

Analyse potentiell chemopräventiv wirksamer Inhaltsstoffe von Apfelsaft

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

vorgelegt von
Wolfgang Hümmer
aus Wipfeld

Würzburg 2009

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:

Meinen Eltern

Loblied auf den Apfel

(unbekannter Autor)

Eines musst du dir gut merken:
Wenn du schwach bist: Äpfel stärken!
Äpfel sind die beste Speise
Für zu Hause, auf der Reise,
Für die Alten, für die Kinder,
Für den Sommer, für den Winter,
Für den Morgen, für den Abend.
Äpfel essen ist stets labend!
Äpfel glätten dir die Stirn,
Bringen Phosphor ins Gehirn.
Äpfel geben Kraft und Mut
Und erneuern dir das Blut.
Auch von Most, sofern du durstig,
Wirst du fröhlich, wirst du lustig.
Drum, mein Freund, so lass dir raten:
Esse frisch, gekocht, gebraten
Täglich ihrer fünf bis zehn:
Wirst nicht dick, bleibst jung und schön
Und kriegst Nerven wie ein Strick.
Mensch, im Apfel liegt dein Glück!

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand von Januar 2005 bis Juni 2008 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Prof. Dr. Peter Schreier, dem ich nicht nur für das überlassene Thema, sondern auch für das entgegengebrachte Vertrauen, den wissenschaftlichen Freiraum sowie die wertvollen Hilfestellungen danke.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des NutritionNet.

Weiterhin danke ich JP Dr. Elke Richling für ihre stets konstruktiven Anmerkungen und Ideen; Dir, liebe Elke, vor allem Danke, dass du Dir auch in stressigen Zeiten immer Zeit für Diskussionen genommen hast.

Bei Dr. Clarissa Gerhäuser und Karin Klimo möchte ich mich für die Durchführung der Testassays und die richtungsweisenden Ideen zur aktivitätsgeleiteten Fraktionierung bedanken. Auch für die Versorgung mit aktueller Literatur nochmals vielen Dank.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof Dr. Doris Marko, Diana Fridrich und Matthias Roth für die Durchführung der EGF-Rezeptor Assay-Studien bedanken.

Prof. Dr. Helmuth Dietrich, Dr. Frank Will und Melanie Olk von der Forschungsanstalt Geisenheim sei für die Bereitstellung der Extrakte und weiterer Materialien, sowie für die Durchführung der Zuckermanalytik der Fraktionen herzlich gedankt.

Ein großes Dankeschön geht an Maria Fischer, Andrea Dreiseitel, Melanie Engelhaupt, Christian Daniel (Jack) Köhler, Christina Schnell, Silke Schimanski und Julian Friedrich, die mich im Rahmen Ihres Forschungspraktikums tatkräftig unterstützt haben.

Dr. Radim Vičík danke ich für die Aufnahme von NMR-Spektren und für die Hilfe bei deren Auswertung, sowie die Einweisung am Gerät, auch wenn es nie zum NMR-Führerschein gekommen ist.

Ein großer Dank geht an Dr. Grüne für die großzügige NMR-Messzeit und die Unterstützung bei der Strukturaufklärung des Phloretin-diglucosids.

Andrea Dreiseitel möchte ich für die Durchsicht des Manuskriptes, den kritischen und konstruktiven Blick von außen und die stete Unterstützung danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an Michael Kempf für die tatkräftige Unterstützung bei „flüchtigen“ Problemen. Lieber Michael, entschuldige die penetranten Weichmacher an der „neuen“ GC-MS.

Michael Kraus möchte ich für die Einweisung an der LC-MS danken, auch wenn ich nie gedacht hätte mal so tief in dem Gerät zu stecken. Hierbei möchte ich mich auch bei Andreas Reiners von Thermo electron für die stets freundliche und kompetente Unterstützung bei allen Reparaturen bedanken, ohne die die Maschine schon lange nicht mehr funktionieren würde.

Kathrin Kahle möchte ich für die stets hilfreichen Diskussionen und Ideen, die Korrektur des Manuskripts und die gute Freundschaft danken

Dr. Anagnostis (Noti) Valotis danke ich für die Unterstützung im Bereich der statistischen Auswertung.

Allen Kollegen, Doktorandinnen und Doktoranden sowie den Laborantinnen danke ich für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit, die stets angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die jederzeit entgegengebrachte Hilfsbereitschaft. Ein besonderer Dank gilt hier Sandra Elß, Christina Preston, Michael Kempf und Matthias Ackermann für die entstandene Freundschaft.

Allen KorrekturleserInnen dieser Arbeit danke ich für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts und die konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Publikationen

Veröffentlichungen

Preston, Christina; Richling, Elke; Kahle, Kathrin; Kraus, Michael; **Hümmer, Wolfgang**; Appel, Markus; Heckel, Frank; Schreier, Peter. Ester Synthesis: Authenticity assessment by stable isotope analysis. State-of-the-Art in Flavour Chemistry and Biology; Proceedings of the 7th Wartburg Symposium (Editor: Hofmann, Thomas; Rothe, Manfred; Schieberle, Peter), deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie, Garching, **2004**, 358-362.

Richling, Elke; Appel, Markus; Heckel, Frank; Kahle, Kathrin; Kraus, Michael; Preston, Christina; **Huemmer, Wolfgang**; Schreier, Peter. Flavor authenticity studies by isotope ratio mass spectrometry: perspectives and limits. ACS Symp. Ser. 952, Oxford University Press, Oxford, **2007**, 75-86.

Kathrin Kahle, **Wolfgang Huemmer**, Michael Kempf, Wolfgang Scheppach, Elke Richling. Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 10605-10614.

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.

Henriette Zessner, Lydia Pan, Frank Will, Karin Klimo, Jutta Knauff, Regina Niewöhner, **Wolfgang Hümmer**, Robert Owen, Elke Richling, Norbert Frank, Peter, Schreier, Hans Becker, Clarissa Gerhauser. Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify cancer chemopreventive potential of constituents. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, 52, S28-S44.

Huemmer, W. Schreier, P. Analysis of Procyanthocyanidins. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, 52, 1381-1398.

Gerhauser, C.; Klimo, K.; **Huemmer, W.**; Hölzer, J.; Petermann, A.; Böhmer, F.D.; Schreier, P. Identification of 3-hydroxy- β -damascone and related carotenoid-derived aroma compounds as novel potent inducers of Nrf2-mediated Phase 2 response with concomitant anti-inflammatory activity. *Mol. Nutr. Food Res.* Angenommen.

Posterbeiträge

Hümmer, W.; Klimo, K.; Fischer, M.; Dreiseitel, A.; Gerhäuser, C.; Will, F.; Dietrich, H.; Schreier, P.; Richling, E. Activity-guided fractionation of chemopreventive apple polyphenols. Symposium Nutintest 2007.

Kahle, K., **Huemmer, W.**, Knaup, B., Erk, T., Scheppach, W., Schreier, P., Richling, E., Intestinal metabolism of apple polyphenols – a study with ileostomy subjects. ICPH2007 – 3rd International Conference on Polyphenols and Health.

Hümmer, W., Dietrich, H., Will, F., Schreier, P., Richling, E. Procyanidingehalt von Extrakten aus klaren und trüben Apfelsäften. 37. Deutscher Lebensmittelchemiker Tag in Kaiserslautern. 8-10. September 2008.

Vortrag

Hümmer, W. Activity-guided fractionation of chemopreventive apple polyphenols. Vortrag im Rahmen der Sitzung des Arbeitskreises Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Bundesverband der Deutschen Süßwarenindustrie e.V. (BDSI) am 12.06.2007

Abkürzungsverzeichnis:

AE	Apfelsaftextrakt
AS	Apfelsaft
ATP	Adenosintriphosphat
br	breites Multiplett
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Caco-2	humane Kolonkrebszelllinie
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Konzentration, die zur Verdopplung der spezifischen Aktivität nötig ist
CEC	3-Cyano-7-Ethoxycoumarin
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P450
d	Duplett
d _f	Filmdicke der Trennphasen von Kapillartrennsäulen
δ	chemische Verschiebung delta
DAD	Dioden-Array-Detektor
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP _m	mittlerer Polymerisationsgrad (<i>mean degree of polymerization</i>)
DPPH	2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl-Radikal
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EI	Elektronenstoßionisierung
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
evtl.	eventuell
eV	Elektronenvolt
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FG	Frischgewicht
GABA	γ-Aminobuttersäure
GC	Gaschromatographie

h	Stunde(n)
HT29	humane Kolonkrebszelllinie
Hz	Hertz
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
I.D.	Innendurchmesser
i. d. R.	in der Regel
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	Kopplungskonstante
KHK	koronare Herzerkrankungen
λ	Wellenlänge
LDL	low-density lipoprotein
LOX	Lipoxygenase
m	Multipllett (bei NMR)
MALDI-TOF-MS	matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight Massenspektrometrie
MAPK	Mitogen-aktivierter Proteinkinase
MG	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
[M-H] ⁻	deprotoniertes Molekülion
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NMR	magnetische Kernresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NP-HPLC	Normalphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>Normal Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>)
o. ä.	oder ähnliche
OD	optische Dichte
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
p. a.	pro analysis
PAC	Proanthocyanidine
PC	Procyanidine
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

PPO	Polyphenoloxidase
psi	Druckeinheit; 100 psi = 5170 Torr
PTK	Protein-Tyrosinkinase
QR	Chinonreduktase
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (<i>Reversed Phase-High performance Liquid Chromatography</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SC ₅₀	halbmaximale Radikalfängeraktivität
SC	Säulenchromatographie
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)
SPS	sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe
t	Triplet (bei NMR)
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidative Capacity
TG	Trockengewicht
TPC	Gesamtprocyanidingehalt (<i>Total Procyanidin Content</i>)
u	atomare Masseneinheit (<i>unified mass unit</i>)
U	Unit (mmol/mg Protein)
u. a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UV	ultravioletter Spektralbereich
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
z. B.	zum Beispiel
X/XO	Xanthin/Xanthinoxidase
XTT	Sodium-2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VI
Summary	X
1 Einleitung.....	1
2 Kenntnisstand.....	4
2.1 Apfel und Apfelsaft	4
2.1.1 Der Apfel	4
2.1.2 Der Apfelsaft.....	6
2.1.2.1 Herstellung von Apfelsaft.....	6
2.1.2.2 Wirtschaftliche Bedeutung	10
2.2 Polyphenole	11
2.2.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.....	11
2.2.2 Chemie und Vorkommen von Polyphenolen.....	12
2.2.2.1 Phenolcarbonsäuren	12
2.2.2.2 Flavonoide	15
2.2.2.3 Lignane und Stilbene	22
2.2.3 Biosynthese von Polyphenolen.....	24
2.2.4 Funktion der Polyphenole in Pflanzen.....	26
2.2.5 Ernährungsphysiologische Bedeutung von Polyphenolen.....	27
2.2.5.1 Antioxidative Eigenschaften.....	29
2.2.5.2 Herz-Kreislauf-Erkrankungen	32
2.2.5.3 Schutz vor Krebserkrankungen.....	35
2.2.5.4 Weitere biologische Effekte.....	39
2.2.6 Toxizität von Polyphenolen.....	41
2.2.7 Apfel-Polyphenole.....	45
2.2.7.1 Frucht.....	45
2.2.7.2 Saft.....	47
3 Ergebnisse und Diskussion.....	49
3.1 Analytik von Apfelsäften und daraus gewonnenen Extrakten	49
3.1.1 Polyphenol- und Procyanidingehalt.....	49
3.1.1.1 Apfelsäfte.....	49

3.1.1.2	Apfelsaftextrakte	58
3.1.2	Nicht-phenolische Substanzen	64
3.1.2.1	Apfelsäfte	65
3.1.2.2	Apfelsaftextrakte	67
3.2	Fraktionierung von Apfelsaftextrakten	69
3.2.1	Apfelsaftextrakt AE04.....	70
3.2.1.1	Fraktionierung an Sephadex LH-20 und Subfraktionierung	70
3.2.1.1.1	Fraktionierung und Analytik der Sephadex-Fraktionen.....	71
3.2.1.1.2	Subfraktionierung der Sephadexfraktion S.2 an Kieselgel	73
3.2.1.1.3	Subfraktionierung der Sephadexfraktion S.5 an C18-Material.....	75
3.2.1.2	Fraktionierung an Kieselgel	76
3.2.2	Apfelsaftextrakt AE06.....	79
3.2.2.1	Fraktionierung an Sephadex LH-20	80
3.3	Strukturaufklärung der Phloretin- und 3-Hydroxyphloretinglycoside.....	82
3.3.1.1	Phloretin-2'-xyloglucosid.....	82
3.3.1.2	Phloretin-2',4'-diglucosid	83
3.3.1.3	3-Hydroxyphloretin.....	84
3.3.1.4	3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid	85
3.3.1.5	3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid	87
3.4	Einfluss von Apfelsaftextrakten sowie von isolierten Apfelpolyphenolen auf den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR).....	88
3.4.1	Apfelsaftextrakt AE04.....	90
3.4.1.1	Fraktionen S.1 – S.9 sowie deren Subfraktionen	90
3.4.1.2	Fraktionen NP.1 – NP.5	93
3.4.2	Apfelsaftextrakt AE06.....	95
3.4.3	Phloretin- und 3-Hydroxyphloretinglycoside.....	97
3.5	Prüfung auf potentielle chemopräventive Aktivität	98
3.5.1	Modulation des Fremdstoffmetabolismus	98
3.5.1.1	Apfelsaftextrakt AE04.....	101
3.5.1.1.1	Fraktionen S.1 – S.9 sowie deren Subfraktionen	101
3.5.1.1.2	Fraktionen NP.1 – NP.5	102
3.5.1.2	Apfelsaftextrakt AE06.....	103
3.5.1.3	Reinsubstanzen.....	104
3.5.2	Antioxidative Eigenschaften	105

3.5.2.1	Apfelsaftextrakt AE04	108
3.5.2.1.1	Fraktionen S.1 – S.9 sowie deren Subfraktionen	108
3.5.2.1.2	Fraktionen NP.1 – NP.5	110
3.5.2.2	Apfelsaftextrakt AE06	112
3.5.2.3	Reinsubstanzen	112
3.5.3	Antiinflammatorische und antihormonelle Wirkungen	114
3.5.3.1	Apfelsaftextrakt AE04	116
3.5.3.1.1	Fraktionen S.1 – S.9 und dessen Subfraktionen	116
3.5.3.1.2	Fraktionen NP.1 – NP.5	117
3.5.3.2	Apfelsaftextrakt AE06	118
3.5.3.3	Reinsubstanzen	119
4	Material und Methoden.....	121
4.1	Material	121
4.1.1	Chemikalien	121
4.1.2	Verbrauchsmaterial	121
4.1.3	Säulenchromatographie	121
4.1.3.1	Normalphasen-Säulenchromatographie (NP-SC).....	121
4.1.3.2	Umkehrphasen-Säulenchromatographie (RP-SC)	122
4.1.4	Dünnschichtchromatographie	122
4.2	Geräte	122
4.2.1	Größenausschlusschromatographie	122
4.2.2	Hochleistungsflüssigchromatographie-Diodenarray-Detektion (HPLC-DAD).....	122
4.2.3	Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS).....	124
4.2.4	Präparative Hochleistungsflüssigchromatographie.....	125
4.2.5	Kapillargaschromatographie (HRGC)	127
4.2.6	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	128
4.2.7	Sonstige Geräte	129
4.3	Methoden	129
4.3.1	Apfelsäfte.....	129
4.3.1.1	AS05 (klar und trüb)	129
4.3.1.2	AS06 (klar und trüb)	130
4.3.1.3	AS07 (klar und trüb)	130

4.3.1.4	Kommerzieller Apfelsaft.....	131
4.3.2	Herstellung Polyphenolreiche Apfelsaftextrakte	131
4.3.2.1	AE02.....	131
4.3.2.2	AE03B aus Tresterextraktionssaft.....	132
4.3.2.3	AE04.....	133
4.3.2.4	AE05.....	133
4.3.2.5	AE06.....	134
4.3.2.6	AE07.....	134
4.3.2.7	Sortenreine Extrakte	134
4.3.3	Analytik.....	135
4.3.3.1	Probenvorbereitung für die HPLC	135
4.3.3.2	Probenvorbereitung GC-MS	135
4.3.3.2.1	Höhsiedende Substanzen.....	135
4.3.3.2.2	Di-(2-ethylhexyl)-phthalat in Apfelsäften.....	135
4.3.3.2.3	Triterpenanalytik von Fraktion S.2.6	136
4.3.3.3	Analytik der Polyphenole in Apfelsäften und Apfelextrakten	137
4.3.3.3.1	Kalibriergeraden.....	137
4.3.3.3.2	Identifizierung und Quantifizierung.....	137
4.3.3.4	Analytik nicht-phenolischer Substanzen in Apfelsäften und Apfelsaftextrakten	138
4.3.3.5	Bestimmung des Gesamtprocyanidingehaltes (TPC).....	138
4.3.3.6	Bestimmung des mittleren Polymerisationsgrades (DPm).....	139
4.3.4	Fraktionierung	139
4.3.4.1	Fraktionierung an Sephadex LH-20	139
4.3.4.2	Fraktionierung von AE04 an Kieselgel	140
4.3.4.3	Fraktionierung der Sephadexfraktion S.5 an C18-Material	140
4.3.4.4	Fraktionierung der Sephadexfraktion S.2 an Kieselgel.....	141
4.3.5	Isolierung.....	141
4.3.5.1	Dihydrochalkone	141
4.3.5.1.1	Phloretin-2',4'-diglucosid	141
4.3.5.1.2	Phloretin-2'-xyloglucosid.....	142
4.3.5.2	Flavonole.....	142
4.3.5.2.1	Quercetin	142
4.3.5.2.2	Quercetin-3-O-glucosid.....	143
4.3.5.2.3	Quercetin-3-O-galactosid	143

4.3.6	Synthesen.....	144
4.3.6.1	3-Hydroxy-2-pyron.....	144
4.3.6.2	3-Hydroxyphloretinglycoside.....	144
4.3.7	Biologische Testsysteme.....	145
4.3.7.1	Bestimmung der Proteintyrosinkinase (PTK)-Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR).....	145
4.3.7.1.1	Kultivierung der Zellen.....	145
4.3.7.1.2	Isolierung und Aufreinigung des EGF Rezeptors.....	146
4.3.7.1.3	Beschichten von Mikrotiterplatten mit Substrat.....	148
4.3.7.1.4	Testung der einzelnen EGFR-Fraktionen auf ihre PTK-Aktivität.....	148
4.3.7.1.5	Aktivitätsuntersuchungen der EGFR-assoziierten Proteintyrosinkinaseaktivität (ELISA).....	148
4.3.7.2	Hemmung der Cytochrom P450 1A-Aktivität.....	150
4.3.7.3	Induktion der NAD(P)H:Chinonreduktase (QR).....	151
4.3.7.4	Abfangen von 1,1-Diphenyl-2-pikrylhydrazyl Radikalen.....	152
4.3.7.5	Abfangen von Superoxidanion-Radikalen gebildet durch Hypoxanthin/Xanthinoxidase.....	153
4.3.7.6	Messung der "Oxygen (Peroxyl) Radical Absorbance Capacity".....	154
4.3.7.7	Hemmung der Aromatase (Cytochrom P450 19).....	154
4.3.7.8	Hemmung der Cyclooxygenase-1-Aktivität.....	155
5	Literatur.....	157
6	Strukturmatrix.....	175
7	Anhang.....	179

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, unbekannte (Minor)-Komponenten aus Apfelsaft zu identifizieren und deren Beitrag zur chemopräventiven Wirkung des Saftes zu bestimmen. Deren Motivation war begründet, dass bisher identifizierte niedermolekulare phenolische Verbindungen als Mischung nicht das gleiche chemopräventive Potential wie ein polyphenolangereicherter Apfelsaftextrakt aufgewiesen hatten.

Zunächst wurden sieben Apfelsäfte verschiedener Erntejahre sowie 14 polyphenolangereicherte Saftextrakte, welche durch Festphasenextraktion an XAD, SP70 und P-495 Adsorberharzen hergestellt worden waren, auf ihre stoffliche Zusammensetzung hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Polyphenolzusammensetzung der Apfelsäfte und -extrakte sowohl zwischen verschiedenen Produktionsjahren als auch abhängig von der verwendeten Produktionstechnologie stark variierte. Insbesondere der durch enzymatische Tresterverflüssigung erhaltene Saftextrakt (AE03B) wies eine deutliche Anreicherung an Quercetin- und Phloretin glycosiden sowie eine Abreicherung an phenolischen Säuren auf. Die Klärung von trüben Säften hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung niedermolekularer Flavonoide. Tendenziell waren die Extrakte der trüben Säfte leicht an Phloretin glycosiden abgereichert. Im Gegensatz dazu wurde eine leichte Anreicherung der phenolischen Säuren in den untersuchten klaren Säften im Vergleich zu den trüben festgestellt.

Der Gehalt hochmolekularer Procyanidine variierte in den untersuchten Säften und Saftextrakten produktions- und sortenbedingt ebenfalls stark. An klaren und trüben Säften einer Charge wurde eine signifikante Abnahme sowohl des Gehaltes als auch des mittleren Polymerisationsgrades durch den Klärungsprozess nachgewiesen. Ferner zeigten Reiffruchtsäfte aus Mostapfelsorten höhere Gehalte und mittlere Polymerisationsgrade als verschnittene Apfelsäfte mit einem Anteil an Tafeläpfeln.

Als nicht phenolische Bestandteile wurden in den Säften und Saftextrakten (*R*)-Oktan-1,3-diol, (*R*)-5-(*Z*)-Oktan-1,3-diol, 3-Hydroxy-2-pyron und 3-Hydroxy- β -damascon detektiert. Deren Gesamtgehalt lag zwischen 30,7 und 150,5 mg/kg in den Säften und zwischen 11,9 und 166,5 mg/g in den Saftextrakten. Die dominierende Verbindung war (*R*)-Oktan-1,3-diol mit einem Gehalt bis zu 97,2 mg/kg in den Säften und bis zu 113,7 mg/g in den Saftextrakten.

Zwei ausgewählte Saftextrakte aus den Jahren 2004 und 2006 wurden unter Zuhilfenahme unterschiedlicher präparativer Trennmethode fraktioniert. Die mittels Sephadex LH-20 erhaltenen Fraktionen zeigten mit Ausnahme der Procyanidine eine gute Auftrennung der Apfelpolyphenole. Hierbei eluierten neben polymeren Kohlenhydraten zuerst unbekannte phenolische Verbindungen. Es folgten die phenolischen Säuren und Dihydrochalkone vor den niedermolekularen Flavan-3-olen und Quercetinglycosiden. Später eluierende Fraktionen bestanden ausschließlich aus polymeren Procyanidinen. Die nichtphenolischen Inhaltsstoffe waren in einer früh eluierenden Fraktion aufkonzentrierbar.

Die polymeren Procyanidine wurden durch Fraktionierung an Kieselgel von den niedermolekularen phenolischen Inhaltsstoffen der Saftextrakte abgetrennt. Aufgrund der hohen Affinität der Procyanidine zur stationären Phase waren jedoch hohe Verluste von nahezu 50% sowie eine Abnahme an hochpolymeren Procyanidinen zu beobachten.

Im weiteren Verlauf der Auftrennung wurden durch präparative Isolierung Quercetin, Quercetin-3-*O*-glucosid, Quercetin-3-*O*-galactosid, 3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid, 3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid, Phloretin-2'-xyloglucosid und Phloretin-2',4'-diglucosid erhalten.

Um ausreichend Reinsubstanz für nachfolgende Aktivitätsstudien zur Verfügung zu haben, wurden 3-Hydroxyphloretin, 3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid, 3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid und 3-Hydroxypyron enzymatisch bzw. chemisch in größeren Mengen synthetisiert.

Die erhaltenen Subfraktionen und Reinstoffe wurden *in vitro* auf ihre Hemmwirkung der Proteintyrosinkinase (PTK) des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) untersucht, welcher in Krebszellen überexprimiert wird und somit einen Beitrag zum unkontrollierten Wachstum leistet. Darüber hinaus wurden die antioxidativen (DPPH, ORAC, X/XO), die antiinflammatorischen und antihormonellen (COX-1, CYP19) Eigenschaften sowie die Fähigkeit zur Modulation des Fremdstoffmetabolismus (CYP1A, QR) überprüft.

Die Procyanidine des Apfels erwiesen sich in Abhängigkeit ihres Polymerisationsgrades als starke Inhibitoren der PTK des EGFR. So zeigten ausschließlich hochpolymere Procyanidine enthaltende Fraktionen (NP.4 und NP.5) eine deutlich stärkere Hemmung als

Fractionen, die nur aus niedermolekularen phenolischen Verbindungen zusammengesetzt waren (NP.1-NP.2; Abbildung 0.1).

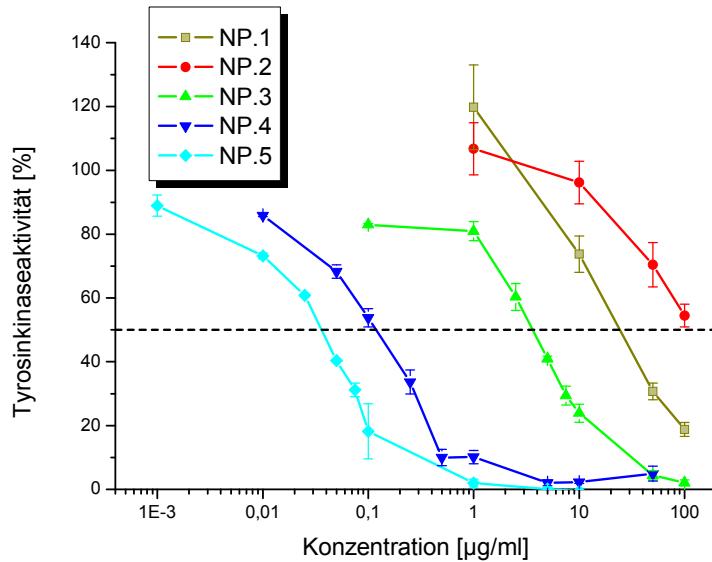


Abbildung 0.1 Hemmung der Proteintyrosinkinase-Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors nach Inkubation mit den AE04 Fraktionen NP.1 bis NP.5; MW \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten

Auf die Enzyme Cytochrom P450 1A und Aromatase (CYP19) hatten die Procyanidine ebenfalls einen entscheidenden Einfluss. Die antioxidativen Eigenschaften der Apfelsaftextrakte waren sowohl vom Gehalt polymerer Procyanidine als auch von dem niedermolekularen Polyphenole abhängig. Die für die Apfelsaftextrakte nachgewiesenen Radikalfängereigenschaften und die Hemmung der Superoxidionbildung wurden für beide Gruppen ebenfalls bestätigt. Dahingegen wurden Peroxylradikale im ORAC-Test fast ausschließlich von niedermolekularen Verbindungen abgefangen.

Die 3-Hydroxyphloretin(glycoside) zeigten, mit Ausnahme des Xyloglucosids, am EGFR eine stärkere inhibitorische Wirkung als die entsprechenden Phloretin(glycoside). Die Untersuchung der Enzyme des Fremdstoffmetabolismus zeigte ein uneinheitliches Bild. So war Phloretin ein effektiverer Hemmstoff der CYP1A im Vergleich zum 3-Hydroxyphloretin. Bei den Glycosiden zeigten 3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid die etwas bessere Wirkung. Ähnlich verhielt es sich bei der antioxidativen Kapazität. Die 3-Hydroxyphloretin(glycoside) wiesen im DPPH und X/XO-Assay eine größere Aktivität auf. Hydroxylperoxidradikale wurden nur durch das dihydroxylierte freie Aglykon besser abgefangen.

Weiterhin wurde mit 3-Hydroxy- β -damascon erstmals ein hochpotenter Induktor der Chinonreduktase in Apfelsaft identifiziert.

Die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse hinsichtlich der neu identifizierten bioaktiven Inhaltsstoffe leisten einen Beitrag zum besseren Verständnis der potentiell chemopräventiven Wirkungen von (trüben) Apfelsäften. Ferner ist die Quantifizierung dieser Substanzen in technologisch unterschiedlich behandelten Säften für weiterführende Studien von Relevanz.

Summary

The aim of the present work was to identify new (minor) components in apple juice and to determine their contribution to the chemopreventive potential of the juice. Motivation for this work were previous findings, demonstrating that known, low-molecular phenolic compounds, as a mixture, did not exhibit the same chemopreventive potential as polyphenol-enriched apple juice extract.

Therefore seven apple juices of different years of harvest as well as 14 polyphenol-enriched apple juice extracts, produced by solid phase extraction on XAD, SP70 and P-495, have been examined with respect to their chemical composition. It was shown, that the polyphenol composition of the apple juices and -extracts differed markedly, depending both on the year of production and the production technology applied. Most notably, juice extract AE03B, produced by enzymatic pomace treatment, showed a significant enrichment of quercetin and phloretin glycosides as well as a depletion of phenolic acids. Clarification of cloudy apple juices had no significant effect on the composition of the low molecular polyphenol fraction. By tendency, extracts obtained from cloudy juices contained slightly less phloretin glycosides compared to clear juice extracts, whereas clear juices showed a low enrichment of phenolic acids compared to cloudy juices.

High variations in high molecular procyanidins were observed in the examined apple juices and apple juice extracts, depending on conditions of production and the apple varieties used. Considering clear and cloudy juices of one batch, procyanidin content and their mean degree of polymerisation were reduced significantly by the process of clarification. Furthermore, higher contents and higher mean degrees of polymerisation were found in juices deriving from one cider apple variety than in juices blended with dessert apples.

(*R*)-Octane-1,3-diol, (*R*)-5-(*Z*)-octene-1,3-diol, 3-hydroxy-2-pyrone and 3-hydroxy- β -damascone were non-phenolic ingredients of the examined apple juices and apple juice extracts. Their total content ranged between 30.7 and 150.5 mg/kg in the apple juices and between 11.9 and 166.5 mg/g in the apple juice extracts. (*R*)-Octane-1,3-diol was thereby the dominating compound, with amounts up to 97.2 mg/kg in juices and up to 113.7 mg/g in juice extracts.

Two selected apple juice extracts produced in 2004 and 2006 were fractionated using different preparative chromatographic methods. Good separation of the apple polyphenols, except for the procyanidins, was obtained upon Sephadex LH-20 fractionation. First, polymeric carbohydrates and unknown phenolics eluted, then phenolic acids and dihydrochalcones, followed by low molecular flavan-3-ols and quercetin glycosides. Later eluting fractions comprised exclusively polymeric procyanidins. Non-phenolic ingredients were concentrated in an early eluting fraction.

Polymeric procyanidins were separated from low-molecular phenolic ingredients of juice extracts by fractionation on silica gel. High affinity of procyanidins to the stationary phase caused a 50% loss, with most pronounced decrease in content for high-polymeric procyanidins.

In the course of preparative fractionations, the substances quercetin, quercetin 3-*O*-glucoside, quercetin 3-*O*-galactoside, phloretin 2'-xyloglucoside, 3-hydroxyphloretin 2'-glucoside, 3-hydroxyphloretin 2'-xyloglucoside, and phloretin 2',4'-diglucoside were obtained.

With the objective of having larger quantities of pure substances for following activity studies, 3-hydroxyphloretin, 3-hydroxyphloretin 2'-glucoside, 3-hydroxyphloretin 2'-xyloglucoside and 3-hydroxy-2-pyrone were synthesised using enzymatic or chemical methods.

Obtained subfractions and pure substances were tested *in vitro* for their inhibitory potentials with respect to protein tyrosine kinase (PTK) at the epidermal growth factor receptor (EGFR). In cancer cells this receptor is overexpressed and contributes to unregulated growth. Furthermore, antioxidative (DPPH, ORAC, X/XO), antiinflammatory and antihormonal (COX-1, CYP19) properties as well as the ability to modulate enzymes of xenobiotic metabolism (CYP1A, QR) were investigated.

Apple procyanidins showed, depending on their degree of polymerisation, strong inhibition of the PTK at the EGFR. So fractions containing exclusively high-polymeric procyanidins (NP.4 and NP.5) showed a clearly stronger inhibition than fractions containing only low-molecular polyphenols (NP.1-NP.2; Figure 0.1).

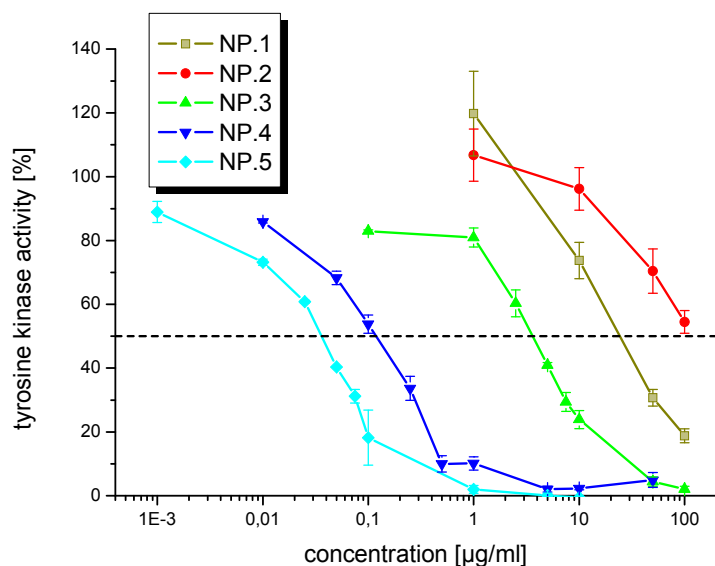


Figure 0.1: Inhibition of protein tyrosinase of the epidermal growth receptor after incubation with AE04-fractions NP.1 to NP.5; mean \pm SD of at least three independent experiments

Procyanidines also had a decisive impact on the enzymes cytochrom P450 1A and aromatase (CYP19). Antioxidative properties of apple juice extracts were dependent on the content of both, polymeric procyanidins and low-molecular polyphenols. On the one hand both phenolic groups contributed to the radical scavenging properties and to an inhibition of superoxide anion generation, attested to the examined apple juice extracts. On the other hand, peroxy radicals generated during the ORAC assay were only quenched by low molecular compounds.

The inhibitory potential of the isolated 3-hydroxyphloretin (glycosides) with respect to the protein tyrosine kinase of the epidermal growth receptor was greater than of their corresponding phloretin (glycosides), except for the xyloglucoside.

Inconsistent results were obtained from investigations of xenobiotic metabolising enzymes. So, phloretin was a more effective inhibitor of CYP1A than 3-hydroxyphloretin, whereas, regarding the glycosides, 3-hydroxyphloretin glycosides were more effective. Likewise, 3-hydroxyphloretin (glycosides) exhibited slightly better radical scavenging activities in the DPPH and X/XO assays than their non-hydroxylated analogs. Only the dihydroxylated free aglycon scavenged hydroxyl peroxide radicals more successfully. Furthermore, 3-hydroxy- β -damascone was identified as a highly potent quinone reductase inductor from apple juice for the first time.

Findings obtained in this work concerning newly identified bioactive compounds contribute to a better understanding of the potential chemopreventive effect of (cloudy) apple juices. Furthermore, quantification of these substances in apple juices, treated differently with respect to technological issues, is of relevance for further studies.

1 Einleitung

In den vergangenen 30-40 Jahren wurden große Fortschritte im Verständnis der Krebsentstehung auf molekularer Ebene gemacht. Dies führte unter dem Begriff „Chemoprävention“ auch zu einem neuen Ansatz der Krebsvorbeugung (Sporn und Newton 1979). Diese hat zum Ziel die Entstehung und das Fortschreiten von Krebsvorstufen z.B. durch Nahrungsbestandteile zu verhindern. Hierbei wurde vor allem eine ausgewogene Ernährung mit einem hohen Anteil von Obst und Gemüse mit einem verminderten Risiko an Krebs zu erkranken assoziiert (Knekt *et al.* 2002).

Es gibt viele Hinweise, die vermuten lassen, dass Äpfel und Apfelsaft eine wichtige Quelle für chemopräventiv wirksame Substanzen sein könnten (Boyer und Liu 2004). In Deutschland lag der Verzehr von Äpfeln bei 20,7 kg/Haushalt weiterhin lag der Apfelsaft mit einem pro-Kopf-Verbrauch von 11,9 l an der Spitze der Fruchtgetränke (www.zmp.de). Epidemiologische Studien der letzten Jahre wiesen den Äpfeln ein krebsvorbeugendes Potential nach, insbesondere bei Lungen und Dickdarmkrebs. So lag beispielsweise in einer finischen Studie an 10.000 Männern und Frauen, die täglich einmal Äpfel verzehrten, das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Knekt *et al.* 2002). Weiterhin konnte in einer Fall-Kontroll-Studie gezeigt werden, dass der Verzehr von mindestens einem Apfel pro Tag mit einem deutlich reduzierten Risiko an Dickdarm-, Brust- und Kehlkopfkrebs sowie Krebs des Mund-Rachenraums zu erkranken einhergeht (Gallus *et al.* 2005).

Für diese Eigenschaften werden insbesondere die phenolischen Substanzen verantwortlich gemacht, die aufgrund ihrer Fähigkeit die Gefäßpermeabilität positiv zu beeinflussen früher auch zu den Vitaminen (Vitamin P) gezählt wurden (Rusznayk und Szent-Györgyi 1936).

Äpfel sind reich an phenolischen Substanzen, die in allen Gewebeteilen der Frucht verteilt sind (Guyot *et al.* 1998). Der Gesamtphenolgehalt des Apfels beträgt zwischen 523 und 2724 mg/kg niedermolekulare Phenole und zwischen 1374 und 19846 mg/kg polymere Procyanidine bezogen auf das Trockengewicht. Der Gehalt und die Zusammensetzung variiert aber stark in Abhängigkeit von der untersuchten Sorte, den Anbaubedingungen und dem Erntejahr (Wojdylo *et al.* 2008). Die Hauptklassen der Apfelphenole sind die phenolischen Säuren und ihre Derivate, Dihydrochalkone, Flavonole sowie monomere und polymere Flavan-3-ole (Alonso-Salces *et al.* 2004, Kahle *et al.* 2005, Wojdylo *et al.* 2008).

Es wurden schon viele biologische Effekte *in vitro* und *in vivo* den Extrakten aus Äpfeln und Apfelsäften sowie deren bekannten Inhaltsstoffen nachgewiesen (Boyer und Liu 2004). Hierzu gehören neben antioxidativen Eigenschaften und die Reduzierung von oxidativen Streß (Schaefer *et al.* 2006) auch die Hemmung der Cytochrom P4501A1-Aktivität (Zessner *et al.* 2008), die Modulation von Zell-Signal-Kaskaden (Kern 2006), die Hemmung der Proteintyrosinkinase am epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) (Kern *et al.* 2005, Kern 2006, Fridrich *et al.* 2007a, Fridrich *et al.* 2007c) und die Induktion der Apoptose in Dickdarmkrebszellen (Kern *et al.* 2007).

Allerdings war es zu Beginn der Studien noch nicht komplett verstanden welche Substanzen des Apfels bzw. Apfelsafts und in welchem Umfang diese einen Beitrag zu den beobachteten potentiell chemopräventiven Aktivitäten leisten. Insbesondere am EGFR war der untersuchte Apfelsaftextrakt ein deutlich potenterer Hemmstoff als eine Mischung der bekannten Einzelsubstanzen (Kern *et al.* 2005).

Ziel dieser Arbeit war daher die Analyse potentiell chemopräventiv wirksamer Inhaltsstoffe sowie die Identifizierung neuer „aktiver“ Verbindungen in Apfelsaft. Hierzu wurden zuerst im Rahmen des Projektes Nutrition Net hergestellte Apfelsäfte untersucht. Da Säfte für die Testung im *in vitro* System nicht geeignet sind, wurden weiterhin aus verschiedenen Säften polyphenolangereicherte Apfelsaftextrakte hergestellt und ihre Inhaltsstoffe charakterisiert.

Zwei unterschiedlich zusammengesetzte Extrakte verschiedener Erntejahre wurden anschließend unter Anwendung präparativer Chromatographiemethoden fraktioniert um neue Inhaltsstoffe mit potentiell chemopräventiver Wirkung zu identifizieren. Hierzu wurden parallel zur Fraktionierung Aktivitätsstudien, sowohl von den erhaltenen Fraktionen als auch von den Reinsubstanzen, durchgeführt.

Für die Aktivitätsstudien wurden folgende Eigenschaften untersucht:

- Einfluss auf die Proteintyrosinkinase am epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR),
- antioxidative Wirkung:
 - Oxygen (Peroxyl) Radical Absorbance Capacity (ORAC)
 - Hemmung der Superoxidationbildung durch Xanthin/Xanthinoxidase (X/XO)
 - Testung der Radikalfängereigenschaften (DPPH)

- Modulation des Fremdstoffmetabolismus
 - Cytochrom P450 1A (CYP1A) Hemmung
 - NAD(P)H:Chinonoxidoreduktase (QR) Induktion
- Antiinflammatorische und antihormonelle Wirkung
 - Cyclooxygenase 1 (Cox-1) Hemmung
 - Aromatase (CYP19) Hemmung

2 Kenntnisstand

2.1 Apfel und Apfelsaft

2.1.1 Der Apfel

Der Apfel (*Malus*) bildet eine eigenständige Gattung in der Unterfamilie der Kernobstgewächse (*Maloidae*). Tabelle 2.1 zeigt die taxonomische Einordnung. Die Gattung *Malus* umfasst etwa 40-55 laubwerfende Bäume und Sträucher der nördlichen gemäßigten Zone in Europa, Asien und Nordamerika. Die weltweit bedeutendste Art ist der Kulturapfel (*Malus domestica*). Von dieser wird der Wildapfel oder Holzapfel (*Malus sylvestris*) unterschieden, der durch dornige Zweige und kleine, herb schmeckende, holzige Früchte gekennzeichnet ist (Lieberei und Reisdorff 2007).

Tabelle 2.1 Taxonomie des Apfels

Klasse	Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige (<i>Rosopsida</i>)
Unterklasse	Rosenähnliche (<i>Rosidae</i>)
Ordnung	Rosenartige (<i>Rosales</i>)
Familie	Rosengewächse (<i>Rosaceae</i>)
Unterfamilie	Kernobstgewächse (<i>Maloidae</i>)
Gattung	Äpfel (<i>Malus</i>)

Äpfel sind im gemäßigten Klimabereich das bedeutendste Fruchtopst. Die Domestikation begann schon vor mehr als 8000 Jahren in Zentralasien. Von dort erfolgte die Verbreitung über Griechenland und Italien nach Mitteleuropa. Gegenwärtig sind über 30.000 Apfelsorten bekannt. Die Vermehrung der Apfelbäume erfolgt zumeist vegetativ durch Veredelung. Infolge ihrer Selbststerilität benötigen die meisten Apfelsorten eine Fremdbestäubung, um ausreichende Fruchtmengen zu liefern (Lieberei und Reisdorff 2007).

Heutzutage werden Äpfel sowohl roh, als auch in Form von zahlreichen verarbeiteten Produkten wie Mus, Gelee, Saft oder Most verzehrt. Des Weiteren stellen die Früchte auch ein wichtiges Ausgangsprodukt für die Herstellung von Essig oder Pektin dar.

Die einzelnen Sorten werden nach ihrem Verwendungszweck in Tafeläpfel, Kochäpfel, Mostäpfel und Zieräpfel eingeteilt.

Die wechselständigen, auf der Unterseite leicht behaarten Blätter des Apfelbaums sind gesägt-gekerbt, breit-oval geformt und am Ende i. d. R. spitz. Die fünfzähligen Blüten sind kurzstielig und stehen in wenigblütigen Doldentrauben zusammen. Manche Apfelblüten sind weiß, die meisten jedoch rosa getönt oder gestreift. Wenige Apfelarten blühen leuchtend rot (Lieberei und Reisdorff 2007).

Im botanischen Sinne ist der Apfel eine Scheinfrucht, da nicht nur der Fruchtknoten, sondern auch das Gewebe der Blütenachse an der Fruchtbildung beteiligt ist. Während der Reife werden die Fruchtblätter durch den sich fleischig entwickelnden Blütenboden umschlossen, bis nur noch ein Teil des Griffels herausragt. Jedes Fruchtblatt enthält zwei Samenanlagen, von denen sich oft nur eine weiterentwickelt.

Die äußeren Merkmale von Äpfeln sind recht vielfältig. Sie erreichen je nach Art etwa Kirsch- bis Grapefruitgröße, und die Farbe der Schale kann zwischen grün und einem tiefen, fast schwarzen Rot liegen. Das Fleisch besitzt meist eine helle Farbe, welches sich durch enzymatische Oxidationsvorgänge an der Luft schnell braun verfärbt. Eine Ausnahme bildet die Sorte Rubens, deren Fruchtfleisch durch den hohen Anthocyangehalt rot gefärbt ist. Auf Verlauf und Intensität der Bräunungsvorgänge hat unter anderem die Sorte einen Einfluss.

Das Apfelfruchtfleisch besteht zu 85% aus Wasser, zu 10% aus Zucker, zu 2% aus Rohfasern, zu 0,7% aus Fruchtsäuren wie Äpfelsäure und Citronensäure und zu 0,4% aus Fett. Der Gehalt an Vitamin C liegt je nach Sorte zwischen 2 und 25 mg/100 g (Souci und Scherz 1989).

Das Aroma des Apfels setzt sich aus einigen hundert Stoffen zusammen. Im Wesentlichen sind Ester, Aldehyde und Alkohole am Apfelaroma beteiligt. Zu den wichtigsten Estern zählen Ethyl-2-methylbutanoat, Ethylbutanoat, 2-Methylbutylacetat, Butylacetat und Hexylacetat. In der quantitativen Zusammensetzung der Aromastoffe des Apfels gibt es große sortenbedingte Unterschiede. Weitere Schlüsselaromastoffe des Apfels sind E-2-Hexenal, E-2- und Z-3-Hexenol, β -Damascenon und α -Farnesen (Dimick und Hoskin 1983, Defilippi *et al.* 2004).

2.1.2 Der Apfelsaft

Der Apfel (*Malus domestica*) dient neben der Orange (*Citrus sinensis* (L.)) weltweit als wichtigste Rohware für die Fruchtsaftindustrie. Die Erkenntnis, aus Früchten Säfte herzustellen, führt bis in die menschliche Frühzeit zurück. Heutzutage liegt die Bedeutung der Fruchtsäfte nicht nur in ihrem erfrischenden und aromatischen Geschmack, sondern zunehmend auch in ihrem ernährungsphysiologischen Wert.

Da sich einzelne Sorten stark voneinander in ihrer Zusammensetzung unterscheiden, hat die Wahl der Sorte einen großen Einfluss auf das Endprodukt. Unter der Vielzahl bekannter Apfelsorten sind für die Fruchtsaftindustrie nur etwa 20 von kommerzieller Bedeutung. Den höchsten Stellenwert besitzen dabei die Sorten Golden und Red Delicious, Granny Smith, McIntosh und Rome Beauty. In den letzten Jahren gewinnen auch neuere Züchtungen wie Gala, Fuji, Jonagold und Braeburn an Bedeutung (USAPPLE-Association 2007). Um ein optimales und im Geschmack ausgewogenes Produkt zu erhalten, werden meist mehrere Apfelsorten für die Herstellung eines Saftes kombiniert.

2.1.2.1 Herstellung von Apfelsaft

Im Folgenden soll kurz die Herstellung von Apfelsaft näher besprochen werden.

Nach der Obstannahme werden die Äpfel in einem Schwemmkanal transportiert und gewaschen.

Die Art und der Zerkleinerungsgrad haben einen großen Einfluss auf die Dauer des anschließenden Entsaftungsvorgangs, die Saftausbeute und den Trubstoffgehalt. Die Zerkleinerung der Früchte kann mittels mechanischer (Obstmühlen), thermischer (Thermobreak, Gefrieren), enzymatischer (Maischefermentierung) oder unkonventioneller Verfahren (Ultraschall, Elektropasmolyse) erfolgen. Durch eine umfangreichere Zerkleinerung werden mehr Zellen zerstört und die Saftausbeute erhöht (Schobinger 2001). Infolge der Zerstörung des Zellgewebes laufen sofort Oxidationsvorgänge, Pektinabbau und trubbildende Reaktionen ab, da fruchteigene Enzyme mit Zuckern und Säuren der Vakuolen reagieren (Birus 2001). Beim Thermobreak-Verfahren erfolgt bei einer Erhitzung der Früchte auf ca. 80°C eine Denaturierung der Protoplasmahäute, wodurch die

Permeabilität des Gewebes erhöht und somit der Saftaustritt erleichtert wird (Schobinger 2001).

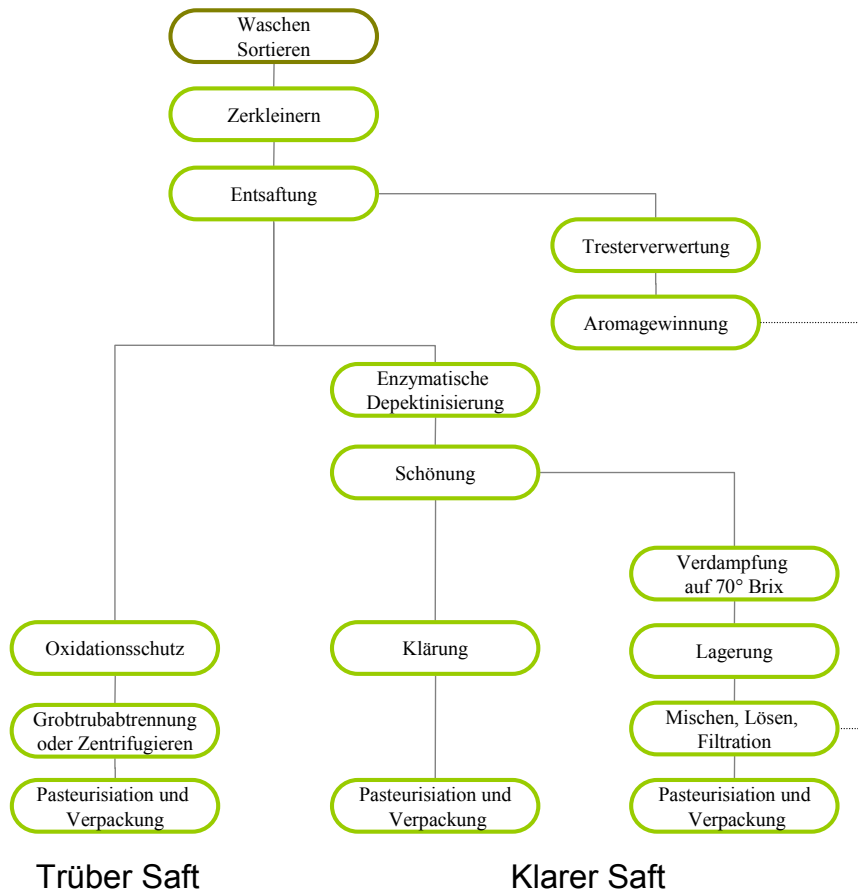


Abbildung 2.1: Herstellung von Apfelsaft (nach Heiss 2004)

Um eine höhere Saftausbeute sowie eine Abnahme der Maischeviskosität zu erreichen, erfolgt vor dem Pressen meist ein enzymatischer Pektinabbau bei einer Temperatur von 45 bis 50°C. Die pektinolytischen Enzyme werden anhand der Angriffspunkte am Pektinmolekül unterschieden (vgl. Abbildung 2.2). Die industriell verwendeten Präparate sind mikrobiellen Ursprungs. Aufgrund der stark ausgeprägten Substrat- und Wirkungsspezifität der Enzyme hat jedes Präparat - abhängig von dem Enzym, welches die Hauptaktivität liefert - einen spezifischen optimalen Wirkungsbereich (Schobinger 2001).

Die sich anschließende Entsaftung erfolgt mit Pressen oder Dekantern. Hierbei werden die Zellwände und -membranen durch Druck mechanisch aufgebrochen. Der erhaltene trübe Saft ist sowohl Ausgangsprodukt für die Herstellung von klaren und naturtrüben Direktsäften, als auch von klaren und naturtrüben Konzentraten.

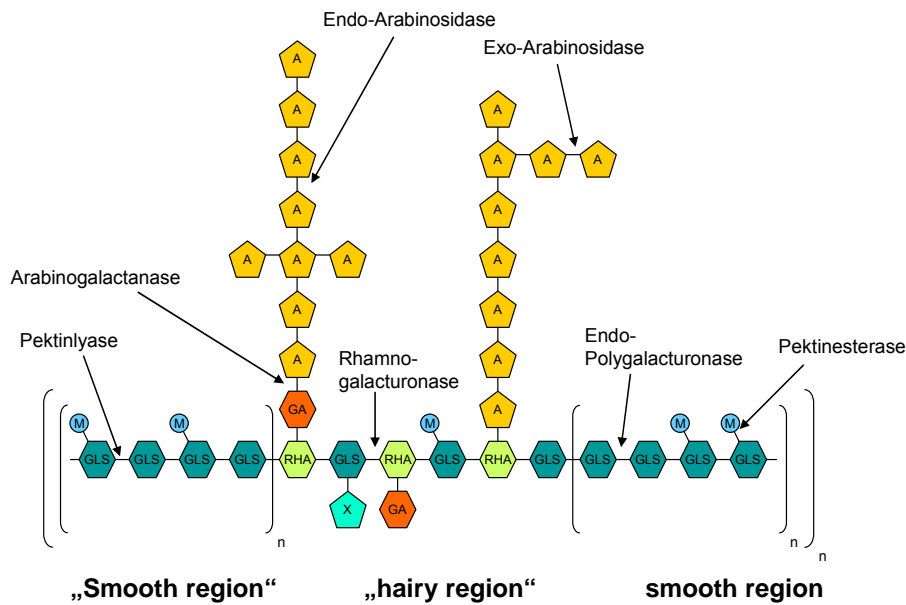


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau des Pektinmoleküls mit den Angriffspunkten pektinolytischer Enzyme. GLS: Galacturonsäure; GA: Galactose; RHA: Rhamnose; A: Arabinose; M: Methyl ester

Zur Entfernung von Stärkekörnern wird der Saft separiert, anschließend bei 80°C pasteurisiert und eingelagert. Durch die Pasteurisierung werden für den Verderb verantwortliche Mikroorganismen abgetötet und Enzyme inaktiviert. Bei Temperaturen über 90°C treten vermehrt unerwünschte Nebenreaktionen auf, die das Aroma beeinflussen können.

Zur Fertigstellung des naturtrüben Direktsaftes wird dieser in der Regel erneut separiert, um den bei der Lagerung gebildeten aggregierten Grobtrub, der sonst in der Flasche sedimentieren würde, zu entfernen. Nach dessen Abtrennung beträgt der Gesamttrub in naturtrübem Apfelsaft zwischen 0,2 und 1,0 g/l. Der Gehalt an Ascorbinsäure wird nach einem weiteren Pasteurisierungsschritt überprüft und gegebenenfalls erneut zugegeben.

Die Herstellung eines klaren Apfelsaftes erfordert zusätzliche Verfahrensschritte, die das Endprodukt in seinen ernährungsphysiologischen und sensorischen Eigenschaften jedoch nur unwesentlich beeinflussen sollten. Als Hauptursachen für unerwünschte Trübungen gelten Proteine, Gerbstoffe, Stärke und Pektin (Birus 2001). Die Entfernung dieser Stoffe erfolgt durch den Einsatz von Enzympräparaten, Schönungsmitteln (Gelatine, Bentonit, o.ä.), sowie durch mechanische Klärung mittels Filtration, Sedimentation oder Flotation (Schobinger 2001). Jeder Schönungsvorgang beeinflusst jedoch auch erwünschte Substanzen, wie z.B. Aromastoffe oder Polyphenole (Birus 2001).

Die enzymatische Saftbehandlung kann man in den enzymatischen Pektin-, Stärke- und Arabanabbau unterteilen. Beim Einsatz pektinolytischer Enzyme ist das richtige Verhältnis zwischen Pektinmethylesterase und Polygalacturonase von entscheidender Bedeutung. Pektinmethylesterase demethoxyliert Pektin, die resultierenden freien Galacturonate bilden mit Kationen wie Ca^{2+} unlösliche Komplexe. Polygalacturonase spaltet das Rückgrat des Pektinmoleküls, wodurch die Viskosität des Saftes sinkt. Der Einsatz von Amylase dient der Hydrolyse von Stärke und verhindert die Retrogradation verkleisterter Stärke und daraus resultierende körnige Strukturen (Ashurst 1998). Zur Entfernung polymerer phenolischer Substanzen werden neben der Ausfällung mit proteinhaltigen Schönungsmitteln und Ultrafiltration zunehmend Laccase-Diphenoloxidase-Enzympräparate eingesetzt. In der EU ist ihr Einsatz jedoch nicht erlaubt (Fruchtsaft VO).

Das traditionelle Schönungsmittel für Apfelsaft ist Gelatine. Das Protein trägt beim pH-Wert des Apfelsafts ($\text{pH} \approx 3,5$) eine positive Ladung. Durch Elektronenpaarbindung werden negativ geladene Trubteilchen gebunden und fallen mit der Gelatine aus. Auf diese Weise wird vor allem der Anteil an hochpolymeren Procyanidinen reduziert, die als Hauptursache für eine Trübung im Saft gelten und bei der Klärung mit mechanischen Verfahren im Saft verbleiben.

Weitere Anwendung finden die Kieselsol-Gelatine-Schönung sowie die Schönung mittels Bentonit, Polyvinylpolypyrrolidon und Aktivkohle. Vor allem letztere binden aber auch einen Teil des Saftaromas.

Im Anschluss wird der Saft durch physikalische Verfahren, wie Filtration, Sedimentation und Flotation geklärt (Schobinger 2001).

Um den klaren Direktsaft haltbar zu machen wird er ebenso wie der trübe Direktsaft bei Temperaturen unter 90°C pasteurisiert; ferner wird der Gehalt an Ascorbinsäure überprüft und evtl. Ascorbinsäure zugegeben.

Klare Säfte werden heute in der Regel aus klarem Apfelsaftkonzentrat hergestellt. Hierbei wird dem frisch gepressten Saft bei Temperaturen von über 90°C das Aroma abgetrennt. Der so erhaltene entaromatisierte Trübsaft wird auf 50°C rückgekühlt und einer Heißklärung unterzogen. Nach Schönung und Klärung durch Filtration oder durch Ultrafiltration und Adsorption wird der klare Saft mit Hilfe von Vakuumverdampfern auf 72°Brix konzentriert und kühl gelagert. Im letzten Schritt erfolgt die Rekonstitution aus Konzentrat, Wasser und dem anfangs abgetrennten Aroma.

2.1.2.2 Wirtschaftliche Bedeutung

Mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von ca. 38,3 l stand Deutschland im Jahr 2007 weltweit an der Spitze im Konsum von Fruchtsäften und Fruchtnektaren. Es folgten Finnland mit 33,1 l, die USA mit 32,5 l, Spanien mit 29,1 l und die Niederlande mit 28,9 l (VdF 2008). Der durchschnittliche Verbrauch in der Europäischen Union lag bei 25,0 l. In Deutschland erfreute sich im Jahr 2007 der Apfelsaft mit einem Pro-Kopf-Verbrauch von 11,4 l der größten Beliebtheit, gefolgt von Orangen- (8,9 l), Multivitamin- (3,8 l) und Traubensaft (1,3 l) (VdF 2008). Der Konsum ist im Vergleich zu den Vorjahren allerdings leicht rückläufig, in denen jeder Bundesbürger etwa 0,4 l (2005) bzw. etwa 0,9 l (2004) mehr trank. Es liegen Schätzungen vor, nach denen der weltweite Pro-Kopf-Verbrauch von Fruchtsäften und -nektaren im Jahre 2008 sechs Litern entsprechen wird. Dies entspricht einer gesunkenen jährlichen Wachstumsrate von 4,2% auf 2,8% (zwischen 1999 und 2005) (Canadean 2006).

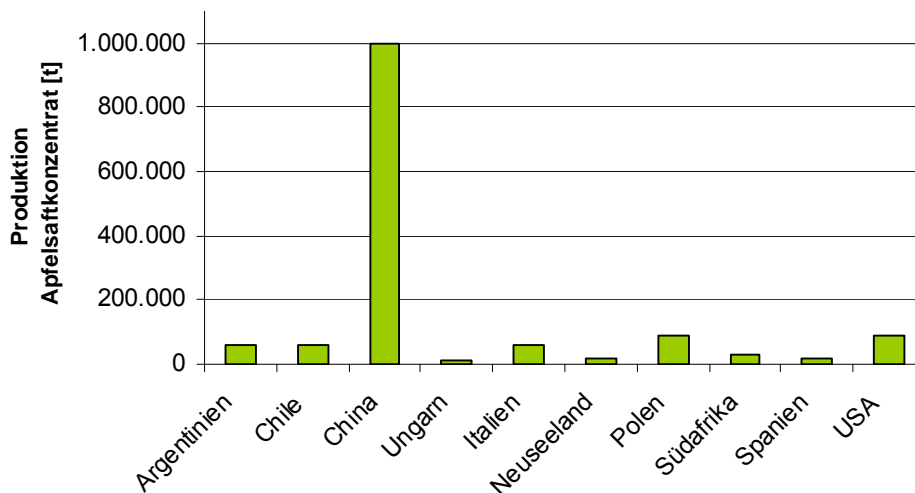


Abbildung 2.3 Produktionsumfang der wichtigsten Apfelsaftkonzentrat produzierenden Ländern (FAS/USDA 2007/08)

Auch die geschätzte Apfelsaftproduktion der wichtigsten Apfelsaft produzierenden Ländern war mit 1,44 Mio. Tonnen in den Jahren 2007/2008 im Gegensatz zu den vorhergehenden Jahren erstmals rückläufig (2006/2007: 1,57 Mio. Tonnen).

In Abbildung 2.3 sind die Produktionszahlen der weltweit wichtigsten Apfelsaftkonzentrat herstellenden Länder gezeigt. China nimmt mit deutlichem Abstand eine Führungsposition ein, es folgen Polen und die USA, vor Italien, Argentinien und Chile.

Deutschland spielt mit einer Produktion von 550 Mio. l Apfelsaft weltweit nur eine untergeordnete Rolle.

2.2 Polyphenole

2.2.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Pflanzliche Inhaltsstoffe werden anhand des Stoffwechsels in „primäre“ und „sekundäre“ eingeteilt. Primäre Pflanzenstoffe, wie Kohlenhydrate, Proteine und Fette, sind am Energiestoffwechsel und am Aufbau der Zellen beteiligt (primärer Pflanzenstoffwechsel). Mit Ausnahme der Ballaststoffe dienen sie als Nährstoffe für den Menschen, weswegen sie auch als nutritive Inhaltsstoffe bezeichnet werden. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (SPS) sind Verbindungen, die im Gegensatz dazu weder im Energiestoffwechsel, noch im anabolen oder katabolen Pflanzenstoffwechsel produziert werden (sekundärer Pflanzenstoffwechsel). Die SPS umfassen eine Vielzahl chemisch sehr unterschiedlicher Verbindungen, welche für die Pflanze lebensnotwendig sind. Zu ihnen gehören neben den Polyphenolen u.a. auch die Alkaloide, Phytosterine, Saponine, Glucosinolate und Isoprenoide. Sie kommen in der Pflanze meist nur in geringen Mengen vor, zudem wird ihnen häufig eine pharmakologische Wirkung zugeschrieben (Shahidi und Naczk 2003, Watzl und Leitzmann 2005). Nicht immer lässt sich der Sekundärstoffwechsel eindeutig abgrenzen, da Primär- und Sekundärstoffwechsel häufig die gleichen Enzymsysteme nutzen. Deshalb erfolgt eine Einteilung der Substanzen oftmals nur aus der Betrachtung der Funktion im pflanzlichen Organismus.

SPS werden von der Pflanze u.a. als Abwehrstoffe vor Pathogenen, als Wachstumsregulatoren, als UV-Schutz, zur Anlockung von Bestäubern, als Verdunstungsschutz und zur mechanischen Festigung synthetisiert. Sie können, bezogen auf das Trockengewicht, einen Anteil von bis zu einigen Gewichtsprozenten ausmachen. Bei gemischter Kost werden täglich bis zu 1,5 g SPS aufgenommen (Watzl und Leitzmann 2005).

Noch vor 20 Jahren wurden die SPS als antinutritive Nahrungsinhaltsstoffe angesehen. Deshalb wurden Versuche unternommen, den Anteil dieser Substanzen durch Züchtungen zu verringern. In den letzten Jahren hat jedoch ein Umdenken begonnen. Nun werden ihnen vielfältige gesundheitsfördernde Wirkungen zugeschrieben, und die Lebensmittelindustrie versucht diese Substanzen unter dem Aspekt einer gesundheitsfördernden

den Wirkung in Lebensmitteln anzureichern. Nachfolgend wird aus der Gruppe der SPS kurz der Bereich der Polyphenole vorgestellt.

2.2.2 Chemie und Vorkommen von Polyphenolen

Unter dem Begriff Polyphenole werden Substanzen zusammengefasst, die auf der Struktur des Phenols basieren. Sie stellen daher keine einheitliche Stoffgruppe dar. Zu ihnen werden insbesondere die Phenolcarbonsäuren, die Flavonoide, die Lignane und die Stilbene gezählt (Harborne 1994, Anderson und Markham 2006).

2.2.2.1 Phenolcarbonsäuren

Unter dem Begriff Phenolcarbonsäuren werden sowohl die eigentlichen phenolischen Säuren, die sog. Hydroxybenzoesäuren, als auch die Hydroxyzimtsäuren zusammengefasst (Manach *et al.* 2004).

Bei den **Hydroxybenzoesäuren** handelt es sich um Phenole mit der Grundstruktur C_6C_1 . In Abbildung 2.4 sind ihre wichtigsten Vertreter in Früchten dargestellt.

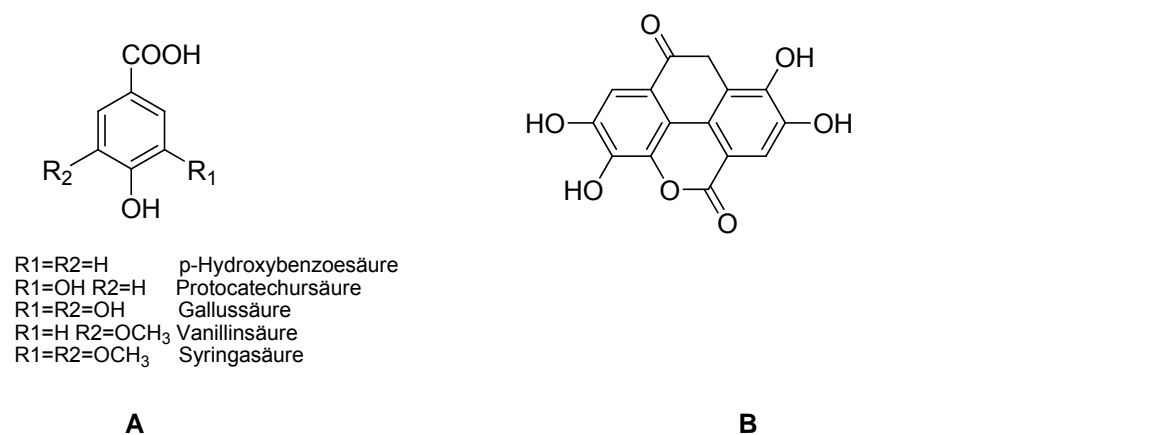


Abbildung 2.4 Strukturen wichtiger Hydroxybenzoesäure-Verbindungen (A) und Grundstruktur der Ellagsäure(B)

Hydroxybenzoesäuren liegen ebenso wie die Hydroxyzimtsäuren im Allgemeinen als Konjugate vor, auch wenn in einigen Früchten ebenso die freien Säuren nachgewiesen wurden (Mattila und Kumpulainen 2002). Ester der Gallussäure und der Hexahydroxydiphensäure bilden neben den Proanthocyanidinen eine der beiden Hauptklassen der

pflanzlichen Gerbstoffe. Man unterscheidet die Gallotannine und die Ellagtannine, die sich durch verdünnte Säuren vollständig in kleinere Moleküle spalten lassen. Aufgrund dieser Eigenschaft werden sie zu den sog. hydrolysierbaren Gerbstoffen gezählt.

Ellagsäure (vgl. Abbildung 2.4) liegt in Beeren in drei verschiedenen Formen vor. Neben der weniger häufigen freien Form kommt sie als polymeres Tannin (Ellagtannine) oder an Glucose gebunden vor. Vor allem die Ellagtannine werden bei der Verarbeitung der Früchte zu Marmeladen oder Saft gespalten, was zu einer Erhöhung des Gehaltes an freier Säure führt (Zafrilla *et al.* 2001).

Die Hydroxybenzoesäureprofile und -gehalte in Früchten und Gemüse unterscheiden sich auch in Varianten derselben Spezies stark. Im Allgemeinen sind ihre Konzentrationen in Lebensmitteln gering. Ausnahmen sind die Früchte der Gattung Rosaceae, einige Kräuter, sowie grüner und schwarzer Tee (Tomás-Barberán und Clifford 2000a).

Die zweite Gruppe der Phenolcarbonsäuren bilden die **Hydroxyzimtsäuren**. Ihre Struktur leitet sich von der *trans*-Phenyl-propansäure (C₆C₃-Körper) ab. Die Doppelbindung der Hydroxyzimtsäuren ist in der Natur immer *trans* konfiguriert, kann aber durch Verarbeitungsschritte und unter Einwirkung von UV-Licht teilweise zur *cis*-Verbindung isomerisieren. Nur ein kleiner Teil der Phenolcarbonsäuren liegt als freie Säure vor. Sie sind praktisch in allen pflanzlichen Lebensmitteln enthalten und in der gesamten Pflanze vertreten. Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure), Ferulasäure (3-Methoxy-4-hydroxyzimtsäure), Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure) und *p*-Cumar-säure (4-Hydroxyzimtsäure; vgl. Abbildung 2.5) sind die in pflanzlicher Nahrung am häufigsten vorkommenden freien Phenolcarbonsäuren (Clifford 1999, Clifford 2000b).

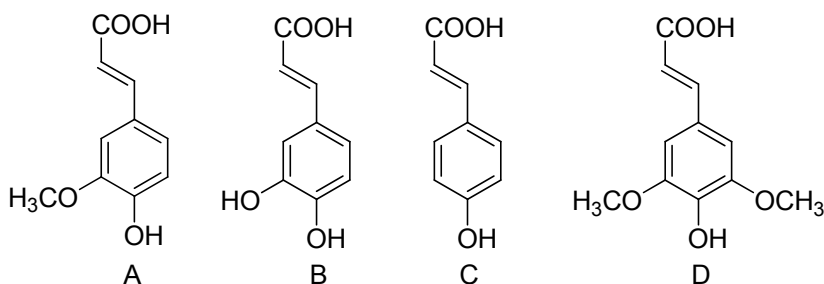


Abbildung 2.5 Strukturformeln von Ferulasäure (A), Kaffeesäure (B), *p*-Cumarsäure (C) und Sinapinsäure (D)

Der Großteil ist durch Ester-, Ether- oder Acetalbindungen entweder mit strukturbildenden Komponenten der Pflanze (Cellulose, Proteine, Lignin), mit größeren Polyphenolen (Flavonoide), mit einfachen Zuckern oder Zuckeralkoholen wie z.B. Glycerin und *myo*-Inositol, mit Fetten, Sterolen oder mit Terpenen gebunden. Durch die Anzahl und Posi-

tion der Hydroxylgruppen am aromatischen Ring ist bei gleichem Grundgerüst eine Vielzahl von Verbindungen möglich, die durch Verknüpfungen mit anderen Molekülen eine große Anzahl an Derivaten bilden (Klick und Herrmann 1988, Clifford 2000b).

Die Zusammensetzung der Phenolcarbonsäuren ist stark von der untersuchten Pflanze abhängig. In Kern- und Steinobst sowie in einigen Beerenobstarten treten die Hydroxyzimtsäuren hauptsächlich als Ester mit D-(-)-Chinasäure auf, wobei die Kaffeoylechinasäuren überwiegen. Die größte Bedeutung haben hierbei die 3- und die 5-Kaffeoylechinasäure, die auch als Neochlorogensäure bzw. Chlorogensäure bezeichnet werden (vgl. Abbildung 2.6). Im Kernobst steht die Chlorogensäure im Vordergrund. Im Steinobst sind es die Neochlorogensäure und die Chlorogensäure, mit Ausnahme der Kirschen, bei denen die 3-*p*-Cumaroylchinasäure dominiert. Glucoseester der Hydroxyzimtsäuren sind z.B. in Beerenobst zu finden.

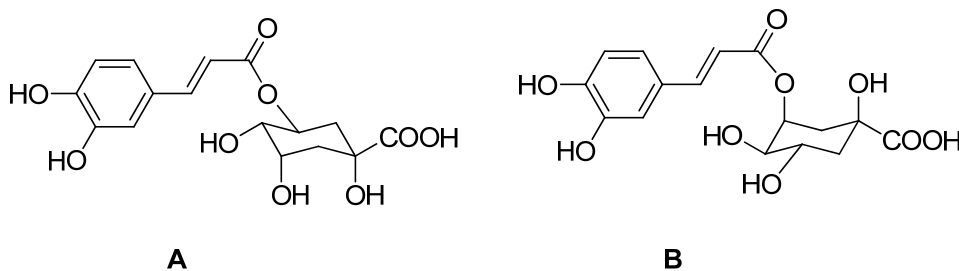


Abbildung 2.6 Strukturformeln der Chlorogensäure (A) bzw. Neochlorogensäure (B)

In Äpfeln kommen sehr geringe Mengen an freier Kaffeesäure (0-7,3 mg/kg) vor. 5-Kaffeoylechinasäure (32,7-487,6 mg/kg) und 4-*p*-Cumaroylchinasäure (9,1-140,4 mg/kg) dominieren die Zusammensetzung phenolischer Verbindungen (Kahle *et al.* 2005). Außerdem wurden geringe Mengen an Kaffeoyle-, *p*-Cumaroyl- und Feruloylglucose nachgewiesen (Risch und Herrmann 1988, Schieber *et al.* 2001, Gliszczynska-Swiglo und Tyrakowska 2003, Will *et al.* 2007). In Sorbus-Arten dominiert die 1-Kaffeoylechinasäure mit einem Gehalt von bis zu 1500 mg/kg (Clifford 1999). Des Weiteren wurde berichtet, dass das Auftreten von Di-Kaffeoyleweinsäure charakteristisch für *Echinacea purpurea* (Wills und Stuart 1999) und das von *meso*-Weinsäure-Konjugaten für Spinat typisch ist (Clifford 1999).

Die Verteilung der Phenolcarbonsäuren im pflanzlichen Gewebe ist nicht homogen. Sie befinden sich überwiegend in den Randschichten der Pflanzen. So sind z.B. in der Kartoffel 50% der Kaffeesäure in der Schale sowie im angrenzenden Gewebe lokalisiert (Brandl und Herrmann 1984). Einen entscheidenden Einfluss besitzt auch das Reifestadium der untersuchten Früchte. So verringerte sich der Gehalt an Kaffeoylechinasäuren

in Maulbeeren auf ein Viertel bis ein Drittel des ursprünglichen Gehaltes während des Reifevorgangs, der Gesamtphenolgehalt hingegen stieg stark an (Oki *et al.* 2006). Auch ein Einfluss der Anbaubedingungen und der Temperatur wird vermutet (Wang und Zheng 2001). Eine statistische Auswertungen der Studien lässt allerdings darauf schließen, dass genetische Faktoren zur Erklärung der Unterschiede wichtiger sind als die Umweltbedingungen (Clifford 2000b).

2.2.2.2 Flavonoide

Die Gruppe der Flavonoide hat die größte Bedeutung unter den Pflanzenphenolen. Sie leiten sich alle vom Flavan (= 2-Phenyl-benzodihydropyran) ab und haben somit einen $C_6C_3C_6$ -Grundkörper. Derzeit sind etwa 4000-5000 verschiedene Strukturen von Flavonoiden bekannt (Anderson und Markham 2006), die sich anhand der Oxidationsstufe der Kohlenstoffatome in Position zwei, drei und vier in mehrere Untergruppen einteilen lassen (Anderson und Markham 2006). Diese sind die Flavan-3-ole und deren Polymere, die sog. Procyanidine, die Flavandiole (3,4-Dihydroxyflavane), die Flavanone (4-Oxoflavane), die Flavone (3-Oxoflav-2-ene), die Flavonole (3-Hydroxy-4-oxo-flav-2-ene), die Dihydrochalkone und die Anthocyane (vgl. Abbildung 2.7).

Die einzelnen Verbindungen der Untergruppen unterscheiden sich durch die Zahl und die Position der Hydroxyl- und/oder Methoxygruppen. Die Catechine und die Procyanidine kommen in der Natur meist frei vor, wohingegen die Anthocyanidine, die Flavonole, die Flavanone und die Dihydrochalkone in der Regel glycosidisch gebunden vorliegen. Dies führt zu einer erhöhten Löslichkeit im Pflanzenzellsaft und stabilisiert sie zudem gegenüber Licht und enzymatischen Abbauvorgängen (Watzl und Leitzmann 2005). Als Zuckerbausteine sind dabei u. a. Glucose, Rhamnose, Galactose, Arabinose und Xylose in Form von Mono-, Di- oder Oligosacchariden, meist β -glycosidisch mit dem Aglykon verknüpft (Harborne 1994). Die Bindung an Zucker erfolgt *O*-glycosidisch bevorzugt in Position 3, 7, 3' und 4' bzw. *C*-glycosidisch in Position 6 und 8 (Cuyckens und Claeys 2004).

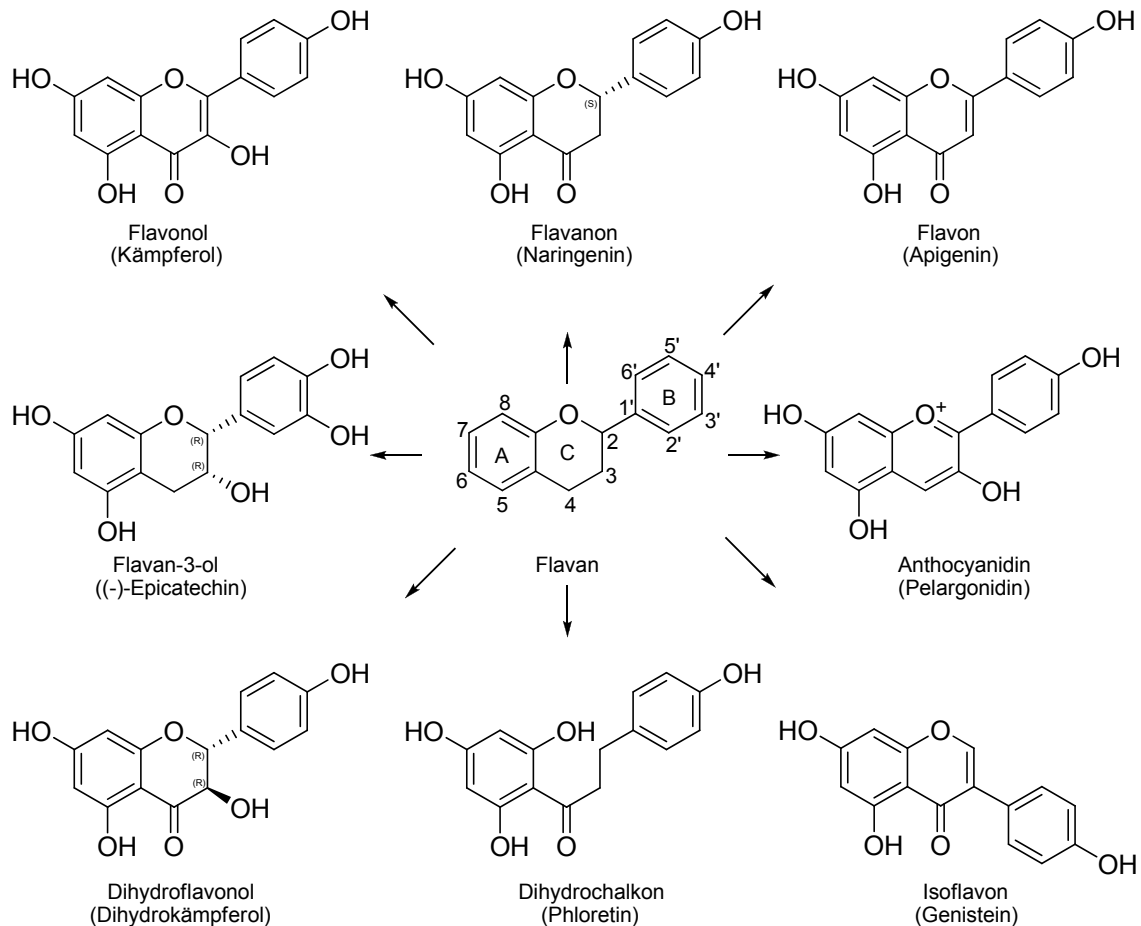


Abbildung 2.7 Strukturmerkmale von Flavonoid-Unterklassen mit ausgewählten Beispielen

Die leicht gelbe Färbung der **Flavonole** (vgl. Abbildung 2.7) gab der Stoffgruppe der Flavonoide (flavus = gelb) ihren Namen. Die bevorzugte Bindungsstelle des Zuckers ist bei dieser Untergruppe die Position 3, seltener die Position 7. Flavonole sind in zahlreichen Obst- und Gemüsesorten vertreten. Häufig kommen bis zu zehn, manchmal auch mehr verschiedene Flavonolglycoside in Früchten vor. Zwischen einzelnen Varietäten gibt es kaum qualitative, bisweilen aber große quantitative Unterschiede. Große Mengen finden sich v.a. in Zwiebeln (Quercetinglycoside). In Früchten wurden nur in Äpfeln, Aprikosen und schwarzen Johannisbeeren Gehalte über 15 mg/kg an Quercetinglycosiden nachgewiesen (Hollman und Arts 2000).

Flavone sind gelb gefärbte Substanzen (vgl. Abbildung 2.7), die ebenfalls meist glycosidisch gebunden in der Pflanze vorliegen. Die Flavone treten vorwiegend als 7-O-Glycoside in Erscheinung, seltener als 6-C- oder 8-C-Glycoside (Kiehne und Engelhardt 1996, Hollman und Arts 2000). Hohe Gehalte wurden vor allem in Rotklee und Tee nachgewiesen.

Isoflavone (vgl. Abbildung 2.7) haben im Gegensatz zu allen anderen Flavonoiden als Grundstruktur das 3-Phenylchroman. Bisher sind 60 verschiedene Stoffe dieser Klasse identifiziert worden. Abhängig von der Art, der geographischen Lage und Umweltbedingungen gibt es eine hohe Variabilität in qualitativer und quantitativer Zusammensetzung bei einzelnen Pflanzen (Eldridge und Kwolek 1983, MacDonald *et al.* 2005). Hohe Gehalte finden sich in verschiedenen Kleearten, Sandelholz und der Rinde von Pflaumenbäumen, vor allem jedoch in Leguminosen, hier insbesondere in Soja (Cassidy *et al.* 2000). Isoflavone kommen in Pflanzen sowohl als Aglykon (Daidzein, Genistein) als auch glycosidisch gebunden vor. Letztere können zusätzlich noch acetyliert oder malonyliert vorliegen (Cassidy *et al.* 2000). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum 17β -Estradiol haben sie, wie auch die Lignane (s. Kap. 2.2.2.3), in hohen Dosen eine schwache geschlechtshormonelle Wirkung auf den Menschen. Sie zählen deshalb zu den Phytoestrogenen.

Flavanone und **Dihydroflavonole** (vgl. Abbildung 2.7) sind biochemisch verwandte Verbindungen mit einer eng begrenzten Verbreitung. Sie haben einen gesättigten C-Ring, der sich in alkalischer Umgebung leicht unter Bildung des Chalkons bzw. Dihydrochalkons öffnet. Die Reaktion ist in saurem Medium reversibel (Tomás-Barberán und Clifford 2000b). In der Natur treten bei den Flavanonen gewöhnlich nur 2S-konfigurierte Isomere auf, allerdings wurden während der Extraktion Isomerisierungsreaktionen beobachtet. Im Gegensatz hierzu sind die Dihydroflavonole meist 2R,3R konfiguriert, es sind aber auch einzelne Dihydroflavanole mit 2S,3S bzw. 2R,3S-Konfiguration bekannt (Anderson und Markham 2006). Flavanone sind charakteristische Verbindungen für Zitrusfrüchte und liegen in der Pflanze nur glycosiliert vor. Den Zuckerrest bilden vorwiegend an Position 7 glycosidisch gebundene Rutinose (6-O- α -L-Rhamnosyl-D-glucose) oder Neohesperidose (2-O- α -L-Rhamnosyl-D-glucose). In süßen Orangen wurden auch 4'-O-Glucoside nachgewiesen (Robards *et al.* 1997). Die Flavanon-7-glycoside der Rutinose, wie Hesperidin, sind geschmacklos, wohingegen die 7-O-Neohesperidoside, wie Neohesperidin und Naringin, für den Bittergeschmack der Zitrusfrüchte verantwortlich sind. Die freien Aglykone Hesperitin und Naringenin sind hingegen geschmacklos. Durch Ringöffnung und Hydrierung kann aus diesen jeweils das entsprechende süß schmeckende Dihydrochalkon gebildet werden. Das Dihydrochalkon des Naringins (Naringenin-7-O-rhamnoglucosid) und des Neohesperidins (Hesperetin-7-O-neohesperidosid) besitzt eine um den Faktor 250 bzw. 2000 höhere

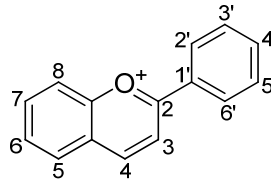
Süßkraft als Saccharose (Baltes 2007). In Säften aus süßen Orangen der Sorte Valencia fanden sich Hesperidin-Konzentrationen bis zu 584 mg/l, allerdings kein Naringin (Galensa *et al.* 1986). Letzteres findet sich mit bis zu 1000 mg/l vor allem in Säften aus Grapefruit und Pomelos (Rouseff *et al.* 1987). Im essbaren Teil getrockneter Früchte liegt der Anteil bei bis zu 2% Hesperidin und 1,5% Naringenin (Kawaii *et al.* 1999), trockene Orangenschalen enthalten sogar bis zu 7% Hesperidin (Tomás-Barberán und Clifford 2000b).

Dihydrochalkone haben im Gegensatz zu allen anderen Flavonoiden eine offene Ringstruktur. Sie werden als charakteristische Verbindungen des Apfels und dessen Verarbeitungsprodukten wie Saft, Püree oder Cidre betrachtet (Tomás-Barberán und Clifford 2000b, Ehrenkranz *et al.* 2005), obwohl vor einigen Jahren auch geringe Konzentrationen (49 mg/kg Trockengewicht) in einigen Erdbeeren-Sorten gefunden wurden (Hilt *et al.* 2003). In Äpfeln wurden bisher Phloridzin (Phloretin-2'-*O*-glucosid), Phloretin-2'-*O*-xyloglucosid, 3-Hydroxyphloridzin sowie Phloretin-2'-*O*-xylogalactosid nachgewiesen. Sowohl der Gehalt als auch die Zusammensetzung der Phloretin-glycoside variiert sortenabhängig stark (Kahle *et al.* 2005, Wu *et al.* 2007, Nybom *et al.* 2008).

Die **Anthocyanidine** unterscheiden sich von den übrigen Flavonoiden durch ihre positive Ladung am Sauerstoff des C-Rings (Flavyliumkation). Ihr Name ist auf die griechischen Wörter „anthos“ (Blüte) und „kyanos“ (blaue Farbe) zurückzuführen. Sie sind in fast allen heimischen Obstarten und Südfrüchten vertreten. Große Mengen finden sich vor allem in Heidelbeeren, in denen die Anthocyane bis zu 1,5% (bezogen auf das Frischgewicht) enthalten sind, wobei die in der Natur am häufigsten vorkommenden Anthocyanidine Cyanidin, Peonidin, Pelargonidin, Malvidin, Delphinidin und Petunidin, in Abbildung 2.8 dargestellt sind.

In pflanzlichem Gewebe liegen sie ausschließlich als Anthocyanidinglycoside (Anthocyane), bevorzugt als 3-*O*- und 5-*O*-glycosid, vor (Clifford 2000a). Als Zuckerrest treten vor allem die Monosaccharide Glucose, Galactose und Arabinose sowie das Disaccharid Rutinose oder Kombinationen dieser auf. Ferner sind Rhamnose, Sophorose (6-*O*- β -D-Glucosyl-D-glucose), Sambubiose (6-*O*- β -D-Xylosyl-D-glucose) zu finden. Der Zucker kann außerdem acyliert sein. Verbindungen mit Kaffee-, *p*-Cumar-, Ferula-, Sinapin-, Essig-, Malon- und Oxalsäure sind ebenfalls bekannt (Clifford 2000a). In Abhängigkeit vom pH-Wert treten bei Anthocyanen starke Farbveränderungen auf. Das

Flavylumkation ist nur bei niedrigen pH-Werten stabil (<1) und geht mit steigendem pH-Wert durch Anlagerung eines Hydroxid-Anions an das C2-Atom in die farblose Carbinolbase über. Bei pH-Werten > 6 kommt es durch Bildung der chinoiden Form bzw. ionischen Anhydrobase durch Abspaltung von Wasser wieder zu einer Farbvertiefung. Durch Ringöffnung entsteht aus der ionischen Anhydrobase bei pH-Werten > 7 das gelbe Chalkon (Mazza und Miniati 1993).



	Position						
	3	5	6	7	3'	4'	5'
Cyanidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Peonidin	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H
Pelargonidin	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Malvidin	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
Delphinidin	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Petunidin	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OH

Abbildung 2.8 Strukturen der natürlich am häufigsten vorkommenden Anthocyanidine

Die letzte Gruppe der Flavonoide stellen die **Flavan-3-ole** dar. Die monomeren Flavan-3-ole sind farblose Verbindungen, die in der Natur meist in freier Form oder als 3-O-Gallat, seltener als Glycoside vorliegen. Der Zucker ist *O*-glycosidisch entweder an Position 3 oder 5 gebunden (Plumb *et al.* 1998, Xu *et al.* 2007).

In der Pflanze liegen neben den monomeren Formen auch die oligomeren oder polymeren Flavan-3-ole vor, welche als Proanthocyanidine (PAC) bezeichnet werden. Als sog. kondensierte Gerbstoffe stellen diese die zweite Gruppe der Tannine dar und können im Gegensatz zu den Ellagtanninen durch verdünnte wässrige Säuren nicht mehr oder nur zu einem geringen Teil hydrolytisch gespalten werden. Abgesehen von Lignin stellen die PAC den größten Teil der pflanzlichen Phenole. Ihren Namen erhielten die PAC aufgrund ihrer charakteristischen oxidativen Depolymerisation in sauren organischen Lösungen, bei der rot gefärbte Anthocyane gebildet werden.

Die PAC bestehen aus monomeren Flavan-3-ol-Einheiten, die meist über eine C4→C8, seltener über eine C4→C6-Bindung verknüpft sind. Dieser Verknüpfungstyp wird als B-Typ bezeichnet. Existiert eine zusätzliche Etherverknüpfung zwischen C2→C7 der Monomeren, so zählt man diese zu den A-Typ-Proanthocyanidinen (vgl. Abbildung

2.9). Neben der üblichen 2β -O7-Verknüpfung wurden in Kakao auch A-Typ-PAC mit einer 2β -O2-Verknüpfung gefunden (Porter *et al.* 1991).

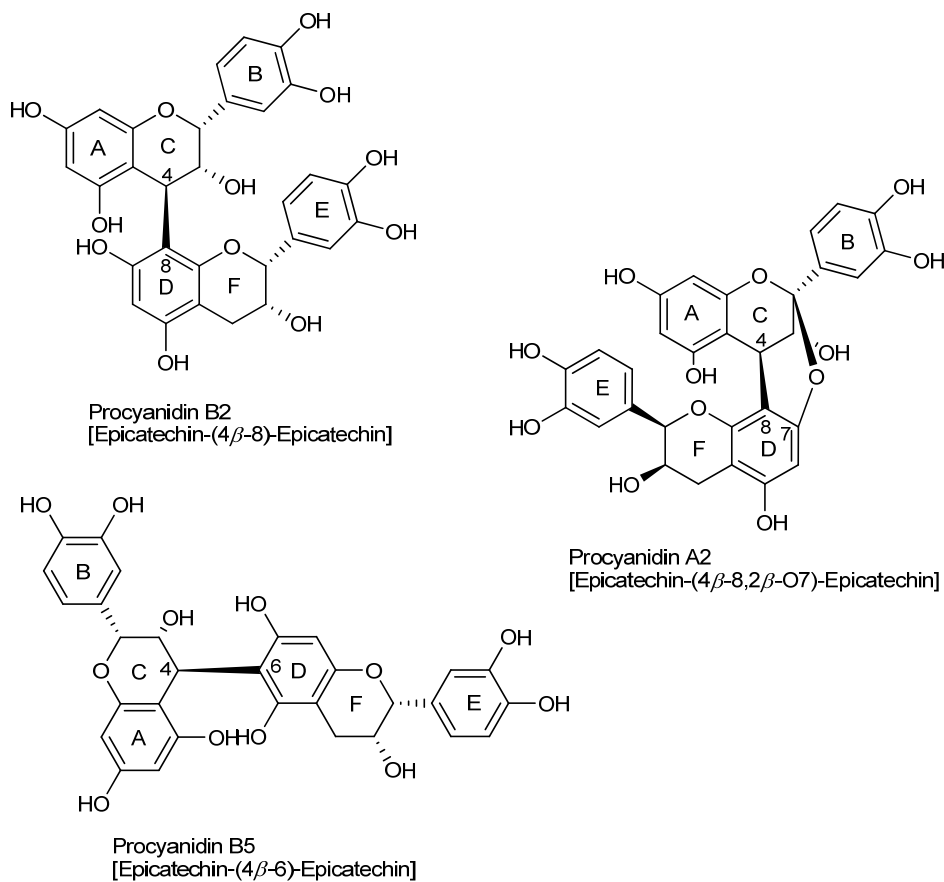


Abbildung 2.9 Beispiele für A- und B-Typ Procyanidine

Abhängig vom Substitutionsmuster der Flavan-3-ol-Einheiten gibt es eine Vielzahl von (unterschiedlichen) Unterklassen; In Abbildung 2.10 sind die meist verbreiteten Monomere dargestellt. Nur aus Catechin- und Epicatechin-Einheiten bestehende PAC werden als Procyanidine bezeichnet und stellen die größte Gruppe der PAC in Pflanzen dar. Die weniger verbreiteten Monomere (Epi)afzelechin und (Epi)gallocatechin bilden die Propelargonidine bzw. die Prodelphinidine. Auch die 5-Deoxy-flavan-3-ole hat man als Bestandteile von PAC gefunden.

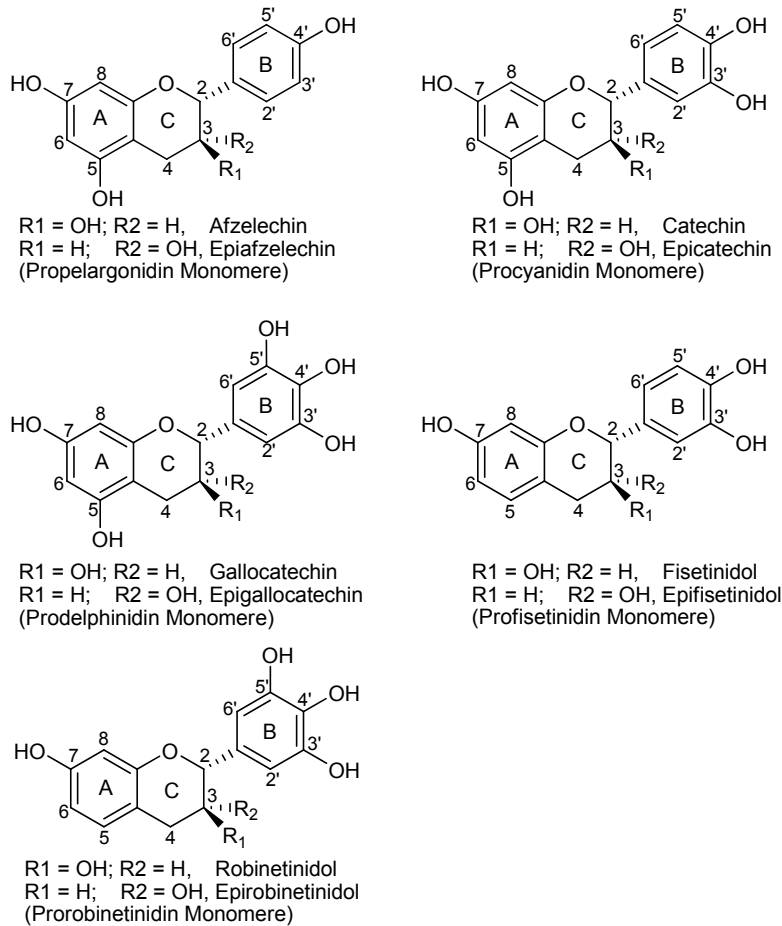


Abbildung 2.10 Strukturen der meist verbreiteten Proanthocyanidin-Monomere

Eine Pflanzengattung besitzt meist eine für sie charakteristische Proanthocyanidin-zusammensetzung. So enthält das Mark der Peka-Nuss (*Carya illionensis*) vorwiegend Prodelphinidin (Prodelphinidin : Procyanidin = 6 : 1), die Rinde der Kiefer (*Pinus radiata*) hochpolymeres Procyanidin, das Holz des Quebrachobaums (*Schinopsis balansae* var. *chaqueno*) vorwiegend Profisetinidin und Prorobinetinidin und der Apfel (*Malus silvestris*) Procyanidin mit einem niedrigen Polymerisationsgrad. In Rotwein wurden auch farbige Copolymere aus Catechinen und Anthocyanen nachgewiesen (Mateus *et al.* 2002).

Die Angaben über die Gehalte an Flavan-3-olen beziehen sich meist nur auf die Monomere und die Oligomere mit bis zu 3 Einheiten. Der Menge an polymeren PAC in Pflanzen und Früchten wurde in der Vergangenheit keine große Aufmerksamkeit geschenkt. Hohe Gehalte an Flavan-3-olen finden sich vor allem in Kakao (40,8 g/kg), Tee (6-20 g/kg TG), Cranberry (2335 mg/kg) und Wildheidelbeeren (3320 mg/kg) (Prior und Gu 2005, Gu *et al.* 2006, Perva-Uzunalic *et al.* 2006, Neto *et al.* 2008).

Procyanidine (PC) besitzen eine große strukturelle Vielfalt, die sich aus den vier möglichen monomeren Einheiten (2*R*,3*S*)-Catechin, (2*S*,3*R*)-ent-Catechin, (2*R*,3*R*)-Epicatechin und (2*S*,3*S*)-ent-Epicatechin, den verschiedenen Verknüpfungsmöglichkeiten der Interflavanoid-Bindung und der variierenden Kettenlänge (Polymerisationsgrad) ergibt. In der Natur dominieren die Diastereomere (2*R*,3*S*)-Catechin und (2*R*,3*R*)-Epicatechin. Bezogen auf die Stereochemie der Bindungen an C2 und C3 hat Epicatechin eine *trans*- und Catechin eine *cis*-Konfiguration. Die stereochemische Orientierung der Bindung zwischen den Monomeren an Position 4 wird nach der IUPAC- α,β -Nomenklatur angegeben (Hemingway *et al.* 1982).

Procyanidine tragen entscheidend zum Geschmack von procyanidinreichen Lebensmitteln wie Tee und Schokolade bei. So besitzen PC mit geringer Molekularmasse (M_r) vorwiegend einen bitteren Geschmack. Mit zunehmender Molekülgröße nimmt dieser ab und es tritt ein adstringierender Geschmack auf (vgl. Abbildung 2.11), der auf der Bindung der Polymeren an Speichelproteine beruhen soll (Lea und Arnold 1978, Hofmann *et al.* 2006, Renard Catherine *et al.* 2007).

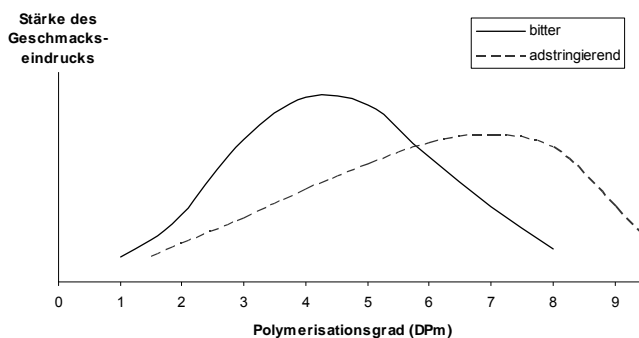


Abbildung 2.11 Zusammenhang zwischen Polymerisationsgrad (DPm) der Procyanidine und Geschmackseindruck (nach Lea und Arnold 1978)

2.2.2.3 Lignane und Stilbene

Lignane (vgl. Abbildung 2.12) zeichnen sich durch dimere C_6C_3 -Körper (Phenylpropanoide) aus, die über das β -C-Atom miteinander verknüpft sind. Unterschiedliche Strukturvarianten ergeben sich durch die Anordnung und Verknüpfung der C_3 -Seitenketten. Den Lignanen, die in Getreide und faserreicher Nahrung vorkommen, werden u.a. estrogenen Wirkungen zugeschrieben (Otto 2000). In Flachssamen leisten sie mit Gehalten von 1 - 15 g/kg einen entscheidenden Beitrag am antioxidativen Potential. Im Getreidekorn können sie in Konzentrationen bis zu 2,3 mg/kg vorkommen. Deutlich höhe-

re Konzentrationen wurden insbesondere in den äußeren Bestandteilen des Getreidekorns, der Kleie, gefunden. Hier fand man nach saurer Hydrolyse Gehalte von bis zu 6,3 mg/kg, nach enzymatischer Hydrolyse der Zellwände stieg der Anteil sogar um das 2 bis 70-fache (Meagher und Beecher 2000, Muir 2006, Oboh und Rocha 2007).

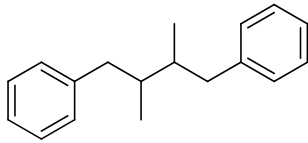


Abbildung 2.12 Grundstruktur der Lignane

Die Grundstruktur der **Stilbene** leitet sich vom 1,2-Diphenylethen ($C_6C_3C_6$ -Grundkörper) ab, wobei am Ethen zwei isomere Formen möglich sind. Beide Isomere, *cis*- und *trans*-Stilben, kommen natürlich in Pflanzen vor und sind bei Raumtemperatur stabil. Wie bei den meisten Verbindungen mit einer disubstituierten Doppelbindung ist das *trans*-Isomer thermodynamisch stabiler.

Ein bekanntes Stilbenderivat ist Resveratrol (3,5,4'-Trihydroxy-*trans*-stilben, Abbildung 2.13), welches mit der gesundheitsfördernden Wirkungen von Rotwein in Verbindung gebracht wird. Als freies Aglykon ist es im Rotwein in Mengen von 0,3 – 7,0 mg/l und glycosidisch gebunden in Mengen von bis zu 15,0 mg/l enthalten. Deutlich höhere Mengen mit bis zu 32,5 mg/kg konnten in der Schale von roten Trauben nachgewiesen werden (Chu *et al.* 1998, Careri *et al.* 2003).

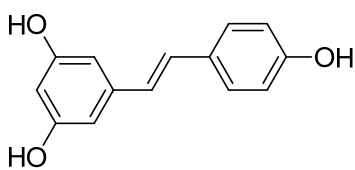


Abbildung 2.13 Struktur von Resveratrol

Eine Reihe von Stilbenderivaten besitzt hormonartige Wirkung; des Weiteren konnten *in vitro* antikanzerogene und antiinflammatorische Effekte nachgewiesen werden (Chavez *et al.* 2008, Sun *et al.* 2008).

2.2.3 Biosynthese von Polyphenolen

Die Biosynthese der Flavonoide beginnt im Phenylpropanoid-Stoffwechsel (Grisebach und Barz 1969, Forkmann und Heller 1999). Hier wird in mehreren Schritten aus der aromatischen Aminosäure Phenylalanin aktivierte *p*-Cumarsäure synthetisiert (vgl. Abbildung 2.14). Die eigentliche Flavonoidbiosynthese geht von drei Molekülen Malonyl-CoA, die den A-Ring bilden werden, und der aktivierten Cumarsäure, die den B-Ring sowie die Kohlenstoffatome 2, 3 und 4 des C-Rings bilden wird, aus. Diese kondensieren unter Einwirkung der Chalkonsynthase über ein Zwischenprodukt zu einem primär gebildeten Chalkon, welches entweder enzymatisch oder spontan zum Naringenin cyclisiert.

Die biogenetischen Zusammenhänge zwischen verschiedenen Flavonoid-Klassen, wie sie sich hauptsächlich auf Grund von Versuchen mit isotopenmarkierten Vorstufen *in vivo* ergaben, sind in Abbildung 2.15 zusammengestellt (Knaggs 2000, Knaggs 2003). Das Naringenin ist das Ausgangsprodukt einer Vielzahl von weiteren Syntheseschritten. Durch Einwirken der Flavonsynthase II (FNSII) entsteht nach einem Dehydrierungsschritt das Apigenin (Flavon). Die Isoflavonoide werden durch Umlagerung des B-Rings durch die 2-Hydroxyisoflavonsynthase (2-HIS) und anschließende Dehydratisierung gebildet. Durch die Flavon-3-Hydroxylase (F3H) wird das Naringenin hingegen zu Dihydrokämpferol (Dihydroflavonol) hydroxyliert, welches selbst wieder Ausgangsprodukt für die Biosynthese der Flavonole und der Flavan-3,4-diole ist. Letztere werden durch enzymatische Dehydrierung zu den Anthocyanidinen bzw. Dehydroxylierung zu den Flavan-3-olen umgewandelt. Durch verschiedene Enzyme können diese Verbindungen am A- oder B-Ring hydroxyliert und/oder methyliert werden. Den letzten Schritt der Biosynthese stellt bei den meisten Flavonoiden die *O*-glycosidische Bindung an einen Zucker (Knaggs 2000).

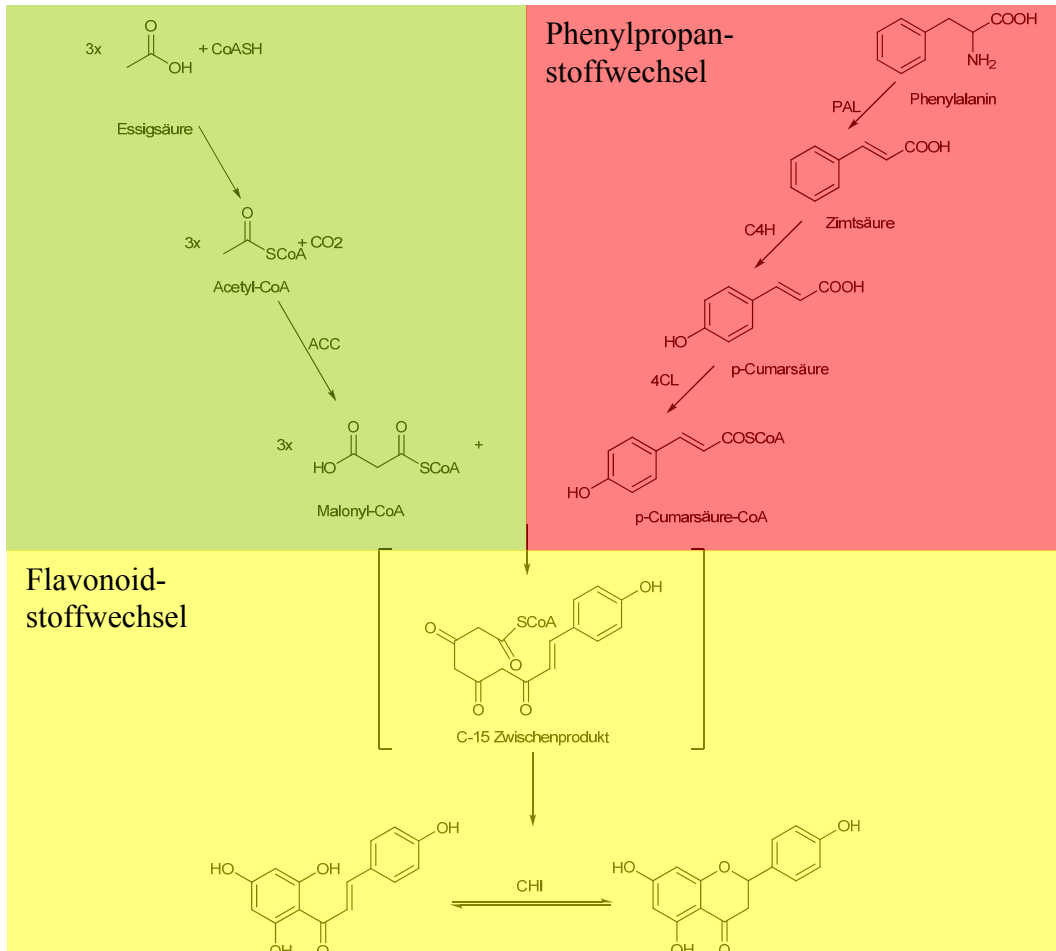


Abbildung 2.14 Biosynthese des Flavanons Naringenin, welches die Ausgangssubstanz aller weiteren Flavonoide darstellt. ACC: Acetyl-CoA-Carboxylase, PAL: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, C4H: Zimtsäure-4-Hydrolase, 4CL: Cumarat-CoA-Ligase, CHS: Chalconsynthase, CHI: Chalconisomerase (nach Forkmann und Heller 1999)

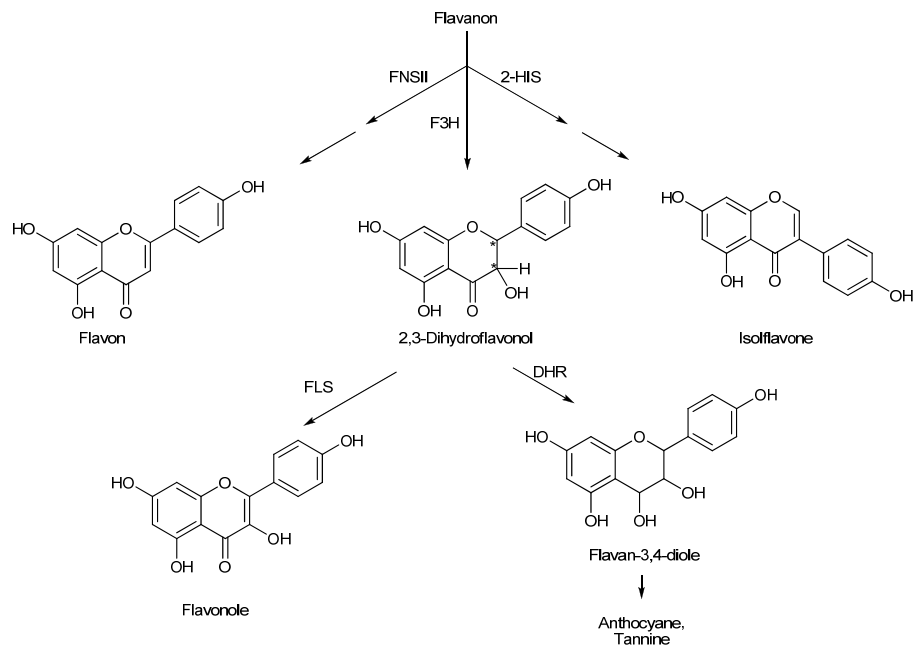


Abbildung 2.15 Biogenetischer Zusammenhang zwischen einzelnen Flavonoid-Klassen. F3H: Flavonoid-3-Hydroxylase, FNSII: Flavonsynthase II, 2-HIS: 2-Hydroxyisoflanonsynthase, FLS: Flavonolsynthase, DHR: Dihydroflavonolreduktase (Knaggs 2000, Knaggs 2003)

2.2.4 Funktion der Polyphenole in Pflanzen

In Pflanzen erfüllen Flavonoide eine Vielzahl wichtiger Funktionen. So verleihen Flavonole der Blüte eine gelbliche Färbung. Komplexierungen der Anthocyane mit Metallionen wie Eisen-, Magnesium- und Aluminiumionen führen abhängig vom pH-Wert der Zellsaftvakuole zu einer roten bis blauen Färbung. Dies hat zur Folge, dass Flavonoide, vor allem aufgrund ihrer stark UV-fluoreszierenden Eigenschaften, als visuelle Lockstoffe sehr gut auf Insekten wirken (Harborne 1994, Cooper-Driver 2001).

Flavonoide wirken außerdem als Regulatoren von Wachstums- und Differenzierungsvorgängen in der Zelle (Formica und Regelson 1995, Brown *et al.* 2001). Diese Eigenschaft wird darauf zurückgeführt, dass Flavonoide in der Lage sind, den Auxinspiegel (Pflanzenhormon) zu beeinflussen. So konnte die Arbeitsgruppe um Murphy (2000) zeigen, dass Flavonole wie Quercetin und Kämpferol ähnlich dem synthetischen Transportinhibitor Naphthylphthalaminsäure (NPA), einem Herbizid, den Auxintransport inhibieren können. Weiterhin spielen Flavonoide eine wichtige Rolle bei der Keimung des Pollenkorns und dem Pollenschlauchwachstum. Untersuchungen zeigten, dass Flavonoid-Mangel-Mutanten von Mais steril waren, so wie auch transgene *Petunia hybrida*-Pflanzen, bei denen durch eine Blockade des Biosyntheseweges die Akkumulation von Flavonolen im Pollen unterdrückt wurde. Von außen dem Pollenkorn, den Antheren, oder der Narbe zugeführtes Kämpferol konnte *in vitro* sowie *in vivo* die Keimfähigkeit des Pollens, das Pollenschlauchwachstum und die Fertilität der Pflanzen wiederherstellen (Shahidi und Naczek 2003, Watzl und Leitzmann 2005).

Einige Flavonoide können antibiotisch, antiviral und fungizid wirken (Harborne und Williams 2000) und sind nach Induktion durch biotische oder abiotische Stressfaktoren (Elicitoren) als Phytoalexine (pflanzliche Abwehrstoffe) an der Abwehr von Schadorganismen beteiligt. Studien an *Pisum sativum* belegten für die Pterocarpane Maackiain und Pisatin eine typische Phytoalexinwirkung bei der Interaktion mit dem Pilz *Nectria haematococca* (Dixon und Steele 1999). Catechine und andere Flavan-3-ole spielen ebenfalls eine wichtige Rolle im Abwehrsystem der Pflanze gegenüber Schädlingen (Scalbert und Haslam 1987, Matthews *et al.* 1997, El Modafar und El Boustani 2005). Als Wirkmechanismus wird hierbei die Inaktivierung der Pathogene durch eine Phenol-Protein-Fällung (Gerbung) diskutiert (Hebert *et al.* 2002).

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

Vereinzelt wurde berichtet, dass Flavonoide einen gewissen Fraßschutz gegenüber Herbivoren vermitteln. Beispielsweise wurden in Blättern der Reispflanze als Antwort auf eine Nematodeninfektion erhöhte Konzentrationen des Flavanons Sakuranetin gefunden. Entsprechend schützen Isoflavone in Klee die Wurzel vor Fraßfeinden, wie dem Käfer *Costelytra zealandica* oder die Blätter von *Trifolium subterraneum* vor Befall durch die Milbe *Halotydeus destructor* (Harborne und Williams 2000).

Des Weiteren kommt den Flavonoiden bei der Katalyse der Elektronentransportprozesse in den Photosynthese betreibenden Zellen eine Schlüsselrolle zu (Harborne und Williams 2000), was sich u.a. in ihrer Akkumulation in den äußeren, dem Licht zugewandten Schichten wie Blattepidermis, Blüten und Früchten widerspiegelt (Shirley 1996). Zudem dienen die Flavonoide, wie auch pflanzliche Phenolcarbonsäuren, dem Schutz vor Schädigung durch intensive UV-Strahlung (Reuber *et al.* 1996). Die Schutzfunktion besteht zum einen in der Absorption der UV-B-Strahlung (Harborne und Williams 2000), zum anderen in der Wirkung als effektive Antioxidantien in Form von Radikalfängern für UV-induzierte reaktive Sauerstoffspezies (Larson 1988, Kondo und Kawashima 2000, Kaneda *et al.* 2006). In einigen Untersuchungen wurde gezeigt, dass Pflanzen auf UV-B-Strahlung sogar mit einer vermehrten Synthese von Flavonoiden reagieren (Shirley 1996, Harborne und Williams 2000, Kim *et al.* 2001, Agarwal 2007).

2.2.5 Ernährungsphysiologische Bedeutung von Polyphenolen

Schon in den 30iger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden die ersten Beobachtungen zur biologischen Wirksamkeit von Polyphenolen gemacht. Szent-Györgyi wies in Zusammenarbeit mit Rusznyák nach, dass eine Mischung aus den Flavonen Eriodictyol und Hesperidin in der Lage war, die Kapillarpermeabilität und –fragilität *in vitro* zu

verringern. Aufgrund dieser Eigenschaft schlugen die Autoren den Namen Vitamin P für die Flavonoide vor (Rusznayk und Szent-Györgyi 1936).

Seitdem wurden eine Reihe epidemiologischer Studien durchgeführt, um die biologische Wirksamkeit von Flavonoiden auf den menschlichen Organismus zu untersuchen. So hat man in der Zutphen-Elderly-Studie (Hertog *et al.* 1993) und in der Finnish Mobile Clinic-Studie (Knekt *et al.* 2002) eine negative Korrelation zwischen der Flavonoidaufnahme und dem Risiko für koronare Herzerkrankungen (KHK) nachgewiesen. Eine kürzlich durchgeführte klinische Studie (placebokontrolliert, doppelblind), bei der über einen Zeitraum von 6 Wochen flavanolreicher Kakao verabreicht wurde, konnte allerdings die Hinweise aus den oben angeführten Studien nicht bestätigen (Byrd John *et al.* 2007).

Die Ergebnisse epidemiologischer Studien in Bezug auf das Krebsrisiko sind auch nicht eindeutig. So wurde von Hertog und Mitarbeitern eine inverse Korrelation zwischen der Flavonoidaufnahme und dem Risiko, an einer Krebserkrankung des Verdauungstraktes zu erkranken, nachgewiesen (Hertog *et al.* 1994). Einen Einfluss auf das allgemeine Krebsrisiko bzw. die Krebssterblichkeit wurde jedoch nicht festgestellt. In der Iowa Women's Health Study wurde eine Abnahme des Lungenkrebsrisikos bei (ehemaligen) Rauchern belegt, die eine hohe Aufnahme von Procyanidinen und Gesamtflavonoiden vorwiesen. Allerdings gab es keine Hinweise auf die Verringerung des Lungenkrebsrisikos bei Nichtrauchern (Cutler *et al.* 2008). Bei einer in Hawaii durchgeführten Fall-Kontroll-Studie mit 582 Lungenkrebspatienten und ebenso vielen Kontrollpersonen aus der Bevölkerung wurde jedoch wieder ein inverser Zusammenhang zwischen dem Lungenkrebsrisiko und der Aufnahme von Flavonoiden beschrieben (Le Marchand *et al.* 2000). Kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Magenkrebs und dem Flavonoid-Verzehr wurde dagegen in einer spanischen Fall-Kontroll-Studie gefunden. Allerdings weisen die Autoren auf einen Trend zu einem geringeren Risiko hin und vermerken auch, dass ein hoher Verzehr an Kämpferol schützend wirkte (Garcia-Closas *et al.* 1999).

Insgesamt kann aus den bisher durchgeführten Studien geschlossen werden, dass sowohl die Flavonoide nicht auf alle Krebsarten in gleicher Weise protektiv wirken, als auch, dass sich die Flavonoid-Subklassen in Bezug auf ihre gesundheitsfördernden Eigenschaften voneinander unterscheiden.

Neben epidemiologischen Studien sind es hauptsächlich *in vitro* sowie tierexperimentelle Untersuchungen, aus denen physiologische Wirkungen von Flavonoiden abgeleitet werden. Derzeit existiert eine kaum zu überschauende Anzahl an *in vitro* Untersuchungen über positive Effekte von Flavonoiden. Nachfolgend wird ein kurzer Überblick über die am häufigsten untersuchten Eigenschaften gegeben.

2.2.5.1 Antioxidative Eigenschaften

Der menschliche Körper ist ständig dem Einfluss reaktiver Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies (ROS bzw. RNS) ausgesetzt, die endogen bei bestimmten, im Körper ablaufenden Prozessen wie der Zellatmung in den Mitochondrien, bei Entzündungsreaktionen, in Phagozyten oder beim Abbau von DNA-Basen entstehen. Daneben können sie auch unter dem Einfluss exogener Faktoren wie UV-Strahlung, Chemikalien und Arzneimitteln, kanzerogenen Verbindungen oder Zigarettenrauch entstehen (Kohen und Nyska 2002, Kuhn Merrily 2003). Zu diesen reaktiven Spezies zählen freie Radikale, wie das Hydroxylradikal (HO^\bullet), das Superoxidradikalanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) und das Stickstoffdioxidradikal (NOO^\bullet), aber auch nicht radikalische Verbindungen wie Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid, Ozon oder Peroxynitrit (Halliwell 1997).

Dem menschlichen Körper stehen neben enzymatischen Schutzmechanismen, wie beispielsweise der Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase, auch Antioxidantien, wie etwa β -Carotin, α -Tocopherol und L-Ascorbinsäure zur Beseitigung dieser reaktiven Moleküle zur Verfügung (Ji und Leichtweis 1997, Chandra *et al.* 2000, Finkel und Holbrook 2000). Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Bildung und Eliminierung der ROS zu Gunsten deren Entstehung führt zu oxidativem Stress (Sies 1991, Kohen und Nyska 2002). Die überschüssigen reaktiven Sauerstoffspezies reagieren mit Zellmembranen, DNA und Proteinen. Diese werden durch die hierbei ablaufenden Oxidationsreaktionen modifiziert und in ihrer Funktion beeinträchtigt. Oxidativer Stress wird mit zahlreichen Erkrankungen, wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Alzheimer, Katarakt, Parkinson, Diabetes mellitus und auch mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht (Poulsen *et al.* 1998, Zarkovic 2000, Ruel *et al.* 2005, LeWitt und Taylor 2008, Ramakrishna und Jaiikhani 2008).

Insbesondere die antioxidative Wirkung von Polyphenolen soll eine besondere Rolle bei deren präventiven Effekten im Hinblick auf die Entstehung verschiedener Krankheiten spielen. Aufgrund ihrer niedrigen Redoxpotentiale sind diese Substanzen thermo-

dynamisch in der Lage, ROS bzw. RNS durch Abgabe eines Wasserstoffatoms zu reduzieren und damit zu deaktivieren. Das als Zwischenstufe auftretende Phenoxyradikal ist im Vergleich zu den freien Radikalen weniger reaktiv (Bors *et al.* 1990) und kann durch Reaktion mit weiteren Radikalen in die stabile Chinon-Struktur übergehen (Abbildung 2.16) (Pietta 2000, Sekher Pannala *et al.* 2001).

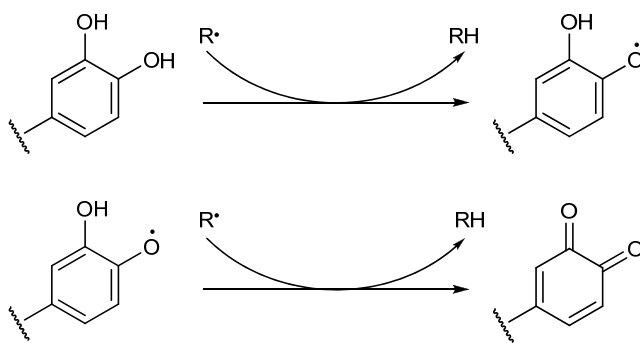


Abbildung 2.16 Prinzip der antioxidativen Wirkung bei Flavonoiden (Pietta 2000)

Phenol selbst ist als Antioxidans inaktiv. Voraussetzung für die Reaktivität gegenüber Radikalen sind Alkylgruppen in *ortho*- oder *para*-Position zur Hydroxylfunktion des Phenols (Shahidi und Wanasundara 1992). Reagiert ein freies Radikal mit einem Flavonoid, so kann das entstehende Radikal über das konjugierte π -Elektronensystem des Flavonoids delokalisiert und stabilisiert werden; eine Radikalkettenreaktion wird damit unterbunden (Abbildung 2.16). Polyphenole gelten daher als Radikalfänger, was in vielen *in vivo*- und *in vitro*-Studien bewiesen wurde.

Die antioxidative Kapazität wird meist mit dem TEAC-Test (Trolox Equivalent Antioxidative Capacity) bestimmt und in Troloxäquivalenten angegeben. Hierbei sind für die Polyphenole nachfolgend aufgeführte Struktur-Wirkungs-Beziehungen bekannt.

Bei Phenolcarbonsäuren wird die antioxidative Kapazität mit der Säuregruppe und der Zahl an Hydroxylgruppen am aromatischen Ring in Verbindung gebracht. Hydroxymzimtsäuren sind hierbei effektivere Antioxidantien als Hydroxybenzoesäuren, da erstere eine erhöhte Zahl an Doppelbindungen besitzen und somit das Radikal stärker delokalisiert werden kann. Benzoesäuren und Zimtsäuren ohne aromatische Hydroxylgruppen besitzen keine antioxidative Kapazität. Di- und Trihydroxylierungen erhöhen den TEAC-Wert, wobei die Position des Substituenten einen wichtigen Einfluss hat. So führen Hydroxylgruppen in Position 2 und 4 oder in 3, 4 und 5 zur stärksten antioxidativen Kapazität. Benachbarte Hydroxylgruppen wie bei Protocatechusäure sind im Vergleich zur *meta*-Stellung weniger vorteilhaft. Auch elektronengebende Substituenten wie Me-

thylgruppen erhöhen den TEAC-Wert. In der Folge ist Vanillinsäure ein besseres Antioxidans als Hydroxybenzoesäure (Miller und Rice-Evans 1997).

Für Flavonoide gelten leicht veränderte Struktureigenschaften als Kriterien für eine maximale antioxidative Kapazität (vgl. Abbildung 2.17). So erhöht eine 3',4'-Dihydroxy-Substitution des B-Rings die Delokalisation des Phenoxyradikals. Eine weitere Erhöhung kann durch eine 2,3-Doppelbindung in Kombination mit einer Ketogruppe in Position 4 des C-Rings erreicht werden. Die größte Elektronendelokalisation und damit das höchste Radikalfängerpotential kann durch die Kombination der Hydroxylgruppen in Position 3 und 5 im C- bzw. A-Ring mit der Ketogruppe in Position 4 des ungesättigten C-Rings erreicht werden (Li *et al.* 2008). Quercetin ist eines der effektivsten Antioxidantien, da es alle Kriterien erfüllt. Catechin, dem die 2,3-Doppelbindung in Kombination mit der 4-Keto-Gruppe fehlt, ist weniger wirksam. Kämpferol, dem die 3'-Hydroxylgruppe fehlt, hat eine deutlich geringere antioxidative Kapazität als Quercetin. Die Bedeutung der 3-Hydroxylgruppe des C-Rings wird durch die signifikante Reduktion der antioxidativen Kapazität durch Glycosilierung der 3-Position, wie in Quercetin-3-*O*-rutinosid (Rutin) gezeigt, deutlich.

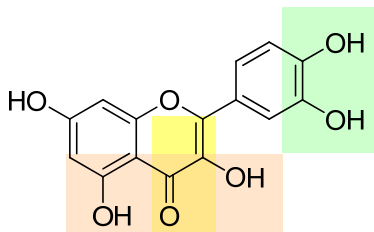


Abbildung 2.17 Struktur-Wirkungsbeziehung der antioxidativen Kapazität von Flavonoiden am Beispiel Quercetin (Li *et al.* 2008)

Beibehaltung der *o*-Dihydroxygruppe des B-Rings mit Sättigung der 2,3-Doppelbindung, wie dies bei Flavanolen der Fall ist, verhindert die Delokalisierung des B-Ring-Phenoxyradikals, wie es beim Vergleich von Quercetin und Dihydroquercetin gezeigt wurde. In Abwesenheit der 3',4'-Dihydroxygruppe im B-Ring, wie z.B. bei Kämpferol, hat die Reduktion der 2,3-Doppelbindung (Dihydrokämpferol) wenig Einfluss auf die antioxidative Kapazität (Rice-Evans *et al.* 1996, Rice-Evans und Miller 1998).

Eine weitere wichtige Eigenschaft von Flavonoiden besteht in der Fähigkeit, freie zweiwertige Kationen zu chelatisieren. Diese Ionen, wie Cu^{2+} - oder Fe^{2+} -Ionen, wirken entweder an sich prooxidativ oder vermögen oxidative Prozesse zu katalysieren (Haber-

Weiss-Reaktion). In der Folge sind Flavonoide gute Inhibitoren der Lipidperoxidation. In verschiedenen *in vitro*- und auch in einigen *in vivo*-Studien zeigten z. B. Catechin und Quercetin hohe Affinität, mit Cu^{2+} - oder Fe^{2+} -Ionen Chelat-Komplexe zu bilden und sie auf diese Weise in ihrer Eigenschaft als Prooxidans unwirksam zu machen (Paganga *et al.* 1996, Van Acker *et al.* 1998, Kuo *et al.* 2001, Melidou *et al.* 2005). Zusätzlich sind Flavonoide in der Lage, zahlreiche Enzyme, die an der Entstehung von freien Sauerstoffradikalen beteiligt sind, wie z. B. Xanthinoxidase, Proteinkinase C, Cyclooxygenase und Lipoxygenase, zu hemmen (Pietta 2000, Kim *et al.* 2008, Sarawek *et al.* 2008).

2.2.5.2 Herz-Kreislauf-Erkrankungen

In klinischen Studien wurde gezeigt, dass der Konsum von Polyphenolen die Parameter für Herz-Kreislauf-Erkrankungen günstig beeinflusst. Zu diesen gehört eine gesteigerte Lipidplasmakonzentration, ein erhöhter Cholesterinspiegel, die Konzentration an oxidiertem *low-density lipoprotein* (LDL) – einem Lipoproteinpartikel im Blutplasma –, eine erhöhte Thrombozytenaggregation (Blutplättchenaggregation) sowie eine verminderte Gefäßelastizität.

Einen Überblick über die aktuell diskutierten Mechanismen der Polyphenole auf das kardiovaskuläre System gibt Abbildung 2.18. Auf einige wird im Nachfolgenden näher eingegangen.

In einer Studie an fettreich ernährten Hamstern wurde gezeigt, dass nach der Behandlung mit einer Mischung aus verschiedenen Flavonoiden sowohl die Plasmatriglyceride und das Gesamtcholesterin als auch die Konzentration an freien Fettsäuren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant abnahmen (Narender *et al.* 2006). Wood (2004) untersuchte einen möglichen Einfluss der Ernährung auf Effekte, die auf Flavonoide zurückgeführt werden. Hierbei stellte er fest, dass die Blutfettwerte im Vergleich zu jeweiligen Kontrollgruppe nur in der fettreich, aber nicht in der stärkereich ernährten Gruppe signifikant verringert wurden. Ein möglicher Mechanismus der Blutfettsenkung nach Lee *et al.* (1999) stellt die Hemmung der Schlüsselenzyme des Cholesterinmetabolismus, Hydroxymethyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA)-Reduktase und Acyl-CoA-cholesterolacyltransferase (ACAT) dar.

Des Weiteren spielt die oxidative Modifizierung von LDL durch ROS eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese von Arteriosklerose (Staprans *et al.* 2005). Flavonoide können

durch ihre Radikalfänger-Eigenschaften die LDL-Teilchen vor Oxidation schützen und damit Herz-Kreislauf-Erkrankungen vorbeugen (Chopra *et al.* 2000). Ferner zeigte die Arbeitsgruppe um De Whalley (1990), dass eine Reihe von Flavonoiden, u.a. Quercetin, die Oxidation von LDL durch Makrophagen hemmt. Die gleichzeitige Gabe von Rutin und einem weiteren (hydrophilen oder lipophilen) Antioxidans führte zu synergistischen Effekten beim Schutz vor LDL-Oxidation (Milde *et al.* 2004).

Die Thrombozytenaggregation ist eine kritische Reaktion, die während der Initiation koronarer Thrombose stattfindet. Daher spielt eine verminderte Thrombozytenaggregation bei der Prävention von Herzinfarkt sowie von Schlaganfällen eine Rolle. Des Weiteren hat die Thrombozytenaggregation einen wichtigen Einfluss auf die Entwicklung und die Stabilität von arteriosklerotischen Plaques (George 2000). Eine *ex vivo* Studie zur Thrombozytenfunktion in Anwesenheit von Flavan-3-olen und Procyanidinen zeigte dosisabhängig eine erniedrigte Thrombozytenaktivierung und -aggregation (Neiva *et al.* 1999, Rein *et al.* 2000). Um den Mechanismus aufzuklären, wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt. Hierbei wurde gezeigt, dass z.B. die Flavonoide aus *Gingko biloba* die Thrombozytenaggregation verringern, da sie in der Lage sind, das Ansteigen des Cytoplasma- Ca^{2+} -Spiegels in den Thrombozyten zu unterdrücken und das cAMP-Level (cyclisches Adenosinmonophosphat) anzuheben (Dutta-Roy *et al.* 1999). Auch eine Hemmung der Thrombozytenfunktion durch die Bindung von Flavonoiden, insbesondere von Flavonen, an den Thromboxan A_2 -Rezeptor wird diskutiert (Guerrero *et al.* 2005).

Daneben ist die Endotheldysfunktion ein entscheidendes Ereignis in der Entwicklung von KHK. Die normale physiologische Funktion des arteriellen Endotheliums ist von essentieller Bedeutung für die Regelung des Blutdrucks und des Blutflusses zu Organen und Geweben. Klinische Studien bewiesen einen Zusammenhang zwischen Endotheldysfunktion und Bluthochdruck (Campia und Panza 2007). Studien an isolierten Zellen zeigten, dass Polyphenole die NO-Produktion der Endothelzellen steigern können (Andriambelason *et al.* 1997). Als Mechanismus werden die Steigerung der K^+ - und Ca^{2+} -Freisetzung, sowie eine Inhibierung der Endothel-Phosphodiesterase PDE_1 , PDE_2 und PDE_4 diskutiert (Zhang *et al.* 2000, Peluso 2006). Auch eine verringerte Plasmakonzentration an ROS wird mit einer gefäßschützenden Wirkung in Verbindung gebracht (Duarte *et al.* 2001).

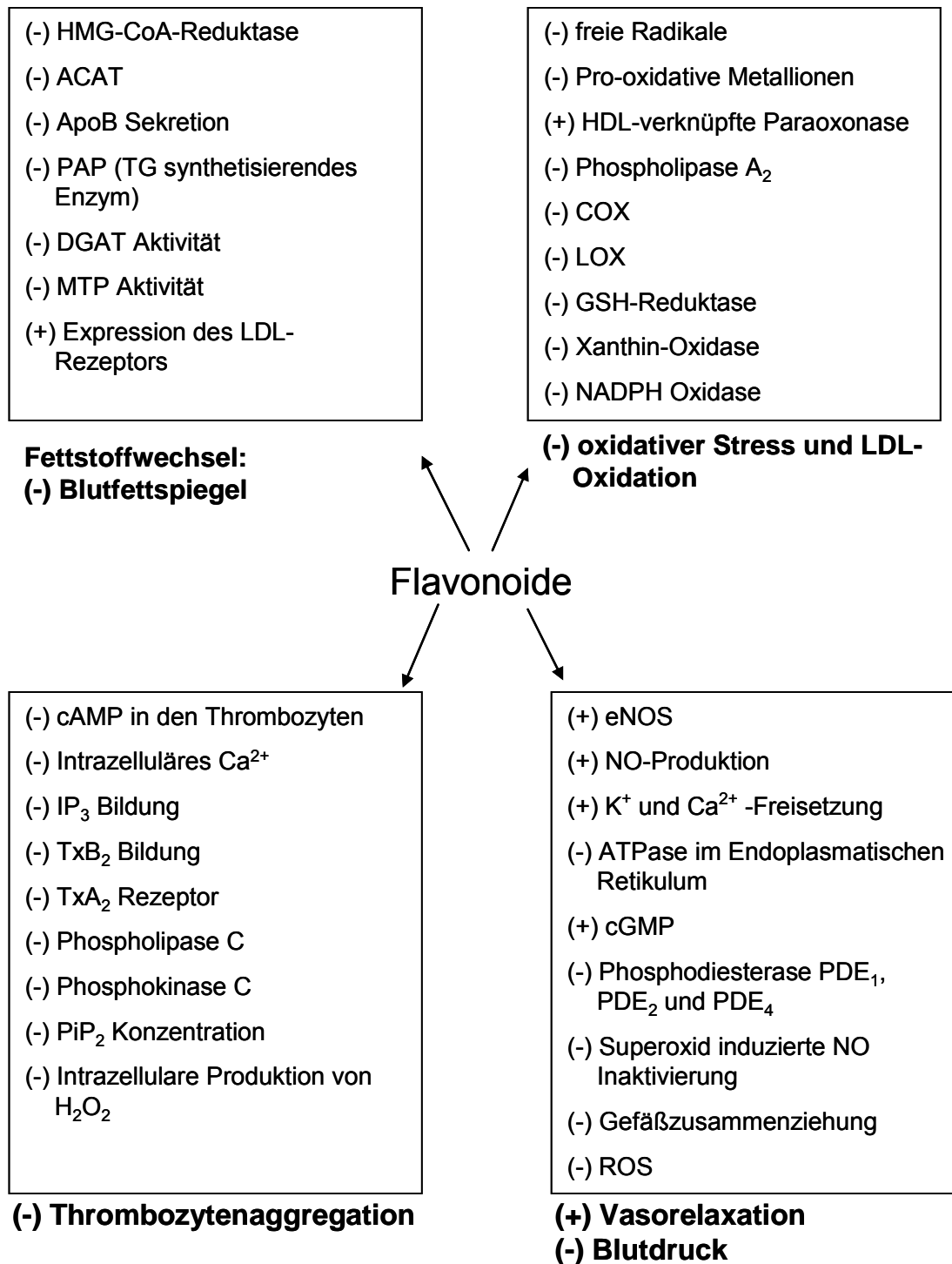


Abbildung 2.18 Einfluss der Flavonoide auf das kardiovaskuläre System (nach Harnafi et al. 2007)
 (+) Aktivierung oder Zunahme; (-) Inhibierung oder Abnahme; ACAT: Acyl-CoA Cholesterin-Acyltransferase; cAMP: cyclisches Adeninmonophosphat; DGAT: Diacylglycerin-Acyltransferase; eNOS: endotheliale Stickoxidsynthase; GSH Reduktase: glutathion Reduktase; HMG-CoA Reduktase: Hydroxymethylglutary-CoA-Reduktase; IP₃: Inositoltriphosphat; LCAT: Lecithincholesterin-Acyltransferase; MTP: Microsomales Triglyceridtransferprotein; PAP: Phosphatidat-Phosphohydrolase; PDE: Phosphodiesterase; PIP₂: Phosphat-didyinositolbiphosphat ROS: Reaktive Sauerstoffspezies; TG: Triacylglycerin; TxA₂: Thromboxan A₂; TxB₂: Thromboxan B₂

2.2.5.3 Schutz vor Krebserkrankungen

Flavonoide werden auch im Rahmen der Krebsprävention intensiv untersucht, da Ergebnisse zahlreicher *in vitro* und tierexperimenteller Untersuchungen darauf hindeuten, dass eine hohe Aufnahme von Flavonoiden durch Obst und Gemüse mit einem geringeren Risiko, an Magen-, Dickdarm- und Brustkrebs zu erkranken, einher geht (Grimmer *et al.* 1992, Bailey und Williams 1993, Hirano *et al.* 1994, Watzl und Rechkemmer 2001). So stellten Bailey und Williams (1993) die These auf, dass die Krebsrate durch Umstellung der Ernährung auf pflanzliche Kost durchschnittlich um 35% vermindert werden könne, wobei für Magen und Dickdarmkrebs eine Verringerung um 90%, für Krebs an Gebärmutter Schleimhaut, Gallenblase, Gebärmutterhals, Mund, Rachen und Speiseröhre eine Reduktion um 20% und für andere Krebsarten um 10% erreichbar sein soll (Bailey und Williams 1993). Heute steht man diesen Angaben allerdings sehr skeptisch gegenüber.

Krebs ist im allgemeinen Sprachgebrauch ein Sammelbegriff für eine Vielzahl verwandter Krankheiten, bei denen Körperzellen unkontrolliert wachsen, sich teilen und gesundes Gewebe verdrängen und zerstören. Das ältere so genannte „Dreistufenmodell“ gliedert die Krebsentstehung in drei Phasen: Initiation, Promotion und Progression (vgl. Abbildung 2.19). Heutzutage geht man von einem „Mehrschrittmodell“ der Krebsentstehung aus, bei dem durch Anhäufung mehrerer Mutationen in einer einzelnen Zelle diese so in ihrem Proliferations- und Differenzierungsverhalten verändert wird, dass letztendlich über benigne (gutartige) Zwischenstufen ein maligner (bösartiger) Zustand mit Metastasierung erreicht wird. Mit diesem Modell kann vor allem die Entstehung von Dickdarmkrebs sehr gut erklärt werden. Kernpunkt dieser Hypothese ist, dass für die Auslösung von Dickdarmkrebs Mutationen an mehreren Genen stattfinden müssen (z.B. Aktivierung von Onkogenen und Inaktivierung von Tumor-Supressor-Genen). Die Akkumulation dieser Läsionen ist vermutlich ein entscheidender Schritt in der Entstehung von Krebs (Finlay 1993). Da im Bezug auf dieses Kanzerogenesemodell jedoch noch wenige Informationen über mögliche modulierende Wirkungen der Flavonoide vorliegen, werden die Ausführungen im Folgenden auf das klassische Dreistufenmodell begrenzt.

Demnach können Flavonoide in die verschiedenen Stufen der Krebsentstehung eingreifen und somit eine chemopräventive Wirkung ausüben. In Abbildung 2.19 sind mögliche Mechanismen der Tumor-Chemoprävention durch Flavonoide zusammengefasst.

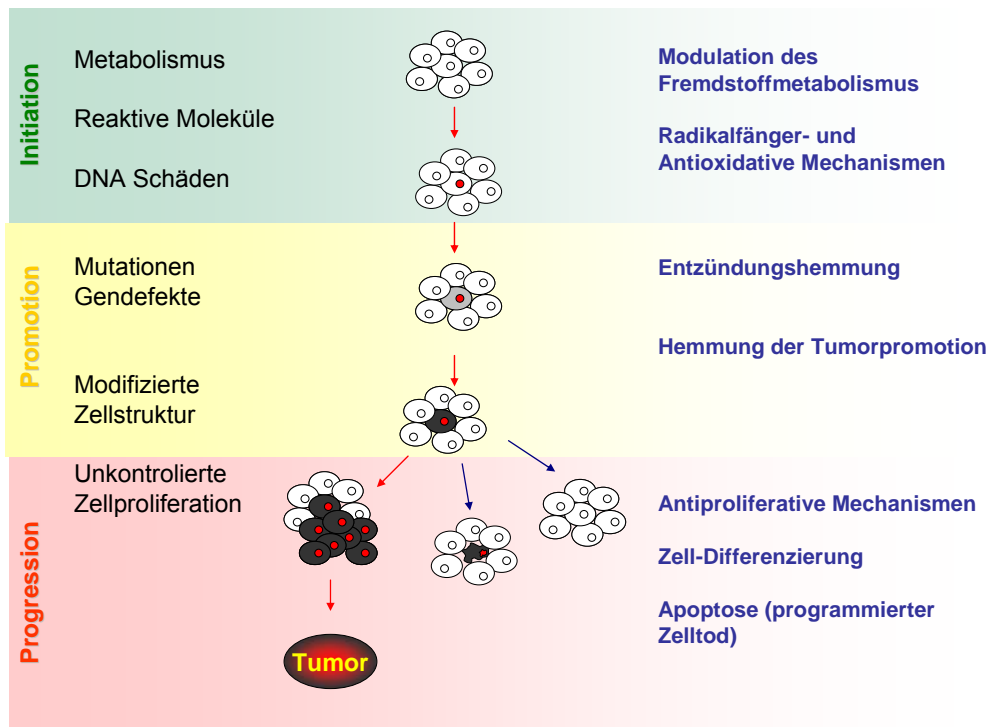


Abbildung 2.19 Stufen zellulärer Kanzerogenese (links) und Wirkmechanismen von Flavonoiden in der Chemoprävention (abgeändert nach Gerhäuser 2001).

In jeder Zelle liegen Gene für die Entstehung einer Krebszelle vor, deren Expression normalerweise blockiert ist. Die Krebsentstehung wird durch Kanzerogene (Strahlen, Viren, chem. Substanzen) ausgelöst, deren Wirkung auf genotoxischen sowie nicht-genotoxischen Mechanismen beruhen kann. Die **Initiation** beinhaltet eine kurzfristige und unwiderrufliche Wechselwirkung zwischen dem Kanzerogen und dem Genom des Zielgewebes. Sie besteht aus mehreren Einzelschritten an deren Ende die transformierte DNA steht. Werden initiierte Zellen durch **Promotoren** in ihrer Zellregulation beeinflusst, kann es zur Tumorbildung kommen. Promotoren sind nicht-genotoxische Substanzen, die die Kanzerogenese steigern. Sie bewirken, dass es zu vermehrtem Auftreten von DNA-Schäden und zur Modulation der Regulationsmechanismen der Proliferation, wie beispielsweise zur Überexpression verschiedener Enzyme (Ornithin-Decarboxylase, DNA-Polymerasen) kommt. Die **Progression** schließt sich an die Promotionsphase an und stellt die letzte Entwicklungsphase eines Tumors dar, die durch invasives Wachstum und/oder Metastasenbildung gekennzeichnet ist (Depeint *et al.* 2002).

Steht die Zelle unter oxidativem Stress – d.h. die zelleigenen enzymatischen sowie nicht-enzymatischen antioxidativen Systeme sind nicht mehr in der Lage, die reaktiven Sauerstoffspezies abzufangen – können diese u.a. mit der DNA reagieren. Polyphenole tragen durch ihre antioxidativen Eigenschaften dazu bei, diese schädlichen Radikale abzufangen und so Lipoproteine (Rice-Evans und Packer 2003), Lipide (Huang und Frankel 1997) und die zelluläre DNA (Arimoto-Kobayashi *et al.* 2003, Cheng *et al.* 2004) vor oxidativer Schädigung zu schützen. Auf diese Weise unterstützen die Polyphenole die antioxidativen Schutzmechanismen im menschlichen Organismus aktiv und wirken dem Auftreten von oxidativem Stress und seinen Folgen entgegen.

Phase-I-Enzyme (z.B. Cytochrom-P450-abhängige Monoxygenasen) katalysieren Reaktionen, bei denen eine polare Gruppe in das Molekül eingeführt wird. Hierdurch wird die Hydrophilie und damit die Ausscheidung der Substanz verbessert. Als Zwischenprodukte entstehen durch Epoxidbildung, Hydroxylierung und Dealkylierung teilweise elektrophile Kanzerogene, die mit den nukleophilen Zentren in der DNA reagieren können (Depeint *et al.* 2002). Flavonoide unterbinden durch Hemmung dieser Enzyme die Aktivierung von Prokanzerogenen und schützen auf diese Weise die DNA. Dahingegen führt die Induktion von Phase-II-Enzymen, wie z. B. der Glutathion-S-Transferase, der UDP-Glucuronyltransferase, oder der Chinonreduktase durch Flavonoide zu einer intensivierte Ausscheidung von Kanzerogenen und damit zu deren verstärkter Detoxifikation. Auf diese Weise verhindern Flavonoide eine Tumor-Initiation (Talalay *et al.* 1995, Patel und Maru 2008).

In einer Studie an Ratten wurde nach Verabreichung des Kanzerogens 4-Nitrochinolin-1-oxid gezeigt, dass die Aktivität der Phase-I-Enzyme Cytochrom P450, Cytochrom B5 Reduktase, Cytochrom P450 Reduktase und Aryl-Kohlenwasserstoff-Hydroxylase nach der Gabe von polyphenolreichem grünem Tee-Extrakt im Vergleich zur Kontrolle signifikant abnahm. Gleichzeitig stieg die Aktivität der Phase-II-Enzyme Glutathion-S-Transferase und UDP-Glucuronyl-Transferase deutlich an (Srinivasan *et al.* 2008). Auch das Flavonol Quercetin ist *in vitro* in der Lage, die Aktivität von Cytochrom P450 1A2, einem Prokarzinogen-aktivierenden Isoenzym der Cytochrom-P450 Familie, bereits in einer Konzentration von 0,1 μM um 50% zu verringern (Kang *et al.* 2004).

Es wird auch angenommen, dass chronische Entzündungsprozesse bei der Krebsentstehung – vor allem im Bereich des Verdauungstraktes (chronische Gastritis oder Pankreatitis) – einen großen Beitrag leisten. Bei diesen Entzündungsprozessen spielt der

Arachidonsäurestoffwechsel eine wichtige Rolle. Hierbei wird aus Membran-Phospholipiden Arachidonsäure freigesetzt, aus der anschließend durch Cyclooxygenasen (*COX*) die Prostaglandine und durch Lipoxygenasen (*LOX*) die Leukotriene gebildet werden, welche wichtige Entzündungsmediatoren darstellen (Zhang und Salomon 2005). Polyphenole, insbesondere Quercetin, vermögen die Freisetzung der Arachidonsäure durch die Phospholipase A_2 zu hemmen (Welton *et al.* 1988). Des Weiteren gelten einige Polyphenole als potente Inhibitoren der *LOX* und der *COX-2*. In Tumorgewebe wurde Überexpression von *COX-2* im Vergleich zu unverändertem Gewebe nachgewiesen und trägt dort durch eine PGE₂-vermittelte Apoptose-Resistenz zur Tumorphorprogression bei (Tsuji *et al.* 2001, Turini und DuBois 2002). Eine Hemmung dieser Überexpression durch Polyphenole würde somit einen weiteren Teilaspekt des protektiven Effektes der Polyphenole im Rahmen der Krebsentstehung erklären und wurde bereits in Studien mit Polyphenol-Extrakten aus Rotwein und schwarzem Tee *in vivo* nachgewiesen (Luceri *et al.* 2002).

Bei der Kanzerogenese ist v.a. das Verhältnis zwischen Zellproliferation und Apoptose (programmierter Zelltod) gestört, so dass es zu einem ungehemmten Zellwachstum und in der Folge zur Ausbildung von Tumoren kommt. Polyphenole wirken als effektive Inhibitoren von Enzymen der Signaltransduktion. So hat man durch Quercetin-Applikation in Karzinomzelllinien (mittels 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) transformierte Mäuse-Fibroblasten-Zellen) eine Hemmung der Proteinkinase C beobachtet, die in die Regulation der Mitose involviert ist (Lee und Lin 1997). In anderen Studien wurde weiterhin eine reduzierte Enzymaktivität bzw. eine Reduktion der Enzymsynthese der für das Fortschreiten des Zellzyklus verantwortlichen Enzyme, wie z.B. MAP-Kinasen und Cyclin D1, nachgewiesen (Orner *et al.* 2003, Patel *et al.* 2008). Auch eine Hemmung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR), der vor allem bei Brust-, Blasen-, Magen- und Lungentumoren verstärkt exprimiert wird (Salomon *et al.* 1995, Grandis *et al.* 1996) und Einflüsse auf das Migrations-, Proliferations- oder Differenzierungsverhalten der Zellen hat, wurde durch verschiedene Gruppen nachgewiesen (Lee *et al.* 2004, Fridrich *et al.* 2007b).

Ein weiterer essentieller Mechanismus ist die Induktion der Apoptose durch Flavonoide. So belegen eine Vielzahl von *in vitro*-Studien die Fähigkeit einer Reihe von Flavonoiden, den programmierten Zelltod in verschiedenen Krebszelllinien zu induzieren (Han *et al.* 2007, Park *et al.* 2008, Winkelmann *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2008). Die hierfür zugrunde liegenden Wirkmechanismen scheinen vielfältig zu sein. In der Literatur wer-

den u.a. die Regulation der Expression von Hitzeschock-Proteinen (Ochel und Gademann 2002), die Verminderung der Expression von anti-apoptotischen Faktoren wie Bcl-2, Bcl-X (L) und NF- κ B (Wenzel *et al.* 2000), sowie die Freisetzung von Cytochrom C mit resultierender Aktivierung von Caspasen 3 und 9 (Wenzel *et al.* 2000, Han *et al.* 2007, Park *et al.* 2008) beschrieben. Erst kürzlich wurde nachgewiesen, dass das Flavanon Hesperidin bei einer Konzentration von 100 μ M in der Lage ist, den Apoptose-Faktor Caspase-3 zu induzieren und in der Folge die Zellzahl der menschlichen Kolonzelllinie SNU-C4 nach 24 h um 35% zu verringern (Park *et al.* 2008).

Eine Verminderung der Expression von Protoonkogenen, wie z. B. H-Ras und c-myc (Csokay *et al.* 1997) sowie die Hochregulierung der Expression des Tumorsuppressorgens p53 (Ganguly *et al.* 2005) durch Flavonoide trägt ebenfalls zu deren antiproliferativen Wirkung bei. Einige Flavonoide sind sogar in der Lage, die Differenzierung von Zellen zu fördern (Middleton *et al.* 2000). So stellten beispielsweise Takahashi und Mitarbeiter fest, dass Quercetin und Genistein die Differenzierung der Leukämie-Zelllinie HL-60 auslösen (Takahashi *et al.* 1998).

2.2.5.4 Weitere biologische Effekte

Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde für einige Flavonoide eine **antivirale** Wirkung nachgewiesen, welche auf unterschiedlichen Mechanismen zu beruhen scheint. So hat man gezeigt, dass Quercetin die Infektiosität von Herpes-simplex-Viren Typ 1, Polio-Viren Typ 1 und Parainfluenza-Viren Typ 3 reduziert, da das Flavonol in der Lage ist, die intrazelluläre Replikation zu verringern (Kaul *et al.* 1985). Für das Flavonol 3-Methylkämpferol ist eine Inhibierung der RNA-Synthese von Polio-Viren nachgewiesen (Kaul *et al.* 1985, Gonzalez *et al.* 1990). Auch auf die Replikation von HI-Viren üben Flavonoide eine Hemmwirkung aus. Hier zeigte v.a. das dimere Flavon 2'',3''-Dihydrochonaflavon-7''-O-methylether aus der *Ochna integerrima* mit einem EC₅₀-Wert von 0,9 μ g/ml (\approx 1,6 μ M) eine herausragende Aktivität (Reutrakul *et al.* 2007). Quercetin hingegen erreichte erst bei einer Konzentration von 40 μ M eine 80%ige Hemmung der HIV-1 Replikation (Gatto *et al.* 2002). Baicalein und Genistein waren in der Lage, die Infektiosität von Zytomegalieviren zu verringern, indem sie den Eintrittsprozess in die Wirtszelle blockieren bzw. mit Proteinen interagieren, die für die Infektion essentiell sind (Evers *et al.* 2005). Auch bei Anti-HIV-Wirkung wurde ein ähnlicher

Mechanismus nachgewiesen. Hierbei wird der Eintritt von HIV in die Wirtszelle behindert, indem Baicalein die Fusion mit den Wirtszellrezeptoren CXCR4 und CCR5 hemmt (Li *et al.* 2000). Weiterhin konnte ein inhibitorischer Einfluss auf verschiedene Influenza-Viren, inklusive der Typen A/H1N1, A/H3N2 und B, gezeigt werden. Die untersuchten Catechine und Theaflavine zeigten eine Hemmung der Hämagglutination. Eine Galloyl-Gruppe in Position 3 konnte diese nochmals steigern. Weitere Ansätze demonstrieren, dass Catechine die virale Aufnahme behindern, indem sie mit dem viralen Hüll-Protein gp41 interagieren (Liu *et al.* 2005) oder indem sie die Oberfläche von CD-4 positiven T-Zellen so verändern, dass die Bindung von viralem gp120 behindert wird (Kawai *et al.* 2003).

Auch **gegenüber Bakterien** zeigten die Flavonoide eine außerordentliche **Hemmwirkung**. So kann der Zusatz von Quercetin zu Zahnpasten das Wachstum vieler gramnegativer Bakterien und Aktinomyceten (grampositiv) verringern (Ammar *et al.* 1990). Des Weiteren wurde eine **antifungale** Wirkung verschiedener Flavonoide wie z.B. dem Isoflavon Hildegardiol nachgewiesen (Meragelman *et al.* 2005). Die Wirkung von Cranberry-Saft gegen Harnwegsentzündungen wird auf die darin enthaltenen Procyanidine zurückgeführt, da diese in der Lage sind, die Zelladhäsion von *Escherichia coli* im Harntrakt zu verhindern (Howell *et al.* 2005).

Eine weitere wichtige Eigenschaft, die vor allem einige Flavone ausüben, ist deren **Bindung an den Benzodiazepinrezeptor** und die demzufolge mögliche Beeinflussung des Zentralnervensystems. Benzodiazepine-Agonisten vermitteln ihre Wirkung, indem sie modulierend auf die Bindungsstelle des Neurotransmitters GABA (γ -Aminobuttersäure) am GABA_A-Rezeptor wirken. Der Einfluss des inhibitorisch wirkenden Neurotransmitters GABA wird verstärkt und ein angstlösender, muskelrelaxierender, krampflösender und sedativer Effekt ausgeübt (Kavvadias *et al.* 2004). So wurde in unserem Arbeitskreis gezeigt, dass das Flavon Hispidulin mit einem IC₅₀ von 1,3 μ M einen hochwirksamen Ligand für den Benzodiazepinrezeptor darstellt (Kavvadias *et al.* 2004).

Die **immunmodulierende** Wirkung von Flavonoiden wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Middleton und Kandaswami 1992, Johnson *et al.* 2003), wobei diese durch die Hemmung von Enzymen erreicht wurde. Mit Hilfe membranständiger Rezeptoren und nachgeschalteter Signalelemente wird ein Stimulus durch sogenannte Signaltransduktionskaskaden weitergeleitet und/oder amplifiziert und dadurch unter anderem das Genexpressionsprofil der Zelle moduliert (Thiel und Roessler 2005). Hier spielen vor allem Signaltransduktionswege eine wichtige Rolle, bei denen Mitogen-aktivierte Pro-

teinkinasen (MAPK) involviert sind. Diese Kaskaden sind ein wichtiger, von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Neurotransmittern genutzter Modus, um physiologische Antworten, wie Immunantworten zu regulieren (Hallwachs 2005). Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass immunmodulatorische Effekte von Flavonoiden insbesondere in inflammatorischen Zellen, wie T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen, auftreten (Middleton *et al.* 2000, Korte 2007).

Seit Anfang der 1980er Jahre wird auch die **antidiabetische** Wirkung von Flavonoiden intensiv untersucht. So wurde erst vor kurzem die schützende Wirkung von Quercetin und Epicatechin gegenüber insulinproduzierenden β -Zellen der Bauchspeicheldrüse im Tiermodell nachgewiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse vermuteten Ardestani *et al.* (2007) eine vorbeugende Wirkung der Flavonoide gegenüber Typ-1 Diabetes. Phloridzin war in der Lage, die intestinale Glucoseaufnahme und die renale Glucoseresorption zu verringern, und somit den Blutzuckerspiegel zu senken (Zhao *et al.* 2004). Weiterhin wirkten sich in einer Studie an Ratten mit diabetischer Nephropathie Flavonoide aus grünem Tee günstig auf die Nierenfunktion aus (Yokozawa *et al.* 2005).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Flavonoide aufgrund ihrer vielfältigen positiven Wirkungen immer häufiger mit der Prävention degenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Allerdings muss ergänzend erwähnt werden, dass viele der Daten anhand von isolierten Aglykonen und/oder durch *in vitro*-Untersuchungen gewonnen wurden. Da noch keine ausreichenden Erkenntnisse über Bioverfügbarkeit und Faktoren, die diese beeinflussen, vorhanden sind, ist jedoch eine direkte Übertragung auf den menschlichen Körper nur eingeschränkt möglich.

2.2.6 Toxizität von Polyphenolen

Neben ihren antioxidativen und protektiven Eigenschaften können Polyphenole aufgrund ihrer reaktiven funktionellen Gruppen in hohen Dosen unter bestimmten Bedingungen toxische Effekte ausüben (Michels *et al.* 2005, Rucinska *et al.* 2007). Wichtige Strukturmerkmale sind, wie bereits bei den antioxidativen Eigenschaften (Kapitel 2.2.5.1) erwähnt, die freie Hydroxylgruppe an C3 und die α/β -ungesättigte Ketogruppe im C-Ring. Polyphenole mit einem Phenolring zeigten keine größeren prooxidativen Eigenschaften auf als Verbindungen mit einem Catecholring. Die unerwünschten Ei-

genschaften sind hauptsächlich auf die elektrophilen Metabolisierungsprodukte der Polyphenole wie Chinone und Chinon-Methidstrukturen zurückzuführen.

Ende der 1970er Jahre wurden von der Arbeitsgruppe um Brown und Dietrich (1979) in einer groß angelegten Studie über 70 verschiedene Flavonoide und deren Glycoside im Ames-Test auf ihre **mutagenen Eigenschaften** untersucht. Hier zeigten sich für einige Flavonole Frameshift-Mutationen in *Salmonella typhimurium*. Vor allem Quercetin zeigte mit 11,6 Revertanten pro nmol Quercetin eine relativ hohe Mutagenität, dahingegen wiesen die entsprechenden Glycoside keine mutagene Wirkung auf. Des Weiteren zeigten die Autoren, dass Quercetin in Rattenleber-Homogenisat einer metabolischen Aktivierung unterliegt, wodurch die mutagenen Eigenschaften von Quercetin weiter gesteigert wurden (Brown und Dietrich 1979). Neben den o.g. strukturellen Eigenschaften spielt für die Mutagenität von Flavonolen sowohl die Substitution am B-Ring als auch das Vorhandensein der Hydroxylgruppe an C5 eine große Rolle (Hardigree und Epler 1978, Brown und Dietrich 1979).

Für Polyphenole hat man auch **prooxidative Wirkungen** nachgewiesen (Lambert *et al.* 2007, Waetjen *et al.* 2007), welche bei Anwesenheit von Metallionen zusätzlich begünstigt wurden (Sahu und Gray 1994, Michels *et al.* 2005). So zeigten *in vitro*-Studien, dass in Gegenwart von Cu^{2+} - oder Fe^{3+} -Ionen DNA-Strangbrüche und Lipidperoxidation durch Quercetin (Michels *et al.* 2005), Myrecetin (Sahu und Gray 1993) und Kämpferol (Sahu und Gray 1994) verursacht wurden. Vermutlich werden die Metallionen durch Flavonoide reduziert und fördern infolgedessen die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies. Ein wässriges Milieu förderte die pH-Wert-abhängige prooxidative Wirkung (Lapidot *et al.* 2002a). Die Autoren machten daneben die *in vitro*-Generierung von H_2O_2 durch Polyphenole indirekt für die anti-proliferative Wirkung der Polyphenole verantwortlich (Lapidot *et al.* 2002b).

Eine weitere Strukturvoraussetzung für eine Chinonbildung ist die Catecholgruppe, wie sie z.B. bei Quercetin, Kaffeesäurederivaten oder den Catechinen vorliegt. Das Flavonol Quercetin ist hinsichtlich seiner prooxidativen Eigenschaften am Besten untersucht, einen Überblick über dessen Aktivierung gibt Abbildung 2.20.

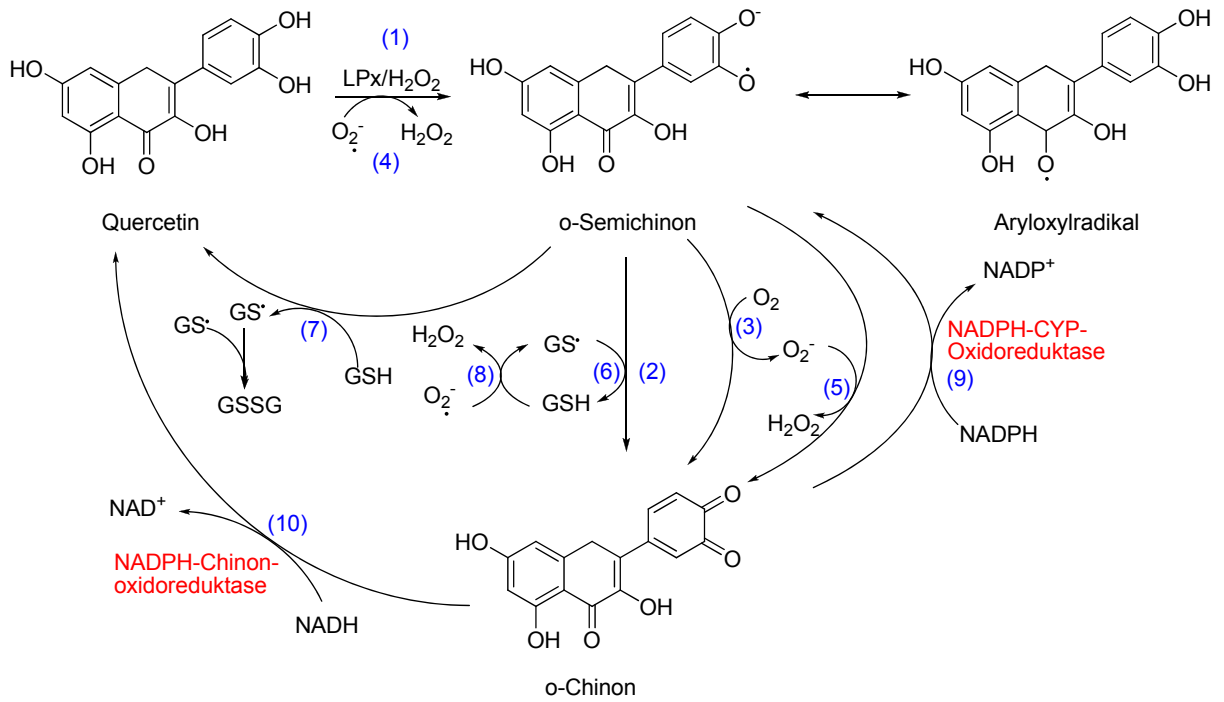
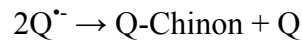
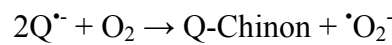


Abbildung 2.20 Schema zur postulierten Reaktion von Quercetin als Prooxidans (Metodiewa *et al.* 1999); LPx = Laktatperoxidase

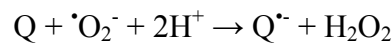
Aus Quercetin entsteht unter Einwirkung der Laktatperoxidase (1) ein intermediär gebildetes *o*-Semichinon, das mesomer über alle drei Ringe stabilisiert wird. Durch Disproportionierung entsteht das Quercetin-*o*-Chinon (2):



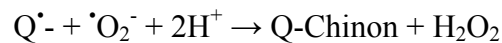
In Gegenwart von Sauerstoff erfolgt die Reaktion zum Chinon über die Bildung des Superoxidanionradikals (3):



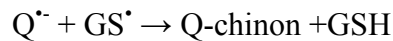
Superoxidanionradikale können anschließend von Quercetinmolekülen unter Bildung des Semichinonradikals (4) abgefangen werden.



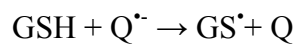
Daneben kann das Semichinonradikal ebenfalls Superoxidanionen unter Bildung des Chinons abfangen (5).



Glutathion (GSH), ein endogenes Antioxidans, kann bei den Redoxreaktionen des Quercetins ebenfalls eine Rolle spielen. Das Glutathionradikal wird durch das Semichinonradikal reduziert (6).



Das Glutathionradikal kann sowohl bei der Ein-Elektronenübertragung mit dem Semichinonradikal (7) als auch bei der Abfangreaktion des Superoxidanionradikals durch Glutathion (8) gebildet werden:



Die NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase katalysiert die Reduktion des Chinons zum Semichinon in einem Ein-Elektronenschritt (9). Dahingegen reduziert die NADPH-Chinonoxido-reduktase das Chinon in einem Zwei-Elektronenschritt (10) zurück in die Ausgangsverbindung (Metodiewa *et al.* 1999). Analog kann Epicatechin durch Tyrosinase und Peroxidasen zum *o*-Chinon oxidiert werden; die Oxidation wurde auch mit Apfelphenoloxidasen beobachtet. Da Chinone sehr reaktiv sind, sind weitere Umlagerungen und Polymerisierungen möglich (Le Guerneve *et al.* 2004).

Neben der Bildung von ROS durch Redox-Cycling kann das als Zwischenprodukt entstandene Chinon weiterreagieren und über Methide mit Glutathion Addukte binden.

Obwohl für einige Flavonoide, insbesondere die Flavonole, mutagene Wirkungen im Ames-Test belegt sind, sprechen Tierversuche nicht für eine kanzerogene Wirkung (Middleton 1998). Ein Grund hierfür ist die geringe Resorptionsrate der Flavonoide über die Ernährung, so dass kaum Plasmakonzentrationen erreicht werden, die *in vitro* mutagen oder zytotoxisch wirken. Daher gibt es bisher keine toxikologischen Bedenken gegenüber flavonoidhaltigen Lebensmitteln.

Eine mögliche Gefahr stellen jedoch Flavonoid-angereicherte Nahrungsergänzungsmittel dar, in denen z.B. Quercetin in Tagesdosen von bis zu 1 g empfohlen wird. So stehen bei Schwangeren hohe Flavonoiddosen (aus Supplementen) im Verdacht, das Leukämierisiko zu erhöhen (Skibola und Smith 2000). Auch eine Schilddrüsendysfunktion gilt als mögliche Folge einer chronisch übermäßigen Flavonoidaufnahme (Divi und Doerge 1996).

Klinisch bedeutsam sind Flavonoidinteraktionen mit dem Cytochrom-P450 abhängigen Enzym CYP3A4, das eine wichtige Rolle im Metabolismus von Medikamenten spielt. So können mit der Nahrung aufgenommene Flavonoide, wie z.B. das im Grapefruitsaft enthaltene Naringenin, den Abbau von Arzneimitteln verzögern (Hodek *et al.* 2002). Auch das in Erdbeeren enthaltene Kämpferol-3- β -D-6-*O*-*trans*-*p*-cumarylglucopyranosid ist in der Lage, das Enzym schon in einer Konzentration von 0,7 μ M zu hemmen (Ota und Tsukamoto 2006). Den Anthocyanen hingegen wurde bisher kein hohes Hemmpotential zugesprochen (Dreiseitel *et al.* 2008).

2.2.7 Apfel-Polyphenole

2.2.7.1 Frucht

Die wichtigsten phenolischen Verbindungen in Äpfeln sind die Chlorogensäure und die *p*-Cumaroylchinasäure, die Quercetinglycoside, das Flavan-3-ol Epicatechin, die polymeren Procyanidine sowie Dihydrochalkone. Die Anthocyane spielen nur in den rot-schaligen Sorten bzw. den eher selteneren rotfleischigen Apfelsorten Danziger Kantapfel und Weirouge eine Rolle.

Die phenolischen Säuren in Äpfeln werden von den Estern der Hydroxyzimtsäuren dominiert. Hierbei bilden die Ester aus Kaffeesäure bzw. *p*-Cumarsäure und Chinasäure den größten Anteil. Die isomeren Krypto- und Neochlorogensäure kommen in deutlich geringeren Mengen vor als Chlorogensäure, die Gehalte bis zu 2420 mg/kg erreicht. Mit bis zu 100 mg/kg ist die 4-*p*-Cumaroylchinasäure der zweithäufigste Hydroxyzimtsäure-ester. Die freien Säuren Kaffeesäure, *p*-Cumarsäure und Ferulasäure kommen meist nur in Spuren vor (Alonso-Salces *et al.* 2004).

Die im Apfel enthaltenen Dihydrochalkone sind Phloridzin, Phloretin-2'-xyloglucosid und 3-Hydroxyphloridzin, wobei vor allem Phloridzin für Apfelprodukte typisch ist. Die Konzentrationen sind stark sortenabhängig und variieren zwischen dem unteren Milligramm-Bereich und bis zu 230 mg/kg (Treutter 2001, Alonso-Salces *et al.* 2004).

Quercetin ist das häufigste Flavonol in Äpfeln. Es liegt vorwiegend als Galactosid (10-920 mg/kg FG) und Glucosid (0-20 mg/kg FG) vor (Treutter 2001). Die glycosidische Bindung ist immer an C3 lokalisiert. Aufgrund der sterischen Hinderung durch den Zuckers sind diese Glycoside keine guten Substrate der Polyphenoloxidase (PPO), so dass

sich ihre Konzentration während der Verarbeitung von Apfelprodukten kaum ändert (van der Sluis *et al.* 2002).

Im Gegensatz dazu sind die Flavan-3-ole hervorragende Substrate der PPO und stark oxidationsanfällig (Hollman und Arts 2000, van der Sluis *et al.* 2002). Im Apfelfruchtfleisch wurden bisher die Monomeren Catechin und Epicatechin, sowie deren oligomere und polymere Kondensationsprodukte, die Procyanidine, nachgewiesen. Aufgrund der schlechten Trennbarkeit mittels RP-HPLC mangelt es an exakten Daten über den Gehalt an polymeren Procyanidinen. In der Gruppe von Guyot ermittelte man den Procyanidingehalt nach Thiolyse und fand, dass dieser 69 – 87% der Gesamtphenole ausmacht (Guyot *et al.* 2002). Der mittlere Polymerisationsgrad wurde mit bis zu 35 bestimmt (Gu *et al.* 2003).

Bei fast allen Polyphenolen gibt es große Unterschiede in den Gehalten zwischen den unterschiedlichen Geweben und verschiedenen Apfelsorten. Tabelle 2.2 orientiert über die Gehalte an Polyphenolen im Fruchtfleisch verschiedener Apfelsorten. Hierbei wird ersichtlich, dass vor allem die Mostapfelsorten einen deutlich höheren Gehalt an phenolischen Inhaltsstoffen als Tafeläpfel aufweisen (Marks *et al.* 2007). Des Weiteren zeigte diese Gruppe, dass die Verteilung der Polyphenole im Gewebe nicht homogen ist. So sind im Fleisch vor allem die Hydroxyzimtsäuren in hohen Konzentrationen zu finden. Quercetinglycoside sind, ebenso wie das Cyanidingalactosid, fast ausschließlich in der Schale zu finden (vgl. Tabelle 2.2 und Tabelle 2.3).

Die Dihydrochalkone sind ebenfalls in der Schale deutlich angereichert, sie sind aber auch im Fleisch einiger Apfelsorten Hauptkomponenten. Auch der Gehalt und das Verhältnis von Phloretin-2'-xyloglucosid zu Phloridzin ist stark sortenabhängig (Marks *et al.* 2007).

Untersuchungen der verschiedenen Gewebezonen von Äpfeln zeigten, dass die Procyanidine und die monomeren Flavan-3-ole relativ gleichmäßig zwischen Epidermis, Parenchym und Kerngehäuse verteilt sind. Etwas geringere Gehalte finden sich in den Samen. Die Hydroxyzimtsäuren sind vorwiegend im Parenchym bzw. im Kerngehäuse und die Flavonole fast ausschließlich in der Epidermis zu finden. Die Dihydrochalkone bilden eine Ausnahme, da diese in den Samen mit ca. 3416 mg/kg in einer bis zu 30 fach höheren Konzentration wie in der Epidermis enthalten sind (Guyot *et al.* 1998).

Tabelle 2.2 Phenolische Hauptkomponenten im Fruchtfleisch verschiedener Apfelsorten (Marks *et al.* 2007)

	Tafeläpfel		Mostäpfel		
	Golden Delicious	Sweet Coppin	Ashton Bitter	Harry Masters Jerseys	Somerset Redstreak
Cyanidin-3-O-galactosid	n.d.	n.d.	n.d.	5	n.d.
(+)-Catechin	8	39	35	115	18
(-)-Epicatechin	46	186	1096	1379	399
Procyanidin B ₂	56	120	695	776	297
Chlorogensäure	89	69	831	339	447
4- <i>p</i> -Cumaroylchinasäure	6	49	n.d.	162	107
Phloretin-2'-xyloglucosid	7	5	58	17	38
Phloretin-2'-glucosid	9	17	71	33	60
Quercetin-3-O-galactosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-glucosid	n.d.	n.d.	0,83	1,54	0,54
Quercetin-3-O-xylosid	1,04	n.d.	1,49	6,91	1,42
Quercetin-3-O-rhamnosid	5,27	n.d.	5,50	12,06	2,19

n.d. = nicht detektiert

Tabelle 2.3 Phenolische Hauptkomponenten in den Schalen verschiedener Apfelsorten (Marks *et al.* 2007)

	Tafeläpfel		Mostäpfel		
	Golden Delicious	Sweet Coppin	Ashton Bitter	Harry Masters Jerseys	Somerset Redstreak
Cyanidin-3-O-galactosid	n.d.	n.d.	72	180	53
(+)-Catechin	10	46	89	57	23
(-)-Epicatechin	116	347	1095	1122	424
Procyanidin B ₂	107	148	782	700	211
Chlorogensäure	63	30	1004	56	273
4- <i>p</i> -Cumaroylchinasäure	4	8	n.d.	47	67
Phloretin-2'-xyloglucosid	37	14	201	33	103
Phloretin-2'-glucosid	35	25	353	124	350
Quercetin-3-O-galactosid	50	40	190	194	130
Quercetin-3-O-glucosid	11	9	41	60	24
Quercetin-3-O-xylosid	20	17	51	108	54
Quercetin-3-O-rhamnosid	39	18	61	106	45

n.d. = nicht detektiert

Der deutlichste Unterschied findet sich aber zwischen einzelnen Apfelsorten. Hier sind vor allem die Mostapfelsorten auffällig, die im Allgemeinen deutlich höhere Gehalte an Flavonoiden und Hydroxyzimtsäuren besitzen.

2.2.7.2 Saft

Der traditionelle Weg, einen Saft zu produzieren, besteht darin, die Äpfel zu zerkleinern und anschließend die erhaltene Pulpe zu pressen (Direktsaft). Die wichtigsten Polyphenole in den hierbei erzeugten Säften sind die phenolischen Säuren. Die Flavonole und die Anthocyane sind meist nur in Spuren nachweisbar, da sie in der Schale des Apfels lokalisiert sind und daher beim Pressen vorwiegend im Trester verbleiben (Alonso-

Salces *et al.* 2004). Im Vergleich zu frischen Äpfeln enthält der Saft ähnliche Mengen an Hydroxyzimtsäuren, aber deutlich geringere Anteile an anderen Flavonoiden. Während des Zerkleinerns und Pressens der Äpfel wird die PPO freigesetzt und Luftsauerstoff in die Pulpe eingebracht. Dies führt dazu, dass die Flavonoide, insbesondere die Flavan-3-ole, oxidiert und als polymere Oxidationsprodukte mit dem Trester abgetrennt werden. Des Weiteren haben polymere Procyanidine auch im nativem Zustand eine hohe Bindungsaffinität zu Zellwandbestandteilen, weswegen sie nur unvollständig in den Saft gelangen (van der Sluis *et al.* 2002).

Die Technologie der Saftgewinnung hat einen entscheidenden Einfluss auf den Polyphenolgehalt des fertigen Produktes. Wird beispielsweise die Maische zur Erhöhung der Saftausbeute mit pektinolytischen Enzymen versetzt, so führt dies in der Regel zu einer deutlichen Verringerung des Polyphenolgehaltes. So wies die Gruppe um van der Sluis (2002) nach, dass die Gehalte der Flavonoide um 15 – 63% abnahmen. Besonders betroffen waren dabei die Flavan-3-ole.

Eine weitere Abnahme des Flavonoidgehaltes erfolgt bei der Klärung des Saftes. So konnten verschiedene Gruppen einen deutlich geringeren Polyphenolgehalt in klaren im Vergleich zu trüben Säften nachweisen (Kahle *et al.* 2005, Hubert *et al.* 2007, Oszmianski *et al.* 2007). Im Allgemeinen zeigte sich, dass die Hydroxyzimtsäuren und die Flavan-3-ole nur in geringen Mengen beeinflusst wurden. Die Menge an Dihydrochalconen stieg nach der Klärung teilweise sogar leicht an (Hubert *et al.* 2007, Oszmianski *et al.* 2007). Die größte Abnahme an polymeren Procyanidinen erfolgte durch die Klärung mit Gelatine (32%), gefolgt von der Klärung mit Pektinase und anschließender Dekantierung (15%) (Hubert *et al.* 2007). Verantwortlich für die hohen Verluste sind sowohl die spezifische Bindung der Procyanidine an Proteine und Zellwandbestandteile, als auch die oxidativen Bedingungen während der Klärung (Oszmianski *et al.* 2007).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Analytik von Apfelsäften und daraus gewonnenen Extrakten

Wie erwähnt, kommen in Äpfeln und Apfelsäften verschiedene Klassen von phenolischen Antioxidantien wie Zimtsäuren, Flavan-3-ole und deren Polymere, Flavonole, Dihydrochalkone sowie Anthocyane vor (Alonso-Salces *et al.* 2004). Darüber hinaus werden während der Apfelreife und -verarbeitung verschiedene, z.T. aromaaktive Substanzen gebildet. Um einen Einblick in die stoffliche Zusammensetzung von Apfelsäften zu gewinnen, wurden diese mittels Hochleistungsflüssigchromatographie-Diodenarray-Detektion (HPLC-DAD) sowie HPLC-Electrospray-Ionisierung-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS) und Gaschromatographie-Elektronenstoßionisation-Massenspektrometrie (GC-EI-MS) auf ihre Inhaltsstoffe hin untersucht. Die Procyanidine wurden mittels Salzsäure-Butanol-Assay quantifiziert und deren mittlerer Polymerisationsgrad (D_{Pm}) durch Thiolyse bestimmt.

3.1.1 Polyphenol- und Procyanidingehalt

3.1.1.1 Apfelsäfte

Der Polyphenolgehalt von Apfelsäften wird in der Literatur mit durchschnittlich 271 mg/l beziffert (Kahle *et al.* 2005). Bei der Verarbeitung gelangen Polyphenole in unterschiedlichen Mengen in den Saft, wobei insbesondere die Quercetinglycoside und die Dihydrochalkone vermutlich zu einem großen Teil im Trester verbleiben (van der Sluis *et al.* 2002). Dem Gehalt an polymeren Procyanidinen wurde bisher kaum Aufmerksamkeit geschenkt. In Untersuchungen an Tafeläpfeln fanden Guyot *et al.* (2002), dass diese Substanzklasse einen Anteil von 69 - 87% der Gesamtphenole ausmacht. In unseren Studien wurden die Gehalte einzelner Polyphenole sowie der Gesamtprocyanidingehalt (TPC) und D_{Pm} der Procyanidine in verschiedenen Säften untersucht. Die Identifizierung der einzelnen Apfelsaftpolyphenole erfolgte mittels HPLC-DAD sowie HPLC-ESI-MS/MS. Die Quantifizierung wurde mittels HPLC-DAD anhand eines externen Standards (3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure) durchgeführt. Die Flavan-3-ole und Dihydrochalkone wurden bei 280 nm, Phenolcarbonsäuren bei 320 nm und

die Flavonole bei 360 nm detektiert. Alle aufgeführten Daten sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

Um den Gesamtprocyanidingehalt der untersuchten Apfelsäfte zu bestimmen, wurde der Salzsäure-Butanol-Assay eingesetzt. Die Methode ist ursprünglich von Swain und Hillis (1959) entwickelt worden und basiert auf einer säurekatalysierten Depolymerisation der Procyanidine zu den farbigen Anthocyanidinen in wasserfreiem Butanol. Diese können anschließend spektralphotometrisch vermessen werden (vgl. Abbildung 3.1).

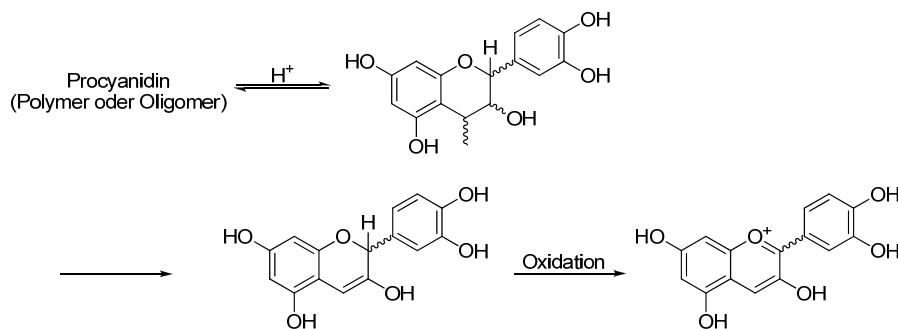


Abbildung 3.1 Reaktionsverlauf (Schema) bei der photometrischen Bestimmung der Procyanidingehalte (nach Swain und Hillis 1959)

Im Hinblick auf eine größere Empfindlichkeit und bessere Reproduzierbarkeit wurde diese Methode seit ihrer Veröffentlichung grundlegend modifiziert, wobei Säure- und Butanolmenge, Reaktionszeit und Wassergehalt variiert wurden. Auch der Einfluss von Eisen als Katalysator wurde untersucht (Porter *et al.* 1986, Scalbert 1992). Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, wurde von uns die Methode von Karonen *et al.* (2006) für die Bestimmung der Procyanidine in Apfelsaft und daraus gewonnenen Extrakten angepasst. Hierzu wurde als Quantifizierungsstandard eine Mischung verschiedener Tetramere des B-Typs aus der Tamarinde (*Tamarindus indica L.*) verwendet, da in vorangegangenen Studien der DPm der Apfelprocyanidine mit vier bis fünf bestimmt worden war. Des Weiteren ist der B-Typ mit (-)-Epicatechin als vorherrschendes Monomer der häufigste Procyanidin-Typ in Äpfeln (Guyot *et al.* 2001, Shoji *et al.* 2006). Da die mittelständigen Einheiten nach der Spaltung schneller zum Cyanidin oxidiert werden als die endständigen Flavan-3-ol-Einheiten, ist für die Kalibrierung und Quantifizierung ein Standard mit vergleichbarem DPm unerlässlich.

Tabelle 3.1 Ausgangsmaterial für die Apfelsaftproduktion

	Bohnapfel klar und trüb	Bittenfelder klar und trüb	AS02 klar	AS03B Trester- extraktionssaft	AS04 klar	AS05 klar und trüb	AS06 klar und trüb	AS07 klar und trüb
Mostäpfel	Malus domestica cv. Bohnapfel	Malus domestica cv. Bittenfelder	22,5% Winterrambur 17,5% Bohnapfel 15,0% Bittenfelder		22% Schafsnase 22% Winterrambur 22% Bohnapfel	10% Bittenfelder 23% Bohnapfel 25% Seestermüher 18% Boertlinger Weinapfel 24% Topaz	10% Bohnapfel 45% Maunzen 10% Winterrambour	48% Bittenfelder 26% Brettacher 7% gemischte Mostäpfel
Tafeläpfel			25% Topaz 20% gemischte Tafel- äpfel	100% gemischte Tafeläpfel			35% gemischte Tafeläpfel	11% Braeburn 8% Jonagold
Verschiedenes					28% AS02, 6% Trester- extraktionssaft			

Tabelle 3.2 Technologie der Saft- und Extraktproduktion

	Bohnapfel klar und trüb	Bittenfelder klar und trüb	AS02 klar	AS03B Trester- extraktionsaft	AS04 klar	AS05 klar und trüb	AS06 klar und trüb	AS07 klar und trüb	Handelsprobe trüb
Saftproduktion	Hammermühle HP-L Horizontal- presse Separator SA R 3036 Pasteurisierung	Hammermühle HP-L Horizontal- presse Separator SA R 3036 Pasteurisierung	Hammermühle HP-L Horizontal- presse Separator SA R 3036 Pasteurisierung	Hammermühle HP-L Horizontal- presse Separator SA R 3036 Pasteurisierung Saft verworfen	Hammermühle HP-L Horizontal- presse Separator SA R 3036 Pasteurisierung	Hammermühle HP-L Horizontal- presse Separator SA R 3036 Pasteurisierung	Schneidmühle HP-L Horizontal- presse Separator SA R 3036 Pasteurisierung	Schneidmühle HP-L Horizontal- presse Separator SA R 3036 Pasteurisierung	unbekannt
Klärung	Nur für klare Säfte: Pektinase- behandlung “Cross-Flow”- Filtration	Nur für klare Säfte: Pektinase- behandlung “Cross-Flow”- Filtration	Pektinase- behandlung “Cross-Flow”- Filtration		Pektinase- Behandlung “Cross-Flow”- Filtration	Nur für klare Säfte: Pektinase- behandlung Schönung “Cross-Flow”- Filtration	Nur für klare Säfte: Fruktozym- behandlung Schönung Separation und “Cross-Flow”- Filtration	Nur für klare Säfte: Pektinase- behandlung Schönung Separation und Schichtenfiltration	
Trester- extraktion				Pektinase- und Cellulase- be- handlung Flottweg Dekanter Separator SA R 3036					
Adsorber	XAD16 HP	XAD16 HP	XAD16 HP	P-495	P-495	XAD16 HP (klar und trüb) P-495 (klar und trüb)	SP-70	SP-70	P-495
Extraktausbeute [g/l]	Klar: 1,53 Trüb: 1,55	Klar: 1,35 Trüb: 1,17	Klar: 0,65	B: 0,47	Klar: 0,91	Klar: 0,59 Trüb: 0,76	Klar: 1,0 Trüb: 1,3	Klar: 0,90 Trüb: 1,00	Trüb: 0,65

Um zu klären, ob auch der DPm der untersuchten Apfelsäfte durch die Klärung einer Veränderung unterliegt, wurden die Procyanidine in den untersuchten Proben unter Einsatz des starken Nukleophils Benzylmercaptan umgesetzt. Die Reaktionsprodukte wurde anschließend mittels RP-HPLC untersucht und der DPm berechnet.

In Abbildung 3.2 ist der Reaktionsverlauf schematisch dargestellt. Das Benzylmercaptan agiert als Nukleophil und spaltet jeweils die C-C-Bindung zwischen C4 und C8 der Procyanidinuntereinheiten.

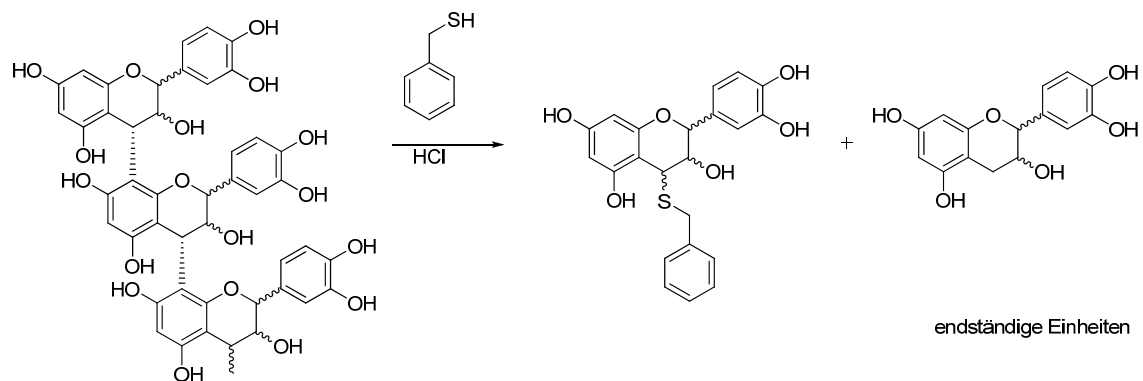


Abbildung 3.2 Reaktion der Thiolyse von oligomeren und polymeren Procyanidinen mittels Benzylmercaptan als nukleophiles Reagenz

Im Gegensatz zur Bestimmung des Procyanidingehaltes wird die Ermittlung des Polymerisationsgrades mittels Thiolyse nicht von der Matrix beeinflusst. Die Retentionszeiten der möglichen Produkte (+)-Catechin, (-)-Epicatechin sowie (+)-Catechinthioether und (-)-Epicatechinthioether wurden vorher durch Thiolyse einer Referenzmischung aus den Procyanidinen B₁, B₂, B₃ und B₄ und anschließender HPLC-Analytik bestimmt.

Um eine Verfälschung des DPm der Procyanidine durch den unterschiedlichen Gehalt an Flavan-3-olen zu verhindern, wurde deren Gehalt in den Extrakten bestimmt und vom Anteil in der Reaktionsmischung abgezogen. Während der Reaktion kann eine Umwandlung von (+)-Catechin in (-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin sowie die Umwandlung von (-)-Epicatechin zu (+)-Epicatechin und (+/-)-Catechin eintreten (Guyot et al. 2001). In einem von uns durchgeführten Modellversuch an (+)-Catechin und (-)-Epicatechin wurde eine Umwandlung von 2,5% bestimmt. Dies stimmt sehr gut mit früheren Ergebnissen überein (Guyot et al. 2001).

In Abbildung 3.3 sind die Flavonoidgehalte in klaren und trüben Säften verschiedener Sorten unterschiedlicher Erntejahre dargestellt (zu Definitionen und Produktionsverfahren s. Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 in Kapitel 3.1.1.1). In der Polyphenolzusam-

mensetzung sind deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Säften erkennbar. Dies war in Anbetracht der Sortenvielfalt und der unterschiedlichen Technologie auch zu erwarten.

Die phenolischen Säuren dominierten die Polyphenolzusammensetzung. Deren Gehalte schwankten zwischen 241,2 mg/l (AS06 klar) und 436,2 mg/l (AS07 klar) bei den klaren und zwischen 221,1 mg/l (AS05 trüb) und 388,0 mg/l (AS07 trüb) bei den trüben Säften. Vergleicht man die Säfte eines Jahrgangs, so waren leicht erhöhte Gehalte in den jeweiligen klaren Säften erkennbar. Die Dihydrochalkone waren, abhängig von den verwendeten Apfelsorten, in Konzentrationen zwischen 56,0 (AS05 klar) und 134,8 mg/l (AS07 klar) bzw. 58,0 (AS06 trüb) und 113,9 mg/l (AS07 trüb) in den klaren bzw. trüben Säften enthalten. Die dritte große Gruppe bildeten die monomeren und dimeren Flavan-3-ole. Diese waren, ähnlich wie die Dihydrochalkone, mit Gehalten bis zu 128,6 mg/l vertreten. Die letzte Gruppe der niedermolekularen Apfelpolyphenole, die Flavonole, wiesen in den untersuchten Apfelsäften mit Gehalten bis zu 6,0 mg/l die geringsten Gehalte auf.

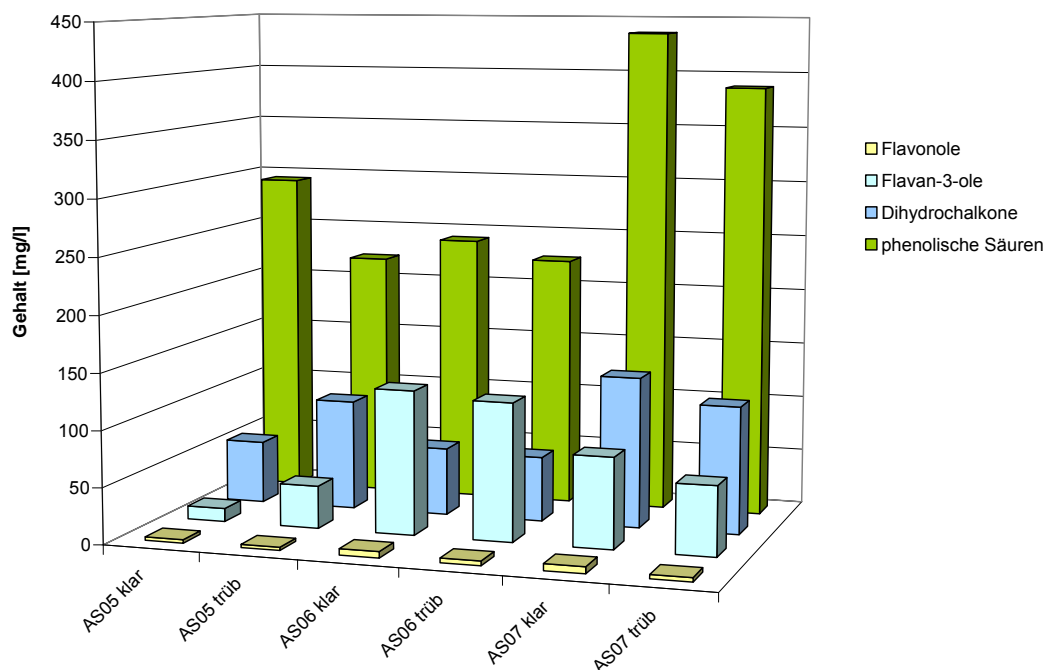


Abbildung 3.3 Polyphenolgehalte der von uns untersuchten klaren und trüben Apfelsäfte (zu Definition und Herstellung s. Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2)

Betrachtet man die einzelnen Substanzen (s. Abbildung 3.4) so hatte die Chlorogensäure, wie für Äpfel typisch, den größten Anteil. Es folgten 4-*p*-Cumaroylchinasäure, Kryptochlorogensäure und Kaffeesäure, wobei die beiden letztgenannten in vergleichs-

weise geringen Mengen enthalten waren. Die Gehalte befanden sich in den für Apfelsaft in der Literatur beschriebenen Bereichen, nur AS07 enthielt mit bis zu 360,7 mg/l überdurchschnittliche Gehalte an Chlorogensäure. Die Konzentration der einzelnen Substanzen war in den klaren und trüben Säften desselben Jahrgangs meist ähnlich.

Der Gehalt an Phloretin-2'-xyloglucosid variierte zwischen 25,1 mg/l (AS05 klar) und 65,8 mg/l (AS05 trüb). Auch Phloretin-2'-glucosid zeigte eine große Schwankungsbreite. Der Anteil der am B-Ring zweifach hydroxylierten 3-Hydroxyphloretin-glycoside am Gesamtdihydrochalkongehalt lag zwischen 10 und 23%.

Die Konzentration der Procyanidine B₁ und B₂ nahm während der Klärung ab. Im Gegensatz hierzu wurde teilweise eine leichte Zunahme des monomeren Flavan-3-ols (-)-Epicatechin festgestellt.

Quercetin-3-O-galactosid und Quercetin-3-O-rhamnosid haben den größten Anteil an den Quercetinglycosiden, gefolgt von Quercetin-3-O-glucosid. Quercetin-3-O-xylosid und Quercetin-3-O-arabinsid waren nur im Saft eines Jahrgangs nachweisbar. Quercetin-3-O-rutinosid konnte in keinem der untersuchten Säfte detektiert werden. Das bevorzugt während der Klärung durch hydrolytische Spaltung freigesetzte Quercetin wurde nur in AS07 klar detektiert.

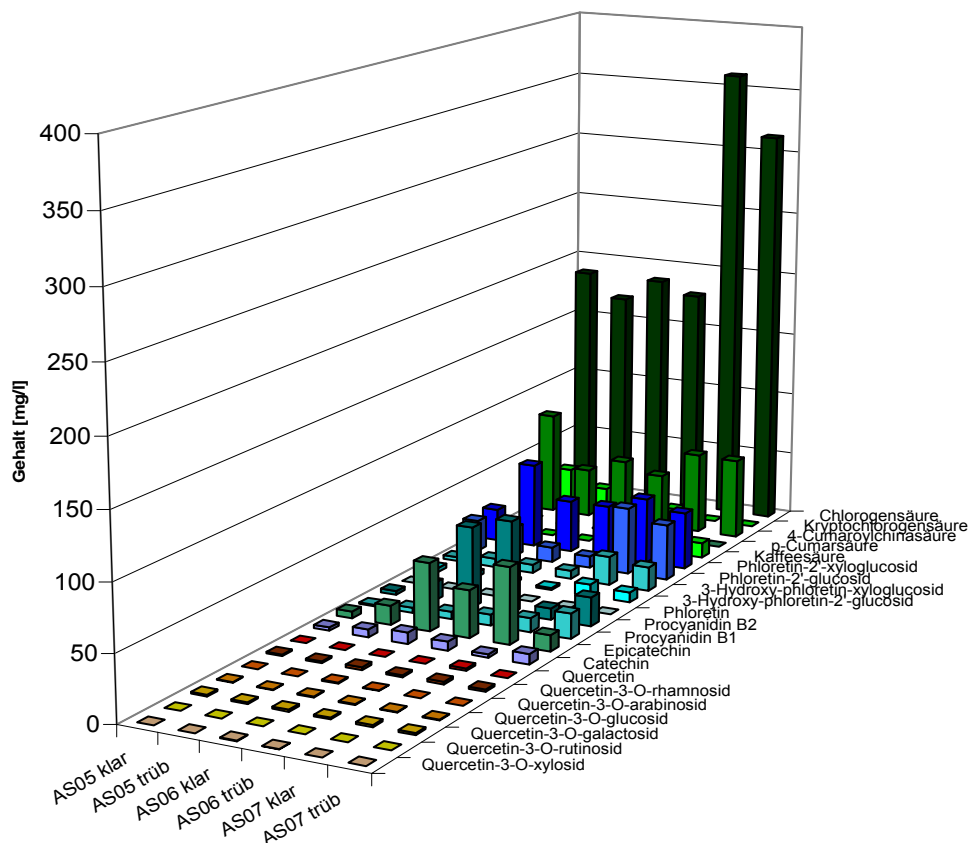


Abbildung 3.4 Polyphenolgehalte der von uns untersuchten Extrakte aus klaren und trüben Apfelsäften

Neben den niedermolekularen Verbindungen sind insbesondere in den naturtrüben Säften die hochpolymeren Procyanidine vorhanden. Für die klaren Säfte wurden Gehalte zwischen 0,3 g/l und 1,6 g/l gemessen. Für die trüben Säfte lagen die Gehalte zwischen 1,5 g/l und 12,4 g/l (Abbildung 3.5). Insgesamt wurde bei den klaren Säften ein um bis zu 92% geringerer Procyanidingehalt ermittelt.

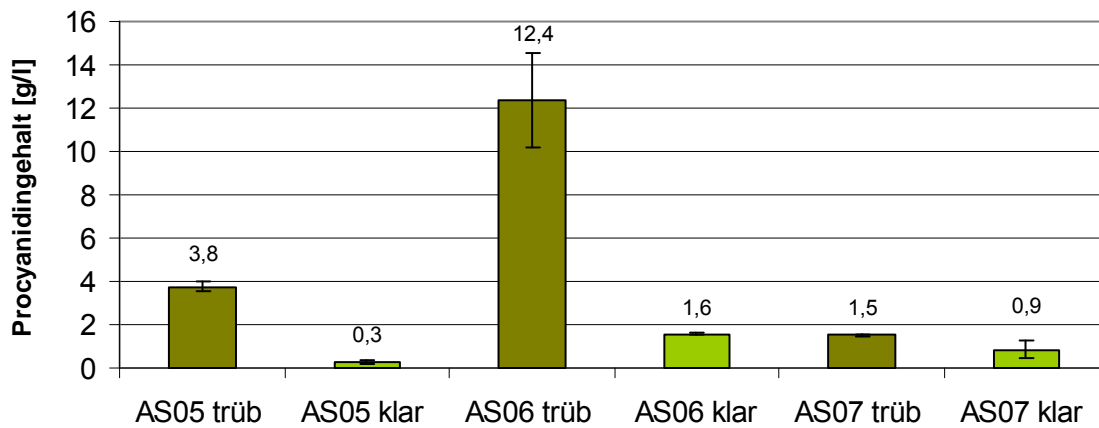


Abbildung 3.5 Procyanidingehalte von uns untersuchter Apfelsäfte (Angaben sind Mittelwerte \pm SD aus Dreifachbestimmungen)

Weiterhin zeigten sich zwischen den klaren und den trüben Säften signifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der Procyanidine (Abbildung 3.6). In den trüben Apfelsäften war der DPM größer als in den entsprechenden klaren Säften. Der DPM der Procyanidine nahm im Mittel um 2,7 ab. Im Detail nahm die mittlere Kettenlänge der Procyanidine von 4,3 auf 2,9 beim AS05, von 8,8 auf 3,4 beim AS06 und beim AS07 von 4,8 auf 3,5 ab.

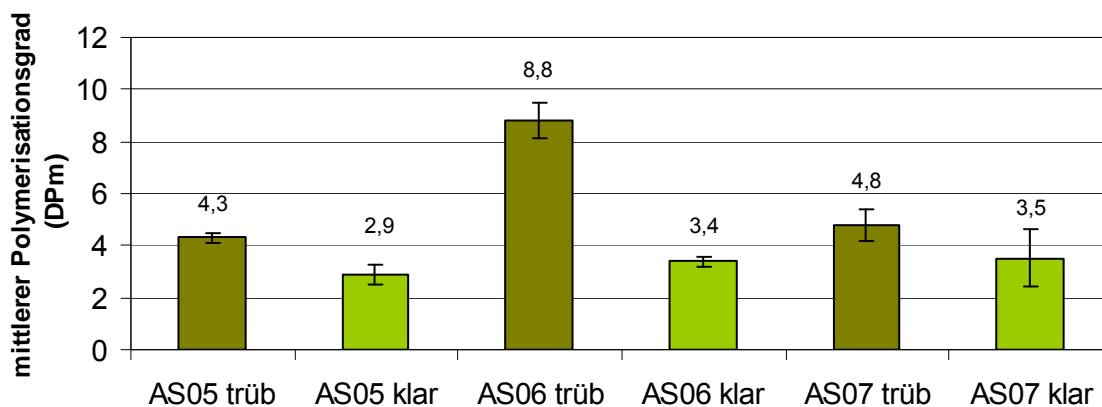


Abbildung 3.6 Polymerisationsgrad der Procyanidine in den untersuchten Apfelsäfte (Angaben sind Mittelwerte \pm SD aus Dreifachbestimmungen)

Die erhaltenen Ergebnisse zum Polyphenolprofil von klaren und trüben Apfelsäften sind in Übereinstimmung mit den Resultaten von Oszmianski und Mitarbeitern (2007), die

ebenfalls eine Zunahme der Dihydrochalkone und eine Abnahme der Flavan-3-ole, insbesondere der Procyanidine, beobachteten. Eine Veränderung der phenolischen Säuren wurde im Gegensatz zu unseren Resultaten nicht detektiert. Die Unterschiede zwischen den Säften verschiedener Produktionsjahre sind vorwiegend auf den großen Einfluss der zur Saftproduktion eingesetzten Sorten zurückzuführen (vgl. Tabelle 3.1). Auch ist der Einfluss unterschiedlicher UV-Strahlung als Folge unterschiedlicher Witterungsbedingungen in den verschiedenen Anbaujahren denkbar. Des Weiteren beeinflusst der Reifegrad der Äpfel während der Ernte das Polyphenolprofil des Produkts. So wiesen Renard *et al.* (2007) eine Abnahme der Polyphenolkonzentration während der Reife nach.

Das Prinzip des zur Procyanidinquantifizierung verwendeten HCl-Butanol-Assays ist die oxidative Spaltung der Procyanidine unter Freisetzung des rot gefärbten Cyanidins. Jedoch ist diese Reaktion sensitiv gegenüber der Anwesenheit von Wasser. Daher wurden die untersuchten Säfte vor der Analyse lyophilisiert und der Rückstand jeweils in absolutem Methanol wieder aufgenommen. Aufgrund eines sehr hohen Zuckergehaltes in den Säften kam es zu Nebenreaktionen, die zu einer gelbbraunen Verfärbung der Lösung führten. Daher war die Bestimmung des Procyanidingehaltes in den Säften nur bedingt möglich: Demzufolge ist nicht auszuschließen, dass die ermittelten Werte aufgrund der Überlagerung des UV-Spektrums durch das der gebildeten Maillard-Produkte deutlich höher sind als die tatsächlichen Procyanidingehalte. Dennoch erkennt man einen deutlich höheren Gehalt des trüben im Vergleich zu dem jeweiligen klaren Saft, obwohl dieser einen ähnlichen Zuckergehalt besitzt.

Durch Messung des DPm der Procyanidine wurde festgestellt, dass insbesondere die hochpolymeren im Gegensatz zu den anderen Apfelpolyphenolen in Folge der Klärung abgereichert wurden. Dies stimmt mit den Erkenntnissen der Arbeitsgruppe um Renard (2001) überein, die nachwies, dass pro Gramm Zellwandbestandteile bis zu 0,6 g Procyanidine gebunden werden können. Die Menge an gebundenen Procyanidinen nahm hierbei mit steigendem Polymerisationsgrad zu (Renard *et al.* 2001). Die verschiedenen Zellwandbestandteile haben unterschiedliche Affinitäten zu den Procyanidinen. In einem Modellversuch mit den Polysacchariden Stärke, Pektin und Cellulose zeigte sich, dass die Bindungsaffinität vom Pektin über Stärke bis zur Cellulose hin abnimmt. Pektin ist in der Lage bis zu 0,8 g Procyanidine je Gramm aufzunehmen (Le Bourvellec *et al.* 2005). Dies wurde auch in eigenen Untersuchungen bestätigt, in denen in isoliertem Apfelsafttrub bis zu 60% Procyanidine gefunden wurden (Daten nicht gezeigt). Die

Bindung der Procyanidine ist neben dem Polymerisationsgrad auch abhängig von der Ionenstärke des Saftes und der Temperatur während der Verarbeitung (Le Bourvellec *et al.* 2007).

Auf andere Polyphenole des Apfelsaftes haben diese Zellwandbestandteile hingegen kaum Einfluss. So wurden (-)-Epicatechin und die Hydroxyzimtsäuren des Apfels nicht gebunden. In einem Vergleich von Säften mit der entsprechenden Frucht betrug die durchschnittliche Wiederfindung für die Hydroxyzimtsäuren (+)-Catechin und (-)-Epicatechin 87% und für das Dihydrochalkon Phloretin-2'-glucosid 33% (Renard *et al.* 2001). Daraus folgt, dass die polymeren Procyanidine sowohl beim Pressvorgang als auch bei der anschließenden Klärung des Saftes in gebundener Form zusammen mit den Zellwandbestandteilen und Pektinen abgetrennt werden. Somit gehen 60-90% der polymeren Procyanidine während der Verarbeitung verloren (Guyot *et al.* 2003, Le Bourvellec *et al.* 2007). Der erhöhte Gehalt an (-)-Epicatechin in den klaren Säften ist vermutlich auf eine hydrolytische Spaltung während der Klärung zurückzuführen.

3.1.1.2 Apfelsaftextrakte

Als Grundlage für *in vitro*-Versuche sind Apfelsäfte aufgrund ihrer hohen Zucker- und Säurekonzentration ungeeignet. Daher wurden aus technologisch unterschiedlich hergestellten Apfelsäften unter Verwendung von Adsorberharzen polyphenolreiche Extrakte gewonnen.

Grundlage für die untersuchten Apfelsaftextrakte bildeten die Apfelsäfte AS02, AS04, AS05, AS06 und AS07, der Tresterextraktionssaft AS03B, ein kommerziell erhältlicher naturtrüber Saft sowie zwei Reiffruchtsäfte aus den Sorten Bohnapfel bzw. Bittenfelder. Die Säfte wurden im Pilotmaßstab an der Forschungsanstalt Geisenheim produziert, wobei sich die jeweilige Ziffernkombination auf das Herstellungsjahr bezieht. Die Säfte bestanden vorwiegend aus Mostapfelsorten. Im AS02 betrug der Anteil der Tafeläpfel nur 45%, in AS04 und AS05 sogar weniger als 30%. Im AS06 und AS07 lagen die Anteile bei 35% bzw. 19%. Detaillierte Angaben zur Produktion verwendeter Äpfel sowie eingesetzter Produktionstechniken sind in Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2 zusammengefasst. Zur Extrakterstellung wurden die Adsorberharze P-495 (Alimentech), XAD16HP (Amberlite) und SP70 (Sepabeads) verwendet. Diese sind in der Literatur für ihre gute Adsorptionsfähigkeit von phenolischen Apfelsaftbestandteilen beschrieben (Tomás-Barberán *et al.* 1992, Kammerer *et al.* 2007). In Vorstudien wurde eine Wieder-

findung nach Aufarbeitung einer standardisierten Polyphenolmischung mit $95,1 \pm 5\%$ bestimmt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit Studien von Tomás-Barberán und Mitarbeitern (1992) an chemisch verwandten Adsorbentien. Des Weiteren ist der Apfelsaft AS05 mit den Harzen P-495 und XAD16HP aufgearbeitet worden. Hierbei wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Extrakten festgestellt.

Das Polyphenolprofil der Apfelextrakte wurde mittels RP-HPLC-DAD bestimmt. Die Charakterisierung und Quantifizierung der in den Extrakten enthaltenen Procyanidine erfolgte unter Anwendung des HCl-Butanol-Assays bzw. der Thiolyse (s. Kapitel 3.1.1.1).

Im Allgemeinen lässt sich feststellen, dass sich die Extrakte, welche aus klaren Apfelsäften erhalten wurden, in ihrer Zusammensetzung an niedermolekularen Polyphenolen nur geringfügig von den Extrakten aus trüben Säften unterschieden (vgl. Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8). In der Polyphenolzusammensetzung der Extrakte unterschiedlicher Produktionsjahre waren jedoch deutliche Unterschiede erkennbar. Dies war in Anbetracht der Sortenvielfalt und der unterschiedlichen Technologie zu erwarten.

Die Gehalte an phenolischen Säuren, welche wie bei den Säften das phenolische Spektrum dominieren, schwankten mit Ausnahme von AE03B zwischen 136,5 mg/g (Bohnapfel klar) und 274,0 mg/g (AE05 klar). Zwischen den Säften einer Charge waren meist nur geringe Unterschiede erkennbar. Eine Ausnahme bildete hierbei AE05, dessen trüber Saftextrakt ca. 30% weniger phenolische Säuren enthielt. Ein klarer Trend zur An- oder Abreicherung in den Extrakten aus klaren Säften war nicht erkennbar.

Die Gehalte an Dihydrochalkonen variierten zwischen 46,7 mg/g (AE06 trüb) und 128,8 mg/g (AE04), die Anteile an niedermolekularen Flavan-3-ole zwischen 8,5 mg/g (AE05 klar) und 89,6 mg/g (AE06 trüb). Bei letzteren war bei einem Vergleich der klaren und trüben Säfte einer Charge eine leichte Abreicherung durch den Klärungsprozess erkennbar. Die Flavonolglycoside waren, wie schon in den Apfelsäften nachgewiesen (vgl. Kapitel 3.1.1.1), mit Gehalten von 2,6 mg/g (AE06 trüb) bis 12,1 mg/g (AE04) nur Minorbestandteile.

AE03B bildete in seiner Zusammensetzung eine Ausnahme, da bei dessen Produktion der normale Saft verworfen und der Trester nach Pektinase- und Cellulase-Behandlung extrahiert wurde. In der Folge waren die phenolischen Säuren mit 32,4 mg/g Minorbestandteile im Extrakt. Hingegen wurde eine deutliche Anreicherung der Flavonole auf 116,2 mg/g erreicht. Auch die Gehalte der Flavan-3-ole und der Dihydrochalkone

befanden sich mit 45,0 bzw. 123,2 mg/g im Vergleich zu den anderen untersuchten Extrakten im oberen Drittel.

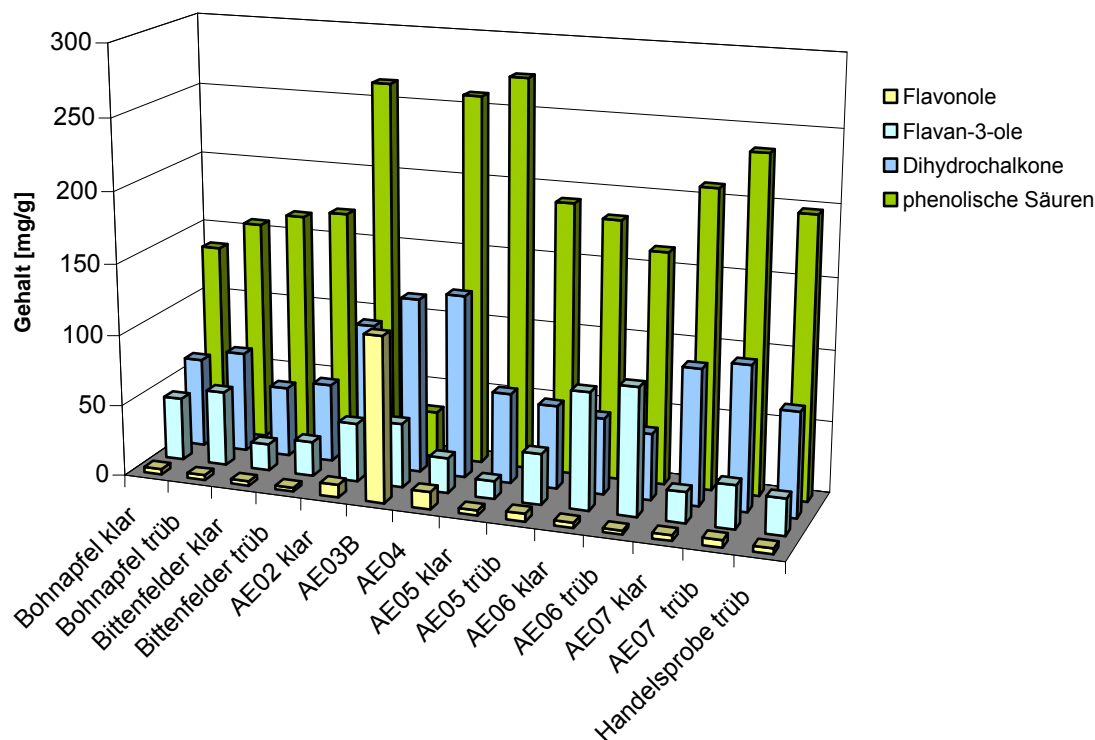


Abbildung 3.7 Polyphenolgehalte der untersuchten Extrakte aus klaren und trüben Apfelsäften (zu Definition und Herstellung s. Tabelle 3.1 und 3.2)

Bei Betrachtung der Einzelkomponenten (Abbildung 3.8) wird erkennbar, dass die Chlorogensäure – apfeltypisch – mit Gehalten von bis zu 183,9 mg/g (AE05 klar) den größten Anteil aller Substanzen aufwies. Die 4-*p*-Cumaroylchinasäure schwankte stark abhängig von den für die Produktion eingesetzten Sorten von 4,8 mg/g (AE06 klar) bis 98,0 mg/g (AE07 trüb). Die freien Säuren Kaffeesäure und *p*-Cumarsäure waren nur in Spuren vorhanden und erreichten insgesamt max. 15 mg/g.

Phloretin-2'-xyloglucosid (11,2 - 69,5 mg/g) und Phloretin-2'-glucosid (11,1 - 78,9 mg/g) waren die mengenmäßig überwiegenden Dihydrochalkone. Aus ihnen können bei der Verarbeitung durch enzymatische Oxidation die entsprechenden, in Position 3 zusätzlich hydroxylierten Verbindungen entstehen, die mit Gehalten von bis zu 27,6 mg/g (AE07 klar) gefunden wurden. Ein Anstieg der Gehalte aufgrund einer enzymatischen Behandlung während der Saftklärung war nicht zu erkennen. Das von uns erstmals identifizierte Phloretin-2',4'-diglucosid war nur in geringen Mengen von ca. 1 mg enthalten.

Epicatechin und dessen Dimer Procyanidin B₂ sind die apfeltypischen Flavan-3-ole. Sie waren in den Extrakten bis zu 44,3 bzw. 37,9 mg/g enthalten. Ein Vergleich der klaren

und trüben Säfte einer Charge zeigte eine deutliche Abnahme dieser Substanzen infolge der Klärung.

Die Quercetinglycoside waren meist nur nahe der Quantifizierungsgrenze detektierbar. Die häufigsten Glycoside waren dabei Rutinosid, Galactosid und Rhamnosid. Das freie Aglykon war nur in einigen Extrakten nachweisbar.

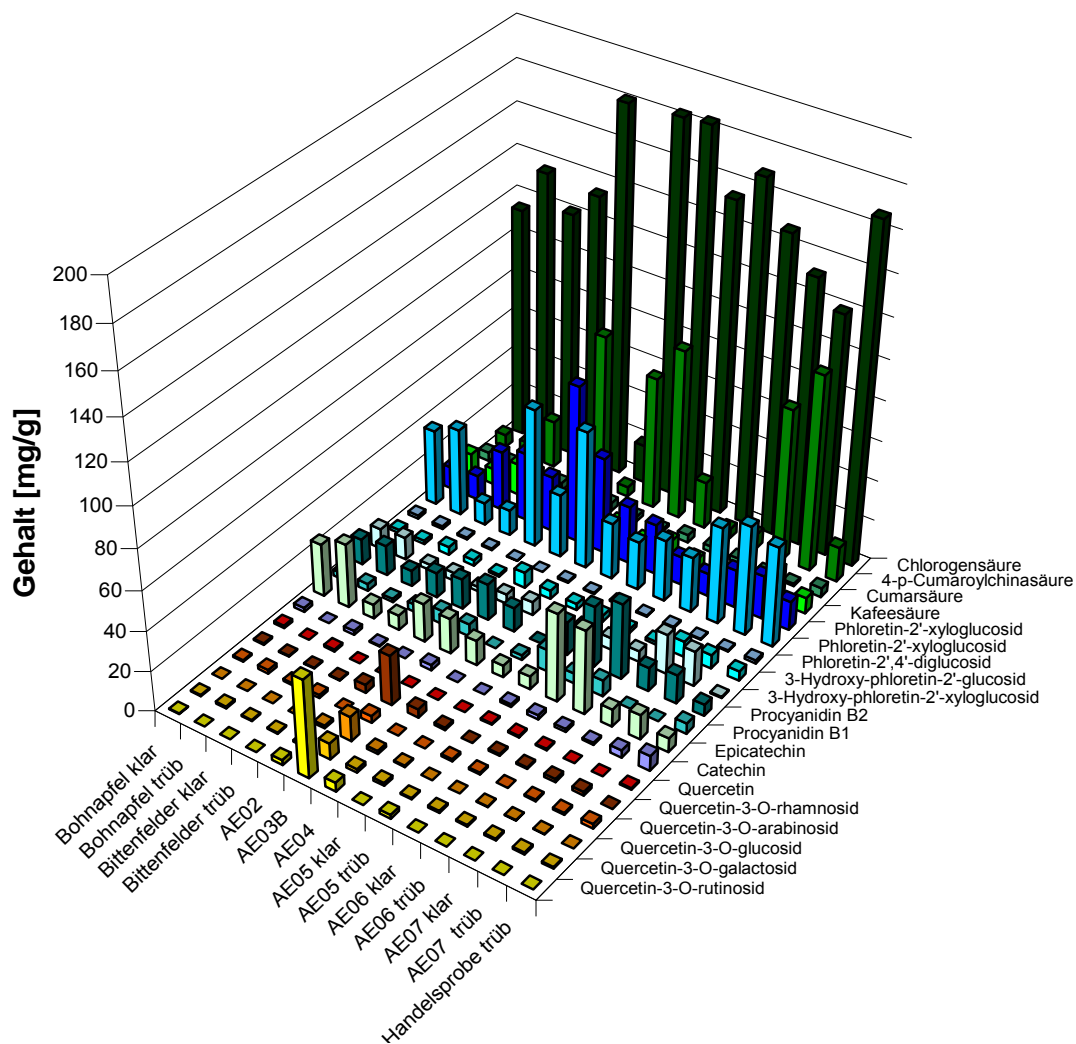


Abbildung 3.8 Polyphenolgehalte der untersuchten Extrakte (zu Definition und Herstellung s. Tabelle 3.1 und 3.2)

Um den Gesamtprocyanidingehalt der untersuchten Apfelsaftextrakte zu bestimmen, wurde der in Abschnitt 3.1.1 beschriebene Salzsäure-Butanol-Assay eingesetzt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.9 dargestellt. Die Extrakte der Mostapfelsorten Bohnapfel (trüb: 605 mg/g bzw. klar: 490 mg/g) und Bittenfelder (trüb: 532 mg/g bzw. klar: 450 mg/g) zeigten einen deutlich höheren Procyanidingehalt als vergleichbare Extrakte aus verschnittenen Säften wie z.B. AE05 (trüb: 517 mg/g bzw. klar: 276 mg/g).

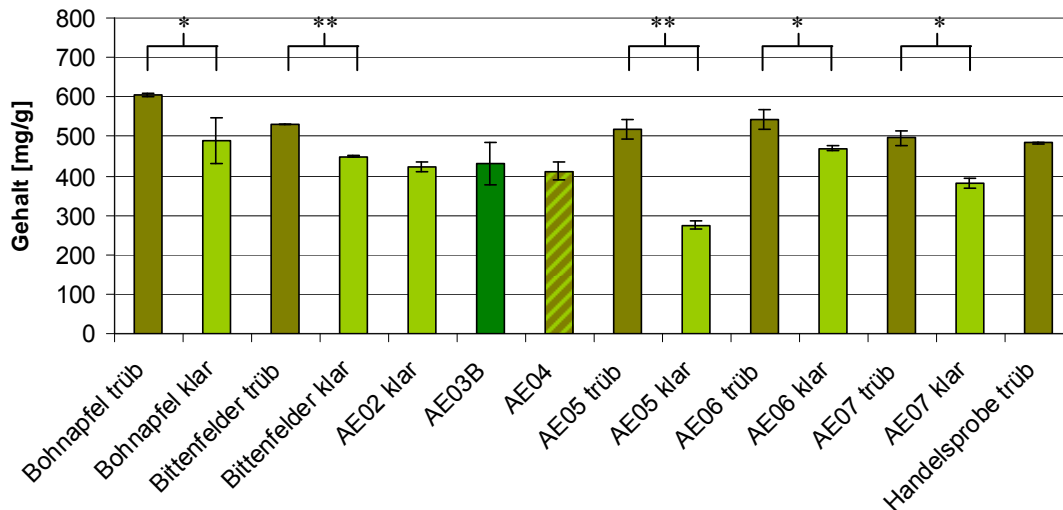


Abbildung 3.9 Gesamtprocyanidingehalt in den untersuchten Apfelsaftextrakten (in mg/g). (Angaben sind Mittelwerte \pm SD aus Dreifachbestimmungen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Des Weiteren wurden signifikante Unterschiede im DPM zwischen den untersuchten Apfelsaftextrakten aus klaren und trüben Säften festgestellt. Dieses Resultat ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen der Säfte (vgl. Kapitel 3.1.1.1). In Abbildung 3.10 ist der DPM der Procyanidine der untersuchten Extrakte dargestellt. Dieser war in den sortenreinen Saftextrakte aus den Mostäpfeln Bohnapfel (12,1 bzw. 8,8) und Bittenfelder (13,4 bzw. 8,9) deutlich höher als in entsprechenden Extrakten aus verschnittenen Säften, die einen gewissen Anteil an Tafeläpfel enthielten. Eine Ausnahme bildete hierbei AE04, der auch einen gewissen Anteil Tresterextraktionsaft enthält.

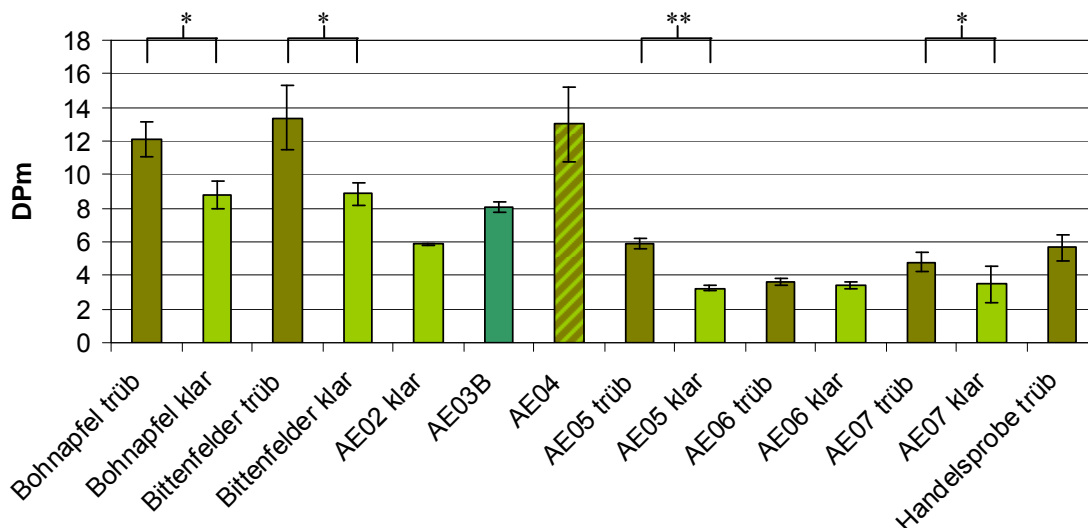


Abbildung 3.10 Mittlerer Polymerisationsgrad (DPM) von Procyanidinen in den untersuchten Apfelsaftextrakten (Angaben sind Mittelwerte \pm SD aus Dreifachbestimmungen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Insgesamt war erkennbar, dass sich die Polyphenolprofile von Saftextrakten verschiedener Jahre stärker unterscheiden als die Extrakte aus klaren und trüben Säften einer

Ernte. Interessanterweise enthielten die Extrakte aus klaren Säften höhere Konzentrationen an Chlorogensäure und *p*-Cumaroylchinasäuren. Dies liegt möglicherweise an dem Klärungsschritt, bei dem durch die Pektinasebehandlung die Ester der phenolischen Säuren freigesetzt wurden. Weiterhin wurde das freie Aglykon nur in einigen Extrakten nachgewiesen. Da es aber in den entsprechenden Säften nicht nachweisbar war, handelte es sich wahrscheinlich um ein Artefakt der Extrakterstellung. In einer Studie mit trüben Apfelsäften von Oszmianski und Wojdylo (2006) wurden ebenfalls Veränderungen der Polyphenolgehalte bei der Klärung der Säfte beobachtet. Allerdings nahm der Polyphenolgehalt mit Ausnahme der Dihydrochalkone leicht ab.

Des Weiteren war AE03B – ein Extrakt des Tresterextraktionssaftes, der durch Cellulase/Pektinasebehandlung erhalten wurde – an phenolischen Säuren abgereichert. Ferner erreichten die Dihydrochalkone sowie die Flavonole eine deutliche höhere Konzentration als es aufgrund der Sortenauswahl zu erwarten gewesen wäre. So erwiesen sich die Reiffruchtsäfte aus den für die AE03B verwendeten Tafelapfelsorten in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe als sehr polyphenolarm und erreichten nicht mehr als 36 bzw. 3 mg/l Phloretin- bzw. Quercetinglycoside (Kahle *et al.* 2005). Dies erklärt sich dadurch, dass Dihydrochalkone- und Quercetinglycoside hauptsächlich in der Apfelschale lokalisiert sind (Guyot *et al.* 1998) und eine zusätzliche Extraktion des Tresters zu einer Veränderung des Polyphenolprofils sowie zur Anreicherung der entsprechenden Flavonoide führt.

Die Daten machen deutlich, dass nicht nur die Verwendung von Mostapfelsorten den Polyphenolgehalt beeinflusst. Obwohl AS05 klar aus 76% Mostäpfeln besteht, ist der Procyanidingehalt seines Extraktes deutlich geringer als der des Extraktes aus AS02, der zu 55% aus Mostäpfeln produziert wurde. Offensichtlich unterscheiden sich die einzelnen Extrakte in zu vielen Variablen, um daraus Schlussfolgerungen ziehen zu können. Regionale und saisonale Variationen des Polyphenol- und Procyanidingehaltes sind eine mögliche Erklärung. Daneben spielen klimatische Bedingungen während des Reifevorgangs, der Erntezeitpunkt sowie die Lagerbedingungen vor der Verarbeitung eine bedeutende Rolle (Rohr *et al.* 2000, del Campo *et al.* 2006, Oszmianski *et al.* 2007). Ein Vergleich der verschiedenen Apfelsaftextrakte ist daher schwierig. Offensichtlich ist der Einfluss der Technologie auf den Procyanidingehalt – im Gegensatz zum Polyphenolprofil – nicht so stark wie der Einfluss der verwendeten Apfelsorten und die Art des Saftes (klar/trüb). Vergleicht man allerdings die Extrakte der klaren und trüben Säfte,

welche aus der gleichen Sorte (Bohnapfel oder Bittenfelder) bzw. einer Charge produziert wurden, ist deutlich zu erkennen, dass die Klärung des Saftes mit einer Verringerung des Procyanidingehaltes einhergeht. Da Flavan-3-ole sehr oxidationsempfindlich sind, ist es nicht auszuschließen, dass die Procyanidine während der Klärung zu hochpolymeren Phlobaphenen oxidiert werden. Diese werden zwar am Adsorberharz gebunden und gehen mit in den Extrakt über, sind aber analytisch nicht mehr zugänglich. Die Extrakte wiesen dann zwar vergleichbare Polyphenolgehalte auf, der Anteil an Procyanidinen ist jedoch deutlich geringer. Diese Ergebnisse stimmen gut mit kürzlich publizierten Arbeiten von Oszminaski *et al.* (2006, 2007) überein, die ebenfalls einen signifikanten Procyanidinverlust während des Klärungsprozesses beobachteten.

In Äpfeln wurde ein DPM von bis zu 35 beschrieben (Gu *et al.* 2003). Diese hohen Werte wurden von uns in den untersuchten Säften und Extrakten nicht gefunden. Ein möglicher Grund ist die schlechte Wasserlöslichkeit der hochpolymeren Procyanidine, weshalb diese bei der Saftproduktion mit dem Trester verworfen werden. Für diese Erklärung spricht auch der Extrakt des Tresterextraktionssaftes AS03B, der deutlich höherpolymere Procyanidine enthält, als es von einem Saft aus Tafeläpfeln zu erwarten gewesen wäre. Auch Renard *et al.* (2001) konnte eine Desorption der polymeren Procyanidine von Trubbestandteilen in Anwesenheit von gelösten Zellwandbestandteilen, wie sie während der enzymatischen Behandlung der Maische entstehen, nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zur Produktion der Säfte bzw. Saftextrakte verwendeten Apfelsorten einen Einfluss auf den Procyanidingehalt sowie deren DPM haben. Daneben sind weitere Faktoren wie Erntezeitpunkt und –jahr sowie die zur Saftproduktion verwendeten Technologien von Bedeutung.

3.1.2 Nicht-phenolische Substanzen

Neben den nutritiven Inhaltsstoffen, wie Zuckern und Proteinen sowie den phenolischen Verbindungen sind noch größere Mengen nicht-phenolische, höhersiedende Substanzen in den Apfelsäften enthalten. Die Stoffe dieser sehr heterogen zusammengesetzten Gruppe stellen oftmals wichtige Begleiter von Aromakomponenten bzw. deren Vorläufer dar. Zu diesen höhersiedenden Substanzen gehören u.a. die Abbauprodukte der Carotinoide, wie etwa das 3-Hydroxy- β -damascon. Das Molekül an sich ist geruchlos,

kann aber durch Dehydratisierung in das für thermisch behandelte Apfelprodukte typische β -Damascenon übergehen (Skouroumounis et al., 1993). Charakteristische Verbindungen im Apfelsaft sind die C₈-Alkohole (*R*)-1,3-Oktandiol und (*R*)-5-(*Z*)-Okten-1,3-diol (Beuerle und Schwab 1999). Diese apfeltypischen Aromastoffe werden sortenabhängig in variablen Konzentrationen gebildet. Vorstufe ist die Linol- bzw. Linolensäure, die durch Einwirkung der Lipoxygenase in Position 13 stereospezifisch hydroperoxidiert wird. Durch Einführung einer zweiten Sauerstofffunktion und Spaltung der Fettsäurekette zwischen C10 und C11 entstehen schließlich die C₈-Dirole. Sie dienen auch als Vorläufer für die Neubildung aromaaktiver Acetale aus der Reaktion mit fruchteigenen Aldehyden (Berger *et al.* 1988, Brunerie *et al.* 1998).

3.1.2.1 Apfelsäfte

Zur Extraktion der höhersiedenden Substanzen in den untersuchten Apfelsäften wurden diese jeweils dreimal mit Diethylether extrahiert; die etherische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, und anschließend entfernt man das Lösungsmittel schonend. Die Identifizierung der Substanzen im erhaltenen Extrakt erfolgte mittels GC-EI-MS, anhand von Vergleichen mit authentischen Referenzen. Die Quantifizierung wurde mittels GC-MS mittels eines internen Standards (2-Methyl-1-pentanol) durchgeführt.

Insgesamt enthielten die untersuchten klaren Apfelsäfte zwischen 30,7 und 150,5 mg/kg, die trüben Säfte zwischen 41,1 mg/kg und 91,9 mg/kg höhersiedende Substanzen. Ein Zusammenhang zwischen der Saftklärung und dem Gehalt war nicht ersichtlich. Allerdings war die Probenanzahl für eine verlässliche Aussage zu gering.

Die Stoffmenge wurde mengenmäßig von (*R*)-1,3-Oktandiol dominiert (vgl. Abbildung 3.11). Daneben war mit 5-(*Z*)-Okten-1,3-diol noch ein weiteres C₈-Diol in den Säften detektierbar. Die enthaltenen Mengen schwankten sehr stark. So wurden in den klaren Säften Gehalte an (*R*)-1,3-Oktandiol bzw. (*R*)-5-(*Z*)-Okten-1,3-diol zwischen 15,0 und 97,2 mg/kg bzw. 5,0 und 28,3 mg/kg gemessen. Die entsprechenden trüben Säfte enthielten zwischen 20,2 und 48,4 mg/kg bzw. 10,0 und 14,8 mg/kg. In wesentlich geringeren Mengen wurde 3-Hydroxy- β -damascon nachgewiesen. Dessen durchschnittliche Konzentration in allen Säften betrug 0,7 mg/kg. Ein Unterschied zwischen den klaren und den trüben Säften konnte nur bei AS06 festgestellt werden. Des Weiteren wurde die natürlicherweise im Apfel nicht vorhandene Substanz 3-Hydroxy-2-pyrone detektiert,

deren Gehalte zwischen 10,2 mg/kg im AS05 klar und 28,5 mg/kg im AS07 trüb variierten.

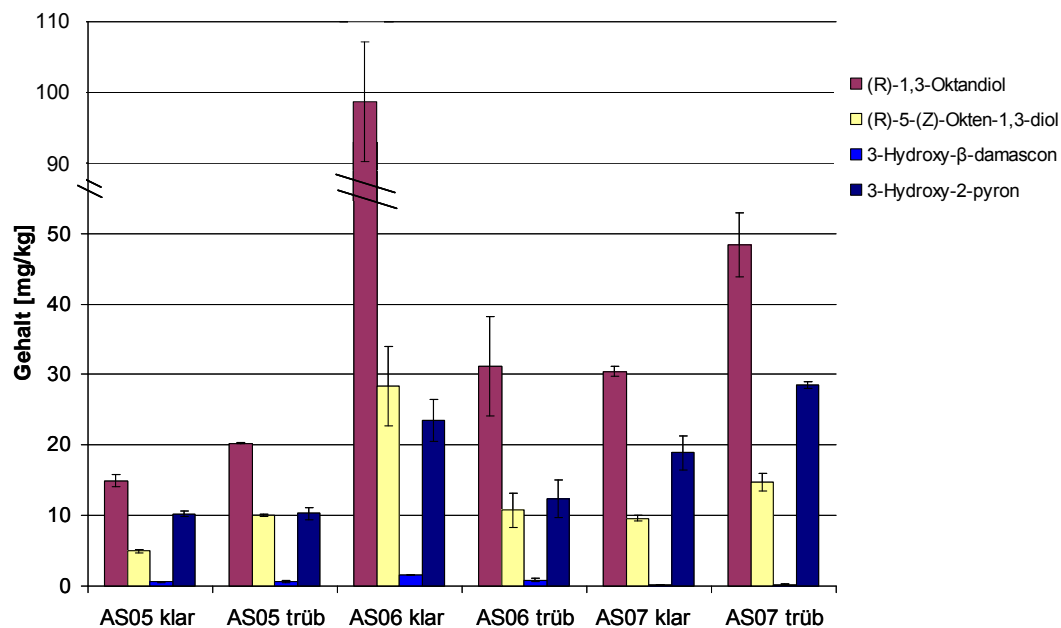


Abbildung 3.11 Gehalte höhersiedender Substanzen in den untersuchten Apfelsäften (mg/kg) Angegeben sind Mittelwerte \pm SD aus Doppelbestimmungen.

Die ermittelten Gehalte der C₈-Dirole stimmen gut mit den von Berger *et al.* (1988) gefundenen Konzentrationen überein. Für deren Untersuchungen wurden die Apfelsorten Red Delicious, Bohnapfel, purpurroter Cousinrot und Börtlinger Weinapfel, sowie die hieraus gewonnen Apfelsäfte untersucht. Die Autoren stellten fest, dass C₈-Dirole in Konzentrationen von 2,5 bis zu 95,1 mg/l enthalten waren und in freier Form vermutlich bevorzugt in aromaarmen, säurereichen Sorten vorkommen. Des Weiteren wiesen sie nach, dass die C₈-Dirole im Apfel glycosidisch gebunden in deutlich höheren Konzentrationen vorliegen und während der Lagerung langsam freigesetzt werden (Berger *et al.* 1988, Brunerie *et al.* 1998). Daraus lässt sich folgern, dass die in unseren Untersuchungen gefunden Unterschiede zwischen den Säften nicht nur abhängig von den verwendeten Sorten oder Technologien sind, sondern auch die Lagerung einen großen Einfluss auf die vorhandenen Gehalte hat.

3-Hydroxy-β-damascon ist ebenfalls in den für Apfel typischen Mengen nachgewiesen worden (Ferrandino *et al.* 2007). In der Literatur wurde neben der freien Form auch von einer glycosidisch gebundenen Form berichtet (D'Incecco *et al.* 2004), welche mit der von uns verwendeten Methode aber nicht bestimmbar war. Ein Einfluss der Klärung auf die detektierten Gehalte wurde mit Ausnahme von AS06 nicht nachgewiesen.

Das in hohen Konzentrationen ermittelte 3-Hydroxy-2-pyron ist im Gegensatz zu den anderen Substanzen keine natürliche Komponente des Apfels. Vielmehr entsteht sie bei der Erhitzung des Saftes während der Heißabfüllung oder während der Lagerung aus Ascorbinsäure durch nicht-enzymatische Bräunung über die intermediär gebildete Dehydroascorbinsäure (Tatum *et al.* 1969, Yuan und Chen 1998). Hierbei wirkt die Anwesenheit von Zuckern fördernd, wohingegen Chelatbildner wie Zitronensäure oder Radikalfänger zu einer verminderten Bildung führen (Shinoda *et al.* 2005). Die unterschiedlichen Gehalte an 3-Hydroxy-2-pyron sind daher auch ein Hinweis auf den Oxidationsstatus des zugrundeliegenden Saftes.

3.1.2.2 Apfelsaftextrakte

Untersucht wurden die Extrakte AE02, AE04, AE05 klar, AE05 trüb, AE06 klar AE06 trüb, AE07 klar, AE07 trüb sowie AE03B. Des Weiteren wurden die Extrakte aus den klaren und trüben sortenreinen Säften Bohnapfel und Bittenfelder sowie der Extrakt eines handelsüblichen naturtrüben Apfelsaftes analysiert. Die Extrakte wurden aus den Apfelsäften unter Zuhilfenahme von Adsorberharzen gewonnen. Die Auswahl der Harze war primär darauf ausgerichtet, eine möglichst vollständige Extraktion der im Saft enthaltenen phenolischen Substanzen zu gewährleisten, da der Einfluss dieser auf verschiedene *in vitro*-Testsysteme untersucht werden sollte. In vergangenen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass neben den phenolischen Substanzen auch Aromastoffe und höhersiedende Substanzen mittels Adsorberharzen extrahiert werden können (Boulanger und Crouzet 2000, Bohlscheid *et al.* 2006). Daher wurden zur Analyse der enthaltenen Komponenten 200 mg Extrakt in Wasser gelöst, dreimal mit Diethylether extrahiert, die etherische Phase über Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel schonend entfernt. Identifizierungs- und Quantifizierungsmethoden entsprachen denjenigen der Säfte. Abbildung 3.12 orientiert über die hierbei erhaltenen Ergebnisse.

Der Gesamtmenge der höhersiedenden Substanzen in den untersuchten Extrakten variierte innerhalb der untersuchten Apfelsaftextrakte stark. So enthielt AE03B nur 11,9 mg/g wohingegen im Extrakt der Handelsprobe 166,5 mg/g bestimmt wurden. Im Gegensatz zu den Säften enthielten meist die Extrakte aus klaren Säften etwas höhere Konzentrationen an höhersiedenden Substanzen als die entsprechenden trüben Varianten.

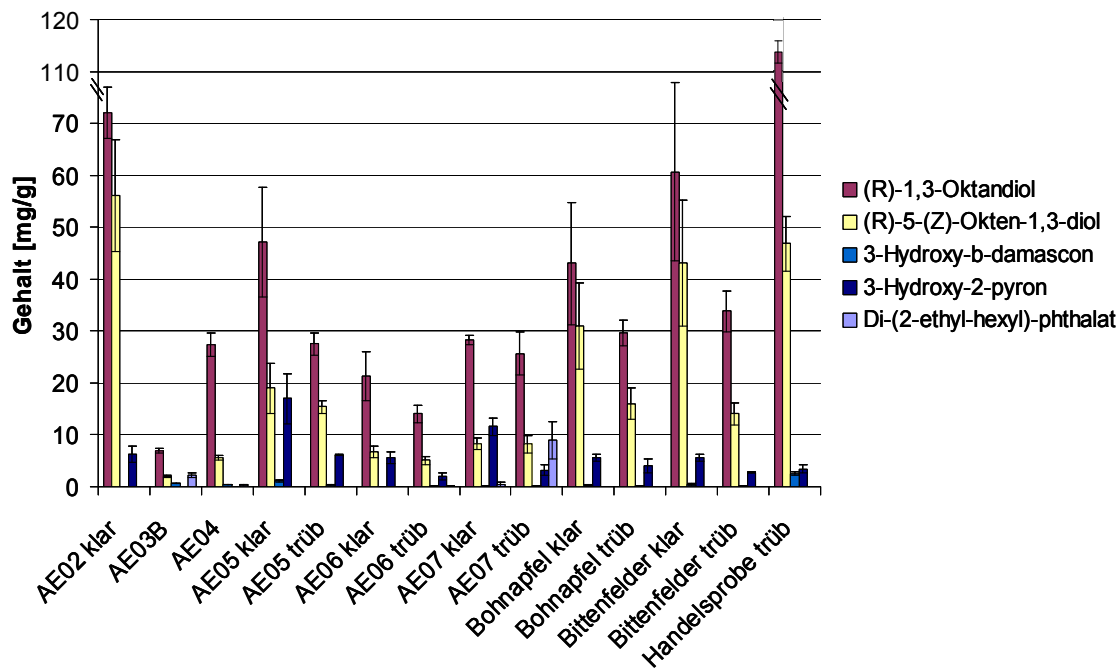


Abbildung 3.12 Gehalte höhersiedender Substanzen in den untersuchten Apfelsaftextrakten (mg/g). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD aus Doppelbestimmungen.

In nahezu allen Extrakten dominierten die Substanzen (*R*)-1,3-Oktandiol und (*R*)-5-(*Z*)-Okten-1,3-diol die Zusammensetzung. In den klaren Säften waren Gehalte durchschnittlich um 38,5% bzw. 31,8% höher als in den entsprechenden trüben Säften. Mit 113,7 mg/g wies der Extrakt der Handelsprobe den höchsten Gehalt an (*R*)-Oktan-1,3-diol auf. (*R*)-5-(*Z*)-Okten-1,3-diol war hingegen im Extrakt AE02 mit 56,1 mg/g am meisten enthalten.

Wie schon bei der Untersuchung der Säfte erkennbar, war 3-Hydroxy- β -damascon nur in Mengen unter 1 mg/g enthalten. Eine Ausnahme bildete hier wiederum der Extrakt der Handelsprobe, der 2,5 mg/g enthielt. 3-Hydroxy-2-pyron war nicht in allen Extrakten nachweisbar. In den Extrakten der Säfte AS05, AS06 und AS07 wurden Gehalte bis zu 17,0 mg/g detektiert worden.

Neben den apfeltypischen Inhaltsstoffen wurde in den Extrakten eine Kontamination mit dem Weichmacher Di-(2-ethyl-hexyl)-phthalat nachgewiesen. Vor allem die Extrakte AE03B mit 2,2 mg/g und AE07 trüb mit 8,9 mg/g waren besonders auffällig.

Ein Rückschluss von den Gehalten in den Extrakten auf die ursprünglich in den Säften enthaltenen Mengen an höhersiedenden Substanzen ist nur schwer möglich. So schwankten beispielsweise die Gehalte der C_8 -Diole stark und schienen von der Ex-

trakterstellung abhängig zu sein, da sie nicht mit denen der untersuchten Säften korrelierten. Dies ist wahrscheinlich im Vergleich zu den phenolischen Substanzen in der geringeren Bindungsstärke an den Adsorber begründet. Die unterschiedlichen Mengen an 3-Hydroxy- β -damascon sind, wie schon bei der Untersuchung der Säfte geschildert, neben der Wahl der Apfelsorte und/oder der Produktionsweise auch auf die Dauer der Lagerung zurückzuführen (D'Incecco *et al.* 2004). Das unter oxidativen Bedingungen aus Ascorbinsäure gebildete 3-Hydroxy-2-pyron korrelierte ebenfalls nicht mit den in den Säften gefundenen Mengen. Die Kontamination der Extrakte mit dem Weichmacher Di-(2-ethyl-hexyl)-phthalat ist vermutlich auf eine Anwendung weichmacherhaltiger Kunststoffschläuche zurückzuführen.

3.2 Fraktionierung von Apfelsaftextrakten

Wie in Kapitel 3.1 bereits beschrieben, enthalten Apfelsäfte und die hieraus erhaltenen Apfelsaftextrakte verschiedene Klassen von Polyphenolen, sowohl Monomere wie beispielsweise das Hydroxyzimtsäurederivat Chlorogensäure, die Flavan-3-ole (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, das Dihydrochalcon Phloretin-2-glucosid, Glycoside des Flavonols Quercetin, als auch kondensierte Procyanidine, wobei letztere mengenmäßig dominieren (Guyot *et al.* 2002).

Da Apfelsaftextrakte mit nahezu identischen Gehalten der Hauptinhaltsstoffe in ihrer antioxidativen Kapazität voneinander abweichen, nimmt man an, dass noch nicht identifizierte Nebenkomponenten zusätzlich eine Rolle spielen (Schaefer *et al.* 2006). Apfelsaftextrakt hemmte *in vitro* das Wachstum der menschlichen Kolonkrebs-Zelllinie HT 29. Dabei inhibierten die wirksamen Verbindungen des Extrakts die Protein-Tyrosinkinase (PTK) des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (EGFR) und die nachfolgenden Signalkaskaden, die eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellproliferation spielen. Als wirksame Substanzen wurden bereits die Proanthocyanidine B₁ und B₂ sowie Quercetin-3-*O*-glucosid und Quercetin-3-*O*-galactosid identifiziert, wobei im Allgemeinen freie Aglykone eine bessere Hemmwirkung aufwiesen als die im Apfelsaft enthaltenen Glycoside. Da ein aus den damals bekannten Hauptinhaltsstoffen rekonstituierter Extrakt nicht die gleiche Hemmwirkung entfalten konnte, sind jedoch offensichtlich noch unbekannte Extrakt-Inhaltsstoffe erheblich an der EGFR-Hemmung und an antiproliferativen Effekten des Apfelsaftextrakts beteiligt (Kern *et al.* 2005).

Um auch Nebenkomponenten auf ihre präventiven Eigenschaften zu untersuchen, wurden von uns präparative Methoden zur Auftrennung der Polyphenole der Apfelsaftextrakte AE04 und AE06 entwickelt und Einzelverbindungen isoliert.

3.2.1 Apfelsaftextrakt AE04

3.2.1.1 Fraktionierung an Sephadex LH-20 und Subfraktionierung

Ausgangsmaterial für erste Fraktionierungsversuchsreihen war der Apfelsaftextrakt AE04, der an der Forschungsanstalt Geisenheim hergestellt worden war. Der zugehörige Saft wurde (aufgrund der schlechten Apfelernte im Jahre 2003) aus einer Mischung verschiedener Ausgangsprodukte hergestellt. Diese wurden so ausgewählt, dass der Saft einen möglichst hohen Polyphenolgehalt und zudem eine mit einem naturtrüben Saft aus Mostäpfeln vergleichbare Polyphenolverteilung aufwies. Zur Produktion des Saftes wurden 250 l klarer Apfelsaft (AS02) eingesetzt, der zu 20% aus gemischten Tafelobst, zu 25% aus der Sorte Topaz, zu 17,5% aus der Sorte Bohnapfel, zu 22,5% aus der Sorte Winterrambur und zu 15% aus der Sorte Bittenfelder bestand. Des Weiteren wurden 50 l Tresterextraktionssaft und jeweils 200 l naturtrübe sortenreine Säfte der Mostapfelsorten Schafsnase, Bohnapfel und Winterrambour zugemischt (vgl. Tabelle 3.1).

Zucker und Säuren wurden anschließend am Absorberharz P-495 von den phenolischen Verbindungen abgetrennt. Letztgenannte wurden mit Methanol vom Absorberharz eluiert und das Lösungsmittel schonend abgezogen. Anschließend wurde lyophilisiert, um einen trockenen, pulvrigen Extrakt zu erhalten.

Mit dem Ziel, bisher nicht beschriebene Apfelsaftextraktinhaltsstoffe zu isolieren, wurde der Extrakt in mehreren Schritten aktivitätsgeleitet fraktioniert. Hierbei kamen neben der Größenausschlusschromatographie auch die Normal- und Umkehrphasenchromatographie zum Einsatz. Abbildung 3.13 orientiert über die hierbei erhaltenen Fraktionen.

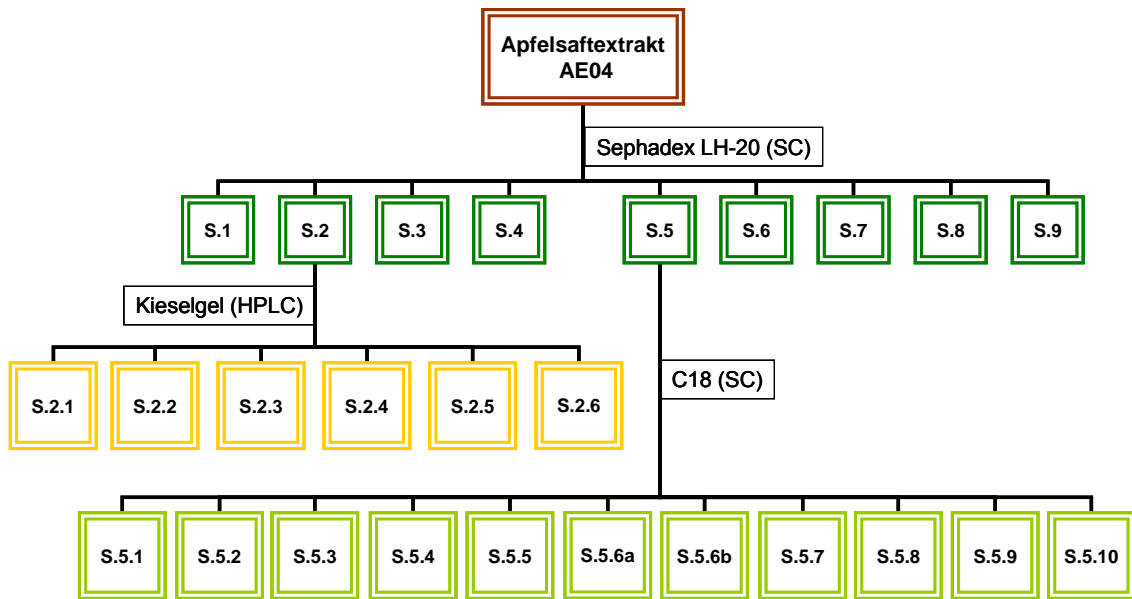


Abbildung 3.13 Überblick über die Fraktionierung von AE04 (SC: Säulenchromatographie, HPLC: präparative Hochleistungsflüssigchromatographie)

3.2.1.1.1 Fraktionierung und Analytik der Sephadex-Fractionen

Die chromatographische Auftrennung des Extraktes AE04 mittels Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 wurde nach Zeßner (2005) modifiziert. Sephadex LH-20 ist ein hydroxypropyliertes quervernetztes Polydextran, das sich aufgrund seiner veränderten Polarität besonders dafür eignet, Naturstoffe mit geringer Molekularmasse aufzutrennen. Hierzu wurden jeweils 10 g des Extraktes in Methanol gelöst und an Sephadex LH-20 gereinigt, wobei Methanol als Fließmittel diente. Es wurden ca. 400 Reagenzglasfraktionen à 9 ml erhalten. Der Verlauf der Trennung wurde durch dünn-schichtchromatographische (DC) Kontrolle an Kieselgel dokumentiert. Die phenolischen Substanzen wurden durch Besprühen mit Naturstoffreagenz A und Polyethylenglykol 400 (PEG-400) nachgewiesen. Anhand der Ergebnisse der DC-Charakterisierung wurde eine Einteilung in acht Grundfraktionen S.1 bis S.8 vorgenommen (vgl. Abbildung 3.13). Nach abgeschlossener Trennung erfolgte die Regenerierung des Säulenmaterials mit einer Aceton/Methanol-Mischung (1:1, v:v). Hierbei wurden stark unpolare Substanzen eluiert (Fraktion S.9).

In Wasser unlösliche Substanzen wurden unter Zuhilfenahme einer Glasfritte (P4) abgetrennt und mit dem Zusatz ND versehen. Fraktion S.9 war vollständig wasserunlöslich. Aus Fraktion S.8 konnte durch Fällung Quercetin in reiner Form gewonnen werden.

Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihr Polyphenolprofil hin untersucht. Dabei erfolgte die Identifizierung der einzelnen Apfelsaftpolyphenole mittels HPLC-DAD sowie HPLC-ESI-MS/MS. Die Quantifizierung wurde mittels HPLC-DAD anhand des externen Standards 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure durchgeführt. Ferner wurde der Gehalt an polymeren Procyanidinen sowie deren mittlerer Polymerisationsgrad mit Hilfe des HCl-Butanol-Assays bzw. Thiolyse bestimmt. In den Fraktionen S.1 und S.2 wurde zusätzlich der Gehalt an polymeren Kohlenhydratbausteinen nach schwefelsaurer Hydrolyse bestimmt, da es in vorangegangenen Arbeiten Hinweise darauf gab, dass diese in den früh eluierenden Sephadexfraktionen enthalten sein können. Hierzu wurden die Fraktionen mit 1M Schwefelsäure hydrolysiert, die Proben verdünnt und nach Filtration mittels Anionenaustauscherchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD) auf Kohlenhydrate untersucht.

Tabelle 3.3 Zusammensetzung der AE04 Subfraktionen. Angaben in mg/g.

Fraktion	S.1	S.2	S.3	S.4	S.5	S.6	S.7	S.8	S.9
Epicatechin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	65,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Catechin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B ₁	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,5	15,7	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B ₂	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	51,4	18,6	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B ₃	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B ₄	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Neochlorogensäure	n.d.	1,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Chlorogensäure	n.d.	n.d.	337,0	213,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kaffeensäure	n.d.	n.d.	0,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4- <i>p</i> -Cumaroylchinasäure	n.d.	1,7	107,4	16,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -Cumarsäure	n.d.	n.d.	11,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin-2'-xyloglucosid	n.d.	n.d.	144,5	107,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin-2'-glucosid	n.d.	n.d.	44,2	191,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin	n.d.	n.d.	0,6	n.d.	5,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid	n.d.	n.d.	n.d.	14,4	2,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid	n.d.	n.d.	n.d.	26,6	62,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin-2',4'-diglucosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-arabinosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-glucosid	n.d.	n.d.	n.d.	0,7	6,7	3,1	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-galactosid	n.d.	n.d.	n.d.	0,8	16,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-rhamnosid	n.d.	n.d.	n.d.	4,0	18,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-rutinosid	n.d.	n.d.	n.d.	5,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-xylosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16,5	3,4	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,3	0,6	1,5	4,5	n.d.
Polymere Procyanidine (photom.)	650,8	357,6	339,8	447,9	767,5	938,7	846,5	868,0	996,3
polymere Kohlenhydratbausteine	113	107	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Summe	763,8	467,7	985,2	1028,9	1035,4	980,2	848,0	872,5	996,3

n.d.: nicht detektierbar; n.u.: nicht untersucht

Wie in Tabelle 3.3 gut ersichtlich, gelang eine gute Auftrennung der Polyphenole. In Fraktion S.1 wurden mittels HPLC-Analytik keine Inhaltsstoffe detektiert. Ähnliches gilt für die Fraktion S.2, in der außer Spuren einiger phenolischer Säuren keine bekannten Substanzen identifiziert wurden. Im weiteren Verlauf der Fraktionierung eluieren zuerst die phenolischen Säuren und die Dihydrochalkone (S.3; S.4), später die monomeren und dimeren Flavan-3-ole (S.5; S.6) sowie die Quercetinglycoside (S.5). Das freie

Aglykon Quercetin wurde aufgrund der geringen Polarität erst sehr spät eluiert (S.8). Die polymeren Procyanidine waren in allen Fraktionen vertreten. Ihr Anteil nahm in den spät eluierenden Fraktionen zu. Eine Ausnahme bildete die Fraktion S.1, die zu 65% aus Procyanidinen bestand. Des Weiteren stieg auch der DPm zum Ende der Fraktionierung leicht an (Daten nicht gezeigt). Vor allem die durch Elution der Säule mit Aceton erhaltene Fraktion S.9 bestand gänzlich aus polymeren Procyanidinen.

Die Analyse der Kohlenhydratbausteine in S.1 und S.2 lieferte als Ergebnis, dass in Fraktion S.1 zu fast gleichen Anteilen Rhamnose (3,7%), Arabinose (3,2%) und Glucose (2,7%) neben kleineren Anteilen anderer Zucker enthalten waren. In Fraktion S.2 wurde hingegen fast ausschließlich Glucose (8,3%) und Arabinose (1,2%) nachgewiesen.

Die GC-MS-Analyse zur Identifizierung höhersiedender Inhaltsstoffe zeigte, dass diese ausschließlich in S.2 zu finden waren. Die Gehalte von 75,1 mg/g (*R*)-1,3-Oktandiol, 19,8 mg/g (*R*)-5-(*Z*)-Okten-1,3-diol und 1,4 mg/g 3-Hydroxydamascon waren geringer als erwartet.

Im Allgemeinen war die erzielte Trennleistung in guter Übereinstimmung mit der von Zeßner (2005) beschriebenen. Aus den Ergebnissen der Kohlenhydratbestimmung kann geschlossen werden, dass in S.1 vorwiegend Abbauprodukte des Pektins (vgl. Abbildung 2.2) und in Fraktion S.2 Reste der im Apfelsaft enthaltenen Hemicellulosen aufkonzentriert wurden.

Die deutlich geringeren Gehalte an höher siedenden Substanzen in den Fraktionen sind vermutlich Folge von Zersetzungsreaktionen, wie sie z.B. für 3-Hydroxy-2-pyron unter Lichteinwirkung und/oder Wärme beschrieben sind (Pirkle und McKendry 1968), oder anderer chemischer Reaktionen der enthaltenen C₈-Dirole (Kavvadias *et al.* 1999).

3.2.1.1.2 Subfraktionierung der Sephadexfraktion S.2 an Kieselgel

Die Modulation des Fremdstoffmetabolismus betreffend zeigte S.2 im Vergleich zu den anderen Fraktionen das größte Potential, das Phase-II-Enzym Chinonreduktase in der Hepa1c1c7 Maus Leberkrebszelllinie zu induzieren (vgl. Kapitel 3.5.1). Daher wurde diese Fraktion an Kieselgel mittels präparativer HPLC weiter aufgetrennt. Als Fließmittel diente ein binärer Gradient aus Methanol und Dichlormethan mit einem konstanten Anteil von 4% wässriger Essigsäure. Dieser ist dazu geeignet, Procyanidine anhand ihrer Kettenlänge aufzutrennen (Lazarus *et al.* 1999). In Abbildung 3.14 ist ein hierbei

erhaltenes Chromatogramm dargestellt, in dem die gesammelten Fraktionen gekennzeichnet sind.

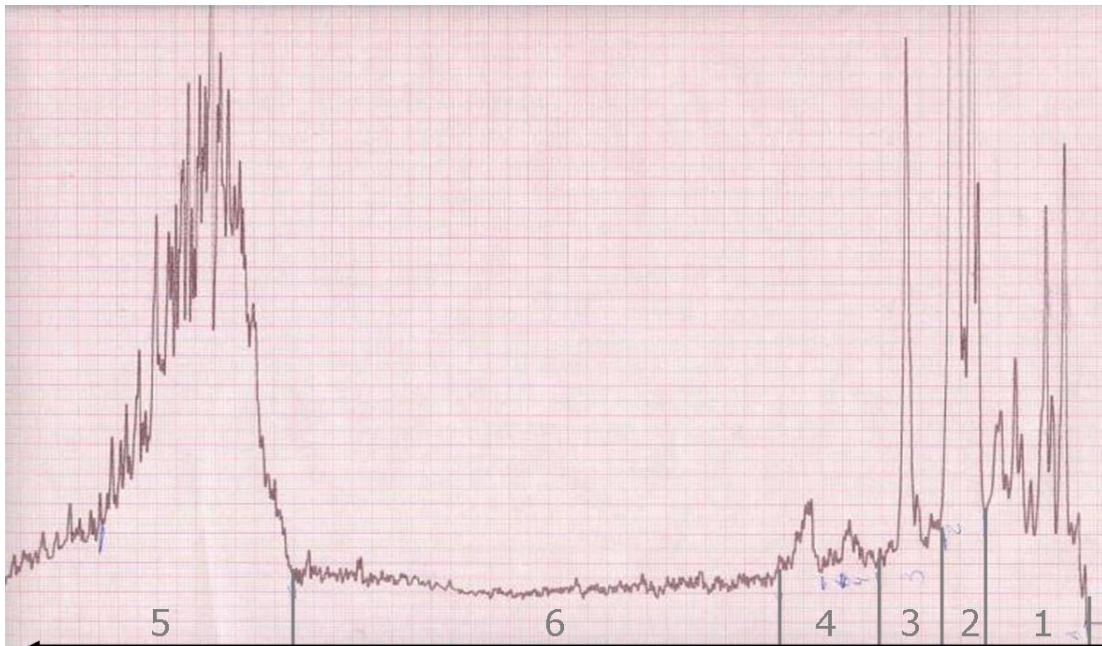


Abbildung 3.14 Mittels präp. HPLC erhaltenes Chromatogramm von Fraktion S.2 mit gekennzeichneten Subfraktionen 1 – 6.

Die Analyse auf polymere Procyanidine zeigte, dass sowohl der Procyanidingehalt als auch der DPm mit zunehmender Retentionszeit anstiegen (vgl. Abbildung 3.15).

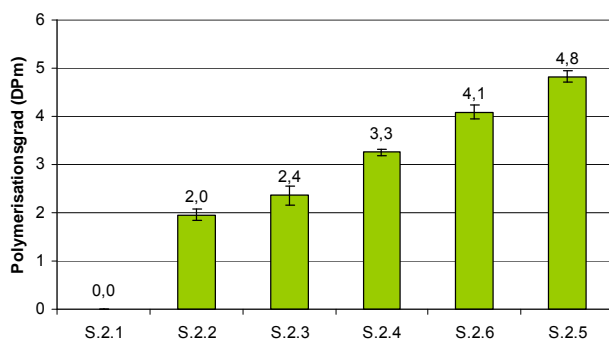


Abbildung 3.15 Mittlerer Polymerisationsgrad (DPm) der S.2 Subfraktionen

Da nur mit den Fraktionen S.2.1 und S.2.6 eine Induktion der Chinonreduktase feststellbar war, wurden die anderen Fraktionen nicht näher auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. HPLC-DAD-Analysen und HPLS-MS/MS-Experimente lieferten in S.2.1 und S.2.6 keine Hinweise auf schon beschriebene Apfelinhaltsstoffe.

Mittels GC-MS-Analysen gelang es, in der erstgenannten Fraktion die typischen Apfelsaftinhaltsstoffe (*R*)-1,3-Oktandiol, (*R*)-5-(*Z*)-Okten-1,3-diol, 3-Hydroxy- β -damascon,

sowie die Kontaminante Di-(2-ethyl-hexyl)-phthalat zu identifizieren. In Fraktion S.2.6 wurden nach Silylierung einzig Spuren des Triterpens Corosolsäure nachgewiesen. Die Identifizierung erfolgte mittels Auswertung der erhaltenen Massenspektren sowie durch Vergleich mit authentischen Referenzen. Die Ergebnisse von Aktivitätsbestimmungen mit verschiedenen *in vitro*-Assays sind in Kapitel 3.5.1 detailliert beschrieben.

3.2.1.1.3 Subfraktionierung der Sephadexfraktion S.5 an C18-Material

Zur Identifizierung am EGFR aktiver Einzelkomponenten der als wirksam erkannten Fraktion S.5 wurde eine etwas andere Strategie als bei S.2 verfolgt. Da in dieser Fraktion eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen mittels RP-HPLC detektiert wurde, orientierte sich die präparative Auftrennung an der RP-HPLC-Methode. Hierzu wurde an einer mit Lichroprep RP18-Material gefüllten Glassäule ein konstanter Stickstoffdruck angelegt, um eine gleichmäßige Fließgeschwindigkeit zu erreichen. Als Fließmittel diente verdünnte Ameisensäure (0,1% v/v in Wasser) mit steigendem Anteil Acetonitril. Nach Trocknung der Fraktionen wurden diese mittels HPLC-DAD vermessen. Es zeigte sich eine gute Trennung der einzelnen Substanzgruppen, Reinstoffe lagen nach dieser Subfraktionierung jedoch noch nicht vor. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihre Wirkung am EGFR sowie auf ihre potentiell chemopräventiven Eigenschaften untersucht. Die hierbei erzielten Ergebnisse sind in Abschnitt 3.4 und 3.5 dargestellt.

Die erhaltene Fraktion S.5.10 ergab einen weißen Niederschlag. Eine Vermessung mittels „matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight“ Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) zeigte Ca^{2+} -Addukte und Hinweise auf Pektin-Spaltprodukte. Allerdings wurde aufgrund der komplexen Zusammensetzung und der zu geringen isolierten Menge keine Hydrolyse mit anschließender Zucker-Analytik durchgeführt.

Zur weiteren Auftrennung der Fraktionen S.5.1 bis S.5.10 wurde eine semi-präparative HPLC-Trennung an C18-Material (5 μm) mit isokratischem Fließmittel verwendet.

Die weitere Auftrennung der erhaltenen Fraktionen erfolgte mittels RP-HPLC. Hierbei wurde aus Fraktion S.5.6 3-Hydroxy-phloretin-2'-xyloglucosid isoliert. Dieses Ergebnis wurde durch NMR-Spektroskopie abgesichert (Kapitel 3.3.1.5). Des Weiteren wurden in dieser Fraktion zwei Substanzen mittels UV- und MS-Detektion nachgewiesen. Als Hauptkomponente wurde Rutin (Quercetin-3-O-rutinosid) identifiziert.

Aus Fraktion S.5.7 gelang die Isolierung von drei Reinsubstanzen, bei denen es sich um 3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid (3-Hydroxyphloridzin), Quercetin-3-O- β -D-galactosid

und Quercetin-3-*O*- β -D-glucosid handelte. Die Identifizierungen erfolgten mittels ^1H -NMR- und HPLC-MS/MS-Analysen. Die Ausbeute an 3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid lag bei 2 mg. Auf die entsprechenden spektroskopischen Daten wird in Kapitel 3.3.1.4 näher eingegangen. Quercetin-3-*O*- β -D-galactosid und Quercetin-3-*O*- β -D-glucosid waren bereits für ihre gute Hemmung der PTK am EGFR bekannt (vgl. Kapitel 3.4).

3.2.1.2 Fraktionierung an Kieselgel

Bei der Analytik der an Sephadex LH-20 erhaltenen Fraktionen wurde deutlich, dass insbesondere die polymeren Procyanidine über sehr viele Fraktionen verteilt sind. Des Weiteren wurde keine diskrete Abtrennung von den einfachen Flavonoiden erreicht. Vor allem die Procyanidine gelten als potente Inhibitoren am EGF-Rezeptor (Fridrich *et al.* 2007a) und sind auch in der Lage, andere Enzyme z.B. des Fremdstoffmetabolismus oder des Entzündungsprozesses schon in geringen Konzentrationen zu hemmen (Sadik *et al.* 2003). Um den Einfluss der Procyanidine abhängig von deren Polymerisationsgrad zu untersuchen, wurde AE04 an Kieselgel aufgetrennt. Basierend auf der Methode von Lazarus (1999) wurden aus 400 mg AE04 mittels präparativer HPLC die 5 Fraktionen NP.1 – NP.5 gewonnen (vgl. Abbildung 3.16).

Die erhaltenen Fraktionen wurden im Vakuum schonend aufkonzentriert und in die wässrige Phase überführt. Die Ausbeute wurde nach Gefriertrocknung durch Wägung bestimmt.



Abbildung 3.16 Chromatogramm der HPLC-Trennung von AE04 an Kieselgel mit den markierten Fraktionen

Um den Gehalt an höhersiedenden nicht phenolischen Substanzen in den Fraktionen zu bestimmen, wurde ein genau eingewogenes Aliquot der Fraktion mit Diethylether extrahiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom schonend entfernt und der Rückstand mit 2-Methyl-1-pentanol versetzt. Die Identifizierung der Substanzen im enthaltenen Extrakt erfolgte mittels GC-EI-MS und Vergleich der erhaltenen Spektren mit der lehrstuhleigenen Datenbank.

Zur Untersuchung der Fraktionen auf ihre Polyphenolzusammensetzung wurde ein genau eingewogenes Aliquot in Methanol gelöst, mit dem internen Standard 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure versetzt und mittels HPLC-DAD und LC-MS auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. Die Quantifizierung wurde jeweils anhand des externen Standards durchgeführt. Diese Stammlösungen wurden auch für die Quantifizierung der Procyanidine mit Hilfe des HCl-Butanol-Assays eingesetzt.

Die Fraktion NP.1 hatte mit 8,0 mg (2,1%) den geringsten Anteil. Die Auswaage von NP.2 betrug 101,4 mg (26,3%), von NP.3 17,9 mg (4,6%), von NP.4 102,5 mg (26,6%) und von NP.5 21,9 mg (5,7%). Insgesamt wurden 251,7 mg (65,3%) nach der Chromatographie an Kieselgel wieder erhalten.

Tabelle 3.4 orientiert über die Ergebnisse der Polyphenol- und Procyanidinquantifizierung. Man erhielt eine sehr gute Trennung der Apfelsaftextraktinhaltsstoffe in die verschiedenen Stoffklassen. In Fraktion NP.1 waren vorwiegend die höher siedenden nicht-phenolischen Inhaltsstoffe aufkonzentriert (s.u.), in NP.2 waren dagegen die phenolischen Säuren sowie Phloretin-2'-glucosid zu finden und in Fraktion NP.3 die übrigen Dihydrochalkone des Apfels. Die Procyanidine koeluierten in geringen Mengen schon mit den Dihydrochalkonen, wurden aber hauptsächlich in den Fraktionen NP.4 und NP.5 nachgewiesen. Die Quercetinglycoside wurden leider nicht in einer einzelnen Fraktion aufkonzentriert, da sie aufgrund ähnlicher Polarität mit den Phloretin-glycosiden koeluierten.

Tabelle 3.4 Polyphenole der NP-Fractionen, Gehalte in mg/g

Fraktion	NP.1	NP.2	NP.3	NP.4	NP.5
Epicatechin	n.d.	4,5	n.d.	n.d.	n.d.
Catechin	n.d.	1,5	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B ₁	n.d.	n.d.	12,4	n.d.	n.d.
Procyanidin B ₂	n.d.	n.d.	28,4	n.d.	n.d.
Procyanidin B ₃	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B ₄	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4- <i>p</i> -Cumaroylchinasäure	1,5	73,7	n.d.	n.d.	n.d.
Neochlorogensäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Chlorogensäure	11,3	697,9	37,4	3,4	n.d.
Kryptochlorogensäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kaffeensäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -Cumarsäure	6,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin-2'-xyloglucosid	n.d.	13,0	484,0	42,7	n.d.
Phloretin-2'-glucosid	n.d.	129,6	39,9	3,3	n.d.
Phloretin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid	n.d.	n.d.	6,2	1,8	n.d.
3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid	n.d.	n.d.	22,5	11,7	n.d.
Quercetin-3- <i>O</i> -arabinosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3- <i>O</i> -glucosid	n.d.	1,5	1,0	n.d.	n.d.
Quercetin-3- <i>O</i> -galactosid	n.d.	4,4	0,0	n.d.	n.d.
Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid	n.d.	5,2	1,6	n.d.	n.d.
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinosid	n.d.	0,0	11,7	n.d.	n.d.
Quercetin-3- <i>O</i> -xylosid	n.d.	4,5	4,5	n.d.	n.d.
Quercetin	n.d.	0,7	0,0	n.d.	n.d.
Polymere Procyanidine (photom.)	0,0	70,2	268,2	739,2	1030,7
Summe	19,2	1006,9	917,8	802,1	1030,7

n.d. = nicht detektiert

Die Bestimmung des DPm zeigte die erwartete Elution mit ansteigender Kettenlänge. So war NP.1 frei von Procyanidinen, anschließend stieg der DPm der eluierten Procyanidine in Reihenfolge der Elution von Fraktion NP.2 bis NP.5 an. Allerdings wurde der hohe DPm des Ursprungsextraktes AE04 nicht erreicht (Abbildung 3.17).

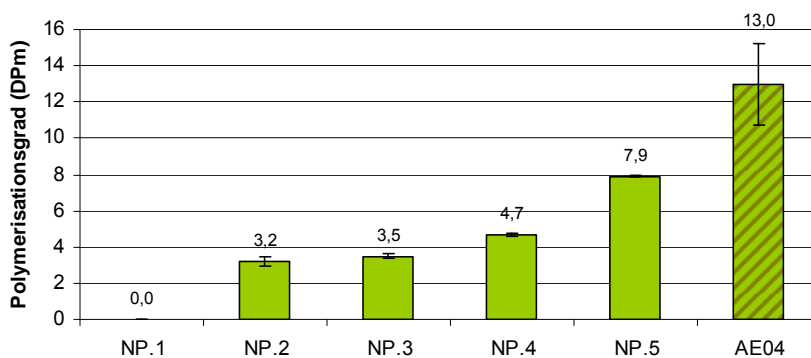


Abbildung 3.17 mittlerer Polymerisationsgrad (DPm) der NP-Fractionen (Mittelwerte aus Dreifachbestimmung \pm Standardabweichung)

Wie schon in der Fraktionierung von S.2 beobachtet (siehe Kapitel 3.2.1.1.2), wurden die nicht-phenolischen Substanzen bei der Chromatographie an Kieselgel nur schwach zurückgehalten. Folglich enthielt die Fraktion NP.1 205,6 mg/g (*R*)-1,3-Oktandiol, 24,4 mg/g (*R*)-5-(*Z*)-Okten-1,3-diol und 6,1 mg/g 3-Hydroxy- β -damascon. In Fraktion NP.2 waren nur noch geringe Mengen an (*R*)-1,3-Oktandiol (2,4 mg/g) und (*R*)-5-(*Z*)-Okten-1,3-diol (0,5 mg/g) nachweisbar. Die Substanzen 3-Hydroxy-2-pyron und Di-(2-ethylhexyl)-phthalat wurden in den NP-Fractionen nicht gefunden, sie eluierten vermutlich erst in der Neukonditionierungsphase des Programms.

Im Allgemeinen war der verwendete Gradient trotz der Verluste geeignet, um eine gute Vortrennung der Apfelsaftextraktinhaltsstoffe zu erreichen. Die hohen Verluste lassen sich sehr gut mit der irreversiblen Bindung von hochpolymeren Procyanidinen an Kieselgel erklären (Shoji *et al.* 2006), die auch von Yanagida (2000) bei der Auftrennung eines procyanidinreichen Apfelextrakts beobachtet wurde. Dieser Verdacht wurde auch durch die Bestimmung des DPM der in den Fraktionen enthaltenen Procyanidine erhärtet. Eine Umesterung der Chinasäureester mit Kaffeesäure oder Cumarsäure unter den stark sauren Bedingungen der Chromatographie und Probenaufbereitung wurde nicht beobachtet.

3.2.2 Apfelsaftextrakt AE06

Ausgangsmaterial zur Fraktionierung eines weiteren Apfelsaftextraktes war AE06, der ebenfalls an der Forschungsanstalt Geisenheim hergestellt worden war. Der zugehörige Saft wurde aus den Mostapfelsorten Bohnapfel (20%), Maunzen (45%) und Winterrambour (10%) sowie zu 35% aus gemischten Tafeläpfeln hergestellt. Die Klärung erfolgte unter Einsatz von Fructozym, Gelatine, Kieselsol und Bentonit mit anschließender Filtration. (vgl. Tabelle 3.1 und 4.2)

Die Zucker und die Säuren wurden am Absorberharz SP-70 von den phenolischen Verbindungen abgetrennt. Letztgenannte wurden mit Methanol vom Absorberharz eluiert, und das Lösungsmittel schonend abgezogen. Anschließend wurde lyophilisiert, um einen trockenen leicht handhabbaren Extrakt zu erhalten.

3.2.2.1 Fraktionierung an Sephadex LH-20

Die chromatographische Auftrennung des Extraktes AE06 mittels Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH-20 erfolgte analog zur Fraktionierung von AE04 (s. Kapitel 3.2.1.1). Der Verlauf der Trennung wurde durch dünnschicht-chromatographische (DC) Kontrolle an Kieselgel dokumentiert. Die phenolischen Substanzen wurden durch Besprühen mit Naturstoffreagenz A und PEG-400 nachgewiesen. Anhand der Ergebnisse der DC-Charakterisierung wurde eine Einteilung in 7 Grundfraktionen S.31 bis S.37 vorgenommen. Nach abgeschlossener Trennung erfolgte die Regenerierung des Säulenmaterials mit einer Aceton/Methanol-Mischung (1:1, v:v). Hierbei wurden stark unpolare Substanzen eluiert (Fraktion S.38).

Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihr Polyphenolprofil hin untersucht, wobei die Identifizierung der einzelnen Apfelsaftpolyphenole mittels HPLC-DAD sowie HPLC-ESI-MS/MS erfolgte. Zusätzlich wurden der Gehalt an polymeren Procyanidinen sowie deren mittlerer Polymerisationsgrad mit Hilfe des HCl-Butanol-Assay bzw. Thiolyse bestimmt.

Tabelle 3.5 orientiert über die Ergebnisse der Polyphenolbestimmung. In Fraktion S.31 wurden mittels HPLC-Analytik nur geringe Mengen an Chlorogensäure detektiert. Zudem enthält die Fraktion ca. 25% Procyanidine. Ähnliches gilt für die Fraktion S.32. In dieser wurden neben ca. 20% Procyandinen nur noch 4-*p*-Cumaroylchinasäure nachgewiesen. Im weiteren Verlauf der Fraktionierung koeluierten die phenolischen Säuren und die Dihydrochalkone (S.33; S.34), später die monomeren und dimeren Flavan-3-ole (S.34-S.37). Die Quercetinglycoside (S.34) wurden in einer einzigen Fraktion aufkonzentriert. Das freie Aglykon Quercetin eluierte aufgrund der geringen Polarität deutlich später als die entsprechenden Glycoside (S.35-S.37). Die polymeren Procyanidine waren in allen Fraktionen vertreten. Ihr Anteil nahm in den späten Fraktionen wiederum zu. Vor allem die durch Elution der Säule mit Aceton erhaltene Fraktion S.38 bestand gänzlich aus polymeren Procyanidinen. Dagegen wurde bei dieser Fraktionierung im Gegensatz zur AE04-Fraktionierung keine Abhängigkeit der Elutionsreihenfolge vom D_{Pm} mehr beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.5 Polyphenolprofil der AE06 Subfraktionen, Gehalt in mg/g

Fraktion	S.31	S.32	S.33	S.34	S.35	S.36	S.37	S.38
(-)-Epicatechin	n.d.	n.d.	n.d.	105,0	23,9	8,3	6,8	n.d.
(+)-Catechin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4- <i>p</i> -Cumaroylchinasäure	n.d.	56,6	25,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Chlorogensäure	8,5	n.d.	371,0	41,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kryptochlorogensäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Kaffeesäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -Cumarsäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin-2'-xyloglucosid	n.d.	n.d.	95,6	16,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Phloretin-2'-glucosid	n.d.	n.d.	35,8	14,6	0,6	1,0	n.d.	n.d.
Phloretin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid	n.d.	n.d.	3,0	2,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid	n.d.	n.d.	14,1	7,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Procyanidin B ₁	n.d.	n.d.	n.d.	153,7	n.d.	10,0	4,3	n.d.
Procyanidin B ₂	n.d.	n.d.	n.d.	0,8	14,6	20,1	25,8	n.d.
Procyanidin B ₃	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,1	16,4	59,4	n.d.
Procyanidin B ₄	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	29,8	10,1	6,9	n.d.
Quercetin-3-O-arabinosid	n.d.	n.d.	n.d.	6,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-glucosid	n.d.	n.d.	n.d.	4,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-galactosid	n.d.	n.d.	n.d.	1,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-rhamnosid	n.d.	n.d.	n.d.	2,9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-rutinosid	n.d.	n.d.	n.d.	4,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin-3-O-xylosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin	n.d.	n.d.	n.d.	2,5	0,6	6,8	2,0	n.d.
Polymere Procyanidine (photometrisch)	247,2	208,1	357,6	664,8	661,8	760,1	935,0	1020
Summe	255,7	264,7	885,0	865,0	686,9	776,2	943,7	1020,0

n.d.: nicht detektiert

Die GC-MS Analyse zur Identifizierung höhersiedender nicht-phenolischer Inhaltsstoffe zeigte, dass diese fast ausschließlich in S.32 zu finden waren, welche einen Gehalt von 135,3 mg/g aufwies. Die Anteile betragen im Detail 96,3 mg/g (*R*)-Oktan-1,3-diol, 38,1 mg/g (*R*)-5-(*Z*)-Okten-1,3-diol und 1,9 mg/g 3-Hydroxy- β -damascon. 3-Hydroxy-2-pyron wurde ausschließlich in S.33 (8,6 mg/g) nachgewiesen. Die Ergebnisse der Aktivitätstestung sind in Kapitel 3.4.2 und 3.5 dargestellt.

Die Auftrennung der Polyphenole von AE06 gelang, wie aus Tabelle 3.5 ersichtlich ist nicht in gleicher Qualität wie die Trennung von AE04. Die etwas schlechtere Trennleistung ist wahrscheinlich auf eine Belegung des Trennmaterials mit unbekanntem Substanzen zurückzuführen, die zu einer veränderten Polarität führten. Dies könnte auch der Grund für die Veränderung der Farbe des Sephadex LH-20 von weiß nach schwach gelb sein. Weiterhin wurden die nicht-phenolischen Substanzen nicht in der erwarteten Menge wiedergefunden. Ein möglicher Grund sind Zersetzungsreaktionen wie sie z.B. für das 3-Hydroxypyron unter Lichteinwirkung und/oder Wärme beschrieben sind (Pirkle und McKendry 1968), oder weitere chemische Reaktionen der enthaltenen C₈-Dirole (Kavvadias *et al.* 1999).

Da keine grundlegend anderen Resultate im Hinblick auf die stoffliche Zusammensetzung und die Aktivitätsstudien ermittelt wurden, fand keine weitere aktivitätsgeleitete Fraktionierung von AE06 statt.

3.3 Strukturaufklärung der Phloretin- und 3-Hydroxyphloretin-glycoside

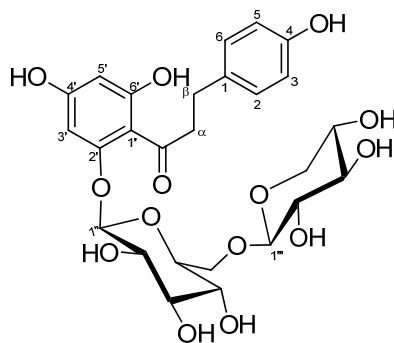
3.3.1.1 Phloretin-2'-xyloglucosid

Phloretin-2'-xyloglucosid ist einer der Hauptbestandteile der untersuchten Apfelsaftextrakte. Da die Verbindung nicht kommerziell zu erwerben ist, aber als Ausgangsprodukt für die Synthese von 3-Hydroxyphloretin-xyloglucosid benötigt wurde, war eine Isolierung dieser Substanz in größerem Maßstab erforderlich. Hierzu wurde der AE04 zuerst mittels präparativer NP-HPLC aufgetrennt (vgl. 3.2.1.2); aus Fraktion NP.3 wurden nach einem weiteren Aufreinigungsschritt an C18-Material 50 mg erhalten.

Wie für die Dihydrochalkone typisch, hat auch Phloretin-2'-O-xyloglucosid einen λ_{\max} -Wert von 284 nm. Im ESI-MS-Spektrum wird die Identität der Verbindung mit der Summenformel $C_{26}H_{32}O_{14}$ durch ein m/z -Signal bei 567,0 des $[M-H]^-$ -Ions bestätigt. MS/MS-Experimente führen nach Abspaltung der Zucker zum freien Aglykon mit dem m/z Signal bei 273. Das 1H -NMR-Spektrum der Verbindung zeigt das AA'BB'-Spinmuster eines paradisubstituierten Phenylrings ($\delta = 7,08$ ppm und $6,69$ ppm), sowie das meta-koppelnde Dublett paar bei $\delta = 6,28$ ppm und $5,97$ ppm, auf das Vorhandensein eines unsymmetrisch substituierten Phloroglucinolringes hindeutet. Das ^{13}C -Spektrum der Substanz beweist das Vorhandensein von zwei Zuckereinheiten mit insgesamt 11 C-Atomen. Die Tieffeldverschiebung von C-6'' von $62,5$ ppm auf $69,5$ ppm ist ein Hinweis auf die 1-6-Verknüpfung der beiden Zuckereinheiten. Die 1H -NMR-Daten der isolierten Substanz stimmen mit den von Lu und Foo (1997) für Phloretin-2'-O- β -D-xylopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranosid angegebenen Werten überein.

Tabelle 3.6 Spektroskopische Daten von Phloretin-2'- β -D-xylo-1,6- β -D-glucosid

Phloretin-2'-xyloglucosid



¹ H-NMR in MeOD-d ₄	δ 7,08 ppm (H-2, H-6, d, 8,5 Hz); δ 6,69 ppm (H-3, H-5, d, 8,5 Hz); δ 6,28 ppm (H-3', d, 2 Hz); δ 5,97 ppm (H-5', d, 2 Hz); δ 4,99 ppm (H-1'', d, 7,5 Hz); δ 4,35 ppm (H-1''', d, 7,5 Hz); δ 4,11 ppm (H6α, dd, 1,8/11,8); δ 3,55 – 3,41 ppm (H2''-H6β'', m); δ 3,82 ppm (H-5α''', m); δ 3,82 – 3,65 ppm (H2''-H6'', m); 3,11 – 3-39 (H2'''-H-5β'''); δ 3,36 ppm (H-α, m); δ 2,88 ppm (H-β, t, 7,5 Hz)	
¹³ C-NMR in MeOD-d ₄	206,6 ppm (C-O); 167,5 ppm (C-4'); 165,8 ppm (C-6'); 162,2 ppm (C-2'); 156,4 ppm (C-4); 133,9 ppm (C-1); 130,5 ppm (C-2,C-6); 116,2 ppm (C-5,C-3); 108,3 ppm (C-1'); 105,2 ppm (C-1'''); 102,3 ppm (C-1''); 98,6 ppm (C-5'); 95,7 ppm (C-3'); 78,4 ppm (C-3'''); 77,9 ppm (C-3''); 77,5 ppm (C-5''); 75,1 ppm (C-2'''); 74,8 ppm (C-2''); 71,2 ppm (C-4'''); 71,1 ppm (C-4'); 69,5 ppm (C-6''); 66,9 ppm (C-5'''); 46,9 ppm (α-CH ₂); 30,8 ppm (β-CH ₂)	
λ _{max}	284 nm	
LCMS/MS	Prekursorion [M-H] ⁻	Produktion
	m/z 567	m/z 273

3.3.1.2 Phloretin-2',4'-diglucosid

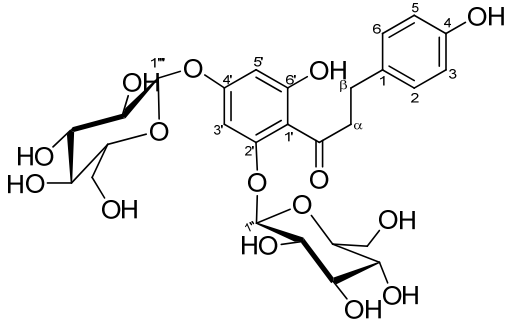
In der Fraktion S.33, welche durch Fraktionierung von AE06 an Sephadex LH-20-Material erhalten wurde (vgl. 3.2.2.1), fiel eine bisher noch nicht beschriebene Substanz mit einem m/z von 597 [M-H]⁻ auf. Um diese zu isolieren, wurde die Fraktion zuerst mittels präparativer NP-HPLC in die Fraktionen S.33.1-4 aufgetrennt. Aus den Fraktionen S.33.3 und S.33.4 ist anschließend mittels präparativer RP-HPLC 2,5 mg Substanz erhalten worden.

Diese wies ein für Dihydrochalkone typisches UV-Spektrum mit einem λ_{max}-Wert von 284 nm auf. Im ESI-MS-Spektrum gab es weitere Hinweise, dass es sich um eine Substanz mit der Summenformel C₂₇H₃₄O₁₅ handelte, die ein m/z-Signal bei 597 des [M-H]⁻-Ions lieferte. MS/MS-Experimente führten nach Abspaltung von zwei Zuckermolekülen zu einem m/z Signal bei 273 [M-H]⁻, welches das freie Aglykon Phloretin repräsentierte.

Das ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung bestätigte die bisherigen Erkenntnisse. Es zeigte sich das AA'BB'-Spinmuster eines paradisubstituierten Phenylringes (δ = 7,02 ppm und 6,63 ppm), sowie das meta-koppelnde Dublettpaar bei δ = 5,81 ppm und 5,19 ppm, das auf das Vorhandensein eines unsymmetrisch substituierten Phloroglucinolringes hindeutete. Die Kopplung von jeweils 7,5 Hz der Wasserstoffatome in Position 1'' und 1''' wiesen auf die β-Konfiguration der beiden Zuckers hin. Das ¹³C-Spektrum der Substanz bewies das Vorhandensein von zwei Zuckereinheiten mit insgesamt 12 C-Atomen. Da keine Tieffeldverschiebung der Zuckerkohlenstoff-Atome beobachtet werden konnte, ist dies ein Hinweis, dass beide Zucker nicht miteinander verknüpft vorliegen. Zu-

dem wurde ein Verschiebung des C-4' von 167,5 zu 161,0 beobachtet. Daraus ließ sich schließen, dass es sich um die Verbindung Phloretin-2',4'-di- β -D-glucosid handelt.

Tabelle 3.7 Spektroskopische Daten von Phloretin-2',4'-di- β -D-glucosid

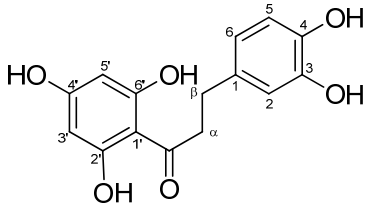
Phloretin-2',4'-diglucosid		
$^1\text{H-NMR}$ in MeOD- d_4 / DMSO- d_6	δ 7,02 ppm (H-2, H-6, d, 8,5 Hz); δ 6,63 ppm (H-3, H-5, d, 8,5 Hz); δ 5,81 ppm (H-3', d, 2 Hz); δ 5,19 ppm (H-5', d, 2 Hz); δ 4,68 ppm (H-1''', d, 7,5 Hz); δ 4,37 ppm (H-1'', d, 7,5 Hz); δ 3,59 ppm (H-6 β '', m); δ 3,58 ppm (H-6 β ''', m); δ 3,40 ppm (H-6 α '', m); δ 3,38 ppm (H-6 α ''', m); δ 3,43 ppm (H-3'', m); δ 3,41 ppm (H-5''', m); δ 3,29 ppm (H-3''', m); δ 3,26 ppm (H-2''', m); δ 3,05 ppm (H-4''', m); δ 3,02 ppm (H-4'', m); δ 2,94 ppm (H-5'', m); 2,85 ppm (H-2''); δ 3,20 ppm (H- α , t, 7Hz); δ 2,78 ppm (H- β , m)	
$^{13}\text{C-NMR}$ in MeOD- d_4 / DMSO- d_6	207,7 ppm (C-O); 167,1 ppm (C-6'); 161,0 ppm (C-4'); 161,0 ppm (C-2'); 156,1 ppm (C-4); 133,1 ppm (C-1); 130,0 ppm (C-2,C-6); 115,8 ppm (C-5,C-3); 100,5 ppm (C-3'); 100,4 ppm (C-5'); 100,0 ppm (C-1'); 104,1 ppm (C-1'''); 101,3 ppm (C-1''); 78,5 ppm (C-3'''); 78,4 ppm (C-3''); 77,7 ppm (C-5'''); 77,2 ppm (C-5''); 74,8 ppm (C-2'''); 74,3 ppm (C-2''); 71,4 ppm (C-4''); 70,0 ppm (C-4'); 62,1 ppm (C-6''); 61,9 ppm (C-6''); 44,1 ppm (α -CH $_2$); 31,3 ppm (β -CH $_2$)	
λ_{max}	284 nm	
LCMS/MS	Prekursorion [M-H] ⁻	Produktion
	<i>m/z</i> 597	<i>m/z</i> 273

3.3.1.3 3-Hydroxyphloretin

Das freie Aglykon 3-Hydroxyphloretin wurde weder in den Extrakten, noch in den erhaltenen Fraktionen detektiert. Allerdings ist die Substanz von essentieller Bedeutung, um einen Vergleich in den Aktivitätsstudien zwischen dem freien Aglykon und den Glycosiden bzw. mit dem nicht in Position 3 hydroxilierten Phloretin machen zu können. Um Referenzsubstanz zu erhalten wurde das Phloretin mit Tyrosinase umgesetzt. Das hierbei synthetisierte 3-Hydroxyphloretin ist bei den verwendeten Versuchsbedingungen aufgrund der beiden ortho-ständigen Hydroxylgruppen instabil und kann leicht zum Chinon weiteroxidiert werden. Daher wurde der Inkubationslösung 1 mM Ascorbinsäure zugesetzt, um das intermediär gebildete Radikal abzufangen. Nach einstündiger Reaktion wurde diese mit Natriumfluorid gestoppt und die Mischung lyophilisiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels präparativer RP-HPLC. Insgesamt wurden 10 mg 3-Hydroxyphloretin synthetisiert.

Die erhaltene Substanz hat, wie für Dihydrochalkone typisch, einen λ_{\max} -Wert von 284 nm. Im ESI-MS-Spektrum wird die Identität der Verbindung mit der Summenformel $C_{15}H_{14}O_6$ durch ein m/z -Signal bei 289 des $[M-H]^-$ -Ions bestätigt, das zu unter Freisetzung des Phloroglucins (m/z 125) bzw. des Trihydroxybenzaldehyd (m/z 167) fragmentiert. Das 1H -Spektrum bestätigt die Identität der Substanz (Tabelle 3.8). Das als Singulett-Signal bei $\delta = 5,81$ ppm weist auf das Vorliegen eines nicht substituierten symmetrischen Phloroglucinolring hin. Statt der vier Protonen des AA'BB'-Spinsystems des Phloretins zeigen sich hier jedoch nur drei Protonen mit einem für einen 1,2,4-trisubstituierten Aromaten typischen ABC-Muster. H-2 zeigt sich als Dublett, das durch eine Kopplungskonstante von 2 Hz auf eine meta-Kopplung schließen lässt. Als Kopplungspartner erscheint H-6 als doppeltes Dublett und deutet mit den Kopplungskonstanten von 2 Hz und 8 Hz auf eine ortho-Kopplung mit H-5 ($\delta = 6,67$ ppm; $J = 8$ Hz) und die meta-Kopplung mit H-2 hin. Im ^{13}C -Spektrum bestätigen zwei aromatische Signale bei 144,4 ppm und 146,1 ppm die Hydroxylierung des Catecholrings in 3- und 4-Position.

Tabelle 3.8 Spektroskopische Daten von 3-Hydroxyphloretin

3-Hydroxyphloretin		
1H -NMR	δ 6,67 ppm (H-5, d, 8 Hz); δ 6,60 ppm (H-2, d, 2 Hz); δ 6,50 ppm (H-6, d, 8/2 Hz); δ 5,81 ppm (H-5', H3', s); δ 3,27 ppm (H- α , t, 7,5); δ 2,80 ppm (H- β , t, 7,5 Hz)	
^{13}C -NMR in MeOD- d_4	206,4 ppm (C-O); 166,3 ppm (C-4'); 165,9 ppm (C-6', C-2'); 146,1 ppm (C-3); 144,4 ppm (C-4); 134,8 ppm (C-1); 120,7 ppm (C-6); 116,6 ppm (C-2); 116,3 ppm (C-5); 105,4 ppm (C-1'); 95,8 ppm (C-3', C-5'); 47,3 ppm (α -CH ₂); 31,7 ppm (β -CH ₂);	
λ_{\max}	284 nm	
LCMS/MS	Prekursorion $[M-H]^-$	Produktion
	m/z 289	m/z 167; 125

3.3.1.4 3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid

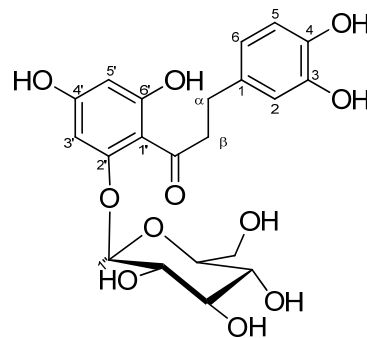
Wie schon die Quercetinglycoside wurde auch das 3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid aus der Fraktion S.5.7 mittels präparativer RP-HPLC in einer Gesamtmenge von 2,5 mg isoliert. Da weitere Substanz für die Durchführung von Aktivitätsstudien am EGF-

Rezeptor benötigt wurden, ist eine Synthese aus Phloretin-2'-glucosid analog zum Vorgehen bei 3-Hydroxyphloretin durchgeführt worden. Die Ausbeute betrug hierbei 10 mg (10%).

Die Substanz wies die für Dihydrochalkone typischen UV-Maxima bei 222 nm und bei 284 nm auf. Mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS wird in Produktionenexperimenten dem deprotonierten Molekül ($[M-H]^- = m/z$ 451) zuerst der Glucose-Rest (162 u) abgespalten, so dass 3-Hydroxyphloretin (m/z 289) entsteht, welches anschließend in das aus dem A-Ring resultierende Phloroglucin (m/z 125) bzw. zu Trihydroxybenzaldehyd (m/z 167) gespalten wird. Die zusätzliche Hydroxylgruppe in Position 3 konnte durch das ¹H-NMR-Spektrum bestätigt werden (Tabelle 3.9). Hier zeigte sich, wie schon beim 3-Hydroxyphloretin, die Existenz eines nicht substituierten symmetrischen Phloroglucinolrings mit drei Protonen in einem für 1,2,4-trisubstituierten Aromaten typischen ABC-Muster. H-2 (6,61 ppm) zeigt sich als Dublett, das durch eine Kopplungskonstante von 2 Hz auf eine meta-Kopplung schließen lässt. Als Kopplungspartner erscheint H-6 (6,48 ppm) als doppeltes Dublett und deutet mit den Kopplungskonstanten von 2 Hz und 8 Hz auf eine ortho-Kopplung mit H-5 ($\delta = 6,59$ ppm; $J = 8$ Hz) und die meta-Kopplung mit H-2 hin. Im ¹³C-Spektrum bestätigen zwei aromatische Signale bei 144,3 ppm und 146,0 ppm die Hydroxylierung des Catecholringes in 3- und 4-Position.

Ob es sich beim 3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid um ein Produkt der Polyphenoloxidasen oder eine im Apfel genuin vorkommende Substanz handelt, ist in der Literatur umstritten (Lu und Foo 1997, Le Guerneve *et al.* 2004, Vrhovsek *et al.* 2004).

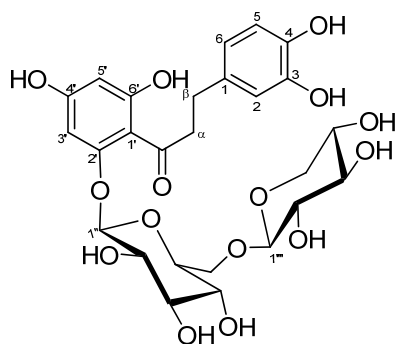
Tabelle 3.9 NMR und M/MS-Daten von 3-Hydroxyphloretin-2'- β -D-glucosid

3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid	
¹ H-NMR	δ 6,61 ppm (H-2, d, 2 Hz); δ 6,59 ppm (H-5, d, 8 Hz); δ 6,48 ppm (H-6, dd, 2/8 Hz); δ 6,13 ppm (H-3', d, 2 Hz); δ 5,92 ppm (H-5', d, 2 Hz); δ 2,72 ppm (α , m), δ 3,19 ppm (β , m); δ 4,91 (H-1'', d, 7,5 Hz)
¹³ C-NMR	206,6 (C-O); 167,6 (C-4'); 165,9 (C-6'); 162,3 (C-2'); 146,0 (C-3); 144,3 (C-4); 134,8 (C-1); 120,7 (C-6); 116,7 (C-2); 116,3 (C-5); 106,8 (C-1'); 102,1 (C-1''); 98,4 (C-5'); 95,5 (C-3'); 78,6 ppm (C-3''); 78,5 ppm (C-5''); 74,7 ppm (C-2''); 71,1 ppm (C-4''); 62,5 ppm (C-6''); 46,9 (α -CH ₂); 31,1 (β -CH ₂);

λ_{\max}	284 nm; 222 nm	
LCMS/MS	Prekursorion [M-H] ⁻	Produktion
	<i>m/z</i> 451	<i>m/z</i> 289; 167; 125

3.3.1.5 3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid

Da für eine Isolierung 3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid aus den Fraktionen des AE04 diese zu komplex zusammengesetzt waren, wurde diesem zunächst die Synthese vorgezogen. Hierzu wurde wie oben schon dargestellt, das Phloretin-2'-xyloglucosid aus dem Extrakt isoliert und darauf mit Tyrosinase in Phosphatpuffer zur entsprechenden 3-Hydroxyverbindung umgesetzt. Nach 1 h wurde die Reaktion durch Zugabe von Natriumfluorid abgebrochen und der Reaktionsansatz gefriergetrocknet. Durch den radikalischen Mechanismus der Reaktion kam es zu einem hohen Anteil an Nebenreaktionen, welche die Ausbeute auf ca. 10% verringerten. Da das Ausgangsprodukt nur in geringen Mengen zur Verfügung stand, wurde schließlich doch die Isolierung (aus AE06) favorisiert. Hierzu wurde der Extrakt mittels präparativer NP-HPLC aufgetrennt und anschließend das 3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid mittel präparativer RP-HPLC aufgereinigt. Insgesamt konnten so über 6 mg der Verbindung erhalten werden. Im HPLC-MS/MS-Massenspektrum sieht man die Masse des deprotonierten Moleküls (M-H⁻, *m/z* = 583) und das nach Abspaltung beider Zucker (294 u) entstehende 3-Hydroxyphloretin (M-H⁻, *m/z* = 289). Das ¹H-Spektrum (Tabelle 3.10) ist in guter Übereinstimmung zu den oben genannten 3-Hydroxyphloretinverbindungen. Man erkennt zwei mit einer Kopplungskonstante von 2 Hz koppelnden Dubletts bei $\delta = 6,31$ ppm und 6,00 ppm, die das Vorliegen von Phloretin-2'-glucosid typischen unsymmetrisch substituierten Phloroglucinolrings beweisen, sowie drei Protonen mit einem für einen 1,2,4-trisubstituierten Aromaten typischen ABC-Muster. Die Kopplungskonstante von 7,5 Hz der H-Atome am anomeren C der Zucker weist auf die β -Konfiguration der beiden Zucker hin.

Tabelle 3.10 Spektroskopische Daten von 3-Hydroxyphloretin-2'- β -D-xylo-1,6- β -D-glucosid3-Hydroxy-
phloretin-2'-
xyloglucosid

$^1\text{H-NMR}$	δ 6,72 ppm (H-2, d, 2 Hz); δ 6,69 ppm (H-5, d, 8 Hz); δ 6,60 ppm (H-6, dd, 2/8 Hz); δ 6,31 ppm (H-3', d, 2 Hz); δ 6,00 ppm (H-5', d, 2 Hz); δ 2,72 ppm (α , m), δ 3,16 ppm (β , m); δ 5,03 (H-1'', d, 7,5 Hz); δ 4,38 (H-1'', d, 7,5)	
λ_{max}	284 nm	
LCMS/MS	Prekursorion [M-H] ⁻	Produktion
	m/z 583	m/z 289; 167; 125

3.4 Einfluss von Apfelsaftextrakten sowie von isolierten Apfelpolyphenolen auf den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR)

Der Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor (EGFR) ist der Oberflächenrezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und ist ein Mitglied der ErbB-Familie, einer Familie von Rezeptortyrosinkinase (RTK). Zu dieser gehören der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor ErbB1 (Her1), ErbB2 (Her2/neu), ErbB3 (Her3) und ErbB4 (Her4). Der EGF ist ein Protein, das bei der Einleitung der Mitose als Signalmolekül auftritt. Es stimuliert die Ausbildung einer Reihe von Zelltypen. Der EGFR ist ein Glykoprotein, das aus 1186 Aminosäuren aufgebaut ist und eine zyttoplasmatische Domäne, eine Transmembrandomäne und eine glycosylierte extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne besitzt. Dieser Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase- (TK) Aktivität kommt in allen Zellarten vor, wird aber in verschiedenen Tumorarten, wie der Brust, dem Zentralen Nervensystem und dem Kolon stark überexprimiert und/oder in mutierter Form vorgefunden. Dies führt dazu, dass die Tumorzellen unkontrolliert wachsen und sich vermehren. Daher korreliert eine erhöhte EGFR-Expression und -Aktivität häufig mit einer schlechteren Prognose und Therapierbarkeit (Mamot *et al.* 2003). Die Aktivierung des EGFR erfolgt durch extrazelluläre Bindung der Liganden EGF und Transforming Growth Factor (TGF α), dessen Signal er über Autophosphorylierung und die

Rekrutierung von Signalmolekülen wie Proteinkinase B (Akt/PKB), MEK (mitogen aktivierbare Proteinkinase/ extrazellulär regulierte Kinasen) oder STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription Protein) ins Zellinnere leitet (Signaltransduktion), die letztendlich das Zellwachstum stimulieren und den apoptotischen (programmierten) Zelltod verhindern (vgl. Abbildung 3.18).

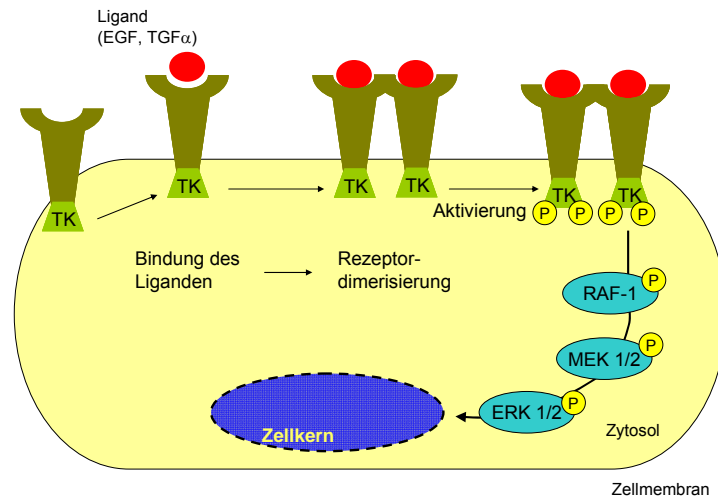


Abbildung 3.18 Dimerisierung des EGFR nach Ligandenbindung und Aktivierung der Proteinkinasekaskade. EGF: epidermaler Wachstumsfaktor; ERK: extrazellulär regulierte Kinasen, MEK: mitogen aktivierbare Proteinkinase; Raf-1, Serin/Threonin-Kinase; TGF α , „transforming growth factor α “; TK, Tyrosinkinase. nach (nach Kern 2006)

Durch Bindung der Polyphenole an den EGFR, ohne die TK zu aktivieren, könnte ein unkontrolliertes Zellwachstum verhindert werden. Tabelle 3.11 orientiert über die Inhibierung der Protein-Tyrosinkinase- (PTK) Aktivität der vor Beginn der Arbeiten bekannten und getesteten Apfelinhaltsstoffe. Bisher wurden vor allem die Quercetin-glycoside und die Procyanidine als wirksame Inhibitoren der PTK am EGFR beschrieben. Dabei hatte sich auch eine starke Abhängigkeit vom glycosidisch gebundenen Zucker gezeigt. So nahm die Inhibitorwirkung in der Reihenfolge Glucose > Galactose > Rhamnose > Rutinose ab. Das freie Aglykon zeigte die größte inhibitorische Wirkung. Chlorogensäure und 4-*p*-Cumaroylchinasäure, welche die beiden phenolischen Hauptinhaltsstoffe des Apfels darstellen, waren hingegen in den getesteten Konzentrationen bis 300 μ M inaktiv. Der untersuchte Extrakt AE04 war jedoch mit einem $IC_{50} = 0,30 \pm 0,04$ μ g/ml ein deutlich besserer Hemmstoff der isolierten EGF-Rezeptor-Präparation (Kern 2006).

Tabelle 3.11 Inhibierung der Proteintyrosinkinase-Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors (nach Kern 2006).

Substanz	IC ₅₀ [μM]
(+)-Catechin	>300
(-)-Epicatechin	>300
Procyanidin B ₁	49,9 ± 10,2
Procyanidin B ₂	37,9 ± 2,8
Kaffeensäure	>300
Chlorogensäure	>300
4- <i>p</i> -Cumaroylchinasäure	>300
Phloretin-2'-glucosid	267 ± 50
Phloretin	43,4 ± 5,1
Quercetin-3- <i>O</i> -glucosid	6,7 ± 1,3
Quercetin-3- <i>O</i> -galactosid	7,5 ± 1
Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid	225 ± 31
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinosid	>300
Quercetin	0,9 ± 0,4

IC₅₀= mittlere inhibitorische Konzentration

3.4.1 Apfelsaftextrakt AE04

3.4.1.1 Fraktionen S.1 – S.9 sowie deren Subfraktionen

Mit dem Ziel, unbekannt, präventiv wirksame Inhaltsstoffe zu identifizieren, wurde eine aktivitätsgeleitete Fraktionierung des Apfelsaftextraktes AE04 durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.1.) AE04, der als Hauptkomponenten Chlorogensäure, 4-*p*-Cumaroylchinasäure, Phloretin-2'-xyloglucosid und Phloretin-2'-glucosid enthält, wurde bereits als hochwirksames Hemmstoffgemisch (IC₅₀= 0,30 ± 0,04 μg/ml) der isolierten EGF-Rezeptorpräparation charakterisiert (Kern 2006).

Die Fraktionen S.1 – S.9, welche von uns nach Fraktionierung an Sephadex LH-20 erhalten wurden, sind nun hinsichtlich ihres Hemmeffektes auf die isolierte EGF-Rezeptorpräparation im ELISA-Testsystem untersucht worden.

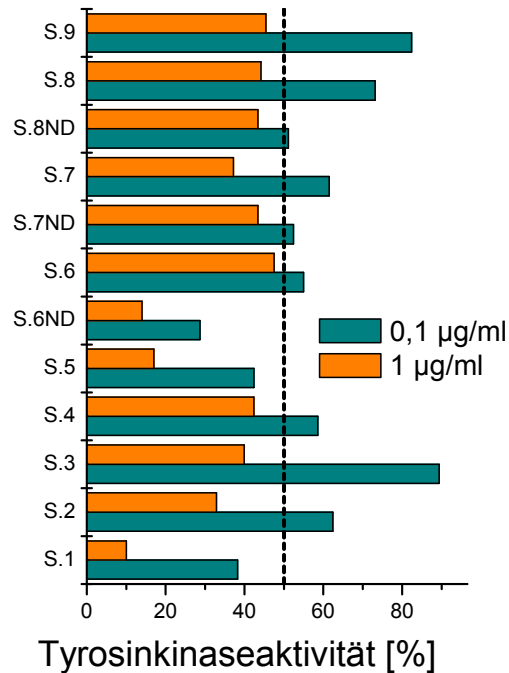


Abbildung 3.19 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR nach Inkubation mit den AE04 Grundfraktionen S.1 bis S.9; 1 Experiment in einer Dreifachbestimmung (ND: Niederschlag)

Die zu untersuchenden Fraktionen sind in einer Versuchsreihe in den Konzentrationen 0,1 µg/ml und 1 µg/ml getestet worden. Als besonders wirksame Fraktionen traten dabei die Fraktion S.1, S.5 und S.6ND hervor (vgl. Abbildung 3.19). Die PTK-Aktivität wurde von diesen drei Fraktionen bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml zu 60-70% gehemmt, während bei 1 µg/ml die Hemmung bereits >80% lag. Auffällig war, dass die Fraktionen S.1, S.5 und S.6ND mit einem $IC_{50} < 0,1$ µg/ml einen stärkeren Hemmeffekt auf die Tyrosinkinase-Aktivität als der Gesamtextrakt zeigten (AE04: $IC_{50} = 0,30 \pm 0,04$ µg/ml). Charakteristisch für diese drei Fraktionen ist ein hoher Gehalt an polymeren Procyanidinen (650 – 940 mg/g Tabelle 3.3). Da Fraktion S.5 zusätzlich auch weitere potentiell chemopräventive Eigenschaften aufwies (siehe Kapitel 3.5), wurde diese Fraktion mittels Flash-Chromatographie an einer RP-18 Phase weiter aufgereinigt. Dabei erhielt man zehn Subfraktionen (S.5.1 - S.5.10), deren Hemmeffekte ebenfalls auf die PTK-Aktivität der isolierten EGF-Rezeptorpräparation getestet wurden.

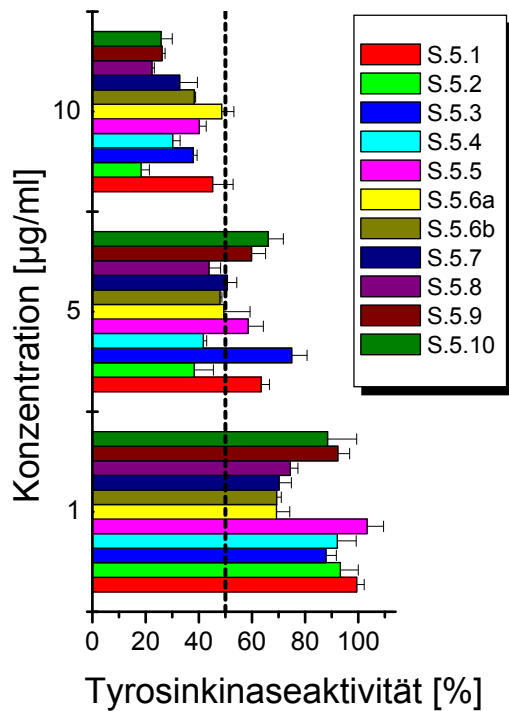


Abbildung 3.20 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR nach Inkubation mit den AE04 Subfraktionen S.5.1 bis S.5.10; MW \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten in einer Dreifachbestimmung

Alle erhaltenen Subfraktionen unterdrückten in Konzentrationen von 10 $\mu\text{g/ml}$ die Tyrosinkinase-Aktivität des EGFR um 50% (vgl. Abbildung 3.20). Mit Ausnahme der Subfraktionen S.5.1 und S.5.6a kam es sogar zu einer Hemmung von 60 bis 80%. Im Vergleich zur Grundfraktion S.5, deren IC_{50} -Wert $<0,1 \mu\text{g/ml}$ lag, zeigten die Subfraktionen S.5.1 – S.5.10 einen um Faktor 100 schwächeren Hemmeffekt auf den isolierten Rezeptor. Möglicherweise ist die abgeschwächte Hemmwirkung in den Subfraktionen darauf zurückzuführen, dass es sich weitgehend um Einzelsubstanzen handelte, deren inhibierendes Potential nicht ausreichte, um eine potente Hemmung der EGFR-Aktivität hervorzurufen. Anscheinend vermag erst eine komplexe Mischung aus Polyphenolen die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR effektiv zu unterdrücken. So besteht die Grundfraktion S.5 aus einer Mischung aus (-)-Epicatechin, Phloretin, Phloretin-glycosiden, Quercetin, Quercetinglycosiden sowie dimeren und polymeren Pro-cyanidinen (Tabelle 3.3) und ähnelt damit dem Apfelsaftextrakt AE04. Aufgrund der komplexen Mischung wäre die Bildung von synergistischen und additiven Hemmeffekten eine mögliche Erklärung. Allerdings ist auch eine Verschleppung der aktiven Substanz in mehrere Fraktionen oder eine chemische Reaktion aktiver Verbindungen denkbar.

Aus Subfraktion S.5.7 gelang die Isolierung von drei Reinsubstanzen. Dabei handelte es sich um 3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid, Quercetin-3-O- β -D-galactosid und Quercetin-

3-*O*- β -D-glucosid. Für diese drei Reinsubstanzen sind IC₅₀-Werte im Konzentrationsbereich von 5-7 μ M bestimmt worden [Quercetin-glycoside: (Kern 2006)].

3.4.1.2 Fraktionen NP.1 – NP.5

Da in den Grundfraktionen S.1 – S.9 von AE04 vor allem die procyanidinreichen Fraktionen als besonders effektive Inhibitoren der isolierten EGF-Rezeptorpräparation identifiziert (Abbildung 3.19) wurden, sollte im Folgenden geklärt werden, inwieweit die Procyanidine von AE04 und deren Polymerisationsgrad einen Einfluss auf die Aktivität des EGFR haben. Des Weiteren ist bereits bekannt, dass oligomere Procyanidine abhängig von ihrem Oligomerisierungsgrad potente Hemmstoffe des EGFR sowohl im isolierten Testsystem als auch in HT29 Zellen darstellen (Fridrich *et al.* 2007a). Zur Trennung der Procyanidine nach ihrem Oligomerisierungsgrad wurde der Apfelsaftextrakt AE04 an Kieselgel mittel präparativer HPLC aufgereinigt (3.2.1.2) Aufgrund der späten Elution der glycosylierten Polyphenole gab es Überlagerungen mit den Procyanidinen. Insgesamt wurden fünf Fraktionen gewonnen, deren DPM von Fraktion NP.1 (procyanidinfrei) zu Fraktion NP.5 anstieg (Abbildung 3.17)

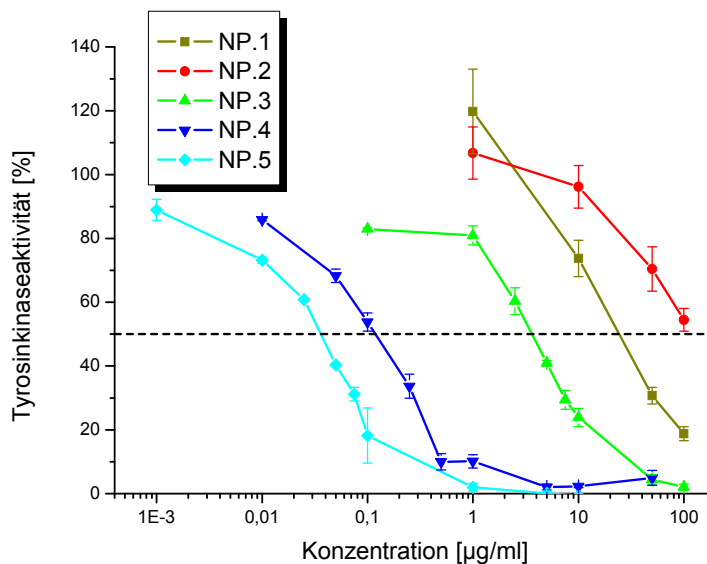


Abbildung 3.21 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR nach Inkubation mit den AE04 Fraktionen NP.1 bis NP.5; MW \pm SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten

Abbildung 3.21 zeigt, dass die Hemmwirkung der Fraktionen auf die PTK-Aktivität des EGFR mit steigendem Oligomerisierungsgrad der Procyanidine zunahm: NP.5 > NP.4 > NP.3 >> NP.1 >> NP.2 (Tabelle 3.12).

Tabelle 3.12 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR durch die AE04 Fraktionen NP.1 – NP.5

AE04 Fraktionen	IC ₅₀ -Werte [µg/ml]
NP.1	39,5 ± 18,0
NP.2	> 100
NP.3	4,0 ± 1,2
NP.4	0,15 ± 0,03
NP.5	0,04 ± 0,01

Für Fraktion NP.1, die procyanidinfrei war und in der ausschließlich Chlorogensäure, Cumarsäure und 4-*p*-Cumaroylchinasäure sowie die nicht-phenolischen Substanzen zu finden waren, ist ein IC₅₀-Wert von ungefähr 40 µg/ml bestimmt worden. Jedoch ist bereits bekannt, dass von Chlorogensäure und 4-*p*-Cumaroylchinasäure nur eine marginale Hemmung auf die isolierte Rezeptorpräparation ausgeht, da deren IC₅₀-Werte > 300 µM liegen (Kern 2006). Unter Berücksichtigung der Molarität lagen in Fraktion NP.1 1,3 µM Chlorogensäure, 1,6 µM Cumarsäure und 0,2 µM 4-*p*-Cumaroylchinasäure vor. Der Hemmeffekt ist daher (wahrscheinlich) auf die Substanzen (*R*)-1,3-Oktandiol, (*R*)-Okt-Z-5-en-1,3-diol, 3-Hydroxy-β-damascon oder weitere bisher noch nicht detektierte Substanzen zurückzuführen. Diese konnten aber aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Menge nicht in diesem Assay getestet werden.

Fraktion NP.2 enthielt im Vergleich zu NP.3-NP.5 nur einen sehr geringen Anteil an Procyanidinen (NP.2: 70 mg/g; NP.3-NP.5: 268-1000 mg/g), der sich auch in der Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR widerspiegelte. Fraktion NP.5, die ausschließlich aus polymeren Procyanidinen bestand, zeigte das stärkste inhibierende Potential auf die isolierte Rezeptorpräparation. Dies stimmt auch mit bereits publizierten Daten überein, in denen gezeigt werden konnte, dass der Hemmeffekt von Procyanidinen auf die isolierte EGF-Rezeptorpräparation vom Monomer zum Tetramer ansteigt (Fridrich *et al.* 2007a).

Ferner wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die im ELISA als wirksam identifizierten Fraktionen den Status der Phosphorylierung des EGFR, als Maß für dessen Rezeptoraktivität, in intakten Zellen modulieren können. Dazu wurden HT29 Zellen in Gegenwart von Katalase (100 U/ml), um die Bildung von Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium zu unterdrücken, mit den Fraktionen inkubiert.

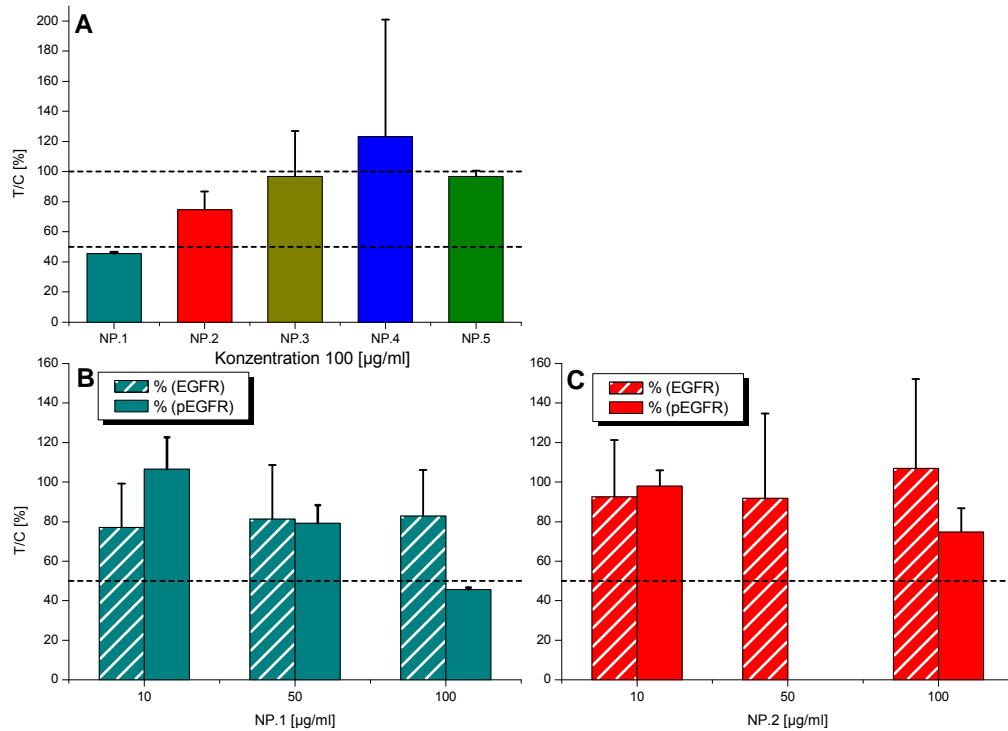


Abbildung 3.22 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR (45 min) in EGF-stimulierten HT29 Zellen durch die AE04 Fraktionen NP.1-NP.5 in Gegenwart von Katalase (100 U/ml); serumfreie Inkubation; MW \pm SD von 2 unabhängigen Experimenten, T/C: Verhältnis Test zur Kontrolle, pEGFR: phosphorylierter EGFR.

In einer ersten orientierenden Messung zeigte die procyanidinfreie Fraktion NP.1 mit Abstand die stärkste Hemmwirkung auf die Autophosphorylierung des EGFR in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29 (Abbildung 3.22 A+B). Die Fraktionen NP.2 bis NP.5 waren hingegen in Konzentrationen von 100 µg/ml weitestgehend unwirksam (Abbildung 3.22A+C). Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Hemmwirkung in der Zelle – im Gegensatz zur isolierten Rezeptorpräparation – aufgrund der Molekularmasse der Procyanidine limitiert zu sein scheint. Dies korreliert mit bereits publizierten Arbeiten zu isolierten Procyanidinen, in denen gezeigt wurde, dass in der intakten Zelle ein Procyanidintrimer einen effizienteren Hemmstoff der EGFR-Autophosphorylierung als ein Procyanidintetramer darstellt (Fridrich *et al.* 2007a). Für Fraktion NP.1 und NP.2 wurde exemplarisch der Effekt auf den Gesamtproteingehalt bestimmt, der jedoch im Rahmen der Fehlertoleranz unbeeinflusst blieb.

3.4.2 Apfelsaftextrakt AE06

An A431-Zellen wurde die Wirkung der Fraktionen auf die Phosphorylierung des EGFR untersucht. Die Inkubation erfolgte für 45 min in Gegenwart von Katalase. In

den Untersuchungen zur Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus des EGFR durch die Fraktionen des AE06 stellte sich die Fraktion S.33 als wirksamste im Hinblick auf die EGFR-hemmenden Eigenschaften heraus. Schon in einer Konzentration von 10 µg/ml wurde der Phosphorylierungsstatus des EGFR um 70% vermindert (Tabelle 3.12).

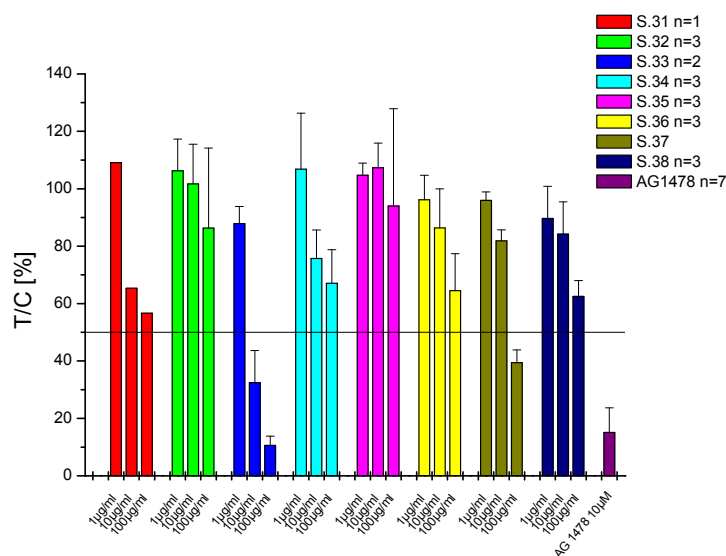


Abbildung 3.23 Modulation des Phosphorylierungsstatus des EGFR in EGF-stimulierten A431-Zellen durch die AE06 Fraktionen S.31-S.38; serumfreie Inkubation, Zusatz von 100U/ml Katalase. AG1478: spezifischer Inhibitor des EGFR, T/C: Verhältnis Test zur Kontrolle

Von den anderen Fraktionen zeigte nur noch S.37 mit 35%iger Restaktivität bei einer Konzentration von 100 µg/ml schwache EGFR-hemmende Eigenschaften. Die Fraktionen S.31, S.34, S.36 und S.38 reduzierten zwar die EGFR-Aktivität, waren aber nicht in der Lage, selbst in den höchsten untersuchten Konzentrationen den IC₅₀-Wert zu erreichen. Keinen Einfluss wiesen die Fraktionen S.32 und S.35 auf. Die Fraktion S.33 enthielt neben hohen Anteilen an Chlorogensäure auch polymere Procyanidine, Phloretin- und 3-Hydroxyphloretinglycoside. Phenolische Säuren haben keinen Einfluss auf die Aktivität des Rezeptors (Kern *et al.* 2005), im Gegensatz hierzu haben oligomere Procyanidine wie auch die Dihydrochalkone schon in früheren Studien ihr hohes Hemmpotential bewiesen (Yang *et al.* 2001, Fridrich *et al.* 2007a).

3.4.3 Phloretin- und 3-Hydroxyphloretinglycoside

Im zellfreien System wurde die Hemmwirkung der Dihydrochalkone auf die Protein-tyrosinkinaseaktivität am EGFR untersucht. Hierbei erwiesen sich 3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid und insbesondere Phloretin-2'-xyloglucosid mit IC_{50} -Werten von 4,9 bzw. 0,5 μM als effektive Wirkstoffe (vgl. Tabelle 3.13), gefolgt von 3-Hydroxyphloretin mit 8,9 μM sowie 3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid und Phloretin-2',4'-diglucosid mit IC_{50} -Werten von 12,1 bzw. 27,1 μM .

Tabelle 3.13 Hemmung der PTK-Aktivität des EGFR durch Dihydrochalkone

Substanz	IC_{50} -Werte [μM]
Phloretin	$43,4 \pm 5,1$
Phloretin-2'-glucosid	267 ± 50
Phloretin-2'-xyloglucosid	$0,5 \pm 0,1$
Phloretin-2',4'-diglucosid	$27,1 \pm 3,7$
3-Hydroxy-phloretin	$8,9 \pm 0,4$
3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid	$4,9 \pm 1,5$
3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid	$12,1 \pm 1,7$

Die Ergebnisse machen deutlich, dass eine weitere glycosidische Bindung in Position 4' am A-Ring des Phloretin bzw. die Verknüpfung mit einer Xyloglucose zu einer Erhöhung der Inhibitorwirkung führte.

Die zusätzliche Hydroxylgruppe in Position 3 des Phloretinmoleküls führte im Falle von 3-Hydroxyphloretin-2'-glucosids zu einer deutlichen erhöhten Inhibitorwirkung an der isolierten Tyrosinkinase. So war das Phloretin-2'-glucosid nahezu nicht in der Lage, die PTK zu inhibieren, 3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid hingegen zeigte mit 4,9 μM eine sehr gute Hemmung. Das gleiche gilt für die freien Aglykone. Dieses Resultat ist in guter Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Yang *et al.* (2001), in denen die in Position 3 und 4 hydroxylierten freien Dihydrochalkone Butein und Marein mit IC_{50} -Werten von 8 μM und 19 μM deutlich effektivere Inhibitoren waren als das nur in Position 3 hydroxylierte Phloretin ($IC_{50} = 25 \mu\text{M}$). Im Falle von 3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosids konnte eine Verstärkung des inhibitorischen Effekts allerdings nicht gemessen werden. Da vor allem phenolische Verbindungen mit zwei ortho-ständigen Hydroxylgruppen sensibel gegenüber Oxidation sind, wäre dies eine mögliche Erklärung für die deutliche Abnahme der Aktivität.

3.5 Prüfung auf potentielle chemopräventive Aktivität

Die Krebsentstehung ist in mehrere Phasen gegliedert. Sie beginnt mit der Initiationsphase, verläuft über die Promotion und geht schließlich in die Progressionsphase über (vgl. Kapitel 2.2.5.3). Während dieser langen Zeit der Krebsentwicklung gibt es verschiedene Ansatzpunkte für die Chemoprävention.

Der Fremdstoffmetabolismus stellt einen sehr frühen Angriffspunkt dar, weil durch ihn bereits die Aktivierung von Prokarzinogenen vor der eigentlichen Initiation verhindert bzw. die Entgiftung von Karzinogenen gefördert werden kann. Des Weiteren kann durch Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies und freier Radikale die Menge an Mutagenen im Körper verringert werden. Hierdurch wird auch die Anzahl von DNA-Schäden, die vor allem während der Initiationsphase von Bedeutung sind, verringert (Ferguson *et al.* 2004). Ein Eingriff in die Krebsentstehung ist auch auf Ebene der Tumorpromotion durch die Hemmung der Bildung von Tumorpromotoren möglich. Prostaglandine, die während des Entzündungsprozesses entstehen, können durch die Beeinflussung der Signaltransduktion gewebespezifisch proliferative Effekte induzieren.

3.5.1 Modulation des Fremdstoffmetabolismus

Der Fremdstoffmetabolismus verläuft im Körper in zwei Phasen und dient dazu, körperfremde Substanzen möglichst rasch wieder zu eliminieren. Durch die sogenannten Funktionalisierungsreaktionen der Phase-I werden durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionelle Gruppen eingeführt oder freigelegt. Diese Reaktionen beeinflussen Aktivität und Eigenschaften der Fremdstoffe und werden durch Cytochrom P-450 Isoenzyme katalysiert. Sie können zu einer Entgiftung oder metabolischen Aktivierung von Substanzen führen. In einer zweiten Phase erfolgt die Konjugation der Phase-I-Metabolite mit aktivierter Glucuronsäure, Schwefelsäure, Aminosäuren oder Glutathion. In Phase-I-Reaktionen können hochreaktive Verbindungen wie z.B. Epoxide entstehen, die in der Lage sind, chemisch mit der DNA zu interagieren. Im Gegensatz dazu entstehen in der Regel bei Phase-II-Reaktionen biologisch inaktive und wasserlösliche Produkte (Forth und Aktories 2006). Die Reduktion von elektrophilen Chinonen zu Hydrochinonen durch NAD(P)H:Chinonreduktase (QR) ist ein wichtiger Entgiftungsmechanismus der Phase-II. Obwohl das Enzym kein klassisches Konjugationsenzym

darstellt, wird QR zu den Phase-II-Enzymen gezählt, weil es die Umwandlung von potenziell toxischen Chinonen in unschädliche Hydrochinone katalysiert. Nachdem gezeigt wurde, dass Phase-I-Enzyme zur Bildung krebserregender Verbindungen führen können, während Phase-II-Enzyme vorwiegend zu deren Entgiftung beitragen, wird die Hemmung von Phase-I-Enzymen und besonders die Aktivierung von Phase-II-Enzymen als sinnvolle Präventionsstrategie in frühen Phasen der Krebsentstehung angesehen.

Um Hemmstoffe des Phase-I-Metabolismus nachzuweisen, wurde exemplarisch das Enzym Cytochrom P450 1A (CYP1A) ausgewählt. Es wird unter anderem für die Aktivierung aromatischer Kohlenwasserstoffe zu hochaktiven Karzinogenen verantwortlich gemacht. Unter Verwendung von Homogenaten β -Naphthoflavon-induzierter H4IIE Rattenhepatomzellen wurde die Enzymaktivität von CYP1A über die Dealkylierung des Substrates 3-Cyano-7-ethoxycoumarin (CEC) zum fluoreszierenden 3-Cyano-7-hydroxycoumarin fluorometrisch bestimmt.

Als Marker für Phase-II-Enzyme wurde die Induktion der QR in der Hepa1c1c7 Maus Leberkrebszelllinie gemessen. Die Maushepatomzellen wurden den Normalzellen vorgezogen, da erstere eine deutlich erhöhte Induzierbarkeit der QR zeigen. Es ist daher auch möglich, Aussagen über schwach induzierende Substanzen zu erhalten. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte über die QR-katalysierte Reduktion von Menadion zu Menadiol sowie die spontan verlaufende Rückreaktion, bei der parallel das gelb gefärbte Tetrazol MTT (3-(4,5-Dimethylthiazo-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem tiefblauen Formazan reduziert wird (Abbildung 3.24). Die Bildung des blauen Farbstoffs wird bei 595 nm photometrisch bestimmt. Die Konzentration der Substanz, die zu einer Verdopplung der spezifischen Aktivität nötig ist, wird als sog. CD-Wert bezeichnet.

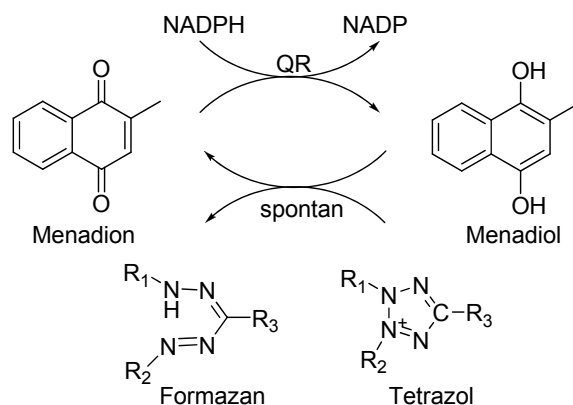


Abbildung 3.24 Reaktion zur Bestimmung der NAD(P)H:Chinonreduktase-Aktivität nach Prochaska und Santamaria (1988).

Der Einfluss der bisher in Apfelsaft identifizierten phenolischen Hauptinhaltsstoffe auf die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus ist von Zeßner (2005) untersucht worden. Die hierbei erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 3.14 dargestellt.

Tabelle 3.14 Einfluss von Apfelpolyphenolen auf die Enzyme Cyp1A und QR (Zeßner 2005)

Substanz	CYP1A Hemmung	QR Induktion
	IC ₅₀ [µM]	CD [µM]
(-)-Epicatechin	>500	>50
Procyanidin B ₁	>50	>50
Procyanidin B ₂	>50	>50
Procyanidin C ₁	12,3	>50
Kaffeensäure	>500	>100
Chlorogensäure	>500	>500
4-Cumaroylchinasäure	>50	>50
Phloretin-2'-xyloglucosid	>50	>50
Phloretin-2'-glucosid	334,0	>500
Phloretin	1,0	25,0
Quercetin-3-O-glucosid	67,3	>50
Quercetin-3-O-galactosid	48,2	>50
Quercetin-3-O-rhamnosid	3,6	5,1
Quercetin-3-O-rutinosid	32,8	11,9
Quercetin	0,026	2,6

IC₅₀ = halbmaximale Hemmkonzentration; CD = Konzentration zur Verdopplung der spezifischen Aktivität der QR. Werte in Klammern geben die die Induktion bei der entsprechenden Konzentration an.

Die phenolischen Säuren hatten keinen Einfluss auf die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus. Die Hemmung des CYP1A durch Flavan-3-ole scheint abhängig von deren Polymerisationsgrad zu sein. So waren die dimeren Procyanidine noch nicht in der Lage, CYP1A zu hemmen. Das trimere Procyanidin C₁ wies aber schon bei einer Konzentration von 12,3 µM eine 50%ige Hemmwirkung auf. Der mit Abstand stärkste Inhibitor von CYP1A ist das Quercetin (IC₅₀=0,026 µM). Die Inhibitorwirkung wird durch die glycosidische Bindung, abhängig vom Zucker, verringert. Quercetin erwies sich auch als der stärkste Induktor der QR. Andere in dieser Studie untersuchte phenolische Bestandteile des Apfels zeigten mit Ausnahme von Phloretin keine QR-Induktion.

3.5.1.1 Apfelsaftextrakt AE04

3.5.1.1.1 Fraktionen S.1 – S.9 sowie deren Subfraktionen

Die Fraktionen S.1 - S.9 wurden auf ihre Fähigkeit, die Aktivität der Enzyme des Fremdstoffmetabolismus zu beeinflussen, untersucht. Tabelle 3.15 orientiert über die hierbei erhaltenen Ergebnisse.

Tabelle 3.15 Einfluss der AE04 Fraktionen und deren Subfraktionen auf Enzyme des Fremdstoffmetabolismus

Fraktion	CYP1A Hemmung	QR Induktion
	IC ₅₀ [µg/ml]	CD [µg/ml]
AE04	11,5	200
S.1	19,9	>50 (1,5)
S.2	30,0	59,1
S.2.1	34,3	34,1
S.2.2	>50	>50 (1,0)
S.2.3	>50	>50 (1,0)
S.2.4	>50	>50 (1,0)
S.2.5	14,8	>50 (1,0)
S.2.6	46	20,5
S.3	>50	>50 (1,2)
S.4	22,4	>50 (1,1)
S.5	4,4	>50 (1,2)
S.6	5,0	>50 (1,1)
S.6 ND	5,0	>50 (1,1)
S.7	3,0	>50 (1,0)
S.8	2,6	>50 (1,2)
S.8 ND	0,3	10,4
S.9	6,8	>50 (1,1)

IC₅₀ = halbmaximale Hemmkonzentration; CD = Konzentration zur Verdopplung der spezifischen Aktivität der QR. Werte in Klammern geben die die Induktion bei der entsprechenden Konzentration an. Stärkere Aktivitäten als der Ursprungsextrakt sind fett hervorgehoben.

CYP1A wurde insbesondere von den spät eluierenden, procyanidinreichen Fraktionen stark gehemmt. Herausragend war die Fraktion S.8ND mit einem IC₅₀ von 0,3 µg/ml, die neben polymeren Procyanidinen auch noch Quercetin enthielt. Die nur aus Procyanidinen bestehende Fraktion S.9 zeigte einen IC₅₀-Wert von 6,8 µg/ml.

Betrachtet man die Ergebnisse der QR-Induktion, so waren nur die Fraktionen S.2 und S.8ND mit einem jeweiligen CD-Wert von 59,1 bzw. 10,4 mg/ml in der Lage die QR in den in Hepa1c1c7 Maus Hepatomzellen zu induzieren. In den S.2 Subfraktionen (vgl. 3.2.1.1.2) wurden die hierfür verantwortlichen Substanzen in Fraktion S.2.1 und S.2.6 aufkonzentriert.

Die Hemmung von CYP1A ist vorwiegend auf den zunehmenden Anteil polymerer Procyanidine sowie auf den hohen Anteil von Epicatechin in S.5 zurückzuführen. Diese Substanzen wurden kürzlich als potente Hemmstoffe von CYP1A beschrieben (Zessner *et al.* 2008). Die herausragende Hemmwirkung der Fraktion S.8 ND ist auf den hohen Gehalt an Quercetin zurückzuführen. QR konnte nur durch die Fraktionen S.2 und S.8 ND induziert werden. In Fraktion S.8 ND ist wiederum der Quercetiningehalt für die Wirkung verantwortlich. S.2 wurde an Kieselgel weiter fraktioniert, da zum damaligen Zeitpunkt kein bekannter QR-Induktor identifiziert werden konnte. Anhand von GC-MS Analysen wurden in Fraktion S.2.1 die höhersiedenden Inhaltsstoffe 3-Hydroxy- β -damascon, Di-(2-ethylhexyl)-phthalat, sowie in Fraktion S.2.6 geringe Konzentrationen des Triterpens Corosolsäure identifiziert. Die beiden erstgenannten waren potente Induktoren der QR (vgl. Kapitel 3.5.1.3). Hinweise auf einen bekannten QR-Induktor in S.2.6. wurden nicht gefunden.

3.5.1.1.2 Fraktionen NP.1 – NP.5

Um den Einfluss der im Extrakt enthaltenen Procyanidine im Vergleich zu den phenolischen Glycosiden näher zu untersuchen wurde der Extrakt an Kieselgel aufgetrennt. Der Gehalt an Procyanidinen sowie deren Polymerisationsgrad nahmen im Laufe der chromatographischen Trennung zu (vgl. 3.2.1.2). Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3.16 dargestellt.

Tabelle 3.16 Einfluss der NP-Fraktionen auf Enzyme des Fremdstoffmetabolismus

Fraktion	CYP1A Hemmung	QR Induktion
	IC ₅₀ [μ g/ml]	CD [μ g/ml]
NP.1	6,2	41,0
NP.2	10,9	>50 (1,4)
NP.3	46,0	>50 (1,7)
NP.4	10,8	42,2
NP.5	10,7	35,3

IC₅₀ = halbmaximale Hemmkonzentration; CD = Konzentration zur Verdopplung der spezifischen Aktivität der QR. Werte in Klammern geben die die Induktion bei der entsprechenden Konzentration an. Stärkere Aktivitäten als der Ursprungsextrakt sind fett hervorgehoben

Gute CYP1A-Hemmung mit einem IC₅₀-Wert < 10 μ g/ml zeigte nur die Fraktion NP.1, die innerhalb der Nachweisgrenzen keine bekannten CYP1A-Inhibitoren enthielt.

In Analogie zur S.2 Fraktionierung waren eine früh (NP.1) und zwei spät eluierte Fraktionen (NP.4+NP.5) in der Lage, als Hinweis auf eine verbesserte Fremdstoffmetaboli-

sierung die Aktivität der QR mehr als 2-fach zu induzieren. Die hierfür verantwortlichen Substanzen in NP.1 waren 3-Hydroxy- β -damascon und Di-(2-ethylhexyl)-phthalat. In den Fraktionen NP.4 und NP.5 konnten keine bekannten QR-Induktoren identifiziert werden.

3.5.1.2 Apfelsaftextrakt AE06

Neben AE04 wurde mit AE06 noch ein weiterer Apfelsaftextrakt fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen S.31-S.38 wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit, den Fremdstoffmetabolismus zu modulieren, untersucht. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 3.17 dargestellt.

Tabelle 3.17 Einfluss der AE06 Subfraktionen auf Enzyme des Fremdstoffmetabolismus

Fraktion	CYP1A Hemmung	QR Induktion
	IC ₅₀ [$\mu\text{g/ml}$]	CD [$\mu\text{g/ml}$]
AE06	11,9	>200 (1,3)
S.31	>50	>50 (1,2)
S.32	>50	>50 (1,7)
S.33	>50	>50 (1,3)
S.34	16,8	>50 (1,1)
S.35	6,4	>50 (1,0)
S.36	2,4	>50 (1,2)
S.37	5,1	>50 (1,0)
S.38	7,8	>50 (1,0)

IC₅₀ = halbmaximale Hemmkonzentration; CD = Konzentration zur Verdopplung der spezifischen Aktivität der QR. Werte in Klammern geben die Induktion bei der entsprechenden Konzentration an. Stärkere Aktivitäten als der Ursprungsextrakt sind fett hervorgehoben

Effektive CYP1A-Hemmer wurden in den Fraktionen S.35-S.36 aufkonzentriert. Diese Fraktionen waren mit einem IC₅₀ < 10 $\mu\text{g/ml}$ deutlich stärkere Inhibitoren als der Ursprungsextrakt. Die aktiven Substanzen hierbei wurden als das freie Aglykon Quercetin (in Fraktion S.36) bzw. polymere Procyanidine in den übrigen Fraktionen (S.35, S.37, S.38) identifiziert.

QR wurde in Analogie zur Versuchsreihe mit AE04 nur durch die Fraktion S.32 induziert. Die hierfür verantwortliche Substanz ist ebenfalls das 3-Hydroxy- β -damascon.

Insgesamt konnten bei der Studie mit AE06 die für den Extrakt AE04 und dessen Subfraktionen erhaltenen Ergebnisse sehr gut reproduziert werden; Hinweise auf neue Substanzen ergaben sich nicht.

3.5.1.3 Reinsubstanzen

Neben den Apfelsaftextrakten und den hieraus erhaltenen Fraktionen wurden auch die hieraus isolierten Reinsubstanzen biologisch geprüft.

Tabelle 3.18 Einfluss verschiedener Reinsubstanzen auf Enzyme des Fremdstoffmetabolismus

Substanz	CYP1A Hemmung	QR Induktion
	IC ₅₀ [µM]	CD [µM]
Di-(2-ethylhexyl)-phthalat	n.b.	6,25
3-Hydroxy-β-damascon	n.b.	2,05
3-Hydroxy-2-pyron	47,0	>50
3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid	>50 (29)	>50
3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid	>50	>50
3-Hydroxyphloretin	2,1	43,5
Corosolsäure	>50	>5.9
(R)-1,3-Oktandiol	n.b.	>50

IC₅₀ = halbmaximale Hemmkonzentration; CD = Konzentration zur Verdopplung der spezifischen Aktivität der QR. Werte in Klammern geben die die Hemmung bei der entsprechenden Konzentration an; n.b. nicht bestimmt.

3-Hydroxyphloretin zeigte mit einem IC₅₀ von 2,1 µM die stärkste inhibitorische Wirkung von CYP1A; der Hemmeffekt wurde durch eine glycosidische Bindung stark verringert. Weiterhin wurde 3-Hydroxy-2-pyron als schwacher Inhibitor identifiziert werden. Die Untersuchung der Maushepatomzellen auf Induktion der Chinonreduktase durch die untersuchten Substanzen zeigte, dass 3-Hydroxy-β-damascon mit einem CD-Wert von 2,05 µM ein effektiver Induktor ist. Auch Di-(2-ethylhexyl)-phthalat war in der Lage, die QR-Aktivität bei einer Konzentration von 6,25 µM zu verdoppeln. Es zeigte sich jedoch, dass das Phthalat mit einem IC₅₀ von 9,35 µM im Vergleich zum 3-Hydroxy-β-damascon (IC₅₀ = 95µM) relativ toxisch ist. Weiterhin konnte nur noch das 3-Hydroxyphloretin die QR schwach induzieren.

QR-Induktoren sind nach Talalay (1989) meist ungesättigte Verbindungen, die α-ständig zur Doppelbindung einen elektronenziehenden Substituenten wie Keto-, Ester- oder Nitrogruppen besitzen. Sowohl 3-Hydroxy-β-damascon als auch Di-(2-ethylhexyl)-phthalat erfüllen diese Strukturvoraussetzungen. Die beobachtete hohe Toxizität des Phthalats war aufgrund kürzlich veröffentlichter Studien zu erwarten (Voss *et al.* 2005, Kang *et al.* 2006).

Durch nicht-enzymatische Bräunung entsteht aus Ascorbinsäure u.a. 3-Hydroxy-2-pyron (Tatum *et al.* 1969). Diese Substanz besitzt allerdings ebenso wie die Ascorbin-

säure selbst keinen Einfluss auf die untersuchten Enzyme (Gerhäuser *et al.* 2003). Die zusätzliche Hydroxylgruppe in Position 3 der Dihydrochalkonglycoside führte zu einer gesteigerten Aktivität in den Enzymassays. War Phloretin-2'-glycosid erst bei einer Konzentration von über 300 μM in der Lage, die Aktivität des Enzym Cyp1A um 50% zu reduzieren (Zeßner 2005), so war 3-Hydroxy-phloretin-2'-glycosid schon bei einer Konzentration von ca. 50 μM in der Lage das Enzym um 29% zu hemmen. Beim freien Aglykon 3-Hydroxyphloretin (2,1 μM) zeigte sich im Vergleich zum Phloretin (1,0 μM) jedoch keine weitere Erhöhung der inhibitorischen Wirkung.

3.5.2 Antioxidative Eigenschaften

Durch metabolische Vorgänge werden innerhalb der Zellen ständig Radikale gebildet. Im gesunden Körper herrscht durch körpereigene Kontrollmechanismen ein Gleichgewicht zwischen prooxidativen und antioxidativen Systemen. Bei Stresssituationen, wie chronischen Entzündungen, Infektionen oder Erkrankungen des Immunsystems, verschiebt sich das Gleichgewicht. Es kommt zu einer Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie Hydroxyl-, Superoxidanionradikal und Peroxylradikalen, die zur Schädigung zellulärer Proteine und Lipide sowie zu DNA-Strangbrüchen führen können (Evans und Halliwell 2001). Durch Bildung von oxidierten DNA-Bausteinen und DNA-Strangbrüchen können Mutationen hervorgerufen werden. Radikalfänger und antioxidative Verbindungen inaktivieren ROS. Sie sind somit in der Lage, das intrazelluläre Redox-Gleichgewicht wieder herzustellen und der Karzinogenese entgegen zu wirken (Halliwell *et al.* 2000).

Ein einfaches System zur Bestimmung der Radikalfängereigenschaften von Extrakten und Reinsubstanzen stellt der DPPH-Test dar. Das stabile Radikal 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) besitzt aufgrund seiner Struktur und dem freien Elektron ein Absorptionsmaximum von 517 nm, was sich in der tiefviolettten Färbung der Substanz ausdrückt. Die Übertragung eines Wasserstoff-Atoms von einem Radikalfänger auf das DPPH-Radikal führt zu einer Entfärbung (vgl. Abbildung 3.25). Hierbei wird die Substanzmenge bestimmt, die notwendig ist, um 50% der vorgelegten DPPH-Radikale abzufangen (SC_{50} -Wert).

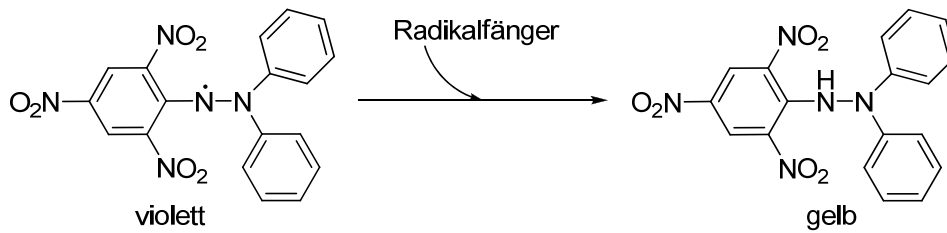


Abbildung 3.25 Reaktionsgleichung des DPPH-Tests

Ein weiterer Test zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität ist die Hemmung der Superoxidanionbildung (X/XO-Test). Hierbei handelt es sich um ein enzymatisches System zur Generierung von Superoxidanion-Radikalen aus Hypoxanthin. Unter physiologischen Bedingungen werden bei der Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure auf zwei Stufen Radikale freigesetzt (vgl. Abbildung 3.26).

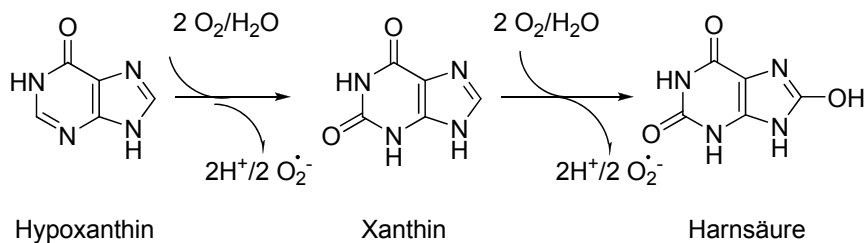


Abbildung 3.26 Bildung der Superoxidanion-Radikale durch Xanthinoxidase

Die Menge der durch Xanthinoxidase gebildeten freien Superoxidanion-Radikale wird bei 480 nm photometrisch durch Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes XTT (Natrium-2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid) zum entsprechenden orange gefärbten Formazan bestimmt (Abbildung 3.27).

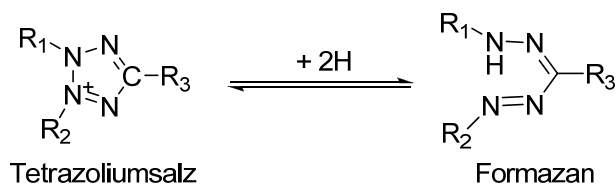


Abbildung 3.27 Reduktion des Tetrazoliumsalzes zu Formazan

Im Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC_{ROO})-Test wurde die antioxidative Kapazität gegenüber Peroxylradikalen analysiert. Durch 2,2'-Azobis-(amidinopropan)-dihydrochlorid (AAPH) wurden bei 37°C Peroxylradikale freigesetzt. Die Radikalfängereigenschaften wurden über den Schutz vor radikalvermitteltem Fluoreszenzabfall des Fluoresceins im Vergleich zum Standard Trolox (wasserlösliches Vit. E-Analoga)

berechnet. Eine ORAC Einheit entspricht hierbei dem Schutz von Fluorescein vor Radikalen durch 1 μM Trolox.

Der Einfluss der bisher in Apfelsaft identifizierten phenolischen Hauptinhaltsstoffe auf die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus ist von Zeßner (2005) untersucht worden. Die hierbei erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 3.19 dargestellt.

Tabelle 3.19 Antioxidative Kapazität von Apfelpolyphenole (Zeßner 2005)

Substanz	DPPH	X/XO	ORAC _{ROO}
	SC ₅₀ [μM]	SC ₅₀ [μM]	[units]
(-)-Epicatechin	13,7	7,0	4,3
Procyanidin B ₁	10,9	14,1	n.b.
Procyanidin B ₂	6,8	13,1	5,1
Procyanidin C ₁	4,4	7,0	n.b.
Kaffeesäure	>50	44,0	3,0
Chlorogensäure	>50	75,1	2,4
4- <i>p</i> -Cumaroylchinasäure	>50	>50	2,6
Phloretin-2'-xyloglucosid	>25	>50	3,5
Phloretin-2'-glucosid	>500	>200	4,0
Phloretin	395,2	>500	2,1
Quercetin-3- <i>O</i> -glucosid	15,7	137,4	2,1
Quercetin-3- <i>O</i> -galactosid	15,8	121,3	2,3
Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid	20,4	124,3	2,2
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinosid	16,8	65,1	3,9
Quercetin	8,6	18,3	2,9

SC₅₀: halbmaximale Radikalfängeraktivität; 1 ORAC-unit entspricht dem Schutz von Fluorescein vor Radikalen durch 1 μM Trolox, n.b. nicht bestimmt.

Die phenolischen Säuren und die Dihydrochalkone des Apfels zeigten keine Radikalfängereigenschaften im DPPH-Test. Die Flavan-3-ole zeigten jedoch eine mit der Kettenlänge korrelierende Zunahme. Es wurde daher vermutet, dass dies in der größeren Anzahl an freien Hydroxylgruppen begründet ist. Dies könnte auch der Grund für die Aktivitätsminderung der Quercetin-glycoside sein (Zeßner 2005).

Weiterhin ist Tabelle 3.19 zu entnehmen, dass nur die Flavan-3-ole sowie Quercetin mit SC₅₀-Werten unter 20 μM in der Lage sind, die durch die Xanthinoxidase gebildeten Superoxidanionen effizient abzufangen. Ferner wird die gute Wirkung von Quercetin durch eine glycosidische Bindung deutlich abgeschwächt.

Im ORAC-Test erwiesen sich alle phenolischen Apfelinhaltsstoffe als mindestens doppelt so effektive Peroxylradikalfänger wie die Referenzsubstanz Trolox. Sehr gute Radikalfängereigenschaften besaßen vor allem Phloretin-2'-glucosid, Quercetin-3-*O*-rutinosid und Epicatechin. Procyanidin B₂ besaß mit 5,1 units den mit Abstand höchsten Wert.

3.5.2.1 Apfelsaftextrakt AE04

3.5.2.1.1 Fraktionen S.1 – S.9 sowie deren Subfraktionen

Aus vorangegangenen Studien war bekannt, dass der Gesamtextrakt eine größere antioxidative Kapazität besaß als die Summe der bis dorthin identifizierten Inhaltsstoffe. Daher wurde der Extrakt an Sephadex LH-20 aufgetrennt. Dabei ergab sich, dass später eluierende Fraktionen in Bezug auf die DPPH- und Superoxidanion-Radikalfängerkapazität eine höhere Aktivität als früh eluierende Fraktionen aufwiesen und SC_{50} -Werte bis zu 4,3 bzw. 10,3 $\mu\text{g/ml}$ erreichten (vgl. Tabelle 3.20). Die herausragende Superoxidanion-Radikalfängerkapazität der Fraktion S.8 ND ($SC_{50} = 3,8 \mu\text{g/ml}$) ist ausschließlich auf den hohen Quercetingehalt zurückzuführen. Die S.5 Subfraktionen zeigten mit min. 15% höheren IC_{50} -Werten deutlich schlechtere Eigenschaften im DPPH-Assay. Gegenüber den Superoxidanionradikalen waren die Fraktionen S.5.2, S.5.3, S.5.4, S.5.6b und S.5.9 deutlich aktiver als die Ursprungsfraktion.

Hingegen waren die chlorogensäure- und phloretinglycosidreichen Fraktionen (S.3-S.5) im ORAC-Test deutlich effektivere Peroxylradikalfänger. Die Subfraktionierung von S.5 führte zu weitestgehend inaktiven Subfraktionen.

Tabelle 3.20 Antioxidative Kapazität von AE04 und dessen Subfraktionen

Fraktion	DPPH	X/XO	ORAC _{ROO}
	SC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	SC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	[units] at 1 $\mu\text{g/ml}$
AE04	8,7	16,2	3,2
S.1	11,1	21,6	2,9
S.2	13,0	28,3	2,5
S.2.1	>50	>50	0,9
S.2.2	>50	>50	0,8
S.2.3	>50	>50	1,7
S.2.4	40,6	>50	1,8
S.2.5	8,2	17,1	2,9
S.2.6	13,7	27,3	3,0
S.3	10,0	30,8	5,2
S.4	7,5	17,7	5,6
S.5	4,3	10,3	4,8
S.5.1	>50	53,2	1,3
S.5.2	6,7	4,4	4,2
S.5.3	7,4	8,0	4,1
S.5.4	5,0	7,1	4,4
S.5.5	5,2	11,9	4,3
S.5.6a	8,6	19,4	2,5
S.5.6b	5,3	5,6	4,0
S.5.7	5,4	11,5	3,5

Fraktion	DPPH	X/XO	ORAC _{ROO}
	SC ₅₀ [µg/ml]	SC ₅₀ [µg/ml]	[units] at 1 µg/ml
S.5.8	8,2	15,5	4,1
S.5.9	8,2	8,6	2,0
S.5.10	10,6	29,6	1,2
S.6	4,7	11,6	3,7
S.6 ND	5,8	18,6	3,4
S.7	5,1	15,0	4,0
S.8	5,5	10,3	3,6
S.8 ND	6	3,8	2,7
S.9	5,6	14,8	2,3

SC₅₀: halbmaximale Radikalfängeraktivität; 1 ORAC-unit entspricht dem Schutz von Fluorescein vor Radikalen durch 1 µM Trolox, n.b. nicht bestimmt; Stärkere Aktivitäten als der Ursprungsextrakt sind fett hervorgehoben.

Insgesamt wird deutlich, dass zur antioxidativen Kapazität des Gesamtexttrakts alle Verbindungsklassen im Apfelsaft beitragen auch wenn die polymeren Procyanidine einen besonders großen Beitrag leisten. Dies wird auch in der Korrelation zwischen dem im DPPH-Test erreichten IC₅₀-Wert und dem Gehalt an allen Radikalfängern (Abbildung 3.A) bzw. dem Gehalt an PC's (Abbildung 3.B) deutlich. Nur durch Beachtung der PC wird zwar ein Trend deutlich, jedoch erst durch die Einbeziehung der Konzentrationen aller Radikalfänger ergibt sich eine gute lineare Regression. Eine analoge Schlussfolgerung kann auch aus den Ergebnissen des X/XO-Tests gezogen werden. Da die Korrelation aller bekannten Superoxidationradikalfänger mit dem erzielten IC₅₀ etwas schlechter ist ($r^2 = 0,857$) als beim DPPH-Test ($r^2 = 0,884$) könnte dies ein Hinweis auf bisher noch nicht identifizierte Substanzen sein.

Die Ergebnisse sind zu einem großen Teil in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen von Zeßner (2005) und Es-Safi et al. (2006), bei denen gezeigt wurde, dass für die antioxidative Kapazität im DPPH- und X/XO-Test vorwiegend höher polymere Procyanidine verantwortlich sind, die in späten Fraktionen eluiert wurden. Die niedermolekularen Flavonoide waren hingegen weitestgehend inaktiv. Weiterhin sind die monomeren und oligomeren Flavan-3-ole als Ursache der guten Superoxidation-Radikalfängerwirkung der Fraktionen S.5.2-S.5.4 identifiziert worden.

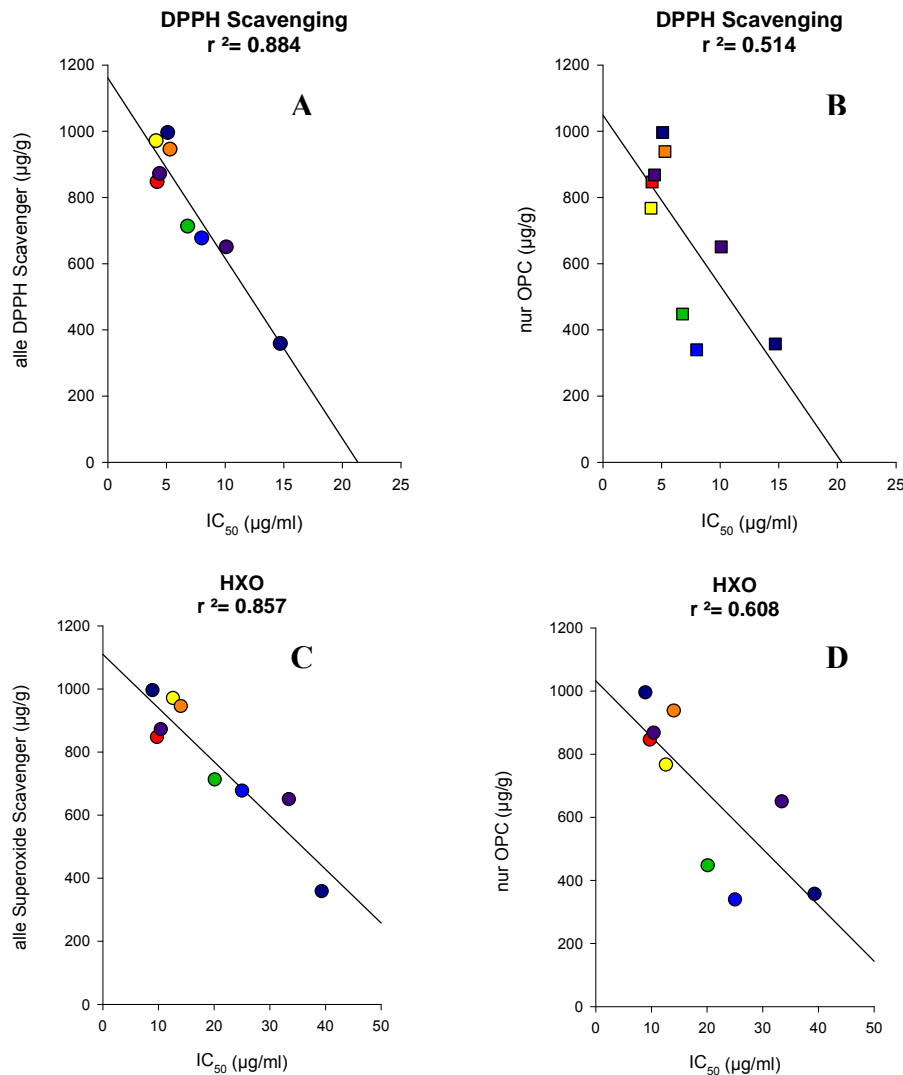


Abbildung 3.28 Korrelation zwischen dem Gehalt an allen Radikalfänger (A) bzw. dem Gehalt an oligomeren Procyanidinen (OPC, B) und dem erzielten IC_{50} im DPPH-Test, sowie zwischen dem Gehalt an Superoxidationenfänger (C) bzw. dem Gehalt an oligomeren Procyanidinen (OPC, D) und dem erzielten IC_{50} in den Fraktionen S.1 – S.9.

Bei der Subfraktionierung von S.5 wurden mit Ausnahme der Superoxidation-radikalfängerkapazität im Vergleich zur Ursprungsfraction durchweg schlechtere Werte erreicht (vgl. Tabelle 3.20). Fraktion S.5.1 besaß keine Radikalfängereigenschaft. Eine mögliche Erklärung könnte ein „Schmiereffekt“ von aktiven polaren Substanzen am unpolaren Säulenmaterial oder einen Verlust der Aktivität durch Oxidation während der Chromatographie sein.

3.5.2.1.2 Fraktionen NP.1 – NP.5

Der Extrakt AE04 wurde an Kieselgel in 5 Fraktionen mit ansteigendem DPm unterteilt, um den Einfluss der Procyanidine auf die Testsysteme bestimmen zu können. Aller-

dings unterschieden sich die Fraktionen etwas vom Gesamtextrakt, da die hochpolymeren Procyanidine vom Kieselgel irreversibel gebunden wurden. Es zeigte sich, dass die Fraktionen sowohl schlechtere Radikalfänger im DPPH-Test als auch schlechtere Superoxidanion-Radikalfänger waren. Dennoch war zu beobachten, dass die Fähigkeit Radikale abzufangen, im Laufe der chromatographischen Trennung stieg und somit der SC_{50} -Wert von 20,9 $\mu\text{g/ml}$ auf 9,1 $\mu\text{g/ml}$ fiel. Peroxylradikale wurden analog zu früheren Fraktionierungen vorwiegend durch die Fraktionen (NP.2, NP.3) mit hohem Anteil an niedermolekularen Flavonoiden abgefangen. NP.2 erwies sich hierbei mit 3,8 units als aktivste Fraktion.

Tabelle 3.21 Antioxidative Kapazität der Fraktionen NP.1 - NP.5

Fraktion	DPPH	X/XO	ORAC _{ROO}
	SC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	SC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]	[units] at 1 $\mu\text{g/ml}$
AE04	8,7	16,2	3,2
NP.1	20,9	30,4	3
NP.2	15,1	23,2	3,8
NP.3	24,3	43,7	3,7
NP.4	13,6	24,3	2,2
NP.5	9,1	24,2	1,5

SC_{50} : halbmaximale Radikalfängeraktivität; 1 ORAC-unit entspricht dem Schutz von Fluorescein vor Radikalen durch 1 μM Trolox, n.b. nicht bestimmt; stärkere Aktivitäten als der Ursprungsextrakt sind fett hervorgehoben.

Sehr gute Radikalfänger im DPPH-Test waren vor allem die Flavan-3-ole, deren SC_{50} -Wert invers mit dem Dpm korrelierte (Pan 2006). Dies spiegelt sich auch in den untersuchten NP-Fraktionen wieder. So besitzt die Fraktion NP.5, welche ausschließlich aus polymeren Procyanidinen (Dpm = 7,9) besteht, mit 9,1 $\mu\text{g/ml}$ ($\approx 4\mu\text{M}$) die größte Aktivität. Die hohen Verluste an polymeren Procyanidinen im Verlauf der Trennung könnte auch eine Erklärung dafür sein, dass keine der Fraktionen in Bezug auf DPPH- und Superoxidanion-Radikalfängerkapazität die Aktivität von AE04 (8,7 bzw. 16,2 $\mu\text{g/ml}$) erreichte.

Im ORAC-Test wiesen die früh eluierenden Fraktionen mit niedermolekularen Polyphenolen und oligomeren Procyanidinen die besten Peroxylradikalfängereigenschaften auf. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit den Erkenntnissen von Pan (2006) und Zeßner (2005), die jeweils bei der Überprüfung der antioxidativen Kapazität von Reinstoffen eine sehr gute antioxidative Aktivitäten der phenolischen Säuren Kaffeesäure (3,0 units), *p*-Cumarsäure (3,0 units) und Chlorogensäure (2,4 units) sowie der Dihydrochalkone Phloretin-2'-xyloglucosid (3,5 units) und Phloretin-2'-glucosid

(4,0 units) gefunden haben. Diese Substanzen waren neben den Quercetinglycosiden in hohen Konzentrationen in den Fraktionen NP.2 und NP.3 enthalten.

3.5.2.2 Apfelsaftextrakt AE06

Zur Identifizierung weiterer aktiver aber bisher unbekannter Verbindungen wurde der Extrakt AE06 analog zu AE04 an Sephadex LH-20 aufgetrennt. Insgesamt konnten bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität die für den Extrakt AE04 getroffenen Hauptaussagen sehr gut reproduziert werden. Zusammenfassend ist festzustellen, dass für die Radikalfängereigenschaften im DPPH- und X/XO-Test sowohl niedermolekulare Verbindungen, als auch die Procyanidine verantwortlich sind. Chlorogensäure sowie Phloretin- und Quercetinglycoside (aus S.33 und S.34) wirkten am stärksten antioxidativ gegen Peroxylradikale im ORAC-Test, während die Procyandine weniger aktiv waren (vgl. Tabelle 3.22). Hinweise auf neue biologisch aktive Substanzen wurden nicht gefunden.

Tabelle 3.22 Antioxidative Kapazität der Fraktionen S.31 - S.38 des AE06

Fraktion	DPPH	X/XO	ORAC _{ROO}
	SC ₅₀ [µg/ml]	SC ₅₀ [µg/ml]	[units] at 1 µg/ml
AE06	8,0	14,6	n.b.
S.31	>50	>50	0,3
S.32	>50	>50	1,0
S.33	12,2	34,2	3,7
S.34	5,9	11,0	3,9
S.35	4,8	12,6	2,8
S.36	5,0	9,4	2,5
S.37	5,8	7,6	1,9
S.38	5,7	7,3	1,2

SC₅₀: halbmaximale Radikalfängeraktivität; 1 ORAC-unit entspricht dem Schutz von Fluorescein vor Radikalen durch 1 µM Trolox; stärkere Aktivitäten als der Ursprungsextrakt sind fett hervorgehoben.

3.5.2.3 Reinsubstanzen

Neben den erhaltenen Fraktionen wurden auch die isolierten und synthetisierten Reinsubstanzen auf ihre antioxidative Kapazität geprüft (vgl. Tabelle 3.23). Im Einzelnen waren es die 3-Hydroxyphloretin(-glycoside) und das 3-Hydroxy-2-pyron. Das 3-Hydroxyphloretin war mit einem IC₅₀-Wert von 13,3 bzw. 20,1 µM DPPH- bzw. Su-

peroxidanionradikale abzufangen. Eine glycosidische Bindung führten unabhängig vom Zuckerrest zu einem deutlichen Verlust der Aktivität. Weiterhin halbierten sich die ORAC-Einheiten von 4,0 auf 1,8. Ein ähnliches Bild zeigte sich beim Xyloglucosid. Hier war noch mal ein ein leichter Abfall der SC_{50} -Werte im DPPH-Assay auf 15,2 μM messbar.

3-Hydroxy-2-pyron zeigte in allen untersuchten Testsystemen kaum Aktivität.

Tabelle 3.23 Antioxidative Kapazität von isolierten Reinsubstanzen

Substanz	DPPH	X/XO	ORAC _{ROO}
	SC_{50} [μM]	SC_{50} [μM]	[units]
3-Hydroxy-2-pyron	39,1	>50	0,9
3-Hydroxyphloretin	13,3	20,1	4,0
3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid	14,7	>50 (45)	1,8
3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid	15,2	>50 (40)	2,4

SC_{50} : halbmaximale Radikalfängeraktivität; 1 ORAC-unit entspricht dem Schutz von Fluorescein vor Radikalen durch 1 μM Trolox, n.b. nicht bestimmt.

Vergleicht man Ascorbinsäure mit dem 3-Hydroxy-2-pyron, das aus dieser bei der nicht-enzymatischen Bräunung entsteht, so stellt man durchgehend einen Verlust der Radikalfängereigenschaften fest. Die halbmaximale Radikalfängeraktivität im DPPH-Test nahm von 8,5 auf 39,1 μM ab. Die antioxidative Wirkung gegenüber Peroxylradikale verringerte sich ebenfalls von 2,0 units auf 0,9 units (Gerhäuser *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu konnte bei den 3-Hydroxyphloretin-glycosiden eine Zunahme der antioxidativen Aktivität ermittelt werden. So waren die Phloretin-glycoside, wie auch das freie Aglykon im DPPH- und X/XO-Test in den untersuchten Konzentrationen inaktiv. Dahingegen führte die zusätzliche Hydroxylgruppe zu einer halbmaximalen Radikalfängeraktivität von 13,3 bzw. 20,1 μM beim 3-Hydroxyphloretin. Eine Verknüpfung mit Glucose in Position 2' führte zu einer deutlichen Abnahme der Radikalfängeraktivität, wie sie häufig für Flavonoide beschrieben wird (Ratty *et al.* 1988, Leu *et al.* 2006). Das Verhalten gegenüber Peroxylradikale verlief uneinheitlich. Bei den Glucosiden erfolgte eine Halbierung der ORAC-Einheiten von 4,0 auf 1,8 bzw. von 3,5 auf 2,4 bei den Xyloglucosiden, beim freien Aglykon hingegen erhöhte sich der Wert von 2,1 auf 4,0 units. Die erzielten Werte sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Leu *et al.* (2006), die den SC_{50} mit 9,2 bzw. 7,7 μM im DPPH-Test und mit 25,0 bzw. 19,6 μM im X/XO-Test für das Phloretin-2'-glucosid bzw. das freie Aglykon bestimmten. Die Autoren vermuteten, dass die Katecholgruppe am B-Ring Grund für die größere antioxidative Wirkung ist, da hierdurch das Elektron des entstehenden Radikals besser delokalisiert werden kann.

3.5.3 Antiinflammatorische und antihormonelle Wirkungen

Etwa 10% aller Krebserkrankungen sollen auf chronisch-entzündliche Prozesse zurückzuführen sein. Die Entzündungsreaktionen in verletzten Geweben werden von Prostaglandinen – körpereigenen, hormonähnlichen Entzündungsmediatoren – gesteuert. Die Cyclooxygenase (COX) spielt bei Entzündungen durch Synthese der Prostaglandine aus der Arachidonsäure, die aus der Lipidschicht der Zellmembran freigesetzt wird, eine wesentliche Rolle. Neben der in konstanter Menge vorliegende COX-1 ist auch die induzierbare, in inflammatorischen und in Tumorgeweben verstärkt vorliegende Form COX-2 bekannt (DuBois *et al.* 1994, Tucker *et al.* 1999).

Prostaglandine modulieren Second-Messenger-Systeme und üben verschiedene Wirkungen im Körper aus, die zwischen den einzelnen Prostaglandinen variiert. Durch Stimulation des Zellwachstums und der Bildung neuer Blutgefäße erfüllen die Prostaglandine in der Wundheilung eine wichtige Funktion. Im Tumorgewebe werden sie als Promotoren betrachtet, da sie eine immunsuppressive und wachstumsfördernde Wirkung ausüben.

Ähnlich wie die Prostaglandine werden auch Hormone wie das 17β -Estradiol unter bestimmten Bedingungen als endogene Tumorpromotoren angesehen. Durch Bindung an den Estrogenrezeptor können diese Substanzen das Wachstum hormonabhängiger Tumorarten durch Weiterleitung von Wachstumssignalen an den Zellkern beeinflussen (Weiss und Ortmann 2002).

Die Aromatase (CYP19) ist ein Enzym der Cytochrom-P450-Familie, das die Aromatisierung von Testosteron zu Estradiol katalysiert und in Brustkrebszellen im Vergleich zu normalen Brustzellen in höherem Maße exprimiert wird. Durch Hemmung dieses Enzyms kann die Konzentration von Estrogenen im Gewebe herabgesetzt werden, was einen positiven Einfluss auf die Entwicklung von hormonabhängigem Brustkrebs haben kann (Kijima *et al.* 2006).

Die Aktivitätsbestimmung von COX-1 basiert auf der Messung der Sauerstoffmenge, die während der Umwandlung von Arachidonsäure in Prostaglandin G_2 verbraucht wird (vgl. Abbildung 3.29).

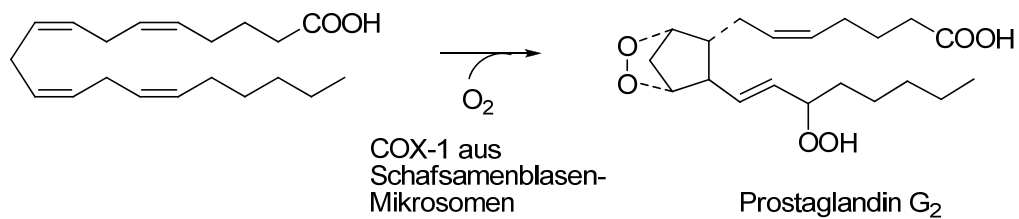


Abbildung 3.29 COX-1 katalysierte Bildung von Prostaglandin G₂ aus Arachidonsäure

Die Identifizierung potenter Aromatasehemmer erfolgte mit humaner rekombinanter Aromatase (CYP19) und dem Substrat *O*-Benzylfluoresceinbenzylester. Das Substrat wird durch die Aromatase zu Fluoresceinmonobenzylester dealkyliert, der nach alkalischer Hydrolyse fluorimetrisch bestimmt werden kann.

In Tabelle 3.24 sind die von Zeßner (2005) erzielten Ergebnisse der bisher identifizierten phenolischen Apfelinhaltsstoffe dargestellt.

Tabelle 3.24 Antiinflammatorische (COX-1-Hemmung) und antihormonelle Wirkungen (Aromatase-Hemmung) der phenolischen Apfelinhaltsstoffe nach (Zeßner 2005)

Substanz	COX-1	Aromatase
	Hemmung [%] bei 100µM	IC ₅₀ [µM]
Catechin	80	>50
(-)-Epicatechin	88	>500
Procyanidin B ₁	17	>50
Procyanidin B ₂	31	>50
Procyanidin C ₁	51	>25
Procyanidin Tetramer	42	5,2
Kaffeensäure	10	>500
Chlorogensäure	14	>500
<i>p</i> -Cumarsäure	2	>12,5
4- <i>p</i> -Cumaroylchinasäure	7	>50
Phloretin-2'-xyloglucosid	32	>50
Phloretin-2'-glucosid	32	137
Phloretin	88	20,7
Quercetin-3- <i>O</i> -glucosid	11	1,5
Quercetin-3- <i>O</i> -galactosid	11	>50
Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid	6	>50
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinosid	13	>50
Quercetin	47	2,8

IC₅₀ = halbmaximale Hemmkonzentration; Besondere Aktivitäten sind fett hervorgehoben

Die Hauptinhaltsstoffe, die phenolischen Säuren, zeigten kaum eine Hemmung der COX-1. Phloretin war in der Lage, die Aktivität der COX-1 bei einer Konzentration von 100 µM um 88% zu reduzieren. Die Konjugation mit Zuckern reduzierte diese deutliche Hemmwirkung auf weniger als die Hälfte. Die Flavan-3-ole zeigten ein bisher ungeklärtes Phänomen. So waren die Monomere im Gegensatz zu den dimeren Procyanidinen

sehr effektive COX-1-Hemmer. Bei den oligomeren Procyanidinen nahm die Hemmwirkung von den Dimeren zu den Tetrameren wieder zu.

Die Aromatase ließ sich nur durch die freien Aglykone Phloretin und Quercetin in relativ niedrigen Konzentrationen hemmen. Der molekularbiologische Mechanismus der deutlich stärkeren Aromatase-Hemmung des Quercetin-3-*O*-glucosids im Vergleich zu den übrigen Quercetinglycosiden bzw. dem Quercetin selbst ist bisher unbekannt (Pan 2006).

3.5.3.1 Apfelsaftextrakt AE04

3.5.3.1.1 Fraktionen S.1 – S.9 und dessen Subfraktionen

Im Bezug auf die anti-Tumor-promovierende Mechanismen zeigte sich eine gute Hemmung der COX-1-Aktivität durch S.5. Diese Fraktion erreichte mit einer 68%igen Hemmwirkung (bei 100 µM) eine mehr als 10fach höhere Hemmung der COX-1 als der Ursprungsextrakt (vgl. Tabelle 3.25).

Herausragende Inhibitoren der Aromatase waren die Fraktionen S.1 ($IC_{50} = 4,2 \mu\text{g/ml}$), S.5 ($IC_{50} = 3,6 \mu\text{g/ml}$) sowie die spät eluierenden Fraktionen ab S.6 ($IC_{50} \leq 2,0 \mu\text{g/ml}$)

Tabelle 3.25 Antiinflammatorische (COX-1-Hemmung) und antihormonelle Wirkungen (Aromatase-Hemmung) der AE04 Fraktionen S.1 - S.9

Substanz	COX-1	Aromatase
	Hemmung [%] bei 100 µg/ml	IC_{50} [µg/ml]
AE04	5	5,4
S.1	15	4,2
S.2	6	12,1
S.2.1	3	>50
S.2.2	11	>50
S.2.3	8	>50
S.2.4	10	>50
S.2.5	27	4,5
S.2.6	17	>50
S.3	20	23,4
S.4	14	11,6
S.5	68	3,6
S.5.2	16	34,7
S.5.3	57	36,8
S.5.4	67	>50
S.5.5	84	>50

Substanz	COX-1	Aromatase
	Hemmung [%] bei 100 µg/ml	IC ₅₀ [µg/ml]
S.5.6a	16	6,7
S.5.6b	26	7,7
S.5.7	27	3,9
S.5.8	40	1,2
S.5.9	28	2,2
S.5.10	72	3,0
S.6	30	1,1
S.6 ND	25	1,7
S.7	38	2,0
S.8	28	1,7
S.8 ND	45	1,5
S.9	38	1,4

IC₅₀ = halbmaximale Hemmkonzentration; Besondere Aktivitäten sind fett hervorgehoben

Die inhibitorische Wirkung von S.5 auf COX-1 war auf den hohen Gehalt von 65,1 mg/g Epicatechin zurückzuführen, welches nach Subfraktionierung an C18-Material wieder in den Fraktionen S.5.3 - S.5.5 zu finden war. Die gute Hemmwirkung der Subfraktion S.5.10 ließ sich mit keiner bekannten Substanz in Zusammenhang bringen.

Die Aromatase-Hemmung erfolgte im Gegensatz dazu vorwiegend durch procyanidin- und quercetinglycosidreichen Fraktionen S.1 und S.6 - S.9. Auch das freie Aglykon Quercetin scheint einen gewissen Beitrag zu leisten. Generell sind die Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den Werten, die von Zeßner (2005) bei einer vergleichbaren Auftrennung des Apfelsaftextraktes AE03B erzielt wurden.

3.5.3.1.2 Fraktionen NP.1 – NP.5

Um die niedermolekularen phenolischen Apfelextraktinhaltsstoffe von den hochmolekularen abzutrennen, ist AE04 an Kieselgel aufgetrennt worden. In der Elutionsreihenfolge stieg der DPM der enthaltenen Procyanidine an und der Anteil an niedermolekularen Phenolen nahm ab. Die Fraktionen NP.4 und NP.5 enthielten ausschließlich polymere Procyanidine mit einem DPM von 4,7 bzw. 7,9. Dies spiegelte sich auch in den Ergebnissen der Aromatase-Hemmung wieder. Hier erwiesen sich die Fraktionen NP.4 und NP.5 mit jeweils einem IC₅₀ von 7,6 bzw. 2,5 µg/ml als sehr gute Inhibitoren. Die Ergebnisse bestätigen die Vermutung von Zeßner (2005), dass die Aromatase neben

Quercetin und Quercetin-3-*O*-glucosid vorwiegend von oligomeren Procyanidinen gehemmt wird.

Die COX-1-Hemmung zeigte ein nicht so eindeutiges Bild. Eine gute Hemmwirkung wurde durch die Fraktion NP.1 erzielt. Die hierfür verantwortliche Substanz konnte bisher aber noch nicht identifiziert werden. Die Fraktion mit trimeren Procyanidinen (NP.3) war aktiver als die mit hochmolekularen (NP.5). Dies spricht gegen eine unspezifische „gerbende“ Wirkung als Mechanismus der Hemmung.

Tabelle 3.26 Antiinflammatorische (COX-1-Hemmung) und antihormonelle Wirkungen (Aromatase-Hemmung) der Fraktionen NP.1 - NP.5

Substanz	COX-1	Aromatase
	Hemmung [%] bei 100 µg/ml	IC ₅₀ [µg/ml]
AE04	5	5,4
NP.1	41	>50
NP.2	12	>50
NP.3	30	>50
NP.4	33	7,6
NP.5	11	2,5

IC₅₀ = halbmaximale Hemmkonzentration; Besondere Aktivitäten sind fett hervorgehoben

3.5.3.2 Apfelsaftextrakt AE06

Die durch Fraktionierung von AE06 an Sephadex LH20 erhaltenen Fraktionen S.31 – S.38 wurden auf ihre anti-Tumor-promovierende Eigenschaften untersucht. Hierbei erwies sich die Fraktion S.34 als ein sehr effektiver COX-1 Inhibitor (77,6% bei 100 µg/ml).

Tabelle 3.27 Antiinflammatorische (COX-1-Hemmung) und antihormonelle Wirkungen (Aromatase-Hemmung) der Fraktionen S.31 - S.38

Substanz	COX-1	Aromatase
	Hemmung [%] bei 100 µg/ml	IC ₅₀ [µg/ml]
AE06	43,3	5,0
S.31	3,1	>50
S.32	2,6	>50
S.33	24,2	25,8
S.34	77,6	4,8
S.35	25,3	1,8
S.36	33,1	2,3
S.37	30,5	1,5
S.38	38,1	1,7

IC₅₀ = halbmaximale Hemmkonzentration; Besondere Aktivitäten sind fett hervorgehoben

Die Aromatase wurde zunehmend von den Fraktionen S.34-S.38 gehemmt. All diese Fraktionen waren in der Lage, die Aktivität deutlich stärker als der Ursprungsextrakt zu hemmen.

Die Ergebnisse, die durch die AE04-Fraktionen erzielt wurden, sind dabei sehr gut reproduziert worden. Fraktion S.34 mit einem Gehalt von 105 mg/g Epicatechin hemmte die COX-1 zu 77,6% (bei 100 µg/ml).

Die procyanidinreichen Fraktionen erzielten in Übereinstimmung mit Pan (2006) und Zeßner (2005) die für oligomere Procyanidine typische Hemmung von ca. 30 – 40%. Auch die Hemmung der Aromatase erfolgte, analog zu S.1 – S.9, vorwiegend durch die procyanidinreichen Fraktionen S.34 – S.38. In S.33 ($IC_{50} = 25,8 \mu\text{g/ml}$) wurde die schwächer ausgeprägte Hemmung neben den Procyanidinen auch durch die 3-Hydroxyphloretinglycoside verursacht.

3.5.3.3 Reinsubstanzen

Die isolierten und synthetisierten Reinstoffe lieferten die in Tabelle 3.28 beschriebenen Ergebnisse. Das 3-Hydroxy-2-pyron war, wie auch die von Gerhäuser (2003) getestete Ascorbinsäure, nicht in der Lage, COX-1 oder Aromatase zu hemmen. Dahingegen erwiesen sich die 3-Hydroxyphloretinglycoside als schwache Inhibitoren sowohl von COX-1 als auch von Aromatase. 3-Hydroxyphloretin war mit einem IC_{50} -Wert von 13,4 µM ein dem Phloretin vergleichbarer COX-1-Hemmer. Eine glycosidische Bindung in Position 2' führte jedoch zu einem Verschwinden der Inhibitorwirkung. Im Gegensatz zu Phloretin und Phloretin-2'-glucosid hatten die beiden in Position 3 hydroxylierten Verbindungen 3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid und 3-Hydroxyphloretin eine nahezu gleiche Hemmwirkung auf die Aromatase. Mit einem IC_{50} -Wert von 0,94 µM erwies sich das 3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid als herausragend.

Auch Le Bail *et al.* (2001) fanden bei den untersuchten Dihydrochalkonen eine Zunahme der Aromatase-Hemmung durch Einführung einer zusätzlichen Hydroxylgruppe in Position 3. Durch kinetische Studien wies die Arbeitsgruppe um Wang (2005) eine gemischt-kompetitive Hemmung der Aromatase nach. Eine Abhängigkeit der Aromatasehemmung vom glycosidisch gebundenen Zucker ist in der Literatur bisher nur für die C-glycoside des Flavons Luteolins beschrieben (Zhao *et al.* 2008).

Tabelle 3.28 Antiinflammatorische (COX-1-Hemmung) und antihormonelle Wirkungen (Aromatase-Hemmung) der isolierten und synthetisierten Reinstoffe

Substanz	COX-1	Aromatase
	IC ₅₀ [μM]	IC ₅₀ [μM]
3-Hydroxy-2-Pyron	>100	>50
3-Hydroxyphloretin-2'-glucosid	>50	12,5
3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucosid	n.b.	0,94
3-Hydroxyphloretin	13,4	12,6

IC₅₀ = halbmaximale Hemmkonzentration; n.b. = nicht bestimmt

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität von den Firmen Sigma (Steinheim), Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe), Fluka (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Extrasynthese (Lyon, Frankreich), BD Bioscience (Heidelberg), Gruessing (Filsum), Serva (Heidelberg) und Apin Chemicals Ltd. (Abingdon, UK) bezogen. 4-*p*-Cumaroylchinasäure, Quercetin-3-*O*-xylosid, Quercetin-3-*O*-arabinosid sowie Procyanidin B₃ und B₄ wurden von Prof. Dr. Hans Becker (Saarbrücken), Procyanidin B₁ und Procyanidin B₂ von Prof. Dr. Peter Winterhalter (Braunschweig) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. 3-Kaffeoylchinasäure wurde von Kathrin Kahle (Würzburg) zur Verfügung gestellt. Lösungsmittel wurden vor der Verwendung über Füllkörperkolonnen rektifiziert. Reinstwasser wurde aus der hauseigenen Millipore™-Aufbereitungsanlage gewonnen (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Für HPLC-DAD und HPLC-MS(MS) wurden „gradient grade“-Lösungsmittel von Acros Organics (Geel, Belgien) und Merck (LiChrosolv®) verwendet. Reinstgase lieferten die Firmen Linde (Berlin) und Messer Griesheim (Frankfurt).

4.1.2 Verbrauchsmaterial

Alle Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Fisher-Scientific (Ulm) und Hartenstein (Würzburg) erworben.

4.1.3 Säulenchromatographie

4.1.3.1 Normalphasen-Säulenchromatographie (NP-SC)

Trennsäule: 35 x 5.5 cm I.D.

Füllmaterial: Kieselgel 60 (0,063 - 0,2 mm, Merck, Darmstadt)

4.1.3.2 Umkehrphasen-Säulenchromatographie (RP-SC)

Trennsäule: 35 x 1 cm I.D.
Füllmaterial: LiChrorep RP-18 (40-63 µm, Merck, Darmstadt)

4.1.4 Dünnschichtchromatographie

Stationäre Phasen: DC-Fertigplatten Kieselgel 60, F254, Schichtdicke
0.25 mm
Fließmittel: Essigsäureethylester/Ameisensäure/Essigsäure/Wasser
100/11/11/27
Sprühreagenz: Naturstoffreagenz A (1%ig in Methanol)
Polyethylenglycol 400 (5%ig in Ethanol)
Auswertung 366 nm

4.2 Geräte

4.2.1 Größenausschlusschromatographie

Pumpe: Knauer HPLC Pump 64 (Knauer, Berlin)
Injektionsventil: Niederdruck Injektionsventil mit 50ml Schleife
Trennsäule: Kronlab Eco, „Solventresist“ (2,5 x 200 cm) (Kronlab, Sinsheim)
Füllmaterial: Sephadex LH-20 (25-100 µm, Sigma-Aldrich, Steinheim)
Fließmittel: 100% Methanol
Fraktionensammler: RediFrac (Amersham Pharmacia Biotech, Wien)

4.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie-Diodenarray-Detektion (HPLC-DAD)

HPLC-System 1

Gerät: Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series (Waldbronn)
Pumpe: Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruck-
gradienten, 1100 Series (Waldbronn)

Autosampler:	Wisp 712b (Waters, Eschborn), mit automatischer Injektion
Trennsäule:	Hypersil™Gold C ₁₈ (3 µm Partikelgröße, 100 x 4,6 mm I.D.) (Thermo, Runcorn, UK)
Fließmittel:	A 0,1% Ameisensäure in Reinstwasser B Acetonitril
Fluß:	1 mL/min
Gradient:	Linear, 1-40% B in 40 min
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray, DAD, 1100 Series (Waldbronn)
Spektralbereich:	200 - 600 nm

HPLC-System 2

Gerät:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series (Waldbronn)
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Waldbronn)
Autosampler:	Wisp 712b (Waters, Eschborn), mit automatischer Injektion
Trennsäule:	Synergy Hydro RP (4 µm Partikelgröße, 250 x 4,6 mm I.D.), (Phenomenex, Aschaffenburg)
Fließmittel:	A 0,1% Ameisensäure in Reinstwasser B Acetonitril
Fluß:	1 mL/min
Gradient:	Linear, 1-40% B in 40 min
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray, DAD, 1100 Series (Waldbronn)
Spektralbereich:	200 - 600 nm

HPLC-System 3

Gerät:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Serie (Waldbronn)
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Waldbronn)
Autosampler:	Wisp 712b (Waters, Eschborn), mit automatischer Injektion
Trennsäule:	Symmetry™C ₁₈ (5 µm Partikelgröße, 150 x 3,9 mm I.D.) (Waters, Milford, USA)
Fließmittel:	A 0,1% Ameisensäure in Reinstwasser

	B Acetonitril
Fluß:	1 mL/min
Gradient:	Linear, 1-40% B in 40 min
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray, DAD, 1100 Series (Waldbronn)
Spektralbereich:	200 - 600 nm

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

4.2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie- Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

HPLC-System 4

Gerät:	Hochdruckgradientenanlage (Applied Biosystems, Bensheim)
Pumpe:	Applied Biosystems 140b Spritzenpumpe für binäre Hochdruckgradienten (Bensheim)
Autosampller:	Spark Holland Triathlon mit automatischer Injektion (Emmen, Niederlande)
Trennsäule:	Hypersil™Gold C ₁₈ (3 µm Partikelgröße, 100 x 2,0 mm I.D.) (Thermo, Runcorn, UK)
Fließmittel:	A 0,1% Ameisensäure in Wasser B Acetonitril
Fluß:	0,2 mL/min
Gradient:	Linear, 5-99% B in 40 min

HPLC-System 5

Gerät:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series (Waldbronn)
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Waldbronn)
Autosampller:	Wisp 712b (Waters, Eschborn), mit automatischer Injektion
Trennsäule:	Synergy Hydro RP (4 µm Partikelgröße, 250 x 4,6 mm I.D.), (Phenomenex, Aschaffenburg)
Fließmittel:	A 0,1% Ameisensäure in Reinstwasser

	B Acetonitril
Fluß:	1 mL/min; Split 1:4
Gradient:	Linear, 1-40% B in 40 min

Massenspektrometer

Gerät:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandem-massenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Electrospray Ionisations-Interface (ESI)
ESI-Kapillare:	desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm I.D.) (J&W, Folsom)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Eingangskapillare:	250°C
Kapillarspannung:	3,2 kV
Sheathgas:	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0 (10 Skalenteile)
Messbereich:	<i>m/z</i> 150 - 1500 (Full Scan Modus)
Kollisionsgas:	Argon 5.0, Kollisionsgasdruck 0,27 Pa (2,0 mTorr)
Kollisionsenergie:	20 bis 50 eV
Multiplierspannung:	1450 V für ESI-MS, 1750 V für ESI-MS/MS

Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit Xcalibur™ Software Version 1.2 (Thermo Electron, Dreieich).

4.2.4 Präparative Hochleistungsflüssigchromatographie

HPLC-System 6

Gerät:	Knauer Niederdruckgradientensystem (Berlin)
Pumpe:	Knauer Well Chrom K1001 (Berlin)
Injektor:	Rheodyne Six-Port Injektionsventil mit 1 mL Probenschleife
Injektionsvolumen:	0,5 mL
Trennsäule:	Eurospher-100 C ₁₈ (5 µm Partikelgröße, 250 x 8,0 mm I.D.) (Knauer, Berlin)
Fließmittel:	A 0,1% Ameisensäure in Reinstwasser B Acetonitril
Fluß:	12 mL/min

Gradient: Linear, 5-50% B in 40 min
 Detektor: Knauer UV-VIS-Detektor (Berlin), 326 nm

HPLC-System 7

Pumpen: Knauer HPLC PUMP 64
 Injektor: Rheodyne six-Port Injektionsventil mit 1 ml Probenschleife
 Detektor: Knauer UV/VIS-Spektralphotometer
 Wellenlänge: 280 nm
 Gradientenformer: Knauer HPLC Software
 Trennsäule: Eurospher-100 C₁₈ (5 µm Partikelgröße, 250 x 16 mm I.D.)
 (Knauer, Berlin)
 Fließmittel: A 0,1% Ameisensäure in Reinstwasser
 B Acetonitril
 Fluß: 12 mL/min
 Gradient: Linear, 1-30% B in 25 min

HPLC-System 8

Pumpen: Knauer HPLC PUMP 64
 Injektor: Rheodyne six-Port Injektionsventil mit 1ml Probenschleife
 Detektor: Knauer UV/VIS-Spektralphotometer
 Wellenlänge: 280 nm
 Gradientenformer: Knauer HPLC Software
 Säule: Eurospher Si 100 (5 µm Partikelgröße, 250 x 25 mm I.D.)
 Eluent A: 82% Dichlormethan, 14% Methanol, 2% Wasser, 2% Essigsäure
 Eluent B: 96% Methanol, 2% Wasser, 2% Essigsäure
 Fluß: 12 ml/min
 Gradient:

t in min	Eluent A in %	Eluent B in %
0	100	0
30	83	17
40	70	30
45	44	56
55	7	93

4.2.5 Kapillargaschromatographie (HRGC)

HRGC-MS System 1

Gerät:	Agilent 6890 GC System (Agilent Technologies, Wilmington, USA)
Injektor:	Split/Splitlessinjektor (Split 1:20) Temperatur 220°C
Autosampler:	Agilent 7683 Series Injector
Trennsäule:	J&W DB-Wax (30 m x 0.25 mm, $d_f = 0.25 \mu\text{m}$)
Trägergas:	1.0 ml/min Helium 5.0, constant flow
Kopplung:	Transferline 250°C
Temperaturprogramm:	50°C, 3 min isotherm, 4°C/min, 250°C, 10 min isotherm
Massenspektrometer:	Agilent 5973 Mass Selective Detector MSD (Agilent Technologies, Wilmington, USA)
Ionenquelle	Elektronenstoßionisation (EI) mit 70 eV
Quellendruck	$1 \cdot 10^{-5}$ mbar
Kathodenstrom	1,5 mA
Messbereich	m/z 39-450

Die Daten wurden mit HP Chemstation aufgezeichnet. Nach Konvertierung der Chromatogramme mit File Converter erfolgte die Datenauswertung mit „Xcalibur“ der Firma Fisons Instruments, sowie der Massenspektrum-Datenbank des National Institutes of Standards in Technology (NIST) und der lehrstuhleigenen Datenbank

HRGC-MS System 2

Model:	Fisons Instruments GC 8060 (ThermoElectron, Dreieich)
Injektor:	Split/Splitlessinjektor (Split 1:20) Temperatur 250°C
Autosampler:	Fisons Instruments AS 800
Trennsäule:	J&W DB-1 (30m x 0,25 mm, $d_f = 0,25\mu\text{m}$)
Trägergas:	1,5 ml/min; Helium 5.0, constant pressure
Kopplung:	Transferline 320°C
Temperaturprogramm:	60°C, 1min isotherm, 5°C/min, 320°C, 5min isotherm
Massenspektrometer:	Fisons Instruments MD 800 (ThermoElectron, Dreieich)

Ionenquelle:	Elektronenstoßionisation (EI) mit 70 eV
Quellendruck:	$1 \cdot 10^{-5}$ mbar
Kathodenstrom:	1,5 mA
Messbereich:	m/z 39-450

Die Chromatogramme wurden mit Xcalibur[®] der Firma Fisons Instruments aufgezeichnet. Die Datenauswertung erfolgte mit „Xcalibur“, sowie der Massenspektrum-Datenbank des National Institutes of Standards in Technology (NIST) und der lehrstuhleigenen Datenbank.

HRGC-MS System 3

Gerät:	Fisons Instruments GC 8060 (ThermoElectron, Dreieich)
Injektor:	Split/Splitlessinjektor (Split 1:20) Temperatur 250°C
Autosampler:	Fisons Instruments AS 800
Trennsäule:	J&W DB-1 (30m x 0,25 mm, $d_f = 0,25 \mu\text{m}$)
Trärgas:	1,5 ml/min; Helium 5.0, constant pressure
Kopplung:	Transferline 320°C
Temperaturprogramm:	80°C, 1 min isotherm, 10°C/min, 200°C, 1 min isotherm, 3°C/min, 320°C, 15 min isotherm
Massenspektrometer:	Fisons Instruments MD 800 (ThermoElectron, Dreieich)
Ionenquelle:	Elektronenstoßionisation (EI) mit 70 eV
Quellendruck:	$1 \cdot 10^{-5}$ mbar
Kathodenstrom:	1,5 mA
Messbereich:	m/z 39-650

4.2.6 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Gerät 1:	Bruker Avance 400 MHz Spektrometer (Rheinstetten)
Gerät 2:	Bruker DMX600 Spektrometer mit Kryoprobekopf (Rheinstetten)
Lösungsmittel:	Dimethylsulfoxid- d_6 (99,8% D), Methanol- d_4 (99,8% D), Dichlormethan- d_2 (99,8% D)

Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit Bruker 1D WINNMR Software (Rheinstetten).

4.2.7 Sonstige Geräte

Lyophilisator:	Christ Alpha1-4; 0,1 mbar (Christ, Osterode)
Magnetrührer:	IKAMAG® RH (IKA Labortechnik, Staufen)
Photometer:	Spectronic Genesys™ 2 PC UV-VIS-Spectrophotometer (Spectronic Instruments, NY, USA)
Rotavapor:	Büchi Vakuum System B-173, Vakuum Controller B-720, Büchi-Rotavapor (Konstanz)
Trockenschrank:	Memmert, Modell 400 (Schwabach)
Ultraschallbad:	Branson 1210 (G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd)
Vortexer:	Vortex Genie (Scientific Industries, NY, USA)
Waagen:	Mettler PL 300 Analysenwaage (Mettler-Toledo, Gießen) Mettler AT 21 Comparator (Mettler-Toledo, Gießen) Sartorius BP 210 S Analysenwaage (Sartorius AG, Göttingen)
Wasserbad:	Heidolph Instruments (Schwabach)
Kühlzentrifuge:	Typ Universal 16R, Rotor 1616 & 1614 (Hettich, Tuttlingen)

4.3 Methoden

4.3.1 Apfelsäfte

Alle Säfte wurden im großtechnischen Maßstab an der Forschungsanstalt Geißenheim produziert.

4.3.1.1 AS05 (klar und trüb)

Die Grundlage für den Saft bildeten die Mostapfelsorten Bittenfelder (10%), Bohnapfel, (23%), Seestermüher (25%) und Börtlinger Weinapfel (18%) sowie die Tafelapfelsorte Topaz (24%). Die verschiedenen Apfelsorten der Ernte 2005 stammten vom Fachgebiet

Obstbau der FA Geisenheim bzw. wurden von Produzenten aus dem Bundesgebiet zugekauft.

Die Apfelsäfte wurden zunächst sortenrein hergestellt. Die Äpfel wurden mit einer Schneidmühle (Seepex) gemahlen. Anschließend wurde die Maische in einer Horizontalpresse (Bucher HP-L 200) abgepresst. In den ablaufenden trüben Saft wurde zum Schutz vor Oxidation 200mg/l Ascorbinsäure dosiert. Im Anschluss wurde separiert (Westfalia Tellerseparator SAR 3036). Die naturtrüben Säfte wurden nach einer Kurzzeiterhitzung (85°C, 30-40 s) in Edelstahltanks eingelagert. Anschließend erfolgten der Verschnitt und die Heißfüllung (85°C) in 0,7 l Schlegelflaschen des „AS05 trüb“. Da die zum Zeitpunkt der Produktion dosierte Ascorbinsäure verbraucht war, wurden abermals 300 mg/l zugegeben.

Zur Erhaltung des klaren Saftes „AS05 klar“ wurden 500 l des naturtrüben Saftes mit 50 ml/t Fructozym P (Erbslöh, Geisenheim) versetzt. Die Schönung erfolgte anschließend durch Zusatz von 8 g/hl Gelatine, 40 ml/hl Kieselsol und 50 g/hl Bentonit. Nach anschließender Separation und Schichtenfiltration (Beco KD, Begerow) wurde der Klarsaft erhalten. Auch hier erfolgte die Heißfüllung (85°C) in 0,7 l Schlegelflaschen.

4.3.1.2 AS06 (klar und trüb)

Zur Herstellung des AS06 wurden die Mostapfelsorten Bohnapfel (10%), Maunzen (45%) und Winterrambour (10%) sowie gemischte Tafeläpfel (35%) verwendet. Die Mostäpfel wurden bei einem Produzenten im Glantal (westliche Rheinland-Pfalz) eingekauft. Das Tafelobst stammte aus der VOG Ingeheim/Rhein. Die naturtrüben Apfelsäfte wurden zunächst sortenrein analog der unter Kapitel 4.3.1.1 dargestellten Methode hergestellt. Aus 1500 l des verschnitten naturtrüben Saftes „AS06 trüb“, wurde nach Enzymierung (50 ml/t Fructozym, Erbslöh Geisenheim), kombinierter Schönung (10 g/hl Gelatine, 40 ml/hl Kieselsol, 50 g/hl Bentonit) anschließender Separation und Cross-Flow Filtration (Seitz Mikro) der Klarsaft „AS06 klar“ hergestellt.

4.3.1.3 AS07 (klar und trüb)

Für den Apfelsaft AS07 wurde nach der Herstellung der einzeln sortenreinen Säfte die folgende Zusammensetzung gewählt: 48% Bittenfelder, 26% Brettacher, 11% Braeburn,

8% Jonagold, 7% gemischtes Mostobst von Streuobstwiesen um Geisenheim. Es handelt sich hierbei bis auf die Sorten Braeburn und Jonagold um Mostobstsorten. Die Apfelsäfte wurden zunächst sortenrein analog zum AS05 hergestellt. Aus 400 l des naturtrüben Saftes wurde nach Enzymierung (50 ml/t Fructozym, Erbslöh Geisenheim), kombinierter Schönung (10 g/hl Gelatine, 40 ml/hl Kieselsol, 50 g/hl Bentonit) und anschließender Separation und Schichtenfiltration ein Klarsaft hergestellt.

4.3.1.4 Kommerzieller Apfelsaft

Der kommerziell erhältliche naturtrübe Apfelsaft wurde von einem lokalen Supermarkt bezogen.

4.3.2 Herstellung Polyphenolreiche Apfelsaftextrakte

Die Extrakte AE02, AE03B, AE04, AE06 klar, AE07 trüb sowie die sortenreinen Extrakte wurden im großtechnischen Maßstab an der Forschungsanstalt Geisenheim hergestellt. Die Extrakte AE05 klar, AE05 trüb, AE06 trüb, AE07 klar sowie der Extrakt des kommerziellen Apfelsaftes wurden im Labormaßstab hergestellt.

4.3.2.1 AE02

Ausgangsmaterial des AE02 Apfelsaftextraktes waren verschiedene Apfelsorten der Ernte 2002. Im Detail handelte es sich um gemischtes Tafelobst (20%), Topaz (25%), Bohnapfel (17,5%), Winterrambur (22,5%) und Bittenfelder (15%). Die Äpfel stammten vom Fachgebiet Obstbau der Forschungsanstalt Geisenheim sowie Produzenten aus deren Umgebung. Zunächst wurde aus diesen Äpfeln mit Hilfe einer Hammermühle und einer Horizontalpresse ein Apfelsaft hergestellt. Danach wurde der Saft über einen Separator der Firma Westfalia separiert. Zur Klärung wurde der naturtrübe Apfelsaft durch Zugabe von 50 g/t Pectinix 3XL (Novoenzymes, Mainz), einem enzymatischen Pektinabbau bis zum negativen Pektintest unterzogen. Danach folgte eine Schönung mit Gelatine/Kieselsol und eine Cross-Flow-Mikrofiltration (Seitz) mit der Ausschlussgrenze von 0,2 µm. Die Extraktion der Polyphenole erfolgte über das Adsorberharz XAD 16HP (Rohm und Haas, Philadelphia; USA). 5 l des Harzes wurden in eine Chromatographie-

säule der Marke Pharmacia BPG 100 (100 x 10 cm) gepackt. Das Harz wurde mit 10 Bettvolumen destilliertem Wasser gespült, bevor 100 l des Saftes AS02 mit einer Geschwindigkeit von 10 Bettvolumen / h mit Hilfe einer Schlauchpumpe aufgegeben wurden. Zucker, organische Säuren und Mineralien wurden durch Spülung mit 6 Bettvolumen destilliertem Wasser entfernt. Die adsorbierten Polyphenole wurden durch Elution mit 3 Bettvolumen 96%-igem Ethanol von dem Harz abgelöst und durch Einengung des alkoholischen Extrakts am Rotationsverdampfer in die wässrige Phase überführt. Anschließend erfolgte die Gefriertrocknung des Polyphenolextraktes. Aus 100 l wurden 65 g polyphenolreicher Extrakt erhalten.

4.3.2.2 AE03B aus Tresterextraktionssaft

Für die Produktion des Saftes, der zur Extraktgewinnung verwendet wurde, sind die Tafelapfelsorten Melrose, Granny Smith, Golden Delicious und Jonagold der Ernte 2003 ausgewählt worden. Bei den Äpfeln handelte sich um ausgesonderte Kühlhausware.

Durch die enzymatische Aufarbeitung des Pressrückstandes (Trester) mit Pektinasen und Zellulasen werden Zellmembrane aufgebrochen und es kann ein so genannter B-Saft mit einem signifikant erhöhten Anteil an Quercetinderivaten und Dihydrochalkonen gewonnen werden. Zur Herstellung des Extraktes wurden 1200 kg der oben genannten Äpfel mit Hilfe einer Schneidmühle (Seepex, Birmingham; GB) gemahlen und einer Bandpresse (Flottweg, Vilsbiburg) entsaftet. Dieser sogenannte A-Saft wurde verworfen und bei der Herstellung des Extraktes nicht berücksichtigt. Die Herstellung des Tresterextraktionssaftes, des so genannten B-Saftes, erfolgte durch Enzymierung von 500 kg Trester mit Pektinasen und Cellulasen nach Zugabe von 500 l entmineralisiertem Wasser. Es wurden jeweils 300 g/t des Pektinasepräparates Rohapect MA-1 sowie der Cellulasepräparate Rohapect AF2 und Rohament CL (AB Enzymes, Darmstadt) zugesetzt. Die Tresterenzymierung wurde über 2 h in einem temperierbaren Maischetank bei 50°C unter kontinuierlichem Rühren durchgeführt. Die Entsaftung erfolgte mittels Dekanter (Flottweg, Vilsbiburg) mit nachgeschaltetem Separator (Westfalia, Hagen).

Die Adsorption der Polyphenole erfolgte im Pilotmaßstab an einer Adsorberanlage der Firma Bucher-Guyer (Niederweningen, Schweiz). Die Adsorbersäule der Anlage (200 x 30 cm, Edelstahl) war mit 55 l Adsorberharz (P-495, Bucher-Alimentech, Neuseeland) gefüllt. Vor dem Einsatz wurde das Harz mit 4 Bettvolumen 2%-iger, heißer

Natronlauge gereinigt. Vor der Aufgabe des Saftes wurde mit Citronensäure neutralisiert und mit demineralisiertem Wasser gespült, bis das Spülwasser klar, farb-, geruch- und geschmacklos war. Der Adsorber wurde über eine integrierte Kreiselpumpe mit 550 l Tresterextraktionsaft beschickt und nach Aufgabe mit 200 l demineralisiertem Wasser gespült. Zur Elution der Phenole mit 1 Bettvolumen 96%-igem Ethanol wurde eine externe, explosionsgeschützte Zahnradpumpe angeschlossen. Das polyphenolhaltige, ethanolische Eluat wurde analog zur oben beschriebenen Methode durch schonendes Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum aufkonzentriert, in die wässrige Phase überführt und anschließend gefriergetrocknet. Aus 550 l B-Saft (Tresterextraktionsaft) wurden 260 g Polyphenolextrakt AE03B gewonnen.

4.3.2.3 AE04

Zur Herstellung des Extraktes wurden verschiedene Apfelsäfte des Erntejahres 2002 verwendet. Im Detail waren dies ein klarer Mischsaft, ein Tresterextraktionsaft, sowie naturtrübe Säfte der Sorten Schafsnase, Bohnapfel und Winterrambour.

Es wurden 250 l des klaren Apfelsaftes AS02 (Herstellung siehe Kapitel 4.3.2.1), 50 l Tresterextraktionsaft und jeweils 200 l der naturtrüben Mostapfelsäfte aus den Sorten Schafsnase, Bohnapfel und Winterrambour gemischt. Aus den resultierenden 900 l Saft wurde wie in Kapitel 4.3.2.2 beschrieben ein polyphenolangereicherter Extrakt hergestellt, dessen Ausbeute 824 g betrug.

4.3.2.4 AE05

Zur Aufkonzentrierung der Polyphenole wurden 200 ml des Adsorberharzes P-495 (Bucher-Alimentech, Neuseeland) in eine Glassäule (60 x 2,5 mm) gefüllt und diese mit 2-3 BV Reinstwasser gespült. Anschließend wurde der Saft auf die Säule aufgebracht und Zucker, Fruchtsäuren und Mineralstoffe durch Spülen mit Reinstwasser (2 BV) entfernt. Anschließend wurden die Polyphenole durch Ethanol (96 vol.%) eluiert. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum schonend abgezogen, der Rückstand in die wässrige Phase überführt und gefriergetrocknet. Die Extraktausbeute betrug für den klaren Saft 0,59 g/l und für den trüben Saft 0,76 g/l.

4.3.2.5 AE06

Der Polyphenolextrakt AE06 wurde aus 300 l des AS06 klar nach der oben beschriebenen Methode (4.3.2.2) hergestellt. Die Ausbeute betrug 301 g

Der Polyphenolextrakt AE06 trüb wurde im Labormaßstab aus 1,5 l des AS06 trüb hergestellt. Die Methode ist unter Kapitel 4.3.2.4 näher beschrieben. Die Ausbeute betrug 1,3 g.

4.3.2.6 AE07

Der Polyphenolextrakt AE07 trüb wurde aus 110 l des AS07 trüb nach der oben beschriebenen Methode (s. 4.3.2.2) hergestellt. Als Adsorberharz diente SP70. Die Ausbeute betrug 0,9 g/l

Der Polyphenolextrakt AE07 klar wurde im Labormaßstab analog dem Extrakt aus trübem Saft aus 1,5 l des AS07klar hergestellt. Die Methode ist unter Kapitel 4.3.2.4 näher beschrieben. Die Ausbeute betrug 1,0 g/l

4.3.2.7 Sortenreine Extrakte

Für die Herstellung der sortenreinen Extrakte Bittenfelder und Bohnapfel wurden aus den jeweiligen Apfelsorten wie unter Kapitel 4.3.1.1 beschrieben ein trüber bzw. klarer Saft hergestellt. Die Adsorption der Polyphenole erfolgte im Labormaßstab mit einer Adsorbersäule (30 x 5 cm, Pharmacia XK), die mit 200 ml Adsorberharz (Sepabeads SP70, Resinion Milano) gefüllt war. Die Säule wurde mit 2-3 BV destilliertem Wasser gespült (Fluß = 10 BV/h). Nach Zentrifugation der naturtrüben bzw. der geklärten Säfte wurden jeweils 2 l auf die Säule gegeben. Zur Entfernung der Zucker, organischen Säuren und Mineralien wurde das Adsorberharz erneut mit 500 ml destillierten Wasser gespült. Die Elution der phenolischen Apfelinhaltsstoffe erfolgte mit Ethanol (5 BV/h). Das braune bis hellgelbe Eluat wurde gesammelt, das Lösungsmittel im Vakuum schonend abgezogen und nach Überführung in die wässrige Phase lyophilisiert. Die Ausbeuten sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 4.1 Ausbeute an Apfelsaftextrakten nach SP70-Adsorberharzbehandlung

Apfelsaft	Ausbeute
Bittenfelder trüb	1,17 g/l
Bittenfelder klar	1,35 g/l
Bohnapfel klar	1,55 g/l
Bohnapfel trüb	1,53 g/l

4.3.3 Analytik

4.3.3.1 Probenvorbereitung für die HPLC

Die klaren Säfte wurden direkt, die naturtrüben Apfelsäfte wurden nach Filtration (Rotilabo Spritzenfilter PVDF, 0,45 µm Porengröße, Roth, Karlsruhe) zur HPLC-Analyse eingesetzt.

Zur Analyse der Polyphenole in den Apfelextrakten wurden ca. 2 mg exakt eingewogen und in 1 ml Methanol gelöst. Die Lösung wurde direkt zur HPLC-Analyse eingesetzt.

4.3.3.2 Probenvorbereitung GC-MS

4.3.3.2.1 Höhersiedende Substanzen

Um die flüchtigen Inhaltsstoffe der Apfelsäfte zu extrahieren wurden jeweils 100-200 g der Säfte exakt eingewogen und mit 100 µg 2-Methyl-1-Pentanol (Interner Standard), in 100 µl Ethanol, versetzt. Zur Analyse der Extrakte wurden jeweils 100-200 mg der Säfte exakt eingewogen, in ca. 20ml Reinstwasser gelöst und mit 100 µg 2-Methyl-1-Pentanol (Interner Standard), in 100 µl Ethanol, versetzt. Anschließend wurde die Probe erschöpfend mit Diethylether extrahiert. Die vereinigten etherischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel schonend im Vakuum bei 35°C entfernt. Der Rückstand wurde in 1 ml Ether aufgenommen und mittels GC-MS (s. 4.2.5, HRGC-MS-System 1) vermessen.

4.3.3.2.2 Di-(2-ethylhexyl)-phthalat in Apfelsäften

Zur Quantifizierung der Kontaminante Di-(2-Ethylhexyl)-phthalat in den Apfelsäften wurden 100-200 g der Säfte exakt eingewogen und mit 100 µg Dimethylphthalat (Inter-

ner Standard), in 100 µl Methanol, versetzt und erschöpfend mit Dichlormethan extrahiert. Zur Quantifizierung der Kontaminante Di-(2-ethylhexyl)-phthalat in den Apfelsaftextrakten wurden 100-200 mg der Extrakte exakt eingewogen, in ca. 20 ml Reinstwasser gelöst und mit 100 µg Dimethylphthalat (Interner Standard), in 100 µl Methanol, versetzt und ebenfalls erschöpfend mit Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel schonend im Vakuum bei 35°C entfernt. Der Rückstand wurde in 1 ml Dichlormethan aufgenommen und zur GC-MS Analyse (s. 4.2.5, HRGC-MS System 2) verwendet. Um eine Kontamination durch die verwendeten Pipetten oder Lösungsmittel auszuschließen wurde eine Kontrolle mit Reinstwasser analog der Proben extrahiert und mit GC-MS (s. 4.2.5, HRGC-MS System 2) analysiert.

4.3.3.2.3 Triterpenanalytik von Fraktion S.2.6

Die Aufarbeitung und die Aufreinigung der Fraktion erfolgte mit Hilfe der Anionen-Austausch Festphasenextraktion.

Probenaufreinigung

SAX-Kartusche (isolute SPE columns; 100 mg SAX 1m1)

Aktivierung des Sorptionsmittels: 1. 4ml CH₃OH

2. 12 ml HCO₃NH₄, pH 7.95, 50 mM

3. 2 ml CH₃OH/HCO₃NH₄, pH 7.95, 50 mM 85/15

Probendurchfluss: 3ml CH₃OH/HCO₃NH₄, pH 7.95, 50 mM 85/15

Elutionsvorgang: 1. 4ml CH₃OH (verworfen)

2. 4ml CH₃OH/CH₃COOH·NH₃, pH 3.7, 100mM
85/15

Nach dem Elutionsvorgang wurden die Proben mit Stickstoff auf ca. 100 µl eingeblasen, in 1,5 ml-GC-Vials (mit 300 µl Einsatz) überführt und mit je 100 µl C₁₅-Alkan-Standard und N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid versetzt und bei 80°C für 20 min. erhitzt und im Anschluss mit HRGC-MS System 3 analysiert. Die Identifizierung der Corosolsäure erfolgte anhand des charakteristischen Massenspektrums (m/z 320(7), 281(5), 207(17), 203 (54), 202(32) 190(15), 189(22). 129(17), 73 (100)).

4.3.3.3 Analytik der Polyphenole in Apfelsäften und Apfelextrakten

4.3.3.3.1 Kalibriergeraden

Zur Erstellung der Kalibriergeraden für die einzelnen Flavonoid-Referenzen wurden von den käuflich erwerbbaaren Flavonoiden jeweils 10 mg Substanz auf 1 µg genau in einen 100 ml Messkolben eingewogen und dieser mit Methanol aufgefüllt (entspricht 0,1 mg/ml). Von den aus Apfelsaft isolierten Substanzen Quercetin-3-*O*-xylosid, Quercetin-3-*O*-arabinosid, Phloretin-2'-*O*-xyloglucosid, 4-*p*-Coumaroylchinasäure sowie den Procyanidinen B₁ bis B₄ wurden je 1 mg genau eingewogen und mit Methanol in einem 10 ml Messkolben gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurden die weiteren Verdünnungen durch entsprechende Zugabe von Methanol hergestellt (Verdünnungen: 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/50, 1/100). Als Standard wurde 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure in einer Konzentration von 0,05 mg/ml Methanol verwendet. Die Stammlösungen sowie die Verdünnungen wurden mit der Standardlösung im Verhältnis 1:1 verdünnt und mittels HPLC-DAD (Kapitel 4.2.2, System 1 und 2) vermessen. Die Detektion der Dihydrochalkone und Flavan-3-ole erfolgte bei 280 nm, die der Hydroxyzimtsäuren bei 320 nm, die der Flavonole bei 360 nm und die des Standards 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure bei 308 nm. Die Kalibriergeraden wurden durch Auftragen des Konzentrationsverhältnisses $c_{\text{Polyphenol}}/c_{\text{Standard}}$ gegen das Flächenverhältnis $a_{\text{Polyphenol}}/a_{\text{Standard}}$ erstellt. Die Bestimmungsgrenzen der Flavonoide wurden zwischen 0,39 und 0,93 µg/ml ermittelt. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden für die einzelnen Substanzen ermittelt und lagen zwischen 0,20 und 0,75 mg/l bzw. zwischen 0,39 und 0,93 mg/l. Die Nachweisgrenze ist die Konzentration, die mit dem Analyseverfahren gerade noch detektiert werden kann. Hierbei geht man von einem Signal/Rausch-Verhältnis von 3:1 aus (Coleman *et al.* 2001). Die Bestimmungsgrenze beträgt den doppelten Wert der Nachweisgrenze und legt die Konzentration fest, die noch reproduzierbar quantifiziert werden kann (Hädrich und Vogelsang 1996).

4.3.3.3.2 Identifizierung und Quantifizierung

Die Identifizierung der einzelnen Apfelpolyphenole erfolgte mittels HPLC-DAD anhand des Vergleiches der Retentionszeiten und UV-Spektren der Probenmoleküle mit denen authentischer Referenzverbindungen. Hierbei wurden je dreimal 100 µl filtrierte

Probenlösung mit dem Standard 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure ($c = 0,05 \text{ mg/ml}$ Methanol) im Verhältnis 1:1 versetzt und mittels HPLC-DAD (Kapitel 4.2.2, für AE04 Subfraktionen System 1, für die übrigen Proben System 2) vermessen (Injektionsvolumen $25 \mu\text{l}$). Des Weiteren wurden zur Identifizierung HPLC-ESI-MS/MS-Untersuchungen im negativen Modus durchgeführt. Hierfür wurden je $25 \mu\text{l}$ der filtrierten Probenlösungen direkt injiziert (Kapitel 4.2.2, HPLC-System 4 bzw. System 5). Die Molekülmassen sowie Ionenspektren der Substanzen wurden mit denen von authentischen Referenzverbindungen verglichen.

Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC-DAD, die Auswertung der einzelnen Substanzen erfolgte anhand der entsprechenden Kalibriergeraden (s.4.3.3.3.1) in mg/l .

4.3.3.4 Analytik nicht-phenolischer Substanzen in Apfelsäften und Apfelsaftextrakten

Die Identifizierung der analysierten Verbindungen erfolgte mit Hilfe authentischer Referenzsubstanzen und Retentionszeitenvergleich sowie zusätzlich durch Vergleich der jeweiligen Massenspektren. Soweit nicht anders angegeben, wurde anhand der Peakfläche des internen Standards in Bezug auf die Peakfläche des Analyten die Konzentration des Analyten ermittelt. Es wurde die gesamte Peakfläche des Totalionenchromatogramms berücksichtigt.

4.3.3.5 Bestimmung des Gesamtprocyanidingehaltes (TPC)

Für die Bestimmung des Gesamtprocyanidingehaltes wurde der von Swain und Hillis (1959) entwickelte, in modifizierter Form, HCl-Butanol-Assay verwendet. Die Apfelsäfte wurden zuerst lyophilisiert und anschließend in trockenem Methanol wieder aufgenommen. Die Apfelextrakte wurden direkt in Methanol ($1\text{-}2 \text{ mg/ml}$) gelöst $100 \mu\text{l}$ der Lösung wurden mit $1,4 \text{ ml}$ 1-Butanol:HCl-Lösung (95:5; v:v) vermischt und für 2 h bei 95°C erhitzt. Anschließend wurde die Absorption bei 555nm an einem Photometer bestimmt. Zur Quantifizierung wurde eine Procyanidin-Mischung (Tetramere B-Procyanidine) eingesetzt, welche nach Sudjaroen *et al.* (2005) mit präparativer HPLC (HPLC-System 8) aus einem Tamarindensamenextrakt isoliert wurden.

4.3.3.6 Bestimmung des mittleren Polymerisationsgrades (DPm)

Die Ermittlung des mittleren Polymerisationsgrades der Procyanidine erfolgte mittels Thiolyse. Die verwendete Methode wurde nach Guyot *et al.* (2001) modifiziert. 200 µl einer methanolischen Apfelextraktlösung (2 mg/ml) wurden mit 400 µl Thiolyse-reagenz (5% Benzylmercaptan; 1,1% HCl_{konz} in Methanol) und gut verschlossen. Zur Bestimmung des DPm der Procyanidine im Saft wurde dieser direkt eingesetzt. Die Reaktionsmischung wird 30 min bei 60°C in einem Heizblock erhitzt um eine vollständige Spaltung der polymeren Procyanidine zu gewährleisten. Anschließend wird die Mischung auf Raumtemperatur heruntergekühlt und bis zur HPLC-Analyse (HPLC-System 3) bei -24°C gelagert um Nebenreaktionen und Umlagerungen zu minimieren. Die Retentionszeiten der Thiolyseprodukte Catechinbenzylthioether und Epicatechinbenzylthioether wurden durch Umsetzung einer Mischung der Procyanidine B₁, B₂, B₃ und B₄ bestimmt. Die Bestimmung des DPm erfolgte unter Zuhilfenahme folgender Formel:

$$\overline{DPm} = \frac{(+)-CatechinSH + (-)-EpicatechinSH}{(+)-Catechin + (-)-Epicatechin - ((+)-Catechin(blind) + (-)-Epicatechin(blind))}$$

Um eine Verfälschung des DPm der Procyanidine durch den unterschiedlichen Gehalt an Flavan-3-olen zu verhindern, wurde deren Gehalt in den Extrakten bestimmt und vom Gehalt in der Reaktionsmischung abgezogen. Während der Reaktion kann eine Umwandlung von (+)-Catechin in (-)-Catechin und (+/-)-Epicatechin sowie die Umwandlung von (-)-Epicatechin zu (+)-Epicatechin und (+/-)-Catechin eintreten (Guyot *et al.* 2001).

4.3.4 Fraktionierung

4.3.4.1 Fraktionierung an Sephadex LH-20

Die Säulenchromatographie erfolgte an Sephadex LH-20 (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Die Trennung wurde an einer geschlossenen Mitteldruckglassäule mit einem definierten Fluß von 3 ml/min durchgeführt (s. 4.2.1). Hierfür wurde eine Glassäule ECO, mit gequollenem Sephadex LH-20 befüllt und vor der Trennung mit 2-3 BV Methanol gespült. Vor der Aufgabe der Probe auf die Säule wurde die Probe in dem jeweiligen

Fließmittel gelöst. Die Aufgabe der Proben auf das Gelbett erfolgte über Injektion der Probenlösung in ein Rheodyne Niederdruckinjektionsventil, an das eine 50-ml-Probenschleife angeschlossen war. Das Eluat wurde jeweils durch einen zeitgesteuerten Fraktionssammler in Fraktionen, die 9 ml umfassten eingeteilt. Nach abgeschlossener Trennung erfolgte die Regeneration des Säulenmaterials mit wässrigem Aceton (90:10, v:v). Die hierbei eluierten Substanzen wurden ebenfalls gesammelt. Nach der Untersuchung aller Reagenzglasfraktionen mittels Dünnschichtchromatographie (s. 4.1.4) auf ihre Inhaltsstoffe hin wurden die geeigneten Reagenzglasfraktionen zu den Subfraktionen S.1 - S.9 (AE04) bzw. S.31 - S.38 (AE06) vereinigt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum bei 35°C schonend entfernt und die Rückstände in die wässrige Phase überführt und gefriergetrocknet.

4.3.4.2 Fraktionierung von AE04 an Kieselgel

Ungefähr 400 mg des Apfelsaftextraktes AE04 (siehe Kapitel 4.3.4.2) werden eingewogen und in 1 ml destilliertem Methanol gelöst, gegebenenfalls für 2-3 min mit Ultraschall behandelt. Jeweils ca. 80-100 µl werden mit HPLC-System 8 aufgetrennt. Anhand des Chromatogramms wird die Probe in 5 Fraktionen (NP.1-NP.5) unterteilt. Anschließend wird das Lösungsmittel schonend im Vakuum abgezogen, der Rückstand in Millipore-Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die getrockneten Substanzen werden gewogen und in Schraubdeckelgläsern abgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -24°C gelagert.

4.3.4.3 Fraktionierung der Sephadexfraktion S.5 an C18-Material

Die Trennung der Fraktion S.5 erfolgt an einer mit RP-18 Material gefüllten Glassäule (s.4.1.3.2) mit eingeschmolzener Fritte. Das Trennmittel wurde mit Acetonitril angeschlämmt und in die Säule gefüllt. Anschließend wurde die Säule mit wässriger Ameisensäure (0,1%) konditioniert. Um einen Fluss von ca. 1 ml/min zu erreichen wurde ein konstanter Stickstoffdruck angelegt.

Von der Sephadexfraktion S.5 wurde 402,7 mg in 2 ml Fließmittel gelöst und auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde in 410 5 ml-Fraktionen gesammelt und der Acetonitrilanteil des Fließmittels in 2%-Schritten erhöht. Ab Fraktion 411 wird mit reinem Aceto-

nitril eluiert, ab Fraktion 461 mit 100%igem Methanol gespült. Nach abgeschlossener Trennung wird die Säule wieder mit 0,1%iger Ameisensäure konditioniert.

Die gesammelten Fraktionen werden eingefroren und anschließend gefriergetrocknet.

Jede 5. Fraktion wurde in 0,5 ml 50%igem Methanol gelöst und mit der HPLC (s.4.2.2, HPLC-System 1) vermessen. Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung wurden zu den S.5 Subfraktionen S.5.1 bis S.5.10 vereinigt.

Zur Isolierung von Reinstoffen wurden die Fraktionen S.5.6 und S.5.7 mittels präparativer RP-HPLC (HPLC-System 6) aufgereinigt. Die UV-Detektion erfolgte bei 280nm.

4.3.4.4 Fraktionierung der Sephadexfraktion S.2 an Kieselgel

Ungefähr 400 mg der aus dem AE04 gewonnenen Fraktion S.2 (siehe Kapitel 4.3.4.2) werden eingewogen und in 1 ml destilliertem Methanol gelöst, gegebenenfalls für 2-3 min mit Ultraschall behandelt. Jeweils ca. 80-100 µl werden mit HPLC-System 8 aufgetrennt. Anhand des Chromatogramms wird die Probe in sechs Fraktionen (S.2.1-S.2.6) unterteilt. In einem späteren Trennschritt werden aus den Subfraktion S.2.1 und S.2.6 mit der gleichen Trennmethode in die Subfraktionen S.2.1a und S.2.1b bzw. S.2.6a, S.2.6b und S.2.6c erhalten. Anschließend wird das Lösungsmittel schonend im Vakuum abgezogen, der Rückstand in Millipore-Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Die getrockneten Substanzen werden gewogen und in Schraubdeckelgläschen abgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -24°C gelagert.

4.3.5 Isolierung

4.3.5.1 Dihydrochalkone

4.3.5.1.1 Phloretin-2',4'-diglucosid

Zur Isolierung von Phloretin-2',4'-diglucosid wurde die Fraktion S.33 (vgl. Kapitel 4.3.4.1), welche durch Fraktionierung des AE06 an Sephadex LH-20-Material erhalten wurde, zuerst mittels präparativer NP-HPLC (HPLC-Methode 8) aufgetrennt. Hierbei erhielt man vier Fraktionen (S.33.1-S.33.4). Aus den Fraktion S.33.3 und S.33.4 konnte durch fraktionierte Trennung mittels präparativer HPLC (HPLC-System 7) 2,5 mg Sub-

stanz gewonnen werden. Die erhaltenen Daten stimmten mit Ausnahme des zusätzlichen Zuckerrestes mit denen von Lu et al. (1997) für Phloretin-2'-glucosid publizierten Daten überein.

4.3.5.1.2 Phloretin-2'-xyloglucosid

Zur Isolierung von Phloretin-2'-xyloglucosid wurde AE04 zuerst mittels präparativer NP-HPLC (HPLC-System 8) (NP.1-NP.5) (vgl. 3.2.1.2) mit dem Ziel polymere Procyanidine weitestgehend abzutrennen in 5 Fraktionen aufgetrennt. Aus Fraktion NP.3 erhält man nach einem weiteren Aufreinigungsschritt an C18-Material (HPLC-System 7) 15 mg Phloretin-2'-xyloglucosid.

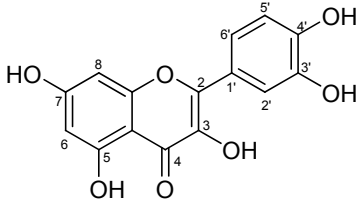
Die in angegebenen NMR-Daten der isolierten Substanz stimmten mit den von Lu und Foo (1997) für Phloretin-2'-O- β -D-xylopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranosid angegebenen Werten überein.

4.3.5.2 Flavonole

4.3.5.2.1 Quercetin

Bei der Gelchromatographie des AE04 an Sephadex LH-20 wurde das Quercetin aufgrund der geringen Polarität lange auf der Säule zurückgehalten und eluierte erst mit den Procyanidinen von der Säule. So reicherte es sich in Fraktion S.8 an, aus der es bei der Aufkonzentrierung in Form eines blassgelben Niederschlages in einer Menge von 10 mg auskristallisierte und unter Verwendung einer Glasfritte abgetrennt wurde.

Tabelle 4.2 Spektroskopische Daten von Quercetin

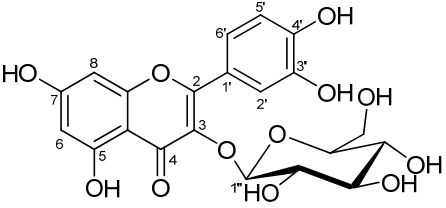
Quercetin	
$^1\text{H-NMR}$ in DMSO- d_6	δ 12,49 ppm (1H, s, OH); δ 10,76 ppm (1H, s, OH); δ 9,57 ppm (1H, s, OH); δ 9,33 ppm (1H, s, OH); δ 9,29 ppm (1H, s, OH); δ 7,68 ppm (1H, d, 2 Hz, H-2'); δ 7,54 ppm (1H, dd, 2/8,5 Hz, H-6'); δ 6,89 ppm (1H, d, 8.5 Hz, H-5'); δ 6,40 ppm (1H, d, 2 Hz, H-6); δ 6,19 ppm (1H, d, 2 Hz, H-8)
$^{13}\text{C-NMR}$	δ 175,7 ppm (C-4); δ 163,8 ppm (C-7); δ 160,6 ppm (C-5); δ 156,0 ppm (C-9); δ 147,6 ppm (C-3'); δ 146,7 ppm (C-2'); δ 145,0 ppm (C-4'); δ 135,6 ppm (C-3); δ 121,9 ppm (C-1'); δ 119,9 ppm (C-6'); δ 115,5 ppm (C-5'); δ 115,0 ppm (C-2'); δ 102,9 ppm (C-10); δ 98,0 ppm (C-6); δ 93,3 ppm (C-8);

λ_{\max}	370 nm; 256 nm	
LCMS/MS	Prekursorion [M-H] ⁻	Produktion
	<i>m/z</i> 301	<i>m/z</i> 151

4.3.5.2.2 Quercetin-3-O-glucosid

Aus der Fraktion S.5.7 wurde mittels präparativer RP-HPLC (HPLC-System 7) 2,2 mg Substanz isoliert. Die LC-MS/MS Spektren sowie die chemischen Verschiebungen der isolierten Substanz stimmten mit den von Lee et al. (1995) publizierten Werten des Quercetin-3-O-glucopyranosids überein.

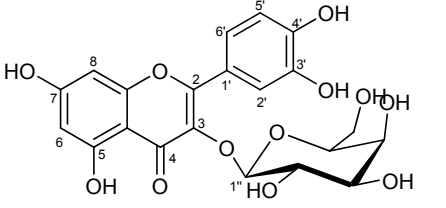
Tabelle 4.3 Spektroskopische Daten von Quercetin-3-O- β -D-glucosid

Quercetin-3-O- β -D-glucosid		
¹ H-NMR in Me-OD-d ₄	δ 5,41 ppm (H-6, d, 2 Hz); δ 5,60 ppm (H-8, d, 2 Hz); δ 6,90 ppm (H-2', d, 2 Hz); δ 6,07 ppm (H-5', d, 8,5 Hz); δ 6,79 ppm (H-6', dd, 2/8,5 Hz); δ 4,43 ppm (H-1'', d, 7,5), δ 2,60 – 2,91 ppm (H2''-H6'', m)	
λ_{\max}	354 nm; 256 nm	
LCMS/MS	Prekursorion [M-H] ⁻	Produktion
	<i>m/z</i> 463	<i>m/z</i> 300; 301

4.3.5.2.3 Quercetin-3-O-galactosid

Aus der Fraktion S.5.7 wurden 1,9 mg einer weiteren Substanz mittels präparativer RP-HPLC (HPLC-System 7) isoliert. Die chemischen Verschiebungen der isolierten Substanz stimmten mit den von Lee et al. (1995) publizierten Werten des Quercetin-3-O-galactopyranosids überein.

Tabelle 4.4 Spektroskopische Daten von Quercetin-3-O- β -D-galactosid

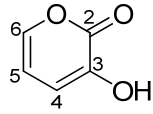
Quercetin-3-O- β -D-galactosid		
¹ H-NMR in DMSO-d ₆	δ 6,12 ppm (H-6, d, 2 Hz); δ 6,32 ppm (H-8, d, 2 Hz); δ 7,52 ppm (H-2', d, 2 Hz); δ 6,79 ppm (H-5', d, 8,5 Hz); δ 7,65 ppm (H-6', dd, 2/8,5 Hz); δ 5,34 ppm (H-1'', d, 7,5), δ 3,82 – 3,65 ppm (H2''-H6'', m)	
λ_{\max}	354 nm; 256 nm	
LCMS/MS	Prekursorion [M-H] ⁻	Produktion
	<i>m/z</i> 463	<i>m/z</i> 300; 301

4.3.6 Synthesen

4.3.6.1 3-Hydroxy-2-pyron

Jeweils 100 g von gepulvertem Kaliumbisulfat und Schleimsäure wurden gut miteinander vermischt und in einen 500 ml Rundkolben überführt. Die Reaktion wurde aufgrund von entstehenden toxischen und ätzenden Gasen im Abzug durchgeführt. Die Mischung aus Kaliumbisulfat und Schleimsäure wurde einer trockenen Destillation unterzogen, indem das Pulvergemisch mit einem Bunsenbrenner von oben nach unten geschmolzen wurde bis die Temperatur am Destillationskopf 160-165°C erreichte. Das braun gelbe Destillat wurde gefiltert und mit 6 N Natronlauge auf pH 7 eingestellt und für 12 Stunden in einem Friedrichs-Extraktor mit Diethylether extrahiert. Die etherische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel schonen im Vakuum bei 35°C entfernt. Anschließend erfolgte die fraktionierte Destillation des gelben Rückstands (Sd.p.= 125°C, 14 torr). Hierbei erhielt man eine leicht gelbe kristalline Substanz, aus der durch Umkristallisieren in Petroleumether das 3-Hydroxy-2-pyrone gewonnen wird (Wiley und Jarboe 1956). Die Ausbeute betrug 1%. Die spektroskopischen Daten (s. Tabelle 4.5) stimmten mit denen der Literatur überein (Wiley und Jarboe 1956, Jacobsen *et al.* 2007).

Tabelle 4.5 Spektroskopische Daten von 3-Hydroxy-2-Pyron

3-Hydroxy-2-Pyron	
¹ H-NMR in DMSO-d ₆	δ 9,97 ppm (OH, s); δ 7,36 ppm (H-6, dd, 5/1,6Hz); δ 6,63 ppm (H-4, dd, 7/1,7Hz); δ 6,27 ppm (H-5, dd, 5/7 Hz)
¹³ C-NMR in DMSO-d ₆	δ 159,6 ppm (C-2); δ 142,8 ppm (C-6); δ 142,6 ppm (C-3); δ 115,5 ppm (C-4); δ 106,6 ppm (C-5)
GC-MS	112(100), 84(87), 56(26), 55(98)
Kovatsindex	1970
Siedepunkt	125°C (17 torr)

4.3.6.2 3-Hydroxyphloretinglycoside

Die Oxidation der Phloretin-glycoside zu den entsprechenden in Position 3 hydroxylierten Verbindungen erfolgte in Anlehnung an LeGuerneve (Le Guerneve *et al.* 2004) mit Tyrosinase. Als Edukte dienen das freie Aglykon Phloretin, sowie die Glycoside Phloretin-2'-glucosid und Phloretin-2'-xyloglucosid. Um den zeitlichen Verlauf der Reaktion zu beobachten wurden 250 ml 1 mM Phloretin-glycosid Lösung (1 mM) mit 250 ml

Ascorbinsäure-Lösung (10 mM) und 500 ml Phosphatpuffer (pH=6) in einem 2 l Dreihalskolben vermischt und auf 30°C erwärmt. Nach Zugabe von 500U Tyrosinase (EC 1.14.18.1; Fluka Steinheim) wurde das Reaktionsgemisch 3 Stunden unter Durchleiten von Luft inkubiert. Nach jeweils 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 Stunden wurde ein Aliquot entnommen 1:1 mit Trimethoxy-Zimtsäure (c=0,05 mg/ml) versetzt und mittels HPLC (Kapitel 4.2.2 HPLC-System 2) auf die Reaktionsprodukte hin untersucht. Für die präparative Synthese der 3-Hydroxyphloretin-glycosiden wurde der gleiche Reaktionsansatz 1 Stunde inkubiert. Die Lösung wurde anschließend gefriergetrocknet. Der gelbliche Rückstand wurde mit Methanol extrahiert und die vereinigten organische Phasen filtriert. Die organische Phase wurde zur Entfernung der gelben, polymeren oxidierten Substanzen über eine C-18-Kartusche (Waters Oasis, Eschborn) aufgereinigt. Die Isolierung der Reinsubstanzen erfolgte mittels präparativer HPLC (s. 4.2.4 System 7).

4.3.7 Biologische Testsysteme

Die Überprüfung auf antioxidative Aktivität, Modulation des Fremdstoffmetabolismus und antiinflammatorische, sowie antihormonelle Wirkung erfolgten am DKFZ in Heidelberg. Die Kontrolle auf Modulation der Tyrosinkinase-Aktivität am EGF-Rezeptor wurde am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie an der Universität Karlsruhe durchgeführt.

4.3.7.1 Bestimmung der Proteintyrosinkinase (PTK)-Aktivität des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR)

4.3.7.1.1 Kultivierung der Zellen

Zur Aufreinigung des EGFR wurden 40 Petrischalen (d = 14 cm) mit jeweils $3,6 \times 10^6$ A431-Zellen in serumhaltigem ME-Medium ausgesät und bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte kultiviert. Die Aufarbeitung zur Rezeptorisolierung erfolgte nach dem Erreichen einer Zelldichte von 80-90 % (Gastpar 1997). Alle Aufarbeitungsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

4.3.7.1.2 Isolierung und Aufreinigung des EGF Rezeptors

Nach Entfernung des Kulturmediums wurden die Petrischalen zweimal mit je 3 ml PBS (1x) gewaschen. Zur Abtrypsinierung der Zellen wurden diese mit 3 ml Trypsin/EDTA für 12 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die A431-Zellen wurden danach mit 2 ml serumhaltigem Medium von der Oberfläche der Petrischale mit Hilfe eines Zellschabers gelöst. Diese Zellsuspension wurde in 50 ml PP-Röhrchen überführt. Mit 3 ml PBS (1x) wurden die Schalen nachgespült und die Lösung mit der Zellsuspension in den PP-Röhrchen vereinigt. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt von 8 min bei 2000 g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit 1x PBS resuspendiert. Nach Vereinigung der Zellpellets wurde nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstandes wurde das Zellfeuchtgewicht bestimmt, welches bei 40 großen Petrischalen in etwa 2 g betrug. Das Zellpellet wurde in 10 ml KMP-Puffer resuspendiert. Mit einer dreimaligen Ultraschallbehandlung (je 10 s auf Eis mit jeweils 20 s Pausen), wurde das Aufbrechen der Zellmembran erreicht. Durch vier Zentrifugationsschritte in der Ultrazentrifuge (UZ) von je 18 min bei 15000 g (2 – 4°C) wurde die gelöste, EGFR-haltige Membran von anderen Zellbestandteilen getrennt. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurden die Überstände auf Eis gesammelt. Das Pellet wurde jeweils in 10 ml KMP-Puffer resuspendiert und vor jeder neuen Zentrifugation erneut mit Ultraschall für 3x 5 s behandelt. Das Pellet konnte schließlich nach dem vierten UZ-Schritt verworfen werden; der Überstand dagegen wurde mit 1 M CaCl₂ x 2 H₂O-Lösung auf eine Endkonzentration von 10 mM CaCl₂ eingestellt. Dadurch aggregierten die intrazellulären Membranbestandteile bei Raumtemperatur (15 min). Dies wurde durch eine deutliche Trübung der Suspension sichtbar. Die aggregierten Membranbestandteile wurden 30 min bei 7000 g (2°C) abzentrifugiert und verworfen. Der Überstand wurde halbiert und nochmals für 60 min (2 – 4°C) bei 100.000 g in der UZ zentrifugiert. Die erhaltenen Membranpellets wurden bei -80°C gelagert und waren unter diesen Bedingungen 6 - 12 Monate haltbar. Die Aufreinigung des EGFR erfolgte mittels Absorptionschromatographie an Weizenkeimlektinagarose (Gastpar 1997). Dazu wurde eine Säule mit Natriumazid-stabilisierte Weizenkeimlektinagarose befüllt und über Nacht mit 1 M NaCl-Lösung und einer Durchflussrate von 0,1 ml/min bei 4°C gespült, um die Weizenkeimlektinagarose von dem antimikrobiell und fungizid wirkenden Natriumazid (NaN₃) zu befreien. Um Aktivitätsverluste des EGFR bei der Aufreinigung zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte auf Eis durchge-

führt. Einer der gelagerten Membranpellets (von 20 Platten) wurde mit KMP-T-Puffer resuspendiert und eine Stunde gerührt. Die Abtrennung ungelöster Bestandteile erfolgte durch die Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 1 h und 4°C. Unterdessen wurde die Säule mit etwa 100 ml Säulenpuffer equilibriert. Der Zentrifugationsüberstand wurde auf die Säule gegeben, das Eluat im PP-Röhrchen gesammelt und erneut auf die Säule gegeben. Dieser Schritt wurde anschließend noch zweimal wiederholt. Dabei banden die Proteine an das Säulenmaterial. Zur Beseitigung von Zellbestandteilen wurde nochmals mit Säulenpuffer gespült. Mit 0,3 M N-Acetyl-D-Glucosaminhaltigem (25 ml) Säulenpuffer wurde der EGFR schließlich eluiert und in 5 Fraktionen zu je 4,5 ml aufgefangen. Nach Zugabe von je 500 µl 10 mM DTT-Lösung zu jeder EGFR-haltigen Fraktion wurden die Fraktionen in je zehn Aliquots in Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei -80°C gelagert. Da die Weizenkeimlektinagarose mehrfach verwendet werden konnte, jedoch sehr anfällig gegenüber Mikroben ist, wurde über Nacht mit 1 M NaCl mit 0,02% (w/v) NaN₃ gespült.

CaCl ₂ -Lösung:	1 M CaCl ₂ x 2 H ₂ O
DTT-Lösung:	10 mM Dithiothreitol
PMSF-Stammlösung:	100 mM PMSF in Isopropanol
KMP-Puffer Stammlösung:	20 mM PIPES 1 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 5 mM KCl
KMP-Puffer:	10 ml KMP-Puffer-Stammlösung 0,2 mM PMSF
KMP-T-Puffer:	10 ml KMP-Puffer-Stammlösung 100 µl Triton® X-100 0,2 mM PMSF
Säulenpuffer (pH 7,2):	40 mM HEPES 500 mM NaCl pH-Wert einstellen, dann erst Zugabe 10% (v/v) Glycerol 0,05% (v/v) Triton® X-100
N-Acetylglucosamin-haltiger Säulenpuffer (300 mmol):	9,95 g N-Acetyl-D-Glucosamin 150 ml Säulenpuffer
NaCl-Lösung:	1 M NaCl
NaN ₃ -haltige NaCl-Lösung:	0,02% (w/v) NaN ₃ in NaCl-Lösung
1 x PBS („Phosphate buffered saline“):	171 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 3,4 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 einstellen, mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen, und auf 1x PBS verdünnte Lösungen autoklavieren, Lagerung bei 4 °C

Trypsin/EDTA-Lösung: 0,25 g Trypsin
0,35 g EDTA
Mit 1 x PBS auf 500 ml auffüllen

4.3.7.1.3 Beschichten von Mikrotiterplatten mit Substrat

Zehn 96-Loch-Immunoplatten (Greiner, Solingen) mit hoher Proteinbindungskapazität wurden über Nacht mit je 100 µl des Proteintyrosinkinase (PTK)-Substrates Poly-Glutaminsäure/Tyrosin (Poly Glu; Tyr 4:1) pro Vertiefung bei 35°C im Trockenschrank inkubiert. Sobald die Platten getrocknet waren, wurden sie dreimal mit 200 µl/Well Waschpuffer für je 5 min gewaschen, ausgeklopft und im Trockenschrank bei 35°C erneut getrocknet. Die beschichteten Platten wurden in einem dunklen Raum/Karton in Plastiktüten gelagert.

4.3.7.1.4 Testung der einzelnen EGFR-Fraktionen auf ihre PTK-Aktivität

Zur Untersuchung der PTK-Aktivität des EGFR wurden die ersten vier der aufgereinigten Fraktionen herangezogen. Ein Aliquot jeder dieser vier Fraktionen wurde jeweils mit PBS/0,1% BSA im Verhältnis 1:2, 1:4, 1:6 und 1:8 auf ein Volumen von 500 µl verdünnt. Die Methode erfolgte, ohne Mehrfachbestimmung, wie unter Kapitel 4.3.7.1.5 beschrieben. Die Fraktionen, die nach maximal einer Stunde bei 35°C bei 405 nm eine Extinktion von 0,8 - 1,2 aufwiesen, wurden in der entsprechenden Verdünnung für den EGFR-ELISA verwendet.

4.3.7.1.5 Aktivitätsuntersuchungen der EGFR-assoziierten Proteintyrosinkinaseaktivität (ELISA)

Der Einfluss von Testsubstanzen auf die PTK-Aktivität des EGFR wurde mittels enzymvermittelter Immunoreaktion (ELISA: „enzyme linked immunosorbent assay“) bestimmt (Abbildung 4.1).

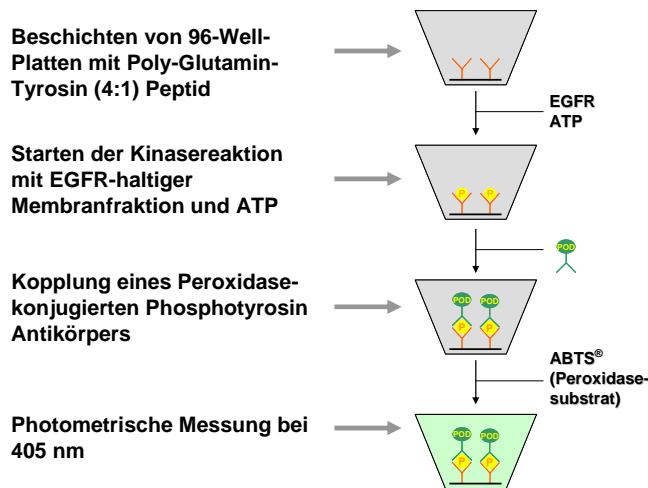


Abbildung 4.1 Testprinzip des EGFR-ELISA (Meiers *et al.* 2001, Marko *et al.* 2004)

Zuerst erfolgte die Erwärmung einer Kupferplatte im Trockenschrank bei 35°C zur späteren gleichmäßige Wärmeverteilung auf alle „Wells“ der 96-Lochplatte. Die Randlöcher wurden mit 100 µl H₂O_{bidest} befüllt, um bei den Inkubationen gleiche Bedingungen in den übrigen Vertiefungen zu erhalten (Abbildung 4.2). Anschließend wurden 10 µl der Testsubstanz in 10%iger DMSO-Lösung in H₂O_{bidest} vorgelegt. Im Vergleich dazu wurden zur Normalreaktion und zum Blindwert 10%ige DMSO-Lösung in H₂O_{bidest} vorgelegt (Abbildung 4.2). Als positive Hemmkontrolle wurde Tyrphostin AG1478 (100 µM in 10%iger DMSO-Lösung in H₂O_{bidest}) mitgeführt (Abbildung 4.2). Aktive EGFR-haltige Fraktion wurde auf Eis aufgetaut und nach Bedarf in 1x PBS (Kapitel 6.3.2) verdünnt. Pro Loch wurden 40 µl der EGFR-Verdünnung zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur mit den Testsubstanzen inkubiert. Zum Blindwert wurden 50 µl H₂O_{bidest} gegeben. In den anderen Vertiefungen (Normalreaktion, positive Hemmkontrolle und Testsubstanzen) wurde die Tyrosinkinase-reaktion durch Zugabe von 50 µl, auf 37°C erwärmten, Assaypuffer gestartet (30 min bei 35°C im Trockenschrank). Die Proteintyrosinkinase-reaktion wurde durch Absaugen der Lösungen und dreimaliges Waschen von je 5 min mit je 200 µl Waschpuffer gestoppt. Die Platten wurden dann zum Trocknen gut ausgeklopft. Zu jedem Ansatz der trockenen Immunolochplatte wurden je 75 µl frisch angesetzte Anti-Phosphotyrosinperoxidase-Lösung, Peroxidase gekoppeltes Antiphosphotyrosin IgG (1:2000) in PBS(1x)/1% BSA, im Dunkeln pipettiert. Nach 1 h bei 35°C wurde die Antikörperlösung entfernt und wie oben beschrieben gewaschen. Durch Zugabe von 100 µl ABTS®-Lösung wurde die Peroxidase-Reaktion im Dunkeln gestartet. Es kam zur peroxidasevermittelten Farbreaktion (Grünfärbung). Nach maximal 1 h bei 35°C wurde die Farbreaktion photometrisch bei $\lambda = 405$ nm gegen $\lambda = 490$ nm vermessen. Die PTK-Aktivitätshemmung zeigte sich durch eine weni-

ger intensive Grünfärbung (Abbildung 4.2). Die Auswertung erfolgt als „Test over Control“ [T/C]-Wert in Bezug auf den als 100% gesetzten Mittelwert der Normalreaktion (= Lösungsmittelkontrolle). Nachfolgend ist die Formel für den „Test over Control“-Wert aufgeführt:

$$T/C[\%] = \frac{T - C_N}{C_B - C_N} \cdot 100\%$$

T/C: „Test over Control“-Wert
 T: optische Dichte der Testsubstanz
 C_N: optische Dichte der Normalreaktion
 C_B: optische Dichte des Blindwerts

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		B	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
C												
D		N										
E			T	T	T	T	T	T	T	T	T	
F		P										
G												
H												

Abbildung 4.2 Pipettierschema für eine Mikrotiterplatte im EGFR-ELISA. Blau, H₂O_{bidest}; B, Basiswert; N, Normal, Lösungsmittelkontrolle; P, Positivkontrolle, Tyrphostin AG1478 [10 µM]; T Testsubstanz, (2-11 in steigender Konzentration).

ABTS®-Lösung: 1x ABTS®-Tablette in 5 ml 10x- ABTS®-Puffer lösen mit 45 ml H₂O_{bidest} auffüllen
 (lichtempfindlich)
 Antikörperlösung: 1 % (w/v) BSA
 1:2000 Anti-Phosphotyrosin (PY99, Santa Cruz) in PBS (1x)
 Assaypuffer (pH 7,2): 50 mM HEPES
 10 mM MgCl₂ x 6 H₂O
 2 mM MnCl₂ x 4 H₂O
 200 µM ATP
 in 5 ml-Röhrchen aliquotieren Lagerung -20°C
 Poly (Glu, Tyr) 4:1-Lösung : 0,1 mg Poly (Glu, Tyr) 4:1 in 1 ml PBS (1 x)
 Tyrphostin-Lösung: 100 µM Tyrphostin AG1478 in 10%iger DMSO-Lösung in H₂O_{bidest}.
 Waschpuffer: 0,1% (v/v) Tween-20 in PBS (1 x)
 PBS Kapitel 4.3.7.1.2

4.3.7.2 Hemmung der Cytochrom P450 1A-Aktivität

Die Hemmung des Phase-1 Enzyms Cytochrom P450 1A (Cyp 1A) wurde unter Verwendung einer modifizierten Methode nach Crespi (Crespi *et al.* 1997)

untersucht. Hierzu wurden Homogenate von H4IIE Rattenhepatomzellen verwendet, die zur Induktion von Cyp 1A 39 h mit 10 μM β -Naphthoflavon behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen drei mal mit PBS gewaschen, in Cyp-Phosphatpuffer aufgenommen, in Aliquots von 1 ml in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für jedes Experiment wurde ein Aliquot des Homogenats bei 37°C aufgetaut, unter Verwendung einer 18 gauge Kanüle homogenisiert und 1:10 verdünnt im Test eingesetzt. 90 μl des verdünnten Zelllysats wurden mit 100 μl Cyp-Reaktionspuffer in eine 96-Lochplatte pipettiert. Abschließend erfolgt die Zugabe von je 10 μl Testsubstanz in acht Konzentrationen einer 1:1 Reihenverdünnung in 10 % DMSO bzw. dem als Positivkontrolle verwendeten α -Naphthoflavon in einer Verdünnungsreihe von 3.9 bis 500 nM in Triplikaten. Die Dealkylierung von 3-Cyano-7-ethoxycumarin zu 3-Cyano-7-hydroxycumarin wurde anhand der zeitabhängigen Substratumsatzrate über einen Zeitraum von 40 min bei 37°C am Cytofluor (Anregung bei 408/20 nm, Emission bei 460/40 nm) bestimmt. Anschließend erfolgte eine Normalisierung der Werte auf den Proteingehalt, der unter Verwendung der BCA Methode (Smith *et al.* 1985) mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt wurde.

Die optische Dichte (OD) wurde dabei bei 562 nm im Photometer gemessen.

Cyp-Phosphatpuffer (pH 7.4): 200 mM KH_2PO_4
10 mM MgCl_2

Cyp-Reaktionspuffer: 5 μM 3-Cyano-7-ethoxycumarin
1,3 mM NADP^+
3.3 mM Glucose-6-Phosphat
0.5 U Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

4.3.7.3 Induktion der NAD(P)H:Chinonreduktase (QR)

Zur Bestimmung der Induktion des Phase-II-Enzyms NAD(P)H:Chinonreduktase fanden kultivierten Hepa 1c1c7 Maushepatomzellen Verwendung (Prochaska *et al.* 1992). Die Zellen wurden in 96-Lochplatten mit 2×10^4 Zellen/ml in 200 μl α -MEM/10% FCS (Fötale Kälberserum) pro Loch ausgesät und für 24 h präinkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und 10 μl Testsubstanz in 10% DMSO (acht serielle 1:1-Verdünnungen, Endkonzentrationen 0,4 - 50 μM) sowie als Positivkontrolle β -Naphthoflavon in einer Endkonzentration von 0,15 - 2 μM in Duplikaten zugegeben.

Nach 48 h wurde das Medium verworfen, die Platten drei Mal mit PBS gewaschen und die Zellen bei 37°C für 10 min in 50 µl Digitonin-Lösung lysiert. Die Platten wurden für weitere 10 min bei RT geschüttelt, und im Anschluss erfolgte die Zugabe von 200 µl Chinonreduktase-Reaktionspuffer pro Loch. Die NADP-abhängige, Menadiol-vermittelte Reduktion des im Puffer enthaltenen MTTs in blaues Formazan wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gemessen. Die Induktion der QR-Aktivität wurde aus dem Verhältnis der spezifischen Enzymaktivität behandelter Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt, woraufhin die Berechnung des CD-Wertes (Konzentration zur Verdopplung der spezifischen QR-Aktivität) erfolgte. Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde parallel an identisch behandelten Platten eine Kristallviolett-Färbung vorgenommen (Prochaska *et al.* 1992). Dazu wurden 50 µl Kristallviolett-Färbelösung in jedes Loch gegeben und nach 15-minütiger Inkubation bei RT überschüssiger Farbstoff durch Spülen mit Wasser entfernt. Die an die Zellmembranen gebundene Farbe wurde unter Verwendung der Solubilisierungslösung 1 h bei 37°C gelöst, und die OD bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer gemessen.

Chinonreduktase-Reaktionspuffer 0,06% BSA (Bovines Serum Albumin)
 0.9 mM 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl] -2,5-diphenyl-
 tetrazoliumbromid
 25 mM Tris-HCl
 0.01 % Tween-20
 5 µM FAD (Flavin-adenin-dinukleotid)
 1 mM Glucose-6-Phosphat
 30 µM NADP⁺
 2 U/ml Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
 50 µM Menadion (gelöst in Acetonitril)

Digitonin-Lösung (pH 7.8) 20 mM EDTA,
 0.8 % Digitonin

Kristallviolett-Färbelösung: 0.2 % Kristallviolett
 2 % Ethanol

Kristallviolett-Solubilisierungslösung: 0.5 % SDS (Natriumdodecylsulfat)
 50 % Ethanol

4.3.7.4 Abfangen von 1,1-Diphenyl-2-pikrylhydrazyl Radikalen

Das Radikalfängerpotenzial wurde photometrisch durch Reaktion mit freien 1,1-Diphenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH) Radikalen modifiziert nach van Amsterdam be-

stimmt (1992). DPPH besitzt aufgrund seiner Struktur mit einem ungepaarten Elektron ein Absorptionsmaximum bei 517 nm, was sich in der tiefvioletten Färbung der gelösten Substanz ausdrückt. Durch Paarung des einzelnen Elektrons, beispielsweise durch Übertragung eines Wasserstoff-Atoms von einem Radikalfänger auf das DPPH-Radikal, entsteht ein hypsochromer Effekt, der photometrisch messbar ist.

Im 96-Loch-Mikrotiterplattenformat wurden 10 µl der Testsubstanzen als Duplikate in acht seriellen 1:1 Verdünnungen (in 100% DMSO) mit 190 µl 100 µM DPPH für 30 min bei 37°C inkubiert. Das Radikalfängerpotenzial wurde nach photometrischer Messung bei 515 nm mit der Lösungsmittelkontrolle (0% Radikalfang) und der Positivkontrolle Vitamin C (250 µM Endkonzentration, 100% Radikalfang, als Blank verwendet) verglichen und daraus die halbmaximale Radikalfängerkonzentration SC_{50} (half-maximal scavenging concentration) berechnet.

4.3.7.5 Abfangen von Superoxidanion-Radikalen gebildet durch Hypoxanthin/Xanthinoxidase

Superoxidanion-Radikale wurden in Hypoxanthin/Xanthinoxidase (H/XO) Reaktionspuffer durch Oxidation von Hypoxanthin zu Harnsäure durch Xanthinoxidase generiert. Die Quantifizierung erfolgte über die Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses XTT zum orangenen Formazan, das bei 480 nm photometrisch erfasst werden kann. Durch die kinetische Messung über 5 min wurden V_{max} -Werte ermittelt. Aus den Werten von fünf seriellen 1:1 Verdünnungen erfolgte die Berechnung der SC_{50} . Die Testsubstanzen wurden in Duplikaten getestet. Als Kontrolle wurde Superoxiddismutase (SOD) in einer Endkonzentration von 30 U/ml verwendet. Um einen direkten hemmenden Effekt der Substanzen auf die Xanthinoxidase auszuschließen, wurde unter identischen Bedingungen die Bildung von Harnsäure ohne Zugabe von XTT bei 290 nm im µQuant gemessen. Im Reaktionsgemisch wurden 50 µM Hypoxanthin durch 100 µM Xanthin ersetzt. Allopurinol wurde als bekannter Hemmstoff der Xanthinoxidase als Positivkontrolle eingesetzt. Die Methode wurde nach Ukeda (1997) modifiziert und an das 96-Loch-Plattenformat angepasst.

H/XO-Reaktionspuffer (pH 8): 50 mM KH_2PO_4
0.1 mM EDTA
50 μM Hypoxanthin
25 μM Natrium-2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
1.5 mU/ml Xanthinoxidase

4.3.7.6 Messung der “Oxygen (Peroxy) Radical Absorbance Capacity”

Das Potenzial von Testsubstanzen, Peroxyradikale abzufangen, wurde anhand des modifizierten oxygen radical absorbance capacity-Tests (ORAC) nach Cao und Prior (1999), ebenfalls angepasst an das 96-Loch-Plattenformat, bestimmt. Hierbei wurde Fluorescein als redox-sensitives, fluoreszierendes Indikatormolekül verwendet. Die Freisetzung von Peroxyradikalen erfolgte durch 2,2-Azobis-(2-amidinopropan) dihydrochlorid (AAPH). 170 μl ORAC-Puffer wurden dazu mit 10 μl Testsubstanz in Quadruplikaten versetzt. Als Positivkontrolle wurde das wasserlösliche Vitamin E Analog Trolox in einer Endkonzentration von 1 μM eingesetzt. Durch Zugabe von 20 μl 190,81 mM AAPH zum Puffer wurde die Reaktion initiiert und die Abnahme der Fluoreszenz bei 37°C über einen Zeitraum von ca. 120 min im Cytofluor (Anregung bei 530/25 nm, Emission bei 585/30 nm) kontinuierlich bis zum vollständigen Fluoreszenzverlust gemessen. Die Ergebnisse der Testsubstanzen, die in einer Endkonzentration von 1 μM bzw. im Falle der Extrakte und Fraktionen von 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vorlagen, wurden zur Positivkontrolle in Relation gesetzt und als ORAC-Einheiten ausgedrückt, wobei eine Einheit dem Schutz des Fluoreszenzabfalls von Fluorescein durch 1 μM Trolox entspricht.

ORAC-Puffer (pH 7,4) 75 mM Na_2HPO_4
75 mM KH_2PO_4
0,21 μM Fluorescein

4.3.7.7 Hemmung der Aromatase (Cytochrom P450 19)

Die Identifikation von potenten Inhibitoren der Aromatase erfolgte unter zu Hilfenahme der Methode nach Stresser (Stresser *et al.* 2000) mittels rekombinanter humaner Aromatase sowie dem Substrat O-benzyl-fluorescein-benzylester. Das Substrat wurde durch die Aromatase dealkyliert, wodurch es zur Bildung eines Fluoresceinmonobenzylesters

kommt, der nach Hydrolyse mit NaOH fluorimetrisch bestimmt werden kann. Die Bestimmung der Aromataseaktivität erfolgte in 100 µl des Kofaktor-Verdünnungspuffers. Nach Vorinkubation des Gemisches bei 37°C für 10 min wurden 10 µl der Testsubstanzen (acht serielle 1:1 Verdünnungen, Endkonzentration von 0,4 -50 µM) in Duplikaten sowie 10% DMSO als Negativkontrolle bzw. Ketoconazol in Endkonzentrationen von 0,4 - 25 µM als Positivkontrolle hinzugegeben und die Reaktion durch Zugabe des Aromatase Enzym-Substratgemisches gestartet und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2,2N NaOH gestoppt. Um ein adäquates Signal/Rausch-Verhältnis zu erzielen, wurde die Platte weitere 2 h bei 37°C inkubiert, bevor die Messung im SpectraMax Fluorimeter (Anregung bei 490 nm, Emission bei 530 nm, mit einem cutoff von 515 nm) erfolgte. Die Ergebnisse wurden in % Hemmung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle angegeben und zur Berechnung von IC₅₀ Werten verwendet.

Aromatase Kofaktor-Verdünnungspuffer (pH 7.4):

50 mM KH₂PO₄
5,2 mM NADP⁺
13,2 mM Glucose-6-Phosphat
13,2 mM MgCl₂
1,6 U/ml Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

Aromatase Enzym-Substratgemisch (pH 7.4)

50 mM KH₂PO₄
2 nM Humane rekombinante Aromatase (Cyp 19)
0,4 µM O-benzyl-fluorescein-benzylester

4.3.7.8 Hemmung der Cyclooxygenase-1-Aktivität

Die Aktivitätsbestimmung der Cyclooxygenase-1 (Cox-1) basiert auf der Messung der Sauerstoffmenge, die während der Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen verbraucht wurde (Jang *et al.* 1997).

Das Reaktionsgemisch (988 µl) wurde für 90 s mit 10 µl Testsubstanz bzw. DMSO als Negativkontrolle bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl 50 mM Arachidonsäure in Ethanol (Endkonzentration 100 µM) gestartet und der Sauerstoffverbrauch mit Hilfe einer Clark-Sauerstoff-Elektrode für 20 s gemessen. Zur Berechnung wurde die über den Sauerstoffverbrauch erfasste Cox-1-Aktivität der DMSO

Kontrolle gleich 100% gesetzt und die Werte für die Testsubstanzen in % der Kontrolle ausgedrückt.

Cox-Reaktionspuffer (pH 7.4) 0,1 M Na₂HPO₄
0.1 M KH₂PO₄
1 mM Hydrochinon
0,01 mM Hämin
2 U/ml Cyclooxygenase-1 (aus Schafsamenblasenmikrosomen)

5 Literatur

- Agarwal, S. Increased antioxidant activity in Cassia seedlings under UV-B radiation. *Biol. Plant.* **2007**, *51*, 157-160.
- Alonso-Salces, R. M.; Barranco, A.; Abad, B.; Berrueta, L. A.; Gallo, B.; Vicente, F. Polyphenolic Profiles of Basque Cider Apple Cultivars and Their Technological Properties. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2938-2952.
- Ammar, N.; El Diwany, A.; Osman, N.; Gaafar, S.; Amin, N. Flavonoids as a possible preventive of dental plaque. *Arch. Pharmacol. Res.* **1990**, *13*, 211-213.
- Anderson, O. M.; Markham, K. R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; CRC Press Inc: Boca Raton, 2006.
- Andriambeloson, E.; Kleschyov, A. L.; Muller, B.; Beretz, A.; Stoclet, J. C.; Andriantsitohaina, R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *120*, 1053-1058.
- Ardestani, A.; Yazdanparast, R. Flavonoids as potential therapeutic agents for type 1 diabetes. *Med. Hypotheses* **2007**, *69*, 955.
- Arimoto-Kobayashi, S.; Inada, N.; Sato, Y.; Sugiyama, C.; Okamoto, K.; Hayatsu, H.; Negishi, T. Inhibitory Effects of (-)-Epigallocatechin Gallate on the Mutation, DNA Strand Cleavage, and DNA Adduct Formation by Heterocyclic Amines. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5150-5153.
- Ashurst, P. R. *Production and packaging of non-carbonated fruit juices and fruit beverages* 2nd ed.; Springer-Verlag GmbH, 1998.
- Bailey, G. S.; Williams, D. E. Potential mechanisms for food-related carcinogens and anticarcinogens. *Food Technol. (Chicago)* **1993**, *47*, 105-118.
- Baltes, W. *Lebensmittelchemie*; 6th ed.; Springer: Berlin, 2007.
- Berger, R. G.; Dettweiler, G. R.; Drawert, F. On the occurrence of C8 diols in apples and apple juices. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **1988**, *84*, 344-347.
- Beuerle, T.; Schwab, W. Biosynthesis of R-(+)-octane-1,3-diol. Crucial role of beta-oxidation in the enantioselective generation of 1,3-diols in stored apples. *Lipids* **1999**, *34*, 617-625.
- Birus, T. *Moderne Apfelsaft-Technologie*; Fachverlag Flüssiges Obst: Schönborn, 2001.
- Bohlscheid, J. C.; Wang, X.-D.; Mattinson, D. S.; Edwards, C. G. Comparison of head-space solid phase microextraction and XAD-2 methods to extract volatile compounds produced by *Saccharomyces* during wine fermentations. *J. Food Qual.* **2006**, *29*, 1-15.
- Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 343-355.
- Boulanger, R.; Crouzet, J. Free and bound flavour components of amazonian fruits: 2. Cupuacu volatile compounds. *Flavour Fragrance J.* **2000**, *15*, 251-257.
- Boyer, J.; Liu, R. H. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr. J.* **2004**, *3*, 5.
- Brandl, W.; Herrmann, K. Occurrence of chlorogenic acids in potatoes. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1984**, *178*, 192-194.
- Brown, D. E.; Rashotte, A. M.; Murphy, A. S.; Normanly, J.; Tague, B. W.; Peer, W. A.; Taiz, L.; Muday, G. K. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 524-535.

- Brown, J. P.; Dietrich, P. S. Mutagenicity of plant flavonols in the Salmonella/mammalian microsome test. Activation of flavonol glycosides by mixed glycosidases from rat cecal bacteria and other sources. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Test.* **1979**, *66*, 223-240.
- Brunerie, P.; Beuerle, T.; Schreier, P.; Schwab, W. C8-diols as precursors of new flavoring acetals in apples. *Nat. Prod. Anal., [Symp.]* **1998**, 345-351.
- Byrd John, C.; Lin Thomas, S.; Dalton James, T.; Wu, D.; Phelps Mitch, A.; Fischer, B.; Moran, M.; Blum Kristie, A.; Rovin, B.; Brooker-McEldowney, M.; Broering, S.; Schaaf Larry, J.; Johnson Amy, J.; Lucas David, M.; Heerema Nyla, A.; Lozanski, G.; Young Donn, C.; Suarez, J.-R.; Colevas, A. D.; Grever Michael, R. Flavopiridol administered using a pharmacologically derived schedule is associated with marked clinical efficacy in refractory, genetically high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2007**, *109*, 399-404.
- Campia, U.; Panza, J. A. Endothelial vasodilatory dysfunction in hypertension. *Endothelial Dysfunct. Vasc. Dis.* **2007**, 213-231.
- Canadean. **2006**.
- Cao, G.; Prior, R. L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 50-62.
- Careri, M.; Corradini, C.; Elviri, L.; Nicoletti, I.; Zagnoni, I. Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5226-5231.
- Cassidy, A.; Hanley, 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.
- Chandra, J.; Samali, A.; Orrenius, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *29*, 323-333.
- Chavez, E.; Reyes-Gordillo, K.; Segovia, J.; Shibayama, M.; Tsutsumi, V.; Vergara, P.; Moreno, M. G.; Muriel, P. Resveratrol prevents fibrosis, NF-kappaB activation and TGF-beta increases induced by chronic CCl4 treatment in rats. *J. Appl. Toxicol.* **2008**, *28*, 35-43.
- Cheng, Y.; Wang, H.-F.; Sun, H.-F.; Li, H.-L. Inhibition of nicotine-DNA adduct formation by polyphenolic compounds in vitro. *Nucl. Sci. Tech.* **2004**, *15*, 219-222.
- Chopra, M.; Fitzsimons, P. E.; Strain, J. J.; Thurnham, D. I.; Howard, A. N. Nonalcoholic red wine extract and quercetin inhibit LDL oxidation without affecting plasma antioxidant vitamin and carotenoid concentrations. *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1162-1170.
- Chu, Q.; O'Dwyer, M.; Zeece, M. G. Direct Analysis of Resveratrol in Wine by Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 509-513.
- Clifford, M. N. Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000a**, *80*, 1063-1072.
- Clifford, M. N. Chlorogenic acid and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, *79*, 362-372.
- Clifford, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* **2000b**, *80*, 1033-1043.
- Coleman, J.; Wrzosek, T.; Roman, R.; Peterson, J.; McAllister, P. Setting system suitability criteria for detectability in high-performance liquid chromatography methods

- using signal-to-noise ratio statistical tolerance intervals. *J. Chromatogr. A* **2001**, *917*, 23-27.
- Cooper-Driver, G. A. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 229-236.
- Crespi, C. L.; Miller, V. P.; Penman, B. W. Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450. *Anal. Biochem.* **1997**, *248*, 188-190.
- Csokay, B.; Prajda, N.; Weber, G.; Olah, E. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci.* **1997**, *60*, 2157-2163.
- Cutler, G., J.; Nettleton, J., A.; Ross, J., A.; Harnack, L., J.; Jacobs, D., R., Jr.; Scraf-ford, C., G.; Barraji, L., M.; Mink, P., J.; Robien, K. Dietary flavonoid intake and risk of cancer in postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 664-671.
- Cuyckens, F.; Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1-15.
- D'Incecco, N.; Bartowsky, E.; Kassara, S.; Lante, A.; Spettoli, P.; Henschke, P. Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation. *Food Microbiol.* **2004**, *21*, 257-265.
- de Whalley, C. V.; Rankin, S. M.; Hoult, J. R.; Jessup, W.; Leake, D. S. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 1743-1750.
- Defilippi, B. G.; Dandekar, A. M.; Kader, A. A. Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh) fruits. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5694-5701.
- del Campo, G.; Berregi, I.; Iturriza, N.; Santos, J. I. Ripening and changes in chemical composition of seven cider apple varieties. *Food Sci. Technol. Int. (London, U. K.)* **2006**, *12*, 477-487.
- Depeint, F.; Gee, J. M.; Williamson, G.; Johnson, I. T. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc. Nutr. Soc.* **2002**, *61*, 97-103.
- Dimick, P. S.; Hoskin, J. C. Review of apple flavor - state of the art. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1983**, *18*, 387-409.
- Divi, R. L.; Doerge, D. R. Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 16-23.
- Dixon, R. A.; Steele, C. L. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* **1999**, *4*, 394-400.
- Dreiseitel, A.; Schreier, P.; Oehme, A.; Locher, S.; Hajak, G.; Sand, P. G. Anthocyanins and their metabolites are weak inhibitors of cytochrome P450 3A4. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 1428-1433.
- Duarte, J.; Perez-Palencia, R.; Vargas, F.; Ocete, M. A.; Perez-Vizcaino, F.; Zarzuelo, A.; Tamargo, J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *133*, 117-124.
- DuBois, R. N.; Tsujii, M.; Bishop, P.; Awad, J. A.; Makita, K.; Lanahan, A. Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* **1994**, *266*, G822-827.
- Dutta-Roy, A. K.; Gordon, M. J.; Kelly, C.; Hunter, K.; Crosbie, L.; Knight-Carpentier, T.; Williams, B. C. Inhibitory effect of Ginkgo biloba extract on human platelet aggregation. *Platelets* **1999**, *10*, 298-305.

- Ehrenkranz, J. R. L.; Lewis, N. G.; Kahn, C. R.; Roth, J. Phlorizin: a review. *Diabetes/Metab. Res. Rev.* **2005**, *21*, 31-38.
- El Modafar, C.; El Boustani, E. S. The role of phenols in plant defense mechanisms. *Biopestic. Plant Origin* **2005**, 157-171.
- Eldridge, A. C.; Kwolek, W. F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition. *J. Agric. Food Chem.* **1983**, *31*, 394-396.
- Evans, P.; Halliwell, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutr.* **2001**, *85*, S67-S74.
- Evers, D. L.; Chao, C.-F.; Wang, X.; Zhang, Z.; Huong, S.-M.; Huang, E.-S. Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: Studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Res.* **2005**, *68*, 124-134.
- Ferguson, L. R.; Philpott, M.; Karunasinghe, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology* **2004**, *198*, 147-159.
- Ferrandino, A.; Duverney, C.; Di Stefano, R. The evolution of apple volatiles during storage as influenced by fruit maturity. *Ital. J. Food Sci.* **2007**, *19*, 375-389.
- Finkel, T.; Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature (London)* **2000**, *408*, 239-247.
- Finlay, G. J. Genetics, molecular biology and colorectal cancer. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1993**, *290*, 3-12.
- Forkmann, G.; Heller, W. In *Compr. Nat. Prod. Chem.*; Elsevier: Amsterdam, 1999; Vol. 1, p 713-748.
- Formica, J. V.; Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* **1995**, *33*, 1061-1080.
- Forth, W.; Aktories, K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*; 9th ed.; Elsevier Urban & Fischer: München, 2006.
- Fridrich, D.; Kern, M.; Fritz, J.; Pahlke, G.; Kohler, N.; Winterhalter, P.; Marko, D. The epidermal growth factor receptor and human topoisomerases represent potential cellular targets of oligomeric procyanidins. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007a**, *51*, 192-200.
- Fridrich, D.; Kern, M.; Pahlke, G.; Volz, N.; Will, F.; Dietrich, H.; Marko, D. Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells. *Mol Nutr Food Res* **2007b**, *51*, 594-601.
- Fridrich, D.; Kern, M.; Pahlke, G.; Volz, N.; Will, F.; Dietrich, H.; Marko, D. Apple polyphenols diminish the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in HT29 colon carcinoma cells. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007c**, *51*, 594-601.
- Galensa, R.; Ara, V.; Siewek, F. Content of naringin in orange juices. *Fluess. Obst* **1986**, *53*, 454, 456.
- Gallus, S.; Talamini, R.; Giacosa, A.; Montella, M.; Ramazzotti, V.; Franceschi, S.; Negri, E.; La Vecchia, C. Does an apple a day keep the oncologist away? *Ann. Oncol.* **2005**, *16*, 1841-1844.
- Ganguly, C.; Saha, P.; Panda Chinmay, K.; Das, S. Inhibition of growth, induction of apoptosis and alteration of gene expression by tea polyphenols in the highly metastatic human lung cancer cell line NCI-H460. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2005**, *6*, 326-331.
- Garcia-Closas, R.; Gonzalez, C. A.; Agudo, A.; Riboli, E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control* **1999**, *10*, 71-75.

- Gastpar, R. Immunchemische Protein-Tyrosin-Kinase-Assays für die wirkmechanistischen Untersuchungen neuer 2-Phenylindol- und 2-Phenylbenzo[b]thiophenderivate. Dissertation, Universität Regensburg, 1997.
- Gatto, M. T.; Falcochio, S.; Grippa, E.; Mazzanti, G.; Battinelli, L.; Nicolosi, G.; Lambusta, D.; Saso, L. Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 269-272.
- George, J. N. Platelets. *Lancet* **2000**, *355*, 1531-1539.
- Gerhäuser, C. Flavonoids and other dietary plant constituents. What is of practical relevance? should we modify our eating habits? *Aktuel. Ernährungsmed.* **2001**, *26*, 137-143.
- Gerhäuser, C.; Klimo, K.; Heiss, E.; Neumann, I.; Gamal-Eldeen, A.; Knauff, J.; Liu, G.-Y.; Sitthimonchai, S.; Frank, N. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2003**, *523-524*, 163-172.
- Gliszczynska-Swiglo, A.; Tyrakowska, B. Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity. *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 1844-1849.
- Gonzalez, M. E.; Martinez-Abarca, F.; Carrasco, L. Flavonoids: potent inhibitors of poliovirus RNA synthesis. *Antiviral Chem.* **1990**, *1*, 203-209.
- Grandis, J. R.; Melhem, M. F.; Barnes, E. L.; Tweardy, D. J. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer (N. Y.)* **1996**, *78*, 1284-1292.
- Grimmer, H. R.; Parbhoo, V.; McGrath, R. M. Antimutagenicity of polyphenol-rich fractions from Sorghum bicolor grain. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, *59*, 251-256.
- Grisebach, H.; Barz, W. Biochemistry of flavonoids. *Naturwissenschaften* **1969**, *56*, 538-544.
- Gu, L.; House, S. E.; Wu, X.; Ou, B.; Prior, R. L. Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4057-4061.
- Gu, L.; M.A., K.; J.F., H.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; R.L., P. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7513-7521.
- Guerrero, J. A.; Lozano, M. L.; Castillo, J.; Benavente-García, O.; Vicente, V.; Rivera, J. Flavonoids inhibit platelet function through binding to the thromboxane A₂ receptor. *J. Thromb. Haemost.* **2005**, *3*, 369-376.
- Guyot, S.; Le Bourvellec, C.; Marnet, N.; Drilleau, J. F. Procyanidins are the most abundant polyphenols in dessert apples at maturity. *Lebensm.-Wiss. Technol.* **2002**, *35*, 289-291.
- Guyot, S.; Marnet, N.; Drilleau, J.-F. Thiolytic-HPLC Characterization of Apple Procyanidins Covering a Large Range of Polymerization States. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 14-20.
- Guyot, S.; Marnet, N.; Laraba, D.; Sanoner, P.; Drilleau, J. F. Reversed-Phase HPLC following Thiolytic 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.

- Guyot, S.; Marnet, N.; Sanoner, P.; Drilleau, J.-F. Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6240-6247.
- Hädrich, J.; Vogelsang, J. Konzept '96 zur Ermittlung von Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. *Dt. Lebensm.-Rundsch* **1996**, *92*, 341–350.
- Halliwell, B. In *Antioxidants in disease mechanisms and therapy*; Sies, H., Ed.; Academic Press: San Diego, 1997, p 3-20.
- Halliwell, B.; Zhao, K.; Whiteman, M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action? *Free Radic Res* **2000**, *33*, 819-830.
- Hallwachs, R. Untersuchungen zur Bedeutung von Rotweininhaltsstoffen bei der Regulation intrazellulärer Signalwege in humanen Endothelzellen *in vitro*. Dissertation, Universität München, 2005.
- Han, J.; Sun, M.; Cui, Y.; Wang, T.; Zhang, W.; Guo, M.; Zhou, Y.; Liu, W.; Zhang, M.; Duan, J.; Xiong, S.; Yao, M.; Yan, X. Kushen flavonoids induce apoptosis in tumor cells by inhibition of NF- κ B activation and multiple receptor tyrosine kinase activities. *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 262-268.
- Harborne, J., B. *The flavonoids: Advances in research since 1986*; Chapman & Hall: London, 1994.
- Harborne, J. B.; Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 481-504.
- Hardigree, A. A.; Epler, J. L. Comparative mutagenesis of plant flavonoids in microbial systems. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Test.* **1978**, *58*, 231-239.
- Hebert, C.; Charles, M. T.; Gauthier, L.; Willemot, C.; Khanizadeh, S.; Cousineau, J. Strawberry proanthocyanidins: Biochemical markers for Botrytis cinerea resistance and shelf-life predictability. *Acta Hortic.* **2002**, *567*, 659-662.
- Heiss, R. *Lebensmitteltechnologie*; 6th ed.; Springer: Berlin, 2004.
- Hemingway, R. W.; Foo, L. Y.; Porter, L. J. Linkage isomerism in trimeric and polymeric 2,3-cis-procyanidins. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 1209-1216.
- Hertog, M. G.; Feskens, E. J.; Hollman, P. C.; Katan, M. B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **1993**, *342*, 1007-1011.
- Hertog, M. G.; Feskens, E. J.; Hollman, P. C.; Katan, M. B.; Kromhout, D. Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutr. Cancer* **1994**, *22*, 175-184.
- Hilt, P.; Schieber, A.; Yildirim, C.; Arnold, G.; Klaiber, I.; Conrad, J.; Beifuss, U.; Carle, R. Detection of phloridzin in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) by HPLC-PDA-MS/MS and NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2896-2899.
- Hirano, T.; Gotoh, M.; Oka, K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. *Life Sci.* **1994**, *55*, 1061-1069.
- Hodek, P.; Trefil, P.; Stiborova, M. Flavonoids - potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P 450. *Chem.-Biol. Interact.* **2002**, *139*, 1-21.
- Hofmann, T.; Glabasnia, A.; Schwarz, B.; Wisman, K. N.; Gangwer, K. A.; Hagerman, A. E. Protein Binding and Astringent Taste of a Polymeric Procyanidin, 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl-beta -D-glucopyranose, Castalagin, and Grandinin. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9503-9509.

- Hollman, P. C. H.; Arts, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 1081-1093.
- Howell, A. B.; Reed, J. D.; Krueger, C. G.; Winterbottom, R.; Cunningham, D. G.; Leahy, M. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2281-2291.
- Huang, S.-W.; Frankel, E. N. Antioxidant Activity of Tea Catechins in Different Lipid Systems. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 3033-3038.
- Hubert, B.; Baron, A.; LeQuere, J. M.; Renard, C. M. G. C. Influence of Prefermentary Clarification on the Composition of Apple Musts. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5118-5122.
- Jacobsen, F. E.; Lewis, J. A.; Heroux, K. J.; Cohen, S. M. Characterization and evaluation of pyrone and tropolone chelators for use in metalloprotein inhibitors. *Inorg. Chim. Acta* **2007**, *360*, 264-272.
- Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G. O.; Slowing, K. V.; Thomas, C. F.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Mehta, R. G.; Moon, R. C.; Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science (Washington, D. C.)* **1997**, *275*, 218-220.
- Ji, L. L.; Leichtweis, S. Exercise and oxidative stress: sources of free radicals and their impact on antioxidant systems. *Age (Chester, Pa.)* **1997**, *20*, 91-106.
- Johnson, V. J.; He, Q.; Osuchowski, M. F.; Sharma, R. P. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: III. Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. *Planta Med.* **2003**, *69*, 44-49.
- Kahle, K.; Kraus, M.; Richling, E. Polyphenol profiles of apple juices. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 797-806.
- Kammerer, D.; Saleh, Z.; Carle, R.; Stanley, R. Adsorptive recovery of phenolic compounds from apple juice. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *224*, 605-613.
- Kaneda, I.; Kubo, F.; Sakurai, H. Antioxidative compounds in the extracts of black rice brans. *J. Health Sci.* **2006**, *52*, 495-511.
- Kang, I.-H.; Kim, H.-J.; Oh, H.; Park, Y. I.; Dong, M.-S. Biphasic effects of the flavonoids quercetin and naringenin on the metabolic activation of 2-amino-3,5-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline by *Salmonella typhimurium* TA1538 co-expressing human cytochrome P450 1A2, NADPH-cytochrome P450 reductase, and cytochrome b5. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2004**, *545*, 37-47.
- Kang, J. S.; Morimura, K.; Toda, C.; Wanibuchi, H.; Wei, M.; Kojima, N.; Fukushima, S. Testicular toxicity of DEHP, but not DEHA, is elevated under conditions of thioacetamide-induced liver damage. *Reprod. Toxicol.* **2006**, *21*, 253-259.
- Karonen, M.; Ossipov, V.; Sinkkonen, J.; Lopenen, J.; Haukioja, E.; Pihlaja, K. Quantitative analysis of polymeric proanthocyanidins in birch leaves with normal-phase HPLC. *Phytochem. Anal.* **2006**, *17*, 149-156.
- Kaul, T. N.; Middleton, E., Jr.; Ogra, P. L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol.* **1985**, *15*, 71-79.
- Kavvadias, D.; Beuerle, T.; Wein, M.; Boss, B.; Koenig, T.; Schwab, W. Novel 1,3-Dioxanes from Apple Juice and Cider. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 5178-5183.
- Kavvadias, D.; Sand, P.; Youdim, K. A.; Qaiser, M. Z.; Rice-Evans, C.; Baur, R.; Sigel, E.; Rausch, W. D.; Riederer, P.; Schreier, P. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. *Br. J. Pharmacol.* **2004**, *142*, 811-820.

- Kawai, K.; Tsuno, N. H.; Kitayama, J.; Okaji, Y.; Yazawa, K.; Asakage, M.; Hori, N.; Watanabe, T.; Takahashi, K.; Nagawa, H. Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2003**, *112*, 951-957.
- Kawaii, S.; Tomono, Y.; Katase, E.; Ogawa, K.; Yano, M. Quantitation of Flavonoid Constituents in Citrus Fruits. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3565-3571.
- Kern, M. Beeinflussung zellulärer Signaltransduktionskaskaden durch Apfelpolyphenole und deren mikrobielle Abbauprodukte in humanen Kolonkarzinomzellen. TU Kaiserslautern, 2006.
- Kern, M.; Pahlke, G.; Balavenkatraman, K. K.; Bohmer, F. D.; Marko, D. Apple polyphenols affect protein kinase C activity and the onset of apoptosis in human colon carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4999-5006.
- Kern, M.; Tjaden, Z.; Ngiewih, Y.; Puppel, N.; Will, F.; Dietrich, H.; Pahlke, G.; Marko, D. Inhibitors of the epidermal growth factor receptor in apple juice extract. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 317-328.
- Kiehne, A.; Engelhardt, U. H. Thermospray-LC-MS analysis of various groups of polyphenols in tea. Part 1. Catechins, flavonol O-glycosides, and flavone C-glycosides. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1996**, *202*, 48-54.
- Kijima, I.; Phung, S.; Hur, G.; Kwok, S.-L.; Chen, S. Grape Seed Extract Is an Aromatase Inhibitor and a Suppressor of Aromatase Expression. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 5960-5967.
- Kim, D. W.; Jun, S.-S.; Hong, Y.-N. Photosynthetic response and protective regulation to ultraviolet-B radiation in green pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *J. Photosci.* **2001**, *8*, 1-7.
- Kim, S. K.; Kim, H. J.; Choi, S. E.; Park, K. H.; Choi, H. K.; Lee, M. W. Anti-oxidative and inhibitory activities on nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (COX-2) production of flavonoids from seeds of *Prunus tomentosa* Thunberg. *Arch. Pharmacol. Res.* **2008**, *31*, 424-428.
- Klick, S.; Herrmann, K. Determination of hydroxybenzoic acid compounds in spices and other plant-derived foods. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1988**, *187*, 444-450.
- Knaggs, A. R. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 119-136.
- Knaggs, A. R. The biosynthesis of shikimate metabolites (1998). *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 269-292.
- Kneer, R.; Poulev, A. A.; Olesinski, A.; Raskin, I. Characterization of the elicitor-induced biosynthesis and secretion of genistein from roots of *Lupinus luteus* L. *J. Exp. Bot.* **1999**, *50*, 1553-1559.
- Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Jarvinen, R.; Rissanen, H.; Heliovaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T.; Aromaa, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 560-568.
- Kohen, R.; Nyska, A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Pathol.* **2002**, *30*, 620-650.
- Kondo, N.; Kawashima, M. Enhancement of the tolerance to oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L) seedlings by UV-B irradiation: Possible involvement of phenolic compounds and antioxidative enzymes. *J. Plant Res.* **2000**, *113*, 311-317.
- Korte, G. Flavonoid-induzierte Cytotoxizität, Neuroprotektion und Immunmodulation im Zellmodell. Dissertation, Universität Würzburg, 2007.

- Kuhn Merrily, A. Oxygen free radicals and antioxidants. *Am. J. Nurs.* **2003**, *103*, 58-62.
- Kuo, S.-M.; Huang, C.-T.; Blum, P.; Chang, C. Quercetin cumulatively enhances copper induction of metallothionein in intestinal cells. *Biol. Trace Elem. Res.* **2001**, *84*, 1-10.
- Lambert, J. D.; Sang, S.; Yang, C. S. Possible Controversy over Dietary Polyphenols: Benefits vs Risks. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 583-585.
- Lapidot, T.; Walker, M. D.; Kanner, J. Antioxidant and Prooxidant Effects of Phenolics on Pancreatic beta -Cells in Vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2002a**, *50*, 7220-7225.
- Lapidot, T.; Walker, M. D.; Kanner, J. Can Apple Antioxidants Inhibit Tumor Cell Proliferation? Generation of H₂O₂ during Interaction of Phenolic Compounds with Cell Culture Media. *J. Agric. Food Chem.* **2002b**, *50*, 3156-3160.
- Larson, R. A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 969-978.
- Lazarus, S. A.; Adamson, G. E.; Hammerstone, J. F.; Schmitz, H. H. High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Proanthocyanidins in Foods and Beverages. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3693-3701.
- Le Bail, J.-C.; Pouget, C.; Fagnere, C.; Basly, J.-P.; Chulia, A.-J.; Habrioux, G. Chalcones are potent inhibitors of aromatase and 17[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase activities. *Life Sci.* **2001**, *68*, 751-761.
- Le Bourvellec, C.; Bouchet, B.; Renard, C. M. G. C. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III: Study on model polysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2005**, *1725*, 10-18.
- Le Bourvellec, C.; Le Quere, J.-M.; Renard, C. M. G. C. Impact of noncovalent interactions between apple condensed tannins and cell walls on their transfer from fruit to juice: Studies in model suspensions and application. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7896-7904.
- Le Guerneve, C.; Sanoner, P.; Drilleau, J.-F.; Guyot, S. New compounds obtained by enzymatic oxidation of phloridzin. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6673-6677.
- Le Marchand, L.; Murphy, S. P.; Hankin, J. H.; Wilkens, L. R.; Kolonel, L. N. Intake of Flavonoids and Lung Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 154-160.
- Lea, A. G. H.; Arnold, G. M. The phenolics of ciders: bitterness and astringency. *J. Sci. Food Agric.* **1978**, *29*, 478-483.
- Lee, C.-S.; Wang, J.-S.; Chen, K. C.-S. Chemical constituents from the roots of *Zizyphus jujuba* Mill. var. *spinosa*. (I). *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei)* **1995**, *42*, 77-82.
- Lee, L.-T.; Huang, Y.-T.; Hwang, J.-J.; Lee, A. Y. L.; Ke, F.-C.; Huang, C.-J.; Kandaswami, C.; Lee, P.-P. H.; Lee, M.-T. Transinactivation of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and focal adhesion kinase phosphorylation by dietary flavonoids: effect on invasive potential of human carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 2103-2114.
- Lee, S. F.; Lin, J. K. Inhibitory effects of phytopolyphenols on TPA-induced transformation, PKC activation, and c-jun expression in mouse fibroblast cells. *Nutr. Cancer* **1997**, *28*, 177-183.
- Lee, S. H.; Park, Y. B.; Bae, K. H.; Bok, S. H.; Kwon, Y. K.; Lee, E. S.; Choi, M. S. Cholesterol-lowering activity of naringenin via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase in rats. *Ann. Nutr. Metab.* **1999**, *43*, 173-180.
- Leu, S. J.; Lin, Y. P.; Lin, R. D.; Wen, C. L.; Cheng, K. T.; Hsu, F. L.; Lee, M. H. Phenolic constituents of *Malus doumeri* var. *formosana* in the field of skin care. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 740-745.

- LeWitt, P. A.; Taylor, D. C. Protection against Parkinson's disease progression: clinical experience. *Neurotherapeutics* **2008**, *5*, 210-225.
- Li, B. Q.; Fu, T.; Dongyan, Y.; Mikovits, J. A.; Ruscetti, F. W.; Wang, J. M. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *276*, 534-538.
- Li, N.; Liu, J.-H.; Zhang, J.; Yu, B.-Y. Comparative Evaluation of Cytotoxicity and Antioxidative Activity of 20 Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3876-3883.
- Lieberei, R.; Reisdorff, C. *Nutzpflanzenkunde*; 7th ed.; Thieme: Stuttgart, 2007.
- Liu, S.; Lu, H.; Zhao, Q.; He, Y.; Niu, J.; Debnath, A. K.; Wu, S.; Jiang, S. Theaflavin derivatives in black tea and catechin derivatives in green tea inhibit HIV-1 entry by targeting gp41. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2005**, *1723*, 270-281.
- Lu, Y.; Foo, L. Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chem.* **1997**, *59*, 187-194.
- Luceri, C.; Caderni, G.; Sanna, A.; Dolara, P. Red wine and black tea polyphenols modulate the expression of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and glutathione-related enzymes in azoxymethane-induced f344 rat colon tumors. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1376-1379.
- MacDonald, R. S.; Guo, J.; Copeland, J.; Browning, J. D., Jr.; Sleper, D.; Rottinghaus, G. E.; Berhow, M. A. Environmental influences on isoflavones and saponins in soybeans and their role in colon cancer. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1239-1242.
- Mamot, C.; Drummond, D. C.; Greiser, U.; Hong, K.; Kirpotin, D. B.; Marks, J. D.; Park, J. W. Epidermal growth factor receptor (EGFR)-targeted immunoliposomes mediate specific and efficient drug delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing tumor cells. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3154-3161.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727-747.
- Marko, D.; Puppel, N.; Tjaden, Z.; Jakobs, S.; Pahlke, G. The substitution pattern of anthocyanidins affects different cellular signaling cascades regulating cell proliferation. *Mol. Nutr. Food Res.* **2004**, *48*, 318-325.
- Marks, S. C.; Mullen, W.; Crozier, A. Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 719-728.
- Mateus, N.; Silva, A. M. S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C.; de Freitas, V. Identification of Anthocyanin-Flavanol Pigments in Red Wines by NMR and Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2110-2116.
- Matthews, S.; Mila, I.; Scalbert, A.; Donnelly, D. M. X. Extractable and non-extractable proanthocyanidins in barks. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 405-410.
- Mattila, P.; Kumpulainen, J. Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3660-3667.
- Mazza, G.; Miniati, E. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains* CRC Press Inc: Boca Raton, 1993.
- Meagher, L. P.; Beecher, G. R. Assessment of Data on the Lignan Content of Foods. *J. Food Compos. Anal.* **2000**, *13*, 935-947.
- Meiers, S.; Kemeny, M.; Weyand, U.; Gastpar, R.; von Angerer, E.; Marko, D. The Anthocyanidins Cyanidin and Delphinidin Are Potent Inhibitors of the Epidermal Growth-Factor Receptor. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 958-962.

- Melidou, M.; Riganakos, K.; Galaris, D. Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation. *Free Radic. Biol. Med.* **2005**, *39*, 1591-1600.
- Meragelman, T. L.; Tucker, K. D.; McCloud, T. G.; Cardellina, J. H., II; Shoemaker, R. H. Antifungal Flavonoids from *Hildegardia barteri*. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1790-1792.
- Metodiewa, D.; Jaiswal, A. K.; Cenas, N.; Dickancaite, E.; Segura-Aguilar, J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 107-116.
- Michels, G.; Waetjen, W.; Niering, P.; Steffan, B.; Thi, Q. H. T.; Chovolou, Y.; Kampkoetter, A.; Bast, A.; Proksch, P.; Kahl, R. Pro-apoptotic effects of the flavonoid luteolin in rat H4IIE cells. *Toxicology* **2005**, *206*, 337-348.
- Middleton, E., Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *439*, 175-182.
- Middleton, E., Jr.; Kandaswami, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43*, 1167-1179.
- Middleton, E., Jr.; 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.
- Milde, J.; Elstner, E. F.; Grassmann, J. Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, gamma-terpinene, and ascorbic acid. *Phytomedicine* **2004**, *11*, 105-113.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C. A. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and black currant drink. *Food Chem.* **1997**, *60*, 331-337.
- Muir, A. D. Flax lignans-analytical methods and how they influence our understanding of biological activity. *J. AOAC Int.* **2006**, *89*, 1147-1157.
- Murphy, A.; Peer, W. A.; Taiz, L. Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* **2000**, *211*, 315-324.
- Narender, T.; Khaliq, T.; Puri, A.; Chander, R. Antidyslipidemic activity of furanoflavonoids isolated from *Indigofera tinctoria*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3411-3414.
- Neiva, T. J.; Morais, L.; Polack, M.; Simoes, C. M.; D'Amico, E. A. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. *Phytother. Res.* **1999**, *13*, 597-600.
- Neto, C. C.; Amoroso, J. W.; Liberty, A. M. Anticancer activities of cranberry phytochemicals: An update. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, S18-S27.
- Nybom, H.; Rumpunen, K.; Hovmalm, H. P.; Marttila, S.; Rur, M.; Garkava-Gustavsson, L.; Olsson, M. E. Towards a healthier apple - chemical characterization of an apple gene bank. *Acta Hort.* **2008**, *765*, 157-164.
- Oboh, G.; Rocha, J. B. T. Antioxidants in foods: A new challenge for food processors. *Leading Edge Antioxid. Res.* **2007**, 35-64.
- Ochel, H. J.; Gademann, G. Heat-shock protein 90: potential involvement in the pathogenesis of malignancy and pharmacological intervention. *Onkologie* **2002**, *25*, 466-473.
- Oki, T.; Kobayashi, M.; Nakamura, T.; Okuyama, A.; Masuda, M.; Shiratsuchi, H.; Suda, I. Changes in radical-scavenging activity and components of mulberry fruit during maturation. *J. Food Sci.* **2006**, *71*, C18-C22.

- Orner, G. A.; Dashwood, W. M.; Blum, C. A.; Diaz, G. D.; Li, Q.; Dashwood, R. H. Suppression of tumorigenesis in the Apc(min) mouse: down-regulation of beta-catenin signaling by a combination of tea plus sulindac. *Carcinogenesis* **2003**, *24*, 263-267.
- Oszmianski, J.; Wojdylo, A. Effect of pectolytic enzyme preparations on the phenolic composition and antioxidant activity of apple juice. *Fruit Process.* **2006**, *16*, 322-329.
- Oszmianski, J.; Wolniak, M.; Wojdylo, A.; Wawer, I. Comparative study of polyphenolic content and antiradical activity of cloudy and clear apple juices. *J. Sci. Food Agric.* **2007**, *87*, 573-579.
- Ota, T.; Tsukamoto, S.; (Kanazawa University, Japan). Application: JP, 2006, p 11.
- Otto, A. M. [Phytoestrogens: potential agents for prevention and treatment of breast cancer. 2. Estrogenic and antiestrogenic plant substances]. *Pharm. Unserer Zeit* **2000**, *29*, 91-99.
- Paganga, G.; Al-Hashim, H.; Khodr, H.; Scott, B. C.; Aruoma, O. I.; Hider, R. C.; Halliwell, B.; Rice-Evans, C. A. Mechanisms of antioxidant activities of quercetin and catechin. *Redox Rep.* **1996**, *2*, 359-364.
- Pan, L. Charakterisierung des darmkrebspräventiven Potenzials von Apfelsaft und polyphenolischen Apfelsaftinhaltsstoffen in vitro und in vivo. Technische Universität München, 2006.
- Park, H. J.; Kim, M. J.; Ha, E.; Chung, J. H. Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 147-151.
- Patel, R.; Krishnan, R.; Ramchandani, A.; Maru, G. Polymeric black tea polyphenols inhibit mouse skin chemical carcinogenesis by decreasing cell proliferation. *Cell Prolif.* **2008**, *41*, 532-553.
- Patel, R.; Maru, G. Polymeric black tea polyphenols induce phase II enzymes via Nrf2 in mouse liver and lungs. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *44*, 1897-1911.
- Peluso, M. R. Flavonoids attenuate cardiovascular disease, inhibit phosphodiesterase, and modulate lipid homeostasis in adipose tissue and liver. *Exp. Biol. Med. (Maywood, NJ, U. S.)* **2006**, *231*, 1287-1299.
- Perva-Uzunalic, A.; Skerget, M.; Knez, Z.; Weinreich, B.; Otto, F.; Gruener, S. Extraction of active ingredients from green tea (*Camellia sinensis*): Extraction efficiency of major catechins and caffeine. *Food Chem.* **2006**, *96*, 597-605.
- Pietta, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035-1042.
- Pirkle, W. H.; McKendry, L. H. Multiplicity of the reactive 2-pyrone excited states. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 5279-5282.
- Plumb, G. W.; De Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Cheynier, V.; Williamson, G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radic. Res.* **1998**, *29*, 351-358.
- Porter, L. J.; Hrstich, L. N.; Chan, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 223-230.
- Porter, L. J.; Ma, Z.; Chan, B. G. Cacao procyanidins: major flavanoids and identification of some minor metabolites. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1657-1663.
- Poulsen, H. E.; Prieme, H.; Loft, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur. J. Cancer Prev.* **1998**, *7*, 9-16.

- Prior, R. L.; Gu, L. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2264-2280.
- Prochaska, H. J.; Santamaria, A. B. Direct measurement of NAD(P)H:quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.* **1988**, *169*, 328-336.
- Prochaska, H. J.; Santamaria, A. B.; Talalay, P. Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 2394-2398.
- Ramakrishna, V.; Jalkhani, R. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetol.* **2008**, *45*, 41-46.
- Ratty, A. K.; Sunamoto, J.; Das, N. P. Interaction of flavonoids with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 989-995.
- Rein, D.; Paglieroni, T. G.; Wun, T.; Pearson, D. A.; Schmitz, H. H.; Gosselin, R.; Keen, C. L. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 30-35.
- Renard, C., M. G. C.; Dupont, N.; Guillermin, P. Concentrations and characteristics of procyanidins and other phenolics in apples during fruit growth. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1128-1138.
- Renard Catherine, M. G. C.; Dupont, N.; Guillermin, P. Concentrations and characteristics of procyanidins and other phenolics in apples during fruit growth. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1128-1138.
- Renard, C. M. G. C.; Baron, A.; Guyot, S.; Drilleau, J. F. Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences. *Int. J. Biol. Macromol.* **2001**, *29*, 115-125.
- Reuber, S.; Bornman, J. F.; Weissenboeck, G. Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Secale cereale*). Light response of their metabolism and the possible role of UV-B protection. *Physiol. Plant.* **1996**, *97*, 160-168.
- Reutrakul, V.; Ningnuek, N.; Pohmakotr, M.; Yoosook, C.; Napaswad, C.; Kasisit, J.; Santisuk, T.; Tuchinda, P. Anti HIV-1 flavonoid glycosides from *Ochna integerima*. *Planta Med.* **2007**, *73*, 683-688.
- Rice-Evans, C.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 933-956.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and isoflavonoids. *Antioxid. Health Dis.* **1998**, *7*, 199-219.
- Rice-Evans, C. A.; Packer, L. *Flavonoids in Health and Disease, Second Edition Revised and Expanded*. [In: *Oxid. Stress Dis.*, 2003; 9]; Marcel Dekker Inc.: New York, 2003.
- Risch, B.; Herrmann, K. Contents of hydroxycinnamic acid derivatives and catechins in pome and stone fruit. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* **1988**, *186*, 225-230.
- Robards, K.; Li, X.; Antolovich, M.; Boyd, S. Characterization of citrus by chromatographic analysis of flavonoids. *J. Sci. Food Agric.* **1997**, *75*, 87-101.
- Rohr, G. E.; Meier, B.; Sticher, O. In *Studies in natural products Chemistry*; Rahman, A.-U., Ed.; Elsevier Science: Amsterdam, 2000, p 497-570.
- Rouseff, R. L.; Martin, S. F.; Youtsey, C. O. Quantitative survey of narirutin, naringin, hesperidin, and neohesperidin in citrus. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 1027-1030.

- Rucinska, A.; Kirko, S.; Gabryelak, T. Effect of the phytoestrogen, genistein-8-C-glucoside, on Chinese hamster ovary cells in vitro. *Cell Biol. Int.* **2007**, *31*, 1371-1378.
- Ruel, G.; Pomerleau, S.; Couture, P.; Lamarche, B.; Couillard, C. Changes in plasma antioxidant capacity and oxidized low-density lipoprotein levels in men after short-term cranberry juice consumption. *Metabolism* **2005**, *54*, 856-861.
- Rusznayk, S.; Szent-Györgyi, A. Vitamin P: flavonols as vitamins. *Nature* **1936**, *138*, 27.
- Sadik, C. D.; Sies, H.; Schewe, T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 773-781.
- Sahu, S.; Gray, G. C. Interactions of flavonoids, trace metals, and oxygen: nuclear DNA damage and lipid peroxidation induced by myricetin. *Cancer Lett. (Shannon, Irel.)* **1993**, *70*, 73-79.
- Sahu, S. C.; Gray, G. C. Kaempferol-induced nuclear DNA damage and lipid peroxidation. *Cancer Lett. (Shannon, Irel.)* **1994**, *85*, 159-164.
- Salomon, D. S.; Brandt, R.; Ciardiello, F.; Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1995**, *19*, 183-232.
- Sarawek, S.; Feistel, B.; Pischel, I.; Butterweck, V. Flavonoids of *Cynara scolymus* possess potent xanthinoxidase inhibitory activity in vitro but are devoid of hypouricemic effects in rats after oral application. *Planta Med.* **2008**, *74*, 221-227.
- Scalbert, A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. *Basic Life Sci.* **1992**, *59*, 259-280.
- Scalbert, A.; Haslam, E. Plant polyphenols and chemical defense. Part 2. Polyphenols and chemical defense of the leaves of *Quercus robur*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 3191-3195.
- Schaefer, S.; Baum, M.; Eisenbrand, G.; Dietrich, H.; Will, F.; Janzowski, C. Polyphenolic apple juice extracts and their major constituents reduce oxidative damage in human colon cell lines. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 24-33.
- Schieber, A.; Keller, P.; Carle, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., A* **2001**, *910*, 265-273.
- Schobinger, U. *Frucht und Gemüsesäfte: Technologie, Chemie, Analytik, Bedeutung, Recht*; 3rd ed.; Ulmer: Eugen, 2001.
- Sekher Pannala, A.; Chan, T. S.; O'Brien, P. J.; Rice-Evans, C. A. Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *282*, 1161-1168.
- Shahidi, F.; Naczk, M. *Food phenolics and Nutraceuticals: sources, chemistry, effects, applications* 2nd ed.; CRC Press Inc.: London, 2003.
- Shahidi, F.; Wanasundara, P. K. J. P. D. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1992**, *32*, 67-103.
- Shinoda, Y.; Komura, H.; Homma, S.; Murata, M. Browning of model orange juice solution: Factors affecting the formation of decomposition products. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2005**, *69*, 2129-2137.
- Shirley, B. W. Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends Plant Sci.* **1996**, *1*, 377-382.

- Shoji, T.; Masumoto, S.; Moriichi, N.; Kanda, T.; Ohtake, Y. Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1102*, 206-213.
- Sies, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* **1991**, *91*, 31S-38.
- Skibola, C. F.; Smith, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, *29*, 375-383.
- Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76-85.
- Souci, S.-W.; Scherz, H. *Food composition and nutrition tables*; 4th ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 1989; Vol. 4th.
- Sporn, M. B.; Newton, D. L. Chemoprevention of cancer with retinoids. *Fed. Proc.* **1979**, *38*, 2528-2534.
- Srinivasan, P.; Suchalatha, S.; Babu, P. V. A.; Devi, R. S.; Narayan, S.; Sabitha, K. E.; Shyamala Devi, C. S. Chemopreventive and therapeutic modulation of green tea polyphenols on drug metabolizing enzymes in 4-Nitroquinoline 1-oxide induced oral cancer. *Chem.-Biol. Interact.* **2008**, *172*, 224-234.
- Staprans, I.; Pan, X. M.; Rapp, J. H.; Feingold, K. R. The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 1075-1082.
- Stresser, D. M.; Turner, S. D.; McNamara, J.; Stocker, P.; Miller, V. P.; Crespi, C. L.; Patten, C. J. A High-Throughput Screen to Identify Inhibitors of Aromatase (CYP19). *Anal. Biochem.* **2000**, *284*, 427-430.
- Sudjaroen, Y.; Haubner, R.; Wurtele, G.; Hull, W. E.; Erben, G.; Spiegelhalder, B.; Changbumrung, S.; Bartsch, H.; Owen, R. W. Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1673-1682.
- Sun, W.; Wang, W.; Kim, J.; Keng, P.; Yang, S.; Zhang, H.; Liu, C.; Okunieff, P.; Zhang, L. Anti-cancer effect of resveratrol is associated with induction of apoptosis via a mitochondrial pathway alignment. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *614*, 179-186.
- Swain, T.; Hillis, W. E. Phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* **1959**, *10*, 63-68.
- Takahashi, N.; Fukui, T.; Iwahori, A.; Kubo, Y.; Hosoe, T.; Kawai, K. Induction of differentiation and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL60 cell line by a new type of steroids. *Exp. Cell Res.* **1998**, *245*, 313-320.
- Talalay, P. Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Adv. Enzyme Regul.* **1989**, *28*, 237-250.
- Talalay, P.; Fahey, J. W.; Holtzclaw, W. D.; Prester, T.; Zhang, Y. Chemoprotection against cancer by Phase 2 enzyme induction. *Toxicol. Lett.* **1995**, *82/83*, 173-179.
- Tatum, J. H.; Shaw, P. E.; Berry, R. E. Degradation products from ascorbic acid. *J. Agr. Food Chem.* **1969**, *17*, 38-40.
- Thiel, G.; Roessler, O. G. Signal transduction. Receptor-tyrosine kinases and intracellular signal cascades. *Biol. Unserer Zeit* **2005**, *35*, 312-319.
- Tomás-Barberán, F. A.; Blázquez, M. A.; Garcia-Viguera, C.; Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F. A comparative study of different amberlite XAD resins in flavonoid analysis. *Phytochem. Anal.* **1992**, *3*, 178-181.

- Tomás-Barberán, F. A.; Clifford, M. N. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000a**, *80*, 1024-1032.
- Tomás-Barberán, F. A.; Clifford, M. N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **2000b**, *80*, 1073-1080.
- Treutter, D. Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Reg.* **2001**, *34*, 71-89.
- Tsuji, S.; Tsujii, M.; Kawano, S.; Hori, M. Cyclooxygenase-2 upregulation as a perigenetic change in carcinogenesis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2001**, *20*, 117-129.
- Tucker, O. N.; Dannenberg, A. J.; Yang, E. K.; Zhang, F.; Teng, L.; Daly, J. M.; Soslow, R. A.; Masferrer, J. L.; Woerner, B. M.; Koki, A. T.; Fahey, T. J., III. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 987-990.
- Turini, M. E.; DuBois, R. N. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 35-57.
- Ukeda, H.; Maeda, S.; Ishii, T.; Sawamura, M. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'--1--(phenylamino)-carbonyl--3, 4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.* **1997**, *251*, 206-209.
- USAPPLE-Association 2007.
- Van Acker, S. A. B. E.; Van Balen, G. P.; Van Den Berg, D.-J.; Bast, A.; Van Der Vijgh, W. J. F. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 935-943.
- Van Amsterdam, F. T. M.; Roveri, A.; Maiorino, M.; Ratti, E.; Ursini, F. Lacidipine: a dihydropyridine calcium antagonist with antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* **1992**, *12*, 183-187.
- van der Sluis, A. A.; Dekker, M.; Skrede, G.; Jongen, W. M. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7211-7219.
- VdF 2008.
- Voss, C.; Zerban, H.; Bannasch, P.; Berger, M. R. Lifelong exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces tumors in liver and testes of Sprague-Dawley rats. *Toxicology* **2005**, *206*, 359-371.
- Vrhovsek, U.; Rigo, A.; Tonon, D.; Mattivi, F. Quantitation of Polyphenols in Different Apple Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6532-6538.
- Waetjen, W.; Chovolou, Y.; Kampkoetter, A.; Kahl, R. Anti- and prooxidative effects of flavonoids. *Leading Edge Antioxid. Res.* **2007**, 1-16.
- Wang, S. Y.; Zheng, W. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4977-4982.
- Wang, Y.; Chan, F. L.; Chen, S.; Leung, L. K. The plant polyphenol butein inhibits testosterone-induced proliferation in breast cancer cells expressing aromatase. *Life Sci.* **2005**, *77*, 39-51.
- Watzl, B.; Leitzmann, C. *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*; 3rd ed.; Hippokrates: Stuttgart, 2005.
- Watzl, B.; Rechkemmer, G. Flavonoids. *Ernaehr.-Umsch.* **2001**, *48*, 499-503.
- Weiss, J. M.; Ortmann, O. Das Karzinomrisiko von Frauen mit Syndrom der polyzystischen Ovarien (PCOS) *Der Gynäkologe* **2002**, *35*, 31-35.

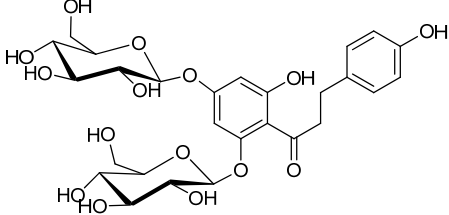
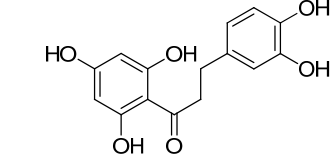
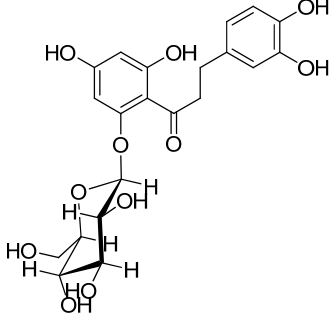
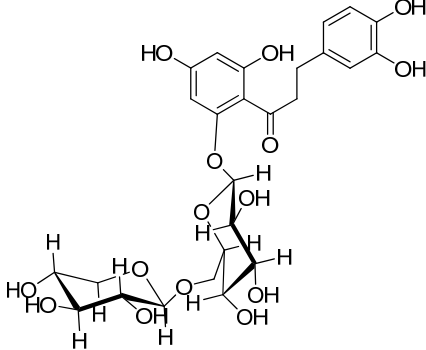
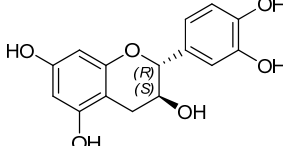
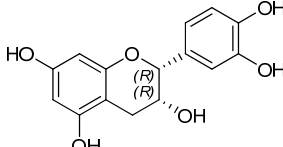
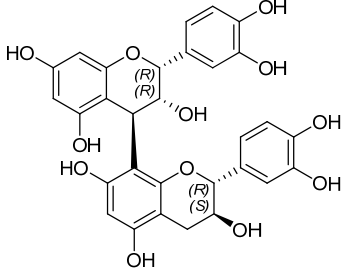
- Welton, A. F.; Hurley, J.; Will, P. Flavonoids and arachidonic acid metabolism. *Prog. Clin. Biol. Res.* **1988**, *280*, 301-312.
- Wenzel, U.; Kuntz, S.; Brendel, M. D.; Daniel, H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 3823-3831.
- Wiley, R. H.; Jarboe, C. H., Jr. 2-Pyrones. XIX. 3-Hydroxy-2-pyrone and 4-arylhydrazono-2,3-pyranones. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2398-2401.
- Will, F.; Ludwig, M.; Dietrich, H. Influence of the clarification and concentration of polyphenolic antioxidants of apple juices. *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **2007**, *103*, 301-306.
- Wills, R. B. H.; Stuart, D. L. Alkylamide and cichoric levels in *Echinacea purpurea* grown in Australia. *Food Chem.* **1999**, *67*, 385-388.
- Winkelmann, I.; Nassl, A. M.; Daniel, H.; Wenzel, U. Proteome response in HT-29 human colorectal cancer cells to two apoptosis-inducing compounds with different mode of action. *Int. J. Cancer* **2008**, *122*, 2223-2232.
- Wojdylo, A.; Oszmianski, J.; Laskowski, P. Polyphenolic Compounds and Antioxidant Activity of New and Old Apple Varieties. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6520-6530.
- Wood, N. Hepatolipidemic effects of naringenin in high cornstarch- versus high coconut oil-fed rats. *J. Med. Food* **2004**, *7*, 315-319.
- Wu, J.; Gao, H.; Zhao, L.; Liao, X.; Chen, F.; Wang, Z.; Hu, X. Chemical compositional characterization of some apple cultivars. *Food Chem.* **2007**, *103*, 88-93.
- Xu, Z.-R.; Lu, Y.-N.; Chai, X.-Y.; Ren, H.-Y.; Tu, P.-F. Chemical constituents from *Xylosma controversum*. *J. Chin. Pharm. Sci.* **2007**, *16*, 218-222.
- Yanagida, A.; Kanda, T.; Takahashi, T.; Kamimura, A.; Hamazono, T.; Honda, S. Fractionation of apple procyanidins according to their degree of polymerization by normal-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2000**, *890*, 251-259.
- Yang, E. B.; Guo, Y. J.; Zhang, K.; Chen, Y. Z.; Mack, P. Inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase by chalcone derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1550*, 144-152.
- Yokozawa, T.; Nakagawa, T.; Oya, T.; Okubo, T.; Juneja, L. R. Green tea polyphenols and dietary fibre protect against kidney damage in rats with diabetic nephropathy. *J. Pharm. Pharmacol.* **2005**, *57*, 773-780.
- Yuan, J.-P.; Chen, F. Degradation of Ascorbic Acid in Aqueous Solution. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 5078-5082.
- Zafrilla, P.; Ferreres, F.; Tomas-Barberan, F. A. Effect of Processing and Storage on the Antioxidant Ellagic Acid Derivatives and Flavonoids of Red Raspberry (*Rubus idaeus*) Jams. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 3651-3655.
- Zarkovic, N. Antioxidants in the prevention and chemotherapy of tumors. *Pharm. Ztg.* **2000**, *145*, 11-15.
- Zeßner, H. Bioaktivitätsgeleitete Isolierung der Polyphenole des Apfelsaftes. Dissertation, Universität des Saarlandes, 2005.
- Zessner, H.; Pan, L.; Will, F.; Klimo, K.; Knauft, J.; Niewöhner, R.; Hümmer, W.; Owen, R.; Richling, E.; Frank, N.; Schreier, P.; Becker, H.; Gerhauser, C. Fractionation of polyphenol-enriched apple juice extracts to identify constituents with cancer chemopreventive potential. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, S28-S44.

- Zhang, Q.; Zhao, X. H.; Wang, Z. J. Flavones and flavonols exert cytotoxic effects on a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by causing G2/M arrest and inducing apoptosis. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 2042-2053.
- Zhang, W.; Salomon, R. G. Oxidized phospholipids, isolevuglandins, and atherosclerosis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, *49*, 1050-1062.
- Zhang, Y. H.; Park, Y. S.; Kim, T. J.; Fang, L. H.; Ahn, H. Y.; Hong, J. T.; Kim, Y.; Lee, C. K.; Yun, Y. P. Endothelium-dependent vasorelaxant and antiproliferative effects of apigenin. *Gen. Pharmacol.* **2000**, *35*, 341-347.
- Zhao, H.; Yakar, S.; Gavrilova, O.; Sun, H.; Zhang, Y.; Kim, H.; Setser, J.; Jou, W.; LeRoith, D. Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes* **2004**, *53*, 2901-2909.
- Zhao, J.; Dasmahapatra, A. K.; Khan, S. I.; Khan, I. A. Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 387-393.

6 Strukturmatrix

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

Nr.	Systematischer-Name	Struktur
1	Chlorogensäure (5-Kaffeoylchinasäure)	
2	Kaffeesäure	
3	4-p-Cumaroylchinasäure	
4	5-p-Cumaroylchinasäure	
5	p-Cumarsäure	
6	Phloretin	
7	Phloretin-2'-O-glucosid (Phloridzin)	
8	Phloretin-2'-O-xyloglucosid	

Nr.	Systematischer-Name	Struktur
9	Phloretin-2'4'- <i>O</i> -diglucosid	
10	3-Hydroxy-phloretin	
11	3-Hydroxy-phloretin-2'- <i>O</i> -glucosid (3-Hydroxyphloridzin)	
12	3-Hydroxy-phloretin-2'- <i>O</i> -xyloglucosid	
13	(+) -Catechin	
14	(-) -Epicatechin	
15	Procyanidin B ₁	

Nr.	Systematischer-Name	Struktur
16	Procyanidin B ₂	
17	Polymere Procyanidine	
18	Quercetin	
19	Quercetin-3- <i>O</i> -glucosid	
20	Quercetin-3- <i>O</i> -galactosid	
21	Quercetin-3- <i>O</i> -xylosid	
22	Quercetin-3- <i>O</i> -arabinosid	

Nr.	Systematischer-Name	Struktur
23	Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid	
24	Quercetin-3- <i>O</i> -rutinosid	
25	Cyanidin	
26	(<i>R</i>)-Oktan-1,3-diol	
27	(<i>R</i>)-5-(<i>Z</i>)-Okten-1,3-diol	
28	3-Hydroxy- β -damascon	
29	3-Hydroxy-2-pyron	
30	Di-(2-ethyl-hexl)-phthalat	
31	β -Naphthoflavon	
32	Benzylmercaptan	
33	Corosolsäure	
Nr.	Systematischer-Name	Struktur
34	Schleimsäure (Galaktarsäure)	$ \begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{COOH} \end{array} $

7 Anhang

Tabelle 7.1 Polyphenolgehalte von uns untersuchten klaren und trüben Apfelsäften in mg/l

	AS05 klar	AS05 trüb	AS06 klar	AS06 trüb	AS07 klar	AS07 trüb
Catechin	2,5	5,9	8,7	6,9	2,6	8,0
Epicatechin	5,3	14,7	52,2	36,3	58,6	12,3
Procyanidin B ₁	1,2	3,8	5,7	8,5	10,8	19,2
Procyanidin B ₂	2,9	13,8	62,0	71,2	8,8	22,3
Σ Flavan-3-ole	11,9	38,2	128,6	122,9	80,8	61,8
Chlorogensäure	187,3	168,8	186,8	177,8	360,7	313,6
Kryptochlorogensäure	26,3	14,1	4,7	5,3	0,0	0,0
Kaffeesäure	n.d.	n.d.	n.d.	0,2	12,2	11,7
4- <i>p</i> -Cumaroylchinasäure	79,9	38,2	49,3	41,8	63,2	62,7
<i>p</i> -Cumarsäure	n.d.	n.d.	0,4	0,4	n.d.	n.d.
Σ phenolische Säuren	293,5	221,1	241,2	225,5	436,2	388,0
Phloretin-2'-xyloglucosid	25,1	65,8	40,6	40,9	51,3	44,3
Phloretin-2'-glucosid	24,4	22,8	11,6	9,0	52,2	43,3
Phloretin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3-Hydroxy-phloretin-xyloglucosid	3,1	6,7	6,6	6,4	22,2	18,5
3-Hydroxy-phloretin-2'-glucosid	3,4	3,7	1,7	1,7	9,1	7,7
Σ Dihydrochalkone	56,0	99,0	60,5	58,0	134,8	113,9
Quercetin-3- <i>O</i> -galactosid	1,3	1,2	1,5	1,3	1,6	1,5
Quercetin-3- <i>O</i> -glucosid	0,5	0,4	0,7	0,6	0,6	0,5
Quercetin-3- <i>O</i> -xylosid	n.d.	n.d.	0,5	0,3	n.d.	n.d.
Quercetin-3- <i>O</i> -arabinosid	n.d.	n.d.	0,8	0,4	n.d.	n.d.
Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid	1,2	1,3	2,1	1,5	2,0	1,7
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinosid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Quercetin	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,8	n.d.
Σ Flavonole	3,0	2,9	5,6	4,1	6,0	3,7
Summe	364,4	361,2	435,9	410,5	657,7	567,4

n.d.: nicht detektierbar

Tabelle 7.2 Polyphenolprofil der untersuchten Apfelsaftextrakte in mg/g

	Bohnapfel				Bittenfelder				AE02		AE03B		AE04		AE05				AE06				AE07				Handelsprobe			
	klar		trüb		klar		trüb		klar	klar	klar		klar		trüb		klar		trüb		klar		trüb		klar		trüb		trüb	
	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
(+)-Catechin	2,0	0,5	1,8	0,3	2,0	0,3	0,5	0,1	n.d.		2,7	0,3	n.d.	n.d.		1,4	0,5	2,1	0,1	1,6	1,1	1,0	0	3,8	0,2	7,5	0,2			
(-)-Epicatechin	26,4	0,6	32,1	0,3	7,1	0,3	7,4	0,2	19,2	0,3	17,7	0,5	12,5	2,1	5,9	0,6	6,6	1,0	44,3	1,2	42	0,2	8,7	1,6	12,3	0,4	7,1	0,6		
Procyanidin B1	3,1	0,5	3,6	0,8	1,7	0,7	3,8	0,6	7,0	0,4	6,2	0,7	n.d.		2,4	0,1	11,0	1,2	5,1	0,1	8,1	0,7	n.d.	n.d.			5,3	0,4		
Procyanidin B2	12,9	0,3	15,1	1,0	8,0	0,7	12,5	1,0	15,1	0,2	18,4	0,4	12,1	2,0	n.d.		16,7	1,1	30,6	1,1	37,9	0,1	11,9	0,5	14,4	0,4	5,7	0,2		
Σ flavan-3-ole	44,4	0,6	52,6	1,7	18,8	0,1	24,2	1,3	41,3	0,3	45,0	0,6	24,6	2,0	8,3	0,7	35,7	1,9	82,1	2,5	89,6	1,0	21,6	2,2	30,5	0,9	25,6	0,6		
3-Hydroxy-Phloretin-2'-xyloglucosid	10,3	0,8	11,4	0,4	2,9	0,1	4,1	0,1	2,3	0,6	4,8	0,3	6,7	0,4	2,5	0,0	5,5	0,3	5,9	0,0	5,4	0,0	19,9	0,2	17,5	0,9	0,6	0,1		
3-Hydroxy-Phloretin-2'-glucosid	1,8	0,2	1,8	0,2	4,1	0,1	2,9	0,0	1,1	0,0	7,8	2,1	4,3	0,3	3,3	0,0	3,2	0,2	2,1	0,4	1,5	0,1	7,7	1,0	6,9	0,6	4,7	0,2		
Phloretin-2',4'-diglucosid *	1,6	0,2	1,5	0,1	1,0	0,2	0,8	0,0	0,3	0,1	n.d.		0,9	0,3	0,6	0,1	0,6	0,2	0,6	0,1	0,7	0,1	0,5	0,2	0,6	0,2	1,6	0,3		
Phloretin 2'-xyloglucosid	38,1	3,2	43,8	1,3	11,2	1,2	12,9	0,3	69,5	0,9	31,7	0,5	68,9	2,1	28,2	2,2	24,3	1,8	30,8	0,9	27,8	1,4	48,5	0,7	54,9	1,8	50,3	1,2		
Phloretin 2'-glucosid	11,1	1,2	12,4	0,6	30,1	0,6	34,4	1,3	27,9	0,7	78,9	0,7	48,0	1,4	28,7	0,6	25,2	1,9	14,2	0,6	11,3	0,2	18,9	0,1	21,7	0,7	14,5	0,9		
Phloretin	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		1,8	0,2		
Σ Dihydrochalkone	62,9	2,1	70,9	0,5	49,3	1,8	55,1	1,6	101,1	0,8	123,2	0,6	128,8	3,5	63,3	1,5	58,8	2,0	53,6	1,8	46,7	1,7	95,5	0,9	101,6	2,5	73,5	0,5		
Chlorogensäure	114,6	3,1	136,7	1,3	121,3	2,1	134,3	3,0	181,5	2,0	19,2	1,0	183,2	3,2	183,9	2,5	154,4	2,9	169,0	3,4	148,1	0,2	132,2	1,	119,8	2,3	167,7	2,5		
Kaffeesäure	11,1	1,7	8,2	0,9	15,9	0,5	7,7	0,5	4,8	0,5	4,0	0,4	7,5	1,6	3,9	0,2	9,1	0,6	5,2	0,0	4,7	0,0			16,4	0,5	8,0	0,2		
4- <i>p</i> -Cumaroylchinasäure	6,4	0,1	7,2	0,1	23,6	0,7	23,5	1,7	77,3	0,2	5,0	0,3	66,0	1,4	84,9	2,0	23,5	1,4	4,8	0,1	7,6	0,1	76,1	1,0	98,0	2,9	17,5	0,3		
Cumarsäure	4,4	0,3	4,3	0,2	4,1	0,2	4,1	0,2	n.d.		4,2	0,2	2,6	0,1	1,3	0,1	3,9	0,4	3,0	0,0	2,6	0,0	0,9	0	1,2	0	4,7	0,1		
Σ Phenolische Säuren	136,5	1,0	156,4	1,3	164,9	2,2	169,6	3,3	263,6	1,5	32,4	0,8	259,3	1,0	274,0	2,0	190,9	4,1	182,0	3,3	163	0,3	209,2	2,3	235,4	5,8	197,9	1,2		
Quercetin 3- <i>O</i> -rutinosid	0,3	0,1	n.d.		n.d.		n.d.		2,6	0,2	49,1	0,2	4,5	0,0	n.d.		2,0	0,3	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.			
Quercetin 3- <i>O</i> -galactosid	0,7	0,1	1,1	0,0	0,6	0,0	0,6	0,1	0,8	0,1	8,1	0,1	1,8	0,4	1,5	0,2	0,6	0,1	1	0,0	0,8	0,0	0,9	0	1,1	0	0,9	0,1		
Quercetin 3- <i>O</i> -glucosid	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		1,4	0,0	12,3	0,5	1,5	0,2	0,7	0,1	n.d.		n.d.		0,3	0,0	0,3	0	0,3	0	n.d.			
Quercetin 3- <i>O</i> -xylosid	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		18,1	0,3	n.d.		n.d.		1,2	0,1	n.d.		n.d.		0,4	0	0,7	0	n.d.			
Quercetin 3- <i>O</i> -arabinosid	0,8	0,1	1,9	0,3	1,0	0,1	1,6	0,4	n.d.		3,5	0,0	n.d.		n.d.		1,1	0,1	0,9	0,0	n.d.		0,8	0	1,0	0	2,3	0,2		
quercetin 3- <i>O</i> -rhamnosid	0,7	0,1	0,5	0,1	0,4	0,0	0,5	0,1	4,1	0,2	25,1	0,2	4,3	0,5	1,3	0,1	n.d.		0,9	0,0	0,8	0,0	1,6	0	1,9	0,1	n.d.			
Quercetin	1,3	0,0	n.d.		1,1	0,0	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		n.d.		0,7	0,1	0,8	0,0	0,7	0,0	n.d.		n.d.		0,8	0,1		
Σ Flavonole	3,8	0,0	3,5	0,3	3,1	0,1	2,7	0,2	8,9	0,2	116,2	0,4	12,1	0,8	3,5	0,1	5,6	0,1	3,6	0,0	2,6	0,1	4	0	5,0	0,2	4,0	0,1		
polymere Procyanidine	490	57	605	3	450	3	532	0	424	13	431	54	412	22	276	43	517	25	470	6	543	25	382	12	496	18	483	4		
Σ Polyphenole	737,6	2,5	888,4	20	686,1	4,0	783,6	3,2	816,8	5,1	747,8	0,7	836,8	8,6	625,1	25	808,0	12	791,3	7,6	844,9	12	712,3	8,2	868,5	7,5	784,0	3,1		

M: Mittelwert; SD: Standardabweichung; n.d.: nicht detektiert; * berechnet als Phloretin-2'-xyloglucosid-Äquivalent

Tabelle 7.3 Hochsiedende Substanzen in von uns untersuchten Apfelsäften in mg/kg

		Di-(2-ethyl-hexyl)phthalat		(R)-1,3-Oktandiol		(R)-5-(Z)-Okten-1,3-diol		3-Hydroxy- β -damascon		3-Hydroxy-pyron		Summe
		Gehalt	SD	Gehalt	SD	Gehalt	SD	Gehalt	SD	Gehalt	SD	
AS05	klar	n.d.		15,0	0,8	5,0	0,2	0,6	0,1	10,2	0,4	30,7
	trüb	n.d.		20,2	0,1	10,0	0,2	0,6	0,2	10,3	0,9	41,1
AS06	klar	n.d.		97,2	24,9	28,3	5,6	1,5	0,0	23,4	3,0	150,5
	trüb	n.d.		31,1	7,0	10,7	2,4	0,8	0,2	12,4	2,7	55,0
AS07	klar	n.d.		30,4	0,7	9,6	0,4	0,2	0,0	18,9	2,4	59,1
	trüb	n.d.		48,4	4,6	14,8	1,3	0,2	0,0	28,5	0,5	91,9

SD: Standardabweichung; n.d.: nicht detektiert

Tabelle 7.4 Hochsiedende Substanzen in von uns untersuchten Apfelsaftextrakten in mg/g

		Di-(2-ethyl-hexyl)phthalat		(R)-1,3-Oktandiol		(R)-5-(Z)-Okten-1,3-diol		3-Hydroxy- β -damascon		3-Hydroxy-pyron		Summe
		Gehalt	SD	Gehalt	SD	Gehalt	SD	Gehalt	SD	Gehalt	SD	
AE02	klar	n.d.		72,1	5,0	56,1	10,7	0,0	0,0	6,3	1,5	134,5
AE03B		2,2	0,5	7,0	0,5	2,1	0,2	0,7	0,0	n.d.		11,9
AE04	klar	0,4	0,2	27,4	2,2	5,7	0,5	0,4	0,0	n.d.		33,9
AE05	klar	n.d.		47,1	10,6	19,0	4,8	1,1	0,3	17,0	4,8	84,2
	trüb	n.d.		27,5	2,1	15,5	1,2	0,4	0,1	6,1	0,1	49,5
AE06	klar	0,0	0,0	21,3	4,8	6,7	1,1	0,0	0,0	5,6	1,2	33,6
	trüb	0,2	0,0	14,0	1,7	5,1	0,8	0,2	0,0	2,1	0,7	21,6
AE07	klar	0,5	0,5	28,2	0,9	8,3	1,0	0,2	0,1	11,6	1,7	48,8
	trüb	8,9	3,5	25,7	4,1	8,2	1,7	0,1	0,0	3,2	1,0	46,1
Bohnäpfel	klar	n.d.		43,0	11,8	30,9	8,3	0,3	0,1	5,6	0,7	79,9
	trüb	n.d.		29,7	2,5	16,0	3,1	0,1	0,0	4,0	1,3	49,9
Bittenfelder	klar	n.d.		60,6	17,1	43,0	12,1	0,5	0,2	5,6	0,7	109,7
	trüb	n.d.		33,9	3,9	14,0	2,2	0,3	0,0	2,7	0,1	50,9
Handelsprobe	trüb	n.d.		113,7	10,8	46,8	5,2	2,5	0,4	3,4	0,7	166,5

SD: Standardabweichung; n.d.: nicht detektiert