

Analytische und Effektor-Studien von Catechinen

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

vorgelegt von

Sanja Locher

aus Stuttgart

Würzburg 2011

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

FÜR MICH

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2006 bis Dezember 2009 unter Leitung von

Prof. Dr. Peter Schreier

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

„SO EINE ARBEIT WIRD EIGENTLICH NIE FERTIG, MAN MUSS SIE FÜR FERTIG ERKLÄREN,
WENN MAN NACH DER ZEIT UND DEN UMSTÄNDEN DAS MÖGLICHSTE GETAN HAT.“

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE (*1749, †1832)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Schreier für sein Vertrauen und die Möglichkeit, die Promotion in seinem Arbeitskreis durchführen und auch nach seiner Pensionierung erfolgreich abschließen zu können.

Frau Prof. Dr. Leane Lehmann danke ich für die wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung. Ein herzliches Dankeschön geht auch an ihren Arbeitskreis.

Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn Prof. Dr. Claus Schneider, Vanderbilt University, der mir trotz großer räumlicher Distanz bei Fragen zur Enzymatik mit viel Rat zur Seite stand.

Herrn Dr. Grüne aus dem Institut für Organische Chemie danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren, Tanja Welsch aus dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Humpf, Universität Münster, für die Aufnahme der CD-Spektren.

Ein weiteres Dankeschön geht an Frau Prof. Dr. Holzgrabe, die es mir ermöglicht hat, die CE-Untersuchungen in Ihrem Arbeitskreis durchzuführen sowie an Christine Büttner-Merz, die diese mit mir zusammen durchgeführt hat.

Herrn Prof. Dr. Sottriffer und Armin Welker danke ich für die Möglichkeit und die Hilfe bei der Durchführung des Molecular Modelings.

Weiterer Dank geht an Herrn Dr. Bernd Reyer für seine Hilfe mit dem IT-System, das „Werkstatt“-Team für unzählige Reparaturen und an die „Jungs“ vom TB, dank derer wir immer Strom und genug zu essen hatten.

Meinen F-Praktikanten, Diplomanden und Praktikanten Frank Güthlein, Ludwig Friedrich, Stefanie Herrmann und Iris Hasslauer danke ich für Ihren unermüdlichen Einsatz und für all die Erfahrungen, die ich durch sie machen durfte.

Dem gesamten Arbeitskreis danke ich für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft.

Ganz besonderer Dank geht an Theresia Feuerbach für Ihren unermüdlichen Einsatz im Aromalabor, Dr. Wolfgang Hümmer für seine Hilfe bei technischen Fragen zur „Masse“ und Dr. Bastian Knaup für die Einführung in „sein“ Enzym-Modell.

Ein großes Dankeschön geht an meine Mitstreiterinnen Claudia Freitag, Kathrin Plochmann und Andrea Dreiseitel. Vielen Dank für eure Unterstützung und Motivation!

Ein riesengroßes Dankeschön geht an Dr. Ebru Ates und Dr. Anett Oehme. Vielen Dank für die wissenschaftlichen Diskussionen, eure Unterstützung und Motivation und für eure Freundschaft!

Julia Sünner danke ich für die Hilfe bei der Auswertung der NMR-Spektren, ihre Unterstützung und Ratschläge bei wissenschaftlichen und privaten Fragen, für die Freundschaft und Motivation sowie für die gesamte Studienzeit.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) sei für die Finanzierung dieser Arbeit im Rahmen des Projektes 0313848A gedankt.

Allen BMBF-Projektpartnern danke ich für die überaus positiven Erfahrungen, die vielen Diskussionen und die interessanten Projekttreffen.

Meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und Ablenkung während der letzten 4 Jahre. Liebe Hannah, liebe Paula, allein euer Anblick hat mich immer wieder motiviert!

Holger danke ich für seine Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen, seine Motivation, seine Liebe und seinen Glauben an mich. Physiker sind immer noch die Besten!

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie mich in allem unterstützt und immer an mich glaubt!

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen	V
Erläuterungen	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Zusammenfassung	XIII
Summary	XV
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Kenntnisstand	4
2.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe	4
2.1.1 Polyphenole	4
2.1.1.1 Phenolcarbonsäuren	4
2.1.1.2 Flavonoide	5
2.1.2 Biosynthese der Flavan-3-ole	10
2.1.2.1 Biosynthese von (+)-Catechin	12
2.1.2.2 Biosynthese von (-)-Epicatechin	12
2.1.2.3 Biosynthese der atypischen Flavan-3-ol-Enantiomere	12
2.1.3 Funktionen von Catechinen in Pflanzen	13
2.1.4 Ernährungsphysiologische Bedeutung von Flavan-3-olen	13
2.1.4.1 Antioxidative Eigenschaften	14
2.1.4.2 Polyphenole und Herz-Kreislauf-Erkrankungen	17
2.1.4.3 Polyphenole und Krebserkrankungen	18
2.1.4.4 Antimikrobielle und antivirale Wirkung von Polyphenolen	21
2.1.5 Prooxidative Eigenschaften von Polyphenolen	22
2.1.6 Pharmakokinetik der Polyphenole	25
2.1.6.1 Aufnahme	25
2.1.6.2 Verteilung	26
2.1.6.3 Metabolismus	27
2.1.6.4 Ausscheidung	29
2.2 Lipoxygenase	33
2.2.1 Vorkommen und Struktur	33
2.2.2 Nomenklatur	34
2.2.3 Mechanismus der Lipoxygenase-Katalyse	35
2.2.4 Die Rolle der Lipoxygenasen und ihre Produkte <i>in vivo</i>	38
2.2.4.1 Pathophysiologische Bedeutung der 5-Lipoxygenase	40
2.2.4.2 Pathophysiologische Bedeutung der 12- Lipoxygenase	41
2.2.4.3 Pathophysiologische Bedeutung der 15- Lipoxygenase	41
2.2.5 Einfluß von Polyphenolen auf die Lipoxygenase	41
2.2.6 Einfluß von C-Glykosiden auf die Lipoxygenase	44

2.3	Xanthinoxidoreduktase	45
2.3.1	Xanthinoxidase-Katalyse	46
2.3.2	Die Rolle der Xanthinoxidase und ihrer Produkte <i>in vivo</i>	48
2.3.3	Xanthinoxidase-Inhibitoren	48
2.3.3.1	Gicht und Tumorlyse-Syndrom	49
2.3.3.2	Ischämie und Reperfusionsschäden	49
2.3.3.3	Kreislaufschock	49
2.3.3.4	Chronische Herzinsuffizienz.....	50
2.3.3.5	Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Arteriosklerose und Diabetes mellitus.....	50
2.3.3.6	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und andere Entzündungskrankheiten	51
2.3.4	Einfluß der Polyphenole auf die Xanthinoxidase	51
3	Ergebnisse und Diskussion	53
3.1	(+)-Catechin	53
3.1.1	Polyphenol-Analytik	53
3.1.2	Stabilitätsuntersuchungen von (+)-Catechin	54
3.1.3	Bestimmung der Reaktionsordnung	55
3.1.3.1	Graphische Ermittlung der Reaktionsordnung	57
3.1.4	Einfluß der Temperatur auf den Abbau von (+)-Catechin	58
3.1.5	Einfluß der Temperatur auf die Produktbildung.....	59
3.2	Identifizierung der Catechin-Abbauprodukte	61
3.2.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	61
3.2.2	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS).....	62
3.2.2.1	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) von Catechin und Epicatechin.....	63
3.2.2.2	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) zur Produktanalytik	65
3.2.3	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	65
3.2.4	Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS)	66
3.2.5	Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassen-spektrometrie (HPLC-MS/MS)	66
3.2.6	Präparative Gewinnung von BC und EC	68
3.2.7	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	69
3.3	Enantiomerenanalytik	71
3.3.1	Hochleistungsflüssigchromatographie an chiraler Phase.....	71
3.3.2	Klärung der Epimerisierung mittels Kapillarelektrophorese (CE)	72
3.3.3	Catechin-C-Glykoside: Mechanistische Überlegungen	74
3.4	Einfluß der Catechine auf Enzymsysteme.....	77
3.4.1	Einfluß der Catechine und ausgewählter C-Glykoside auf die Lipoxygenase.....	77
3.4.1.1	(Direkter) Soja Lipoxygenase-1-Assay	77
3.4.1.2	Assay mittels Dihydrodichlorofluorescin-Diacetat	78
3.4.2	Einfluß der Catechine und ausgewählter C-Glykoside auf die Xanthinoxidase	83
3.4.2.1	(Direkter) Harnsäure-Assay	83

3.4.2.2	Cytochrom c-Assay	84
3.5	Docking	88
3.5.1	Lipoxygenase.....	89
3.5.2	Xanthinoxidase	90
4	Material und Methoden	92
4.1	Material	92
4.1.1	Chemikalien	92
4.1.2	Verbrauchsmaterial	93
4.2	Geräte	93
4.2.1	Hochleistungsflüssigchromatographie-Diodenarray-Detektion (HPLC-DAD)	93
4.2.2	Präparative Hochleistungsflüssigchromatographie	96
4.2.3	Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS)	96
4.2.4	Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)	98
4.2.5	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)	98
4.2.6	CD-Spektroskopie	99
4.2.7	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR).....	99
4.2.8	Kapillarelektrophorese	100
4.2.9	Photometer	100
4.2.10	Plattenlesegerät.....	100
4.2.11	Sonstige Geräte.....	101
4.3	Methoden	102
4.3.1	Vorbereitung	102
4.3.1.1	Dünnschicht-Chromatographie (DC).....	102
4.3.2	Stabilität von (+)-Catechin bei verschiedenen pH	102
4.3.2.1	Herstellung der Inkubationspuffer	102
4.3.2.2	Durchführung der Inkubationsversuche	103
4.3.2.3	Standard.....	104
4.3.3	Einfluß der Temperatur auf den Abbau von Catechin und die Bildung von BC und Epicatechin	104
4.3.3.1	Probenaufarbeitung und Analytik	104
4.3.4	Aufarbeitung von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin für die GC-MS.....	104
4.3.5	Isolierung von Dehydrodicatechin mittels präparativer HPLC	105
4.3.6	CD-Spektren der Flavan-3-ole.....	105
4.3.7	Kapillarelektrophorese	106
4.3.7.1	Hintergrundelektrolyt	106
4.3.7.2	Optimierte Trennparameter für die Enantiomerentrennung der monomeren Flavan-3-ole	106
4.3.7.3	Konditionierung und Spülschritte	106
4.3.8	Einfluß der Flavan-3-ole und ausgewählter C-Glykoside auf Enzymsysteme	107
4.3.8.1	Lipoxygenase (LOX)	107
4.3.8.2	Xanthinoxidase (aus Buttermilch)	109

4.3.9	Docking.....	111
4.3.9.1	Docking mit Lipoxygenase (1JNQ).....	111
4.3.9.2	Docking mit Xanthinoxidase (1V97).....	111
5	Strukturmatrix.....	113
6	Literatur.....	116
7	Anhang	137

Veröffentlichungen

ORIGINALPUBLIKATIONEN

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.*, **52** (2008) 1428-1433.

Dreiseitel, A.; Schreier, P.; Oehme, A.; Locher, S.; Rogler, G.; Piberger, H.; Hajak, G.; Sand, P.G. Anthocyanins and anthocyanidins are poor inhibitors of CYP2D6. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **31** (2008) 3-9.

Dreiseitel, A.; Schreier, P.; Oehme, A.; Locher, S.; Rogler, G.; Piberger, H.; Hajak, G.; Sand, P.G. Inhibition of proteasome activity by anthocyanins and anthocyanidins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **372** (2008) 57-61.

Dreiseitel, A.; Schreier, P.; Oehme, A.; Locher, S.; Hajak, G.; Sand, P.G. Berry anthocyanins and their aglycons inhibit monoamine oxidases A and B. *Pharmacol Res.*, **59** (2009) 306-311.

Korte, G.; Dreiseitel, A.; Schreier, P.; Oehme, A.; Locher, S.; Hajak, G.; Sand, P.G. An examination of anthocyanins' and anthocyanidins' affinity for cannabinoid receptors. *J. Med. Food*, **12** (2009) 1407-1410.

Dreiseitel, A.; Schreier, P.; Oehme, A.; Locher, S.; Hajak, G.; Sand, P.G. Phospholipase A₂ is inhibited by anthocyanidins. *J. Neural Transm.*, **116** (2009) 1071-1077.

Dreiseitel, A.; Oosterhuis, B.; Vukman, K.V.; Schreier, P.; Oehme, A.; Locher, S.; Hajak, G.; Sand, P.G. (2009). Berry anthocyanins and anthocyanidins exhibit distinct affinities for efflux transporters BCRP and MDR1. *Br. J. Pharmacol.*, **158** (2009) 1942-1950.

Sand, P.G.; Dreiseitel, A.; Stang, M.; Schreier, P.; Oehme, A.; Locher, S.; Hajak, G. Cytochrome P450 2C19 inhibitory activity of common berry constituents. *Phytoth Res*, **24** (2010) 304-307.

Korte, G.; Dreiseitel, A.; Schreier, P.; Oehme, A.; Locher, S.; Geiger, S.; Heilmann, J.; Sand, P.G. Tea catechins' affinity for human cannabinoid receptors. *Phytomedicine*, 17 (2010) 19-22.

Hasslauer, I.; Oehme, A.; Locher, S.; Valotis, A.; van't Slot, G.; Humpf, H.-U.; Schreier, P. Biologically relevant Flavan-3-ol C-glycosides – preparation and model experiments mimicking their human intestinal transit, *Mol. Nutr. Food Res.*, 54 (2010) 1546-1555.

Erläuterungen

Die in der vorliegenden Dissertation relevanten Verbindungen sind mit fettgedruckten arabischen Zahlen chronologisch nach Nennung im Ergebnis- und Diskussions-Teil durchnummeriert. Die unter Abschnitt 5 aufgeführte Strukturmatrix fasst diese im Überblick zusammen.

In Zahlen mit Dezimalstellen wurden nach englischen Vorbild Kommata statt Punkte verwendet. Dies dient der besseren Übersicht, vor allem in Aufzählungen verschiedener Zahlenwerte. Mehrere Zahlenwerte werden durch Kommata separiert (Bsp.: 3.657, 2.874, 2.652).

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

Gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen sind im Text durch den Zusatz „®“ gekennzeichnet.

Abkürzungsverzeichnis

1JNQ	ID der Soja-LOX 3 in der Protein Data Bank (www.pdb.org)
1V97	ID der Xanthinoxidase in der Protein Data Bank (www.pdb.org)
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
amu	atomare Masseneinheit (<i>atomic mass unit</i>)
AU	Absorbance Unit
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (<i>area under curve</i>)
BAN	BANYLUS-Protein
bidest.	bidestilliert
br	breites Multipllett
BSA	<i>N,O</i> - Bis(trimethylsilyl)acetamid
(±)-C	(±)-Catechin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBG	zytosolische β -Glucosidase
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CI	Konfidenzintervall
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation (<i>collision induced dissociation</i>)
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COSY	Homonukleare Korrelationsspektroskopie
COX	Cyclooxygenase
CVD	kardiovaskuläre Erkrankungen (<i>cardiovascular diseases</i>)
CYC	Cytochrom C
d	Duplett
d_f	Filmdicke der Trennphasen von Kapillartrennsäulen
δ	chemische Verschiebung „delta“
d	Tage
Da	Dalton
DAD	Diodenarray-Detektion
DCF	Dichlorofluorescein
Dept-135	Distorsionsfreie Verstärkung durch Polarisationstransfer um 135° (<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
D ₂ O	deutertes Wasser
(+/-)-EC	(+/-)-Epicatechin

EC-Nr.	Numerisches Klassifikationssystem der Enzyme (<i>enzyme commission</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Ed./Eds.	Editor/Editoren
EGC(G)	Epigallocatechin(-Gallat)
EGFR	epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor
EI	Elektronenstoßionisation
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ESI	Elektrospray-Ionisierung
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
eV	Elektronenvolt
FDA	Amerikanische Gesundheitsbehörde (<i>U.S. Food and Drug Administration</i>)
GC	Gaschromatographie
Gew-%	Gewichtsprozent
GSH	Glutathion
h	Stunde(n)
H ₂ DCFDA	Dihydrodichlorofluorescein-Diacetat
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HMBC	Heteronukleare Korrelation über mehrere Bindungen (<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
HPLC-DAD	Hochleistungsflüssigchromatographie-Diode Array Detektion
HPLC-ESI-MS	Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrospray-Massenspektrometrie
HPLC-MS/MS	Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie
HRGC-MS	Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (<i>high resolution gas chromatography</i>)
HS	Harnsäure
HX	Hypoxanthin
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
I.D.	Innendurchmesser
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkreislauferkrankungen

KPi	Kalium-Phosphat-Puffer
LAR	Leucocyanidin-Reduktase
LC	Flüssigkeitschromatographie
LDL	<i>Low Density</i> Lipoprotein
LDOX	Leucocyanidin-Dioxygenase
LOX	Lipoxygenase
μM	Mikromolar
m	Multipllett (bei NMR)
M	Molar (mol/L)
MHz	Megahertz
min	Minute(n)
Mio.	Million(en)
mM	Millimolar (mmol/L)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-Ladungsverhältnis
[M-H] ⁻	deprotoniertes Molekülion
[M+H] ⁺	protoniertes Molekülion
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	Nuclear-Factor-Kappa-B
nmol	Nanomol
NMR	Kernresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
p. a.	<i>pro analysis</i>
PBE	Rindenextrakt der französischen Strandkiefer
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
ppm	<i>parts per million</i> ; chemische Verschiebung in Hertz
Pro B1	Procyanidin B1
Pro B2	Procyanidin B2
psi	Druckeinheit; 100 psi = 5170 Torr
Q	Quercetin
Qq	Quercetin- <i>o</i> -Chinon
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
s	Singulett

SC	Säulenchromatographie
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
Smp.	Schmelzpunkt
SO	Superoxidanionen
SRM	spezifisches Messsystem der LC-MS/MS (<i>single reaction monitoring</i>)
SULT	Phenol-Sulfotransferase
t	Triplett (bei NMR)
t	Zeit
t _R	Retentionszeit
t _{1/2}	Eliminationshalbwertszeit
u	atomare Masseneinheit (<i>unified mass unit</i>)
U	<i>Unit</i> (mmol/mg Protein) (Einheit)
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UGT	UDP-Glucuronyltransferase
U.S.P.	<i>United States Pharmacopeia</i> ; analog dem Deutschen Arzneibuch
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
X	Xanthin
XOD	Xanthinoxidase

Zusammenfassung

Catechine gehören als Flavan-3-ole zur Gruppe der Polyphenole. Aufgrund deren vielfältiger positiver Effekte auf den menschlichen Organismus nehmen sie in der Ernährungsforschung einen hohen Stellenwert ein. Dabei hat man bei den Flavan-3-olen meist nur die in der Natur vorherrschenden Isomere (+)-Catechin und (-)-Epicatechin untersucht, doch auch (-)-Catechin und (+)-Epicatechin sind Naturstoffe. Letztere findet man z.B. in Guarana oder in verarbeiteten Lebensmitteln, wie z.B. Kakao- und Kakaoerzeugnissen. Sie entstehen durch Epimerisierung unter den technologischen Bedingungen beim Rösten der Kakaobohnen und der Alkalisierung der Kakaomasse. Bei der Kakao-Verarbeitung werden ferner auch Catechin-C-Glykoside gebildet.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Stabilitätsstudien mit (+)-Catechin bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen durchgeführt.

Der zweite Teil dieser Arbeit umfasst Untersuchungen von Catechin-Isomeren und zwei Catechin-C-Glykosiden auf ihren Einfluß auf die Lipoxygenase (LOX)- und Xanthinoxidase (XOD)-Aktivität. Für die Catechin-C-Glykosidbildung ist von uns eine neue Vorstellung zu deren Entstehungsmechanismus im Laufe der Lebensmittelverarbeitung entwickelt worden. Abschließend wurden anhand von Modelling-Studien die Effekte auf die Enzymsysteme erklärt.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Catechin erwies sich im Säuren bis pH-Wert 4.5 über den geprüften Zeitraum (10 Tage) als stabil. Bei pH-Werten > 6.5 war ein Abbau von Catechin zu beobachten. So war bei pH 8.4 schon nach 4 Tagen (Hepes-Puffer) bzw. 6 Tagen (Phosphat-Puffer) kein Catechin mehr vorhanden. Bei pH-Werten > 9.5 erfolgte der Abbau von Catechin so schnell, dass schon nach wenigen Stunden kein Catechin mehr nachweisbar war. Die Reaktionskinetik ergab eine Reaktion erster Ordnung.
- Die beim Abbau von (+)-Catechin entstehenden Substanzen wurden als (+)-Epicatechin und Dehydrodicatechin B₁₁ identifiziert.
- Die Stereochemie der Epimerisierung von Catechinen wurde mittels Kapillarelektrophorese (CE) geklärt. Als chiraler Selektor wurde Hydroxypropyl- γ -

Cyclodextrin eingesetzt. Anhand der CE-Analytik ergab sich, dass (+)-Catechin zu (+)-Epicatechin und (-)-Catechin zu (-)-Epicatechin epimerisiert.

- Der Einfluß von Catechinen und Catechin-C-Glykosiden auf die Soja-LOX wurde mit einem Fluoreszenz-Assay untersucht, bei dem Dihydrodichlorofluorescein-Diacetat (H₂DCFDA) durch die entstehenden Hydroperoxide zu Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert und dann detektiert wird. Ein Cytochrom c-Assay zur Untersuchung des Einflusses der Catechine auf die Xanthinoxidase wurde etabliert.
- Nachfolgend sind die Ergebnisse der Effektorstudien zusammengestellt:

Einfluss von Catechinen und ausgewählter C-Glycoside auf die Soja Lipoxygenase-1 (Soja LOX-1) und die Xanthinoxidase (XOD). Ermittelte IC₅₀-Werte und die dazugehörigen 95 %-Konfidenzintervalle

Effektor	Soja LOX-1	XOD
	IC ₅₀ [µM] (95%-CI [µM])	IC ₅₀ [µM] (95%-CI [µM])
(+)-Catechin-8-β-D-rhamnosid (14)	0.5 (0.31 - 0.72)	102.5 (73 - 144)
(-)-Catechin (9)	0.7 (0.30 - 1.50)	59.5 (44 - 81)
(+)-Catechin (1)	0.8 (0.56 - 1.20)	54.1 (49 - 60)
(-)-Epicatechin (3)	1.1 (0.72 - 1.62)	29.3 (24 - 36)
(+)-Epicatechin-8-β-D-galactosid (13)	1.8 (1.61 - 1.94)	64.8 (48 - 88)

- Die experimentell ermittelten Ergebnisse wurden anhand der Docking-Studien bestätigt.

Summary

As flavan-3-ols, catechins belong to the group of polyphenols. Due to their manifold positive effects on the human organism, catechins are of important significance in food research. Although only the two most abundant isomers in nature, (+)-catechin and (-)-epicatechin, have been studied in most cases; however, (-)-catechin and (+)-epicatechin occur in nature as well. The latter are found i.e. in guarana or in processed food, as cacao and cacao products as the result of epimerization due to technological processing, i.e. while roasting the cocoa beans and alkalisation of the cacao mass. Catechin-*C*-glycosides are also formed during cacao processing.

In the first part of this thesis stability studies with (+)-catechin at different pH values and temperatures were carried out.

The second part of this work comprises analysis of catechin isomers and two catechin-*C*-glycosides on their influence on lipoxygenase (LOX)- and xanthinoxidase (XOD)-activity. For the building mechanism of catechin-*C*-glycosides during food processing a new hypothesis was developed. Finally the effects on enzyme systems were explained by means of modelling studies.

Following results can be summarized:

- Catechin was stable under acidic conditions (pH 4.5) within the 10 days testing period. At pH values > 6.5 a degradation of catechin was observed. At a pH value of 8.4 no catechin could be detected after 4 days (hepes buffer) and 6 days (phosphate buffer), respectively. At pH values > 9.5 the degradation of catechin occurred so quickly that there was no catechin detectable after a few hours. Reaction kinetics revealed a first order reaction.
- The formed substances while (+)-catechin degrades were identified as (+)-epicatechin and dehydrodicathechin B₁₁.
- Stereochemistry of the epimerization of catechin was clarified using capillary electrophoresis (CE) with hydroxypropyl- γ -cyclodextrine as chiral selector. With the help of CE analysis it was shown that (+)-epicatechin was formed from (+)-catechin and (-)-epicatechin from (-)-catechin due to epimerization.

- The influence of catechins and catechin-C-glycosides on soy bean-LOX was studied using a fluorescence assay in which dihydrodichlorofluorescein-diacetate (H₂DCFDA) is first oxidized through the formed hydroperoxides to give dichlorofluorescein (DCF) and is then detected. A cytochrom c assay to study the influence of catechins on xanthinoxidase was established.
- The results of the effector studies are summarized in the following table:

Influence of catechins and selected C-glycosides on soy bean lipoxygenase-1 (Soy LOX-1) and xanthinoxidase (XOD). Determined IC₅₀ values and their 95 %-confidence intervals

Effektor	Soy LOX-1	XOD
	IC ₅₀ [μM] (95%-CI [μM])	IC ₅₀ [μM] (95%-CI [μM])
(+)-catechin-8-β-D-rhamnosid (14)	0.5 (0.31 - 0.72)	102.5 (73 - 144)
(-)-catechin (9)	0.7 (0.30 - 1.50)	59.5 (44 - 81)
(+)-catechin (1)	0.8 (0.56 - 1.20)	54.1 (49 - 60)
(-)-epicatechin (3)	1.1 (0.72 - 1.62)	29.3 (24 - 36)
(+)-epicatechin-8-β-D-galactosid (13)	1.8 (1.61 - 1.94)	64.8 (48 - 88)

- Experimentally found results were confirmed by docking studies.

1 Einleitung und Zielsetzung

Polyphenole wurden in den letzten Jahren verstärkt auf ihre vielfältigen positiven Effekte im menschlichen Organismus untersucht.

Waren früher noch Infektionskrankheiten die häufigste Todesursache in Deutschland, so sind es heute mit über 40% Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems (Statistisches Bundesamt, 2010) und mit rund 25 % Krebserkrankungen (DKFZ, 2010). Neben Tabakkonsum (25 – 30 %), beruflicher Exposition (4 – 8 %) und Alkoholkonsum (3 %) sollen auch Infektionskrankheiten (20 %) und vor allem Ernährungsgewohnheiten (20 bis 42 %) (Becker und Wahrendorf, 1998, zur Hausen, 2006) zu dieser Situation beitragen. Dies erklärt den aktuellen Fokus der Wissenschaft auf eine Prävention durch Ernährung, vor allem durch Obst und Gemüse. Zahlreiche, allerdings nicht unumstrittene epidemiologische sowie viele *in vitro* und einige Tierstudien liefern Hinweise auf deren Wirkung. Man geht davon aus, dass nicht-nutritive Lebensmittelinhaltsstoffe, wie z.B. Polyphenole, für einen protektiven Effekt in Frage kommen. Sie wirken u.a. antikanzerogen, antioxidativ, antimikrobiell, antiviral sowie antiinflammatorisch (Watzl und Leitzmann 1999, Scalbert *et al.*, 2005a, Scalbert *et al.*, 2005b).

Eine strukturell äußerst komplexe Unterklasse der Polyphenole stellen die Flavan-3-ole dar. Sie kommen in der Natur als Monomere, Oligomere und Polymere vor. Oligo- und Polymere von Catechin und Epicatechin werden als Procyanidine bezeichnet.

Bei der Entstehung von Krankheiten spielen Enzyme eine entscheidende Rolle. Eine Gruppe wichtiger Biokatalysatoren sind die Lipoxygenasen (LOX). Verschiedene *in vitro*-Studien zeigten, dass z.B. die 15-LOX in der Lage ist, veresterte Fettsäuren in biologischen Membranen und Lipoproteinen (LDL) zu oxidieren, weshalb diese mit Arteriosklerose in Zusammenhang gebracht wird. Dementsprechend gibt es Hinweise, dass 15-LOX-Inhibitoren das Risiko, an Arteriosklerose zu erkranken, verringern (Schneider und Bucar, 2005).

Die in der Arachidonsäurekaskade durch die Lipoxygenasen freigesetzten Leukotriene spielen eine wichtige Rolle bei inflammatorischen und allergischen Fehlfunktionen des Körpers. Seit langem schon werden *Asthma bronchiale*, allergische Rhinitis, entzündliche Hauterkrankungen, rheumatische Arthritis und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie *Colitis ulcerosa* und *Morbus Crohn* als von der 5-LOX vermittelte Krankheiten angesehen. *Asthma bronchiale* wird allgemein als die bedeutendste Krankheit gesehen, die im Zusammenhang mit der 5-LOX steht.

Jüngeren Studien zur Folge könnte die 5-LOX ebenfalls an Osteoporose, Prostata-, Bauchspeicheldrüsen- und Brustkrebs, sowie an Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, wie z. B. Arteriosklerose, Herzinfarkt und Schlaganfällen beteiligt sein (Werz, 2007).

Ein weiteres Enzym, das eine genauere Betrachtung in Zusammenhang mit Erkrankungen verdient, ist die Xanthinoxidase (XOD).

Während des Katalyse-Zyklus dieses Enzyms entsteht Harnsäure. Schon kleinere Stoffwechselstörungen können dazu führen, dass diese sich als Natriumuratkristalle im Gewebe ablagert, was zu Hyperurikämie und später auch Gicht führen kann. Neuere Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Xanthinoxidase auch eine wichtige Rolle bei der Ischämie und anderen Gewebs- und Gefäßverletzungen, Entzündungskrankheiten sowie chronischer Herzinsuffizienz spielt (Pacher *et al.*, 2006).

Eine beachtliche Menge an experimentellen und epidemiologischen Beweisen deutet außerdem darauf hin, dass vor allem bei Patienten, die unter Herzinsuffizienz, Diabetes und Bluthochdruck leiden, Harnsäure ein wichtiger, unabhängiger Risikofaktor für Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen ist. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es gilt mittlerweile jedoch als gesichert, dass reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) der XOD-Katalyse an der Ischämie und den daraus resultierenden Reperfusionsschäden an Herz, Gehirn, Darm, Leber, Niere, Lunge und anderem Gewebe beteiligt sind. Ebenso wahrscheinlich ist, dass Xanthinoxidase und durch XOD-bedingte Sauerstoff-Spezies bei der Pathogenese der chronischen Herzinsuffizienz (CHF) eine Rolle spielen.

Allopurinol gilt bisher als einer der effektivsten XOD-Inhibitoren. Es besteht jedoch großer Bedarf an neuen Hemmstoffen, da die Gabe von Allopurinol mit schweren Nebenwirkungen einhergeht (Pacher *et al.*, 2006).

Die antioxidativ wirkenden Catechine kommen in nicht unerheblichen Mengen in Lebensmitteln, vor allem in Schokolade und Schokoladenprodukten, schwarzem Tee, Trauben und Äpfeln vor, wobei bisher hauptsächlich (+)-Catechin und (-)-Epicatechin untersucht wurden (Arts *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2007). Bei der technologischen Herstellung von Schokolade und Schokoladenprodukten werden die Kakaobohnen einem Alkalisierungsprozeß unterzogen, der nötig ist, um die freien organischen Säuren zu neutralisieren und dadurch den Geschmack abzurunden (Hofmann und Stark, 2006). Hierbei entstehen u.a. Catechin-C-Glykoside, die bisher ebenfalls wenig untersucht wurden.

In dieser Arbeit sollen sowohl die durch Epimerisierung entstehenden Enantiomere von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin (-)-Catechin und (+)-Epicatechin sowie auch Vertreter der C-Glykoside untersucht werden.

Es ist bereits bekannt, dass Catechine im Sauren stabil sind, bei alkalischen pH-Werten tritt allerdings Epimerisierung ein. In *in vitro* Studien sollen zunächst die genauen Bedingungen hierfür untersucht werden, um später Rückschlüsse auf das Verhalten dieser Substanzen *in vivo* ziehen zu können. Im Magen liegt der pH-Wert bei 1.8 - 4, bei einer Verweildauer von 1-3 h. Im Darm steigt der pH-Wert auf bis zu 7.4 an. Mit einer Verweildauer von bis zu 80 h (Oehme, 2010) ist hier eine Epimerisierung der hauptsächlich vorkommenden Catechine (+)-Catechin und (-)-Epicatechin möglich, die dann als (-)-Catechin und (+)-Epicatechin absorbiert werden könnten.

Eine Grundvoraussetzung hierfür ist, dass man das Verhalten von Catechin in verschiedenen Systemen genau kennt. Deshalb soll zunächst die chemische Stabilität von Catechin in verschiedenen Puffersystemen untersucht werden.

Auch der Einfluß der Temperatur auf das Verhalten von Catechin soll genauer betrachtet werden.

Aufgrund ihres antioxidativen Potentials wurden (+)-Catechin und (-)-Epicatechin als Effektoren in LOX- und XOD-Enzymsystemen eingesetzt (Baumann *et al.*, 1980; Schewe *et al.*, 2001; Werz, 2007; Mahesha *et al.*, 2007; Burnett *et al.*, 2007; Iio *et al.*, 1985; Cos *et al.*, 1998). Auch hier soll der Einfluß von (-)-Catechin und (+)-Epicatechin sowie Catechin-C-Glykosiden untersucht werden.

Als enzymatische Testsysteme sollen die für die Zielsetzung relevanten Enzyme Soja 1-LOX sowie die bovine XOD verwendet werden.

2 Kenntnisstand

2.1 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Aufgrund ihres Stoffwechsels teilt man Pflanzeninhaltsstoffe in primäre und sekundäre Stoffe ein. Während am Energiestoffwechsel beteiligte Pflanzenstoffe, wie z.B. Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, Vitamine, Mineralstoffe und Wasser zu den primären Inhaltsstoffen gezählt werden, gehören z.B. Polyphenole zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Sie liefern keine Energie, kommen nur in geringen Mengen vor, beeinflussen den Humanstoffwechsel und werden deshalb auch als „nicht-nutritive bioaktive Inhaltsstoffe“ bezeichnet (Pechanek, 2006).

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe werden in der Pflanze u.a. als Abwehrstoffe gegenüber Schädlingen und Krankheiten, als Schutz vor UV-Strahlung, als Wachstumsregulatoren sowie als Lock- und Duftstoffe gebildet. Bei einer ausgewogenen Ernährung liegt ihre Pro-Kopf-Aufnahme schätzungsweise bei 1.5 g pro Tag (Ames *et. al.*, 1990, Watzl und Leitzmann, 1999).

In den letzten 20 Jahren setzte die Wissenschaft verstärkt auf die Erforschung der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Ihnen werden u.a. antikanzerogene, antimikrobielle, antioxidative, antithrombotische, immunmodulatorische, entzündungshemmende, blutdruck- und blutglukosebeeinflussende Eigenschaften zugeschrieben (Watzl und Leitzmann 1999, Scalbert *et al.*, 2005a, Scalbert *et al.*, 2005b).

Auf die Polyphenole wird im Folgenden näher eingegangen.

2.1.1 Polyphenole

Zu den Polyphenolen zählen Phenolcarbonsäuren, Flavonoide, Stilbene und Lignane. Die ersten beiden Substanzklassen werden auf den nächsten Seiten genauer beschrieben.

2.1.1.1 Phenolcarbonsäuren

Phenolische Säuren sind phenolische Verbindungen mit einer Carboxylgruppe. Sie werden in zwei Klassen unterteilt: Benzoessäure- und Zimtsäure-Derivate. Sie besitzen ein C6-C1- bzw. ein C6-C3-Grundgerüst. Einige bekannte Vertreter der phenolischen Säuren sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

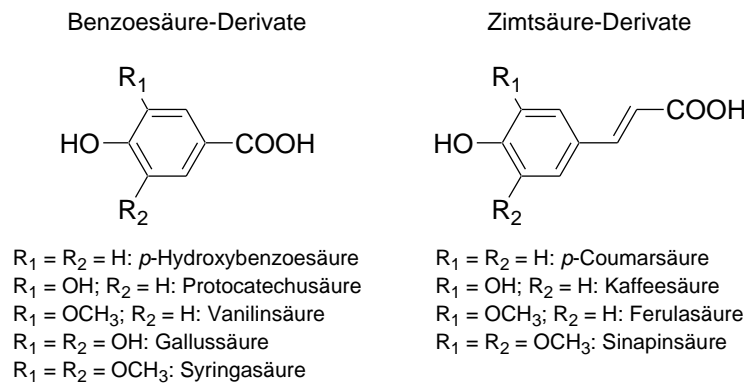


Abbildung 2.1: Phenolische Säuren (modifiziert nach Pereira *et al.*, 2009).

In der Natur kommen die Phenolcarbonsäuren zum Großteil gebunden vor. Sie liegen glycosyliert bzw. mit China-, Shikimi- oder Weinsäure verestert vor. Dabei ist Chlorogensäure der am häufigsten vorkommende Hydroxyzimtsäureester. Sie wird aus Kaffee- und Chinasäure gebildet (Abbildung 2.2).

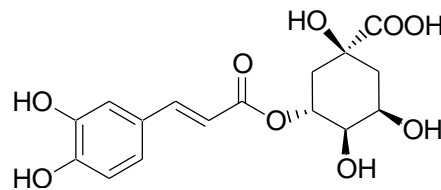


Abbildung 2.2: Struktur von Chlorogensäure.

2.1.1.2 Flavonoide

Flavonoide sind polyphenolische Substanzen, die aus zwei aromatischen Ringen bestehen, die über drei C-Atome verknüpft sind (C₆-C₃-C₆). Mit bisher mehr als 9 000 bekannten Verbindungen (Richling, 2010) stellen sie unter den Phenolen die größte Gruppe dar und sind im gesamten Pflanzenreich vertreten. So kommen sie z.B. in der Epidermis von Blättern und in Fruchthäuten vor.

Das Grundgerüst der Flavonoide ist das Flavan (2-Phenylbenzodihydropyran). Es besteht aus zwei aromatischen Ringen A und B, die über einen heterozyklischen Ring C verknüpft sind. Die Nummerierung der einzelnen Kohlenstoffatome ist fortlaufend (Abbildung 2.3).

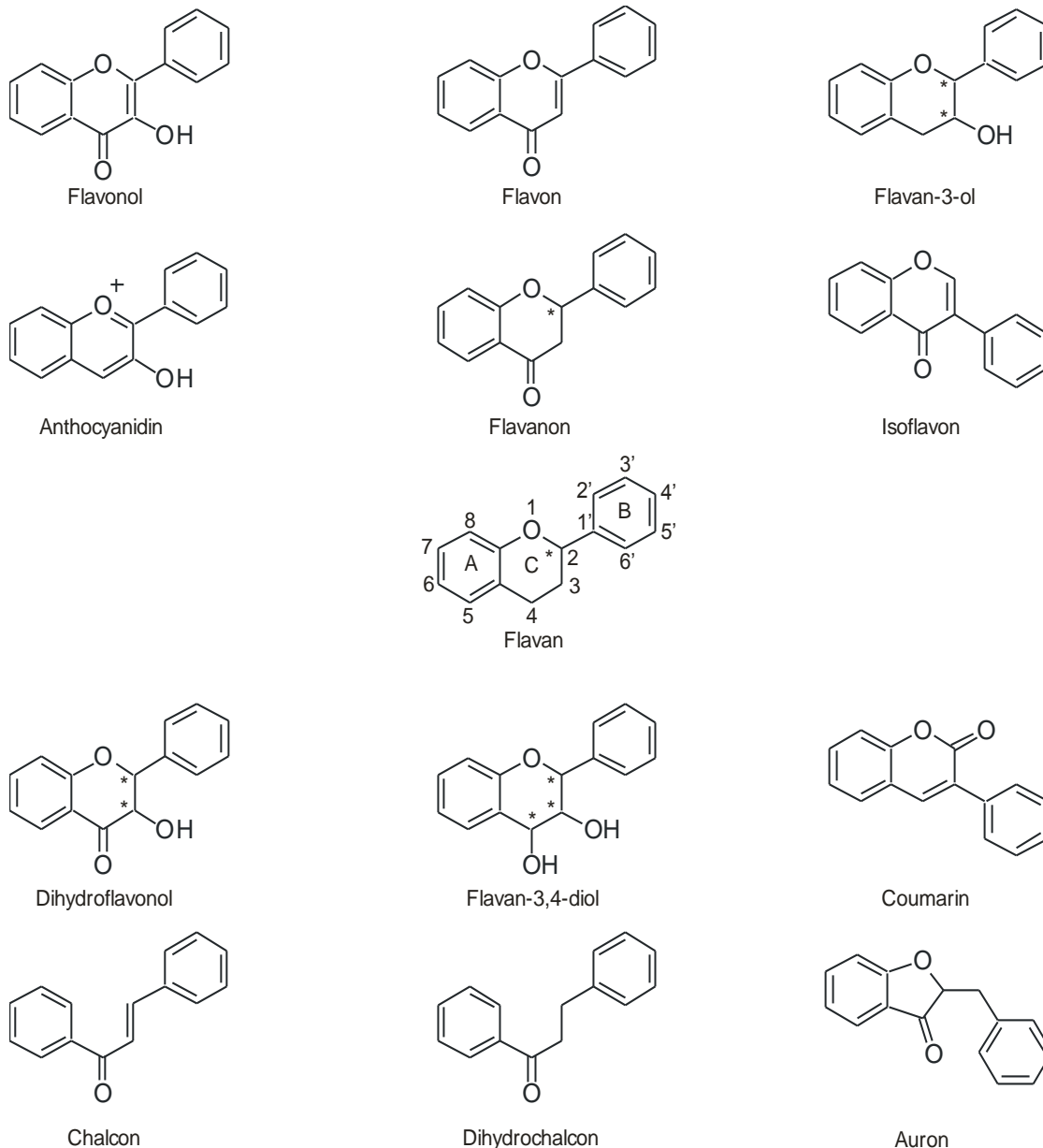


Abbildung 2.3: Übersicht über die verschiedenen Gruppen der Flavonoid-Familie mit Flavan-Grundstruktur (Mitte).

Innerhalb der Gruppe der Flavonoide stellen die Flavonole (3-Hydroxy-4-oxoflav-2-ene), Flavone (4-Oxoflav-2-ene), Flavan-3-ole (3-Hydroxy-flavan), Anthocyanidine, Flavanone (4-Oxoflavane) und Isoflavone die wichtigsten Unterklassen dar. Dihydroflavonole, Flavan-3,4-diole, Coumarine, Chalcone, Dihydrochalcone und Aurone sind in der Natur seltener vertreten (Abbildung 2.3). Die einzelnen Verbindungen der jeweiligen Unterklassen unterscheiden sich sowohl durch Anzahl und Verteilung der Hydroxylgruppen als auch durch deren Methylierungsgrad. Die Position 4', 5 und 7 des Flavonoid-Grundgerüsts sind meist hydroxyliert. Der Großteil der Flavonoide liegt in der Natur glykosyliert vor. Hydroxyl-Gruppen und Zucker erhöhen die Wasserlöslichkeit der

Flavonoide. Im Gegensatz dazu erhöhen Substituenten wie Methylgruppen und Isopentyl-Einheiten die Lipophilie.

Eine wichtige Gruppe der Flavonoide sind die in dieser Arbeit untersuchten Flavan-3-ole.

2.1.1.2.1 Flavan-3-ole

Die Flavan-3-ole sind die strukturell vielfältigste Unterklasse der Flavonoide. Sie kommen in der Natur als Monomere, Oligomere und Polymere vor. Oligo- und Polymere von Catechin und Epicatechin, sowie von Gallocatechin und Epigallocatechin werden als Proanthocyanidine oder kondensierte Tannine bezeichnet. In schwarzen Johannisbeeren wurde ein Proanthocyanidin mit 48 monomeren Einheiten gefunden (Gu *et al.*, 2003).

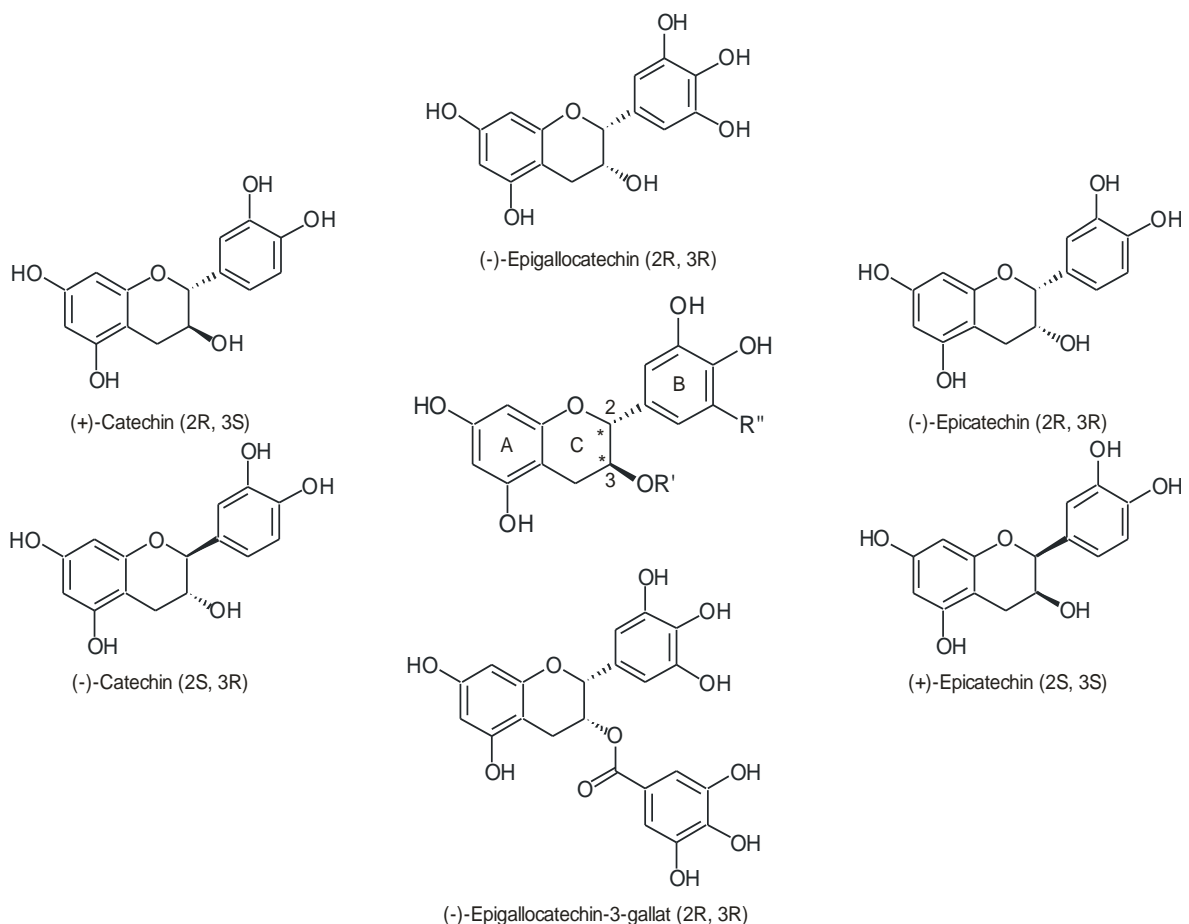


Abbildung 2.4: Flavan-3-ol-Grundstruktur und Enantiomere von Catechin und Epicatechin, sowie (-)-Epigallocatechin und (-)-Epigallocatechin-3-gallat.

Die farblosen Monomere Catechin und Epicatechin kommen in der Natur meist in freier Form oder als 3-O-Gallat vor (Abbildung 2.4). Sie sind nur sehr selten glykosidisch gebunden, sofern dann an C3 oder C5 O-glykosidisch (Plumb *et al.*, 1998, Xu *et al.*,

2007). Aufgrund lebensmitteltechnologischer Verarbeitung, z.B. von Kakao hat man auch Flavan-3-ol C-Glykoside gefunden (Stark und Hofmann, 2006).

Aufgrund der zwei chiralen Zentren an C2 und C3 gibt es vier Isomere (Abbildung 2.4). (+)-Catechin und (-)-Epicatechin kommen in der Natur häufig vor, (-)-Catechin und (+)-Epicatechin sind eher selten.

Während Catechine im Sauren relativ stabil sind, kommt es bei alkalischen pH-Werten zur Epimerisierung (Abbildung 2.5) und anschließendem Abbau (Courbat *et al.*, 1977).

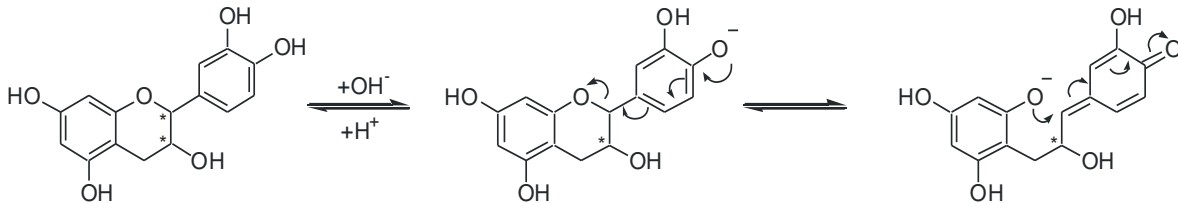


Abbildung 2.5: Mechanismus der Flavan-3-ol-Epimerisierung (modifiziert nach Courbat *et al.*, 1977).

Die unterschiedliche Stereochemie der vier Catechin-Monomere hat kaum Einfluß auf das Redox-Potential oder die Radikalfänger-Eigenschaften, wahrscheinlich aber auf die Bindungseigenschaften, vor allem auf solche, die nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ ablaufen, wie z.B. Enzym-Substrat-, Enzym-Inhibitor- und Rezeptor-Ligand-Interaktionen (Crozier *et al.*, 2009).

Werden nur die Flavaneinheiten Catechin und Epicatechin zum Aufbau der Strukturen verwendet, spricht man von Procyanidinen, der in der Natur am weitesten verbreiteten Gruppe der Proanthocyanidine. Unterschiede in der Struktur bestehen in der Stereochemie, im Polymerisationsgrad und in der Art der Interflavanverknüpfung. Man unterscheidet A-Typ-, B-Typ- und C-Typ-Procyanidine. Procyanidine vom Typ A bestehen aus zwei Catechin-Einheiten und sind zusätzlich zur C4-C6 Bindung auch noch über C2-C7 verknüpft. Die in der Natur deutlich häufiger vorkommenden B-Typ-Procyanidine sind über eine C4-C8-Bindung oder seltener über eine C4-C6-Bindung einfach verknüpft (Abbildung 2.6). C-Typ-Procyanidine bestehen aus drei einfach verknüpften Flavaneinheiten.

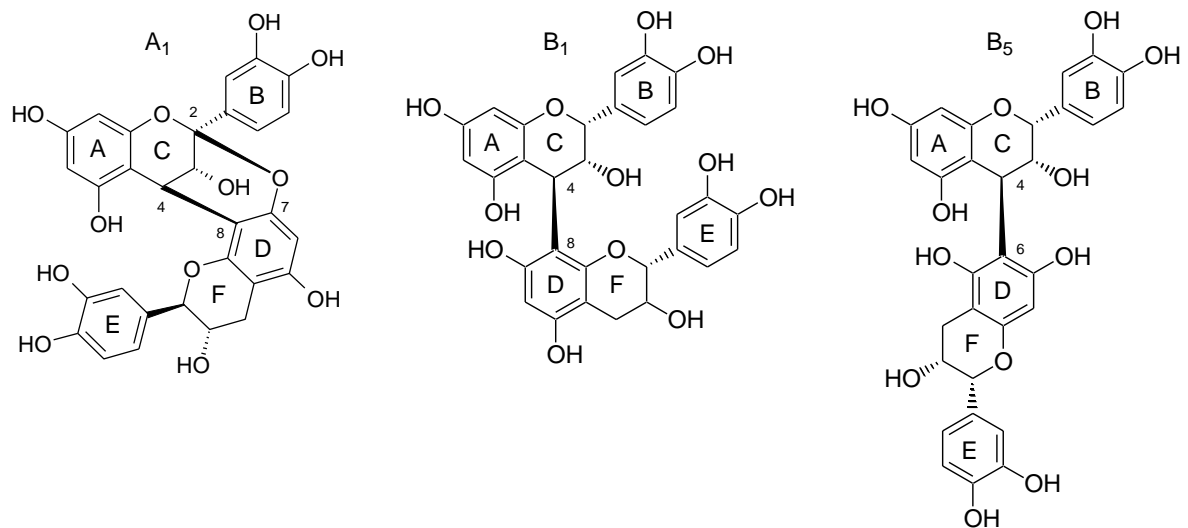


Abbildung 2.6: A-Typ- und B-Typ-Procyanidine: Procyanidin A1 [Epicatechin-(4 β -8, 2 β -O-7)-catechin], Procyanidin B1 [Epicatechin-(4 β -8)-catechin] und Procyanidin B5 [Epicatechin-(4 β -6)-epicatechin].

Oligo- und polymere B-Typ-Proanthocyanidine haben am C4 jeder Flavan-3-ol-Einheit ein weiteres chirales Zentrum.

B-Typ-Procyanidine sind in Kakao, Brombeeren, roten Trauben, Äpfeln und Kirschen enthalten; in Avocados, Erdnüssen, Curry und Zimt sind A-Typ-Procyanidine anzutreffen (Gu *et al.*, 2003).

Oligomere Proanthocyanidine mit bis zu sechs Flavan-Einheiten haben einen bitteren Geschmack, Procyanidine mit sechs bis zehn Grundeinheiten sind adstringierend (Lea und Arnold, 1978).

Catechine und Procyanidine kommen vorwiegend in grünem und schwarzem Tee vor. Aufgrund der Fermentation von schwarzem Tee ist der Gehalt im grünen Tee mit bis zu 200 mg/L fast doppelt so hoch. Als weitere wichtige Quellen werden Kakao (5 – 8.4 mg/g) (Waterhouse *et al.*, 1996) und Rotwein (bis zu 300 mg/L) (Manach *et al.*, 2004) genannt.

Tabelle 2.1: Flavan-3-ol Gehalte. Durchschnittswerte (in mg/kg) in ausgewählten Lebensmitteln (Arts *et al.*, 2000)

	(+)-Catechin	(-)-Epicatechin	Gesamtflavanole
Schokolade (60% Kakao)	132.4	327.4	459.8
Milkschokolade (30% Kakao)	38.3	124.9	163.2
Schokoriegel	21.7	32.5	82.2
Schwarzer Tee (Earl Grey)	6.2	15.1	139.1
Blaue Trauben	89.4	86.4	203.9
Äpfel (Jona Gold, mit Schale)	4.0	67.1	71.1
Äpfel (Jona Gold, ohne Schale)	2.8	48.3	51.2
Erdbeeren	44.7	n.b.	44.7

Von den Flavan-3-olen kommt (-)-Epicatechin in Nahrungsmitteln am häufigsten vor, an zweiter Stelle steht (+)-Catechin (Tabelle 2.1). (-)-Catechin und (+)-Epicatechin (Abbildung 2.4) kommen in der Natur nur sehr selten vor. Sie wurden bisher in einigen Palmenarten (z.B. *Phoenix canariensis* L. *Arecaceae*) und in Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* KUNTH, *Sapindaceae*) nachgewiesen (Delle Monache *et al.*, 1972, Kofink *et al.*, 2007).

Die tägliche Proanthocyanidinaufnahme kann sich aufgrund unterschiedlicher Ernährungsgewohnheiten stark unterscheiden. Sie variiert zwischen 10 und 500 mg pro Tag, wobei die Dimere B2 und B5 den größten Anteil daran ausmachen sollen (Scalbert *et al.*, 2000, Dépréz *et al.*, 2001).

Auf weitere Untergruppen der Flavonoide, wie z. B. die Anthocyane, wird nicht weiter eingegangen, da sie in dieser Arbeit keine Rolle spielen.

2.1.2 Biosynthese der Flavan-3-ole

Die Biosynthese der Flavan-3-ole findet unter Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums im Cytoplasma der Zelle statt (Fritsch und Griesebach, 1975). Ausgehend von Phenylalanin, welches über den Shikimatweg gebildet wird, wird in Gegenwart der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) *trans*-Zimtsäure synthetisiert (Schuster und Rétey, 1995). Durch sequenzielle enzymatische Hydroxylierungs- und Methylierungsreaktionen entstehen hieraus die Hydroxyzimtsäuren *p*-Cumar-, Kaffee-, Ferula- und Sinapinsäure. Der Coenzym A-Ester der *p*-Cumarsäure reagiert nun, im entscheidenden Schritt der Biosynthese, mit drei Einheiten Malonyl-CoA. Dabei wird durch das Enzym

Chalkonsynthase (CHS) das Naringenin-Chalkon gebildet. Durch eine Enzym-katalysierte Ringschlußreaktion an C2 entsteht Naringenin (Abbildung 2.7). Dies weist die typische Flavan-Grundstruktur auf.

Die Flavonoid-3'-Hydroxylase (F3'H) katalysiert nun die Reaktion von Naringenin zu Eriodictyol. Im nächsten Schritt wird unter Mithilfe der Flavanon-3-β-Hydroxylase (F3H) Dihydroquercetin gebildet. Die 2,3-*trans* Konfiguration, die auch (+)-Catechin besitzt, ist hier schon vorhanden. Durch das Enzym Dihydroflavonol-4-Reductase (DFR) reagiert Dihydroquercetin zum 2,3-*trans*-3,4-*cis*-Leucocyanidin (Tanner *et al.*, 2003).

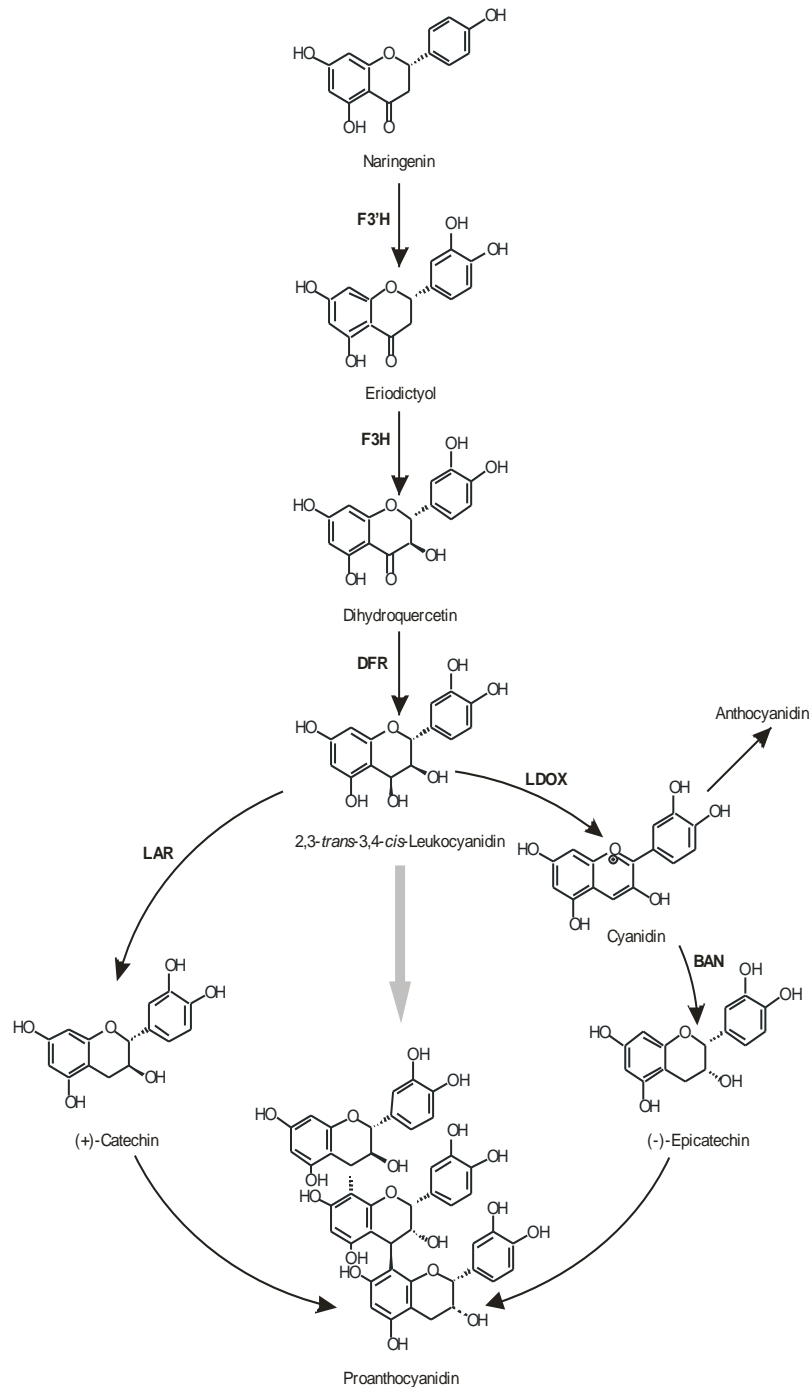


Abbildung 2.7: Biosynthese der Flavan-3-ole ausgehend vom Naringenin (modifiziert nach Tanner *et al.*, 2003).

2.1.2.1 Biosynthese von (+)-Catechin

Ausgehend von 2,3-*trans*-3,4-*cis*-Leucocyanidin wird mit Hilfe des Enzyms Leucocyanidin-Reduktase (LAR) (+)-Catechin gebildet. Dieses ist 2,3-*trans*-konfiguriert (Abbildung 2.7).

2.1.2.2 Biosynthese von (-)-Epicatechin

Bei der Bildung von (-)-Epicatechin sind, ausgehend vom 2,3-*trans*-3,4-*cis*-Leucocyanidin, im Gegensatz zur Biosynthese von (+)-Catechin mehrere Reaktionsschritte nötig. Die Leucocyanidin-Dioxygenase (LDOX) katalysiert die Reaktion zum Cyanidin (Abbildung 2.7). Es sind jetzt alle drei chiralen Zentren entfernt worden. Im nächsten Schritt wird unter Einfluss einer Anthocyanidin-Reduktase, dem BANYLUS-Protein (BAN), (-)-Epicatechin gebildet. Dieses ist 2,3-*cis*-konfiguriert. Die *cis*-Konfiguration ist aufgrund der Stellung des Phenylrestes und der Hydroxyl-Gruppe sterisch und thermodynamisch ungünstig. Trotzdem ist (-)-Epicatechin das in der Natur am häufigsten vorkommende Flavan-3-ol.

2.1.2.3 Biosynthese der atypischen Flavan-3-ol-Enantiomere

Wie bereits schon erwähnt (s. 2.1.1.2.1), kommen (-)-Catechin und (+)-Epicatechin in der Natur nur sehr selten vor. Die Biosynthese der als atypischen Flavan-3-ol-Enantiomere bekannten Verbindungen ist kaum untersucht.

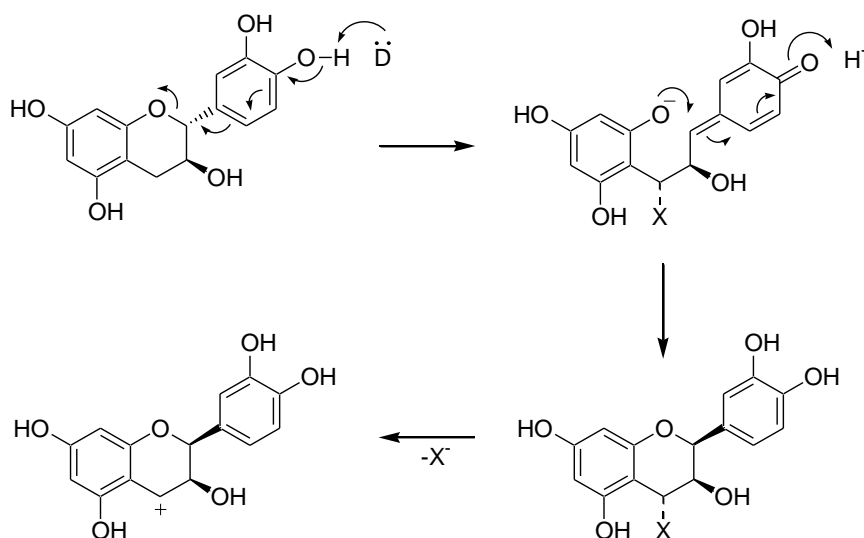


Abbildung 2.8: Vorgeschlagener Mechanismus der Biosynthese atypischer Flavan-3-ole (modifiziert nach Ellis *et al.*, 1982); X: unbekanntes Enzym, D: Elektronendonator.

Da aber z.B. in Palmen neben (+)-Catechin auch dessen Enantiomer (+)-Epicatechin nachgewiesen wurde (Delle Monache *et al.*, 1972, Kofink *et al.*, 2007), muß in der Pflanze eine Epimerisierung erfolgen. Ellis *et al.* (1982) nehmen an, dass dieser Reaktionsschritt über eine enzymatisch gesteuerte Reaktion an C2 erfolgt (Abbildung 2.8).

Wie bei der nicht-enzymatischen Epimerisierung (Abbildung 2.5) kommt es auch hier zu einer Ringöffnung zwischen C2 und C3. Dabei wird aus einer 2,3-*trans*- eine 2,3-*cis*-Konfiguration (Abbildung 2.8) wie bei der Epimerisierung von (+)-Catechin zu (+)-Epicatechin. Im Fall der Epimerisierung von (-)-Epicatechin (2,3-*cis*) zu (-)-Catechin (2,3-*trans*) geschieht dies andersherum. Die Reaktion soll über einen C2-Epimerase-Enzymkomplex katalysiert werden.

2.1.3 Funktionen von Catechinen in Pflanzen

Den Polyphenolen im Allgemeinen wird eine Vielzahl von biologischen Funktionen in Pflanzen zugesprochen. Im Folgenden wird allerdings nur auf die Funktionen von Catechinen eingegangen.

Die Flockenblume, eine Kornblumenart, wird von Tieren nicht gefressen und kann sich deshalb ungehindert in Nordamerika und Europa ausbreiten. Es wurde außerdem beobachtet, dass sich um die Pflanze herum ein Bereich bildet, indem keine anderen Pflanzen wachsen. Bais *et al.* (2002) zeigten, dass in den Wurzeln der Flockenblume (*Centaurea maculosa*) racemisches Catechin vorhanden ist.

Während (+)-Catechin antimikrobielle Eigenschaften aufweist, ist (-)-Catechin phytotoxisch. Auch (+)-Epicatechin zeigt eine phytotoxische Wirkung und interessanterweise sogar auf *C. maculosa*, obwohl diese resistent gegen das eigen gebildete (-)-Catechin ist (Bais *et al.*, 2003).

2.1.4 Ernährungsphysiologische Bedeutung von Flavan-3-olen

Über die Flavan-3-ole Catechin und Epicatechin sowie ihre Oligomere, die Procyanidine, und deren positive physiologische Eigenschaften gibt es zahlreiche Publikationen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um *in vitro*-Studien, aber auch aus epidemiologischen Studien sowie tierexperimentellen Untersuchungen werden physiologische Wirkungen mit

Nutzen für den Menschen abgeleitet. Die *in vivo*- Beweise dieser Ergebnisse stehen größtenteils noch aus.

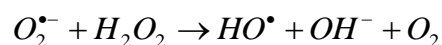
Die physiologische Wirkung von Catechin und Epicatechin wird vor allem anhand der Flavan-3-ol-reichen Lebensmittel Tee, Wein und Kakao untersucht. Im Folgenden wird auf die am häufigsten studierten Eigenschaften näher eingegangen.

2.1.4.1 Antioxidative Eigenschaften

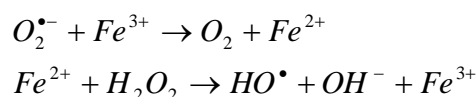
Im Körper des Menschen werden permanent reaktive Stickstoff- bzw Sauerstoffspezies (ROS bzw. RNS) gebildet. Sie entstehen bei der Zellatmung in den Mitochondrien, in Phagozyten bei der Immunantwort des Körpers und beim Abbau der DNA-Basen. Sie können aber auch durch exogene Faktoren wie UV-Strahlung, Arzneimittel, kanzerogene Chemikalien oder Zigarettenrauch entstehen (Kohen und Nyska, 2002, Kuhn Merrily, 2003).

Reaktive Sauerstoffspezies können Sauerstoff- oder Stickstoffradikale sein, wie das Hydroxylradikal (HO^\bullet), das Superoxidanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Peroxyl- (ROO^\bullet) und Alkoxyradikale (RO^\bullet) oder auch nicht-radikalische Verbindungen wie Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid, Ozon oder Peroxynitrit (Halliwell, 1997, Eisenbrand und Metzler, 2005).

Von den oben genannten Sauerstoffradikalen ist das Hydroxylradikal mit einer Halbwertszeit von 10^{-9} s und einem Standardreduktionspotential von 2.31 V das reaktivste. Eine der wichtigsten Reaktionen in biologischen Systemen von Hydroxylradikalen ist die Eisen-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion:



Der Metallionen-katalysierte Teilschritt ist als Fenton-Reaktion bekannt (Eisenbrand und Metzler, 2005):



Das Superoxidradikalanion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ist deutlich weniger aggressiv als das Hydroxylradikal. Superoxidanionen können bei enzymatischen Vorgängen, wie dem Xanthinoxidase-katalysierten Abbau von Hypoxanthin bzw. Xanthin zu Harnsäure (s. 2.3.1), im Körper gebildet werden.

Peroxy- und Alkoxyradikale sind auf Grund ihrer Fähigkeit, Wasserstoff-Atome von anderen Molekülen zu abstrahieren, sehr stark an der Initiation der Lipidperoxidation beteiligt. Zu den wichtigsten nicht-radikalischen ROS zählt Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Es wird als Produkt bei der Superoxid-Dismutation gebildet und entsteht daher bei allen Mechanismen, die Superoxidanionen generieren. H_2O_2 ist nur schwach oxidierend und reduzierend und bewirkt an sich keine Veränderung der DNA, Lipide oder Proteine. Es kann allerdings über die Fenton- bzw. Haber-Weiss-Reaktion zum hochreaktiven HO^\bullet reduziert werden und ist dadurch für einen großen Teil der beobachteten oxidativen Zellschäden verantwortlich, die nach H_2O_2 -Inkubationen beobachtet werden.

ROS haben auch eine nützliche Funktion im Körper, sie werden z.B. von Leukozyten aktiv gebildet, um Mikroorganismen zu bekämpfen. Außerdem werden sie auch bei der Synthese von Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen in der Arachidonsäurekaskade gebildet (Halliwell und Gutteridge, 1999).

Normalerweise werden die entstandenen überzähligen ROS und RNS über verschiedene Schutzmechanismen des Körpers deaktiviert. Dies können Enzyme sein, wie die Superoxiddismutase, die den Abbau von Superoxidradikalanionen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid katalysiert, welches dann in Gegenwart von Katalase zu Sauerstoff und Wasser reagiert. Die Glutathionperoxidase reduziert organische Peroxide sowie Wasserstoffperoxid (Sies, 1986). Es können aber auch Verbindungen mit Radikalfänger-Eigenschaften sein, die im Körper synthetisiert werden, wie z.B. Glutathion, Ubichinon, Harnsäure, Bilirubin u. a., oder welche, die über die Nahrung in den Körper gelangen. Hierzu zählen Tocopherole, Carotinoide, Ascorbinsäure oder Polyphenole (Krinsky, 1998, Chandra *et al.*, 2000).

Ist das Gleichgewicht der pro- und der antioxidativen Verbindungen zugunsten der prooxidativen verschoben, spricht man von „oxidativem Stress“ (Sies, 1985), bei dem es zu oxidativen Schädigungen von Zellmembranen, DNA und Proteinen kommen kann. Oxidativer Stress wird mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Alzheimer, Katarakt, Parkinson, Diabetes mellitus oder 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 Jaikhani, 2008). In diesem Zusammenhang wird vor allem die antioxidative Wirkung der Polyphenole diskutiert.

Flavan-3-ole zeigen ihre antioxidative Wirkung über verschiedene Mechanismen. Sie fangen freie Radikale ab (Abbildung 2.9), bilden Chelat-Komplexe mit Übergangsmetallen und beeinflussen und inhibieren Enzyme (Cos *et al.*, 2004).

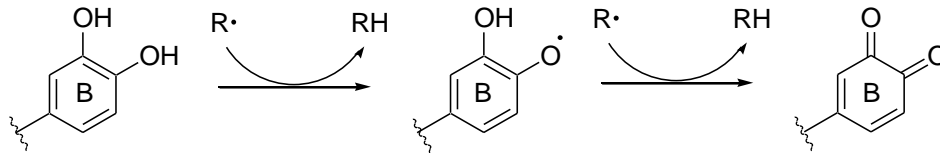


Abbildung 2.9: Prinzip der antioxidativen Wirkung von Flavonoiden (modifiziert nach Aron und Kennedy, 2008).

Eine wesentliche strukturelle Voraussetzung für die Radikalfängereigenschaft der Flavan-3-ole sind die Hydroxylgruppen an C3' und C4' des B-Rings zur Elektronendelokalisierung und dadurch zur Ausbildung eines stabilen Phenoxyradikals. Quercetin ist mit seiner zusätzlichen 2,3-Doppelbindung und der Oxogruppe an C4 ein noch besseres Antioxidans als Catechin und Epicatechin. Eine Methoxylierung oder Glykosylierung an C3 des Flavanols bewirkt dagegen eine Verringerung des antioxidativen Potentials (Rice-Evans, 1996), die Ausbildung einer stabilen Chinon-Struktur ist hier nicht mehr möglich.

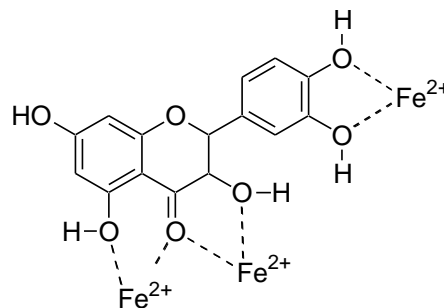


Abbildung 2.10: Postulierte Bindungsstellen für Übergangsmetall-Chelat-Komplexe (modifiziert nach Pietta, 2000).

Flavonoide können zweiwertige Kationen wie Cu^{2+} - oder Fe^{2+} -Ionen chelatisieren (Abbildung 2.10) und verhindern dadurch weitere prooxidative Prozesse (Van Acker *et al.*, 1998, Melidou *et al.*, 2005). Außerdem hemmen sie mehrere Enzyme, die an der Entstehung von freien Sauerstoffradikalen beteiligt sind. Neben der Proteinkinase C und der Cyclooxygenase sind das auch die Lipoxygenase und die Xanthinoxidase, auf die in dieser Arbeit speziell eingegangen wird (Pietta, 2000, Kim *et al.*, 2008, Sarawek *et al.*, 2008).

2.1.4.2 Polyphenole und Herz-Kreislauf-Erkrankungen

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystemes sind eines der größten Probleme der Industrienationen und stellen mittlerweile die häufigste Todesursache dar (Fan und Watanabe, 2003).

Freie Radikale und oxidativer Stress sind die Hauptursachen für koronare Herz-Kreislauf-Erkrankungen (KHK) wie kongestive Herzinsuffizienz, Herzklappenfehler, Herzmuskel-erkrankungen, Hypertrophie und Arteriosklerose (Bagchi *et al.*, 2003).

Bei der Arteriosklerose handelt es sich um eine krankhafte Veränderung der Arterien. Es kommt zu Verhärtungen, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung, was auch als endotheliale Dysfunktion bezeichnet wird. Sie ist meist der erste Schritt bei der Entstehung arteriosklerotischer Plaques. Die Ursache der endothelialen Dysfunktion liegt oft in einer verminderten Synthese von Stickstoffmonoxid oder in deren reduzierter Bioaktivität (Rösen, 2002).

Flavan-3-ole sind über verschiedene Mechanismen in der Lage, die Pathogenese von Herz-Kreislauf-Erkrankungen positiv zu beeinflussen. Es werden antioxidative, antithrombotische und antiinflammatorische Eigenschaften diskutiert.

Proanthocyanidine und Flavan-3-ol-Monomere senken den Cholesterin-Spiegel im Blutplasma, hemmen die Oxidation von LDL (Low Density Lipoprotein) und regen die Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase im Endothelium an, die eine Thrombozyten-Adhäsion verhindert (Bagchi *et al.*, 2003, Rasmussen *et al.*, 2005, Folts, 2002).

Hohe Cholesterin-Werte, vor allem hohe LDL-Werte und ein hoher Anteil an gesättigten Fettsäuren erhöhen das Risiko, an Arteriosklerose oder koronaren Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu erkranken (Aviram und Fuhrmann, 2002).

In einer Tierstudie hat man gezeigt, dass flavonoidreiche Kost, die fettreich ernährten Hamstern verfüttert wurde, Plasmatriglyceride, Gesamtcholesteringehalt und freie Fettsäuren im Vergleich zu einer Kontrollgruppe signifikant verringert hat (Narender *et al.*, 2006). Die Ursache hierfür könnte die Hemmung der Schlüsselenzyme des Cholesterinmetabolismus, Hydroxymethyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA)-Reduktase und Acyl-CoA-cholesterolacyltransferase (ACAT) sein (Lee *et al.*, 1999).

De Whalley *et al.* (1990) zeigten, dass eine Reihe von Flavonoiden, u.a. Quercetin, die Oxidation von LDL durch Makrophagen hemmt. Die parallele Gabe von Rutin und einem weiteren (hydrophilen oder lipophilen) Antioxidans führte zu synergistischen Effekten beim Schutz vor LDL-Oxidation (Milde *et al.*, 2004).

In *ex vivo*-Studien zur Thrombozytenfunktion wurde gezeigt, dass in Anwesenheit von Flavan-3-olen und Procyanidinen dosisabhängig eine erniedrigte Thrombozytenaktivierung und -aggregation vorliegt (Neiva *et al.*, 1999, Rein *et al.*, 2000). Zur Klärung des Mechanismus wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt. Dabei verringern z.B. die Flavonoide aus *Gingko biloba* die Thrombozytenaggregation. Sie sind in der Lage, ein Ansteigen des Cytoplasma-Ca²⁺-Spiegels in den Thrombozyten zu unterdrücken und das cAMP-Level (cyclisches Adenosinmonophosphat) anzuheben (Dutta-Roy *et al.*, 1999). Die Arbeitsgruppe um Guerrero (2005) diskutierte auch eine Hemmung der Thrombozytenfunktion durch die Bindung von Flavonoiden, insbesondere von Flavonen, an den Thromboxan A₂-Rezeptor (Guerrero *et al.*, 2005).

In einer *in vitro*-Studie von Lorenz *et al.* (2004) konnte gezeigt werden, dass das Flavan-3-ol Epigallocatechin-Gallat (EGCG) die Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) erhöht. Durch Freisetzung von NO lässt sich eine Thrombozyten-Aggregation verhindern (Bagchi *et al.*, 2003, Rasmussen *et al.*, 2005, Folts, 2002). Der genaue Signalweg der Enzym-Aktivierung ist bisher unbekannt. NO-Synthasen sind in der Lage, aus L-Arginin Stickstoffmonoxid (NO) freizusetzen (Urban, 2009).

Eine Studie von Ottaviani *et al.* (2006) zeigt, dass oligomere Procyanidine in der Lage sind, die Bildung von Angiotensin II *in vitro* zu hemmen, was eine Senkung des Blutdrucks zur Folge hat. Angiotensin II ist ein vasokonstriktorisches wirkendes Hormon, das mit Hilfe des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) aus Angiotensin I gebildet wird.

2.1.4.3 Polyphenole und Krebserkrankungen

Mit 29 % bei Männern und 23 % bei Frauen stellen Krebserkrankungen, nach Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (DKFZ, 2010). Man schätzt, dass nur etwa 5 – 10 % der Erkrankungen eine genetische Disposition als Ursache haben. Als Hauptrisikofaktoren gelten neben Tabakkonsum (25 – 30 %), beruflicher Exposition (4 – 8 %) und Alkoholkonsum (3 %) auch Infektionskrankheiten (20 %) und Ernährungsgewohnheiten (20 – 42 %) (Becker und Wahrendorf, 1998, zur Hausen, 2006). Dies erklärt den Fokus der Wissenschaft auf eine mögliche Krebsprävention durch Obst und Gemüse. Zahlreiche epidemiologische, *in vitro*- und Tierstudien liefern Hinweise darauf. Es wurde die These aufgestellt, dass nicht-nutritive Inhaltsstoffe, wie z.B. Polyphenole, für diesen protektiven Effekt verantwortlich sind.

Epidemiologische Studien aus den 1990er Jahren zeigten, dass bei einem hohem Obst- und Gemüse-Verzehr das Risiko, an Krebs zu erkranken, deutlich verringert ist (Steinmetz und Potter, 1991, Steinmetz und Potter, 1996, Block *et al.*, 1992). In einer kürzlich veröffentlichten epidemiologischen Studie (Boffetta *et al.*, 2010) hat man jedoch keine signifikante Senkung des Krebsrisikos durch den Verzehr von Obst und Gemüse festgestellt.

Man nimmt heute an, dass die Krebsentstehung ein mehrstufiger Prozeß ist, bei dem die DNA-Schädigung eine bedeutende Stellung einnimmt. In einem älteren und einfacheren Modell ging man von nur drei Stufen aus, der Initiation, die den ersten Schritt der Krebsentstehung darstellt, der Promotion, in der sich die mutierten Zellen vermehren und der Progression. In dieser dritten Phase findet die eigentliche maligne Transformation statt. Tumorzellen entdifferenzieren sich und verdrängen gesundes Gewebe (Becker und Wahrendorf, 1998).

Es wird davon ausgegangen, dass Polyphenole aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Eigenschaften in alle drei Phasen der Kanzerogenese eingreifen können (Ramos, 2008) und somit eine chemopräventive Wirkung ausüben. Dafür werden unterschiedliche Mechanismen angenommen. Für eine mögliche modulierende Wirkung der Flavonoide wird hier das Drei-Stufen-Modell herangezogen.

Im Phase-I-Metabolismus werden unpolare, lipophile Stoffe durch Epoxidierung, Hydroxylierung, N- oder S-Dealkylierung oder reduktiv durch Nitro- oder Carbonylreduktion in polare, hydrophilere Verbindungen überführt. Hierdurch wird die Ausscheidung dieser Stoffe gefördert.

Polyphenole können als Hemmstoffe wirken und so die Entstehung von Prokanzerogenen in der Initiationsphase beeinflussen. Sie greifen in den *Phase-I*-Metabolismus ein, indem sie die Expression der Cytochrom-P450 abhängigen Monooxygenase modulieren (Suschetet *et al.*, 1997). Bei diesen *Phase-I*-Reaktionen können elektrophile Kanzerogene als Zwischenstufe entstehen, die mit den nucleophilen Zentren der DNA reagieren (Depeint *et al.*, 2002). Gegenüber einem Isoenzym der Cytochrom-P450-Enzymfamilie, dem Cytochrom 1A1, zeigten Flavonoide wie Quercetin, Phloretin und Procyanidine starke Inhibierungseffekte (Kanazawa *et al.*, 1998, Pohl *et al.*, 2006).

Im *Phase-II*-Metabolismus konjugieren Enzyme Fremdstoffe oder *Phase-I*-Metabolite an hydrophile, endogene Moleküle durch Glutathionkonjugation, Glucuronidierung, Acetylierung oder Sulfatierung. Hierdurch wird die Ausscheidung über Niere und Galle ermöglicht. Polyphenole können im Körper potentiell toxische Quinone bilden. Diese stellen wiederum Substrate für die *Phase-II*-Enzyme wie Glutathion-S-transferase, UDP-Glucuronyltransferase oder die Chinonreduktase dar. Die Induktion dieser Enzyme führt

zu einer intensivierten Ausscheidung der Kanzerogene und somit zu einer verstärkten Detoxifikation. Dadurch sind Flavonoide in der Lage, eine Tumor-Initiation zu verhindern (Talalay *et al.*, 1995, Depeint *et al.*, 2002, Patel und Maru, 2008).

Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Nukleotiden sind einige Flavonoide in der Lage, sich an die DNA anzulagern (Dixit und Gold, 1986, Duthie *et al.*, 1999) und diese dadurch zu maskieren. Andere Substanzen, wie z. B. Kanzerogene, können sich nun nicht mehr anlagern.

Polyphenole können auch in wichtige Mechanismen der Suppression bzw. der Eliminierung von Tumorzellen eingreifen, indem sie sowohl die Bildung als auch das Wachstum von Tumoren aus initiierten Zellen inhibieren. Bei *in vitro*-Studien verringerten sie die Expression von Protoonkogenen und hemmten so die Proliferation von Krebszelllinien (Csokay *et al.*, 1997, Kuntz *et al.*, 1999). Polyphenole inhibieren auch Enzyme der Signaltransduktion. In einer *in vitro*-Studie konnte an Karzinomzelllinien der Maus gezeigt werden, dass Quercetin die Proteinkinase C hemmt (Lee und Lin, 1997). Auch durch Inhibierung der Proteintyrosinkinase (Nardini *et al.*, 2001) sowie der Phosphoinositol-3-kinase (Agullo *et al.*, 1997, Weber *et al.*, 1997) haben Polyphenole Einfluß auf die Kontrolle der Zellproliferation.

Außerdem hemmen sie den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), der vor allem bei Brust-, Blasen-, Magen- und Lungentumoren verstärkt exprimiert wird (Salomon *et al.*, 1995, Grandis *et al.*, 1996, Kern *et al.*, 2005) und Einflüsse auf das Migrations-, Proliferations- oder Differenzierungsverhalten der Zellen hat. Dies wurde durch verschiedene Gruppen nachgewiesen (Lee *et al.*, 2004, Fridrich *et al.*, 2007).

Chronische Entzündungsprozesse stellen ebenfalls eine Ursache für Krebserkrankungen dar. Dabei handelt es sich hier vor allem um Erkrankungen des Gastro-Intestinal-Traktes, wie z.B. chronische Gastritis oder Pankreatitis. Bei Entzündungsprozessen wird die Arachidonsäurekaskade aktiviert. Hierbei werden durch Cyclooxygenasen (COX) und Lipoxygenasen (LOX, s. 2.2) Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine bzw. Leukotriene gebildet (Mutschler, 1991). Verschiedene Studien zeigen, dass Polyphenole potente Inhibitoren der LOX, COX-1 und COX-2 sind und dadurch die Bildung dieser Entzündungsmediatoren unterdrücken können (Metz *et al.*, 2000, Welton *et al.*, 1988, Luceri *et al.*, 2002).

In Tumorzellen ist die Apoptose, der programmierte Zelltod, gestört. Tumorzellen können sich ungehindert ausbreiten. Bei *in vitro*-Studien hat man gezeigt, dass Flavonoide in Krebszelllinien Apoptose induzieren können (Wenzel *et al.*, 2000, Kern *et al.*, 2005, He *et al.*, 2006, Winkelmann *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2008). Der genaue Mechanismus hierfür ist allerdings noch unbekannt. In der Literatur werden u.a. die Regulation der Expression

von Hitzeschock-Proteinen (Ochel und Gademann, 2002), die Freisetzung von Cytochrom-C mit resultierender Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3 (Wang *et al.*, 1999, Han *et al.*, 2007, Park *et al.*, 2008) sowie die Verminderung der Expression von anti-apoptotischen Faktoren wie dem Nuclear-Factor-Kappa-B (NF- κ B) (Wenzel *et al.*, 2000) diskutiert.

2.1.4.4 Antimikrobielle und antivirale Wirkung von Polyphenolen

Einige Polyphenole besitzen eine antimikrobielle Wirkung. So kann z.B. Gurgeln mit Grüntee vor Zahnfleischentzündung schützen (Sakanaka *et al.*, 1996, Narayana *et al.*, 2001, Cushnie und Lamb, 2005). Durch Epigallocatechin wurde bei *in vitro*-Experimenten das Wachstum und das Anheften von *Porphyromonas gingivalis* auf humane Epithelzellen der Mundschleimhaut verhindert (Sakanaka *et al.*, 1996). Ein Zusatz von Quercetin oder Naringenin zu Zahnpasta soll das Wachstum vieler gramnegativer Bakterien sowie Aktinomyzeten in der Mundhöhle unterbinden (Ammar *et al.*, 1990).

Die Arbeitsgruppe um Foo (2000) konnte eine antibakterielle Wirkung von trimeren A-Typ-Proanthocyanidinen aus Cranberries (*Vaccinium macrocarpon*) auf die bakterielle Adhärenz von *E. coli* (*Escherichia coli*) zeigen. Diese Bakterien sind eine der Hauptursachen für Harnwegsinfekte. In der Naturheilkunde wird Cranberrysaft sehr häufig zur Prävention und Therapie solcher Infekte eingesetzt.

Für einige Flavonoide hat man eine antivirale Wirkung sowohl bei *in vitro*- als auch *in vivo*-Studien nachgewiesen. Das Flavonol Quercetin zeigte *in vitro* bei *Herpes simplex*-Viren Typ 1, Polio-Viren Typ 1 und *Parainfluenza*-Viren Typ 3 eine Verringerung der Infektiosität sowie der Verminderung der intrazellulären Replikation der Viren. Man nimmt an, dass Quercetin in der Lage ist, virale Proteine zu binden (Kaul *et al.*, 1985, Middleton *et al.*, 2000). Für Methylquercetin und 3-Methylkämpferol wurde eine Blockade der Replikation des Polio-Virus auf RNA-Ebene nachgewiesen (Kaul *et al.*, 1985, Formica und Regelson, 1995). Flavonoide sind ebenfalls in der Lage, die Replikation von HI-Viren zu hemmen. Hier zeigte v.a. das dimere Flavon 2'',3''-Dihydrochonaflavon-7''-O-methylether aus der Rinde von *Ochna integerrima*, einer in Thailand weit verbreiteten Baumart (Kaewamatawong *et al.*, 2002), mit einem EC₅₀-Wert von 0.9 μ g/mL (\approx 1.6 μ M) eine herausragende Aktivität (Reutrakul *et al.*, 2007). Mit Quercetin konnte eine 80%ige Hemmung der HIV-1 Replikation hingegen erst bei einer Konzentration von 40 μ M erreicht werden (Gatto *et al.*, 2002).

2.1.5 Prooxidative Eigenschaften von Polyphenolen

Für Polyphenole sind nicht nur protektive Eigenschaften bekannt. Sie sind aufgrund ihrer funktionellen Gruppen unter bestimmten Bedingungen oder in hohen Dosen toxisch (Metodiewa *et al.*, 1999, Michels *et al.*, 2005, Rucinska *et al.*, 2007). Die hierfür verantwortlichen Strukturmerkmale sind dieselben wie bei den bereits erwähnten autoxidativen Eigenschaften (vgl. Abschnitt 2.1.4.1). Es handelt sich um die freie Hydroxylgruppe an C3, die Doppelbindung zwischen C2 und C3 und die Ketofunktion an C4. Ein zusätzlicher Phenolring sorgt im Vergleich zur Catecholstruktur für keine größeren prooxidativen Eigenschaften. Hauptverantwortlich für die unerwünschten Eigenschaften der Polyphenole sind die elektrophilen Metabolisierungsprodukte wie Chinone und Chinonmethid-Strukturen.

Bei *in vitro*-Studien hat man gezeigt, dass die prooxidativen Eigenschaften der Polyphenole durch die Anwesenheit von Metallionen gefördert werden. In Gegenwart von Kupfer(II)- und Eisen(III)-Ionen kann es zu DNA-Strangbrüchen und Lipidperoxidation durch Quercetin kommen (Michels *et al.*, 2005, Wätjen *et al.*, 2005).

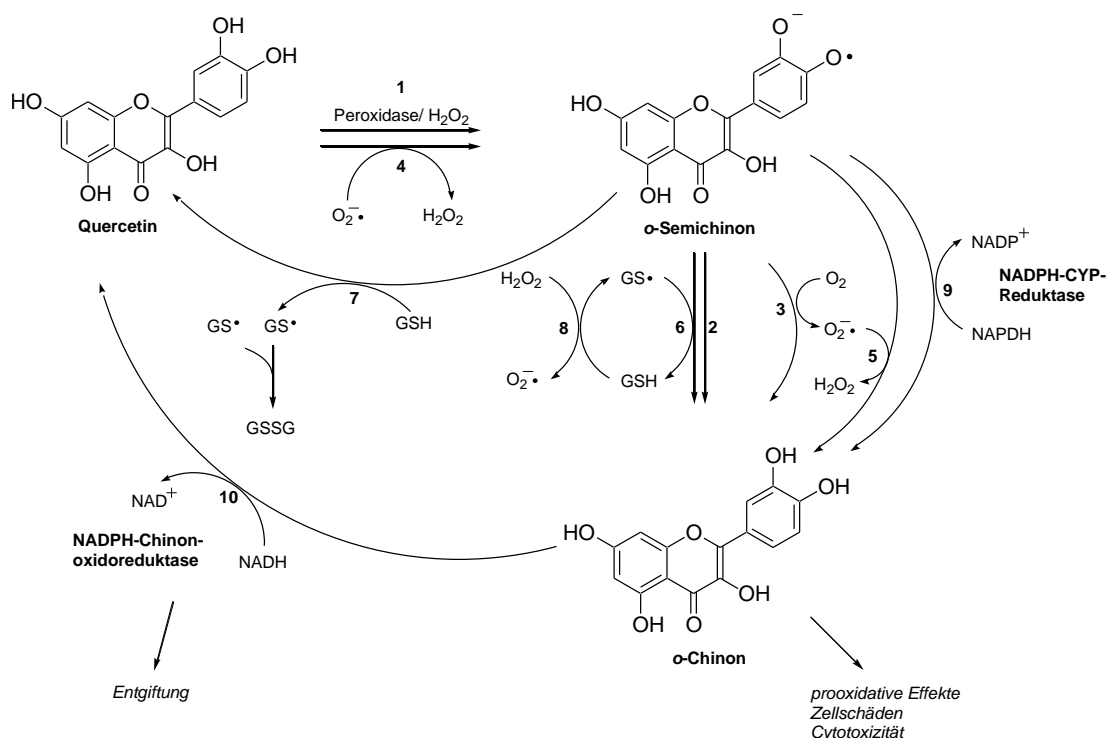
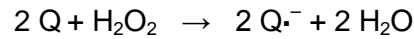


Abbildung 2.11: Mögliche Reaktionen von Quercetin und biologische Konsequenzen (ohne Berücksichtigung der Stöchiometrie) (modifiziert nach Metodiewa *et al.*, 1999), Erklärung der Reaktionen 1-10 im Text.

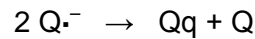
Strukturvoraussetzung für eine Chinonbildung ist die Catecholgruppe, wie sie z.B. bei Quercetin, Kaffeesäurederivaten oder den Catechinen vorliegt. Das Flavonol Quercetin ist

hinsichtlich seiner prooxidativen Eigenschaften sehr gut untersucht. Einen Überblick über mögliche Oxidationsmechanismen gibt Abbildung 2.11.

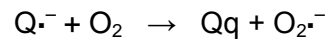
Die Reaktion von Quercetin (Q) mit Lactat-Peroxidase (1) folgt dem allgemeinen Peroxidase-Mechanismus:



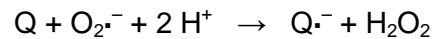
Die mesomere Struktur des gebildeten *o*-Semichinonradikals ($\text{Q}^{\cdot-}$) geht von der Catecholgruppe aus und verläuft über alle drei Ringe, was Voraussetzung für die Radikalstabilisierung ist. Durch Disproportionierung entsteht das Quercetin-*o*-Chinon (Qq) (2):



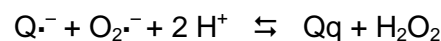
In Gegenwart von Sauerstoff kann die Reaktion zum Chinon auch über die Bildung des Superoxidradikal-Anions ablaufen (3):



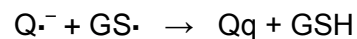
Superoxidradikal-Anionen können von Quercetin-Molekülen unter Bildung des Semichinonradikals abgefangen werden (4):



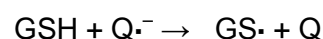
Auch das Semichinonradikal kann Superoxidradikal-Anionen abfangen (5):



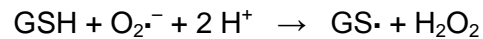
Das endogene Antioxidans Glutathion (GSH) kann bei den Redoxreaktionen des Quercetins ebenfalls eine Rolle spielen. Das Glutathionyl-Radikal (GS^{\cdot}) wird durch das Semichinonradikal reduziert (6):



Das Glutathionyl-Radikal kann entweder bei einer Ein-Elektronenübertragung mit dem Semichinon-Radikal gebildet werden (7):



oder bei der Abfangreaktion des Superoxidradikal-Anions durch Glutathion (8):



NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase katalysiert die Reduktion des Chinons zum Semichinon in einem Ein-Elektronenschritt (9), die NADPH-Chinon-Oxidoreduktase reduziert die chinoide Form hingegen in einem Zwei-Elektronenschritt zurück zur Ausgangsverbindung (10). Quercetin steht nun wieder dem oben genannten Redox-Cycling zur Verfügung (Metodiewa *et al.*, 1999).

Obwohl für einige Flavonoide, insbesondere für die Flavonole, durch den sogenannten Ames-Test, der Ende der 1970er Jahre durchgeführt wurde, mutagene Wirkungen nachgewiesen sind, sprechen Tierversuche nicht für eine kanzerogene Wirkung (Brown und Dietrich, 1979, Middleton, 1998). Ein Grund hierfür ist die geringe Resorptionsrate der Flavonoide aus der Nahrung, so dass kaum Plasmakonzentrationen erreicht werden, die *in vitro* mutagen oder zytotoxisch wirken. Es gibt daher bis heute keine toxikologischen Bedenken gegenüber flavonoidhaltigen Lebensmittel.

Kritisch zu sehen sind allerdings flavonoidhaltige Nahrungsergänzungsmittel, die hohe Flavonoid-Tagesdosen empfehlen. Bei Schwangeren besteht der Verdacht, dass eben diese hohen Dosen mit einem erhöhten Risiko für Neugeborene an Leukämie zu erkranken, einhergehen (Skibola und Smith, 2000). Eine weitere Folge einer übermäßig hohen Flavonoidkonzentration könnte eine Schilddrüsendysfunktion sein (Divi *et al.*, 1996). Die Arbeitsgruppe um Olthof (2001) konnte einen signifikanten Anstieg einer Homocysteinämie durch Chlorogensäure aus Kaffee nachweisen. Hier wurden allerdings 7 Tage lang 2 g Chlorogensäure (entspricht ca. 2.5 L Kaffeegetränk) pro Tag konsumiert. Eine Homocysteinämie wird als unabhängiger Risikofaktor für Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems angesehen.

Klinisch bedeutsam sind Flavonoidinteraktionen mit dem Cytochrom-P450 abhängigen Enzym CYP3A4, das eine wichtige Rolle im Metabolismus von Medikamenten spielt. Die gleichzeitige Einnahme von Medikamenten und Grapefruitsaft gilt als bedenklich, da das enthaltene Naringenin den Abbau von Arzneimitteln verzögert (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 μM zu hemmen (Ota und Tsukamoto, 2006). In einer kürzlichen Studie von Dreiseitel und Mitarbeitern (2008) wurde

in Kooperation mit unserem Arbeitskreis gezeigt, dass Anthocyane kein hohes Hemmpotential für dieses Enzym besitzen.

2.1.6 Pharmakokinetik der Polyphenole

Unter der Bioverfügbarkeit eines Stoffes versteht man Geschwindigkeit und Ausmaß, mit denen ein Stoff freigesetzt, resorbiert und dann am Wirkort verfügbar wird. Per Definition ist die Bioverfügbarkeit bei intravenöser Applikation 100 %. Die Stoffkonzentration wird meist durch Plasma- und Urin-Untersuchungen ermittelt (Mutschler, 1991). Die Bioverfügbarkeit ist also die Grundvoraussetzung für eine Wirkung im menschlichen Körper.

Da Polyphenolen bioaktive Wirkungen zugeschrieben werden und sie für den menschlichen Organismus bioverfügbar sind, gilt für sie, wie für andere Xenobiotika, das ADME-Konzept (absorption, distribution, metabolism, excretion) (Marquardt und Schäfer, 2004).

2.1.6.1 Aufnahme

Catechine und Procyanidine sind in Speichel stabil. Dies konnte in einer *in vitro*-Studie von Tsuchiya *et al.* (1997) gezeigt werden. In Magensaft sind allerdings nur die monomeren Verbindungen stabil (Zhu *et al.*, 2002, Neilson *et al.*, 2007). Procyanidin-Oligomere unterliegen gemäß Studien von Spencer *et al.* (2000) in simuliertem Magensaft (pH 2.0) einem Abbau in dimere und monomere Catechin-Einheiten. In einer weiteren Studie konnten in simuliertem Magensaft (pH 1.8) sowohl ein Abbau für das dimere Procyanidin B₂ zu (-)-Epicatechin als auch die Epimerisierung zu Procyanidin B₅ nachgewiesen werden (Zhu *et al.*, 2002). Die Instabilität der oligo- und polymeren Catechine ist umstritten, denn die Gruppe um Rios (2002) konnte bei *in vivo*-Versuchen nach Kakaokonsum keine Veränderungen des Procyanidinprofils (Dimere bis Pentamere) feststellen.

Polyphenole werden hauptsächlich über Dün- und Dickdarmmukosa resorbiert. Flavonoid-Glykoside können, da sie durch die Magensäure nicht gespalten werden, unverändert in den Dünndarm gelangen. In einer Tierstudie an Ratten hat man gezeigt, dass einige Aglykone, z.B. Quercetin oder auch Anthocyanidine, bereits im Magen resorbiert werden (D'Archivio *et al.*, 2007). Die Aufnahme der Glykoside sowie der Aglykone in die Zelle erfolgt im Dünndarm vermutlich mit Hilfe der Glucose-Transporter SGLT1 und GLUT2 (Chen *et al.*, 2007). In der Zelle können glykosidische Bindungen

durch β -Glucosidasen gespalten werden (Day *et al.*, 2000). Polyphenole, die verestert oder als Polymere vorliegen, müssen zunächst gespalten werden, da sie in dieser Form meist nicht resorbiert werden können. Dies geschieht entweder enzymatisch durch Enzyme der Bürstensaum-Membran oder mikrobiell durch die intestinale Mikroflora des Darmes (Bellion, 2009). Freie Hydroxyzimtsäuren können entweder durch passive Diffusion der protonierten Säure im Magen oder unter Beteiligung aktiver Transporter im Dünndarm aufgenommen werden (Ader *et al.*, 1996, Olthof *et al.*, 2001). Studien an Ileostomie-Patienten zeigen, dass Hydroxyzimtsäureester, wie z.B. die Chlorogensäure, teilweise (33 %) im Magen oder Dünndarm als intaktes Molekül absorbiert werden (Olthof *et al.*, 2001). Der Großteil der Ester gelangt aber vermutlich unmetabolisiert in den Dickdarm, wird dort durch die intestinale Mikroflora gespalten und schließlich absorbiert (D'Archivio *et al.*, 2007).

In einer in unserem Arbeitskreis durchgeführten Studie, wurde gezeigt, dass der Anteil der Polyphenole, der nicht im Magen oder Dünndarm resorbiert wird, sondern bis in den Dickdarm gelangt, zwischen 0 und 66 % liegt (Kahle *et al.*, 2005).

In den Enterozyten des Darmes finden aufgrund ihrer hohen metabolischen Aktivität bereits die ersten Hydrolyse- und *Phase II*-Metabolisierungsreaktionen statt.

2.1.6.2 Verteilung

Aufgrund der bereits erwähnten geringen Bioverfügbarkeit werden Polyphenole aus der Nahrung nur in geringen Mengen vom Körper aufgenommen. Phenolische Verbindungen werden zum größten Teil im Dünndarm metabolisiert (Abbildung 2.12) und gelangen meist glucuronidiert über die Pfortader in die Leber. Hier können sie ebenfalls metabolisiert werden. Es kann erneut zu Glucuronidierung kommen oder auch zu Methylierungen und Sulfatierungen. Diese Metabolite oder auch die Aglykone können nun biliär durch den enterohepatischen Kreislauf wieder in das Kolon gelangen (Scalbert und Williamson, 2000). Die Ausscheidung der Polyphenole und ihrer Metabolite über die Leber ist dabei von mehreren Eigenschaften abhängig: von Molekulargewicht, Struktur und Polarität (Siegers und Klaassen, 1983).

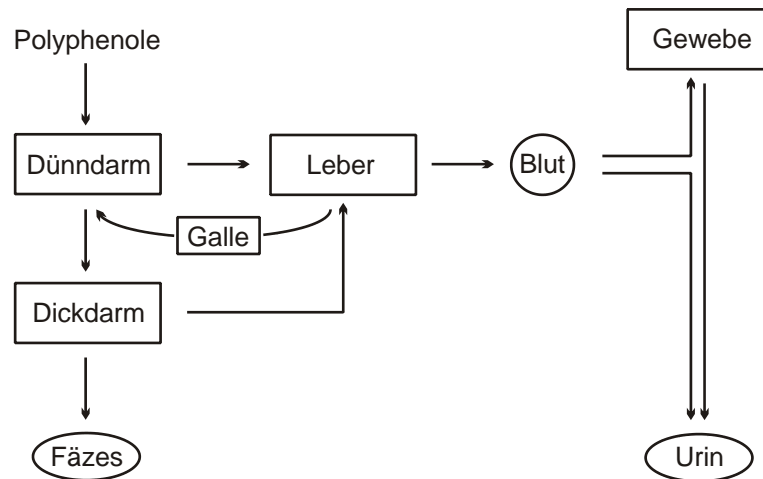


Abbildung 2.12: Mögliche Verteilungswege der Polyphenole im Gastrointestinaltrakt (Schema modifiziert nach Kahle, 2008).

Polyphenole werden auch im Blutkreislauf verteilt. So hat man in mehreren Studien gezeigt, dass nach Gabe von Quercetin und Quercetin-Glykosiden, entweder in Reinform oder in quercetinreichen Lebensmitteln, deren Sulfate und Glucuronide als Metabolite, nicht aber das freie Quercetin, im Blut nachgewiesen wurden (Day *et al.*, 2001, Graefe *et al.*, 2001, Manach *et al.*, 2004).

2.1.6.3 Metabolismus

Studien an Ratten ergaben, dass Flavonoide bereits in den Enterozyten des Dünndarmes metabolisiert werden können (Spencer *et al.*, 2001). Es kann hier sowohl zu *Phase I*-Reaktionen, wie z.B. Oxidationen (durch Cytochrom P450) oder Hydrolyse, aber auch zu den für *Phase II*-Reaktionen typischen Konjugationen kommen. In Abbildung 2.13 ist dies schematisch dargestellt.

Bei der Hydrolyse werden die Polyphenol-Glykoside je nach Zucker-Rest durch β -Glucosidasen hydrolysiert. Im menschlichen Organismus spielen dabei die Laktase-Phloridzin-Hydrolase (LPH, EC 3.2.1.108) und die zytosolische β -Glucosidase (CBG) eine bedeutende Rolle.

Die Laktase-Phloridzin-Hydrolase besitzt zwei unterschiedliche Domänen. An der einen werden hauptsächlich Laktose und Laktosylceramide aus der Milch hydrolysiert, an der anderen kann Phloridzin in Phloretin und Glucose gespalten werden. Quercetin-Glykoside können an der Laktase-Domäne umgesetzt werden.

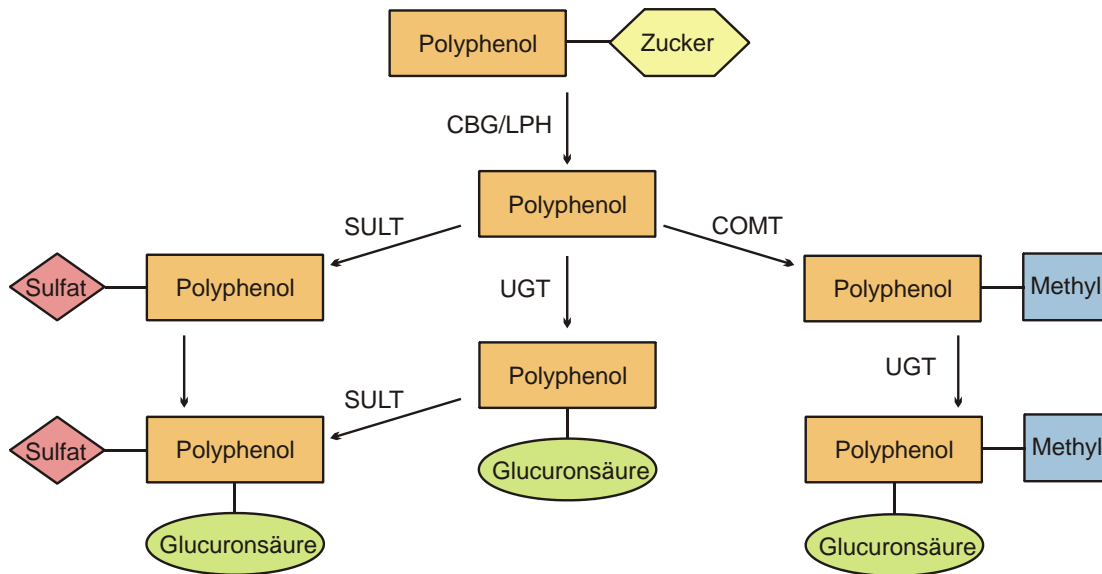


Abbildung 2.13: Schema des möglichen Metabolismus glykosidisch gebundener Polyphenole im Dünndarm (modifiziert nach Scalbert und Williamson, 2000). CBG: cytosolische β -Glucosidase; LPH: Laktase-Phloridzin-Hydrolase; COMT: Catechol-O-Methyltransferase; UGT: UDP-Glucuronyltransferase; SULT: Phenol-Sulfo-transferase.

Die zytosolische β -Glucosidase ist Substrat-unspezifisch und wird in Säugern hauptsächlich in Leber, Niere und Dünndarm gefunden. Sie spaltet Glukoside und wird auch mit der Detoxifizierung von Xenobiotika in Verbindung gebracht (Day *et al.*, 2000, Nemeth *et al.*, 2003).

An den Cytochrom-P450-abhängigen Phase I-Reaktionen sind Cytochrom-P450-Oxidoreduktasen beteiligt. Sie sind maßgeblich für den oxidativen Abbau von Xenobiotika verantwortlich. In den Metabolismus der Flavonoide sind vor allem die beiden Isoenzyme CYP1A1 und CYP3A4 involviert. Je nach Substitutionsmuster der Flavonoide kommt es zu Hydroxylierungen oder Demethylierungen, wobei erstere bei Polyphenolen mit keiner oder einer Hydroxylgruppe am B-Ring stattfinden. Demethylierungen erfolgen nur, wenn die Methoxygruppe an C4' (z.B. Tamarixetin) sitzt, nicht aber bei 3'-O-methylierten Derivaten (z.B. Isorhamnetin) (Breinholt *et al.*, 2002, Nielsen *et al.*, 1998).

Bei den für *Phase II*-Reaktionen typischen Konjugationen werden die Aglykone nach der Hydrolyse schnell metabolisiert. Hieran sind die Catechol-O-Methyltransferase (COMT, EC 2.1.1.6), die UDP-Glucuronyltransferasen (UGT, EC 2.4.1.17) sowie die Sulfotransferasen (SULT, EC 2.8.2.1) beteiligt.

Die Catechol-O-Methyltransferase deaktiviert in den sympathischen Nervenenden die Neurotransmitter Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin. Sie kommt in verschiedenen Geweben vor. Polyphenole können ebenfalls von ihr methyliert werden. Im Gegensatz zu

Cytochrom-P450 kommt es bei COMT-katalysierten Reaktion zu einer Methylierung an C3'.

Uridin-5'-diphosphat-Glucuronyltransferasen katalysieren die Konjugation von Polyphenolen mit Glucuronsäure. Dies geschieht vor allem durch die UGT 1A-Familie. Die zum Teil großen interindividuellen Unterschiede werden durch unterschiedliche Lebensgewohnheiten erklärt. Es wird diskutiert, dass Alkohol, Drogen, Rauchen und die Ernährung die Aktivität der UGT steigern können (Scalbert und Williamson, 2000, Williamson et al., 2000). Die UGT-katalysierte Glucuronidierung verläuft regioselektiv an C3'. Existiert diese Position nicht, verläuft die Glucuronidierung ausschließlich an C7 (Davis und Brodbelt, 2008).

Sulfotransferasen sind weit verbreitet und kommen vor allem im Zytosol von Leber und Kolon vor. Die beiden Isoenzyme SULT1A1 und SULT1A3 sind für die Sulfatierung der Polyphenole verantwortlich. Anders als bei den UGT haben die Lebensgewohnheiten wie z.B. Xenobiotika, Nahrung oder auch Umweltfaktoren keinen Einfluss auf das Enzym. Es kann allerdings zu einer Substrat-Inhibierung durch die Polyphenole kommen. Die Struktur des C-Rings der Polyphenole bestimmt hier das Ausmaß von Sulfatierung und Inhibierung (Huang *et al.*, 2009, Scalbert und Williamson, 2000).

Während in einer an Ratten durchgeführten Fütterungsstudie für (+)-Catechin das Glucuronid als Hauptmetabolit ermittelt wurde, hat man für (-)-Epicatechin das Sulfoglucuronid, das Glucuronid und das 3'-O-methylierte Sulfat identifiziert (Baba *et al.*, 2001). Die Autoren diskutieren unterschiedliche Affinitäten der beiden Monomere zu COMT, UGT und SULT.

2.1.6.4 Ausscheidung

Die Ausscheidungsrate der Polyphenole schwankt sehr stark. In der Literatur sind Werte von 0.3% der aufgenommenen Menge für Chlorogensäure, 2.5% für Quercetin-Glykoside und 19% für Catechin-Monomere genannt. Die Ausscheidung erfolgt in diesem Fall renal, sie kann aber auch biliär erfolgen (Manach *et al.*, 2005).

Neben den Ausgangsverbindungen werden auch zahlreiche Metabolite der Polyphenole über die Niere ausgeschieden. Diese können aus dem bakteriellen Abbau im Dickdarm und anschließender Resorption stammen (Olthof *et al.*, 2003, Rechner *et al.*, 2002).

Die Polyphenole sowie ihre Metabolite, die entweder im Darm nicht resorbiert werden oder durch den enterohepatischen Kreislauf erneut in den Darm gelangt sind, befinden sich in Fäzes und Fäzeswasser. Über die Quantifizierung dieser Substanzen kann auf die metabolische Aktivität von Darmbakterien und Leber geschlossen werden (Jenner *et al.*, 2005).

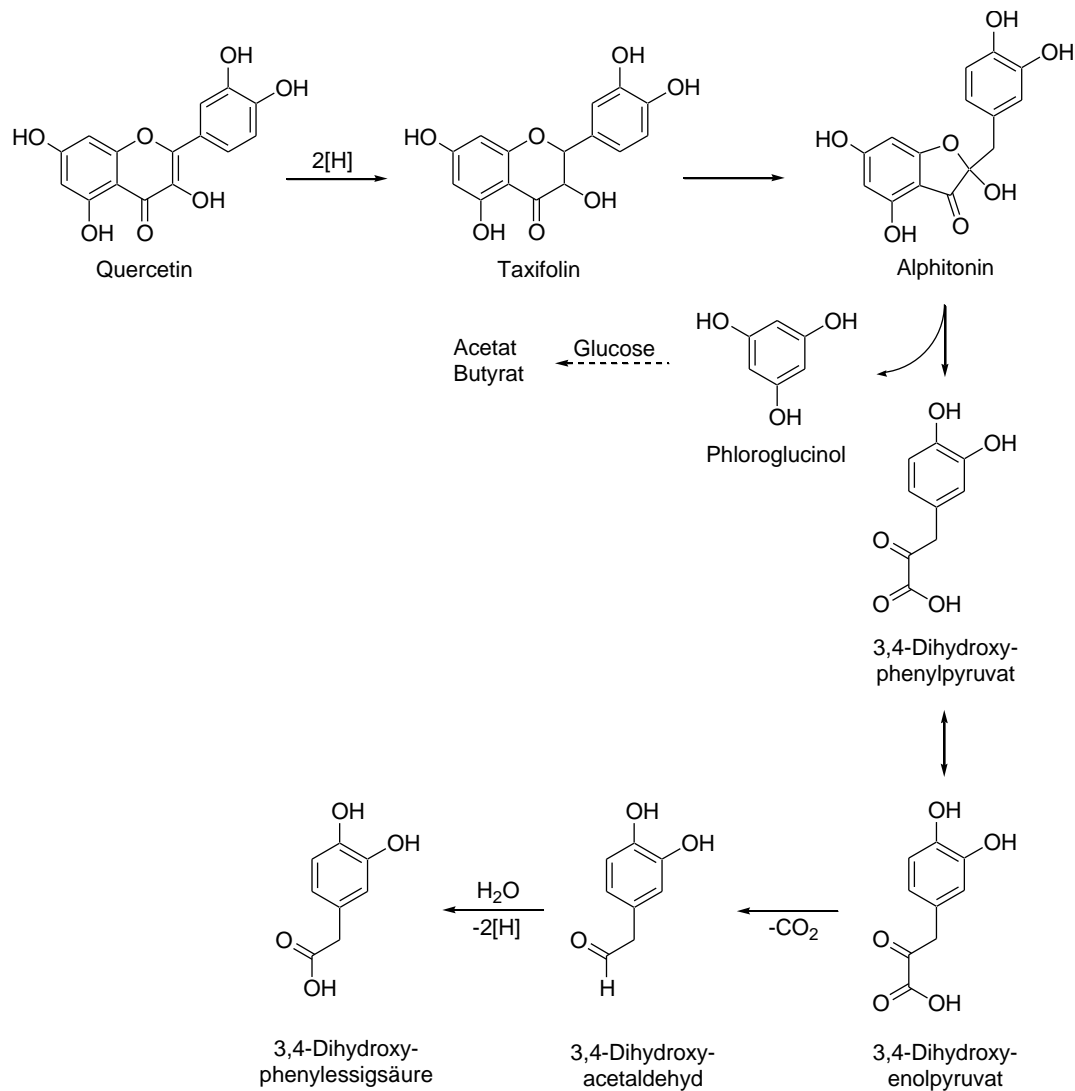


Abbildung 2.14: Postulierter Abbau von Quercetin durch das humane Darmbakterium *Eubacterium ramulus* (modifiziert nach Blaut *et al.*, 2003).

Interessanterweise wird ein großer Teil der Flavonoide wahrscheinlich nach Abbau über die Atemluft ausgeschieden. In einer Studie von Walle und Mitarbeitern (2001) mit ^{14}C -markiertem Quercetin konnte gezeigt werden, dass in der Atemluft 42 – 64 % des oral verabreichten radioaktiven Kohlenstoffs als $^{14}\text{CO}_2$ enthalten waren. Der ^{14}C -Anteil lag im Urin bei 3.3 – 5.7 % und in Fäzes bei 0.2 – 4.6 %. In Abbildung 2.14 ist der postulierte

intestinale Abbau von Quercetin gezeigt. Bei der Decarboxylierung von 3,4-Dihydroxyenolpyruvat wird der radioaktiv markierte Kohlenstoff abgespalten.

Es ist bekannt, dass der C-Ring der Flavonoide von verschiedenen Bakterienspezies der intestinalen Humanflora gespalten werden kann (Winter *et al.*, 1991, Kim *et al.*, 1998). In Abbildung 2.14 ist der wahrscheinliche Abbau von Quercetin durch das Darmbakterium *Eubacterium ramulus* dargestellt. Dabei wird Quercetin durch Reduktion und Ringkontraktion und anschließender Hydrolyse zu 3,4-Dihydroxyphenylpyruvat und Phloroglucin abgebaut. Ist Glucose zugegen, wird letzteres zu Acetat und Butyrat weiter umgesetzt (Blaut *et al.*, 2003).

Bei *in vitro*-Studien, in denen monomere Flavan-3-ole mit humanen Fäzes bzw. mit reinen Bakterienkulturen inkubiert wurden, traten neben den für Polyphenole, wie z.B. Quercetin, bekannten Metaboliten 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, 3-Hydroxyphenylelessigsäure und Homovanillinsäure auch spezifische Metabolite wie δ -Phenyl- γ -valerolactone (Abbildung 2.15) auf. Die Bildung dieser Metabolite bei der Inkubation von (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und (-)-Epicatechingallat ist auf das Fehlen der Carbonylgruppe an C4 zurückzuführen (Meselhy *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2001).

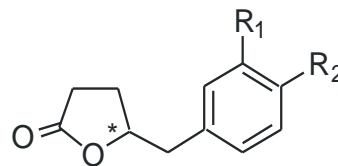


Abbildung 2.15: Phenyl- γ -valerolacton ($R_1=R_2=H$); 5-(4-Hydroxyphenyl)- γ -valerolacton ($R_1=H$, $R_2=OH$); 5-(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton ($R_1=OH$, $R_2=OH$);

Allgemein ist allerdings zu beachten, dass die in der jeweiligen Studie betrachteten „positiven“ und auch „negativen“ Eigenschaften der Polyphenole aus den jeweiligen Studien genau hinterfragt werden. So macht es wenig Sinn, wenn bei *in vitro*-Studien die Konzentrationen der vom Körper aufgenommenen Substanzen unverhältnismäßig sind. Werden Reinsubstanzen verabreicht, können eventuelle Wechselwirkungen mit anderen Verbindungen, die normalerweise im Lebensmittel vorhanden sind, nicht berücksichtigt werden.

Die Ergebnisse aus *in vitro*-Studien dürfen auch nicht einfach auf *in vivo*-Testsysteme übertragen werden. Es muß genau bekannt sein, wie die Verbindungen im Humanstoffwechsel vorliegen, d.h. auch die Metabolite sind zu berücksichtigen. Ihre biologische Aktivität kann sich unter Umständen deutlich von derjenigen der ursprünglichen

Verbindung unterscheiden (Manach *et al.*, 2004). Dies ist z.B. bei Daidzein (4',7-Dihydroxyisoflavon) aus Soja und seinem Metabolit Equol (4',7-Dihydroxyisoflavan) der Fall (Kang *et al.*, 2007).

Ergebnisse aus Tierexperimenten können aufgrund der Unterschiede im Metabolismus zwischen Mensch und Tier ebenfalls nicht ohne weiteres übernommen werden. Ratten besitzen im Vergleich zum Mensch keine Gallenblase, diese spielt im Flavonoidmetabolismus (siehe Abbildung 2.13) aber eine wichtige Rolle (Manach *et al.*, 2004). Der mikrobielle Abbau der Polyphenole im Magen von Ratten unterscheidet sich aufgrund einer erhöhten Anzahl an Bakterien ebenfalls deutlich vom menschlichen Metabolismus (Williamson *et al.*, 2000).

Auch Schweine und Katzen metabolisieren unterschiedlich. Während erstere keine Sulfatkonjugate bilden können, besitzen Katzen keine Glucuronidasen (Gibson und Skett, 1994).

Um die biologischen Effekte der Polyphenole besser abschätzen zu können, sind umfassende Kenntnisse also unabdingbar. Vor allem *in vivo*-Studien sind hilfreich, diese Informationen zu erlangen. Vorab liefern *in vitro*-Studien die Grundlagen.

2.2 Lipoxygenase

2.2.1 Vorkommen und Struktur

Die zu den zytosolischen Enzymen zählenden Lipoxygenasen (LOX) (EC 1.13.11.12) sind eine Gruppe eng verwandter nicht-häm-Eisen enthaltender Dioxygenasen. Sie kommen in Pflanzen, Pilzen, Tieren und Humangewebe vor. Neuesten Studien zufolge wurden LOX-Proteine ebenfalls in Korallen, Moos und Bakterien gefunden (Andreou *et al.*, 2009b, Oliw, 2002). Lipoxygenasen spielen eine wichtige Rolle in Wundheilungs- und Abwehrprozessen von Pflanzen. In Säugern sind sie an Entzündungsprozessen, Asthma und Herzerkrankungen beteiligt. In Pilzen spielen Lipoxygenasen eine Rolle bei der Regulierung der Mykotoxinproduktion sowie im sexuellen und asexuellen Lebenszyklus. Über ihre biologische Funktion in Prokaryonten ist bisher nichts bekannt (Andreou und Feussner, 2009a).

Höhere Pflanzen enthalten viele verschiedene LOX. So kommen allein in der Sojabohne (*Glycine max*) 8 und im Menschen 5 Isoformen vor (Boeglin *et al.* 1998; Krieg *et al.* 1998; Sun *et al.* 1998).

LOX-Proteine bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette mit einer Molekülmasse von 75-80 kDa in tierischen und 94-104 kDa in pflanzlichen Organismen (Brash, 1999). Alle LOX bestehen aus einer kleinen N-terminalen β -Barrel Domäne sowie einer größeren fast ausschließlich helikalen C-terminalen Domäne, die das katalytische Zentrum enthält (Abbildung 2.16). In diesem ist ein einzelnes Nichthäm-Eisen-Atom enthalten. Das Eisen in der Soja-LOX ist high-spin konfiguriert (Gaffney 1996) und liegt in zwei Oxidationsstufen vor: Fe^{2+} (inaktive Form) und Fe^{3+} (aktive Form).

Die Liganden sind verzerrt octahedral bipyramidal um das Eisen-Atom angeordnet. Im pflanzlichen Organismus stellen drei Histidinreste, eine Asparaginseitenkette und die Carboxylgruppe eines Isoleucinrestes vom C-Terminus des Proteins fünf der Liganden dar, als sechster Ligand wird ein Wassermolekül oder eine Hydroxy-Gruppe angesehen. Im Säugerorganismus ist statt des Asparagins ein weiterer Histidinrest vorhanden (Brash 1997, Andreou und Feussner, 2009a).

Die Soja LOX-1 wurde sehr detailliert untersucht und stellt ein exzellentes Modellsystem zum Verständnis aller Lipoxygenasen dar. Sie ist einfach aufzureinigen, ausreichend stabil und in großen Mengen verfügbar. Aufgrund der hohen Sequenzhomologien zwischen den einzelnen Lipoxygenasen wird davon ausgegangen, dass

Schlussfolgerungen auf andere Lipoxygenasen gezogen werden können (Prigge *et al.*, 1997, Sudharsan und Rao, 1997).

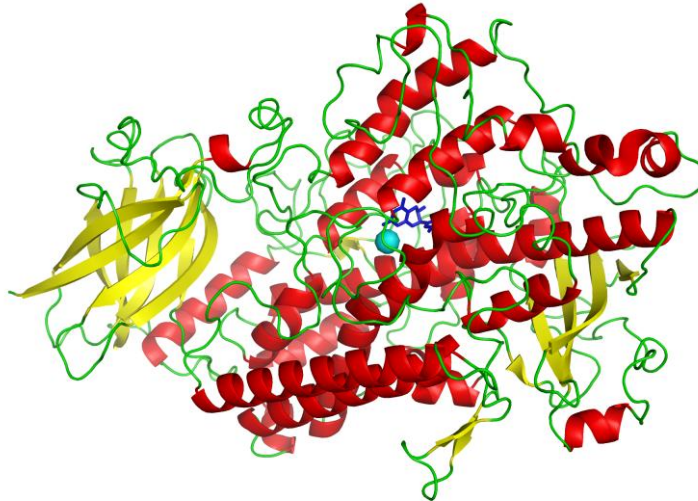


Abbildung 2.16: Soja-LOX mit N-terminalem β -Barrel (links, gelb) und der katalytische Domäne mit nicht-Häm Eisenatom (türkis), Ligand (dunkelblau) (basiert auf PDB ID 1JNQ).

Die Struktur des Lipoxygenase-3-Isoenzym ist der LOX-1 mit 72%iger Übereinstimmung sehr ähnlich. Dabei weist der Bereich des Eisens im katalytischen Zentrum die größte Sequenzübereinstimmung der Lipoxygenasen auf (Prigge *et al.*, 1997).

2.2.2 Nomenklatur

Die Nomenklatur beruht auf der Substratspezifität des Enzyms. Eine 15-LOX oxidiert Arachidonsäure (20 C-Atome) an C15, Linolsäure wird an C13 oxidiert; eine pflanzliche 13-LOX entspricht also einer 15-LOX aus Säugern. Wenn es erforderlich ist, wird die Stereoselektivität ebenfalls angegeben. Existieren mehrere, z.B. 12-LOX-Typen in einer Spezies, wird nach dem Gewebe des Auftretens unterschieden (Yamamoto *et al.*, 1997).

Bis vor einigen Jahren wurden die LOX nach ihrem pH-Optimum klassifiziert und in Typ L-1, L-2 und L-3 unterteilt. So haben Typ L-1 LOX ihr pH-Optimum bei pH 9, Typ L-2 LOX bei genau pH 6.5 und Typ L-3 LOX um pH 7 (Axelrod *et al.*, 1981).

Das Sojabohnen L-1 Isozym ist allerdings eine „reine“ 15-LOX, die bei geringen Enzymkonzentration aus Arachidonsäure ausschließlich 15S-HPETE (Hydroperoxy-eicosatetraensäure) bildet (Brash, 1999).

2.2.3 Mechanismus der Lipoxygenase-Katalyse

Nur mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit 1,4-(Z,Z)-Pentadiensystem stellen Substrate für LOX-katalysierte Reaktionen dar (Abbildung 2.17) (Yamamoto *et al.*, 1997; Grechkin, 1998).

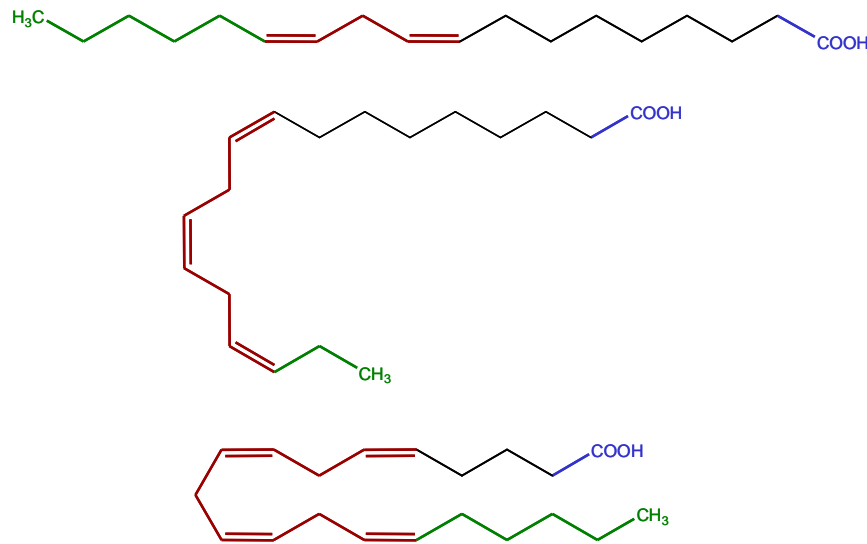


Abbildung 2.17 Gemeinsame Strukturelemente von LOX-Substraten am Beispiel von Linol-, Linolen- und Arachidonsäure (von oben nach unten); ■: proximaler Rest (hydrophil) ■: distaler Rest (hydrophob), ■: Pentadiensystem (Wiedergaben nach Lit. Knaup, 2008 mit Genehmigung von Knaup, B.).

Die Umsetzung von 1,4-(Z,Z)-Pentadien-strukturierten Fettsäuren mit molekularem Sauerstoff zu Hydroperoxyfettsäuren ist in Abbildung 2.18 dargestellt.

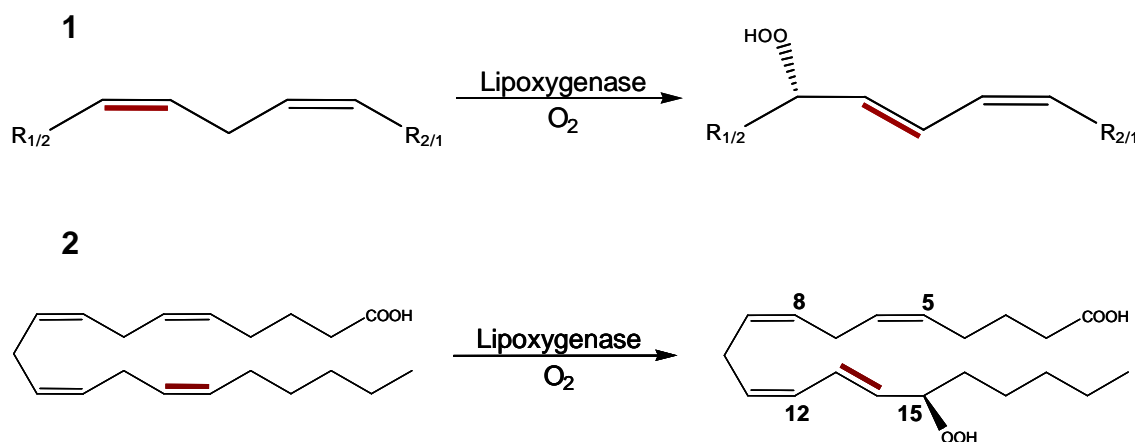


Abbildung 2.18: 1: Dioxigenierung 1,4-(Z,Z)-ungesättigter Fettsäuren durch LOX (für Linolsäure: R_1 (Methylende) = $(CH_2)_4Me$; R_2 (Carboxylende) = $(CH_2)_7COOH$). 2: Dioxigenierung von Arachidonsäure durch 15-LOX (modifiziert nach Brash, 1999).

Zu Beginn der Katalyse muss die LOX aktiviert werden. Durch katalytische Mengen an Fettsäureperoxiden wird Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert. Es kommt außerdem zur stereoselektiven Wasserstoff-Abspaltung einer doppeltallylständigen Methylengruppe des 1,4-(Z,Z)-Pentadiensystems des Substrats (Abbildung 2.18). Dies erfolgt ausschliesslich nach einem Tunnelmechanismus, wie unter anderem aus dem Vergleich von kinetischen Konstanten mit Wasserstoffisotopen (Deuterium, Tritium) gezeigt wurde (Rickert und Klinmann, 1999; Knapp und Klinmann, 2002). Da der Transfer nun eben nicht über, sondern durch eine Energiebarriere hindurch erfolgt, können Prozesse ablaufen, die nach dem klassischen Ansatz energetisch verboten wären. Der abstrahierte Wasserstoff wird zu einem freien Radikal oxidiert und ist jetzt in der Lage, mit nicht-aktiviertem molekularem Sauerstoff zu reagieren. Während dieses Schritts findet die Reduktion von Fe [III] zu Fe [II] statt. Das entstandene Fettsäure-Radikal reagiert mit O_2 zu einem Peroxyl-Radikal. Aufgrund des konjugierten Doppelbindungssystems ist dieses relativ stabil. Die Insertion von molekularem Sauerstoff erfolgt antarafacial zum abstrahierten Wasserstoff (Schneider *et al.*, 2007). Wie der Sauerstoff zum aktiven Zentrum gelangt, ist noch nicht geklärt. Diskutiert werden eine diffusionskontrollierte Bewegung durch die Substratbindungstasche bzw. ein separater Sauerstoffkanal von der Enzymoberfläche zum aktiven Zentrum (Knapp *et al.*, 2001). Im letzten Schritt erfolgt die Reduktion des Peroxyl-Radikals zum Hydroperoxid unter Oxidation des Eisens zum Eisen [III] (Wiederherstellung der katalytisch aktiven Zustands).

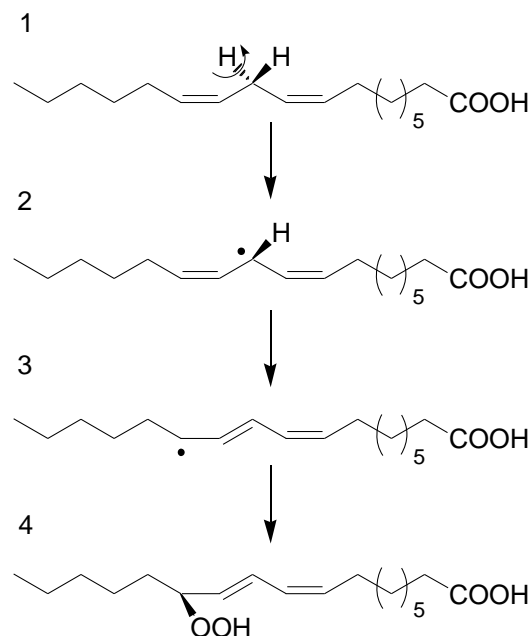


Abbildung 2.19: LOX-Katalyse und Regioselektivität des Reaktionsmechanismus, modifiziert nach Andreou *et al.* (2009a). 1: H-Abspaltung, 2 nach 3: Ausbildung des konjugierten Diens, 3 nach 4: antarafaciale Sauerstoff-Insertion mit anschließender Reduktion zum Hydroperoxid.

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

2.2.4 Die Rolle der Lipoxygenasen und ihre Produkte *in vivo*

Die Funktionen der LOX und ihrer Produkte sind äußerst vielfältig. Die Bildung biologisch aktiver Verbindungen der Lipoxygenasen ist bisher am ausführlichsten untersucht. In Abbildung 2.20 ist ein schematischer Überblick gezeigt.

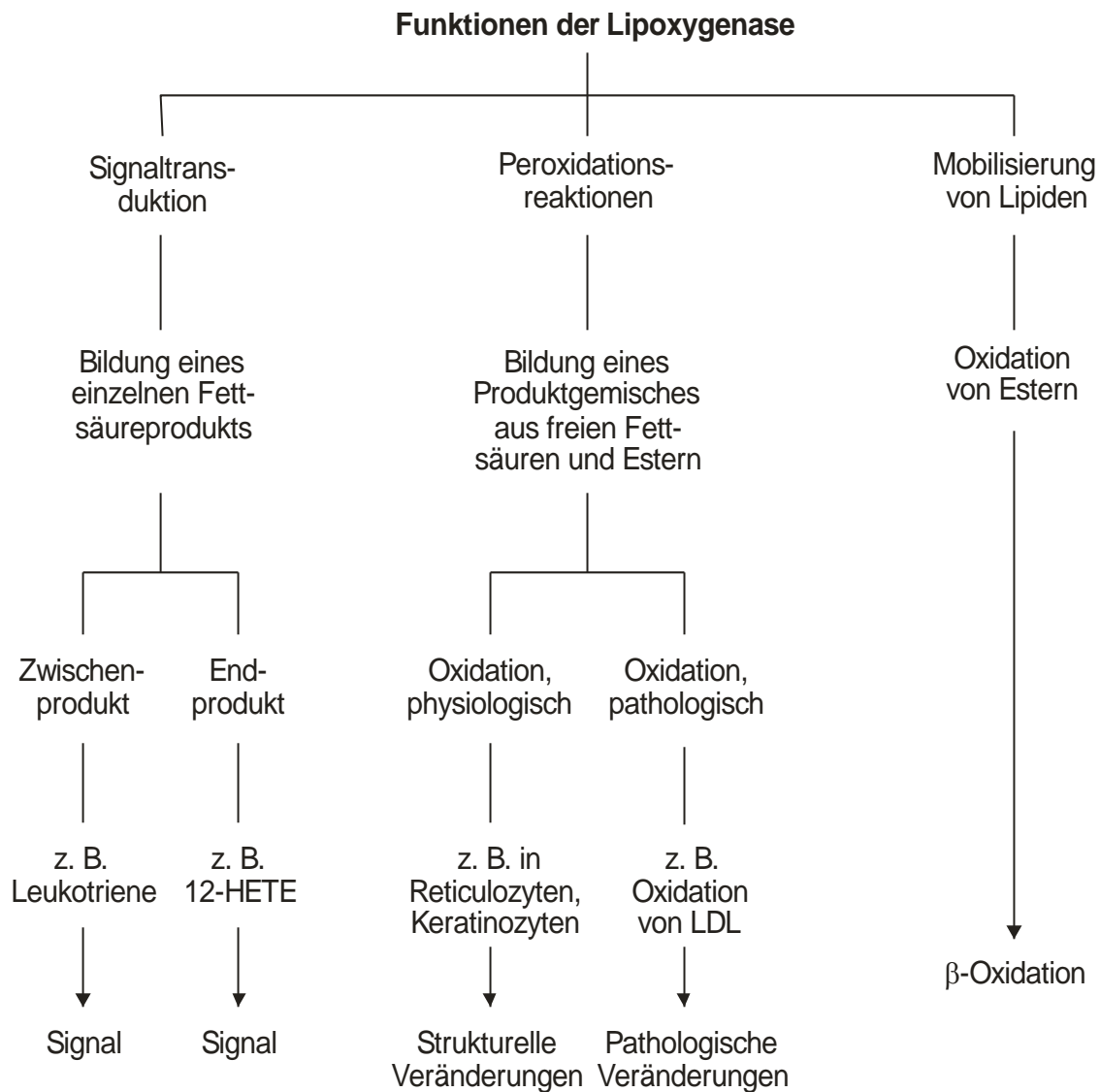


Abbildung 2.20: Biologische Funktionen der LOX modifiziert nach Brash (1999).

Als ein Zwischenprodukt in der Signalübertragung in Pflanzen werden Jasmonsäure und die Aldehydbiosynthese betrachtet, in Wirbeltieren sind dies Leukotriene oder die Lipoxinsynthese. Wird die 5-LOX im Menschen aktiviert, werden Leukotriene produziert, die zusammen mit Dihydroxyeicosanoiden Bronchokonstriktion und Entzündungs-

reaktionen hervorrufen. 5-LOX Inhibitoren und Leukotrienrezeptor-Antagonisten werden in der Asthmathherapie eingesetzt.

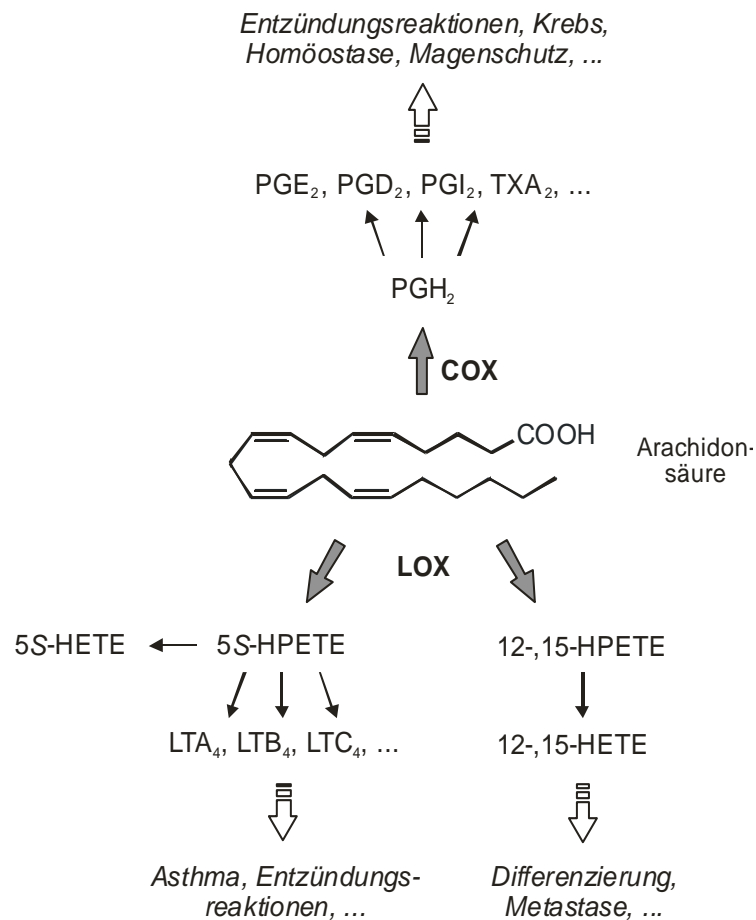


Abbildung 2.21: Schematische Darstellung der Arachidonsäurekaskade (PG = Prostaglandin, z.B. PGE₂ = Prostaglandin E₂; TXA₂ = Thromboxan A₂; COX = Cyclooxygenase; LOX = Lipoxygenase; HETE = Hydroxyeicosatetraensäure; HPETE = Hydroperoxyeicosatetraensäure; LT = Leukotrien, z.B. LTA₄ = Leukotrien A₄) (Steinhilber, 1994; Brash, 1999).

Ein Beispiel für ein durch 12-LOX aus Blutplättchen katalysiertes Endprodukt ist 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE). LOX-Produkte wie 12-HETE können sehr schnell wirken. Schon im nanomolaren Bereich binden sie an Rezeptoren und Kanäle der Zelloberfläche um dort u.a. Neurotransmission und Zelladhäsion zu modulieren. Die 12-LOX ist aber auch in der Lage, ihre Wirkung über einen längeren Zeitraum zu entfalten und dabei Produkte zu bilden, die einen Effekt auf Zelldifferenzierung oder das Überleben der Zellen haben.

Wird eine veresterte Fettsäure umgesetzt, entstehen Mischungen von Hydroxyperoxiden, die durch Änderungen der physikalischen Eigenschaften Membranstrukturen modifizieren können. Das Potential zur Veränderung der Membranstruktur wurde erstmals anhand der 15-LOX aus Säugetierreticulozyten und ihrer Funktion während der Zellalterung gezeigt.

Den gleichen Effekt hat man auch während der Zellalterung von Keratinozyten und der Entwicklung von Epithelzellen der Linse beobachtet (Brash, 1999).

Der komplexe, von Lipoxygenasen katalysierte Metabolismusweg wird im Menschen Arachidonsäurekaskade genannt und ist in Abbildung 2.21 schematisch dargestellt.

Durch die Bereitstellung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden wird infolge enzymatischer Wirkung der cPLA₂ dieser Mechanismus eingeleitet. Das Substrat AA steht nun zur oxidativen Umsetzung durch LOX bereit und kann in Hydroperoxyeicosatetraensäuren (HPETEs) umgewandelt werden. Durch die Leukotrien A₄-Synthase entsteht nachfolgend LTA₄, welches als zentrales Substrat für die LTA₄-Hydrolase und die Leukotrien C₄-Synthase zur Verfügung steht. LTC₄ kann anschliessend durch Peptidasen zu LTD₄ und LTE₄ gespalten werden (Steinhilber, 1994).

Im Folgenden wird nun eine kurze Zusammenfassung über die wichtigsten Eigenschaften der Lipoxygenasen gegeben (Werz und Steinhilber, 2006), ohne auf die genauen Wechselwirkungen näher einzugehen.

2.2.4.1 Pathophysiologische Bedeutung der 5-Lipoxygenase

Leukotriene spielen eine wichtige Rolle bei inflammatorischen und allergischen Fehlfunktionen des Körpers. Seit langem schon werden *Asthma bronchiale*, allergische Rhinitis, entzündliche Hauterkrankungen, rheumatische Arthritis und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie *Colitis ulcerosa* und *Morbus Crohn* als von der 5-LOX vermittelte Krankheiten angesehen. Asthma bronchiale wird allgemein als die bedeutendste Krankheit gesehen, die im Zusammenhang mit der 5-LOX steht.

Aktuellen Studien zu Folge könnte die 5-LOX ebenfalls an Osteoporose, Prostata-, Bauchspeicheldrüsen- und Brustkrebs, sowie an Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, wie z. B. Atherosklerose, Herzinfarkt und Schlaganfällen beteiligt sein (Werz, 2007).

Der Signalübertragungsweg der 5-LOX ist der am besten untersuchte, aber auch die 12- und 15-LOX könnten eine wichtige Rolle in der Krankheitsentstehung spielen.

2.2.4.2 Pathophysiologische Bedeutung der 12- Lipoxygenase

Die wichtigsten Bedeutungen haben Schneider und Bucar (2005) zusammengefasst: durch zahlreiche Studien wurde gezeigt, dass 12S-HETE eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese und der Apoptose spielt. Eine gesteigerte Expression der 12S-LOX konnte u. a. bei Prostata-, Bauchspeicheldrüsen- Lungen- und Brustkrebs nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass 12-LOX-Metabolite auch an der Pathogenese der Psoriasis (Schuppenflechte) beteiligt sind; dabei handelt es sich hier um das 12R-Enantiomer. In Säugetieren wird die 12-LOX hauptsächlich in Thrombozyten, Leukozyten und Hautzellen exprimiert.

2.2.4.3 Pathophysiologische Bedeutung der 15- Lipoxygenase

15-LOX kommen sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Zellen vor. Bei letzteren wurden sie bisher in Retikulozyten (Schewe *et al.*, 1975), Makrophagen (Levy *et al.*, 1993) Gefäßendothel-, Prostataepithel-, Gliazellen und Neuronen (Kühn *et al.*, 1984; Kelavkar *et al.*, 2000; Praticò *et al.*, 2004), sowie in eosinophilen und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen (Izumi *et al.*, 1991) Die physiologischen Eigenschaften der LOX sind nicht vollständig geklärt.

In vitro Studien zeigten, dass die 15-LOX in der Lage ist, veresterte Fettsäuren in biologischen Membranen und Lipoproteinen (LDL) zu oxidieren, deshalb wird die 15-LOX mit Arteriosklerose in Zusammenhang gebracht. Man nimmt an, dass 15-LOX Inhibitoren das Risiko, an Arteriosklerose zu erkranken, verringern (Schneider und Bucar, 2005).

2.2.5 Einfluß von Polyphenolen auf die Lipoxygenase

Der erste natürliche 5-LOX-Inhibitor ist Nordihydroguaretsäure (NDGA) (Bokoch und Reed, 1981). NDGA kommt als *R,S*-Enantiomer im Kreosotbusch (*Larrea tridentata*) vor (Arteaga *et al.*, 2005).

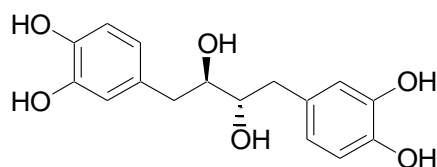


Abbildung 2.22: Struktur der *R,S*-Nordihydroguaretsäure.

Obwohl die Inhibierung der Lipoxygenase durch viele Naturstoffe belegt ist, sind die genauen Mechanismen bisher nicht geklärt. In Betracht kommen kompetitiv-reversible und irreversible Inhibitionsmechanismen wie auch Inhibierung durch Reduktion des enzym-gebundenen radikalischen Zwischenproduktes (Fiorucci *et al.*, 2008). Flavonoide können in biologische Prozesse eingreifen, indem sie z.B reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) abfangen. Aufgrund ihrer stark funktionalisierten Ringstruktur haben sie antioxidative und radikalfangende Eigenschaften (s. 2.1.4.1). Unter den pflanzlichen Lipoxygenasen wird das Soja LOX-1-Isoenzym als Modell für nichthämeisenhaltige Dioxygenasen angesehen. Außer den Flavonoiden können auch deren Abbauprodukte die LOX hemmen (Borbulevych *et al.*, 2004).

Tabelle 2.2: Inhibierung der Soja LOX-1 (zellfrei) durch verschiedene Polyphenole

Substanz	IC ₅₀ [µM]	
NDGA	3	Schewe <i>et al.</i> , 2001
NDGA	12	Gleason <i>et al.</i> , 1995
(+)-Catechin	inaktiv	Schewe <i>et al.</i> , 2001
(+)-Catechin	>1000	Baumann <i>et al.</i> , 1980
(-)-Epicatechin	Nicht getestet	Schewe <i>et al.</i> , 2001
(-)-Epicatechin	330	Baumann <i>et al.</i> , 1980
Quercetin	0.18 ± 0.02	Whitman <i>et al.</i> , 2002
Quercetin	5	Schewe <i>et al.</i> , 2001
Genistein	107 ± 5	Mahesha <i>et al.</i> , 2007
Genistein	1000	Schewe <i>et al.</i> , 2001

Mechanistisch hemmen Polyphenole die LOX primär über die Reduktion von reaktiven Sauerstoffspezies, was auf ihr antioxidatives Potential zurückzuführen ist. Außerdem können die vicinalen Hydroxylgruppen der Polyphenole das Eisenatom des aktiven Zentrums der LOX chelieren (Werz, 2007).

Tabelle 2.3: Inhibierung der 5-LOX (modifiziert nach Werz, 2007; *Mahesha *et al.*, 2007; **Burnett *et al.*, 2007)

Substanz	IC ₅₀ [µM], intakt	IC ₅₀ [µM], zellfrei
NDGA	0.8	28
(+)-Catechin**	Nicht getestet	57 (16.5 µg/mL)
(-)-Epicatechin	Nicht getestet	22
Quercetin	3.2	0.3, 25
Genistein*	Nicht getestet	125 ± 5

In Tabelle 2.2 sind die IC₅₀-Werte verschiedener Polyphenole zusammengefasst. Obwohl die Soja LOX-1 sehr gut untersucht ist und als Modellsystem für Lipoxygenase-induzierte Dioxygenierung angesehen wird, finden sich nur wenige und teils widersprüchliche Daten zu IC₅₀-Werten in zellfreiem Medium und fast keine zu Untersuchungen im intakten Zellsystem (s. Tabelle 2.2). Zur 5-LOX sind weit mehr zu finden (s. Tabelle 2.3). Daten zu Flavan-3-olen sind, wenn dann auch nur für die beiden in der Natur am häufigsten vorkommenden Flavan-3-ole, (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, zu finden. Durch Epimerisierung im Alkalischen entstehen (+)-Epicatechin und (-)-Catechin (Courbat *et al.*, 1977). Dies geschieht u. a. bei der Herstellung von Kakaopulver. Für (+)-Epicatechin und (-)-Catechin gibt es bisher keine Daten zur Inhibierung der Lipoxygenasen.

Untersucht man den Einfluss bestimmter Substanzen auf die LOX-1 in zellfreiem Medium, wird deren direkte Wechselwirkung betrachtet. Im zellulären Assay hingegen bestehen neben dieser direkten Beeinflussung noch viele weitere Möglichkeiten, wie z. B. die Unterdrückung der Produktsynthese der LOX-1. Idealerweise sollten die zu testenden Substanzen sowohl in zellfreien als auch in Zellen-enthaltenden Testsystemen (z. B. Vollblut, isolierte primäre Leukozyten, 5-LOX exprimierende Zelllinien) untersucht werden (Wertz, 2007).

2.2.6 Einfluß von C-Glykosiden auf die Lipoxygenase

Für die in Kakaobohnen vorkommenden Flavan-3-ol-C-Glykoside (Stark und Hofmann, 2006) gibt es bisher keine Studien über deren Einfluß auf Lipoxygenasen.

Demzufolge ist auch über den Mechanismus nichts bekannt. Der Zuckerrest könnte aufgrund der Hydroxylgruppen zu einer Steigerung der Inhibierung des Enzyms führen, da diese ebenfalls in der Lage sein sollten, mit dem Eisen-Atom des aktiven Zentrums der LOX einen Chelat-Komplex zu bilden. Andererseits ist z.B. für die Xanthinoxidase bereits bekannt, dass glykosylierte Verbindungen aufgrund ihres sperrigen Zuckerrestes höhere IC_{50} -Werte besitzen als ihre Aglykone (Iio *et al.*, 1985). Dies könnte auch bei der Lipoxygenase der Fall sein.

Im Folgenden wird die Xanthinoxidoreduktase, ein weiteres Enzym, das nicht nur im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle spielt, näher betrachtet.

2.3 Xanthinoxidoreduktase

Die Xanthinoxidoreduktase (XOR) ist eine Mangan-Hydroxylase, die vom Bakterium bis zum Mensch, in allen Organismen vorkommt. Sie besteht aus zwei identischen Untereinheiten (à 145 kDa), die je aus einem Molybdän-Atom im aktiven Zentrum, zwei zwei-Eisen-zwei-Schwefel-Cluster (2Fe-2S) sowie einer Flavin-Adenin-Dinukleotid-Einheit (FAD) bestehen (s. Abbildung 2.23) (Okamoto *et al.*, 2004).

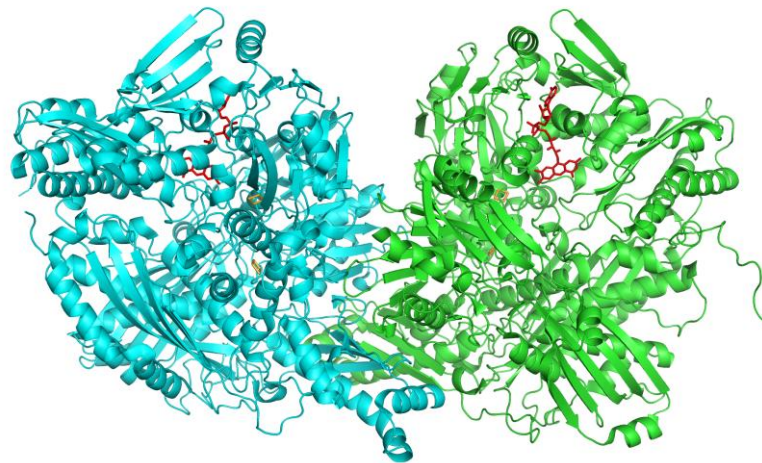
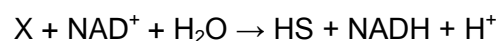


Abbildung 2.23: Zwei identische Untereinheiten der Xanthinoxidase (blau und grün) mit Fe-S-Clustern (gelb) und FAD-Einheit (rot).

Die Xanthinoxidoreduktase ist ein in den Purinstoffwechsel involviertes zytosolisches Enzym. Sie existiert in zwei möglichen Formen, die sich ineinander umwandeln können. Das Verhältnis der hauptsächlich vorhandenen Dehydrogenaseform (XDH) zur Oxidaseform (XO) ist 80:20 (Nishino *et al.*, 1997, Sarnesto *et al.*, 1996). Beide katalysieren im menschlichen Organismus den Abbau von Hypoxanthin (HX) über Xanthin (X) zu Harnsäure (HS). Dabei verwendet die XDH oxidiertes Nicotinamadenindinucleotid (NAD⁺) als Elektronenakzeptor:



Die Oxidase bevorzugt Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Im Unterschied zur Lipoxygenase wird kein molekularer Sauerstoff umgesetzt, es wird vielmehr

angenommen, dass der eingebaute Sauerstoff aus dem Wasser stammt (Okamoto *et al.*, 2004).

Im Menschen kommt die XOR u. a. in Leber, Darm, Lunge, Niere, Herz, Gehirn und Plasma vor (Pacher *et al.*, 2006).

2.3.1 Xanthinoxidase-Katalyse

Xanthinoxidase ist nicht besonders substratspezifisch; außer Hypoxanthin und Xanthin (s. Abbildung 2.24) können auch verschiedene Purine und Pterine sowie Aldehyde als Substrate dienen (Udilova, 1999).

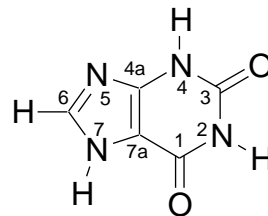


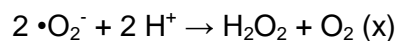
Abbildung 2.24: Strukturformel von Xanthin.

Im Allgemeinen verläuft die Hydroxylierung nach folgender Gleichung:



Der allgemeine Reaktionsmechanismus der Xanthinoxidase wird in eine reduktive (Abbildung 2.25) und eine oxidative Hälfte des katalytischen Reaktionszykluses eingeteilt. Das Molybdän des aktiven Zentrums wird im reduktiven Teil von Mo(VI) zu Mo(IV) reduziert was zur Hydroxylierung des Substrats führt. Im oxidativen Teil wird das Mo (VI) wieder zu Mo (VI) oxidiert und der molekulare Sauerstoff wird über zwei Ein-Elektronen-Schritte zu Wasserstoffperoxid reduziert.

Bei physiologischen pH-Werten in wässrigem Medium sind die produzierten $\cdot\text{O}_2^-$ -Radikale instabil und dismutieren, wobei Wasserstoffperoxid gebildet wird.



Superoxidanionen ($\cdot\text{O}_2^-$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) werden neben dem Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) und anderen, unter dem Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) zusammengefasst (s. auch 2.1.4.1).

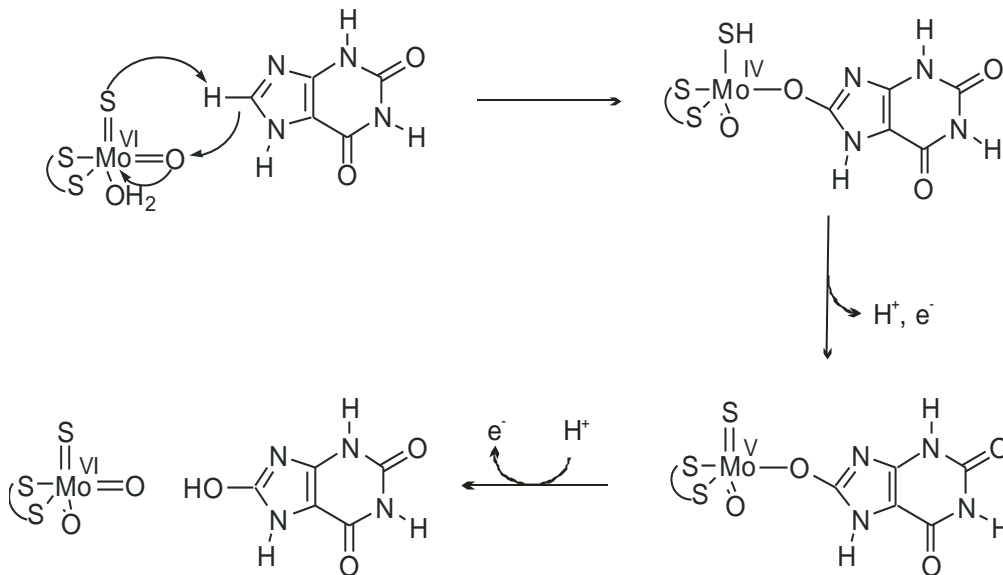


Abbildung 2.25: Reduktiver Teilzyklus der Xanthinoxidase Katalyse (modifiziert nach Hille, 1996).

Freie Radikale bzw. ROS sind an vielfältigen pathophysiologischen Prozessen beteiligt, auf die in Abschnitt 2.3.2 und 2.3.3 näher eingegangen wird.

Die unterschiedlichen Schädigungsmechanismen haben dabei verschiedene Ansatzpunkte. Neben einer direkten Interaktion mit der DNA (Induktion von DNA-Strangbrüchen und Punktmutationen) sind die Inhibierung von Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung von Onkogenen möglich. Sauerstoffradikale sind ebenfalls in der Lage, Enzyme und Proteine zu inaktivieren und Lipidperoxidationen zu initiieren (Porter, 1984; Sies, 1986).

ROS entstehen z.B. bei der Signaltransduktion verschiedener Regulationsvorgänge und haben somit auch eine nicht zu unterschätzende Bedeutung im physiologischen Stoffwechsel. Sie fungieren als *second messenger*, stellen chemotaktische Faktoren bei entzündlichen Prozessen dar und dienen der Abwehr von Bakterien durch phagozytierende Zellen (Halliwell und Gutteridge, 1999). Sie sind außerdem an der vasomotorischen Regulation beteiligt (Harrison, 1997; Dhalla *et al.*, 2000).

H_2O_2 besitzt eine stabile Elektronenkonfiguration, ist somit kein Radikal und kaum reaktionsfreudig (Yu, 1994). Bei einer Halbwertszeit von einigen Sekunden liegt die

intrazelluläre Konzentration im mikromolaren Bereich. Das ungeladene H_2O_2 kann größere Distanzen zurücklegen und Membranen permeieren (Halliwell und Gutteridge, 1990; Pryor, 1986). Wasserstoffperoxid hat als Vorstufe zur Bildung von Hydroxylradikalen durch die Superoxidanion ($\cdot\text{O}_2^-$) vermittelte Fenton-Reaktion (s. 2.1.4.1) eine große pathophysiologische Bedeutung. In einer Entgiftungsmaßnahme des Körpers wird H_2O_2 durch Katalase (KAT) und durch Glutathionperoxidase (GPX) abgebaut (Halliwell und Gutteridge, 1999).

2.3.2 Die Rolle der Xanthinoxidase und ihrer Produkte *in vivo*

Beim Abbau von Xanthin durch die Xanthinoxidase entsteht Harnsäure als Endprodukt des Purinabbaus. Aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit können Störungen des Purinstoffwechsels den Zellstoffwechsel erheblich beeinflussen. Ist die renale Ausscheidung vermindert oder fällt Harnsäure vermehrt im Stoffwechsel an, kommt es zur Hyperurikämie (Löffler *et al.*, 2007). Sind die Harnsäurewerte über längere Zeit erhöht, kann es durch Ablagerung von Natriumuratkristallen im Gewebe zur Entwicklung einer Gichterkrankung kommen. Während man die Xanthinoxidase etliche Jahrzehnte lang hauptsächlich mit Hyperurikämie und Gicht in Verbindung brachte, lassen neuere Untersuchungen darauf schließen, dass die Xanthinoxidase auch eine wichtige Rolle bei der Ischämie und anderen Gewebs- und Gefäßverletzungen, Entzündungskrankheiten sowie chronischer Herzinsuffizienz spielt (Pacher *et al.*, 2006).

2.3.3 Xanthinoxidase-Inhibitoren

Wichtige Hemmstoffe der Xanthinoxidase sind das Substratanalogon Allopurinol und sein Metabolit Oxipurinol (Abbildung 2.26). Allopurinol bindet an die Molybdänuntereinheit, was zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führt (Bray, 1975; Harrison, 1997; Massey und Harris, 1997).

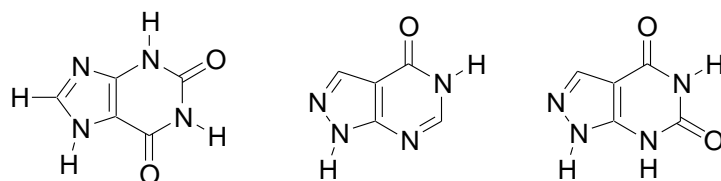


Abbildung 2.26: Strukturformeln von Xanthin (links), Allopurinol (Mitte) und Oxipurinol (rechts).

Stark erhöhte Serum- und Urinkonzentrationen von Xanthin und Hypoxanthin belegen, dass die beiden Purinbasen nun die Endprodukte des Purinabbaus sind. Sie können aufgrund ihrer deutlich besseren Löslichkeit relativ leicht renal ausgeschieden werden (Löffler *et al.*, 2007).

Nicht nur bei Hyperurikämie und Gicht, sondern auch bei Ischämie, anderen Gewebs- und Gefäßverletzungen, Entzündungskrankheiten sowie chronischer Herzinsuffizienz zeigten Allopurinol und Oxipurinol in Tierversuchen und in klinischen Humanstudien vielversprechende Ergebnisse. Einen Überblick über die Situation geben Pacher *et al.* (2006):

2.3.3.1 Gicht und Tumorlyse-Syndrom

Laut einer US-amerikanischen Studie des National Center for Health Statistics sind bereits mehr als 2% aller Männer über 30 Jahre und Frauen über 50 Jahre an Gicht erkrankt. Bei den über 80-jährigen sind es sogar 9% der Männer und 6% der Frauen. Zur Behandlung der Hyperurikämie sowie der Gicht ist immer noch Allopurinol Mittel der Wahl.

Bei einer Chemotherapie kann es passieren, dass in kurzer Zeit große Mengen an Tumorzellen zerstört werden, die u. a. große Mengen an Harnsäure in den Blutkreislauf freisetzen. Kommt es nun zu einer Stoffwechsellage, spricht man vom Tumorlyse-Syndrom. Auch hier ist die Hemmung der Xanthinoxidase ein effektiver therapeutischer Ansatz.

2.3.3.2 Ischämie und Reperfusionsschäden

Es gilt mittlerweile als gesichert, dass reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) der XO-Katalyse an der Ischämie und den daraus resultierenden Reperfusionsschäden an Herz, Gehirn, Darm, Leber, Niere, Lunge und anderem Gewebe, beteiligt sind.

2.3.3.3 Kreislaufschock

Die meisten experimentellen Daten über Allopurinol, XO und Kreislaufschock beziehen sich auf den hämorrhagischen Schock, der durch starken inneren und äußeren Blutverlust entstehen kann. Der hämorrhagische Schock wird von vielen Wissenschaftlern als Ganzkörper-Ischämie gesehen. Mehrere Studien belegen, dass durch Behandlung mit

Allopurinol die Mortalität und Organverletzungen aufgrund eines hämorrhagischen Schocks verringert werden.

2.3.3.4 Chronische Herzinsuffizienz

Einige Studien des letzten Jahrzehnts belegen, dass XO und durch XO-bedingte Sauerstoff-Spezies an der Pathogenese der chronischen Herzinsuffizienz (CHF) beteiligt sind. *In vitro* Studien an Rattenherzen und *in vivo* Studien am Hunde-Modell zeigten, dass eine fortschreitende Entwicklung der Herzinsuffizienz mit einer bis zu vierfach erhöhten XO-Aktivität im Myokard einhergeht. Eine Steigerung des oxidativen Stresses im Herzen ist die Folge.

Auch ein erhöhter Harnsäurespiegel in CHF-Patienten führt zu einer Erhöhung der myokardialen XO-Aktivität. Von einem Zusammenhang zwischen den hohen Harnsäure-Werten und der Schwere der chronischen Entzündung wird ebenfalls ausgegangen. Durch Allopurinol konnte in den bereits oben erwähnten Tierstudien der Sauerstoffverbrauch des Herzmuskels gesenkt und seine Kontraktilität verbessert werden. Eine Verringerung der Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies im Maus- und Rattenmodell durch Allopurinol wurde ebenfalls belegt.

2.3.3.5 Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Arteriosklerose und Diabetes mellitus

Eine beachtliche Menge an experimentellen und epidemiologischen Beweisen deutet darauf hin, dass vor allem bei Patienten, die unter Herzinsuffizienz, Diabetes und Bluthochdruck leiden, Harnsäure ein wichtiger, unabhängiger Risikofaktor für Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen ist. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Bildung von reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies mit einer Endotheldysfunktion in Zusammenhang steht. Endotheldysfunktionen sind bedeutende erste Anzeichen von Arteriosklerose, Diabetes mellitus, Bluthochdruck und Herzinsuffizienz. Studien belegen, dass auch hier Allopurinol bzw. Oxipurinol einen positiven Effekt auf die Endothelgefäßfunktionen haben.

2.3.3.6 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und andere Entzündungskrankheiten

Auch hier gibt es aussagekräftige Hinweise darauf, dass die XO im Maus-Modell in der Pathogenese von Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und Darmgeschwüren eine Rolle spielt. In Humanstudien zeigte Allopurinol, welches unterstützend zur herkömmlichen 5-Aminosalicylsäure-Therapie verabreicht wurde, eine Verbesserung der Beschwerden. Man vermutet allerdings, dass die Wirkung von Allopurinol in diesem Fall eher auf die antioxidativen und weniger auf die XO-hemmenden Eigenschaften zurückgeht.

Weiter liegen Hinweise auf den Einfluß der XO auf die Pathogenese der Sichelzellenanämie vor. Auch bei Lungenentzündung, „Atemnotsyndrom des Erwachsenen“ (ARDS), Nephritis, Pankreatitis, Bauchfellentzündung und peritonealen Adhäsionen, Uveitis und Dermatitis ist noch nicht geklärt, ob der positive Effekt durch Allopurinol auf die Hemmung der Xanthinoxidase oder auf die antioxidativen Eigenschaften zurückgeführt werden können.

2.3.4 Einfluß der Polyphenole auf die Xanthinoxidase

In einer Studie von Moini *et al.* (2000) wurde der Einfluss von Pycnogenol[®], einem procyanidinhaltigen Rinden-Extrakt der französischen Strandkiefer (PBE) auf XO aus Rattenleber getestet. Der Extrakt enthielt neben einem Großteil von Dimeren und höher kondensierten Polymeren auch monomere Flavonoide wie (+)-Catechin, (-)-Epicatechin, Taxifolin und Phenolcarbonsäuren, sowie die entsprechenden Glykoside. Mit PBE-Konzentrationen zwischen 10 und 100 µg/mL wurde eine Inhibierung der Aktivität der XO zwischen 10% und 70% erzielt. Einzeln getestet, zeigte Epicatechingallat im Gegensatz zu Taxifolin, Epicatechin, Catechin und den Procyanidinen C1 und C2 einen inhibitorischen Effekt auf die Xanthinoxidase. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem antioxidativen Potential und dem inhibitorischen Effekt der Procyanidine auf die XO gefunden werden.

In einer weiteren Studie (Cos *et al.*, 1998) wurden neben (+)-Catechin, (-)-Epicatechin und (-)-Epicatechingallat auch Quercetin sowie Allopurinol auf ihren Einfluss auf die Xanthinoxidase und auch auf die Produktion von Superoxiden untersucht. In Tabelle 2.4 sind die IC₅₀-Werte gezeigt.

Tabelle 2.4: IC₅₀-Werte von Allopurinol und ausgewählten Flavonoiden der Inhibierung der Xanthinoxidase (XO) und der Reduktion der Superoxidanionen (SO) (modifiziert nach Cos *et al.*, 1998)

Substanz	XO	SO
	IC ₅₀ [μM] ± SD	IC ₅₀ [μM] ± SD
Allopurinol (10)	0.24 ± 0.01	0.23 ± 0.01
(+)-Catechin (1a)	> 100	1.61 ± 0.04
(-)-Epicatechin (2a)	> 100	1.59 ± 0.08
(-)-Epigallocatechin (3)	> 100	0.48 ± 0.02
Quercetin (4)	2.62 ± 0.13	1.63 ± 0.02

Aus Tabelle 2.4 wird ersichtlich, dass die Struktur-Aktivitätsbeziehung der Flavonoide für die Hemmung der Xanthinoxidase und für ihre Eigenschaft als Radikalfänger unterschiedlich ist. Quercetin ist aufgrund der Doppelbindung zwischen C2 und C3 komplett planar (s. Abbildung 2.27). Es wird vermutet, dass die planare Flavonoidstruktur ein Grund für die Inhibierung der Xanthinoxidase ist (Cos *et al.*, 1998). Allopurinol inhibiert die XO ebenfalls. Antioxidative Eigenschaften zeigen alle in Tabelle 2.4 aufgelisteten Substanzen mit IC₅₀-Werten von 0.23 μM bis 1.63 μM. Die zusätzliche aromatische Hydroxylgruppe von (-)-Epigallocatechingallat am B-Ring verbessert diese im Vergleich zu den Catechinen nochmals (Iio *et al.*, 1985).

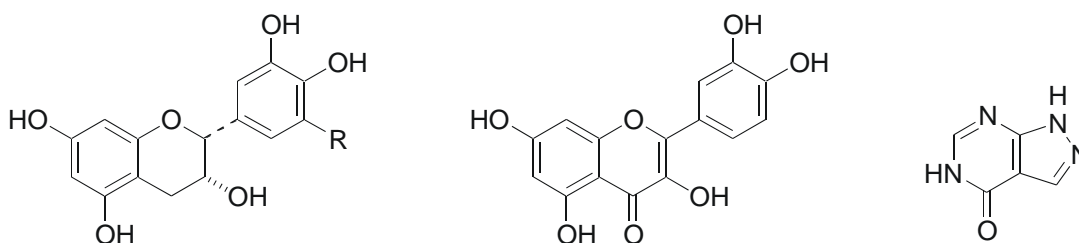


Abbildung 2.27: Strukturformeln von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin: R = H; (-)-Epigallocatechin: R = OH (links); Quercetin (Mitte) und Allopurinol (rechts).

Wie auch schon bei der Soja-LOX gibt es für die Xanthinoxidase ebenfalls keine Informationen über deren Einfluß auf (-)-Catechin und (+)-Epicatechin oder glykosylierte Flavan-3-ole.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 (+)-Catechin

Wie bereits ausgeführt werden den Flavonoiden antikanzerogene, antimikrobielle, antioxidative, antithrombotische, immunmodulatorische, entzündungshemmende, blutdruck- und blutglukosebeeinflussende Eigenschaften zugeschrieben (Watzl und Leitzmann 1999, Scalbert *et al.* 2005a, Scalbert *et al.* 2005b). In zahlreichen Studien hat man den Einfluss von kakaohaltigen Getränken, Schokoladenprodukten, Rotwein, Grünem und Schwarzem Tee, Fruchtsäften (z.B. aus Äpfeln oder Cranberries) oder polyphenolreichen Extrakten aus z. B. Traubenkernen auf verschiedene Organismen geprüft (Cooper *et al.*, 2007, Aviram und Fuhrmann, 2002, Urban, 2009, Arts *et al.*, 2000, Kahle *et al.*, 2005, Fridrich *et al.*, 2007, Bagchi *et al.*, 2003). Dabei handelte es sich oft um Tierstudien oder *in vitro*-Experimente, in denen z.B. simulierter Magensaft eingesetzt wurde (Kahle *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden biologische Systeme zunächst außer Acht gelassen und vorab nur die chemische Stabilität von (+)-Catechin (**1**) untersucht.

3.1.1 Polyphenol-Analytik

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden als Analyseverfahren hauptsächlich HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS zur Analytik der Polyphenole eingesetzt. Um den Catechin-Abbau quantitativ beurteilen zu können, wurde 3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure (**S**) als Standard verwendet. Hierdurch liessen sich mögliche Geräteschwankungen sowie kleinere Abweichungen im Dosiervolumen berücksichtigen (Geräteparameter und Methoden s. 4.2). Die Flavan-3-ole wurden bei 280 nm detektiert.

Strukturanalysen erfolgten mittels HPLC-DAD und Vergleich der UV-Spektren der einzelnen Peaks, durch Standardaddition mit Reinsubstanzen und mittels HPLC-ESI-MS sowie HPLC-ESI-MS/MS. Ein Vorteil der Elektrospray-Ionisierung (ESI) ist die schonende und weitestgehend zerstörungsfreie Ionisierung der Analyten. Dadurch können die intakten Moleküle zur Ermittlung der molaren Masse herangezogen werden (Gross, 2004). Es kann sowohl im positiven als auch im negativen Modus gemessen werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden im negativen Modus durchgeführt, da sich dabei eine bessere Nachweisempfindlichkeit zeigte. Im „fullscan“-Modus werden deprotonierte Molekülonen $[M-H]^-$ und gelegentlich auch

Lösungsmitteladdukte beobachtet. Mit der Tandemmassenspektrometrie (ESI-MS/MS) lassen sich die Elternionen („precursor ions“) der Zielverbindungen in Produktionen fragmentieren und so weitere Strukturinformationen ableiten.

3.1.2 Stabilitätsuntersuchungen von (+)-Catechin

Catechin ist in saurer, nicht jedoch in wässriger alkalischer Lösung, stabil (Courbat *et al.*, 1977). Um die Bedingungen für den Abbau in wässriger Lösung genauer zu untersuchen, wurden (+)-Catechin (**1**)-Konzentrations- und pH-Wert-Studien durchgeführt. Dazu verwendeten wir vier verschiedene Puffer mit je drei unterschiedlichen pH-Werten. Catechin (**1**) wurde jeweils in drei Konzentrationen inkubiert. In definierten Zeitabständen wurden Proben genommen und standardkontrolliert mittels HPLC-DAD vermessen (HPLC-System 2, s. 4.2.1; Herstellung der Puffer: s. 4.3.2.1, Versuchsdurchführung: s. 4.3.2.2). Die im Zeitverlauf erhaltenen Catechingehalte wurden nicht abgebildet (s. Anhang Tabelle 7.1).

Im Säuren, bei pH 2.5 bis 4.5, war erwartungsgemäß kein Catechin-Abbau zu beobachten. Der Catechingehalt blieb bei allen drei untersuchten Konzentrationen in Formiat-Puffer über 10 Tage stabil.

Im physiologisch wichtigen pH-Bereich zwischen 6.4 und 8.4 wurde neben Phosphat- auch Hepes-Puffer eingesetzt, um einen Einfluß der unterschiedlichen Puffer-Ionen auf den Abbau von Catechin (**1**) mit zu berücksichtigen.

In diesen Pufferlösungen fand bei bei pH 6.4 in den ersten 6 Tagen ein Abbau von Catechin (**1**) jeder Konzentration um ca. 20 % statt. An Tag 10 waren noch knapp 40 % des eingesetzten Catechins (**1**) vorhanden. Ein konzentrationsabhängiger Abbau war nicht zu beobachten.

Beim Abbau von (**1**) in Phosphat- bzw. Hepes-Puffer bei pH 7.4 scheint die Konzentration eine Rolle zu spielen. Bei einer Anfangskonzentration 0.5 mg/mL (**1**) waren nach 6-tägiger Inkubation in Phosphat- sowie Hepes-Puffer 44 % \pm 4 % bzw. 46 % \pm 23 % abgebaut. Nach insgesamt 10 Tagen lagen in Phosphat-Puffer noch 23 % \pm 7 % und in Hepes-Puffer noch 31 % \pm 21 % (**1**) vor. Der Abbau bei pH 7.4 unterschied sich von Phosphat- zu Hepes-Puffer nicht signifikant. Der Versuchsansatz mit der höchsten Catechin-Konzentration ($c_0=1.0$ mg/mL) enthielt nach 6 Tagen noch 73 % \pm 7 % in Phosphat-Puffer und 54 % \pm 5 % in Hepes-Puffer. Nach weiteren 4 Tagen waren noch 25 % \pm 4 % bzw.

33 % \pm 10 % (1) enthalten. Auch hier spielte es keine entscheidende Rolle, ob (1) in Phosphat- oder Hepes-Puffer inkubiert wurde. Bei der kleinsten untersuchten Konzentration ($c_0=0.1$ mg/mL) waren nach 6-tägiger Inkubation noch 38 % in Phosphat- und 27 % in Hepes-Puffer vorhanden. Nach 10 Tagen lag jeweils nur noch 10 % (1) vor. Bei pH 8.4 erfolgte der Abbau von (1) deutlich schneller und konzentrationsabhängig. In Phosphat-Puffer waren nach 6 Tagen noch 3 % ($c_0=0.1$ mg/mL), 12 % \pm 9 % ($c_0=0.5$ mg/mL) oder 22 % \pm 2 % ($c_0=1.0$ mg/mL) (1) vorhanden. In Hepes-Puffer war bei der geringsten Konzentration bereits nach 4-tägiger Inkubation kein (+)-Catechin (1) mehr detektierbar. In den anderen Konzentrationen waren nach 6 Tagen noch 1.5 % bzw 3 % (1) vorhanden. Nach weiteren 4 Tagen war auch hier kein (1) mehr nachzuweisen. Der Abbau von (1) bei pH 8.4 scheint in Hepes-Puffer schneller abzulaufen, als in Phosphat-Puffer.

Bei pH-Werten über 9 erfolgte der Abbau von (1) sehr schnell. Bei $c_0=0.1$ mg/ml verlief er innerhalb weniger Stunden. Nach 24 h war kein (1) mehr detektierbar, bei pH 11.5 war der 0 h-Wert nicht bestimmbar, da der Abbau von 0.1 mg/ml (1) schneller erfolgte als die HPLC-Messung (< 45 min). Bei pH 9.5 waren nur bei der höchsten Konzentration ($c_0=1.0$ mg/mL) nach 2-tägiger Inkubation in Carbonat-Puffer noch 3 % (1) detektierbar. Bei pH 10.5 und 11.5 erfolgte der gesamte Catechin-Abbau innerhalb der ersten 24 h.

Die erhaltenen Ergebnisse ergänzen mit Detailinformationen die bisher vorliegenden Angaben zum chemischen Abbau von (1) (Courbat *et al.*, 1977, Zhu *et al.*, 1997).

3.1.3 Bestimmung der Reaktionsordnung

Als Reaktion erster Ordnung bezeichnet man Reaktionen vom Typ $A \rightarrow B+C$. Die Konzentration des Stoffes A zur Zeit t wird mit $[A]$ bezeichnet. Die Geschwindigkeit mit der $[A]$ abnimmt, ist proportional zu $[A]$. k_1 ist die Geschwindigkeitskonstante.

Daraus ergibt sich der lineare Ansatz:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_1[A]$$

$$\frac{d[A]}{[A]} = -k_1 dt$$

$$\ln[A] = -k_1 t + c$$

$$\ln[A]_0 = c$$

$$\Rightarrow \ln \frac{[A]}{[A]_0} = -k_1 t$$

Als Zeitgesetz 1. Ordnung erhält man:

$$[A] = [A]_0 \cdot e^{-k_1 t}$$

$$k_1 = \frac{1}{t} \ln \frac{[A]_0}{[A]}$$

Als Reaktion zweiter Ordnung bezeichnet man Reaktionen vom Typ $2A \rightarrow C+D$ oder allgemeiner $A+B \rightarrow C+D$.

Für eine Reaktion 2. Ordnung gilt der Ansatz:

$$-\frac{d[A]}{dt} = 2k_2[A]^2$$

$$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = 2k_2 t$$

Sind die Anfangskonzentrationen $[A]_0$ und $[B]_0$ gleich groß, fällt der Faktor 2 auf der rechten Seite weg.

Das Zeitgesetz 2. Ordnung lautet also:

$$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_0} = k_2 t$$

Formuliert man die Zeitgesetze für die Reaktionen 1. und 2. Ordnung in Form von Geradengleichungen $y = m \cdot x + c$ erhält man

$$\ln[A] = -kt + \ln[A]_0 \text{ für Reaktionen 1. Ordnung und}$$

$$\frac{1}{[A]} = k_2 \cdot t + \frac{1}{[A]_0} \text{ für Reaktionen 2. Ordnung (Wedler, 1997).}$$

3.1.3.1 Graphische Ermittlung der Reaktionsordnung

Trägt man nun $\ln [A]$ (1. Ordnung) bzw. $\frac{1}{[A]}$ (2. Ordnung) gegen die Zeit auf, erhält man

im zutreffenden Fall Geraden. In Abbildung 3.1 wird am Beispiel vom Catechin-Abbau in Phosphat-Puffer bei pH 7.4 deutlich, dass es sich hierbei um eine Reaktion 1. Ordnung handelt, da das Bestimmtheitsmaß (R^2) durchgängig Werte größer 0.855 aufweist. Der Messwert von Tag 10 bei der geringsten Konzentration (0.1 mg/mL) wurde bei der Berechnung des Bestimmtheitsmaßes nicht berücksichtigt, da es sich um eine Einfachbestimmung handelte und der Fehler bei sehr geringen Konzentrationen sehr groß ist.

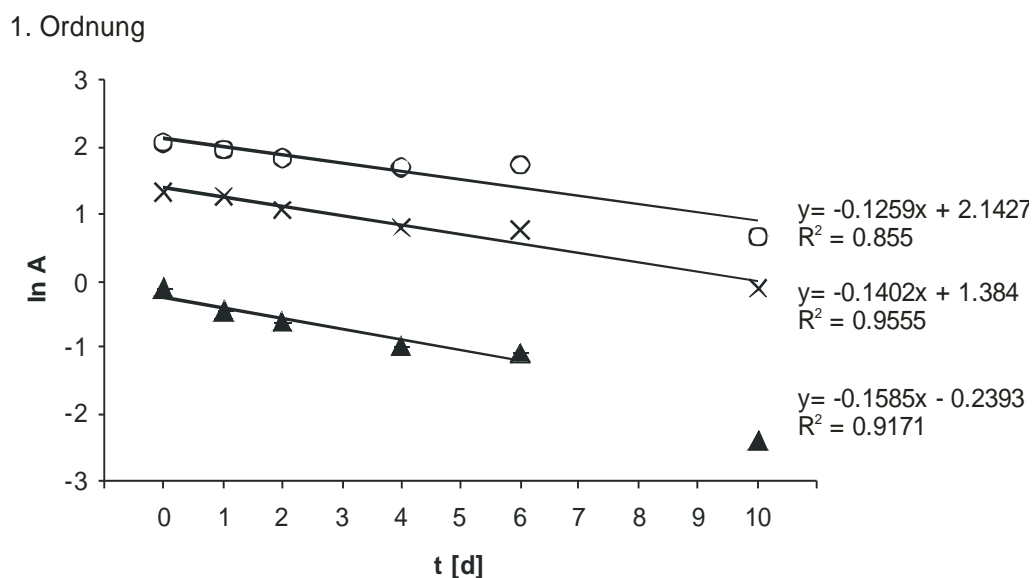


Abbildung 3.1: Catechin (1) in Phosphat-Puffer pH 7.4: aufgetragen sind die $\ln A$ Werte gegen die Zeit (A = Peakfläche der Probe/ Peakfläche des internen Standards), $c_0=1.0$ mg/mL (o), 0.5 mg/mL (x), 0.1 mg/mL (▲).

Die Steigung der Geraden entspricht der Geschwindigkeitskonstanten k_1 . Diese betragen bei den Konzentrationen 1.0 mg/mL -0.1259, bei 0.5 mg/mL -0.1402 und bei 0.1 mg/mL -0.1585. Die Geraden sind nicht parallel und zeigen somit ein konzentrationsabhängiges Verhalten. Je geringer die Konzentration, desto größer die Abbaurrate. Der Unterschied der Steigungen der Geraden der Konzentrationen 0.5 mg/mL und 0.1 mg/mL ist mit 0.0706 um Faktor 4.9 größer als der Unterschied der Steigungen der Geraden der Konzentrationen 1.0 mg/mL und 0.5 mg/mL mit 0.0143, was bedeutet, dass es sich außerdem um eine lineare Konzentrationsabhängigkeit handelt.

Die Auftragung von $\frac{1}{[A]}$ gegen die Zeit liefert für alle Konzentrationen einen exponentiellen Verlauf der Kurven. Da das Kriterium der graphischen Ermittlung ist, dass sich Geraden ergeben müssen, kann eine Reaktion 2. Ordnung ausgeschlossen werden.

3.1.4 Einfluß der Temperatur auf den Abbau von (+)-Catechin

Um den Einfluss der Temperatur auf die Bildung von EC und BC zu untersuchen wurde (+)-Catechin (1) in Kalium-Phosphat-Puffer pH 7.4 ($c = 1.0 \text{ mg/mL}$) bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ und $70 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Eine Probenentnahme folgte nach 0, 1, 2, 4, 6 und 8 h. Die Proben wurden membranfiltriert, mit Standard versetzt und anschließend gemessen. Bei einer Temperatur von $50 \text{ }^\circ\text{C}$ werden innerhalb von 8h ca. 30% (1) abgebaut, bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $70 \text{ }^\circ\text{C}$ sind es in dieser Zeit 45 % bzw. 48 %. Geht man hier ebenfalls von einer Reaktion 1. Ordnung (s. 3.1.3.1) aus und trägt die Abbaukurven bei unterschiedlichen Temperaturen gegen die Zeit auf, erhält man Geraden (s. Anhang Abbildung 7.1).

Die Arrhenius-Gleichung

$$k_n = k_0 \cdot e^{-\frac{A}{T}}$$

sagt, dass k_n mit steigender Temperatur zunimmt (Wedler, 1997). Das bedeutet, dass mit zunehmender Temperatur mehr Catechin abgebaut werden sollte. Dies soll im Folgenden überprüft werden.

Löst man die Arrhenius-Gleichung nun nach T auf, erhält man:

$$\ln(k_n) = \ln\left(k_0 \cdot e^{-\frac{A}{T}}\right)$$

$$\ln(k_n) = \ln(k_0) + \ln\left(e^{-\frac{A}{T}}\right)$$

$$\ln(k_n) = \ln(k_0) - \frac{A}{T}$$

Formuliert man diese Gleichung zu

$$\ln(k_n) = -A \cdot \frac{1}{T} + \ln(k_0)$$

kann man durch Auftragung von $\ln(k_n)$ über $\frac{1}{T}$ diesen linearen Zusammenhang graphisch überprüfen. In Abbildung 3.2 wurde nun jeweils der natürliche Logarithmus der Steigung $\ln(k_n)$ der Abbaukurven von (+)-Catechin bei unterschiedlichen Temperaturen gegen $\frac{1}{T}$

aufgetragen. Es ergibt sich eine Ausgleichsgerade mit einem Bestimmtheitsmaß von 0.93, was sehr gut dem erwarteten linearen Zusammenhang entspricht.

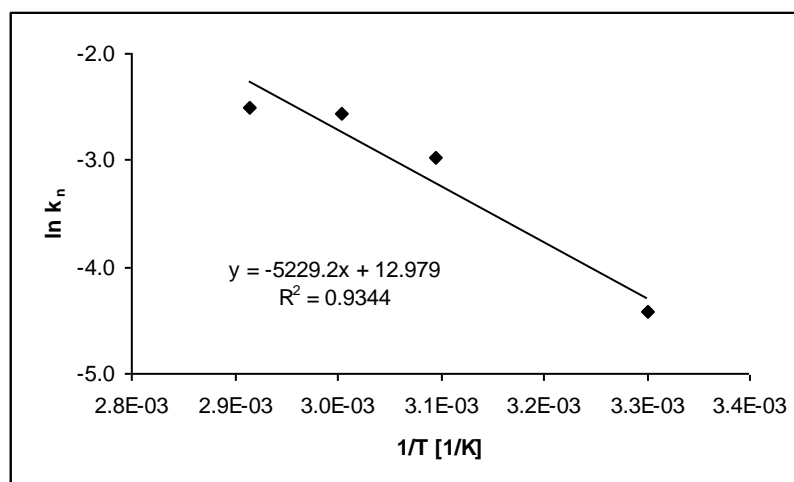


Abbildung 3.2: Natürlicher Logarithmus der Steigung (k_n) der Abbaukurven von (+)-Catechin (1) durch Inkubation in Kalium-Phosphat-Puffer pH 7.4 über 8 h bei 30°C, 50°C, 60°C und 70°C aufgetragen gegen $1/T$ (s. Anhang Tabelle 7.4).

Der Abbau von (+)-Catechin ist also eine Reaktion 1. Ordnung, deren Temperaturabhängigkeit dem erwarteten Verlauf nach Arrhenius entspricht.

3.1.5 Einfluß der Temperatur auf die Produktbildung

Da beim Abbau von (+)-Catechin (1) zwei Produkte, EC und BC, entstehen, wurde die temperaturabhängige Bildung dieser beiden Substanzen aus demselben Versuchsansatz wie in 3.1.4 angegeben untersucht. Die zu definierten Zeitpunkten gezogenen Proben wurden mittels HPLC-UV vermessen.

In Abbildung 3.3 ist zu erkennen, dass durch Temperaturerhöhung der Gehalt an gebildetem EC anstieg, und zwar nach 8 h aufgrund der Steigerung von 30 °C auf 70 °C um 97 %. Das Maximum wurde bei 70 °C und 4 h erreicht. In weiteren 4 h nahm der Anteil an EC um 14 % ab. Betrachtet man die temperaturabhängige Bildung von BC, stellt man im Gegensatz zur Bildung von EC fest, dass die Erhöhung der Temperatur von 30 °C auf 40 °C eine Steigerung um 66 % bewirkte. Eine Temperaturerhöhung auf über 50 °C führt nur zu einer beschleunigten Bildung, allerdings bei geringeren Ausbeuten. So wurden jeweils nach 8 h für 60 °C 62 % und für 70 °C 70 % des Maximalwertes bei 40 °C detektiert.

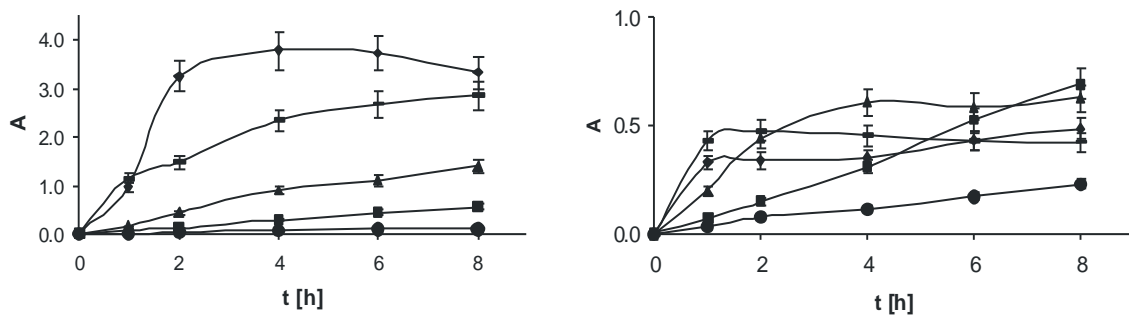


Abbildung 3.3: Gehalt an entstehendem EC (links) und BC (rechts) bei 30°C (●), 40°C (■), 50°C (▲), 60°C (-) und 70°C (◆) durch Inkubation von (+)-Catechin (1) in Kalium-Phosphat-Puffer pH 7.4 über 8 h, HPLC-System 1 (s. 4.2.1) (A = Peakfläche der Probe/ Peakfläche des internen Standards). Wert \pm Fehler. Experimentelle Bedingungen s. 4.3.3.

Interessanterweise erreichten EC und BC jeweils Sättigungskonzentrationen, zeitlich beschleunigt durch Temperaturerhöhung. Betrachtet man den Graphen des Produkts EC in Abbildung 3.3 erkennt man dies bei der 70 °C-Kurve am deutlichsten. Während eine Sättigung hier bereits nach 2 h vorliegt, wird diese bei 60 °C erst nach ca. 8 h erreicht. Bei 50 °C, 40 °C und 30 °C ist die Sättigungskonzentration nach 8 h noch nicht erreicht.

Im rechten Graphen der Abbildung 3.3 tritt die Sättigungskonzentration bei 60 °C und 70 °C bereits nach 1 h ein, bei 50 °C nach 4 h, bei 40 °C und 30 °C ist sie nach 8 h noch nicht zu beobachten.

Im Gegensatz hierzu erreicht die Konzentration von (1) bei dessen Abbau kein stabiles Niveau (s. 3.1.3 und 3.1.4) sondern nimmt über den gesamten Untersuchungsbereich stetig ab. Als Gründe hierfür lässt sich diskutieren:

Würde (1) ausschließlich in EC und BC umgewandelt werden, würden diese Produkte ohne in einen Sättigungsbereich zu gelangen, kontinuierlich aufgebaut werden, und zwar solange, bis kein (1) mehr zur Verfügung steht. Ein solches Verhalten setzt ebenfalls voraus, dass EC und BC stabil sind und keine weiteren Reaktionen eingehen. Es ist bereits literaturbekannt, dass beim Abbau von (1) mindestens vier verschiedene Produkte entstehen sollen (Courbat *et al.*, 1997). Unter unseren Versuchsbedingungen sind allerdings nur zwei Produkte beobachtet worden.

Ein weiterer Grund für das Sättigungsverhalten könnte sein, dass die Reaktion von (1) zu EC und BC reversibel ist, oder auch, dass sich BC und EC ineinander umwandeln. Eigene Untersuchungen zeigten außerdem, dass sowohl (1), als auch EC und BC mit der Zeit vollständig abgebaut werden (Daten nicht gezeigt). Diese möglichen Erklärungen können einzeln oder, wahrscheinlicher, in Kombination Gründe für das Erreichen einer Sättigungskonzentration von EC und BC sein.

3.2 Identifizierung der Catechin-Abbauprodukte

Beim Abbau von (+)-Catechin (**1**) treten im HPLC-Chromatogramm zwei neue Peaks auf (Abbildung 3.4), die, wie schon erwähnt, zunächst als BC und EC bezeichnet wurden. Diese Produkte werden über einen gewissen Zeitraum aufgebaut, bevor sie offensichtlich nach einiger Zeit selbst einem Abbau unterliegen.

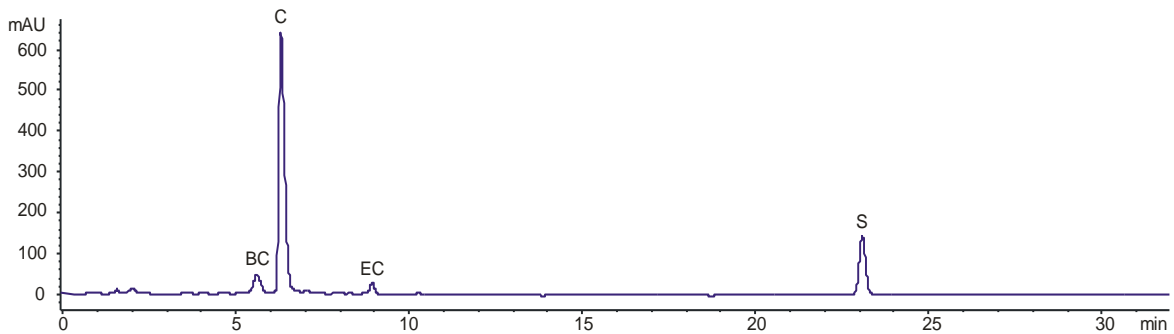


Abbildung 3.4: HPLC-Analytik: Abbau von (+)-Catechin (**1**) nach zweitägiger Inkubation in KPi (0.1 M, pH 7.4) (HPLC-System 1, 280 nm); BC, C=Catechin (**1**), EC, S=Standard: 3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure (**S**).

Zur Identifizierung dieser unbekanntenen Substanzen wurden mehrere Methoden eingesetzt:

3.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Aufgrund der Vermutung, dass es sich bei dem in Abbildung 3.4 gezeigten, vorerst nicht-identifizierten Peak (BC) um ein Procyanidin handeln könnte, wurde eine DC-Methode entwickelt, mit der sich Catechin (**1**) von Procyanidinen (**5-8**) abtrennen lässt. Hierfür wurden mehrere Phasen, Fließmittel und Anfärbereagenzien untersucht. Als die am besten geeignete Kombination stellten sich Kieselgel als stationäre Phase und Aceton/Toluol/Ameisensäure im Verhältnis 4:3:1 (v/v/v) als mobile Phase heraus. Als Anfärbereagenz wurde Molybdänblau verwendet. In Abbildung 3.5 ist eine typische DC-Platte mit Catechin- und Procyanidin-Spots gezeigt. Die R_f -Werte unterscheiden sich mit 0.78 für Catechin (**1**) und 0.54 für die (untereinander nicht getrennten) Procyanidine (**5-8**) deutlich voneinander.

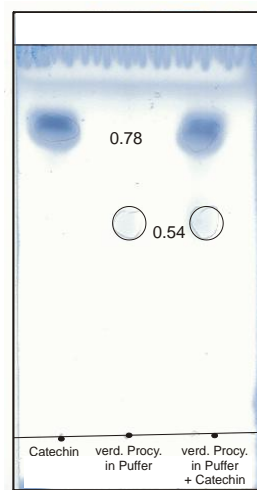


Abbildung 3.5: DC von Catechin (**1**) und Procyanidinen (**5-8**). R_f (Catechin)= 0.78; R_f (Procyanidine)=0.56. (Methode s. 4.3.1.1).

Die bisher nicht identifizierte Substanz BC eluierte ebenfalls bei einem R_f -Wert von 0.54. Inwieweit es sich bei BC um ein B-Typ-Procyanidin handelt, war im Folgenden zu prüfen.

3.2.2 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die gängigste Methode zur Flavonoidanalytik ist die HPLC. Dies liegt vor allem daran, dass Flavonoide keine leichtflüchtigen Substanzen sind. Es gibt aber auch Literatur zur Analytik von Catechinen mittels GC-MS (Stremple, 1996; Devanand *et al.*, 1997). Derivatisiert man diese mit einem geeigneten Reagenz, z.B. BSTFA (*N,O*-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamid) oder BSA (*N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid), so lassen sich die gebildeten Trimethylsilyl-Ether mittels GC-MS untersuchen (Stremple, 1996).

Infolge der Derivatisierung von (+)-Catechin (**1**) oder (-)-Epi-catechin (**2**) erhält das vollständig silylierte Molekül eine Molekularmasse von 650 Da. In Abbildung 3.6 sind die potentiell auftretenden Fragmente abgebildet. Durch Abspaltung des B-Rings entstehen solche mit m/z 399, m/z 355, m/z 179 und m/z 283 je nach unterschiedlichem Silylierungsmuster. Bei Flavonoiden kommt es zur charakteristischen Retro Hetero-Diels-Alder (RHDA)-Spaltung. Hierdurch entstehen die Fragmente m/z 283 und m/z 368 (Devanand *et al.*, 1997).

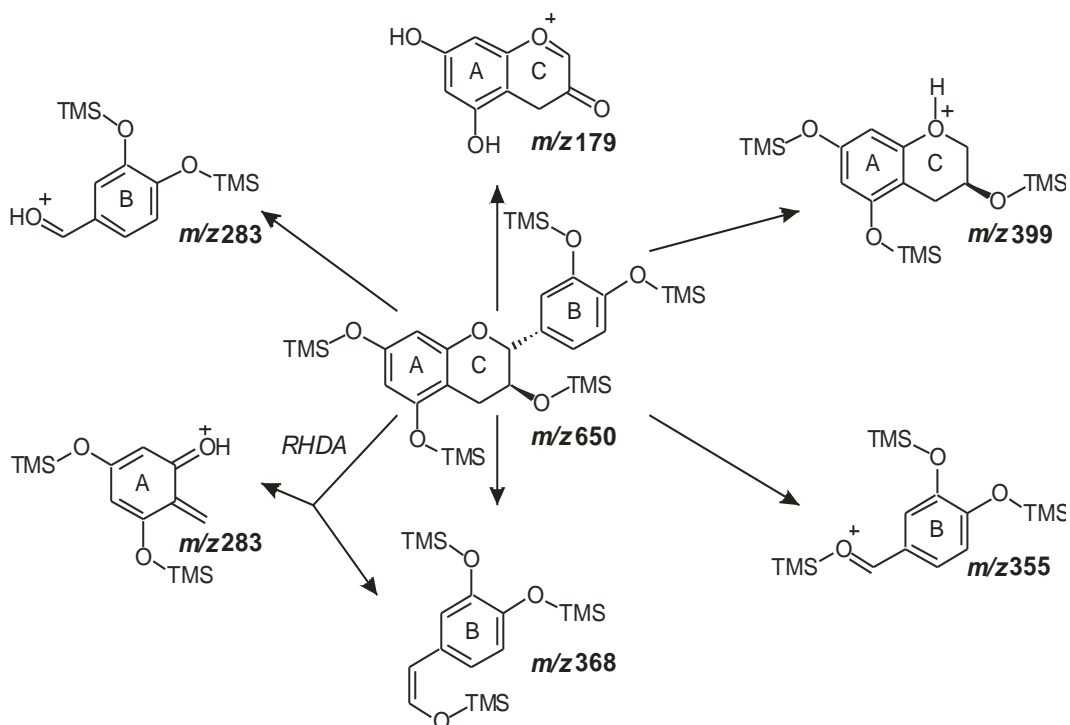


Abbildung 3.6: Mögliche Fragmente von silyliertem (+)-Catechin (1) (RHDA = Retro-Hetero Diels-Alder) (modifiziert nach Devanand *et al.*, 1997).

Bei unseren Untersuchungen verwendeten wir eine achirale Phase. Es konnte also nicht zwischen den Enantiomeren (+)-Catechin (1) und (-)-Catechin (3) sowie zwischen (+)-Epicatechin (4) und (-)-Epicatechin (2) unterschieden werden. Demzufolge wird nur von Catechin und Epicatechin gesprochen.

3.2.2.1 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) von Catechin und Epicatechin

Die Retentionszeit (t_R) von Catechin lag unter den verwendeten Bedingungen (s. 4.2.5, HRGC-MS System 1) bei 41.75 min. In Abbildung 3.7 ist das Massenspektrum von silyliertem Catechin dargestellt.

Der Basis-Peak ist m/z 368. Hierbei könnte es sich um das B-Ring-Fragment handeln, welches durch die Retro Diels-Alder-Spaltung (s. 3.2.2) entsteht. Weitere Hauptproduktionenfragmente sind m/z 369, m/z 355 und m/z 73. Bei dem Fragment m/z 369 könnte es sich um das protonierte Fragment des Basis-Peaks handeln, m/z 355 ist ein dreifacher Silylether des B-Ringes (s. Abbildung 3.6) und bei m/z 73 handelt es sich um den Trimethylsilyl-Rest ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$).

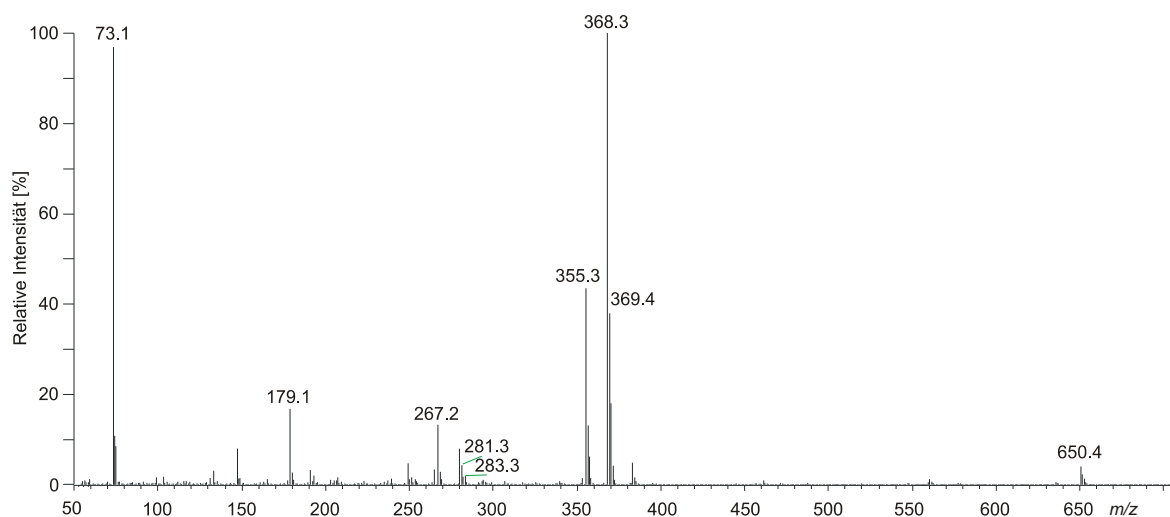


Abbildung 3.7: MS-Spektrum von silyliertem Catechin (s. 4.2.5, HRGC-MS System 1).

Im MS-Spektrum sind außerdem das Precursorion (m/z 650), das nicht-silylierte AC-Ring Fragment m/z 179 sowie zwei weitere Signale bei m/z 267 und m/z 281 vorhanden.

Tabelle 3.1: Relative Intensitäten der Hauptproduktionsfragmente von silyliertem Catechin mit Literaturvergleich (* : Devanand *et al.*, 1997)

m/z	Rel. Intensität [%]	Rel. Intensität [%] *
73	97	
179	17	
267	13.5	
281	4.5	
283	2	1-3
355	44	30-37
368	100	100
369	38.5	
650	2	5-6

Tabelle 3.1 sind die relativen Intensitäten der detektierten Hauptproduktionsfragmente mit denen von Devanand und Mitarbeitern (1997) ermittelten verglichen. Die in der Literatur aufgeführten Intensitäten der Hauptproduktionsfragmente stimmen mit unseren Beobachtungen überein.

Silyliertes Epicatechin eluierte unter identischen Bedingungen bei $t_R = 41.27$ min, also ca. 29 s früher als Catechin. Die detektierten Hauptproduktionsfragmente von Epicatechin waren identisch mit denen von Catechin; ihre relativen Intensitäten unterschieden sich nur gering (Daten nicht gezeigt).

3.2.2.2 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) zur Produktanalytik

Nach 8-tägiger Inkubation von (+)-Catechin (**1**) in Phosphat-Puffer pH 7.4 wurde die Produktbildung nach Silylierung (s. 4.3.4) mittels HRGC-MS untersucht. Anhand von Vergleichen der Retentionszeiten und der dazugehörigen MS-Spektren konnte neben dem Edukt auch Epicatechin in der Probe nachgewiesen werden. Dies war ein eindeutiger Hinweis auf das Vorkommen von Epicatechin als Abbauprodukt von (+)-Catechin, den es mittels weiterer Verfahren zu verifizieren galt.

3.2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Zunächst wurde die HPLC mit UV-Detektion herangezogen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Catechin unter bestimmten Bedingungen epimerisiert. Durch Standardadditionsversuche mit (-)-Epicatechin (**2**) konnte rasch gezeigt werden, dass es sich beim Produkt EC (vgl. Abbildung 3.4) um Epicatechin handelt. Auch die UV-Absorptionsspektren stimmten überein (Abbildung 3.8).

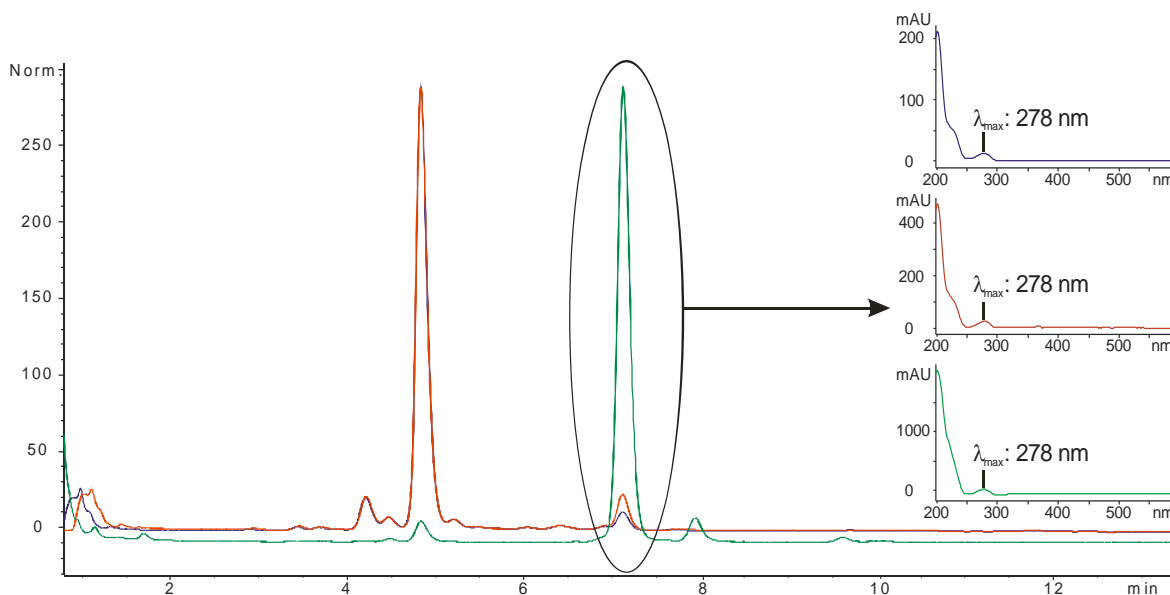


Abbildung 3.8: HPLC-UV-Chromatogramm (280 nm) von (-)-Epicatechin (**2**) in KPi (0.1 M, pH 7.4, 3 d) (grün); (+)-Catechin (**1**) in KPi (0.1M, pH 7.4, 12 d) (blau); (+)-Catechin (**1**) und (-)-Epicatechin (**2**) (rot); (HPLC-System 3, s. 4.2.1)

Die DC-Vorversuche hatten erste Hinweise geliefert, dass es sich bei dem unbekanntem Produkt BC um ein dimeres Procyanidin vom B-Typ handeln könnte (vgl. Abschn. 3.2.1).

Aus diesem Grund wurden mittels HPLC-UV Standardadditionsversuche mit den Procyanidinen B1 (**5**), B2 (**6**), B3 (**7**) und B4 (**8**) durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass BC und Procyanidin B3 (**7**) koeluierten (Daten nicht gezeigt). Demzufolge war zu klären, ob es sich bei BC um Procyanidin B3 (**7**) handelte.

Unberücksichtigt blieb bisher die Frage der Stereochemie, da vorerst nur achirale HPLC-Phasen eingesetzt wurden. Vor allem für Epicatechin muss noch geklärt werden, um welches der zwei möglichen Enantiomere es sich handelt (s. 3.3).

3.2.4 Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS)

Wie bereits im Abschnitt 3.2 erwähnt, traten bei Abbaustudien von (+)-Catechin (s. Abbildung 3.4) zwei Produkte auf. Die massenspektrometrische Untersuchung lieferte im Fall von EC ein Spektrum mit einem Basepeak bei m/z 289, was die Vermutung, dass es sich bei Substanz EC um Epicatechin handelt, erneut bestätigte (Daten nicht gezeigt). Das Spektrum von BC zeigte ein intensives Signal bei m/z 577 für das deprotonierte Molekül $[M-H]^-$. Diese Ergebnisse ließen den Schluß zu, dass es sich hierbei um ein dimeres Procyanidin handelt. In weiteren Untersuchungen wurde nunmehr die HPLC-MS/MS eingesetzt.

3.2.5 Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

Bei der MS/MS wird ein Parention, in diesem Fall m/z 577, fragmentiert. Die sogenannten Produktionen liefern weitere Hinweise auf die Struktur des Ausgangsmoleküls. In Abbildung 3.9 sind die Fragmentierungsmuster von BC (A) und Procyanidin B3 (B) (**7**) gezeigt. Hieraus wird deutlich, dass es sich bei BC nicht um das natürlich vorkommende Procyanidin B3 (**7**) handelt.

Die häufigsten Fragmente des B-Typ-Procyanidins (Abbildung 3.9, B) sind m/z 451, 425, 407 und 289. Eine häufige Reaktion der Catechine ist die Retro-Diels-Alder-Umlagerung, die meist am C-Ring der Catechine stattfindet (s. auch Abbildung 3.6). In diesem Fall können zwei Fragmente entstehen, zum einen ist dies durch den Verlust des B-Rings das m/z 425 $[M-H-152]^-$ und zum anderen infolge Abspaltung des A-Rings $[M-H-138]^-$ das m/z 439. Dass im Spektrum von Procyanidin B3 (**7**) nur m/z 425 beobachtet wurde, bedeutet, dass an keinem der beiden B-Ringe eine Modifizierung vorlag. Außerdem zeigt

das Fehlen von m/z 439, dass die Interflavan-Bindung zwischen C-4(o) und C-8(u) (Nomenklatur s. Abbildung 3.10) den Verlust des A-Rings verhindert.

Im Produktionenspektrum von BC (Abbildung 3.9, A) sind die häufigsten Fragmente m/z 439, m/z 425, m/z 393, m/z 289 und m/z 269. Die Fragmente m/z 451 und m/z 407, die im Spektrum vom Procyanidin (7) vorkommen, fehlen. Hieraus wird deutlich, dass es sich bei BC und Procyanidin B3 um unterschiedliche Substanzen handelt.

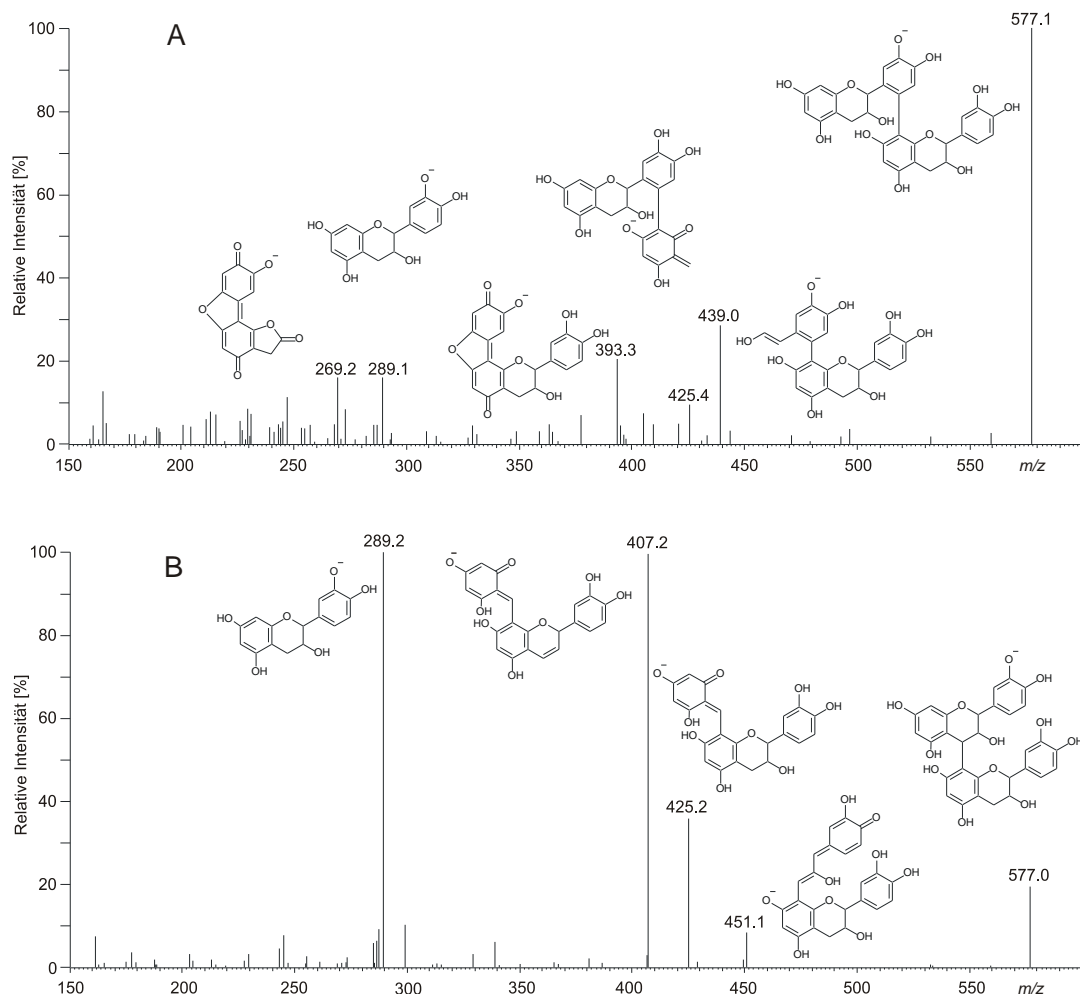


Abbildung 3.9: Aufgenommene HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Spektren nach Fragmentierung mit Strukturformeln der entstandenen Fragmente von BC (A) und Procyanidin B-Typ (B) (5). Precursorion ist m/z 577 (HPLC-ESI-MS/MS-Bedingungen s. 4.2.4, HPLC-System 2, Massenspektrometer 2).

Im Spektrum des Produktes BC sind die beiden Fragmente m/z 439 und m/z 425 zu sehen. Die Interflavan-Bindung verhindert in diesem Fall also weder den Verlust des A-Rings, noch den des B-Rings. Eine C-5'(o)–C-8(u)-Verknüpfung der beiden Catechin-Einheiten ist also wahrscheinlich.

Weder die HPLC-UV noch die HPLC-MS lieferten die entscheidenden Hinweise auf die Struktur des Moleküls, erst mit Hilfe der Tandemmassenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass es sich bei BC nicht um das Procyanidin B3 (**7**) handelt, sondern vielmehr um ein B-Typ-Dehydrodiccatechin. Aufgrund von Vergleichsdaten der Literatur (Sun und Miller, 2003) wurde davon ausgegangen, dass es sich um das Dehydrodiccatechin B₁₁ (**9**) handelt (Abbildung 3.10).

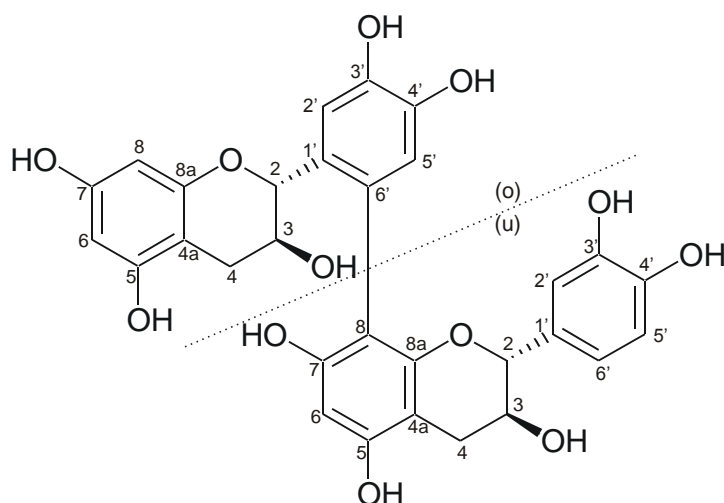


Abbildung 3.10: Strukturformel von Dehydrodiccatechin B₁₁ (**9**), geteilt in eine obere (o) und eine untere (u) (+)-Catechineinheit.

Diese Annahme sollte durch NMR-Untersuchungen bestätigt werden. Hierzu musste die zu den Messungen notwendige Menge an BC gewonnen werden.

3.2.6 Präparative Gewinnung von BC und EC

Zur Produktgewinnung wurde die analytische HPLC-Methode (HPLC-System 4) an das präparative HPLC-System (Präp. HPLC-System 1) angepasst. In Abbildung 3.11 ist das Chromatogramm einer (+)-Catechin (**1**)-Puffer Lösung (nach 9-tägiger Inkubation) zu sehen. Edukt und Produkte sind hinreichend voneinander getrennt.

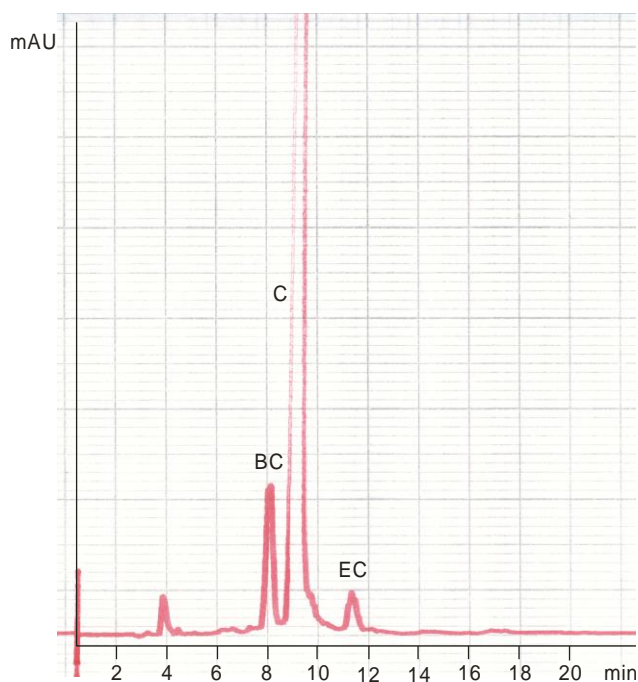


Abbildung 3.11: HPLC-Chromatogramm (280 nm) von (+)-Catechin (**1**) nach 9-tägiger Inkubation in Kalium-Phosphat Puffer (pH 7.4) (BC, Dehydrodiccatechin; C, Catechin; EC, Epicatechin) (Präp. HPLC-System 1).

Die Peaks BC und EC aus 100 HPLC-Läufen wurden jeweils gesammelt. Das Lösemittel wurde schonend am Rotationsverdampfer (40 °C) entfernt, um weitere Epimerisierungs- und Autoxidationsreaktionen zu verhindern (s. Abschnitt 3.1.4). Im Anschluss daran erfolgte die Gefriertrocknung der Proben. Dieses Vorgehen lieferte 1.3 mg BC und 0.8 mg EC.

3.2.7 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Von der gemäß Angaben in Abschnitt 3.2.6 gewonnenen BC-Reinsubstanz wurden nun ^1H -, ^{13}C -, COSY- und Dept-135-Spektren aufgenommen (s. 4.2.7). Die Auswertung des Dept-Spektrums (

Abbildung 7.2) zeigt zwei sekundäre Kohlenstoffatome bei 25.9 ppm und 28.9 ppm (C-4u und C-4b). Dies bestätigt, dass es sich bei BC, wie vermutet, nicht um ein dimeres Procyanidin handelt. Dimere Procyanidine sind 4u-8b oder 4u-6b verknüpft (Gu et al., 2003) und besitzen somit nur ein sekundäres C-Atom. Die Auswertung der oben genannten Spektren (

Abbildung 7.2 -7.4) legt nahe, dass es sich um die in Abbildung 3.12 aufgeführte Struktur handelt.

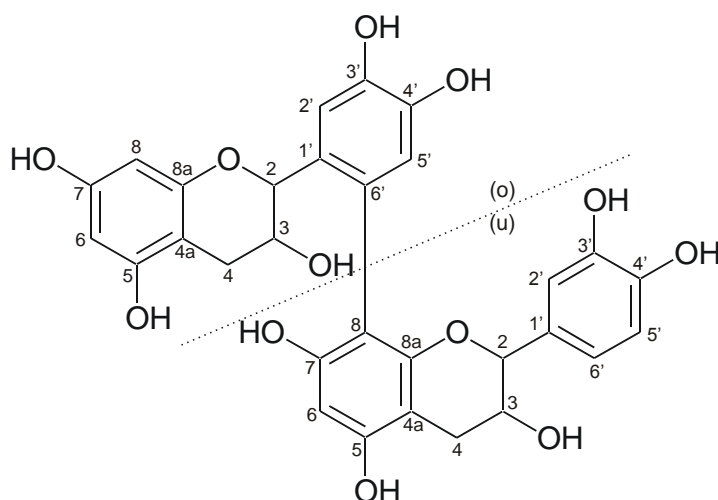


Abbildung 3.12: Struktur von Dehydrodicatichin, geteilt in eine obere (o) und eine untere (u) Catechineinheit.

Dehydrodicatichin (Abbildung 3.12): $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz) δ [ppm]= 2.58 (m, 2H, H-4u); 2.61-2.86 (m, 2H, H-4o); 3.98 (m, 1H, H-3o); 4.15 (m, 1H, H-3u); 4.86 (d, $J=5.4$ Hz, 2H, H-2o/2u); 5.88 (d, $J=2.32$ Hz, 1H, H-8o); 5.90 (d, $J=2,3$ Hz, 1 H, H-6o); 6.05 (s, 1H, H-6u); 6.54 (s, 1H, H-5'o); 6.62 (m, 1H, H-5'u); 6.71 (s, 1H, H-2'o); 6.74 (d, $J=2.0$ Hz, 1H, H-2'u); 6.80 (s, 1H, H-6'u)

^{13}C (CD_3OD , 600 MHz) δ [ppm]= 26.04 (C-4u); 29.06 (C-4o); 67.38 (C-3u); 68.58 (C-3o); 80.34 (C-2u); 82.99 (C-2o); 95.46 (C-8o); 96.06 (C-6u); 96.43 (C-6o); 100.29 (4au); 101.38 (C-4ao); 108.23 (C-8o); 113.92 (C-2'u); 115.72 (C-5'u); 116.17 (C-2'o); 119.87 (C-6'u); 120.29 (C-6'o); 131.74 (C-1'u); 132.08 (C-1'o); 145.57 (C-3'u); 145.65 (C-4'o/4'u), 145.93 (C-4'o/4'u), 146.10 (C-3'o); 154.32 (C-7u); 154.60 (C-8a); 156.64 (C-5u); 157.01 (C-8ao); 157.71 (C-7o); 157.76 (C-5o)

Da die Substanzmenge nicht ausreichend war für Spektren, in denen die räumliche Kopplung zu sehen ist, kann über die Stereochemie der Verbindung (an C-2o/u, C-3o/u) keine Aussage getroffen werden.

Die NMR-Experimente bestätigen die chromatographischen und massenspektrometrischen Untersuchungen, die den Hinweis auf das aus zwei (+)-Catechin-Einheiten bestehende Dehydrodicatichin B₁₁ (**9**) lieferten (s. Abschnitt 3.2.5).

3.3 Enantiomerenanalytik

Die bisher verwendeten Analysetechniken erlaubten keine Enantiomerentrennung. In diesem Kapitel wird nun näher auf diese Thematik eingegangen.

3.3.1 Hochleistungsflüssigchromatographie an chiraler Phase

Wie vorgängig gezeigt wurde, konnte eines der Abbauprodukte von (+)-Catechin (**1**) als Epicatechin identifiziert werden. Um nun zu ermitteln, um welches der beiden Enantiomere es sich handelt, war eine Methode zur Enantiomerentrennung an chiraler HPLC-Phase zu entwickeln. Vorab wurde eine chirale HPLC-Phase mit modifiziertem β -Cyclodextrin verwendet.

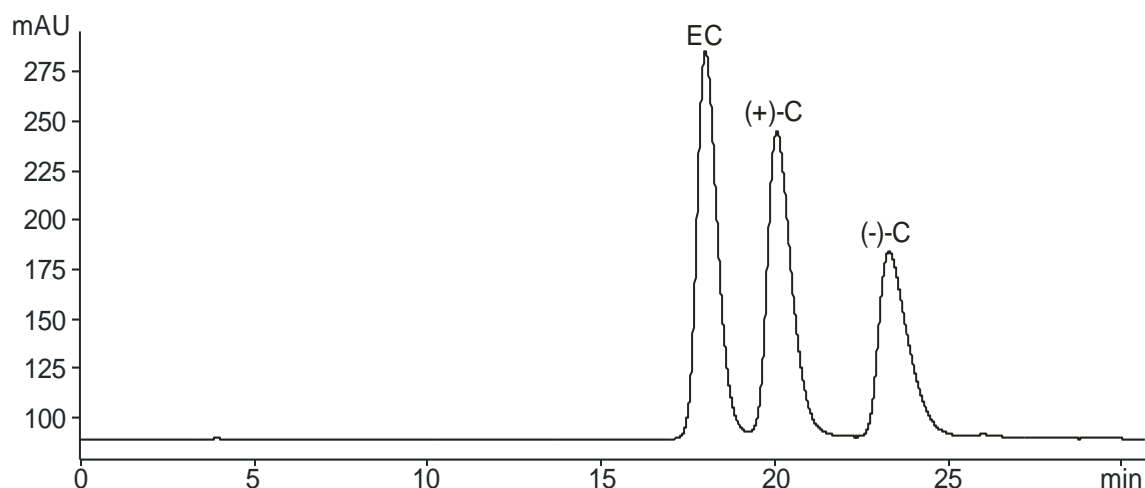


Abbildung 3.13: Chromatographische Trennung von (+)-Catechin (**1**), (-)-Catechin (**3**) und (\pm)-Epicatechin (**2+4**) mit HPLC-System 4 (s. 4.2.1).

Die Enantiomere von Catechin wurden unter den in Kapitel 4.2.1 (HPLC-System 4) beschriebenen Bedingungen getrennt. Für die Enantiomere von Epicatechin war dies allerdings nicht der Fall (Abbildung 3.13).

Cooper und Mitarbeitern (2007) gelang die chromatographische Enantiomerentrennung von (\pm)-Catechin (**1+3**) und (\pm)-Epicatechin (**2+4**) in Kakao. Für ihre Untersuchungen verwendeten sie mit Hydroxypropyl-Resten modifiziertes β -Cyclodextrin als Säulenmaterial. In dem in Abbildung 3.13 gezeigten Chromatogramm wurde permethyliertes β -Cyclodextrin verwendet. Der Polaritätsunterschied der Phasen dürfte der Grund dafür sein, dass (\pm)-Epicatechin (**2+4**) von uns nicht getrennt wurde.

Im Folgenden wurde eine weitere Möglichkeit zur Enantiomertrennung in Betracht gezogen, die Kapillarelektrophorese.

3.3.2 Klärung der Epimerisierung mittels Kapillarelektrophorese (CE)

Ein großer Vorteil der Kapillarelektrophorese (CE) liegt darin, dass die Methodenentwicklung relativ einfach, schnell und kostengünstig ist. In einem CE-Trennsystem sind Art, Konzentration und pH-Wert des Hintergrundelektrolyten von großer Bedeutung, ebenso Temperatur, angelegte Spannung, Art und Länge der Kapillare, das Injektionsvolumen der Probe sowie der Zusatz von Pufferadditiven wie z.B. organischen Lösungsmitteln. Zur Optimierung der Methode wurden die genannten Parameter variiert. Die Methode von Kofink und Galensa (2007) wurde hierzu bei Verwendung von Hydroxypropyl- γ -Cyclodextrin (HP- γ -CD) modifiziert.

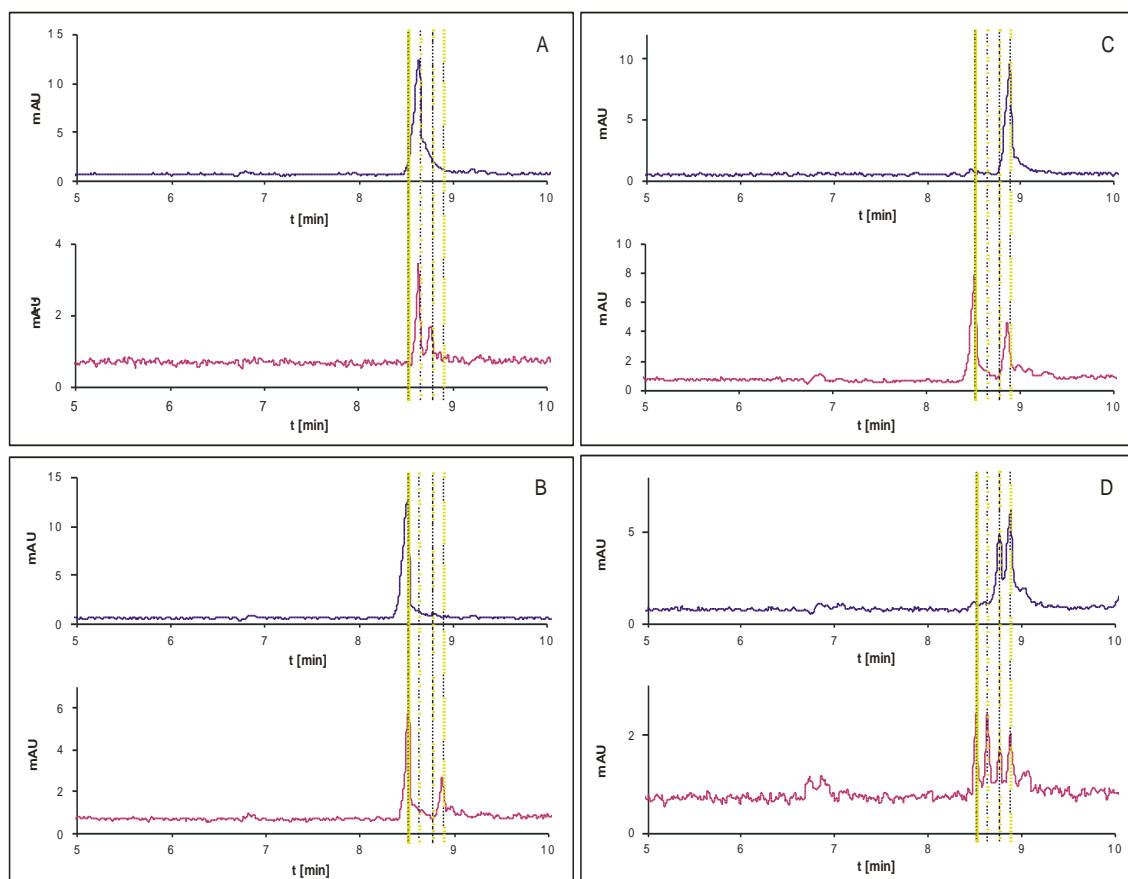


Abbildung 3.14: Elektropherogramme (280 nm) von Catechinen in Kalium-Phosphat Puffer (pH 7.4), (A: (+)-Catechin (**1**), B: (-)-Catechin (**3**), C: (-)-Epicatechin (**2**), D: (+/-)-Epicatechin (**2+4**)), jeweils nach ca. 2h (blau) und 7d (rosa) (Bedingungen s. 4.2.8).

Zur Klärung der Epimerisierung von (\pm)-Catechin (**1+3**) und (\pm)-Epicatechin (**2+4**) wurden (+)-Catechin (**1**), (-)-Catechin (**3**), (-)-Epicatechin (**2**) und (\pm)-Epicatechin (**2+4**) in Phosphat-Puffer (pH 7.4) gelöst und umgehend mittels CE untersucht (blaue Elektropherogramme in Abbildung 3.14).

Nach 7-tägiger Inkubation der Catechine in Kalium-Phosphat-Puffer wurden diese abermals untersucht (rosa Elektropherogramme in Abbildung 3.14). Durch Migrationszeitvergleich und Standardadditionsversuche mit den Reinsubstanzen konnte so die Identität der Enantiomeren geklärt werden.

Als Migrationsreihenfolge der Catechine ergab sich: (-)-Catechin (**3**), (+)-Catechin (**1**), (+)-Epicatechin (**4**) und (-)-Epicatechin (**2**). Diese Reihenfolge lässt sich dadurch erklären, dass der enantiomere Analyt, der aufgrund seines sterischen Aufbaus am stärksten mit der chiralen Phase in Wechselwirkung tritt, am schnellsten mit dem elektroosmotischen Fluß (EOF) in Richtung Detektor migriert (Kofink, 2009). Bei den Flavan-3-ol-Enantiomeren ist dies das (-)-Catechin (**3**) und dann sein Enantiomer, das (+)-Catechin (**1**). Erst darauf folgt (+)-Epicatechin (**4**). Aufgrund seiner verhältnismäßig schwachen Wechselwirkung mit dem CD migriert (-)-Epicatechin (**2**) von den vier Flavan-3-ol-Enantiomeren am langsamsten.

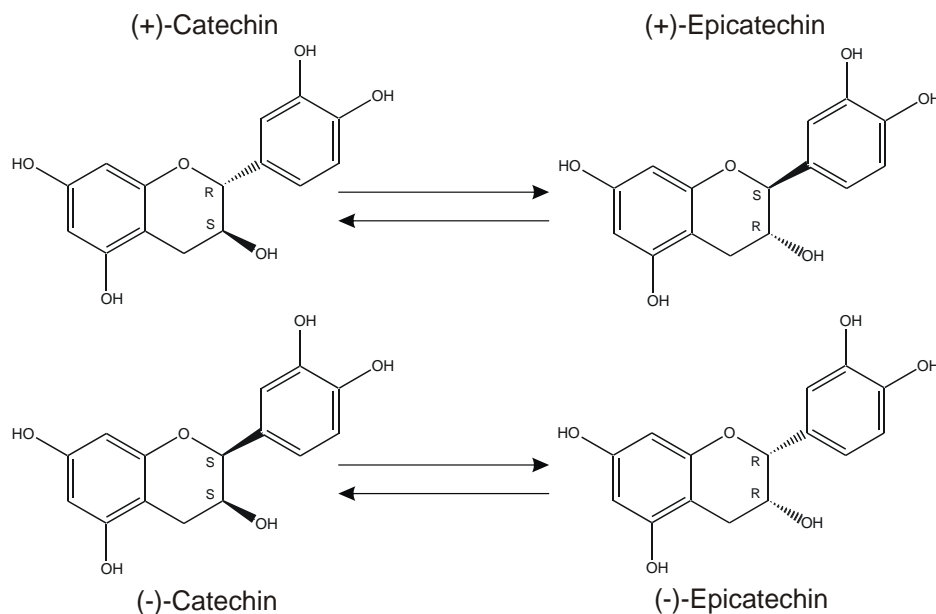


Abbildung 3.15: Epimerisierung von Catechinen (**1-4**) in Kalium-Phosphat Puffer.

Mittels Kapillarelektrophorese konnte so gezeigt werden, dass (+)-Catechin (**1**) zu (+)-Epicatechin (**4**) und (-)-Catechin (**3**) zu (-)-Epicatechin (**2**) und vice versa epimerisieren (s. Abbildung 3.15) (Courbat *et al.*, 1997).

3.3.3 Catechin-C-Glykoside: Mechanistische Überlegungen

In unserem Arbeitskreis wurden parallel zur vorliegenden Arbeit im Rahmen einer Diplomarbeit biomimetisch Flavan-3-ol-C-Glykoside gewonnen (Hasslauer *et al.*, 2010). Dies geschah in Anlehnung an die bei der Kakaoproduktion entstehenden Catechin-C-Glykoside. Hierzu wurde eine nach Stark und Hoffmann (2006) modifizierte Methode zur nichtenzymatischen Gewinnung von Flavan-3-ol-C-Glykosiden verwendet. In Abbildung 3.16 ist am Beispiel von (-)-Epicatechin der von Stark und Hoffmann (2006) postulierte Reaktionsweg dargestellt.

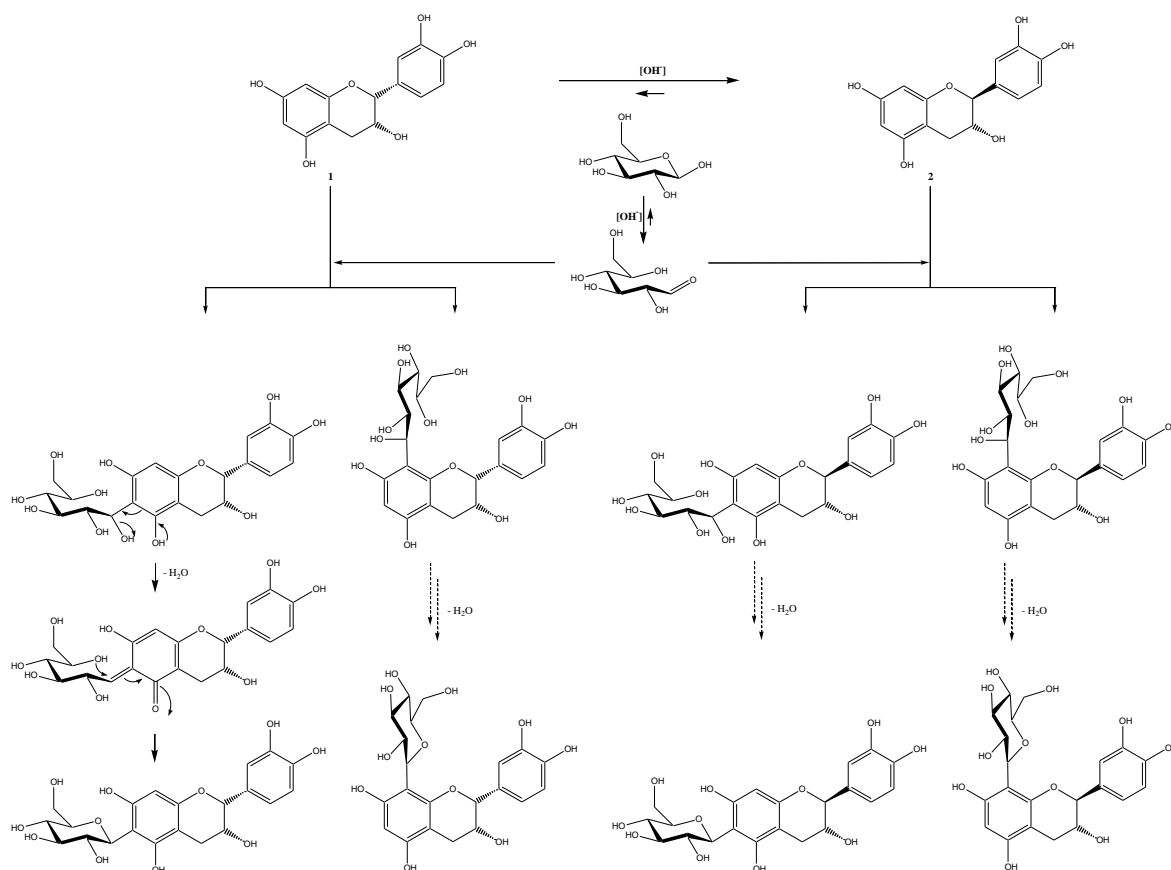


Abbildung 3.16: Von Stark und Hoffmann (2006) postulierter Reaktionsmechanismus für die nichtenzymatische Glykosylierung von (-)-Epicatechin (**2**) und (-)-Catechin (**3**) zu (-)-Epicatechin-6-C- β -D-glucopyranosid, (-)-Epicatechin-8-C- β -D-glucopyranosid, (-)-Catechin-6-C- β -D-glucopyranosid und (-)-Catechin-8-C- β -D-glucopyranosid (von links nach rechts) (Hasslauer *et al.*, 2010)

Wie u.a. bereits in Abschnitt 3.3.2 erwähnt, epimerisiert (-)-Epicatechin unter alkalischen Bedingungen zu (-)-Catechin (Courbat *et al.*, 1997). Die Hexose, die im basischen Milieu bevorzugt offenkettig vorliegt, wird vom A-Ring am Carbonyl-C-Atom angegriffen. Durch eine Michael-Addition entstehen nach der Eliminierung von Wasser, die C-C-Glycoside. Auf diesem Weg müssten nun, unabhängig von der Struktur der Flavonole an B- und C-Ring, verschiedene C-C-Glykoside gebildet werden können. Es wurden daraufhin von uns verschiedene Vertreter der Flavonole, der Flavone, der Flavanone sowie der Flavan-3-ole eingesetzt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse zeigten jedoch, dass nur Flavan-3-ole und Flavanone zu C-C-Glykosiden umgesetzt wurden.

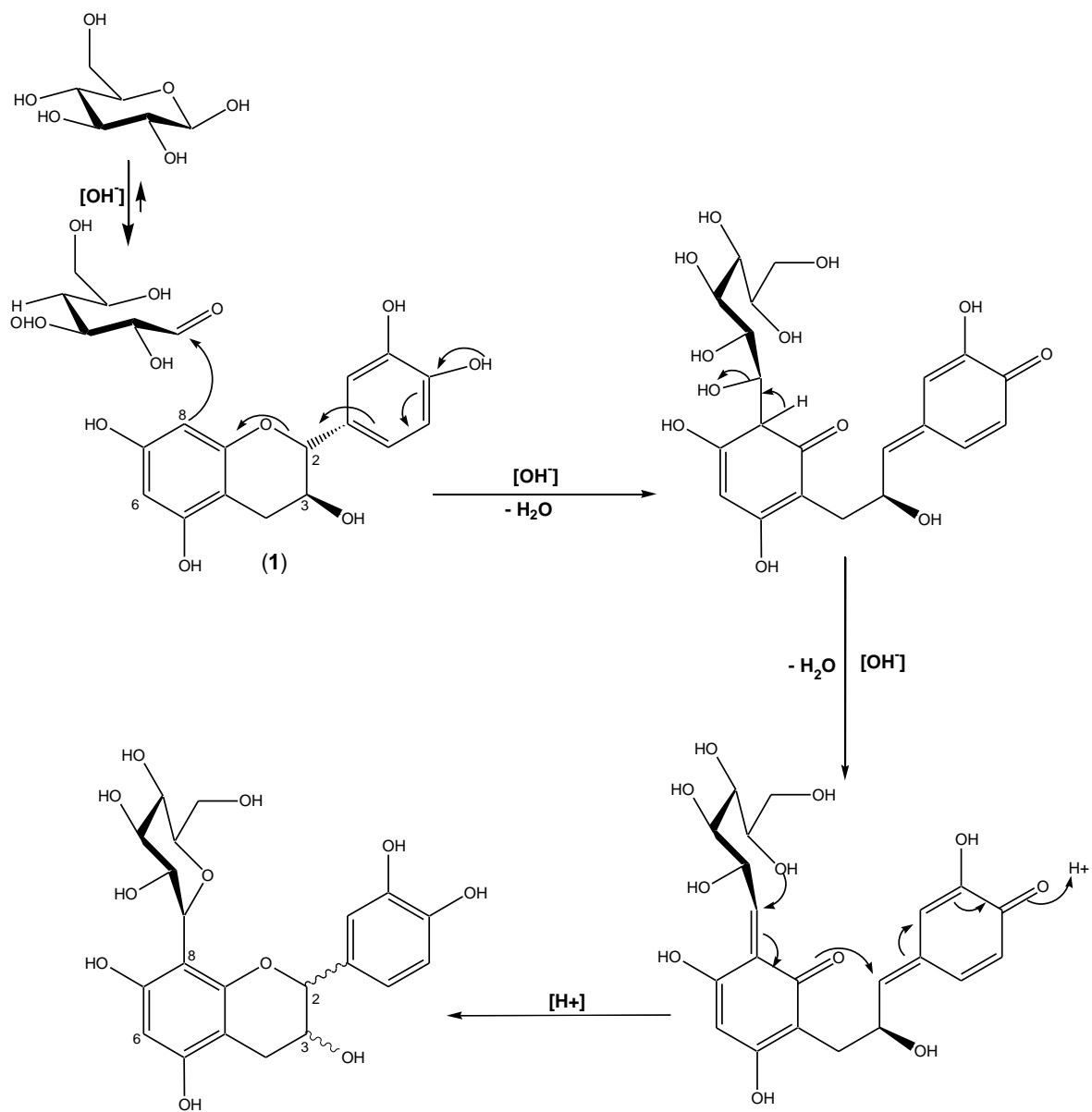


Abbildung 3.17: Postulierter Mechanismus am Beispiel von (+)-Catechin (1) zu (Epi)-Catechin-8-C-Glykosid (modifiziert nach Hasslauer *et al.*, 2010).

Das gemeinsame Strukturmerkmal der Flavonole und Flavone ist im Unterschied zu Flavan-3-olen und Flavanonen die Doppelbindung zwischen C2 und C3. Nur wenn diese nicht vorhanden ist, konnten von uns C-C-Glykoside gewonnen werden. Dies führte zu dem von uns postulierten Reaktionsmechanismus (Abbildung 3.17), der analog zum Mechanismus der Epimerisierung von z.B. (+)-Catechin verläuft (Abbildung 2.5). Unter diesen Vorstellungen kann auch eine Addition des Zuckers an Position C6 erklärt werden. Der in Abbildung 3.17 gezeigte Elektronen-Transfer-Mechanismus kann jedoch nur ablaufen, wenn zwischen Position C2 und C3 keine Doppelbindung besteht.

3.4 Einfluß der Catechine auf Enzymsysteme

Polyphenolen und damit auch den Catechinen werden vor allem aufgrund ihrer antioxidativen Kapazität positive Eigenschaften in Bezug auf verschiedene Krankheiten zugeschrieben (s. Abschnitt 2.1.1).

Lipoxygenase (LOX) ist Bestandteil der Arachidonsäurekaskade und u.a. an Asthma und Entzündungsreaktionen beteiligt (s. Abschnitt 2.2). Auch die Xanthinoxidase (XOD) ist an Entzündungsreaktionen aber auch bei chronischer Herzinsuffizienz sowie Gicht beteiligt (s. Abschnitt 2.3). In den Katalysezyklen beider Enzyme spielen reaktive Sauerstoffspezies eine entscheidene Rolle. Es lag also nahe, den Einfluß der antioxidativ wirksamen Catechine auf diese beiden Enzymsysteme zu untersuchen. Zunächst geschah dies mittels *in vitro*-Studien.

3.4.1 Einfluß der Catechine und ausgewählter C-Glykoside auf die Lipoxygenase

Modellsysteme mit Entzündungsmarkern wie LOX, COX, NF κ B, „peroxisome proliferator-activated receptor γ “ (PPAR γ), „C-reactive protein“ (CRP), Interleukinen und TNF- α und deren Wechselwirkungen mit verschiedenen Polyphenolen sind bereits in der Literatur beschrieben (Bengmark, 2006; Terra *et al.*, 2007; Terra *et al.*, 2008). LOX ist neben COX Schlüsselenzym der Arachidonsäurekaskade und für die Bildung von HPETEs verantwortlich; sie leitet dadurch die Entstehung der Entzündungsmediatoren LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄ und LTE₄ ein. Wird die LOX inhibiert, führt dies zu einer erheblichen Abschwächung der Entzündungsreaktion.

Zu eigenen Untersuchungen kam die Soja LOX-1 zur Anwendung.

3.4.1.1 (Direkter) Soja Lipoxygenase-1-Assay

In vorangegangenen Studien unseres Arbeitskreises wurden u.a bereits Anthocyane mit dem Soja LOX-1 Modellsystem untersucht (Knaup, 2008). Wir wählten demzufolge zunächst die gleichen Versuchsbedingungen für die Untersuchung des Einflusses von Catechinen auf die LOX, wie sie schon in den Studien mit Anthocyanen zur Anwendung gekommen waren. Es stellte sich allerdings heraus, dass die Bedingungen für das Catechin-LOX-Modell nicht geeignet waren, da bei diesen die Bildung des Hydroperoxids bei 234 nm photometrisch verfolgt wird und die Catechine in diesem Bereich eine hohe

Eigenabsorption aufweisen. Für die Positivkontrolle mit Nordihydroguaretsäure (NDGA) (**10**) konnte erwartungsgemäß ein IC_{50} -Wert ermittelt werden; er wurde mit $1.4 \mu\text{M}$ bestimmt (s. Abbildung 3.18). Hierauf wird im Abschnitt 3.4.1.2 noch näher eingegangen.

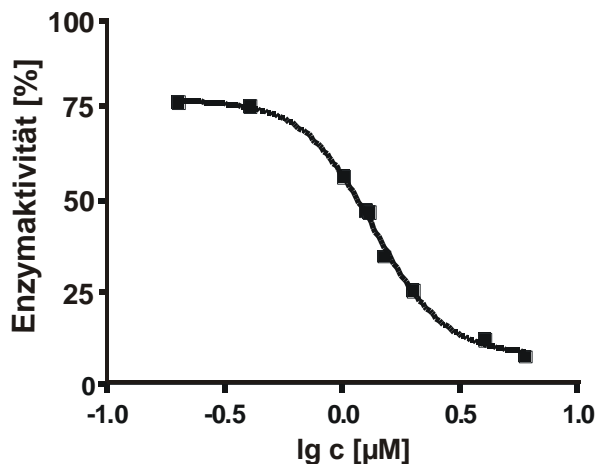


Abbildung 3.18: Dosis-Wirkungskurve des Einflusses von NDGA (**10**) auf die Soja LOX-1 (Substrat: Linolsäure) ($IC_{50} = 1.4 \mu\text{M}$). Aufgetragen sind jeweils Mittelwerte ($n=3$). Experimentelle Bedingungen s. 4.2.9 System 1 und 4.3.8.1.1.

Eine Alternative zu dem Modell der direkten Kontrolle der Hydroperoxidbildung ist der H_2DCFDA (**11**)-Assay.

3.4.1.2 Assay mittels Dihydrodichlorofluorescein-Diacetat

Ursprünglich wurde dieser Assay entwickelt, um Wasserstoffperoxid in wässrigen Lösungen quantitativ zu bestimmen (Keston und Brandt, 1965; Cathcart *et al.*, 1983). Heutzutage wird mit Hilfe dieser Methode die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nachgewiesen. Sie wird als zuverlässig, empfindlich und spezifisch angesehen (LeBel *et al.*, 1992; Shen *et al.*, 1996).

Das im LOX-Katalyse-Zyklus entstehende Hydroperoxid oxidiert Dihydrodichlorofluorescein-Diacetat (H_2DCFDA) (**11**) zu Dichlorofluorescein (DCF) (**12**), das mittels Fluoreszenzmessung erfasst wird (s. Abschnitt 4.2.10, System 1). In Abbildung 3.19 ist der mit dieser Methode bestimmte zeitliche Ablauf der aeroben LOX-katalysierten Reaktion ohne und bei Anwesenheit verschiedener Catechin-Konzentrationen beispielhaft dargestellt.

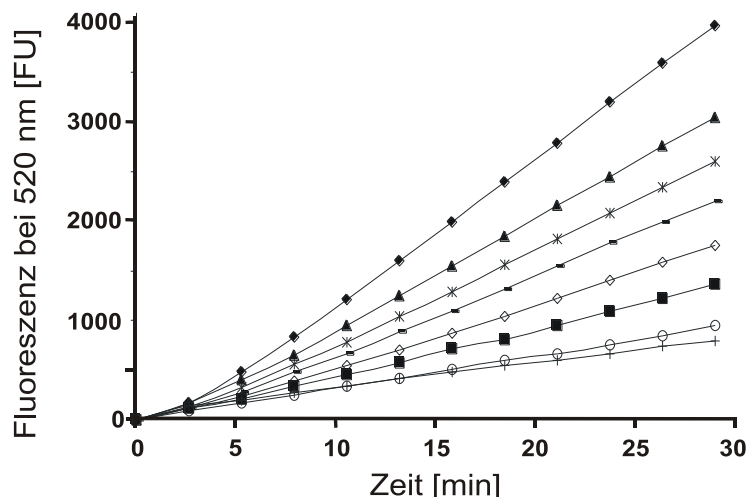


Abbildung 3.19: Zeitlicher Ablauf der LOX-katalysierten Reaktion mit Arachidonsäure. Die Bildung von DCF (**12**) in Gegenwart von (+)-Catechin (**1**) wurde untersucht (Bedingungen s. 4.2.10 System 1 und 4.3.8.1.2). Die Konzentrationen (nicht alle untersuchten Konzentrationen gezeigt) waren 0 μM (\blacklozenge), 0.125 μM (\blacktriangle), 0.35 μM (\times), 1 μM ($-$), 2 μM (\diamond), 4 μM (\blacksquare), 10 μM (\circ) und 80 μM ($+$). Aufgetragen sind Mittelwerte ($n=3$).

Aus Abbildung 3.19 ist zu erkennen, dass die Bildung von (**12**) mit steigender Konzentration an (**1**) immer geringer wird. Während ohne (**1**) eine Umsatzrate von 136 FU/min erreicht wird, sind es bei 0.125 μM (**1**) noch 105 FU/min und bei 1 μM (**1**) nur noch 76 FU/min (s. Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Zeitliche Änderung der Fluoreszenz beim Ablauf der LOX-katalysierten Reaktion mit Arachidonsäure. Die Bildung von DCF (**12**) in Gegenwart von (+)-Catechin (**1**) in unterschiedlichen Konzentrationen (0 – 80 μM) wurde untersucht (Bedingungen s. 4.2.10 und 4.3.8.1.2)

μM	0.00	0.125	0.35	1	2	4	10	80
$\Delta \text{FU}/\text{min}$	136	105	89	76	60	47	32	28

Die gezeigten Effekte können aufgrund des indirekten Messansatzes via Oxidation von H_2DCFDA (**11**) zu DCF (**12**) nicht ohne weiteres einer Enzyminhibierung zugesprochen werden. Prinzipiell gibt es zwei Erklärungen für eine verminderte Bildung von DCF (**12**), die nachfolgend erläutert werden. Zum einen ist es vorstellbar, dass das Enzym durch die Catechine gehemmt wird und deshalb weniger ROS gebildet werden, die wiederum weniger H_2DCFDA (**11**) zu DCF (**12**) umsetzen. Es ist aber auch möglich, dass die Catechine aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung die ROS abfangen und somit weniger H_2DCFDA (**11**) zu DCF (**12**) umgesetzt werden kann. Um von einer Enzyminhibierung sprechen zu können, muß der Sauerstoffgehalt während der Enzym-Katalyse bestimmt

werden. Ist das Enzym tatsächlich gehemmt, kann es keine weiteren Sauerstoffmoleküle in die Fettsäure einbauen und der O₂-Gehalt müsste konstant bleiben. Ob es sich hier nun um eine antiinflammatorische Wirkung oder um den antioxidativen Effekt der Flavan-3-ole handelt, muss in weiteren Studien überprüft werden, die im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht mehr realisierbar waren. Die nachfolgend gezeigten Ergebnisse zeigen den Einfluß der Catechine und ihrer C-Glykoside auf die Soja LOX-1.

In Abbildung 3.20 sind beispielhaft die Dosis-Wirkungskurven des Referenzinhibitors NDGA (**10**), von (+)-Catechin (**1**) sowie (+)-Epicatechin-8- β -D-galactosid (**13**) und der Soja LOX-1 gezeigt.

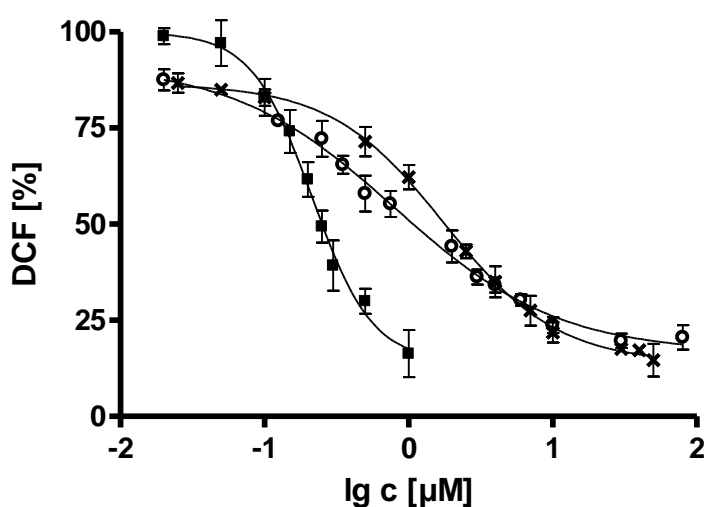


Abbildung 3.20: Dosis-Wirkungskurven des Einflusses von (**10**), (**1**) und (**13**) auf Soja LOX-1-Katalyse (Arachidonsäure) ; repräsentativ: NDGA (**10**) (■), (+)-Catechin (**1**) (o) und (+)-EC-8- β -D-galactosid (**13**) (x). Aufgetragen sind die Mittelwerte (n=3) \pm SD. Experimentelle Bedingungen s. 4.2.10 System 1 und 4.3.8.1.2.

Die berechneten IC₅₀-Werte für die von uns untersuchten Substanzen sind in Tabelle 3.3 wiedergegeben. Der Einfluß der untersuchten Flavan-3-ole und ihrer C-Glykoside nimmt in folgender Reihenfolge ab: NDGA (**10**) > (+)-Catechin-8- β -D-ramnosid (**14**) > (-)-Catechin (**3**) > (+)-Catechin (**1**) > (-)-Epicatechin (**2**) > (+)-Epicatechin-8- β -D-galactosid (**13**).

Vergleicht man den mit dem H₂DCFDA-Assay ermittelten IC₅₀-Wert für NDGA (**10**) (0.2 μ M für 25 U Enzym) mit dem beim direkten Soja LOX-1 Assay ermittelten (1.4 μ M bei 250 U Enzym, s. 3.4.1.1) stellt man fest, dass das Ergebnis vergleichbar ist. Alle geprüften Verbindungen erwiesen sich als effektive LOX-Inhibitoren. Dabei zeigte (+)-Catechin (**1**) einen größeren Einfluß auf die Soja LOX als (-)-Epicatechin (**2**). Aus der

Literatur ist bereits bekannt, dass dieser Effekt auf die Stereochemie an C2 und C3 ((+)-Catechin **(1)**: 2*R*3*S*, (-)-Epicatechin **(2)**: 2*R*3*R*) zurückzuführen ist (Richard-Forget *et al.*, 1995). Für (-)-Catechin **(3)** sowie die hier untersuchten C-Glykoside gibt es bisher noch keine Literaturdaten. Betrachtet man die Ergebnisse in Tabelle 3.3, stellt man fest, dass (-)-Catechin **(3)** einen kleineren IC₅₀-Wert als (-)-Epicatechin **(2)** und sogar (+)-Catechin **(1)** hat. Die Konfiguration des B-Ringes ist 2*S*, die Stellung der Hydroxygruppe an C3 ist *R*. Auch hier stimmen die ermittelten Ergebnisse mit früheren überein (Richard-Forget *et al.*, 1995). Die *trans*-Stellung an C2 und C3 ist günstiger, als die *cis*-Stellung (2*R*3*R*) bei (-)-Epicatechin **(2)**. Eine Untersuchung von (+)-Epicatechin **(4)** könnte hierüber weitere Erkenntnisse bringen. Der Einfluß von (+)-Epicatechin **(4)** auf die LOX konnte in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht werden, da es zu dem benötigten Zeitpunkt keine Reinsubstanz kommerziell zu erwerben gab und eine Aufreinigung aus epimerisiertem (+)-Catechin **(1)** zu zeitaufwendig war.

Tabelle 3.3: Inhibierung der Soja 1-LOX durch Catechine und ausgewählte Catechin-C-glykoside; (Referenz: NDGA **(10)**) IC₅₀-Werte und die dazugehörigen 95 %-Konfidenzintervalle. Experimentelle Bedingungen s. 4.2.10 und 4.3.8.1.2

Substanz	IC ₅₀ [µM]	95 % - Konfidenzintervall
NDGA (10)	0.2	0.18 - 0.25
(+)-Catechin-8-β-D-rhamnosid (14)	0.5	0.31 - 0.72
(-)-Catechin (3)	0.7	0.30 - 1.50
(+)-Catechin (1)	0.8	0.56 - 1.20
(-)-Epicatechin (2)	1.1	0.72 - 1.62
(+)-Epicatechin-8-β-D-galactosid (13)	1.8	1.61 - 1.94

Der Vergleich mit Literaturdaten (s. Tabelle 2.2) ist schwierig, da es kaum Studien gibt, in denen der Einfluß von NDGA **(10)**, (+)-Catechin **(1)** und (-)-Epicatechin **(2)** auf die LOX unter gleichen Bedingungen untersucht wurde. In einer Studie mit Fisch-LOX lagen die IC₅₀-Werte von **(1)**, **(2)** und **(10)** bei 22.4 nM, 6.0 nM und 0.07 µM (Banerjee, 2006). In einer Untersuchung von Baumann *et al.* (1980) war **(2)** im Vergleich zu **(1)** der potentere Effektor. In einer weiteren Studie war **(1)** ein stärkerer Inhibitor als **(2)** (Richard-Forget *et al.*, 1995). Dieses Ergebnis konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (s. Tabelle 3.3). Für (-)-Catechin **(3)** und (+)-Epicatechin **(4)** gibt es bisher noch keine Daten zur Inhibierung der Lipoxygenasen. Der Reaktionstyp für **(1)** und **(2)** ist unkompetitiv, was

bedeutet, dass der Inhibitor außerhalb des aktiven Zentrums an das Enzym bindet, wenn hier bereits ein Substratmolekül gebunden ist (Richard-Forget *et al.*, 1995). Der Inhibitionstyp von **(10)** wird als Redox-Mechanismus (Pufahl *et al.*, 2007) bzw. als kompetitiver Inhibitionstyp (Belman *et al.*, 1989) beschrieben.

Die Einführung eines Zuckerrests bewirkt im Fall von (+)-Catechin-8- β -D-rhamnosid **(14)** im Vergleich zu (+)-Catechin **(1)** eine weitere deutliche Steigerung des antioxidativen Potentials. Das (+)-Epicatechin-8- β -D-galactosid **(13)** hingegen ist ein relativ schlechter Inhibitor (der Vergleich mit dem Aglykon (+)-Epicatechin **(4)** kann erneut nicht gemacht werden, da **(4)** nicht zur Verfügung stand).

In der Literatur führt die Konjugation mit einem Zuckerrest nicht immer zu einer gesteigerten Inhibierung der LOX. So wurde in einer in unserem Arbeitskreis durchgeführten Studie gezeigt, dass eine Konjugation der Anthocyane Delphinidin und Cyanidin mit Glucose bzw. Galactose zu einem Anstieg des Inhibierungspotentials führt (Knaup, 2008). Auch in einer Studie von Werz (2007) zeigte das konjugierte Myricetin 3-O-glucuronid, mit Ausnahme der Arabinose, einen niedrigeren IC₅₀-Wert als sein entsprechendes Aglykon. Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse der LOX-Inhibierung mit Peonidin und Peonidin-Derivaten. In diesem Fall war das Aglykon der wirksamste Effektor (Richard-Forget *et al.*, 1995; Knaup, 2008).

3.4.2 Einfluß der Catechine und ausgewählter C-Glykoside auf die Xanthinoxidase

In Fortführung der im Abschnitt 3.4.1 besprochenen Studien setzten wir im Folgenden Xanthinoxidase ein. In deren Katalysezyklus entsteht auch Wasserstoffperoxid (vgl. Abschnitt 2.3.1). Die Vermutung liegt nahe, dass dieses die XOD inhibieren könnte. Eine Zugabe von Katalase zur Eliminierung von H_2O_2 war in diesem Versuchsansatz jedoch nicht erforderlich, da nach Udilova (1999) keine signifikante Veränderung der Harnsäurebildung in Anwesenheit der Katalase beobachtet wurde. Eine Hemmung der Aktivität der Xanthinoxidase durch das während der Reaktion entstehende Wasserstoffperoxid wird deshalb ausgeschlossen.

3.4.2.1 (Direkter) Harnsäure-Assay

Der Assay beruht auf der Tatsache, dass Xanthin (**15**) durch die XOD äquimolar zu Harnsäure (**16**) umgesetzt wird und deren Bildung bei 290 nm photometrisch verfolgt werden kann (s. 2.3). Durch die Sättigung des Puffers mit Sauerstoff wird gewährleistet, dass bei der eingesetzten Xanthin (**15**)-Konzentration Sauerstoff im Überschuß vorhanden ist. Wenn das Substrat verbraucht ist, kommt die Harnsäure (**16**)-Bildung und somit die Extinktionszunahme bei 290 nm zum Erliegen. Dies wird durch Erreichen des Plateaus, unter den von uns gewählten Bedingungen (s. 4.2.9 System 2 und 4.3.8.2.1) ungefähr 6 min nach Reaktionsbeginn, deutlich (Abbildung 3.21).

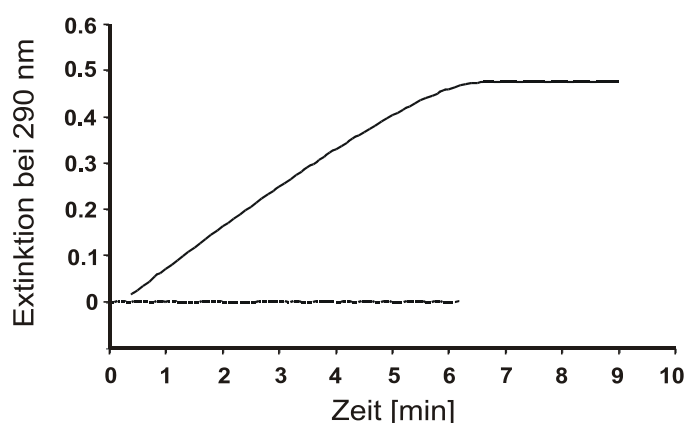
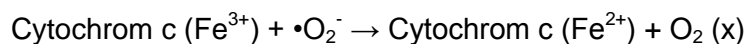


Abbildung 3.21: Zeitlicher Ablauf der XOD-katalysierten Reaktion mit Kontrollversuch ohne Enzym. Die Bildung von Harnsäure (**16**) wurde photometrisch bei 290 nm untersucht (s. 4.2.9 System 2 und 4.3.8.2.1).

Da die Eigenabsorption der Catechine ($E_{\max}=278$ nm) auch hier die Extinktion der Harnsäure (**16**) stört, wurden weitere Untersuchungen erneut über einen indirekten Reaktionsansatz durchgeführt.

3.4.2.2 Cytochrom c-Assay

Cytochrom c ist ein Hämprotein und spielt in der mitochondrialen Energiegewinnung eine wichtige Rolle als Elektronentransporter. Aufgrund der Eigenschaft seiner zwei spektralphotometrisch unterscheidbaren Redoxformen wird Cytochrom c u.a. zur Detektion von Superoxidanionen ($\bullet\text{O}_2^-$) verwendet (Fridovich, 1970; Kakinuma und Minakami, 1978). Dabei wird die oxidierte Form, das *ferr*-Cytochrom c (Fe^{3+}), durch eine Ein-Elektronen-Übertragung vom Radikal zum *ferro*-Cytochrom c (Fe^{2+}) reduziert (s. Abbildung 3.22). Dieses kann bei 550 nm detektiert werden.



In Abbildung 3.22 sind die Spektren des oxidierten und des reduzierten Cytochrom c abgebildet.

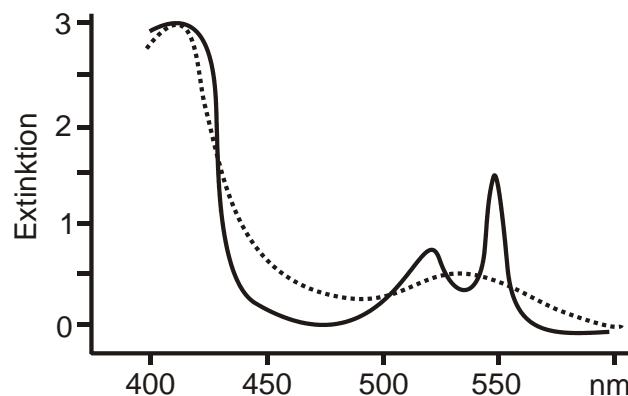


Abbildung 3.22: Spektren des oxidierten (---) und reduzierten (—) Cytochrom c (modifiziert nach Udilova, 1999).

Einer der Vorteile des Xanthin/Xanthinoxidase-Modellsystems für die Superoxidbildung ist die über einen längeren Zeitraum (ca. 5 min.) konstant bleibende $\bullet\text{O}_2^-$ -Bildungsrate, die je nach Substrat/Enzym-Verhältnis auf einen beliebigen, biologisch relevanten Wert einstellbar ist. In der vorliegenden Untersuchung wurde dieses Verhältnis so gewählt, daß die $\bullet\text{O}_2^-$ -Bildungsraten den vermuteten Raten *in vivo* entsprechen. Die in den Experimenten verwendete Konzentration des Xanthins (**15**) war mit 170 μM so gewählt,

daß es als Substrat im Überschuß vorliegt und die gewünschte $\bullet\text{O}_2^-$ -Bildungsrate durch Variation des Xanthinoxidase-Gehaltes eingestellt wurde.

Ausgeschlossen ist laut Udilova (1999) die Möglichkeit, dass bei einer Reaktion des Cytochrom c mit Superoxidradikalen das Elektron nicht auf das Häm-Eisen, sondern auf die Aminosäure des Proteinteils übertragen wird.

Vorab soll schon darauf hingewiesen werden, dass aufgrund des indirekten Messansatzes nicht zwangsläufig von einer Enzyminhibierung gesprochen werden kann, da ein Abfangen der Superoxidradikale durch antioxidative Substanzen ebenfalls zu einer geringeren Extinktion bei 550 nm führt. In einer Studie von Cos und Mitarbeitern (1998) wurde gezeigt, dass (+)-Catechin (1) und (-)-Epicatechin (2) Superoxid-Radikalfänger ohne Inhibitionspotential der Xanthinoxidase sind.

Der zeitliche Ablauf der durch XOD katalysierten Reaktion bei Anwesenheit von 0-250 μM (+)-Catechin (1) ist in Abbildung 3.23 dargestellt.

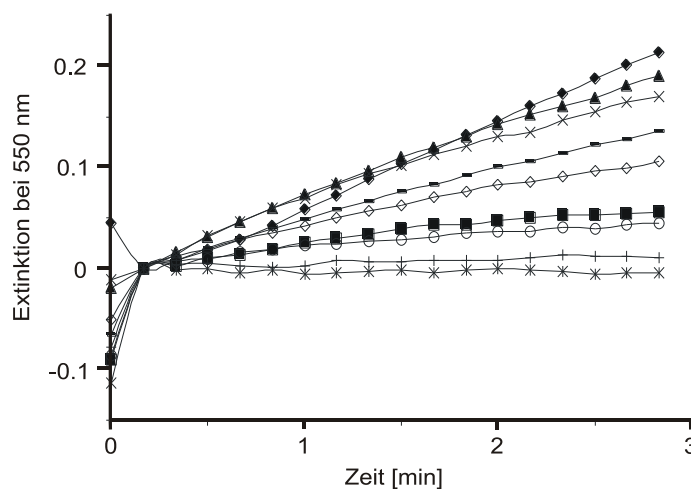


Abbildung 3.23: Zeitlicher Ablauf der XOD-katalysierten Reaktion. Die Bildung von reduziertem Cytochrom c in Gegenwart von (+)-Catechin (1) wurde untersucht (Bedingungen s. 4.2.10 System 2 und 4.3.8.2.1.). Die Konzentrationen (nicht alle untersuchten Konzentrationen gezeigt) waren 0 μM (◆), 20 μM (▲), 30 μM (x), 40 μM (-), 50 μM (◇), 80 μM (■), 100 μM (o), 150 μM (+) und 250 μM (*). Aufgetragen sind Mittelwerte ($n=3$).

Aus Abbildung 3.23 ist zu erkennen, dass die Bildung von ferro-Cytochrom c mit steigender Konzentration an (1) immer geringer wird. Während ohne (1) eine Umsatzrate von 0.075 E/min erreicht wird, sind es bei 20 μM (1) noch 0.068 E/min und bei 150 μM (1) nur noch 0.005 E/min (s. Tabelle 3.2).

Tabelle 3.4: Zeitliche Änderung der Extinktion beim Ablauf der XOD-katalysierten Reaktion mit Xanthin. Die Bildung von *ferro*-Cytochrom c in Gegenwart von (+)-Catechin (**1**) in unterschiedlichen Konzentrationen (0 – 250 μ M) wurde untersucht (Bedingungen s. 4.2.10 und 4.3.8.2.2).

μ M	0	20	30	40	50	80	100	150	250
$\Delta E/min$	0.075	0.068	0.062	0.049	0.039	0.021	0.016	0.005	0

Alle untersuchten Catechine und Catechin-C-Glykoside zeigten einen konzentrations-abhängigen Einfluss auf die XOD, wie repräsentativ an den Beispielen von (+)-Catechin (**1**) und (+)-Epicatechin-8- β -D-galactosid (**13**) in Abbildung 3.24 dargestellt ist.

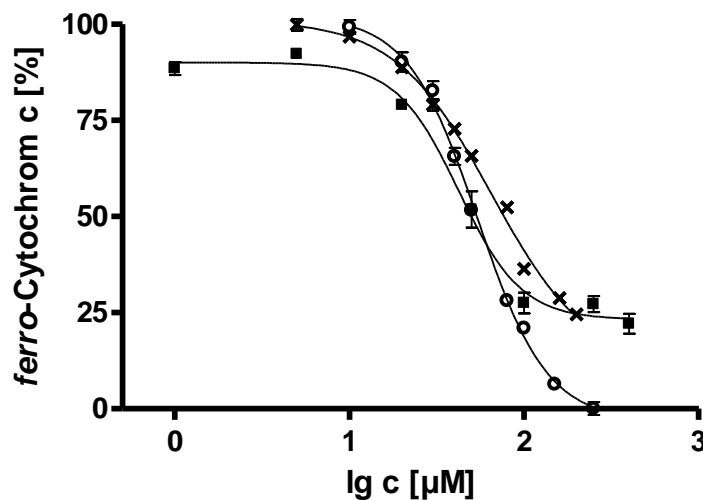


Abbildung 3.24: Dosis-Wirkungskurven des Einflusses auf Xanthinoxidase; repräsentativ: Allopurinol (**17**) (■), (+)-Catechin (**1**) (○) und (+)-EC-8- β -D-galactosid (**13**) (x). Aufgetragen sind die Mittelwerte ($n=3$) \pm SD (Bedingungen s.4.2.10 System 2 und 4.3.8.2.2).

Als Referenzsubstanz wurde in diesem Modellsystem Allopurinol (**17**) eingesetzt. Dieses bindet an die Molybdän-Untereinheit und führt so zu einem vollständigen Aktivitätsverlust (Bray, 1975; Harrison, 1997; Massey und Harris, 1997; s. 2.3.3). Die erhaltenen Einzelergebnisse sind in Tabelle 3.5 zusammengestellt.

Der Einfluss der Catechine auf die Xanthinoxidase-Aktivität nahm in folgender Reihenfolge ab: (-)-Epicatechin (**2**) > (+)-Catechin (**1**) > (-)-Catechin (**3**) > (+)-Epicatechin-8- β -D-galactosid (**13**) > (+)-Catechin-8- β -D-rhamnosid (**14**).

Tabelle 3.5: Einfluss von Catechinen und ausgewählten Catechin-C-glykoside auf die Xanthinoxidase; (Referenz: Allopurinol (**17**)) IC₅₀-Werte und die dazugehörigen 95 %-Konfidenzintervalle (Bedingungen s.4.2.10 System 2 und 4.3.8.2.2)

Substanz	IC ₅₀ [µM]	95 % - Konfidenzintervall
(-)-Epicatechin (2)	29.3	24 - 36
Allopurinol (17)	42.4	31 - 58
(+)-Catechin (1)	54.1	49 - 60
(-)-Catechin (3)	59.5	44 - 81
(+)-Epicatechin-8-β-D-galactosid (13)	64.8	48 - 88
(+)-Catechin-8-β-D-rhamnosid (14)	102.5	73 - 144

Die Resultate zeigen, dass (-)-Epicatechin (**3**) einen größeren Einfluß auf die XOD hatte als das als Referenzsubstanz eingesetzte Allopurinol (**17**). Mit IC₅₀-Werten von 29.3 µM-59.5 µM verhinderten die Aglykone (**2**, **1**, **3**) die Bildung von *ferro*-Cytochrom c effektiver als die entsprechenden Glykoside (**13**, **14**) (IC₅₀-Werte: 64.8 µM und 102.5 µM) (s. Tabelle 3.5). Als effektivstes Antioxidans erwies sich (-)-Epicatechin (**2**). Was (+)-Catechin (**1**) und (-)-Epicatechin (**2**) betrifft, stimmen diese Ergebnisse mit Literaturdaten überein (Cos *et al.*, 1998). Als Enantiomer von (+)-Catechin (**1**) wird (-)-Catechin (**3**) ebenfalls die rein antioxidative Eigenschaft unterstellt. Durch die Verwendung von Allopurinol (**17**) als Referenzsubstanz im Assay konnte sichergestellt werden, dass die Enzymaktivität zu Beginn jedes Ansatzes identisch war.

Betrachtet man die glykosidischen Verbindungen (**13**, **14**), stellt man fest, dass es keine Literaturdaten über ihren Einfluss auf die XOD gibt. Es muß also noch geklärt werden, ob diese ebenfalls ausschließlich antioxidativ wirken oder ob es hier zu einer Enzyminhibierung kommt.

Die C-Glykoside (**13**, **14**) haben einen deutlich geringeren Einfluß auf die XOD als die Aglykone (**2**, **1**, **3**). Eine mögliche Erklärung für die verminderte Enzyminhibierung der konjugierten Verbindungen lieferten Iio *et al.* (1985): Die Zuckerreste sind sehr sperrig oder zu hydrophil und verhindern dadurch den Kontakt der glykosidischen Flavanole mit dem Enzym (s. auch Docking, 3.5.2).

Um eine Erklärung für den Einfluß der Catechine und ihrer C-Glykoside zu finden, wurden Docking Studien durchgeführt, die in Kapitel 3.5 näher beschrieben sind.

3.5 Docking

Im Bereich des Molecular Modellings ist Docking eine wichtige Methode, um den Bindemodus eines Liganden an einem Protein vorauszusagen. Dies kann dazu genutzt werden, um z.B. Bindungsaffinitäten zu berechnen. Oftmals wird Docking dazu verwendet, die Bindung eines potentiellen Wirkstoffes an ein Enzym zu simulieren. Hat man ein zuverlässiges Modellsystem gefunden, können auf Grundlage dieses Modellsystems auch neue Wirkstoffe entworfen werden.

Um ein Modellsystem zu simulieren, geht man von der Kristallstruktur des Enzym-Ligandkomplexes aus, wobei dieser Ligand eine möglichst große strukturelle Ähnlichkeit mit den zu untersuchenden Molekülen haben sollte. Die Lösemittelmoleküle werden entfernt und die Struktur energieminiert. Durch Wahl der geeigneten Parameter in der Simulationssoftware werden die Bedingungen für ein erfolgreiches Redocking festgelegt. Redocking bedeutet, dass der Ligand, der in der Kristallstruktur vorhanden war und zunächst entfernt wurde, jetzt mittels Docking in der Bindetasche platziert wird. Gelingt dies, kann das Modellsystem zur Berechnung weiterer Enzym-Ligandkomplexe herangezogen werden.

Bei Docking-Studien wird von der Fähigkeit der Substanzen zur Enzyminhibierung ausgegangen. Da noch nicht eindeutig geklärt ist, ob Catechine die Enzyme inhibieren oder ob allein ihre antioxidative Wirkung für den positiven Effekt verantwortlich ist, wurden diese Studien durchgeführt. Ziel war es, strukturelle Hypothesen zu generieren, die zur Interpretation der experimentellen Ergebnisse beitragen können.

Um die Berechnungen zuverlässiger zu machen, wurde mit zwei verschiedenen Scoringfunktionen gearbeitet. Diese waren Chemscore (Eldridge *et al.*, 1997) und PLP (Piecewise Linear Potential) (Gelhaar *et al.*, 1995). Der Chemscore schätzt die Bindungsaffinität von Protein-Ligand Komplexen auf Basis von 82 Datensätzen von Protein-Ligand Komplexen ab. Hierbei werden vier Terme berücksichtigt: die Energie der Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Protein, die Energie der hydrophoben Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein, die Wechselwirkungsenergie zwischen Ligand und Metall sowie die Energie der Torsionsspannung. Bei PLP werden hauptsächlich die Energie der Wasserstoffbrücken zwischen Ligand und Protein sowie sterische Interaktionsterme zwischen Ligand und Protein berücksichtigt. Sind die Werte, die diese Scoringfunktionen liefern hoch und stimmen die Bindungsmodi der zu untersuchenden Substanzen in beiden Lösungen miteinander überein, ist die Wahrscheinlichkeit, dass der vorgeschlagene Bindemodus realistisch ist, ebenfalls hoch.

3.5.1 Lipoxygenase

In der Kristallstruktur 1JNQ (www.pdb.org; Skrzypczak-Jankun *et al.*, 2003) war der Ligand Epigallocatechin (EGC) (**18**) bereits vorhanden. Epigallocatechin (**18**) unterscheidet sich von den in 3.4.1 eingesetzten Flavan-3-olen nur durch eine zusätzliche Hydroxyl-Gruppe am B-Ring (C-4'). Nachdem (**18**) aus der Kristallstruktur entfernt wurde, konnte ein erfolgreiches Redocking von EGC (**18**) mit der LOX durchgeführt werden.

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Aglykone können keine Aussagen gemacht werden, da die Scoring Werte der beiden Funktionen und die vorgeschlagenen Bindemodi sehr unterschiedlich sind. Für die Catechin-*C*-Glykoside ist in Abbildung 3.25 die energetisch beste Dockinglösung gezeigt, die dem Bindemodus von EGC (**18**) am ähnlichsten ist. Es sind jeweils die glykosidischen Reste, die in Richtung des aktiven Zentrums zeigen. Dies wäre eine Möglichkeit, wie die Catechin-*C*-glykoside in der Bindetasche der LOX liegen könnten.

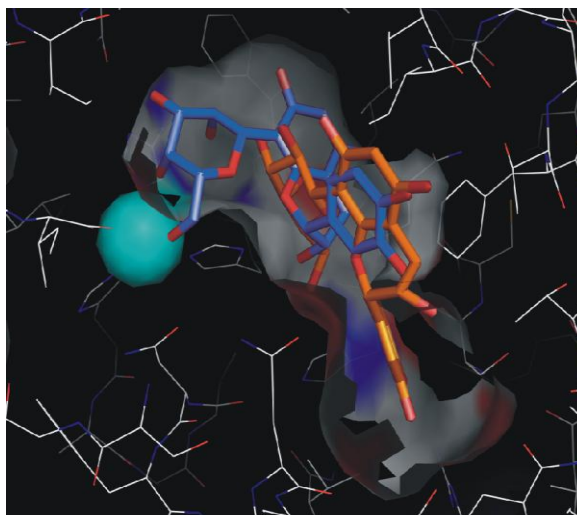


Abbildung 3.25: Mit Chemscore erhaltene Dockinglösungen für (+)-*C*-8- β -*D*-rhamnosid (**14**) (blau) und (+)-*EC*-8- β -*D*-galactosid (**13**) (orange) in der Bindetasche der LOX; Fe-Atom (türkis). Docking wurde mit der modifizierten Kristallstruktur 1JNQ (766Ser Mutante) (entspricht der LOX-1) durchgeführt.

Im LOX-System waren (+)-Catechin (**1**), (-)-Catechin (**3**) sowie das (+)-Catechin-8- β -*D*-rhamnosid (**14**) wirksamer als (-)-Epicatechin (**2**) und (+)-Epicatechin-8- β -*D*-galactosid (**13**). Hierfür könnten sterische Effekte verantwortlich sein, da die Epicatechine an C-2 und C-3 entweder *SS*- oder *RR*- konfiguriert sind, die Catechine sind *RS*- bzw. *SR*- konfiguriert und scheinen besser in die vermutliche Bindetaschen der LOX hinein zu passen. Das Docking der *C*-Glykoside mit der LOX zeigt, dass (+)-*C*-8- β -*D*-rhamnosid

(**14**) besser in der Bindetasche liegt als (+)-EC-8- β -D-galactosid (**13**) (s. Abbildung 3.25), wodurch die experimentell erzielten Ergebnisse ebenfalls gestützt werden.

3.5.2 Xanthinoxidase

In der Kristallstruktur 1V97 (www.pdb.org; Okamoto *et al.*, 2004) liegt die XOD in der gebundenen Form vor. Nach Aufarbeitung der Struktur wurde das Docking ebenfalls mit den beiden Scoringfunktionen Chemscore (Eldridge *et al.*, 1997) und PLP (Piecewise Linear Potential) (Gelhaar *et al.*, 1995) simuliert.

In Abbildung 3.26 sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Ausgewählt wurden die Dockinglösungen, die gehäuft auftraten (Clustering), tief in der Bindetasche liegen und in beiden Scoringfunktionen gute Scoringwerte erzielten.

Die Aglykone (+)-Catechin (**1**), (-)-Catechin (**3**) und (-)-Epicatechin (**2**) haben eine sehr ähnliche Position in der Bindetasche der XOD. Die beiden Glykoside unterscheiden sich im Gegensatz dazu deutlich, das (+)-EC-8- β -D-galactosid (**13**) liegt näher am Mo-S-Komplex, und somit besser in der Bindetasche als das (+)-C-8- β -D-rhamnosid (**14**), beide liegen aber weiter entfernt vom Mo-S-Komplex als die Aglykone.

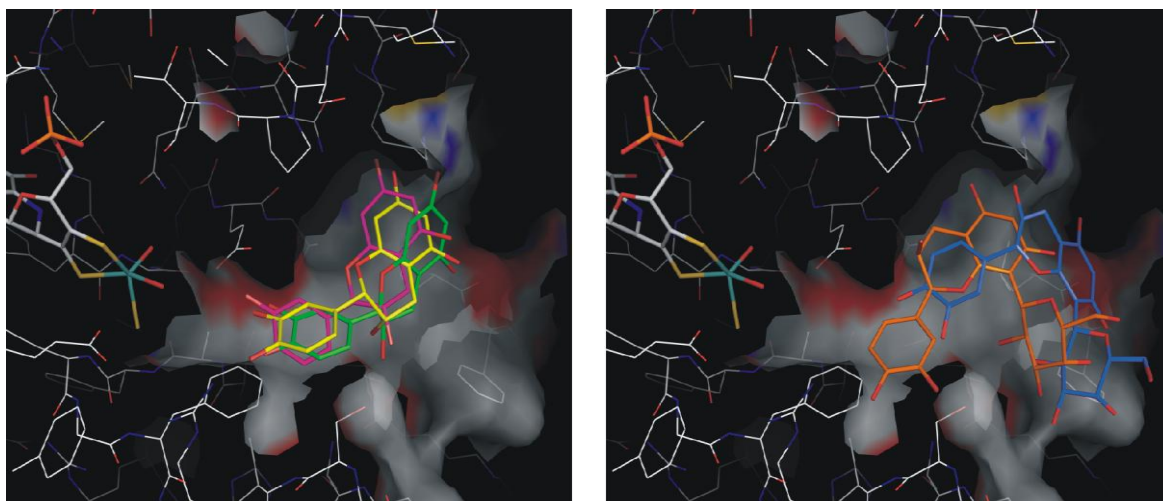


Abbildung 3.26: Links: Mit Chemscore erhaltene Dockinglösungen für (+)-Catechin (**1**) (rosa), (-)-Catechin (**3**) (grün) und (-)-Epicatechin (**2**) (gelb) in der Bindetaschen der XOD; Rechts: Mit Chemscore erhaltene Dockinglösungen für (+)-C-8- β -D-rhamnosid (**14**) (blau) und (+)-EC-8- β -D-galactosid (**13**) (orange); jeweils am linken Bildrand ist der Mo-S-Komplex (türkis-gelb) zu sehen. Die Dockingergebnisse beruhen auf der Kristallstruktur 1V97 (www.pdb.org; Okamoto *et al.*, 2004).

Die Flavanol-C-glykoside haben einen deutlich geringeren Effekt auf das XOD-Cytochrom c-System als die Aglykone, dies wird besonders deutlich bei (+)-Catechin-8- β -D-rhamnosid (**14**) und (+)-Catechin (**1**) mit IC_{50} -Werten von 102.5 μ M und 54.14 μ M (s. Tabelle 3.5). Die sperrigen Zuckerreste verhindern, dass die Substanzen weit genug in die Bindetasche der Xanthinoxidase eindringen können. Hierdurch wird die Interaktion mit dem aktiven Zentrum des Enzyms erschwert, woraus die schwächere Enzymhemmung resultieren könnte. Diese Ergebnisse entsprechen der Literatur (Iio *et al.*, 1985). Die durchgeführte Docking Studie bestätigt dies ebenfalls. In Abbildung 3.26 ist die Bindetasche der XOD mit den Flavan-3-olen (**1**, **2**, **3**) (links) und den C-glykosiden (**13**, **14**) (rechts) zu sehen. Während die Aglykone (**1**, **2**, **3**) gut in der Bindetasche liegen, ist bei den C-Glykosiden (**13**, **14**) deutlich zu erkennen, dass vor allem das Catechin-Rhamnosid (**14**) aufgrund des sperrigen Zuckerrestes nicht weit in die Bindetasche eindringen kann. Verbindung (**14**) war im experimentellen Versuch mit einem IC_{50} -Wert von 102.5 μ M der schwächste Inhibitor. Die in Kapitel 3.4.2.2 erhaltenen Ergebnisse werden somit durch die Ergebnisse des Dockings unterstützt.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität bezogen.

(+)-Catechin stammt von Roth (Karlsruhe, (-)-Catechin und (-)-Epicatechin von Sigma-Aldrich (Steinheim), (+/-)-Epicatechin von Sequoia Research Products Ltd. (Pangbourne, UK) und γ -HP-CD von Fluka, (Steinheim).

Procyanidin B1, B2, B3 und B4 wurden im Rahmen einer früheren Dissertation im Arbeitskreis aus Tamarindenextrakt extrahiert (Hümmer, 2009) und mir freundlicherweise von Dr. Wolfgang Hümmer zur Verfügung gestellt.

N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) wurde von Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

(+)-Epicatechin-8- β -D-galactosid und (+)-Catechin-8- β -D-rhamnosid wurden im Rahmen einer Diplomarbeit im Arbeitskreis synthetisiert und gereinigt (Hasslauer *et al.*, 2010).

LOX-1 Typ V (Soja) (701000 U/mg Protein; 3.6 mg/mL Protein), Ölsäure 99 %, Linolsäure 95 %, Arachidonsäure (Schwein), DCF, H₂DCFDA und NDGA wurden über Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen, ebenso Xanthinoxidase (Grade III, Buttermilch), Xanthin (99-100 %), Cytochrom c (Rinderherz) und Allopurinol.

Alle hier nicht erwähnten Chemikalien wurden über die Chemikalienausgabe der Universität Würzburg bezogen.

Lösungsmittel wurden vor der Verwendung über Füllkörperkolonnen rektifiziert. Reinstwasser kam aus der Institutseigenen MilliporeTM-Anlage (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Für HPLC-DAD- und HPLC-MS(MS)-Analysen wurden ‚gradient grade‘-Lösungsmittel von Acros Organics (Geel, Belgien) und Merck (LiChrosolv[®], Darmstadt) verwendet. Reinstgase lieferten die Firmen Linde (Berlin) und Messer Griesheim (Frankfurt).

4.1.2 Verbrauchsmaterial

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

Die 96-well Platten schwarz, flat bottom wurden von BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA) und 96-well Platten klar, flat bottom von Sarstedt (Nümbrecht) erworben.

4.2 Geräte

4.2.1 Hochleistungsflüssigchromatographie-Diodenarray-Detektion (HPLC-DAD)

HPLC System 1

Gerät:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series (Waldbronn)
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Waldbronn)
Autosampler:	Waters Wisp 712b (Eschborn) mit automatischer Injektion
Trennsäule:	Waters Symmetry TM C18 (5 µm Partikelgröße, 150 x 3.9 mm I.D.) (Milford, USA)
Fließmittel:	A: 0.1 % Ameisensäure in Reinstwasser B: Acetonitril
Fluß:	1 mL/min
Gradient:	Linear, 10-99 % B in 40 min
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray (DAD), 1100 Series (Waldbronn)
Spektralbereich:	200 – 600 nm

Datenaufnahme sowie -auswertung erfolgten mittels Hewlett Packard ChemStation[®] (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA).

HPLC System 2

Gerät:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series (Waldbronn)
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Waldbronn)
Autosampler:	Waters Wisp 712b (Eschborn) mit automatischer Injektion
Trennsäule:	Waters Symmetry TM C18 (5 µm Partikelgröße, 150 x 3.9 mm I.D.) (Milford, USA)
Fließmittel:	A: 0.1 % Ameisensäure in Reinstwasser B: Acetonitril
Fluß:	1 mL/min
Gradient:	Linear, 10-30 % B in 25 min
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray (DAD), 1100 Series (Waldbronn)
Spektralbereich:	200 – 600 nm

Datenaufnahme sowie -auswertung erfolgten mittels Hewlett Packard ChemStation[®] (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA).

HPLC System 2*

Gerät:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series (Waldbronn)
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Waldbronn)
Autosampler:	Waters Wisp 712b (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, 10-30 % B in 25 min
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray (DAD), 1100 Series (Waldbronn)
Spektralbereich:	200 – 600 nm

Datenaufnahme sowie -auswertung erfolgten mittels Hewlett Packard ChemStation[®] (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA).

HPLC System 3

Gerät:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series (Waldbronn)
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Waldbronn)
Autosampler:	Waters Wisp 712b (Eschborn) mit automatischer Injektion
Trennsäule:	Knauer Hypersil [™] ODS C18 (5 µm Partikelgröße, 150 x 4.6 mm I.D.) (Berlin)
Fließmittel:	A: 0.1 % Ameisensäure in Reinstwasser B: Acetonitril
Fluß:	1 mL/min
Gradient:	Linear, 10-99 % B in 40 min
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray (DAD), 1100 Series (Waldbronn)
Spektralbereich:	200 – 600 nm

Datenaufnahme sowie -auswertung erfolgten mittels Hewlett Packard ChemStation[®] (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA).

HPLC System 4

Gerät:	Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series (Waldbronn)
Pumpe:	Hewlett Packard Hochdruckpumpe für binäre Hochdruckgradienten, 1100 Series (Waldbronn)
Autosampler:	Waters Wisp 712b (Eschborn) mit automatischer Injektion
Injektionsvolumen:	30 µL
Trennsäule:	Nucleodex β-PM (5 µm Partikelgröße, 200 x 4 mm I.D.) (Macherey Nagel, Düren)
Fließmittel:	35% Methanol, 65 % 0.1 % HCOOH in Wasser
Fluß:	0.5 mL/min
Gradient:	isokratisch, 30 min

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

Spektralbereich: 200 – 600 nm

Datenaufnahme sowie -auswertung erfolgten mittels Hewlett Packard ChemStation[®] (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA).

4.2.2 Präparative Hochleistungsflüssigchromatographie

Präp-HPLC System 1

Gerät: Knauer Niederdruckgradientensystem (Berlin)

Pumpe: Knauer Well Chrom K1001 (Berlin)

Injektor: Rheodyne Six-Port Injektionsventil mit 1 mL Probenschleife

Injektionsvolumen: 1 mL

Trennsäule: Waters XBridge™ Prep C18 OBD™ (5 µm Partikelgröße, 19 x 150 mm I.D.) (Milford, USA)

Fließmittel: A: 0.1 % Ameisensäure in Reinstwasser
B: Acetonitril

Fluß: 10 mL/min

Gradient: Linear, 10-99 % B in 50 min

Detektor: Knauer Variable Wavelength Detektor (Berlin), 280 nm

4.2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS)

HPLC-System 2 mit Split

Gerät: Photodiodenarray Hewlett Packard 1100 Series (Waldbronn)

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

Autosampler: Waters Wisp 712b (Eschborn) mit automatischer Injektion
Injektionsvolumen: 50 µl

Trennsäule:	Waters Symmetry TM C18 (5 µm Partikelgröße, 150 x 3,9 mm I.D.) (Milford, USA) mit Split
Fließmittel:	A: 0.1 % Ameisensäure in Reinstwasser B: Acetonitril
Fluß:	1 mL/min
Gradient:	Linear, 10-99 % B in 40 min
Detektor:	Hewlett Packard Photodiodenarray (DAD), 1100 Series (Waldbronn)
Spektralbereich:	200 – 600 nm

Datenaufnahme sowie -auswertung erfolgten mittels Hewlett Packard ChemStation[®] (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA).

Massenspektrometer 1

Gerät:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Electrospray Ionisations-Interface (ESI)
ESI-Kapillare:	Desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm I.D.) (J&W Scientific, Folsom, CA, USA)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Eingangskapillare:	250 °C
Kapillarspannung:	3.2 kV
Sheathgas:	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0 (10 L/min)
Messbereich:	<i>m/z</i> 150-1000 (Full Scan Modus)
Multiplierspannung:	1350 V
Modus:	negativ
Fluß	0.2 mL/min

Die Datenaufnahme erfolgte mit ICIS 8.1 Data System (Finnigan MAT, Bremen) auf DECstation 5000/33 (Digital Equipment, Unterföhring). Die Datenauswertung erfolgte mit XcaliburTM Software Version 1.2 (FinniganTM Corp., San Jose, CA, USA) nach Konvertierung.

4.2.4 Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

HPLC-System 2 mit Split

Massenspektrometer 2

Gerät:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Electrospray Ionisations-Interface (ESI)
ESI-Kapillare:	Desaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm I.D.) (J&W Scientific, Folsom, CA, USA)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Eingangskapillare:	250 °C
Kapillarspannung:	3.2 kV
Sheathgas:	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0 (10 L/min)
Messbereich:	<i>m/z</i> 150-1000 (Full Scan Modus)
Modus:	negativ
Fluß	0.2 mL/min
Kollisionsgas:	Argon 5.0, Kollisionsgasdruck 0.27 Pa (2.0 mTorr)
Kollisionsenergie:	20 eV
Multiplierspannung:	1350 V für ESI-MS, 1650 V für ESI-MS/MS

Die Datenaufnahme erfolgte mit ICIS 8.1 Data System (Finnigan MAT, Bremen) auf DECstation 5000/33 (Digital Equipment, Unterföhring). Die Datenauswertung erfolgte mit Xcalibur™ Software Version 1.2 (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA) nach Konvertierung.

4.2.5 Kapillargaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS)

HRGC-MS System 1

HRGC 1

Gerät:	Agilent 6890 GC System (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)
Injektor:	Split/Splitless Injektor (Split 1:20), Temperatur 250 °C

Autosampler:	Agilent 7683 Series Injektor
Trennsäule:	J&W DB-5MS (30 m x 0.25 mm, Filmdicke = 0.25 µm)
Trägergas:	2.0 mL/min Helium 5.0, constant flow
Temperaturprogramm	60 °C, 5 °C/min, 320 °C, 5 min isotherm
Kopplung:	direkte GC-MS Kopplung; Transferline 300 °C
Transferkapillare:	unbelegt und deaktiviert, Filmdicke = 0.25 µm 0.32 mm ID

MS 2

Gerät:	Agilent 5973 Mass Selective Detector MSD (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)
Ionisation:	Elektronenstoßionisation (EI), 70 eV
Temperatur:	Ionenquelle 220°C, Transferline 300°C
Quellendruck:	1*10 ⁻⁵ bar
Multipliiert:	1800 V
Massenbereich:	50-800 u

Die Datenaufnahme erfolgte mittels Hewlett Packard ChemStation[®] (Hewlett Packard, Santa Clara, CA, USA), nach Konvertierung mit File Converter (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA) erfolgte die Datenauswertung mittels Xcalibur[™] Version 1.2 (Finnigan Corp., San Jose, CA, USA).

4.2.6 CD-Spektroskopie

Gerät:	J600 Spectro Polarimeter (Jasco, Hachioij, Japan)
Lösungsmittel:	Methanol

4.2.7 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

NMR-System 1

Gerät:	Bruker Avance 600 MHz Spektrometer (Rheinstetten)
Lösungsmittel:	Methanol- <i>d</i> ₄ (MeOH- <i>d</i> ₄ , 99.8 % D)

Die Datenaufnahme erfolgte mit Bruker 1D WINNMR Software (Rheinstetten). Die Auswertung erfolgte mittels ACD/Labs NMR Software.

4.2.8 Kapillarelektrophorese

CE-System 1

Gerät:	Beckmann P/ACE MDQ (Beckmann Instruments, Fullerton, CA, USA)
Kapillare:	Fused-Silica Kapillare (375 µm A.D. x 75 µm I.D.) (J&W Scientific, Folsom, CA, USA))
Detektor:	UV-Detektor 280 nm

Datenaufnahme und -auswertung erfolgten mittels Beckmann 32 Karat Software Version 7.0.

4.2.9 Photometer

System 1 (LOX)

Gerät:	Varian Cary® 50 UV/VIS Photometer (Varian, Darmstadt)
Wellenlänge:	234 nm
Temperatur:	RT
Küvetten:	3 ml Quarzglasküvetten (Hellma, Müllheim, Deutschland)

System 2 (XOD)

Gerät:	Varian Cary® 50 UV/VIS Photometer (Varian, Darmstadt)
Wellenlänge:	290 nm
Temperatur:	RT
Küvetten:	3 ml Quarzglasküvetten (Hellma, Müllheim, Deutschland)

4.2.10 Plattenlesegerät

System 1

Gerät:	Fluostar Galaxy (BMG Labtech, Offenburg)
Modus:	Fluoreszenz

Anregungswellenlänge:	485 nm
Emissionswellenlänge:	520 nm
Verstärkung (Gain):	28
Anzahl der Lichtblitze:	20
Länge eines Messzyklus:	30 –180 s
Positionsverzögerung:	0.2 s
Temperatur:	RT
Lochplatte:	96 Löcher, schwarz

System 2

Gerät:	Fluostar Galaxy (BMG Labtech, Offenburg)
Modus:	Extinktion (Absorbance)
Extinktionswellenlänge:	550 nm
Anzahl der Lichtblitze:	20
Länge eines Messzyklus:	10 s
Positionsverzögerung:	0.5 s
Temperatur:	RT
Lochplatte:	96 Löcher, klar

4.2.11 Sonstige Geräte

Lyophilisator:	Christ Alpha1-4; 0.063 mbar (Christ, Osterode)
Magnetrührer:	IKAMAG® RH (IKA Labortechnik, Staufen)
pH-Meter:	pH 526 (Hartenstein, Würzburg)
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)
Waagen:	Mettler PL 300 Analysenwaage (Mettler-Toledo, Gießen); Mettler AT 21 Comparator (Mettler-Toledo, Gießen)
Wasserbad:	Heidolph Instruments (Schwabach)

4.3 Methoden

4.3.1 Vorbereitung

4.3.1.1 Dünnschicht-Chromatographie (DC)

Stationäre Phase:	Kieselgel, Polygram SIL G/UV ₂₅₄ (Macherey Nagel, Düren)
Fließmittel:	Aceton/ Toluol/ Ameisensäure (4:3:1 (v/v/v))
Anfärbereagenz:	Molybdänblau
Detektion:	254 nm
Trocknung:	20 min bei 80°C

Molybdänblau

20 g Ammoniummolybdat ((NH₄)₂MoO₄)
0.4 g Cer (IV)-sulfat (Ce(SO₄)₂ x 4 H₂O)
400 ml 10 % H₂SO₄ in Wasser

Catechin: R_f = 0.78

Procyanidine: R_f = 0.54

4.3.2 Stabilität von (+)-Catechin bei verschiedenen pH

Für die Stabilitätsversuche von (+)-Catechin wurden unterschiedliche Puffer mit verschiedenen pH-Werten hergestellt.

4.3.2.1 Herstellung der Inkubationspuffer

4.3.2.1.1 Formiat-Puffer (0.1 M, pH 2.5, 3.5, 4.5)

0.1 M HCOOH-Lösung (380 µL konz. HCOOH) in 100 mL Millipore-Wasser.

0.1 M NH₄HCOO⁻ -Lösung (1000 µL 10 M NH₄HCOO⁻ auf 100 mL mit Millipore-Wasser auffüllen.)

Aus beiden Lösungen wurden durch Mischen unterschiedlicher Volumina die drei Formiat-Puffer unterschiedlicher pH-Werte hergestellt.

4.3.2.1.2 Phosphat-Puffer (0.1 M, pH 6.4, 7.4, 8.4)

1.7418 g K_2HPO_4 in 100 mL Millipore-Wasser lösen.

1.361 g KH_2O_4 in 100 mL Millipore-Wasser lösen.

Aus beiden Lösungen wurden durch Mischen unterschiedlicher Volumina die drei Phosphat-Puffer unterschiedlicher pH-Werte hergestellt.

4.3.2.1.3 Physiologischer Hepes-Puffer (0.1 M, pH 6.4, 7.4, 8.4)

2.384 g HEPES /100 mL

0.596 g NaCl /100 mL

Es wurde mit 1 M NaOH der jeweilige pH-Wert eingestellt.

4.3.2.1.4 Carbonat-Puffer (0.1 M, pH 9.5, 10.5, 11.5)

1.06 g Na_2CO_3 in 100 mL Millipore-Wasser lösen.

0.84 g $NaHCO_3$ in 100 mL Millipore-Wasser lösen.

Aus beiden Lösungen wurden durch Mischen unterschiedlicher Volumina die drei Carbonat-Puffer unterschiedlicher pH-Werte hergestellt.

4.3.2.2 Durchführung der Inkubationsversuche

Aus dem jeweiligen Puffer und (+)-Catechin wurden je drei Konzentrationen hergestellt (0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL und 1.0 mg/mL). Es wurden umgehend Proben entnommen, membranfiltriert, mit Standard versetzt (2:1) und mit dem HPLC System 2 vermessen. Nach drei Proben einer Konzentration wurde die Säule 10 min mit 100 % Acetonitril gespült und anschließend mit Fließmittel equilibriert, bevor weitere Proben vermessen wurden.

An Tag 1, 2, 4, 6 und 10 wurden die Proben erneut vermessen. Der gesamte Versuchsansatz wurde jeweils einmal wiederholt.

4.3.2.3 Standard

Als Standard wurde 3,4,5-*trans*-Trimethoxyzimtsäure (0.05 mg/mL) zur jeweiligen Probe im Verhältnis 1:2 (v/v) hinzugegeben. Die Peakfläche der Probe wurde durch die Peakfläche des Standards des jeweiligen Laufes geteilt. Die Mittelwerte der einzelnen Ansätze wurden jeweils in einem Diagramm aufgetragen.

4.3.3 Einfluß der Temperatur auf den Abbau von Catechin und die Bildung von BC und Epicatechin

Hierfür wurde (+)-Catechin in Kalium-Phosphat-Puffer pH 7.4 ($c = 1.0 \text{ mg/mL}$) bei 30 °C, 50 °C, 60 °C und 70 °C für 8h inkubiert. Nach 0, 1, 2, 4, 6 und 8 h wurde jeweils eine Probe entnommen, membranfiltriert, mit Standard versetzt (2:1) und mit dem HPLC System 1 vermessen ($n=1$, Fehler= 10%, da vergleichbare Messungen durchschnittliche Fehler von 10 % zeigten.)

4.3.3.1 Probenaufarbeitung und Analytik

Die Aufarbeitung der Inkubationsansätze erfolgte analog 4.3.2.2.

4.3.4 Aufarbeitung von (+)-Catechin und (-)-Epicatechin für die GC-MS

(+)-Catechin, (-)-Epicatechin und Procyanidin B2 wurden jeweils in Kalium-Phosphat-Puffer pH 7.4 (s. 3.2.2) gelöst ($c = 1.0 \text{ mg/mL}$), innerhalb weniger Stunden silyliert und mittels GC-MS vermessen. Ebenso wurde ein Inkubationsabsatz (8d) von (+)-Catechin in Phosphat-Puffer pH 7.4 untersucht.

150 μL des jeweiligen Catechin-Ansatzes wurden mit Stickstoff bis zur Trockne eingengt, 150 μL Silylierungsreagenz BSA dazugegeben, danach wurde der Ansatz 30 min auf 55 °C erhitzt. Der Rückstand wurde in 600 μL Toluol aufgenommen und 10 min bei

12 000 x g/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem HRGC-MS System 1 vermessen.

4.3.5 Isolierung von Dehydrodicatechin mittels präparativer HPLC

(+)-Catechin wurde in Kalium-Phosphat Puffer pH 7.4 gelöst ($c = 1.0 \text{ mg/mL}$) und 8 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Aus diesem Reaktionsansatz wurde Dehydrodicatechin mittels präparativer HPLC (s. 4.2.2; Präp-HPLC-System 1) fraktioniert. Die gesammelten Fraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel (Acetonitril) schonend im Vakuum bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Rotavapor) entfernt. Der wässrige Rückstand wurde tiefgefroren und anschließend gefriergetrocknet. Dehydrodicatechin wurde als schwach gelbes Pulver mit einer Reinheit von 80 % erhalten. Die spektroskopischen Daten stimmen mit denen der Literatur überein (Sun *et al.*, 2003).

λ_{max} : 280 nm

HPLC-ESI-MS $[\text{M-H}]^-$: m/z 577.1

HPLC-ESI-MS/MS $[\text{M-H}]^-$ (20 eV): m/z (%) 577,1 (100); 439,0 (30); 425.4 (12); 393.3 (22); 289.1 (16); 269.2 (16)

NMR-Daten: siehe Abschnitt 3.2.7.

4.3.6 CD-Spektren der Flavan-3-ole

Abbildung 4.1 zeigt die CD-Spektren von Procyanidin B3 und der isolierten Substanz BC, gemessen mit einem Jasco J600 Spektropolarimeter (Hachioji, Japan).

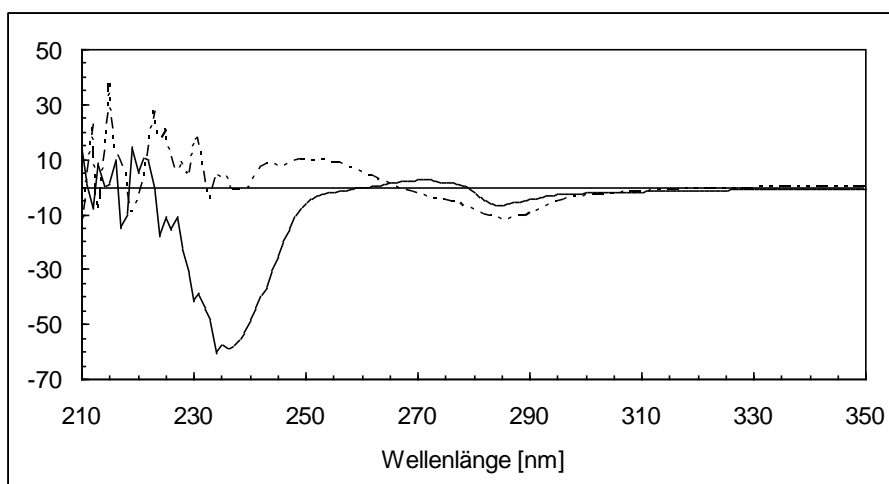


Abbildung 4.1: CD-Spektren von Procyanidin B3 (—) und BC (----).

4.3.7 Kapillarelektrophorese

4.3.7.1 Hintergrundelektrolyt

Zur Herstellung der Trennpuffers wurden entsprechende Mengen Borsäure und Natriumtetraborat in bidestilliertem Wasser gelöst, mit Natronlauge oder Salzsäure auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und direkt vor dem Gebrauch membranfiltriert (Wätzig, 1998).

4.3.7.2 Optimierte Trennparameter für die Enantiomerentrennung der monomeren Flavan-3-ole

Die Methode von Kofink *et al.* (2007) wurde modifiziert.

Puffer:	150 mM Borat, pH 8.5
Chiraler Selektor:	12 mMol γ -HP-CD
Effektive Kapillarlänge:	50 cm
Kapillartemperatur:	20 °C
Spannung:	+18 kV
Polung:	kathodischer Modus
Injektion:	hydrodynamisch (0.3 p.s.i.), 3 s

4.3.7.3 Konditionierung und Spülschritte

Bevor die erste Probe des Tages gemessen werden konnte, wurde die Kapillare mit Natronlauge (0.25 M für 20 min bei 40 p.s.i.) gespült. Dadurch werden eventuelle Probenbestandteile aus vorangegangenen Messungen, die eventuell an der Kapillarwand absorbiert sind, abgelöst. Danach wurde mit bidestilliertem Wasser (10 min bei 40 p.s.i.) neutral gespült. Vor jeder Messung wurde die Kapillare mit Natronlauge (0.25 M für 3 min bei 20 p.s.i.) und mit bidestilliertem Wasser (2 min bei 20 p.s.i.) gespült. Die Konditionierung der Kapillare mit dem jeweiligen Trennpuffer (5 min, 50 p.s.i.) erfolgte im Anschluß. Danach wurde die Probe mittels hydrodynamischer Injektion in die Kapillare aufgegeben.

4.3.8 Einfluß der Flavan-3-ole und ausgewählter C-Glykoside auf Enzym-systeme

4.3.8.1 Lipoxygenase (LOX)

4.3.8.1.1 (Direkter) Soja LOX-1 Assay

Während des Versuchs wurde die Bildung des *cis*, *trans*-Hydroperoxidderivats der Linolsäure photometrisch bei 234 nm (Produkt, $\epsilon = 25 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) (Photometer s. 4.2.11) und Raumtemperatur über 6 min verfolgt. Der Versuch wurde bei pH 9 in sauerstoff-gesättigtem 0.1 M Kalium-Phosphatpuffer (s. 3.4.1.1) durchgeführt.

Die Standardreaktionsmischung (Endvolumen: 2 mL) enthielt 250 U des Enzyms, 0 – 12 μM Inhibitor (in EtOH), Die Reaktion wurde durch Substratzugabe (90 μM) gestartet. Die Kontrollen (Enzymaktivität) enthielten gleiche Volumina EtOH ohne Inhibitor. Der Lösemittel-Gehalt war insgesamt nicht höher als 1 % EtOH pro Küvette. Die Umsetzungsrate (v) wurde von den Kurven (nicht gezeigt) durch Extrapolation der Anfangsgeschwindigkeit über 90 s erhalten. Die Restaktivität wurde durch Vergleich der Umsetzungsraten (v) der Versuche mit und ohne Inhibitorzusatz berechnet. Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung der LOX-Standardreaktionsmischung ((Direkter) Soja LOX-1 Assay)

Substanz	Konzentration der Stammlösung	V [μL] der Stammlösung pro Küvette	Konzentration in der Küvette
Phosphat-Puffer pH 9	100 mM	1970	
Soja LOX-1 [Puffer]	25 kU/ mL	10	250 U
Linolsäure [EtOH]	18 mM	10	90 μM
Inhibitor [EtOH]	0 - 2.4 mM	10	0 – 12 μM

4.3.8.1.2 *H₂DCFDA-Assay*

Während des Versuchs wurde die Bildung des Dichlorofluoresceins (DCF) fluorimetrisch bei 520 nm und Raumtemperatur über 40 min verfolgt (s. 4.2.10, System 1). Der Versuch wurde bei pH 9 in sauerstoff-gesättigtem 0.1 M Kalium-Phosphatpuffer durchgeführt.

Die Standardreaktionsmischung (Endvolumen: 200 µL) enthielt 80 µM Arachidonsäure (AA), 80 µM Dihydrodichlorofluorescein-Diacetat (H_2DCFDA) und 0 – 10 µM Inhibitor (in DMSO). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µL des Enzym (25 U) gestartet. Die Kontrollen (Enzymaktivität) enthielten gleiche Volumina DMSO ohne Inhibitor. Der Lösemittel-Gehalt war insgesamt nicht höher als 1.5 % pro Loch. Die Umsetzungsrate (v) wurde von den gemessenen Kurven durch Vergleich der FU Units nach einer definierten Zeit bestimmt. Die Enzymaktivität wurde durch Vergleich der Umsetzungsrate (v) der Versuche mit und ohne Inhibitorzusatz berechnet. Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt.

Tabelle 4.2: Zusammensetzung der LOX-Standardreaktionsmischung (H₂DCFDA-Assay)

Substanz	Konzentration der Stammlösung	V [μ L] der Stammlösung pro Küvette	Konzentration in der Küvette
Phosphat-Puffer pH 9	100 mM	97	
Soja LOX-1 [Puffer]	250 U/ mL	100	25 U
Arachidonsäure [EtOH]	16 mM	1	80 μ M
H ₂ DCFDA [DMSO]	16 mM	1	80 μ M
Inhibitor [DMSO]	0 – 2 mM	1	0 – 10 μ M

4.3.8.1.3 Auswertung

Dosis-Wirkungskurven wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 4 errechnet. Die 95 % -Konfidenzintervalle der IC₅₀-Werte wurden angegeben.

4.3.8.2 Xanthinoxidase (aus Buttermilch)

4.3.8.2.1 (Direkter) Harnsäure-Assay

Während des Versuchs wurde die Bildung der Harnsäure photometrisch bei 290 nm und Raumtemperatur über 10 min verfolgt (s. 4.2.10, System 2). Der Versuch wurde bei pH 7.5 in sauerstoff-gesättigtem 0.05 M Kalium-Phosphatpuffer durchgeführt.

Die Standardreaktionsmischung (Endvolumen: 3 mL) enthielt 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7.5) und 50 μ M Xanthin. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 32 mU XOD gestartet. Die Umsetzungsrate (v) wurde von den Kurven (Abbildung 3.21) durch Extrapolation der Anfangsgeschwindigkeit über 90 s erhalten.

4.3.8.2.2 Cytochrom c-Assay

Während des Versuchs wurde die Bildung des Cytochrom c (Fe^{2+}) photometrisch bei 550 nm und Raumtemperatur über 3 min verfolgt (s. 4.2.10, System 2). Der Versuch wurde bei pH 7.4 in sauerstoff-gesättigtem 0.1 M Kalium-Phosphatpuffer durchgeführt.

Die Standardreaktionsmischung (Endvolumen: 200 μL) enthielt 170 μM Xanthin, 170 μM Cytochrom c (Fe^{3+}) und 0 – 300 μM Inhibitor, Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μL des Enzym (6 mU) gestartet. Die Kontrollen (Enzymaktivität) enthielten gleiche Volumina DMSO ohne Inhibitor. Der Lösemittel-Gehalt war insgesamt nicht höher als 0.5 % pro Loch. Die Umsetzungsrate (v) wurde von den Kurven (Abbildung 3.23) durch Vergleich der Extinktionswerte bei 2.5 min erhalten. Dabei Extinktion der Kurve ohne Inhibitor 100 % gesetzt, durch Dreisatzrechnung konnten aus den ermittelten Werten der Kurven mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen deren prozentuale *ferro*-Cytochrom c Bildung berechnet werden. Die Enzymaktivität wurde durch Vergleich der Umsetzungsraten (v) der Versuche mit und ohne Inhibitorzusatz berechnet. Alle Versuche wurden dreimal durchgeführt.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung der XOD-Standardreaktionsmischung (Cytochrom c-Assay)

Substanz	Konzentration der Stammlösung	V [μL] der Stammlösung pro Küvette	Konzentration in der Küvette
Phosphat-Puffer pH 7.4	100 mM	97	
XOD [Puffer]	60 mU/ mL	100	6 mU
Xanthin [0.1 M NaOH]	3.4 mM	1	170 μM
Cytochrom c [Puffer]	3.4 mM	1	170 μM
Inhibitor [DMSO]	0 – 60 mM	1	0 – 300 μM

4.3.9 Docking

Die verwendeten Kristallstrukturen wurden von der RCSB Proteindatenbank (www.pdb.org) erhalten. Die Aufbereitung der Kristallstrukturen erfolgte mittels MOE (Chemical Computing Group, Montreal, Kanada; www.chemgroup.com). Das Docking sowie die Visualisierung erfolgten mit GOLD Suite (CCDC, Cambridge, UK) (Jones *et al.*, 1997). Die Grafiken wurden mittels PyMOL (www.pymol.org) generiert.

Es wurden die Scoringfunktionen Chemscore (Eldridge *et al.*, 1997) und PLP (Piecewise Linear Potential) (Gelhaar *et al.*, 1995) verwendet. Insgesamt gilt, je höher die erhaltenen Zahlenwerte sind, desto besser ist die Bewertung.

4.3.9.1 Docking mit Lipoxygenase (1JNQ)

In der Kristallstruktur der Soja LOX-3 (Protein Data Bank ID 1JNQ; Skrzypczak-Jankun *et al.*, 2003) wurde Asp766 zu Ser766 modifiziert, um der Soja LOX-1 zu entsprechen.

Das Docking der Liganden NDGA, (+)-C, (-)-C, (-)-EC, (+)-Catechin-8- β -D-rhamnosid und (+)-Epicatechin-8- β -D-galactosid erfolgte unter Verwendung der Scoringfunktionen Chemscore bzw. PLP. Zur Überprüfung der generierten Bindemodi wurde ein Redocking von EGC mit Chemscore und PLP durchgeführt. Das strukturell beste Ergebnis (dem Bindemodus der Referenzstruktur am ehesten entsprechend) für EGC lieferte PLP (Rang 38). Je Ligand wurden 40 Docking-Runs durchgeführt. Die Ergebnisse der Runs wurden nach Scoring-Werten sortiert. Die Ergebnisse mit den besten Werten und ähnlichem Bindemodus wie EGC wurden als am realistischsten betrachtet.

Ausgewähltes Atom (zur Definition der Bindetasche): Fe

Radius: 15 Å

100% GA (Genetic Algorithm Parameter Settings, von GOLD automatisch festgelegte Anzahl an Parametereinstellungen, die die Länge eines GOLD Runs bestimmen, s. GOLD Manual.)

Flexible Aminosäuren: Ser766.

4.3.9.2 Docking mit Xanthinoxidase (1V97)

Das Docking der Liganden Allopurinol, (+)-C, (-)-C, (-)-EC, (+)-Catechin-8- β -D-rhamnosid und (+)-Epicatechin-8- β -D-galactosid erfolgte unter Verwendung der Scoringfunktionen Chemscore bzw. PLP. Je Ligand wurden 40 Docking-Runs durchgeführt. Die Ergebnisse

der Runs wurden ebenfalls nach Scoring-Werten sortiert. Ausgewählt wurden die Dockinglösungen, die gehäuft auftraten (Clustering), tief in der Bindetasche liegen und in beiden Scoringfunktionen gute Scoringwerte erzielten.

Ausgewählte Aminosäure (zur Definition der Bindetasche): Pro1076

Radius: 15 Å

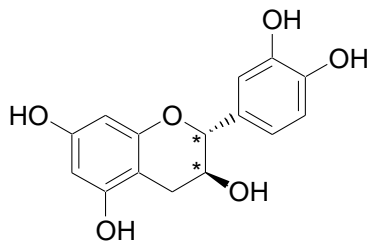
50% GA (Genetic Algorithm Parameter Settings, von GOLD automatisch festgelegte Anzahl an Parametereinstellungen, die die Länge eines GOLD Runs bestimmen, s. GOLD Manual.)

Flexible Aminosäuren: Leu648, Phe649, Gln767, Glu802, Arg880, Phe914, Phe1009, Thr1010, Val1011, Glu1261.

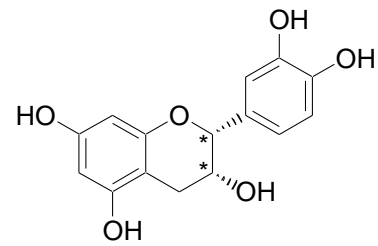
5 Strukturmatrix

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

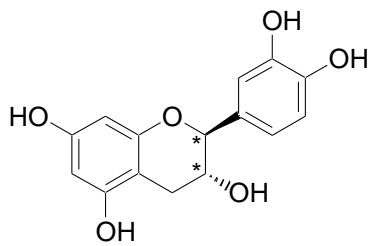
Nr.	Substanz	Nr.	Substanz
(1)	(+)-Catechin	(10)	<i>R,S</i> -Nordihydroguaretsäure (NDGA)
(2)	(-)-Epicatechin	(11)	H ₂ DCFDA
(3)	(-)-Catechin	(12)	Dichlorofluorescein (DCF)
(4)	(+)-Epicatechin	(13)	(+)-Epicatechin-8-β- <i>D</i> -galactosid
(5)	Procyanidin B1	(14)	(+)-Catechin-8-β- <i>D</i> -rhamnosid
(6)	Procyanidin B2	(15)	Xanthin
(7)	Procyanidin B3	(16)	Harnsäure
(8)	Procyanidin B4	(17)	Allopurinol
(9)	Dehydrodiccatechin B ₁₁	(18)	Epigallocatechin (EGC)
		(S)	3,4,5- <i>trans</i> -Trimethoxyzimtsäure



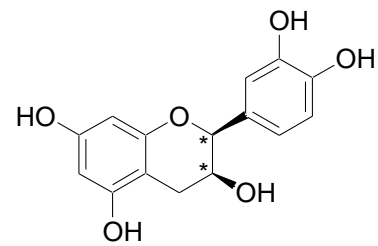
(1)



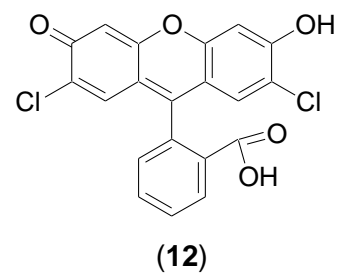
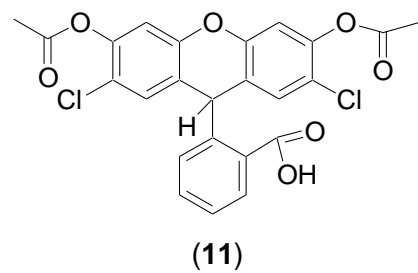
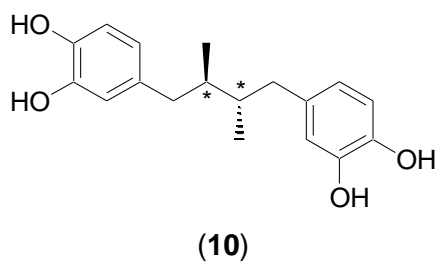
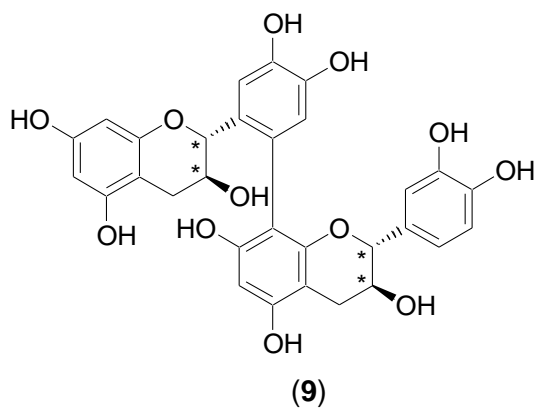
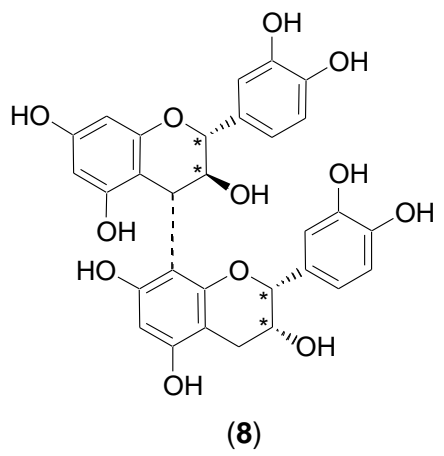
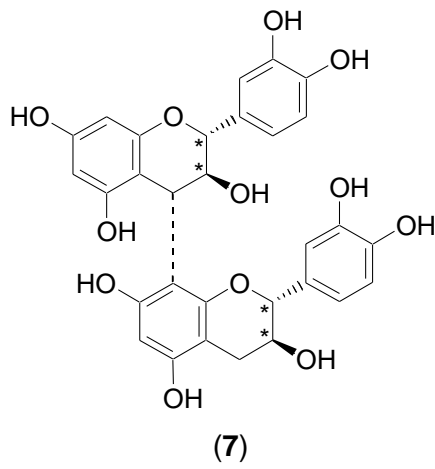
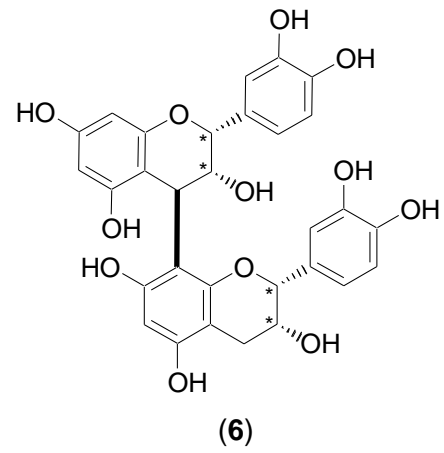
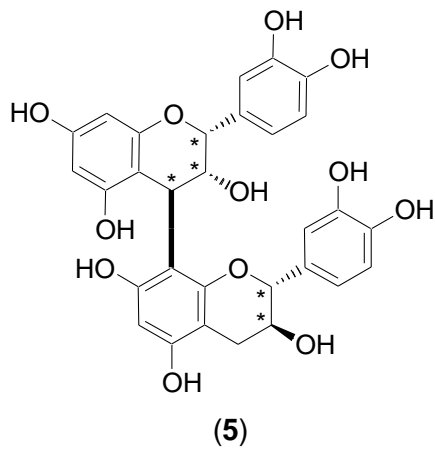
(2)

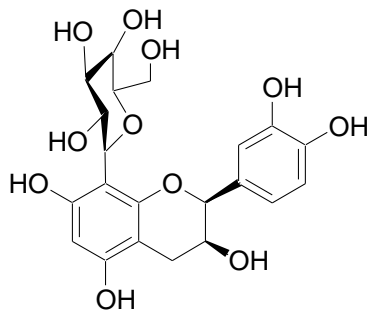


(3)

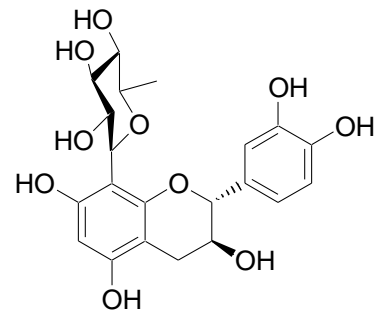


(4)

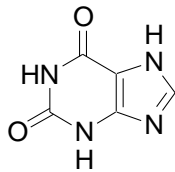




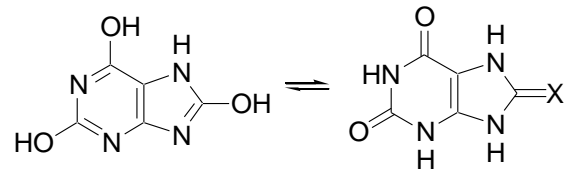
(13)



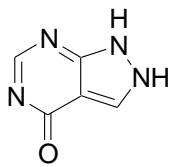
(14)



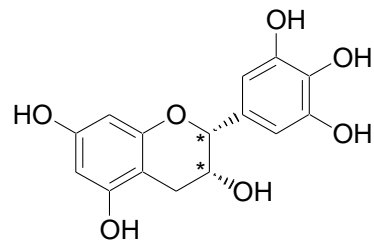
(15)



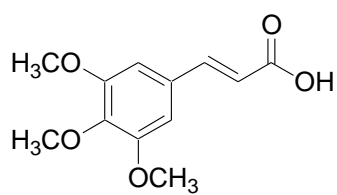
(16)



(17)



(18)



(S)

6 Literatur

Ader, P.; Grenacher, B.; Langguth, P.; Scharrer, E.; Wolfram, S. Cinnamate uptake by rat small intestine: transport kinetics and transepithelial transfer. *Exp. Physiol.*, **81** (1996) 943-955.

Agullo, G.; Gamet-Payrastre, L.; Manenti, S.; Viala, C.; Rémésy, C.; Chap, H.; Payrastre, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase; a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem. Pharmacol.*, **53** (1997) 1649-1657.

Ames, B.N.; Profet, M.; Gold, L.S. Dietary pesticides (99.99% all natural). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87** (1990) 7777-7781.

Ammar, N.; El Diwany, A.; Osman, N.; Gaafar, S.; Amin, N. Flavonoids as a possible preventive of dental plaque. *Arch. Pharm. Res.*, **13** (1990) 211-213.

Andreou, A.; Feussner, I.; Lipoxygenases - Structure and reaction mechanism, *Phyto-chemistry*, **70** (2009a) 1504-1510.

Andreou, A.-Z.; Brodhun, F.; Feussner, I.; Biosynthesis of oxylipins in non-mammals, *Prog. Lipid Res.*, **48** (2009b) 148-170.

Arteaga, S.; Andrade-Cetto, A.; Cárdenas, R. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid, *J. Ethnopharm.* **98** (2005) 231-239.

Aron, P.M.; Kennedy, J.A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.*, **52** (2008) 79-104.

Arts, I.C.; van de Putte, B.; Hollman, P.C.: Catechin content of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple food and processed food. *J. Agric. Food Chem.*, **48** (2000) 1746-1751.

Aviram, M.; Fuhrmann, B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann. NY Acad. Sci.*, **957** (2002) 146-161.

Axelrod, B., Cheesbrough, T.M, Laasko, S.; Lipoxygenase from soybeans. *Methods Enzymol.*, **71** (1981) 441-451.

Bagchi, D.B.; Sen, C.K.; Ray, S.D.; Das, D.K., Bagchi, M.;Preuss, H.G.; Vinson, J.A. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523 (2003) 87-97.

Bais, H.P.;Walker, T.S.; Stermitz, F.R.; Hufbauer, R.A.; Vivanco, J.M. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (\pm)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiol.*, 128 (2002) 1173-1179.

Bais, H.P.; Vepachedu, R.; Gilroy, S.; Callaway, R.M.; Vivanco, J.M. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecule and genes to species interactions. *Science*, 301 (2003) 1377–1380.

Banerjee, S. Inhibition of mackerel (*Scomber scombrus*) muscle lipoxygenase by green tea polyphenols, *Food Res. Intern.*, 39 (2006) 486-491.

Becker, N.; Wahrendorf, J. *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland*. Springer-Verlag, Heidelberg (1998).

Belman, S.; Solomon, J.; Segal, A.; Block, E.; Barany, G. Inhibition of soybean lipoxygenase and mouse skin tumor promotion by onion and garlic components. *J. Biochem Toxicol.* 4 (1989) 151-160.

Bellion, P. Modulation oxidativer Zellschäden durch phenolische Apfelsaftinhaltsstoffe und deren intestinale Abbauprodukte in humanen Kolonzellen. *Dissertation*, TU Kaiserslautern (2009).

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

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

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

Boffetta, P.; Couto, E.; Wichmann, J.; Ferrari, P.; Trichopoulos, D.; Bueno-de-Mesquita, H.B.; van Duijnhoven, F.J.B.; Büchner, F.L.; Key, T.; Boeing, H.; Nöthlings, U.; Linseisen, J.; Gonzalez, C.A.; Overvad, K.; Nielsen, M.R.S.; Tjønneland, A.; Olsen, A.; Clavel-Chapelon, F.; Boutron-Ruault, M.-C.; Morois, S.; Lagiou, P.; Naska, A.; Benetou, V.; Kaaks, R.; Rohrmann, S.; Panico, S.; Sieri, S.; Vineis, P.; Palli, D.; van Gils, C.H.; Peeters, P.H.; Lund, E.; Brustad, M.; Engeset, D.; Huerta, J.M.; Rodríguez, L.; Maria-José Sánchez, M.-J.; Dorronsoro, M.; Barricarte, A.; Hallmans, G.; Johansson, I.; Manjer, J.; Sonestedt, E.; Allen, N.E.; Bingham, S.; Khaw, K.-T.; Slimani, N.; Jenab,

M.; Mouw, T.; Norat, T.; Riboli, E.; Trichopoulou, A. Fruit and vegetable intake and overall cancer risk in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *J. Nat. Cancer Inst.*, 102 (2010) 529-537.

Bokoch, G.M; Reed, P.W. Evidence for inhibition of leukotriene A4 synthesis by 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid in guinea pig polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 4156-4159.

Borbulevych, O.Y.; Jankun, J.; Selman, S.H.; Skrzypczak-Jankun, E. Lipoxygenase interactions with natural flavonoid, quercetin, reveal a complex with protocatechuic acid in its X-ray structure at 2.1 Å resolution. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.*, 54 (2004) 13-19.

Brash, A.R.; Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 23679-23682.

Bray, R.C..Molybdenum iron-sulfur flavin hydroxylases and related enzymes. Boyer, P.D. (Ed.). The Enzymes. *Academic Press, New York* (1975) (299-419).

Breinholt, V.M.; Offord, E.A.; Brouwer, C.; Nielsen, S.E.; Brosen, K.; Friedberg, T. In vitro investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food Chem. Toxicol.*, 40 (2002) 609-616.

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

Cathcart, R.; Schwieters, E.; Ames, B.N. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal. Biochem*, 134 (1983) 111-116.

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

Chen, C.H.; Hsu, H.J.; Huang, Y.J.; Lin, C.J. Interaction of flavonoids and intestinal facilitated glucose transporters. *Planta Med.*, 73 (2007) 348-354.

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*, 917 (2001) 23-27.

Cooper, K.A.; Campos-Giménez, E.; Alvarez, D.J.; Nagy, K.; Donovan, J.L.; Williamson, G., Rapid Reversed Phase Ultra-Performance Liquid Chromatography Analysis of the Major Cocoa

Polyphenols and Inter-relationships of Their Concentrations in Chocolate, *J. Agric. Food Chem.*, **55** (2007) 2841-2847.

Cooper-Driver, G. Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry*, **56** (2001) 229-236.

Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Vlietnick, A.J.; Vanden Berghe, D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.*, **61** (1998) 71-76.

Cos, P.; De Bruyne, T., Hermans, S.; Apers, S.; Vanden Berghe, D Vlietnick, A.J. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. *Current Med. Chem.*, **11** (2004) 1345-1359.

Courbat, P.; Weith, A.; Albert, A. 167. Contribution à l'étude du comportement de la catéchine en milieu alcalin" *Review, Helv. Chim Acta*, **60** (1977) 1665-1675.

Csokay, B.; Prajda, N.; Weber, G.; Olah, E. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci.*, **60** (1997) 2157-2163.

Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.*, **26** (2009) 1001-1043.

Cushnie, T.P.T.; Lamb, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **26** (2005) 343-356.

D'Archivio, M.; Filesì, C.; Di Benedetto, R.; Gargiulo, R.; Giovannini, C.; Masella, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann. Ist. Super Sanità*, **43** (2007) 348-361.

Das, D.K. Naturally occurring flavonoids: structure, chemistry, and high-performance liquid chromatography methods for separation and characterisation. *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc., New York (1994) 410-420.

Davis, B.D.; Brodbelt, J.S. Regioselectivity of human UDP-glucuronosyl-transferase 1A1 in the synthesis of flavonoid glucuronides determined by metal complexation and tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **19** (2008) 246-256.

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

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

Delle Monache, F.; Ferrari, F.; Poce-Tucci, A.; Marini-Bettolo, G. Catechins with (+)-epi-configuration in nature. *Phytochem.*, **11** (1972) 2333–2335.

Depeint, F.; Gee, J.M.; Williamson, G.; Johnson, I.T. Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc. Nutr. Soc.*, **61** (2002) 97-103.

Dépréz, S.; Mila, I.; Huneau, J. F.; Tome, D.; Scalbert, A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antiox. Redox Sig.*, **3** (2001) 957-967.

Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg, (www.dkfz.de/de/krebsatlas) 20.04.2010.

Devanand, L.L.; Jones, A.D.; Donovan, J.L.; Waterhouse, A.L. GC-MS Determination of Catechin and Epicatechin Levels in Human Plasma, *J. High Resol. Chromatogr.*, **20** (1997) 621-623.

Dhalla, N.S.; Temsah, R.M., Netticadan, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens*, **18** (2000) 655-673.

Divi, R.L.; Doerge, D.R. Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.*, **9** (1996) 16-23.

Dixit, R.; Gold, B. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83** (1986) 8039-8043.

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.*, **52** (2008) 1428-1433.

Duthie, S. J.; Dobson, V. L. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur. J. Nutr.*, **38** (1999) 28-34.

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*, **10** (1999) 298-305.

Eisenbrand, G.; Metzler, M. *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner*. Wiley, VCH: Weinheim (2005).

Eldridge, M.D.; Murray, C.W.; Auton, T.R.; Paolini, G.V.; Mee, R.P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 11 (1997) 425-445.

Ellis, C.; Yeap Foo, L.; Porter, L. Enantiomerism: A characteristic of the proanthocyanidin chemistry of the Monocotyledonae. *Phytochem.*, 22 (1983) 483-487.

Fan, J.; Watanabe, T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J. Atheroscler. Thromb.*, 10 (2003) 63-71.

Fiorucci, S.; Golebiowski, J.; Cabrol-Bass, D.; Antonczak, S. Molecular simulations enlighten the binding mode of quercetin to lipoxygenase-3. *Proteins*, 73 (2008) 290-298.

Foo, L.Y.; Lu, Y.; Howell, A.B., Vorsa, N. A-type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. *J. Nat. Prod.*, 63 (2000) 1225-1228.

Folts, J.D. Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 505 (2002) 95-111.

Formica, J. V.; Regelson, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxic.*, 33 (1995) 1061-1080.

Fridovich, I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthin oxidase. *J. Biol. Chem.*, 245 (1970) 4053-4057.

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.*, 51 (2007) 594-601.

Fritsch, H.; Griesebach, H. Biosynthesis of cyanidin in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Phytochemistry*, 14 (1975) 2437-2442.

Gaffney, B.J.; Lipoxygenases: Structural Principles and Spectroscopy, *Annu. Ref. Biophys. Biomol. Struct.*, 25 (1996) 431-459.

Gatto, M.T.; Falcocchio, 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.*, 10 (2002) 269-272.

Gelhaar, D.K.; Verkhivker, G.M.; Rejto, P.A.; Sherman, C.J.; Fogel, D.B.; Fogel, L.J.; Freer, S.T. Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 protease: conformationally flexible docking by evolutionary programming. *Chem. Biol.*, 2 (1995) 317-324.

Gibson, G.G.; Skett, P. In *Introduction to drug metabolism*. Blackie Academic and Professional, London (1994) 107.

Graefe, E.U.; Wittig, J.; Mueller, S.; Riethling, A.K.; Uehleke, B.; Drewelow, B.; Pforte, H.; Jacobasch, G.; Derendorf, H.; Veit, M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J. Clin. Pharmacol.*, 42 (2001) 492-499.

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.)*, 78 (1996) 1284-1292.

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

Gross, J.H. *Mass spectrometry*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg (2004).

Gu, L.; Kelm, M.A.; Hammerstone, J.F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Prior, R. L. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (2003) 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.*, 3 (2005) 369-376.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, 186 (1990) 1-85.

Halliwell, B. *Antioxidants in disease mechanisms and therapy*; Sies, H., Ed.; Academic Press: San Diego (1997) 3-20.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 3. Auflage, Oxford University Press (1999).

Harborne, J.B.; Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.*, 55 (2000) 481-505.

Harrison, D.G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J. Clin. Invest.*, 100 (1997) 2153-2157.

Harrison, R. Human xanthine oxidoreductase: in search of a function. *Biochem. Soc. Trans.*, 25 (1997) 786-791.

Hasslauer, I; Oehme, A.; Locher, S.; Valotis, A.; van't Slot, G.; Humpf, H.-U.; Schreier, P. Flavan-3-ol C-glycosides – Preparation and model experiments mimicking their human intestinal transit. *Mol. Nutr. Food Res.*, 54 (2010) 1546-1555.

He, Y.J.; Liu, B.H.; Xiang, D.B.; Qiao, Z.Y.; Fu, T.; He, Y.H. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of SW480 colorectal tumor cells involves beta-catenin associated signaling pathway down-regulation. *World J. Gastroenterol.*, 12 (2006) 4981-4985.

Hille, R. The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.*, 96 (1996) 2757-2816.

Hodek, P.; Trefil, P.; Stiborova, M. Flavonoids - potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P 450. *Chem.-Biol. Interact.*, 139 (2002) 1-21.

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 1841-1856.

Hümmer, W. Analyse potentiell chemopräventiv wirksamer Inhaltsstoffe von Apfelsaft. *Dissertation*, Universität Würzburg (2009).

Iio, M.; Moriyama, A.; Matsumoto, Y.; Takaki, N.; Fukumoto, M., Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids, *Agric. Biol. Chem.*, 49 (1985) 2173-2176.

Izumi, T.; Rådmark, O.; Samuelsson, B. Purification of 15-lipoxygenase from human leukocytes, evidence for the presence of isozymes. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.*, 21A (1991) 101-104.

Jenner, A.M.; Rafter, J.; Halliwell, B. Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic. Biol. Med.*, 38 (2005) 763-772.

Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C.; Leach, A.R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.*, 267 (1997) 727-748.

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

Kahle, K. Polyphenole aus Apfelsaft: Studien zur Verfügbarkeit im Humanstoffwechsel. *Dissertation*, Universität Würzburg (2008).

Kakinuma, K.; Minakami, S. Effects of fatty acids on superoxide radical generation in leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 538 (1978) 50-59.

Kanazawa, K.; Yamashita, T.; Ashida, H.; Danno, G. Antimutagenicity of flavones and flavonols to heterocyclic amines by specific and strong inhibition of the cytochrome P450 1A family. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62 (1998) 970-977.

Kaul, T.N.; Middleton, E., Jr.; Ogra, P.L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol.*, 15 (1985) 71-79.

Kaewamatawong, R.; Likhitwitayawuid, K.; Ruangrunsi, N.; Takayama, H.; Kitajima, M.; Aimi, N. Novel biflavonoids from the stem bark of *Ochna integerrima*. *J. Nat. Prod.*, 65 (2002) 1027-1029.

Kang, N.J.; Lee, K.W.; Rogozin, E.A.; Cho, Y.-Y.; Heo, Y.-S.; Bode, A.M.; Lee, H.J.; Dong, Z. Equol, a metabolite of the soybean isoflavone Daidzein, inhibits neoplastic cell transformation by targeting the MEK/ERK/p90RSK/activator protein-1 pathway. *J. Biol. Chem.*, 282 (2007) 32856-32866.

Kelavkar, U.P.; Cohen, C.; Kamitani, H.; Eling, T.E.; Badr, K.F. Concordant induction of 15-lipoxygenase-1 and mutant p53 expression in human prostate adenocarcinoma: correlation with Gleason staging. *Carcinogenesis*, 21 (2000) 1777-1787.

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.*, 49 (2005) 317-328.

Keston, A.S.; Brandt, R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.*, 11 (1965) 1-5.

Kim, D.H.; Jung, E.A.; Sohng, I.S.; Han, J.A.; Kim, T.H.; Han, M.J. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch. Pharm. Res.*, 21 (1998) 17-23.

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.*, 31 (2008) 424-428.

Knapp, M.J.; Klinman, J.P. Environmentally coupled hydrogen tunneling. *Eur. J. Biochem.*, 269 (2002) 3113-3121.

Knapp, M.J.; Seebeck, F.P.; Klinman, J.P.; Steric control of oxygenation regiochemistry in soybean lipoxygenase-1, *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 2931-2932.

Knaup, B. *In vitro*- und *ex vivo*-Studien zum intestinalen Metabolismus und zu Lipoxygenase-hemmenden Eigenschaften ausgewählter sekundärer Pflanzenstoffe. *Dissertation*, Universität Würzburg (2008).

Kofink, M; Galensa, R.; Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis; *Eur. Food Res. Technol.*, 225 (2007) 569-577.

Kofink, M; Enantiomerentrennung von Polyphenolen mittels Kapillarelektrophorese. *Dissertation*, Universität Bonn (2009).

Kohen, R.; Nyska, A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Pathol.*, 30 (2002) 620-650.

Kondo, N.; Kawashima, M. Enhancement of tolerance to oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings by UV-B irradiation: possible involvement of phenolic compounds and antioxidative enzymes. *J. Plant Res.*, 113 (2000) 311-317.

Korver, O., Wilkins, C.K.; Circular Dichroism Spectra of Flavanols, *Tetrahedron*, 27 (1971) 5459-5465.

Krieg, P., Kinzig, A., Heidt, M., Marks, F., Furstenberger, G. cDNA cloning of a 8-lipoxygenase and a novel epidermis-type lipoxygenase from phorbol ester-treated mouse skin. *Bba-Lipid Lipid Met.*, 1391 (1998) 7-12.

Krinsky, N.I. Overview of lycopene, carotenoids and disease prevention. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 218 (1998) 95-97.

Kühn, H.; Pönicke, K.; Schewe, T.; Förster, W.; The possible biological importance of lipoxygenase pathway in aorta endothelial cells. *Biomed. Biochim. Acta*, 43 (1984) 304-306.

Kuhn Merrily, A. Oxygen free radicals and antioxidants. *Am. J. Nurs.*, 103 (2003) 58-62.

Kuntz, S.; Wenzel, U.; Daniel, H. Comparative analysis of effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur. J. Nutr.*, 38 (1999) 133-142.

Lea, A.G.H.; Arnold, G.M. The phenolics of ciders: bitterness and astringency. *J. Sci. Food Agric.*, 29 (1978) 478-483.

LeBel, C.P.; Ischiropoulos, H.; Bondy, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.*, 5 (1992) 227-231.

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*, 28 (1997) 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.*, 43 (1999) 173-180.

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.*, 67 (2004) 2103-2114.

Levy, B.D.; Romano, M.; Chapman, H.A.; Reilly, J.J.; Drazen, J.; Serhan, C.N. Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15S-hydroxy-5,8,11-*cis-trans*-eicosatetraenoic acid and lipoxins. *J. Clin. Invest.*, 92 (1993) 1572-1579.

LeWitt, P.A.; Taylor, D.C. Protection against Parkinson's disease progression: clinical experience. *Neurotherapeutics*, 5 (2008) 10-225.

Löffler, G.; Petrides, P.E.; Heinrich, P.C. *Biochemie & Pathobiochemie*, 8. Auflage, Springer Medizin Verlag (2007) 599-602.

Lorenz, M.; Wessler, S.; Follmann, E.; Michaelis, W.; Düsterhöft, T.; Baumann, G.; Stangl, K.; Stangl, V. A constituent of green tea, Epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J. Biol. Chem.*, 7 (2004) 6190-6195.

Luceri, C.; Caderni, G.; Sanna, A.; Dolaro, 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.*, 132 (2002) 1376-1379.

Luthria, D.L., Jones, A.D., Donovan, J.L., Waterhouse, A.L., "GC-MS Determination of Catechin and Epicatechin Levels in Human Plasma", *J. High Resol. Chromatogr.*, 20 (1997) 621-623.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79 (2004) 727-747.

Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81 (2005) 230S-242S.

Marquardt, H., Schäfer, S. *Lehrbuch der Toxikologie*, 2. Aufl., Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (2004).

Massey, V.; Harris, C.M. Milk xanthine oxidoreductase: the first one hundred years. *Biochem. Soc. Trans.*, 25 (1997) 750-755.

McKay, D.L.; Blumberg, J.B. The role of tea in human health: An update, *J. Am. Coll. Nutr.*, 21 (2002) 1-13.

Mehta, P.; Whalley, W. The Stereochemistry of Some Catechin Derivatives, *J. Chem. Soc.* (1963) 5327-5332.

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.*, 39 (2005) 1591-1600.

Mendoza-Wilson, A.M.; Glossmann-Mitnik, Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-epicatechin related to their antioxidant ability, *Theochem.*, 761 (2006) 97-106.

Meselhy, M.R.; Nakamura, N.; Hattori, M. Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chem. Pharm. Bull.*, 45 (1997) 888-893.

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.*, 26 (1999) 107-116.

Metz, N.; Lobstein, A.; Schneider, Y.; Gosse, P.; Schleiffer, R.; Anton, R.; Raul, F. Suppression of azoxymethane-induced preneoplastic lesions and inhibition of cyclooxygenase-2 activity in the colonic mucosa of rats drinking a crude tea extract. *Nutr. Cancer*, 38 (2000) 60-64.

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*, 206 (2005) 337-348.

Middleton, E., Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 439 (1998) 175-182.

Milde, J.; Elstner, E.F.; Grassmann, J. Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, gamma-terpinene, and ascorbic acid. *Phytomedicine*, 11 (2004) 105-113.

MOE-Molecular Operating Environment, www.chemgroup.com

Moini, H.; Guo, Q.; Packer, L. Enzyme inhibition and protein-binding action of the procyanidin-rich french maritime pine bark extract, pycnogenol: Effect on xanthine oxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **48** (2000) 5630-5639.

Mutschler, E. *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. 6. Aufl., Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart (1991).

Narayana, K.R.; Reddy, M.S.; Chaluvadi, M.R.; Krishina, D.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects therapeutic potential. *Indian. J. Pharmacol.*, **33** (2001) 2-16.

Nardini, M.; Natella, F.; Scaccini, C.; Ghiselli, A. Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. *J. Nutr. Biochem.*, **17** (2006) 14-22.

Narender, T.; Khaliq, T.; Puri, A.; Chander, R. Antidyslipidemic activity of furano-flavonoids isolated from *Indigofera tinctoria*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16** (2006) 3411-3414.

Neilson, A.P.; Hopf, A.S.; Cooper, B.R.; Pereira, M.A.; Bomser, J.A.; Ferruzzi, M.G. Catechin degradation with concurrent formation of homo- and heterocatechin dimers during in vitro digestion. *J. Agric. Food Chem.*, **55** (2007) 8941-8949.

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.*, **13** (1999) 597-600.

Nemeth, K.; Plumb, G.W.; Berrin, J.G.; Juge, N.; Jacob, R.; Naim, H.Y.; Williamson, G.; Swallow, D.M.; Kroon, P.A. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur. J. Nutr.*, **42** (2003) 29-42.

Nielsen, S.E.; Breinholt, V.; Justesen, U.; Cornett, C.; Dragsted, L.O. In vitro biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotica*, **28** (1998) 389-401.

Nishino, T.; Nakanishi, S.; Okamoto, K.; Mizushima, J.; Hori, H.; Iwasaki, T.; Nishino, T.; Ichimori, K.; Nakazawa, H. Conversion of xanthine dehydrogenase into oxidase and its role in reperfusion injury. *Biochem. Soc. Trans.*, **25** (1997) 783-786.

Ochel, H. J.; Gademann, G. Heat-shock protein 90: potential involvement in the pathogenesis of malignancy and pharmacological intervention. *Onkologie*, **25** (2002) 466-473.

Oehme, A. Studien zur Zusammensetzung der Inhaltsstoffe getrockneter Heidelbeeren und Formulierungen zum Colon-Targeting von Anthocyanen. *Dissertation*, Universität Würzburg (2010).

Okamoto, K.; Matsumoto, K.; Hille, R.; Eger, B.T.; Pai, E.F.; Nishino, T. The crystal structure of xanthine oxidoreductase during catalysis: Implications für reaction mechanism and enzyme inhibition. *PNAS*, 101 (2004) 7931-7936.

Oliw, E.H. Plant and fungal lipoxygenases. *Prostag. Oth. Lipid Mediators*, 68-69 (2002) 313-323.

Olthof, M.R.; Hollman, P.C.; Zock, P. L.; Katan, M.B. Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or of black tea increases plasma total homocysteine concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 73 (2001) 532-538.

Ota, T.; Tsukamoto, S.; (Kanazawa University, Japan). Application: JP (2006) 11.

Pacher, P.; Nivorozhkin, A.; Szabó, C. Therapeutic effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol. Rev.*, 57 (2006) 87-114.

Patel, R.; Maru, G. Polymeric black tea polyphenols induce phase II enzymes via Nrf2 in mouse liver and lungs. *Free Radic. Biol. Med.*, 44 (2008) 1897-1911.

Pechanek, U. Phenolsäuren und Flavonoide. *Österreichische Apothekerzeitschrift*, 15 (2006) 6-16.

Pereira, D.M.; Valentão, P.; Pereira, J.A.; Andrade, P.B. Polyphenols: from chemistry to biology. *Molecules*, 14 (2009) 2202-2211.

Pietta, P.-G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63 (2000) 1035-1042.

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.*, 29 (1998) 351-358.

Pohl, C.; Will, F.; Dietrich, H.; Schrenk, D. Cytochrome P450 1A1 expression and activity in Caco-2 cells: modulation by apple juice extract and certain apple polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 10262-10268.

Porter N.A. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 105 (1984) 273-282.

Poulsen, H.E.; Prieme, H.; Loft, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur. J. Cancer Prev.*, 7 (1998) 9-16.

Praticò, D.; Zhukareva, V.; Yao, Y.; Uryu, K.; Funk, C.D.; Lawson, J.A.; Trapjanowski, J.Q.; Lee, V.M.Y. 12/15-lipoxygenase is increased in Alzheimer's disease. Possible involvement in brain oxidative stress. *Am. J. Pathol.*, **164** (2004) 1655-1662.

Prigge, S.T., Structure and mechanism of lipoxygenases, *Biochimie*, **79** (1997) 629-636.

Pryor, W.A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* **48** (1986) 657-667.

Pufahl, R.A.; Kasten, T.P.; Hills, R.; Gierse, J.K.; Reitz, B.A.; Weinberg, R.A.; Masferrer, J.L.; Development of a fluorescence-based enzyme assay of human 5-lipoxygenase, *Anal. Biochem.*, **364** (2007) 204-212.

Ramakrishna, V.; Jaikhan, R. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetol.*, **45** (2008) 41-46.

Ramos, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res.*, **52** (2008) 507-526.

Rasmussen, S.E.; Frederiksen, H.; Stuntze Kroghol, K.; Poulsen, L., Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease, *Mol. Nutr. Food Res.*, **49** (2005) 159-174.

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.*, **72** (2000) 30-35.

Reuber, S.; Bornmann, J. F.; Weissenböck, G. Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Secale cereale*). Light response of their metabolism and the possible role in UV-B protection. *Physiologia Plantarum*, **97** (1996) 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 integerrima*. *Planta Med.*, **73** (2007) 683-688.

Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, **20** (1996) 933-956.

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

- Richling, E. Polyphenole. *Nachr. Chemie*, 58 (2010) 345-349.
- Rickert, K.W. und Klinman, J.P. Nature of hydrogen transfer in soybean lipoxygenase 1: separation of primary and secondary isotope effects. *Biochemistry*, 38 (1999) 12218-12128.
- Rios, L. Y.; Bennett, R. N.; Lazarus, S. A.; Rémésy, C.; Scalbert, A.; Williamson, G. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 76 (2002) 1106–1110.
- Rösen, P. Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose. *J. Kardiol.*, 9 (2002) 556-562.
- Rucinska, A.; Kirko, S.; Gabryelak, T. Effect of the phytoestrogen, genistein-8-C-glucoside, on Chinese hamster ovary cells in vitro. *Cell Biol. Int.*, 31 (2007) 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*, 54 (2005) 856-861.
- Sadik, C.D.; Sies, H.; Schewe, T. Inhibition of 15-lipoxygenase by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem. Pharmacol.*, 65 (2003) 773-781.
- Salomon, D.S.; Brandt, R.; Ciardiello, F.; Normanno, N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 19 (1995) 183-232.
- Sakanaka, S.; Aizawa, M.; Kim, M.; Yamamoto, T. Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium, porphyromonas gingivalis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60 (1996) 745-749.
- 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.*, 74 (2008) 221-227.
- Sarnesto A, Linder N, Raivio KO: Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase/ xanthine oxidase protein. *Lab Invest*, 74 (1996) 48-56.
- Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130 (2000) 2073S-2085S.
- Scalbert, A.; Dépréz, S.; Mila, I.; Albrecht, A.M.; Huneau, J.F.; Rabot, S. Proanthocyanidins and human health: systemic effects and local effects in the gut. *BioFactors*, 13 (2000) 115-120.

Scalbert, A.; Johnson, I. T.; Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.*, **81** (2005a) 215S-217S.

Scalbert, A.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Critical review. *Food Sci. Nutr.*, **45** (2005b) 287-306.

Schewe, T; Halangk, W.; Hiebsch, C.; Rapoport, SM. A lipoxygenase in rabbit reticulocytes which attacks phospholipids and intact mitochondria. *FEBS Lett.* **60** (1975) 149-152.

Schmidt, B.M.; Howell, A.B.; McEniry, B.; Knight, C.T.; Seigler, D.; Erdmann, J.W.; Lila, M.A. Effective separation of potent antiproliferation and antiadhesion components from wild blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **52** (2004) 6433-6442.

Schneider, C.; Pratt, D.A.; Porter, N.A.; Brash, A.R., Control of Oxygenation in Lipoxygenase and Cyclooxygenase Catalysis, **Review**, *Chem. Biol.*, **14** (2007) 473-488.

Schneider, I.; Bucar, F.; Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 2: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene receptor antagonisten, *Phytother. Res.*, **19** (2005) 263-272.

Schuster, B.; Rétey, J. The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92** (1995) 8433-8437.

Shen, H.M.; Shi, C.Y.; Shen, Y.; Ong, C.N. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radic. Biol. Med.*, **21** (1996) 139-146.

Siegers, C.P.; Klaassen, C.D. The Significance of Biliary-Excretion of Drugs in Man. *Deut. Med. Wochenschr.*, **108** (1983) 1564-1570.

Sies, H. Oxidative stress: Introductory remarks. *Oxidative Stress* (H. Sies, Ed.), Academic Press, London, UK (1985) 1-8.

Sies, H. Biochemie des oxidativen Stress. *Angew Chem.*, **98** (1986) 1061-1075.

Skibola, C.F.; Smith, M.T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic. Biol. Med.*, **29** (2000) 375-383.

Skrzypczak-Jankun, E.; Zhou, K.; Jankun, J. Inhibition of lipoxygenase by epigallocatechin gallate: X-ray analysis at 2.1 Å reveals degradation of EGCG and shows soybean LOX-3 complex with EGC instead. *Int. J. Mol. Med.*, **12** (2003) 415-420.

Spencer, J.P.E.; Chaudry, F.; Pannala, A.S.; Srai, S.K.; Debnam, E.; Rice-Evans, C. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 272 (2000) 236-241.

Spencer, J.P.E.; Schroeter, H.; Rechner, A.; Rice-Evans, C. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo. *Antiox. Redox Signal.*, 3 (2001) 1023-1040.

Stark, T.; Hofmann, T. Application of a molecular sensory science approach to alkalized cocoa (*Theobroma cacao*): structure determination and sensory activity of nonenzymatically C-glycosylated flavan-3-ols. *J. Agr. Food Chem.*, 54 (2006) 9510-9521.

Statistisches Bundesamt, 05.03.2011

http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Presse/pm/2010/10/PD10_371_232.psml

Steinhilber, D. 5-lipoxygenase: enzyme expression and regulation of activity. *Pharm. Act. Helv.* 69 (1994) 3-14.

Steinmetz, K.A.; Potter, J.D. Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control*, 2 (1991) 325-357.

Steinmetz, K.A.; Potter, J.D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet. Assoc.*, 10 (1996) 1027-1039.

Stremple, P. Improved separation and identification of aglycon flavonoids by gas chromatography on phenylmethylsilicone copolymers. *J. High Resol. Chromatogr.*, 19 (1996) 581-584.

Suchetet, M.; Siess, M.H.; LeBonn, A.M.; Canivenc-Lavier, M.C. Anticarcinogenic properties of some flavonoids. In *Polyphenols*. Vercauteren, J.; Chèze, C.; Triaud, J., Eds. INRA Editions: Paris, 96 (1997) 165-204.

Sudharshan, E.; Rao, A.G.A. Rapid method to separate the domains of soybean lipoxygenase-1: Identification of the interdomain interactions. *FEBS Letters*, 406 (1997) 184-188.

Sun, D.; Elsea, S.H.; Patel, P.I.; Funk, C.D. Cloning of a human "epidermal-type" 12-lipoxygenase-related gene and chromosomal localization to 17p13. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 81 (1998) 79-82.

Sun, W.; Milller, J. Tandem mass spectrometry of the B-type procyanidins in wine and B-type dehydrodicatechins in an autoxidation mixture of (+)-catechin and (-)-epicatechin. *J. Mass Spectrom.*, 38 (2003) 438-446.

Talalay, P.; Fahey, J.W.; Holtzclaw, W.D.; Prestera, T.; Zhang, Y. Chemoprotection against cancer by Phase 2 enzyme induction. *Toxicol. Lett.*, **82/83** (1995) 173-179.

Tanner, G.; Franki, A.S.; Watson, J.; Larkin, P.; Ashton, A.: Proanthocyanindin biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.*, **34** (2003), 31647–31656.

Terra, X.; Valls, J.; Vitrac, X.; Mérrillon, J.-M.; Arola, L.; Ardèvol, A.; Bladé, C.; Fernández-Larrea, J.; Pujadas, G.; Salvadó, J.; Blay, M. Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macrophages by inhibiting NFκB signaling pathway. *J. Agric. Food Chem.*, **55** (2007) 4357-4365.

Terra, X., Montagut, G.; Bustos, M.; Llopiz, N.; Ardèvol, A.; Bladé, C.; Fernández-Larrea, J.; Pujadas, G.; Salvadó, J.; Arola, L.; Blay, M. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *J. Nutr. Biochem.*, **20** (2008) 210-218.

Udilova, N.; Vergleichende Untersuchung von Methoden zum Nachweis von Superoxidanionen in biologischen und Modellsystemen. *Dissertation*, Humboldt-Universität Berlin (1999).

Urban, J. Vergleich von grünem und schwarzem Tee auf NO-Produktion und Endothelfunktion. *Dissertation*, Medizinische Fakultät Charité, Berlin (2009).

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.*, **56** (1998) 935-943.

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

Wätjen, W.; Michels, G.; Steffan, B.; Niering, P.; Chovolou, Y.; Kampkotter, A.; Quynh-Hoa, T. T.; Proksch, P.; Kahl, R. Low concentration of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J. Nutr.*, **135** (2005) 525-531.

Wätzig, H.; Degenhardt, M.; Kunkel, A.; Strategies for capillary electrophoresis: Method development and validation for pharmaceutical and biological applications, *Electrophoresis*, **19** (1998) 2695-2752.

Wang, L.Q.; Meselhy, R.M.; Li, Y.; Nakamura, N.; Min, B.S.; Qin, G.W.; Hattori, M. The heterocyclic ring fission and dehydroxylation of catechins and related compounds by eubacterium sp. strain SDG-2, a human intestinal bacterium. *Chem. Pharm. Bull.*, **49** (2001) 1640-1643.

- Waterhouse, A. L.; Shirley, J. R.; Donovan, J. L. Antioxidants in chocolate. *Lancet* (1996) 348, 834.
- Watzl, B.; Leitzmann, C. *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. 2. Aufl., Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart (1999).
- Weber, G.; Shen, F.; Prajda, N.; Yang, H.; Li, W.; Yeh, A.; Csokay, B.; Olah, E.; Look, K.Y. Regulation of the signal transduction program by drugs. *Adv. Enzyme Regul.*, 37 (1997) 35-55.
- Wedler, G. *Lehrbuch der physikalischen Chemie*. 4. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim (1997).
- Wellmann, E. UV dose-dependent induction of enzymes related to flavonoid biosynthesis in cell suspension cultures of parsley. *FEBS Lett.*, 51 (1975) 105-107.
- Wenzel, U.; Kuntz, S.; Brendel, M.D.; Daniel, H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.*, 60 (2000) 3823-3831.
- Welton, A. F.; Hurley, J.; Will, P. Flavonoids and arachidonic acid metabolism. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 280 (1988) 301-312.
- Werz, O.; Inhibition of 5-Lipoxygenase Product Synthesis by Natural Compounds of Plant Origin; *Planta Med.* 73 (2007) 1331-1357.
- Werz, O.; Steinhilber, D.; Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors; *Pharmacol. Ther.*, 112 (2006) 701-718.
- Whitman, S.; Gezgin, M.; Timmermann, B.N.; Holman, T.R. Structure-activity relationship studies of nordihydroguareic acid inhibitors towards soybean, 12-human, and 15-human lipoxygenase. *J. Med. Chem.*, 45 (2002) 2659-2661.
- Williamson, G.; Day, A.J.; Plumb, G.W.; Couteau, D. Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem. Soc. Trans.*, 28 (2000) 16-22.
- Winkelmann, I.; Naessl, 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. *Internat. J. Cancer*, 122 (2008) 2223-2232.
- Winter, J.; Popoff, M.R.; Grimont, P.; Bokkenheuser, V.D. *Clostridium orbiscindens* sp. nov., a human intestinal bacterium capable of cleaving the flavonoid C-ring. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 41 (1991) 355-357.

Wippich, N., Nachweismöglichkeiten reaktiver Sauerstoffspezies am Beispiel der Xanthin- und der NAD(P)H-Oxidase, *Dissertation*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2003).

Xie, D.-Y.; Dixon, R.A. "Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers?" *Phytochemistry*, 66 (2005) 2127-2144.

Xu, Z.-R.; Lu, Y.-N.; Chai, X.-Y.; Ren, H.-Y.; Tu, P.-F. Chemical constituents from *Xylosma controversum*. *J. Chin. Pharm. Sci.*, 16 (2007) 218-222.

Yamamoto, S., Suzuki, H., Ueda, N. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prog. Lipid. Res.*, 36 (1997) 23-41.

Yu, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, 74 (1994) 139-162.

Zarkovic, N. Antioxidants in the prevention and chemotherapy of tumors. *Pharm. Ztg.*, 145 (2000) 11-15.

Zhang, B.; Rusciano, D.; Osborne, N.N. Orally administered epigallocatechin gallate attenuates retinal neuronal death in vivo and light-induced apoptosis in vitro. *Brain Res.*, 1198 (2008) 141-152.

Zhu, Q.Y.; Zhang, A.; Tsang, D.; Huang, Y.; Chen, Z. Stability of Green Tea Catechins. *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 4624-4628.

Zhu, Q.Y.; Holt, R.R.; Lazarus, S.A.; Ensunsa, J.L.; Hammerstone, J.F.; Schmitz, H.H.; Keen, C.L. Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 1700-1705.

Zur Hausen, H. *Infections causing human cancer*. (zur Hausen, H., Ed.), 1. Aufl., Wiley VCH, Weinheim (2006) I-XIV.

7 Anhang

Tabelle 7.1: Catechin-Stabilitätsversuche: Mittelwerte (n=2) und SD [in %]

Formiat-Puffer (c = 0.1 mg/mL)							Phosphat-Puffer (c = 0.1 mg/mL)							Hepes-Puffer (c = 0.1 mg/mL)							Carbonat-Puffer (c = 0.1 mg/mL)						
t [d]	pH 2.5		pH 3.5		pH 4.5		t [d]	pH 6.4		pH 7.4		pH 8.4		t [d]	pH 6.4		pH 7.4		pH 8.4		t [d]	pH 9.5		pH 10.5		pH 11.5	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD		MW	SD	MW	SD	MW	SD		MW	SD	MW	SD	MW	SD		MW	SD	MW	SD	MW	SD
0	100.00	1.28	100.00	8.E-04	100.00	4.05	0	100.00	9.86	100.00	4.E-04	100.00	5.26	0	100.00	0.00	100.00	2.E-04	100.00	3.90	0	100.00	16.95	100.00	0.00	0.00	0.00
1	84.62	1.52	97.40	4.E-04	110.81	28.05	1	92.96	7.58	70.00	6.E-05	57.89	13.64	1	95.77	5.88	71.43	6.E-05	59.74	10.87	1	0.00	0.00	0.00	0.00		
2	93.59	8.22	90.91	4.E-04	89.19	9.09	2	91.55	4.62	60.00	3.E-04	25.00	10.53	2	77.46	1.82	66.23	5.E-05	38.96	0.00	2						
4	105.13	14.63	88.31	7.E-05	105.41	14.10	4	80.28	8.77	41.11	7.E-05	3.95	33.33	4	64.79	0.00	44.16	1.E-04	6.49	0.00	4						
6	89.74	1.43	98.70	1.E-03	102.70	11.84	6	81.69	8.62	37.78	2.E-04	2.63	0.00	6	54.93	25.64	27.27	1.E-04	0.00	0.00	6						
10	116.67	6.59	94.81	4.E-04	109.46	0.00	10	39.44	7.14	10.00	0.00	0.00	0.00	10	47.89	55.88	10.39	2.E-05	0.00	0.00	10						

Formiat-Puffer (c = 0.5 mg/mL)							Phosphat-Puffer (c = 0.5 mg/mL)							Hepes-Puffer (c = 0.5 mg/mL)							Carbonat-Puffer (c = 0.5 mg/mL)						
t [d]	pH 2.5		pH 3.5		pH 4.5		t [d]	pH 6.4		pH 7.4		pH 8.4		t [d]	pH 6.4		pH 7.4		pH 8.4		t [d]	pH 9.5		pH 10.5		pH 11.5	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD		MW	SD	MW	SD	MW	SD		MW	SD	MW	SD	MW	SD		MW	SD	MW	SD	MW	SD
0	100.00	1.79	100.00	3.50	100.00	1.37	0	100.00	5.41	100.00	12.17	100.00	0.00	0	100.00	5.09	100.00	1.17	100.00	1.67	0	100.00	1.25	100.00	5.67	100.00	4.85
1	95.41	0.27	98.92	6.27	105.46	11.14	1	98.65	7.95	93.39	7.08	69.00	3.52	1	98.66	1.09	95.32	5.52	60.05	4.38	1	4.05	46.15	0.00	0.00	0.00	0.00
2	109.44	17.95	111.05	24.51	95.63	14.57	2	105.68	21.74	76.98	1.03	52.29	17.01	2	86.33	11.49	82.75	6.01	48.09	7.96	2	0.00	0.00				
4	111.48	6.86	100.54	11.80	103.55	4.75	4	84.32	28.21	58.47	4.52	24.53	16.48	4	76.68	2.80	68.13	8.15	20.81	14.94	4						
6	97.96	2.60	97.57	3.31	100.82	2.71	6	81.89	15.84	56.35	3.76	12.13	8.89	6	78.28	0.34	54.09	22.70	1.44	0.00	6						
10	97.45	2.36	109.97	6.37	104.92	1.56	10	34.59	1.56	23.28	6.82	2.43	11.11	10	68.63	12.11	30.70	20.95	0.00	0.00	10						

Formiat-Puffer (c = 1.0 mg/mL)							Phosphat-Puffer (c = 1.0 mg/mL)							Hepes-Puffer (c = 1.0 mg/mL)							Carbonat-Puffer (c = 1.0 mg/mL)						
t [d]	pH 2.5		pH 3.5		pH 4.5		t [d]	pH 6.4		pH 7.4		pH 8.4		t [d]	pH 6.4		pH 7.4		pH 8.4		t [d]	pH 9.5		pH 10.5		pH 11.5	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD		MW	SD	MW	SD	MW	SD		MW	SD	MW	SD	MW	SD		MW	SD	MW	SD	MW	SD
0	100.00	15.76	100.00	2.67	100.00	14.89	0	100.00	5.12	100.00	1.53	100.00	7.57	0	100.00	5.19	100.00	0.71	100.00	10.70	0	100.00	2.35	100.00	0.62	100.00	14.91
1	97.39	1.02	106.23	10.89	100.24	5.54	1	99.61	7.52	92.07	4.58	80.89	15.30	1	82.85	11.37	93.47	15.35	86.00	2.76	1	17.84	18.42	2.07	0.00	0.00	0.00
2	112.16	0.22	100.25	1.39	88.89	17.69	2	93.30	5.63	79.41	7.09	57.81	1.04	2	81.76	12.56	79.12	2.87	56.54	10.75	2	3.13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	130.89	11.00	98.35	1.16	91.61	2.97	4	87.65	10.19	70.08	4.20	30.89	15.18	4	69.32	2.09	72.59	4.70	27.21	6.31	4	0.00	0.00				
6	90.32	4.67	104.70	10.68	93.14	3.05	6	82.52	20.06	72.51	17.11	21.51	2.23	6	66.55	8.71	57.81	5.16	2.77	14.29	6						
10	110.42	21.57	103.18	1.48	93.03	2.16	10	38.76	1.69	24.94	4.10	10.82	1.11	10	64.73	0.93	32.81	9.96	0.00	0.00	10						

Tabelle 7.2: Bestimmung der Reaktionsordnung (s. Abbildung 3.1)

Phosphat-Puffer (c = 0.1 mg/mL)					Phosphat-Puffer (c = 0.5 mg/mL)					Phosphat-Puffer (c = 1.0 mg/mL)				
pH 7.4					pH 7.4					pH 7.4				
t [d]	MW [%]	A	ln A	1/A	t [d]	MW [%]	A	ln A	1/A	t [d]	MW [%]	A	ln A	1/A
0	100.00	0.90	-0.11	1.11	0	100.00	3.78	1.33	0.26	0	100.00	7.82	2.06	0.13
1	70.00	0.63	-0.46	1.59	1	93.39	3.53	1.26	0.28	1	92.07	7.20	1.97	0.14
2	60.00	0.54	-0.62	1.85	2	76.98	2.91	1.07	0.34	2	79.41	6.21	1.83	0.16
4	41.11	0.37	-0.99	2.70	4	58.47	2.21	0.79	0.45	4	70.08	5.48	1.70	0.18
6	37.78	0.34	-1.08	2.94	6	56.35	2.13	0.76	0.47	6	72.51	5.67	1.74	0.18
10	10.00	0.09	-2.41	11.11	10	23.28	0.88	-0.13	1.14	10	24.94	1.95	0.67	0.51

Tabelle 7.3: Einfluß der Temperatur auf (+)-Catechin (s. Abbildung 3.2)

x-Achse (h)	30°C			50°C		
	%	$A_{EC}/A_{Standard}$	ln	%	$A_{EC}/A_{Standard}$	ln
0	100.00	14.26	2.79	100.00	14.04	2.64
1	100.37	14.31	2.66	94.11	13.21	2.58
2	96.75	13.80	2.76	91.32	12.82	2.55
4	90.32	12.88	2.56	82.84	11.63	2.45
6	90.62	12.92	2.56	68.96	9.68	2.27
8	93.26	13.30	2.59	68.78	9.66	2.27

x-Achse (h)	60°C			70°C		
	%	$A_{EC}/A_{Standard}$	ln	%	$A_{EC}/A_{Standard}$	ln
0	100.00	14.10	2.65	100.00	14.09	2.65
1	94.81	13.36	2.59	83.63	11.78	2.47
2	71.25	10.04	2.31	81.40	11.47	2.44
4	64.75	9.13	2.21	58.45	8.24	2.11
6	57.97	8.17	2.10	56.37	7.94	2.07
8	54.92	7.74	2.05	52.29	7.37	2.00

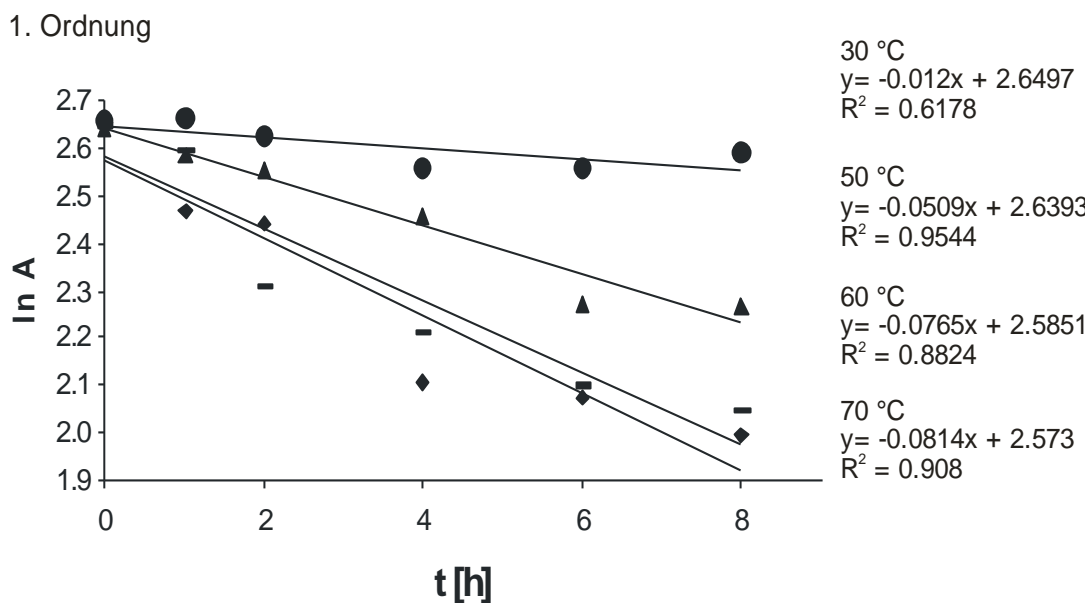


Abbildung 7.1: Gehalt von (+)-Catechin (1) durch Inkubation in Kalium-Phosphat-Puffer pH 7.4 über 8 h bei 30°C (●), 50°C (▲), 60°C (-) und 70°C (◆), HPLC-System 1 (s. 4.2.1). als Reaktion 1. Ordnung mit Geradengleichung der Ausgleichsgerade und Bestimmtheitsmaß R^2 .

Tabelle 7.4: Einfluß der Temperatur auf den Abbau von (+)-Catechin (k ist die Steigung der Ausgleichsgeraden in Abbildung 7.1)

T [°C]	T [K]	1/T	k	ln k
30	303	0.0033	0.012	-4.42
50	323	0.0031	0.0509	-2.98
60	333	0.003	0.0765	-2.57
70	343	0.00292	0.0814	-2.51

Tabelle 7.5: Einfluß der Temperatur auf die Bildung von BC und EC (s. Abbildung 3.3)

x-Achse (h)	30°C		40°C		50°C	
	$A_{BC}/A_{Standard}$	$A_{EC}/A_{Standard}$	$A_{BC}/A_{Standard}$	$A_{EC}/A_{Standard}$	$A_{BC}/A_{Standard}$	$A_{EC}/A_{Standard}$
0	0.000	0.000	0.011	0.01	0.000	0.000
1	0.039	0.013	0.073	0.07	0.201	0.139
2	0.082	0.037	0.150	0.12	0.441	0.419
4	0.118	0.058	0.312	0.28	0.606	0.899
6	0.176	0.084	0.527	0.44	0.590	1.098
8	0.231	0.105	0.695	0.56	0.628	1.388

x-Achse (h)	60°C		70°C	
	$A_{BC}/A_{Standard}$	$A_{EC}/A_{Standard}$	$A_{BC}/A_{Standard}$	$A_{EC}/A_{Standard}$
0	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.433	1.149	0.331	0.962
2	0.480	1.466	0.342	3.250
4	0.453	2.330	0.354	3.781
6	0.432	2.678	0.436	3.717
8	0.429	2.851	0.489	3.319

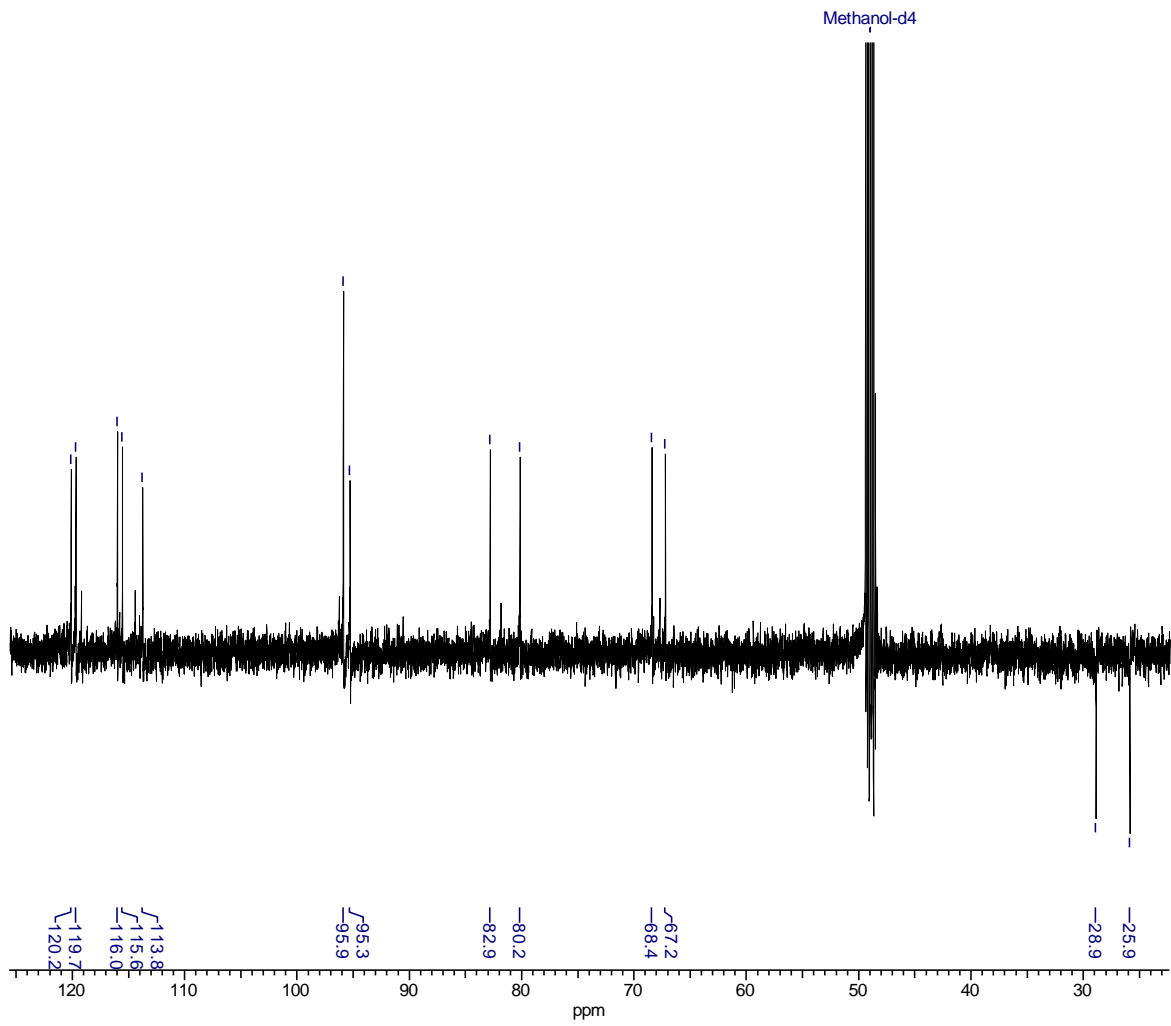


Abbildung 7.2: Dept-135 NMR Spektrum von Dehydrodicatechin (s. 3.2.7)

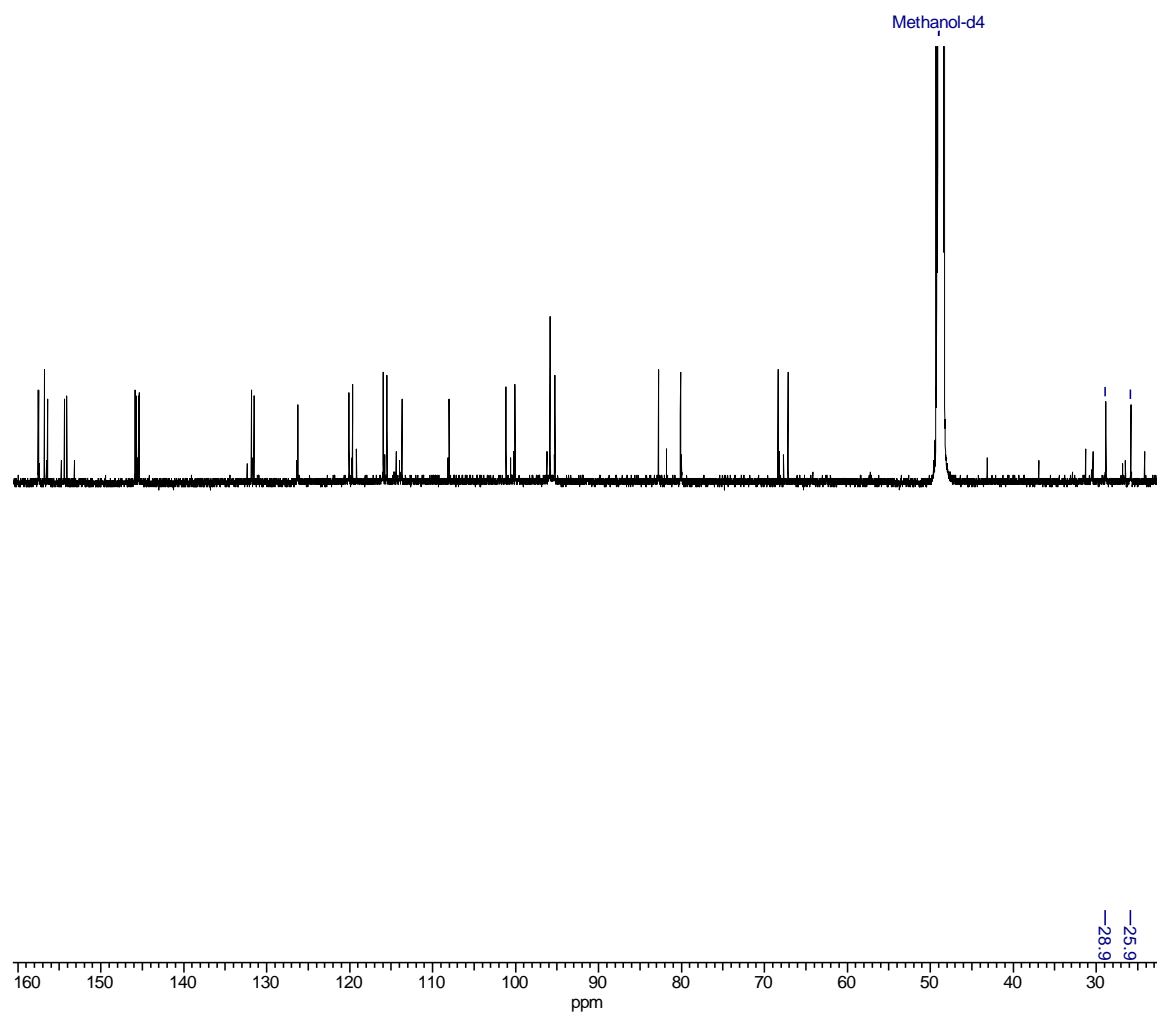


Abbildung 7.3: ^{13}C Spektrum von Dehydrodicathechin (s. 3.2.7).

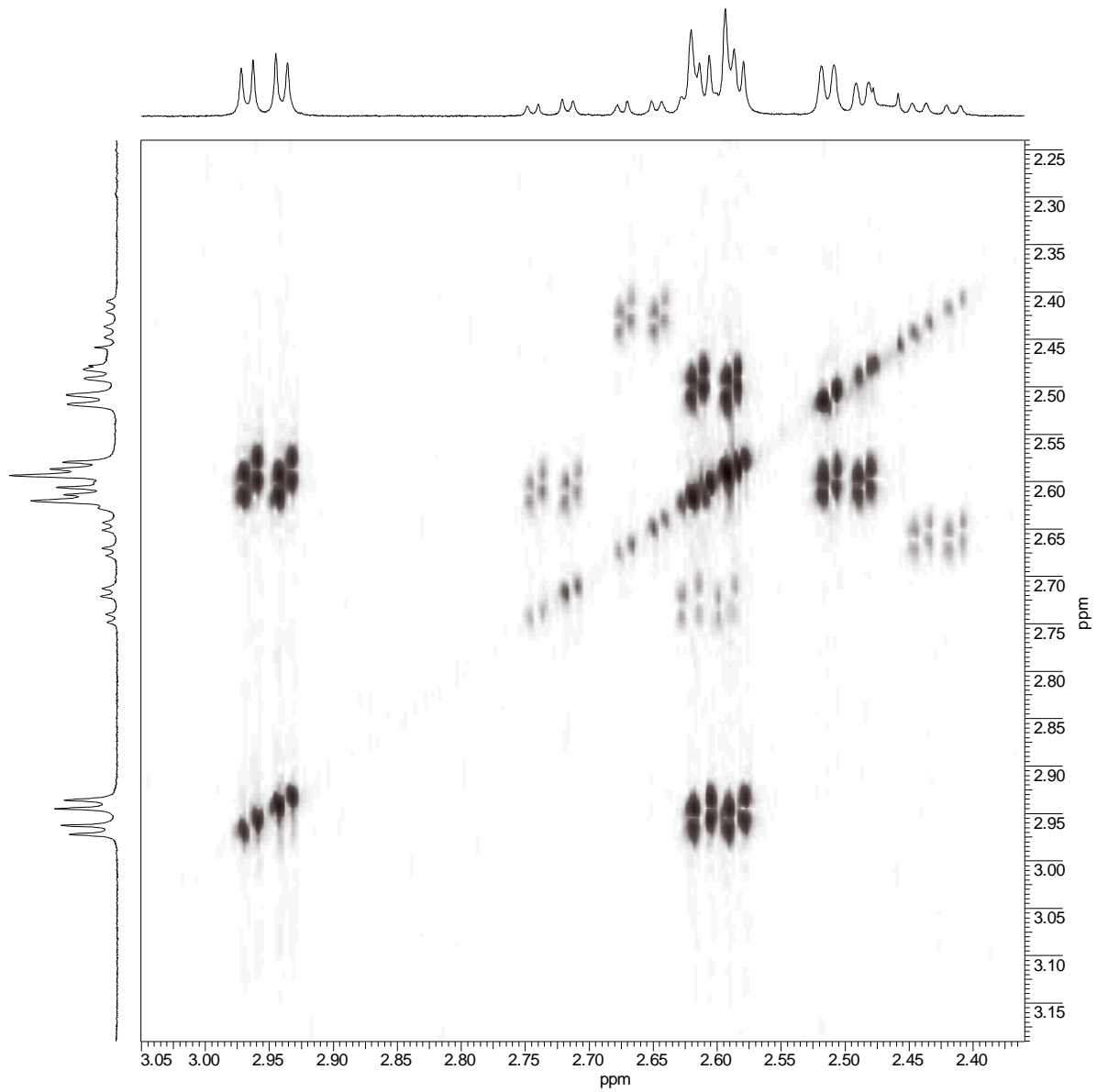


Abbildung 7.4: COSY-Spektrum von Dehydrodicatichin (s. 3.2.7).

