inhibierung oder Induktion von CYP-Enzymen durch Flavonoide beschreiben Studien von Kay und Holub (2006) und Moon *et al.* (2006). Phase-II Enzyme wie UDP-Glucuronyltransferase, Glutathion-S-Transferase und Chinonreduktase werden durch Flavonoide aktiviert. Es wird vermutet, dass die Induktion der Phase-II Enzyme dabei ihren Ursprung in der durch Flavonoide hervorgerufenen Toxizität hat. Polyphenole können im Organismus prokanzerogene Chinone bilden, die von der Chinonreduktase metabolisiert und damit von der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen abgehalten werden. Die Aufnahme von Flavonoiden aktiviert diese Phase-II Enzyme primär zu deren Metabolisierung und Exkretion, bedingt dadurch aber eine generelle Steigerung des Abwehrsystems gegen weitere Kanzerogene (Scalbert *et al.* 2005). Weiterhin stellen zahlreiche Flavonoide (z.B. Fisetin, Galangin, Quercetin, Kämpferol und Genistein) wirksame nichtkompetitive Inhibitoren der Sulfotransferase 1A1 dar (Moon *et al.* 2006).

Die Hemmung von Enzymen des Arachidonsäuremetabolismus durch Polyphenole ist bedeutsam für die Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen und die Bildung von Tumoren. Die durch COX und LOX katalysierte Peroxidierung von Arachidonsäure (AA) führt potentiell zu einer Vielzahl von Genotoxinen, deren DNA-Addukte als ein Schritt im Prozess der Karzinogenese angesehen werden (Blair *et al.* 2006).

Ebenso bedeutend wie die Bildung von Lipidhydroperoxiden ist die metabolische Umsetzung der AA durch COXs und LOXs zu den physiologisch aktiven Eicosanoiden (COXs: Endoperoxide, Prostaglandine, Thromboxane, Prostacycline; LOXs: Leukotriene, Hepoxiline, Trioxiline, Lipoxine). Diese können als lokal wirkende Hormone unterschiedliche Zellantworten auslösen. In der Pathogenese von Herz-Kreislauf-erkrankungen stehen insbesondere die Thromboxane und Leukotriene im Mittelpunkt des Interesses. Die Thromboxane A<sub>2</sub> und B<sub>2</sub> wirken zum Einen gefäßverengend

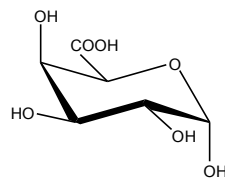
und zum Anderen stark proaggregatorisch auf die Blutplättchen. Somit steigt die Gefahr einer Thrombenbildung und damit die eines Herzinfarktes oder Schlaganfalls erheblich (Löffler und Petrides 1998). Verschiedene Luteolinderivate inhibierten nachweislich COX und verringerten dadurch die Synthese von Thromboxan B<sub>2</sub> (Odontuya *et al.* 2005). Weitere Studien zur Modulation der Arachidonsäurekaskade durch Flavonoide wurden von Schneider und Bucar (2005) und Werz (2007) zusammengefasst.

## 2 D-Galacturonsäure und Pektin

### 2.1 D-Galacturonsäure

D-Galacturonsäure zeigt Mutarotation und liegt bevorzugt in der dargestellten  $\alpha$ -pyranoiden Form vor (Abbildung 13). Als solche ist sie Bestandteil vieler saurer Oligo- und Polysaccharide, von denen einige als Verdickungsmittel und Geliermittel bei der Lebensmittelherstellung verwendet werden (Pektin, s. Abschnitt A 2.2; Tragant, Karaya-Gummi). Die Gewinnung von D-Galacturonsäure erfolgt durch enzymatische Hydrolyse von Pektin.

Mit Hilfe von Farbreagenzien wie Naphthalin-1,3-diol (Tollens-Reagenz) oder Carbazol läßt sich D-Galacturonsäure qualitativ und quantitativ erfassen. Zusätzlich kann dies auch enzymatisch erfolgen (Eisenbrand *et al.* 2006).



**Abbildung 13:** Struktur von  $\alpha$ -D-Galacturonsäure.

Über den intestinalen Metabolismus von  $\alpha$ -D-Galacturonsäure ist bisher noch nichts bekannt.

## 2.2 Pektin

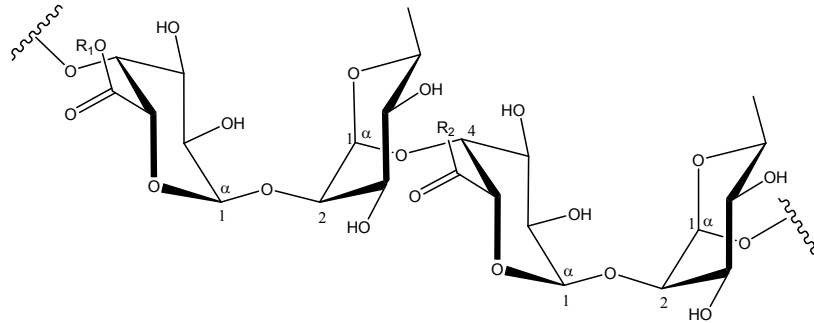
### 2.2.1 Allgemeines

Pektine sind hochmolekulare glycosidische Pflanzeninhaltsstoffe, die in Früchten, Wurzeln und Blättern weit verbreitet sind. Die Pektine bestehen im Wesentlichen aus Ketten von 1,4- $\alpha$ -glycosidisch verbundenen Galacturonsäure-Einheiten, deren Säuregruppen zu 20-80% mit Methanol (MeOH) verestert sind. Man unterscheidet zwischen hochveresterten (HV-Pektine, > 50%) und niedrigveresterten Pektinen (NV-Pektine, < 50%) (Abbildung 14). Durch Esterhydrolyse erhält man Pektinsäure (Polygalacturonsäure) und durch deren Salzbildung Pektate (Eisenbrand *et al.* 2006).

Obst-Pektin enthält 95%, Rüben-Pektin bis zu 85% D-Galacturonsäure, der Rest besteht aus anderen Zuckereinheiten (s. Abschnitt A 2.2.2). Die Molmassen der verschiedenen Pektine variieren zwischen 10 und 500 kDa. Die Struktureigenschaften sind stark vom Polymerisationsgrad abhängig. So bilden z.B. die Obst-Pektine in getrocknetem Zustand Fasern, während die Flachs-Pektine eine feinkörnige, pulvrige Textur aufweisen (Eisenbrand *et al.* 2006).

### 2.2.2 Struktur

Pektine verfügen über keine exakt festgelegte Struktur (Pérez *et al.* 2000). Der Hauptanteil wird von homopolymeren, partiell methylierten  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-Galacturonsäure-Resten („smooth region“) gebildet (Abbildung 14), die von sogenannten „hairy regions“ mit alternierenden  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)-L-Rhamnosyl- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-Galacturonosyl-Sektionen ergänzt werden. Diese Verzweigungsstellen mit meist neutralen Seitenketten (1–20 Reste) enthalten vorwiegend L-Arabinose und D-Galactose als Zuckereinheit (Rhamnogalacturonan I). Auch sogenannte Rhamnogalacturonan-II-Seitenketten, die andere Reste wie D-Xylose, L-Fucose, D-Glucuronsäure, D-Apiose, 3-Desoxy-D-manno-2-octulosonsäure und 3-Desoxy-D-lyxo-2-heptulosonsäure enthalten, tragen zur Strukturbildung der Pektine bei (Pérez *et al.* 2003).



**Abbildung 14:** Grundstruktur des Pektinmoleküls, modifiziert nach Eisenbrand *et al.* (2006); HV- und NV-Pektin:  $R_1=H$ ,  $R_2=OCH_3$ ; amidiertes Pektin:  $R_1=H$ ,  $R_2=NH_2$ .

### 2.2.3 Vorkommen

Pektin kommt in der Natur hauptsächlich in folgenden Formen vor:

- a.) gelöst im Zellsaft,
- b.) als unlösliches Calcium-Pektat in der Mittellamelle der Zellwände,
- c.) als unlösliches, wahrscheinlich mit Calcium-, Magnesium- und Phosphat-Ionen vernetztes Protopektin in der primären Zellmembran.

Der Pektingehalt in Früchten kann stark variieren: Äpfel 1-1,5%, Aprikosen 1%, Kirsche 0,4%, Apfelsine 0,9-3,5%, Möhren 1,4%, Orangenschalen und Zitronenschalen 30%, Apfeltrester 15% (Eisenbrand *et al.* 2006).

### 2.2.4 Funktionen

Pektine fungieren in der Pflanze hauptsächlich als Gerüst- und Kittsubstanzen, sie gewährleisten dadurch den Zusammenhalt der Zellen im Gewebsverband. Werden Pektine durch Einwirkung Pektin-spaltender Enzyme lysiert, resultiert ein Gewebszerfall in der Pflanze. Der Pektingehalt der Pflanzen ist großen Schwankungen unterworfen; er ist in jungen, unverholzten Pflanzenteile am höchsten (Eisenbrand *et al.* 2006).

### 2.2.5 Gewinnung

Pektin wird aus Schalen von Citrusfrüchten (Orangen, Grapefruit, Limone) und Apfeltrester nach Trocknung bei 80-100°C und Extraktion mit Säure (pH 1,5-3,5) gewonnen. Der Extrakt wird filtriert, adsorptiv gereinigt und im Vakuum bis auf 8-12% Trockensubstanz konzentriert. Aus dem Konzentrat wird Pektin a) durch organische Lösemittel (Ethanol, Isopropanol, Aceton) oder b) durch Aluminiumsalze als unlösliches Aluminium-Pektat gefällt. Durch Filtration und Trocknung erhält man bei a) HV-Pektin, bei b) wird das Aluminium-Pektat mit angesäuerten organischen Lösemitteln in das freie Pektin überführt, wobei man ebenfalls ein HV-Pektin erhält. Durch Behandlung mit Säuren, Alkalien oder Enzymen erhält man NV-Pektin. Die Entesterung mit alkoholischem Ammoniumhydroxid führt zur Bildung von amidiertem Pektin (AP, E 440b) (Eisenbrand *et al.* 2006).

### 2.2.6 Gelbildungseigenschaften

Durch Wasserstoffbrückenbindungen kommt es in Teilbereichen der hochveresterten Pektin-Kette zu Assoziationen, wodurch sich ein dreidimensionales Netzwerk ausbildet. Die Unregelmäßigkeiten im Molekül, hervorgerufen durch Zuckereinheiten wie L-Rhamnose, bewirken nur kurze Haftstellen, deren Stabilisierung durch Herabsetzen der Wasseraktivität und Dissoziation vermindert werden muss. Beides gelingt durch Zusatz von Zucker (z.B. Saccharose) und Säure (Fruchtsäuren wie Citronensäure und Äpfelsäure). Allgemein unterscheidet man schnell gelierendes Pektin (20-70 s) mit einem Veresterungsgrad zwischen 72% und 74%, normal gelierendes Pektin (100-140 s) mit 68-71% Veresterungsgrad und langsam gelierendes Pektin (180-250 s) mit 61-68% Veresterungsgrad. Die Gele der hochveresterten Pektine sind nicht hitzereversibel (Eisenbrand *et al.* 2006).

Niedrigveresterte Pektine (20-45%) benötigen zur Gelbildung zweiwertige Kationen, welche mit den Carboxy- und Hydroxylgruppen der durch axial-axial Bindung verknüpften Galacturonsäurebausteine Kettenassoziate nach dem Egg-Box-Modell bilden. Calcium-Ionen müssen im Unterschuss bleiben und dürfen nur langsam mit dem



Pektin-Molekül reagieren. Letzteres wird durch Verwendung von unlöslichen Calciumsalzen wie Citrat oder Phosphat erreicht. Bei Calcium-Pektinaten handelt es sich um hitzereversible Gele (Eisenbrand *et al.* 2006).

Amidierte Pektine nehmen hinsichtlich ihrer Gelbildungseigenschaften eine Mittelstellung ein; sie benötigen zwar Calcium-Ionen, neigen aber bei Calcium-Überschuss nicht zur Koagulation (Eisenbrand *et al.* 2006).

### **2.2.7 Verwendung**

Die technisch wichtigste Eigenschaft der Pektine ist ihre Fähigkeit zur Bildung von Gelen. Die hochveresterten Pektine liefern in saurer (pH 3-5), wässriger Lösung nach Zusatz von ca. 60-65% Zucker (und gegebenenfalls Säuren) klare, feste Gele. Diese Eigenschaft der Pektine wird zur Herstellung von Obstgelees, Marmeladen und Konfitüren und beim Eindicken von Einmachgut aller Art genutzt, indem man während des Kochens durch Zusatz von Pektin-Extrakten (Gelierpulver) oder vorgemischtem Gelierzucker ein Gelieren herbeiführt. Bei niederveresterten Pektinen ist die Gelbildung weitgehend unabhängig vom Zuckergehalt und Säuregehalt, erfordert dagegen die Anwesenheit von Calcium-Ionen. Pektine werden – meist in amidierter Form – z.B. zur Herstellung nährstoffreduzierter, diätetischer Konfitüren und Marmeladen, für Tortenguß, zur Gelierung von Milchdesserts und als Verdickungsmittel und Schutzkolloid für Emulsionen in der Lebensmittel-, Pharma- und Kosmetikindustrie verwendet. Weiterhin finden Pektine Verwendung als Stabilisatoren für Speiseeis sowie als Komplexbildner zur Entgiftung bei Schwermetallvergiftungen (Eisenbrand *et al.* 2006).

### **2.2.8 Metabolismus**

Da Pektin als bekannter physiologisch aktiver Bestandteil der Ballaststoffe gilt (Lim *et al.* 2005; Young Graeme, Hu *et al.* 2005), wurde der intestinale Metabolismus von HV- und NV-Pektin bereits mehrfach untersucht. Saito *et al.* (2005) und Dongowski *et al.* (2002) haben allerdings widersprüchliche Ergebnisse erzielt. Im Gegensatz dazu gibt es nahezu keine Informationen über den Metabolismus von amidiertem Pektin

(Gulfi *et al.* 2006) und D-Galacturonsäure - dem Monomer und gleichzeitig Hauptmetaboliten des Pektins (s. Abschnitt A 2.1). Pektin wird partiell oder vollständig durch die Mikroflora des Dickdarms abgebaut (Dongowski *et al.* 2002), wobei der Abbau ein mehrstufiger Prozess ist, der durch Demethylierung unter Einfluss von Pektinesterasen eingeleitet wird und zur Bildung von Pektinsäure führt. Diese wird durch die Enzyme Pektinlyase und endo- bzw. exo-Polygalacturonase depolymerisiert, wobei oligomere und monomere, gesättigte und ungesättigte Galacturonsäurereste entstehen. Die Oligomeren werden sukzessiv zu Monomeren abgebaut, die anschließend über den Embden-Meyerhof-Parnas- und den Pentosephosphat-Weg fermentiert und letztendlich zu kurzkettigen Fettsäuren (SCFA) (Acetat, Propionat, Butyrat und Valerat) und Gasen (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) als Endprodukte abgebaut werden (Dongowski *et al.* 2002).

### **2.2.9 Biologische Effekte**

Der anerkannt ernährungsphysiologische Nutzen der Pektine besteht in ihrer Funktion als Ballaststoffe. Einige neuere Untersuchungen deuten auf immunstimulierende Effekte der Pektine hin (Paulsen 2002). In der Medizin wird Pektin traditionell wegen seiner antidiuretischen Eigenschaften verabreicht. Des Weiteren werden dem Ballaststoff zahlreiche gesundheitsfördernde Effekte wie Wechselwirkung mit Gallensäuren und vor allem Senkung des Serum-Cholesterolspiegels zugeschrieben (Paulsen 2002). Die genannten Wirkungen kann Pektin nur als Makromolekül entfalten, wie von Dongowski *et al.* (2002) gezeigt worden ist.

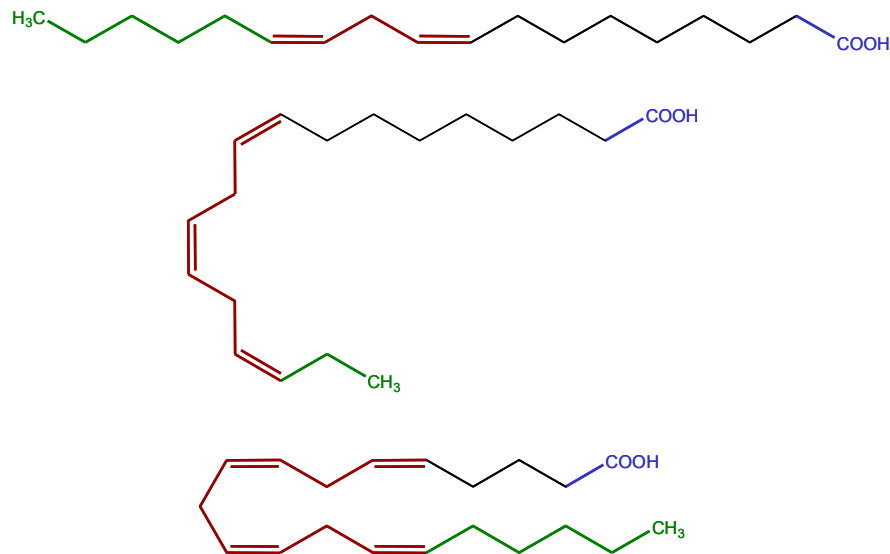
### 3 Lipoxygenase (LOX)

#### 3.1 Die LOX-Familie

##### 3.1.1 Vorkommen

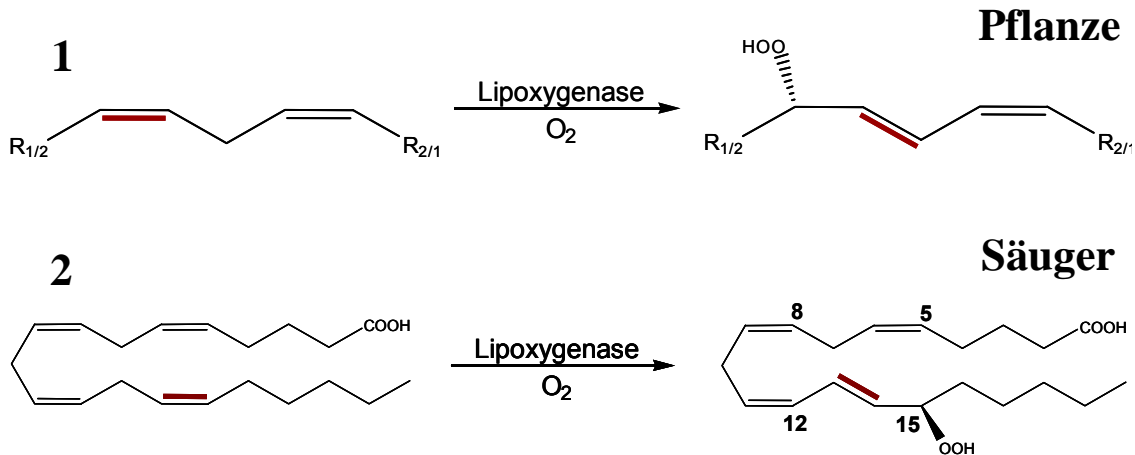
Lipoxygenasen (LOX) (EC 1.13.11.12) gehören zu den cytosolischen Enzymen und sind in Pflanzen, Pilzen, Tieren und Humangewebe weit verbreitet. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit 1,4-(Z,Z)-Pentadiensystem stellen Substrate für LOX-katalysierte Reaktionen dar (Abbildung 15) (Yamamoto *et al.* 1997; Grechkin 1998).

Höhere Pflanzen enthalten viele verschiedene LOX. So kommen allein in der Sojabohne (*Glycine max*) 8 Isoformen vor. In der Maus werden Lipoxygenaseproteine von 7 Genen exprimiert, und 5 homologe LOX wurden bereits im Menschen charakterisiert (Boeglin *et al.* 1998; Krieg *et al.* 1998; Sun *et al.* 1998).



**Abbildung 15:** Gemeinsame Strukturelemente von LOX-Substraten am Beispiel von Linol-, Linolen- und Arachidonsäure (von oben nach unten); ■: proximaler Rest (hydrophil) ■: distaler Rest (hydrophob), ■: Pentadiensystem.

In den folgenden Beispielen (Abbildung 16) ist die Umsetzung von 1,4-(Z,Z)-Pentadien-strukturierten Fettsäuren mit molekularem Sauerstoff zu Hydroperoxyfettsäuren dargestellt.



**Abbildung 16:** 1: Dioxygenierung 1,4-(Z,Z)-ungesättigter Fettsäuren durch LOX (für Linolsäure: R<sub>1</sub> (Methylende) = (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>Me; R<sub>2</sub> (Carboxylende) = (CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>COOH). 2: Dioxygenierung von Arachidonsäure durch 15-LOX. Modifiziert nach Brash (1999).

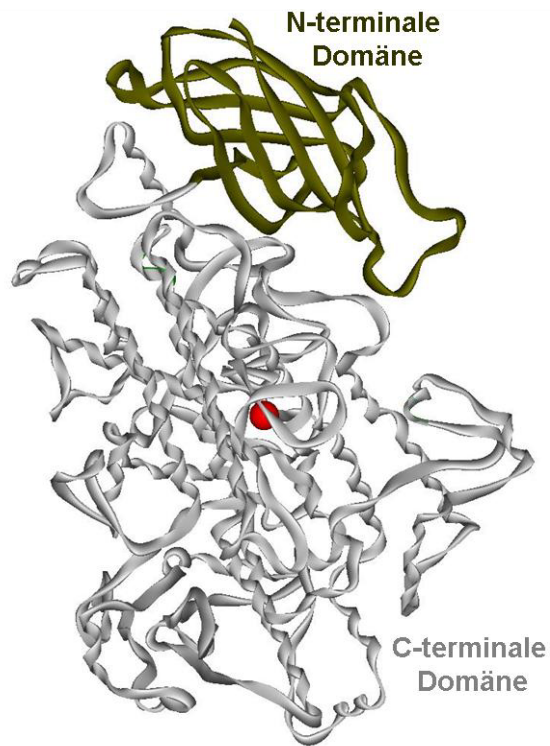
### 3.1.2 Nomenklatur

Die Nomenklatur basiert auf der Substratspezifität des Enzyms. Im Folgenden bedeutet dies, dass eine 12-LOX Arachidonsäure an C12 oxygeniert. Sofern erforderlich, wird zusätzlich die Stereoselektivität angegeben (12-(R)-LOX oder 12-(S)-LOX). Sollte mehr als ein 12-LOX-Typ in der selben Spezies vorkommt, wird nach dem Gewebe des Auftretens unterschieden (z.Bsp.: Blutplättchen-, Leukozyten- oder epidermale 12-LOX) (Yamamoto *et al.* 1997).

## 3.2 LOX-Katalyse

### 3.2.1 Enzymstruktur

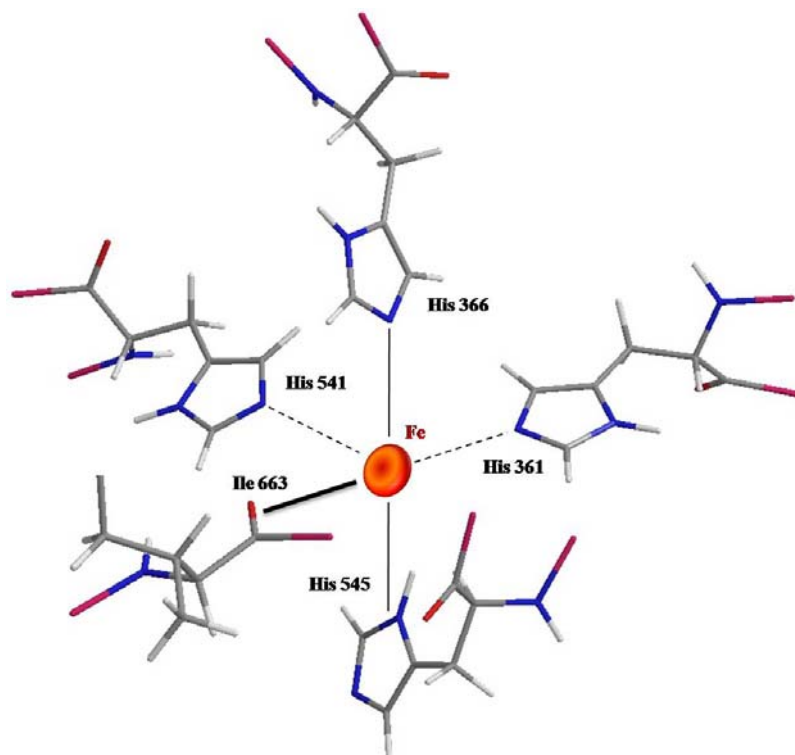
Das Lipoxygenaseprotein besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einer Molekularmasse von 75-80 kDa in Tieren (inklusive Mensch) und 94-104 kDa in Pflanzen.



**Abbildung 17:** Kristallstruktur der Soja LOX-1 modifiziert nach Youn *et al.* (2006). Die Quelldaten wurden von der Protein Data Base bezogen (PDB: 2IUJ). Die Visualisierung erfolgte durch Accelrys viewer lite 5.0 Software. Die N-terminale Domäne ist dunkelgrün und die C-terminale Domäne silbern gefärbt. Das Fe<sup>2+</sup>-Ion ist als rote Kugel dargestellt.

Das N-terminale Ende stellt eine  $\beta$ -Faltblattstruktur (8 Faltblätter) dar, die größere katalytische Domäne besteht aus  $\alpha$ -helicalen Einheiten (20-30 Helices) mit einem nicht-Häm Eisenatom als katalytischem Zentrum (Abbildung 17) (Brash 1999).

Die Liganden des Eisenatoms umfassen 4 Histidinreste und die Carboxylgruppe eines Isoleucinrests vom C-Terminus des Proteins. Die Aminosäurereste sind in Form einer Bipyramide octahedral um das Eisenatom angeordnet (Abbildung 18) (Brash 1999).



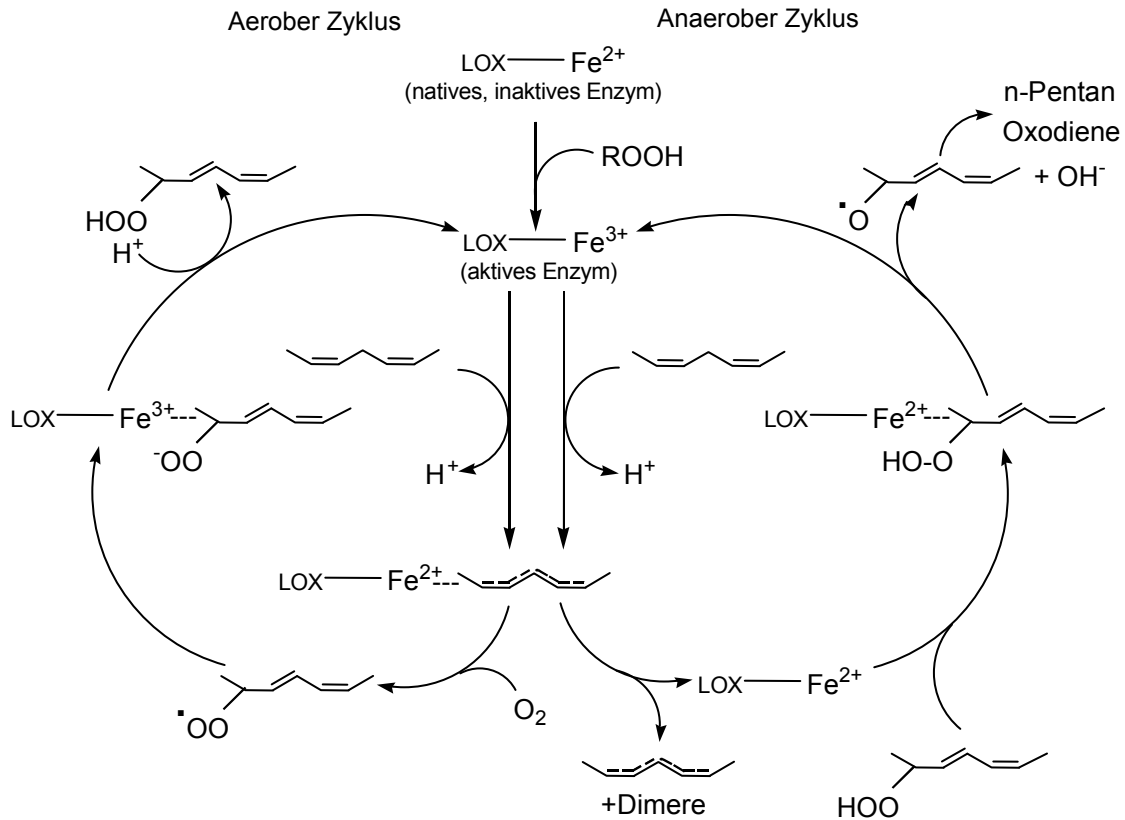
**Abbildung 18:** Anordnung der Liganden um das nicht-Häm Eisenatom der LOX modifiziert nach Gillmor *et al.* (1997). Die Visualisierung erfolgte durch ChemBioDraw 3D Ultra 9.0 Software. Darstellung im Stäbchenmodell. Grau: Kohlenstoffatome, Weiß: Wasserstoffatome, Blau: Stickstoffatome, Rot: Sauerstoffatome, Magenta: Rest.

Nach Isolierung des Enzyms liegt das Eisenatom üblicherweise in der inaktiven zweiwertigen Form vor. Bei der Katalyse wird das Eisen durch das Produkt oxidiert und so in die aktive  $\text{Fe}^{3+}$ -Form überführt (Produktaktivierung) (Abbildung 19). Von vier Isoformen sind die Kristallstrukturen bekannt: drei sind 15-LOX (Soja LOX-1 und zwei 15-LOX aus Kaninchen-Reticulozyten) (Boyington *et al.* 1993; Minor *et al.* 1996; Gillmor *et al.* 1997). Bei der vierten handelt es sich um Soja LOX-3, die eine unspezifische Peroxidation katalysiert (Skrzypczak-Jankun, *et al.* 1997). Trotz der aufgeklärten Kristallstrukturen ist weder bekannt, wie das Substrat zum katalytischen Zentrum gelangt, noch wie es zur Substratbindung kommt.

### 3.2.2 Mechanismus der LOX-Katalyse

Der Mechanismus der LOX-Katalyse ist bis heute noch nicht vollkommen geklärt. Experimentelle Befunde weisen auf einen Radikalmechanismus hin (Chamulitrat und

Mason 1989; Maccarrone *et al.* 1995). Nach dem in Abbildung 19 dargestellten Modell der LOX-Katalyse durchläuft das Enzym unter *aeroben Bedingungen* nach Produkt-Aktivierung einen Redoxzyklus, den man in fünf Schritte unterteilen kann:



**Abbildung 19:** Postulierter Reaktionsablauf der LOX-Katalyse: Dioxygenasereaktion (aerober Zyklus) und Hydroperoxidase-reaktion (anaerober Zyklus) modifiziert nach De Groot *et al.* (1975). Die Visualisierung erfolgte durch ChemDraw Ultra 9.0 Software.

1. Abstraktion eines H-Atoms der doppeltallylständigen Methylengruppe im Substrat unter Bildung eines Fettsäureradikals; Valenzwechsel von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$  im aktiven Zentrum.
2. Bildung des konjugierten Doppelbindungssystems verbunden mit Isomerisierung in die *E*-Form.
3. Insertion von molekularem Sauerstoff unter Bildung eines Peroxyradikals.
4. Oxidation des Eisens von  $\text{Fe}^{2+}$  zu  $\text{Fe}^{3+}$ , zugleich Reduktion des Fettsäureradikals zum Anion.

5. Freisetzung der aktiven  $\text{Fe}^{3+}$ -Form und Bildung des Hydroperoxids durch Protonierung.

Sinkt die  $\text{O}_2$ -Konzentration während der Katalyse, treten Dioxygenase- und Hydroperoxidase-reaktion in Konkurrenz zueinander auf. Bei der Hydroperoxidase-reaktion handelt es sich um einen *anaerob verlaufenden Mechanismus* (Ludwig *et al.* 1987). Das Eisen im aktiven Zentrum des Enzyms absolviert einen Redoxzyklus, in dessen Verlauf ein Pentadienylradikal aus einem Fettsäuremolekül sowie ein Alkoxyradikal aus einem Hydroperoxid freigesetzt werden (Garssen *et al.* 1972; Verhagen *et al.* 1977). Analog zur Dioxygenase-reaktion wird aus der doppeltallylständigen Methylen-gruppe eines Fettsäuremoleküls ein H-Atom abstrahiert. Aufgrund des Sauerstoffmangels findet jedoch keine Sauerstoffinsertion, sondern die Dissoziation des Fettsäureradikals aus dem Enzym-Fettsäureradikal-Komplex statt. Durch Reaktion zweier Radikale entstehen Fettsäuredimere. Durch Reaktion der inaktiven  $\text{Fe}^{2+}$ -Form des Enzyms mit einem Fettsäurehydroperoxid werden Hydroxyionen und Alkoxyradikale, die wiederum zu Oxodienen und n-Pentan zerfallen können, gebildet. Dabei wird die inaktive  $\text{Fe}^{2+}$ -Form zur aktiven  $\text{Fe}^{3+}$ -Spezies oxidiert und kann erneut einen Katalysezyklus durchlaufen (Roth 1998).

Die LOX-katalysierte Dioxygenierung verläuft sowohl regio- als auch enantioselektiv. Typ-I LOX wie Soja LOX-1, Kartoffel- oder Weizen-LOX zeichnen sich durch ihre hohe Regio- und Stereoselektivität aus, d.h. sie bilden eines der beiden Regioisomere in enantiomerenreiner Form. Typ-II LOX wie Soja LOX-2 und -3 hingegen zeigen kaum Selektivität: die Regioisomere und Enantiomere werden in vergleichbaren Mengen gebildet (van Os *et al.* 1979). Mit Ausnahme der Biosynthese (*R*)-konfigurierter Hydroperoxide durch die Koralle *Pseudoplexaura porosa* wird für alle bisher untersuchten Typ-I LOX die stereoselektive Bildung (*S*)-konfigurierter Hydroperoxide beschrieben (Bundy *et al.* 1986).



### 3.3 Übernahme des Substrats

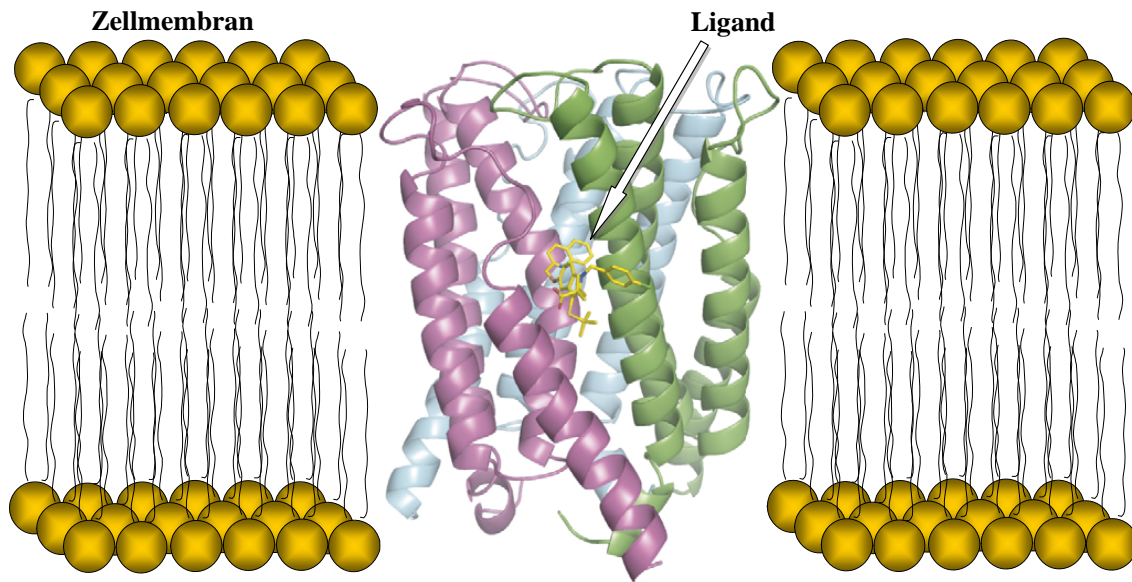
#### 3.3.1 Einfluss der Proteinstruktur

Die  $\beta$ -Fallblattstruktur der LOX (Abbildung 17) besitzt signifikante Homologie zu einer Domäne am C-Terminus der Säuger-Lipasen (Gillmor *et al.* 1997). Analog zur LOX sind Lipasen cytosolische Enzyme, die nur an der Grenzfläche Wasser/Lipid aktiv sind und sich daher im hydrophoben Umfeld des Substrats vor entsprechender Umsetzung erst Zugang verschaffen müssen. Diese Funktion der Anlagerung an der Phasengrenze übernimmt nachweislich eine Domäne mit  $\beta$ -Faltblattstruktur, die dem Enzym über Protein-Protein und hydrophobe Wechselwirkungen mit Lipoproteinpartikeln Zugang zum Substrat verschafft (Gillmor *et al.* 1997). Bei LOX ist diese Funktion zwar noch nicht vollständig bewiesen, wird aber aufgrund der Homologie der beiden Domänen angenommen.

#### 3.3.2 5-LOX und five-LOX-activating Protein (FLAP)

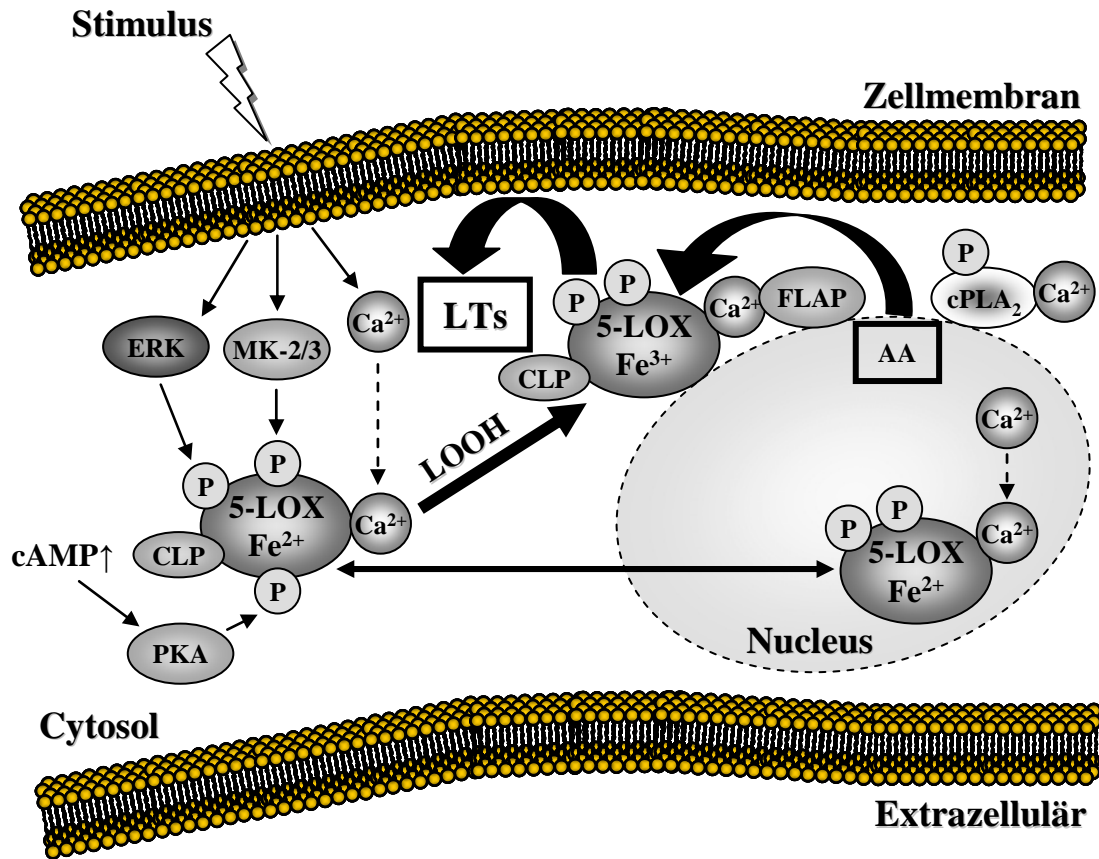
Bei der leukozytären 5-LOX wurden Wechselwirkungen mit dem Substrat bisher am besten untersucht (Abbildung 21).

Dabei immobilisiert die 5-LOX das Substrat über eine komplexe Protein-Protein Interaktion mit dem „five-lipoxygenase activating protein“ (FLAP), welches ein 18-kDa großes integrales Membranprotein darstellt (Struktur s. Abbildung 20) (Evans *et al.* 2008).



**Abbildung 20:** Struktur des „five-lipoxygenase activating proteins“ (FLAP) im Komplex mit MK-591 modifiziert nach Evans *et al.* (2008). Die einzelnen Monomere des FLAP-Trimers sind grün, blau und violett dargestellt. Der Blick zeigt das Protein integriert in die angedeutete Zellkernmembran. Das MK-591-Molekül ist als Stäbchenmodell dargestellt.

Nach Stimulation der Zelle kommt es vermehrt zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisierung und Aktivierung der „mitogen-activated protein kinase“ (MK-2/3) bzw. der „extracellular-signal regulated kinase“ (ERK). Beide Kinasen aktivieren die 5-LOX durch Phosphorylierung, während parallel dazu Fettsäurehydroperoxide (LOOH) das Eisen im aktiven Zentrum oxidieren. Nachdem AA durch die cytosolische Phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) aus der Zellmembran freigesetzt wird, präsentiert FLAP, das selbst keine enzymatische Wirkung besitzt, das Substrat der 5-LOX (Mancini *et al.* 1993) (Abbildung 21). Bis dato wurden drei weitere Proteine identifiziert, die mit 5-LOX in Wechselwirkung treten und an der Regulierung bzw. Lokalisierung des Enzyms am Zellkern beteiligt sind. FLAP gehört jedoch zu den bislang am besten untersuchten (Provost *et al.* 1999).



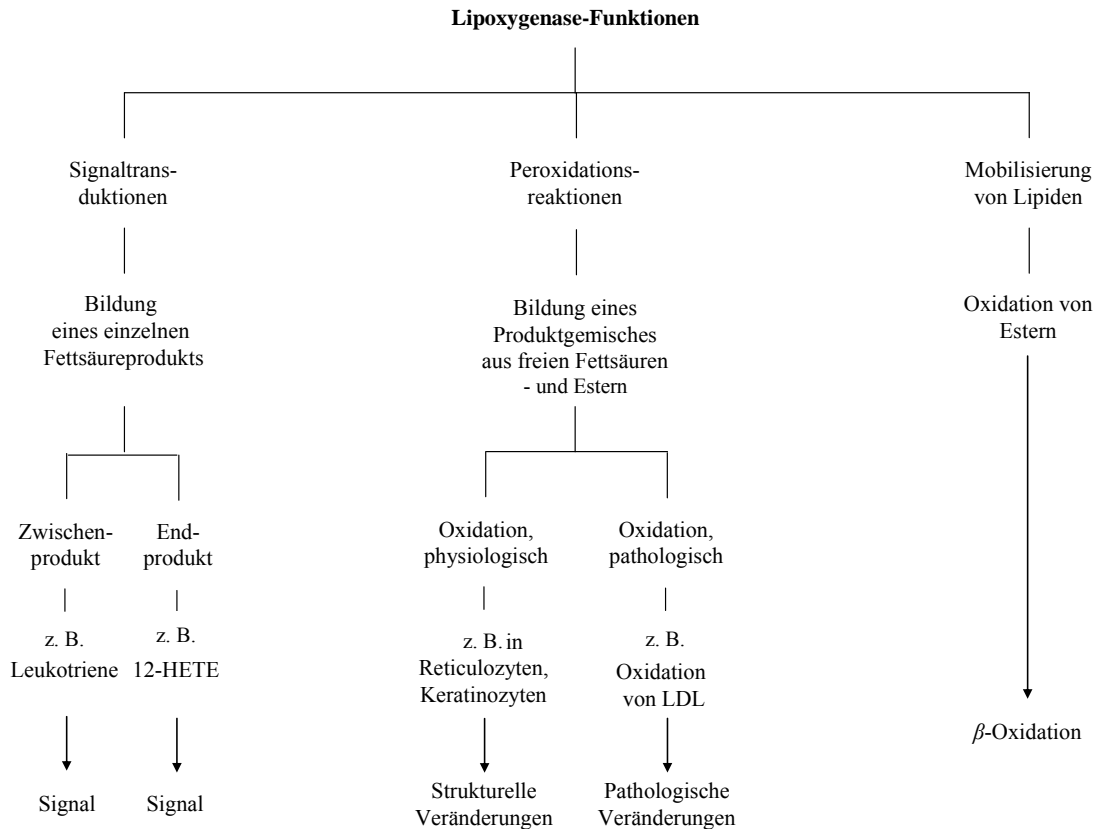
**Abbildung 21:** Aktivierung und Bereitstellung des Substrats in Leukozyten modifiziert nach Werz (2007). cAMP: cytosolisches Adenosinmonophosphat, PKA: Proteinkinase A, CLP: „coactosine-like protein“, ERK: „extracellular-signal regulated kinase“, P: Phosphat, MK-2/3: „mitogen-activated protein kinase“, LOOH: Fettsäurehydroperoxid, LTs: Leukotriene, FLAP: „five-lipoxygenase activating protein“, AA: Arachidonsäure, cPLA<sub>2</sub>: cytosolische Phospholipase A<sub>2</sub>.

### 3.4 Die Rolle der LOX und ihrer Produkte *in vivo*

Die Funktionen der LOX und ihrer Produkte sind sehr vielfältig. Am besten untersucht ist die Bildung biologisch aktiver Verbindungen/Signalmoleküle. Abbildung 22 gibt einen Überblick über die biologischen Funktionen von Lipoxygenasen.

Ein Beispiel für ein durch LOX katalysiertes Endprodukt ist 12-Hydroxyeicosatetraen (12-HETE), das durch die 12-LOX der Blutplättchen generiert wird. LOX-Produkte wie 12-HETE können sehr schnell wirken. Schon im nanomolaren Bereich sind sie in der Lage, an Rezeptoren und Kanälen der Zelloberfläche zu binden und dort u.a. die

Neurotransmission und Zelladhäsion zu modulieren (Piomelli *et al.* 1987). Die 12-LOX ist aber auch fähig, ihre Wirkung über einen längeren Zeitraum zu entfalten und dabei Produkte zu bilden, die Effekte auf Zelldifferenzierung oder Zellüberleben ausüben (Yu, *et al.* 1995; Tang, *et al.* 1996).



**Abbildung 22:** Die biologischen Funktionen der LOX modifiziert nach (Brash 1999).

Wenn eine veresterte Fettsäure umgesetzt wird, werden Mischungen von Hydroperoxyprodukten gebildet, die durch Änderung der physikalischen Eigenschaften Membranstrukturen modifizieren können (Abbildung 22). Das Potential zur Veränderung der Membranstruktur wurde erstmals anhand von 15-LOX aus Säugetierreticulozyten und ihrer Funktion während der Zellalterung gezeigt (Rapoport und Schewe 1986). Während der Alterung von Keratinozyten und der Entwicklung von Epithelzellen der Linse wurde der gleiche Effekt beobachtet (Schewe und Kuhn 1991).

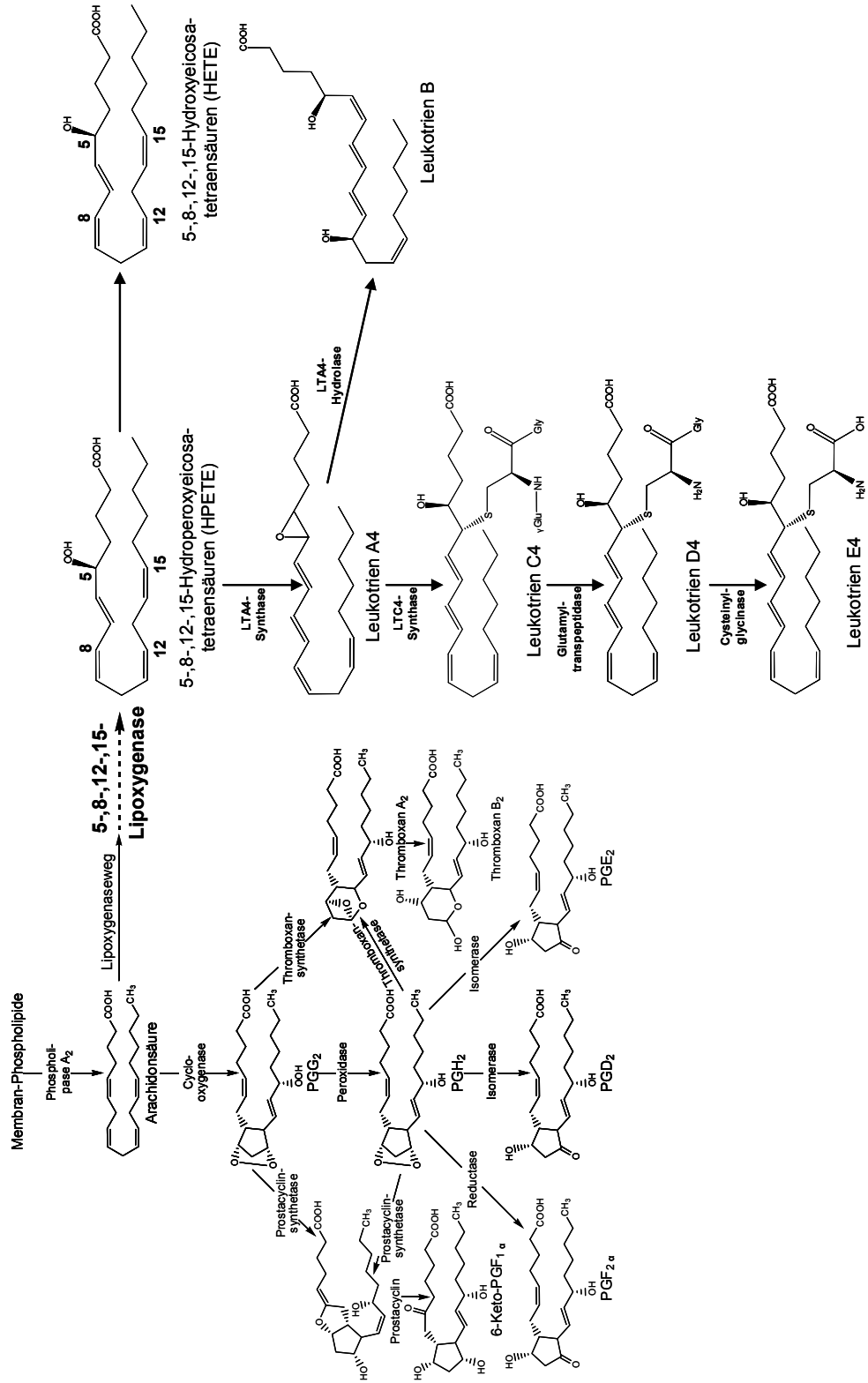


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Arachidonsäurekaskade.

Der komplexe, von Lipoxygenasen katalysierte Metabolismusweg wird im Menschen Arachidonsäurekaskade genannt und ist in Abbildung 23 schematisch dargestellt.

Dieser Mechanismus wird durch die Bereitstellung von AA aus Membranphospholipiden infolge enzymatischer Wirkung der cPLA<sub>2</sub> eingeleitet. Das Substrat AA steht nun zur oxidativen Umsetzung durch LOX bereit und kann in Hydroperoxyeicosatetraene (HPETE) umgewandelt werden. Durch die Leukotrien A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>)-Synthase entsteht nachfolgend LTA<sub>4</sub>, welches als zentrales Substrat für die LTA<sub>4</sub>-Hydrolase und die Leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>)-Synthase zur Verfügung steht. LTC<sub>4</sub> kann anschließend durch Peptidasen zu Leukotrien D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) und Leukotrien E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>) gespalten werden (Steinhilber 1994).

Im Folgenden wird die spezifische Bedeutung der wichtigsten humanen LOX-Isomere (5-, 12- und 15-LOX) und deren Produkte kurz zusammengefasst, ohne dass auf die vielfältigen Wechselwirkungen im Einzelnen eingegangen wird.

### **3.4.1 Pathophysiologische Bedeutung der 5-LOX**

Leukotriene vermitteln als Sekundärprodukte des 5-LOX-Weges akute Entzündungen sowie immunologische Reaktionen (Mayatepek und Hoffmann 1995; Heller *et al.* 1998). Besonders hervorzuhebende Entzündungsreaktionen sind hierbei rheumatoide Arthritis, Gicht, Schuppenflechte (*Psoriasis*), *Colitis ulcerosa* und *Morbus Crohn* (Ford-Hutchinson 1985). LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> werden auch unter dem Oberbegriff „slow reacting substance of anaphylaxis“ (SRS-A) zusammengefasst und sind wichtige Mediatoren des Immunsystems bei hypersensitiven Reaktionen; sie sind mitverantwortlich für die dabei auftretende Broncho- und Vasokonstriktion bei *Asthma bronchiale* (Crowther und Rees 2000).

### **3.4.2 Pathophysiologische Bedeutung der 12-LOX**

Für die 12-LOX ist eine Beteiligung an der Kanzerogenese, insbesondere der Metastasierung der Krebszellen (Honn *et al.* 1994), nachgewiesen worden, wobei speziell das

Verhältnis von 13-Hydroxyoctadecadiensäure (13-HODE) zu 15-Hydroxyeicosatetraen (15-HETE) von besonderer regulatorischer Bedeutung ist (Bastida *et al.* 1990). Des Weiteren ist die 12-LOX an der Entstehung von *Psoriasis* und neuronaler Degeneration beteiligt (Mueller 1994; Li *et al.* 1997). In Säugetieren wird die 12-LOX vornehmlich in Thrombozyten, Leukozyten und Hautzellen exprimiert.

### 3.4.3 Pathophysiologische Bedeutung der 15-LOX

Obwohl man die 15-LOX in einer Anzahl verschiedener Säugetierzellen nachgewiesen hat, ist die physiologische und pathophysiologische Bedeutung dieses Enzyms noch nicht völlig geklärt. Die Beteiligung der 15-LOX an immunologischen Reaktionen (Vanderhoek 1988), der endothelialen Zellproliferation (Setty *et al.* 1987), der Ausreifung von Blutzellen (Grulich *et al.* 2001) sowie der Arteriosklerose (Kuehn *et al.* 1997) gilt als gesichert. Ergebnisse von *in vitro*-Untersuchungen zeigten, dass die 15-LOX den Oxidationsprozess von LDL initiiert (Cathcart *et al.* 1991). Eine Inhibierung dieses Enzyms sollte demzufolge initial hemmend auf die Arteriosklerose wirken (Berliner und Heinecke 1996).

### 3.5 Polyphenole als LOX-Inhibitoren

Über natürliche LOX-Inhibitoren pflanzlichen Ursprungs gibt es eine Vielzahl von Informationen. Neben Chinonen, Triterpenen und Sesquiterpenen, Alkaloiden und Polyacetylenen stellen vor allem die Polyphenole (inklusive Flavonoide) eine Gruppe gut untersuchter LOX-Inhibitoren dar. Mechanistisch hemmen Polyphenole die LOX primär über die Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies, was auf ihr antioxidatives Potential zurückzuführen ist. Des Weiteren können die vicinalen Hydroxylgruppen der Polyphenole das Eisenatom des aktiven Zentrums der LOX chelieren (Werz 2007). In Tabelle 4 und 5 sind die IC<sub>50</sub> Werte (Versuche in intakten Zellen und im zellfreien System) von ausgewählten Polyphenolen und Flavonoiden nach 5-LOX-Inhibierung gezeigt. Eine Zusammenfassung der aktuellen Situation gibt Werz (2007).

**Tabelle 4:** Hemmung der 5-LOX durch Polyphenole (n.b. = nicht bestimmt) modifiziert nach Werz (2007).

Verbindung	IC <sub>50</sub> , intakte Zellen	IC <sub>50</sub> , zellfrei	Pflanze
Hydroxytyrosol	10-26 µM	13 µM	<i>Olea europaea</i>
Eugenol	20 µM	26 µM	<i>Syzygium aromaticum</i>
Kaffeensäure	n.b.	3,7 µM	<i>Artemisia rubripes</i>
Resveratrol	1,37-8,9 µM	n.b.	<i>Polygonum multiflorum</i>
Nordihydroguaretsäure (NDGA)	0,8 µM	28 µM	<i>Larrea divaricata</i>
Hyperforin	1,2 µM	0,09 µM	<i>Hypericum perforatum</i>
Curcumin	2,7 µM	0,7-30 µM	<i>Curcuma longa</i>
Gingerole	0,004-3 µM	n.b.	<i>Zingiber officinalis</i>

Polyphenole sind strukturell sehr unterschiedliche Verbindungen; dementsprechend variieren auch die IC<sub>50</sub>-Werte im Bereich von 0,004 bis 30 µM.

Flavonoide sind die bekannteste Gruppe bioaktiver Polyphenole, wobei viele von ihnen wirksame LOX-Hemmer sind (Tabelle 5). Die IC<sub>50</sub>-Werte zeigen eine Bandbreite von 0,09 bis 22 µM, mit Sophoraflavanon G als stärkstem Inhibitor.

**Tabelle 5:** Inhibition der 5-LOX durch Flavonoide (n.b. = nicht bestimmt) modifiziert nach Werz (2007).

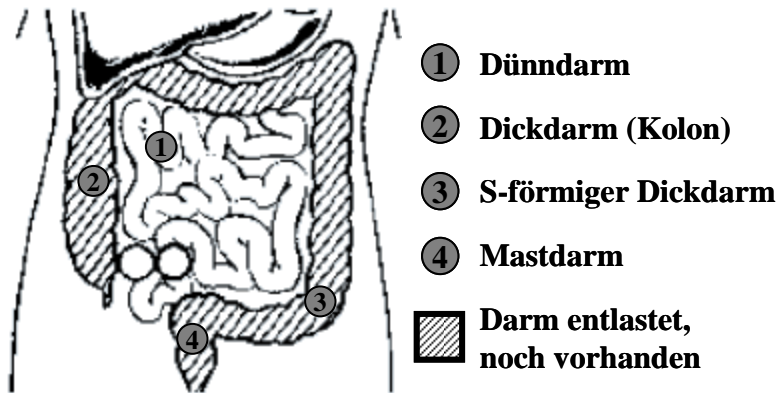
Verbindung	IC <sub>50</sub> , intakte Zellen	IC <sub>50</sub> , zellfrei	Pflanze
Quercetin	3,2 µM	0,3 µM, 25 µM	<i>Lonicera japonica</i> , ubiquitär
Myricetin	13 µM	n.b.	ubiquitär
Myricetin-3- <i>O</i> -β-D-glucuronid	0,1 µM (Ratte) 2,2 µM (Mensch)	n.b.	<i>Epilobium angustifolium</i>
Rhamnetin	0,7 µM	n.b.	<i>Guiera senegalensis</i>
5- <i>O</i> -Demethylnobiletin	0,35 µM	0,25 µM	<i>Sideritis tragoriganum</i>
Cirsiliol	0,4 µM	0,1 µM	<i>Salvia officinalis</i>
Baicalein	7,13-9,5 µM	n.b.	<i>Scutellaria baicalensis</i>
Luteolin	0,1 µM	n.b.	ubiquitär
Papyriflavanon	0,64 µM	7 µM	<i>Broussonetia papyrifera</i>
Sophoraflavanon G	n.b.	0,09-0,25 µM	<i>Sophora flavescens</i>
Epicatechin	n.b.	22 µM	<i>Erythroxylum coca</i>
Epigallocatechin	n.b.	< 30 µg/ml	<i>Camellia sinensis</i>



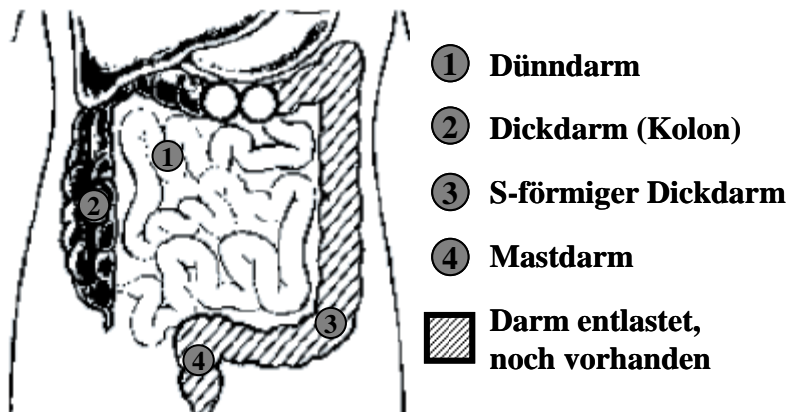
Überrschenderweise ist trotz der Fülle an Informationen über Polyphenole bzgl. der Wechselwirkung von Anthocyanen mit Lipoxygenase fast nichts bekannt. Lediglich Narayan *et al.* (1999) beschrieben eine schwache Inhibierung von Soja LOX-5 mit einem anthocyanhaltigen Pigment aus einer Zellkultur von schwarzen Karotten ( $IC_{50}$ : 5 M).

## 4 Ileo- und Kolostoma

Durch Studien mit Probanden, die einen künstlichen Darmausgang besitzen, hat man einen guten Zugang zur Mikroflora des Intestinums. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit neben Speichel und künstlichem Magensaft insbesondere auch Ileo- und Kolostomabeutelinhalt als Inkubationsmedien benutzt, um die Verfügbarkeit von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zu untersuchen. Der Name der beiden genannten künstlichen Darmausgänge kommt vom griechischen *Stoma* (Mund, Öffnung); er ist in der Medizin ein Sammelbegriff für einen stuhlableitenden künstlichen Ausgang. Dies kann, wie bereits erwähnt, ein Dickdarm- (Kolostoma) oder ein Dünndarmausgang (Ileostoma) sein. Ein Ileo- bzw. Kolostoma ist nötig, wenn der Darm aufgrund einer Erkrankung chirurgisch behandelt werden muss oder bestimmte Darmbereiche wegen Entzündungen von der Stuhlpassage ausgeschlossen werden sollen. Dies kann z.B. bei *Morbus Crohn*, *Colitis ulcerosa* oder der adenomatösen Polyposie der Fall sein. Durch einen chirurgischen Eingriff wird ein Teil des Darms mit einer Öffnung im Bauch verbunden, durch die der Stuhl abfließen kann. Operativ eingesetzte Stomatypen können das endständige Ileo- bzw. Kolostoma und das doppelläufige Ileo- bzw. Kolostoma sein. Beim doppelläufigen Stoma gibt es eine zuführende und eine abführende Schlinge zur Bauchdecke. Sinn und Zweck ist dabei die Entlastung des noch vorhandenen Darms. Dies gilt sowohl für doppelläufige Ileo- als auch doppelläufige Kolostomata (Abbildungen 24 und 25).

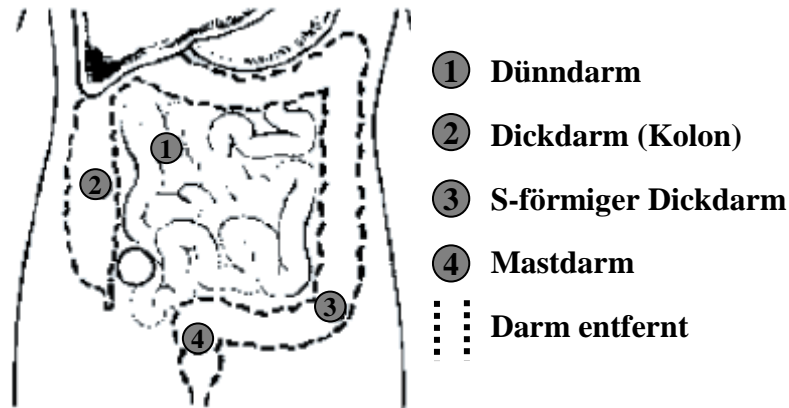


**Abbildung 24:** Darstellung eines doppelläufigen Ileostomas modifiziert nach Schürmann und Bauchredner (2001).



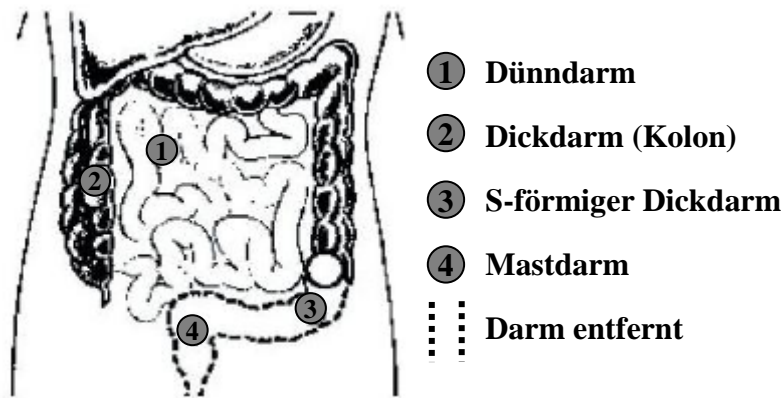
**Abbildung 25:** Darstellung eines doppelläufigen Kolostomas modifiziert nach Schürmann und Bauchredner (2001).

Für den Begriff endständiges (terminales) Kolostoma wird oftmals auch die Bezeichnung AP für *Anus praeter naturalis* (künstlicher Darmausgang) verwendet. Ein endständiges Ileostoma wird notwendig, wenn der gesamte Dickdarm auf Grund einer Erkrankung operativ entfernt werden muss oder ebenfalls eine Entlastung des noch vorhandenen Dickdarms erzielt werden soll. In Abbildung 26 ist ein endständiges Ileostoma schematisch dargestellt.



**Abbildung 26:** Darstellung eines endständigen Ileostomas modifiziert nach Schürmann und Bauchredner (2001).

Das endständige Kolostoma wird notwendig, wenn nur ein Teil des erkrankten Dickdarms entfernt werden muss oder bei entzündlichen Darmerkrankungen entlastet werden soll. Zu diesem Zweck wird der Dickdarm durch die Bauchdecke nach außen verlegt (Abbildung 27) (Schürmann und Bauchredner 2001).



**Abbildung 27:** Darstellung eines endständigen, linksseitigen Kolostomas modifiziert nach Schürmann und Bauchredner (2001).

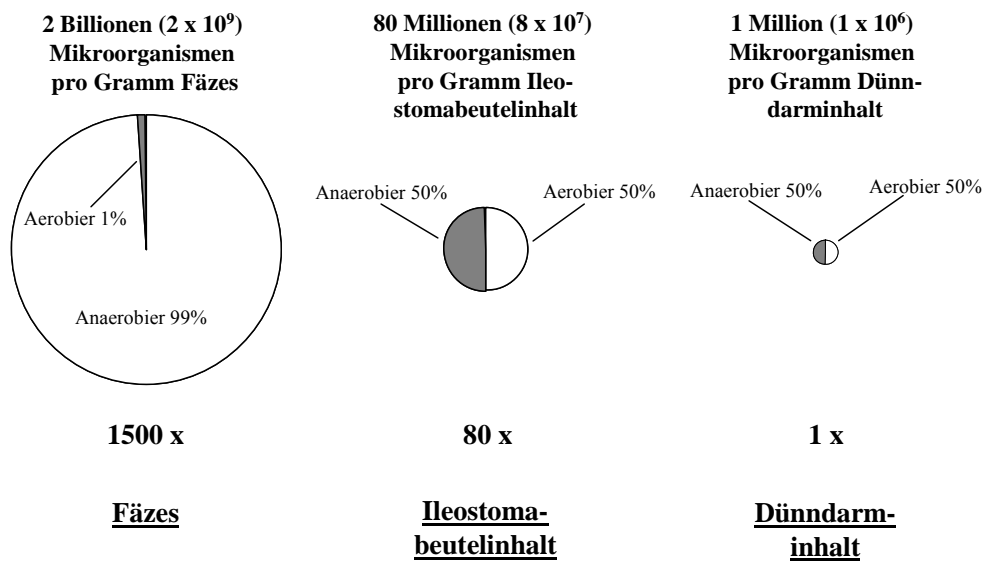
Die folgende Abbildung zeigt Stomabeutel, mit denen der ausfließende Darminhalt aufgefangen wird (Abbildung 28). Zur Anbringung der Beutel wird zuerst die in Abbildung 28 gezeigte Halterung auf die Bauchdecke angebracht und an dieser der Beutel aufgeklebt.



**Abbildung 28:** Stomabeutel und deren Anbringungshilfe.

Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Probanden hatten alle ein endständiges Ileo- bzw. Kolostoma (linksseitig).

Um das mikrobielle Potential von Stomabeutelinhalten zu zeigen, wurde die Mikroflora von Ileostomabeutelinhalten mit der von gesunden Probanden von Gorbach *et al.* (1967) verglichen. Um die Anzahl der Mikroorganismen zu bestimmen, wurden Fäzes-, Ileostomabeutel- und Dünndarmproben von je 30 Probanden untersucht.



**Abbildung 29:** Vergleich der gesamten Mikroorganismen in Fäzes, Ileostomabeutelinhalt und Dünndarminhalt modifiziert nach Gorbach *et al.* (1967).

---

Die Ermittlung der Keimzahlen ergab, dass in den Fäzes mit  $2 \times 10^9$  kolonienbildende Einheiten/g (KbE/g) die höchste Keimzahl vorlag, während die Ileostomabeutelinhalte mit  $8 \times 10^7$  KbE/g und die Inhalte von gesunden Dünndärmen mit  $1 \times 10^6$  KbE/g weniger Mikroorganismen enthielten (Abbildung 29) (Gorbach *et al.* 1967).

Die Keimzahlen lassen darauf schließen, dass Fäzes über ein größeres metabolisches Potential verfügen als der Dünndarminhalt. Desweiteren wies der Inhalt der Ileostomabeutel 80x höhere Keimzahlen als der Inhalt des gesunden Dünndarms auf. Die Fäzesproben enthielten mit 99% die meisten Anaerobier und mit 1% die wenigsten Aerobier, während sowohl die Stomabeutel- als auch die Dünndarminhalte je 50% enthielten.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass intestinale Inhalte signifikant hinsichtlich Anzahl und Art der Keime variieren. Desweiteren unterscheidet sich die Flora der Stomabeutel von der des gesunden Dünndarms, sie ist aber aufgrund der gleichen Verteilung der Keime (50% Anaerobier bzw. Aerobier) trotzdem mit dieser vergleichbar und somit als *ex-vivo*-Testsystem grundsätzlich geeignet (Gorbach *et al.* 1967).



## **B. Ergebnisse**

---





Wie einleitend ausgeführt wurde, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, anhand von *in vitro*- und *ex vivo*-Modellsystemen den intestinalen Metabolismus sowie die anti-inflammatorischen Eigenschaften ausgewählter sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe zu untersuchen, um eine Verbindung zwischen den bekannten *in vitro*-Effekten und der bislang weitgehend ungeklärten *in vivo*-Situation zu knüpfen. Zur Anwendung kamen humaner Speichel, künstlicher Magensaft, Ileo- und Kolostomabeutelinhalte, Soja LOX-1 sowie 5-LOX aus menschlichen neutrophilen Granulozyten.

Da Speichel und die *in vitro*-Modellsysteme Magensaft und Soja LOX-1 standardisierte Werkzeuge darstellen, wurden sie ohne vorherige Überprüfung direkt zu den Versuchen eingesetzt. Die *ex vivo*-Modellsysteme (Ileo- und Kolostomabeutelinhalte; 5-LOX aus menschlichen neutrophilen Granulozyten) wurden vor den Experimenten auf metabolische Kompetenz bzw. Zellvitalität überprüft.

## **1 Prüfung auf metabolische Kompetenz der verwendeten Ileo- und Kolostomabeutelinhalte**

Die verwendeten Stomabeutel stammten von 6 weiblichen Probanden, die 48 h vor den Versuchen auf polyphenol- bzw. pektin- oder galacturonsäurehaltige Nahrungsmittel verzichteten. Während des raschen Transports vom Probanden ins Labor wurden die Beutel kühl in einem Anaerobentopf gelagert (s. Abschnitt E 1.3-1.4).

### **1.1 System zum Nachweis von Enzymaktivitäten**

Im Rahmen der Charakterisierung der verwendeten humanen Stomabeutelinhalte wurden mit Hilfe des APIZYM<sup>TM</sup> Tests (Durchführung s. Abschnitt E 1.1) Profile der Enzymaktivitäten erstellt. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist in der Routineanalytik belegt. Bei dem schnell durchzuführenden Test wurden 19 verschiedene Enzymaktivitäten überprüft. Zur Auswertung dienten Farbreaktionen, die eine An- bzw. Abwesenheit bestimmter Enzyme bestätigten (Abbildung 30). Tabelle 6 gibt einen Überblick über die durchgeführten Testreaktionen sowie deren Ergebnisse für die Inhalte von sechs unterschiedlichen Stomabeutelinhalten. Der Test diente weiterhin als Positivkontrolle und wurde parallel zu den Inkubationsexperimenten durchgeführt.



**Abbildung 30:** Abbildung des APIZYM™-Teststreifens zum qualitativen Nachweis von Enzymaktivitäten (repräsentativ: Proband 2). Nummer 1: Kontrolle; die übrige Zuordnung Nummer – Enzymaktivität s. Tabelle 6.

**Tabelle 6:** Ergebnisse von Farbreaktionen zum Nachweis von Enzymaktivitäten in den verwendeten Ileo- und Kolostomabeutelinhalten (positiver (+) oder negativer (-) Ausgang der Farbreaktion).

Nr.	Enzymnachweis (APIZYM-Test)	Ileostomabeutelinhalte (1-3)			Kolostomabeutelinhalte (4-6)		
		Proband 1 <sup>a</sup>	Proband 2 <sup>a</sup>	Proband 3 <sup>a</sup>	Proband 4 <sup>a</sup>	Proband 5 <sup>a</sup>	Proband 6 <sup>a</sup>
2	Alkalische Phosphatase	+	+	+	+	+	+
3	Esterase (C4)	+	+	+	+	-	-
4	Esterase Lipase (C8)	+	+	+	+	+	-
5	Lipase (C14)	+	+	+	-	-	-
6	Leucin Arylamidase	+	+	+	-	-	-
7	Valin Arylamidase	+	+	+	-	-	-
8	Cystin Arylamidase	-	-	-	-	-	+
9	Trypsin	+	+	+	-	-	-
10	$\alpha$ -Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-
11	Saure Phosphatase	+	+	+	+	+	+
12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+	+	+
13	$\alpha$ -Galactosidase	-	+	-	+	+	+
14	$\beta$ -Galactosidase	+	+	+	+	+	+
15	$\beta$ -Glucuronidase	+	+	+	+	+	+
16	$\alpha$ -Glucosidase	+	+	+	+	+	+
17	$\beta$ -Glucosidase	+	+	-	+	+	+
18	N-acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase	+	-	-	+	+	+
19	$\alpha$ -Mannosidase	-	-	-	-	-	-
20	$\alpha$ -Fucosidase	-	-	-	+	+	-

## 1.2 Bestimmung der anaeroben Gesamtkeimzahl

Für die Bestimmung der anaeroben Gesamtkeimzahl erfolgten Kultivierungsversuche gemäß den im Abschnitt E 1.2 aufgeführten Angaben. Die Anzahl kolonienbildender Einheiten der Beutelinhalte der Probanden 1-6 nach 4-tägiger Bebrütung bei 37°C unter anaeroben Bedingungen ist Tabelle 7 zu entnehmen.

**Tabelle 7:** Anaerobe Keimzahlen der Ileo- und Kolostomabeutelinhalte

	Ileostomabeutelinhalte (1-3)			Kolostomabeutelinhalte (4-6)		
	Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 4	Proband 5	Proband 6
Anaerobe Keimzahl [KbE/g]	1,77E+08	1,36E+09	7,28E+08	4,20E+09	5,40E+09	6,40E+10

Wie dargestellt, zeigten die untersuchten Ileo- und Kolostomabeutelinhalte geeignete metabolische Kompetenz für nachfolgend beschriebene Anwendungen. Wie im Abschnitt B 2 beschrieben, wurden die Stomabeutelinhalte benutzt, um den Metabolismus ausgewählter, sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe zu untersuchen.

## 2 Untersuchung des Metabolismus von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen mit verschiedenen Modellsystemen

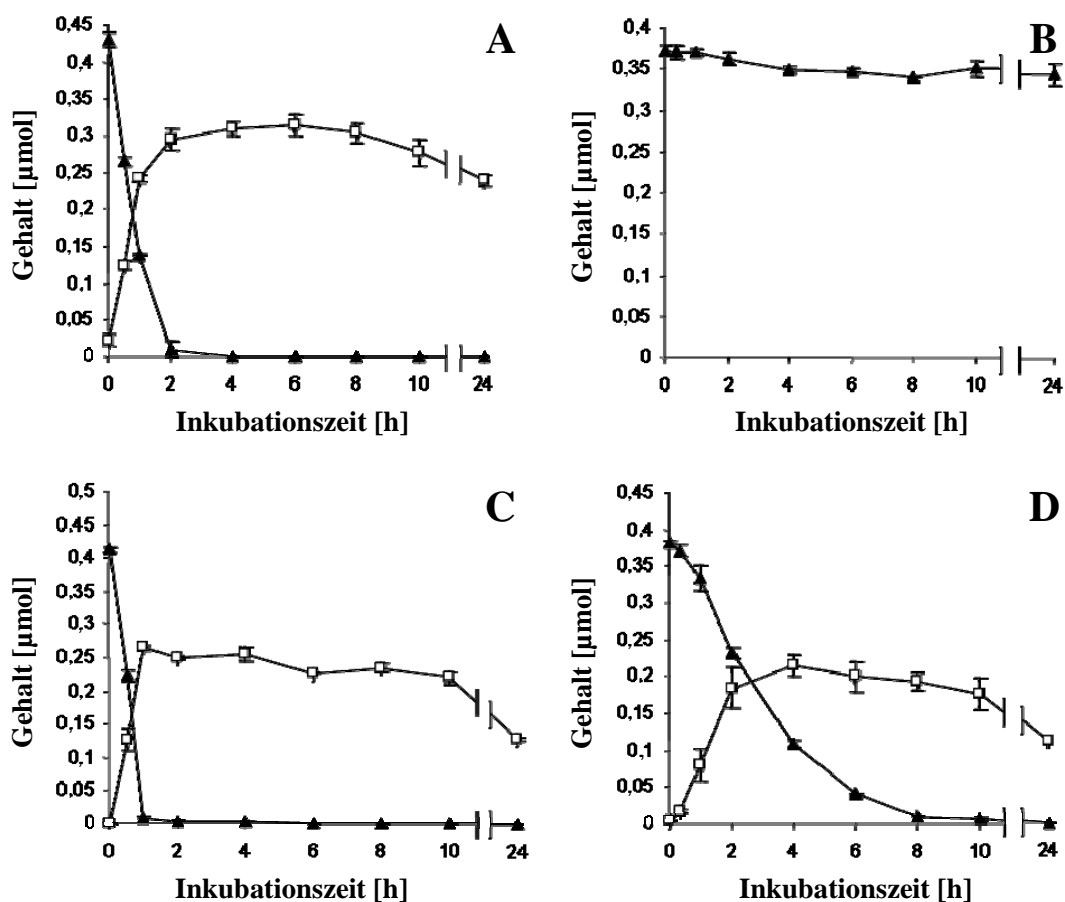
### 2.1 Inkubation von Apfelinhaltsstoffen mit Ileo- und Kolostomabeutelinhalten

#### 2.1.1 Einfluss des Zuckerrests, der Aglyconstruktur und der Mikroflorkonzentration auf die Hydrolyse von Phenolglycosiden im menschlichen Dünndarm

Quercetin- (**1b-f**) und *p*-Nitrophenolglycoside (**2b-f**) (hier: 3-*O*- $\beta$ -D-Glucoside (**1b**, **2b**), 3-*O*- $\beta$ -D-Galactoside (**1c**, **2c**), 3-*O*- $\alpha$ -L-Arabinoside (**1d**, **2d**), 3-*O*- $\beta$ -D-Xyloside (**1e**, **2e**) und 3-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnoside (**1f**, **2f**)) wurden unter anaeroben Bedingungen bei

37°C für 24 h mit den Ileostomabeutelinhalten von drei Probanden inkubiert (Durchführung s. Abschnitt E 2.1.1).

Repräsentativ für alle untersuchten Quercetin- (**1b-f**) und *p*-Nitrophenol-glycoside (**2b-f**) sind in Abbildung 31 die Abbaukurven von Quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid (Q3glc) (**1b**) (Bild A), Quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnosid (Q3rha) (**1f**) (Bild B), *p*-Nitrophenylglucosid (*p*-Npglc) (**2b**) (Bild C) und *p*-Nitrophenylrhamnosid (*p*-Np-rha) (**2f**) (Bild D) dargestellt. Q3glc (**1b**) wurde innerhalb von 2 h nahezu vollständig hydrolysiert. Das Aglykon erreichte nach 6 h ein Maximum von 0,3  $\mu$ mol und war bis zum Ende der Inkubation stabil. Q3rha (**1f**) erwies sich über den gesamten Inkubationszeitraum als stabil.

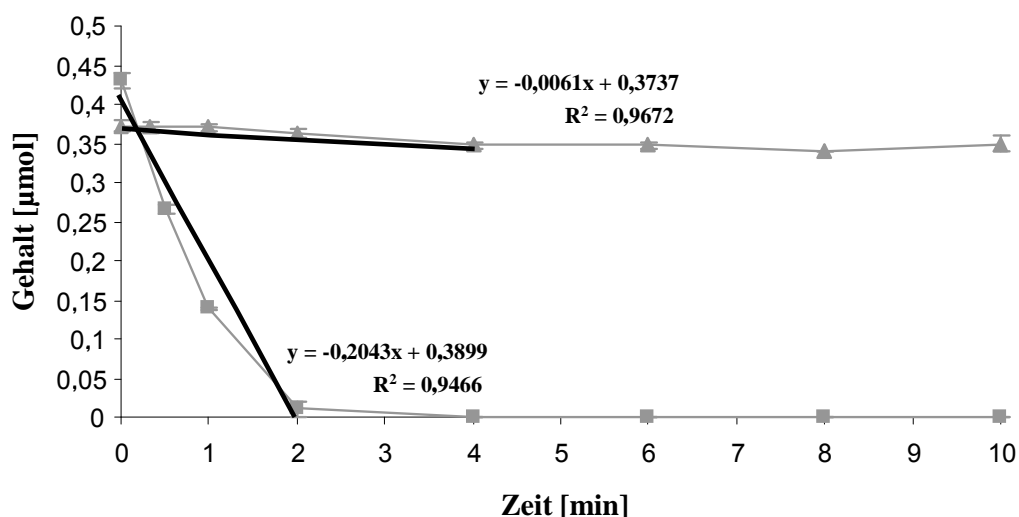


**Abbildung 31:** Abbau von Phenolglycosiden (je 20  $\mu$ L einer 50 mM Stammlösung) während Inkubation mit menschlichen Ileostomabeutelinhalten (pH: 6,3, repräsentativ: Proband 1) verfolgt mit HPLC-DAD (302-360 nm). Bild A: Q3glc (**1b**) ( $\blacktriangle$ ), Quercetin (**1a**) ( $\square$ ), 360 nm. Bild B: Q3rha (**1f**) ( $\blacktriangle$ ), 360 nm. Bild C: *p*-Npglc (**2b**) ( $\blacktriangle$ ); *p*-Np (**2a**) ( $\square$ ), 302 nm. Bild D: *p*-Nprha (**2f**) ( $\blacktriangle$ ); *p*-Np (**2a**) ( $\square$ ), 304 nm. Bild A-D: Aufgetragene Werte sind Mittelwerte  $\pm$  „standard deviation“ (SD) aus Dreifachbestimmungen.

Innerhalb 1 h wurde *p*-Npglc (**2b**) vollständig in *p*-Nitrophenol (*p*-Np) (**2a**) und Glucose gespalten. Das Aglykon nahm parallel bis 0,27  $\mu\text{mol}$  zu und war während der Inkubationszeit stabil (Abbildung 31, Bild C). Im Gegensatz zu Q3rha (**1f**) wurde *p*-Nprha (**2f**) durch den menschlichen Dünndarminhalt gespalten. Nach 8 h wurde *p*-Nprha (**2f**) größtenteils zu *p*-Np (**2a**) (erstmal nach 0,5 h detektiert) und Rhamnose hydrolysiert. *p*-Np (**2a**) erreichte ein Maximum (0,21  $\mu\text{mol}$ ) nach 4 h und war bis 8 h stabil (Abbildung 31, Bild D). Die leichte Abnahme der *p*-Np-Konzentration zwischen 10 und 24 h (Abbildung 31, Bild C und D) ist möglicherweise auf mikrobiell bedingten Abbau zurückzuführen - ein Effekt der nicht weiter untersucht wurde.

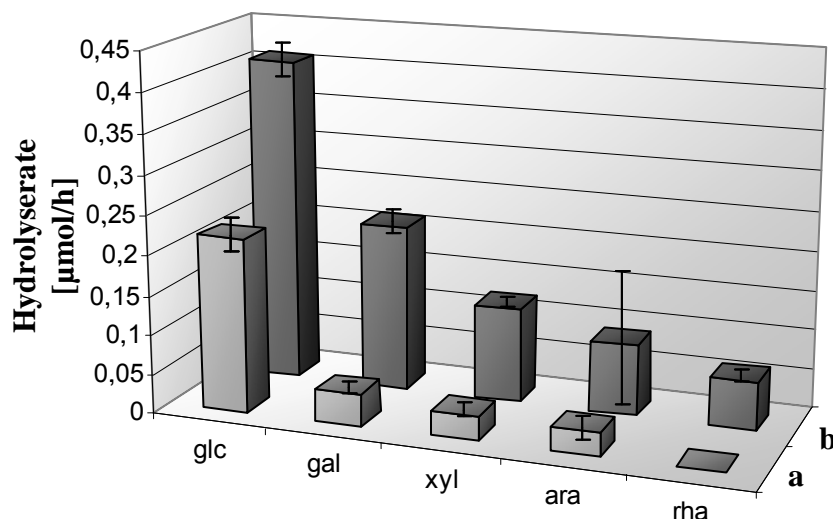
Quercetin (**1a**) und *p*-Np (**2a**) waren die einzigen im Verlauf der Inkubationen detektierten Metaboliten. In zusätzlich durchgeführten Stabilitätsexperimenten - mit Puffer (pH 6,3), aber ohne Ileostomabeutelinhalt - waren Quercetin (**1a**), *p*-Np (**2a**) und deren entsprechende Glycoside (**1b-f** bzw. **2b-f**) über 24 h stabil (Daten nicht gezeigt).

Um die Hydrolyserate für jedes Substrat zu bestimmen, wurde eine Tangente durch den linearen Bereich der Abbaukurven gelegt. Die dadurch erhaltenen Steigungen jeder linearen Regressionslinie ergaben die Hydrolyseraten in  $\mu\text{mol}/\text{h}$  (Abbildung 32).



**Abbildung 32:** Graphische Auswertung der Abbaukurven am Beispiel von Q3glc (**1b**) (■) und Q3rha (**1f**) (▲). Es wurde eine Tangente durch den linearen Bereich der Abbaukurve gelegt. Die dadurch erhaltenen Steigungen jeder linearen Regressionslinie ergaben die Hydrolyseraten in  $\mu\text{mol}/\text{h}$ . Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus Dreifachbestimmungen.

Die Hydrolyserate für Q3glc (**1b**) war mit 0,22  $\mu\text{mol/h}$  die höchste der untersuchten Quercetinglycoside (**1b-f**). Q3rha (**1f**) erwies sich während der genannten Inkubationszeit als stabil und hatte demnach eine Hydrolyserate von nahezu Null. Mit 0,04 bzw. je 0,03  $\mu\text{mol/h}$  zeigten Quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid (Q3gal) (**1c**), Quercetin-3-*O*- $\beta$ -D-xylosid (Q3xyl) (**1e**) und Quercetin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinsid (Q3ara) (**1d**) praktisch identische Hydrolyseraten (Abbildung 33, Reihe a).



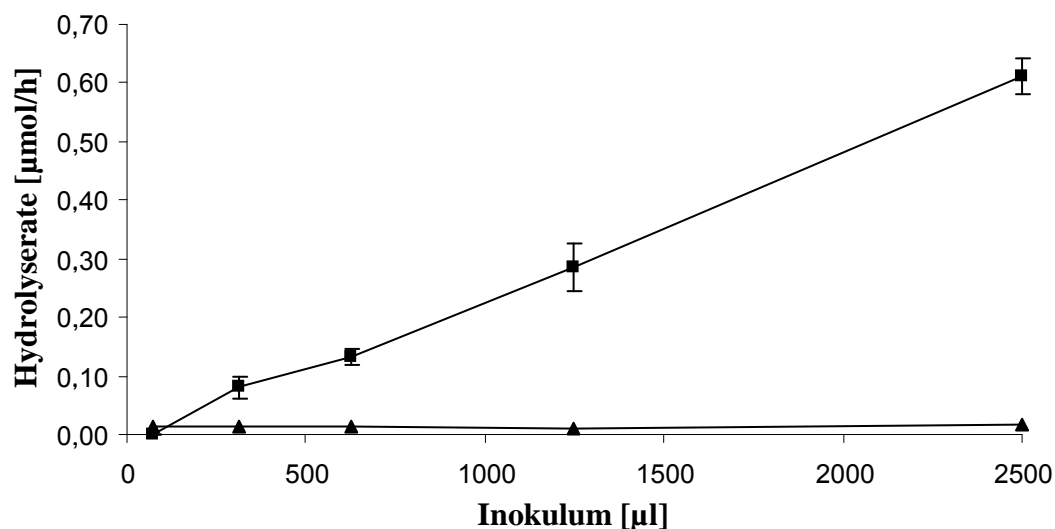
**Abbildung 33:** Hydrolyseraten [ $\mu\text{mol/h}$ ] der untersuchten Quercetin- (**1b-f**) und *p*-Np-glycoside (**2b-f**) während Inkubation mit Ileostomabeutelinhalten von Proband 1-3 zwischen 0 und 24 h mit verschiedenen Quercetin- und *p*-Np-glycosid Stammlösungen (50 mM). glc: Glucosid; gal: Galactosid; ara: Arabinosid; xyl: Xylosid; rha: Rhamnosid. a: Quercetinglycoside, b: *p*-np-Glycoside. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus Dreifachbestimmungen.

Im Gegensatz zu Q3rha (**1f**) wurde *p*-Nprha (**2f**) mit einer Hydrolyserate von 0,06  $\mu\text{mol/h}$  durch die Ileostomabeutelinhalte gespalten. *p*-Npglc (**2b**) zeigte die höchste Hydrolyserate, gefolgt von *p*-Nitrophenylgalactosid (*p*-Npgal) (**2c**) (0,21  $\mu\text{mol/h}$ ), *p*-Nitrophenylxylosid (*p*-Npxyl) (**2e**) (0,12  $\mu\text{mol/h}$ ) und *p*-Nitrophenylarabinsid (*p*-Npara) (**2d**) (0,09  $\mu\text{mol/h}$ ), während *p*-Nprha (**2f**) mit 0,06  $\mu\text{mol/h}$  am langsamsten hydrolysiert wurde (Abbildung 33, Reihe b). Als einziger Metabolit während der Inkubationen war *p*-Np (**2a**) detektierbar.

Beim Vergleich der Hydrolyseraten der untersuchten Quercetin- (**1b-f**) und *p*-Np-glycoside (**2b-f**) fällt auf, dass die Spaltung der *p*-Np-glycoside (**2b-f**) (Abbildung 33,

Reihe b) in jedem Fall schneller war als die der entsprechenden Quercetinglycoside (**1b-f**) (Abbildung 33, Reihe a).

Um den Einfluss der Mikroflora bezüglich der Hydrolyse von Phenolglycosiden zu untersuchen, wurde zusätzlich eine Studie mit konstanter Q3glc-Konzentration (20  $\mu\text{l}$  einer 50 mM Stammlösung) und unterschiedlichen Inokulum-Volumina (75  $\mu\text{l}$ , 312,5  $\mu\text{l}$ , 625  $\mu\text{l}$ , 1250  $\mu\text{l}$ , 2500  $\mu\text{l}$ ) durchgeführt. Eine zweite Versuchsreihe erfolgte unter Zusatz eines Penicillin/Streptomycin Antibiotikums (Durchführung s. Abschnitt E 2.1.1.3).



**Abbildung 34:** Hydrolyseraten [ $\mu\text{mol/h}$ ] einer Q3glc-Lösung (**1b**) (20  $\mu\text{L}$  einer 50 mM Stammlösung) während der Inkubation mit verschiedenen Volumina Inokulum (75  $\mu\text{L}$ , 312,5  $\mu\text{L}$ , 625  $\mu\text{L}$ , 1250  $\mu\text{L}$ , 2500  $\mu\text{L}$ ), erhalten von 3 unterschiedlichen Ileostomabeutelinhalten (Proband 1-3); ohne Zusatz von Antibiotikum ( $\blacksquare$ ), mit Zusatz eines Penicillin/Streptomycin Antibiotikums ( $\blacktriangle$ ). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus Dreifachbestimmungen.

Wie in Abbildung 34 dargestellt ist, nahm die Hydrolyserate von Q3glc (**1b**) ohne Antibiotikumzusatz von 75 bis zu 2500  $\mu\text{l}$  Inokulum mit steigendem Mikroflorgehalt linear zu. In 1 ml Ileostomabeutelinhalt wurde ein durchschnittlicher Gehalt von  $\log 8,75 (\pm 0,37)$  KbE bestimmt. Dies bedeutet für die angewandten Volumina von 75 bis 2500  $\mu\text{l}$  Durchschnittsgehalte von  $\log 0,68$  bis zu 21,9 KbE. Nach Zusatz des Antibiotikums fand keine Hydrolyse von Q3glc (**1b**) statt (Abbildung 34).

Quercetin (**1a**) und Q3rha (**1f**) erwiesen sich als stabil gegen ilealen Abbau/Hydrolyse. Um dem Verlauf der Verdauung weiter zu folgen, wurden diese, zusammen mit weiteren im Dünndarm stabilen Verbindungen, mit Kolostomabeutelinhalten inkubiert. Die erzielten Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt dargestellt.

### 2.1.2 Inkubation der gegen ilealen Abbau resistenten Verbindungen mit Kolostomabeutelinhalten

Chlorogensäure (**3**), Procyanidin B<sub>2</sub> (**4**), (-)-Epicatechin (**5**), Phloretin (**6**), Quercetin (**1a**) und Q3rha (**1f**), wurden mit Kolostomabeutelinhalt unter anaeroben Bedingungen bei 37°C für 24 h inkubiert (Durchführung s. Abschnitt E 2.1.2). Alle diese Verbindungen sind bekannte Apfelinhaltsstoffe.

Abbildung 35 zeigt den zeitlichen Verlauf der Inkubation von Chlorogensäure (**3**) (Bild A), Procyanidin B<sub>2</sub> (**4**) (Bild B), (-)-Epicatechin (**5**) (Bild C), Phloretin (**6**) (Bild D), Quercetin (**1a**) (Bild E) und Q3rha (**1f**) (Bild F).

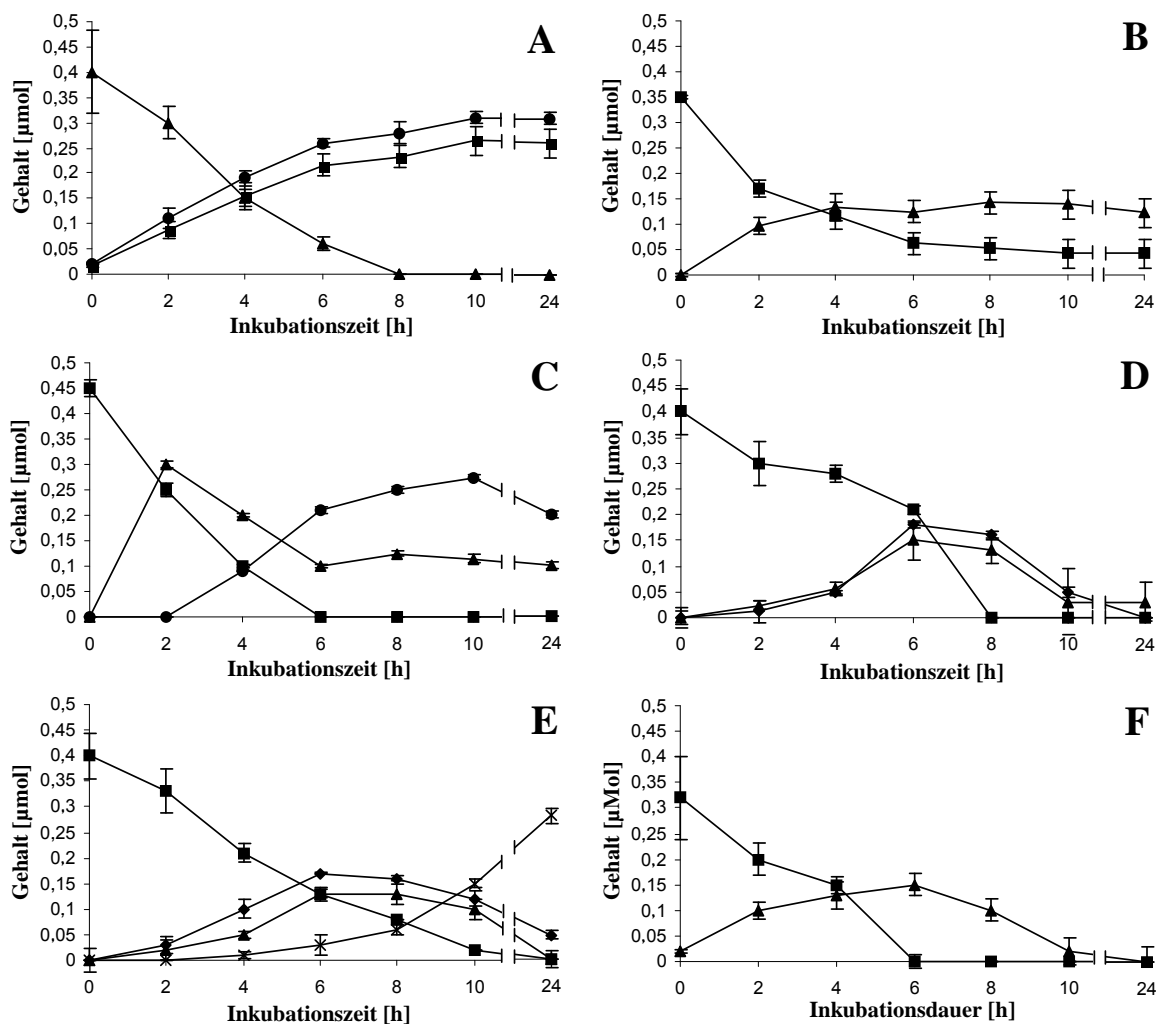
Chlorogensäure (**3**) wurde innerhalb von 8 h vollkommen abgebaut. Spuren der beiden Metabolite Kaffeesäure (**7**) und D-(-)-Chinasäure (**8**) konnten bereits zu Beginn der Versuchsreihe detektiert werden. Die Konzentration der Kaffeesäure (**7**) nahm zwischen 0-10 h bis 0,26 µmol zu. Parallel wurde D-(-)-Chinasäure (**8**) (0,31 µmol) gebildet. Beide Metabolite blieben bis zu einer Inkubationsdauer von 24 h stabil (Abbildung 35, Bild A).

Procyanidin B<sub>2</sub> (**4**) wurde bis 24 h nicht vollständig abgebaut. Einhergehend mit dem Abbau entstand (-)-Epicatechin (**5**) bis zu einem Gehalt von 0,14 µmol, der bis 24 h konstant blieb (Abbildung 35, Bild B).

(-)-Epicatechin (**5**) selbst wurde im Zeitraum von 6 h vollkommen abgebaut. Parallel dazu nahm der Anteil an  $\delta$ -(3',4',5'-Trihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton (**9a**) mit einem Maximum von 0,3 µmol bei 2 h zu. Danach kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme bis auf 0,11 µmol (nach 6 h) mit nachfolgender Konstanz bis zu 24 h. Zeitgleich



zum Abbau des Lactons nahm die Dihydrokaffeensäure-Konzentration (**10**) bis zu einem Maximum von  $0,27 \mu\text{mol}$  bei 10 h zu und sank anschließend bis auf  $0,18 \mu\text{mol}$  (24 h) (Abbildung 35, Bild C).



**Abbildung 35:** Abbau von Polyphenolen (je  $20 \mu\text{L}$  einer  $50 \text{ mM}$  Stammlösung) während Inkubation mit menschlichem Kolostomabeutelinhalt (Proband 4, pH: 7,4), verfolgt mit HPLC-DAD (210-360 nm). Bild A: Chlorogensäure (**3**) (▲), Kaffeensäure (**7**) (■), D-(-)-Chinasäure (**8**) (●), 280 nm (Chinasäure (**8**): 210 nm). Bild B: Procyanidin B<sub>2</sub> (**4**) (■), (-)-Epicatechin (**5**) (▲), 280 nm. Bild C: (-)-Epicatechin (**5**) (■),  $\delta$ -(3',4',5'-Trihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton (**9a**) (▲), Dihydrokaffeensäure (**10**) (●), 280 nm. Bild D: Phloretin (**6**) (■), Phloroglucin (**11**) (▲), *p*-Hydroxy-dihydrozimtsäure (**12**) (◆), 280 nm. Bild E: Quercetin (**1a**) (■), 360 nm, 3,4-Dihydroxy-phenylessigsäure (**13**) (◆), 280 nm, Phloroglucin (**11**) (▲), 210 nm, 3,4-Dihydroxy-methylbrenzcatechin (**14**) (x), 280 nm. Bild F: Q3rha (**1f**) (■), Quercetin (**1a**) (▲). Bild A-F: Aufgetragene Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus Dreifachbestimmungen.

Phloretin (**6**) wurde innerhalb von 8 h vollständig abgebaut, zeitgleich stiegen die Phloroglucin- (**11**) und *p*-Hydroxy-dihydrozimtsäuregehalte (**12**) ( $0,17 \mu\text{mol}$  bzw.  $0,15$

$\mu\text{mol}$ ) bis 6 h und blieben bis 8 h nahezu konstant (Abbildung 35, Bild D). Phloroglucin (**11**) war nach 24 h nicht mehr, *p*-Hydroxy-dihydrozimtsäure (**12**) noch in geringen Mengen ( $0,03 \mu\text{mol}$ ) detektierbar.

Der Quercetingehalt (**1a**) nahm bis 24 h kontinuierlich ab. Die Konzentration der beiden Metabolite Phloroglucin (**11**) und 3,4-Dihydroxy-phenyllessigsäure (**13**) nahm während der Inkubation mit Maximalgehalten von  $0,17 \mu\text{mol}$  und  $0,13 \mu\text{mol}$  nach 6 h zu. Während ein geringer Gehalt an 3,4-Dihydroxy-phenyllessigsäure (**13**) ( $0,05 \mu\text{mol}$  nach 24 h) noch nachweisbar war, wurde Phloroglucin (**11**) vollkommen abgebaut. Der dritte Metabolit, 3,4-Dihydroxy-methylbrenzcatechin (**14**), wurde nach 4 h erstmals detektiert. Dessen Konzentration nahm zeitgleich zum Abbau der anderen beiden Metaboliten mit einem Maximum von  $0,28 \mu\text{mol}$  nach 24 h zu (Abbildung 35, Bild E).

Aus Abbildung 35, Bild F, ist ein kontinuierlicher Abbau von Q3rha (**1f**) bis 6 h ersichtlich, wobei die parallel dazu stattfindende Zunahme von Quercetin (**1a**) nach 6 h mit  $0,15 \mu\text{mol}$  ihr Maximum erreichte. Innerhalb von 24 h wurde Quercetin (**1a**) vollkommen abgebaut, wobei die in Bild E beschriebenen Metabolite nicht detektiert werden konnten.

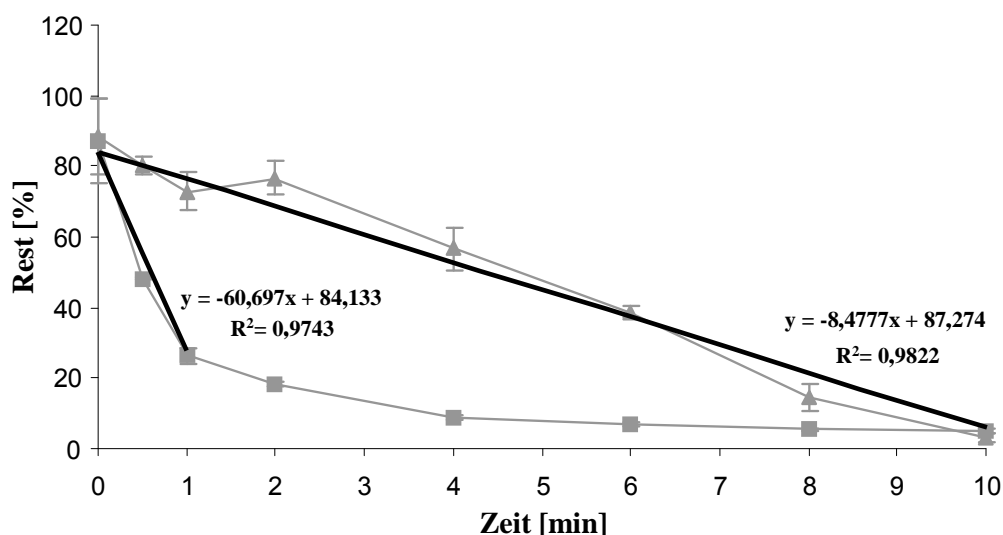
Nachdem der intestinale Metabolismus von Quercetinderivaten und weiteren ausgewählten Polyphenolen untersucht worden war, waren im Folgenden strukturelle Determinanten des Verhaltens von Anthocyanen im Intestinaltrakt zu erarbeiten. Die erzielten Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt präsentiert.

## **2.2 Einfluss des Zuckerrests und der Aglyconstruktur auf die Hydrolyse von Heidelbeeranthocyanen im menschlichen Dün- und Dickdarm**

Ein Heidelbeerextrakt wurde unter anaeroben Bedingungen bei  $37^\circ\text{C}$  für 10 bzw. 24 h mit den Ileo- bzw. Kolostomabeutelinhalt von je drei unterschiedlichen Probanden inkubiert. Der Abbau der Anthocyane wurde mittels HPLC-DAD bei  $520 \text{ nm}$  verfolgt (Durchführung s. Abschnitt E 2.2). Es zeigte sich rasch, dass bei den Inkubationen

eine Hydrolyse der Anthocyane zu den Aglykonen erfolgte (strukturell nicht dargestellt).

Um die Hydrolyserate für jedes Anthocyan zu bestimmen, wurde jeweils eine Tangente durch den linearen Bereich der Abbaukurve gelegt. Die dadurch erhaltenen Steigungen jeder linearen Regressionslinie ergaben die Hydrolyseraten in %/h (Abbildung 36).

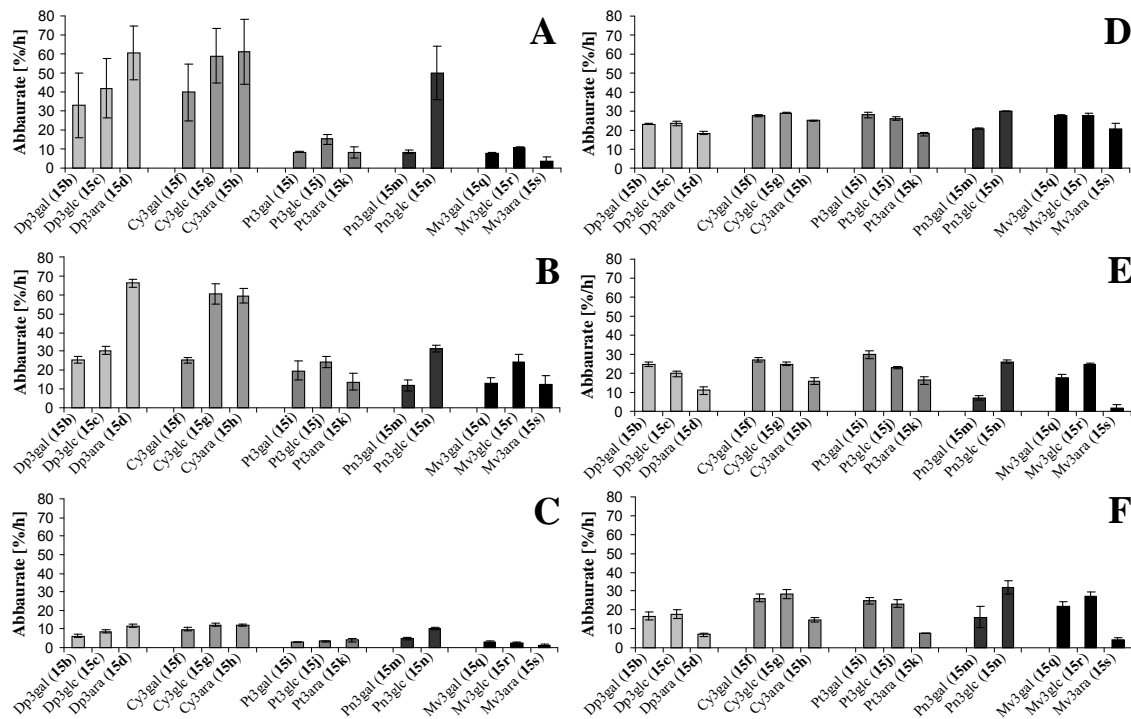


**Abbildung 36:** Anthocyan-Abbaukurve am Beispiel der Hydrolyse von Delphinidin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinosid (Dp3ara) (**15d**) (■) und Petunidin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid (Pt3gal) (**15i**) (▲) während Inkubation mit Ileostomabeutelinhalt (repräsentativ: Proband 1). Es wurde eine Tangente durch den linearen Bereich der Abbaukurve gelegt. Die dadurch erhaltenen Steigungen jeder linearen Regressionslinie ergaben die Hydrolyseraten in %/h. Aufgetragene Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus Doppelbestimmungen.

Die erhaltenen Hydrolyseraten in %/h sind für jeden Proband und jedes Anthocyan detailliert in Abbildung 37 dargestellt. Sie variierten im Verlauf der Inkubationen mit Ileo- (Probanden 1-3) und Kolostomabeutelinhalten (Probanden 4-6) von 1,2 bis 66%/h bzw. 2 bis 32%/h. Im Detail lagen die Hydrolyseraten bei 3,74-61,5 %/h (Proband 1; Abbildung 37, Bild A), 11,8-66,1 %/h (Proband 2; Abbildung 37, Bild B), 1,2-12,2 %/h (Proband 3; Abbildung 37, Bild C), 18,2-30,1 %/h (Proband 4; Abbildung 37, Bild D), 2-30 %/h (Proband 5; Abbildung 37, Bild E) und 4,2-32 %/h (Proband 6; Abbildung 37, Bild F).

Die ileale Hydrolyse der unmethylierten Anthocyane (Delphinidin- (**15b-d**) und Cyanidinglycoside (**15f-h**)) verlief schneller (33-61%/h) als diejenige der methylierten Anthocyane (Petunidin- (**15i-k**), Peonidin (**15m, n**) und Malvidinglycoside (**15q-s**)) (3,7-15,5%/h; Ausnahme: Peonidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid (Pn3glc) (**15n**)) (Abbildung 37, Bilder A-C).

Die bei den Inkubationen mit Kolostomabeutelinhalt ermittelten Hydrolysegeschwindigkeiten waren für unmethylierte (18,4-29%/h) und methylierte Anthocyane (18,1-30%/h) gleich (Abbildung 37, Bilder E-F).



**Abbildung 37:** Hydrolyseraten [%/h] der Anthocyane während Inkubation eines Heidelbeerextrakts (0.8 g/l) mit Ileo- (Proband 1-3) und Kolostomabeutelinhalten (Proband 4-6) zwischen 0 und 24 h. Bild A: Proband 1. Bild B: Proband 2. Bild C: Proband 3. Bild D: Proband 4. Bild E: Proband 5. Bild F: Proband 6. Aufgetragene Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SD aus Doppelbestimmungen. Dp3gal: Delphinidin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid, Dp3glc: Delphinidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid, Dp3ara: Delphinidin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinosid, Cy3gal: Cyanidin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid, Cy3glc: Cyanidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid, Cy3ara: Cyanidin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinosid, Pt3gal: Petunidin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid, Pt3glc: Petunidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid, Pt3ara: Petunidin-3-*O*- $\beta$ -D-arabinosid, Pn3gal: Peonidin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid, Pn3glc: Peonidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid, Pn3ara: Peonidin-3-*O*- $\beta$ -D-arabinosid, Mv3gal: Malvidin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid, Mv3glc: Malvidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid, Mv3ara: Malvidin-3-*O*- $\beta$ -D-arabinosid.

Bezogen auf die Strukturen der konjugierten Zucker nahmen die ilealen Hydrolysegeschwindigkeiten [%/h] tendenziell in folgender Reihenfolge ab: ara > glc > gal (unmethylierten Anthocyane) bzw. glc > gal > ara (methylierten Anthocyane) (Abbildung 37, Bilder A-C).

Die bei den Inkubationen mit Kolostomabeutelinhalten bestimmten Hydrolysegeschwindigkeiten [%/h] wiesen ebenfalls Abhängigkeit vom Zuckerrest auf: gal  $\geq$  glc > ara (unmethylierte Anthocyane) bzw. glc > gal > ara (methylierte Anthocyane) (Ausnahme: Petunidinderivate) (Abbildung 37, Bilder E-F). Somit zeigte die Mikroflora von Ileostoma- und Kolostomabeutelinhalten identische Abhängigkeit von der Struktur der konjugierten Zucker bei Hydrolyse der methylierten Anthocyane, aber genau entgegengesetzte bei Hydrolyse der unmethylierten Anthocyane.

Bei sämtlichen Kolostomainkubationen wurden die Anthocyanarabinoide (**15d, h, k, s**) immer am langsamsten hydrolysiert, während Dp3ara (**15d**) und Cyanidin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinosid (Cy3ara) (**15h**) durch die Ileostomabeutelinhalte am schnellsten hydrolysiert wurden.

Neben den bereits vorgestellten Polyphenolen war auch der Metabolismus von Pektin zu studieren. Weder dessen Monomer D-Galacturonsäure noch die amidierete Form des Pektins hat man bisher diesbezüglich untersucht. Desweiteren gab es keine Informationen über die Stabilität von Pektin in Mundhöhle und Magen. Daher wurden im Folgenden als Substrate D-Galacturonsäure und amidiertes Pektin benutzt und deren Verhalten in Mundhöhle, Magen und Dünn- bzw. Dickdarm untersucht. Die erzielten Ergebnisse sind nachfolgend dargestellt.

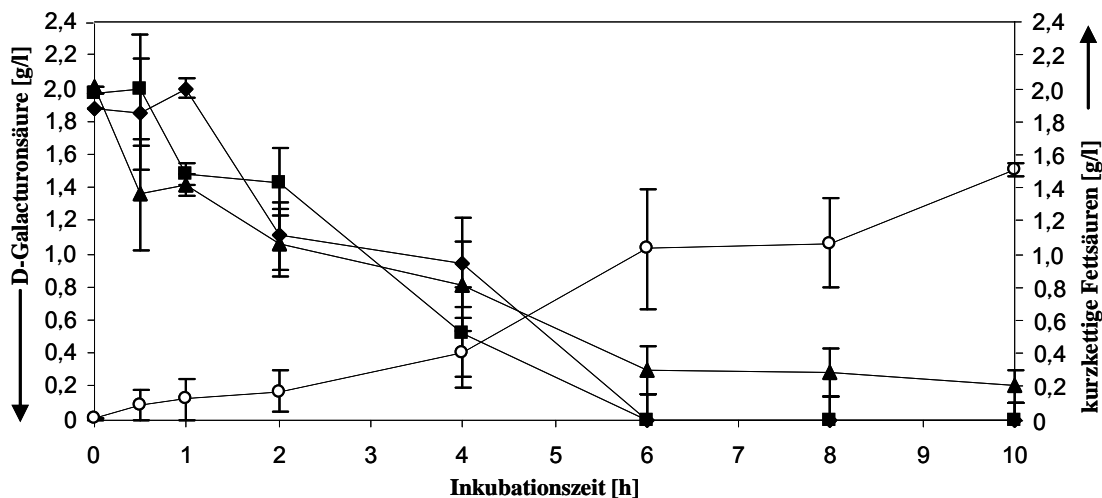
### **2.3 Metabolismus von D-Galacturonsäure und amidiertem Pektin**

D-Galacturonsäure (**16**) und amidiertes Pektin (**17**) sind zunächst unter aeroben Bedingungen mit Speichel und künstlichen Magensaft inkubiert worden. Unter anaeroben Bedingungen wurden dann die beiden Substrate mit Ileo- (Probanden 1-3) und Kolostomabeutelinhalten (Probanden 4-6) untersucht. Zusätzlich wurden Stabilitätsstudien beider Substrate nur mit Carbonat-Phosphatpuffer (pH 6,3 and pH 7,4), aber ohne Inokulum durchgeführt. Die bei den Studien zu erwartenden Zielverbindungen

waren D-Galacturonsäure (**16**), kurzkettige Fettsäuren (SCFA) (Acetat (**18**), Propionat (**19**) und Butyrat (**20**)) sowie Methanol (MeOH) (**21**) (Inkubationen mit amidierten Pektin (**17**)) (Durchführung s. Abschnitt E 2.3).

D-Galacturonsäure (**16**) erwies sich sowohl im Verlauf der Inkubationen mit Speichel und künstlichen Magensaft als auch bei Stabilitätsstudien als stabil (Daten nicht gezeigt). Bei den Inkubationen mit den Ileostomabeutelinhalten der Probanden 1 und 2 wurde D-Galacturonsäure (**16**) innerhalb von 6 h vollkommen abgebaut (Abbildung 38).

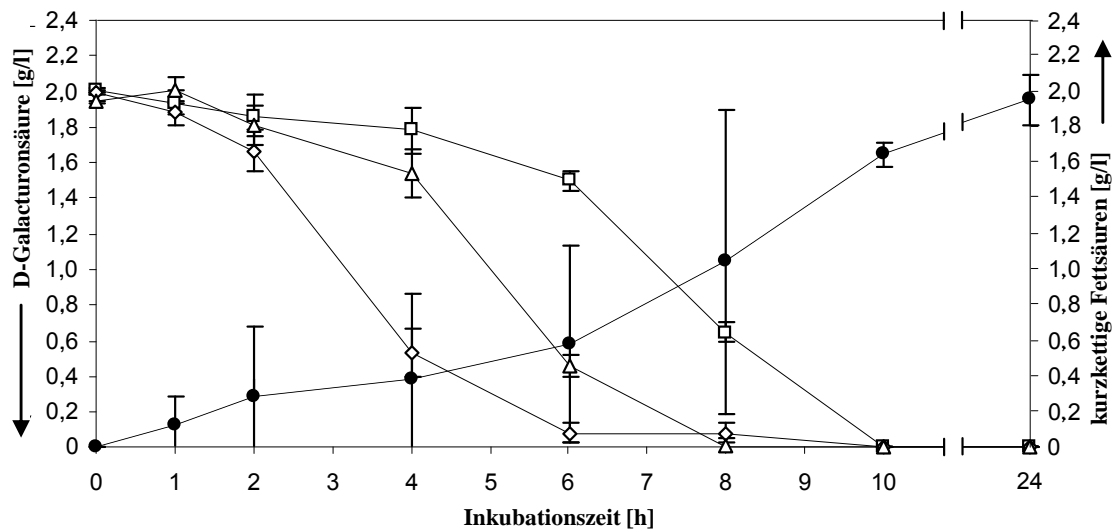
Im gleichen Zeitraum waren während der Inkubation mit Ileostomabeutelinhalt von Proband 3 noch 0,3 g/l D-Galacturonsäure (**16**) zu ermitteln. Diese Konzentration blieb dann bis 10 h mit 0,2 g/l nahezu stabil. Die SCFA nahmen im Verlauf der Inkubationen mit allen Ileostomabeutelinhalten kontinuierlich bis zu einem Mittelwert von  $1,5 \pm 0,04$  g/l zu (Abbildung 38).



**Abbildung 38:** Zeitlicher Verlauf der Inkubation von D-Galacturonsäure (**16**) (2 g/L) mit den Ileostomabeutelinhalten der Probanden 1-3. D-Galacturonsäure (**16**) und SCFA wurden photometrisch (524 nm) nach Carbazolreaktion bzw. durch Gaschromatographie-Flammenionisations-Detektion (GC-FID) bestimmt. D-Galacturonsäure (**16**): Proband 1 (■), Proband 2 (◆), Proband 3 (▲); SCFA: (○). Die D-Galacturonsäurewerte jedes Probanden sind als Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen  $\pm$  SD dargestellt; für bessere Illustration sind die SCFA-Werte als Mittelwerte  $\pm$  SD der Probanden 1-3 gezeigt.

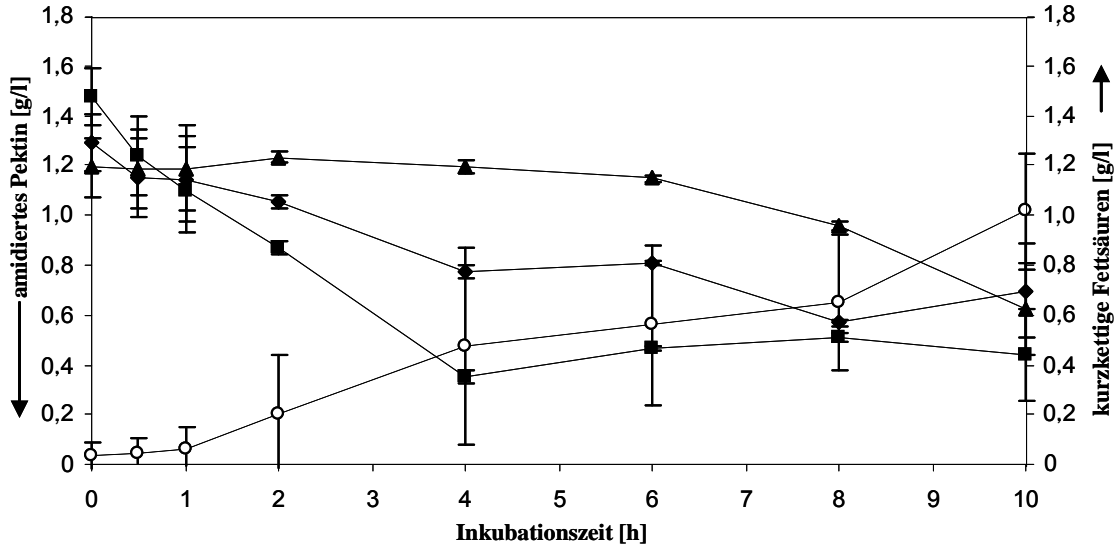
Die Inkubationen von D-Galacturonsäure (**16**) mit Kolostomabeutelinhalten zeigten größere individuelle Unterschiede im Abbau und der damit verbundenen SCFA-Bildung (Abbildung 39).

So variierten die D-Galacturonsäurekonzentrationen nach 6 h Inkubation von 1,5 g/l (Proband 4), 0,46 g/l (Proband 6) bis 0,08 g/l (Proband 5); nach 10 h war D-Galacturonsäure nicht mehr nachweisbar. Parallel hierzu nahm die SCFA-Konzentration (mit erwartet hohen individuellen Abweichungen) bis zu einem Maximalwert von  $1,95 \pm 0,14$  g/l zu (Abbildung 39). Detaillierte Informationen über die bei den Inkubationen gebildeten Konzentrationen von Acetat (**18**), Propionat (**19**), Butyrat (**20**) und Gesamt-SCFA liefern die in Abbildung 44 und Tabelle 8 zusammengestellten Daten.



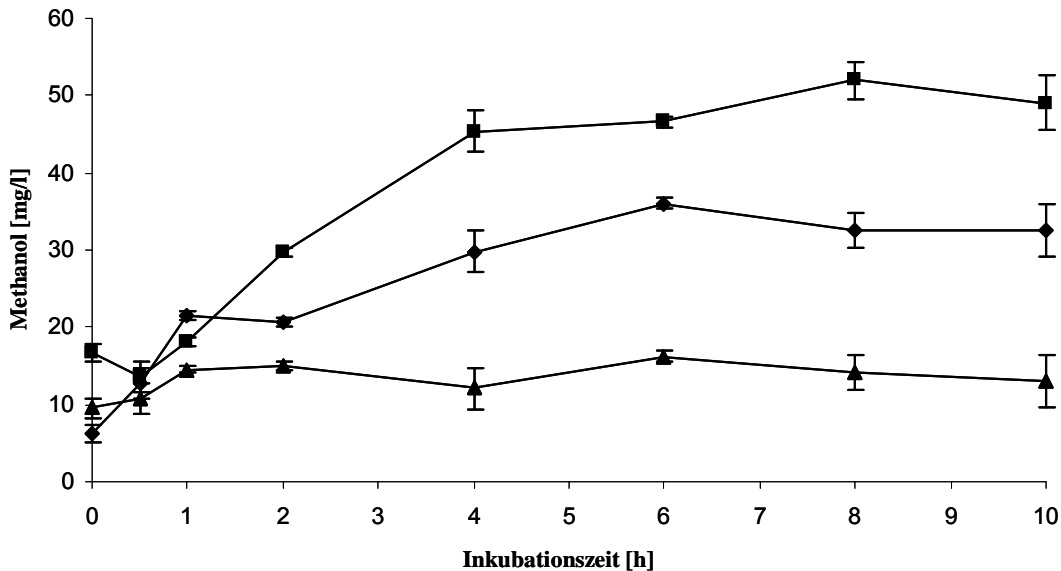
**Abbildung 39:** Zeitlicher Verlauf der Inkubation von D-Galacturonsäure (**16**) (2 g/l) mit den Kolo-stomabeutelinhalten der Probanden 4-6. D-Galacturonsäure (**16**) und SCFA wurden photometrisch (524 nm) nach Carbazolreaktion bzw. durch Gaschromatographie-Flammenionisations-Detektion (GC-FID) bestimmt. D-Galacturonsäure: Proband 4 (□), Proband 5 (◇), Proband 6 (Δ); SCFA: (●). Die D-Galacturonsäurewerte jedes Probanden sind als Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen  $\pm$  SD dargestellt; für bessere Illustration sind die SCFA-Werte als Mittelwerte  $\pm$  SD der Probanden 4-6 gezeigt.

Amidiertes Pektin (**17**) war sowohl im Verlauf der Inkubationen mit Speichel und künstlichen Magensaft als auch bei den Stabilitätsstudien stabil (Daten nicht gezeigt). Die Inkubationen mit den Ileostomabeutelinhalten der Probanden 1-3 führten zu sehr unterschiedlichen Abbaukurven. So nahmen die Anfangskonzentrationen von amidier-tem Pektin (**17**) (Proband 1: 1,47 g/l, Proband 2: 1,3 g/l, Proband 3: 1,2 g/l) nach 6 h bis zu 0,47 g/l (Proband 1), 0,81 g/l (Proband 2) und 1,15 g/l (Proband 3) ab. Die ent-standenen SCFA-Werte betrugen nach 6 h Inkubation  $0,56 \pm 0,32$  g/l und erreichten maximal  $1 \pm 0,23$  g/l (Abbildung 40).



**Abbildung 40:** Zeitlicher Verlauf der Inkubation von amidierem Pektin (**17**) (2 g/L) mit den Ileostomabeutelinhalten der Probanden 1-3. Amidiertes Pektin (**17**) und SCFA wurden photometrisch (524 nm) nach Carbazolreaktion bzw. durch Gaschromatographie-Flammenionisations-Detektion (GC-FID) bestimmt. Amidiertes Pektin (**17**): Proband 1 (■), Proband 2 (◆), Proband 3 (▲); SCFA: (○). Die Werte des amidierem Pektins (**17**) jedes Probanden sind als Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen  $\pm$  SD dargestellt; für bessere Illustration sind die SCFA-Werte als Mittelwerte  $\pm$  SD der Probanden 1-3 gezeigt.

Die mit dem Pektinabbau verbundene MeOH-Freisetzung betrug 52 mg/l (Proband 1) bzw. 36 mg/l (Proband 2) und 16 mg/l (Proband 3) (Abbildung 41).

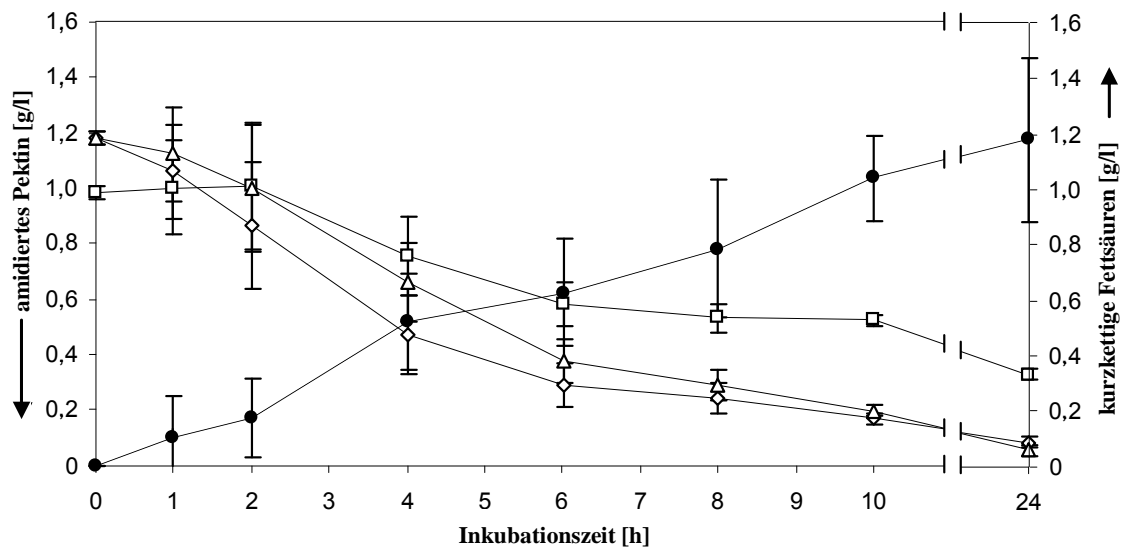


**Abbildung 41:** Methanolfreisetzung während der Inkubation von amidierem Pektin (**17**) (2 g/L) mit den Ileostomabeutelinhalten der Probanden 1-3. MeOH (**21**) wurde via Headspace solid-phase microextraction Gaschromatographie/Massenspektrometrie (HS-SPME-GC/MS) bestimmt. Die Methanolwerte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD der Probanden 1 (■), 2 (◆) und 3 (▲) dargestellt.



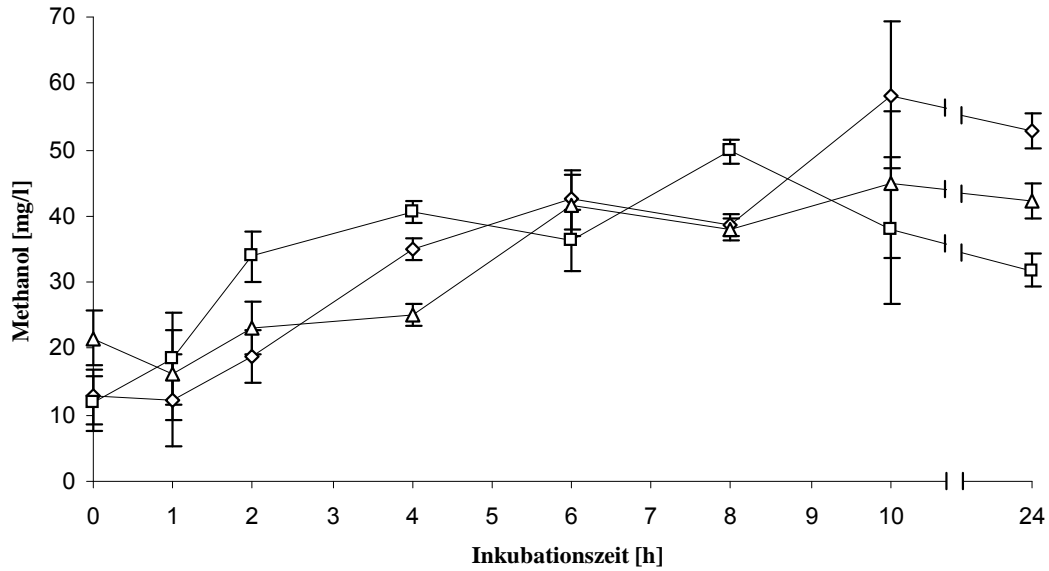
Verglichen mit den bei den Inkubationen von amidierem Pektin mit Ileostomabeutelinhalten erhaltenen Ergebnissen zeigten die Inkubationen mit Kolostomabeutelinhalten geringere individuelle Unterschiede im Abbau des Substrats und in der Bildung von SCFA (Abbildung 42).

So betragen die Konzentrationen des amidierem Pektins (**17**) nach 6 h Inkubation 0,58 g/l (Proband 4), 0,38 g/L (Proband 6) und 0,29 g/L (Proband 5). Nach 24 h waren noch 0,33-0,06 g/l amidierem Pektin (**17**) vorhanden. Parallel nahm die SCFA Konzentration (mit erwarteter hohen individuellen Abweichungen) bis zu  $1,18 \pm 0,3$  g/l (Abbildung 42) zu.



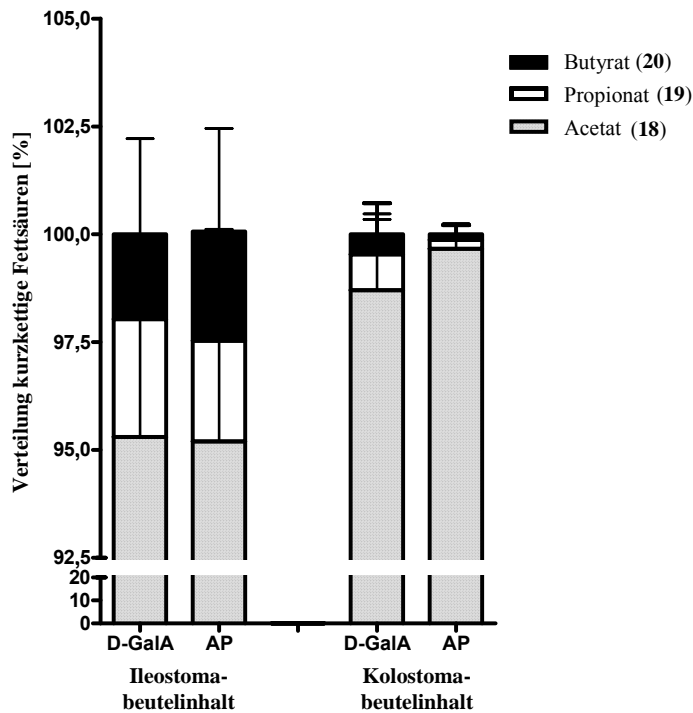
**Abbildung 42:** Zeitlicher Verlauf der Inkubation von amidierem Pektin (**17**) (2 g/L) mit den Kolostomabeutelinhalten der Probanden 4-6. Amidiertes Pektin (**17**) und SCFA wurden photometrisch (524 nm) nach Carbazolreaktion bzw. durch Gaschromatographie-Flammenionisations-Detektion (GC-FID) bestimmt. Amidiertes Pektin (**17**): Proband 4 (□), Proband 5 (◇), Proband 6 (△); SCFA: (●). Die Werte des amidierem Pektins (**17**) jedes Probanden sind als Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen  $\pm$  SD dargestellt; für bessere Illustration sind die SCFA-Werte als Mittelwerte  $\pm$  SD der Probanden 4-6 gezeigt.

Die ermittelten MeOH-Werte betragen 49,7 mg/l (Proband 4), 58,1 mg/l (Proband 5) und 44,8 mg/l (Proband 6) (Abbildung 43).



**Abbildung 43:** Methanolfreisetzung während der Inkubation von amidierter Pektin (2 g/L) mit den Kolostomabeutelinhalten der Probanden 4-6. MeOH (**21**) wurde via Headspace solid-phase microextraction Gaschromatographie/Massenspektrometrie (HS-SPME-GC/MS) bestimmt. Die Methanolwerte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD der Probanden 4 (□), 5 (◇) und 6 (△) dargestellt.

Acetat (**18**) war der Hauptmetabolit bei allen Inkubationen (Abbildung 44).



**Abbildung 44:** Verteilung der SCFA [%] nach Inkubation von D-Galacturonsäure (**16**) (D-GalA) und amidierter Pektin (**17**) (AP) mit Ileo- (10 h) und Kolostomabeutelinhalten (24 h). SCFA-Werte sind dargestellt als Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen  $\pm$  SD.

Prozentual setzten sich die Gesamt-SCFA nach Inkubation von D-Galacturonsäure (**16**) mit Ileostoma- (10 h) und Kolostomabeutelinhalten (24 h) wie folgt zusammen: 91,2-98% Acetat (**18**), 1-4,3% Propionat (**19**), 0,4-4,5% Butyrat (**20**) bzw. 96,8-99,7% Acetat (**18**), 0,1-2,2% Propionat (**19**), 0,1-1% Butyrat (**20**) (Abbildung 44). Daneben ergaben die Inkubationen von amidiertem Pektin (**17**) mit Ileo- (10 h) und Kolostomabeutelinhalten (24 h) 89,6-98,8% Acetat (**18**), 0,8-5,2% Propionat (**19**), 0,6-5,2% Butyrat (**20**) bzw. 99-100% Acetat (**18**), 0-0,6% Propionat (**19**), 0-0,4% Butyrat (**20**) (Abbildung 44).

Bei Vergleich jedes Datenpaares zeigten nur die Acetat-Werte signifikante Unterschiede (Tabelle 8).

**Tabelle 8:** Bildung von Acetat (**18**), Propionat (**19**) und Butyrat (**20**) bei der Inkubation von D-Galacturonsäure (**16**) und amidiertem Pektin (**17**) mit Ileo- und Kolostomabeutelinhalten. Mittelwerte  $\pm$  SD von n = 6 unabhängigen Versuchen.

Inkubationsmedium	Kontrolle		Substrat	Inkubationszeit	Acetat ( <b>18</b> )	Propionat ( <b>19</b> )	Butyrat ( <b>20</b> )	Total SCFA <sup>2)</sup>
	Inkubationszeit	Total SCFA <sup>1)</sup>						
	[h]	[mmol/l]		[h]	[mmol/g]	[mmol/g]	[mmol/g]	[mmol/g]
Ileostomabeutelinhalt	0	7,14 $\pm$ 0,58	D-Galacturonsäure ( <b>16</b> )	10	12 $\pm$ 0,24 **	0,28 $\pm$ 0,13	0,18 $\pm$ 0,15	12,4 $\pm$ 0,51
	10	7,03 $\pm$ 0,47	amidiertes Pektin ( <b>17</b> )	10	8,71 $\pm$ 2,87	0,05 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,04	8,81 $\pm$ 2,94
Kolostomabeutelinhalt	0	65,5 $\pm$ 41,5	D-Galacturonsäure ( <b>16</b> )	24	16 $\pm$ 0,8 *	0,12 $\pm$ 0,12	0,06 $\pm$ 0,04	16,2 $\pm$ 0,96
	24	72 $\pm$ 30,4	amidiertes Pektin ( <b>17</b> )	24	10,1 $\pm$ 1,5 **	0,02 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,002	10,1 $\pm$ 1,5

<sup>1)</sup> Summe der Acetat (18), Propionat (19) und Butyrat (20) Konzentrationen (mmol/l Inokulum); Inkubationen ohne Zusatz von Substrat

<sup>2)</sup> Summe der Acetat (18), Propionat (19) und Butyrat (20) Konzentrationen (mmol/g Substrate); korrigierte Werte (Differenz zwischen den Inkubationen mit Substrat und den entsprechenden Kontrollen)

\* Signifikant höher als \*\* (p < 0,001); bestimmt durch one-way ANOVA

Die Acetatkonzentrationen am Ende der Inkubationen von D-Galacturonsäure (**16**) mit Ileostomabeutelinhalten ( $12 \pm 0,24$  mmol/g Substrat) waren signifikant niedriger ( $p < 0,001$ ) verglichen mit den entsprechenden Werten der Inkubationen mit Kolostomabeutelinhalten ( $16 \pm 0,8$  mmol/g Substrat). Daneben wurde während der Inkubation von D-Galacturonsäure (**16**) mit Kolostomabeutelinhalt signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr Acetat ( $16 \pm 0,8$  mmol/g Substrat) gebildet als nach Inkubation von amidierten Pektin (**17**) mit Kolostomabeutelinhalt ( $10,1 \pm 1,5$  mmol/g Substrat) (Tabelle 8). Die Propionat- und Butyratkonzentrationen ergaben keine signifikanten Unterschiede.

Nach der Metabolisierung der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe können die stabilen Verbindungen oder deren Anteile bzw. gebildete Metabolite von den Darmepithelzellen absorbiert werden und dort protektive Effekte ausüben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde lediglich auf potentielle antiinflammatorische Wirkung fokussiert und demzufolge wurden nachfolgend Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Polyphenolen mit dem proinflammatorischen Enzym LOX untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien werden im nächsten Abschnitt dargestellt.

### **3 LOX-Hemmung durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe**

#### **3.1 Flavonoide und deren intestinale Metabolite als Soja LOX-1 Inhibitoren**

Folgende Verbindungen wurden auf ihre Wirksamkeit gegenüber Soja LOX-1 getestet: (+)-Catechin (**22**), (-)-Epicatechin (**5**), (S)- $\delta$ -(3',4',5'-Trihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton (**9a**), racemisches  $\delta$ -(3',4'-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton (**9b**), Procyanidin B<sub>2</sub> (**4**), Q3glc (**1b**), Q3gal (**1c**), Q3rha (**1f**), *p*-Npglc (**2b**), *p*-Npgal (**2c**), *p*-Nprha (**2f**), Taxifolin (**23**), Apigenin (**24a**), Luteolin (**24b**), Hispidulin (**24c**), Scutellarein (**24d**), Daidzin (**25a**), Daidzein (**25b**), Genistein (**25c**), Puerarin (**25d**) und Equol (**26**).

Die Enzymversuche erfolgten spektralphotometrisch, wobei die Bildung des Hydroperoxidprodukts bei 234 nm verfolgt wurde (Durchführung s. Abschnitt E 3.1) (von

den Flavan-3-olen und deren Metaboliten musste eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eingesetzt werden, da sich mit 10  $\mu\text{M}$  keine messbare Inhibierung erreichen ließ).

Die Inhibierungseffektivität der untersuchten Flavan-3-ole und deren Metabolite nahm in folgender Reihenfolge ab: (+)-Catechin (**22**) > (-)-Epicatechin (**5**) > racemisches  $\delta$ -(3',4'-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton (**9b**) = Procyanidin B<sub>2</sub> (**4**) > (S)- $\delta$ -(3',4',5'-Trihydroxy-phenyl)- $\gamma$ -valerolacton (**9a**) (s. Tabelle 9).

**Tabelle 9:** Inhibierung von Soja LOX-1 durch Flavonoide und deren intestinaler Metabolite (Flavan-3-ole und Metabolite: 50  $\mu\text{M}$ ; alle anderen: 10  $\mu\text{M}$ ).

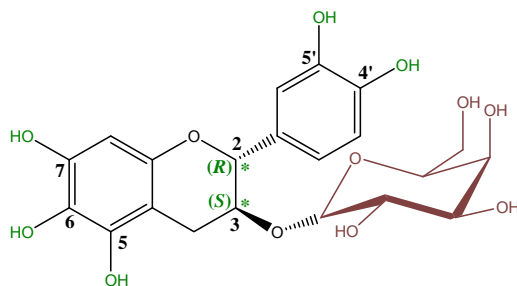
Flavan-3-ole und Metabolite	Restaktivität [%]	Quercetin- und <i>p</i> Np-glycoside	Restaktivität [%]
(+)-Catechin ( <b>22</b> )	24,4	Quercetin ( <b>1a</b> )	64,4
(-)-Epicatechin ( <b>5</b> )	49	Quercetin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid (Q3glc) ( <b>1b</b> )	49
(S)- $\delta$ -(3',4',5'-Trihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton ( <b>9a</b> )	80	Quercetin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactosid (Q3gal) ( <b>1c</b> )	13,3
		Quercetin-3- <i>O</i> - $\alpha$ -L-rhamnosid (Q3rha) ( <b>1f</b> )	42,2
racemisches $\delta$ -(3',4'-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton ( <b>9b</b> )	77,8	<i>p</i> -Nitrophenylglucosid ( <i>p</i> -Npglc) ( <b>2b</b> )	62,2
		<i>p</i> -Nitrophenylgalactosid ( <i>p</i> -Npgal) ( <b>2c</b> )	35,6
Procyanidin B <sub>2</sub> ( <b>4</b> )	77,8	<i>p</i> -Nitrophenylrhamnosid ( <i>p</i> -Nprha) ( <b>2f</b> )	46,7
Flavone (+ Flavanon Taxifolin)	Restaktivität [%]	Isoflavone und Metabolite	Restaktivität [%]
Apigenin ( <b>24a</b> )	95	Daidzin ( <b>25a</b> )	84,6
Luteolin ( <b>24b</b> )	83,7	Daidzein ( <b>25b</b> )	95
Hispidulin ( <b>24c</b> )	49	Genistein ( <b>25c</b> )	83,8
Scutellarein ( <b>24d</b> )	46	Puerarin ( <b>25d</b> )	62,2
Taxifolin ( <b>23</b> )	71	Equol ( <b>26</b> )	77

Für die Inhibierungsstärke der Flavonole ergab sich folgende Reihenfolge: Scutellarein (**24d**) (46% Restaktivität) > Luteolin (**24b**) > Apigenin (**24a**). Die Effekte von Scutellarein (**24d**) und Hispidulin (**24c**) unterschieden sich mit 46% bzw. 49% Restaktivität kaum.

Die Resultate zeigten ferner, dass Quercetin (**1a**) LOX stärker inhibierte als sein Dihydroderivat Taxifolin (**23**) (s. Tabelle 9). Mit Restaktivitäten von 13,3%-49% hemmten die Quercetinglycoside (**1b, c, f**) LOX effektiver als die entsprechenden *p*-Np-Glycoside (**2b, c, f**) (Restaktivitäten: 46,7%-62,2%) (s. Tabelle 9). Als wirksamste Inhibitoren der Soja LOX-1 erwiesen sich die Galactoside.

Die Inhibierungseffektivität der Isoflavone nahm in folgender Reihenfolge ab: Puerarin (**25d**) > Genistein (**25c**) > Daidzin (**25a**) > Daidzein (**25b**). Der intestinale Isoflavon-Metabolit Equol (**26**) zeigte mit 77% Restaktivität einen stärkeren Hemmeffekt als die meisten untersuchten Isoflavone (s. Tabelle 9).

In Abbildung 45 sind die als inhibierungssteigernd identifizierten Strukturelemente (dreifache Hydroxylierung an Ring A, vicinale Hydroxygruppen an Ring B, Stereochemie an C2 (*R*) bzw. C3 (*S*) und Konjugation mit Galactose an C3) zusammengefasst.



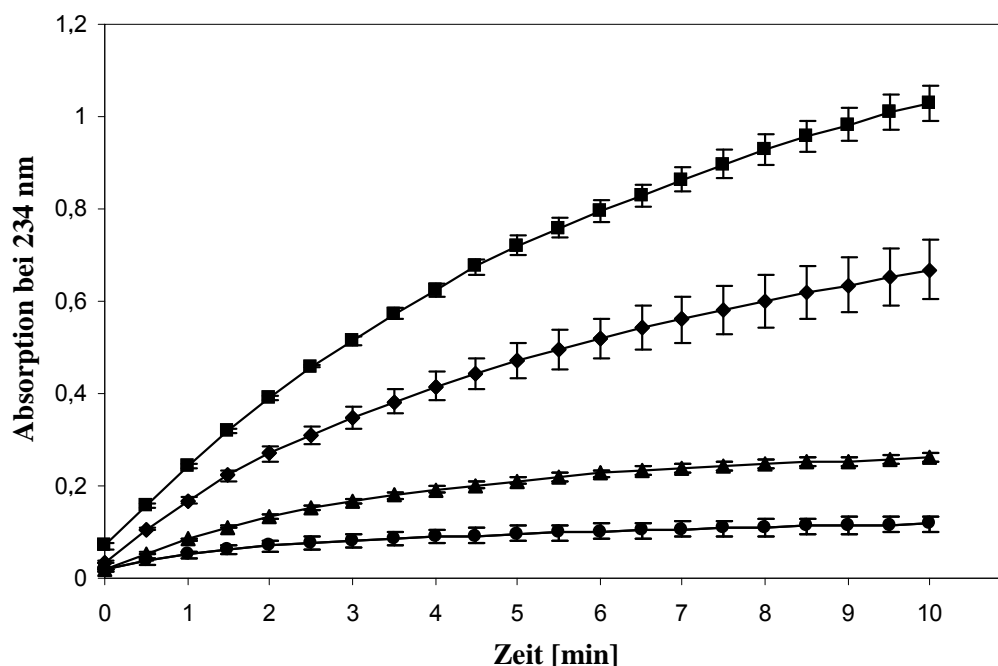
**Abbildung 45:** Zusammenfassung LOX-inhibierungssteigernder Strukturelemente. Grün: in der Literatur schon beschrieben (Richard-Forget *et al.* 1995, Werz 2007), Rot: noch nicht literaturbekannt.

Das bekannte Potential von Polyphenolen zur LOX-Hemmung wurde durch die bei unseren Versuchen erzielten Ergebnisse im Wesentlichen bestätigt und im Hinblick auf den Effekt der Zuckerkonjugation erweitert. Über das Verhalten von Anthocyanen gegenüber LOX war dagegen bisher praktisch nichts bekannt. Daher waren im Folgenden Anthocyane als LOX-Inhibitoren genauer zu untersuchen. Die Ergebnisse werden im nächsten Abschnitt präsentiert.

## 3.2 Anthocyane als LOX-Inhibitoren

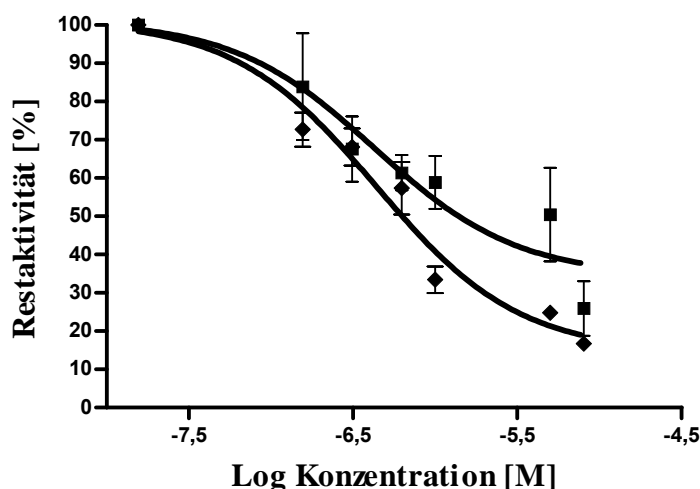
### 3.2.1 Soja LOX-1

Zur Ermittlung ihres LOX-Inhibitionspotentials wurden die Anthocyane Delphinidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid (Dp3glc) (**15c**), Delphinidin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid (Dp3gal) (**15b**), Dp3ara (**15d**), Cyanidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid (Cy3glc) (**15g**), Cyanidin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid (Cy3gal) (**15f**), Cy3ara (**15h**), Peonidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid (Pn3glc) (**15n**), Peonidin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid (Pn3gal) (**15m**), Peonidin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinosid (Pn3ara) (**15o**), Malvidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid (Mv3glc) (**15r**) und ihre Aglycone untersucht (Isolierung der Anthocyane s. Abschnitt E 3.2.2-3.2.5; Durchführung der Enzymversuche s. Abschnitt E 3.2.8.1). Um die Wechselwirkungen und den Hemmtyp zu untersuchen, wurde Soja LOX-1 als bekanntes und standardmäßig angewendetes Modellsystem benutzt. Der zeitliche Ablauf der durch Soja LOX-1 katalysierten Reaktion bei Anwesenheit von 0-8  $\mu$ M Dp3gal (**15b**) ist in Abbildung 46 dargestellt.



**Abbildung 46:** Zeitlicher Ablauf der LOX-katalysierten Reaktion. Das Inhibierungspotential von Dp3gal (**15b**) wurde mit Soja LOX-1 für 10 min in sauerstoffgesättigtem 0,1 M Boratpuffer (pH 9,0) untersucht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu$ M Linolsäure gestartet und die Bildung des Hydroperoxidprodukts wurde bei 234 nm verfolgt. Die Konzentrationen von Dp3gal (**15b**) waren 0 (■), 0,1 (◆), 0,3 (▲) und 8  $\mu$ M (●). Aufgetragen sind die Mittelwerte ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

Alle untersuchten Anthocyane und Anthocyanidine, mit Ausnahme der Malvidinderivate – sie zeigten keinen messbaren Hemmeffekt - inhibierten die Soja LOX-1 konzentrationsabhängig, wie repräsentativ an den Beispielen von Dp3glc (**15c**) und Dp3gal (**15b**) in Abbildung 47 dargestellt ist.



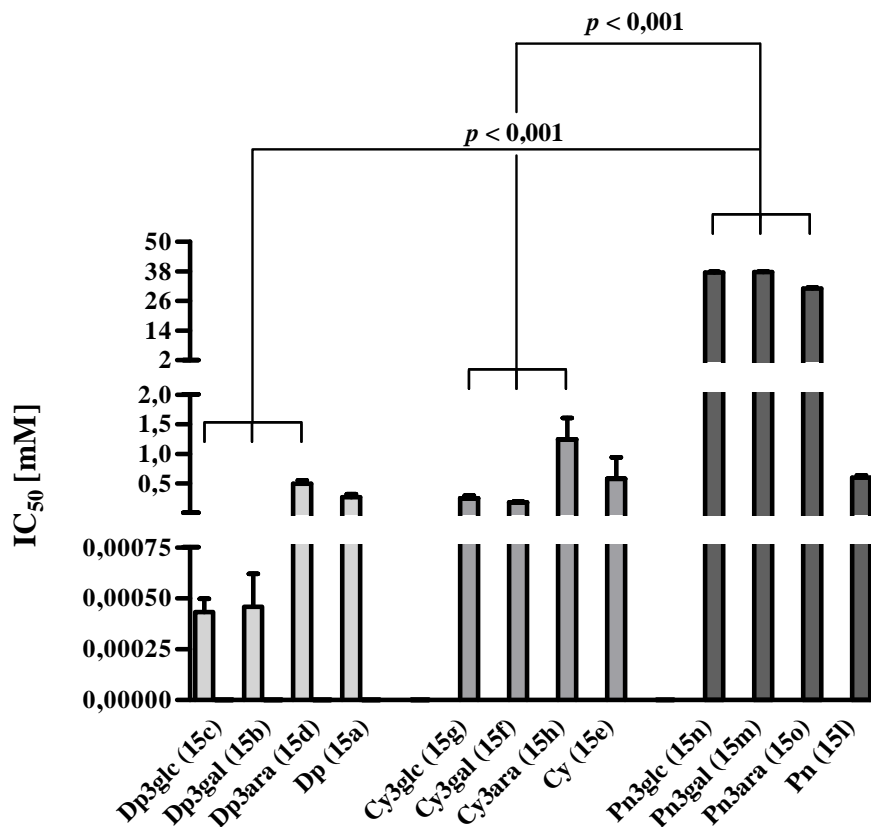
**Abbildung 47:** Dosis-Wirkungskurven der Inhibierung von Soja LOX-1; repräsentativ: Dp3-glc (**15c**) (■) und Dp3gal (**15b**) (◆). Beide Komponenten wurden mit Soja LOX-1 für 10 min in sauerstoffgesättigtem 0,1 M Boratpuffer (pH 9,0) untersucht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu$ M Linolsäure gestartet und die resultierende Bildung des Hydroperoxidprodukts wurde bei 234 nm verfolgt. Aufgetragen sind die Mittelwerte ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

Abbildung 48 zeigt eine schematische Übersicht der bestimmten  $IC_{50}$ -Werte.

Die Delphinidinderivate (**15a-d**) waren mit  $IC_{50}$ -Werte von 0,43  $\mu$ M-0,49 mM (im Detail: Dp3glc (**15c**):  $0,43 \pm 0,07 \mu$ M, Dp3gal (**15b**):  $0,46 \pm 0,16 \mu$ M, Dp3ara (**15d**):  $0,49 \pm 0,06$  mM, Delphinidin (Dp) (**15a**):  $0,27 \pm 0,06$  mM) die effektivsten Inhibitoren, gefolgt von den Cyanidderivaten (**15e-h**) mit  $IC_{50}$ -Werten von 0,18-1,24 mM (im Detail: Cyglc (**15g**):  $0,25 \pm 0,04$  mM, Cy3gal (**15f**):  $0,18 \pm 0,02$  mM, Cy3ara (**15h**):  $1,24 \pm 0,36$  mM, Cyanidin (Cy) (**15e**):  $0,58 \pm 0,36$  mM) und den Peonidderivaten (**15l-o**) mit den höchsten  $IC_{50}$ -Werten von 0,59-37,7 mM (im Detail: Pn3glc (**15n**):  $37,5 \pm 0,33$  mM, Pn3gal (**15m**):  $37,7 \pm 0,25$  mM, Pn3ara (**15o**):  $31 \pm 0,43$  mM, Peonidin (Pn) (**15l**):  $0,59 \pm 0,04$  mM) (Abbildung 48).



Die statistischen Analysen (Durchführung s. Abschnitt E 3.2.8.5) ergaben signifikant niedrigere ( $p < 0,001$ )  $IC_{50}$ -Werte der unmethylierten Anthocyane (im Detail: Dp3glc (**15c**), Dp3gal (**15b**), Dp3ara (**15d**), Cy3glc (**15g**), Cy3gal (**15f**), Cy3ara (**15h**)) verglichen mit den methylierten Peonidinglycosiden (im Detail: Pn3glc (**15n**), Pn3gal (**15m**), Pn3ara (**15o**)) (Abbildung 48).



**Abbildung 48:**  $IC_{50}$ -Werte [mM] der Inhibierung von Soja LOX-1 durch Anthocyane und entsprechenden Aglyconen. Die  $IC_{50}$ -Werte sind dargestellt als Mittelwerte ( $n=3$ ) + SD. Signifikanz-Tests wurden durch one-way ANOVA mit „post-hoc Bonferroni's multiple comparison test“ durchgeführt. Dp3glc: Delphinidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid, Dp3gal: Delphinidin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid, Dp3ara: Delphinidin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinosid, Dp: Delphinidin, Cy3glc: Cyanidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid, Cy3gal: Cyanidin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid, Cy3ara: Cyanidin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinosid, Cy: Cyanidin, Pn3glc: Peonidin-3-*O*- $\beta$ -D-glucosid, Pn3gal: Peonidin-3-*O*- $\beta$ -D-galactosid, Pn3ara: Peonidin-3-*O*- $\alpha$ -L-arabinosid, Pn: Peonidin.

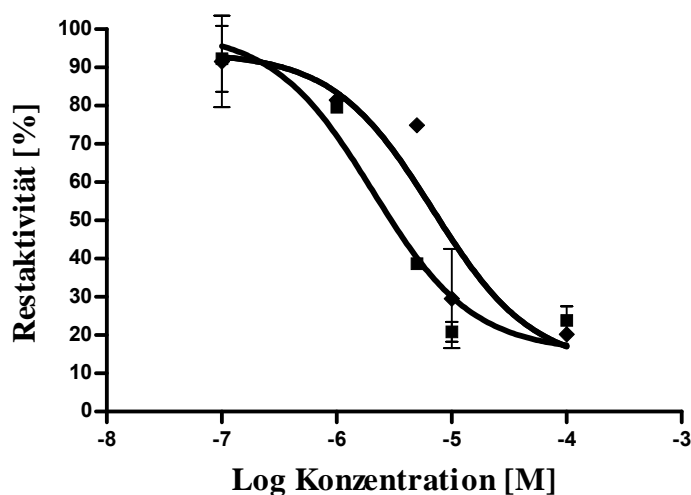
### 3.2.2 5-LOX aus menschlichen neutrophilen Granulozyten

Die beiden effektivsten Soja LOX-1 Inhibitoren, Dp3glc (**15c**) und Dp3gal (**15b**), wurden zusätzlich mit 5-LOX aus isolierten humanen neutrophilen Granulozyten untersucht (Durchführung s. Abschnitt E 3.2.8.2). Hierfür wurden neutrophile Granulozyten

aus peripherem Humanblut isoliert und deren Zellvitalität überprüft (Durchführung s. Abschnitt E 3.2.6). Sowohl die Zellvitalität ( $> 90\%$  lebende Zellen) als auch die Zellkonzentration ( $> 5000$  Zellen/ $\mu\text{l}$ ) erwiesen sich nach Anfärbung mit Trypan-blau und mikroskopischer Analyse als für die geplanten Studien als geeignet.

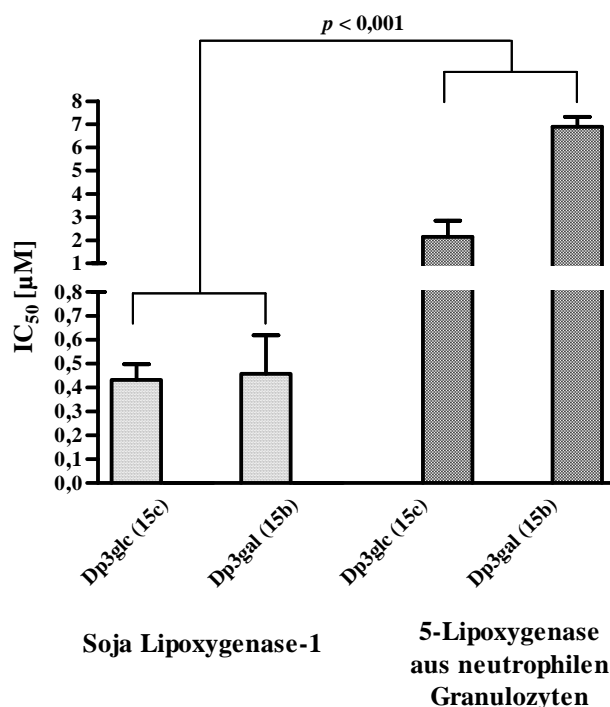
Für die Inhibierungsversuche wurden die Granulozyten lysiert und die 5-LOX-Aktivität im entstehenden Lysat spektralphotometrisch bestimmt (Durchführung und Aktivität s. Abschnitt E 3.2.8.2).

Dp3glc (**15c**) und Dp3gal (**15b**) inhibierten effektiv auch die Aktivität der 5-LOX konzentrationsabhängig (Abbildung 49). Diese beiden untersuchten Anthocyane übertrugen mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von  $2,15 \pm 0,7 \mu\text{M}$  (Dp3glc (**15c**)) und  $6,9 \pm 0,42$  (Dp3gal (**15b**)) ihr starkes Soja LOX-1-Inhibitionspotential auf die humane 5-LOX.



**Abbildung 49:** Dosis-Wirkungskurven der Inhibition von 5-LOX aus humanen neutrophilen Granulozyten durch Dp3glc (**15c**) (■) und Dp3gal (**15b**) (◆). Beide Komponenten wurden mit 5-LOX aus humanen neutrophilen Granulozyten für 5 min in sauerstoffgesättigtem 0,1 M „phosphate buffered saline“ (PBS)-Puffer (pH 7,4) untersucht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM Arachidonsäure gestartet und die resultierende Bildung von 5-HETE wurde bei 236 nm verfolgt. Aufgetragen sind die Mittelwerte ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

Die bei Versuchen mit Dp3glc (**15c**) bzw. Dp3gal (**15b**) und 5-LOX ermittelten  $IC_{50}$ -Werte waren signifikant höher ( $p < 0,001$ ) als die bei den Versuchen mit Soja LOX-1 bestimmten  $IC_{50}$ -Werte (Abbildung 50).

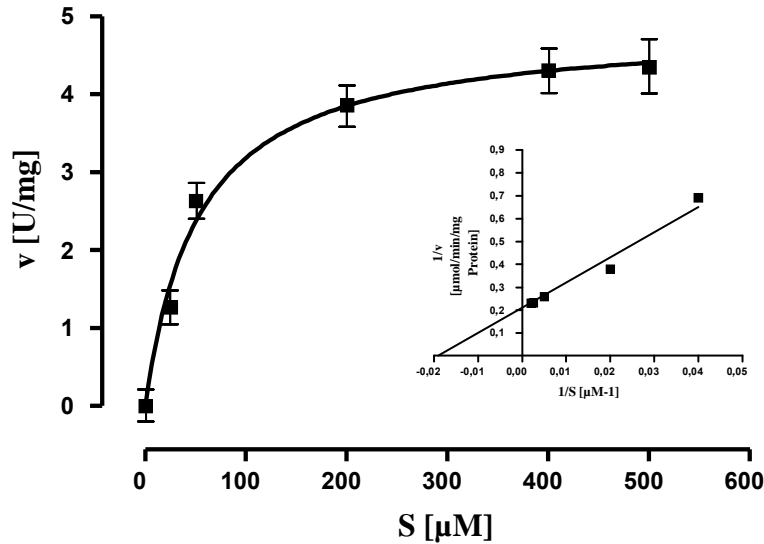


**Abbildung 50:**  $IC_{50}$ -Werte [µM] der Inhibition von Soja LOX-1 und 5-LOX aus humanen neutrophilen Granulozyten durch Dp3glc (**15c**) and Dp3gal (**15b**). Die  $IC_{50}$ -Werte sind dargestellt als Mittelwerte ( $n=3$ ) + SD. Signifikanz-Tests wurden durch one-way ANOVA mit „post-hoc Bonferroni's multiple comparison test“ durchgeführt.

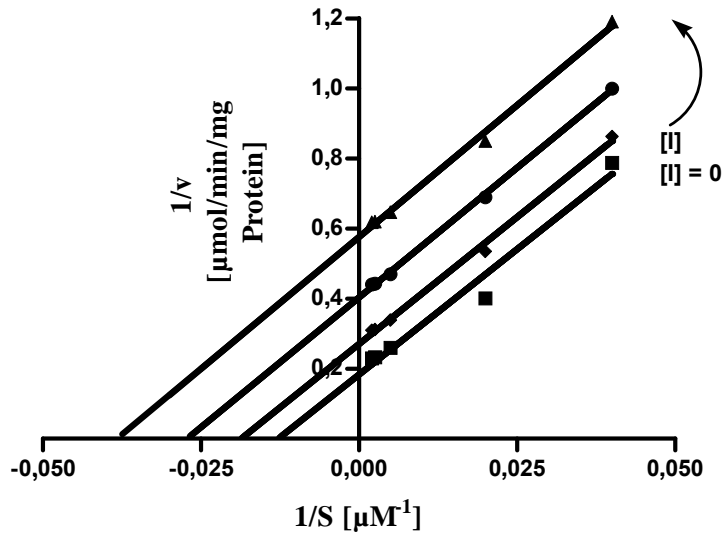
Mit Peonidin (**15l**), das aufgrund guter kommerzieller Verfügbarkeit als repräsentatives Beispiel gewählt wurde, erfolgte mit Soja LOX-1 die Ermittlung des Inhibitionstyps (Durchführung s. Abschnitt E 3.2.8.3).

Nach spektralphotometrischer Messung von mit unterschiedlichen Inhibitor- und Substratkonzentrationen (0-1500 bzw. 25-500 µM) durchgeführten Versuchen wurden die Daten nach Michaelis-Menten ausgewertet und anschließend nach Lineweaver-Burk linearisiert (Abbildung 51). Durch diese doppelt-reziproke Auftragung und Linearisierung der erhaltenen Daten zeigt bekanntlich jeder der drei Inhibitionstypen (kompetitiv, nichtkompetitiv, unkompetitiv) ein charakteristisches Muster. Da bei unseren Ergebnissen die Trendlinien parallel angeordnet sind, handelt es sich um einen unkompe-

titiven Inhibierungstyp, wodurch die Affinität des Inhibitors für den Enzym-Substrat-Komplex beschrieben wird (Abbildung 52).



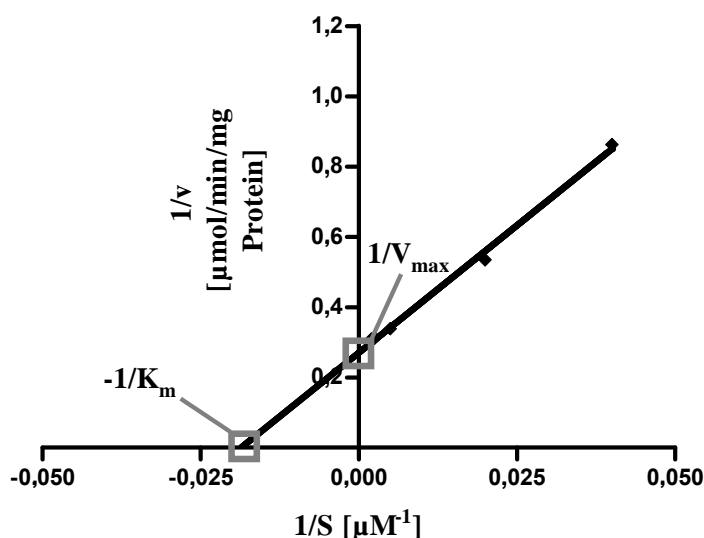
**Abbildung 51:** Kombinierte Darstellung der Werte zur Charakterisierung der Soja LOX-1-Aktivität. Die Darstellung besteht aus einem Michaelis-Menten-Plot (Mittelwerte ( $n=3$ )  $\pm$  SD) und einem integrierten Lineweaver-Burk-Plot (Mittelwerte ( $n=3$ )). S: Substrat (Linolsäure).



**Abbildung 52:** Lineweaver-Burk Plot der Inhibition von Soja LOX-1 durch Peonidin (**151**) (Mittelwerte ( $n=3$ )). Der Assay wurde mit Enzym (10  $\mu\text{L}$  einer 0,5 mg/ml Proteinstammlösung; spezifische Aktivität: 131000 units/mg Protein) in An- und Abwesenheit von Peonidin (**151**) (verschiedene Konzentrationen) durchgeführt. Die Peonidinkonzentrationen waren 0 ( $\blacksquare$ ), 500 ( $\blacklozenge$ ), 1000 ( $\bullet$ ) und 1500  $\mu\text{M}$  ( $\blacktriangle$ ). Die Konzentrationen der Linolsäure (S) variierten von 25-500  $\mu\text{M}$ . Bei Abwesenheit des Inhibitors betragen der  $K_m$ -Wert 78,4  $\mu\text{M}$  und der  $V_{\text{max}}$ -Wert 5,47  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , während sowohl die  $K_m$ -Werte bei zunehmender Inhibitorkonzentration  $[I]$  (500, 1000 und 1500  $\mu\text{M}$ ) mit 53,8, 36,8 und 26,2  $\mu\text{M}$  als auch die  $V_{\text{max}}$ -Werte mit 3,71, 2,48 und 1,74  $\mu\text{mol}/\text{min}$  abnahmen.

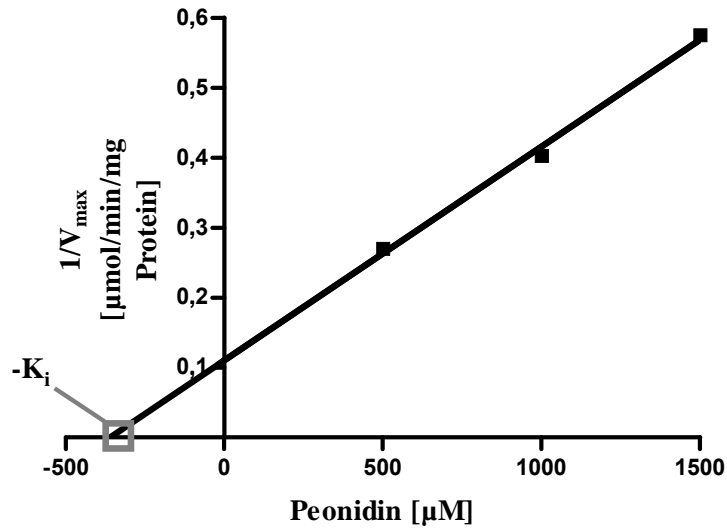
Zum rechnerischen Nachweis wurden die aus dem Lineweaver-Burk Diagramm erhaltenen  $1/V_{\max}$  und  $-1/K_m$ -Werte, wie in Abbildung 53 dargestellt, abgelesen, aufgelöst und  $V_{\max}$  bzw.  $K_m$  berechnet.

Bei Abwesenheit des Inhibitors betragen der  $K_m$ -Wert  $78,4 \mu\text{M}$  und der  $V_{\max}$ -Wert  $5,47 \mu\text{mol}/\text{min}$ , während sowohl die  $K_m$ -Werte bei zunehmender Inhibitorkonzentration  $[I]$  ( $500, 1000$  und  $1500 \mu\text{M}$ ) mit  $53,8, 36,8$  und  $26,2 \mu\text{M}$  als auch die  $V_{\max}$ -Werte mit  $3,71, 2,48$  und  $1,74 \mu\text{mol}/\text{min}$  abnehmen.



**Abbildung 53:** Graphische Darstellung zur Ermittlung von  $V_{\max}$  und  $K_m$ . Lineweaver-Burk Plot der Inhibition von Soja LOX-1 durch Peonidin (**151**). Der Assay wurde mit Enzym ( $10 \mu\text{L}$  einer  $0,5 \text{ mg}/\text{ml}$  ProteinstammLösung; spezifische Aktivität:  $131000 \text{ units}/\text{mg Protein}$ ) in An- und Abwesenheit von Peonidin (verschiedene Konzentrationen) durchgeführt. Dargestellt: lediglich Inhibition mit  $500 \mu\text{M}$  ( $\blacktriangle$ ) Peonidin (**151**). Die Konzentrationen der Linolsäure (S) variierten von  $25$ - $500 \mu\text{M}$ .

Die Inhibierungskonstante  $K_i$  wurde graphisch mittels Sekundärplot bestimmt. Hierfür wurden die  $1/V_{\max}$  Werte aus dem Lineweaver-Burk Plot gegen die Konzentrationen des Inhibitors aufgetragen (Abbildung 54). Die Inhibierungskonstante  $K_i$ , die sich aus dem Schnittpunkt der erhaltenen Trendlinie mit der x-Achse ergab, betrug  $361 \mu\text{M}$ .



**Abbildung 54:** Bestimmung der Inhibierungskonstanten  $K_i$  von Peonidin (**15I**). Dazu wurden die  $1/V_{\text{max}}$ -Werte aus Abbildung 54 gegen die Peonidin-Konzentrationen (500, 1000 und 1500  $\mu\text{M}$ ) aufgetragen.

Nachfolgend werden die im Abschnitt B dargestellten Ergebnisse diskutiert. Die Reihenfolge der Diskussionspunkte wird dabei aus Abschnitt B übernommen.

## **C. Diskussion**

---





## **1 Prüfung auf metabolische Kompetenz der verwendeten Ileo- und Kolostomabeutelinhalte**

Vor ihrer Verwendung zur Umsetzung der zu untersuchenden Substrate wurde die Mikroflora der Stomabeutelinhalte zunächst auf ihre enzymatische Aktivität und Vitalität überprüft. Hierzu wurden die enzymatischen Aktivitäten der Darminhalte zunächst anhand des APIZYM<sup>TM</sup>-Testsystems untersucht. Solche standardisierten Testsysteme werden bereits seit vielen Jahren in der Routineanalytik erfolgreich zum Nachweis enzymatischer Aktivitäten in ungereinigten Untersuchungsmaterialien, wie z.B. Geweben, Zellen, biologischen Flüssigkeiten, Mikroorganismen etc., eingesetzt. Die Durchführung des Tests ermöglichte die Überprüfung von 19 ausgewählten Enzymaktivitäten mittels geeigneter Farbreaktionen.

Wie Tabelle 6 zu entnehmen ist, waren im Wesentlichen Hydrolasen, wie z. B.  $\beta$ -Glucuronidase,  $\beta$ -Glucosidase und  $\alpha$ -Glucosidase (Scheline 1973; Krishnaiah *et al.* 2001; Laube *et al.* 2001) im Großteil der untersuchten Medien aktiv vertreten. Um die interindividuellen Unterschiede der Beutelinhalte bezüglich des Vorkommens einiger Enzyme (Tabelle 6) nicht zu vernachlässigen, wurden die Metabolismusstudien mit jedem Inhalt durchgeführt. Der Test diente weiterhin als Positivkontrolle für die enzymatischen Aktivitäten der verwendeten Medien und wurde parallel zu den Inkubationsexperimenten durchgeführt.

Darüber hinaus wurde die Anzahl kolonienbildender Einheiten aller Beutelinhalte nach 4-tägiger Bebrütung bei 37°C unter anaeroben Bedingungen gemäß Angaben im Abschnitt E 1.2 durchgeführt. Damit wurde abgesichert, dass der zügige, unter anaerober Atmosphäre gehaltene Transport der Beutelinhalte vom jeweiligen Probanden ins Labor die Lebensfähigkeit der Anaerobier, die den vorwiegenden Anteil in diesen Darmsegmenten darstellen, nicht beeinträchtigte. Die erhaltenen Werte von 1,77E+08 bis 6,40E+10 Kbe/g stimmen mit der Literatur überein (Gorbach *et al.* 1967; Hart *et al.* 2002) und belegen die Lebensfähigkeit der Anaerobier während des Transports (Tabelle 7).

## **2 Untersuchung des Metabolismus von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen mit verschiedenen Modellsystemen**

### **2.1 Inkubation von Apfelinhaltsstoffen mit Ileo- und Kolostomabeutelinhalten**

#### **2.1.1 Einfluss des Zuckerrests, der Aglyconstruktur und der Mikroflorkonzentration auf die Hydrolyse von Phenolglycosiden im menschlichen Dünndarm**

Trotz zahlreicher nachgewiesener chemopräventiver *in vitro*-Effekte ist die *in vivo*-Situation von Polyphenolen im Hinblick auf gesundheitsfördernde Effekte noch immer ungeklärt (Hertog *et al.* 1992; Scalbert und Williamson 2000; USDA 2003; Manach *et al.* 2004). Der aktuelle Stand wurde kürzlich zusammengefasst (Manach *et al.* 2004; Manach *et al.* 2005). Demnach wird der größte Teil der oral aufgenommenen Polyphenole im Dünndarm absorbiert oder metabolisiert. Dies wurde u.a. in unserem Arbeitskreis durch eine Studie mit Apfelpolyphenolen und Ileostomaprobanden bestätigt, bei der nach oraler Aufnahme in den Ileostomabeutelinhalten bis zu 33% Apfelpolyphenole wiedergefunden wurden (Kahle *et al.* 2005).

In welchem Maß verschiedene Polyphenole absorbiert oder metabolisiert werden, hängt von deren Struktur ab. Beispielsweise werden Quercetinglucoside (**1b**) im Dünndarm vollständig in Quercetin (**1a**) und Glucose gespalten, die Spaltprodukte zum größten Teil (64,5-80,7%) absorbiert (Walle *et al.* 2000; Williamson *et al.* 2000), konjugiert und im Plasma transportiert (Day *et al.* 2001). Tierstudien, *ex vivo*- und *in vivo*-Experimente (Arts *et al.* 2004; Keppler und Humpf 2005; Kahle *et al.* 2005) zeigten, dass die Hydrolyse von Quercetinglycosiden im Dünndarm von der Struktur des konjugierten Zuckers abhängt. So war lediglich Q3rha (**1f**) resistent gegen ileale Hydrolyse, wohingegen Q3ara (**1d**) zum größten Teil, Q3glc (**1b**), Q3gal (**1c**) und Q3xyl (**1e**) vollkommen gespalten wurden. Bis zu diesem Metabolismusschritt hat man nachweislich keinen mikrobiell bedingten Abbau des Aglycons beobachtet (Manach *et al.* 2004; Rechner *et al.* 2004).

Sowohl die Abhängigkeit von der Struktur des Zuckers bei der Hydrolyse als auch die Stabilität des Aglycons wurden in unseren Studien, bei der Effekte in der Mundhöhle und im Magen (Walle *et al.* 2005) unberücksichtigt blieben, bestätigt (Abbildung 33). Q3glc (**1b**) wurde schnell gespalten, während Q3rha (**1f**) von der Mikroflora nicht metabolisiert wurde (Abbildung 31). Das Aglycon der hydrolysierten Glucoside erreicht nach Absorption den Blutkreislauf, während die Rhamnose unverändert ins Kolon gelangen und dort der Mikroflora ausgesetzt werden (Williamson *et al.* 2000). Diese spaltet Q3rha (**1f**) zu Rhamnose und Quercetin (**1a**), welches dann u.a. zu Phloroglucin (**11**) und 3,4-Dihydroxy-phenyllessigsäure (**13**) (Groenewoud und Hundt 1986; Miyake *et al.* 1997; Schneider *et al.* 1999; Labib *et al.* 2004) abgebaut wird.

Um die strukturelle Abhängigkeit der Hydrolyse auf das Aglycon auszuweiten, wurde die Glycosidaseaktivität der Mikroflora zusätzlich mit *p*-Np-Glycosiden (**2b-f**) (*p*-Npgal (**2c**), *p*-Npara (**2d**), *p*-Nprha (**2f**), *p*-Npxyl (**2e**) und *p*-Npglc (**2b**)) – häufig eingesetzten synthetischen Standardsubstraten zur Überprüfung von Enzymaktivitäten - untersucht. Deren Hydrolyse war, den Quercetinanaloge entsprechend, ebenfalls vom Zuckerrest abhängig. Darüber hinaus bewies der direkte Vergleich der Hydrolyseraten beider Phenolklassen den Einfluss der Aglyconstruktur, denn die Spaltung der *p*-Np-Glycoside (**2b-f**) war in jedem Fall schneller als die der entsprechenden Quercetin-glycoside (**1b-f**) (Abbildung 33). Diese Beobachtung bestätigte schon früher von Berrin *et al.* (2003) vorgelegte Ergebnisse. Während ihrer Studien mit einer cytosolischen  $\beta$ -Glucosidase aus menschlichen Zellen wurden die untersuchten Flavonoid-glucoside in Abhängigkeit ihrer Aglyconstruktur in unterschiedlichem Maß hydrolysiert. Hierfür wurden vier einzelne Proteinmutanten (Val<sup>168</sup>→Tyr, Phe<sup>225</sup>→Ser, Tyr<sup>308</sup>→Ala und Tyr<sup>308</sup>→Phe) die Homologie zur Substratbindungsstelle (Aglycon) der  $\beta$ -Glucosidase besaßen, in *Pichia pastoris* exprimiert, aufgereinigt und charakterisiert. Die Val<sup>168</sup>→Tyr Mutation beeinflusste während der Versuche mit den *p*-Np-Glycosiden die  $K_m$  nicht, verfunffachte diese jedoch bei Anwendung der Flavonoid-glycoside. Diese Ergebnisse zeigten erstmals die biochemische Bedeutung dieses Rests während der Aglyconbindung des Substrats.

Aufgrund ihrer vorwiegend  $\beta$ -glycosidischen Struktur schienen Quercetinglycoside resistent gegen Hydrolyse durch Pankreasenzyme und somit auch gegen Absorption zu sein (Kuehnau 1976). Im Laufe der Zeit hat man jedoch gezeigt, dass nach Zufuhr von Quercetinglucosid-reicher Nahrung das Aglycon rasch ins Plasma gelangte, was eine schnelle Absorption im Dünndarm bewies (Scalbert und Williamson 2000; Day *et al.* 2001). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde der Absorptionsmechanismus vor allem von Quercetinglucosid eingehender untersucht; dies führte zu zwei Hypothesen (Day *et al.* 2003):

- a) aktiver Transport von Quercetinglucosiden in Enterozyten durch den SGLT gefolgt von systematischer zellulärer Hydrolyse durch CBG;
- b) luminale Hydrolyse der Glucoside durch die LPH mit nachfolgender Absorption des freigesetzten Aglycons durch passive Diffusion.

Die Ergebnisse weiterer Versuche wiesen der LPH, einer auf der Bürstensaummembran des Säugerdünndarms gebundenen  $\beta$ -Glycosidase, die entscheidende Rolle zu (Day *et al.* 2000 und 2003).

Nichtsdestotrotz ist LPH - wie erwähnt - membrangebunden, und dürfte deshalb nur zu einem geringen Anteil, vor allem über Abrieb, an der Hydrolaseaktivität des angewendeten Ileostomabeutelinhalts beteiligt sein. Aus diesem Grund postulierten wir, dass die Spaltung von Phenolglycosiden insbesondere auch von der hydrolytischen Aktivität der Mikroflora bestimmt wird. Erstmals wurde dies durch unsere mit Q3glc (**1b**) durchgeführte Studie bewiesen, bei der eine eindeutige Abhängigkeit der Hydrolyseraten vom eingesetzten Gehalt an Mikroflora beobachtet wurde. Dieses Resultat fand ferner eine Stütze durch das Fehlen jeglicher Hydrolyse von Q3glc (**1b**) nach Zusatz eines Antibiotikums (Abbildung 34).

Trotz der interindividuellen Variabilität der Mikroflora in den verwendeten Ileostomabeutelinhalten, welche durch die Anwendung von drei verschiedenen Probanden nur teilweise berücksichtigt wurde, lässt sich nunmehr folgern, dass die Hydrolyse von

Phenolglycosiden im menschlichen Intestinaltrakt neben der Art der Zuckereinheit und der Aglyconstruktur auch von der Menge der verfügbaren Mikroflora abhängt.

### **2.1.2 Inkubation der gegen ilealen Abbau resistenten Verbindungen mit Kolostomabeutelinhalten**

Die folgenden Verbindungen hatten sich bereits bei Ileostoma-Modellstudien mit Quercetinglycosiden (**1b-f**) (s. Abschnitt B 3.1.1) und weiteren Polyphenolen (Daten nicht gezeigt) als stabil erwiesen: Quercetin (**1a**), Q3rha (**1f**), Chlorogensäure (**3**), Procyanidin B<sub>2</sub> (**4**), (-)-Epicatechin (**5**) und Phloretin (**6**). Da diese Verbindungen aufgrund ihrer ilealen Stabilität das Kolon erreichen, wurden sie mit Kolostomabeutelinhalt inkubiert, um den weiteren Verlauf ihres Metabolismus zu zeigen. Der Stoffwechsel dieser oder ähnlicher Verbindungen durch Kolon- bzw. Fäkalflora ist in unserem Arbeitskreis und von Anderen bereits eingehend untersucht worden (Rechner *et al.* 2004; Labib 2006), sodass auf eine detaillierte Diskussion der einzelnen Metabolismvorgänge verzichtet werden kann.

Durch Inkubation von Quercetin (**1a**) (Abbildung 35, Bild E) wurden die Ringspaltungsprodukte Phloroglucin (**11**), 3,4-Dihydroxy-phenylelessigsäure (**13**) und 3,4-Dihydroxy-methylbrenzcatechin (**14**) erhalten. Die Bildung von 3,4-Dihydroxy-phenylelessigsäure (**13**) und Phloroglucin (**11**) belegte die Fähigkeit der Mikroflora des Kolons, Quercetin (**1a**) durch Spaltung des C-Rings abzubauen. Phloroglucin (**11**) und 3,4-Dihydroxy-phenylelessigsäure (**13**) unterlagen einem weiteren Abbau, der jedoch von uns nicht genauer untersucht wurde (Abbildung 35, Bild E). Die beschriebene intermediäre Bildung von Phloroglucin (**11**) und 3,4-Dihydroxy-phenylelessigsäure (**13**) steht in Übereinstimmung mit bereits vorliegenden Literaturergebnissen (Schneider *et al.* 2000; Braune, Gutschow *et al.* 2001; Labib *et al.* 2004). Sowohl Justesen *et al.* (2000) als auch Labib *et al.* (2004) führten Inkubationsversuche mit humanen Fäzes bzw. Schweinecaecum und Quercetin (**1a**) durch und wiesen dabei die Bildung von 3,4-Dihydroxy-methylbrenzcatechin (**14**) nach. Dies stimmt ebenfalls mit unseren Ergebnissen überein.

Q3rha (**1f**) wurde von der Mikroflora des Kolons vollständig zum Aglycon Quercetin (**1a**) abgebaut (Abbildung 35, Bild F). Eine darauffolgende Ringspaltung wurde nicht beobachtet. Die Kompetenz der Kolonmikroflora, im Gegensatz zu der des Ileums Rhamnoside zu spalten, ist bekannt und wurde von Aura *et al.* (2002) durch *in vitro*-Versuche mit humaner Fäkalflora und *p*-Nprha (**2f**) bzw. Rutin gezeigt.

Die Inkubation von Chlorogensäure (**3**) führte zur Spaltung in Kaffee- (**7**) und Chinasäure (**8**). Beide Metabolite blieben bis zu einer Inkubationsdauer von 24 h stabil (Abbildung 35, Bild A). Schon Plumb *et al.* (1999) hatten gezeigt, dass Chlorogensäure (**3**) im Menschen durch ein Enzym der Kolonflora in Kaffee- (**7**) und Chinasäure (**8**) gespalten wird. Die Spaltung von Chlorogensäure (**3**) ist später von Rechner *et al.* (2004) eingehend untersucht worden. Die dort beschriebene weitere Umwandlung von Kaffeesäure (**7**) zu Dihydrokaffeesäure (**10**) und 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure wurde bei unseren Versuchen jedoch nicht festgestellt.

Procyanidin B<sub>2</sub> (**4**) wurde während der Inkubation nur teilweise abgebaut; als einziger Metabolit war (-)-Epicatechin (**5**) detektierbar (Abbildung 35, Bild B). Der beschriebene Abbau von Procyanidin B<sub>2</sub> (**4**) war bereits bekannt; so fanden Baba *et al.* (2002) in einer Studie mit Ratten, dass Procyanidin B<sub>2</sub> (**4**) absorbiert, im Urin ausgeschieden und teilweise zu (-)-Epicatechin (**5**) metabolisiert wurde.

Nach Inkubation von (-)-Epicatechin (**5**) wurden  $\delta$ -(3',4',5'-Trihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton (**9a**) und Dihydrokaffeesäure (**10**) gebildet (Abbildung 35, Bild C). Die nachgewiesene Transformation von Flavonolen zu Phenylvalerolactonen und deren anschließende Metabolisierung zu Phenylpropionsäuren im Kolon ist bereits in früheren Studien von Scalbert und Williamson (2000) bzw. Olthof *et al.* (2003) gezeigt worden und fand seine Bestätigung in den von Rechner *et al.* (2004) vorgelegten Ergebnissen. Dabei wurde beschrieben, dass im Kolon während des Abbaus von (-)-Epicatechin (**5**)  $\delta$ -5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton und das methylierte Derivat  $\delta$ -5-(3'-Methoxy-4'-hydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton gebildet wurden.

Phloretin (**6**) wurde zu Phloroglucin (**11**) und *p*-Hydroxy-hydrozimtsäure (**12**) abgebaut (Abbildung 35, Bild D). Auch dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Literaturergebnissen (Labib 2006). Dabei wurde Phloretin (**6**) im Laufe der Inkubation mit Schweinecaecum ebenfalls zu den genannten Metaboliten abgebaut. Zusätzlich wurde noch 3-Phenylpropionsäure detektiert.

## **2.2 Einfluss des Zuckerrests und der Aglyconstruktur auf die Hydrolyse von Heidelbeeranthocyanen im menschlichen Dünndarm und Dickdarm**

Anthocyane sind in Pflanzen, vor allem Beeren, weit verbreitet und werden daher täglich durch die Nahrung aufgenommen. Aktuelle Studien bestätigen eine Anthocyanaufnahme von 12,5 mg/d (USA) bzw. 82 mg/d (Finnland). Nichtsdestotrotz ist deren Verfügbarkeit mit einer Wiederfindung von etwa 0,1% der aufgenommenen Menge im Urin sehr gering (McGhie und Walton 2007).

Nach Eintritt in den Körper werden die Anthocyane zahlreichen metabolischen Veränderungen unterworfen. Über mögliche Metabolisierung in der Mundhöhle gibt es keine Informationen, während sich die Anthocyane im Magen als stabil erwiesen. Dort und im Dünndarm werden sie teilweise absorbiert; der Rest wird im Kolon zu phenolischen Säuren metabolisiert (McGhie und Walton 2007; Keppler und Humpf 2005).

Bezüglich des Metabolismus im Dünndarm fanden Kahle *et al.* (2006), dass nach oraler Aufnahme hohe Anteile an Heidelbeeranthocyanen (bis zu 85%) den Dünndarm unmetabolisiert passierten und das Kolon erreichten. Dabei hatten sowohl die Struktur des B-Rings als auch der gebundene Zucker Einfluss auf Abbau und/oder Absorption der einzelnen Anthocyane. So erwiesen sich an Ring-B methylierte Anthocyane (Pt (**15i-k**), Pn (**15m, n**), Mv (**15q-s**)) verglichen mit den unmethylierten Dp (**15b-d**) und Cy (**15f-h**) als stabiler. Daneben wurden vor allem die Anthocyanoglucoside metabolisiert/absorbiert, während die Arabinoside sich am stabilsten erwiesen.

Um die *in vivo*-Situation des Anthocyanabbaus eingehender bzgl. Aglycon- und Zuckerabhängigkeit im Dünndarm zu untersuchen, wurden *ex vivo*-Studien mit Heidelbeerextrakt und Ileostomabeutelinhalten durchgeführt und die Hydrolyseraten der einzelnen Anthocyane bestimmt. Desweiteren wurden zusätzlich Studien mit Kolostomabeutelinhalten durchgeführt, um die Stabilität der Anthocyane im Dickdarm zu prüfen.

Methylierung am B-Ring und Konjugation mit Arabinose an C3 sind nachweislich Strukturparameter, die eine Stabilität von Anthocyanen im Dünndarm begünstigen. Von Kahle *et al.* (2006) wurde dies für alle Heidelbeeranthocyane (Ausnahme: Dp3ara) bewiesen. Der Einfluss der Methylierung wurde durch unsere *ex-vivo*-Studien mit Ileostomabeutelinhalten bestätigt. Die methylierten Pt- (**15i-k**) Pn- (**15m, n**), und Mv-glycoside (**15q-s**) erwiesen sich im Durchschnitt resistenter gegen mikrobiellen Abbau als die unmethylierten Dp- (**15b-d**) und Cy-glycoside (**15f-h**) (Abbildung 37). Auch der stabilisierende Effekt einer Arabinosekonjugation an C3 wurde während unserer Versuche bei den untersuchten unmethylierten Anthocyanen beobachtet (Abbildung 37). Wie schon von Kahle *et al.* (2006) gezeigt, bildete Dp3ara (**15d**) auch bei den von uns durchgeführten *ex-vivo*-Experimenten eine Ausnahme und war das instabilste Dp-Derivat. Außer den Cyanidinen (Reihenfolge der Geschwindigkeit des *in vivo*-Abbaus: glc > gal > ara; *ex vivo*-Abbau: ara > glc > gal) wurden die *in vivo*-Ergebnisse von Kahle *et al.* (2006) somit auch durch die *ex vivo*-Experimente mit Ileostomabeutelinhalt bestätigt (Abbildung 37).

Da ein Großteil der aufgenommenen Anthocyane in den Dickdarm gelangt (Kahle *et al.* 2006), wurde der Heidelbeerextrakt zusätzlich mit Kolostomabeutelinhalten inkubiert. Die Methylierung am B-Ring hatte keinen Einfluß auf die Stabilität, denn sowohl die Dp- (**15b-d**) und Cy-glycoside (**15f-h**) als auch die Pt- (**15i-k**), Pn- (**15m, n**) und Mv-glycoside (**15q-s**) wurden ungefähr gleich schnell abgebaut. Bei den Inkubationen mit Kolostomabeutelinhalten waren die Anthocyanarabinoside am stabilsten (Abbildung 37).



Zusammenfassend erwies sich das angewandte *ex-vivo*-Stomamodell, bei dem Absorptionsvorgänge unberücksichtigt blieben, als gut geeignet um die *in vivo*-Situation des intestinalen Abbaus von Anthocyanen zu überprüfen. Methylierte und mit Arabinose konjugierte Anthocyane sind demnach im Intestinaltrakt besonders stabil, gelangen bis zu 85% in den Dickdarm (Kahle *et al.* 2006) und könnten dort gegebenenfalls (ihre postulierten) gesundheitsfördernden Effekte ausüben.

### 2.3 Metabolismus von D-Galacturonsäure und amidiertem Pektin

Obwohl der intestinale Metabolismus von hoch- bzw. niederverestertem Pektin sowie von Pektinsäure schon intensiv untersucht worden ist (Dongowski und Lorenz 1998; Dongowski *et al.* 2002; Saito *et al.* 2005), gibt es diesbezüglich kaum Informationen über amidiertes Pektin (**17**) und dessen Monomer D-Galacturonsäure (**16**) (Marounek *et al.* 2005; Gulfi *et al.* 2006; Marounek *et al.* 2007). Zudem ist bisher noch ungeklärt, ob und gegebenenfalls inwieweit diese Komponenten in Mundhöhle und Magen metabolisiert werden.

Der Mundhöhle wird seit langem hydrolytische Aktivität zugeschrieben die u.a. mit der Hydrolyse von Flavonoidglycosiden in Verbindung gebracht wurde (Walle *et al.* 2005). Im Rahmen unserer Experimente mit Speichel erwiesen sich die untersuchten Substrate D-Galacturonsäure (**16**) und amidiertes Pektin (**17**) allerdings als stabil.

Im weiteren Verlauf der Verdauung scheint ein Abbau von Pektin unter den physikochemischen Bedingungen des Magens möglich (Dongowski *et al.* 2002). Dennoch wurde kürzlich gezeigt, dass sich Pektin im Milieu des Magens stabil verhält (Dupuis *et al.* 2006). In der angeführten Studie wurde das Medikament Ketoprofen mit Pektin umhüllt, um einen Transport in den Dickdarm zu ermöglichen. Während der Inkubation mit Magensaftsimulanz blieb der Pektinverband stabil, und nichts von der umhüllten Substanz wurde ins gastrische Medium abgegeben (Dupuis *et al.* 2006). Unsere Studien, welche die Stabilität von D-Galacturonsäure (**16**) und amidiertem Pektin (**17**) im Verlauf der Inkubationen mit künstlichem Magensaft bewiesen, bestätigten im Wesentlichen diese Ergebnisse.

In unseren Versuchen wurde D-Galacturonsäure (**16**) durch Ileo- und Kolostomabeutelinhalte vorwiegend vollständig (Abbildungen 38 und 39), amidiertes Pektin (**17**) teilweise abgebaut (Abbildungen 40 bzw. 42). Bisher wurden weder der gesamte Abbau des Monomers, noch die partielle Depolymerisierung des Pektins durch die Mikroflora des Dünndarms berichtet. Obwohl der Abbau von Pektin durch die Mikroflora des Dickdarms bekannt ist (Dongowski *et al.* 2000), nahm man absolute Stabilität des Polymers im Dünndarm an (Dongowski *et al.* 2002). Mit der Bildung von SCFA und der zusätzlichen Freisetzung von MeOH (**21**) (im Falle des amidierten Pektins (**17**)), wurde ein Abbau der inkubierten Substrate durch die ileale Mikroflora bewiesen. Somit ist eine vollständige Stabilität von Pektin im Dünndarm nicht gegeben. Der verbleibende, stabile Anteil dieses physiologisch aktiven Ballaststoffs gelangt in den Dickdarm und kann dort die beschriebenen gesundheitsfördernden Eigenschaften entfalten (Lim *et al.* 2005; Young Graeme, *et al.* 2005). Allgemein wies amidiertes Pektin (**17**) nach Inkubation mit Ileostomabeutelinhalt (Abbildung 40) eine größere Stabilität auf als nach Inkubation mit Kolostomabeutelinhalt (Abbildung 42).

SCFA und MeOH (**21**) sind bekannte Produkte des Pektinmetabolismus (Bourquin *et al.* 1996; Lindinger *et al.* 1997) und wurden nach Abbau von Pektin gefunden. Die Kontrolle der Bildung von Oligogalacturonsäuren als Zwischenprodukte (Dongowski und Lorenz 1998) wurde im übrigen bei unserer Studie nicht berücksichtigt.

SCFA, vorrangig Acetat (**18**), Propionat (**19**) und Butyrat (**20**), sind neben den Gasen CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub> dominierende Endprodukte des Polysaccharidmetabolismus (Wong *et al.* 2006). Als solche erfüllen sie vielfältige physiologische Funktionen im Kolon. Nach ihrer Bildung werden die SCFA schnell und effizient im Kolon absorbiert und nur zu 5-10% SCFA über die Fäzes ausgeschieden (Roberfroid 2005). In den Kolon-epithelzellen und dem angrenzenden Gewebe fungieren die SCFA als Nährstoffe und darüber hinaus als Modulatoren des pH-Werts und des Zellvolumens. Weiterhin spielen sie als Signalmoleküle bei Regulation der Proliferation, Differenzierung und Genexpression (Cook und Sellin 1998) sowie als Bausteine für die Lipidsynthese (Wolever *et al.* 1989) eine entscheidende Rolle. Während unserer Versuche wurde

Acetat (**18**) als vorherrschende SCFA bestimmt, was jüngste Ergebnisse von Marounek *et al.* (2007) bestätigte. Jedoch lag in dieser Studie eine unterschiedliche prozentuale Verteilung der SCFA (54,7% Acetat (**18**), 10,4% Propionat (**19**), 27,8% Butyrat (**20**)) im Caecum der untersuchten Ratten vor, denen amidiertes Pektin (**17**) mit der Nahrung verabreicht worden war. Verglichen mit unseren Modellstudien sind höhere Anteile an Butyrat (**20**) und Propionat (**19**), aber geringere Anteile an Acetat (**18**) gebildet worden (Abbildung 44). Dies ist möglicherweise der von der Humanflora abweichenden caecalen Mikroflora der Ratte zuzuschreiben. Nach seiner Bildung wird Acetat (**18**) sofort absorbiert, zur Leber transportiert und daher im Kolon kaum metabolisiert (Cook und Sellin 1998). Im Gegensatz zu Propionat (**19**) führt Acetat (**18**) nachweislich zu einem Anstieg der Cholesterolsynthese (Wong *et al.* 2006). So können Substrate, welche das Acetat (**18**):Propionat (**19**) Verhältnis senken (z.B. propionylierte Stärkederivate (Clarke *et al.* 2007)), den Gehalt an Serumlipiden verringern und möglichen kardiovaskulären Krankheiten vorbeugen (Wong *et al.* 2006). Da Butyrat (**20**) während unserer Versuche nur ein untergeordnetes Fermentationsprodukt darstellte, wird seine genauere Funktion nachfolgend nicht weiter diskutiert.

Die im Verlauf der Inkubationen bestimmten maximalen MeOH-Konzentrationen variierten von 16 bis 58,1 mg/l (Abbildungen 41 und 43) und lagen damit im Bereich bereits publizierter Daten, die aus Experimenten mit Pektin und Äpfeln erhalten wurden (Siragusa *et al.* 1988; Lindinger *et al.* 1997). Nach Siragusa *et al.* (1988) liegen die in unserer Studie ermittelten MeOH-Konzentrationen weit unterhalb des toxikologisch relevanten Bereichs. Daneben hatten frühe Studien bereits gezeigt, dass nach Verabreichung hoher Dosen an Pektin (15-50 g/d) keine toxischen Nebeneffekte beim Menschen auftraten (Kay und Truswell 1977; Meittinen und Tarpila 1977).

Zusammengefasst belegen unsere Ergebnisse erstmals die Stabilität von D-Galacturonsäure (**16**) und amidierten Pektin (**17**) in Speichel und künstlichen Magensaft. Während das Monomer nach Inkubation mit Ileo- und Kolostomabeutelinhalten abgebaut wurde, erwies sich amidiertes Pektin (**17**) mit Gehalten von 22-35% und 3-17% in Ileo- (nach 10 h) und Kolostomabeutelinhalten (nach 24 h) als teilweise stabil.

### 3 LOX-Hemmung durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

In den letzten Jahren wurde verstärkt versucht, die Pathogenese der entzündlichen Darmerkrankungen zu entschlüsseln. Dies führte u.a zu einer Reihe von neuen Therapiemöglichkeiten, die sowohl auf spezifische als auch unspezifische Mediatoren des Entzündungsverlaufs abzielen. Die Anwendung dieser Therapien (u.a. TNF- $\alpha$ -Blocker wie Infliximab und Adalimumab, rekombinante Cytokine, Adhäsions-Molekül-Inhibitoren wie Natalizumab, Probiotika etc.) ist ein vielversprechender Ansatz, die bisherigen (u.a. Glucocorticoide, Corticosteroide, „non-steroidal anti-inflammatory drugs“ (NSAIDs)) zu unterstützen (Noble *et al.* 2008, Rizzello *et al.* 2008).

Neben diesen vielfältigen Therapiemöglichkeiten, wie sie aktuell von Noble *et al.* (2008) zusammengefasst sind, werden zusätzlich natürliche Wirkstoffe zur Entzündungsvorsorge gesucht. Diskutiert werden vermehrt sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, unter diesen auch die antioxidativ wirksamen Polyphenole (Dryden *et al.* 2006). Ihr Potential, Entzündungen vorzubeugen bzw. gegebenenfalls zu therapieren, wurde mit einigen im Entzündungsprozess wichtigen Faktoren untersucht. Unter diesen sind Modellsysteme mit Entzündungsmarkern wie LOX, COX, NF $\kappa$ B, „peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ “ (PPAR $\gamma$ ), „C-reactive protein“ (CRP), Interleukinen und TNF- $\alpha$  zu nennen, deren Wechselwirkungen mit Polyphenolen wie Curcumin und Procyanidinen in jüngster Zeit untersucht worden sind (Bengmark 2006, Terra *et al.* 2007, Terra *et al.* 2008). Hier nimmt die LOX als Modellsystem eine zentrale Rolle ein, da sie neben COX ein Schlüsselenzym der Arachidonsäurekaskade darstellt. LOX ist verantwortlich für die Bildung der HPETEs und leitet so die Entstehung der Entzündungsmediatoren LTA4, LTB4, LTC4, LTD4 und LTE4 ein. Die Inhibierung von LOX führt daher zu einer erheblichen Abschwächung der Entzündungsreaktion.

Aus diesem Grund wurde LOX im Rahmen dieser Arbeit als Modellsystem gewählt, um die antiinflammatorischen Eigenschaften von Polyphenolen zu untersuchen. Dabei wurde Soja LOX-1 wegen ihrer - im Vergleich zur COX - besseren Verfügbarkeit zur

Etablierung der Methode angewendet. Zur Übertragbarkeit des Modells auf den Menschen wurde anschließend das Modell mit 5-LOX aus humanen neutrophilen Granulozyten gewählt.

### 3.1 Flavonoide und deren intestinale Metabolite als Soja LOX-1 Inhibitoren

Nach der beschriebenen Metabolisierung der Polyphenole (u.a. von Quercetinderivaten) werden diese von den Zellen absorbiert und können dort protektive (u.a. antiinflammatorische) Effekte ausüben. Um mögliche Mechanismen der antiinflammatorischen Wirkungen aufzuklären, wurden Struktur-Wirkungsbeziehungen von Polyphenolen mit dem proinflammatorischen Enzym LOX untersucht. Um die Inhibitionsstärken von Flavan-3-olen, deren Metaboliten sowie Flavonen, Flavanonen und Isoflavonen miteinander zu vergleichen, wurde das in der Literatur bereits etablierte Modellenzym Soja LOX-1 verwendet.

(+)-Catechin (**22**) wies unter den untersuchten Flavan-3-olen das stärkste Inhibierungspotential auf (Tabelle 9). Der beobachtete Einfluss der Stereochemie an C3 ((+)-Catechin (**22**): *S*, (-)-Epicatechin (**5**): *R*) ist bereits bekannt (Richard-Forget *et al.* 1995). Des Weiteren ist eine metabolische Aktivierung der Flavan-3-ole unwahrscheinlich, da beide Valerolactone (als intestinale Metabolite von Epicatechin) LOX kaum inhibierten und auch bei den Untersuchungen von Lambert *et al.* (2005) keine nennenswerten „bioaktiven“ Eigenschaften zeigten.

Die von uns ermittelte Inhibierungsstärke des Flavan-3-ol-Dimers Procyanidin B<sub>2</sub> (**4**) ist überraschend gering und entspricht nicht Literaturangaben; so ist bekannt, dass niedermolekulare Procyanidine die Dioxygenaseaktivität signifikant hemmen (Schewe *et al.* 2002).

Um den Einfluss der Hydroxylierung am A- und B-Ring zu untersuchen, wurden die Flavonole Apigenin (**24a**) (A-Ring: 2 x OH, B-Ring: 1 x OH), Luteolin (**24b**) (A+B-Ring: 2 x OH) und Scutellarein (**24d**) (A-Ring: 3 x OH, B-Ring: 1 x OH) auf ihre

Inhibierungseffektivität gegen LOX geprüft. Scutellarein (**24d**) wies unter den untersuchten Flavonolen das stärkste Inhibierungspotential auf (Tabelle 9). Die starken inhibitorischen Eigenschaften von Scutellarein (**24d**) lassen sich auf die dreifache Hydroxylierung am A-Ring zurückführen. Auch Baicalein besitzt dieses Strukturkriterium und ist als effektiver LOX-Inhibitor bekannt (Werz 2007). Weiterhin wurde gezeigt, dass Luteolin (**24b**) aufgrund seiner vicinalen Diolstruktur am B-Ring besser inhibitorisch wirksam ist als das Monohydroxyderivat Apigenin (**24a**). Auf diesen Effekt haben schon Richard-Forget *et al.* (1995) hingewiesen.

Der Einfluß der Doppelbindung zwischen C2 und C3 auf die Inhibierungsstärke wurde mit Taxifolin (**23**) (2,3-Dihydroquercetin) untersucht; die erhaltenen Ergebnisse wurden mit denen von Quercetin (**1a**) verglichen. Die Resultate zeigten, dass die C2-C3-Doppelbindung die Inhibierung von LOX nur leicht verstärkte (Quercetin (**1a**): 64,4% Restaktivität > Taxifolin (**23**): 71% Restaktivität) (Tabelle 9). Dieses Ergebnis bestätigte die bereits früher von Richard-Forget *et al.* (1995) vorgelegten Resultate.

Der Einfluß der Methylierung (OCH<sub>3</sub>) wurde anhand von Scutellarein (**24d**) (OH an C6) und Hispidulin (**24c**) (OCH<sub>3</sub> an C6) untersucht. Da sich die Inhibierungseffekte der beiden Verbindungen mit 46% bzw. 49% Restaktivität kaum unterschieden, schwächt offensichtlich eine Methoxygruppe nicht zwingend die Inhibierungskapazität gegenüber LOX. Bas *et al.* (2006) hatten sogar eine effiziente LOX-Hemmung mit 5-O-Demethylnobiletin, einem Polymethoxyflavon, gezeigt.

Der Einfluss der Strukturen des Aglycons bzw. der Zuckereinheit auf die Inhibierungseffektivität wurde mit Quercetin (**1b**, **c**, **f**)- und *p*-Np-Glycosiden (**2b**, **c**, **f**) (hier:  $\beta$ -D-glucoside (**1b**; **2b**),  $\beta$ -D-galactoside (**1c**; **2c**), und  $\alpha$ -L-rhamnoside (**1f**; **2f**)) untersucht. Die stärkere Inhibierung der Quercetinglycoside (**1b**, **c**, **f**) im Vergleich zu den *p*-Np-Glycosiden (**2b**, **c**, **f**) lässt sich anhand ihrer Flavonoidstruktur erklären, die ein größeres antioxidatives Potential besitzt. Daneben führte die Glycosylierung zu einer gesteigerten Hemmmrate, bewiesen durch den Vergleich der bei Quercetin (**1a**) bzw. mit Quercetinglycosiden (**1b**, **c**, **f**) erhaltenen Ergebnisse. Dieses Resultat be-

stätigt indirekt die von Werz (2007) vorgelegten Daten, wonach das konjugierte Myricetin 3-*O*-glucuronid ein stärkeres Inhibierungspotential als das Aglycon aufwies.

Zusätzlich beeinflusste die Art des konjugierten Zuckers die Inhibierungsstärke der untersuchten Verbindungen. Sowohl bei den Quercetinglycosiden (**1b**, **c**, **f**) als auch bei den *p*-Np-Glycosiden (**2b**, **c**, **f**) nahm diese in der Reihenfolge gal > rha > glc ab.

Um den Einfluss der Stellung des B-Rings auf das Inhibierungspotential gegenüber LOX zu überprüfen, wurden ferner auch Isoflavone (**25a-d**) (Daidzin (**25a**), Daidzein (**25b**), Genistein (**25c**), Puerarin (**25d**); B-Ring an C3 anstatt C2) und deren intestinaler Metabolit Equol (**26**) untersucht. Bei diesen positionsisomeren Verbindungen kam es zu einer unwesentlich stärkeren Hemmung der LOX, wie durch den Vergleich von Genistein (**25c**) (83,8% Restaktivität) mit Apigenin (**24a**) (95% Restaktivität) gezeigt werden konnte. Interessanterweise zeigte der intestinale Isoflavon-Metabolit Equol (**26**) mit 77% Restaktivität einen stärkeren Hemmeffekt als die meisten untersuchten Isoflavone.

Zusammenfassend wurden folgende in der Literatur bereits beschriebene Strukturelemente als gegenüber LOX inhibierungssteigernd identifiziert:

- dreifache Hydroxylierung am Ring A (Wertz 2007)
- vicinale Hydroxygruppen an Ring B (Richard-Forget *et al.* 1995)
- Stereochemie an C2 (*R*) bzw. C3 (*S*) (Richard-Forget *et al.* 1995).

Der von uns nachgewiesene starke Einfluss der Konjugation mit Galactose an C3 ist allerdings bisher noch nicht beschrieben worden.

### 3.2 Anthocyane als LOX-Inhibitoren

Die IC<sub>50</sub>-Werte der untersuchten Anthocyane umfassten mit 0,43 µM bis 37,7 mM einen weiten Bereich (Abbildung 48). Die beiden effektivsten Verbindungen, Dp3glc (**15c**) und Dp3gal (**15b**), zeigten sowohl gegen Soja LOX-1 als auch 5-LOX eine

größeres Inhibierungspotential als Baicalein – ein bekannter, effektiver 5-LOX-Inhibitor mit Flavonoidstruktur ( $IC_{50}$  in Leukozyten (Ratte, Mensch): 7,13-9,5  $\mu\text{M}$ ) (Werz 2007) (Abbildung 50). Die Konjugation von Dp (**15a**) und Cy (**15e**) mit Glucose bzw. Galactose führte zu einem Anstieg des Inhibierungspotentials (Abbildung 48). Diese Erkenntnisse stimmen indirekt mit kürzlich publizierten Daten überein (Werz 2007). Hier zeigte das konjugierte Myricetin 3-*O*-glucuronid mit 2,2  $\mu\text{M}$  einen niedrigeren  $IC_{50}$ -Wert als das Aglycon ( $IC_{50}$ : 13  $\mu\text{M}$ ). Allerdings führte die Konjugation mit Arabinose in allen Versuchen zu einer leichten Zunahme der  $IC_{50}$ -Werte (Abbildung 48). Bei den Pn-Derivaten (**15l-o**) führte jegliche Glycosylierung - verglichen mit dem Aglycon - zu einer Abnahme des Hemmeffekts (Abbildung 48), was die Ergebnisse von Richard-Forget *et al.* (1995) bestätigte, bei denen jegliche Glycosylierung auch zu einem Verlust des Inhibierungspotentials führte.

Allgemein nahm die Inhibierungsaktivität gegen Soja LOX-1 in der folgenden Reihenfolge ab: Dp-Derivate (**15a-d**) > Cy-Derivate (**15e-h**) > Pn-Derivate (**15l-o**) > Mv-Derivate (**15p-s**). Im Detail waren die  $IC_{50}$ -Werte der unmethylierten Anthocyane (Dp3glc (**15c**), Dp3gal (**15b**), Dp3ara (**15d**), Cy3glc (**15g**), Cy3gal (**15f**), Cy3ara (**15h**)) signifikant niedriger als diejenigen der entsprechenden methylierten Peonidinglycoside (**15m-o**) (Pn3glc (**15n**), Pn3gal (**15m**), Pn3ara (**15o**)) (die Mv-Derivate (**15p-s**) zeigten keine messbares Inhibitionspotential). Das Inhibierungspotential der Aglycone nahm mit Dp (**15a**) > Cy (**15e**) > Pn (**15l**) > Mv (**15p**) in derselben Folge ab, jedoch ohne Signifikanz (Abbildung 48). Diese Beobachtungen könnten auf die unterschiedlichen antioxidativen Aktivitäten der Anthocyane und Anthocyanidine, verbunden mit ihrer variierenden Anzahl an freien Hydroxylgruppen, zurückzuführen sein. Rahman *et al.* (2006) zeigten, dass das Potential der antioxidativen Aktivität von Anthocyanen sowohl durch ihre Aglyconstruktur als auch durch den jeweiligen Zuckerrest bestimmt wird. Daraus resultierte eine antioxidative Aktivität der Verbindung gegenüber Superoxidradikalen bzw. Peroxynitrit in folgender Reihenfolge: Dp (**15a**) > Cy (**15e**) = Mv (**15p**) > Pn (**15l**). Obwohl die antioxidative Aktivität der untersuchten Verbindungen nicht verfolgt wurde, bestätigten unsere Ergebnisse - mit Ausnahme von Mv (**15p**) - diese Beobachtungen.



Während der Soja LOX-1 Versuche erwiesen sich vicinale Hydroxygruppen am B-Ring und Konjugation mit Glucose bzw. Galactose an C3 als inhibierungssteigernde Strukturelemente. Im letztgenannten Punkt besteht ein grundsätzlicher Unterschied zu Flavonolen wie Quercetin (**1a**), deren hohe antioxidative Wirkung nach Konjugation an C3 konserviert wurde, das LOX-Inhibierungspotential dagegen verloren ging (Loke *et al.* 2008).

Bei einer unkompetitiven Inhibierung (Abbildung 52) reagieren entsprechende Inhibitoren ausschließlich mit dem Enzym-Substrat-Komplex ohne Affinität zum freien Enzym. Dies könnte eine Reaktion von Pn (**15l**) mit einem enzymgebundenen Fettsäureradikal (höchstwahrscheinlich ein Peroxylradikal) sein. Wenn dieses Radikal das aktive Zentrum verlässt, liegt das Fe-Atom dort in der reduzierten, also inaktiven Form vor. Dies senkt den Gehalt an aktivem Enzym in der Reaktion und führt so zur Hemmung. Bisher gibt es allerdings keine Ergebnisse, welche diese Hypothese bestätigen würden, und deshalb müssen zur Beweisführung noch weitere Experimente durchgeführt werden. Den Typ unkompetitiver Inhibierung hat man im Übrigen auch für weitere phenolische Verbindungen wie Vanillinsäure, (-)-Epicatechin (**5**) und Sclerotiorin gezeigt (Richard-Forget *et al.* 1995; Chidananda und Sattur 2007).

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass Nahrungsbestandteile wie Dp3glc (**15c**) und Dp3gal (**15b**) (reiche Quellen: Heidelbeeren und schwarze Johannisbeeren) *in vitro* starkes LOX-Inhibierungspotential besitzen. Um diese Wirkungen *in vivo* entfalten zu können, müssen diese Anthocyane mögliche Zielzellen unmodifiziert erreichen, da metabolische Veränderungen nachweislich grundlegende Effekte auf die Wirksamkeit von Flavonoiden haben (Loke *et al.* 2008; Lotito und Frei (2006)). Tatsächlich sind Anthocyane die einzige Untergruppe der Flavonoide, die unmodifiziert, d.h. als intakte Glycoside absorbiert werden (McGhie und Walton 2007).

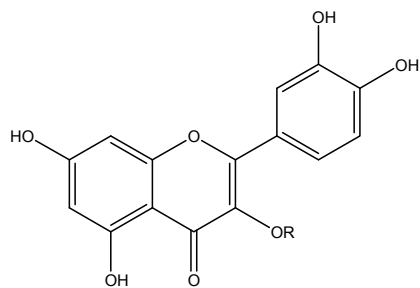
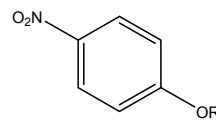
Unter Berücksichtigung der niedrigen IC<sub>50</sub>-Werte in Verbindung mit ihrer aktuell bekannten Verfügbarkeit im Metabolismus des Menschen (McGhie und Walton 2007), ist eine *in vivo* Prävention entzündlicher Erkrankungen durch diese Anthocyane grund-

sätzlich vorstellbar. Strukturell stellt sich daher aufgrund der Instabilität von Anthocyanen beim physiologischen pH (7,4) noch die Frage, welche chemische(n) Struktur(n) unter *in vivo*-Bedingungen wirksam sind. Diesbezüglich zeigten von uns durchgeführte Kontrollexperimente bei pH 7,4 (Daten nicht gezeigt) das Vorliegen von chinoiden Anhydrobasen.

## **D. Strukturmatrix**

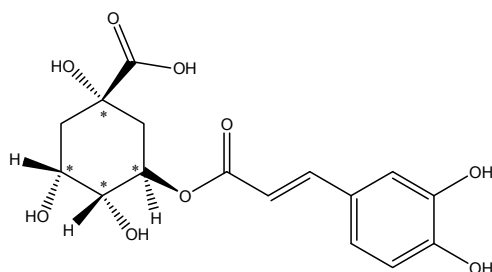
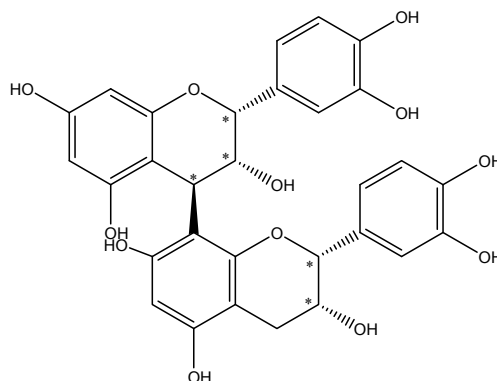
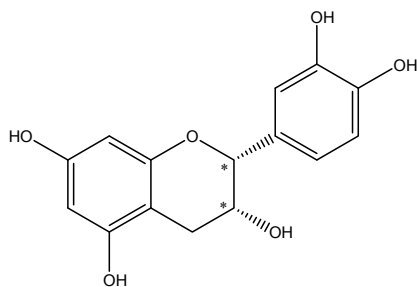
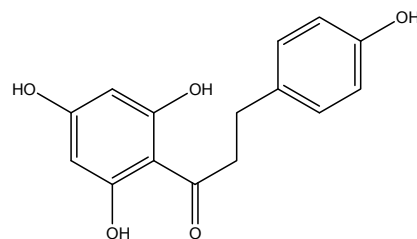
---

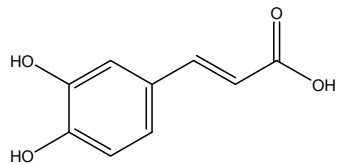
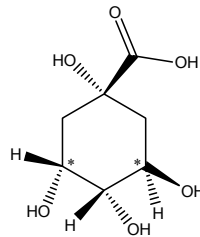
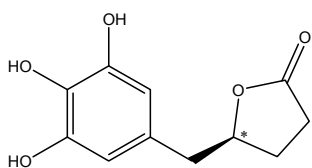
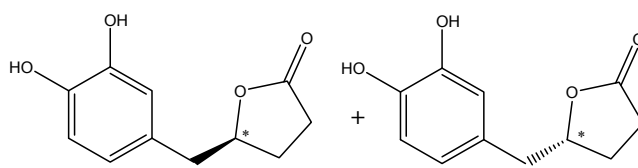
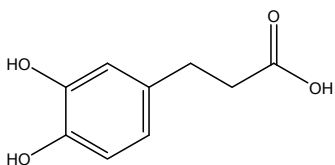
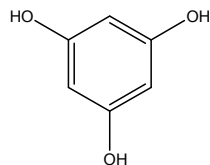
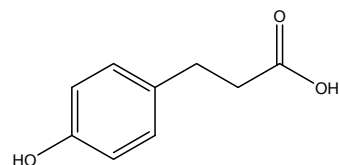
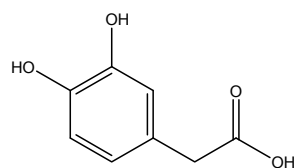
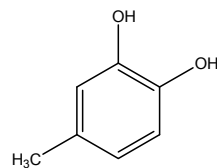


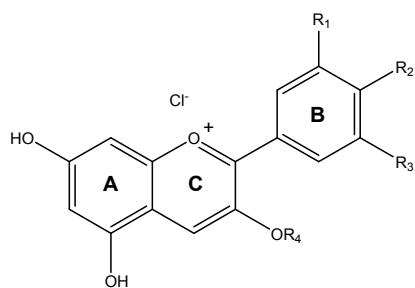
**1a-f****2a-f**

Verbindung	R
1a	H
1b	glc
1c	gal
1d	ara
1e	xyl
1f	rha

Verbindung	R
2a	H
2b	glc
2c	gal
2d	ara
2e	xyl
2f	rha

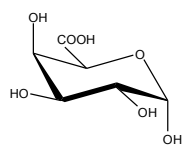
**3****4****5****6**

**7****8****9a****9b****10****11****12****13****14**

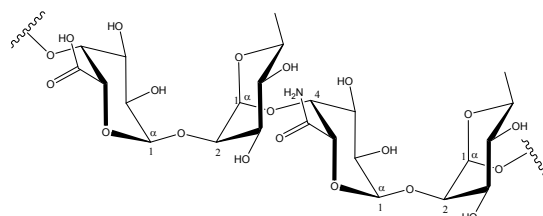


15a-s

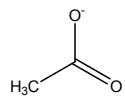
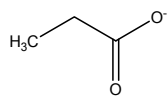
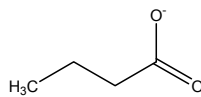
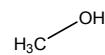
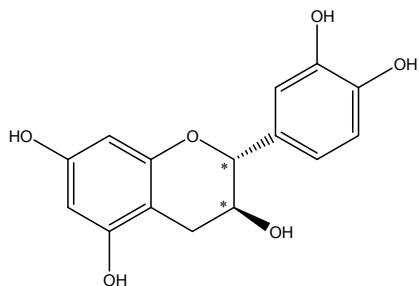
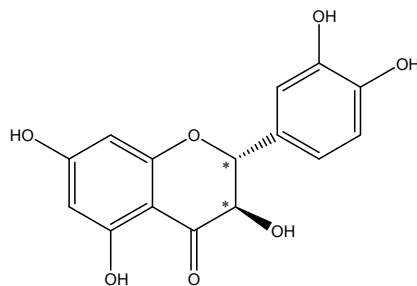
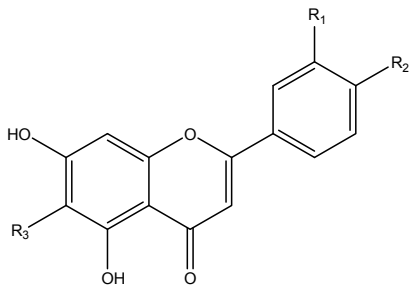
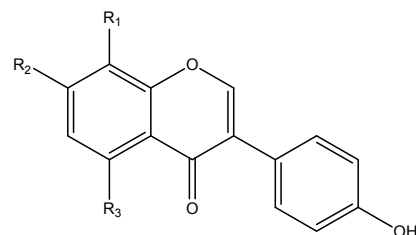
Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
15a	OH	OH	OH	H
15b	OH	OH	OH	gal
15c	OH	OH	OH	glc
15d	OH	OH	OH	ara
15e	OH	OH	H	H
15f	OH	OH	H	gal
15g	OH	OH	H	glc
15h	OH	OH	H	ara
15i	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	gal
15j	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	glc
15k	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	ara
15l	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H
15m	OCH <sub>3</sub>	OH	H	gal
15n	OCH <sub>3</sub>	OH	H	glc
15o	OCH <sub>3</sub>	OH	H	ara
15p	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H
15q	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	gal
15r	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	glc
15s	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	ara



16

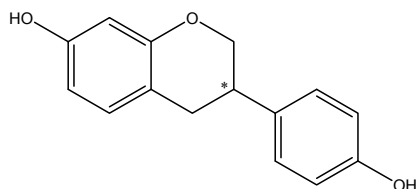


17

**18****19****20****21****22****23****24a-d****25a-d**

Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
24a	H	OH	H
24b	OH	OH	H
24c	H	OH	OCH <sub>3</sub>
24d	H	OH	OH

Verb.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
25a	H	OGlc	H
25b	H	OH	H
25c	H	OH	OH
25d	CGlc	OH	H

**26**



## **E. Experimenteller Teil**

---



# **1 Prüfung auf metabolische Kompetenz der verwendeten Ileo- und Kolostomabeutelinhalte**

## **1.1 System zum Nachweis von Enzymaktivitäten**

### **1.1.1 Verwendete Substanzen**

Der API ZYM Testkit wurde von Bio Mérieux (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) bezogen. Tris(hydroxyl-methyl)aminomethan (TRIS) war von Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland), Natrium-Laurylsulfat von Serva (Heidelberg, Germany), 2-Methoxy-ethanol von Merck (Darmstadt, Deutschland) und Fast Blue BB von Sigma (Steinheim, Deutschland).

### **1.1.2 Prinzip**

Für die Überprüfung der Enzymaktivitäten in den verwendeten Ileo- und Kolostomabeutelinhalten wurde der APIZYM<sup>TM</sup>-Testkit zum halbquantitativen Nachweis von Enzymaktivitäten eingesetzt. Das System eignet sich für verschiedene Materialien (Mikroorganismen, Zellsuspensionen, Gewebe, biologische Flüssigkeiten usw.).

Der APIZYM Streifen besteht aus 20 Bechern, die speziell für den Nachweis von Enzymreaktionen konzipiert sind. Der Boden des Streifens ist ein nichtverwobenes Faserteil, auf dem sich die synthetischen Substrate befinden. Dieser Träger fördert die Enzymreaktionen, selbst wenn die Substrate nicht löslich sind.

Die enzymatischen Tests wurden mit einer dichten Bakteriensuspension (hier: Ileo- bzw. Kolostomabeutelinhalte) beimpft, welche die Substrate löst. Die während der Inkubationszeit auftretenden Reaktionen wurden durch Farbumschläge nach der Reagenzzugabe sichtbar gemacht. Die entsprechenden Enzymaktivitäten wurden gemäß beiliegendem Auswertungsbogen zugeordnet.

### **1.1.3 Testdurchführung**

Die Probe wurde 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt. Eine Inkubationswanne mit Deckel wurde bereitgestellt und zur Herstellung einer feuchten Kammer mit ca. 5 ml

destilliertem Wasser versetzt. Anschließend wurden 65 µl der verdünnten Probe in jeden Becher des API ZYM<sup>TM</sup>-Streifens pipettiert und 4 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 1 Tropfen ZYM A und ZYM B Reagenz (Zusammensetzung s. Tabelle 10) in jeden Becher gegeben und 5 min zur Farbentwicklung stehen gelassen.

**Tabelle 10:** Zusammensetzung der Reagenzien

<b>ZYM A</b>	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan	25 g	<b>ZYM B</b>	Fast Blue BB	0,35 g
<b>Reagenz</b>	HCl 37%	11 ml	<b>Reagenz</b>	2-Methoxyethanol	100 ml
	Na-Laurylsulfat	10 g			
	H <sub>2</sub> O	100 ml			

Danach wurde der Streifen für 10 s in einem Abstand von 10 cm unter eine starke Lichtquelle (1000 W) gehalten. Die Reaktionen wurden abgelesen und mit Hilfe des Auswertungsbogens interpretiert.

### 1.1.4 Verwendete Geräte

Die in Tabelle 11 aufgeführten Geräte wurden verwendet:

**Tabelle 11:** Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Waage	BP 210S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Inkubationsschrank	Heraeus Trischrank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Lampe	Typ 50	SIS (Schweinfurt, Deutschland)

## 1.2 Bestimmung der anaeroben Gesamtkeimzahl

Die Bestimmung der anaeroben Gesamtkeimzahlen aller im Rahmen dieser Arbeit benutzten Ileo- und Kolostomabeutelinhalte wurde freundlicherweise von Dr. Lembke (Tetra Pak Research, Stuttgart, Deutschland) durchgeführt.

### 1.2.1 Material und Methoden

Die Proben wurden während der Untersuchung bei 8°C aufbewahrt. Die mikrobiologischen Untersuchungen erfolgten in einer Don Whitley MAKS VA500 Anaerobenkammer unter vollständigem Sauerstoffausschluss durchgeführt. Es wurde eine Untersuchung auf anaerob wachsende Gesamtkeime nach dem Koch'schen Plattenverfahren (Koch 1994) als Doppelbestimmung auf Brain Heart Infusion Agar (BHI) durchgeführt. Die Homogenisierung der Probe erfolgte durch kräftiges Schütteln für 30 s. Sämtliche Arbeitsschritte fanden in der Anaerobenkammer statt, inklusive der Bebrütung der Platten bei 37°C für 4 d.

### 1.3 Speichel-, Ileo- und Kolostomaprobanden

Die Speichelproben wurden von 3 gesunden männlichen Probanden (23-35 Jahre) zwischen 7.00 und 8.00 Uhr gesammelt. Die Probanden verzichteten ab dem vorhergehenden Abend auf Zähneputzen.

Die Ileostomabeutelinhalte wurden von 3 weiblichen Probanden (34-39 Jahre) bereitgestellt. Allen Probandinnen hatte man auf Grund einer Erkrankung des Dickdarms durch *Morbus Crohn* (jeweils ohne Beteiligung des Dünndarms) 5-6 Jahre vor Beginn der hier durchgeführten Untersuchungen ein endständiges Ileostoma gelegt. Bei keiner der Probandinnen wurde Dünndarmgewebe operativ entfernt.

Die Kolostomabeutelinhalte wurden von 3 weiblichen Probanden (30-60 Jahre) bereitgestellt. Allen Probandinnen hatte man infolge Dickdarmkrebses oder entsprechender Vorstufen 12-30 Jahre vor Beginn der hier durchgeführten Untersuchungen ein linksseitiges Kolostoma gelegt. Nach Entfernung des erkrankten Kolonbereichs wurden keine weiteren Symptome für Dickdarmkrebs beobachtet.

Die Probandinnen verzichteten 48 h vor den Versuchen auf polyphenolhaltige (Tee, Kaffee, Schokolade, Gemüse, Früchte, Zwiebeln, Soja-Produkte, Säfte und Wein) bzw. pektin-oder galacturonsäurehaltige (Gemüse, Früchte, Marmeladen und Gelees,

Säfte und Milchprodukte) Nahrungsmittel. Des Weiteren nahmen die Probandinnen während dieser Diät keine Arzneimittel zu sich und wurden mindestens 4 Wochen vor den Versuchen nicht mit Antibiotika behandelt.

## **1.4 Vorbereitung der Modellsysteme zur Untersuchung des Metabolismus von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen**

### **1.4.1 Vorbereitung des Speichels**

Die Bedingungen für D-Galacturonsäure und amidiertes Pektin in der Mundhöhle wurden durch Speichel simuliert. Für die Inkubationen (s. Abschnitt E 7.2.1) wurde der Speichel nach Walle *et al.* (2005) 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt, homogenisiert, zentrifugiert (5000 x g, 5 min) und der Überstand als Inkubationsmedium benutzt.

### **1.4.2 Herstellung des künstlichen Magensafts**

Die Bedingungen für D-Galacturonsäure und amidiertes Pektin im Magen wurden mit künstlichem Magensaft (Inkubationen s. Abschnitt E 7.2.2) nach Gillatt *et al.* (1985) simuliert.

#### **1.4.2.1 Verwendete Substanzen**

NaCl und KCl waren aus der Chemikalienausgabe der Universität, Pepsin von Sigma (Steinheim, Deutschland) und HCl von VWR (Fontenay sous Bois, Frankreich).

#### **1.4.2.2 Durchführung**

0,21 g NaCl, 0,187 g KCl und 0,069 g Pepsin wurden in 30 ml destillierten H<sub>2</sub>O gelöst, mit HCl (0,1 N) auf pH 1,8 eingestellt und mit H<sub>2</sub>O (pH: 1,8) auf 50 ml aufgefüllt.

#### **1.4.2.3 Verwendete Geräte**

Die in Tabelle 12 aufgeführten Geräte wurden verwendet:

**Tabelle 12:** Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Waage	BP 210S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Rührplatte	IKAMAG®RH	Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland)
Vortexer	Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
pH-Meter	WTW Series inoLab®, pH 720	WTW (Weilheim, Deutschland)

### 1.4.3 Gewinnung des Inokulums

Die Bedingungen für alle untersuchten Polyphenole, D-Galacturonsäure und amidiertes Pektin im Dünn- bzw. Dickdarm wurden durch Ileo- bzw. Kolostomabeutelinhalte simuliert.

#### 1.4.3.1 Verwendete Substanzen

HCl wurde von VWR (Fontenay sous Bois, Frankreich) bezogen. AnaeroGen™ wurde bei Oxoid Limited (Hampshire, UK) bestellt. Resazurin war von Sigma (Steinheim, Deutschland) und die restlichen Chemikalien des Carbonat-Phosphatpuffers sowie die Glaswolle waren aus der Chemikalienausgabe der Universität.

#### 1.4.3.2 Durchführung

Nach Abnahme wurde der Ileo- bzw. Kolostomabeutel zusammen mit AnaeroGen™, um eine möglichst anaerobe Atmosphäre zu erzeugen, sofort in den Anaerobentopf überführt. Der Topf wurde auf schnellstem Weg ins Labor gebracht und sofort in eine begaste (N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> Gasmisch; 80:20 v/v) Anaerobkammer (Eigenkonstruktion, Labib 2006) gestellt. Der Ileo- bzw. Kolostomabeutelinhalt wurde mit gleichem Volumen eines anaeroben Carbonat-Phosphatpuffers (pH 6,3: Ileostomabeutelinhalt, pH 7,4: Kolostomabeutelinhalt) (Zusammensetzung s. Tabelle 13) nach Lebet *et al.* (1998) verdünnt, gemixt und über Glaswolle filtriert. Das Filtrat wurde als Inokulum benutzt.

**Tabelle 13:** Zusammensetzung des anaeroben Carbonat-Phosphatpuffers nach Lebet *et al.* (1998)

Zusammensetzung des Carbonat-Phosphatpuffers		Zusammensetzung der Spurenelementlösung	
Chemikalien	Einwaage	Chemikalien	Einwaage
NaHCO <sub>3</sub>	9,24 g/l	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	368,0 mg/100 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,83 g/l	MnSO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	115,9 mg/100 ml
NaCl	0,47 g/l	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	44,0 mg/100 ml
KCl	0,45 g/l	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	12,0 mg/100 ml
Harnstoff	0,4 g/l	NiCl <sub>2</sub>	10,0 mg/100 ml
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,07 g/l	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	9,8 mg/100 ml
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , wasserfrei	0,1 g/l	Mo <sub>7</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> O <sub>24</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1,7 mg/100 ml
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,1 g/l		
Spurenelementlösung	10 ml/l		
Resazurin (1 mg/ml)	1 ml/l		

Das erhaltene Inokulum wurde jeweils unter dem Punkt *Inkubationsbedingungen* (s. jeweils Abschnitt E 2.1.1.2, 2.1.2.2, 2.2.2 und 2.3.2) als Inkubationsmedium benutzt.

### 1.4.3.3 Verwendete Geräte

Die in Tabelle 14 aufgeführten Geräte wurden verwendet:

**Tabelle 14:** Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Waage	BP 210S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Rührplatte	IKAMAG®RH	Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland)
Vortexer	Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Trockenschrank	Modell 400	Memmert (Schwabach, Deutschland)
pH-Meter	WTW Series inoLab®, pH 720	WTW (Weilheim, Deutschland)
Wasserbad	HBR-2	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Anaerobentopf		Merck (Darmstadt, Deutschland)
Anaerobkammer		selbst konstruiert



## **2 Untersuchung des Metabolismus von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen mit verschiedenen Modellsystemen**

### **2.1 Inkubation von Apfelinhaltsstoffen mit Ileo- und Kolostoma-beutelinhalten**

#### **2.1.1 Einfluss des Zuckerrests, der Aglyconstruktur und der Mikroflorkonzentration auf die Hydrolyse von Phenolglycosiden im menschlichen Dünndarm**

##### **2.1.1.1 Verwendete Substanzen**

Alle verwendeten Chemikalien waren pro analysis (p.a.)-Qualität und die Lösungsmittel „HPLC-grade“. Die Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch zusätzlich destilliert und H<sub>2</sub>O für die HPLC Analysen durch die hauseigene Millipore™ Aufbereitungsanlage von Millipore S.A. (Molsheim, Frankreich) filtriert. Acetonitril (Lichrosolv®) wurde von Merck (Darmstadt, Deutschland), Ameisensäure von Fluka (Deisenhofen, Deutschland) und Dimethylsulfoxid (DMSO) sowie Essigsäure von Guessing (Filsum, Deutschland) bezogen. Q3<sub>ra</sub>, Quercetin, *p*-Np, *p*-Npara, und *p*-Nprha waren von Sigma (Steinheim, Deutschland). Q3<sub>glc</sub> und *p*-Np<sub>glc</sub> wurden von Fluka (Deisenhofen, Deutschland) erhalten. *p*-Np<sub>gal</sub> und *p*-Np<sub>xyl</sub> waren von Serva (Heidelberg, Deutschland). Q3<sub>gal</sub> wurde von Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Q3<sub>ara</sub> und Q3<sub>xyl</sub> wurden freundlicherweise von Prof. H. Becker (Saarbrücken, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das Penicillin/Streptomycin Antibiotikum wurde von der Biochrom AG (Berlin, Deutschland) bezogen. Der interne Standard (IS) 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure war von Sigma (Steinheim, Deutschland). Die Inkubationsröhrchen wurden von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), die HPLC-Filter (Polyvinyliden-difluorid, 0,45 µm) von Roth (Karlsruhe, Deutschland) und die HPLC-Gläschen von WICOM (Heppenheim, Deutschland) bezogen.

##### **2.1.1.2 Inkubationsbedingungen**

In Inkubationsröhrchen wurden je 20 µl Stammlösung (50 mM in DMSO) des jeweiligen Substrates pipettiert und nach Begasung (N<sub>2</sub>) 2,5 ml des Inokulums zugege-

ben. Die Röhren wurden verschlossen und bei 37°C für 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 und 24 h inkubiert. Um die enzymatischen Reaktionen zu stoppen, wurden die Röhren mit flüssigem N<sub>2</sub> behandelt und sofort lyophilisiert. Als Kontrollen wurden Proben mit 20 µl DMSO statt Substrat und Inokulum vorbereitet und wie beschrieben inkubiert. Zusätzlich wurden Stabilitätsstudien von jedem Substrat mit anaerobem Carbonat-Phosphatpuffer (pH 6,3) analog den Inkubationen durchgeführt. Alle Experimente erfolgten als Dreifachbestimmungen.

### **2.1.1.3 Versuch zur Abhängigkeit Hydrolyserate – Mikroflorakonzentration**

In Inkubationsröhren wurden je 20 µl Q3glc Stammlösung (50 mM in DMSO) pipettiert und nach Begasung (N<sub>2</sub>) unterschiedliche Volumina an Inokulum (75 µl, 312,5 µl, 625 µl, 1250 µl, 2500 µl) zugegeben. Zu festgelegten Zeitpunkten (0, 30, 60, 90 und 120 min) wurden die enzymatischen Reaktionen durch flüssigen N<sub>2</sub> gestoppt und alle Proben anschließend lyophilisiert.

Die gleichen Versuche wurden nach Zugabe eines 1% Penicillin/Streptomycin Antibiotikum durchgeführt.

### **2.1.1.4 Probenaufarbeitung**

Die gefriergetrockneten Proben wurden zweimal mit je 1,25 ml 70%igem (v/v) MeOH (1% (v/v) Essigsäure) im Ultraschallbad extrahiert. Nach Zentrifugation (5000 x g, 10 min) wurden die Überstände vereinigt und filtriert. Die Kontrollen (ohne Substrat bzw. Inokulum) wurden genauso behandelt. Teile des gewonnenen Extrakts (50 µl) wurden mit Hochdruckflüssigchromatographie-Diodenarray-Detektion (HPLC-DAD) und HPLC-Elektrospray-Ionisierung-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS) gemessen.

### **2.1.1.5 HPLC-DAD-Analytik**

Die Quantifizierung aller Substrate und Metabolite durch HPLC-DAD Analytik wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 15:** HPLC-DAD Bedingungen

Pumpe	Hewlett-Packard 1100 HPLC Gradientenpumpe (Waldbronn, Deutschland)
Probengeber	Wisp 712b Autosampler (Waters, Eschborn, Deutschland)
Stationäre Phase	Hypersil™ Gold C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 3 µm Partikelgröße) (Thermo, Runcorn, UK)
Detektor	Hewlett-Packard 1100 Photodiode array Detektor (DAD)
Meßwellenlängen	Quercetin und Quercetinglycoside: 360 nm <i>p</i> -Npara: 306 nm, <i>p</i> -Nprha: 304 nm, <i>p</i> -Npxyl, <i>p</i> -Npgal, <i>p</i> -Npglc: 302 nm
Steuerung und Datenverarbeitung	Hewlett-Packard ChemStation Software (Waldbronn, Deutschland)
Mobile Phase	A: 0,1%ige ( <i>v/v</i> ) Ameisensäure; B: Acetonitril
Gradient	0 - 40 min: 1 - 50% B
Fluß	1 ml/min

Die Quantifizierung erfolgte mittels Kalibriergeraden (gemessen bei den entsprechenden Absorptionsmaxima). Die Berechnungen erfolgten über die Relation der jeweiligen Substanz zum eingesetzten IS (Peakfläche Verbindung/Peakfläche IS versus (vs.) Konzentration Verbindung/Konzentration IS). Alle Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen  $\pm$  SD.

Die Linearität der inkubierten Substrate (Quercetin- und *p*-Np-Glycoside) war von 0,1-50 mg/l gewährleistet. Die Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden betragen mindestens 0,99. Die Versuche waren reproduzierbar. Die Bestimmungsgrenze (LOQ: „limit of quantitation“) lag bei 0,1-1 mg/l (je nach Substrat). Die Wiederfindungen der inkubierten Substrate betragen: 76-90% (Quercetinglycoside) bzw. 70-96% (*p*-Np-Glycoside).

Um die Hydrolyserate für jedes Substrat zu bestimmen, wurde eine Tangente durch den linearen Bereich der Abbaukurve gelegt. Die dadurch erhaltenen Steigungen jeder linearen Regressionslinie ergaben die Hydrolyseraten in µmol/h.

Um die Abhängigkeit Hydrolyserate – Mikroflorakonzentration mit und ohne Antibiotikumzusatz zu zeigen, wurden die Hydrolyseraten zusätzlich gegen die entsprechenden Inokulumvolumina aufgetragen.

### 2.1.1.6 HPLC-ESI-MS/MS

Die Identifizierung der untersuchten Verbindungen erfolgte durch HPLC-ESI-MS/MS Analytik.

**Tabelle 16:** HPLC-ESI-MS/MS Bedingungen

Gerät	Finnigan TSQ 7000 Triple Stage Quadrupol-Massenspektrometer mit Finnigan Elektrospray Ionisation-Interface (ESI) (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland)
Pumpe	Applied Biosystems 140B Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten (Applied Biosystems, Bensheim, Deutschland)
Probengeber	Triathlon-900 Autosampler (Spark Holland, Emmen, Holland)
Stationäre Phase	Hypersil™ Gold C <sub>18</sub> column (100 x 2,1 mm, 3 µm Partikelgröße) (Thermo, Runcorn, UK)
Ionization mode	negativ
Sheath- und Auxiliary-Gas	Stickstoff 5,0, Sheath (70 psi), Auxiliary (10 units)
Massenbereich	Full-scan mode, <i>m/z</i> 150-700, total scan duration: 1,0 s
Kollisionsgas	Argon (2,0 mTorr)
Kollisionsenergie	20-40 eV
Kapillarspannung	3,2 kV
Kapillartemperatur	200°C
Steuerung und Datenverarbeitung	Xcalibur Qual Browser Software 1.2/1.3 (Thermo Electron Corp., Dreieich, Deutschland)
Mobile Phase	A: 0,1%ige (v/v) Ameisensäure; B: Acetonitril
Gradient	0 - 40 min: 5 - 99% B
Fluß	0,2 ml/min

Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten, deprotonierten Ionen und Produktionenspektren mit denen von entsprechenden Referenzsubstanzen.

### 2.1.1.7 Verwendete Geräte

Die in Tabelle 17 aufgeführten Geräte wurden verwendet:

**Tabelle 17:** Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Waage	BP 210S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Rührplatte	IKAMAG <sup>®</sup> RH	Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland)
Vortexer	Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Anaerobkammer		selbst konstruiert
Ultraschallbad	TranssonicT460	Elma <sup>®</sup> (Singen, Deutschland)
Inkubationsschrank	Heraeus Trischrank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	Universal 16R, Rotor: 1616/1614	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage	Christ Alpha 1-4, 0,1 mbar	Christ (Osterode am Harz, Deutschland)

## 2.1.2 Inkubation der gegen ilealen Abbau resistenten Verbindungen mit Kolostomabeutelinhalten

### 2.1.2.1 Verwendete Substanzen

Alle verwendeten Chemikalien waren p.a.-Qualität und die Lösungsmittel „HPLC-grade“. Die Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch zusätzlich destilliert und H<sub>2</sub>O für die HPLC Analysen durch die hauseigenen Millipore™ Aufbereitungsanlage von Millipore S.A. (Molsheim, Frankreich) filtriert. Acetonitril (Lichrosolv<sup>®</sup>) wurde von Merck (Darmstadt, Deutschland), DMSO und Ameisensäure sowie Essigsäure wurden von Grüssing (Filsum, Deutschland) bezogen. Chlorogensäure, Chinasäure, Phloroglucin, Hydrokaffeesäure, *p*-OH-Hydrozimsäure und 3,4-diOH-Phenyllessigsäure wurden von Fluka (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Kaffeesäure, Procyanidin B<sub>2</sub>, (-)-Epicatechin, Quercetin und Q3rha wurden von Sigma (Steinheim, Deutschland) gekauft. 4-Methylbrenzcatechin war ein Merck Produkt (Darmstadt, Deutschland). Phloretin und (+)-Catechin waren von Roth (Karlsruhe, Deutschland). Die Referenz  $\delta$ -(3',4',5'-Trihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Rice (Rutgers, University of New Jersey, USA) zur Verfügung gestellt. Der IS (3,4,5-Trimethoxy-zimtsäure) war von Sigma (Steinheim, Deutschland). Die Inkubations-

röhrchen wurden von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), die HPLC-Filter (Polyvinylidendifluorid, 0,45 µm) von Roth (Karlsruhe, Deutschland) und die HPLC-Gläschen von WICOM (Heppenheim, Deutschland) bezogen.

#### **2.1.2.2 Inkubationsbedingungen**

In Inkubationsröhrchen wurden je 20 µl Stammlösung (100-200 mM in DMSO) des jeweiligen Substrates pipettiert und nach Begasung (N<sub>2</sub>) 5 ml des Inokulums zugegeben. Die Röhrchen wurden verschlossen und bei 37°C für 0, 2, 4, 6, 8, 10 und 24 h inkubiert. Um die enzymatischen Reaktionen zu stoppen, wurden die Röhrchen mit flüssigem N<sub>2</sub> behandelt und sofort lyophilisiert. Als Kontrollen wurden Proben mit 20 µl DMSO statt Substrat vorbereitet und wie beschrieben inkubiert. Zusätzlich wurden Stabilitätsstudien von jedem Substrat mit anaerobem Carbonat-Phosphatpuffer (pH 7,4) analog den Inkubationen durchgeführt. Alle Experimente erfolgten als Dreifachbestimmungen.

#### **2.1.2.3 Probenaufarbeitung**

Die gefriergetrockneten Proben wurden zweimal mit je 2,5 ml 70%igem (v/v) MeOH (1% (v/v) Essigsäure) im Ultraschallbad extrahiert. Nach Zentrifugation (5000 x g, 10 min) wurden die Überstände vereinigt und filtriert. Die Kontrollen (ohne Substrat bzw. Inokulum) wurden analog behandelt. Teile des gewonnenen Extrakts (50 µl und 20 µl) wurden mit HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS/MS gemessen.

#### **2.1.2.4 HPLC-DAD-Analytik**

Die Quantifizierung aller Substrate und Metabolite durch HPLC-DAD Analytik wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 18:** HPLC-DAD Bedingungen

Pumpe	Hewlett-Packard 1100 HPLC Gradientenpumpe (Waldbronn, Deutschland)
Probengeber	Wisp 712b Autosampler (Waters, Eschborn, Deutschland)
Stationäre Phase	Hypersil™ Gold C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm, 3 µm Partikelgröße) (Thermo, Runcorn, UK)
Stationäre Phase (Chinasäure)	Vorsäulen: 2x RP <sub>18</sub> Hypersil ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße) (Thermo, Runcorn, UK) Trennsäule: BioRad Aminex, HPX-87 H (300 x 7,8, 5 µm Partikelgröße) (BioRad, Hercules, USA)
Detektor	Hewlett-Packard 1100 Photodiode array Detektor (DAD)
Meßwellenlängen	210-360 nm
Steuerung und Datenverarbeitung	Hewlett-Packard ChemStation Software (Waldbronn, Deutschland)
Mobile Phase	A: 0,1%ige (v/v) Ameisensäure; B: Acetonitril
Mobile Phase (Chinasäure)	A: 0,0075 N Schwefelsäure; B: Wasser
Gradient	0-40 min: 1-50% B
Gradient (Chinasäure)	0-5 min: 100% A isokratisch, 5-20 min: 0-90% B linearer Gradient, 20-47 min: 90% B isokratisch, 47-48 min: 90-0% B linearer Gradient
Fluß	1 ml/min
Fluß (Chinasäure)	0,6 ml/min

Die Quantifizierung aller Verbindungen erfolgte mittels Kalibriergeraden (erstellt bei den entsprechenden Absorptionsmaxima). Die Berechnungen erfolgten über die Relation der jeweiligen Substanz zum eingesetzten IS (Peakfläche Verbindung/Peakfläche IS vs. Konzentration Verbindung/Konzentration IS). Alle Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen  $\pm$  SD.

Die Linearität der inkubierten Substrate (Chlorogensäure, Procyanidin B<sub>2</sub>, (-)-Epicatechin, Phloretin, Quercetin und Q3rha) war von 0,1-50 mg/l gewährleistet. Die Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden betragen mindestens 0,99. Die Versuche waren akkurat und reproduzierbar. Das LOQ lag bei 0,1-1 mg/l (je nach Substrat). Die Wiederfindungen der inkubierten Substrate betragen 65-90%.

### 2.1.2.5 HPLC-ESI-MS/MS

Die Identifizierung der untersuchten Verbindungen erfolgte durch HPLC-ESI-MS/MS Analytik durch Vergleich von Retentionszeiten, deprotonierten Ionen und Produktionspektren mit denen von entsprechenden Referenzsubstanzen.

**Tabelle 19:** HPLC-ESI-MS/MS Bedingungen

Gerät	Finnigan TSQ 7000 Triple Stage Quadrupol-Massenspektrometer mit Finnigan Elektrospray Ionisation-Interface (ESI) (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland)
Pumpe	Applied Biosystems 140B Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten (Applied Biosystems, Bensheim, Deutschland)
Probengeber	Triathlon-900 Autosampler (Spark Holland, Emmen, Niederlande)
Stationäre Phase	Hypersil™ Gold C <sub>18</sub> column (100 x 2,1 mm, 3 µm Partikelgröße) (Thermo, Runcorn, UK)
Ionization mode	negativ, positiv
Sheath- und Auxiliary-Gas	Stickstoff 5,0, Sheath (70 psi), Auxiliary (10 units)
Massenbereich	Full-scan mode, <i>m/z</i> 150-700, total scan duration: 1,0 s
Kollisionsgas	Argon (2,0 mTorr)
Kollisionsenergie	20-40 eV
Kapillarspannung	3,2 kV
Kapillartemperatur	200°C
Steuerung und Datenverarbeitung	Xcalibur Qual Browser Software 1.2/1.3 (Thermo Electron Corp., Dreieich, Deutschland)
Mobile Phase	A: 0,1%ige ( <i>v/v</i> ) Ameisensäure; B: Acetonitril
Gradient	0-30 min: 5-99% B
Fluß	0,2 ml/min

### 2.1.2.6 Verwendete Geräte

Die in Tabelle 20 aufgeführten Geräte wurden verwendet:



**Tabelle 20:** Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Waage	BP 210S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Rührplatte	IKAMAG <sup>®</sup> RH	Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland)
Vortexer	Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Anaerobkammer		selbst konstruiert
Ultraschallbad	TranssonicT460	Elma <sup>®</sup> (Singen, Deutschland)
Inkubationsschrank	Heraeus Trischrank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	Universal 16R, Rotor: 1616/1614	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage	Christ Alpha 1-4, 0,1mbar	Christ (Osterode am Harz, Deutschland)

## 2.2 Einfluss des Zuckerrests und der Aglyconstruktur auf die Hydrolyse von Heidelbeeranthocyanen im menschlichen Dünndarm und Dickdarm

### 2.2.1 Verwendete Substanzen

Alle verwendeten Chemikalien waren p.a.-Qualität und die Lösungsmittel „HPLC-grade“. Die Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch zusätzlich destilliert und H<sub>2</sub>O für die HPLC Analysen durch die hauseigenen Millipore<sup>™</sup> Aufbereitungsanlage von Millipore S.A. (Molsheim, Frankreich) filtriert. Acetonitril (Lichrosolv<sup>®</sup>) wurde von Merck (Darmstadt, Deutschland) und Ameisensäure wurde von Grüssing (Filsum, Deutschland) bezogen. Die Präparategläser waren aus der Chemikalienausgabe. Der Heidelbeerextrakt wurde von Kaden Biochemicals (Hamburg, Deutschland) und der IS (3,4,5-Trimethoxyzimtsäure) von Sigma (Steinheim, Deutschland) bezogen. Die Inkubationsröhrchen waren von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), die HPLC-Filter (Polyvinylidendifluorid, 0,45 µm) von Roth (Karlsruhe, Deutschland) und die HPLC-Gläschen von WICOM (Heppenheim, Deutschland).

### 2.2.2 Inkubationsbedingungen

In Präparategläser wurden je 630 µl Stammlösung des Heidelbeerextrakts (20 g/l in 1%iger Ameisensäure) pipettiert und nach Begasung (N<sub>2</sub>) 15 ml des Inokulums zugegeben (finale Konzentration: 806 mg/l). Die Gläschen wurden verschlossen und bei

37°C unter kontinuierlichem Rühren für 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 und 10 h (Ileostoma-beutelinhalt) und 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 h und 24 h (Kolostomabeutelinhalt) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 1 ml Probe entnommen und in Inkubationsröhrchen (100 µl konzentrierte Ameisensäure darin vorgelegt) pipettiert, vorsichtig homogenisiert und 5 min ins Ultraschallbad gestellt. Um die enzymatischen Reaktionen zu stoppen, wurden die Röhrchen anschließend mit flüssigem N<sub>2</sub> behandelt und sofort lyophilisiert. Als Kontrollen wurden Proben mit 630 µl 1%iger Ameisensäure statt Substrat und Inokulum bzw. Puffer statt Inokulum vorbereitet und wie beschrieben inkubiert. Alle Experimente waren Doppelbestimmungen.

### 2.2.3 Probenaufarbeitung

Die gefriergetrockneten Proben wurden dreimal mit je 1 ml MeOH/Ameisensäure (95/5, v/v) im Ultraschallbad extrahiert. Nach folgender Zentrifugation (5000 x g, 5 min) wurden die Überstände vereinigt und mit N<sub>2</sub> abgeblasen. Der Rückstand wurde in 1 ml 10%iger (v/v) Ameisensäure aufgenommen und durch HPLC-Filter filtriert. Danach wurden 380 µl Filtrat mit 20 µl internem Standard versetzt und 25 µl mit HPLC-DAD vermessen. Die Kontrollen (ohne Substrat bzw. Inokulum) wurden genauso behandelt.

### 2.2.4 HPLC-DAD-Analytik

Die Quantifizierung aller Anthocyane des Extrakts durch HPLC-DAD Analytik wurde unter den in Tabelle 21 dargestellten Bedingungen durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte über das jeweilige Peakflächenverhältnis Peakfläche Anthocyan/Peakfläche IS vs. Konzentration Anthocyan/Konzentration IS bezogen auf eine Anthocyanextraktlösung (380 µl Anthocyanextraktlösung (806 mg/l) + 20 µl IS, 25 µl davon mit HPLC-DAD gemessen). Die Flächenverhältnisse der Anthocyanextraktlösung entsprachen dabei 100% und dienten zur Berechnung der Inkubationswerte.

**Tabelle 21:** HPLC-DAD Bedingungen

Pumpe	Hewlett-Packard 1100 HPLC Gradientenpumpe (Waldbronn, Deutschland)
Probengeber	Wisp 712b Autosampler (Waters, Eschborn, Deutschland)
Stationäre Phase	Agilent Hypersil ODS C <sub>18</sub> (4,6 x 150 mm, 5 µm Partikelgröße) (Thermo, Runcorn, UK)
Detektor	Hewlett-Packard 1100 Photodiode array Detektor (DAD) (Waldbronn, Deutschland)
Meßwellenlängen	Interner Standard: 300 nm, Anthocyane: 520 nm
Steuerung und Datenverarbeitung	Hewlett-Packard ChemStation Software (Waldbronn, Deutschland)
Mobile Phase	A: 2,5%ige (v/v) Ameisensäure; B: Acetonitril
Gradient	0-40 min: 3-11% B, 40-60 min: 11-22% B, 60-65 min: 22-80% B 65-70 min: 80% B, 70-75 min: 80-3% B, 75-85 min: 3 % B
Fluß	0,5 ml/min

Die Wiederfindungen der Anthocyane betragen 92-100% (Ileostomaversuche) bzw. 34-51% (Kolostomaversuche). Die niedrigen Wiederfindungen bei den Kolostomaversuchen erklären sich durch die dickflüssige Beschaffenheit des Kolostomabeutelinhalts. Dagegen war der Ileostomabeutelinhalt sehr dünnflüssig und somit besser zu extrahieren.

### 2.2.5 Verwendete Geräte

Die in Tabelle 22 aufgeführten Geräte wurden verwendet:

**Tabelle 22:** Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Waage	BP 210S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Rührplatte	IKAMAG <sup>®</sup> RH	Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland)
Vortexer	Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Anaerobkammer		selbst konstruiert
Ultraschallbad	TranssonicT460	Elma <sup>®</sup> (Singen, Deutschland)
Inkubationsschrank	Heraeus Trischrank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Zentrifuge	Universal 16R, Rotor: 1616 & 1614	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage	Christ Alpha 1-4, 0.1 mbar	Christ (Osterode am Harz, Deutschland)

## **2.3 Metabolismus von D-Galacturonsäure und amidiertem Pektin**

### **2.3.1 Verwendete Substanzen**

Alle verwendeten Chemikalien waren p.a.-Qualität und die Lösungsmittel „HPLC-grade“. Die Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch zusätzlich destilliert und H<sub>2</sub>O für die HPLC Analysen durch die hauseigenen Millipore™ Aufbereitungsanlage von Millipore S.A. (Molsheim, Frankreich) filtriert. D3-MeOH wurde von Deutero GmbH (Kastellaun, Deutschland) bezogen. Buttersäure, Carbazol, Galacturonsäure, MeOH, Schwefelsäure und Natriumtetraborat waren von Fluka (Deisenhofen, Deutschland). Essigsäure und Ammoniumsulfat waren von Grüssing (Filsum, Deutschland) und 2-Methyl-1-pentanol, Propionsäure und Perchlorsäure wurden von Sigma (Steinheim, Deutschland) erhalten. Ethanol absolut war von Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland). Amidiertes Pektin (AF 020; deklarierter Veresterungsgrad (DE): 30% bzw. Amidierungsgrad (DA): 20%) wurde freundlicherweise von der Herbstreith & Fox KG (Neuenbürg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Inkubationsröhrchen und Eppendorfcaps waren von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), die HPLC-Filter (Polyvinylidendifluorid, 0,45 µm) von Roth (Karlsruhe, Deutschland) und die Headspace-Gläschen von WICOM (Heppenheim, Deutschland). Die verwendeten Küvetten waren von Hellma (Präzisions Quartz Suprasil® Küvetten, Lichtpfad: 10 mm) (Müllheim, Germany).

### **2.3.2 Inkubationsbedingungen**

#### **2.3.2.1 Speichel**

Verdünnter Speichel (2,5 ml) wurde zu 5 mg D-Galacturonsäure enthaltenden und mit N<sub>2</sub> begasten Inkubationsröhrchen gegeben. Für die Inkubation mit amidiertem Pektin wurden 1,25 ml verdünnter Speichel zu 1,25 ml einer Pektinstammlösung (4 g/l) pipettiert. Die Inkubationsröhrchen wurden fest verschlossen, homogenisiert und bei 37°C für 0, 30, 60, 120 s inkubiert. Um die enzymatischen Reaktionen zu stoppen, wurden die Proben anschließend mit flüssigem N<sub>2</sub> behandelt und lyophilisiert.

Für die MeOH-Messungen wurden 5 ml verdünnter Speichel zu 5 ml einer Pektinstammlösung (4 g/l) gegeben und nach Homogenisierung bei 37°C für 0, 30, 60, 120 s inkubiert. Um die enzymatischen Reaktionen zu stoppen, wurden die Proben anschließend mit flüssigem N<sub>2</sub> behandelt.

Die Kontrollproben bestanden aus entsprechenden Volumina destilliertem Wasser anstatt D-Galacturonsäure bzw. amidierten Pektin.

### **2.3.2.2 Künstlicher Magensaft**

Künstlicher Magensaft (2,5 ml) wurde zu 5 mg D-Galacturonsäure enthaltenden und mit N<sub>2</sub> begasten Inkubationsröhrchen gegeben. Für die Inkubation mit amidierten Pektin wurden 1,25 ml verdünnter Speichel zu 1,25 ml einer Pektinstammlösung (4 g/l) pipettiert. Die Inkubationsröhrchen wurden fest verschlossen, homogenisiert und bei 37°C für 0, 1, 2, 3, 4 h inkubiert. Um die enzymatischen Reaktionen zu stoppen, wurden die Proben anschließend mit flüssigem N<sub>2</sub> behandelt und lyophilisiert.

Für die MeOH-Messungen wurden 5 ml künstlicher Magensaft zu 5 ml einer Pektinstammlösung (4 g/l) gegeben und nach Homogenisierung bei 37°C 0, 1, 2, 3, 4 h inkubiert. Um die enzymatischen Reaktionen zu stoppen, wurden die Proben anschließend mit flüssigem N<sub>2</sub> behandelt.

Die Kontrollproben bestanden aus entsprechenden Volumina von destilliertem Wasser anstatt D-Galacturonsäure bzw. amidierten Pektin.

### **2.3.2.3 Ileo- und Kolostomabeutelinhalte**

Inokulum (2,5 ml) wurde zu 5 mg D-Galacturonsäure enthaltenden und mit N<sub>2</sub> begasten Inkubationsröhrchen gegeben. Für die Inkubation mit amidierten Pektin wurden 1,25 ml Inokulum zu 1,25 ml einer Pektinstammlösung (4 g/l) pipettiert. Die Inkubationsröhrchen wurden fest verschlossen, homogenisiert und bei 37°C für 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 h (Ileostomabeutelinhalte) und 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h (Kolostomabeutel-

inhalte) inkubiert. Um die enzymatischen Reaktionen zu stoppen, wurden die Proben anschließend mit flüssigem N<sub>2</sub> behandelt und für die D-Galacturonsäure- bzw. Pektinbestimmungen lyophilisiert. Für die Bestimmung der SCFA s. Abschnitt E 7.3.3.

Zusätzlich wurden Stabilitätsstudien von D-Galacturonsäure und amidierten Pektin mit dem verwendeten anaeroben Carbonat-Phosphat Puffer (pH 6,3 bzw. pH 7,4) ohne Inokulum wie beschrieben durchgeführt.

Für die MeOH-Messungen wurden 5 ml Inokulum zu 5 ml einer Pektinstammlösung (4 g/l) gegeben und nach Homogenisierung bei 37°C für 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 h (Ileostomabeutelinhalte) und 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24 h (Kolostomabeutelinhalte) inkubiert. Um die enzymatischen Reaktionen zu stoppen, wurden die Proben anschließend mit flüssigem N<sub>2</sub> behandelt.

Die Kontrollproben bestanden aus entsprechenden Volumina destilliertem Wasser anstatt D-Galacturonsäure bzw. amidierten Pektin.

#### 2.3.2.4 Verwendete Geräte

Die in Tabelle 23 aufgeführten Geräte wurden verwendet:

**Tabelle 23:** Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Waage	BP 210S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Rührplatte	IKAMAG®RH	Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland)
Vortexer	Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Anaerobkammer		selbst konstruiert
Inkubationsschrank	Heraeus Trischrank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage	Christ Alpha 1-4, 0,1 mbar	Christ (Osterode am Harz, Deutschland)

### **2.3.3 Probenaufarbeitung**

#### **2.3.3.1 Aufarbeitung für die Messung von D-Galacturonsäure und amidiertem Pektin**

Die gefriergetrockneten Proben wurden zweimal mit je 1,25 ml destilliertem Wasser extrahiert. Nach Zentrifugation (5000 x g für 10 min) wurden die Überstände vereinigt und mit HPLC-Filtern filtriert. Die Kontrollen (ohne Substrate) wurden analog behandelt. Teile des Extrakts (Inkubation mit Speichel: 1 ml; Inkubation mit künstlichem Magensaft: 500 µl; Inkubation mit Ileo- bzw. Kolostomabeutelinhalt: 500 µl) wurden verdünnt (Inkubation mit Speichel: 1:100; Inkubation mit künstlichem Magensaft: 1:50; Inkubation mit Ileo- bzw. Kolostomabeutelinhalt: 1:50) und photometrisch gemessen (s. Abschnitt E 7.4.1).

#### **2.3.3.2 Aufarbeitung für die Messung von MeOH**

Die gefrorenen Proben wurden aufgetaut und per Headspace solid-phase microextraction Gaschromatographie/Massenspektrometrie (HS-SPME-GC/MS) (s. Abschnitt E 7.4.2) gemessen.

#### **2.3.3.3 Aufarbeitung für die Messung von SCFA**

Zur Bestimmung der SCFA wurden die inkubierten Proben zentrifugiert (5000 x g für 10 min). Anschließend wurden 100 µl des Überstandes mit 50 µl 2-Methyl-1-pentanol (IS), 280 µl einer 0,36 M Perchlorsäure-Lösung und 270 µl einer 1 M KOH-Lösung versetzt und das Gemisch gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Proben wurden mit 950 µl einer 0,5 M HCl aufgenommen und nach Zentrifugation (5000 x g für 10 min) mit GC-Flammenionisations-Detektion (GC-FID) (s. Abschnitt E 7.4.3) gemessen.

#### **2.3.3.4 Verwendete Geräte**

Die in Tabelle 24 aufgeführten Geräte wurden verwendet:

**Tabelle 24:** Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Vortexer	Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Ultraschallbad	TranssonicT460	Elma® (Singen, Deutschland)
Zentrifuge	Universal 16R, Rotor: 1616/1614	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage	Christ Alpha 1-4, 0,1 mbar	Christ (Osterode am Harz, Deutschland)

## 2.3.4 Probenmessungen

### 2.3.4.1 Photometrische Messung von D-Galacturonsäure und amidiertem Pektin

D-Galacturonsäure und amidiertes Pektin wurden photometrisch nach einer modifizierten Carbazolreaktion des D-Galacturonsäurerests (Bitter und Muir 1962; Dische und Rothschild 1967) analog Platzer *et al.* (1999) gemessen. Dafür wurden 1,25 ml Natriumtetraborat-Lösung (0,025 M Natriumtetraborat x 10 H<sub>2</sub>O in Schwefelsäure) in Eppendorfcaps pipettiert und auf 4°C abgekühlt. Teile (210 µl) der nach Abschnitt E 7.3.1 vorbereiteten Proben wurden vorsichtig über die Säure geschichtet, die Caps verschlossen und unter ständigem Kühlen 5 min lang leicht geschüttelt. Danach wurden die Proben für 10 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die Farbreaktion wurden 40 µl Carbazollösung (0,125% Carbazol in Ethanol absolut (v/v)) hinzupipettiert, gefolgt von mehrmaligem Schütteln der Caps. Dann wurden die Proben für 15 min in einem kochenden Wasserbad erhitzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und die Absorption der Proben bei 524 nm gegen Kontrollen (destilliertes Wasser anstatt Probe) gemessen.

Durch diese Bestimmungsmethode wurden nur die freien D-Galacturonsäurereste (unverestert oder unamidiert) des verwendeten amidierten Pektins erfasst; dieser Anteil wurde bestimmt und lag bei  $47,5 \pm 0,7\%$ . Folglich wurden die eingesetzten Pektinkonzentrationen von 4 g/l bzw. 2 g/l korrigiert und die Werte 1,9 g/l bzw. 0,95 g/l erhalten.



Die Konzentrationen von D-Galacturonsäure und amidierten Pektin wurden über Kalibriergeraden bestimmt. Alle Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen  $\pm$  SD.

Linearität war von 1-100 mg/l D-Galacturonsäure gewährleistet und die Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden betragen mindestens 0,99. Die Versuche waren akkurat und reproduzierbar. Das LOQ lag bei 1 mg/l Galacturonsäure. Die Wiederfindungen der inkubierten Substrate betragen 94-100% Galacturonsäure.

Die in Tabelle 25 aufgeführten Geräte wurden verwendet:

**Tabelle 25:** Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Photometer	UVmini-1240 Spectrophotometer	Shimadzu (Kyoto, Japan)
Wasserbad	Julabo MWB	Julabo Labortechnik (Seelbach, Deutschland)

#### **2.3.4.2 HS-SPME-GC/MS**

Die verwendete Faser wurde vor den Versuchen, wie vom Hersteller empfohlen, konditioniert. Der Assay wurde modifiziert nach Savary und Nunez (2003) durchgeführt. Dafür wurden 6 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und 1,25  $\mu\text{l}$  D3-MeOH (IS) mit 10 ml der aufgetauten Probe (s. Abschnitt E 7.3.2) in einem Headspacegläschen gemischt. Die verschlossenen Gläschen wurden bei 70°C 30 min lang in einem Aluminiumblock erhitzt. Danach wurde die Nadel der SPME-Vorrichtung durch das Septum der Headspacegläschen gestochen und die Faser für weitere 30 min dem Kopfraum ausgesetzt. Nach Ablauf der Zeit wurde die Faser eingezogen und sofort in den GC-Injektor appliziert. Zur Desorption wurde die Faser für 1 min im Injektor belassen und danach zwecks Equilibrierung in einen weiteren Injektor überführt.

In Tabelle 26 sind die während der Versuche gewählten Bedingungen aufgeführt.

**Tabelle 26:** HS-SPME-GC/MS Bedingungen

SPME-Faser	Solid-phase microextraction fibers (Supelco, Bellefonte, USA; 70 µm Carbowax-DVB)
Heizplatte mit Alublock	
Gaschromatograph	Agilent 6890 Series Gaschromatograph; (Agilent Technologies, Wilmington, USA)
Injektor	Split/Splitless Injektor (1:20), Temperatur 220°C
Probengeber	Agilent 7683 Series Injektor (Agilent Technologies, Wilmington, USA)
Stationäre Phase	DB-Wax Kapillarsäule (30 m × 0,25 mm i.d.; d <sub>f</sub> = 0,25 µm) (J&W, Agilent, Waldbronn, Germany)
Temperaturprogramm	30°C, 10 min isotherm; 25°C/min, 240°C
Trägergas	1,0 ml/min Helium 5.0, constant flow
Massenspektrometer	Agilent 5973 Mass Selective Detector MSD (Agilent Technologies, Wilmington, USA)
Ionisation	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Temperatur	Ionenquelle 150 °C, Transferline 220 °C
Quellendruck	1*10 <sup>-5</sup> mbar
Multiplifier	1300 V
Massenbereich	Scan mode, 10-50 u
Datenaufnahme	Hewlett-Packard ChemStation Software (Waldbronn, Deutschland)
Datenkonvertierung	File Converter
Datenauswertung	Xcalibur Qual Browser Software 1.2/1.3 (Thermo Electron Corp., Dreieich, Deutschland)

Die MeOH-Konzentrationen wurden über das jeweilige Flächenverhältnis MeOH/D3-MeOH (eingesetzte D3-MeOH-Konzentration bekannt) der Basis-Ionenpaare (m/z 32/35) bestimmt. Alle Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen ± SD.

Die Linearität war in einem Bereich von 5-100 mg/l MeOH gewährleistet. Die Versuche waren akkurat und reproduzierbar. Das LOQ lag bei 5 mg/l MeOH. Die Wiederfindung von MeOH betrug 90-100%.

### 2.3.4.3 GC-FID

Ein Aliquot (1  $\mu$ l; split 1:20) der nach Abschnitt E 7.3.3 vorbereiteten Probe wurde per GC-FID unter folgenden Bedingungen analysiert:

**Tabelle 27:** GC-FID Bedingungen

Gaschromatograph	Hewlett-Packard 5890 Series II Gaschromatograph; (Waldbronn, Deutschland)
Injektor	Split/Splitless Injektor (1:20), Temperatur 220°C
Probengeber	Hewlett-Packard 7673 Series Injektor (Waldbronn, Deutschland)
Stationäre Phase	DB-Wax Kapillarsäule (30 m $\times$ 0,25 mm i.d.; $d_f$ = 0,25 $\mu$ m) (J&W, Agilent, Waldbronn, Germany)
Temperaturprogramm	40°C für 3 min isotherm; 4°C/min, 240°C
Trärgas	2,0 ml/min Helium 5.0, constant flow
Make-up Gas	30 ml/min Stickstoff 5.0
Brennergas	30 ml/min Wasserstoff 5.0, 300 ml/min Luft
Detektor	Flammenionisationsdetektor (FID), Temperatur 250 °C
Datenaufnahme und Datenauswertung	Hewlett-Packard ChemStation Software (Waldbronn, Deutschland)

Die Konzentrationen der SCFA wurden über Kalibriergeraden bestimmt. Die Berechnungen erfolgten über die Relation der SCFA zum eingesetzten IS (Peakfläche Verbindung/Peakfläche IS vs. Konzentration Verbindung/Konzentration IS). Alle Werte sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen  $\pm$  SD.

Die Linearität war von 1-200 mg/l SCFA gewährleistet und die Korrelationskoeffizienten der Kalibriergeraden betragen 0,99. Das LOQ lag für alle SCFA bei 1 mg/l.

### 2.3.4.4 Statistische Analyse

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für den kompletten Datensatz berechnet (n = 6 unabhängige Versuche; jeder Versuch wurde doppelt ausgeführt). Die Da-

tensätze wurden durch one-way ANOVA mit „post-hoc Bonferroni's multiple comparison test“ statistisch analysiert. Statistische Signifikanz wurde als  $p \leq 0,05$  definiert. Wegen der limitierten Probenzahl wurde ein Vortest durchgeführt, um die normale Resteverteilung zu untersuchen. Dafür wurden die Reste jedes Datensatzes berechnet und das Verhältnis des erhaltenen Bereichs zur Standardabweichung wurde analog David *et al.* (1954) analysiert. Um eine normale Resteverteilung und folgende ANOVA Analyse zu erreichen, wurde mit jedem Datensatz eine reziproke Transformation durchgeführt. Aufgrund der limitierten Anzahl an Daten sollten die  $p$ -Werte mit Vorsicht interpretiert werden. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism Software durchgeführt.

### **3 LOX-Hemmung durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe**

#### **3.1 Flavonoide und deren intestinale Metabolite als Soja LOX-1 Inhibitoren**

##### **3.1.1 Verwendete Substanzen**

Alle verwendeten Chemikalien waren p.a.-Qualität und die Lösungsmittel „HPLC-grade“. Die Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch zusätzlich destilliert und H<sub>2</sub>O für die HPLC Analysen durch die hauseigenen Millipore™ Aufbereitungsanlage von Millipore S.A. (Molsheim, Frankreich) filtriert. Ölsäure, Procyanidin B<sub>2</sub>, Q3glc, Apigenin, Luteolin, Daidzin, Genistein und Taxifolin wurden bei Fluka (Buchs, Schweiz) gekauft.  $p$ -Npglc und  $p$ -Npgal wurden von Serva (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Borsäure, Soja-LOX-1, (-)-Epicatechin, Q3rha, Puerarin, Daidzein und  $p$ -Nprha wurden von Sigma (Steinheim, Deutschland) gekauft. Q3gal und (+)-Catechin waren von Roth (Karlsruhe, Deutschland). Equol war von Chromadex (Irvine, USA) und Scutellarein von Extrasynthèse (Genay-Cedex, Frankreich).  $\delta$ -(3',4',5'-Trihydroxyphenyl)- $\gamma$ -valerolacton wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Rice (Rutgers, University of New Jersey, USA) zur Verfügung gestellt. Hispidulin wurde dankenswerterweise von Dr. Kavvadias (Universität Würzburg) bereitgestellt. Die Eppendorfcaps

wurden von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland) und die Quarzküvetten von Hellma (Müllheim, Deutschland).

### 3.1.2 Soja LOX-1 Assay

Die Bildung des *cis,trans*-Hydroperoxidderivats der Linolsäure wurde photometrisch bei 234 nm (Produkt,  $\epsilon = 25 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ ) und Raumtemperatur über 10 min verfolgt. Der Versuch wurde bei pH 9,0 in sauerstoffgesättigtem 0,1 M Boratpuffer durchgeführt. Die Standardreaktionsmischung (Endvolumen: 2 ml) enthielt dabei 10  $\mu\text{l}$  des Enzyms (Proteinstammlösung: 0,5 mg/ml; spezifische Aktivität: 131000 units/mg Protein), 10  $\mu\text{l}$  der zu untersuchenden Verbindung (Stammlösungen: 2 mM in Ethanol/Boratpuffer) und wurde mit 0,1 M Boratpuffer (pH 9,0) aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Addition von 100  $\mu\text{l}$  des Substrates (1 mM Linolsäure) gestartet. Die Kontrollen (Enzymaktivität) enthielten gleiche Volumina Ethanol ohne jeweiligen Inhibitor. Die Umsetzungsrate ( $v$ ) wurde von den Kurven (Abbildung 46) durch Extrapolation der Anfangsgeschwindigkeit über 90 s erhalten. Die Restaktivität wurde durch Vergleich der Umsetzungsraten ( $v$ ) der Versuche mit und ohne Inhibitorzusatz berechnet. Ölsäure diente als Positivkontrolle (der Hemmung) während aller Versuche.

### 3.1.3 Verwendete Geräte

Folgende Geräte wurden für den Enzymassay benutzt:

**Tabelle 28:** Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Spektralphotometer	UV mini-1240	Shimadzu (Duisburg, Deutschland)
Vortexer	Vortex Reax 1	Heidolph (Schwabach, Deutschland)

## 3.2 Anthocyane als Lipoxygenase-Inhibitoren

### 3.2.1 Verwendete Substanzen

Alle verwendeten Chemikalien waren p.a.-Qualität und die Lösungsmittel „HPLC-grade“. Die Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch zusätzlich destilliert und H<sub>2</sub>O für die HPLC Analysen durch die hauseigenen Millipore™ Aufbereitungsanlage von Millipore S.A. (Molsheim, Frankreich) filtriert. Acetonitril und Methanol waren von Fisher Scientific (Leicestershire, UK), Ameisensäure war von Gruessing (Filsum, Deutschland). Amberlite XAD-7 wurde von Supelco (Bellefonte, USA) bezogen. Dp war von Extrasynthèse (Lyon, Frankreich), Cy, Pn und Mv waren von Alsachim (Illkirch Graffenstaden, Frankreich). Die Trypan-blau Lösung, Ammoniumchlorid, Linolensäure, Arachidonsäure, Borsäure, Soja-LOX-1, Dithiothreitol (DTT), Adenosintriphosphat (ATP) und Calciumchlorid x 2 H<sub>2</sub>O wurden von Sigma (Steinheim, Deutschland) gekauft. „Phosphate buffered saline“ (PBS) und Biocol Dichtegradienten-Lösung waren von Biochrom (Berlin, Deutschland). Natriumcitrat und TRIS wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Salzsäure war von VWR (Fontenay sous bois, Frankreich), Ölsäure und Nordihydroguarensäure (NDGA) waren von Fluka (Buchs, Schweiz). Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 M NaOH, CuSO<sub>4</sub> und Natriumtartrat waren aus der Chemikalienausgabe, Bovines Serumalbumin (BSA) von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) und Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz von Merck (Darmstadt, Deutschland) Die Monoventen™ und Eppendorfcaps waren von Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), die Quarzküvetten von Hellma (Müllheim, Deutschland) und die Halbmikro PMMA-Küvetten von Brand (Wertheim, Deutschland).

### 3.2.2 Extraktion und Isolierung der Anthocyane

Die verwendeten Anthocyane wurden von Wildheidelbeeren (*Vaccinium myrtillus*) (Dp3glc, Dp3gal, Dp3ara, Mv3glc), kommerziell erhältlichen Aroniakonzentrat (*Aronia melanocarpa*) (Cy3glc, Cy3gal, Cy3ara) und Cranberrysaft (*Vaccinium macrocarpon*) (Pn3glc, Pn3gal, Pn3ara) erhalten. Um phenolische Rohextrakte der verwendeten Heidelbeeren zu erhalten, wurden diese nach Kaehkoenen *et al.* (2003)

extrahiert. Dafür wurden 2 g Beeren mit 20 ml Lösungsmittel (H<sub>2</sub>O/Acetonitril/Ameisensäure; 50:49:1) 1 min lang homogenisiert. Die Probe wurde zentrifugiert (5000 x g für 15 min) und der Überstand wurde gesammelt. Die Extraktion wurde zweimal durchgeführt. Die gesammelten Überstände wurden abrotiert und der Rückstand in 0,5% Ameisensäure gelöst. Die gekauften Aronia- bzw. Cranberry-Produkte wurden unextrahiert verwendet.

Zur Isolierung wurden der phenolische Heidelbeerhextrakt, das Aroniakonzentrat und der Cranberrysaft nach Kaehkoenen *et al.* (2003) Amberlite XAD-7 Säulenchromatographie aufgereinigt. Dafür wurden die Proben auf eine gefüllte Glassäule gegeben, um freie Zucker, organische und phenolische Säuren mit 2% Ameisensäure abzutrennen. Die anthocyanreiche Fraktion wurde durch Elution mit Acetonitril/H<sub>2</sub>O/Ameisensäure (50:49.5:0.5) gefolgt von einem Waschschriff mit Acetonitril/Ameisensäure (99.5:0.5) erhalten. Folgende Geräte wurden zur Extraktion und Isolierung benutzt:

**Tabelle 29:** Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Ultra-Turax Mixer	T25 Mixer	Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland)
Glassäule	Durchmesser: 40 mm, Länge: 300 mm	Chemikalienausgabe

### 3.2.3 Präparative HPLC/ UV-VIS Fraktionierung

Die weitere Auftrennung der unter 3.2.2 erhaltenen Fraktionen wurde mittels präparativer HPLC unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 30:** Präparative HPLC-UV/VIS Bedingungen

Pumpe	Knauer K1001 Pumpe (Knauer, Berlin, Deutschland)
Injektor	Rheodyne Six-Port Injektionssystem, 1 ml Probenschleife (Rheodyne Europa, Alsbach a.d. Bergstrasse, Deutschland); Injektionsvolumen: 400 µl
Stationäre Phase	Waters XBridge™ Prep C18 (19 x 150 mm, 5 µm Partikelgröße) (Waters, Milford, USA)
Detektor	Knauer UV/VIS Detektor (Knauer, Berlin, Deutschland)
Meßwellenlänge	520 nm
Steuerung und Datenverarbeitung	SE 120 BBC Goertz Metrawatt Datenschreiber (Goertz, Wien, Österreich)
Mobile Phase	A: 10%ige (v/v) Ameisensäure; B: Acetonitril
Gradient	0-36 min: 2% B isokratisch, 36-50 min: 2-4% B, 50-75 min: 4-6% B 75-85 min: 6-9% B
Fluß	8 ml/min

Die isolierten Anthocyane wurden ausgewogen und die Ausbeuten waren wie folgt: 2,32% Dp3glc, 1,38% Dp3gal, 2,5% Dp3ara (Prozentangaben bezogen auf Heidelbeer-XAD-Extrakt); 0,4% Cy3glc, 0,1% Cy3gal, 0,3% Cy3ara (Prozentangaben bezogen auf Aronia-XAD-Extrakt); 0,24% Pn3glc, 5,14% Pn3gal, 2,44% Pn3ara (Prozentangaben bezogen auf Cranberrysaft).



### 3.2.4 HPLC-DAD-Analytik

Die HPLC-DAD-Analyse wurde zur Überprüfung der Reinheit der unter 3.2.3 erhaltenen Fraktionen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

**Tabelle 31:** HPLC-DAD Bedingungen

Pumpe	2 Alexys LC 100 Pumpen (Antec Leyden, Zouterwoude, Niederlande)
Probengeber	AS 100 Autosampler (Antec Leyden, Zouterwoude, Niederlande) Injektionsvolumen: 100 µl
Stationäre Phase	Agilent Hypersil ODS C <sub>18</sub> (4,6 x 150 mm, 5 µm Partikelgröße) (Thermo, Runcorn, UK)
Detektor	SPA-10A UV/VIS Detektor (Shimadzu Europa, Duisburg, Deutschland)
Meßwellenlängen	520 nm
Steuerung und Datenverarbeitung	Alexys Data System Software (Antec Leyden, Zouterwoude, Niederlande)
Mobile Phase	A: 10%ige (v/v) Ameisensäure; B: 10%ige (v/v) Ameisensäure/ Acetonitril (1:1; v/v)
Gradient	0-60 min: 2-8% B
Fluß	0,5 ml/min

### 3.2.5 HPLC-ESI-MS/MS

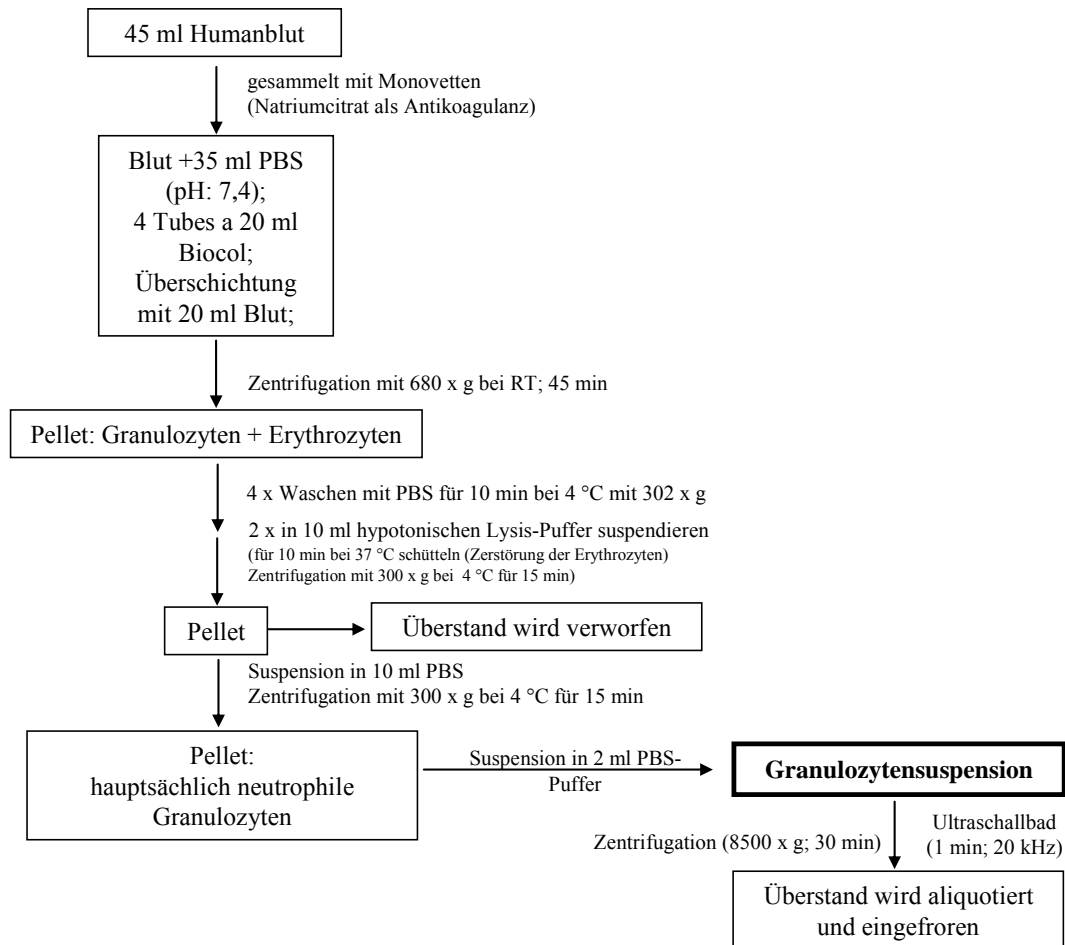
Die Identifizierung der erhaltenen Anthocyane erfolgte durch HPLC-ESI-MS/MS Analytik durch Vergleich der Retentionszeiten, deprotonierten Ionen und Produktionspektren mit denen von entsprechenden Referenzsubstanzen und Literaturdaten.

**Tabelle 32:** HPLC-ESI-MS/MS Bedingungen

Gerät	Finnigan TSQ 7000 Triple Stage Quadrupol-Massenspektrometer mit Finnigan Elektrospray Ionisation-Interface (ESI) (Finnigan MAT, Bremen, Deutschland)
Pumpe	Applied Biosystems 140B Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten (Applied Biosystems, Bensheim, Deutschland)
Probengeber	Triathlon-900 Autosampler (Spark Holland, Emmen, Niederlande) Injektionsvolumen: 100 µl
Stationäre Phase	Waters Symmetry C18 column (150 x 2,1 mm, 3 µm Partikelgröße) (Waters, Milford, USA)
Ionization mode	positiv
Sheath- und Auxiliary-Gas	Stickstoff 5.0, Sheath (70 psi), Auxiliary (10 units)
Massenbereich	Full-scan mode, $m/z$ 150-1000, total scan duration: 1,0 s
Kollisionsgas	Argon (2,0 mTorr)
Kollisionsenergie	20-40 eV
Kapillarspannung	3,5 kV
Kapillartemperatur	250°C
Steuerung und Datenverarbeitung	Xcalibur Qual Browser Software 1.2/1.3 (Thermo Electron Corp., Dreieich, Deutschland)
Mobile Phase	A: 1%ige ( $v/v$ ) Ameisensäure; B: Acetonitril
Gradient	0-20 min: 1-50% B
Fluß	0,2 ml/min

### 3.2.6 Isolierung der 5-LOX aus humanen neutrophilen Granulozyten

Die Isolierung der 5-LOX wurde nach dem in Abbildung 55 dargestellten Schema durchgeführt.



**Abbildung 55:** Isolierung der 5-LOX aus Humanblut modifiziert nach Cusan *et al.* (2005).

Menschliches peripheres venöses Blut von gesunden Probanden, welche keine Medikamente eingenommen hatten, wurde in Monovetten™ auf Natriumcitrat als Antikoagulant gesammelt. Die humanen neutrophilen Granulozyten wurden angelehnt an Cusan *et al.* (2005) durch einen Biocol Dichtegradienten und folgende hypotonische Lyse der Erythrozyten isoliert. Dafür wurden 45 ml des Blutes mit PBS-Puffer (pH: 7,4) vermischt und sofort in 20 ml Biocol Lösung enthaltende Inkubationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (680 x g bei Raumtemperatur für 45 min) bildeten die

Leukozyten und Erythrozyten ein Pellet, während die Thrombozyten und das Plasma im verworfenen Überstand blieben. Das Pellet wurde anschließend in 10 ml PBS-Puffer (pH: 7,4) aufgenommen. Nach wiederholter Zentrifugation (300 x g bei 4°C für 10 min) und Verwerfung des Überstandes, wurde das gewaschene Pellet in 10 ml hypotonischen Lysispuffer (0,17 g NH<sub>4</sub>Cl, 0,2 g TRIS, H<sub>2</sub>O auf 100 ml, pH 7,2) suspendiert und vorsichtig für 10 min bei 37°C geschüttelt, um die noch vorhandenen Erythrozyten zu zerstören. Die Suspension wurde abermals zentrifugiert (300 x g bei 4°C für 15 min), der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit PBS-Puffer gewaschen (300 x g bei 4°C für 10 min). Die Lyse- und Waschschrte wurden wiederholt bis das Pellet frei von Erythrozyten war. Das resultierende Pellet, welches hauptsächlich neutrophile Granulozyten enthielt, wurde in 2 ml PBS-Puffer suspendiert.

Um die Zellvitalität und Zellkonzentration zu überprüfen, wurden 50 µl Leukozytensuspension und 10 µl einer 0,4% Trypan-blau Lösung auf einem Objektträger gemischt und mit einem Lichtmikroskop bei 1000facher Vergrößerung untersucht. Tote Zellen erschienen wegen der Absorption der Trypan-blau Lösung größer und dunkler, während die lebenden Zellen kleiner, heller und granulöser erschienen. Die Suspension mußte dabei > 90% lebende Zellen enthalten. Die Leukozytenkonzentration der verdünnten Zellsuspension wurde in einer Zählkammer und mit einem Lichtmikroskop bestimmt. Für den Bioassay musste die Zellkonzentration 5000 Zellen/µl PBS-Puffer betragen.

Die Suspension wurde für 20-30 s bei 20 kHz in ein Ultraschallbad gestellt, um die cytosolische 5-LOX in Lösung zu bringen. Die Lösung wurde anschließend zentrifugiert (8500 x g für 30 min bei Raumtemperatur) und der Überstand direkt als Enzymquelle eingesetzt. Die Proteinkonzentration der erhaltenen Enzymquelle wurde nach Lowry *et al.* (1951) mit BSA als Standard bestimmt (s. Abschnitt E 3.2.7).

**Tabelle 33:** Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Laminar Air Flow	Typ UVF 6.07	BDK (Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland)
Zentrifuge	Megafuge 1.0R	Kendro (Osterode, Duetschland)
Zentrifuge	Sigma 101 M	Sigma (Osterode, Deutschland)
Mikroskop	Inversmikroskop, ECLIPSE TS100	Nikon (Düsseldorf, Deutschland)
Zählkammer	Neugebauer improved, Tiefe 0,1 mm	Superior (Marienfeld, Deutschland)
Ultraschallbad	Bandelin Smarex TK 52	Bandelin Electronics (Berlin, Deutschland)

### 3.2.7 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinkonzentration der unter Abschnitt E 3.2.6 erhaltenen Enzymquelle wurde nach Lowry *et al.* (1951) mit BSA als Standard bestimmt.

Hierfür wurden folgende Lösungen vorbereitet:

Lösung A: 2 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  wurden in 100 ml 0,1 M NaOH gelöst (18,86 mM)

Lösung B: 1 g  $\text{CuSO}_4$  wurde in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. (6,26 mM)

Lösung C: 2 g Natriumtartrat wurden in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. (8,69 mM)

Lösung D: Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz :  $\text{H}_2\text{O}$  im Verhältnis 5:4

Lösung E: 10 ml Lösung A, 0,1 ml Lösung B und 0,1 ml Lösung C

Kalibrierlösungen:

Aus einer BSA-Stammlösung (5 mg/ml) wurden 6 Kalibrierlösungen in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 1,0 mg/ml hergestellt.

Probelösung:

Das Cytosol wurde vor der Bestimmung mit  $\text{H}_2\text{O}$  1:100 verdünnt.

Durchführung:

200 µl der Probe-, Kalibrierlösungen bzw. H<sub>2</sub>O (Nullabgleich) wurden mit 1 ml Lösung E versetzt, gut gemischt und 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Lösung D zugegeben, nochmals gut gemischt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln stengelassen. Nach der Inkubation wurde die Absorption der Probe- bzw. Kalibrierlösungen bei 750 nm gegen die Leerprobe (Nullabgleich) bestimmt. Mit Hilfe der erstellten Kalibriergeraden wurde der Proteingehalt des Cytosols ermittelt. Bei der Bestimmung wurden folgende Geräte benutzt:

**Tabelle 34:** Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Spektralphotometer	UV mini-1240	Shimadzu (Duisburg, Deutschland)
Vortexer	Vortex Reax 1	Heidolph (Schwabach, Deutschland)

### 3.2.8 Enzymassays

#### 3.2.8.1 Soja LOX-1 Assay

Die Bildung des *cis,trans*-Hydroperoxidderivats der Linolsäure wurde photometrisch bei 234 nm (Produkt,  $\epsilon = 25 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ ) und Raumtemperatur über 10 min verfolgt. Der Versuch wurde bei pH 9,0 in sauerstoff-gesättigtem 0,1 M Boratpuffer durchgeführt.

Die Standardreaktionsmischung (Endvolumen: 2 ml) enthielt 10 µl des Enzyms (Proteinstammlösung: 0,5 mg/ml; spezifische Aktivität: 131000 units/mg Protein), 10-200 µl des zu untersuchenden Anthocyans bzw. Anthocyanidins (Stammlösungen: 2-200 mM in MeOH (0,1% HCl)/0,1 M Boratpuffer), nicht mehr als 0,1% MeOH und wurde mit 0,1 M Boratpuffer (pH 9,0) aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Addition von 100 µl des Substrates (1 mM Linolsäure) gestartet. Die Kontrollen (Enzymaktivität)

enthielten gleiche Volumina MeOH (0,1% HCl) ohne Inhibitor (Anthocyane und Anthocyanidine). Die Umsetzungsrate ( $v$ ) wurde von den Kurven (Abbildung 46) durch Extrapolation der Anfangsgeschwindigkeit über 90 s erhalten. Die Restaktivität wurde durch Vergleich der Umsetzungsraten ( $v$ ) der Versuche mit und ohne Inhibitorzusatz berechnet. Ölsäure diente als Positivkontrolle während aller Versuche. Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt.

### 3.2.8.2 Assay mit 5-LOX aus menschlichen neutrophilen Granulozyten

Der Assay mit 5-LOX aus menschlichen neutrophilen Granulozyten wurde nach Aharony und Stein (1986) durchgeführt. Dabei wurde die Bildung des 5-HETE (Produkt,  $\varepsilon = 28 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ ) über die Absorptionzunahme photometrisch bei 236 nm und 37 °C für 5 min verfolgt. Das Substrat (AA) wurde analog Axelrod *et al.* (1981) vorbereitet.

Für die Inhibierungsversuche wurde zunächst die 5-LOX-Aktivität im unter Abschnitt E 3.2.6 gewonnenen Lysat spektrophotometrisch bestimmt.

Die nach Gleichung 1 berechnete spezifische Aktivität betrug 0,22  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  Protein (Durchführung der Proteinbestimmung s. Abschnitt E 3.2.7).

$$V_a = \frac{(\Delta E \cdot V_1 \cdot 1000)}{(t \cdot \varepsilon \cdot d \cdot V_2)}$$

**Gleichung 1:** Berechnung der Volumenaktivität ( $V_a$ ) des eingesetzten Enzyms

$\Delta E$ : Absorptionsänderung/min	t: Zeiteinheit [min]
$V_1$ : Gesamtvolumen [ml]	d: Schichtdicke der Küvette [cm]
$V_2$ : Volumen des Enzyms [ml]	$\varepsilon$ 5-Hydroxyeicosatetraen
$\varepsilon$ : mikromolarer Extinktionskoeffizient [ $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ ]	(5-HETE): 28 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$

Die Standardreaktionsmischung (Endvolumen: 500  $\mu\text{l}$ ) enthielt 100  $\mu\text{l}$  der unter 3.2.6 erhaltenen Enzymquelle (Spezifische Aktivität: 0,22  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  Protein), 2,5-25  $\mu\text{L}$  Dp3glc bzw. Dp3gal (Stammlösung: 2 mM in MeOH (0,1% HCl)/0.1 M Boratpuffer),

nicht mehr als 0,1% MeOH, 75  $\mu\text{l}$  Cofaktoren (je 25  $\mu\text{l}$  von 5 mM DTT, 4 mM ATP und 6 mM  $\text{CaCl}_2$ ) und wurde anschließend mit 0,1 M PBS-Puffer (pH 7,4) aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  Substrat (10 mM AA) gestartet. Die Kontrollen (Enzymaktivität) enthielten gleiche Volumina MeOH (0,1% HCl) ohne Inhibitor (Dp3glc und Dp3gal). Die Umsetzungsrate ( $v$ ) wurde von den Kurven (Abbildung 46) durch Extrapolation der Anfangsgeschwindigkeit über 90 s erhalten. Die Restaktivität wurde durch Vergleich der Umsetzungsraten ( $v$ ) von Versuche mit und ohne Inhibitorzusatz berechnet. NDGA diente als Positivkontrolle (der Hemmung) während aller Versuche. Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt.

### 3.2.8.3 Bestimmung des Inhibitionstyps mit Peonidin und Soja LOX-1

Die Anwesenheit eines Inhibitors ändert die Michaelis-Menten Konstante ( $K_m$ ) und/oder die Geschwindigkeit ( $v$ ) der Reaktion (Das 1993). Das Ausmaß der Veränderung hängt sowohl von der Inhibitorkonzentration ( $I$ ) als auch von dessen Affinität für das Enzym, ausgedrückt durch die Inhibitionskonstante  $K_i$ , ab. Eine hohe  $K_i$  bedeutet niedrige Affinität und umgekehrt.

Um die Inhibitionsmuster und etwaige Struktur-Aktivitätsbeziehungen detailliert zu untersuchen, wurde der Inhibitionstyp (kompetitiv, unkompetitiv, nichtkompetitiv) von Pn bei Soja LOX-1 untersucht. Dafür wurden Lineweaver-Burk Plots (doppelt reziprok) von  $1/\text{Substratkonzentration}$  ( $S$ ) gegen  $1/v$  mit und ohne Zusatz des Inhibitors erstellt. Für jede Konzentration des Inhibitors (drei unterschiedliche Konzentrationen) wurden graphische Plots gegen 3 verschiedene Konzentrationen des Substrats gebildet (25-500  $\mu\text{M}$ ). Von der Anordnung der erhaltenen Plot-Trendlinien konnte der Inhibitionstyp abgeleitet werden. Die  $K_m$  bzw.  $V_{\max}$  Werte wurden durch die Schnittpunkte auf der  $1/S$ -Achse bzw.  $1/v$ -Achse des Lineweaver-Burk Plots erhalten.

Um  $K_i$  zu berechnen wurde  $1/V_{\max}$  gegen  $I$  aufgetragen, wobei der Schnittpunkt der erhaltenen Trendlinie auf der Inhibitorachse  $K_i$  ergab.



### 3.2.8.4 Verwendete Geräte

Folgende Geräte wurden für die Enzymassays benutzt:

**Tabelle 35:** Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Spektralphotometer	UV mini-1240	Shimadzu (Duisburg, Deutschland)
Vortexer	Vortex Reax 1	Heidolph (Schwabach, Deutschland)

### 3.2.8.5 Statistische Analyse

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden für den kompletten Datensatz berechnet (jedes Experiment wurde dreifach ausgeführt). Die Datensätze wurden durch one-way ANOVA mit „post-hoc Bonferroni's multiple comparison test“ statistisch analysiert. Statistische Signifikanz wurde als  $p \leq 0.05$  definiert. Wegen der limitierten Probenzahl wurde ein Vortest durchgeführt, um die normale Resteverteilung zu untersuchen. Dafür wurden die Reste jedes Datensatzes berechnet und das Verhältnis des erhaltenen Bereichs zur Standardabweichung wurde analog David *et al.* (1954) analysiert. Um eine normale Resteverteilung und folgende ANOVA Analyse zu erreichen, wurde repräsentativ mit einem Datensatz eine reziproke Transformation durchgeführt. Aufgrund der limitierten Anzahl an Daten sollten die  $p$ -Werte mit Vorsicht interpretiert werden. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism Software durchgeführt.



# **Literaturverzeichnis**

---



Abd El Mohsen, M. M., Kuhnle, G., Rechner A. R., Schroeter H., Rose S., Jenner P., Rice-Evans C. A. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 1693-1702.

Abdulrahman, F., Inyang, I. S., Abbah, J., Binda, L., Amos, S., Gamaniel, K. Effect of aqueous leaf extract of *Irvingia gabonensis* on gastrointestinal tract in rodents. *Indian J. Exp. Biol.* **2004**, *42*, 787-791.

Adlercreutz, H. and Mazur, W. Phytoestrogens and Western diseases. *Ann. Medicinal Research Reviews* **1997**, *29*, 95-120.

Agbor Gabriel, A., Leopold, T., Jeanne Ngogang, Y. The antidiarrhoeal activity of *Alchornea cordifolia* leaf extract. *Phytother. Res.*, **2004**, *18*, 873-876.

Aharony, D. and Stein, R. L. Kinetic Mechanism of Guinea-Pig Neutrophil 5-Lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 1512-1519.

Andlauer, W., Kolb, J., Furst, P. Absorption and metabolism of genistin in the isolated rat small intestine. *FEBS Lett.* **2000**, *475*, 127-130.

Arts, I. C. W., van de Putte, B., Hollman, P. C. H. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric. Food Chem.* **2000a**, *48* 1746–1751.

Arts, I. C., van de Putte, B., Hollman, P. C. H. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J. Agric. Food Chem.* **2000b**, *48*, 1752–1757.

Arts, I. C. W., Sesink, A. L. A., Faassen-Peters, M. Hollman, P. C. H. The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *Brit. J. Nutr.* **2004**, *91*, 841-847.

Aura, A. M., O'Leary, K. A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Puupponen-Piimä, R., Nuutila, A. M., Oksman-Caldentey, K. M., Poutanen, K. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1725-1730.

Axelrod, B., Cheesbrough, T. M., Laakso, S. Lipoxygenase from soybeans. *Methods in Enzymology (Lipids, Pt. C)* **1981**, *71*, 441-451.

Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M., Terao, J. Absorption and urinary excretion of procyanidin B<sub>2</sub> [epicatechin-(4 beta-8)-epicatechin] in rats. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *33*, 142-148.

Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R. L., Bagchi, M., Tran, M. X., Stohs, S. J. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract *in vitro*. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **1997**, *95*, 179-189.

Bas, E., Recio, M. C. Giner, R. M., Manez, S., Cerda-Nicolas, M., Rios, J. L. Anti-inflammatory activity of 5-*O*-demethylnobiletin, a poly-methoxyflavone isolated from *Sideritis tragoriganum*. *Planta Med.* **2006**, *72*, 136-142.

Bastida, E., Bertomeu, M. C. Haas, T. A., Almirall, L., Lauri, D., Orr, F. W., Buchanan, M. R. Regulation of Tumor-Cell Adhesion by Intracellular 13-Hode-15-Hete Ratio. *J. Lipid Mediator.* **1990**, *2*, 281-293.

Belitz, H. D. and Grosch W. (eds.) Lehrbuch der Lebensmittelchemie, Springer-Verlag, Heidelberg, 6. Auflage, **2007**.

Bengmark, S. Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NF $\kappa$ B, cyclooxygenase-2, lipoxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* **2006**, *30*, 45-51.

Berliner, J. A. and Heinecke, J. W. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 707-727.

Berrin, J. G., Czjzek, M., Kroon, P. A., McLauchlan, W. R., Puigserver, A., Williamson, G., Juge, N. Substrate (aglycone) specificity of human cytosolic beta-glucosidase. *Biochem. J.* **2003**, *373*, 41-48.

Bitter, T. and Muir, H. M. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.* **1962**, *4*, 330-334.

Blair, I. A., Lawson, J. A., Ischiropoulos, H., Fitzgerald, G. A. Biomarkers of oxidant stress *in vivo*: oxidative modifications of lipids, proteins and DNA. *In*: Bourassa, M. G.; Tardif, J.-C. (eds.) Antioxidants and cardiovascular disease, Springer-Verlag, New York **2006**, 131-165.

Blaut, M., Schoefer, L. Braune, A. Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **2003**, *73*, 79-87.

Boeglin, W. E., Kim, R. B., Brash, A. R. A 12R-lipoxygenase in human skin: Mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6744-6749.

Boersma, M. G., van der Woude, H., Bogaards, J., Boeren, S., Vervoort, J., Cnubben, N. H., van Iersel, M. L., van Bladeren, P. J., Rietjens, I. M. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15*, 662-670.

Bors, W., Heller, W., Michel, C. The chemistry of flavonoids. *Antioxidants in health and disease, Issue: Flavonoids in health and disease*, **1998**, 7, 111-136.

Boulton, D. W., Walle, U. K., Walle, T. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, 50, 243-249.

Bourquin, L. D., Titgemeyer, E. C., Fahey, G. C. Fermentation of various dietary fiber sources by human fecal bacteria. *Nutr. Res.* **1996**, 16, 1119-1131.

Boyington, J. C., Gaffney, B. J., Amzel, L. M. The 3-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science* **1993**, 260, 1482-1486.

Brash, A. R. Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 23679-23682.

Braune, A., Gutschow, M., Engst, W., Blaut, M. Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 5558-5567.

Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C., Rice-Evans, C. A. Structural dependence of flavonoid interactions with  $\text{Cu}^{2+}$  ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* **1998**, 330, 1173-1178.

Bundy, G. L., Nidy, E. G., Epps, D. E., Mizersak, S. A., Wnuk, R. J. Discovery of an arachidonic acid C-8 lipoxygenase in the gorgonian coral *Pseudoplexaura porosa*. *J. Biol. Chem.* **1986**, 61, 747-751.

Butkovic, V., Klasnic, L., Bors, W. Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 2816-2820.

Cassidy, A., Hansley, B., Lamuela-Raventos, R. M. Isoflavones, lignans and stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 1044-1062.

Cathcart, M. K., McNally, A. K., Chisolm, G. M. Lipoxygenase-mediated transformation of human low-density-lipoprotein to an oxidized and cytotoxic complex. *J. Lipid. Res.* **1991**, 32, 63-70.

Chamulitrat, W. and Mason, R. P. Lipid peroxy radical intermediates in the peroxidation of polyunsaturated fatty-acids by lipoxygenase - direct electron-spin resonance investigations. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 20968-20973.

Chandra, J., Samali, A., Orrenius, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 29, 323-333.

Cheng, I. F. and Breen, K. On the ability of four flavonoids, baicalein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the fenton reaction of the iron-ATP complex. *BioMetals* **2000**, *13*, 77-83.

Chidananda, C. and Sattur, A. P. Sclerotiorin, a novel inhibitor of lipoxygenase from *Penicillium frequentans*. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2879-2883.

Clarke, J. M., Bird, A. R., Topping, D. L., Cobiac, L. Excretion of starch and esterified short-chain fatty acids by ileostomy subjects after the ingestion of acylated starches. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *86*, 1146-51.

Clifford, M. and Scalbert, A. Ellagitannins-occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J. Food. Sci. Agric.* **2000**, *80*, 1118-1125.

Clifford, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food. Agric.* **1999**, *79*, 362-372.

Clifford, M. N. Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *J. Food. Sci. Agric.* **2000**, *80*, 1063-1072.

Cook, S. I. and Sellin J. H. Short chain fatty acids in health and disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1998**, *12*, 499-507.

Coward, L., Smith, M., Kirk, M., Barnes, S. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 1486-1491.

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.

Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., Remesy, C. Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 2109-2114.

Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., Remesy, C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 618-621.

Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Cotellet, N., Vezin, H., Demigne, C., Remesy, C. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *Am. J. Physiol.* **2003**, *284*, 980-988.

Crowther, S. D. and Rees, P. J. Current treatment of asthma - focus on leukotrienes. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **2000**, *1*, 1021-1040.



Cusan, C., Spalluto, G., Prato, M., Adams, M., Bodensieck, A., Bauer, R., Tubaro, A., Bernardi, P., Da Ros, T. Synthesis and biological evaluation of new phenidone analogues as potential dual cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) and human lipoxygenase (5-LOX) inhibitors. *Farmaco* **2005**, *60*, 7-13.

Da Silva, E. L., Piskula, M. K., Yamamoto, N., Moon, J.-H., Terao, J. Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Lett.* **1998**, *430*, 405-408.

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.

Das, D. *In: Biochemistry* (8<sup>th</sup> ed.), Calcutta: Academic Publishers **1993**, 89-111.

Datla, K. P., Christidou, M. *et al.* Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport* **2001**, *12*, 3871-3875.

David, H. A., Hartley, H. O., Pearson, E. S. The distribution of the ratio, in a single normal sample of the range to standard deviation. *Biometrika* **1954**, *41*, 482-493.

Day, A. J., DuPont, M. S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M. J., Morgan, M. R., Williamson, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity. *FEBS Lett.* **1998**, *436*, 71-75.

Day, A. J., Canada, F. J., Diaz, J. C., Kroon, P. A., Mclauchlan, R., Faulds, C. B., Plumb, G. W., Morgan, M. R. A., Williamson, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *Febs Lett.* **2000**, *468*, 166-170.

Day, A. J., Mellon, F., Barron, D., Sarrazin, G., Morgan, M. R., Williamson, G. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free. Radic. Res.* **2001**, *35*, 941-952.

Day, A. J., Gee, J. M., DuPont, M. S., Johnson, I. T., Williamson, G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1199-1206.

De Groot, J. J. M. C., Veldink, G. A., Vliegthart, J. F. G., Boldingh, J., Wever, R., Van Gelder, B. F. Demonstration by EPR spectroscopy of the functional role of iron in soybean lipoxygenase-1. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *377*, 71-79.

Dische, Z. and Rothschild C. 2 Modifications of carbazole reaction of hexuronic acids for differentiation of polyuronides. *Anal. Biochem.* **1967**, *21*, 125-130.

Dongowski, G. and Lorenz, A. Unsaturated oligogalacturonic acids are generated by *in vitro* treatment of pectin with human faecal flora. *Carbohydr. Res.* **1998**, *314*, 237-244.

Dongowski, G., Lorenz, A. *et al.* Degradation of pectins with different degrees of esterification by *Bacteroides thetaiotaomicron* isolated from human gut flora. *Appl. Environ. Microb.* **2000**, *66*, 1321-1327.

Dongowski, G., Lorenz, A., Anger, H. The degree of methylation influences the degradation of pectin in the intestinal tract of rats and *in vitro*. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1935-1944.

Donovan, J. L., Crespy, V., Manach, C., Morand, C., Besson, C., Scalbert, A., Remesy, C. Catechin is metabolized by both the small intestine and the liver in rats. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 1753-1757.

Dryden, G. W., Jr., Deaciuc, I., Arteel, G., McClain, C. J. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2005**, *7*, 308-316.

Dryden, G. W., Song, M. *et al.* Polyphenols and gastrointestinal diseases. *Curr. Opin. Gastroen.* **2006**, *22*, 165-170.

Dupuis, G., Chambin, O., Genelot, C., Champion, D., Pourcelot, Y. Colonic drug delivery: Influence of cross-linking agent on pectin beads properties and role of the shell capsule type. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **2006**, *32*, 847-855.

Eisenbrand, G., Schreier, P. *et al.* (eds.) RÖMPP Lexikon Lebensmittelchemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, **2006**.

Es-Safi, N. E., Cheynier, V., Moutounet, M. I. Interactions between cyanidin 3-*O*-glucoside and furfural derivatives and their impact on food color changes. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5586-5595.

Evans, J. F., Ferguson, A. D., Mosley, R. T., Hutchinson, J. H. What's all the FLAP about?: 5-lipoxygenase-activating protein inhibitors for inflammatory diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 72-78.

Falany, C. N. Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J.* **1997**, *11*, 206-216.

Feng, Y., McDonald, C. E., Vick, B. A. C-glycosylflavones from hard red spring wheat bran. *Cereal. Chem.* **1988**, *65*, 452-456.

Feussner, I., Kuhn, H., Wasternack, C. Do specific linoleate 13-lipoxygenases initiate beta-oxidation? *FEBS Lett.* **1997**, *406*, 1-5.

Finkel, T. and Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **2000**, *408*, 239-247.

Ford-Hutchinson, A. W. Leukotrienes: their formation and role as inflammatory mediators. *Federation Proceedings* **1985**, *44*, 25-29.

Garssen, G. J., Boldingh, J., Vliegthart, J. F. Origin and structures of dimeric fatty-acids from anaerobic reaction between soybean lipoxygenase, linoleic acid and its hydroperoxide. *Biochem. J.* **1972**, *130*, 435-442.

Gee, J. M., Du Pont, M. S., Rhodes, M. J. C., Johnson, I. T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic. Biol. Medicinal Research Reviews* **1998**, *25*, 19-25.

Gillatt, P. N., Palmer, R. C., Smith, P. L., Walters, C. L., Reed, P. I. Susceptibilities of drugs to nitrosation under simulated gastric conditions. *Food Chem. Toxicol.* **1985**, *23*, 849-855.

Gillmor, S. A., Villasenor, A., Fletterick, R., Sigal, E., Browner, M. F. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nature Structural Biology* **1997**, *4*, 1003-1009.

Giusti, M. M., Rodriguez-Saona, L. E., Rodriguez-Saona, L. E., Wrolstad, R. E. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4631-4637.

Gorbach, S. L., Nahas, L., Weinstein, L., Levitan, R., Patterson, J. F. Studies of intestinal microflora. IV. The microflora of ileostomy effluent: a unique microbial ecology. *Gastroenterology* **1967**, *53*, 874-880.

Grechkin, A. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog. Lipid Res.* **1998**, *37*, 317-352.

Griffiths, L. A. and Smith, G. E. Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. Metabolite formation *in vivo* and by the intestinal microflora *in vitro*. *Biochem. Genet.* **1972**, *128*, 901-11.

Groenewoud, G. and Hundt, H. K. L. The microbial metabolism of condensed (+)-catechins by rat-cecal microflora. *Xenobiotica* **1986**, *16*, 99-107.

Grulich, C., Duvoisin, R. M., Wiedmann, M., van Leyen, K. Inhibition of 15-lipoxygenase leads to delayed organelle degradation in the reticulocyte. *FEBS Lett.* **2001**, *489*, 51-54.

Gulfi, M., Arrigoni, E., Amado, R. The chemical characteristics of apple pectin influence its fermentability *in vitro*. *Lwt-Food Sci. Technol.* **2006**, *39*, 1001-1004.

Guyot, S., Marnet, N., Laraba, D., Sanoner, P., Drilleau, J-F. Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* Var. Kermerrien). *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1698-1705.

Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., Riechel, T. L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 1887-1892.

Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* **1996**, *16*, 33-50.

Halliwell, B. Antioxidants: the basics-what they are and how to evaluate them. *Advances in Pharmacology (San Diego), (Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy)* **1997**, *38*, 3-20.

Harborne, J. B. (ed.) The flavonoids: Advances in research since 1986. Chapman & Hall, London, **1994**.

Harborne, J. B., Baxter, H. *et al.* (eds.) Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. Taylor & Francis, London, Second Edition, **1998**.

Harborne, J. B. and Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 481-504.

Hart, A. L., Stagg, A. J., Frame, M., Graffner, H., Glise, H., Falk, P., Kamm, M. A. Review article: the role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy. *Aliment. Pharm. Therap.* **2002**, *16*, 1383-1393.

Heller, A., Koch, T., Schmeck, J., van Ackern, K. Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs* **1998**, *55*, 487-496.

Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the netherlands. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2379-2383.

Hollman, P. C., de Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J., Katan, M. B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *62*, 1276-1282.

Hollman, P. C. H., vanTrijp, J. M. P., Buysman, M. N. C. P., VanderGaag, M. S., Mengelers, M. J. B., deVries, J. H. M., Katan, M. B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *Febs Lett.* **1997**, *418*, 152-156.

Hollman, P. C. H. and Arts, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agr.* **2000**, *80*, 1081-1093.

Honn, K. V., Tang, D. G., Gao, X., Butovich, I. A., Liu, B., Timar, J., Haggmann, W. 12-Lipoxygenases and 12(S)-HETE - Role in Cancer Metastasis. *Cancer Metast. Rev.* **1994**, *13*, 365-396.

Huemmer, W., Dietrich, H., Will, F., Schreier, P., Richling, E. Content and mean polymerization degree of procyanidins in extracts obtained from clear and cloudy apple juices. *Biotechnol. J.* **2008**, *3*, 234-243.

Ji, B. T., Chow, W. H., Hsing, A. W., McLaughlin, J. K., Dai, Q., Gao, Y. T., Blot, W. J., Fraumeni, J. F. Green tea consumption and the risk of pancreatic and colorectal cancers. *Int. J. Cancer* **1997**, *70*, 255-258.

Ju, J., Liu, Y., Hong, J., Huang, M. T., Conney, A. H., Yang, C. S. Effects of green tea and high-fat diet on arachidonic acid metabolism and aberrant crypt foci formation in an azoxymethane-induced colon carcinogenesis mouse model. *Nutr. Cancer* **2003**, *46*, 172-178.

Justesen, U., Arrigoni, E., Larsen, B. R., Amado, R. Degradation of flavonoid glycosides and aglycones during *in vitro* fermentation with human faecal flora. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **2000**, *33*, 424-430.

Kaehkoenen, M. P., Heinaemaeki, J., Ollilainen, V., Heinonen, M. Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. *J. Sci. Food Agr.* **2003**, *83*, 1403-1411.

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

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.

Kay, C. D. and Holub B. J. Anthocyanins and cancer prevention. In: *Nutrition and Cancer Prevention: New Insights into the Role of Phytochemicals (Advances in Experimental Medicine and Biology)*, American Institute for Cancer Research (ed.), Springer-Verlag, New York, **2006**, *492*, 411-432.

Kay, R. and Truswell, A. Effect of citrus pectin on blood lipids and fecal steroid excretion in man. *Am. J. Clin. Nutr.* **1977**, *30*, 171-175.

Keppler, K. and Humpf, H. U. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorgan. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5195-5205.

- Kepler, K., Hein, E. M., Humpf, H. U. Metabolism of quercetin and rutin by the pig caecal microflora prepared by freeze-preservation. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 686-695.
- King, H. G. C. Phenolic compounds of commercial wheat germ. *J. Food Sci.* **1962**, *27*, 446-454.
- Koch, A. L. *In: Methods for general and molecular bacteriology.* Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Woods, W. A., Krieg, N. R. (eds.), Washington DC, American Soc. Microbiology Publishers, **1994**.
- Kohen, R. and Nyska, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol. Pathol.* **2002**, *30*, 620-650.
- Kohri, T., Nanjo, F., Suzuki, M., Seto, R., Matsumoto, N., Yamakawa, M., Hojo, H., Hara, Y., Desai, D., Amin, S., Conaway, C. C., Chung, F. L. Synthesis of (-)-[4-<sup>3</sup>H]epigallocatechin gallate and its metabolic fate in rats after intravenous administration. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1042-1048.
- Krieg, P., Kinzig, A., Heidt, M., Marks, F., Furstenberger, G. cDNA cloning of a 8-lipoxygenase and a novel epidermis-type lipoxygenase from phorbol ester-treated mouse skin. *Bba-Lipid Lipid Met.* **1998**, *1391*, 7-12.
- Krishnaiah, Y. S. R., Seetha, D. A., Nageswara, R. L., Bhaskar, R. P. R., Karthikeyan, R. S., Satyanarayana, V. Guar gum as a carrier for colon specific delivery; influence of metronidazole and tinidazole on *in vitro* release of albendazole from guar gum matrix tablets. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **2001**, *4*, 235-243.
- Kudou, S., Fleury, Y., Welti, D., Magnolato, D., Uchida, T., Kitamura, K., Okubo, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* MERRILL). *Agric. Biol. Chem.* **1991**, *55*, 2227-2233.
- Kuehn, H., Heydeck, D., Hugou, I., Gniwotta, C. *In vivo* action of 15-lipoxygenase in early stages of human atherogenesis. *J. Clin. Invest.* **1997**, *99*, 888-893.
- Kuehnau, J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World. Rev. Nutr. Diet.* **1976**, *24*, 117-191.
- Kuhn Merrily, A. Oxygen free radicals and antioxidants. *Am. J. Nurs.* **2003**, *103*, 58-62.
- Labib, S. *Ex vivo*-Studien zum intestinalen Metabolismus von Flavonoiden. Dissertation, Universität Würzburg, **2006**.

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

Lakenbrink, C., Lapczynski, S., Maiwald, B., Engelhardt, U. H. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2848-2852.

Lambert, J. D., Rice, J. E., Hong, J. G., Hou, Z., Yang, C. S. Synthesis and biological activity of the tea catechin metabolites, M4 and M6 and their methoxy-derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 873-876.

Laube, B., Wiebel, F. J., Schwarz, L. R., Ladstetter, B. J. Neues *in-vitro*-Verfahren - Untersuchungen zum enterohepatischen Metabolismus von Fremdstoffen. *BIOforum* **2001**, *9*, 596-600.

Lebet, V., Arrigoni, E., Amado, R. Measurement of fermentation products and substrate disappearance during incubation of dietary fibre sources with human faecal flora. *Food Sci. Technol.-Leb.* **1998**, *31*, 473-479.

Lee, K.-M., Yeo, M., Choue, J.-S., Jin, J.-H., Park, S. J., Cheong, J.-Y., Lee, K. J., Kim, J.-H., Hahm, K.-B. Protective mechanism of epigallocatechin-3-gallate against *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial cytotoxicity via the blockage of TLR-4 signaling. *Helicobacter* **2004**, *9*, 632-642.

Li, Y., Maher, P., Schubert, D. A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron* **1997**, *19*, 453-463.

Lim, C., Ferguson, L., Tannock, G. Dietary fibers as "prebiotics": implications for colorectal cancer. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 609-619.

Lindinger, W., Taucher, J., Jordan, A., Hansel, A., Vogel, W. Endogenous production of methanol after the consumption of fruit. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **1997**, *21*, 939-943.

Loeb, H., Vandenplas, Y., Wursch, P., Guesry, P. Tannin-rich carob pod for the treatment of acute-onset diarrhea. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **1989**, *8*, 480-485.

Löffler, G. and Petrides, P. E. (eds.) Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag, Heidelberg, **1998**.

Loke, W. M., Proudfoot, J. M., Stewart, S., McKinley, A. J., Needs, P. W., Kroon, P. A., Hodgson, J. M., Croft, K. D. Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: Lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, *75*, 1045-1053.

- Lotito, S. B. and Frei, B. Dietary flavonoids attenuate tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. Structure-function relationships and activity after first pass metabolism. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 37102-37110.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A., Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *143*, 265-271.
- Ludwig, P., Holzhutter, H. G., Colosimo, A., Silvestrini, M. C., Schewe, T., Rapoport, S. M. A kinetic model for lipoxygenases based on experimental data with the lipoxygenase of reticulocytes. *Eur. J. Biochem.* **1987**, *168*, 325-337.
- Maccarrone, M., Veldink, G. A., Vliegenthart, J. F. G., Agro, A. F. Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by chain breaking antioxidants. *Lipids* **1995**, *30*, 51-54.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Billot, J. (eds.) Fruit phenolics. CRC Press, Boca Raton, **1990**.
- Manach, C., Morand, C., Texier, O., Favier, M.-L., Agullo, G., Demigne, C., Regeat, F., Remesy, C. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 1911-1922.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727-747.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Remesy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 230-242.
- Mancini, J. A., Abramovitz, M., Cox, M. E., Wong, E., Charleson, S., Perrier, H., Wang, Z. Y., Prasit, P., Vickers, P. J. 5-Lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding-protein. *FEBS Lett.* **1993**, *318*, 277-281.
- Markakis, P. Anthocyanins and their stability in foods. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* **1974**, *4*, 437-456.
- Marounek, M., Synytsya, A., Copikova, J., Sirotek, K. Assay of availability of amidated pectins for colon microorganisms. *Chemicke Listy* **2005**, *99*, 591-593.
- Marounek, M., Volek, Z., Synytsya, A., Copikova, J. Effect of pectin and amidated pectin on cholesterol homeostasis and cecal metabolism in rats fed a high-cholesterol diet. *Physiol. Res.* **2007**, *56*, 433-442.
- Mayatepek, E. and Hoffmann, G. F. Leukotrienes - Biosynthesis, metabolism, and pathophysiologic significance. *Pediatr. Res.* **1995**, *37*, 1-9.



Mazzon, E., Muia, C., Di Paola, R., Genovese, T., Menegazzi, M., De Sarro, A., Suzuki, H., Cuzzocrea, S. Green tea polyphenol extract attenuates colon injury induced by experimental colitis. *Free Radic. Res.* **2005**, *39*, 1017-1025.

McGhie, T. K. and Walton, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: towards a better understanding. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 702-713.

Meittinen, T. A. and Tarpila, S. Effect of pectin on serum cholesterol, fecal bile acids, and biliary lipids in normolipidemic and hyperlipidemic individuals. *Clin. Chim. Acta* **1977**, *79*, 471-477.

Merken, H. M. and Beecher, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 577-599.

Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52*, 673-751.

Minor, W., Steczko, J., Stec, B., Otwinowski, Z., Bolin, J. T., Walter, R., Axelrod, B. Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 angstrom resolution. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10687-10701.

Mira, L., Fernandez, M. T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M. H., Jennings, K. R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their anti-oxidant activity. *Free Radic. Res.* **2002**, *36*, 1199-1208.

Miyake, Y., Yamamoto, K., Osawa, T. Metabolism of antioxidant in lemon fruit (*Citrus limon* B-URM. f.) by human intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3738-3742.

Moon, Y. J., Wang, X., Morris, M. E. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in Vitro* **2006**, *20*, 187-210.

Morand, C., Manach, C., Crespy, V., Remesy, C. Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radic. Res.* **2000**, *33*, 667-676.

Mueller, K. 5-Lipoxygenase and 12-lipoxygenase: attractive targets for the development of novel antipsoriatic drugs. *Archiv der Pharmazie* **1994**, *327*, 3-19.

Mullen, W., Graf, B. A., Caldwell, S. T., Hartley, R. C., Duthie, G. G., Edwards, C. A., Lean, M. E. J., Crozier, A. Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-C-14]quercetin-4'-glucoside. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6902-6909.

- Narayan, M. S., Naidu, K. A., Ravishankar, G. A., Srinivas, L., Venkataraman, L. V. Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. *Prostag. Leukotr. Ess.* **1999**, *60*, 1-4.
- Noble, A., Baldassano, R., Mamula, P. Novel therapeutic options in the inflammatory bowel disease world. *Dig. Liv. Dis.* **2008**, *40*, 22-31.
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., Packer, L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 166-171.
- Odontuya, G., Hoult, J. R. S., Houghton, P. J. Structure-activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytother. Res.* **2005**, *19*, 782-786.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C. H., Buijsman, M. N. C. P., van Amelsvoort, J. M. M., Katan, M. B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 2692-2692.
- Ovaskainen, M. L., Torronen, R., Koponen, J. M., Sinkko, H., Hellstrom, J., Reinivuo, H., Mattila, P. Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 562-566.
- Oz, H. S., Chen, T. S., McClain, C.J., de Villiers, W.J. Antioxidants as novel therapy in a murine model of colitis. *J. Nutr. Biochem.* **2005**, *16*, 297-304.
- Paulsen, B. S. Biologically active polysaccharides as possible lead compounds. *Phytochem. Rev.* **2002**, *1*, 379-387.
- Pérez, S., Mazeau, K., Herve du Penhoat, C. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol. Biochem.* **2000**, *38*, 37-55.
- Pérez, S., Rodriguez-Carvajal, M. A., Doco, T. A complex plant cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* **2003**, *85*, 109-121.
- Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035-1042.
- Piomelli, D., Volterra, A., Dale, N., Siegelbaum, S. A., Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Belardetti, F. Lipoxygenase metabolites of arachidonic-acid as 2nd messengers for presynaptic inhibition of aplysia sensory cells. *Nature* **1987**, *328*, 8-43.
- Piskula, M. K. and 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.

- Piskula, M. K., Yamakoshi, J., Iwai, Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett.* **1999**, *447*, 287-291.
- Platzer, M., Ozegowski, J. H., Iwai, Y. Quantification of hyaluronan in pharmaceutical formulations using high performance capillary electrophoresis and the modified uronic acid carbazole reaction. *J. Pharmaceut. Biomed.* **1999**, *21*, 491-496.
- Plumb, G. W., de Pasqual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Cheynier, V., Williamson, G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effects of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Rad. Res.* **1998**, *29*, 351-358.
- Plumb, G. W., Garcia-Conesa, M. T., Kroon, P. A., Rhodes, M., Ridley, S., Williamson, G. Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. *J. Sci. Food Agr.* **1999**, *79*, 390-392.
- Provost, P., Samuelsson, B., Radmark, O. Interaction of 5-lipoxygenase with cellular proteins. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 1881-1885.
- Rahman, M. M., Ichianagi, T., Komiyama, T., Hatano, Y., Konishi, T. Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. *Free Rad. Res.* **2006**, *40*, 993-1002.
- Rapoport, S. M. and Schewe, T. The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. *Bba-Reviews on Biomembranes* **1986**, *864*, 471-95.
- Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, S. K. S., Moore, K. P., Rice-Evans, C. A. Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free. Radical Bio. Med.* **2004**, *36*, 212-225.
- Reinli, K. and Block, G. Phytoestrogen content of foods-a compendium of literature values. *Nutr. Cancer* **1996**, *26*, 123-48.
- Renaud, S. and Delorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the french paradox for coronary heart-disease. *Lancet* **1992**, *339*, 1523-1526.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., Pridham, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.* **1995**, *22*, 375-83.
- Rice-Evans, C., Miller, N. J., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free. Radical Bio. Med.* **1996**, *20*, 933-956.
- Rice-Evans, C. Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 797-807.

Richard-Forget, F., Gaillard, F., Hugues, M., Jean-Marc, T., Boivin, P., Nicolas, J. Inhibition of horse bean and germinated barley lipoxygenase by some phenolic compounds. *J. Food Sci.* **1995**, *60*, 1325-1329.

Rizzello, F., Campieri, M., Tambasco, R., Straforini, G., Brugnera, R., Poggioli, G., Gionchetti, P. Medical treatment and management of severe ulcerative colitis. *Dig. Liv. Dis.* **2008**, *40S*, S280-S284.

Robards, K., Prenzler, D. P., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **1999**, *66*, 401-436.

Roberfroid, M. B. E. Inulin-type fructans: functional food ingredients. CRC Press, Boca Raton, **2005**.

Roth, M. Lipoxygenase in der Biokatalyse. Dissertation, Würzburg, **1998**.

Saito, D., Nakaji, S., Fukuda, S., Shimoyama, T., Sakamoto, J., Sugawara, K. Comparison of the amount of pectin in the human terminal ileum with the amount of orally administered pectin. *Nutrition* **2005**, *21*, 914-919.

Saito, T., Miyake, M., Toba, M., Okamatsu, H., Shimizu, S., Noda, M. Inhibition by apple polyphenols of ADP-ribosyl-transferase activity of cholera toxin and toxin-induced fluid accumulation in mice. *Microbiol. Immunol.* **2002**, *46*, 249-255.

Santos-Buelga, C. and Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1094-1117.

Sartelet, H., Serghat, S., Lobstein, A., Ingenbleek, Y., Anton, R., Petitfrère, E., Aguié-Aguie, G., Martiny, L., Haye, B. Flavonoids extracted from Fonio millet (*Digitaria exilis*) reveal potent antithyroid properties. *Nutrition* **1996**, *12*, 100-106.

Satue-Gracia, M. T., Heinonen, M., Frankel, E. N. Anthocyanins as Antioxidants on Human Low-Density Lipoprotein and Lecithin-Liposome Systems. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3362-3367.

Savary, B. J. and Nunez A. Gas chromatography-mass spectrometry method for determining the methanol and acetic acid contents of pectin using headspace solid-phase microextraction and stable isotope dilution. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1017*, 151-159.

Scalbert, A. and Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073-2085.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci.* **2005**, *45*, 287-306.

Scheline, R. R. Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacol. Rev.* **1973**, *25*, 451-523.

Scheline, R. R. (ed.) CRC Handbook of mammalian metabolism of plant compounds. CRC Press, Boca Raton, **1991**.

Schewe, T. and Kuhn, H. Do 15-lipoxygenases have a common biological role. *Trends Biochem. Sci.* **1991**, *16*, 369-373.

Schewe, T., Kuhn, H., Sies, H. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1825-1829.

Schneider, H., Schwiertz, A., Collins, M. D., Blaut, M. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Arch. Microbiol.* **1999**, *171*, 81-91.

Schneider, H., Simmering, R., Hartmann, L., Pforte, H., Blaut, M. Degradation of quercetin-3-glucoside in genotobiotic rats associated with human intestinal bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *89*, 1027-1037.

Schneider, I. and Bucar, F. Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 1: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase[cyclooxygenase]. *Phytother. Res.* **2005**, *19*, 81-102.

Schürmann, G. and Bauchredner, F. Stoma bei Crohn und Colitis. *DCCV-Journal* **2001**, *1*, 12-18.

Setty, B. N. Y., Graeber, J. E., Stuart, M. J. The mitogenic effect of 15-hydroxyeicosatetraenoic and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid on endothelial-cells may be mediated via diacylglycerol kinase inhibition. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17613-17622.

Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., Barnes, S. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.* **1997**, *127*, 1260-1268.

Shahidi, F. and Naczk, M. Food phenolics, sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Co Inc., Lancaster **1995**.

Sies, H. Oxidative stress - from basic research to clinical-application. *Am. J. Med.* **1991**, *91*, 31-38.

Siess, M. H., Mas, J. P., CanivencLavier, M. C., Suschetet, M. Time course of induction of rat hepatic drug-metabolizing enzyme activities following dietary administration of flavonoids. *J. Toxicol. Env. Health* **1996**, *49*, 481-496.

Singh, B., Bhat, T. K., Singh, B. Potential therapeutic applications of some anti-nutritional plant secondary metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5579-5597.

- Siragusa, R. J., Cerda, J. J., Baig, M. M., Burgin, C. W., Robbins, F. L. Methanol production from the degradation of pectin by human colonic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **1988**, *47*, 848-851.
- Skrzypczak-Jankun, E., Amzel, L. M., Kroa, B. A., Funk, M. O., Jr. Structure of soybean lipoxygenase L3 and a comparison with its L1 isoenzyme. *Proteins* **1997**, *29*, 15-31.
- Slimestad, R. and Solheim, H. Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum L.*). *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3228-3231.
- Soczynska-Kordala, M., Bakowska, A., Oszmianski, J., Gabrielska, J. Metal ion-flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2001**, *6*, 277-281.
- Spector, A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *FASEB J.* **1995**, *9*, 1173-1182.
- Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E.S., Srail, S.K., Rice-Evans, C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 224-230.
- Steinhilber, D. 5-Lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity. *Pharm. Act. Helv.* **1994**, *69*, 3-14.
- Suganuma, M., Okabe, S., Oniyama, M., Tada, Y., Ito, H., Fujiki, H. Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis* **1998**, *19*, 1771-1776.
- Sun, D., Elsea, S. H., Patel, P. I., Funk, C. D. Cloning of a human "epidermal-type" 12-lipoxygenase-related gene and chromosomal localization to 17p13. *Cytogenet. Cell. Genet.* **1998**, *81*, 79-82.
- Tang, D. G., Chen, Y. Q., Honn, K. V. Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 5241-5246.
- Terra X, Valls, J., Vitrac, X., Mérrillon, J.-M., Arola, L., Ardèvol, A., Bladé, C., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, J., Blay, M. Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFκB signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4357-4365.
- Terra X, Montagut, G., Bustos, M., Llopiz, N., Ardèvol, A., Bladé, C., Fernández-Larrea, J., Pujadas, G., Salvadó, J., Arola, L., Blay, M. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, [Epub ahead of print].

Tilgmann, C. and Ulmanen, I. Purification methods of mammalian catechol-*O*-methyltransferases. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* **1996**, *684*, 147-161.

Tomas-Barberan, F. A. and Clifford, M. N. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives and their possible role in health protection. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1024-1032.

Tomas-Barberan, F. A. and Clifford, M. N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1073-1080.

Ueno, I., Nakano, N., Hirono, I. Metabolic fate of [<sup>14</sup>C]quercetin in the ACI rat. *Jpn. J. Exp. Med.* **1983**, *53*, 41-50.

USDA. USDA Database for the flavonoid content of selected foods. **2003**.

van Acker, S. A. B. E., van den Berg, D.-J., Tromp, Michel N. J. L., Griffioen, D. H., van Bennekom, W. P., van der Vijgh, W. J. F., Bast, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free. Radical Bio. Med.* **1996**, *20*, 331-342.

van Os, C. P., Rijke-Schilder, G. P., Vliegthart, J. F. 9-LR-linoleyl hydroperoxide, a novel product from the oxygenation of linoleic acid by type-2 lipoxygenases from soybeans and peas. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *575*, 479-84.

Vanderhoek, J. Y. Role of the 15-lipoxygenase in the immune-system. *Ann. Ny. Acad. Sci.* **1988**, *524*, 240-251.

Verhagen, J., Bouman, A. A., Vliegthart, J. F. G., Boldingh, J. Conversion of 9-D-hydroperoxylinoleic and 13-L-hydroperoxylinoleic acids by soybean lipoxygenase-1 under anaerobic conditions. *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, *486*, 114-120.

Vitrac, X., Desmouliere, A., Brouillaud, B., Krisa, S., Deffieux, G., Barthe, N., Rosenbaum, J., Merillon, J. M. Distribution of [<sup>14</sup>C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.* **2003**, *72*, 2219-2233.

Walle, T., Browning, 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.

Walle, T., Otake, Y., Walle, U. K., Wilson, F. A. Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2658-2661.

Watzl, B., Briviba, K., Rechkemmer, G. Anthocyane. *Ernaehrungs-Umschau* **2002a**, *49*, 148-150.

Watzl, B. and C. Leitzmann (eds.). Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, **1995**.

Wenzel, E. and Somoza, V. Metabolism and bioavailability of *trans*-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 472-481.

Werz, O. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta Med.* **2007**, *73*, 1331-1357.

Williamson, G., Day, A. J., Plumb, G. W., Couteau, D. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem. Soc. T.* **2000**, *28*, 16-22.

Wolever, T. M., Brighenti, F., Royall, D., Jenkins, A. L., Jenkins, D. J. Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subjects. *Am. J. Gastroenterol.* **1989**, *84*, 1027-1033.

Wong, J. M. W., de Souza, R., Kendall, C. W. C., Emam, A., Jenkins, D. J. A. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* **2006**, *40*, 235-243.

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.

Wu, X. and Prior, R. L. Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the united states: vegetables, nuts, and grain. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3101-3113.

Yamamoto, S., Suzuki, H., Ueda, N. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prog. Lipid. Res.* **1997**, *36*, 23-41.

Yang, F., Oz, H. S., Barve, S., De Villiers, W. J. S., McClain, C. J., Varilek, G. W. The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate blocks nuclear factor- $\kappa$ B activation by inhibiting I $\kappa$ B kinase activity in the intestinal epithelial cell line IEC-6. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *60*, 528-533.

Youdim, K. A., Martin, A., Joseph, J. A. Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 51-60.

Youn, B., Sellhorn, G. E., Mirchel, R. J., Gaffney, B. J., Grimes, H. D., Kang, C. Crystal structures of vegetative soybean lipoxygenase VLX-B and VLX-D, and comparisons with seed Isoforms LOX-1 and LOX-3. *Proteins* **2006**, *65*, 1008-1020.



---

Young Graeme, P., Hu, Y., Le Leu R. K., Nyskohus, L. Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment-gene interactions. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 571-584.

Yu, K., Bayona, W., Kallen, C. B., Harding, H. P., Ravera, C. P., McMahon, G., Brown, M., Lazar, M. A. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23975-23983.



## Erklärung I

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

**„*In vitro*- und *ex vivo*- Studien zum humanen intestinalen Metabolismus und zu Lipoxygenase-hemmenden Eigenschaften ausgewählter sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe“**

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

Würzburg, den 19. September 2008

---

Unterschrift  
(Bastian Knaup)



## Erklärung II

Hiermit erkläre ich, dass ich in meiner Doktorarbeit

**„*In vitro*- und *ex vivo*- Studien zum humanen intestinalen Metabolismus und zu Lipxygenase-hemmenden Eigenschaften ausgewählter sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe“**

bei Abbildungen aus Journalen das Copyright von den Verlagen bzw. vom Autor eingeholt habe. Bei Abbildungen aus dem Internet habe ich den entsprechenden Link angegeben.

Würzburg, den 19. September 2008

---

Unterschrift  
(Bastian Knaup)