

Untersuchungen zum Metabolismus,  
zur Bioverfügbarkeit und  
zur antioxidativen Wirkung  
von Anthocyanen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)  
vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemiker

**Jens Fleischhut**

aus Heilbronn

Dekan: Prof. Dr. Manfred M. Kappes

Referent: Prof. Dr. Sabine E. Kulling

Korreferent: Prof. Dr. Stefan Bräse

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 2004

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Juli 2001 und September 2004 im Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe angefertigt.

Frau Prof. Dr. Sabine E. Kulling danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, ihre sehr wohlwollende und allzeit freundliche Unterstützung sowie für die großzügig gewährten Freiräume bei der Durchführung dieser Arbeit.

**Für meinen Opa**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und theoretische Grundlagen</b>	<b>1</b>
1.1	Allgemeines . . . . .	1
1.2	Die Familie der Flavonoide . . . . .	1
1.3	Chemische Eigenschaften der Anthocyane . . . . .	2
1.3.1	Chemische Struktur . . . . .	2
1.3.2	Strukturelle Veränderungen in Abhängigkeit vom pH-Wert . . . . .	4
1.3.3	Zerfall der Anthocyanidine . . . . .	5
1.3.4	Bildung von Metallkomplexen . . . . .	6
1.4	Physikalische Eigenschaften der Anthocyane . . . . .	7
1.4.1	Absorptions-Spektren der Anthocyane . . . . .	7
1.4.2	Copigmentierung von Anthocyanen . . . . .	7
1.5	Natürliches Vorkommen der Anthocyane und Gehalte in Lebensmitteln . . . . .	8
1.6	Physiologische Eigenschaften der Anthocyane . . . . .	10
1.6.1	Antioxidative Eigenschaften . . . . .	11
1.6.2	Schutz vor koronaren Herzerkrankungen . . . . .	13
1.6.3	Schutz vor Krebserkrankungen . . . . .	15
1.6.4	Antibakterielle und antivirale Wirkung, Verbesserung der Nachtsicht und sonstige Effekte . . . . .	17
1.7	Bisherige Erkenntnisse zur Bioverfügbarkeit und zum Metabolismus der An- thocyane . . . . .	19
1.7.1	Aufnahme mit der Nahrung . . . . .	19
1.7.2	Bioverfügbarkeitsstudien . . . . .	20
1.7.3	Untersuchungen zum Metabolismus und den Aufnahme- und Vertei- lungsmechanismen . . . . .	22
<b>2</b>	<b>Problemstellung</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>26</b>
3.1	Entwicklung und Etablierung geeigneter analytischer Methoden . . . . .	26
3.1.1	Etablierung einer geeigneten Festphasenextraktion . . . . .	26
3.1.2	Etablierung einer geeigneten Flüssig-Flüssig-Extraktion . . . . .	27
3.1.3	Etablierung einer geeigneten HPLC-Methode . . . . .	27
3.1.4	Etablierung einer LC/MS-Methode und Strukturaufklärung verschie- dener natürlicher Anthocyane . . . . .	27
3.1.4.1	Strukturaufklärung . . . . .	28

3.1.4.2	Massenübersicht . . . . .	30
3.1.5	Etablierung einer GC/MS-Methode zum Nachweis phenolischer Säuren	31
3.1.6	Einfluss dreiwertiger Metallkationen auf die enzymatische Spaltung .	32
3.2	Allgemeine Untersuchungen zu Anthocyanen . . . . .	34
3.2.1	Stabilität der Aglykone bei unterschiedlichen pH-Werten und Einfluss dreiwertiger Metallkationen auf die Stabilität . . . . .	34
3.2.2	Verhalten der Anthocyane bei enzymatischen Umsetzungen . . . . .	36
3.2.2.1	Spaltung mit $\beta$ -Glucuronidase . . . . .	36
3.2.2.2	Spaltung mit $\beta$ -Glucosidase . . . . .	37
3.3	<i>in vitro</i> -Untersuchungen zum Metabolismus . . . . .	37
3.3.1	Phase I-Reaktionen . . . . .	37
3.3.1.1	Cytochrom P450-abhängige Oxidationen . . . . .	37
3.3.1.2	Intestinaler Metabolismus . . . . .	38
3.3.2	Phase II-Reaktionen . . . . .	41
3.3.2.1	Methylierung . . . . .	41
3.3.2.2	Glucuronidierung . . . . .	43
3.4	<i>in vivo</i> -Untersuchungen . . . . .	48
3.4.1	Tierexperimentelle Studien an Ratten . . . . .	48
3.4.1.1	Aufnahme von phenolischen Säuren . . . . .	48
3.4.1.2	Aufnahme von Anthocyanen . . . . .	52
3.4.2	Humanversuch – Pilotversuch . . . . .	60
3.4.2.1	Urin . . . . .	60
3.4.2.2	Plasma . . . . .	63
3.5	Antioxidative Eigenschaften der Anthocyane und ihrer Metabolite . . . . .	68
3.5.1	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)-Assay . . . . .	68
3.5.1.1	Reaktionskinetiken und Methodenoptimierung . . . . .	68
3.5.1.2	Bestimmung der TEAC-Werte . . . . .	70
3.5.1.3	Synergismusuntersuchungen . . . . .	71
3.5.2	Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP)-Assay . . . . .	71
3.5.2.1	Reaktionskinetiken und Methodenoptimierung . . . . .	71
3.5.2.2	Kalibrierung . . . . .	73
3.5.2.3	Bestimmung der EC <sub>1</sub> -Werte . . . . .	73
3.5.2.4	Synergismusuntersuchungen . . . . .	75
3.5.3	Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)-Assay . . . . .	76
3.5.3.1	Berechnung der Trolox-Äquivalente . . . . .	76
3.5.3.2	Vergleich der Ergebnisse der beiden Fluoreszenzfarbstoffe . .	77
3.5.3.3	Synergismusuntersuchungen . . . . .	78

3.5.4	Vergleich der Ergebnisse . . . . .	78
3.5.5	Messung einer Modell-Plasmalösung . . . . .	79
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
4.1	Stabilität und Optimierung der analytischen Methoden . . . . .	81
4.2	Metabolismus, Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik der Anthocyane . . .	82
4.2.1	<i>in vitro</i> -Untersuchungen . . . . .	82
4.2.2	<i>in vivo</i> -Untersuchungen . . . . .	85
4.2.3	Zusammenfassende Erkenntnisse aus den <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> - Untersuchungen . . . . .	90
4.2.4	Weiterer Forschungsbedarf . . . . .	92
4.3	Biologische Wirkung . . . . .	94
4.3.1	Antioxidative Eigenschaften . . . . .	94
4.3.1.1	Gegenüberstellung der eingesetzten Testsysteme . . . . .	94
4.3.1.2	Struktur-Wirkungs-Beziehungen . . . . .	95
4.3.1.3	Synergismusuntersuchungen . . . . .	98
4.3.2	Beurteilung der biologischen Wirkung und gesundheitsprotektiven Re- levanz einer anthocyanreichen Ernährung . . . . .	98
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>105</b>
6.1	Geräte und Chemikalien . . . . .	105
6.1.1	Liste der verwendeten Geräte . . . . .	105
6.1.2	Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien . . . .	106
6.1.2.1	Allgemeine Chemikalien . . . . .	106
6.1.2.2	<i>in vitro</i> -Untersuchungen . . . . .	108
6.1.2.3	<i>in vivo</i> -Untersuchungen . . . . .	109
6.1.2.4	Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung . . . . .	109
6.2	Methoden . . . . .	111
6.2.1	Analytik . . . . .	111
6.2.1.1	Gewinnung von Lebensmittelextrakten . . . . .	111
6.2.1.2	Isolierung von Anthocyanen mittels HSCCC . . . . .	111
6.2.1.3	Festphasenextraktion . . . . .	111
6.2.1.4	Flüssig-Flüssig-Extraktion . . . . .	112
6.2.1.5	HPLC/DAD und HPLC/MS . . . . .	112
6.2.1.6	GC/MS . . . . .	114
6.2.2	Allgemeine Untersuchungen . . . . .	115

6.2.2.1	Stabilitätsuntersuchungen . . . . .	115
6.2.2.2	Enzymatische Inkubationen mit $\beta$ -Glucosidase und $\beta$ - Glucuronidase . . . . .	115
6.2.3	<i>in vitro</i> -Metabolismus-Assays . . . . .	116
6.2.3.1	Mikrosomale Umsetzung . . . . .	116
6.2.3.2	Anaerobe Inkubation mit Fäzes-Suspensionen . . . . .	119
6.2.3.3	Methylierung durch Inkubation mit COMT/SAM . . . . .	120
6.2.3.4	Glucuronidierungsreaktionen . . . . .	121
6.2.4	<i>in vivo</i> -Studien . . . . .	122
6.2.4.1	Tierversuche . . . . .	122
6.2.4.2	Humanversuch . . . . .	127
6.2.5	Antioxidativitäts-Assays . . . . .	131
6.2.5.1	TEAC-Assay . . . . .	131
6.2.5.2	FRAP-Assay . . . . .	133
6.2.5.3	ORAC-Assay . . . . .	135
6.2.5.4	Synergismusuntersuchungen . . . . .	139
6.2.5.5	Statistische Methoden zur Signifikanzüberprüfung . . . . .	139
<b>A</b>	<b>Anhang</b>	<b>141</b>
A.1	Übersichtsdaten . . . . .	141
A.2	Massenspektren . . . . .	143
A.3	Sonstiges . . . . .	145
<b>B</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>146</b>
<b>C</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>150</b>
<b>D</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>152</b>
<b>E</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>176</b>
<b>F</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>178</b>

## Wissenschaftliche Abkürzungen

*	signifikant mit $P < 0,05$
**	signifikant mit $P < 0,01$
aA	acyliertes Anthocyan
ABAP	2,2-Azobis(2-amidinopropan) Dihydrochlorid
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz
AC	Anthocyan
AM	Abweichung vom Mittelwert
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
AP-1	Activator protein-1
API-ES	atmospheric pressure ionisation electrospray
ASC	Ascorbinsäure
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
bidest.	bidestilliert
BMI	Body Mass Index
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CCC	Countercurrent Chromatography
COMT	Catechol- <i>O</i> -methyltransferase
COX	Cyclooxygenase (Prostaglandin-Endoperoxid H-Synthase)
CS	Cumarsäure
Cy	Cyanidin
Cy3ara	Cyanidin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-arabinosid
Cy3glc	Cyanidin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid (Kuromanin)
Cy3gal	Cyanidin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-galactosid (Idaein)
Cy3rut	Cyanidin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-rutinosid
Cy3sam	Cyanidin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-sambubiosid
Cy35d-glc	Cyanidin-3,5- <i>O</i> - $\beta$ -D-diglucosid (Cyanin)
Cy-rut/glc	Cyanidin-3-rutinosid-5-glucosid
Cy-sam/glc	Cyanidin-3-sambubiosid-5-glucosid
CYP-450	Cytochrom P-450
DAD	Diodenarraydetektor
Del	Delphinidin
Del3glc	Delphinidin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid
Del3rut	Delphinidin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-rutinosid

DP	degeneration product (Abbauprodukt)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGC(g)	Epigallocatechin(gallat)
EGFR	Epidermal Growth-factor Receptor
EI	electron impact (Elektronenstoß)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
FIA	Fließmittelinjektionsanalyse
FL	Fluorescein
FRAP	Ferric Reducing Activity of Plasma <i>oder</i> Ferric Reducing/Antioxidant Power
FS	Ferulasäure
GC	Gaschromatographie
glc	Glucose
HDL	high density lipoproteins (Lipoproteine hoher Dichte)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HSCCC	High Speed Countercurrent Chromatography
Hkt	Hämatokrit-Wert
IS	Interner Standard
JNK/SAPK	c-Jun N-terminale Kinase/Stress-aktivierte Protein-Kinase
KG	Körpergewicht
KS	Kaffeensäure
LC	Liquid Chromatography
LDL	low density lipoproteins (Lipoproteine niedriger Dichte)
M	Molekulargewicht
m/z	Masse / Ladungsverhältnis
Mal	Malvidin
MAL	Malonsäure
Mal3glc	Malvidin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid (Oenin)
Mal35d-glc	Malvidin-3,5- <i>O</i> - $\beta$ -D-diglucosid (Malvin)
MAP	mitogen-activated protein (Mitogen-aktiviertes Protein)
mAU	milli absorption units (Milliabsorptionseinheiten)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MW	arithmetischer Mittelwert
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Magnetische Kernresonanz)
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PBS-Puffer	Phosphate Buffered Saline (Phosphatpuffer mit 0,15 M NaCl, pH 7,3)
PE	R-Phycoerythrin
Pel	Pelargonidin
Pel3ara	Pelargonidin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-arabinosid
Pel3glc	Pelargonidin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid (Callistephin)
Pel-soph/glc	Pelargonidin-3-sophorosid-5-glucosid
Peo	Peonidin
Peo3glc	Peonidin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid
Peo35d-glc	Peonidin-3,5- <i>O</i> - $\beta$ -D-diglucosid
Pet	Petunidin
Pet3glc	Petunidin-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucosid
PCS	Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure)
ROS	Reaktive(s) Sauerstoffspezies
RP	reversed phase (Umkehrphase)
RT	Raumtemperatur
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
rut	Rutinose
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
sam	Sambubiose
SD	Standardabweichung
SIM	selected ion monitoring
SOD	Superoxid-Dismutase
soph	Sophorose
SPE	solid phase extraction (Festphasenextraktion)
SS	Syringasäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure)
TBARS	thiobarbituric acid-reactive substances (Thiobarbitursäure-reaktive Verbindungen)
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Total ion current (Totalionenstrom)
TPA	12- <i>O</i> -Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TPTZ	2,4,6-Tri-(2-pyridyl)-s-triazin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trolox	( $\pm$ )-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (wasserlösliches Vitamin E-Analogen)

U	Units (Enzymeinheit)
UDPGA	Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure
UDPGlc	Uridin-5'-diphosphat-glucose
UGT	Uridin-Glucuronyl-Transferase
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VS	Vanillinsäure (4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure)
WF	Wiederfindung

# 1 Einleitung und theoretische Grundlagen

## 1.1 Allgemeines

Schon seit einigen Jahren stellen epidemiologische Studien wie die Zutphen-Studie [1], die Iowa Women's Health Study [2], die Adelaide Case-Control Study [3] oder die Women's Health Study [4] sowie zahlreiche weitere Untersuchungen [5–11] eine Verbindung zwischen einer Obst- und Gemüse-reichen Ernährung und einer verminderten Inzidenz für Krebs, kardiovaskuläre und andere chronische Krankheiten her. Neben Ballaststoffen und essentiellen Mikronutrienten wie Ascorbaten, Tocopherolen und Selen werden dafür v.a. sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe verantwortlich gemacht. Sie werden im Gegensatz zu den primären Stoffwechselprodukten wie Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen nicht im Primärstoffwechsel gebildet oder verbraucht und kommen in den meisten Lebensmitteln auch nur als Minorkomponenten vor. Zu dieser Gruppe gehören zahlreiche polyphenolische Verbindungen, darunter auch die zur Familie der Flavonoide gehörenden Anthocyane. Ihr Name leitet sich von den griechischen Wörtern *anthos* (für Blüte) und *kyanos* (für blau) ab. Da diesen Stoffen gesundheitsfördernde Wirkungen zugeschrieben werden, gewinnen sie bei der Erzeugung von funktionellen Lebensmitteln oder im Bereich der Nahrungsergänzungsmittel als hochdosierte Supplemente zunehmend an Bedeutung.

Diese Entwicklung schreitet ungeachtet der Tatsache voran, dass häufig weder über die Bioverfügbarkeit und den Metabolismus der eingesetzten Substanzen noch über die tatsächlichen Wirkungen im Körper ausreichend Informationen vorhanden sind. Gerade diese Informationen sind jedoch essentiell, will man eine aussagekräftige Beurteilung der gesundheitsfördernden Relevanz dieser Verbindungen geben.

## 1.2 Die Familie der Flavonoide

Zur heterogenen Stoffklasse der phenolischen Verbindungen, häufig auch als Polyphenole oder Pflanzenphenole bezeichnet, gehört neben den Phenolcarbonsäuren (Hydroxybenzoesäure- und Hydroxyzimtsäurederivate mit C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>- bzw. C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-Grundgerüst), den Lignanen (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-Dimere) und den Stilbenen (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Struktur) auch die große Familie der Flavonoide mit einer C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Struktur. Die Flavonoide leiten sich strukturell vom Flavan (2-Phenylbenzo-dihydropyran) ab (Abb. 1.1) und kommen in fast jeder höheren Pflanze vor, während Tiere nicht in der Lage sind, den Flavan-Grundkörper zu synthetisieren [12]. Die Einordnung der Anthocyane in diese mehr als 6000 Verbindungen umfassende Familie lässt sich am Biosynthese-Weg darstellen (Abb. 1.2).

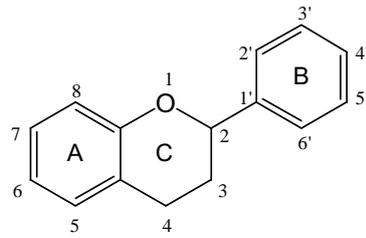


Abbildung 1.1: Strukturformel von Flavan

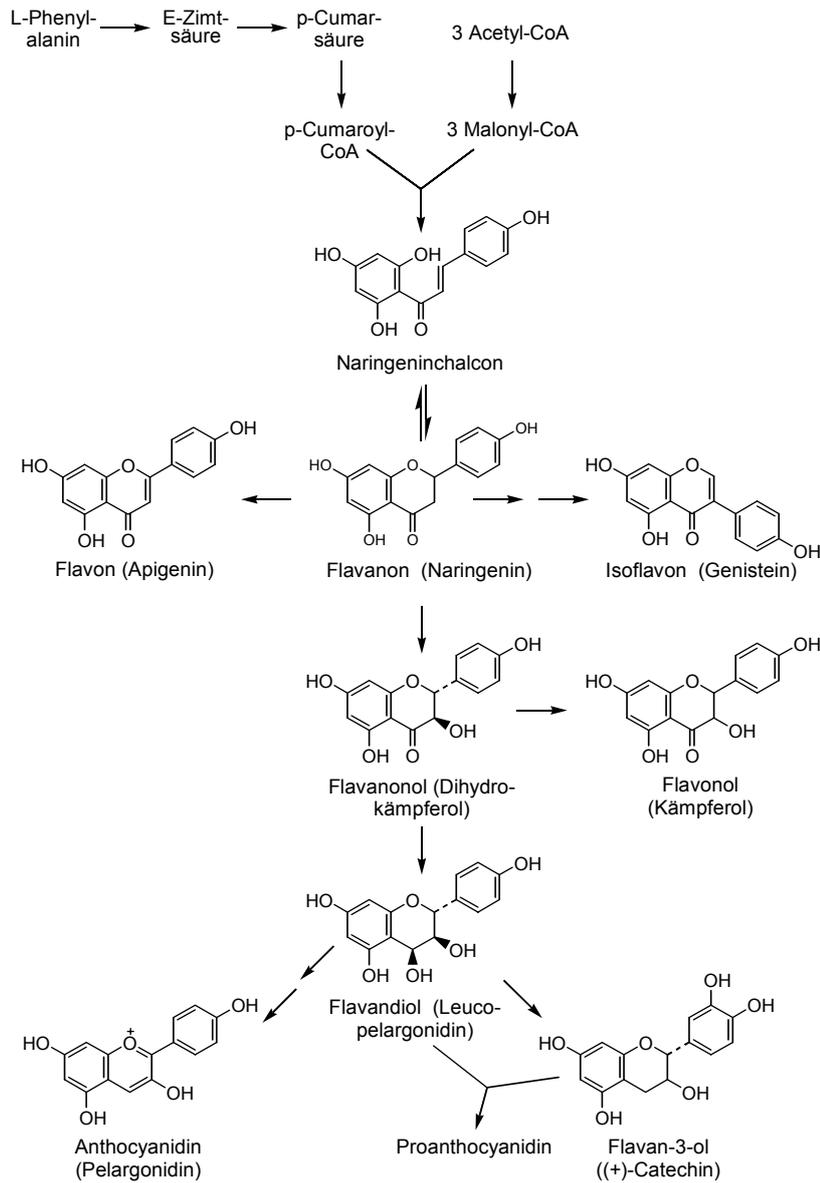


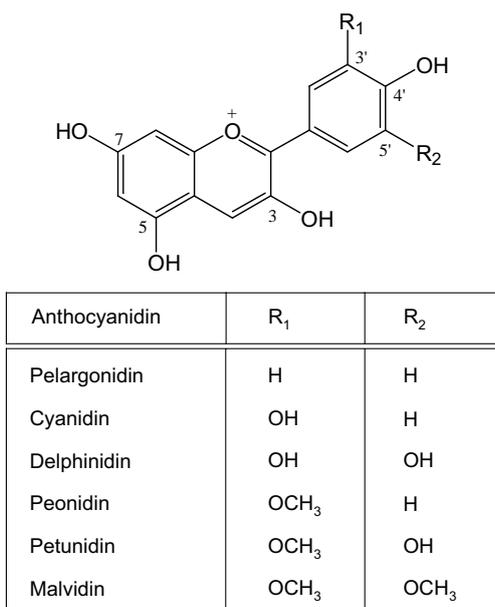
Abbildung 1.2: Biosyntheseweg der verschiedenen Flavonoide (nach [12–14])

## 1.3 Chemische Eigenschaften der Anthocyane

### 1.3.1 Chemische Struktur

Anthocyane (Synonym: Anthocyanine) sind eine Gruppe von über 400 Verbindungen, die sich im phenolischen Kernaglykon und im Glycosylierungsmuster der konjugierenden Zucker

unterscheiden [15]. Der Grundkörper der Anthocyane und die sechs in der Natur am häufigsten vorkommenden Aglykone (*Anthocyanidine*) sind in Abbildung 1.3 dargestellt. Sie variieren lediglich im Hydroxy- und Methoxy-Substitutionsmuster des B-Ringes. Darüber hinaus gibt es jedoch noch weitere, seltene Anthocyanidine, denen z.B. die 3-Hydroxylgruppe fehlt (Apigeninidin, Luteolinidin, Tricetinidin), die eine zusätzliche Hydroxylgruppe am C-6 des A-Ringes (Aurantininidin, 6-Hydroxycyanidin) oder an den Positionen 5 oder 7 im A-Ring statt Hydroxylgruppen Methoxygruppen besitzen (Capensinidin, Europinidin, Hirsutidin, 5-Methylcyanidin, Pulchellidin, Rosinidin) und v.a. in Blütenblättern zu finden sind [15–17].

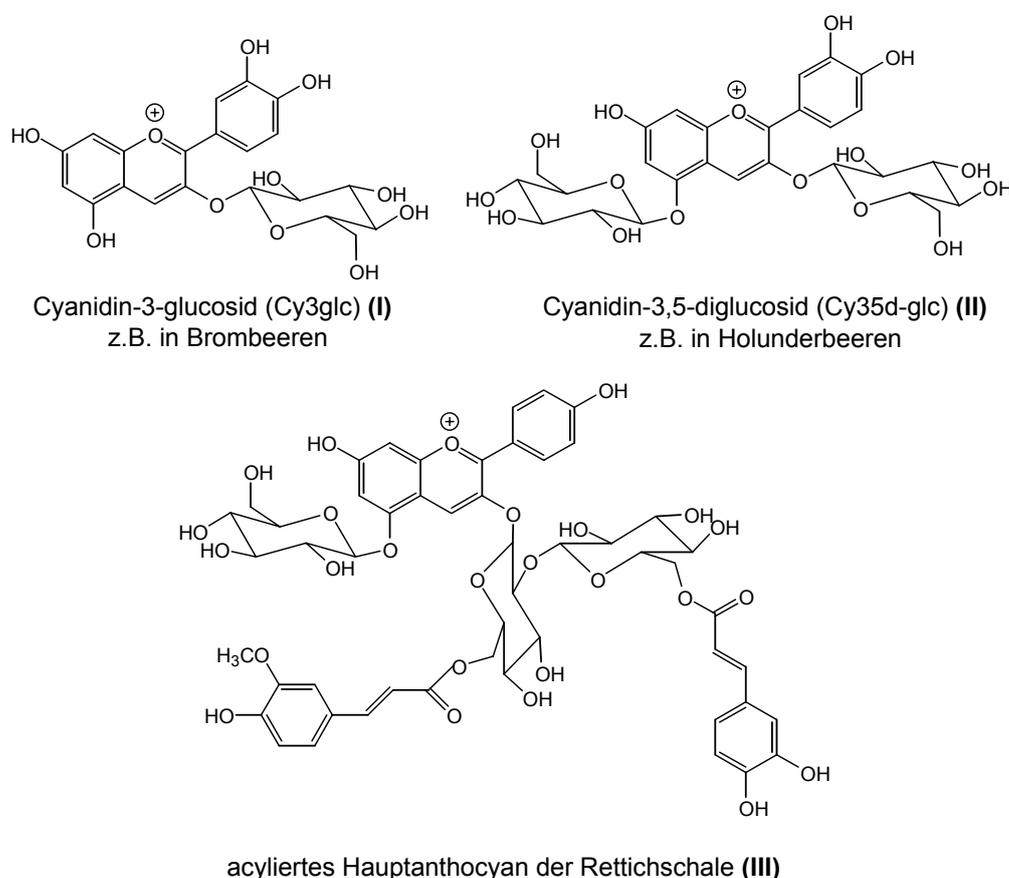


**Abbildung 1.3:** Grundkörper der Anthocyane und die wichtigsten Anthocyanidine in der Natur

In Pflanzen liegen die Anthocyanidine glycosidisch gebunden vor. Als Zuckerkomponenten dieser *Anthocyane* kommen v.a. Glucose, Galactose, Rhamnose, Xylose und Arabinose in Frage, die über eine Sauerstoffbrücke am C3- oder am C3- und C5-Atom gebunden sind. Häufig werden auch Di- und Trisaccharide, die aus Kombinationen dieser vier Zucker bestehen, gefunden [18]. In einigen Fällen findet man auch 3,7-Diglycoside [16, 19] oder Zuckerbindungen an die 4'-Position des B-Rings [20]. Das Gegenion in Pflanzen ist meist Chlorid, die Anthocyane liegen somit als Pyryliumchloride (Chloridsalze des 2-Phenylbenzo-[b]-pyrans) vor [21]. Eine Übersicht über typische natürliche Anthocyane zeigt Abbildung 1.4.

Acylierte Anthocyane enthalten zusätzlich eine oder mehrere Säuren, die über eine Esterbindung an unterschiedliche Stellen des Zuckerrestes gebunden sein können. Dabei kommen aliphatische, phenolische und Hydroxycimtsäuren wie z.B. Essig-, Oxal-, Malon-, Gallus-, Cumar-, Kaffee-, Ferula- oder Sinapinsäure in Frage [13, 18, 19, 22, 23]. Die vielfältigen strukturellen Variationsmöglichkeiten führen zu der großen Anzahl an unterschiedlichen Verbindungen, die z.T. auch hochmolekulare Strukturen besitzen (vgl. Abb. 1.4). Die Säuren

können auch Zuckerreste – selbst wenn sie an verschiedenen Positionen des Anthocyanidins gebunden sind – miteinander verbinden [24–26]. Solche außergewöhnlichen Anthocyane kommen v.a. in Blütenblättern vor [19].

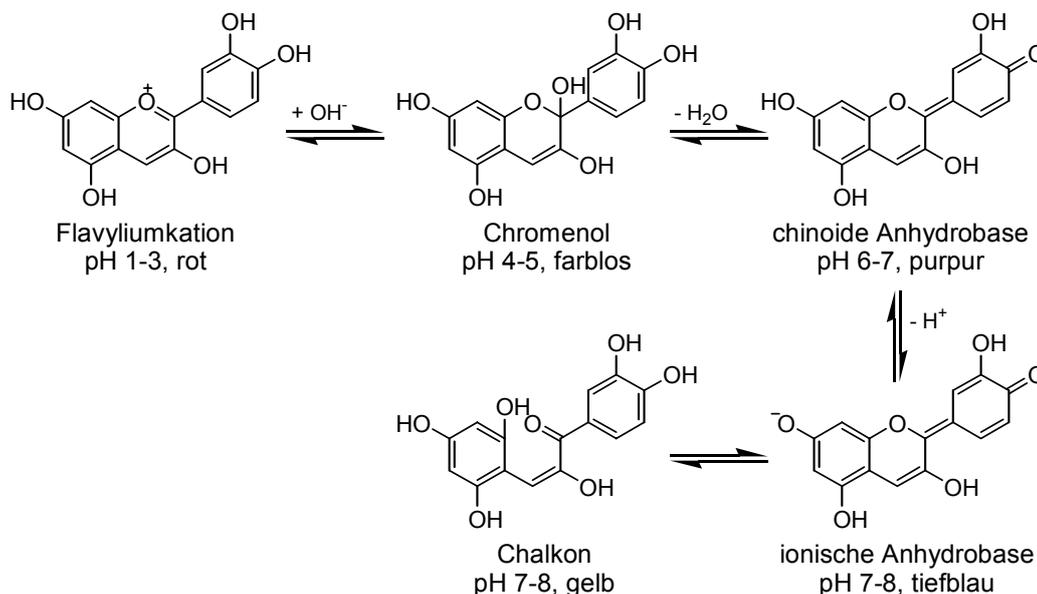


**Abbildung 1.4:** Struktur verschiedener, natürlich vorkommender Anthocyane

### 1.3.2 Strukturelle Veränderungen in Abhängigkeit vom pH-Wert

Im wässrigen Milieu liegen Anthocyane in Abhängigkeit vom pH-Wert in vier verschiedenen Formen nebeneinander vor, wobei je nach pH-Wert das Gleichgewicht in Richtung verschiedener Einzelstrukturen verschoben ist (s. Abb 1.5). Bei sehr niedrigen pH-Werten (pH 1–3) überwiegt das rot-gefärbte, mesomeriestabilisierte Benzopyrylium- oder Flavylumkation. Dieses ist nur bei sehr sauren Milieubedingungen stabil und geht mit steigendem pH-Wert durch Anlagerung eines Hydroxid-Anions an das C2-Atom (s. Abb 1.5) in die farblose Carbinolbase (Chromenol) über. Bei pH-Werten  $> 6$  kommt es durch Wasserabspaltung zur Bildung der chinoiden Form bzw. der ionischen Anhydrobase, was zu einer Farbvertiefung nach purpur führt. Bei pH-Werten oberhalb von 7 kann die tiefblau gefärbte, ionische Anhydrobase durch Ringöffnung in das gelbe Chalkon übergehen. Dieser Farbumschlag tritt bei den einzelnen Anthocyanen bei verschiedenen pH-Werten ein [13, 22, 27–30]. In der Natur

kommen Anthocyane in der Regel im moderat sauren Zellsaft als Flavylumsalz oder als Pseudobase vor [12].



**Abbildung 1.5:** Strukturelle Veränderung der Anthocyane in Abhängigkeit vom pH-Wert

### 1.3.3 Zerfall der Anthocyanidine

Die Anthocyanidine sind chemisch wenig stabil und zerfallen v.a. bei höheren pH-Werten. Zur Chemie des Zerfalls existieren dabei mehrere Theorien [31, 32], von denen die am weitesten akzeptierte in Abbildung 1.6 dargestellt ist [18, 33]. Nach der Ringöffnung entsteht über die Zwischenstufe des  $\alpha$ -Diketons ein Aldehyd und eine phenolische Carbonsäure. Erst die Glycosylierung bedingt eine Stabilität des entstehenden Anthocyanins.

Da der entstehende Aldehyd aus dem A-Ring des Anthocyanins hervorgeht, ist er für alle Aglykone identisch. Dagegen ist die aus dem B-Ring gebildete Carbonsäure für das jeweilige Anthocyanidin charakteristisch (s. Tab. 1.1).

**Tabelle 1.1:** Beim Zerfall wichtiger Anthocyanidine entstehende Carbonsäuren ( $R_1$  und  $R_2$  beziehen sich auf Abb. 1.6)

Anthocyanidin	entstehende Carbonsäure	$R_1$	$R_2$
Cyanidin	Protocatechusäure (PCS)	OH	H
Malvidin	Syringasäure (SS)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Peonidin	Vanillinsäure (VS)	OCH <sub>3</sub>	H
Pelargonidin	4-Hydroxybenzoesäure	H	H

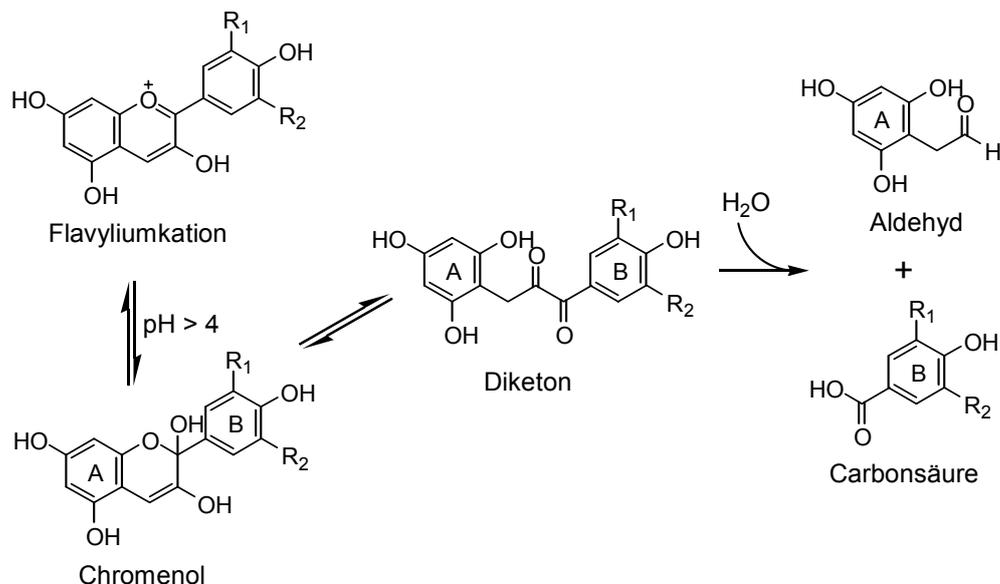


Abbildung 1.6: Zerfall-Mechanismus der Anthocyanidine (nach [31])

Die Zerfallsgeschwindigkeit der Anthocyane nimmt mit steigender Temperatur zu und ist stark vom pH-Wert abhängig. Eine Glycosylierung in der 3-Position zeigt einen deutlich stabilisierenden Effekt auf Anthocyane, auch wenn bei längeren Zeiten auch hier ein Zerfall stattfindet [27]. Acylierungen der Zuckerreste bewirken eine weitere Stabilisierung des Moleküls [34].

### 1.3.4 Bildung von Metallkomplexen

Wie Abbildung 1.7 zeigt, können Anthocyane eine Komplexbildungsreaktion mit dreiwertigen Metallionen (v.a.  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) eingehen, wodurch es zu einer Blauverschiebung (hypsochromer Shift) des Absorptionsspektrums kommt [13]. Dabei werden zwei Anthocyane über ein Metallion komplexiert. Dies ist ein Phänomen, das man auch in der Natur beobachtet. So kann die blaue Farbe der Hortensie (*Hydrangea macrophylla*) auf die Komplexbildung zweier Anthocyan-Moleküle mit dreiwertigem Aluminium zurückgeführt werden [13].

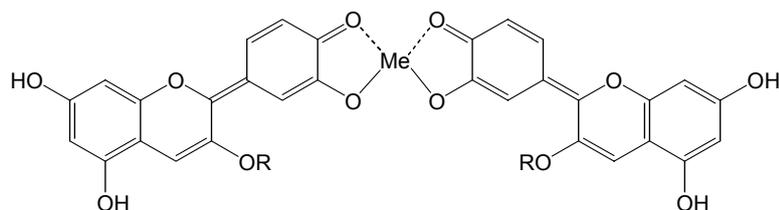
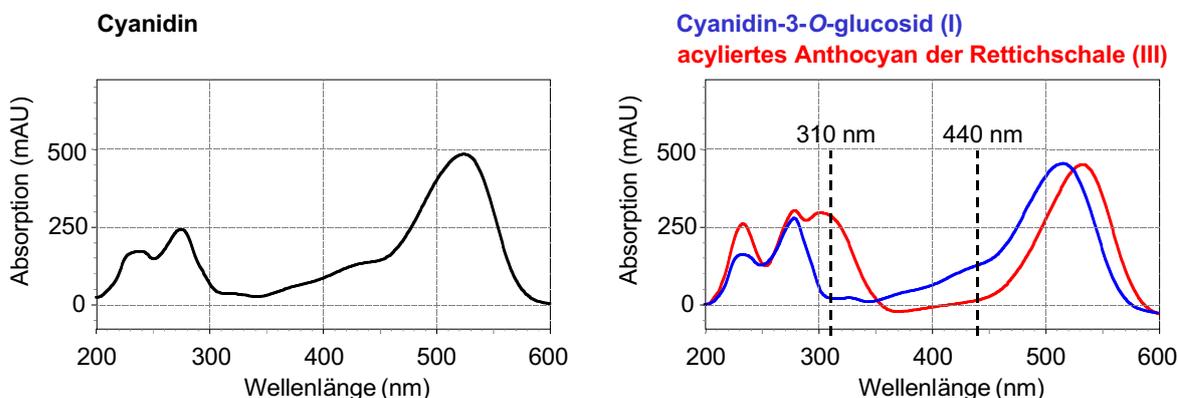


Abbildung 1.7: Komplexbildung der Anthocyane mit dreiwertigen Metallionen

## 1.4 Physikalische Eigenschaften der Anthocyane

### 1.4.1 Absorptions-Spektren der Anthocyane

Anthocyane liegen im sauren Milieu als Flavyliumkation vor, wobei die positive Ladung über das gesamte Molekül mesomerieverteilt ist. Sie zeigen daher neben einem Maximum bei 265–275 nm eine starke Absorptionsbande im sichtbaren Bereich bei einer Wellenlänge von 465–560 nm [21]. Die Absorptionsmaxima sind abhängig vom pH-Wert und der Struktur. So zeigt sich bei zunehmender Hydroxylierung am B-Ring eine Rotverschiebung (bathochromer Shift), Glycosylierung und Methylierung bewirken dagegen eine Blauverschiebung (hypsochromer Shift) [31, 35]. Die Absorption der Anthocyane im sichtbaren Bereich sowie die jeweilige Feinstruktur der Absorptionsspektren werden zur Identifizierung genutzt. Abbildung 1.8 zeigt typische Absorptionsspektren verschiedener Anthocyane, die Hinweise auf die Struktur geben. Wie zu erkennen ist, besitzen 3-Monoglucoside bei 440 nm eine leichte Schulter, die Anthocyanen mit einem Zuckerrest in 5-Position fehlt [36]. Mit Hydroxyzimtsäuren acylierte Anthocyane zeigen neben einem bathochromen Shift um etwa 10 nm ein drittes, schwächeres Maximum bei 310–330 nm [31, 35, 36]. Aus dem Verhältnis der Absorption bei 310 nm und der maximalen Absorption im sichtbaren Bereich lassen sich Rückschlüsse auf das molare Verhältnis Anthocyan : Hydroxyzimtsäure gewinnen [36].



**Abbildung 1.8:** Absorptionsspektren typischer Anthocyane (römische Zahlen beziehen sich auf die Strukturen in Abb. 1.4)

### 1.4.2 Copigmentierung von Anthocyanen

Inter- und intramolekulare Copigmentierung von Anthocyanen mit anderen Polyphenolen verursacht neben einem Anstieg der Farbintensität (hyperchromer Effekt) und einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu höheren Wellenlängen (bathochromer Effekt) [37] eine Stabilisierung des Moleküls [38]. Viele Moleküle wie Polyphenole (z.B. Ferulasäure, Flavone),

Alkaloide, Aminosäuren, organische Säuren, die DNA und die Anthocyane selbst besitzen die Fähigkeit, als Copigment mit Anthocyanen zu interagieren [13, 39, 40]. Das Copigment verschiebt durch die Interaktion mit der farbigen Form des Anthocyan, dem Flavylumkation, das Gleichgewicht zwischen diesem und der farblosen Carbinolbase (Abb. 1.5) auf die Seite des Flavylumkations, wodurch sich die Stabilität erhöht [38, 41]. Die Stabilisierung kann auch durch den Schutz des planaren Pyryliumkerns vor nukleophilem Angriff des Wassers in Position 2 durch Interaktion der aromatischen Gruppen der Copigmente mit dem  $\pi$ -System des Anthocyan erklärt werden. Dadurch wird die Bildung des Chromenols und damit der Zerfall des Anthocyanidins verhindert [38, 42].

Die Wechselwirkung kann dabei sowohl auf schwache hydrophobe Kräfte und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zwischen den aromatischen Kernen der Moleküle (intermolekulare Copigmentierung) zurückgeführt werden [14, 39] als auch durch kovalente Bindungen an das Anthocyan-Chromophor zustande kommen (intramolekulare Copigmentierung). Intramolekulare Copigmentierung findet sich z.B. bei den acylierten Anthocyanen [42–45] und kann auch bei der Bindung z.B. an Flavone vorkommen [42]. In der Natur liegen die Anthocyane folglich häufig als Metall-chelatisierte Pigment-Copigment-Komplexe vor [46].

### 1.5 Natürliches Vorkommen der Anthocyane und Gehalte in Lebensmitteln

Anthocyane sind in der Natur sehr weit verbreitet und kommen als wasserlösliche Pigmente im Zellsaft der Vakuolen zahlreicher Pflanzen, überwiegend in den Außenbereichen wie Epidermis- und Subepidermiszellen der Früchte vor [13, 22]. Dabei ist Cyanidin (Cy) das weitverbreitetste Anthocyanidin, Cyanidin-3-*O*-glucosid (Cy3glc) das häufigste Anthocyan [12]. Tabelle 1.2 und Tabelle 1.3 zeigen Daten über Vorkommen und Gehalte in verschiedenen Lebensmitteln. Herausragend ist der Anthocyangehalt von Aronia, die mit Hunderbeere, Schwarzer Johannisbeere, Blau- und Brombeere zu den Anthocyan-reichsten essbaren Früchten in Europa gehört und mit Gehalten von bis zu 1000 mg/100 g Frischgewicht weit über den für andere Flavonoid-Klassen erwarteten Werten liegt. Die Gewinnung allgemeingültiger quantitativer Gehaltsangaben ist aufgrund verschiedener Einflussfaktoren wie genetische Faktoren, Reifegrad, Lagerung, Düngung, Bodentyp und Witterung aber auch verwendeter Analysemethoden schwierig [22, 47, 48]. Zudem kommen Anthocyane auch in zahlreichen anderen, industriell gefertigten Produkten vor, da sie nach der Zusatzstoffzulassungsverordnung zur Färbung von Lebensmitteln zugelassene Farbstoffe (E 163) sind.

Tabelle 1.2: Anthocyane in verschiedenen Lebensmitteln

Lebensmittel	Hauptanthocyan(e)	Gehalt in $\frac{mg}{100g}$	Referenz
Apfel ( <i>Malus domestica L.</i> )	Cy3gal, Cy3glc, Cy3ara	100 (i.d. Schale)	[22]
		10	[22]
Aronia (Apfelbeere) ( <i>Aronia melanocarpa</i> )	Cy3gal, Cy3glc, Cy3ara	1040	[51]
		200–1000	[18]
		800	[22]
Aubergine ( <i>Solanum melongena</i> )	Del3glc, Cy3rut, Del3rut Nasurin, Pel3rut	750	[12, 18]
Blutorange ( <i>Citrus sinensis</i> )	Cy3glc	200	[18]
Brombeere ( <i>Rubus fruticosus</i> )	Cy3glc	115	[18]
		83–326	[22]
		160	[22]
		111–117	[52]
		80–230	[53]
		50–190	[54]
Erdbeere ( <i>Fragaria virginiana</i> )	Pel3glc, Pel3ara	30	[55]
		7–30	[56]
		15–35	[18]
		30–50	[16]
		22–47	[57]
		39	[58]
		24	[59]
Heidelbeere ( <i>Vaccinium myrtillus</i> )	Cy3ara, Cy3gal, Cy3glc, Del3ara, Mal3ara, Pet3gal	230	[12, 27]
		25–495	[22]
		83–420	[18]
		100–370	[16]
		12–197	[52]
		73–515	[53]
Himbeere, rot ( <i>Rubus idaeus</i> )	Cy3glc, Cy3rut, Cy3sam	10–60	[12, 18]
		40	[55]
		20–60	[22]
		45–100	[58]
		52–230	[53]
		20–50	[54]
Himbeere, schwarz ( <i>Rubus occidentalis</i> )	Cy35d-glc, Cy-rut/glc	197	[12, 58]
		179–627	[53]
		700	[54]

(Fortsetzung)

Lebensmittel	Hauptanthocyan(e)	Gehalt in $\frac{mg}{100g}$	Referenz
Holunderbeere ( <i>Sambucus nigra</i> )	Cy3glc, Cy3sam	570–1005	[60]
	Cy3glc, Cy3sam, Cy35d-glc	200–1000	[34, 61]
		300–500	[16]
Johannisbeere, rot ( <i>Ribes rubrum</i> )	Cy3glc, Cy3rut, Cy3soph	12–19	[12, 22]
		10–20	[54]
Johannisbeere, schwarz ( <i>Ribes nigrum</i> L.)	Cy3rut, Del3rut, Del3glc, Cy3glc	250	[22, 49, 50]
		150–390	[60]
		130–400	[18]
		150–340	[54]
Rhabarber ( <i>Rheum rhaponticum</i> )	nicht bekannt	0–200	[18]
Rotkohl ( <i>Brassica oleracea</i> )	acylierte Cy-polyglucoside	25	[18, 62, 63]
		12	[22, 34, 64]
		20–40	[16]
Sauerkirsche ( <i>Prunus cerasus</i> )	Cy3rut, Cy3glc	35	[22]
Süßkartoffel ( <i>Ipomoea batatas</i> )	acylierte Cy-/Peo35d-glc		[34]
Süßkirsche ( <i>Prunus avium</i> )	Cy3rut, Cy3glc	2–450	[65]
		180	[65]
		82–297	[65]
		350–450	[22]
Weintrauben (rot) ( <i>Vitis vinifera</i> )	stark sortenabhängig	100–320	[66]
		30–750	[18, 34]
		145	[67]
		6–751	[67]
Zwiebel, rot ( <i>Allium cepa</i> )	Cy3glc, Cy3soph, Cy35d-glc	0–25	[12, 18]
		15	[22]
		9–21	[68]
		10–20	[16]

## 1.6 Physiologische Eigenschaften der Anthocyane

In Pflanzen dienen phenolische Verbindungen wie Anthocyane als Pigmente, Attraktantien, Phytoalexine (z.B. zum Schutz vor Pilz- und Bakterieninfektionen) und zum Schutz vor UV-Strahlung und vor Insekten [13, 15, 46, 71–74]. Darüber hinaus sind sie an der Regulation des pflanzlichen Hormonhaushaltes, der Genexpression und der Enzymaktivität beteiligt und

**Tabelle 1.3:** Anthocyane in verschiedenen Säften und anderen Getränken

Getränk	Hauptanthocyan(e)	Gehalt in $\frac{mg}{l}$	Referenz
Cabernet-Sauvignon	uneinheitlich	730	[66]
Holunderbeersaft	Cy3glc, Cy3sam	1941–6576	[60]
Johannisbeersaft, schwarz ( <i>Ribes nigrum</i> L.)	Del3rut, Cy3rut, Cy3glc	1500–3900	[60]
		1300–4000	[18]
	Del3rut, Cy3rut, Cy3glc, Del3glc	1,4–492	[69]
Portwein, rot	uneinheitlich	140–1100	[18]
Rotwein, allg.	Mal3glc	240–350	[18]
	stark sortenabhängig	100–1000	[22]
		2–50	[70]
		260	[59]

tragen zum Geschmack und zum Aussehen bei [75, 76]. Im Körper werden sie mit einer Reihe von gesundheitsfördernden Wirkungen in Zusammenhang gebracht, die auf verschiedene Wirkmechanismen zurückgehen.

### 1.6.1 Antioxidative Eigenschaften

Bei vielen biochemischen Prozessen in der Zelle entstehen aus dem lebensnotwendigen Sauerstoff sog. reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie z.B. Hydroxyl- und Peroxylradikale ( $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ), Superoxidradikalanionen ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ). Neben enzymatischen Schutzmechanismen dienen dem Körper auch antioxidativ wirksame Substanzen (wie z.B. Vitamin E oder C) zur Beseitigung dieser ROS. Verschiebt sich dieses Gleichgewicht aus Antioxidantien und ROS auf die Seite der ROS, so spricht man von oxidativem Stress [77]. ROS können dann mit Targetmolekülen (z.B. DNA, Lipide oder Proteine) reagieren und dadurch den Organismus schädigen [78–80]. Zwischen dieser Schädigung von Biopolymeren und dem Entstehen von degenerativen Erkrankungen wie koronaren Herzkrankungen (vgl. 1.6.2) und Krebs (vgl. 1.6.3) werden seit mehreren Jahren ursächliche Beziehungen gesehen. Auch entzündliche Gelenkerkrankungen wie Arthritis und Arthrosen, Nierenerkrankungen, Pankreatitis, Morbus Crohn, diverse Lungenerkrankungen, Katarakt sowie allgemeine Alterungsprozesse werden auf einen solchen Entstehungsprozess zurückgeführt [81–86].

Die antioxidative Wirkung von Flavonoiden und anderen Pflanzenphenolen erfolgt über den Transfer von Elektronen oder Wasserstoffatomen von den Hydroxylgruppen auf die freien

Radikale und konnte *in vitro* auch für Anthocyane gezeigt werden [68, 87–91]. Anthocyane können freie Radikale abfangen, durch das konjugierte Doppelbindungssystem stabilisieren und so Radikal-Kettenreaktionen unterbrechen. Sie chelatieren redoxaktive Metallionen, wodurch die Lipidperoxidation inhibiert wird, oder verhindern durch Proteinbindungen oxidative Reaktionen [92]. So besitzt z.B. das Apolipoprotein B der LDL spezifische Stellen für eine Kupfer-Bindung, die für die Kupfer-vermittelte Oxidation dieser Teilchen essentiell ist [93]. Durch Bindung an diese Stelle verhindern Anthocyane oxidative Veränderungen.

Noda et al. [89], Gabrielska et al. [94] und Gardner et al. [90] haben die antioxidative Wirkung von Anthocyanidinen und Beerenextrakten mit Hilfe einer Elektronspinresonanz-Technik (ESR) mit Spin-Trapping untersucht und konnten zeigen, dass die getesteten Anthocyane freie Radikale wie das Superoxidradikalanion abfangen und die Bildung von HO• in einem Fenton-Reaktions-System wahrscheinlich durch die Chelatierung von Eisen-Ionen inhibieren können. Dies konnte von Noda et al. [95, 96] auch für das Auberginen-Anthocyan Nasurin gezeigt werden. Zudem kann Nasurin – bereits ab Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  – vor Lipidperoxidation in Rattenhirngewebe schützen, was von Tsuda et al. [91] für Cy und Cy3glc bestätigt wurde. Lipidperoxide sind reaktive Moleküle, die ein Cross-Linking von Proteinen und Schäden an der DNA induzieren und zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren führen können [97, 98]. Sie werden deshalb mit dem Alterungsprozess und der Entstehung von Krebs in Zusammenhang gebracht [99]. Daneben schützen Anthocyane Erythrozyten vor oxidativen Schäden durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [88]. Die ROS-abfangende Eigenschaft der Anthocyane *in vitro* konnte von zahlreichen anderen Autoren bestätigt werden [71, 100]. Tsuda et al. [72] zeigten, dass Anthocyan-Pigmente aus *Phaseolus vulgaris L.* in liposomalen Systemen starke antioxidative Wirkung besitzen und die Bildung von Malondialdehyd nach UVB-Bestrahlung reduzieren, während acylierte Anthocyane aus Karotten-Zellkulturen sowohl auf die enzymatische als auch auf die nicht-enzymatische Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die häufig Bestandteil von Zellmembranen sind, als nicht-kompetitiver Inhibitor wirken [101]. Versuche mit kultivierten Zellen zeigten, dass die mit dem oxidativen Stressor t-Butylhydroperoxid induzierte Lipidperoxidation, die Veränderung des Redoxstatus, der Zelltod und die Schädigung der DNA durch Anthocyane reduziert werden konnte [102]. Für Pelargonidin (Pel) konnte zudem eine abfangende Wirkung auf Peroxynitrit festgestellt werden [103].

Auch *in vivo*-Untersuchungen an Ratten deuten auf eine antioxidative Wirkung der Anthocyane hin: Ramirez-Tortosa et al. [104] untersuchten die antioxidative Wirkung von Anthocyan-3-glucosiden auf Vitamin E-depletierte und damit für oxidativen Stress anfällige Ratten und konnten eine signifikante Verbesserung der antioxidativen Kapazität im Plasma sowie einen Rückgang der durch die Depletion gesteigerten Hydroperoxid- und

8-*Oxo*-deoxyguanosin-Konzentration in der Leber zeigen, die Indikatoren für Lipidperoxidation und DNA-Schädigungen sind. Auch andere Studien an Ratten, die unter oxidativem Stress litten, konnten die Wirkung von Anthocyanen als potente Antioxidantien bestätigen [90, 105, 106]. Als Modell für den oxidativen Stress wurde die Schädigung durch hepatische Ischemie-Reperfusion (I/R) gewählt. Die Fütterung von Cy3glc unterdrückte signifikant verschiedene pathogene Veränderung wie die Erhöhung der hepatischen Thiobarbitursäure-reaktiven Verbindungen (TBARS), die Verminderung der Glutathion-Konzentration und die Serumaktivität verschiedener Marker-Enzyme für Leberschäden (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase und Laktatdehydrogenase). Außerdem zeigten Cy3glc-supplementierte Ratten eine geringere Anfälligkeit für Lipidperoxidations-Reaktionen [107, 108]. Der schützende Effekt von Anthocyanen auf die mit oxidativen Schäden assoziierten allgemeinen Symptome des Alterns konnte auch am Tiermodell u.a. an motorischen Veränderungen und neuronal-biochemischen Parametern gezeigt werden [109, 110]. In diesem Zusammenhang sind auch Resultate von Youdim et al. [111] zur Passage der Blut-Hirn-Schranke durch Anthocyane interessant.

Untersuchungen an Menschen zeichnen dagegen ein widersprüchliches Bild. Maxwell et al. [112, 113], Carbonneau et al. [114] sowie Whitehead et al. [115] fanden eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Serums nach Aufnahme von Rotwein und Fuhrmann et al. [116] konnten bei gleicher Indikation eine Verringerung der Anfälligkeit der LDL für Oxidation feststellen, was jedoch de Rijke et al. [117] nicht bestätigen konnten. Nach Aufnahme eines anthocyanreichen Beerensaftes fanden Netzel et al. [118] einen Anstieg der antioxidativen Kapazität im Serum, was jedoch den Ergebnissen von Young et al. [119] widerspricht, die in einem ähnlichen Versuch keine Erhöhung finden konnten. Die meisten dieser *in vivo*-Studien untersuchen stets die Veränderungen der antioxidativen Kapazität nach Aufnahme komplexer Lebensmittelmatrices (Beeren, Rotwein, Säfte), die neben den Anthocyanen noch zahlreiche andere Substanzen (wie z.B. Ascorbinsäure, Ethanol oder andere Polyphenole) enthalten (vgl. z.B. [120] für verschiedene Beeren), so dass die gefundenen Effekte nicht eindeutig einer Verbindung(sklasse) zugeschrieben werden können.

Weitere Studien zur *in vitro*-Inhibition der LDL-Oxidation finden sich unter 1.6.2.

### 1.6.2 Schutz vor koronaren Herzerkrankungen

Neben dem Stilben Resveratrol [121–123] werden v.a. Anthocyane mit dem „French Paradox“ in Verbindung gebracht. Darunter versteht man die Ergebnisse aus epidemiologischen Studien, die für Bevölkerungsteile Frankreichs trotz ungesunder Lebensführung mit fettreicher Ernährung eine niedrigere Sterblichkeitsrate durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen fanden verglichen mit anderen westlichen Industrieländern. Diesen Effekt führt man auf die positive

Wirkung von mäßigem Rotweingenuss zurück [124, 125]. Umstritten sind dagegen weiterhin die wirksamen Komponenten. Viele Untersuchungen weisen einen protektiven Effekt der phenolischen Komponenten des Rotweines aus [126, 127], sei es direkt auf die Entstehung von Atherosklerose im Tiermodell [128, 129], durch allgemeine antioxidative Wirkungen *in vivo* [130], durch den Schutz von LDL und HDL vor Oxidation [131, 132] oder durch die Verminderung der Plasmalipide und des Apolipoprotein B [128]. Manche Gruppen gehen dagegen von einem Effekt des Alkohols aus, darunter auch die Autoren der Copenhagen City Heart Study [133, 134]. Alkohol führt dabei entweder zu einer Erhöhung der HDL [135] oder durch das Hervorrufen von oxidativem Stress zu einer Expressions-Induktion verschiedener kardioprotektiver Proteine, darunter das Hitzeschockprotein 70, was zu einer Adaptation des Herzens an oxidativen Stress führt [130]. Wieder andere Gruppen führen die Wirkung des Rotweines auf die Kombination aller Inhaltsstoffe zurück [128, 136].

Der initiale Schritt in der Pathogenese Atherosklerose ist die oxidative Modifikation der LDL im subendothelialen Raum der arteriellen Blutgefäße z.B. durch ROS [137–140]. Dadurch kommt es zum Einwandern von Gefäßmonozyten und deren Umwandlung zu Makrophagen. Über spezielle Rezeptoren nehmen diese Makrophagen vermehrt und irreversibel oxidierte LDL auf und werden dadurch zu sog. Schaumzellen. Diese lagern sich direkt unterhalb des Endothels ab, wo sie zu Ausbuchtungen ins Gefäßlumen heranwachsen (atheriosklerotische Plaques). Dort kann es leicht durch Anlagerung von Thrombozyten zum Gefäßverschluss kommen [141–146]. Das Abfangen dieser ROS durch Anthocyane trägt daher zum Schutz vor koronaren Herzerkrankungen bei.

Wegen der besonderen Bedeutung der Oxidation von Lipoproteinen für die Pathologie koronarer Erkrankungen seien hier zusätzlich zu den unter 1.6.1 beschriebenen antioxidativen Effekten einige Studien an Lipoproteinen angeführt. *In vivo* konnten Fuhrman et al. [116] zeigen, dass es nach Aufnahme von Rotwein zu einer Reduzierung der Lipidperoxidation kam, während dieser positive Effekt bei Weißwein nicht nachgewiesen werden konnte, was darauf schließen lässt, dass bestimmte phenolische Substanzen, die nur in Rotwein enthalten sind, die aktiven Komponenten darstellen [116]. Allerdings konnten de Rijke et al. [117] diese Ergebnisse bei analoger Indikation nicht bestätigen.

*In vitro*-Ergebnisse zur Inhibition der LDL-Oxidation sprechen dagegen eine einheitliche Sprache: Der Schutz durch Anthocyane konnte für zahlreiche Lebensmittelextrakte [147–150] und für die Reinsubstanzen sowohl als Aglykone [72, 92], als 3-Glycoside [72] als auch in Form der 3,5-Diglucoside [92] gezeigt werden. So reduzierten Anthocyane die Cu-induzierte Bildung von Hexanal und konjugierter Diene [92] oder verlängerten die lag-Phase und die maximale Oxidationsrate bei Peroxylradikal-Induktion [148]. Die Untersuchung verschiedener Polyphenolfractionen des Rotweins durch Ghiselli et al. [151] zeigte zudem die stärkste

Wirkung auf die Inhibierung der Lipoproteinoxidation und der Blutplättchenaggregation in der Anthocyan-Fraktion.

Anthocyane zeigen zudem entzündungshemmende Eigenschaften, indem sie z.B. durch die Hemmung der Prostaglandin-Endoperoxid H-Synthase (Cyclooxygenase, COX) in die Arachidonsäurekaskade eingreifen, die Bildung von Prostaglandinen und Thromboxanen vermindern und damit ebenfalls koronaren Herzerkrankungen vorbeugen [152, 153]. Sie zeigen dabei z.T. eine stärkere Wirkung als Aspirin und liegen im Bereich von entzündungshemmenden Arzneimitteln wie Naproxen [153]. Da Prostaglandinen auch eine tumorpromovierende Wirkung zugeschrieben wird, deutet diese mechanistische Funktion der Anthocyane auch auf einen antikanzerogenen Effekt hin (vgl. 1.6.3). Die entzündungshemmende Wirkung wird auch auf die Inhibition der Bildung von  $\text{NO}^\bullet$  im Körper zurückgeführt [154, 155].  $\text{NO}^\bullet$  wird im Körper aus L-Arginin v.a. bei viralen und bakteriellen Infektionen im Überschuss produziert und kann zu Gewebsverletzungen, oxidativem Stress und sogar zu Krebs führen [156, 157]. Als Mechanismen für den protektiven Effekt der Anthocyane werden das Abfangen von  $\text{NO}$ -Radikalen, die direkte Hemmung der  $\text{NO}^\bullet$ -Synthase-Aktivität und die Hemmung der  $\text{NO}^\bullet$ -Synthase-Genexpression diskutiert [154]. Neuere Befunde [158] zeigen zudem eine Inhibition der Endothelin-1-Synthese durch Polyphenole aus den Schalen roter Trauben. Der Überproduktion dieses gefäßaktiven Peptids wird eine Schlüsselrolle in der Entstehung vaskulärer Krankheiten zugeschrieben. Schließlich zeigen Anthocyane durch eine Interaktion mit Kollagen auch allgemein protektive Wirkungen auf die vaskuläre Permeabilität und die Kapillarzerbrechlichkeit [15, 159, 160], und können nach Aufnahme in das Cytosol und die Plasmamembran von Aorta-Endothelzellen zu deren Schutz vor oxidativem Stress beitragen [161].

### 1.6.3 Schutz vor Krebserkrankungen

Anthocyane tragen eventuell zum krebspräventiven Potential von Obst und Gemüse bei, auch wenn die epidemiologischen Belege hierfür noch unzureichend sind und sich diese Vermutung lediglich auf *in vitro*-Befunde stützt [162, 163]. Die möglicherweise chemopräventive Wirkung der Anthocyane kann dabei auf drei verschiedene Mechanismen zurückgeführt werden: Anthocyane sind durch ihre antioxidative Wirkung, wie unter 1.6.1 beschrieben, durch ihre antikanzerogenen Effekte und durch die Apoptose-Induktion in Tumorzellen am Schutz vor Krebserkrankungen beteiligt [164].

Zur antikanzerogenen Wirkung von Anthocyanen gibt es verschiedene Studien. Bei Tierversuchen von Hagiwara et al. [165, 166] zur Kolon-Karzinogenese an mit 1,2-Dimethylhydrazin

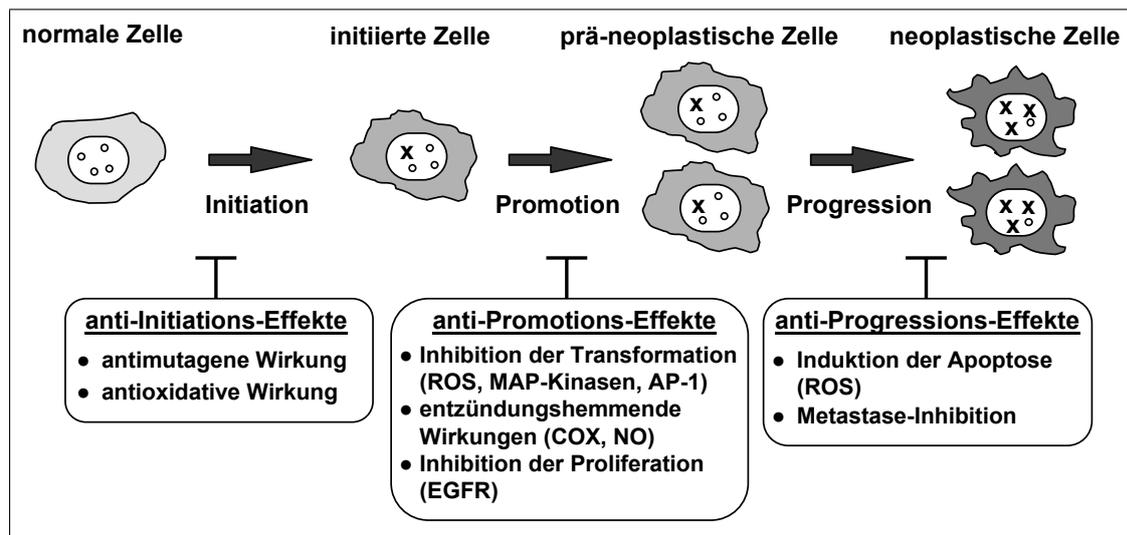
initiierten männlichen F344-Ratten wurde die Wirkung von Anthocyanen aus roten Süßkartoffeln, Rotkohl und violetterem Mais bei gleichzeitiger Gabe eines Enhancers (2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin) untersucht, wobei ein Rückgang der induzierten Läsionen durch Anthocyane gezeigt werden konnte. Der molekulare Mechanismus der Wirkung ist jedoch noch unklar. Eine Abhängigkeit der Wirkung von den Substituenten am B-Ring konnte vor kurzem von Hou et al. [167] in einem Zellkulturmodell nachgewiesen werden: In JB6-Zellen (epidermale Zellen der Maus) induzieren Tumorpromotoren wie 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) die AP-1-Aktivität und neoplastische Transformationen durch die Aktivierung der MAP-Kinasen. Diese Induzierung kann durch chemopräventive Agentien geblockt werden. Beim Einsatz der geläufigen Anthocyanidine in Konzentrationen von 0–20  $\mu\text{M}$  konnte nur für Delphinidin (Del), Petunidin (Pet) und Cy, nicht jedoch für Pel, Peonidin (Peo) und Malvidin (Mal) ein inhibitorischer Effekt gemessen werden, was auf die notwendige Anwesenheit einer *ortho*-Dihydroxyphenyl-Struktur am B-Ring hindeutet. Der Versuch der mechanistischen Aufklärung dieser Wirkung wurde auf der Ebene der MAP-Kinase-Kaskade vorgenommen, wobei gezeigt werden konnte, dass Anthocyane die TPA-induzierte Phosphorylierung u.a. von ERK und JNK/SAPK unterdrücken und somit zur Inhibition der Karzinogenese durch Blockierung des MAP-Kinase-Signalweges beitragen. Darüber hinaus ist noch ein zweiter Mechanismus für die Wirkung verantwortlich: Die Behandlung der Zellen mit TPA führt zu einer vermehrten Bildung von Superoxidradikalanionen, die eine weitere AP-1-Aktivierung und neoplastische Transformationen fördern. Durch die Katalyse von Disproportionierungsreaktionen kontrolliert das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) den Spiegel an Superoxidradikalanionen und hemmt damit die AP-1-Aktivierung. Anthocyane mit *ortho*-Dihydroxyphenyl-Struktur am B-Ring wirken bei dieser Hemmung synergistisch mit der SOD zusammen [167].

Ein weiterer Mechanismus der chemopräventiven Wirkung von Anthocyanen stellt die Induktion der Apoptose dar, was in Zellkultur an promyelocytischen Leukämiezellen (HL-60) und Kolonkarzinomzellen (HCT-116) mit reinen Anthocyanen und Beerenextrakten gezeigt werden konnte [168–170]. Auch hier konnte eine Induktion der Apoptose wieder nur für Anthocyanidine mit *ortho*-Dihydroxyphenyl-Struktur nachgewiesen werden. Die Autoren gehen von einem prooxidativen Effekt aus, bei dem intrazellulär Wasserstoffperoxid gebildet wird, und stellen eine Verbindung zum Pyrogallol her, das eine Autoxidation durchlaufen kann [171, 172], was zur Bildung von toxischen Sauerstoffspezies oder anderen reaktiven Intermediaten führt.

Darüber hinaus werden noch einige andere Mechanismen diskutiert. So gibt es Studien, die Anthocyanen und anthocyanreichen Früchten eine antimutagene Wirkung zuschreiben, z.B. auf die Mutagenität heterocyclischer Amine, wobei der Wirkmechanismus eventuell

über eine Hemmung bestimmter Isoenzyme der Cytochrom P450-Familie erfolgt [173–177]. Auch hier nimmt die Wirkung zum einen mit der Anzahl der Hydroxylgruppen im B-Ring zu, zum anderen spielen catecholische Strukturen eine wichtige Rolle. Meiers et al. [178] konnten zudem eine starke Hemmung der Tyrosinkinase-Aktivität des Epidermal Growth-factor Receptors (EGFR) durch Cy und Del feststellen. Der EGFR ist an dem anomalen Wachstum vieler Krebszelltypen beteiligt [179]. Dagegen zeigten die Glycoside Cyanidin-3-*O*-galactosid (Cy3gal) und Malvidin-3-*O*-glucosid (Mal3glc) sowie das Aglykon Mal keine Wirkung, was auf die notwendige Anwesenheit freier Hydroxylgruppen am B-Ring sowie an der 3-Position hindeutet. Einen antiproliferativen Effekt konnten auch Konczak-Islam et al. [177] mit Anthocyanextrakten, die v.a. nicht-acylierte Cyanidin-3-sophorosid-5-glucosid enthielten, an promyelocytischen Leukämiezellen (HL-60) zeigen. Auch bei Untersuchungen von Kamei et al. [180] fand eine Inhibition des Zellwachstums statt, die bei Anthocyanen deutlich stärker war als bei anderen Flavonoiden, und Malik et al. [181] konnten diesen Effekt der Induktion einer Zellzyklusblockade zuordnen. Ein weiterer chemopräventiver Mechanismus der Anthocyane beruht auf der Inhibition der Tumorzell-Invasivität durch Hemmung von Matrix-Metalloproteinasen und damit der Verhinderung der Metastasierung, der Hauptursache der Sterblichkeit bei Krebs [182]. In einem anderen Testsystem mit menschlichen Tumorzellen (HT29) konnten Pool-Zobel et al. [87] zeigen, dass komplexe Extrakte anthocyanreicher Pflanzen die Bildung H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter Strangbrüche reduzieren, während die Reduktion oxidiertes DNA-Basen weder durch Extrakte noch durch isolierte Anthocyane (Aglykone und Glycoside) erzielt werden konnte. Auch wird die Bildung von Anthocyan-DNA-Copigmenten (1.4.2) und der daraus resultierende Schutz vor oxidativer Schädigung der DNA durch ROS und die Maskierung von Bindungsstellen für Kanzerogene diskutiert [183]. Und schließlich werden auch estrogene Wirkungen bei der Prävention hormonabhängiger Krebserkrankungen beschrieben, die an zwei Zelllinien (MCF-7 und BG-19) anhand der induzierten Expression von Reportergenen und der induzierbaren Zellproliferation nachgewiesen werden konnten [184]. Verschiedene Anthocyanidine zeigten dabei eine um den Faktor 10000 bis 20000 schwächere Bindungsaffinität zum Estrogen Rezeptor  $\alpha$  als 17- $\beta$ -Estradiol und konnten in Kombinationsinkubationen die durch 17- $\beta$ -Estradiol induzierte Zellproliferation reduzieren.

Die wichtigsten Mechanismen der Krebs-Chemoprävention durch Anthocyane sind in Abb. 1.9 zusammengefasst.



**Abbildung 1.9:** Auswahl diskutierter Mechanismen der Krebs-Chemoprävention durch Anthocyane (nach [164])

#### 1.6.4 Antibakterielle und antivirale Wirkung, Verbesserung der Nachtsicht und sonstige Effekte

Die antibakterielle und antivirale Wirkung von Flavonoiden hängt mit der Phytoalexin-Wirkung in Pflanzen zusammen (vgl. 1.6) und beruht auf der Änderung der Permeabilität der Zellmembran sowie auf der Bindung und Denaturierung von lebenswichtigen Enzymen in Bakterien, Pilzen und Viren [185]. In verschiedenen Untersuchungen [186–189] konnten den Extrakten der Holunder- und schwarzen Johannisbeere antivirale Aktivität gegen Influenza A und B- sowie gegen Herpesviren 1 und 2 zugeordnet werden, die auf der Inaktivierung der Viren selbst oder auf einer Verhinderung der Adsorption an Zellen und der Freisetzung aus infizierten Zellen beruhen. Knox et al. [190] konnten diese Effekte der Anthocyanfraktion eines Johannisbeer-Extraktes zuordnen.

Aus der Volksmedizin weiß man, dass Holunder- und Moosbeerextrakte bei Harnwegserkrankungen Linderung verschaffen. Auch dieser Effekt wird auf antibakterielle Wirkungen der Anthocyane zurückgeführt [191–193]. In einer Untersuchung von Avorn et al. [194] konnte durch den regelmäßigen Konsum eines Moosbeerensaftes das Auftreten von Bakteriurien (erhöhte Bakterienwerte im Harn) mit Pyurien (hoher Leukozytengehalt des Urins) bei älteren Frauen verringert werden. Howell [195] führt diesen Effekt allerdings nicht auf die Anthocyane, sondern die antiadhäsive und damit antibakterielle Wirkung der Proanthocyanidine zurück.

Aus der Luftfahrt werden zudem schon seit den 60er Jahren Wirkungen von Anthocyanen in der Augenheilkunde beschrieben [196, 197] und auch sonst tauchen in der Literatur immer wieder Hinweise auf positive Effekte v.a. bei der Nachtsicht [198], der progressiven

Myopie (Kurzsichtigkeit) [199] und der diabetischen Retinopathie [200] auf. Diese Ergebnisse wurden in den letzten Jahren wieder aufgegriffen und die Experimente mit modernen Methoden wiederholt. Die Resultate sind jedoch widersprüchlich: So konnten z.B. Nakaishi et al. [201] in einer Placebo-kontrollierten Studie nach Aufnahme von Anthocyanen aus schwarzen Johannisbeeren eine Verbesserung der Adaptation an die Dunkelheit und einen Rückgang der Ermüdungssymptome und subjektiven Augenbeschwerden infolge von Überbeanspruchung der Augen (*Asthenopie*) nachweisen. Auch Matsumoto et al. [202] fanden einen stimulatorischen Effekt von Cyanidin-3-glycosiden (nicht jedoch von den entsprechenden Delphinidin-Derivaten) auf die Regeneration des Rhodopsins, wohingegen weder Zadok et al. [203] und Levy & Glovinsky [204] bei der Nachtsicht noch Muth et al. [205] bei der Nachtsicht und bei der Kontrastsensitivität nach wiederholter Gabe eines Anthocyanextraktes in Cross-over-Studien einen Effekt zeigen konnten.

Anthocyane haben zudem anti-diabetische Wirkung, wie vor kurzem von Matsui et al. [206–208] beschrieben wurde. Diacylierten Anthocyanen aus Süßkartoffeln konnte dabei im Tierversuch bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten ein postprandialer anti-hyperglykämischer Effekt zugeschrieben werden, der auf der Hemmung der Maltase-Aktivität beruht. Tsuda et al. [209] konnten dies bestätigen und fanden zudem eine schützende Wirkung der Anthocyane vor Fettleibigkeit.

Schließlich finden sich in der Literatur auch Hinweise auf immunmodulatorische Effekte der Anthocyane, wie z.B. die Erhöhung der NK-Zellzahl in Lymphozytenkultur aus Raucherblut [210], was jedoch zumindest für die akute Aufnahme moderater Mengen von Rotwein bei gesunden Probanden nicht bestätigt werden konnte [211].

## 1.7 Bisherige Erkenntnisse zur Bioverfügbarkeit und zum Metabolismus der Anthocyane

### 1.7.1 Aufnahme mit der Nahrung

Die tägliche Gesamt-Flavonoid-Aufnahme des Menschen (hauptsächlich durch Obst- und Gemüseprodukte sowie Tee) wird in westlichen Ländern auf maximale Mengen zwischen 0,5 und 1 g geschätzt [12, 63, 212]. Eine neuere Studie aus Dänemark beziffert die aufgenommene Menge auf 75–150 mg/Tag [213]. Untersuchungen aus den USA zufolge wird die täglich aufgenommene Menge an Anthocyanen auf ca. 180 bis 215 mg geschätzt [12] und liegt damit weit über der verzehrten Menge anderer Flavonoide wie z.B. Flavone und Flavonole (23 mg), wie eine Untersuchung in den Niederlanden ergab [212]. Dagegen ergab die Auswertung der Daten der Nationalen Verzehrsstudie aus dem Jahre 1991 durch Linseisen et al. [214] für eine bayerische Bevölkerung lediglich eine tägliche Aufnahme von

2,7 mg Anthocyanen (Schwankungsbreite von 0–76 mg) bei einer Gesamtmenge an täglich aufgenommenen Flavonoiden von 54 mg. Die stark variierenden Daten liegen zum einen an den unterschiedlichen Ernährungserhebungsmethoden. Zum anderen ist die Aufnahme auch stark vom individuellen Verzehrverhalten abhängig; saisonal können Personen mit hohem Obstverzehr (insbesondere von Beeren, roten Trauben und Steinobst) leicht Aufnahmemengen von mehreren hundert Milligramm/Tag erreichen. Mindestens 10% der Bevölkerung in Deutschland nehmen allerdings überhaupt keine Anthocyane auf [215].

### 1.7.2 Bioverfügbarkeitsstudien

Die biologische Aktivität von Substanzen nach ihrer Aufnahme in das Gastrointestinaltrakt hängt v.a. davon ab, wo, wie und in welchem Umfang sie absorbiert und metabolisiert werden. Zur Bioverfügbarkeit von monoglycosylierten Anthocyanen gibt es einige Untersuchungen, meist mit anthocyanreichen Lebensmittelextrakten. Schon 1933 beobachtete Horwitt, dass Kaninchen, denen 500 mg eines Anthocyan-Extraktes aus Trauben subkutan verabreicht wurde, einen stark pigmentierten Urin haben [216]. Morazzoni et al. [217] fanden bei Ratten nach oraler Gabe sehr großer Mengen (400 mg/kg) eines Anthocyan-Extraktes aus Heidelbeeren eine Bioverfügbarkeit von nur 1,2% der aufgenommenen Anthocyan-Menge. Die maximale Anthocyan-Plasma-Konzentration wurde 15 min nach Aufnahme erreicht und lag bei 2–3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (4–6  $\mu\text{M}$ ). Innerhalb von zwei Stunden war eine schnelle Abnahme zu beobachten, wobei kein hepatischer „first-pass-Effekt“ auftrat. Ähnliche Ergebnisse fanden Miyazawa et al. [218] nach oraler Verabreichung von Cy3glc und Cy-35d-glc. Auch hier wurde die maximale Plasmakonzentration nach 15 min erreicht, die Gesamtmenge der aufgenommenen Anthocyane lag bei 1% der ursprünglichen Dosis. Neben den verabreichten Anthocyanen konnten in der Leber Spuren von Methylierungsprodukten nachgewiesen werden. Diese Methylierungsprodukte fanden auch Tsuda et al. [219] in Leber und Niere nach Gabe von Cy3glc, nicht jedoch im Plasma. Zusätzlich konnte das Aglykon im Jejunum nachgewiesen werden.

In den letzten Jahren sind vermehrt Arbeiten zur Aufnahme und Metabolisierung beim Menschen erschienen, wobei in diesen Untersuchungen stets Lebensmittelextrakte verabreicht wurden. Bub et al. [220] fanden nach Aufnahme von Traubensaft und Rotwein (normal und entalkoholisiert) in einer Studie mit sechs Probanden etwa 0,03% der aufgenommenen Anthocyan-Menge in Urin und Plasma, wobei die Resorption – wie auch bei Untersuchungen von Andlauer et al. [221] – unabhängig von der Anwesenheit des Alkohols war. Die maximale Plasmakonzentration war nach 90 min erreicht. Lapidot et al. [66] konnten die schlechte Bioverfügbarkeit in einer ähnlichen Studie bestätigen, wobei neben den originären Substanzen auch Metabolite detektiert wurden, die jedoch nicht weiter charakterisiert werden konnten.

Dagegen konnten bei zahlreichen anderen Studien [218, 222–225] im Anschluss an die Aufnahme verschiedener Extrakte nur die originären Anthocyane, nicht jedoch das Aglykon, konjugierte oder methylierte Produkte oder andere Metabolite nachgewiesen werden. Auch hier lagen die in Körperflüssigkeiten gefundenen Mengen weit unterhalb von 0,5% der ursprünglich aufgenommenen Anthocyane. Eine Übersicht über die verschiedenen Humanversuche und ihre wichtigsten pharmakokinetischen Daten findet sich im Anhang (s. Tab. A.24).

Anthocyane besitzen folglich eine sehr geringe Bioverfügbarkeit, was v.a. augenscheinlich wird, wenn man den in den Körper aufgenommenen Anteil mit dem anderer Flavonoide vergleicht (z.B. Epicatechin oder Daidzein in Abb. 1.10). Bezogen auf die verabreichten Anthocyan-Mengen liegt die prozentuale Wiederfindung in Humanversuchen zwischen 0,004 und 0,23% [118, 220, 223, 224, 226–233] und im Tierversuch zwischen 0,3 und 1,2% [217, 218, 234].

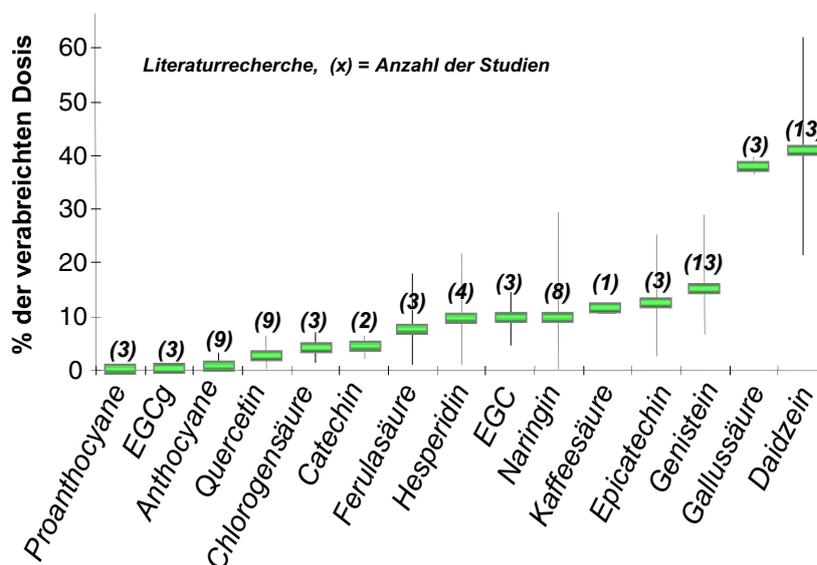


Abbildung 1.10: Vergleich der Plasmakinetik verschiedener Flavonoide (nach [235])

Alle Studien über die Aufnahme von Anthocyanen zeigen zudem eine schnelle Resorption und Ausscheidung, v.a. in intakter, unmetabolisierter Form, die im Plasma einer Kinetik erster Ordnung folgt [223, 236]. Auch Miyazawa et al. [218] fanden diese raschen Mechanismen mit sehr kurzen Halbwertszeiten nach Anthocyan-Konsum sowohl beim Menschen als auch im Tierversuch, wobei die Verstoffwechslung der Anthocyane sogar noch schneller verlief als die des Catechins. Bub et al. [220] konnten zeigen, dass im Urin von Probanden bereits 24 h nach Aufnahme anthocyanreicher Getränke keine Anthocyane mehr nachweisbar waren und unterschiedliche Gruppen [223, 226, 233, 236, 237] bestimmten die Halbwertszeiten verschiedener Anthocyane auf Werte zwischen 0,8 und 2,2 h beim Menschen und 0,8 und 2,1 h bei der Ratte. Vergleicht man diese Werte mit Literaturangaben für andere Flavonoide (23–28 h für Quercetin-Glucosid [238] oder 7–8 h für die Isoflavone Genistein und Daidzein [239]),

so fällt auch anhand dieser Zahlen die schnelle Verstoffwechslung der Anthocyane auf. Die maximalen Plasmakonzentrationen nach oraler Aufnahme monoglucosylierter Anthocyane waren im Tierversuch nach 15 bis 120 min [218, 219, 226] und beim Menschen nach 60 bis 120 min [220, 223, 226, 228, 229, 240] erreicht und lag je nach verabreichter Dosis bei 13–3000 ng/ml [218] bzw. 35–170 ng/ml [222, 223, 240]. Eine vergleichende Darstellung der erreichten Plasmakonzentrationen und der entsprechenden Kinetik verschiedener Flavonoide gibt Abbildung 1.11 wieder.

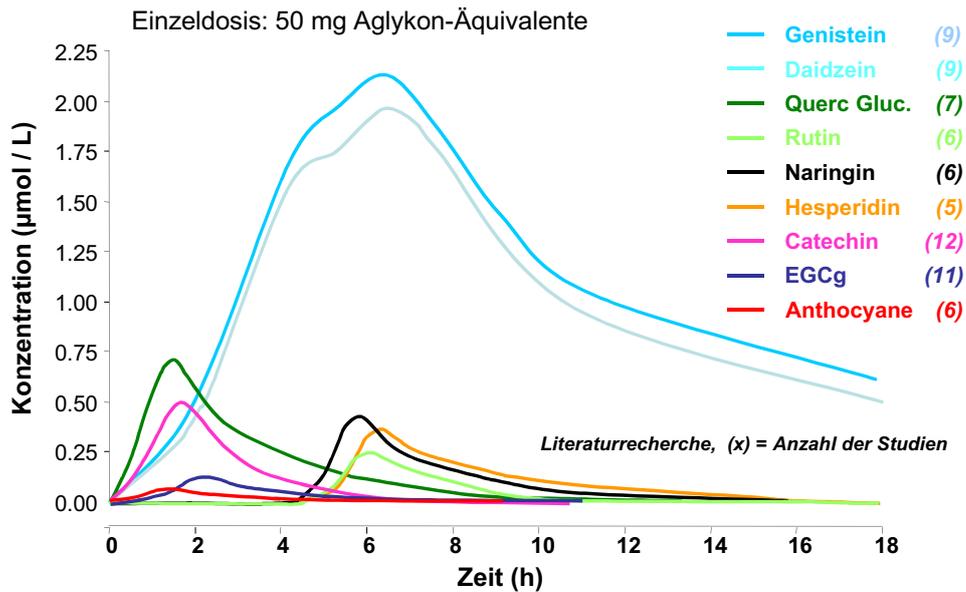


Abbildung 1.11: Vergleich der Bioverfügbarkeit verschiedener Flavonoide (nach [235])

### 1.7.3 Untersuchungen zum Metabolismus und den Aufnahme- und Verteilungsmechanismen

Lange Zeit wurde angenommen, dass nur Aglykone der Flavonoide vom Körper aufgenommen werden können und Flavonoidglycoside erst durch die intestinale Darmflora mikrobiell in das Aglykon und das Glycosid gespalten werden müssen, um für den Organismus verfügbar zu sein. Doch spätestens durch Studien, die eine bessere Aufnahme der Quercetinglycoside verglichen mit dem Aglykon Quercetin belegten [241–243] und die Absorption der Quercetinglycoside über den  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glucose-Cotransporter (SGLT1) zeigten [241, 244–246], geriet diese Theorie ins Schwanken. Anthocyanoglycoside fanden sich dagegen bislang nach Aufnahme v.a. in unmetabolisierter Form wieder, so dass auf eine direkte Resorption, Blut-Verteilung und Exkretion über den Harn als Glycosid geschlossen werden konnte [66, 218, 226].

Im Gegensatz zu den Anthocyanen, von denen zu Beginn dieser Arbeit kaum Metabolite identifiziert waren, liegen andere Flavonoide im Urin nach oraler Aufnahme überwiegend

in metabolisierter Form als Glucuronsäure- oder Sulfat-Konjugate vor [247–249]. Die metabolischen Veränderungen finden dabei hauptsächlich im Dickdarm durch Bakterien und nach Absorption in der Leber und Niere statt [250–253]. Die wichtigsten Reaktionen der Bakterien sind dabei die Hydrolyse von Konjugaten und Glycosiden sowie die Ringspaltung der Aglykone, wodurch einfachere Substanzen wie Benzoesäure, Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyphenyllessigsäuren entstehen, die ihrerseits dann absorbiert, metabolisiert und ausgeschieden werden [18, 254]. In der Leber und Niere finden Glucuronidierungs-, Sulfatierungs- und Methylierungsreaktionen statt [255, 256].

Während bei vielen anderen Flavonoiden heute die Aufklärung der Resorptions- und Metabolisierungswege sehr weit fortgeschritten und z.B. die Resorption von Quercetin-Glycosiden aus dem Dünndarm und über den  $\text{Na}^+$ -abhängigen Glucosetransporter SGLT1 als intaktes Glycosid [241, 253] oder aber der enterohepatische Kreislauf bei Genistein [257] nachgewiesen wurde, sind die Kenntnisse hierzu bei Anthocyanen noch sehr begrenzt.

---

## 2 Problemstellung

Anthocyanen werden seit jeher gesundheitsfördernde Eigenschaften zugeschrieben, sei es zur Bekämpfung von Harnwegsentzündungen in der Volksmedizin oder zur Verbesserung der Nachtsicht. Spätestens seit der Entdeckung des Französischen Paradoxons, der chemopräventiven Wirkung und des Schutzes vor allgemeinen Prozessen des Alterns rücken Anthocyane auch in der Diskussion um die Prävention von Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen in den Mittelpunkt. Diese beiden Erkrankungen stehen heute in der Statistik der Todesursachen in Deutschland an vorderster Stelle.

Obwohl Anthocyane in der Natur in zahlreichen Obst- und Gemüsesorten sehr weit verbreitet sind, und die geschätzte tägliche Aufnahme verglichen mit anderen Flavonoiden und sekundären Pflanzeninhaltsstoffen hoch ist, ist das Wissen über die Bioverfügbarkeit und v.a. den Metabolismus dieser Verbindungsklasse sehr begrenzt. Dieser Mangel führt zu einer Unsicherheit in der Beurteilung ihrer tatsächlichen biologischen Relevanz bei der Prävention degenerativer Krankheiten sowie in der Risiko-Nutzen-Analyse von Supplementierungen mit Nahrungsergänzungsmitteln.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit eben dieser Frage und stellt dabei v.a. das Cyanidin-3-*O*-glucosid in den Mittelpunkt, das in der Natur die weiteste Verbreitung besitzt. Der erste Teil der Arbeit befasst sich dabei mit der Etablierung geeigneter analytischer Verfahren (SPE, HPLC, LC/MS, GC/MS), die den Nachweis und die Identifizierung der Anthocyane und ihrer potentiellen Metabolite auch im Hinblick auf ihre Instabilität und den erwarteten niedrigen Konzentrationsbereich ermöglichen.

Auf dieser Grundlage sollten im zweiten Teil neue Erkenntnisse zum Metabolismus und zur Bioverfügbarkeit der Anthocyane gewonnen werden. Die Annäherung an die Vorgänge im Körper erfolgte dabei zunächst auf der Ebene von *in vitro*-Untersuchungen, die sich mit Phase I- und Phase II-Reaktionen beschäftigten (Cytochrom P450-abhängige Oxidationen, intestinale Metabolisierungen, Methylierungs- und Glucuronidierungsreaktionen). Die Ergebnisse sollten anschließend in *in vivo*-Experimenten mit Reinsubstanzen bestätigt und ausgebaut werden. Hierzu wurde neben tierexperimentellen Untersuchungen an der Ratte auch ein Humanversuch in Form einer Pilotstudie durchgeführt.

Im dritten Teil der Arbeit sollte anhand von Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung der Anthocyane eine Einschätzung der biologischen Relevanz vor dem Hintergrund der Ergebnisse zum Metabolismus und zur Bioverfügbarkeit erfolgen. Diese antioxidativen Effekte werden neben anderen als Mechanismus der potentiellen antikanzerogenen Wirkung von Anthocyanen und ihres Schutzes vor Prozessen des Alterns diskutiert. Zur Abklärung wurden

Anthocyane und ihre nachgewiesenen Metabolite in verschiedenen Testsystemen (TEAC-, FRAP-, ORAC-Assay) eingesetzt, die nach Modifizierung etabliert wurden. Neben der Untersuchung des antioxidativen Potentials der Einzelsubstanzen sollte dabei gleichzeitig auch die Frage eines möglichen synergistischen Zusammenwirkens aller Metabolite beleuchtet werden.

---

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Entwicklung und Etablierung geeigneter analytischer Methoden

#### 3.1.1 Etablierung einer geeigneten Festphasenextraktion

Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit und den dadurch erwarteten niedrigen Konzentrationen in den biologischen Matrices ist bei der Vorbereitung der Proben neben einer Aufreinigung ein Anreicherungsschritt notwendig. Beide Ziele erfüllt eine Festphasenextraktion (SPE), wobei diese optimalerweise alle interessierenden Substanzen bei hoher Wiederfindung aufkonzentriert und dabei möglichst viele störenden Komponenten entfernt.

Die im Rahmen dieser Arbeit zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung von Proben verwendeten Festphasenextraktionen wurden durch Variation des Säulenmaterials sowie der Vorkonditionierungs-, Wasch- und Elutionsbedingungen (Volumina- und Lösungsmittelvariationen) zu den in 6.2.1.3 beschriebenen Bedingungen hinsichtlich der Wiederfindung der Anthocyane (verschiedene 3-*O*-Monoglucoside, 3,5-*O*-Diglucoside und Aglykone sowie die acylierten Anthocyane der Radieschenschale) und ausgewählter phenolischer Säuren (Vanilinsäure(VS), Protocatechusäure (PCS), Syringasäure (SS)) optimiert.

Die hier angeführten Wiederfindungen stellen Mittelwerte aus mindestens vier unabhängig durchgeführten Analysen dar und wurden im Falle der Anthocyane mittels HPLC (HPLC-System 1, vgl. 6.2.1.5) und im Falle der phenolischen Säuren mittels HPLC (HPLC-System 1) und GC/MS (vgl. 6.2.1.6) bestimmt. Sie lagen für die verschiedenen Anthocyane bei Werten zwischen 91 und 96% und bei den getesteten phenolischen Säuren zwischen 95 und 102%.

Die in der Literatur beschriebenen SPE mit C18-Phasen ergaben zwar hohe Wiederfindungsraten für die Anthocyane (91–98%) aber schlechte Raten für die phenolischen Säuren (7 – 39%). Ein zusätzlicher Elutionsschritt mit Ethylacetat steigerte die Wiederfindung auf Werte von bis zu 76%, senkte jedoch die Wiederfindung für Anthocyane auf maximal 75%. Die hier angewandte SPE mit OASIS HLB-Kartuschen erlaubt hingegen die gleichzeitige Aufarbeitung von Anthocyanen und phenolischen Säuren.

Neben der Optimierung der Festphasenextraktion wurde auch der Einfluss von Ultraschallbehandlung auf die Stabilität der Anthocyane untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Anthocyane durch die Einwirkung von Ultraschall keine zusätzliche Destabilisierung erfahren.

### 3.1.2 Etablierung einer geeigneten Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Isolierung der Anthocyane aus komplexen Matrices wie die der Rattenorgane, die im Anschluss an einen Zellaufschluss stattfindet und bei der größere Volumina anfallen, fordert die Möglichkeit einer Flüssig-Flüssig-Extraktion, da die SPE hier an ihre Grenzen stößt. Hierzu wurden verschiedene Lösungsmittel (Ethylacetat, Toluol, Chloroform, Butanol, Dichlormethan) und Lösungsmittelgemische bei verschiedenen pH-Werten getestet. Aufgrund der besten Wiederfindung der Anthocyane aus angesäuertem, wässrigem System ( $\geq 95\%$ ) oder aus angesäuertem Preiselbeersaft ( $\geq 90\%$ ) wurde die Extraktion für einen pH-Wert von 1 und das Lösungsmittel Butanol etabliert.

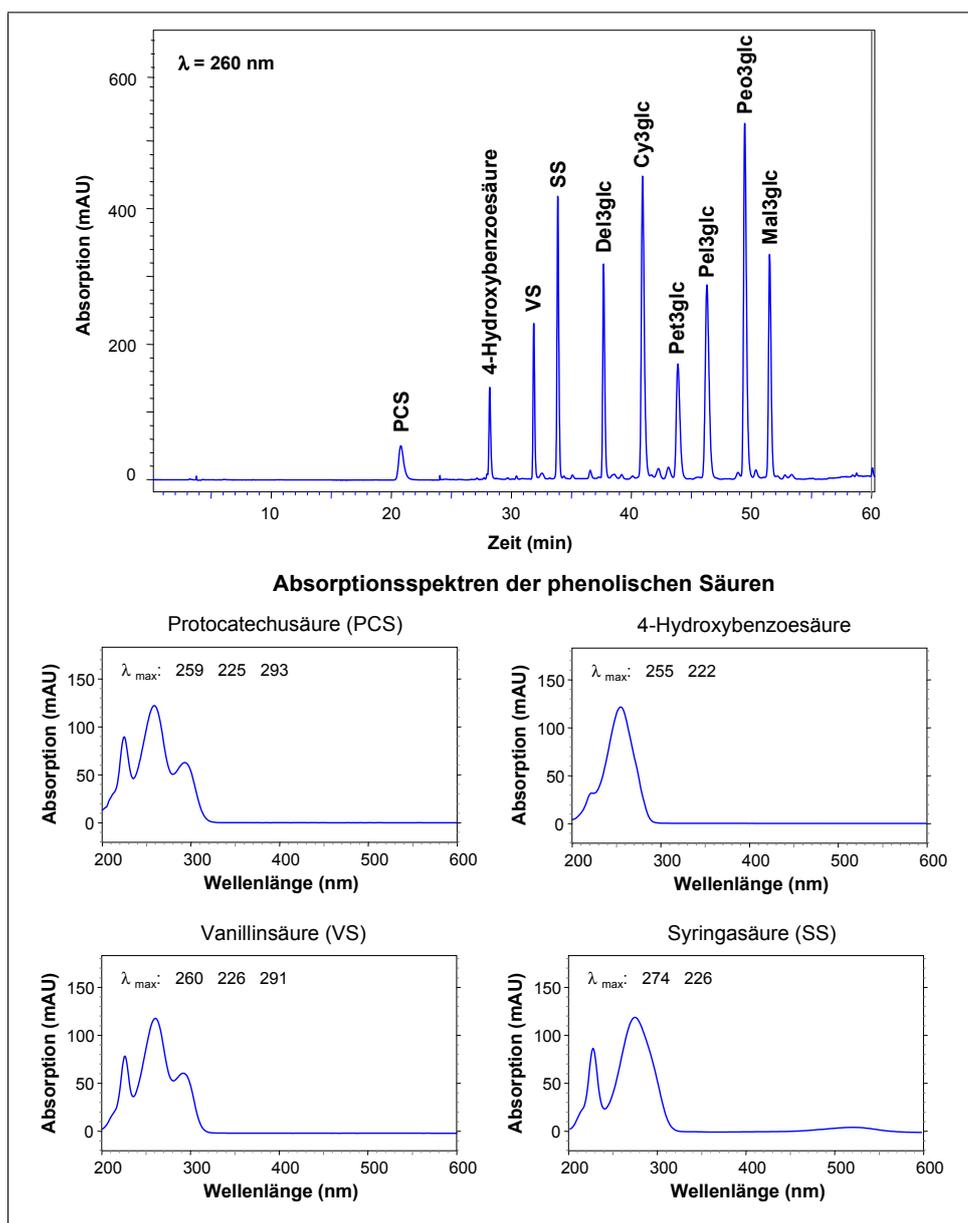
### 3.1.3 Etablierung einer geeigneten HPLC-Methode

In der Literatur sind zahlreiche Methoden zur flüssigchromatographischen Trennung von Anthocyanen beschrieben [21, 258], die jedoch nur die Trennung und den Nachweis der Anthocyane selbst ermöglichen und keine Abbauprodukte und Metabolite wie phenolische Säuren berücksichtigen. An die hier verwendete HPLC-Methode wurde die Anforderung gestellt, alle interessierenden Substanzen in möglichst kurzer Zeit basisliniengetrennt zu analysieren. Die unter 6.2.1.5 beschriebene Methode erfüllt diese Ansprüche und ermöglicht die Trennung sämtlicher Anthocyan-3-Glucoside sowie der phenolischen Säuren. Ein repräsentatives Chromatogramm dieser Trennung sowie die Absorptionsspektren der phenolischen Säuren sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

Anthocyane werden im sauren Milieu analysiert, da das Flavylium-Kation dominierende Absorptions-Eigenschaften besitzt und am stabilsten gegenüber Umwandlungen in andere Resonanz-Strukturen ist (vgl. 1.3.2). Die Bestimmung der Anthocyane in ihrem Absorptionsmaximum bei 520 nm erlaubt eine sehr selektive Messung, die jedoch aufgrund des niedrigen Absorptionskoeffizienten nicht sehr empfindlich ist [225, 240].

### 3.1.4 Etablierung einer LC/MS-Methode und Strukturaufklärung verschiedener natürlicher Anthocyane

Während die massenspektrometrische Analyse anderer Flavonoide schon seit Jahren Verwendung findet, gestaltet sich diese Methodik bei Anthocyanen als schwierig und wird erst seit kurzem angewandt. Zur Etablierung einer LC/MS-Methode zum Nachweis und zur Identifizierung verschiedener Anthocyane wurden zunächst die Messparameter mittels Fließmittelinjektionsanalyse (FIA) zu den in 6.2.1.5 bestimmten Werten ermittelt. Die Methode wurde



**Abbildung 3.12:** Repräsentatives HPLC/DAD-Chromatogramm (Detektion bei 260 nm) der Trennung von Anthocyan-3-Glucosiden und bestimmter phenolischer Säuren sowie deren Absorptionsspektren

zur Identifizierung und Strukturaufklärung mehrerer natürlicher Anthocyane in verschiedenen Lebensmitteln sowie in allen strukturelevanten Fragestellungen der Metabolismus- und Bioverfügbarkeitsuntersuchungen angewandt.

### 3.1.4.1 Strukturaufklärung

Zur Überprüfung der Funktionalität der entwickelten LC/MS-Methode wurden verschiedene Lebensmittel untersucht, die meist mehrere, strukturell sehr unterschiedliche Anthocyane enthielten. Die jeweiligen Hauptanthocyane wurden mittels massenspektrometrischer Messung bei verschiedenen Fragmentorspannungen (100 und 200 V) analysiert. In den vorgeschlagenen Strukturen sind alle Informationen aus den Fragmentierungsmustern,

den Retentionszeiten und den Absorptionsspektren (vgl. 1.4.1) einbezogen. Exakte konfigurationskonforme Strukturen sind erst nach weiteren Messungen, etwa mittels NMR möglich. Neben den hier separat beschriebenen Lebensmitteln (Radieschen und Rotkohl) wurden verschiedene Anthocyane zahlreicher weiterer Proben (roter Rettich, Radicchio, Aubergine, Erdbeere, rote Johannisbeere, Himbeere, Aronia-, Holunderbeer-, Heidelbeer- und Preiselbeersaft) untersucht (Daten nicht gezeigt).

### Radieschenschale (*Raphanus sativus*)

Die erhaltenen Massenspektren der in der Schale des Radieschens enthaltenen Anthocyane konnten zu den in der Literatur beschriebenen Strukturen [36, 259–263] zugeordnet werden. Abbildung 3.13 zeigt das Massenspektrum des Hauptanthocyanins aus der Radieschenschale.

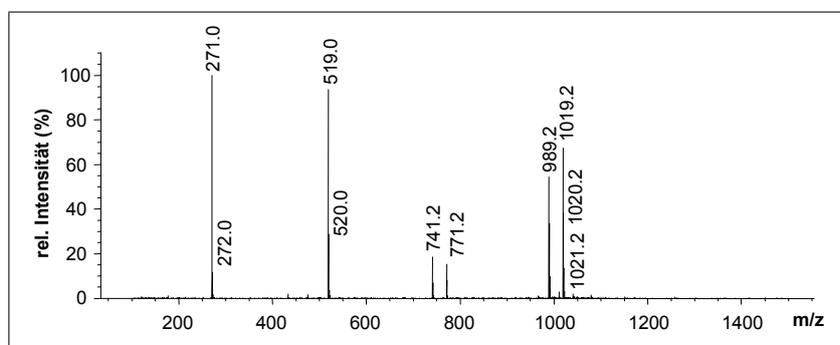
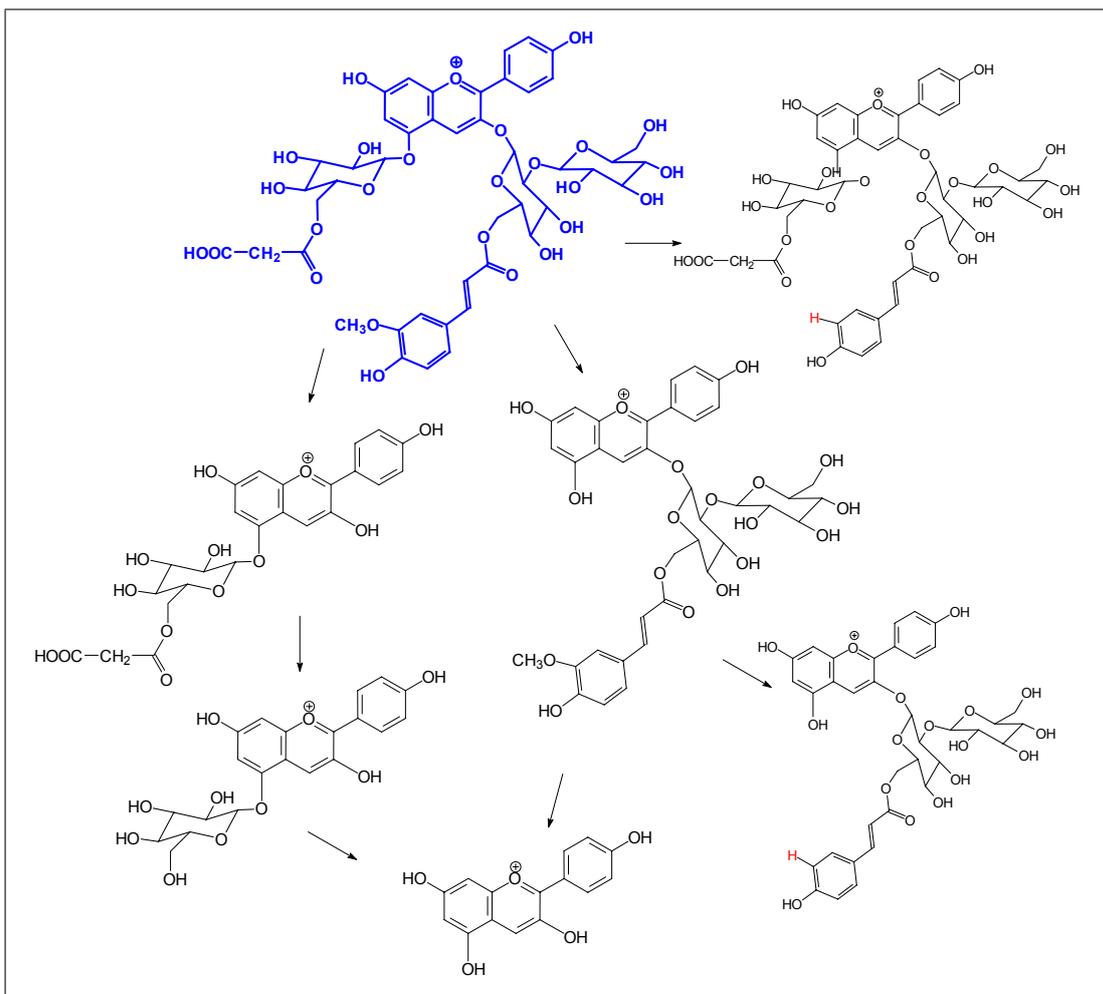


Abbildung 3.13: Massenspektrum des Hauptanthocyanins der Radieschenschale

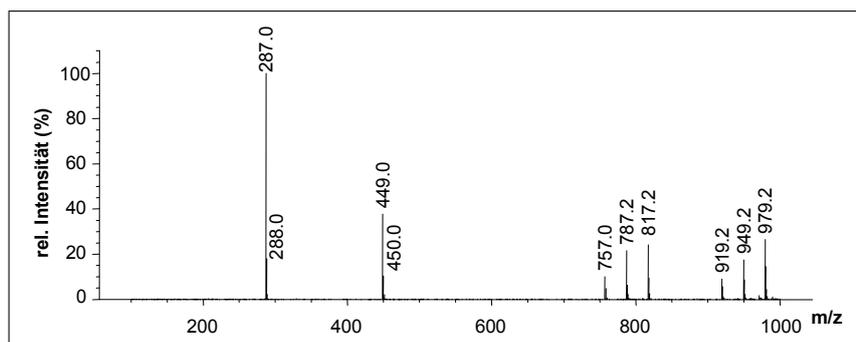
Die sich aus dem Massenspektrum ergebende Struktur und das Fragmentierungsmuster ist in Abbildung 3.14 dargestellt (Pelargonidin-3-*O*-[2-*O*-( $\beta$ -glucopyranosyl)-6-*O*-(*trans*-feruloyl)- $\beta$ -glucopyranosid]-5-*O*-(6-*O*-malonyl- $\beta$ -glucopyranosid)) und stimmt mit der von Giusti et al. [260] mit Hilfe von 2-dimensionalen NMR-Messungen gewonnenen Struktur überein. Es fällt auf, dass der Säurerest des Zuckers in 3-Position (Ferulasäure) nicht separat abgespalten wird, sondern zusammen mit dem kompletten Zuckerrest fragmentiert. Aussagen über die Säurereste lassen sich am ehesten über die sukzessive Abspaltung der Methoxygruppen (Sinapin- und Ferulasäure) und den daraus resultierenden Fragmenten machen.

### Rotkohl

Das in Abbildung 3.15 gezeigte Massenspektrum konnte der Abbildung 3.16 vorgeschlagenen Struktur mit dem dargestellten Fragmentierungsmuster zugeordnet werden. Es handelt sich um Cyanidin-3-*O*-[2-*O*-( $\beta$ -glucopyranosyl)-6-*O*-sinapoyl- $\beta$ -glucopyranosid]-5-*O*- $\beta$ -glucopyranosid. Auch diese Ergebnisse stimmen mit Literaturdaten überein [50, 263, 264].



**Abbildung 3.14:** Struktur und MS-Fragmentierungsmuster des Hauptanthocyans der Radieschenschale



**Abbildung 3.15:** Massenspektrum des Hauptanthocyans des Rotkohls

### 3.1.4.2 Massenübersicht

Tabelle 3.4 gibt eine Übersicht über die Massen und typische, zu erwartende Fragmente bei verschiedenen Anthocyanen an. Bei niedrigen Fragmentorspannungen (30–70 V) erhält man v.a. den Molekülpeak und nur wenige Fragmente, bei höher Spannung (100–200 V) dagegen das komplette Fragmentierungsmuster, eventuell unter Verlust des Molekülpeaks.

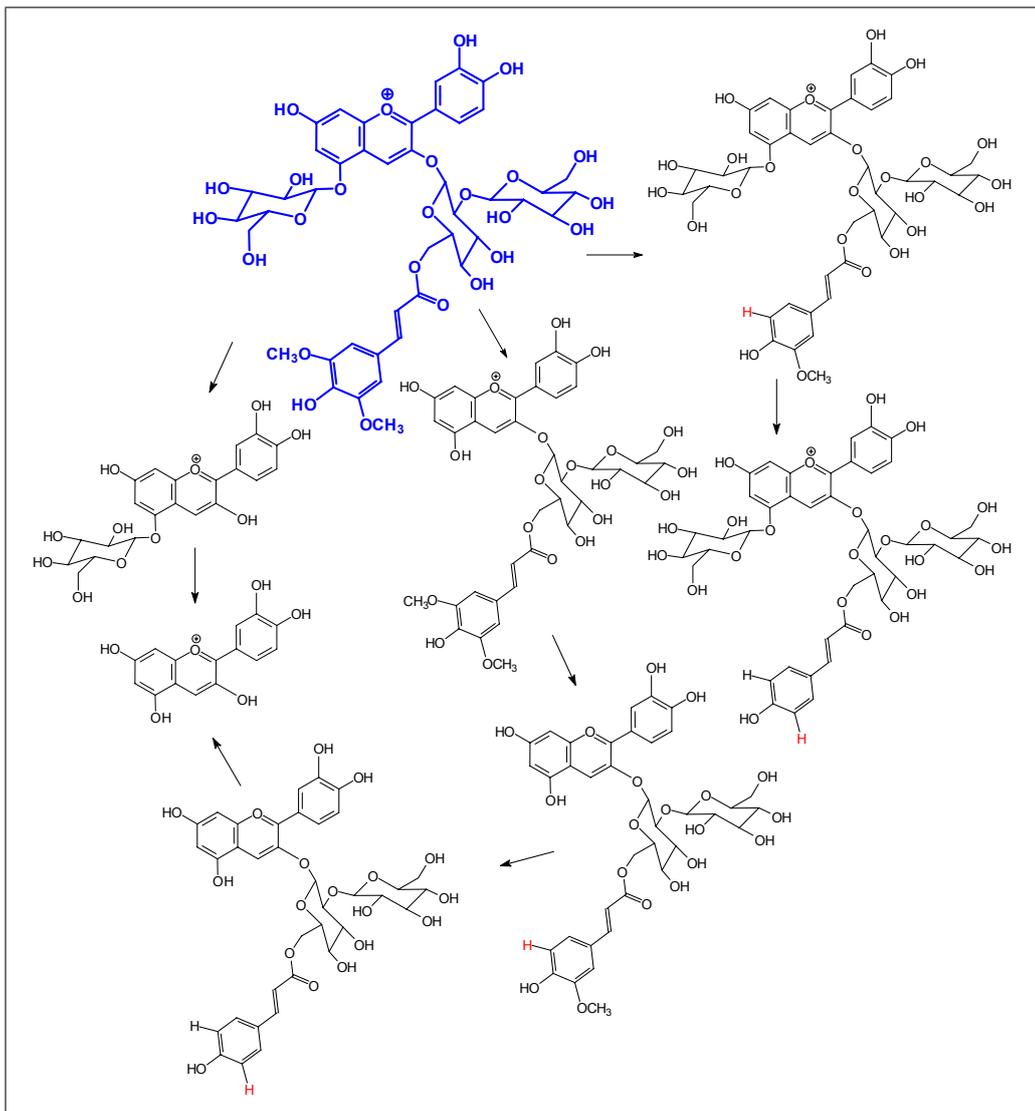


Abbildung 3.16: Struktur und MS-Fragmentierungsmuster des Hauptanthocyans des Rotkohls

### 3.1.5 Etablierung einer GC/MS-Methode zum Nachweis phenolischer Säuren

Zwar ermöglicht auch die unter 3.1.3 vorgestellte HPLC-Methode die Trennung und den Nachweis der phenolischen Säuren. Diese Methode ist jedoch nur bei einer einfachen Probenmatrix anwendbar, da es sonst zu Coelutionen verschiedener Substanzen kommt. Komplexere Matrices mit vielen verschiedenen Komponenten, wie sie Körperflüssigkeiten darstellen, und der Nachweis im Spurenbereich erforderten jedoch die Entwicklung einer anderen, empfindlicheren Methode. Hierzu wurde die unter 6.2.1.6 beschriebene GC/MS-Methode etabliert, die durch die Selektion von Massenspuren aus der Messung des Full Scans die komplexen Gemische einer Auswertung zugänglich machte.

**Tabelle 3.4:** Fragmentierungsmuster verschiedener Anthocyane bei geeigneter Fragmentorspannung

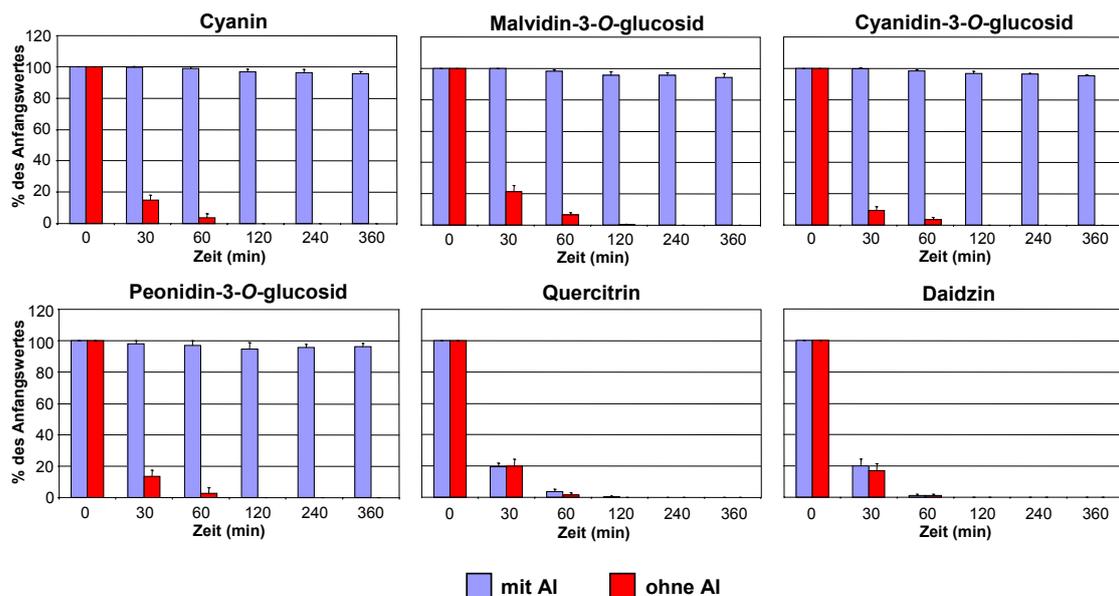
Substanz	Molekülpeak und Fragmente
Cy	287 (M <sup>+</sup> )
Cy3glc	449 (M <sup>+</sup> ) 287 (M <sup>+</sup> – glc: – 162)
Cy35d-glc	611 (M <sup>+</sup> ) 449 (M <sup>+</sup> – glc: – 162) 287 (M <sup>+</sup> – 2 × glc: – 2 × 162)
Cyanidin-glucosid-monoglucuronid	625 (M <sup>+</sup> ) 449 (Glucuronsäure-Abspaltung: – 176) 287 (Glucose-Abspaltung: – 162)
Cyanidin-monoglucuronid	463 (M <sup>+</sup> ) 287 (Glucuronsäure-Abspaltung: – 176)
Del3glc	465 (M <sup>+</sup> ) 303 (M <sup>+</sup> – glc: – 162)
Mal3glc	493 (M <sup>+</sup> ) 331 (M <sup>+</sup> – glc: – 162)
Peo3glc	463 (M <sup>+</sup> ) 301 (M <sup>+</sup> – glc: – 162)
Peonidin-monoglucuronid	477 (M <sup>+</sup> ) 301 (Glucuronsäure-Abspaltung: – 176)

### 3.1.6 Einfluss dreiwertiger Metallkationen auf die enzymatische Spaltung

Da bei der Verstoffwechslung der Anthocyane *in vivo* Glucuronidierungs- und Sulfatierungsreaktionen zu erwarten sind, müssen diese Metabolite beim analytischen Nachweis berücksichtigt werden. Das Auftreten von entsprechenden Konjugaten der gebildeten phenolischen Säuren und deren Nachweis mittels gaschromatographischer Analysen erfordert die enzymatische Spaltung der Phase II-Konjugate mittels  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase. Da bei dieser Enzymbehandlung auch die entsprechenden Anthocyan-Konjugate und auch die Anthocyan-Glucoside zu den Aglykonen gespalten (vgl. 3.2.2) und im weiteren Verlauf zu eben diesen phenolischen Säuren zerfallen würden (vgl. 1.3.3), wäre ein Nachweis der endogen im Anthocyan-Metabolismus gebildeten phenolischen Säuren in ihrer konjugierten Form nicht von den einfachen Zerfallsprodukten der Anthocyanidine zu unterscheiden.

Durch den Einsatz von Aluminium-Ionen ( $280 \mu\text{M}$ ) bei den enzymatischen Inkubationen mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase konnte eine Methode etabliert werden, die die Spaltung der Anthocyan-Glycoside (Glucoside und Glucuronide) selektiv verhindert, ohne dabei das Enzym zu inhibieren (vgl. Abb. 3.17). Wie Coinkubationen von Anthocyan-Glucosiden mit Daidzin oder Quercitrin zeigten, werden diese beiden Glycoside gespalten, während das Anthocyan unverändert blieb. Auch mittels gaschromatographischer Methoden waren keine phenolischen Säuren als finale Produkte der Anthocyan-Glucosid-Spaltung nachweisbar (vgl. 3.2.2). Die leichte Abnahme der Anthocyan-Konzentration während der Inkubation ist z.T. auf Wechselwirkungen mit den Proteinstrukturen des Enzyms zurückzuführen.

Wie auch bei der stabilisierenden Wirkung von  $\text{Al}^{3+}$ -Ionen auf die Anthocyanidine gezeigt werden konnte (vgl. 3.2.1), ist wahrscheinlich die Möglichkeit der Anthocyane zur Komplexbildung mit dreiwertigen Metallionen (vgl. Abb. 1.7) für diesen Effekt verantwortlich; der entstehende Komplex ist sterisch zu anspruchsvoll und bindet nicht mehr an das aktive Zentrum der Enzyme.



**Abbildung 3.17:** Selektive Hemmung der enzymatischen Spaltung von Anthocyan-mono- und -diglucosiden bei gleichzeitiger Spaltung von Daidzin und Isoquercitrin

Auch bei der enzymatischen Spaltung von Urinproben nach Anthocyan-Aufnahme (vgl. 3.4.2) wurden die Anthocyan-Glucuronide in Gegenwart von Aluminium-Ionen nicht gespalten, während zugesetztes Quercitrin bzw. Isoquercetin innerhalb von 2 h zum Aglykon hydrolysiert wurde. Die Inkubationsbedingungen für enzymatische Konjugat-Spaltungen wurden folglich auf diese Bedingungen festgelegt.

## 3.2 Allgemeine Untersuchungen zu Anthocyanen

### 3.2.1 Stabilität der Aglykone bei unterschiedlichen pH-Werten und Einfluss dreiwertiger Metallkationen auf die Stabilität

Die Stabilität der Anthocyanidine wurde anhand zweier Testsysteme untersucht (vgl. 6.2.2.1). Bei Inkubation höherer Anthocyanidin-Konzentrationen (ab ca. 200  $\mu\text{M}$ ) bei 37°C (Testsystem I) trat ein rascher Abbau der Anthocyane ein, der bei Malvidin (Mal), Cyanidin (Cy), Peonidin (Peo) und Delphinidin (Del) nach 60 min nahezu abgeschlossen war. Pelargonidin (Pel) zeigte dagegen eine größere Stabilität und war nach 30 min nur etwa zu 20% abgebaut. Zu Beginn der Reaktion (nach 30 min) wurden einige neue Verbindungen detektiert (vgl. Abb. 3.18 am Beispiel des Cy). Die Peaks 1–5 besitzen ein Anthocyan-ähnliches Absorptionsspektrum und die in Abbildung 3.19 dargestellten Massenspektren mit (Quasi-)Molekülonen bei  $m/z$ -Verhältnissen von 589, 605 bzw. 587. Darüberhinaus konnte PCS als Zerfallsprodukt nachgewiesen werden, das nach dem in Abbildung 1.6 gezeigten Zerfallsschema entsteht.

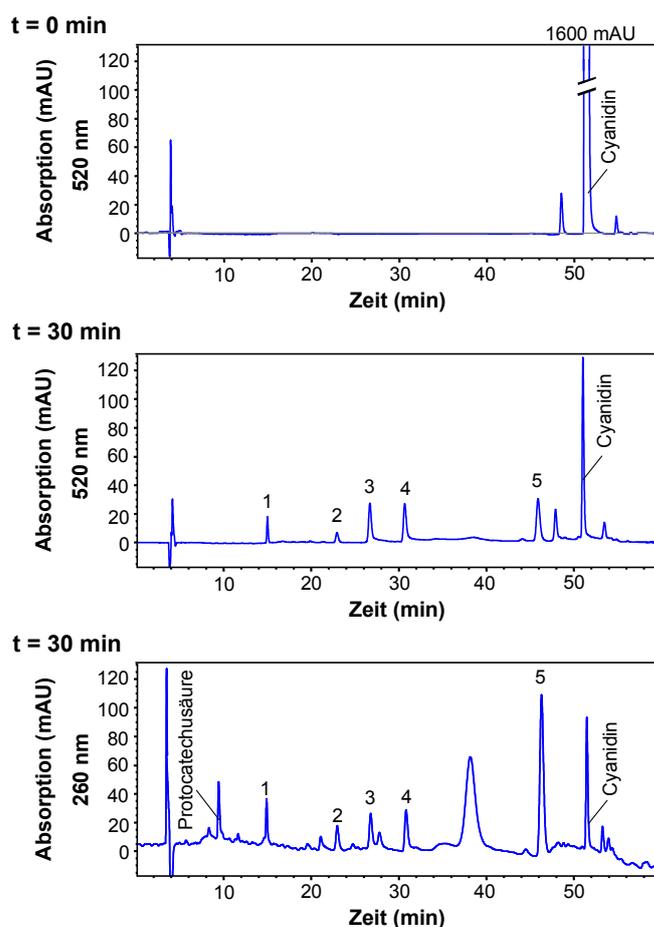
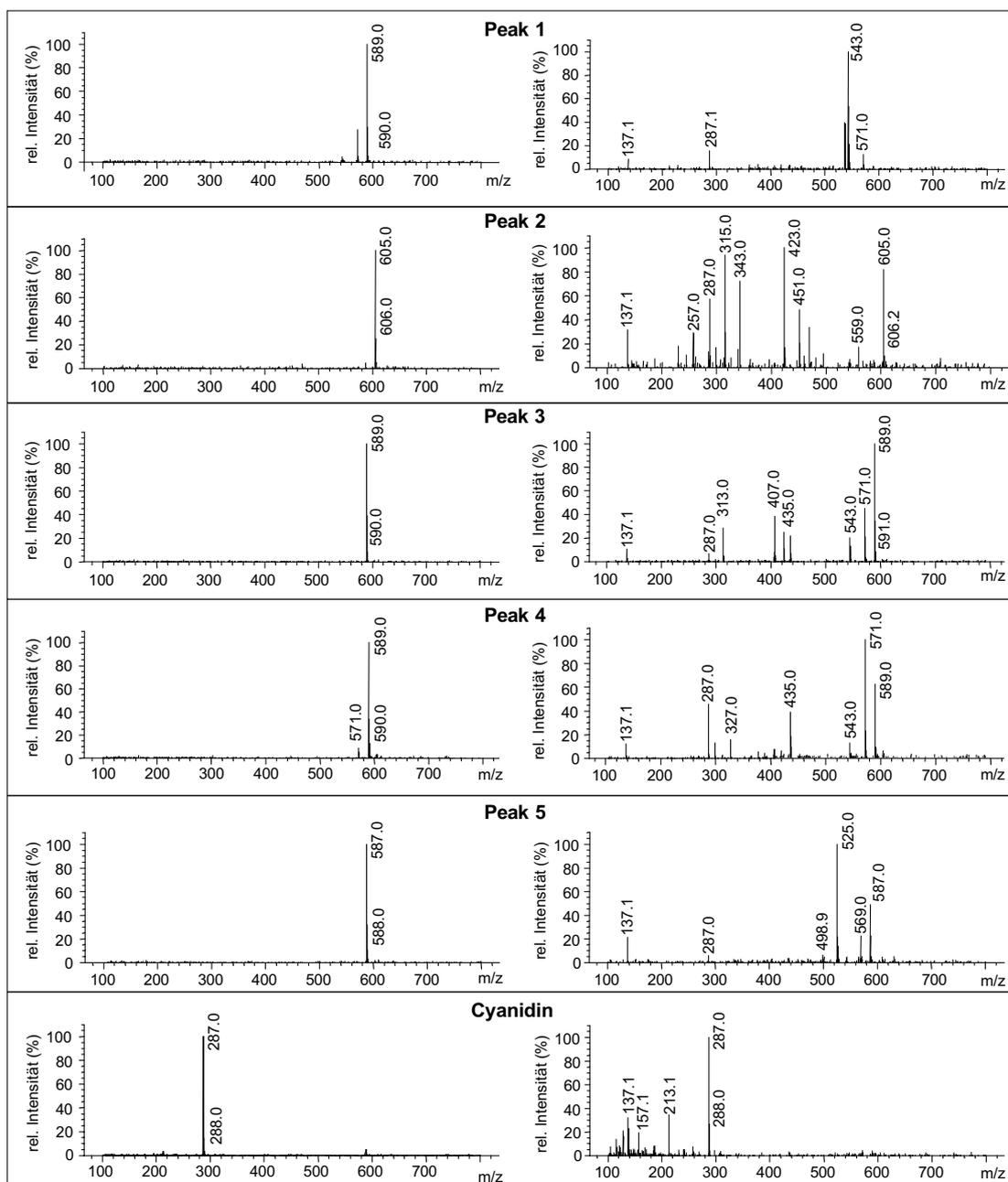
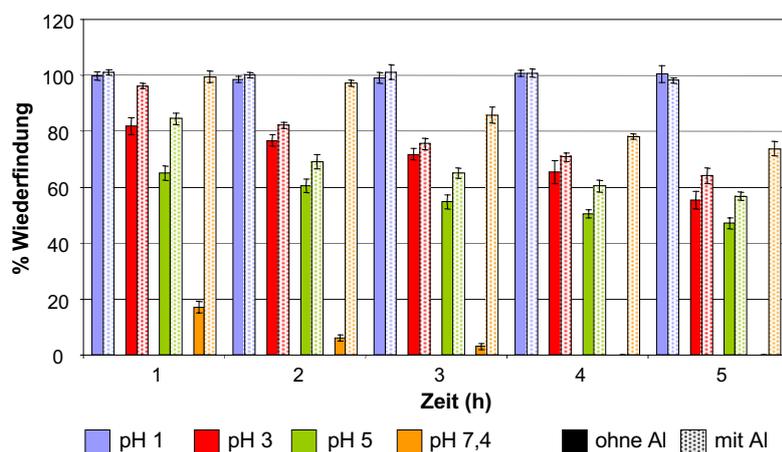


Abbildung 3.18: HPLC-Chromatogramm des Abbauprozesses von Cyanidin im Testsystem I



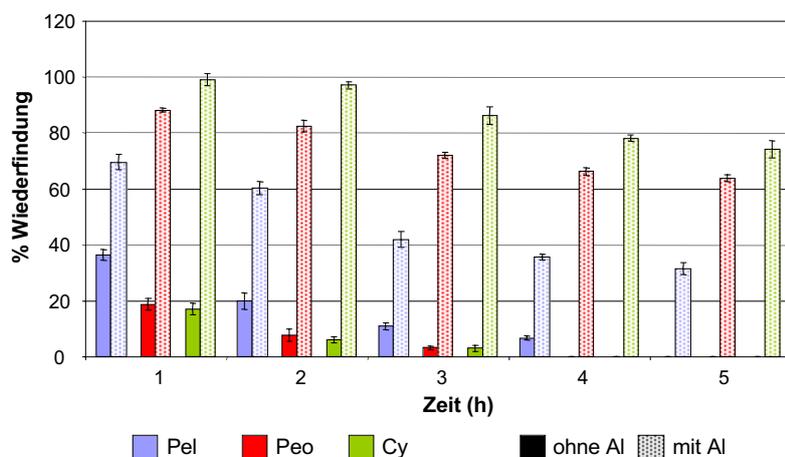
**Abbildung 3.19:** HPLC/APCI-ES-Massenspektren der Abbauprodukte des Cyanidins im Testsystem I (links: Fragmentorspannung 100 V; rechts: Fragmentorspannung 200 V)

Beim Zerfall niedrigerer Anthocyanidin-Konzentrationen bei RT (Testsystem II) wurden keine Anthocyan-artigen Intermediate gebildet. Die Geschwindigkeit des Zerfalls und damit die Instabilität der Anthocyane nahm mit steigendem pH-Wert zu und ist in Abbildung 3.20 für Cy dargestellt. Während Cy bei pH 1,0 auch über 5 h hinweg stabil war, war der Abbau der Anthocyan-Struktur bei pH 7,4 bereits nach 4 h komplett abgeschlossen. Durch die Komplexbildung in Anwesenheit von dreiwertigen Metallionen (vgl. Abb. 1.7) wie z.B.  $\text{Al}^{3+}$  gewinnen die Anthocyanidine auch bei höheren pH-Werten an Stabilität. Der stärkste stabilisierende Effekt war dabei bei pH 7,4 zu erkennen (Abb. 3.20).



**Abbildung 3.20:** Stabilität von Cyanidin bei unterschiedlichen pH-Werten im Testsystem II und stabilisierender Effekt von  $\text{Al}^{3+}$

Abbildung 3.21 zeigt die unterschiedlichen Zerfallsgeschwindigkeiten von Pel, Peo und Cy bei pH 7,4. Auch hier wird die höhere Stabilität von Pel deutlich. Vergleicht man jedoch den stabilisierenden Effekt der Aluminium-Ionen, so wird erkennbar, dass Cy mit seinen beiden *ortho*-ständigen Hydroxylgruppen im B-Ring am stärksten stabilisiert wird.



**Abbildung 3.21:** Stabilität von Pelargonidin, Peonidin und Cyanidin bei pH 7,4 im Testsystem II und stabilisierender Effekt von  $\text{Al}^{3+}$

### 3.2.2 Verhalten der Anthocyane bei enzymatischen Umsetzungen

#### 3.2.2.1 Spaltung mit $\beta$ -Glucuronidase

Die zur Spaltung von Glucuroniden eingesetzte  $\beta$ -Glucuronidase spaltet neben Glucuroniden auch  $\beta$ -Glucoside. Abbildung 3.22 zeigt die Spaltung der Monoglucoside Cyanidin-3-*O*-glucosid (Cy3glc), Malvidin-3-*O*-glucosid (Mal3glc) und Peonidin-3-*O*-glucosid (Peo3glc) sowie des Diglucosids Cyanin. In allen Fällen verlief die Hydrolyse des Zuckerrestes sehr

schnell und war bereits nach 2 h komplett abgeschlossen. Da die Reaktion bei pH 5,0 durchgeführt wurde, konnten keine Aglykone nachgewiesen werden. Dagegen fanden sich auch hier die phenolischen Säuren als Zerfallsprodukte der Anthocyanidine (vgl. Abb. 1.6).

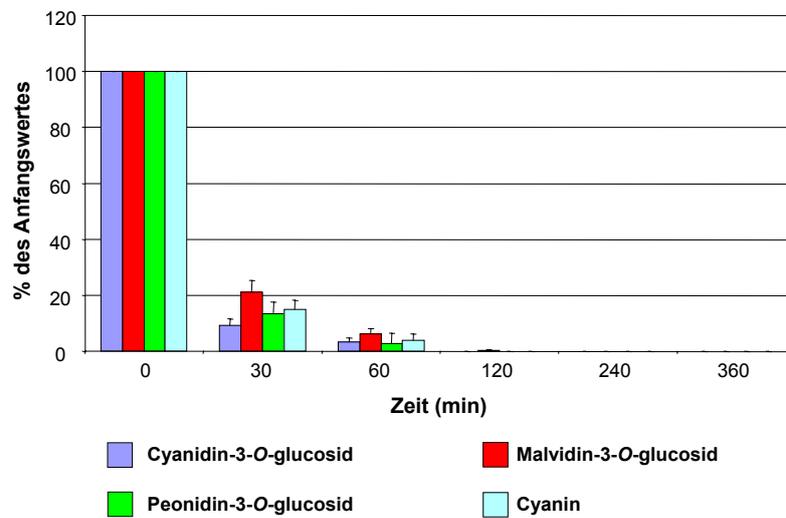


Abbildung 3.22: Enzymatische Spaltung verschiedener Anthocyane mit Glucuronidase

### 3.2.2.2 Spaltung mit $\beta$ -Glucosidase

Anthocyan-Glucoside werden durch  $\beta$ -Glucosidase gespalten, wobei die Spaltung wesentlich langsamer als bei der Inkubation mit Glucuronidase erfolgt, da diese auch eine wesentlich geringe Aktivität besitzt (7800 U verglichen mit 367500 U bei der Glucuronidase). Zudem erwies sich die Reaktion als viel stärker pH-abhängig und fand nur im optimalen pH-Bereich (pH 5) merklich statt. Bei diesen Bedingungen waren von den getesteten Anthocyan-3-O-glucosiden Mal3glc, Cy3glc und Peo3glc nach 4 h zwischen 35 und 49%, nach 7 h zwischen 52 und 61% der eingesetzten Menge gespalten. Nach 24 h war die Reaktion bei allen Anthocyanen abgeschlossen, wobei sich als Produkte auch hier nur die entsprechenden phenolischen Säuren und keine Aglykone fanden.

## 3.3 *in vitro*-Untersuchungen zum Metabolismus

### 3.3.1 Phase I-Reaktionen

#### 3.3.1.1 Cytochrom P450-abhängige Oxidationen

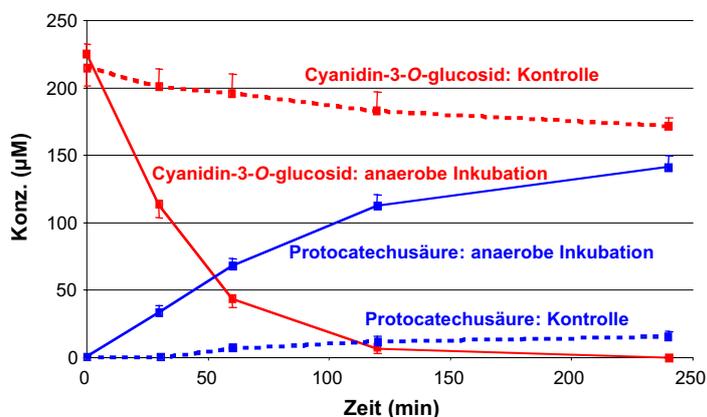
Als Modellreaktion für die durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen katalysierten Oxidationsreaktionen des Phase I-Metabolismus fand die unter 6.2.3.1 beschriebene mikrosomale Umsetzung Verwendung. In allen Inkubationen mit verschiedenen Anthocyanen fand keine Reaktion statt, während die Funktionalität durch die Umsetzung von Ethoxycumarin

zu Umbelliferon nachgewiesen werden konnte. Anthocyane stellen damit weder in Form der 3-*O*-Glucoside noch als Aglykone Substrate dieser Monooxygenasen dar.

### 3.3.1.2 Intestinaler Metabolismus

#### Abbau von Anthocyan-3-*O*-Glucosiden durch humane Darmflora

Anthocyan-3-glucoside (eingesetzt wurden exemplarisch Cy3glc, Mal3glc und Peo3glc) erfahren in Gegenwart von humaner Darmflora einen sehr schnellen Abbau, in dessen Verlauf ein neuer Metabolit entstand, der aus dem B-Ring des Anthocyans hervorgeht und als die dem jeweiligen Anthocyan entsprechende phenolische Säure (vgl. Tab. 1.1) identifiziert werden konnte. So entstand aus Cy3glc PCS, aus Mal3glc SS und aus Peo3glc VS. Der Abbau der Anthocyane erfolgte sehr schnell. Abbildung 3.23 zeigt stellvertretend für die analog auch bei den beiden anderen Monoglucosiden stattfindenden Vorgänge den zeitlichen Verlauf der Reaktion von Cy3glc. Bereits nach zwei Stunden waren mehr als 90% der Ausgangssubstanz abgebaut, während in Kontrollinkubationen mit hitzeinaktivierter Fäzes-Suspension nur ein leichter Abbau beobachtbar war. Dies belegt, dass v.a. die Mikroflora für den Abbauprozess der Anthocyan-Monoglucoside verantwortlich ist.

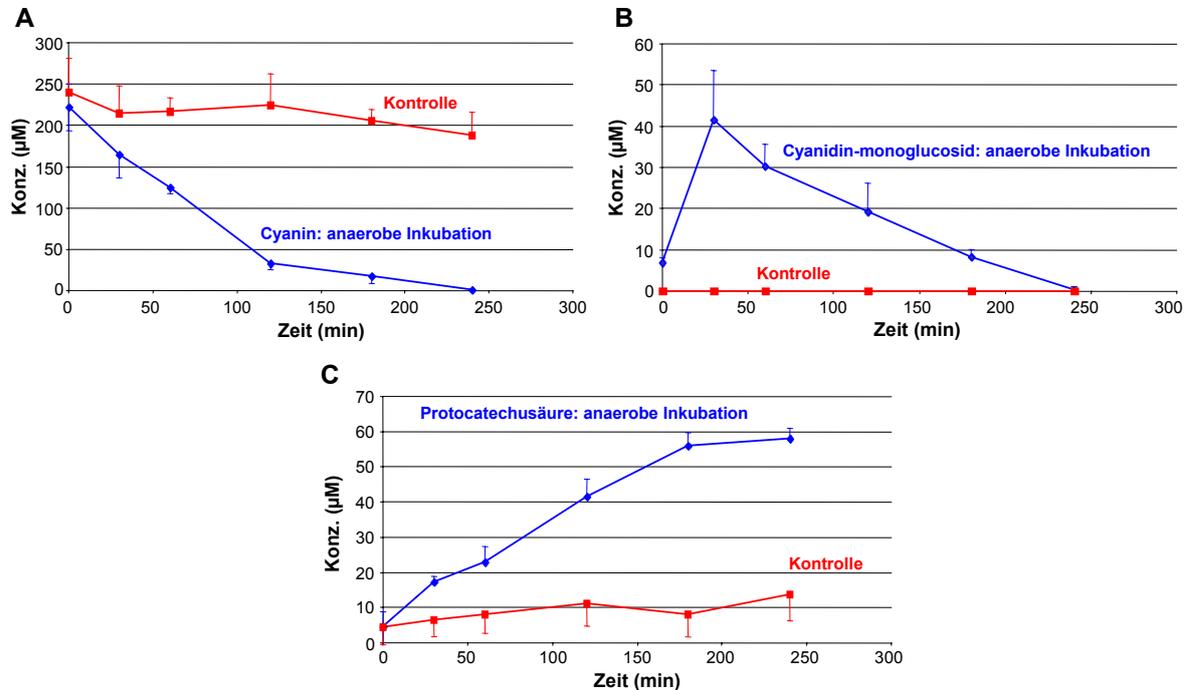


**Abbildung 3.23:** Zeitabhängiger Abbau eines Anthocyan-Monoglucosids am Beispiel des Cyanidin-3-*O*-glucosids bei Inkubation mit humaner Darmflora ( $n \geq 4$ )

#### Abbau von Anthocyan-3,5-*O*-Diglucosiden durch humane Darmflora

Der intestinale Abbau der 3,5-Diglucoside wurde an den Beispielen Cyanin (Cyanidin-3,5-*O*-diglucosid) und Malvin (Malvidin-3,5-*O*-diglucosid) untersucht. Auch hier konnte eine sehr schnelle Konzentrationsabnahme der Ausgangsverbindung beobachtet werden, wie Abbildung 3.24, A für das Cyanin zeigt, wobei ein neuer Metabolit als Intermediat auftrat, der nach Retentionszeiten- und Absorptionsspektrenvergleich als Cy3glc identifiziert werden konnte. Dieses Monoglucosid erreichte nach 30 min seine maximale Konzentration und

war nach 4 h vollständig abgebaut (Abb. 3.24, B). Zusätzlich konnte eine deutliche Zunahme der PCS-Konzentration, dem Zerfallsprodukt des Cy (vgl. Tab. 1.1), beobachtet werden (Abb. 3.24, C). Bei Inkubationen mit autoklavierten Fäzes-Suspensionen war das Diglucosid dagegen stabil; es traten keine Metabolite oder Zerfallsprodukte auf.



**Abbildung 3.24:** Zeitabhängiger Abbau eines Anthocyan-Diglucosids am Beispiel des Cyanins bei Inkubation mit humaner Darmflora ( $n \geq 4$ )

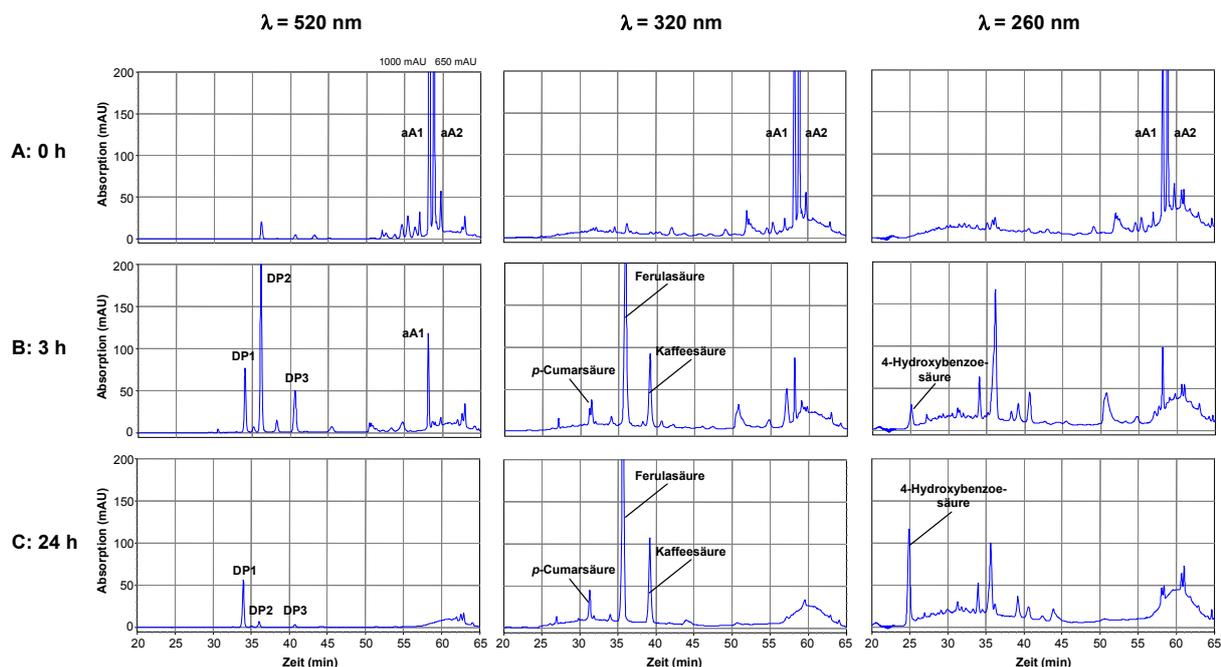
Analoge Ergebnisse konnten für Malvin erhalten werden, das über die Zwischenstufe des Mal3glc zu SS abgebaut wird, die sich vom B-Ring des Mal ableitet.

### Abbau von acylierten Anthocyanen durch humane Darmflora

Der Abbau acylierter Anthocyane wurde anhand des Radieschenschalen-Extraktes (*Raphanus sativus L.*) untersucht, der, wie in 6.2.1.1 beschrieben, gewonnen wurde. Die Hauptanthocyane in diesem Extrakt waren – gemäß eigenen Messungen (3.1.4.1) und nach Angaben aus der Literatur [36] – Derivate des Pelargonidin-3-sophorosid-5-glucosids (Pel-soph/glc), das an verschiedenen Positionen der Zuckerreste mit *p*-Cumar-, Ferula-, Kaffee- oder Malonsäure acyliert ist.

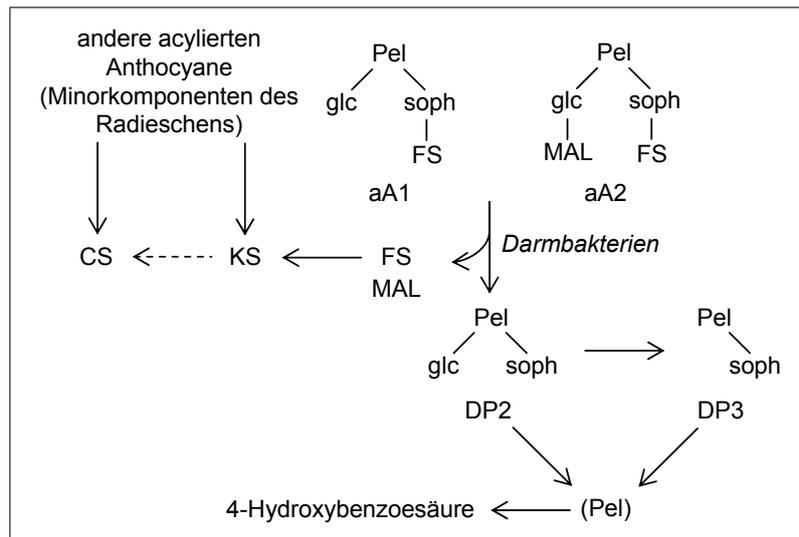
Wie schon für Mono- und Diglucoside gezeigt, werden auch acylierte Anthocyane durch die humane Darmflora abgebaut, wobei aus den beiden Hauptkomponenten aA1 (Pel-soph/glc, das mit Ferulasäure acyliert ist) und aA2 (Pel-soph/glc, das mit Ferulasäure und Malonsäure acyliert ist, vgl. Abb. 3.14) verschiedene Intermediate entstehen, die Anthocyan-ähnliche Absorptionsspektren besitzen. Abbildung 3.25 zeigt die entsprechenden Chromatogramme

bei drei verschiedenen Wellenlängen (520, 320 und 260 nm) zu den Zeitpunkten 0, 3 und 24 Stunden.



**Abbildung 3.25:** Repräsentative Chromatogramme des Abbaus der Anthocyane aus dem Radieschenschalenextrakt bei verschiedenen Detektionswellenlängen (Zeile A: vor der Inkubation; Zeile B: nach 3-stündiger Reaktion; Zeile C: nach 24-stündiger Reaktion)

Wie die Chromatogramme bei 520 nm zeigen, werden hauptsächlich drei Abbauprodukte (DP) mit Anthocyan-Charakter gebildet (DP1, DP2 und DP3). Mittels LC/MS-Analysen, Retentionszeiten- und Absorptionsspektrenvergleichen konnte DP3 als Pelargonidin-sophorosid und DP2 als das schon im Rohextrakt in geringen Mengen enthaltene Pelargonidin-sophorosid-glucosid identifiziert werden. Die Struktur der Verbindung DP1 konnte dagegen bislang nicht aufgeklärt werden. Als weitere Metabolite konnten das Zerfallsprodukt des Pel, 4-Hydroxybenzoesäure (Abb. 3.25, B und C, Detektion bei 260 nm), oder die Hydroxycimtsäuren *p*-Cumar-, Ferula- und Kaffeesäure (Abb. 3.25, B und C, Detektion bei 320 nm) nachgewiesen werden. Die beiden Hauptanthocyane aA1 und aA2 waren bereits nach 4 h vollständig metabolisiert, während der komplette Abbau aller entstandener Anthocyan-Metabolite erst nach 24 h abgeschlossen war. In Kontrollinkubationen erwiesen sich die acylierten Anthocyane dagegen als sehr stabil und unterlagen auch nach 24 h kaum einer Abbaureaktion. Der postulierte Abbaumechanismus dieser Metabolite ist in Abbildung 3.26 zusammengefasst.



**Abbildung 3.26:** Angenommener Abbaumechanismus der acylierten Anthocyane der Radieschenschale

### Abbau von Phenolsäuren durch humane Darmflora

Die Inkubation von SS, VS und PCS mit humaner Darmflora zeigte während der ersten vier Stunden keinen Effekt. Einzig im Fall der PCS und nach längeren Inkubationszeiten (24 bzw. 48 Stunden) konnte eine Abnahme der Substratkonzentration beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Mit den verwendeten analytischen Methoden waren dabei keine Metabolite identifizierbar.

#### 3.3.2 Phase II-Reaktionen

Phase II-Reaktionen wie Methylierungs- oder Glucuronidierungsreaktionen sind für viele Flavonoide wie z.B. Naringenin oder Hesperidin bekannt und können z.B. im Dünndarm, der Leber oder der Niere stattfinden [249, 265].

##### 3.3.2.1 Methylierung

Die Chromatogramme der Methylierungsreaktion von Cy und Cy3glc mit den entsprechenden Massenspektren sind in Abbildung 3.27 und Abbildung 3.28 dargestellt. Mit den verwendeten analytischen Methoden (HPLC-System 1 und 2) konnte jeweils ein Methylierungsprodukt nachgewiesen werden. Die beiden Produkte konnten nach massenspektrometrischer Analyse und Cochromatographie sowie Retentionszeitenvergleichen als die entsprechenden Peonidin-Derivate identifiziert werden.

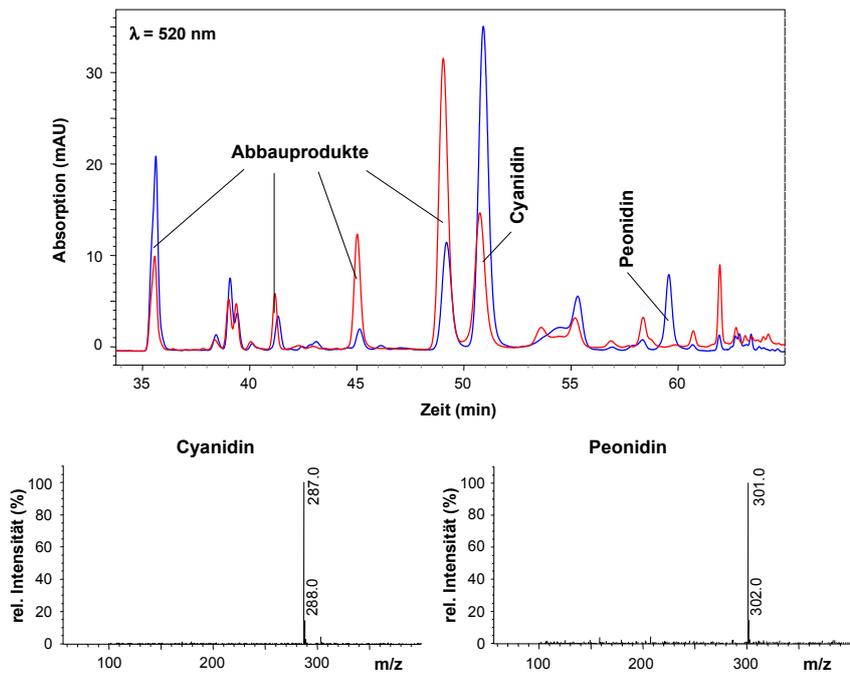


Abbildung 3.27: HPLC-Chromatogramm der Cyanidin-Methylierung mit SAM/COMT und die Massenspektren der gebildeten Substanzen (blaue Linie: Umsetzung; rote Linie: Negativkontrolle)

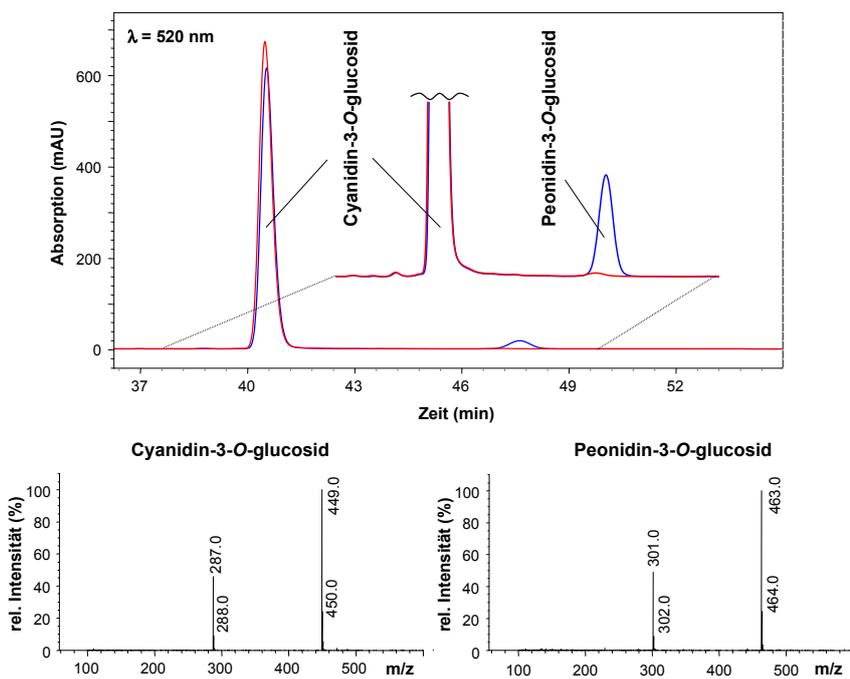


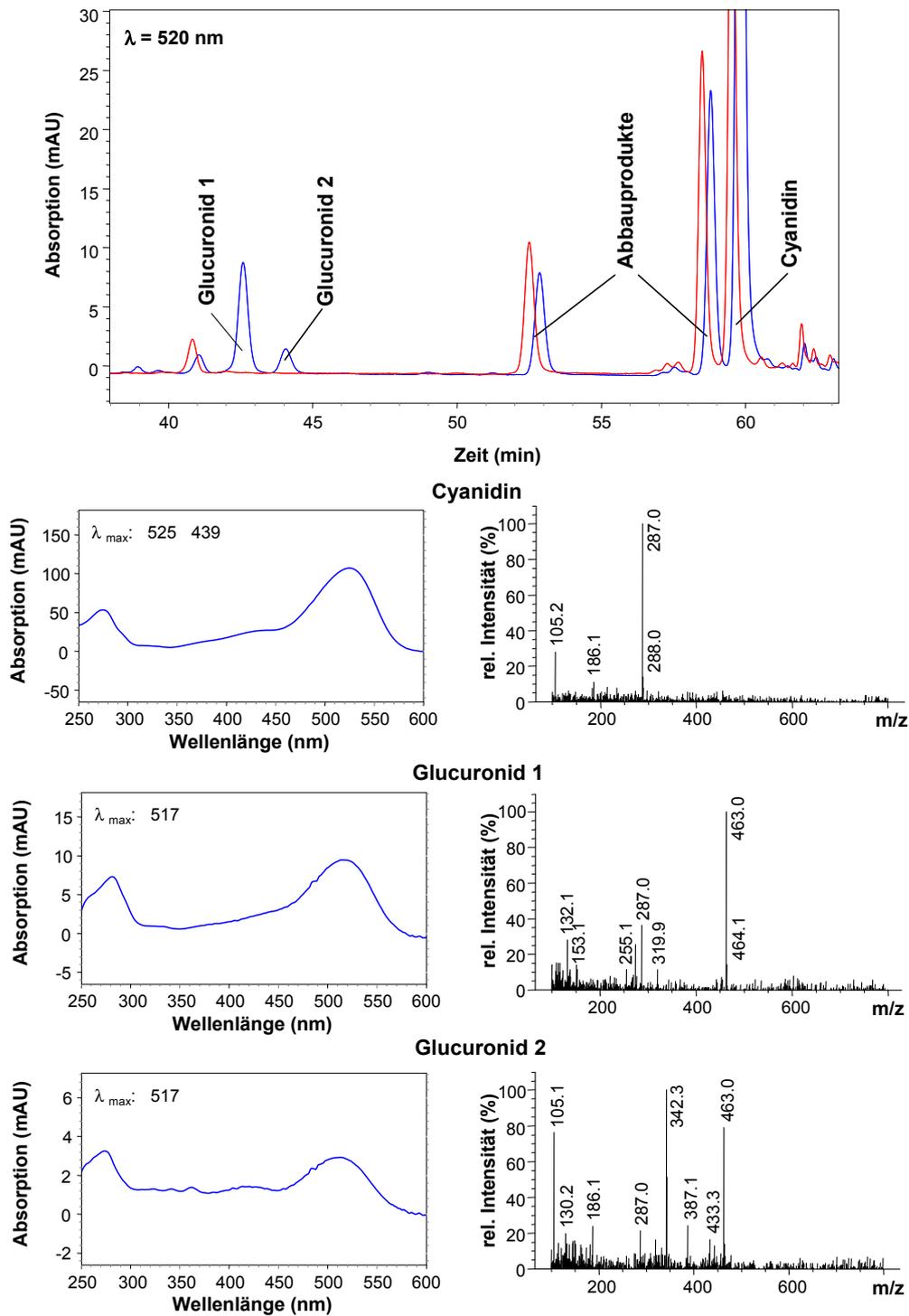
Abbildung 3.28: HPLC-Chromatogramm der Cyanidin-3-O-glucosid-Methylierung mit SAM/COMT und die Massenspektren der gebildeten Substanzen (blaue Linie: Umsetzung; rote Linie: Negativkontrolle)

### 3.3.2.2 Glucuronidierung

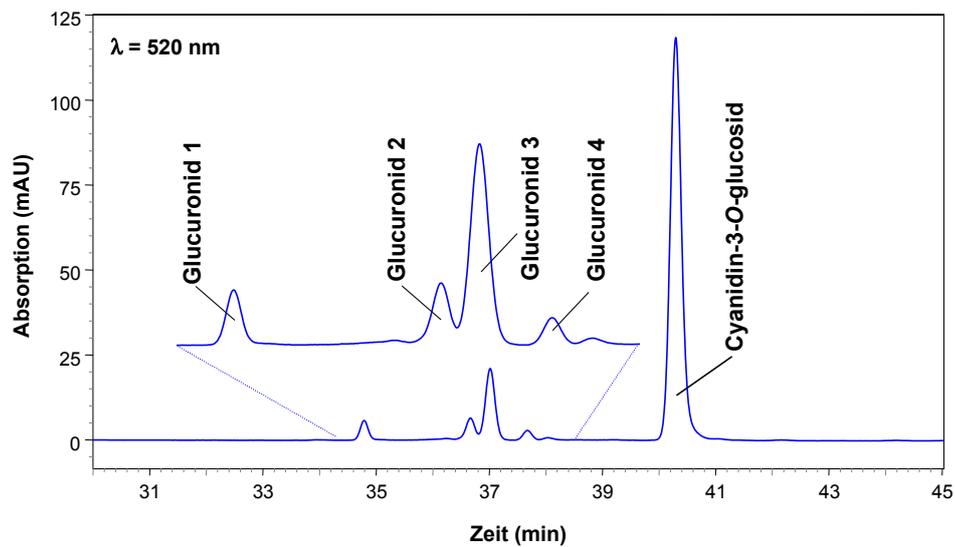
#### Mikrosomale Glucuronidierungen

Glucuronidierungsreaktionen erfolgen im Körper im Rahmen des Phase II-Metabolismus durch Übertragung von Glucuronsäure aus ihrer aktivierten Form (UDPGA) auf Substrate. Diese Reaktionen werden durch Glucuronyltransferasen katalysiert, die als integrale Membranenzyme im ER verschiedener Gewebe lokalisiert sind. Das mittels HPLC analysierte Ergebnis der Glucuronidierung des Aglykons Cy ist in Abbildung 3.29 zusammen mit den Absorptions- und Massenspektren der Reaktionsprodukte dargestellt. Neben den beiden beschrifteten Glucuroniden fanden sich auch noch verschiedene, für die eingesetzte Cy-Konzentration übliche Abbauprodukte (vgl. hierzu Abb. 3.18 in 3.2.1), die auch bei Kontrollinkubationen gebildet wurden. Wie aus den Massenspektren hervorgeht, handelt es sich bei den gebildeten Konjugaten um monoglucuronidierte Produkte. Neben dem Molekülpeak bei einem  $m/z$ -Verhältnis von 463 entsteht durch Abspaltung der Glucuronsäureeinheit das Fragment 287 (vgl. Tab. 3.4). Über die genaue Position der Glucuronid-Bindung lässt sich aus den vorliegenden Daten jedoch keine Aussage treffen.

In ähnlicher Weise wurden aus Cy3glc vier verschiedene monoglucuronidierte Glucosid-Glucuronid-Konjugate gebildet (Abb. 3.30), die ebenfalls massenspektrometrisch nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.31). Zusätzlich zum Molekülpeak 625 finden sich Fragmente bei  $m/z$ -Verhältnissen von 449 (Abspaltung der Glucuronsäure) und im Falle des Glucuronids 3 auch bei 287 (Abspaltung von Glucuronsäure und Glucose). Auch hier lässt sich über die Bindungsstelle der Glucuronsäure an das dann entstehende gemischte Glucosid-Glucuronid keine Aussage treffen, wobei die Glucuronsäure-Bindung an die freien Hydroxylgruppen in Position 5, 7, 3' und 4' wahrscheinlich scheint. Mal3glc bildete dagegen nur zwei gemischte Glucosid-Glucuronid-Konjugate, was darauf hindeutet, dass die freie Hydroxylgruppe in 4'-Position des B-Ringes aus sterischen Gründen nicht mehr zugänglich ist und Glucuronidierungsreaktionen nur noch an den Positionen 7 und 5 erfolgen.



**Abbildung 3.29:** HPLC-Trennung der Cyanidin-Glucuronidierung durch mikrosomale Inkubation sowie die Absorptions- und Massenspektren der gebildeten Substanzen (blaue Linie: Umsetzung; rote Linie: Negativkontrolle)



**Abbildung 3.30:** HPLC-Trennung der Cyanidin-3-*O*-glucosid-Glucuronidierung durch mikrosomale Inkubation

Während die eingesetzten 3,5-*O*-Diglucoside Malvin und Cyanin keine Substrate der Glucuronyltransferase darstellten und keine glucuronidierten Konjugate bildeten, wurden die phenolischen Säuren SS, PCS und VS zu den entsprechenden Glucuroniden umgesetzt, wie bereits in der Literatur beschrieben ist [266, 267].

### Glucuronidierungen mit rekombinanten Glucuronyltransferasen

Die Bestimmung der für die Glucuronidierung verantwortlichen UDP-Glucuronyltransferasen wurde mit Cy und Cy3glc durchgeführt. Nicht jedes Isoenzym ist dabei in der Lage, jedes Glucuronid zu bilden. Prinzipiell ergab sich ein ähnliches Bild der chromatographischen Trennung wie in Abbildung 3.29 bzw. 3.30 gezeigt. Die in Tabelle 3.5 für Cy und in Tabelle 3.6 für Cy3glc angegebenen prozentualen Anteile der verschiedenen Glucuronide im Verhältnis zu allen bei 520 nm absorbierenden Substanzen beziehen sich auf die dort gezeigten, nummerierten Glucuronide. Cy wurde dabei v.a. durch die Glucuronyltransferasen 1A9, 1A1, 1A4 und 1A7, Cy3glc hauptsächlich von den Isoenzymen 1A1, 1A10 und 1A8 umgesetzt. Allgemein ist das Ausmaß der Glucuronidierung verglichen mit der Positivkontrolle (Quercetin) sehr gering.

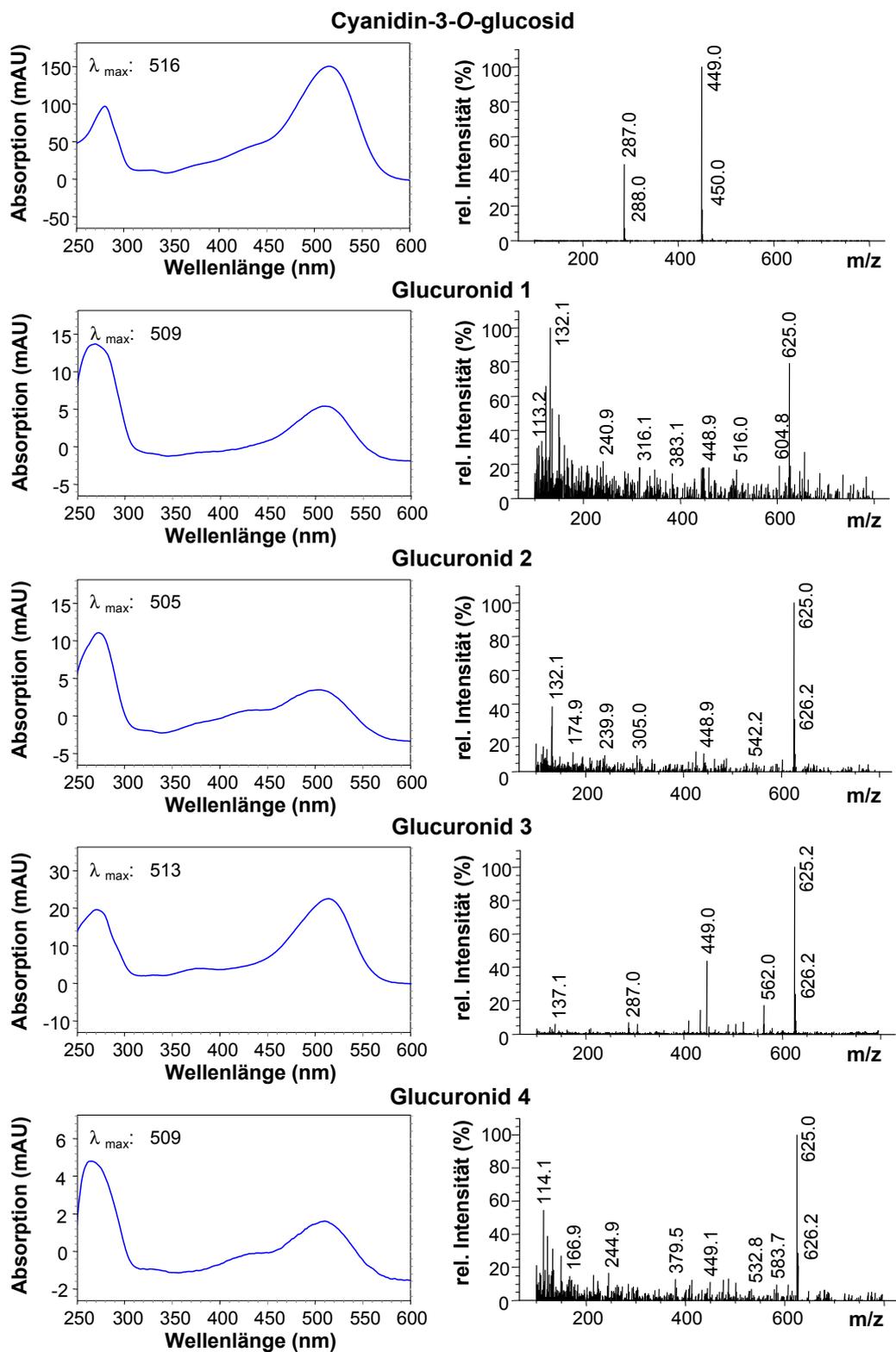


Abbildung 3.31: Absorptions- und Massenspektren der gebildeten Substanzen bei der Cyanidin-3-O-glucosid-Glucuronidierung

**Tabelle 3.5:** Prozentualer Anteil der beiden Glucuronide des Cyanidins an der Gesamtmenge der bei 520 nm absorbierenden Substanzen in Abhängigkeit vom verwendeten Enzymsystem

Enzymsystem	Glucuronid 1		Glucuronid 2		Summe	SD
	MW	SD	MW	SD		
Mikrosomen	6,50	2,05	3,50	1,07	10,00	2,31
1A1	0,20	0,19	-	-	0,20	0,19
1A3	0,03	0,01	-	-	0,03	0,01
1A4	0,03	0,02	0,13	0,04	0,16	0,04
1A6	0,03	0,03	-	-	0,03	0,03
1A7	0,16	0,05	-	-	0,16	0,05
1A8	0,07	0,05	0,04	0,01	0,11	0,05
1A9	0,37	0,08	0,17	0,07	0,54	0,11
1A10	0,09	0,04	-	-	0,09	0,04
2B7	-	-	-	-	-	-

**Tabelle 3.6:** Prozentualer Anteil der vier Glucuronide des Cyanidin-3-*O*-glucosids an der Gesamtmenge der bei 520 nm absorbierenden Substanzen in Abhängigkeit vom verwendeten Enzymsystem (G 1–4: gebildete Glucuronide 1–4, vgl. Abb. 3.30)

Enzymsystem	G 1		G 2		G 3		G 4		Summe	SD
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD		
Mikrosomen	0,23	0,10	2,45	0,17	11,03	0,22	1,43	0,05	15,14	0,30
1A1	-	-	0,31	0,03	4,7	0,96	0,33	0,10	5,34	0,97
1A3	-	-	0,13	0,01	-	-	0,23	0,05	0,36	0,05
1A4	-	-	0,33	0,11	-	-	-	-	0,33	0,11
1A6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1A7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1A8	0,14	0,04	-	-	0,40	0,10	0,10	0,00	0,64	0,11
1A9	-	-	0,33	0,88	-	-	-	-	0,33	0,08
1A10	0,13	0,01	0,25	0,06	0,68	0,15	-	-	1,06	0,16
2B7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

### 3.4 *in vivo*-Untersuchungen

Um die Übertragbarkeit der *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse über den Metabolismus von Anthocyanen auf die *in vivo*-Situation zu überprüfen, wurde zunächst ein Tierversuch mit oraler Verabreichung der Anthocyane Cy3glc und Malvin durchgeführt. Zusätzlich erfolgte zur Aufklärung der Bioverfügbarkeit und zur Ermittlung eventueller neuer Metabolite auch die Gabe der *in vitro*-Abbauprodukte der Anthocyane, PCS, VS und SS. Da tierexperimentelle Ergebnisse nicht per se auf den Menschen zu übertragen sind, wurden Untersuchungen auch direkt in einem Humanversuch vorgenommen.

#### 3.4.1 Tierexperimentelle Studien an Ratten

Vor Beginn der Fütterungsversuche wurde das flavonoid- und phenolsäurefreie Futter der Ratten mittels HPLC und GC auf die Abwesenheit von Phenolsäuren (PCS, VS, SS, 4-Hydroxybenzoesäure, Gallussäure) und gängigen Flavonoiden (Anthocyane, Quercetin, Isoflavone, Catechin) getestet.

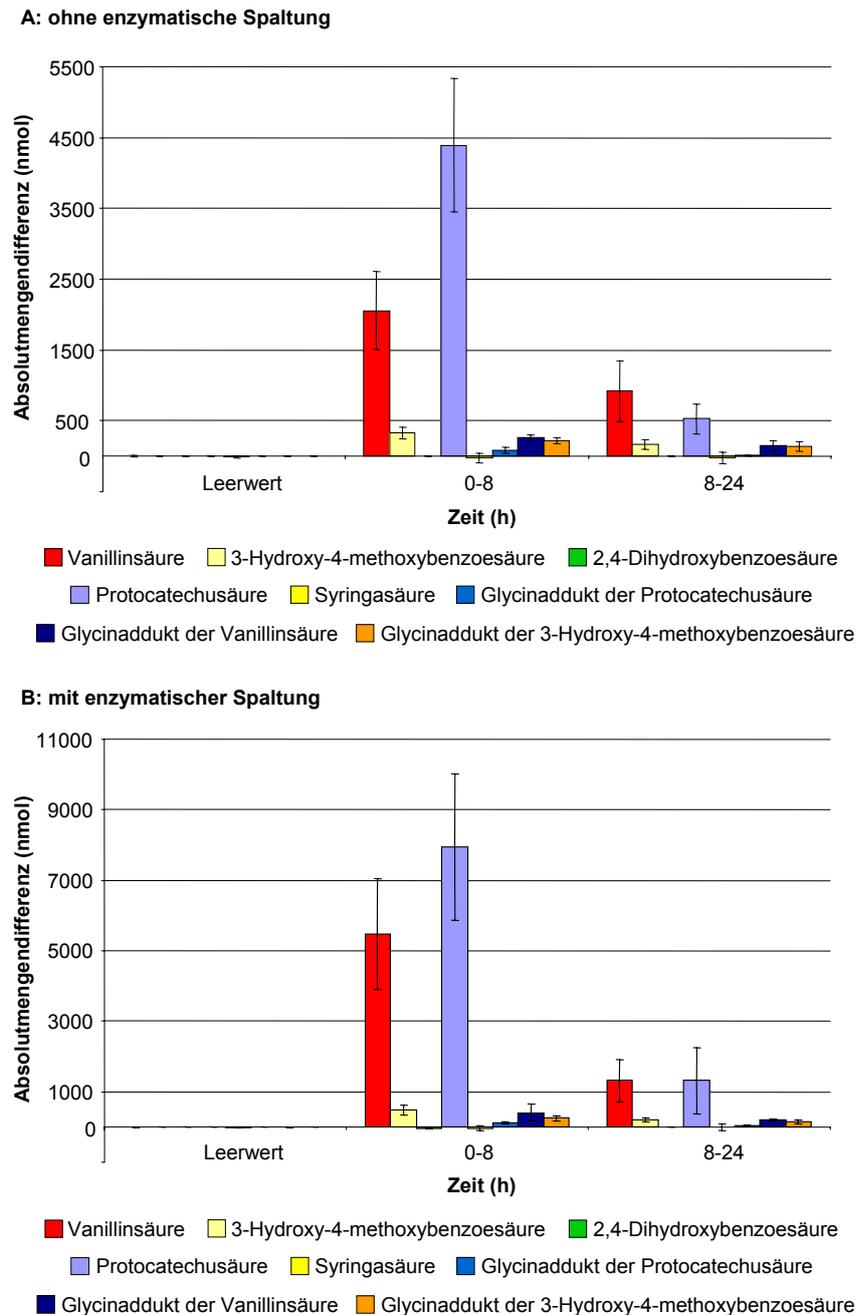
##### 3.4.1.1 Aufnahme von phenolischen Säuren

###### Protocatechusäure

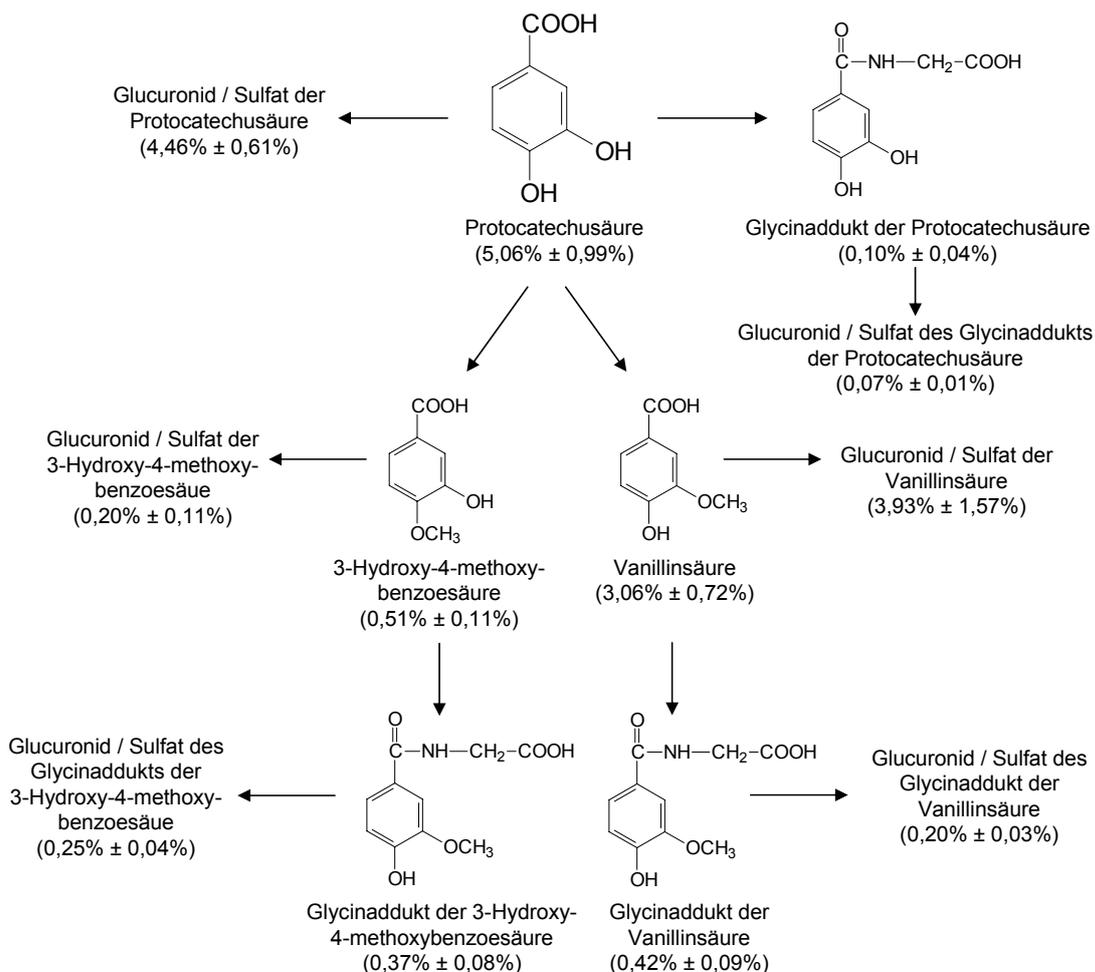
###### *Urin*

Nach oraler Verabreichung von PCS konnten im Rattenurin verschiedene Metabolite detektiert werden. Durch massenspektrometrische Analysen, Retentionszeitenvergleiche und Cochromatographie konnte neben der PCS die VS (4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure) als Methylierungsprodukt nachgewiesen werden. Bei einer zweiten Verbindung mit analogem Massenspektrum und sehr ähnlicher Retentionszeit handelt es sich wohl mit der 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure um ein weiteres Methylierungsprodukt. Die Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase zeigte, dass diese Verbindungen auch als entsprechende Phase II-Konjugate vorliegen. Zusätzlich wurde eine weitere Verbindung detektiert, die das im Anhang (A.2, Abb. A.75) dargestellte Massenspektrum zeigte. Durch Vergleich des Fragmentierungsmusters und der Retentionszeitendifferenz mit dem bekannten Aminosäure-Konjugationssystem Benzoesäure/Hippursäure (vgl. Anhang A.2, Abb. A.74) konnte diese Substanz als das Glycinaddukt der PCS identifiziert werden. Eine Bestätigung mit Hilfe einer Referenzsubstanz war nicht möglich, da diese nicht kommerziell erhältlich war. Analog dazu konnten auch die Glycinaddukte der VS und der 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure nachgewiesen werden, die – wie durch Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase gezeigt werden konnte – ebenfalls zusätzlich konjugiert als Glucuronid oder Sulfat vorliegen können.

Die im Urin der Ratten gefundenen Absolutmengen (ausgedrückt als Differenz zu den Werten der Kontrolltiere) mit und ohne enzymatische Spaltung sind in Abbildung 3.32 gezeigt; der Metabolismus der Protocatechusäure ist in Abbildung 3.33 zusammengefasst. Bei einer Gesamtwiederfindung der verabreichten Menge im Urin von  $(18,4 \pm 2,9)\%$  sind dabei die PCS selbst, die VS und deren beiden Sulfo- bzw. Glucurono-Konjugate die Hauptmetabolite der PCS. Der größte Teil der Metabolite ( $(81,9 \pm 4,1)\%$ ) wird in den ersten acht Stunden nach Aufnahme ausgeschieden.



**Abbildung 3.32:** Absolutmengen der im Urin gefundenen Protocatechusäure-Metabolite (ausgedrückt als Differenz zu den Werten der Kontrolltiere)



**Abbildung 3.33:** Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Protocatechusäure (in Klammern die prozentuale Wiederfindung bezogen auf die oral verabreichte Menge Protocatechusäure als Mittelwerte der behandelten Ratten ± SD)

### Plasma

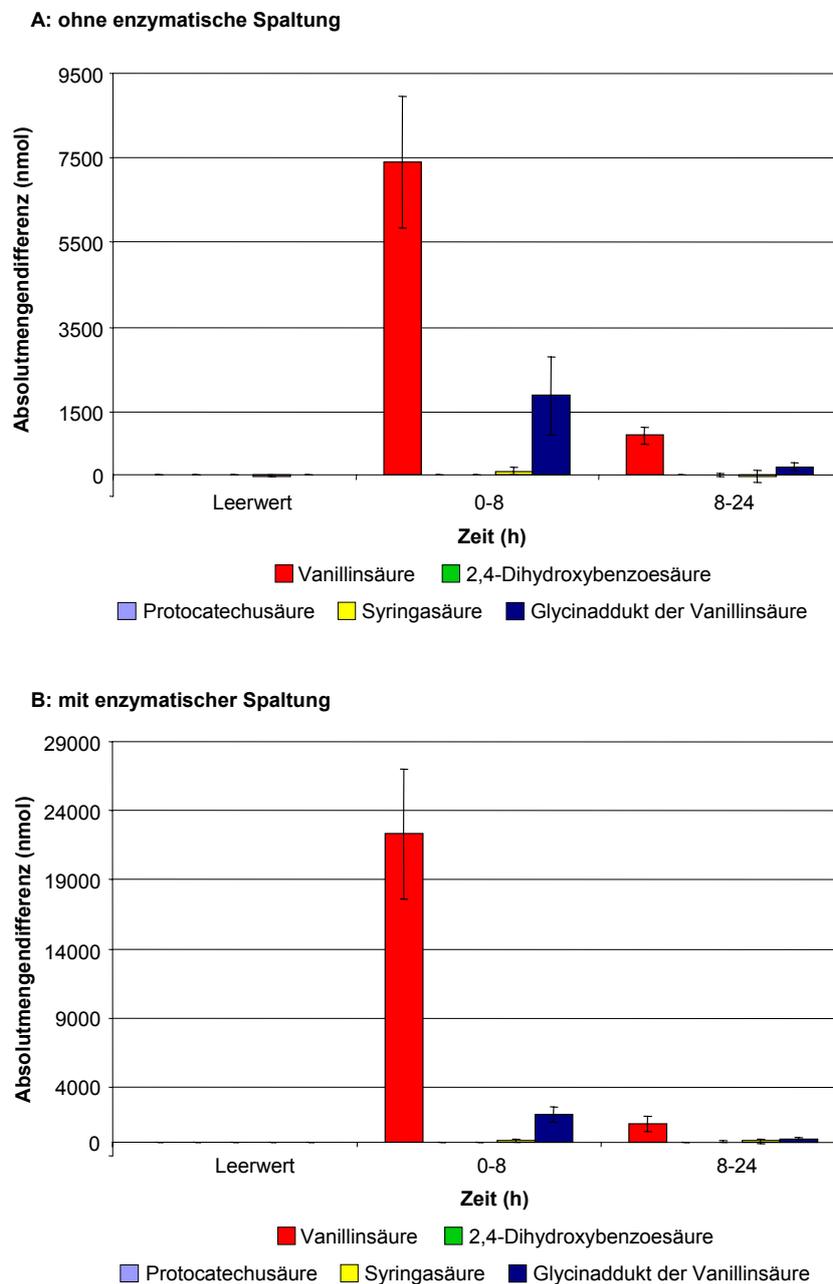
Die Analytik des 24 Stunden nach Schlundsondierung entnommenen Blutes ergab erwartungsgemäß keine Zunahme der untersuchten phenolischen Säuren verglichen mit den Werten der Kontrolltiere.

### Vanillinsäure

#### Urin

In Analogie zum Metabolismus der PCS konnten auch im Falle der VS neben der VS selbst in freier und konjugierter Form (Glucuronid oder Sulfat) ein Glycinaddukt (Massenspektrum s. Anhang, Abb. A.76) durch Vergleich des Fragmentierungsmusters und der Retentionszeitendifferenz mit dem Aminosäure-Konjugationssystem Benzoessäure/Hippursäure (vgl. Anhang, Abb. A.74) identifiziert werden. Eine endgültige Bestätigung mit Hilfe einer Referenzsubstanz war auch hier nicht möglich. Das Vorkommen des glucuronidierten/sulfatierten Glycinadduktes konnte nicht eindeutig belegt werden (vgl. Standardabweichung in Abb. 3.35).

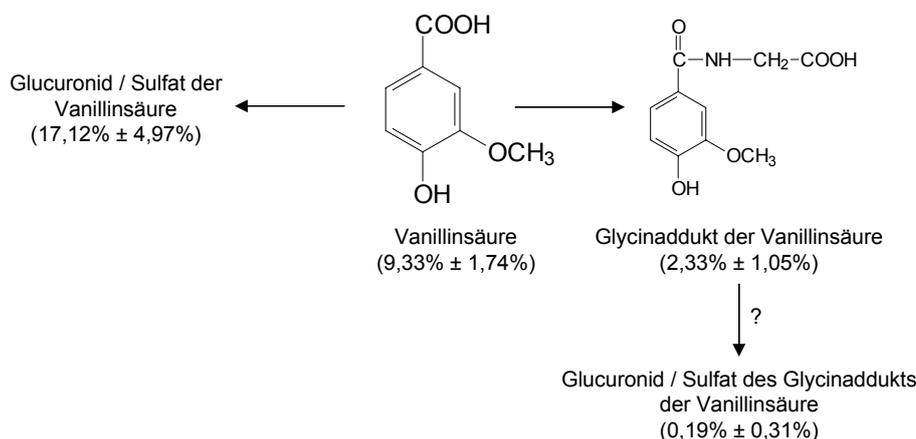
Wie bei der PCS erfolgte die Ausscheidung über den Harn v.a. in den ersten acht Stunden (vgl. Abb. 3.34). Abbildung 3.35 fasst den Metabolismus der VS zusammen, wobei bei einer Gesamtwiederfindung im Urin von  $(29,0 \pm 5,3)\%$  (bezogen auf die verabreichte Menge) als Hauptmetabolite die VS selbst, ihr Sulfo- bzw. Glucuronokonjugat und auch das Glycinaddukt zu nennen sind.



**Abbildung 3.34:** Absolutmengen der im Urin gefundenen Vanillinsäure-Metabolite (ausgedrückt als Differenz zu den Werten der Kontrolltiere)

### Plasma

Die Analytik des 24 Stunden nach Schlundsondierung entnommenen Blutes ergab erwartungsgemäß keine Zunahme der untersuchten phenolischen Säuren verglichen mit den Werten der Kontrolltiere.



**Abbildung 3.35:** Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Vanillinsäure (in Klammern die prozentuale Wiederfindung bezogen auf die oral verabreichte Menge Vanillinsäure als Mittelwerte der behandelten Ratten  $\pm$  SD)

## Syringasäure

### Urin

Im Falle der SS konnte kein entsprechendes Glycinaddukt gefunden werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass SS kein Substrat der Glycintransferase ist. Der überwiegende Teil der ausgeschiedenen SS lag in freier Form vor ( $24,7\% \pm 4,5\%$ ); einziger nachgewiesener Metabolit ist das Glucurono- oder Sulfokonjugat der SS ( $7,3\% \pm 0,5\%$ ). Die Exkretion erfolgte auch hier sehr schnell und ist in [Abbildung 3.36](#) dargestellt.

### Plasma

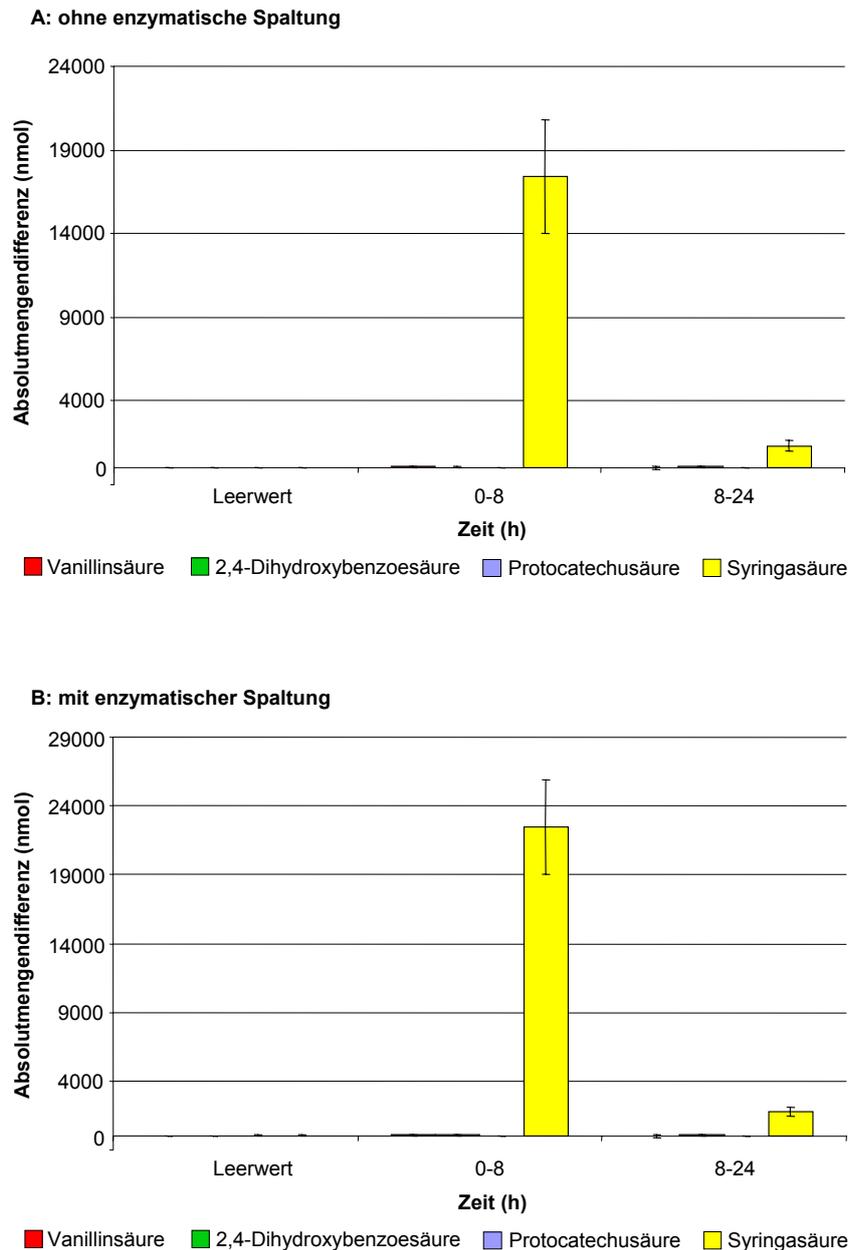
Die Analytik des 24 Stunden nach Schlundsondierung entnommenen Blutes ergab erwartungsgemäß keine Zunahme der untersuchten phenolischen Säuren verglichen mit den Werten der Kontrolltiere.

### 3.4.1.2 Aufnahme von Anthocyanen

#### Cyanidin-3-O-glucosid

##### Urin

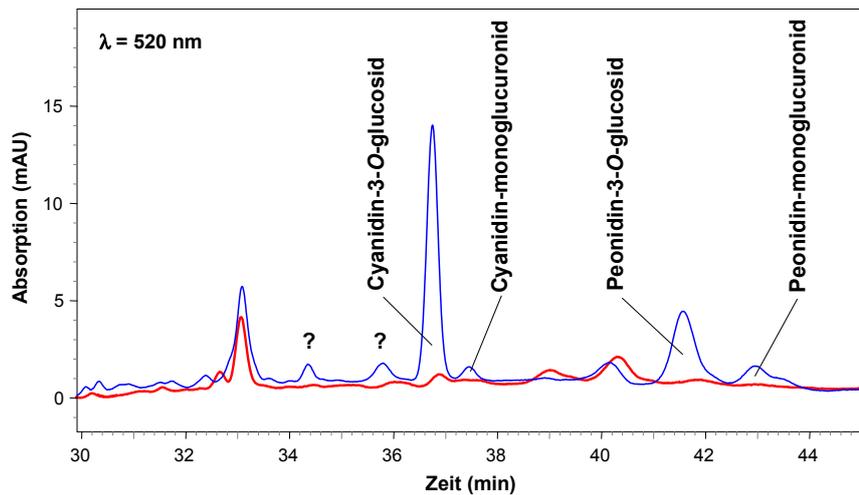
[Abbildung 3.37](#) zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm der Anthocyan-Analytik. Durch Retentionszeiten- und Absorptionsspektrenvergleiche sowie durch Cochromatographie und massenspektrometrische Analysen konnten die beschrifteten Peaks als Cy3glc, Peo3glc sowie Cyanidin- und Peonidin-monoglucuronid identifiziert werden. Der Urin von Kontrolltieren und Tieren vor der Schlundsondierung enthielt keine Anthocyane. Die Anthocyane wurden nach Verabreichung sehr schnell ausgeschieden, so dass fast die gesamten, im Urin detektierbaren Anthocyane in den ersten acht Stunden im Harn zu finden waren (vgl. [Abb. 3.38](#)). Hauptmetabolite bei einer Gesamtwiederfindung von ( $0,11 \pm 0,04\%$ ) waren dabei Cy3glc



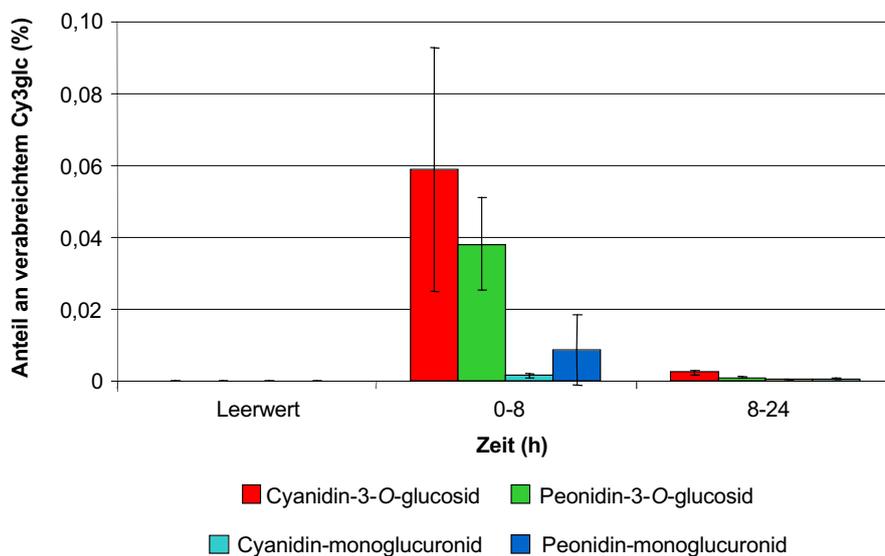
**Abbildung 3.36:** Absolutmengen der im Urin gefundenen Syringasäure-Metabolite (ausgedrückt als Differenz zu den Werten der Kontrolltiere)

(fast 0,06% der verabreichten Menge Cy3glc) und Peo3glc (fast 0,04% der verabreichten Menge Cy3glc). Tabelle A.25 im Anhang zeigt die genauen Werte.

Die Analyse der Phenolsäuren im Urin ergab ein uneinheitliches Bild (Abb. 3.39). Der Leerwert vor Verabreichung der Substanzen müsste bei allen phenolischen Säuren bei 0 liegen. Die großen Standardabweichungen spiegeln die Schwierigkeiten wider, bestimmte phenolische Säuren (z.B. VS oder SS) als Stoffwechselprodukte von Anthocyanen zu identifizieren, da sie endogene Stoffwechselprodukte darstellen und ihre Bildung von vielen Faktoren abhängig ist. Auch die Abnahme der SS in der zweiten Sammelfraktion (8–24 h), die wie die

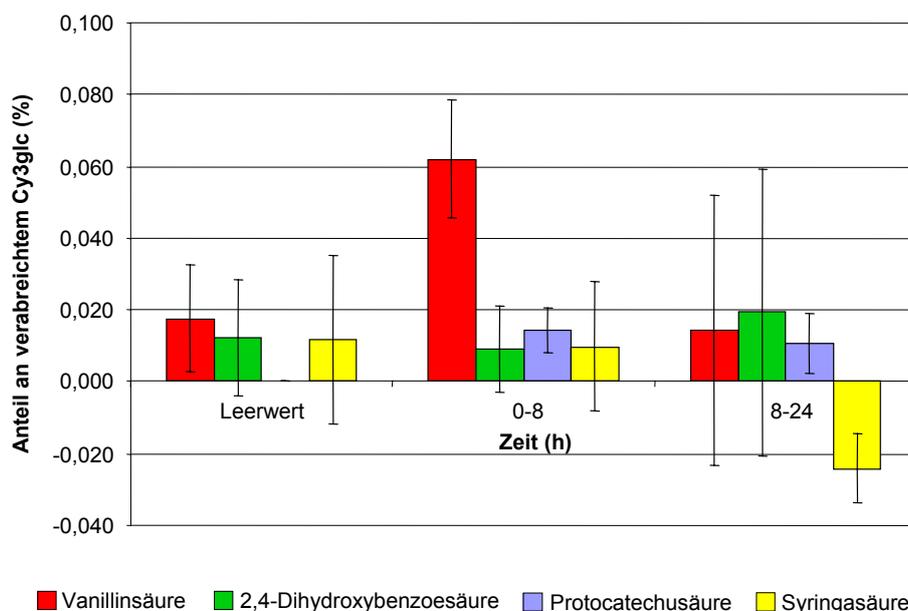


**Abbildung 3.37:** Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse von Rattenurin nach Verabreichung von Cyanidin-3-*O*-glucosid (blaue Linie: Urinfraktion 0–8 h; rote Linie: Kontrolltier)



**Abbildung 3.38:** Zeitlicher Verlauf der im Urin der Ratten gefundenen Anthocyan-Metabolite nach Verabreichung von Cyanidin-3-*O*-glucosid und ihr Anteil an der verabreichten Substanzmenge

2,4-Dihydroxybenzoesäure in keiner Fraktion vom Nullwert abweichen dürfte, muss vor diesem Hintergrund gesehen werden. Dagegen wird PCS eindeutig erst nach Gabe von Cy3glc gebildet und war in den Kontrolltieren und vor Verabreichung des Anthocyans nicht nachzuweisen. Auch die vermehrte Bildung der VS als Metabolit des Cy3glc scheint auf die Supplementierung zurückzugehen, müsste aber noch mit einer größeren Anzahl an Ratten statistisch abgesichert werden. Glycinaddukte der VS oder PCS konnten dagegen nicht identifiziert werden; auch eine enzymatische Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase brachte kaum Veränderungen.



**Abbildung 3.39:** Zeitlicher Verlauf der im Urin der Ratten gefundenen phenolischer Säuren nach Verabreichung von Cyanidin-3-*O*-glucosid (ohne enzymatische Spaltung)

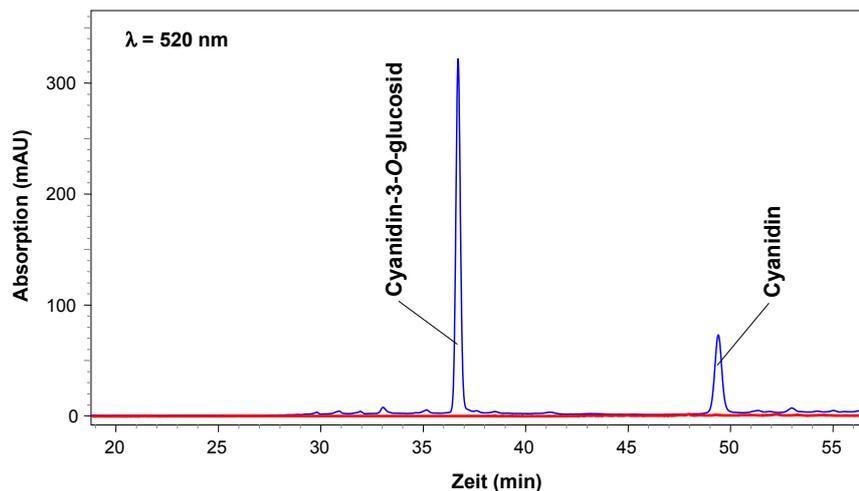
#### *Plasma*

Bei der analytischen Untersuchung des 24 Stunden nach oraler Gabe (Schlundsondierung) entnommenen Blutes konnten erwartungsgemäß weder in den supplementierten noch in den Kontrolltieren Anthocyane oder Anthocyan-ähnliche Substanzen identifiziert werden. Auch die Phenolsäure-Analytik ergab keine Zunahme der untersuchten phenolischen Säuren verglichen mit den Werten der Kontrolltiere.

#### *Fäzes*

Abbildung 3.40 zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm der Anthocyan-Analytik mit den beiden mittels Cochromatographie, Massenspektrometrie sowie Retentionszeiten- und Absorptionsspektrenvergleich identifizierten Anthocyanen Cy3glc und Cy. Peo3glc sowie die Glucuronide von Cy und Peo konnten nicht nachgewiesen werden. Vor der Schlundsondierung und in den Kontrolltieren waren keine Anthocyane nachweisbar. Bei einer Gesamtwiederfindung von  $(3,02 \pm 0,06)\%$  lagen  $(2,42 \pm 0,09)\%$  als Cy3glc und  $(0,59 \pm 0,04)\%$  als Cy in den Fäzesproben vor (jeweils bezogen auf die verabreichte Menge Cy3glc). Die Ausscheidung erfolgte sehr schnell: Zwischen 97,1 und 99,9% der über die Fäzes ausgeschiedenen Anthocyanmenge waren bereits in der ersten Sammelfraktion (0–8 h) enthalten.

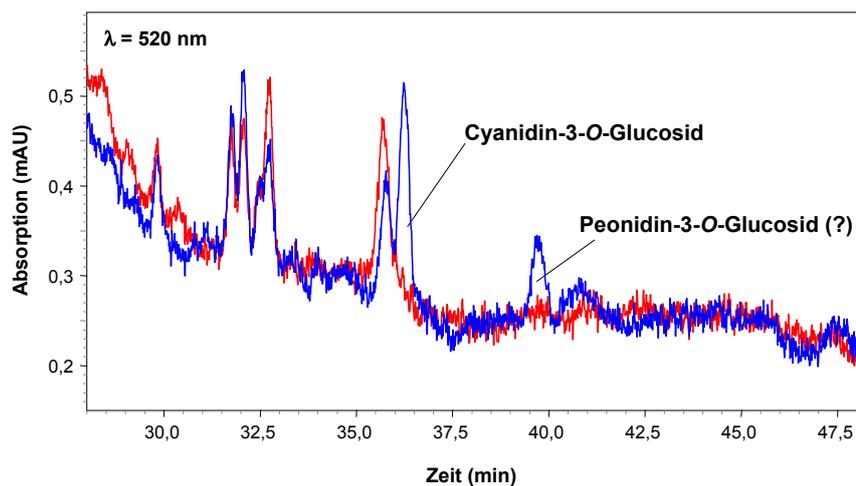
Da die Analyse der phenolischen Säuren eine enzymatische Spaltung der erwarteten Konjugate (Sulfate und Glucuronide) bei neutralen pH-Bedingungen erfordert und das in den Fäzes-Proben nachgewiesene Aglykon Cy unter diesen Bedingungen zu PCS zerfallen würde (vgl. 3.2.1), wäre ein Nachweis der originären Entstehung dieser phenolischen Säure in Fäzes so nicht möglich. Daher wurde auf die Durchführung dieser Analytik verzichtet.



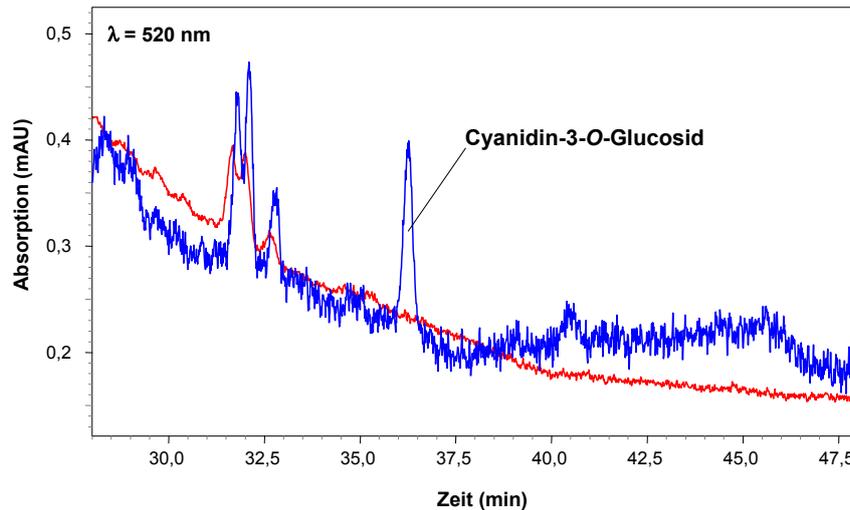
**Abbildung 3.40:** Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse von Rattenfäzes nach Verabreichung von Cyanidin-3-*O*-glucosid (blaue Linie: Fäzesfraktion 0–8 h; rote Linie: Kontrolltier)

### Organe

Von den untersuchten Organen finden sich im Dickdarm (Abb. 3.41) und im Magen (Abb. 3.42) Hinweise auf Anthocyane. Aufgrund des Vergleichs von Retentionszeiten ist anzunehmen, dass es sich im Falle des Dickdarms um Cy3glc und Peo3glc bzw. im Falle des Magens um Cy3glc handelt. Aufgrund der geringen Menge und der komplexen Matrix konnten weder eindeutige Absorptions- noch Massenspektren weiteren strukturellen Aufschluss geben. In Dünndarm, Leber und Niere konnten keine Hinweise auf Anthocyane gefunden werden.



**Abbildung 3.41:** HPLC-Chromatogramm der Analyse eines Rattendickdarmes nach Verabreichung von Cyanidin-3-*O*-glucosid (blaue Linie: 24 h nach Verabreichung; rote Linie: Kontrolltier)

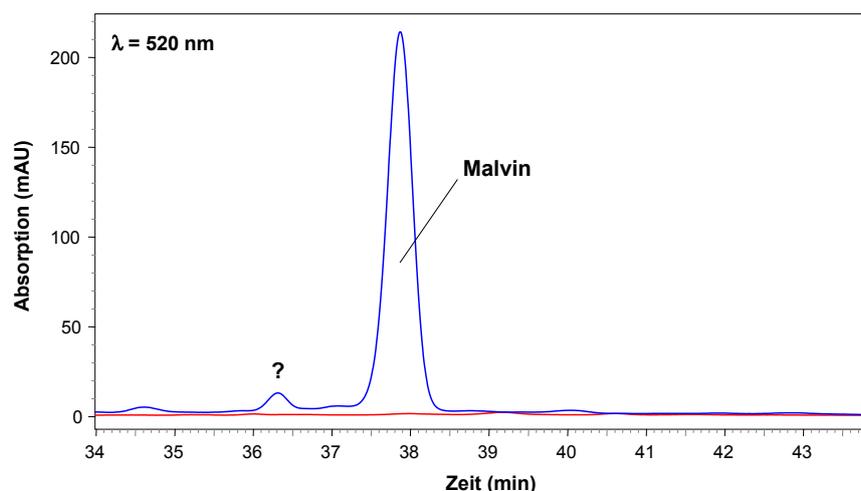


**Abbildung 3.42:** HPLC-Chromatogramm der Analyse eines Rattenmagens nach Verabreichung von Cyanidin-3-*O*-glucosid (blaue Linie: 24 h nach Verabreichung; rote Linie: Kontrolltier)

## Malvin

### *Urin*

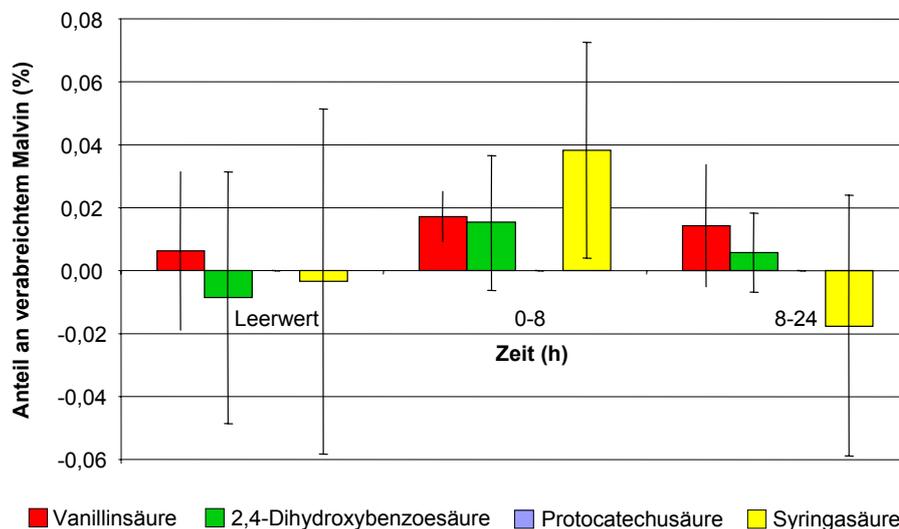
Das in [Abbildung 3.43](#) dargestellte typische HPLC-Chromatogramm der Analyse des Rattenurins nach Verabreichung von Malvin zeigt als einzigen nachgewiesenen Anthocyan-Metaboliten das Malvin selbst, das mit Hilfe von massenspektrometrischen Messungen identifiziert werden konnte. Der überwiegende Teil ( $(98,9 \pm 0,4)\%$ ) der insgesamt über den Beobachtungszeitraum von 24 h gefundenen ( $0,056 \pm 0,026\%$ ) (bezogen auf die verabreichte Menge Malvin) war bereits in den ersten acht Stunden nach der Schlundsondierung zu finden. In den folgenden 16 h waren nur noch Spuren von Malvin nachzuweisen.



**Abbildung 3.43:** Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse von Rattenurin nach Verabreichung von Malvin (blaue Linie: Urinfraction 0–8 h; rote Linie: Kontrolltier)

[Abbildung 3.44](#) zeigt die Veränderungen der phenolischen Säuren im Laufe des Versuchs. Die aus den oben erwähnten Gründen zustande kommenden Schwankungen ermöglichen hier

keine sinnvolle Aussagen. Somit ist auch keine Aussage über die aus den Fäzesinkubationen (vgl. 3.3.1.2) erwartete Zunahme der SS zu treffen, da schon die Standardabweichung im Leerwert eine potentielle Zunahme in der ersten Urinfraktion einschließt. Auch die Ergebnisse nach enzymatischer Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase zeigten keine eindeutigen Effekte.



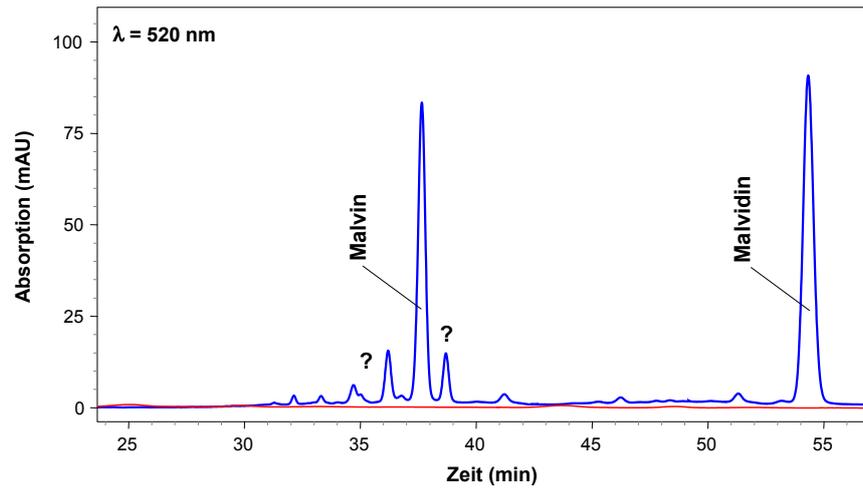
**Abbildung 3.44:** Zeitlicher Verlauf der im Urin der Ratten gefundenen phenolischen Säuren nach Verabreichung von Malvin (ohne enzymatische Spaltung)

### Plasma

Bei der analytischen Untersuchung des 24 Stunden nach der Schlundsondierung entnommenen Blutes konnten weder in den supplementierten noch in den Kontrolltieren Anthocyane oder Anthocyan-ähnliche Substanzen identifiziert werden. Auch die Phenolsäure-Analytik ergab keine Zunahme der untersuchten phenolischen Säuren verglichen mit den Werten der Kontrolltiere.

### Fäzes

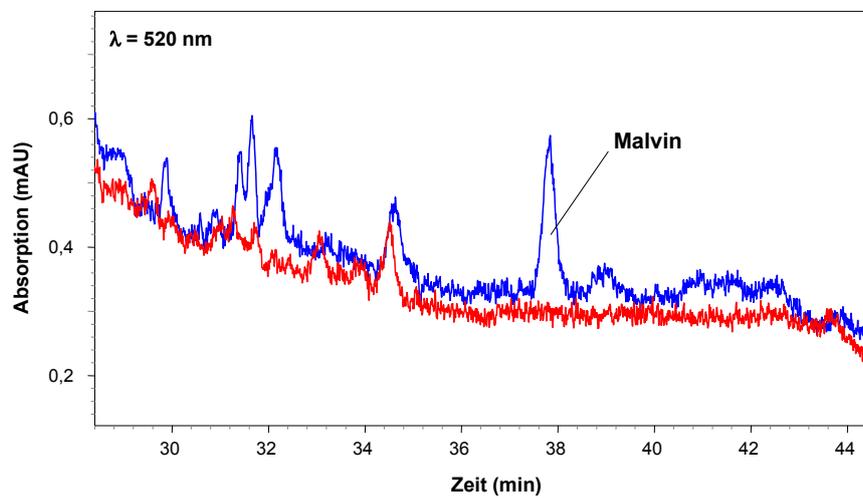
Bei der Analyse der Fäzesproben wurden mehrere Anthocyan-Derivate gefunden (Abb. 3.45), von denen zwei mittels massenspektrometrischer Messung als Malvin und als das Aglykon Mal identifiziert werden konnten. Die anderen identifizierten Peaks konnten nicht näher charakterisiert werden; auch die vermutete Entstehung von Mal3glc konnte nicht nachgewiesen werden. Vor der Schlundsondierung bzw. in den Kontrolltieren fanden sich keine Anthocyane in den entsprechenden Fäzesproben. Die Gesamtwiederfindung, bezogen auf die verabreichte Menge Malvin, lag hier bei  $(0,382 \pm 0,007)\%$ , wobei  $(29 \pm 8)\%$  als Malvin und  $(71 \pm 8)\%$  als Mal vorlagen. Auch hier erfolgte die Ausscheidung fast komplett innerhalb der ersten acht Stunden:  $(96 \pm 1)\%$  der insgesamt in den Fäzesproben gefundenen Anthocyane waren in dieser Fraktion enthalten.



**Abbildung 3.45:** Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse von Rattenfäzes nach Verabreichung von Malvin (blaue Linie: Fäzesfraktion 0–8 h; rote Linie: Kontrolltier)

### *Organe*

Die Analyse der Organe ergab nur im Fall des Dickdarms einen Hinweis auf das Auftreten von Malvin (Abb. 3.46). Auch hier konnte die durch Retentionszeitenvergleich angestellte Vermutung der Identität des Peaks aus den bei der Verabreichung von Cy3glc geschilderten Schwierigkeiten nicht durch massenspektrometrische Messungen bestätigt werden. Im Dünndarm, in der Leber, in der Niere und im Magen waren keine Anthocyane nachweisbar.



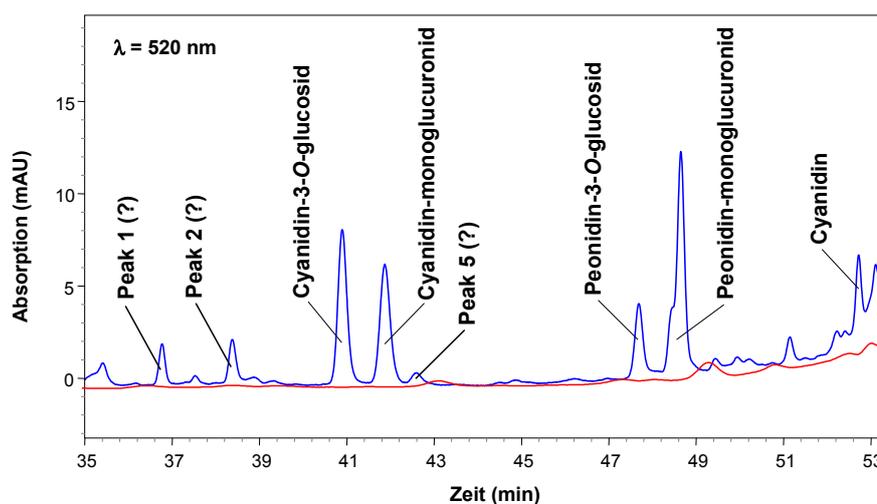
**Abbildung 3.46:** HPLC-Chromatogramm der Analyse eines Rattendickdarmes nach Verabreichung von Malvin (blaue Linie: 24 h nach Verabreichung; rote Linie: Kontrolltier)

### 3.4.2 Humanversuch – Pilotversuch

Die durchgeführte Humanstudie in Form eines Pilotversuchs mit zwei Probanden sollte klären, ob die *in vitro* und im Tierversuch gefundenen Metabolite auch beim Menschen zu finden sind und in welchen Konzentrationen sie vorkommen. Diese Untersuchungen sollten eine Abschätzung des tatsächlich durch die Anthocyane gelieferten Beitrags an der antioxidativen Wirkung von Beeren und anderen Anthocyan-reichen Lebensmitteln ermöglichen, die in 3.5 näher diskutiert wird.

#### 3.4.2.1 Urin

Abbildung 3.47 zeigt ein typisches Chromatogramm einer aufgearbeiteten und analysierten Urinprobe bei einer Detektionswellenlänge von 520 nm, 1,5 h nach Aufnahme des Cy3glc. Bei beiden Probanden konnten acht Substanzen mit Anthocyan-ähnlichen Absorptionsspektren nachgewiesen werden, die – wie ein Vergleich mit dem Placebo-Wert zeigt – aus dem aufgenommenen Cy3glc entstanden sein müssen. Vor Aufnahme des Cy3glc bzw. bei Durchführung des Placebo-Versuchs fanden sich im Urin keinerlei Anthocyane. Fünf der neu detektierten Substanzen konnten mittels massenspektrometrischer Analysen strukturell zu den benannten Substanzen identifiziert werden. Ihre Absorptions- und Massenspektren sind in Abbildung 3.48 dargestellt. Im Falle der detektierten Monoglucuronide konnte die Position des Glucuronsäurerestes mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht näher charakterisiert werden. Bei den nicht identifizierten Verbindungen könnte es sich um Sulfo-Konjugate oder gemischte Glucosid-Glucuronide handeln, wie sie *in vitro* gebildet werden (vgl. 3.3.2.2).



**Abbildung 3.47:** Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse des Humanurins nach Aufnahme von Cy3glc am Beispiel von Proband A (blaue Linie: Urinfraktion 1 (0–1,5 h) nach Aufnahme von Cy3glc; rote Linie: Urinfraktion 1 (0–1,5 h) des Placeboversuchs)

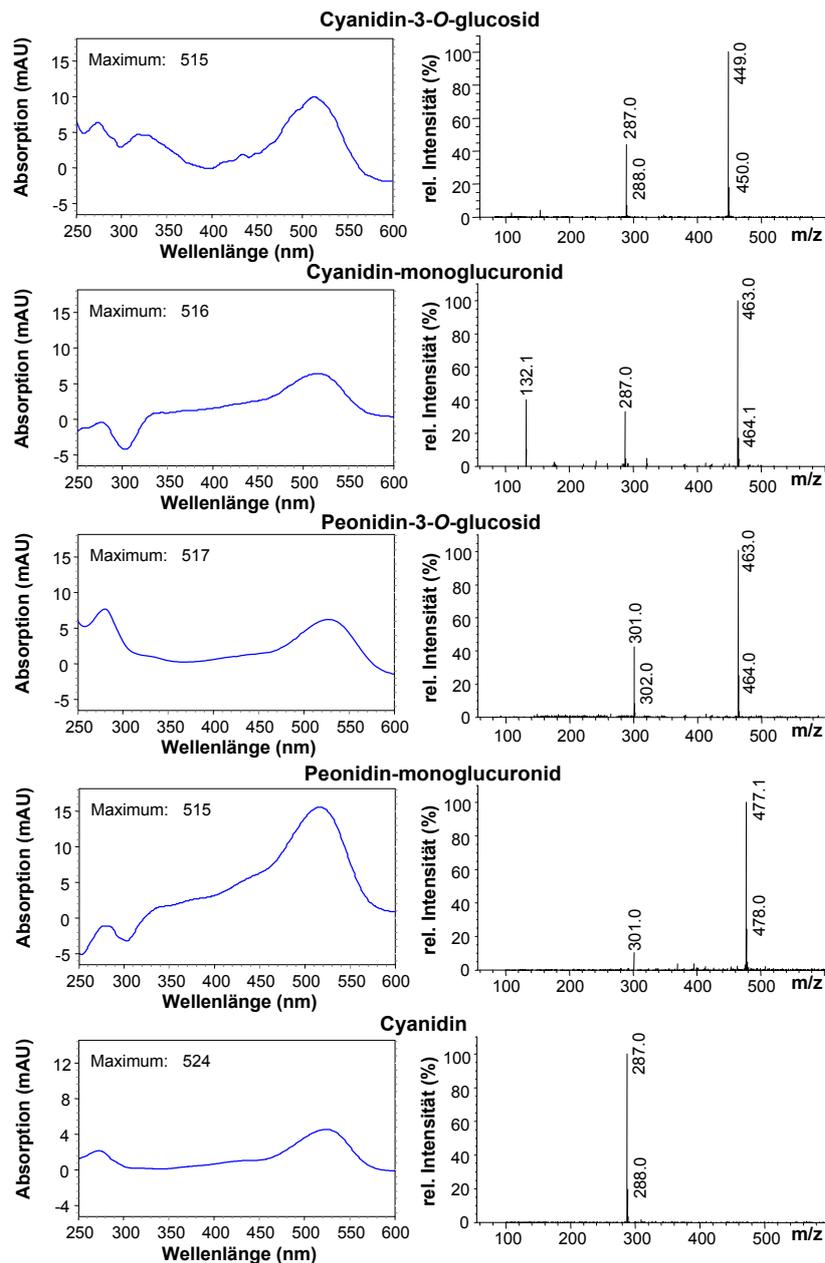
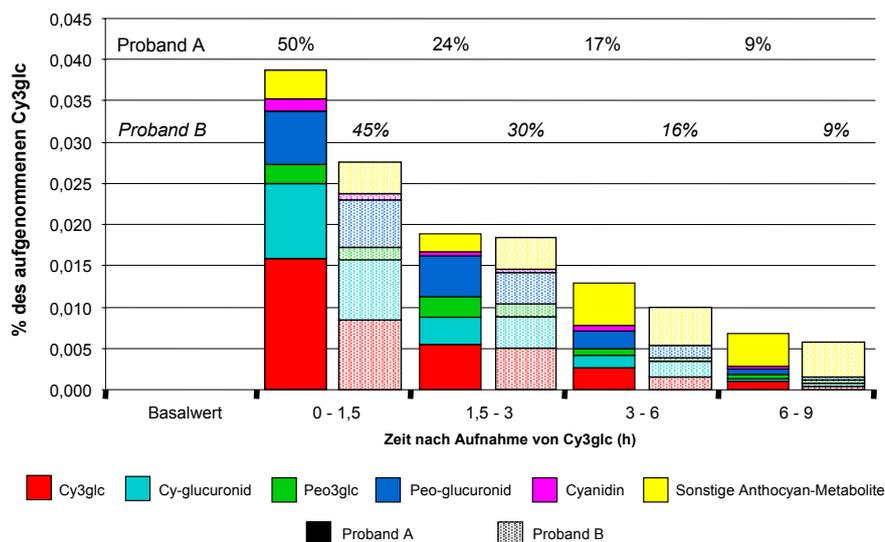


Abbildung 3.48: Absorptions- und Massenspektren der identifizierten Substanzen im Humanurin

In Abbildung 3.49 ist das Auftreten der unterschiedlichen Anthocyan-Metabolite in verschiedenen Urinfraktionen als prozentualer Anteil zu der verabreichten Menge Cy3glc für die beiden Probanden gezeigt. Insgesamt werden bei Proband A 0,066%, bei Proband B 0,059% des aufgenommenen Cy3glc als Anthocyan-Derivat ausgeschieden. Etwa die Hälfte (50 bzw. 45%) der insgesamt ausgeschiedenen Anthocyan-Derivate sind bereits in der ersten Fraktion (0–1,5 h) enthalten. In den folgenden Fraktionen nimmt die Ausscheidung der Anthocyane schnell ab, ist jedoch nach neun Stunden noch nicht vollständig abgeschlossen (jeweils noch 9% in der letzten Urinfraktion).

Bezogen auf alle im Urin auftretenden Anthocyan-Derivate, sind bei beiden Probanden das Cy3glc (mit 34 bzw. 27% bei Proband A bzw. B), ein Cyanidin-monoglucuronid (mit 19



**Abbildung 3.49:** Prozentualer Anteil der unterschiedlichen Anthocyan-Derivate in den verschiedenen Urinfraktionen der beiden Probanden A und B bezogen auf die aufgenommene Menge Cyanidin-3-*O*-glucosid (angegebene Prozentwerte spiegeln den jeweiligen Fraktionsanteil an der in allen Fraktionen ausgeschiedenen Anthocyangesamtmenge wider)

bzw. 24%) und ein Peonidin-monoglucuronid (mit 20 bzw. 18%) die Hauptmetabolite des verabreichten Cy3glc. Ein Überblick über die gefundenen Daten findet sich im Anhang (Tabelle A.26).

Zusätzlich zu diesen Metaboliten, bei denen das Anthocyan-Skelett noch vorhanden war, konnten auch erstmals beim Menschen die *in vitro* und im Tierversuch nachgewiesenen phenolischen Säuren, PCS und VS, als Metabolite detektiert werden. Abbildung 3.50 zeigt das schnelle Auftreten dieser Verbindungen in den Fraktionen der Urinsammlung bezogen auf die verabreichte Cy3glc-Menge. PCS und VS treten dabei sowohl in freier als auch in konjugierter Form als Glucuronid oder Sulfat auf, wobei meist die freie Form dominiert (in den Hauptfraktionen 1 und 2 zwischen 65 und 93% bei der VS und zwischen 82 und 91% bei der PCS). Die Gesamtwiederfindung der verabreichten Cy3glc-Menge in dieser Form lag bei Proband A bei 0,136, bei Proband B bei 0,109%. Während VS in der Fraktion 1 klar die PCS als Metabolit dominiert, liegt das Verhältnis VS : PCS über den Gesamtbeobachtungszeitraum bei ca. 60:40 (Proband A) bzw. 50:50 (Proband B). Zudem konnte bei Proband A noch das Glycinaddukt der VS, sowohl in konjugierter als auch in freier Form, nachgewiesen werden. Glycinaddukte der PCS oder das im Tierversuch nach Verabreichung von PCS gefundene zweite Methylierungsprodukt, die 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure, fanden sich dagegen weder bei Proband A noch bei Proband B.

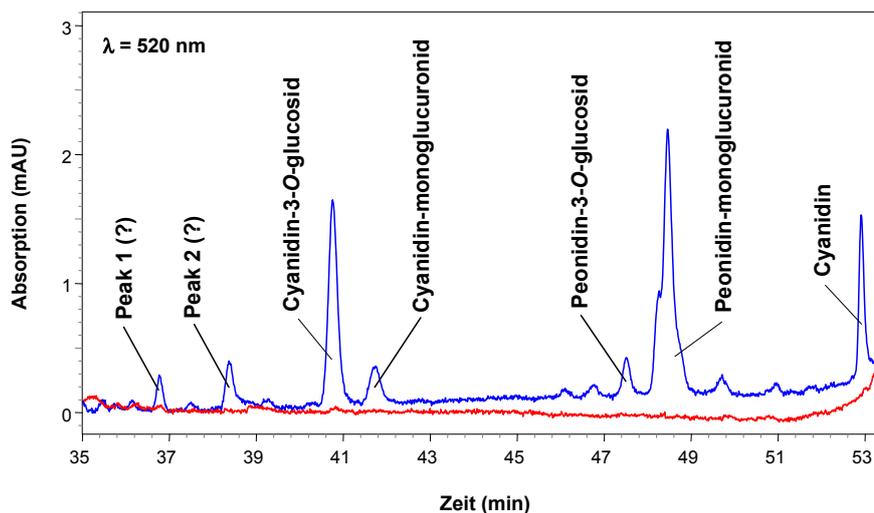


**Abbildung 3.50:** Protocatechu- und Vanillinsäure als Urin-Metabolite von Cyanidin-3-*O*-glucosid: Prozentualer Anteil in den verschiedenen Urinfraktionen der beiden Probanden A und B bezogen auf die aufgenommene Menge Anthocyan (angegebene Prozentwerte spiegeln den jeweiligen Fraktionsanteil an der in allen Fraktionen ausgeschiedenen Phenolsäuregesamtmenge wider)

### 3.4.2.2 Plasma

Wie Abbildung 3.51 zeigt, konnten im Plasma nach LC-Messungen sieben Metabolite mit Anthocyan-ähnlichen Absorptionsspektren nachgewiesen werden, von denen fünf – wie schon im Urin anhand der dort abgebildeten Spektren – mit Hilfe massenspektrometrischer Messungen zu den benannten Verbindungen identifiziert werden konnten.

Über den gesamten 5-stündigen Beobachtungszeitraum hinweg waren Cy3glc, Cyanidin-monoglucuronid, Peonidin-monoglucuronid und der nicht-identifizierte Metabolit 2 mit den in Tabelle 3.7 angegebenen prozentualen Anteilen die Haupt-Anthocyanmetabolite bezogen auf alle im Plasma detektierten Anthocyan-Derivate. Peo3glc spielte dagegen mit nur 4% (Proband A) bzw. 1% (Proband B) eine sehr untergeordnete Rolle im Metabolitenspektrum. Betrachtet man den Peak des Peonidin-monoglucuronids genauer, so erkennt man, dass dieser sich im Laufe der Plasmaentnahme-Zeitpunkte veränderte (Abb. 3.52). Die Schulter des Peaks zu Beginn deutet auf das Vorhandensein zweier unterschiedlicher Glucuronide hin. 2 bzw. 3 h nach Cy3glc-Aufnahme taucht ein drittes Peonidin-Glucuronid auf. Wie in den *in vitro*-Untersuchungen gesehen (vgl. 3.3.2.2), bilden die Anthocyane durch Bindung an



**Abbildung 3.51:** Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse des Humanplasmas nach Aufnahme von Cyanidin-3-*O*-glucosid am Beispiel von Proband A (blaue Linie: 1 h nach Anthocyan-Aufnahme; rote Linie: Placeboversuch, 1 h-Wert)

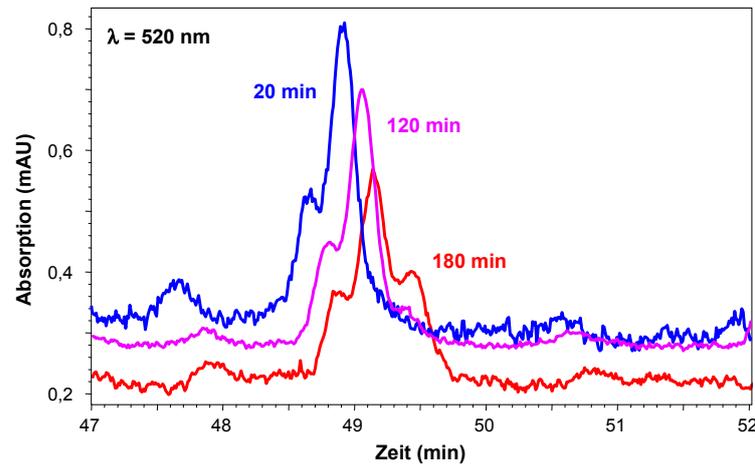
**Tabelle 3.7:** Prozentualer Anteil der Haupt-Anthocyan-Metabolite an der Gesamtmenge der detektierten Anthocyan-Derivate

Anthocyan-Metabolit	Proband A	Proband B
Cy3glc	34%	24%
Cyanidin-monoglucuronid	11%	25%
Peonidin-monoglucuronid	29%	25%
Peak 2	11%	19%

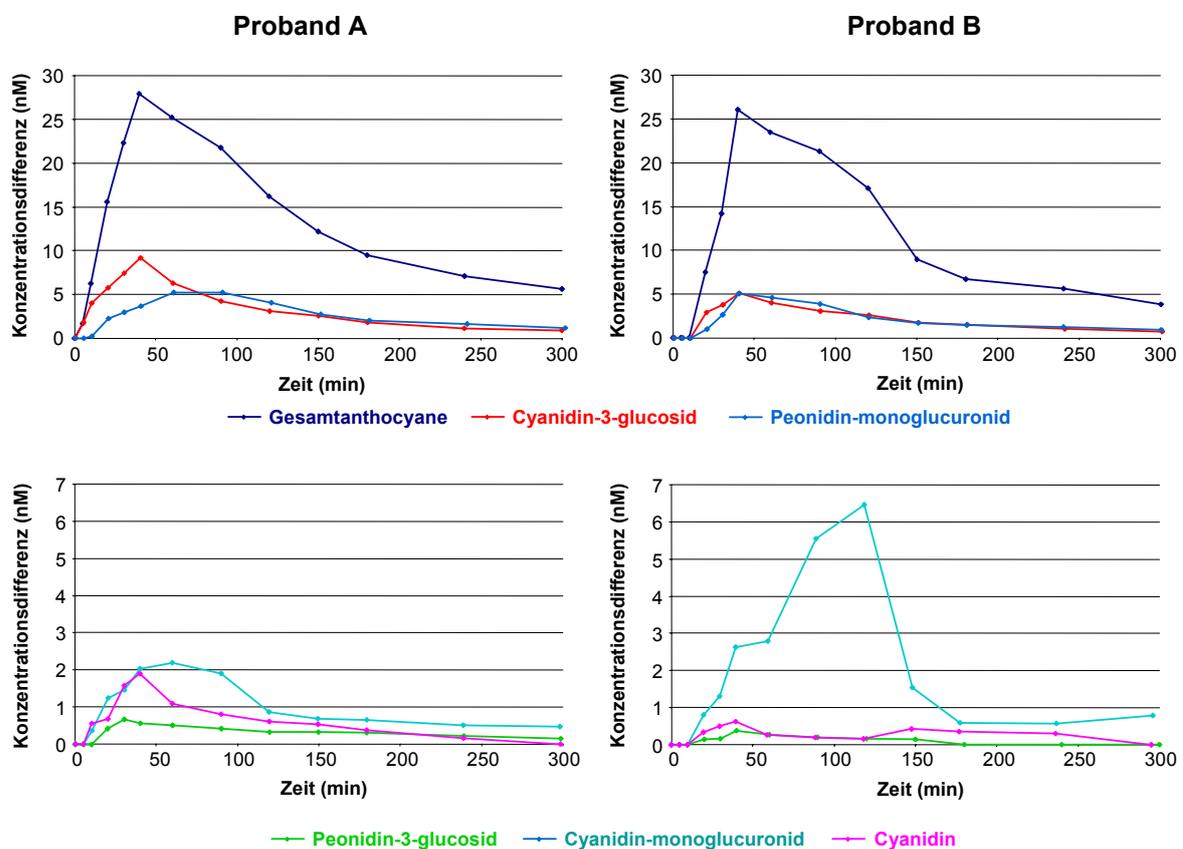
verschiedene freie Hydroxylgruppen unterschiedliche Glucuronsäure-Konjugate, die in diesem Fall mit der verwendeten HPLC-Methode nicht getrennt wurden.

Trägt man die zu den jeweiligen Messzeitpunkten gefundene Plasma-Anthocyan-Konzentration gegen die Zeit auf, so erhält man für die unterschiedlichen Anthocyan-Metabolite und die Gesamtanthocyane die in [Abbildung 3.53](#) dargestellten Kurven. Die erreichten Anthocyan-Konzentrationen sind sehr niedrig (unterer nanomolarer Bereich) und erreichen früh, meist schon nach 40 bis 60 min, ihre maximalen Werte. Deutlich wird bei Proband A auch, dass lediglich das Cy3glc selbst nach 5 min nachweisbar war, während die Metabolite erst später gebildet werden.

Im Falle der oralen Aufnahme von in Wasser gelöstem Cy3glc (Proband A) ließen sich bereits 5 min nach Aufnahme Anthocyane in Form des Cy3glc im Plasma nachweisen. Schon nach 10 min fanden sich Cy, Cyanidin-monoglucuronid und Peonidin-monoglucuronid, während Peo3glc erst nach 20 min erstmals detektierbar war. Die aufgrund der Aufnahme über die



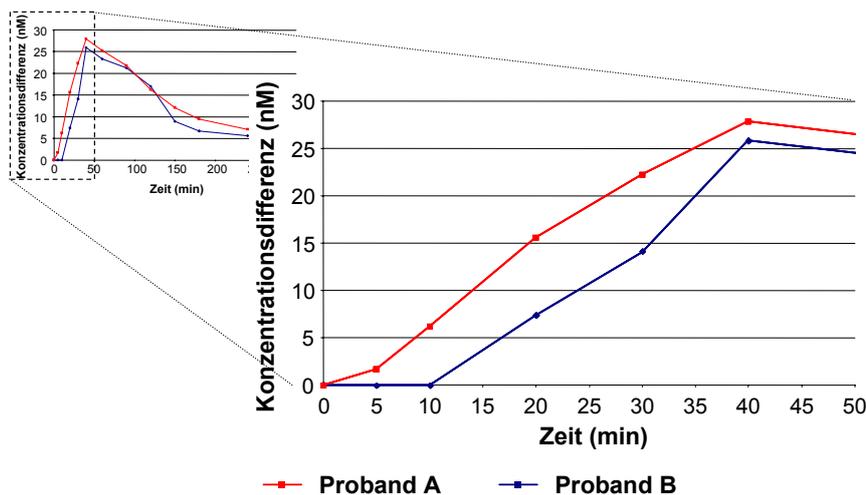
**Abbildung 3.52:** Veränderung des Peaks von Peonidin-monoglucuronid im Laufe des Beobachtungszeitraums (am Beispiel von Proband B)



**Abbildung 3.53:** Plasma-Anthocyan-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit nach Aufnahme von Cyanidin-3-*O*-glucosid

Weichgelatinekapselform und der dadurch benötigten Auflösungszeit verzögerte Resorption bei Proband B ist dieser schnellen Resorption in Abbildung 3.54 anhand der Gesamtanthocyan-Konzentration gegenübergestellt.

Die Berechnungen der Flächen unter diesen Kurven (AUC) und die Einbeziehung der Hämatokritwerte (Hkt) von Proband A und Proband B ergab nach Anwendung der Formel aus



**Abbildung 3.54:** Gegenüberstellung der Gesamtanthocyan-Konzentration im Plasma bei Proband A und B nach Aufnahme von Cyanidin-3-*O*-glucosid in Wasser oder in Weichgelatinecapseln

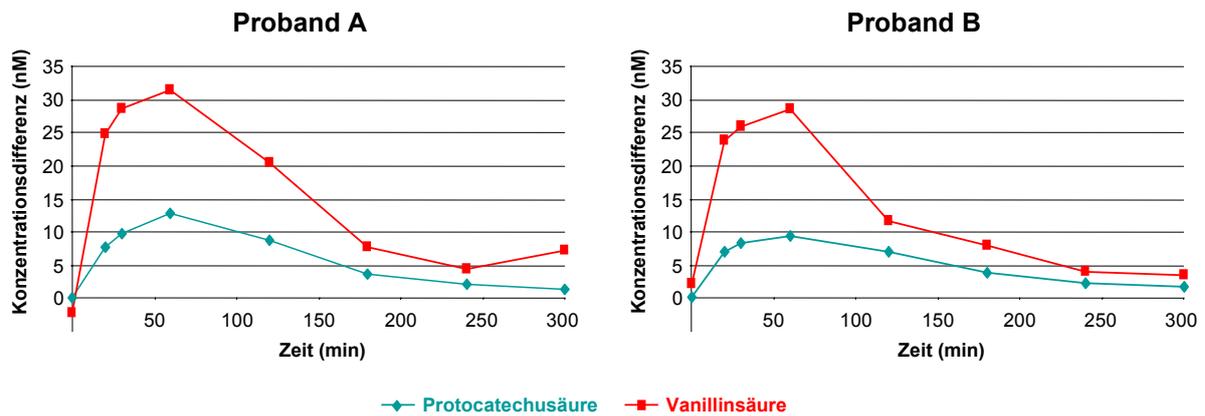
6.2.4.2 die im Plasma gefundene Gesamtstoffmenge  $n_{ges}$ , die, bezogen auf die verabreichte Menge Cy3glc ( $n_{Cy3glc}$ ), die folgenden Wiederfindungen (WF) ergab:

	AUC $\left[\frac{nmol}{l \times 5h}\right]$	Hkt	$V_{Plasma}$ [l]	$n_{ges}$ $\left[\frac{nmol}{5h}\right]$	$n_{Cy3glc}$ [nmol]	WF [%]
Proband A	4007	46	2,60	10418	449100	2,32
Proband B	3351	45	2,44	8176	505700	1,62

Auch im Plasma konnten als weitere Metabolite des Cy3glc PCS und VS in freier Form nachgewiesen werden. Während PCS im Placebo-Versuch nicht nachzuweisen war und erst nach Aufnahme des Anthocyans im Plasma auftrat, wurde VS auch nach Gabe des Placebos im Plasma detektiert, jedoch auf einem gleichbleibenden Niveau (ca. 30 nM) zu allen gemessenen Zeitpunkten. Diese Werte wurden wie üblich von den entsprechenden Werten nach Cy3glc-Verabreichung substrahiert. Abbildung 3.55 zeigt den sich daraus ergebenden Verlauf der Konzentrationen in Abhängigkeit von den Zeitpunkten nach Anthocyan-Aufnahme. Glycinaddukte konnten weder für VS noch für PCS nachgewiesen werden.

Quantifiziert man, wie bei den Anthocyanen beschrieben, die Gesamtstoffmenge  $n_{ges}$  über die Fläche unter der Kurve (AUC) und setzt diese wieder in Bezug zu der verabreichten Menge Cy3glc ( $n_{Cy3glc}$ ), so erhält man die folgenden Wiederfindungen (WF):

	$n_{ges}$ $\left[\frac{nmol}{5h}\right]$		$n_{Cy3glc}$ [nmol]	WF [%]		
	VS	PCS		VS	PCS	Summe
Proband A	13585	4666	449100	3,02	1,04	4,06
Proband B	9004	4211	505700	1,78	0,83	2,61



**Abbildung 3.55:** Plasma-Konzentrationen an Protocatechu- und Vanillinsäure in Abhängigkeit von der Zeit nach Aufnahme von Cyanidin-3-*O*-glucosid

Tabelle 3.8 fasst die Ergebnisse der Plasma-Untersuchungen nach Verzehr von Cy3glc zusammen.

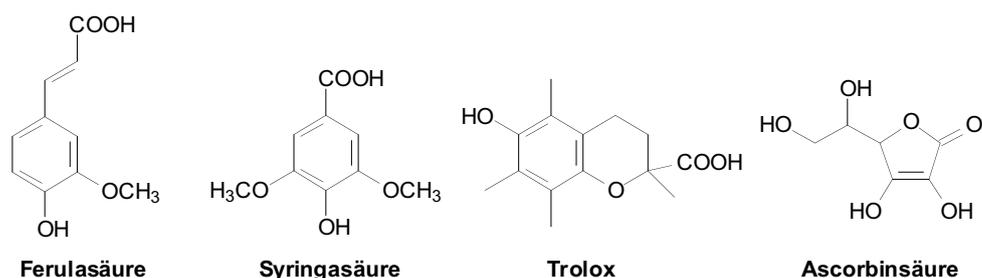
**Tabelle 3.8:** Zusammenfassung der prozentualen Wiederfindungen der verschiedenen Metabolite im Plasma nach Verzehr von Cyanidin-3-*O*-glucosid (*Abweichungen vom Mittelwert (AM) unter Anwendung der Fehlerfortpflanzung errechnet*)

	Anthocyane	VS	PCS	Summe
<b>Proband A</b>	2,32%	3,02%	1,04%	6,38%
<b>Proband B</b>	1,62%	1,78%	0,83%	4,23%
Mittelwert	1,97%	2,40%	0,94%	
AM	0,49%	0,88%	0,15%	
Summe		(3,34 ± 0,89)%		
Gesamtsumme	(5,31 ± 1,02)%			

## 3.5 Antioxidative Eigenschaften der Anthocyane und ihrer Metabolite

Unter den diskutierten gesundheitsfördernden Eigenschaften der Anthocyane (vgl. 1.6) nimmt die antioxidative Wirkung eine zentrale Stellung ein und sollte daher näher beleuchtet werden. Aufgrund der Komplexität und Vielfalt antioxidativer Wirkmechanismen ist anhand eines Testsystems jedoch nur eine begrenzte Aussage möglich. Erst durch vergleichende Untersuchungen verschiedener Substanzen und durch den Einsatz verschiedener Testsysteme ist eine umfassende Beurteilung der antioxidativen Eigenschaften möglich.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur antioxidativen Wirkung der kommerziell erhältlichen Metabolite (Cy3glc, Peo3glc, Cy, Peo, PCS und VS) aus den *in vivo*-Untersuchungen (vgl. 3.4) in den Testsystemen TEAC-, FRAP- und ORAC-Assay vorgestellt. Zur Einstufung ihres antioxidativen Potentials wurden diese Substanzen mit den bekannten phenolischen Antioxidantien Ferulasäure (FS) und Syringasäure (SS), mit dem wasserlöslichen Vitamin E-Analogon Trolox und mit Ascorbinsäure (ASC) verglichen (Abb. 3.56).

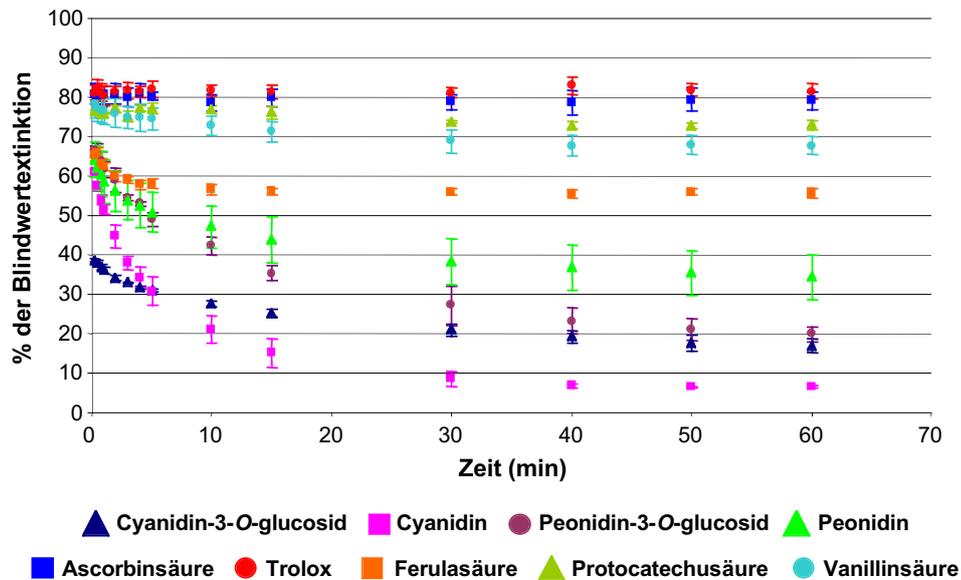


**Abbildung 3.56:** Strukturformeln der Referenzsubstanzen Ferulasäure, Syringasäure, Trolox und Ascorbinsäure

### 3.5.1 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)-Assay

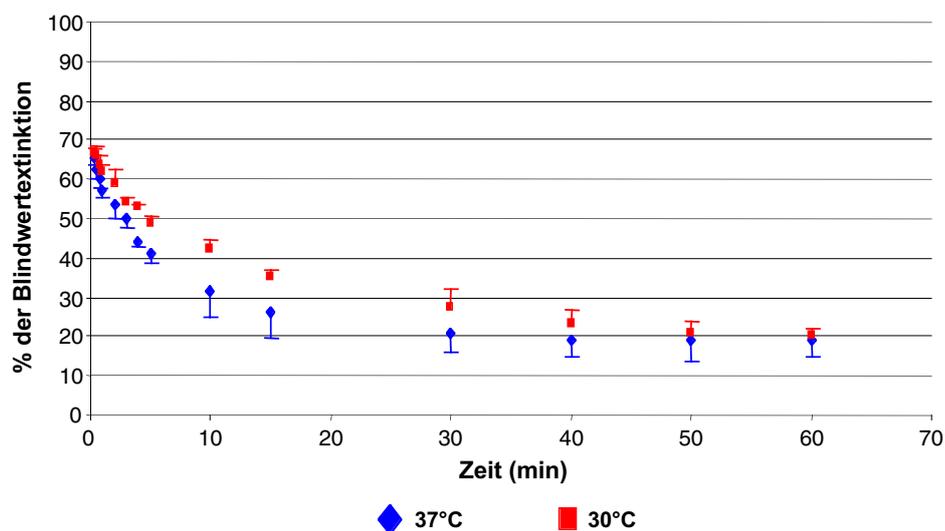
#### 3.5.1.1 Reaktionskinetiken und Methodenoptimierung

Um den Reaktionsverlauf bei den unter 6.2.5.1 beschriebenen Bedingungen zu verfolgen, wurde der Reaktionsverlauf über 60 min zunächst bei einer Temperatur von 30°C, dann bei 37°C verfolgt. Die untersuchten Anthocyane (Cy, Cy3glc, Peo, Peo3glc) zeigten andere Reaktionsverläufe als die getesteten phenolischen Säuren (FS, PCS, SS, VS) oder die Referenzsubstanzen (Trolox und ASC). Trolox und ASC reagierten bei allen eingesetzten Konzentrationen spontan mit dem ABTS-Radikal, so dass das Reaktionsende unmittelbar erreicht wurde (vgl. Abb. 3.57). Die phenolischen Säuren zeigten lediglich anfänglich eine leichte Extinktionsabnahme, während alle Anthocyane (sowohl die Aglykone als auch die Glucoside) verzögert reagierten.



**Abbildung 3.57:** Reaktionsverlauf des TEAC-Assays bei 30°C mit verschiedenen Antioxidantien (4,5  $\mu\text{M}$  im Reaktionsansatz, Mittelwerte aus vier Messwerten  $\pm$  SD)

Wurde die Temperatur auf 37°C erhöht, stellte sich das Reaktionsende bei prinzipiell gleichem Reaktionsverlauf schneller ein (vgl. Abb. 3.58 am Beispiel des Peo3glc) und war bereits nach 40 min bei allen Substanzen erreicht, weswegen die Reaktionsbedingungen auf 37°C und Messungen nach 40 min bestimmt wurden, da der Sättigungsbereich am ehesten den Begriff der antioxidativen Kapazität widerspiegelt.



**Abbildung 3.58:** Vergleich der Reaktionsverläufe im TEAC-Assay bei 30 bzw. 37°C am Beispiel des Peonidin-3-*O*-glucosids

### 3.5.1.2 Bestimmung der TEAC-Werte

#### TEAC-Werte

Die durch Bestimmung mindestens fünf unabhängiger Messungen gewonnen Mittelwerte der TEAC-Werte samt ihrer Standardabweichung sind in Abbildung 3.59 graphisch gegenübergestellt. Je höher der Wert, desto größer die antioxidative Kapazität.

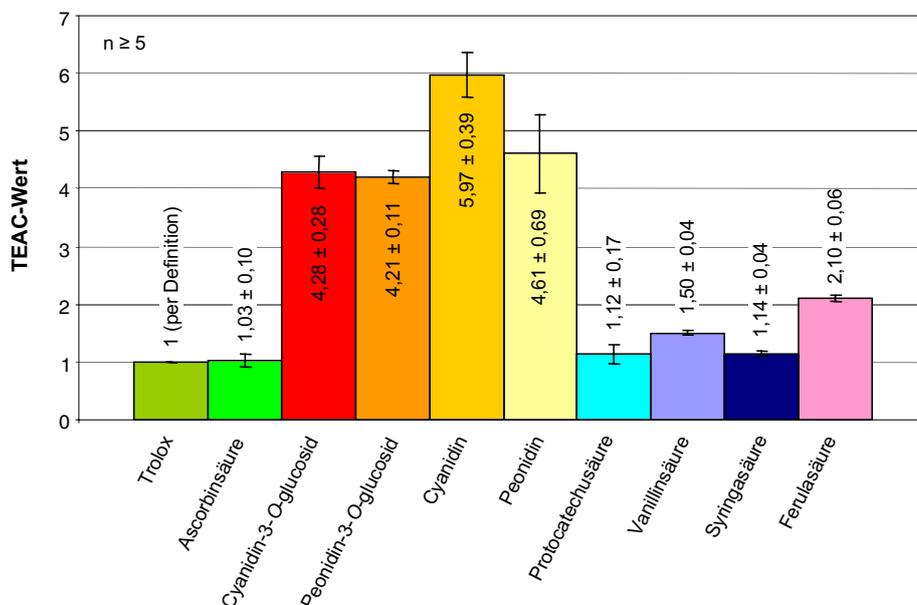


Abbildung 3.59: TEAC-Werte der unterschiedlichen Testsubstanzen

Sofern in der Literatur Werte bekannt sind, stimmen diese gut mit den hier ermittelten Daten überein. So wurden für ASC TEAC-Werte von 0,99 [268], 1,00 [16] und 1,05 [268], für FS von 3,2 [269] und 1,9 [268], für VS von 1,8 [269] und für PCS von 1,1 [269] und 1,2 [270] ermittelt. Dagegen weichen die in der Literatur beschriebenen Werte für die Anthocyane (4,4 für Cy [16, 270, 271] bzw. 2,2 für Peo [270]) von den hier bestimmten ab, was in erster Linie an den in diesen Arbeiten verwendeten Reaktionszeiten liegt, die die spezielle Kinetik der Anthocyane (vgl. 3.5.1.1) unberücksichtigt lässt.

Es fällt auf, dass alle Anthocyane eine um den Faktor 4,2 bis 6,0 höhere antioxidative Kapazität besitzen als die typischen Antioxidantien Trolox und Ascorbinsäure. Diese Werte sind auch verglichen mit anderen, in der Literatur beschriebenen, ausgewiesenen starken Antioxidantien sehr hoch. So finden sich z.B. für die Harnsäure oder das Flavonoid Quercetin in der Literatur Werte von 1,02 bzw. 4,72 [268].

### Reihungen und Mittelwertvergleiche (Signifikanzberechnungen)

Nach Mittelwertvergleichen mittels *ungepaartem Student's t-Test* und Varianzanalyse (*ANOVA; Post Hoc Tests: Games-Howell*) ergab sich für die getesteten Substanzen folgende Reihung:

$$\text{Cy}^{**} > \text{Peo} = \text{Peo3glc} = \text{Cy3glc}^{**} \gg \text{FS}^{**} > \text{VS}^{**} > \text{SS} = \text{PCS} = \text{ASC}$$

Interessanterweise gibt es einen signifikanten Wirkungsunterschied zwischen Cy und Peo bzw. zwischen Cy und Cy3glc, nicht jedoch zwischen Cy3glc und Peo3glc oder Peo und Peo3glc, was die außergewöhnlich hohe antioxidative Wirkung von Cy im TEAC-Test unterstreicht. Alle getesteten Anthocyane – sowohl in Form der Aglykone als auch als 3-*O*-Glucoside – besitzen im TEAC-Assay eine stärkere antioxidative Kapazität als alle eingesetzten phenolischen Säuren. Die Wirkung der im Körper gebildeten VS und PCS ist signifikant geringer als die der Anthocyane und die der zum Vergleich getesteten Ferulasäure, jedoch höher (im Falle der VS) oder gleich hoch wie die von ASC.

#### 3.5.1.3 Synergismusuntersuchungen

Cy3glc, PCS und VS wurden in Konzentrationen von 5, 10 und 15  $\mu\text{M}$  in den in Tabelle 3.9 gezeigten Kombinationen eingesetzt und zu den angegebenen äquivalenten Trolox-Konzentrationen bestimmt ( $n = 4$ ). Daneben wurden die Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen ebenfalls in Vierfachbestimmung einzeln gemessen. Abbildung 3.60 stellt die Summe dieser Einzelwerte (als Mittelwert von vier, zufällig ausgewählten Kombinationen der entsprechenden Konzentrationen) und die Ergebnisse der Kombinationsinkubation gegenüber. In keiner der untersuchten Kombinationen zeigte sich ein synergistischer Effekt des Cy3glc mit den phenolischen Säuren PCS und VS.

### 3.5.2 Ferric Reducing/Antioxidant Power (FRAP)-Assay

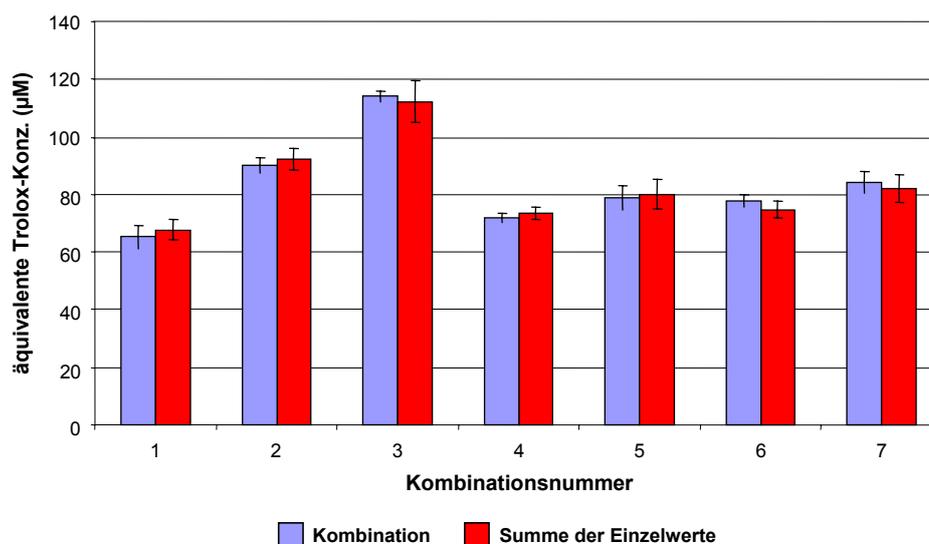
Es wurden sowohl die Konzentrationsabhängigkeit als auch die Reaktionskinetik der Testsubstanzen untersucht.

#### 3.5.2.1 Reaktionskinetiken und Methodenoptimierung

Abbildung 3.61 zeigt den Verlauf der Reaktion verschiedener Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen mit dem  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ-Redoxsystem. Lediglich im Falle der Ascorbinsäure erfolgte bei allen eingesetzten Konzentrationen die Reaktion spontan und das Reaktionsende wurde unmittelbar erreicht. Die anderen Substanzen zeigten dagegen andere Verläufe, wobei das Cy3glc typisch für alle getesteten Anthocyane (Aglykone und 3-*O*-Glucoside)

**Tabelle 3.9:** Kombinationen der eingesetzten Substanzen in den Synergismusuntersuchungen des TEAC-Assays und die Ergebnisse der Kombinationsuntersuchung und der Summe der Einzelinkubationsuntersuchungen

Mix	Konz. ( $\mu\text{M}$ )			äquivalente Trolox-Konz. ( $\mu\text{M}$ )			
	Cy3glc	VS	PCS	Kombination		$\Sigma$ (Einzelwerte)	
				MW	SD	MW	SD
1	5	5	5	65,3	3,8	67,9	3,4
2	10	5	5	90,2	2,8	92,3	3,9
3	15	5	5	114,1	2,0	112,3	7,3
4	5	10	5	71,9	1,6	73,7	2,2
5	5	15	5	78,8	4,1	80,2	5,1
6	5	5	10	77,7	2,1	74,7	3,1
7	5	5	15	84,0	3,8	82,2	4,7



**Abbildung 3.60:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der Synergismusuntersuchungen im TEAC-Assay (Mittelwert immer aus vier Messwerten  $\pm$  SD)(Kombinationsnummern beziehen sich auf die Kombinationen in Tab. 3.9)

war. Wie auch im Falle der SS, der VS und der FS deutete die Reaktion der Anthocyane einen Sättigungsverlauf an, der mit zunehmender Konzentration ausgeprägter war und auch nach 90 min noch nicht sein Ende erreicht hatte. Lediglich beim Einsatz geringer Konzentrationen war die Reaktion innerhalb von 30 min beendet. Die PCS zeigte dagegen bei allen eingesetzten Konzentrationen einen nahezu linearen Reaktionsverlauf. Aufgrund dieses unterschiedlichen Verhaltens der getesteten Substanzen wurden die Messungen bei zwei verschiedenen Zeitpunkten (10 min und 60 min) durchgeführt.

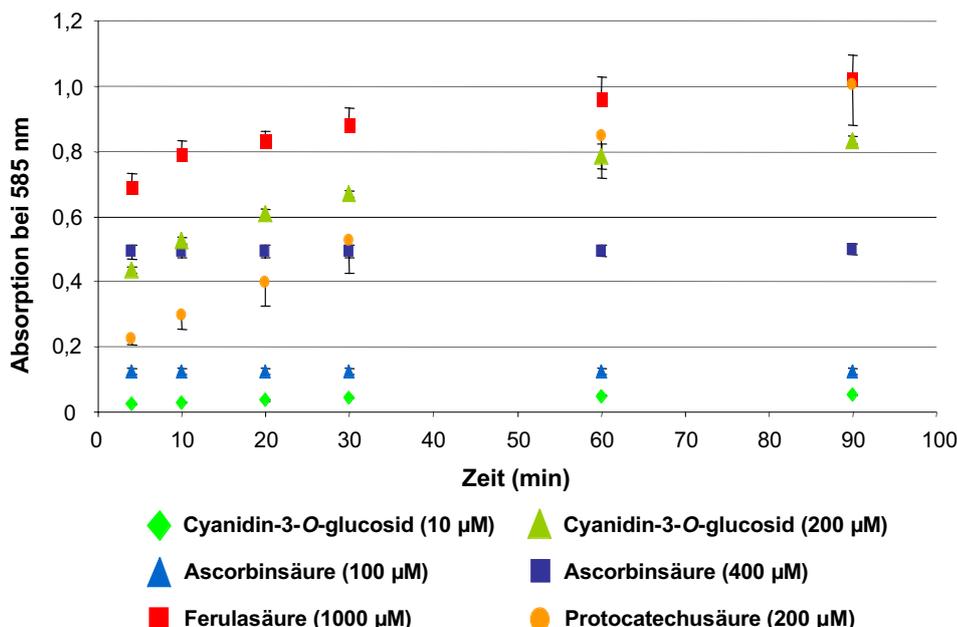


Abbildung 3.61: Reaktionsverlauf des FRAP-Assays mit verschiedenen Antioxidantien (Mittelwerte aus vier Messwerten  $\pm$  SD)

### 3.5.2.2 Kalibrierung

Die Kalibrierung wurde für einen  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentrationsbereich von 100–1750  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Die Konzentrationsangaben wurden für die eingesetzten Lösungen und nicht für die Endkonzentration im Reaktionsansatz angegeben. Eine Umrechnung findet sich in Tabelle 6.22. Da die Reaktion des  $\text{Fe}^{2+}$  mit TPTZ zum  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ-Komplex spontan erfolgt, unterscheiden sich die Messwerte bei 10 und bei 60 min kaum. Im gewählten Konzentrationsbereich besteht eine lineare Abhängigkeit zwischen Absorption und Konzentration des  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ-Komplexes. Die durch lineare Regression gewonnenen resultierenden Gleichungen der Kalibriergeraden lauten:

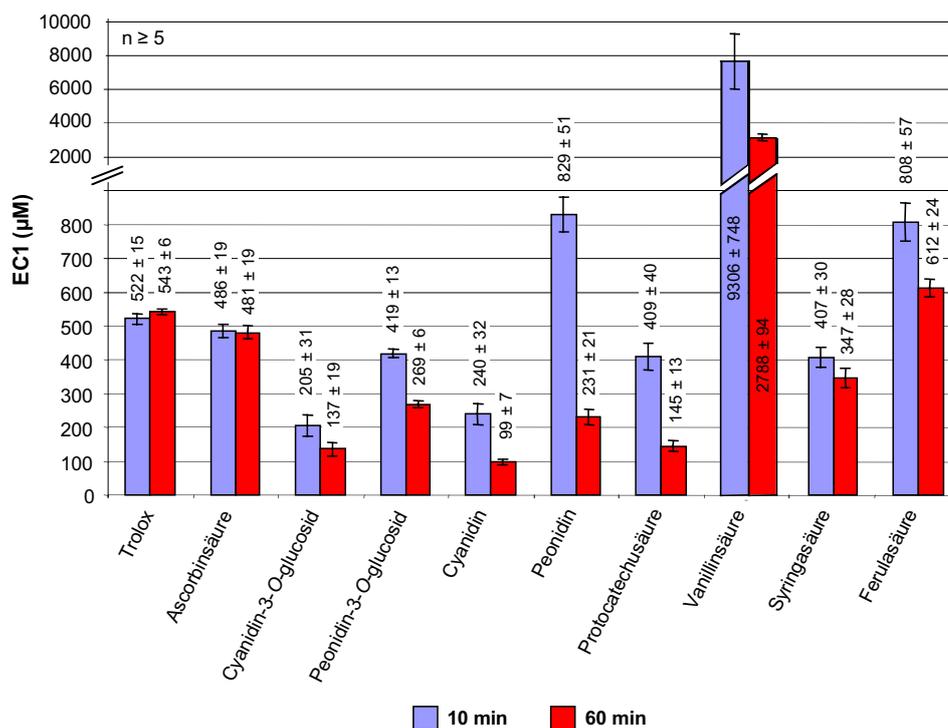
$$10 \text{ min Reaktionszeit: } \text{Abs (585 nm)} = 0,0006 \times c [\mu\text{M}] + 0,0032 \quad R^2 = 0,9998$$

$$60 \text{ min Reaktionszeit: } \text{Abs (585 nm)} = 0,0006 \times c [\mu\text{M}] - 0,0020 \quad R^2 = 0,9999$$

### 3.5.2.3 Bestimmung der $\text{EC}_1$ -Werte

#### $\text{EC}_1$ -Werte

Die Mittelwerte der durch Bestimmung mindestens fünf unabhängiger Messungen gewonnenen  $\text{EC}_1$ -Werte samt ihrer Standardabweichungen sind in Abbildung 3.62 graphisch gegenübergestellt. Je niedriger der Wert, desto größer die antioxidative Kapazität.

Abbildung 3.62: EC<sub>1</sub>-Werte des FRAP-Assays der unterschiedlichen Testsubstanzen

### Reihungen und Signifikanzberechnungen

Signifikanzberechnungen mittels *ungepaartem Student's t-Test* ergeben für die getesteten Substanzen folgende Reihungen:

**10 min:** Cy = Cy3glc > SS = PCS = Peo3glc > ASC = Trolox > FS = Peo >> VS

**60 min:** Cy > Cy3glc = PCS > Peo > Peo3glc > SS > ASC > Trolox > FS >> VS

Bei der Auswertung über die Varianzanalyse (*ANOVA*) wurden die Werte der VS aus der Berechnung gestrichen, um weniger die Unterschiede zu der sich in diesem Test komplett anders verhaltenden VS als vielmehr die Unterschiede unter den anderen getesteten Substanzen in den Vordergrund zu stellen. Der durchgeführte *Post Hoc Test* nach *Games-Howell* lieferte sehr ähnliche Ergebnisse wie der *ungepaarte Student's t-Test*, wobei für die 10 min-Werte kein signifikanter Unterschied zwischen der antioxidativen Aktivität des Peo3glc und der ASC zu erkennen war und bei den 60 min-Werten die Unterschiede zwischen Cy3glc und Cy sowie zwischen Peo3glc und Peo nicht signifikant waren.

Der Vergleich der beiden Messzeiten zeigt, wie stark die EC<sub>1</sub>-Werte von der Reaktionskinetik (vgl. 3.5.2.1) abhängen, wie v.a. das Beispiel des Peo zeigt. Während der EC<sub>1</sub>-Wert des Peo nach 10 min für die zweitniedrigste antioxidative Wirkung der ganzen Reihe steht, zeigt Peo nach 60 min im Vergleich mit den anderen Substanzen die vierthöchste antioxidative

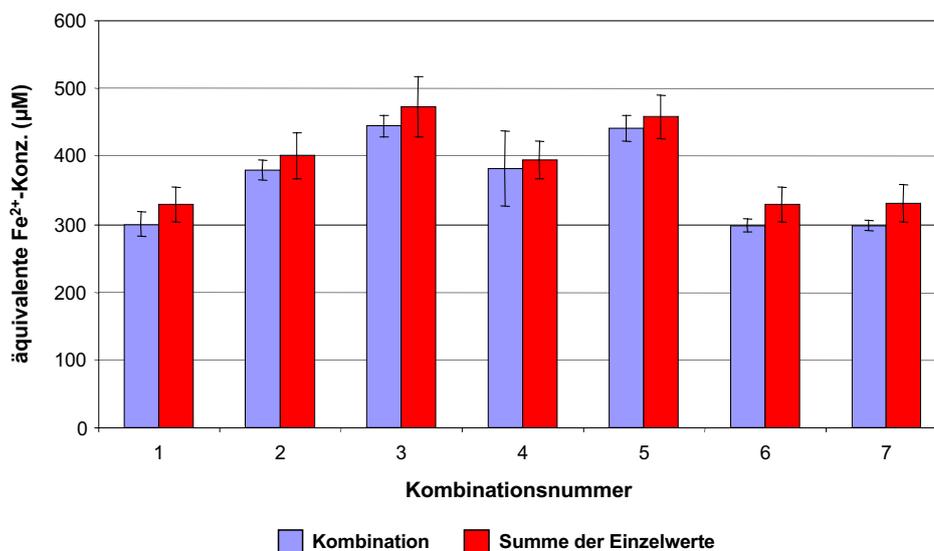
Kapazität. Eine ähnlich starke Abnahme ist auch bei der PCS und der VS zu beobachten, dort jedoch auf wesentlich schwächerem antioxidativem Niveau. Auffällig ist ferner, dass in allen Testrechnungen die Cyanidin-Derivate signifikant stärker antioxidativ wirksam sind als Peonidin-Derivate. Während das Aglykon des Cyanidins nur nach 60 min signifikant potenter war als das 3-O-Monoglucosid, kehrte sich die Wirksamkeitsreihenfolge im Falle des Peonidins sogar um: nach 10 min war das Glucosid wirksamer, nach 60 min das Aglykon. Interessanterweise war das Abbauprodukt des Cy, die PCS, im FRAP-Assay eine sehr potente Verbindung, während die auf den B-Ring des Peo zurückgehende VS nur eine sehr geringe Wirkung zeigte.

### 3.5.2.4 Synergismusuntersuchungen

Die Konzentrationen der in verschiedenen Kombinationen (vgl. Tab. 3.10) eingesetzten Cy3glc, PCS und VS lagen hier bei 20, 30 und 40  $\mu\text{M}$ . In Vierfachbestimmungen wurden über die Kalibriergeraden (vgl. 3.5.2.2) äquivalente  $\text{Fe}^{2+}$ -Werte bestimmt und mit den Summen der einzeln gemessenen Substanzen ( $n = 4$ ) in den entsprechenden Konzentrationen verglichen. Hierzu wurden – wie für den TEAC-Assay beschrieben (vgl. 3.5.1.3) – vier zufällig ausgewählte Kombinationen berechnet. Wie aus Abbildung 3.63 für eine Reaktionszeit von 60 min hervorgeht, gab es in keiner der untersuchten Kombinationen signifikant synergistische Effekte des Cy3glc mit den phenolischen Säuren PCS und VS. Analoge Ergebnisse wurden auch für die Reaktion nach 10 min beobachtet (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle 3.10:** Kombinationen der eingesetzten Substanzen in den Synergismusuntersuchungen des FRAP und die Ergebnisse der Kombinationsuntersuchung und der Summe der Einzelinkubationsuntersuchungen bei einer Reaktionszeit von 60 min

Mix	Konz. ( $\mu\text{M}$ )			äquivalente $\text{Fe}^{2+}$ -Konz. ( $\mu\text{M}$ )			
				Kombination		$\Sigma$ (Einzelwerte)	
	Cy3glc	VS	PCS	MW	SD	MW	SD
1	20	20	20	300	18	329	25
2	30	20	20	380	15	401	33
3	40	20	20	444	15	473	44
4	20	20	30	381	55	394	28
5	20	20	40	441	20	458	32
6	20	30	20	298	9	329	25
7	20	40	20	298	8	331	27



**Abbildung 3.63:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der Synergismusuntersuchungen im FRAP-Assay bei einer Reaktionszeit von 60 min (Mittelwert immer aus vier Messwerten  $\pm$  SD)(Kombinationsnummern beziehen sich auf die Kombinationen in Tab. 3.10)

### 3.5.3 Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)-Assay

#### 3.5.3.1 Berechnung der Trolox-Äquivalente

Abbildung 3.64 zeigt die Mittelwerte der bestimmten Trolox-Äquivalente im ORAC-Assay für die beiden Fluoreszenzfarbstoffe Phycoerythrin und Fluorescein. Je höher der Wert, desto größer die antioxidative Kapazität.

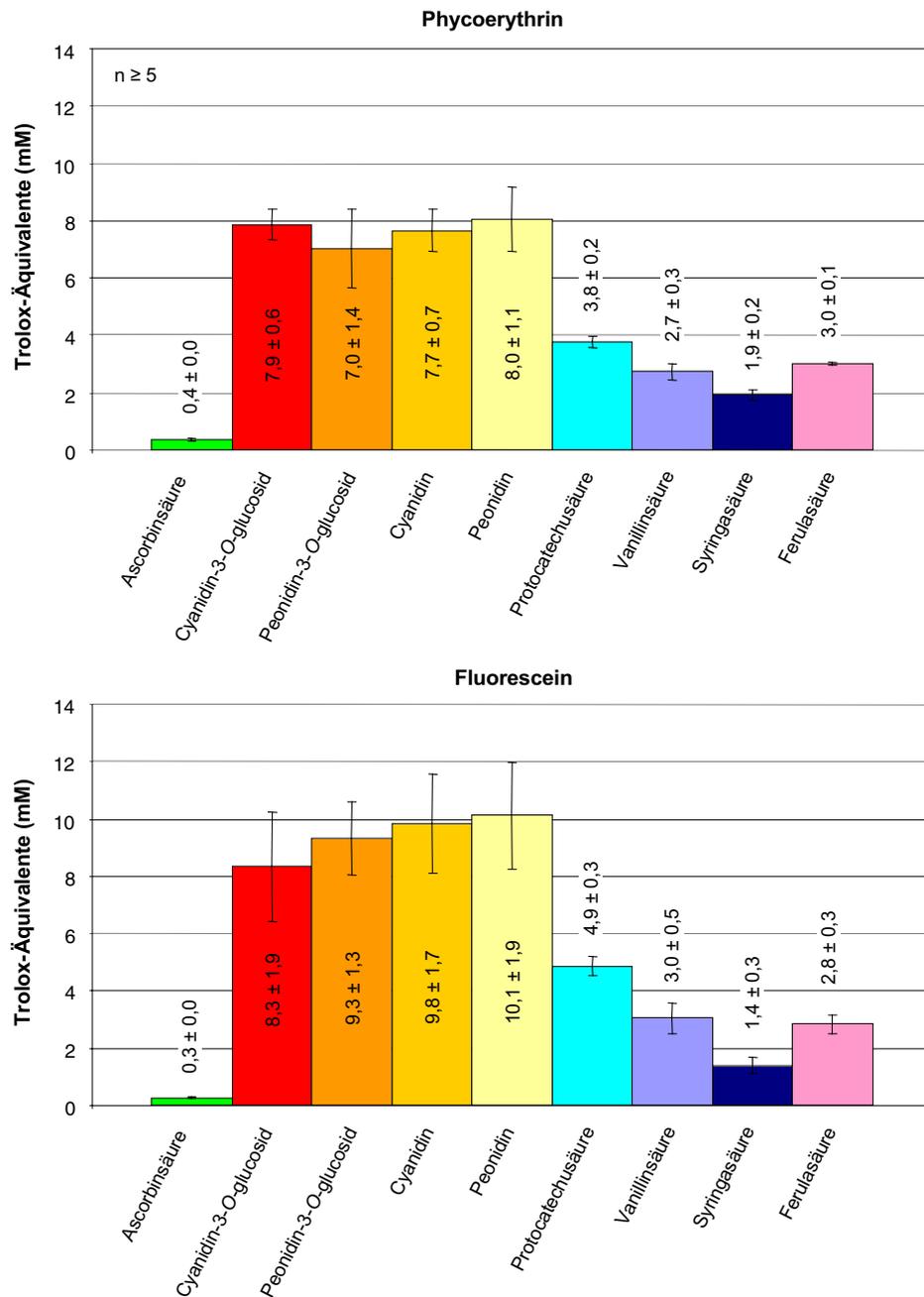
Aus den Messungen ergeben sich nach Signifikanzberechnungen mittels *ungepaartem Student's t-Test* für die getesteten Substanzen folgende Reihenungen:

**Phycoerythrin:** Peo = Cy3glc = Cy = Peo3glc  $\gg$  PCS  $\gg$  FS = VS  $\gg$  SS  $\gg$  ASC

**Fluorescein:** Peo = Cy = Peo3glc = Cy3glc  $>$  PCS  $>$  VS = FS  $>$  SS  $\gg$  ASC

Die Varianzanalyse (*ANOVA, Post Hoc Test: Games-Howell*) lieferte im Falle des Phycoerythrins die gleichen Ergebnisse wie der *ungepaarte Student's t-Test*. Auch im Fall des Fluoresceins waren die Ergebnisse sehr ähnlich, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen der antioxidativen Aktivität des Cy3glc und der PCS zu erkennen war.

Ein Vergleich mit Absolutwerten aus der Literatur war aufgrund der unterschiedlichen Auswertetechniken nicht möglich, jedoch konnte die Wirkungsreihung einzelner Substanzpaare bestätigt werden [272, 273].



**Abbildung 3.64:** Trolox-Äquivalente der unterschiedlichen Testsubstanzen im ORAC-Assay beim Einsatz der beiden Fluoreszenzfarbstoffe Phycoerythrin und Fluorescein

### 3.5.3.2 Vergleich der Ergebnisse der beiden Fluoreszenzfarbstoffe

Unter Berücksichtigung der Signifikanzen erhält man für beide Fluoreszenzfarbstoffe dieselbe Reihung der getesteten Substanzen, wobei die Absolutwerte der äquivalenten Trolox-Konzentrationen bei allen getesteten Substanzen mit Ausnahme der ASC bei Verwendung von FL als Fluoreszenzfarbstoff höher lagen. Während der in der Literatur [274] beschriebene Nachteil der Photolabilität des PE bestätigt werden konnte und eine Abnahme der Fluoreszenzintensität in Abwesenheit von ABAP nur hier und nicht beim FL zu beobachten war,

bereitete die Chargenabhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften beim PE keinerlei Probleme und führte nicht zu größeren Standardabweichungen als dies beim FL der Fall war.

### 3.5.3.3 Synergismusuntersuchungen

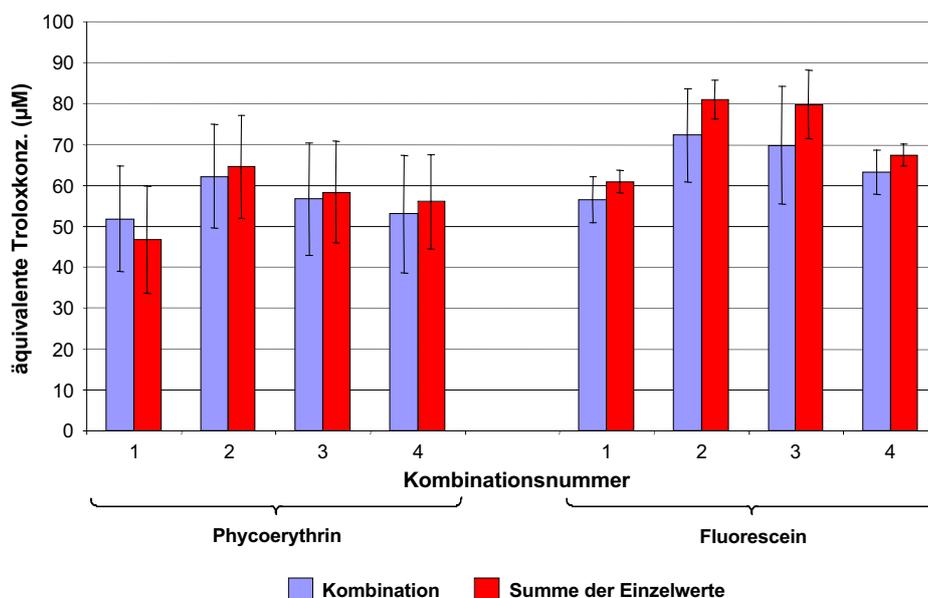
Für die Synergismusuntersuchungen wurden Cy3glc, PCS und VS in den Konzentrationen 2,5, 5 und 7,5  $\mu\text{M}$  in verschiedenen Kombinationen eingesetzt (vgl. Tab. 3.11). Auch hier zeigte der Vergleich der in Vierfachbestimmungen gewonnenen äquivalenten Trolox-Konzentrationen der Kombinationen mit den entsprechenden Summen der Einzelwerte (Zufallskombinationen) keine signifikant synergistischen Effekte (vgl. Abb. 3.65) weder beim Einsatz von Phycoerythrin noch bei der Verwendung von Fluorescein als Fluoreszenzfarbstoff.

**Tabelle 3.11:** Kombinationen der eingesetzten Substanzen in den Synergismusuntersuchungen des ORAC und die Ergebnisse der Kombinationsuntersuchung und der Summe der Einzelinkubationsuntersuchungen beim Einsatz von Phycoerythrin bzw. Fluorescein als Fluoreszenzfarbstoff (Komb. = Kombination, EW = Einzelwerte)

Mix	Konz. ( $\mu\text{M}$ )			äquivalente Troloxkonz. ( $\mu\text{M}$ )								
				Phycoerythrin				Fluorescein				
	Cy3glc	VS	PCS	Komb.		$\Sigma$ (EW)		Komb.		$\Sigma$ (EW)		
			MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
1	2,5	5	5	51,8	12,8	46,7	13,1	56,5	5,7	60,9	2,8	
2	5	5	5	62,2	12,7	64,6	12,5	72,2	11,3	81,0	4,8	
3	2,5	5	7,5	56,7	13,8	58,3	12,5	69,8	14,4	79,8	8,4	
4	2,5	7,5	5	53,0	14,4	56,0	11,7	63,2	5,4	67,4	2,7	

### 3.5.4 Vergleich der Ergebnisse

Da die verschiedenen Assays unterschiedliche Endpunkte besitzen ( $\text{Fe}^{3+}$ -reduzierendes Potential im Falle des FRAP-Assays, Abfangen künstlicher oder natürlicher Radikale beim TEAC- bzw. ORAC-Assay) und ihnen verschiedene Reaktionsmechanismen zugrunde liegen, lassen sich sinnvolle Aussagen über das tatsächliche antioxidative Potential der Anthocyane und ihrer Metabolite erst durch Vergleiche der Ergebnisse treffen. Tabelle 3.12 gibt eine Reihung der getesteten Substanzen in den verschiedenen Testsystemen wieder.



**Abbildung 3.65:** Graphische Darstellung der Ergebnisse der Synergismusuntersuchungen im ORAC-Assay bei einer Reaktionszeit von 60 min (Mittelwert immer aus vier Messwerten  $\pm$  SD)(Kombinationsnummern beziehen sich auf die Kombinationen in Tab. 3.11

**Tabelle 3.12:** Übersicht über die antioxidativen Eigenschaften der untersuchten Substanzen

Assay	Zusatzbedingung	Reihung
TEAC		Cy > Peo = Peo3glc = Cy3glc $\gg$ FS > VS > SS = PCS = ASC
FRAP	10 min	Cy = Cy3glc $\gg$ SS = PCS = Peo3glc > ASC > FS = Peo $\gg$ VS
	60 min	Cy > Cy3glc = PCS > Peo > Peo3glc > SS > ASC > FS $\gg$ VS
ORAC	mit R-Phycoerythrin	Peo = Cy3glc = Cy = Peo3glc $\gg$ PCS > FS = VS > SS $\gg$ ASC
	mit Fluorescein	Peo = Cy = Peo3glc = Cy3glc > PCS > VS = FS > SS $\gg$ ASC

### 3.5.5 Messung einer Modell-Plasmalösung

Eine endgültige Aussage über das antioxidative Potential aller im Körper nach Verzehr von einem Anthocyan gebildeten Metabolite ist nicht möglich, da zum einen weiterhin der Verbleib eines Großteils der verabreichten Substanz ungeklärt ist und zum anderen noch nicht alle Metabolite identifiziert und wenn, dann oftmals nicht in Reinform erhältlich sind. Daher wurde eine Modelllösung erstellt, die die Einzelsubstanzen im maximalen Konzentrationsbereich der entsprechenden Plasmawerte besaß (vgl. 3.4.2.2). Die phenolischen Säuren wurden dabei als Aglykone zugesetzt und Cyanidin-3-Glucosid bzw. Cyanidin als Leit-Anthocyan

stellvertretend für alle Aglykone, Glucoside, Glucuronide, Sulfate oder sonstige Anthocyan-Derivate gewählt. In Anlehnung an die Konzentrationsverhältnisse im Plasma setzte sich die Modelllösung damit wie folgt zusammen:

- 25 nM Anthocyan (Cy oder Cy3glc)
- 13 nM PCS
- 31 nM VS

Diese Modelllösung wurde in allen oben beschriebenen Assays eingesetzt. In keinem der beschriebenen Tests zeigte sich dabei eine antioxidative Wirkung im gewählten Konzentrationsbereich.

## 4 Diskussion

### 4.1 Stabilität und Optimierung der analytischen Methoden

Die Aglykone der Anthocyane sind instabil und zerfallen nach bekanntem Schema (vgl. Abb. 1.6). Bei höheren Konzentrationen entstanden dabei *in vitro* Intermediate mit Anthocyan-ähnlichen Absorptionsspektren, die auf den Erhalt der Anthocyan-Grundstruktur hindeuten. Massenspektrometrische Analysen dieser Zwischenprodukte (vgl. Abb. 3.19 am Beispiel des Cyanidins (Cy)) legten die Vermutung nahe, dass es sich um Dimerisierungsprodukte handelt, die durch Reaktionen zweier Cyanidin-Einheiten entstehen. Bei neutralen pH-Bedingungen liegen die Anthocyanidine als reaktive Chinoid-Basen vor (vgl. Abb. 1.5), die miteinander zu Dimeren reagieren können, wie Abbildung A.77 im Anhang beispielhaft zeigt. Bei längerer Inkubation oder niedrigeren Konzentrationen fanden Zerfallsreaktionen statt, in deren Verlauf phenolische Säuren gebildet wurden (vgl. Tab. 1.1). Da in Zellkultursystemen und in *in vitro*-Untersuchungen häufig Aglykone eingesetzt werden, ist die Beurteilung der Ergebnisse nur vor diesem Hintergrund möglich. Die gefundenen Effekte müssen daher auch auf die Wirkungen der Abbau- und Dimerisierungsprodukte zurückgeführt werden (vgl. 4.3). Bei der Reihenfolge der Stabilität der Anthocyanidine zeigten unsere Ergebnisse eine abnehmende Stabilität mit zunehmender Hydroxylierung und Methoxylierung des B-Ringes, während in der Literatur auch oft von einem stabilisierenden Effekt durch Methylierung von freien Hydroxylgruppen wie im Malvidin (Mal) ausgegangen wird [14]. In Übereinstimmung zu unseren Resultaten zeigen neuere Untersuchungen die größere Stabilität von Pelargonidin (Pel) [18, 275].

Die Stabilität der Anthocyanidine konnte durch Zugabe von Aluminium verbessert werden [27]. Dabei zeigten sich die größten Stabilitätsverbesserungen bei Cy und Delphinidin (Del), die am B-Ring *ortho*-ständige freie Hydroxylgruppen besitzen und den in 1.3.4 beschriebenen Komplex eingehen können. Auch Peonidin (Peo) zeigte trotz einer methylierten Hydroxylgruppe eine, wenngleich auch schwächere Stabilisierung durch  $\text{Al}^{3+}$ -Ionen und selbst bei dem am B-Ring monohydroxylierten Pel war dieser Effekt zu beobachten, was auf die Existenz eines weiteren Komplexes hindeutet. Hinweise darauf liefern Untersuchungen von George et al. [276] an Malvin, die die Einlagerung und Komplexierung von Eisen-Ionen über die Ausbildung von Hohlräumen in der Chalkon-Form des Anthocyans postulieren.

In Übereinstimmung mit Ergebnissen aus der Literatur zeigte sich, dass die 3-*O*-Glucoside der Anthocyane v.a. im sauren Milieu stabil waren (Daten nicht gezeigt). So konnten auch Nielsen et al. [69] nachweisen, dass die Glucoside und Rutinoside von Cy und Del bei pH-Werten bis 3,3 stabil waren und erst ab pH-Werten oberhalb von 4,5 abgebaut wurden. Auf

der Grundlage dieser Stabilitätsuntersuchungen und um die Anthocyane einheitlich in ihre Flavyliumform zu überführen, wurden alle Analysen bei stark sauren pH-Werten ( $\text{pH} < 2$ ) durchgeführt.

Eine wichtige Verbesserung der Anthocyan-Analytik verglichen mit den bekannten Vorgehensweisen der Literatur war die schnelle Aufarbeitung der Proben. Wie auch von anderen Gruppen [225] beobachtet und für andere Flavonoide wie z.B. Quercetin [277] beschrieben, binden Anthocyane durch Wasserstoffbrücken, über Komplexbindungen oder kovalent an Plasmaproteine [92, 240], wodurch sich bei längeren Standzeiten der Proben die Wiederfindungsraten verschlechtern. Außerdem erlaubte die schnelle Analyse die Detektion der instabilen Aglykone.

Die Festphasenextraktion wurde auf spezielle C18-Phasen von WATERS (OASIS<sup>TM</sup>-Säulen) umgestellt, mit denen die Anthocyane über ihre unsubstituierten Hydroxylgruppen in Wechselwirkung treten und die – im Gegensatz zu den sonst in der Literatur verwendeten einfachen C-18-Phasen [15] – auch die phenolischen Säuren retardieren und so für die weitere Analytik zugänglich machen. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 91 und 102%.

Es konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von Aluminium-Ionen nicht nur eine Stabilisierung der Aglykone, sondern auch eine Verhinderung der enzymatischen Spaltung von Cyanidin-3-*O*-glucosid (Cy3glc) und Peonidin-3-*O*-glucosid (Peo3glc) mit  $\beta$ -Glucuronidase realisiert werden kann. Aluminium hemmt dabei nicht die Aktivität des Enzyms wie Cointubationen mit Dadzin, Quercitrin oder Isoquercitrin zeigten, sondern verhindert wohl über die Ausbildung von Komplexen die Einlagerung des Substrates an das aktive Zentrum des Enzyms. Dies ermöglicht die selektive Hemmung der Spaltung der 3-*O*-Glucoside und Glucuronide von Cy und Peo zu den instabilen Aglykonen, die im weiteren Verlauf zu Protocatechusäure (PCS) und Vanillinsäure (VS) zerfallen würden, und macht somit den Nachweis dieser Verbindungen als originär im Körper gebildete Metabolite möglich. Andere Glucuronide wie etwa die der PCS und VS können davon unberührt gespalten und bestimmt werden.

## 4.2 Metabolismus, Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik der Anthocyane

### 4.2.1 *in vitro*-Untersuchungen

Da lange Zeit entsprechende Metabolite *in vivo* nicht gefunden werden konnten, wurde angenommen, dass Anthocyane aufgrund ihrer Struktur einer Verstoffwechslung durch konjugierende und spaltende Enzyme widerstehen [218, 234], während dieser Metabolismusweg für zahlreiche andere Flavonoide längst belegt war und z.B. zur Metabolisierung zu kleineren

phenolischen Säuren führt [278–282]. Diese Theorie konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung verschiedener *in vitro*-Assays widerlegt werden.

Während Anthocyane – im Gegensatz zu vielen anderen Flavonoiden wie z.B. dem Isoflavon Daidzein [283] – weder in Form des Monoglucosids noch in Form des Aglykons Substrate der P450-abhängigen Monooxygenasen darstellten, konnte hier zum ersten Mal gezeigt werden, dass verschiedene Anthocyane einem intestinalen Metabolismus durch humane Darmbakterien unterliegen. Durch *in vitro*-Untersuchungen wurden dabei je nach eingesetztem Anthocyan verschiedene neue Metabolite identifiziert. So entstand beim schnellen Abbau der Anthocyan-Monoglucoside bei Inkubation mit humaner Darmflora die entsprechende, aus dem B-Ring hervorgehende phenolische Säure. Cy3glc wurde z.B. innerhalb von 2 h komplett abgebaut und zur PCS metabolisiert. Eine solche Metabolisierung durch intestinale Mikroorganismen zu verschiedenen hydroxylierten und nicht-hydroxylierten Benzoe-, Phenyllessig- und Phenylpropionsäure-Derivaten wurde für andere Flavonoide bereits gezeigt [278, 279, 284–290]. Intestinale Bakterien enthalten eine ganze Reihe dekonjugierender Enzyme wie z.B.  $\beta$ ,D-Glucuronidase,  $\beta$ ,D-Glucosidase oder  $\alpha$ ,L-Rhamnosidase [251, 291, 292]. Wie von Bokkenheuser et al. [250] vermutet, spielt beim metabolischen Prozess v.a. die  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität der Mikroorganismen eine wichtige Rolle. Bei Umsetzungen mit humanen Darmbakterien konnten jedoch nur maximal 62% der eingesetzten Anthocyane als Metabolit in Form der entsprechenden phenolischen Säure gefunden werden. Aus diesem Befund kann geschlossen werden, dass neben dem wichtigen Abbauweg zur phenolischen Säure noch andere Zerfallsmechanismen beim Abbauprozess eine Rolle spielen. Der verbleibende Rest kann entweder, als Chinoid vorliegend, mit SH-Gruppen-haltigen Molekülen reagieren und sich damit einem Nachweis entziehen oder zu bisher noch nicht identifizierten Metaboliten abgebaut werden. So können z.B. beim Erhitzen von Anthocyanen bei neutralen pH-Werten aus der Anhydrobase Cumarinderivate und verschiedene andere Produkte wie z.B. Phloroglucin-Aldehyd, 2,4-Dihydroxy- und 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure entstehen [32, 293, 294]. Phloroglucin wird inzwischen als Schlüsselverbindung der anaeroben Metabolisierung von Aromaten durch Bakterien angesehen und wird nach Ringöffnung weiter zu CO<sub>2</sub> und Acetyl-CoA abgebaut [295]. Die Resultate zum intestinalen Abbau von Anthocyan-Monoglucosiden konnten inzwischen auch von Aura et al. [296] bestätigt werden, die zwei weitere, nicht identifizierte Metabolite fanden. Auch Anthocyan-Diglucoside und acylierte Anthocyane werden durch intestinale Mikroorganismen abgebaut. Während Diglucoside dabei über das Intermediat des entsprechenden Monoglucosids ebenfalls innerhalb kurzer Zeit (4 h) zur phenolischen Säure metabolisiert werden, durchlaufen acylierte Anthocyane wie die Malon- und Ferulasäure-acylierten Pelargonidin-glucosid-sophorosid-Derivate

des Radieschens einen sukzessiven Abbau über die Abspaltung einzelner Säuren und ganzer Zuckerreste bis auch hier die phenolische Säure aus dem B-Ring entstanden war. Die abgespaltenen Hydroxyzimtsäuren können bei längerer Inkubation durch intestinale Bakterien zu Phenylpropionsäurederivaten umgesetzt werden, die dann im Körper im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation und der Glycinkonjugatbildung über die Zwischenstufe der Benzoesäure zur Hippursäure verstoffwechselt werden [253, 297].

Im Gegensatz zu den Anthocyanen erwiesen sich die untersuchten phenolischen Säuren in diesem Testsystem als sehr stabil; während VS und SS überhaupt keiner Metabolisierung unterlagen, konnte bei PCS nach 24-stündiger Inkubation ein leichter Abbau festgestellt werden, wobei mit den verwendeten Methoden keine strukturelle Metaboliten-Identifizierung möglich war. Diese Ergebnisse entsprechen Resultaten aus der Literatur unter Verwendung spezieller Bakterienstämme: So fanden z.B. Hsu et al. [298] bei Inkubation mit *Clostridium thermoaceticum* eine Metabolisierung der PCS, während SS nicht abgebaut wurde. Als Metabolite fanden sich die Decarboxylierungs- und Dehydroxylierungs-Produkte der PCS, Catechol und Phenol [298, 299]. Dacre & Williams [267] wiesen in ihren Untersuchungen die Umsetzung von PCS in Gegenwart von Rattenfäzes zu CO<sub>2</sub> und geringen Mengen *m*- und *p*-Hydroxybenzoesäure nach, wobei auch hier fast 90% der eingesetzten PCS unmetabolisiert blieben.

Neben diesem intestinalen Metabolismus durch Darmbakterien konnten *in vitro* weitere Metabolisierungsreaktionen der Anthocyane gezeigt werden. So unterliegt das Anthocyan Cyanidin mit seiner catecholischen Struktur im B-Ring sowohl in Form des Aglykons als auch als Monoglucosid einer Methylierung in Gegenwart von COMT/SAM, wobei die entsprechenden Peonidin-Derivate (Methylierung an der 3'-Position) gebildet wurden, die massenspektrometrisch und durch Cochromatographie identifiziert wurden. Bei Untersuchungen an Ratten konnten Ichiyanagi et al. [300] dagegen die Methylierung von Del3glc an der 4'-Position mittels NMR-Messungen nachweisen, was zu dem Schluss führt, dass Anthocyane mit einer Pyrrogallolstruktur anders verstoffwechselt werden als die mit einer Catecholstruktur. Dieses Prinzip konnte auch für Epicatechin/Epigallocatechin gezeigt werden [301, 302]. Im Gegensatz dazu finden die in der Pflanze selbst in späten Stadien der Biosynthese stattfindenden Methylierungsreaktionen stets an der 3'- oder 5'-Position statt [13].

Darüber hinaus sind Anthocyane Substrate der UDP-Glucuronyltransferasen und werden *in vitro* sowohl als Aglykone als auch in Form der Monoglucoside metabolisiert. Die Konjugation der Aglykone erfolgte dabei schneller als der parallel ablaufende Zerfall unter den neutralen Inkubationsbedingungen. Im Falle des Cy entstanden zwei monoglucuronidierte Produkte, wobei sich über die genaue Position der Glucuronid-Bindung aus den vorliegenden Daten keine Aussage treffen lässt. Bevorzugte Positionen der Glucuronidierung

anderer Flavonoide wie z.B. des Luteolins oder des Quercetins sind die 7-, 3-, 3'- oder die 4'-Position [303]. Bei der Glucuronidierung von Cy3glc entstanden sogar vier verschiedene Glucuronsäure-Konjugate, bei denen es sich um, mit den zur Verfügung stehenden massenspektrometrischen Analysen strukturell nicht näher charakterisierbare, gemischte Glucosid-Glucuronide handelte. Die unterschiedliche Anzahl an gebildeten glucuronidierten Produkten beim Aglykon und dem Monoglucosid lässt sich wahrscheinlich über die im Falle des Aglykons geringere, bis zum Zerfall zur Verfügung stehende Zeit erklären, die nur zur Bildung der dominierenden Konjugate führt. Da sowohl Aglykone als auch 3-*O*-Glucoside Substrate für Glucuronidierungs-Reaktionen darstellen, kann die Entstehung monoglucuronidierter Anthocyanidine im Körper entweder auf eine Glucuronidierung der Aglykone selbst nach vorangegangener glucosidischer Spaltung z.B. in der Leber oder im Darm erfolgen oder auf eine Glucuronidierung der Monoglucoside zum gemischten Glucosid-Glucuronid zurückgeführt werden, in deren Folge es dann zur Abspaltung des Glucose-Restes und der Entstehung des einfachen Monoglucuronids kommt.

Die Aufklärung der beteiligten Isoenzyme der Glucuronidierungen zeigte, dass diese im Falle des Cy v.a. von den UDP-Glucuronyltransferasen 1A9, 1A1, 1A4 und 1A7 geleistet werden, während beim Cy3glc v.a. die Isoenzyme 1A1, 1A10 und 1A8 beteiligt sind. Diese Isoenzyme sind auch an Glucuronidierungsreaktionen von komplexen Phenolen und Flavonen beteiligt [304] und im Körper für die Detoxifizierung endogener und exogener Substanzen verantwortlich. Viele phenolische Substanzen sind Substrate der UGT1A-Gruppe [305], wobei das endogene Hauptsubstrat von UGT1A1 der Gallenfarbstoff Bilirubin ist [306] und UGT1A10 u.a. Steroidhormone glucuronidiert [305]. UGT1A7, UGT1A9 und UGT1A10 glucuronidieren hauptsächlich endogene und exogene phenolische Verbindungen, aber auch Umweltkarzinogene wie z.B. Benzo[a]pyren-Metabolite [305, 306]. Von der UDP-Glucuronyltransferase sind bei Wirbeltieren etwa 50 Isoformen bekannt, von denen sich die meisten (z.B. UGT1A1 und 1A4) in der Leber befinden, aber auch im Darm Aktivität zeigen [304, 306, 307]. Einige Isoenzyme wie z.B. das UGT1A8, 1A7 oder 1A10 sind jedoch für den Gastrointestinaltrakt spezifisch [305–309]. Tabelle 4.13 fasst die Verteilung der verwendeten Isoenzyme in unterschiedlichen Geweben zusammen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen folglich, dass Glucuronidierungsreaktionen an Anthocyanen im Körper nicht nur in der Leber und Niere erfolgen, sondern v.a. im Fall des Cy3glc auch in Bereichen des Gastrointestinaltraktes stattfinden, was für andere Flavonoide bereits gezeigt werden konnte [310, 311] und Einfluss auf die Bioverfügbarkeit dieser Verbindungen hat.

**Tabelle 4.13:** Vorkommen der verwendeten Isoenzyme in unterschiedlichen Geweben (nach [304])

Isoenzym	Leber	Galle	Darm	Speiseröhre	Magen
1A1	+	+	+	–	+
1A3	+	+	+	–	+
1A4	+	+	+	–	–
1A6	+	+	+	–	+
1A7	–	?	?	+	+
1A8	–	?	+	+	–
1A9	+	–	+	+	–
1A10	–	+	+	+	+
2B7	+	?	?	+	?

#### 4.2.2 *in vivo*-Untersuchungen

Die *in vitro* erhaltenen Ergebnisse zum Metabolismus der Anthocyane konnten auch *in vivo* bestätigt werden. Hierzu wurden zunächst tierexperimentelle Studien durchgeführt, bei denen sowohl Anthocyane als auch die phenolischen Säuren PCS und VS oral verabreicht wurden. Auf diese Weise konnte die Verteilung und der Metabolismus der Anthocyane in zahlreichen biologischen Proben (Urin, Plasma, Fäzes und Organe) untersucht werden. Die Verabreichung der phenolischen Säuren diente der *in vivo*-Aufklärung der aus diesen Verbindung entstehenden Metabolite, über die in der Literatur nur wenige Daten verfügbar sind. Da Anthocyane z.B. durch intestinalen Metabolismus oder einfachen Zerfall der Aglykone in diese Verbindungen übergehen, sind die nachgewiesenen Metabolite dieser Substanzen auch potentielle Metabolite der Anthocyane.

Als Hauptmetabolite der PCS wurden ihre beiden Methylierungsprodukte, VS und 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure, sowie die Glucuronsäure- bzw. Sulfat-Konjugate dieser Verbindungen nachgewiesen. Dies entspricht Resultaten von Dacre & Williams [267], die allerdings nur ein Methylierungsprodukt, dafür geringe Mengen an *m*-Methoxybenzoesäure, *m*- und *p*-Hydroxybenzoesäure sowie Phenol und Catechol nachweisen konnten. VS und SS wurden dagegen – wie hier gezeigt – nur zu den entsprechenden Glucuronsäure- und Sulfat-Konjugaten umgesetzt, während sich in der Literatur für VS Hinweise auf eine Metabolisierung zum Guajacol und zum Catechol finden [266]. Im Falle der PCS und der VS gelang in unseren Untersuchungen zudem der Nachweis von Glycin-Addukten über den Vergleich mit dem Aminosäure-Konjugationssystem Benzoesäure/Hippursäure. Wie von Kasuya et al. beschrieben [312, 313] stellen *meta*- und *para*-substituierte Benzoesäuren Substrate der

Glycin-N-Acyltransferase dar, die v.a. in der Niere und der Leber lokalisiert ist. Das Auftreten entsprechender Konjugate im Tierversuch ist z.B. für VS in der Literatur beschrieben [266]. Alle drei phenolischen Säuren zeigten in unseren Versuchen bei vergleichsweise hohen Wiederfindungsraten im Urin von 18% (PCS), 29% (VS) und 32% (SS) eine sehr schnelle Resorption und Ausscheidung. Über 80% der ausgeschiedenen Metabolite waren bereits in den ersten 8 h nach Substanzzufuhr im Urin nachweisbar und bereits nach 24 h fanden sich keine Metabolite mehr im Plasma.

Wie in zahlreichen anderen tierexperimentellen Studien [217, 218, 234] und auch beim Menschen [220, 223, 224, 227–230, 232] nachgewiesen, zeigte sich auch hier sowohl bei Ratten als auch in der Humanstudie nach Verabreichung der Anthocyane als Reinsubstanzen eine schnelle Resorption und Ausscheidung mit den in der Literatur beschriebenen kurzen Halbwertszeiten [223, 226] bei einer sehr geringen Bioverfügbarkeit. Matrixfreie Anthocyane unterscheiden sich folglich in dieser Hinsicht nicht von den in der Literatur eingesetzten komplexen Lebensmittelmatrices. Dieses Ergebnis konnte auch von anderen Gruppen bestätigt werden. So fanden auch Matsumoto et al. [226] nach Isolierung der Rutinoside von Delphinidin und Cyanidin aus schwarzen Johannisbeeren mittels präoperativer HPLC nur 0,11% der eingesetzten Anthocyane im Urin wieder [314]. Die Absorption und Verteilung erfolgte in intakter Form als Glycosid. Diesen geringen Einfluss von Matrixbestandteilen auf die Bioverfügbarkeit zeigen auch Untersuchungen von Bub et al. [220] und Mulleder et al. [315], die keinen oder nur einen geringen Einfluss von Ethanol bzw. Kohlenhydraten auf die Resorptionsraten zeigen konnten.

Zusätzlich zu den in der Literatur beschriebenen nicht-metabolisierten Anthocyanen konnten im Fall des Cy3glc jedoch auch verschiedene neue Metabolite identifiziert werden. So fanden sich nach Aufnahme von Cy3glc sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen erstmals verschiedene Metabolite in Urin und Plasma. Von diesen Verbindungen konnten neben dem intakten Cy3glc und einem Monoglucuronid des Cy auch die Methylierungsprodukte des Cy in Form des Peo3glc und des Peo-monoglucuronids sowie das Aglykon Cy selbst identifiziert werden. Das Vorkommen des Aglykons im Urin kann eventuell über die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase in der Niere erklärt werden [316]. Bei drei weiteren, in geringeren Mengen auftretenden Metaboliten gelang die strukturelle Aufklärung nicht. Es könnte sich hierbei z.B. um die in der Literatur [316] für Pel beschriebenen Sulfokonjugate der Anthocyane oder um die *in vitro* nachgewiesenen gemischten Glucosid-Glucuronide handeln (vgl. 3.3.2.2). Darüberhinaus wurden auch erstmals die Abbauprodukte der beiden Anthocyane, die PCS und die VS, in freier und konjugierter Form nachgewiesen. Dieser Nachweis gelang insbesondere im Humanversuch, wohingegen die Ergebnisse der tierexperimentellen Studien keine eindeutigen Rückschlüsse v.a. im Fall des Malvins erlaubten und einer statistischen Absicherung

mit einer größeren Anzahl von Tieren bedürfen. Gleiches gilt auch für den Humanversuch, der im Rahmen dieser Arbeit als Pilotversuch konzipiert war und bei dem die signifikante Zunahme der phenolischen Säuren in Plasma und Urin noch in einem Versuch mit einer größeren Anzahl von Probanden bestätigt werden muss. Dies ist v.a. auch deshalb notwendig, da der Fremdstoffmetabolismus je nach Individuum aufgrund genetischer Anlagen und verschiedener Umweltfaktoren unterschiedlich sein kann [317].

Während das Auftreten von Methylierungsprodukten und Glucuronsäure-Konjugaten der Anthocyane auch von anderen Gruppen für den Urin bestätigt werden konnte [227] und die Methylierung von Del3glc im Tierversuch auch im Plasma nachgewiesen wurde [300], gelang es sonst bislang nur, Hinweise für eine Metabolisierung von Cy3glc zu PCS im Tierversuch zu erhalten [106, 219]. So fanden Tsuda et al. [219] nach oraler Cy3glc-Gabe an Ratten PCS in achtfach höherer Konzentration im Plasma als Cy3glc selbst. Diesem Nachweis entziehen sich insbesondere Untersuchungen nach Verabreichung von Lebensmittelextrakten, die oftmals wie z.B. der von Cacetta et al. [318] eingesetzte Rotwein, der Johannisbeersaft von Rechner et al. [229] oder der Pflaumenextrakt von Kayano et al. [273] schon PCS bzw. VS enthalten [319, 320] oder bei denen diese Substanzen auch als Metabolite anderer Inhaltsstoffe auftreten können. So ist z.B. die VS ein bekannter Metabolit der weit verbreiteten Kaffeesäure [321, 322]. Leider finden sich in der Literatur nur sehr wenige Daten über die Bioverfügbarkeit, das Vorkommen und die Gehalte dieser einfachen phenolischen Säuren in Lebensmitteln [323]. Um den Metabolismus im Detail aufzuklären, wurde daher in dieser Arbeit die Reinsubstanz verwendet. Dies war erst durch die Etablierung von Methoden zur Isolierung größerer Mengen reiner Substanzen (vgl. 6.2.1.2) möglich. Da PCS auch aus Cy durch Zerfall gebildet wird und auch in Urin und Plasma entsteht [219], kann die Bildung von PCS auf zwei verschiedene Wege zurückgeführt werden. Wie *in vitro* gezeigt, kann PCS zum einen durch das Einwirken intestinaler Mikroflora gebildet und dann von dort aus resorbiert werden. Zum anderen kann PCS auch nach Resorption von Cy und anschließendem Zerfall unter physiologischen Bedingungen entstanden sein.

Neben der Ausscheidung über den Harn zeigten die Untersuchungen an Ratten, dass auch die Exkretion der Anthocyane über die Fäzes eine wichtige Rolle spielt. So fanden sich bei Cy3glc-supplementierten Ratten 3% in Form des Glucosids selbst und als Aglykon wieder, beim Malvin waren es ca. 0,4%. Die in den Fäzesproben gefundenen Aglykone Cy und Mal würden sich bei gleicher Verstoffwechslung in dieser Form beim Menschen nicht finden, da nur Rattenfäzes durch seine Trockenheit einen Zerfall verhindert. Andere Metabolite wie z.B. die entsprechenden Peo-Derivate des Cy3glc wurden nicht gefunden, was zusammen mit der Tatsache der schnellen Exkretion die Vermutung nahe legt, dass dieser Teil der Anthocyane nicht resorbiert, sondern direkt der Ausscheidung zugeführt wird und nur noch

durch Darmbakterien eine enzymatische Spaltung erfährt. Die Untersuchung der Fäzescheidung im Humanversuch war aufgrund des ausbleibenden Stuhlganges infolge der rigiden Depletionsphase nicht möglich.

Abbildung 4.66 fasst des Metabolismus des Cy3glc so weit zusammen, wie er im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden konnte. Neuere Ergebnisse von Kay et al. [324] beschreiben eine zusätzliche Methylierung an der 4'-Position des Cy und des Cy3glc, wodurch zum einen ein Peonidin-Isomeres und zum anderen ein dimethyliertes Produkt entstand. Darüber hinaus konnte diese Gruppe auch Cytochrom P450-Enzym-katalysierte Hydroxylierungsreaktionen nachweisen, jedoch nur an den dimethylierten Produkten, während Cyanidin- und Peonidin-Derivate in Übereinstimmungen mit den hier vorgestellten *in vitro*-Untersuchungen keine Substrate dieser Enzymfamilie darstellten. Dieses Hydroxylierungsprodukt und das dimethylierte Cyanidin-Derivat konnten in unseren Studien weder *in vitro* noch *in vivo* nachgewiesen werden. In den Untersuchungen von Kay et al. wurden sehr hohe Dosen verabreicht (1,3 g). Die von uns verwendete physiologische Menge (ca. 200 mg) führt eventuell dazu, dass diese Metabolite unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

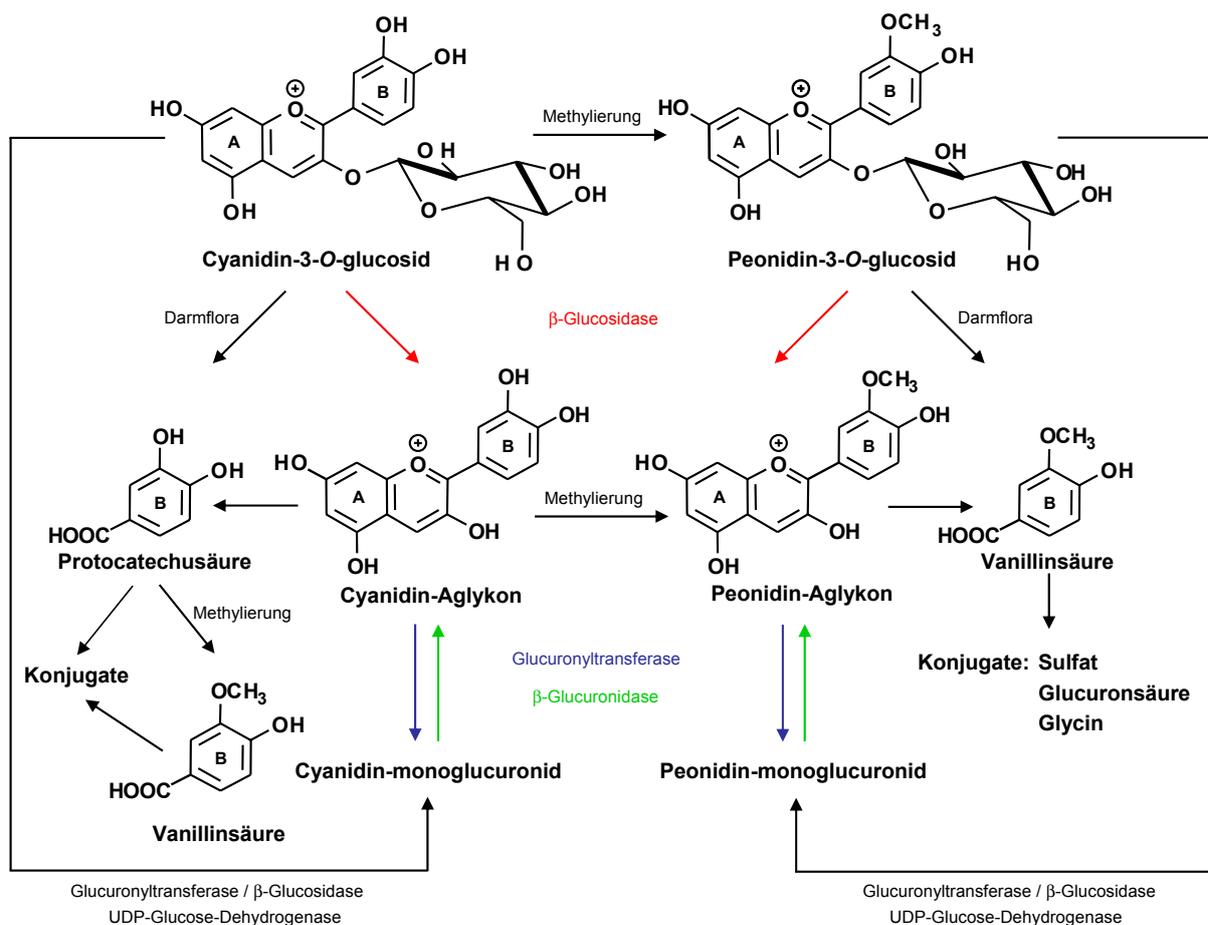


Abbildung 4.66: Metabolismus des Cyanidin-3-O-glucosids

Tabelle 4.14 gibt einen Überblick über die Wiederfindungsraten des verabreichten Cy3glc wieder und schließt dabei die Ergebnisse des Humanversuchs und der tierexperimentellen Studie mit Cy3glc-supplementierten Ratten ein.

**Tabelle 4.14:** Überblick über die Wiederfindungsraten des verabreichten Cyanidin-3-*O*-glucosids in den untersuchten Proben des Humanversuchs und des Tierversuchs

	Humanversuch				Tierversuch	
	Proband A		Proband B		mit Cy3glc	
	AC	PS	AC	PS	AC	PS
<b>Plasma</b>	2,32%	4,06%	1,62%	2,61%		
<b>Urin</b>	0,07%	0,14%	0,06%	0,11%	0,11%	Spuren
<b>Fäzes</b>					3,02%	

Macht man den sicherlich nicht ganz korrekten Schritt und addiert zur Abschätzung der dadurch bislang im Körper detektierten Menge des verabreichten Cy3glc die Mengen aus Urin und Plasma des Humanversuchs zu den Wiederfindungsmengen im Rattenfäzes, kann mit den hier verwendeten Methoden der Verbleib von ca. 8,5% des aufgenommenen Cy3glc erklärt werden.

#### 4.2.3 Zusammenfassende Erkenntnisse aus den *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen

Der potentielle Weg der Anthocyane im Körper nach oraler Aufnahme kann wie folgt postuliert werden: Die kurze Zeit zwischen der Aufnahme und dem Erscheinen der intakten Anthocyane im Plasma deutet auf eine (teilweise) Resorption des Anthocyan-Glucosids im Magen, eventuell schon über die Mundschleimhaut hin. Dafür sprechen auch Ergebnisse einer tierexperimentellen Studie an Ratten [325], bei denen ebenfalls bereits 6 min nach Supplementierung Anthocyane sowohl im Portalblut als auch systemisch nachweisbar waren. Trotz dieser Resultate wird die Magen-Resorption auch kontrovers diskutiert. Bei einer Studie von Murkovic et al. [225] fanden sich erst 2 h nach Aufnahme einer Mahlzeit mit Holunderbeerenextrakt Anthocyane im Plasma, was auf den hohen Fettgehalt der Mahlzeit und der damit verhinderten schnellen Magenpassage zurückgeführt wurde. Dagegen deuten Untersuchungen von Passamonti et al. [326] zur Interaktion der Anthocyane mit dem Anionentransporter Bilitranslocase, einem Membrancarrier in der Magenmucosa, auf eben diese Resorption über den Magen und den direkten Transport in das Pfortaderblut hin. Aufgrund ihrer sperrigen Struktur und ihrer Polarität bei den pH-Bedingungen des Magens sind solche

Carrier-vermittelten Resorptionsvorgänge anzunehmen und finden v.a. mit mono- und diglycosylierten Anthocyanen statt. Die Theorie der Aufnahme der Anthocyane aus dem Magen wird auch durch die Ergebnisse von Talavera et al. [327] gestützt, die in der Magenvene und -aorta von Ratten unmittelbar im Anschluss an die Fütterung Anthocyane in unmetabolisierter Form nachweisen konnten. Denkbar ist auch, dass es im sauren Milieu des Magens zu einer Spaltung der glycosidischen Bindung kommt. Das entstehende Aglykon wäre unter diesen Bedingungen zunächst stabil und könnte ebenfalls aufgenommen werden. Eine weitere Resorption erfolgt im Dünndarm, wie am Modell des isolierten Rattendünndarmes gezeigt werden konnte [221]. Die Aufnahme der Glucoside kann dabei, wie für Quercetin gezeigt [241, 244–246], über den Na<sup>+</sup>-abhängigen Glucosetransporter (SGLT1) erfolgen. Diese Theorie belegen auch Ergebnisse von Mulleder et al. [230], die bei gleichzeitiger Verabreichung von Saccharose eine langsamere und leicht geringere Resorption der Anthocyane fanden. Außerdem finden sich bei entsprechender Verabreichung auch Anthocyane mit komplexeren Zuckerresten wie etwa Cyanidin-3-*O*- $\beta$ -D-sambubiosid im Körper wieder [227], die im Körper nicht aus den Aglykonen gebildet werden können. Daneben finden im Dünndarm Spaltungsreaktionen durch dort anwesende hydrolysierende Enzyme statt, wie Untersuchungen an anderen Flavonoiden zeigen [328]. Das dadurch entstehende Aglykon liegt bei den pH-Bedingungen des Dünndarms als ungeladenes Chromenol oder in Form der chinoiden Anhydrobase vor und kann wiederum durch passive Diffusion aufgenommen werden, oder aber es zerfällt unter diesen Bedingungen, wodurch die entsprechende phenolische Säure entsteht, die ebenfalls resorbiert werden kann. Gelangen intakte Anthocyane bis in den Dickdarm, erfolgt eine anaerobe Metabolisierung durch die intestinale Mikroflora, in deren Verlauf phenolische Säuren gebildet werden, für die ebenfalls nur eine schlechte Bioverfügbarkeit zu erwarten ist. Alle ins Blut aufgenommenen Substanzen können nach Transport in Leber, Galle oder Niere unter Bildung konjugierter und methylierter Verbindungen weiter metabolisiert werden. Anthocyane können dabei über die Wechselwirkung mit der oben beschriebenen Bilitranslocase in die Leber aufgenommen werden, da dieser Membrancarrier auch in den sinusoidalen Domänen der Leber lokalisiert ist [326]. Der Transport erfolgt dabei sehr rasch, da in Untersuchungen mit Ratten von Talavera et al. [327] bereits 20 min nach Aufnahme Anthocyane in der Galle nachweisbar waren. Diese schnelle Verteilung in unterschiedliche Gewebe werden auch durch Ergebnisse von Lietti et al. [329] gestützt, in denen nach intraperitonealer und intravenöser Verabreichung eines Heidelbeerextraktes an Ratten bereits nach einer Stunde v.a. in der Niere aber auch der Leber, der Haut, dem Herzen und der Lunge Anthocyane detektiert wurden. Die Methylierung erfolgt dabei wohl überwiegend in der Leber durch die dort lokalisierte COMT. Dagegen zeigen die Ergebnisse mit rekombinanten Glucuronyltransferasen, dass die Glucuronidierungsreaktionen nicht zwangsläufig in der Leber, sondern auch in Bereichen des Gastrointestinaltraktes stattfinden können. Wie für andere Flavonoide

bereits gezeigt [328], kann es in der Leber auch durch  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität zu einer Spaltung der glycosidischen Bindung und anschließender weiterer Verstoffwechslung kommen. Da auch Monoglucoside Substrate der Glucuronyltransferasen sind (vgl. 3.3.2.2), wäre somit auch eine Glucuronidierung dieser Monoglucoside zum gemischten Glucosid-Glucuronid und eine folgende Spaltung der glycosidischen Bindung zum monoglucuronidierten Konjugat in der Leber denkbar. Des Weiteren könnten die 3-*O*-Glucoside der Anthocyane auch Substrate der UDP-Glucose-Dehydrogenase sein, die UDP-Glucose in UDP-Glucuronsäure umwandelt und ebenfalls sowohl in der Leber als auch dem Dünndarm vorkommt [227]. Dagegen ist die Zirkulation zwischen Darm und Leber durch wiederholte Glucuronsäure-Konjugation und bakterielle Spaltung dieser Bindung (enterohepatischer Kreislauf) aufgrund der schnellen Ausscheidung der Anthocyane als unwahrscheinlich anzusehen.

#### 4.2.4 Weiterer Forschungsbedarf

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung des Metabolismus und der Bioverfügbarkeit von Cy3glc geleistet und der Verbleib von ca. 8,5% der ursprünglich aufgenommenen Anthocyan-Menge geklärt werden. Dennoch bleibt die Frage nach dem Verbleib der restlichen 91,5%. Eine mögliche Erklärung liegt in der starken Reaktivität von Chinonen. In eben dieser Form liegen die Anthocyane bei physiologischen pH-Bedingungen vor (vgl. Abb. 1.5). Chinone können mit vielen Stoffgruppen, darunter auch die im Körper ubiquitär vorkommenden Kohlenhydrate und Proteine reagieren. Dabei kommt es zur Ausbildung einer irreversiblen, kovalenten Bindung, so dass ein neues Molekül entsteht, das sich dem Nachweis mit den verwendeten analytischen Methoden entzieht. Die Beeinflussung der Absorption im Körper durch Bindung an Proteine in der Nahrung konnte für Flavan-3-ole aus Tee, der mit und ohne Milch getrunken wurde, bereits nachgewiesen werden [330]. Für Quercetin konnte zudem *in vitro* eine 99%ige Absorption an menschliches Serumalbumin gezeigt werden [277]. Zudem können Chinone auch mit sich selbst und anderen Polyphenolen zu Kondensationsprodukten reagieren wie in dieser Arbeit im *in vitro*-Modell gezeigt werden konnte (vgl. 3.2.1). Und schließlich bedingen, wie von Lapidot et al. [66] vermutet, antioxidative Aktivitäten strukturelle Veränderung, die ebenfalls mit den verwendeten Methoden analytisch nicht erfasst wurden. So zeigt sich z.B. in *in vitro*-Untersuchungen eine bleichende Wirkung bei der Reaktion von Anthocyanen mit Superoxidradikalanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ) [71]. Ziel weiterer Arbeiten muss folglich die *in vitro*-Aufklärung dieser Reaktionsprodukte und der mögliche Nachweis *in vivo* sein.

Wie für Quercetin bereits gezeigt [331], ist es auch denkbar, dass Anthocyane im Körper z.T. vollständig zu  $CO_2$  verstoffwechselt werden. Beim Quercetin wurden 23–81% der oral aufgenommenen Menge in der Atemluft nachgewiesen [288]. Dieser Stoffwechselweg ist auch

für Anthocyane denkbar und könnte nach glycosidischer Spaltung über die Zwischenstufe der Aglykone und der weiteren Verstoffwechslung der beim Zerfall entstehenden Phenolsäuren erfolgen und wäre nur durch den Einsatz radioaktiv markierter Ausgangsverbindungen in Tierversuchen nachzuweisen. An der Synthese gelabelter, C<sup>13</sup>- oder C<sup>14</sup>-markierter Verbindungen wird derzeit geforscht [332]. Die Verwendung radioaktiv markierter Anthocyane könnte auch bei der Aufklärung des Schicksals des beim Zerfalls aus dem A-Ring der Anthocyane entstehenden Aldehyds (Abb. 1.6) behilflich sein. Auch hier ergeben sich bislang noch keine Erkenntnisse aus den Verzehrsstudien und es kann lediglich über eine Weiterreaktion dieser reaktiven Substanz mit Molekülen des Körpers spekuliert werden.

Die Aufklärung des Metabolismus und der Bioverfügbarkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit v.a. anhand des Cy3glc vorangetrieben. Verschiedene Studien belegen jedoch eine unterschiedliche Bioverfügbarkeit verschiedener Anthocyanidin-Glucoside auf niedrigem Niveau und deuten damit auf den Einfluss des Aglykons auf die Resorption hin [233, 234, 333]. Untersuchungen an diesen Anthocyanen mit den entsprechenden Reinsubstanzen stehen noch aus. Auch der Zuckerrest hat einen Einfluss auf die Resorptionsrate im Körper [227, 333], wengleich sich die Rutinoside des Cy und des Del in Untersuchungen von Matsumoto et al. [226] nicht so stark vom Verhalten der meist untersuchten 3-Glucoside unterschieden, wie das für andere Flavonoide (Rutin, Naringin) in der Literatur beschrieben ist [238, 334]. Cyanidin-3-rutinosid und Delphinidin-3-rutinosid zeigten lediglich ein etwas späteres Konzentrationsmaximum im Urin sowie eine etwas langsamere Konzentrationsabnahme im Plasma und damit eine etwas längere Halbwertszeit als die entsprechenden Glucoside.

Genauere Untersuchungen zu den molekularen Resorptionsmechanismen der Anthocyane wie z.B. der Beteiligung des Natrium-Glucose-Cotransporters (SGLT1) stehen ebenfalls noch aus. Hierzu gibt es nur wenige Untersuchungen wie z.B. die Resultate zur Interaktion der Anthocyane mit dem Membrancarrier der Magenmucosa, Bilitranslocase [326]. Ergebnisse von Youdim et al. [161] zeigten zudem, dass Anthocyane durch Endothelzellen in intakter Form aufgenommen werden und sich anschließend im Cytosol und v.a. der Plasmamembran finden, wo sie zum Schutz vor oxidativem Stress beitragen. Die Einlagerung in solche Zellkompartimente stellt auch eine weitere Möglichkeit des Verbleibs der Anthocyane dar. Ein anderes Modell zur Aufklärung der Transportwege ist der isoliert perfundierte Rattendünndarm, mit dessen Hilfe die Aufnahme aus diesem Verdauungsabschnitt untersucht werden kann [310] und in einer Arbeit von Andlauer et al. [221] auch für Anthocyane gezeigt wurde. Auch Rutin wird in diesem Modell aus dem Dünndarm intakt, teilweise auch als Glucuronid- oder Sulfatkonjugat resorbiert [335].

## 4.3 Biologische Wirkung

### 4.3.1 Antioxidative Eigenschaften

Zur Untersuchung der antioxidativen Wirkung von Substanzen sind in der Literatur zahlreiche Testsysteme beschrieben, die aufgrund unterschiedlicher mechanistischer Funktionsweisen nur schwer miteinander vergleichbar sind [336]. Daher lassen sich sinnvolle Aussagen über antioxidative Kapazitäten von Substanzen erst nach Verwendung und Vergleich verschiedener Testsysteme machen. Obwohl die Daten zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen in der Literatur zahlreich sind (1.6.1), herrscht ein Mangel an vergleichenden Studien zur Wirkung der Aglykone, Monoglucoside und der im Laufe des Abbaus und Metabolismus gebildeten phenolischen Säuren. Neben der Gegenüberstellung des antioxidativen Potentials dieser Verbindungen in verschiedenen Testsystemen war das Ziel der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen auch die Abklärung eines möglichen synergistischen Effekts der Anthocyane mit ihren Metaboliten wie er z.B. für das Zusammenwirken von Ascorbinsäure und  $\alpha$ -Tocopherol [337–339] oder Kaffeesäure bzw. Ferulasäure, Ascorbinsäure und  $\alpha$ -Tocopherol [340, 341] beschrieben ist.

#### 4.3.1.1 Gegenüberstellung der eingesetzten Testsysteme

In allen eingesetzten Testsystemen besitzen die Anthocyane ein vergleichsweise starkes antioxidatives Potential, das mit Ausnahme des FRAP-Assays und dabei v.a. im Fall der PCS wesentlich größer ist als das der getesteten Phenolsäuren. Zudem unterscheiden sich die Anthocyane häufig in ihrem Reaktionsverhalten und damit in der Reaktionskinetik von anderen Substanzen und wirken häufig erst verzögert (vgl. Abb. 3.57). Aufgrund verschiedener Messprinzipien, Endpunkte und Quantifizierungssysteme liefern die verwendeten Testsysteme unterschiedliche Absolutmengen und unterschiedliche Reihungen (vgl. Tab. 3.12). Am aussagekräftigsten scheint der ORAC-Assay zu sein, der durch Auswertung über die AUC neben dem Inhibierungsgrad auch die Kinetik berücksichtigt. Zudem besitzt das verwendete Peroxylradikal physiologische Bedeutung, während z.B. das im TEAC-Assay generierte Radikal synthetisch ist. Im FRAP-Assay manifestiert sich die antioxidative Wirkung der Anthocyane aufgrund ihrer reduktiven Kapazität und ihres Eisen-chelatisierenden und Radikal-fangenden Potentials [87]. Die antioxidative Wirkung ist außerdem z.B. über die chelatisierende Wirkung auch vom pH-Wert abhängig [92], was den Vergleich unterschiedlicher Testsysteme zusätzlich erschwert. Die durchgeführten und zusätzlich in der Literatur beschriebenen Tests zur antioxidativen Wirkung der Anthocyane werden bei den unterschiedlichsten pH-Werten durchgeführt (7,4 bzw. 7,0 im ORAC-, 3,6 im FRAP-Assay), und selbst in neutralem Milieu

zeigen Anthocyane eine Wirkung, was darauf hindeutet, dass sie unabhängig von der vorliegenden Struktur wirken und von diesem Gesichtspunkt aus auch im Körper eine Relevanz haben könnten [29, 100].

#### 4.3.1.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

##### Anthocyane

Eine Struktur-Wirkungs-Beziehung ist in der Literatur für die antioxidative Wirkung bereits beschrieben. Allgemein ist der ungesättigte Charakter der Verbindung wichtig, der eine Elektronenwanderung erlaubt. So ist z.B. Catechin, praktisch ein Cyanidin mit hydriertem C-Ring, nur etwa halb so wirksam wie dieses [107], während die Unterschiede im antioxidativen Potential zwischen Flavonen und Anthocyanen nach Untersuchungen von Rice-Evans et al. [270] nur sehr gering sind. Eine Rangfolge der Anthocyane untereinander kann allerdings höchstens innerhalb einer bestimmten Versuchsanordnung erstellt werden; allgemeingültige Aussagen sind dagegen schwer zu treffen. So korreliert meist die zunehmende Anzahl der Hydroxylgruppen im B-Ring mit einem steigenden antioxidativen Potential, wobei v.a. die *ortho*-ständige Hydroxylierung der Positionen 3' und 4' (*o*-Diphenylsubstitution) wichtig zu sein scheint [68, 72, 270, 342–344], während die Rolle der Hydroxylierung an der 5'-Position umstritten ist [68]. Dagegen vermindert eine *O*-Methylierung der Hydroxylsubstituenten die antioxidative Kapazität [342]. Dies konnte auch in den hier durchgeführten TEAC- und FRAP-Assay bestätigt werden, wohingegen sich im ORAC-Assay keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Anthocyanen zeigten. Beim Abfangen von Superoxidradikalanionen *in vitro* steigt die Effektivität in der Reihe Pel, Cy, Del an [72, 104] und konnte in zellulären Systemen zu der Reihenfolge Del > Cy, Pet > Pel, Peo, Mal bestimmt werden [167]. Eine Erklärung für die Bedeutung der Hydroxylgruppen hinsichtlich ihrer Wirkung liefert ein Vergleich mit Pyrogallol. Pyrogallol-Konfigurationen bei Flavonoiden sind wichtig für die Wirkung, wie z.B. das Flavon Myricetin zeigt [342]. Wie schwierig jedoch die Interpretation der Ergebnisse ist, zeigen Untersuchungen von Satué-Gracia et al. [92], die bei Kupfer-induzierter LDL-Oxidation für eine Kupfer-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die Reihung Mal > Del > Cy > Pel, bei 80  $\mu\text{M}$  Kupfer dagegen Del > Cy > Mal > Pel fanden.

Auch der Einfluss einer Glycosylierung an der C-3-Position ist von mehreren Faktoren abhängig und nicht einheitlich, wie die Ergebnisse der hier durchgeführten Tests zeigen (Tab. 3.12). Dies steht im Einklang mit Daten aus der Literatur, in der das verwendete Testsystem starken Einfluss nimmt [29]. So fanden Wang et al. [68] im ORAC-Assay für Cy eine Steigerung der antioxidativen Kapazität durch Glycosylierung und für Mal eine Abnahme, während für Pel kein Effekt festgestellt werden konnte. Rice-Evans et al. [270] zeigten dagegen im TEAC-Assay einen allgemein schwächenden Effekt durch Glycosylierungen, was von Tsuda

et al. [91] für die Lipidperoxidation und von Bianchi et al. [102] für oxidative Schäden in Zellkultursystemen bestätigt werden konnte. In anderen Testsystemen konnten dagegen weder Tsuda et al. [72] noch Pool-Zobel et al. [87] einen Einfluss der Glycosylierung feststellen. Darüber hinaus ist auch die Art des Zuckers wichtig [270]; so kann bei Cy die Glycosylierung mit Glucose die Antioxidativität steigern, während eine Bindung an Galaktose zu einer Abnahme führt [68].

Acylierte Anthocyane zeigen schließlich aufgrund synergistischer Effekte der kovalent gebundenen Säuren eine stärkere antioxidative Wirkung als die Aglykone oder die Glycoside [259, 345, 346].

#### Phenolische Säuren

Auch bei den phenolischen Säuren hängt die antioxidative Aktivität von der Anzahl der Hydroxylgruppen im Molekül ab und auch hier ist die *ortho*-ständige Hydroxylierung von großer Bedeutung [347], während die *O*-Methylierung der Hydroxylsubstituenten eine Verminderung der Wirkung bedingt [270, 318]. Dies zeigte sich v.a. im FRAP-Assay, in dem die VS im Gegensatz zur PCS kaum antioxidative Wirkung zeigte. Allgemein lässt sich jedoch sagen, dass die elektronen-ziehende Wirkung der Carboxylgruppe einen negativen Einfluss auf die Fähigkeit zum Transfer von Wasserstoffatomen auf freie Radikale besitzt und die Antioxidativität daher niedriger ist als bei den Anthocyanen selbst [270].

#### Beurteilung der antioxidativen Aktivität vor dem Hintergrund des Anthocyan-Metabolismus

Diese Erkenntnisse zur Veränderung der antioxidativen Wirkung in Abhängigkeit von den strukturellen Voraussetzungen der Substanzen müssen vor dem Hintergrund der metabolischen Umwandlung der Moleküle betrachtet werden. So nimmt die biologische Wirkung des Cy3glc durch die Methylierung zum Peo3glc zumindest im Hinblick auf die Antioxidativität tendenziell eher ab (vgl. Ergebnisse aus dem FRAP-Assay, 3.5.2). Auch besitzen die im Rahmen des Metabolismus und Abbaus gebildeten phenolischen Säuren, PCS und VS, geringeres antioxidatives Potential als die originären Anthocyane. Der Einfluss der Glucuronidierung lässt sich dagegen nur schwer abschätzen. Untersuchungen von Day et al. [307] über die inhibierende Wirkung des Quercetins und seiner Glucuronide auf die Xanthin-Oxidase führen zu der Schlussfolgerung, dass die Position der Glucuronsäure-Konjugation am Quercetin-Molekül entscheidender für die Wirkung ist als die Tatsache der Glucuronidierung selbst. Betrachtet man die beschriebene Bedeutung der *ortho*-Dihydroxyphenyl-Struktur im B-Ring der Anthocyane, lässt sich leicht abschätzen, dass Hydroxylierungen in den Positionen 3' und 4' großen Einfluss auf die biologische Wirkung der Substanzen haben

können [303]. Leider lässt sich zu der Position der Glucuronidierung in den gefundenen Konjugaten mit den verwendeten Methoden keine Aussage machen und bleibt damit Gegenstand weiterer Forschungen. Für Sulfatierungsreaktionen konnte für verschiedene Isoflavone zudem ein allgemein senkender Effekt auf die antioxidative Wirkung gezeigt werden [348, 349]. Zu diskutieren bleibt in diesem Zusammenhang ferner die Frage des Einflusses der Konjugation und der dadurch bedingten Erhöhung der Polarität auf die zelluläre Aufnahme dieser Substanzen.

Da die gebildeten phenolischen Säuren, PCS und VS, z.B. über die Hemmung der Phenolsulfotransferase [269] Einfluss auf die metabolischen Veränderungen und damit auch auf die Änderung der Antioxidativität nehmen, wird schnell deutlich, wie komplex die Zusammenhänge werden. Alles in allem ist eine abschließende Einschätzung der tatsächlichen biologischen Wirkung der Substanzen kaum aus theoretischen Überlegungen ableitbar, sondern ergibt sich nur durch *in vivo*-Studien mit verschiedenen Testsystemen.

Solche *in vivo*-Arbeiten finden sich in der Literatur (vgl. 1.6.1), wobei meist unzureichend charakterisierte Lebensmittelextrakte eingesetzt wurden, so dass die gefundenen Zunahmen an antioxidativer Kapazität im Plasma nicht zwangsläufig auf Anthocyan-Metabolite zurückgehen, sondern auch auf andere Inhaltsstoffe der Extrakte und deren Metabolite zurückgeführt werden könnten. So konnten Rechner et al. [229] nach der Aufnahme von Johannisbeersaft aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit der Anthocyane wesentlich höhere Plasmakonzentrationen an anderen Polyphenolen (z.B. VS, FS oder Quercetin) finden, obgleich die Anthocyane fast 86% der Gesamtpolyphenole im Saft ausmachten. Unter Berücksichtigung der identifizierten Metabolite im nachgewiesenen Konzentrationsbereich konnten im Rahmen dieser Arbeit in Modelllösungen bei Anwendung der beschriebenen Testsysteme keine Belege für eine Erhöhung der antioxidativen Wirkung in rekonstruiertem Plasma gefunden werden. Anthocyane als solche und bedingt auch ihre Metabolite und Abbauprodukte besitzen – auch verglichen mit gängigen natürlichen Antioxidantien – ein sehr großes antioxidatives Potential. Dieses können sie jedoch aufgrund ihrer geringen Bioverfügbarkeit nicht ausschöpfen.

Eine abschließende Klärung des Beitrags der Anthocyane zur Erhöhung der antioxidativen Kapazität im Plasma kann nur über eine großangelegte Studie mit hoher Probandenzahl realisiert werden, die – nach rigider Depletionsphase – Anthocyane in Reinform aufnehmen. Dazu ist die Isolierung großer Mengen reiner Anthocyane nötig.

Wie wichtig allgemein die metabolische Aufklärung der Anthocyane ist, wird anhand der Tatsache deutlich, dass die Wirkung dieser Verbindungen in vielerlei Hinsicht von ihrem strukturellen Aufbau abhängt. So konnten Hou et al. [167] erst vor kurzem zeigen, dass bestimmte Anthocyanidine (darunter Cy) inhibitorische Effekte auf die Kanzerogenese besitzen,

während andere Anthocyanidine (darunter das Cyanidin-Methylierungsprodukt, Peo) diese Wirkung nicht mehr zeigen, was auf die Anordnung der Hydroxylsubstituenten am B-Ring zurückgeführt wird (vgl. 1.6.3).

### 4.3.1.3 Synergismusuntersuchungen

Da in der Literatur verschiedene synergistische Effekte beim Zusammenwirken antioxidativ wirksamer Substanzen beschrieben sind (z.B. zwischen Vitamin E und Ascorbinsäure [350]) und es auch Hinweise gibt, dass dieser Effekt auch bei Anthocyanen auftritt [351], erfolgten Untersuchungen an Anthocyanen und ihren Metaboliten in Kombinationsinkubationen. Es zeigte sich jedoch, dass – im Gegensatz zu Resultaten von Rossetto et al. [352] über das synergistische Zusammenwirken von Mal3glc mit (+)-Catechin und (–)-Epicatechin durch regenerierende Prozesse – bei den hier durchgeführten Untersuchungen keine signifikanten Ergebnisse zu erhalten waren. Ein Synergismus zwischen Cy3glc und den Abbau- und Metabolisierungsprodukten PCS und VS kann daher ausgeschlossen werden. Denkbar wäre dagegen noch ein synergistischer Effekt mit anderen, endogenen Antioxidantien ( $\alpha$ -Tocopherol oder Ascorbinsäure), wie er für Kaffeesäure [340], Ferulasäure [341] und verschiedene Isoflavone [353] beschrieben ist. Hinweise dafür gibt es bereits in der Literatur. So konnten Abuja et al. [148] zeigen, dass Anthocyane  $\alpha$ -Tocopheroxylradikale zum  $\alpha$ -Tocopherol reduzieren können, und auch in einer Studie von Heinonen et al. [147] zur antioxidativen Wirkung von Beeren- und Fruchtweinen konnten die Effekte nicht einfach über die Summe der Einzelsubstanzen erklärt und mussten auf synergistische Wechselwirkungen zurückgeführt werden. Zudem erhöhte sich die Tocopherol-Konzentration in der Leber und Lunge von Ratten, denen mit der normalen Nahrung zusätzlich Anthocyane verabreicht wurden [354]; Sarma et al. [355] konnten einen Schutz der Ascorbinsäure vor Oxidation durch Metallionen in Gegenwart von Anthocyanen nachweisen, der auf die Chelatisierung der Ionen und die Bildung von Copigmenten zurückgeführt wurde.

### 4.3.2 Beurteilung der biologischen Wirkung und gesundheitsprotektiven Relevanz einer anthocyanreichen Ernährung

Die unter 1.6 beschriebenen, biologischen Effekte sind kritisch zu betrachten: Häufig wurden mit den Anthocyanidinen die instabilen Aglykone eingesetzt, die – wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte – einem sehr schnellen Zerfall oder einer Dimerisierung unterliegen. Viele Effekte der Anthocyane wie z.B. die Hemmung der Cyclooxygenase (vgl. [152]) konnten jedoch nur für die Aglykone, nicht aber für die Glucoside gezeigt werden. In allen Überlegungen zur Beurteilung der Wirkung müssen daher die Folgeprodukte berücksichtigt werden.

Darüber hinaus zeigen auch die anderen, entstehenden Metabolite und Abbauprodukte biologische Wirkungen [292]. So sind z.B. für die entstehenden phenolischen Säuren zahlreiche gesundheitsprotektive Effekte beschrieben. Neben der hier gezeigten antioxidativen Wirkung von PCS, VS und SS (vgl. 3.5), die auch in Untersuchungen an anderen Testsystemen bestätigt werden konnte [356–360] und z.B. zum Schutz der LDL [361] und der DNA [356] vor oxidativen Schäden beiträgt, wirkt z.B. PCS durch die Inhibition der NO-Bildung entzündungshemmend [359, 362] und zeigt in Zellkultursystemen [363] und in zahlreichen Tierversuchen eine antikanzerogene Wirkung. So inhibiert sie z.B. verschieden induzierte Karzinogenesen in der Leber [364], im Darm [365, 366], in der Blase [367], in der Bauchspeicheldrüse [368], in der Haut [369] und im Mund- und Rachenraum [370–372] durch die Hemmung der Zellproliferation [373] oder die Induktion der Apoptose [363]. Auch SS bzw. VS können über ihre antikanzerogenen [374, 375] bzw. immunstimulierenden [376] Eigenschaften die Gesundheit positiv beeinflussen. Für andere, im Rahmen des intestinalen Metabolismus von Flavonoiden gebildete Phenolsäuren (Phenyllessigsäuren) ist z.B. für die Blutplättchenaggregationshemmung eine Steigerung verglichen mit den Ausgangsverbindungen beschrieben [292].

Ebenso müssen die jeweiligen Konzentrationen der Substanzen berücksichtigt werden. In fast allen in der Literatur beschriebenen Versuchen zur Wirkung (vgl. 1.6) werden die Anthocyane in unphysiologisch hohen Konzentrationen eingesetzt. So liegen z.B. die von Meiers et al. [178] eingesetzten Konzentrationen zur Hemmung des Epidermal Growth-factor Receptors (EGFR) (vgl. 1.6.3) im mikromolaren Bereich, in anderen Untersuchungen sogar im Bereich von bis zu 2 mM und damit weit über dem im Plasma erreichten Level. In tierexperimentellen Studien konnten auch nur nach Verabreichung sehr hoher Dosen Wirkungen beobachtet werden [104]. Vielleicht ist die Dosis der entscheidende Faktor für die gesundheitsprotektiven Wirkungen der Anthocyane *in vivo*, die über die alimentäre Aufnahme selbst durch Supplementierung nicht erreicht werden kann. Durch die Verteilung der Anthocyane nach Aufnahme in metabolisierende Gewebe wie Leber und Niere könnte allerdings dort die Konzentration zumindest kurzfristig erhöht sein, so dass protektive Effekte vorstellbar wären. Zudem werden sicherlich im oberen Magen-Darm-Trakt (v.a. in den Epithelzellen dieses Organsystems) [377] nach Aufnahme größerer Mengen an Anthocyanen höhere Konzentrationen erreicht, die die beschriebenen positiven Effekte leisten könnten. Und schließlich ist eine Anreicherung in bestimmten Zellkompartimenten denkbar, wie es *in vitro* für das Cytosol und die Plasmamembran von Endothelzellen gezeigt wurde [161]. Dagegen reichen die im Plasma gefundenen Konzentrationen wohl nicht für physiologische Effekte aus, auch wenn die Wirkung der Anthocyane in *in vitro*-Testsystemen höher als die endogener Antioxidantien wie Tocopherol oder Ascorbat ist, deren Plasmakonzentrationen

aber um 3–5 Größeneinheiten höher liegen [234]. So wird schon die, verglichen mit anderen natürlich vorkommenden Antioxidantien sehr niedrig liegende wirksame Konzentration zur Inhibition der LDL-Oxidation von 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  [148] *in vivo* nicht einmal durch Supplementierung erreicht. In der hier durchgeführten Humanstudie konnten durch Aufnahme der ernährungsrelevanten Menge von ca. 200 mg Cy3glc maximale Plasmakonzentrationen von 25 nM (0,011  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für die Anthocyane und 13 nM (0,002  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) bzw. 31 nM (0,005  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für die Phenolsäure-Metabolite erreicht werden.

Eine Anreicherung der Anthocyane im Plasma nach wiederholter Aufnahme findet ebenfalls nicht statt, wie in einem Tierversuch mit Ratten nachgewiesen werden konnte [234]. Es zeigte sich, dass selbst nach achttägiger Anthocyan-Supplementierung die Konzentrations-Kinetik im Plasma und Urin nur von der letzten Anthocyan-Aufnahme abhängig war. Damit kann auch ein protektiver Effekt, der auf eine höhere Plasmakonzentration aufgrund regelmäßiger Anthocyan-Aufnahme zurückgeführt wird, ausgeschlossen werden. Diese Effekte sind höchstens für den oberer Gastrointestinaltrakt zu diskutieren.

Ferner ist zu beachten, dass auch für Anthocyane – wie schon zuvor für andere Polyphenole wie Catechol oder Quercetin gezeigt [378–380] – je nach getesteten Systemen und eingesetzten Konzentrationen in der Literatur prooxidative Effekte beschrieben sind [92, 148, 172]. Allerdings werden diese Konzentrationen *in vivo* ebenfalls kaum erreicht.

Ohne Zweifel besitzen Anthocyane und ihre Metabolite zahlreiche gesundheitsfördernde Eigenschaften, wobei das antioxidative Potential im Vordergrund steht. Ob die im Körper erreichten Konzentrationen jedoch für eine systemische Wirkung ausreichen, muss bezweifelt werden. Welche Substanzen wirklich für die Effekte aus epidemiologischen Studien verantwortlich sind, oder ob die Wirkung nur durch ein Zusammenspiel vieler Komponenten zustande kommt, ist letztendlich schwer zu beantworten. So kann bis heute das Französische Paradoxon nicht auf die Wirkung einer einzelnen Substanz oder einer Substanzgruppe zurückgeführt werden, und wird vielmehr auf das Zusammenwirken von verschiedenen phenolischen Komponenten und dem Alkohol des Rotweines zurückgeführt. Zwar konnten viele biologische Wirkungen auch für Anthocyane gezeigt werden (vgl. 1.6), doch bleibt bei der geringen Bioverfügbarkeit die Frage nach der Relevanz *in vivo*. Die Wirkungen im Tiermodell oder beim Menschen nach Gabe von Lebensmittelextrakten sind nur schwer monokausal zu deuten. So zeigen Anthocyane protektive Effekte (vgl. 1.6.2) und könnten so zum Schutz vor kardiovaskulären Krankheiten beitragen. Diese Wirkung wird jedoch auch von anderen phenolischen Komponenten wie dem Resveratrol, einem bekannten Inhaltsstoff des Rotweins, geleistet [381]. Die beschriebene antimutagene Wirkung von Anthocyanen (1.6.3) ist ebenfalls eine Eigenschaft, die auch ubiquitär in Lebensmitteln vorkommende organische Säuren wie Kaffee-, Ferula- oder *p*-Hydroxybenzoesäure besitzen [174]. Zudem korreliert die Aufnahme

von Anthocyanen und anderer Flavonoide über eine Obst- und Gemüse-reiche Ernährung mit dem Konsum anderer Substanzen, die möglicherweise auch Einfluss auf die untersuchten Krankheitsbilder nehmen wie z.B. Ascorbinsäure,  $\beta$ -Carotin oder Ballaststoffe [382].

Viele dieser gesundheitsprotektiv wirkenden Verbindungen und zahlreiche weitere Substanzen kommen als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe ausschließlich in pflanzlichen Produkten vor, so dass sich die Empfehlung einer gesundheitsbewussten Ernährung sicherlich nicht auf die Zufuhr einzelner Komponenten in Form von Supplementen beschränken darf, sondern aus einer ausgewogenen Ernährung mit viel Obst und Gemüse, bestehen sollte.

---

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den zu den Flavonoiden gehörenden Anthocyanen, wobei der Schwerpunkt auf dem Cyanidin-3-*O*-glucosid (Cy3glc) liegt. Anthocyane sind weit verbreitete Bestandteile pflanzlicher Nahrung und werden als gesundheitsfördernde, kardioprotektive und krebspräventive Verbindungen diskutiert. Ziel dieser Arbeit war die Beurteilung und Abschätzung der biologischen Relevanz anthocyanreicher Lebensmittel hinsichtlich einer gesundheitsfördernden Ernährung. Hierzu wurde zunächst der Metabolismus und die Bioverfügbarkeit *in vitro* und *in vivo* untersucht. Diese Untersuchungen lieferten die Grundlage für Experimente zur Ermittlung der antioxidativen Wirkung von Anthocyanen und ihrer Metabolite.

### I. Optimierung der analytischen Methoden

Zunächst war die Entwicklung geeigneter analytischer Methoden notwendig, die den Nachweis und die Identifizierung der Anthocyane sowie aller potentiellen Metabolite und Abbauprodukte erlaubte. Hierzu wurde eine Festphasenextraktion etabliert, die im Unterschied zu der in der Literatur beschriebenen Methoden sowohl Anthocyane als auch Phenolsäuren bei hohen Wiederfindungsraten berücksichtigt. Darüber hinaus wurde durch die Etablierung einer LC/DAD und einer LC/MS-Methode die strukturelle Aufklärung der Anthocyane und ihrer Metabolite, durch die entwickelte GC/MS-Methode die massenspektrometrische Analyse der Phenolsäuren im relevanten Konzentrationsbereich und in komplexen Körperflüssigkeiten zugänglich. Schließlich war es für den Nachweis der Phenolsäure-Metabolite der Anthocyane noch nötig, eine Methode zu finden, die eine Spaltung von Phase II-Konjugaten der Phenolsäuren ermöglichte, ohne dabei Anthocyan-Glycoside zu spalten. Aus den dabei entstehenden Anthocyanidinen würden durch Zerfall eben diese phenolischen Säuren entstehen, die nicht mehr von den endogen im Körper gebildeten Phenolsäure-Metabolite der Anthocyane zu unterscheiden wären. Diese selektive Verhinderung der enzymatischen Spaltung gelang durch den Zusatz von Aluminium-Ionen und beruht auf der Komplexbildung der Anthocyane und nicht auf inhibitorischen Effekten.

### II. Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Anthocyane

Obwohl es in der Literatur zahlreiche Untersuchungen über die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen gibt, ist das Wissen über den Metabolismus dieser Verbindungsklasse sehr begrenzt. Zu Beginn dieser Arbeit konnten lediglich weniger als 0,5% der in Humanversuchen verabreichten Anthocyanmengen nach Verzehr in Körperflüssigkeiten wiedergefunden werden. Der Verbleib der übrigen 99,5% war dagegen unklar. Zur Untersuchung der Biotransformation

der Anthocyane wurden in dieser Arbeit verschiedene *in vitro*-Modelle eingesetzt. Während Anthocyane dabei keine Phase I-Metabolisierung durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen erfahren, konnte gezeigt werden, dass sowohl einfache als auch komplexe Anthocyane in Gegenwart intestinaler Bakterien schnell zu phenolischen Säuren abgebaut werden. Am Beispiel des Cy3glc konnte so die Entstehung der Protocatechusäure (PCS) nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten durch enzymatische *in vitro*-Reaktionen an den catecholischen Strukturelementen des Cyanidins (Cy) und des Cy3glc die entsprechenden Methylierungsprodukte dargestellt werden, die als das freie und glucosylierte Peonidin-Derivat identifiziert wurden. Anthocyane sind zudem Substrate der UDP-Glucuronyltransferasen und werden *in vitro* sowohl als Aglykone als auch in Form der Monoglucoside metabolisiert. Dabei entstehen einfache Glucuronsäure-Konjugate oder gemischte Glucosid-Glucuronide. Durch die Untersuchung der beteiligten Isoenzyme konnte gezeigt werden, dass dieser Konjugationsschritt nicht nur in der Leber und Niere, sondern auch in Bereichen des Gastrointestinaltraktes stattfinden kann.

In den sich anschließenden *in vivo*-Untersuchungen konnten die *in vitro*-Resultate bestätigt und neue Erkenntnisse über den Metabolismus und die Bioverfügbarkeit gewonnen werden. Tierexperimentelle Studien klärten dabei zunächst den Metabolismus der Phenolsäuren auf. Die nach oraler Verabreichung der PCS identifizierten neuen Metabolite können auch nach der Aufnahme von Cy3glc entstehen, da PCS z.B. durch intestinalen Metabolismus oder einfachen Zerfall des Aglykons im Körper gebildet werden kann. Als Metabolite der PCS konnten die beiden Methylierungsprodukte, Vanillinsäure (VS) und 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure, sowie die Glucuronsäure-, Sulfat- und Glycin-Konjugate dieser Verbindungen nachgewiesen werden.

In dem zentralen Versuch der Arbeit konnten diese Ergebnisse erstmals auch beim Menschen bestätigt werden. Hierzu wurde ein Humanversuch als Pilotstudie mit zwei Probanden durchgeführt. Durch die orale Aufnahme des Cy3glc als Reinsubstanz in physiologischen Mengen (ca. 200 mg) konnte dabei der Metabolismus im Detail aufgeklärt und Interferenzen mit anderen Verbindungen ausgeschlossen werden. Wie in komplexen Lebensmittelmatrixen werden auch matrixfreie Anthocyane sehr schnell resorbiert und ausgeschieden und zeigen eine geringe Bioverfügbarkeit. Zusätzlich zu dem nicht-metabolisierten Cy3glc konnten mit dem Peonidin-3-*O*-glucosid und den Glucuronsäurekonjugaten von Cyanidin und Peonidin (Peo) in Urin und Plasma auch die *in vitro* gezeigten Phase II-Metabolite identifiziert werden. Aufgrund des speziell konzipierten Studiendesigns mit einer rigiden Depletionsphase gelang zudem eindeutig und erstmals der Nachweis der phenolischen Säuren als Anthocyan-Metabolite in Plasma und Urin in freier und konjugierter Form; als Metabolite des Cy3glc

---

konnten PCS und VS nachgewiesen werden. Mit der gezeigten Verstoffwechslung der Anthocyane gelang es, einen zentralen Weg des Metabolismus und Abbaus dieser Substanzen aufzuklären.

Die Ergebnisse konnten auch im Tierversuch nach oraler Verabreichung von Anthocyanen bestätigt werden. Fasst man die Resultate aus dem Tierversuch und der Humanstudie zusammen, so kann mit den hier vorgestellten Methoden der Verbleib von ca. 8,5% des verabreichten Cy3glc erklärt werden.

### **III. Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung**

Will man die biologischen Wirkungen der Anthocyane beurteilen, müssen alle Metabolite, Abbau- und Dimerisierungsprodukte in die Überlegungen mit einbezogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die antioxidative Wirkung vor diesem Hintergrund anhand der modifizierten Testsysteme TEAC-, FRAP- und ORAC-Assay beleuchtet. Hierbei konnte für die Einzelsubstanzen sowohl im Falle der untersuchten Anthocyane als auch für die Metabolite PCS und VS eine starke antioxidative Wirkung nachgewiesen werden, die bei den Phenolsäuren im Bereich gängiger Referenzsubstanzen (Trolox, ASC) lag, bei den Anthocyanen deren Wirkung sogar weit übertraf. Insgesamt erfahren Anthocyane im Rahmen ihrer metabolischen Veränderungen durch Methylierungs-, Zerfalls- und Konjugationsreaktionen tendenziell eine Schwächung dieser Wirkung.

Dennoch besitzen Anthocyane und ihre Metabolite ein sehr hohes antioxidatives Potential *in vitro*, dessen Bedeutung jedoch für die *in vivo*-Situation aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit fraglich ist. So zeigten unsere Untersuchungen in einer Plasma-Modelllösung unter Berücksichtigung der identifizierten Metabolite im nachgewiesenen Konzentrationsbereich in den verwendeten Testsystemen keine Wirkung; auch ein synergistischer Effekt von Cy3glc, PCS und VS konnte ausgeschlossen werden.

Es ist daher zu schlussfolgern, dass durch alimentäre Aufnahme oder gezielte Supplementierung mit Anthocyanen die nötigen Konzentrationen im Körper für eine systemische antioxidative Wirkung nicht erreichbar sind. Daher scheint es wenig sinnvoll, durch die Aufnahme Anthocyan-reicher Nahrungsergänzungsmittel eine erhöhte antioxidative Kapazität des Körpers erreichen zu wollen. Eine gesunde Ernährung manifestiert sich vielmehr in einer ausgewogenen Aufnahme verschiedener kompletter Lebensmittel, die v.a. viel Obst und Gemüse umfassen sollten.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Geräte und Chemikalien

#### 6.1.1 Liste der verwendeten Geräte

Tabelle 6.15: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Anaerobiertopf Anaerocult <sup>®</sup>	Merck
Autoklav 23	Melag
Biofreezer –86C	FormaScientific
Digitalwaage 1265MP	Sartorius
Elvehjem-Potter	Braun
Feinanalysenwaage AE136	Mettler
Kreatininmessgerät Reflektron	Boehringer
Kühlschrank	Liebherr
Magnetrührer	Ika
Mikrotiterplatten-Lesegerät Thermomax	Molecular Devices
pH-Messgerät MP220	Mettler Toledo
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Reaktionsgefäße, 1,5/2 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäße, 15/50 ml	Greiner
Spektralfluorimeter SpectraFluor Plus	Tecan
Spektralphotometer Lambda 15	Perkin-Elmer
Spektralphotometer Lambda Bio 20	Perkin-Elmer
SPE-Station VAC-ELUT	Analytichem International
Stomacher 400	Seward
Tiefkühlschrank	Forma Scientific
Ultraschallbad Transsonic T570/H	Elma
Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel
Ultrazentrifuge Optima, XL-100K	Beckman
Vakuum-Pumpe für SPE-Station, Typ N035	KNF Neuberger
Vakuum-Zentrifuge Maxi dry plus	Heto
Vortex Genie 2	Scientific Industries

(Fortsetzung)

Gerät	Hersteller
Wasserbad, W6	P-D Industriegesellschaft
Wasserbad, WB22	Memmert
Zentrifuge CR422	Jouan
Zentrifuge, DW-41BR-230	Qualitron Inc.
Zentrifuge Z160M	Hermle

## 6.1.2 Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

### 6.1.2.1 Allgemeine Chemikalien

**Tabelle 6.16:** Allgemein verwendete Chemikalien

Substanz	Hersteller
Acetonitril	Roth
Aluminiumnitrat	Fluka
Ameisensäure	Roth
Ammoniumhydrogenphosphat	Fluka
Ascorbinsäure	Fluka
BSTFA	Fluka
1-Butanol	Merck
<i>p</i> -Cumarsäure	Roth
Cyanidin	Roth, Polyphenols
Cyanidin-3-glucosid	Roth, Polyphenols
Cyanin	Roth
Delphinidin	Roth, Polyphenols
Delphinidin-3-glucosid	Polyphenols
2,4-Dihydroxybenzoesäure	Fluka
Ferulasäure	Roth
Gallussäure	Roth
$\beta$ -Glucosidase (aus Mandeln)	Fluka
$\beta$ -Glucuronidase (aus <i>Helix pomatia</i> ), 367500 U/g	Sigma
Glycerin	Roth
4-Hydroxybenzoesäure	Fluka
Kaffeesäure	Roth

(Fortsetzung)

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kryoröhrchen	Nalgene
Malvidin	Polyphenols
Malvidin-3-glucosid	Roth
Malvin	Roth
Methanol	Roth
Na <sub>2</sub> EDTA	Fluka
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
OASIS HLB-Kartuschen (1cc, 30 mg)	Waters
Pelargonidin	Sigma
Pelargonidin-3-glucosid	Polyphenols
Peonidin	Roth, Polyphenols
Peonidin-3-glucosid	Polyphenols
Petunidin	Polyphenols
Petunidin-3-glucosid	Polyphenols
Phosphorsäure	Roth
Protocatechusäure	Fluka
Salzsäure (32%)	Roth
Sulfatase (aus <i>Helix pomatia</i> ), 16400 U/g	Sigma
Syringasäure	Roth
Trichloressigsäure	Roth
Trifluoressigsäure	Merck
TRIS	Merck
TRIS-HCl	Merck
Vanillisäure	Roth

6.1.2.2 *in vitro*-UntersuchungenTabelle 6.17: Verwendete Chemikalien bei den *in vitro*-Untersuchungen

Chemikalie	Hersteller
Alamethicin	Sigma
Anaerocult <sup>®</sup> A-Kit	Merck
Anaerotest-Streifen <sup>®</sup>	Merck
Bio-Rad DC Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Fluka
Catechol- <i>O</i> -methyltransferase	Fluka
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Roth
Daidzein	TCI Tokyo Kasei
1,4-Dithiothreitol	Fluka
Equol	Plantech
Ethoxycumarin	Fluka
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	Fluka
Isocitrat	Fluka
Isocitrat-Dehydrogenase	Sigma
Magnesiumchlorid	Fluka
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	Roth
NADP <sup>+</sup>	Fluka
Na <sub>2</sub> S · 7H <sub>2</sub> O	Fluka
Quercetin	Roth
S-Adenosyl-L-Methionin	Sigma
UDPGA	Fluka
UGT1A1, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A7, UGT1A10, UGT2B7	PanVera
UGT1A4, UGT1A8, UGT1A9	Gentest
Umbelliferon	Fluka

### 6.1.2.3 *in vivo*-Untersuchungen

**Tabelle 6.18:** Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien bei den *in vivo*-Untersuchungen

Chemikalie	Hersteller
alkoholisches Hautantiseptikum Neo-Kodan	Schülke & Mayr
Benzoessäure	Roth
Citronensäure	Roth
Cyanidin-3-glucosid	CCC-Isolierung (AK Winterhalter, Braunschweig)
Einmal-Injektions-Kanülen	Sterican
Hippursäure	Roth
Kreatinin-Schnelltest Reflotron®	Roche
Malvin	CCC-Isolierung (AK Winterhalter, Braunschweig)
Monovetten, EDTA KE/9 ml	Sarstedt
Natrium-hydrogencarbonat	Roth
Protocatechusäure	Fluka
Sprague-Dawley Ratten	Charles-River
Syringasäure	Roth
Triton-X	Fluka
Vanillinsäure	Roth
Venenpunktionsbesteck Venofix	Braun
Weichgelatine kapseln	Pharmapol-Arzneivertrieb

### 6.1.2.4 Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung

**Tabelle 6.19:** Verwendete Chemikalien bei den Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung

Chemikalie	Hersteller
Ascorbinsäure	Fluka
2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz	Fluka
2,2-Azobis(2-amidinopropan) Dihydrochlorid	Fluka
Cyanidin	Polyphenols
Cyanidin-3-glucosid	Polyphenols

(Fortsetzung)

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Kaliumperoxodisulfat puriss. p.a.	Fluka
Eisen(III)-chlorid Hexahydrat	Fluka
Eisen(II)-sulfat Heptahydrat	Fluka
Ferulasäure	Roth
Fluorescein	Fluka
Peonidin	Polyphenols
Peonidin-3-glucosid	Polyphenols
R-Phycoerythrin	Molecular Probes
Protocatechusäure	Fluka
Syringasäure	Roth
TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-triazin)	Fluka
Trolox	Sigma
Vanillinsäure	Roth

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Analytik

#### 6.2.1.1 Gewinnung von Lebensmittelextrakten

Die Anthocyan-Lösungen verschiedener Lebensmittel wurden durch Extraktion mit TFA (1% in Methanol) aus den ganzen Früchten oder aus Teilen davon (geschälte Haut im Falle des Radieschens oder der Aubergine) gewonnen. Die anthocyanhaltigen Bestandteile wurden dabei mit einer Schere grob zerkleinert und in Gegenwart der Extraktionslösung in zweifachem Überschuss zur Masse (v/m) in einer Reibschale mit dem Mörser aufgeschlossen. Dieser Vorgang wurde bis zur deutlichen Entfärbung des Extraktionsmittels mit stets neuer Extraktionsflüssigkeit wiederholt, wobei diese bei jedem Schritt für ca. 30 min auf der Probe verweilten. Die Extraktionslösungen wurden vereint, im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet und zur weiteren Verwendung bei -18°C gelagert. Die verwendete Säurekonzentration führte nicht zu einer Hydrolyse der Substanzen wie sie in der Literatur für höhere Konzentrationen beschrieben ist [15].

#### 6.2.1.2 Isolierung von Anthocyanen mittels HSCCC

Die präparative Isolierung der Anthocyane für die *in vivo*-Untersuchungen erfolgte mittels High-Speed Countercurrent Chromatography im Arbeitskreis von Prof. Winterhalter, Braunschweig. Das Prinzip dieser Methode und die genaue Vorgehensweise sind in verschiedenen Publikationen beschrieben [50, 383–386]. Cy3glc wurde dabei aus Brombeeren (*Rubus fruticosus*), Mal3glc und Malvin aus Rotwein (Spätburgunder, 1997, Baden bzw. Ruby Red, 1998, Kalifornien) isoliert. Die Charakterisierung erfolgte über NMR-, LC/DAD- und LC/MS-Messungen. Die Reinheit bezogen auf alle bei 520 nm absorbierenden Substanzen lag bei 99% (Cy3glc), 85% (Mal3glc) bzw. 80% (Malvin). Zusätzlich wurde mittels GC/MS-Untersuchungen die Anwesenheit phenolischer Säuren (PCS, VS, SS, 4-Hydroxybenzoesäure, Gallussäure) ausgeschlossen.

#### 6.2.1.3 Festphasenextraktion

Die im Rahmen dieser Arbeit zur Aufreinigung und Aufkonzentrierung von Proben verwendeten Festphasenextraktionen wurden – soweit nicht anders vermerkt – stets mit der hier beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Die verwendeten OASIS HLB-Kartuschen (1cc, 30 mg) wurden zunächst mit 2 ml Methanol und 2 ml wässriger HCl-Lösung (0,01%, v/v)

vorkonditioniert und nach Applikation der aufzureinigenden Probe mit 1 ml derselben HCl-Lösung gewaschen. Die Elution der interessierenden Substanzen erfolgte mit 2 ml methanolischer HCl-Lösung (0,01%, v/v). Anschließend wurde des Eluats im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet. Die weitere Behandlung ist jeweils bei den einzelnen Methoden aufgeführt.

Zur Bestimmung der Wiederfindung (vgl. 3.1.1) dieser SPE-Methode wurden verschiedene Anthocyane (Cy3glc, Mal3glc, Peo3glc, Pel3glc, Del3glc, Pet3glc, Cy35d-glc, Mal35d-glc, Radieschenschalenextrakt) und Phenolsäuren (PCS, VS, SS, 4-Hydroxybenzoesäure) eingesetzt.

### 6.2.1.4 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion der Anthocyane wurde für die Isolierung der Anthocyane aus Rattenorganen etabliert, bei denen aufgrund der sehr komplexen Matrix und des Aufschlusses der Zellen sowie wegen der größeren Volumina eine einfache Festphasenextraktion nur schwer zu realisieren war. Die Extraktion fand bei pH 1 durch wiederholte Zugabe von Butanol statt. Die organischen Phasen wurden vereint, in der Evaporatorzentrifuge zur Trockene reduziert und wie beschrieben weiterverarbeitet.

### 6.2.1.5 HPLC/DAD und HPLC/MS

Zur Analytik der während der Arbeit angefallenen Proben kamen zwei verschiedene HPLC-Systeme zum Einsatz, die im Folgenden näher beschrieben werden. Die Identifizierung der auftretenden Substanzen erfolgte stets durch Absorptionsspektren- und Retentionszeitenvergleich mit kommerziell erhältlichen Referenz-Substanzen, durch Cochromatographie der Probelösungen mit diesen und – wo angegeben – durch massenspektrometrische Analysen.

#### HPLC-System 1

Analytisches Hochdruckgradientensystem von Shimadzu mit Pumpen (LC-10Atvp), Controller (SCL-10Avp), Autosampler (SIL-10Advp), Diodenarray-Detektor (SPD-M10Avp) und Shimadzu Class Vp 6.12 zur Datenverarbeitung.

Vorsäule: Nova Pak C18

Säule: WATERS Nova Pak C18

Korngröße: 4  $\mu\text{m}$

Länge: 250 mm

Innendurchmesser: 4,60 mm

Eluent A: Wasser (mit 1% TFA)

Eluent B: 100% Acetonitril

Gradient:

Zeit (min)	0	15	25	32	40	50	60	70	71	80
% Eluent A	100	100	89	86	86	80	50	0	100	100
% Eluent B	0	0	11	14	14	20	50	100	0	0

Flussrate: 0,8 ml/min

Detektion: DAD (260 nm, 320 nm, 520 nm)

Mit diesem HPLC-System wurden die Quantifizierungen der verschiedenen Substanzen anhand von externen Kalibriergeraden durchgeführt sowie die Nachweisgrenzen- und Wiederfindungsbestimmungen vorgenommen. Die Auswertung der Anthocyane erfolgte bei einer Wellenlänge von 520 nm, die der phenolischen Säuren bei 260 bzw. 320 nm. Alle Eluenten wurden vor ihrem Einsatz im Ultraschallbad entgast.

*Allgemeine Anmerkung:*

Da das System über keinen Säulenofen verfügt und die verwendete Säule aufgrund der extremen pH-Bedingungen Veränderungen unterlag und infolgedessen häufig durch andere Säulen gleichen Typs ausgetauscht werden musste, ließen sich Schwankungen der Retentionszeiten nicht vermeiden.

## HPLC-System 2

Analytisches Hochdruckgradientensystem von HP Serie 1100 mit Degasser, Säulenofen, Autosampler, Diodenarray-Detektor und massenselektivem Detektor mit API-ES Ionisationskammer; die Auswertung erfolgte mittels HP Chem Station.

Vorsäule: s. HPLC-System 1

Säule: s. HPLC-System 1

Eluent A: Wasser (mit 5% Ameisensäure)

Eluent B: 100% MeOH

Gradient:

Zeit (min)	0	10	15	30	35	50	55	65	68
% Eluent A	95	80	80	70	70	55	55	95	95
% Eluent B	5	20	20	30	30	45	45	5	5

Flussrate: 0,7 ml/min

Detektion: DAD (280 nm, 520 nm)

**MS-Bedingungen:**

Ionisationsmodus:	API-ES positiv
Trocknungsgasfluss:	12 l/min
Zerstäubedruck:	30 psig
Trocknungsgastemperatur:	350 °C
Kapillarspannung (V <sub>cap</sub> ):	2500 V
Fragmentor-Spannung:	30–150 V
Massenbereich:	100–1500
Scanrate:	0,7 s/Zyklus

Die Analysen erfolgten im Scan- und SIM-Modus.

**6.2.1.6 GC/MS****Derivatisierung für die GC/MS-Analyse**

Das Lösungsmittelgemisch der Proben wurde an der Vakuum-Zentrifuge oder im N<sub>2</sub>-Strom entfernt, die Probe in Methanol aufgenommen und in ein GC-Gläschen überführt und dort mit internem Standard (30 µl Gallussäure (5 µM in Methanol)) versetzt. Nach erneutem Entfernen des Lösungsmittels im N<sub>2</sub>-Strom erfolgte in Anlehnung an Smolarz [387] die Derivatisierung mit 30 µl BSTFA, die zu einer Massenerhöhung von 72 führt. Die Lösung kann nach einer Mindestreaktionszeit von 30 Minuten mittels GC-MS analysiert werden. Die Derivatisierung wurde auf Reproduzierbarkeit evaluiert.

**GC/MS-Bedingungen**

Säule:	HP-5MS mit Gap, ca. 30 m, i.D. 0,25 mm (Narrowbore), Filmdicke 0,25 µm
Trärgas:	Helium (1 ml/min)
Injektionsvolumen:	1 µl
Injektortemperatur:	250°C
Temperaturprogramm:	Anfangstemperatur: 60°C Isotherme 1: 3 min Aufheizrate 1: 10°C /min Temperatur 2: 280°C Isotherme 2: 15 min

Massenanalysator:	Quadrupol
Massenbereich:	20–450 amu
Ionisation:	Electron Impact bei 70 eV
Scanrate:	0,5 s/Scan

Neben dem Chromatogramm des Totalionenstroms können durch Selektion von Massenspuren aus der Messung des Full Scans weitere Chromatogramme dargestellt werden. Durch Auswahl substanzspezifischer  $m/z$ -Werte kann so der Nachweis von interessierenden Substanzen verbessert werden, insbesondere im Spurenbereich bzw. bei Coelution mit anderen Komponenten. Diese Methode wurde auch unter Anwendung von Gallussäure als internem Standard zur Quantifizierung mittels externer Kalibriergeraden benutzt. Als Massenspuren wurden hierbei verwendet: 458 (Gallussäure), 297 (VS), 327 (SS), 370 (PCS), 370 (2,4-Dihydroxybenzoesäure).

## 6.2.2 Allgemeine Untersuchungen

### 6.2.2.1 Stabilitätsuntersuchungen

Die Untersuchungen zur Stabilität der Anthocyan-Aglykone (Cy, Del, Mal, Pel, Peo und Pet) wurden in unterschiedlichen Konzentrationen bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Der Abbau wurde dabei im Testsystem I bei einer Anthocyan-Konzentration im Ansatz von 200  $\mu\text{M}$  bei 37°C und pH 7,4, im Testsystem II bei einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  bei RT und verschiedenen pH-Werten (1,0; 3,0; 5,0; 7,4) überprüft. Anhand des Testsystems II wurde auch der Einfluss von Aluminium-Ionen auf die Stabilität der Anthocyane untersucht. Dazu wurden Reaktionen in Abwesenheit und Gegenwart von 140 mM  $\text{Al}^{3+}$  (Endkonzentration) durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h; 30 min; 1 h; 2 h; 3 h; 4 h; 5 h) wurde die Reaktion durch Zugabe von 10% (v/v) Phosphorsäure (85%) gestoppt und mittels HPLC analysiert.

Aufgrund ihrer Instabilität wurden Stammlösungen der Anthocyane vor den entsprechenden Versuchen stets frisch angelöst und nur möglichst kurze Zeit bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 6.2.2.2 Enzymatische Inkubationen mit $\beta$ -Glucosidase und $\beta$ -Glucuronidase

#### Allgemeine Untersuchungen

Die Untersuchungen zur Fähigkeit der Enzyme zur Spaltung von Anthocyan-Glucosiden wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt, das neben dem entsprechenden

Puffer (0,1 M Natriumacetatpuffer, pH 5,0 bzw. 3,0; 0,1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,4) 100  $\mu$ M Anthocyan-Glucosid und 5 mg  $\beta$ -Glucuronidase (367500 U) oder  $\beta$ -Glucosidase (7800 U) enthielt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0–24 h) wurden Aliquote von 100  $\mu$ l entnommen, zum Stoppen der Reaktion mit 10  $\mu$ l Phosphorsäure (85%) versetzt und mittels HPLC analysiert.

### **Inkubation in Gegenwart von Aluminium-Ionen**

Die Inkubationsansätze in Gegenwart von Aluminium-Ionen fanden ebenfalls in einem Gesamtvolumen von 1 ml statt und enthielten neben dem Substrat (Anthocyan-Glucosid) in einer Konzentration von 100  $\mu$ M, dem entsprechenden Puffer und dem Enzym (5 mg) zusätzlich Aluminium-Ionen in einer Konzentration von 280  $\mu$ M. Auch hier erfolgte die Analyse nach unterschiedlichen Zeitpunkten, wobei die Verhinderung der enzymatischen Spaltung auch durch gaschromatographische Analyse der Inkubationsansätze überprüft wurde. Nach dem Reaktionsstopp wurden 30  $\mu$ l des Ansatzes derivatisiert und mittels GC/MS analysiert (vgl. 6.2.1.6).

### **6.2.3 *in vitro*-Metabolismus-Assays**

#### **6.2.3.1 Mikrosomale Umsetzung**

##### **Mikrosomenpräparation aus Rattenleber**

Die Isolierung der Mikrosomen aus Lebern männlicher Sprague Dawley Ratten erfolgte in Anlehnung an Lake [388]. Nach dem Töten und dem Entbluten der Tiere wurden die Lebern mit eisgekühlter 0,9%iger Kochsalzlösung perfundiert und entnommen. Danach wurden die Lebern gewogen, mit einer Schere grob zerkleinert und mit der dreifachen Menge (m/v) Mic-I-Puffer unter Eiskühlung im Elvehjem-Potter bei ca. 500 rpm homogenisiert. Durch Zentrifugation bei  $9000 \times g$  (15 min, 4°C) wurden grobe Zellbestandteile (nicht aufgebrochene Zellen, Mitochondrien, Zellkerne) abgetrennt. Der Überstand (sogenannte S9-Fraktion) wurde 60 min bei  $105000 \times g$  und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Mikrosomenpellet (Mikrosomen) wurde vorsichtig unter Zurücklassen des weißen bis glasigen Glykogenrückstandes wieder aufgeschlämmt. Die Mikrosomensuspension wurde in ein weiteres Zentrifugenröhrchen dekantiert und erneut 60 min bei  $105000 \times g$  zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen, das Pellet in Mic-II-Puffer (0,75 ml/g Leber) resuspendiert, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die beiden Puffer setzten sich dabei wie folgt zusammen:

Mic-I-Puffer:     0,15 M KCl  
                  0,05 M Tris  
                  1 mM Na<sub>2</sub>EDTA  
                  lösen, mit HCl<sub>konz</sub> auf pH 7,4 einstellen und mit H<sub>2</sub>O auf 1 l auffüllen

Mic-II-Puffer:    25 mM HEPES  
                  1,5 mM Na<sub>2</sub>EDTA  
                  1 mM 1,4-Dithiothreitol  
                  100 mM NaCl  
                  lösen, mit Natriumhydroxid auf pH 7,6 einstellen  
                  nach Zugabe von 115 ml Glycerin (87%) auf 1 l auffüllen

### Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach einer modifizierten Form des Bio-Rad DC Protein Assays nach Lowry [389] auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Proteine bilden in alkalischer Lösung mit Cu<sup>2+</sup>-Ionen einen Komplex und reduzieren diese zu Cu<sup>+</sup>-Ionen (Biuret-Reaktion). Durch Reduktion des sog. Folin-Reagenzes (Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>- und Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>-Lösung) durch diesen dann entstandenen Protein-Cu<sup>+</sup>-Komplex entsteht ein blauer Farbkomplex, dessen Absorption bei 650 nm spektralphotometrisch bestimmt werden kann und proportional zum Proteingehalt der Probe ist.

#### *BIO-RAD DC Reagenzien:*

Reagenz A:   alkalische Kupfertartrat-Lösung  
Reagenz B:   verdünntes Folin-Reagenz  
Reagenz S:   Natriumdodecylsulfat-Lösung  
                  100 mM NaCl  
                  lösen, mit Natriumhydroxid auf pH 7,6 einstellen  
                  nach Zugabe von 115 ml Glycerin (87%) auf 1 l auffüllen

Die Messungen erfolgten als Dreifachbestimmung, wobei sich die Ansätze auf den Mikrotiterplatten aus folgenden Komponenten zusammensetzten:

Reagenz A	alkalische Kupfertartrat-Lösung
Reagenz B	verdünntes Folin-Reagenz
Reagenz S	Natriumdodecylsulfat-Lösung
Standard	lyophilisiertes Rinderserumalbumin (0,1–1,4 mg/ml)
Puffer	PBS-Puffer

Jeweils 5  $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Probe bzw. des Standards oder des Puffers (Leerwert) wurden mit 20  $\mu\text{l}$  Arbeitsreagenz (20  $\mu\text{l}$  Reagenz S in 1 ml Reagenz A) und 200  $\mu\text{l}$  Reagenz B gemischt und nach 15-minütiger Inkubation bei RT bei 650 nm mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

### Inkubation

Die mikrosomalen Inkubationen fanden in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) in einem Gesamtvolumen von 2 ml statt. Neben mikrosomalem Protein (1 mg/ml) und dem Substrat (25 und 50  $\mu\text{M}$  Endkonzentration der Anthocyan-3-Glucoside Cy3glc, Mal3glc und Peo3glc bzw. 1 mM Endkonzentration der Anthocyan-Aglykone Cy, Pel und Peo) enthielt der Ansatz noch ein NADPH-generierendes System, das als Cosubstrat von CYP-450-Enzymen benötigt wird. Es wurde jeweils unmittelbar vor Versuchsbeginn hergestellt und setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenzien		Endkonz. im Ansatz
Isocitrat-Dehydrogenase (20 U/ml)	500 $\mu\text{l}$	0,9 Units
Isocitrat (2,33 M)	90 $\mu\text{l}$	9,4 mM
NADP <sup>+</sup>	25 mg	1,21 mM
Magnesiumchlorid (1 M)	100 $\mu\text{l}$	4,3 mM
Kaliumphosphatpuffer (0,1 M), pH 7,4	100 $\mu\text{l}$	

Für den Inkubationsansatz wurden der Puffer, die unter Eiskühlung langsam aufgetaute Mikrosomensuspension und die Substratlösung 2 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad vorinkubiert. Anschließend erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe von 70  $\mu\text{l}$  NADPH-generierendem System. Im Falle der Aglykone wurde aufgrund der Instabilität die Substratlösung zusammen mit dem NADPH-generierenden System nach der Vorinkubation zugesetzt. Die Reaktion wurde nach 30 bzw. 60 min durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Phosphorsäure (85%)

gestoppt. Nach dem Zentrifugieren (5 min bei  $7000 \times g$ ) wurden die Proben sofort der HPLC-Analytik zugeführt.

Alle Inkubationen wurden als Dreifachbestimmungen ausgeführt. Als Positivkontrolle diente die bekannte Reaktion von Ethoxycumarin zu Umbelliferon. Negativkontrollen wurden entweder in Abwesenheit des NADPH-generierenden Systems oder durch Einsatz hitzeinaktivierter Mikrosomen durchgeführt.

### 6.2.3.2 Anaerobe Inkubation mit Fäzes-Suspensionen

#### Herstellung der Fäzes-Suspensionen

Die Präparation der Fäzes-Suspensionen fand in Anlehnung an die Arbeiten von Wang et al. [390] und Meselhy et al. [391] statt. Demnach wurden frische Fäzesproben (ungefähr 2,5 g) von zwei gesunden männlichen Probanden mit 25 ml Natrium-Phosphat-Puffer (100 mM, pH 7,3), der zur Eliminierung von Sauerstoff im Ultraschallbad behandelt und mit  $N_2$  begast wurde, versetzt und homogenisiert. Die Probanden waren mindestens sechs Monate vor Versuchsbeginn frei von Antibiotika-Behandlungen und ernährten sich normal. Die anschließende Filtration der Rohsuspension durch eine Mullbinde diente der Entfernung unlöslicher Grobpartikel. Das erhaltene Filtrat wurde mit Puffer auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Damit enthielten die Fäzes-Suspensionen einen Fäzesanteil von 5% (m/v), was dem physiologischen Gehalt entspricht [392].

#### Anaerobe Inkubation

Der Inkubationsansatz für die anaerobe Inkubation setzte sich in Anlehnung an Karppinen et al. [393] wie folgt zusammen:

Reagenzien	Menge
Substrat (gelöst in Natrium-Phosphat-Puffer, 100 mM, pH 7,3)	1690 $\mu\text{l}$
reduzierendes Medium	300 $\mu\text{l}$
Spurenelementlösung	10 $\mu\text{l}$
Fäzes-Suspension	3000 $\mu\text{l}$

Die *Spurenelementlösung* enthielt dabei folgende Salze in 250 ml bidest. Wasser gelöst:

- 3,3 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 2,5 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 0,25 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 2 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Das *reduzierende Medium* bestand aus:

- 240 mg  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 40 ml  $\text{H}_2\text{O}$
- 1,7 ml NaOH (1N)

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Fäzes-Suspension gestartet und fand unter anaeroben Bedingungen bei 37°C statt. Das anaerobe Milieu wurde in einem Anaerobiertopf durch die Verwendung von Anaerocult A-Kits realisiert und mittels Anaerotest-Streifen kontrolliert. Zu definierten Zeitpunkten (0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 24 und 48 h) wurden 0,5 ml aus der Inkubationsmischung entnommen. Die Fermentation wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Phosphorsäure (85%) gestoppt. Parallel durchgeführte Kontrollinkubationen wurden mit autoklavierter Fäzes-Suspension durchgeführt, die bei 121°C 30 min lang behandelt wurden. Alle Inkubationen wurden als Vierfachbestimmungen durchgeführt; als Positivkontrolle diente die reduktive Transformation von Daidzein zu Equol und Dihydrodaidzein [394].

Die entnommenen und säurebehandelten Proben wurden bei  $4000 \times g$  5 min zentrifugiert und der Überstand einer Festphasenextraktion (vgl. 6.2.1.3) unterzogen. Nach Trocknung des Eluats im  $\text{N}_2$ -Strom wurde der Rückstand in 125  $\mu\text{l}$  wässriger TFA-Lösung (1%, v/v) gelöst und durch Injektion von 50  $\mu\text{l}$  mittels HPLC (vgl. 3.1.3) analysiert.

### 6.2.3.3 Methylierung durch Inkubation mit COMT/SAM

Durch Umsetzung mit COMT/SAM können Substanzen mit catecholischer Struktur in die entsprechenden Methylierungsprodukte umgesetzt werden. Die Inkubationen wurden in Anlehnung an Kulling et al. [395] durchgeführt und fanden in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4; 100 mM) statt. Die Reaktionsansätze enthielten 50  $\mu\text{M}$  Ascorbinsäure, 10  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  SAM und 70  $\mu\text{M}$  1,4-Dithiothreitol, das Thiolgruppen im reduzierten Zustand hält. Die Substratkonzentrationen lagen im Fall des Cy bei 1 mM bzw. 100  $\mu\text{M}$ , im Fall des Cy3glc bei 100  $\mu\text{M}$  (jeweils bezogen auf die Endkonzentration). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 U COMT gestartet und bei 37°C im Schüttelwasserbad durchgeführt. Durch Zugabe von 40  $\mu\text{l}$  TCA (20% in Wasser) wurde die Reaktion beim Aglykon nach 30 min, beim Glucosid nach 60 min gestoppt. Nach dem Zentrifugieren (5 min bei  $7000 \times g$ ) wurden die Proben sofort mittels HPLC/DAD/MS analysiert (vgl. 3.1.3).

Alle Inkubationen wurden als Dreifachbestimmungen ausgeführt. Als Positivkontrolle diente die bekannte Methylierung von Protocatechusäure zu Vanillinsäure. Negativkontrollen wurden entweder in Abwesenheit von SAM oder COMT durchgeführt.

### 6.2.3.4 Glucuronidierungsreaktionen

#### Mikrosomale Glucuronidierungen

Die Glucuronidierungs-Reaktionen wurden nach Optimierungsversuchen mit einfachen Leberhomogenisaten, mit Leberzellencytosol und mit dem sog. S9-Mix mit Mikrosomen durchgeführt, die wie unter 6.2.3.1 beschrieben hergestellt wurden. Sie fanden in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  Natriumphosphat-Puffer (pH 7,4; 100 mM) statt. Die Reaktionsansätze enthielten in Anlehnung an Day et al. [307] und Nadelmann et al. [396] 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mg/ml mikrosomales Protein und 1 mM UDPGA, die aktivierte Form der Glucuronsäure. Als Substrate wurden Cy als Vertreter der Anthocyanidine (in einer Endkonzentration von 1 mM), Cy3glc und Mal3glc als Vertreter der 3-*O*-Glucoside (Endkonzentration 100  $\mu\text{M}$ ), Cyanin sowie Malvin als Beispiel eines 3,5-*O*-Diglucosids (Endkonzentration 100  $\mu\text{M}$ ) und die phenolischen Säuren SS, PCS und VS (Endkonzentration 500  $\mu\text{M}$ ) eingesetzt. Die Inkubation fand bei 37°C in einem Schüttelwasserbad statt. Da Glucuronide z.B. in Gegenwart von Mikrosomen chemisch häufig instabil sind, wurde das mikrosomale Protein durch Ansäuern mit 40  $\mu\text{l}$  TCA-Lösung (20% in Wasser) nach 30 min ausgefällt und die Reaktion dadurch gestoppt. Zur Vermeidung von sauren Hydrolysereaktionen erfolgte unmittelbar danach die Neutralisation mit 25  $\mu\text{l}$  1 M NaOH. Nach dem Zentrifugieren (5 min bei 7000  $\times$  g) wurden die Proben sofort mittels HPLC/DAD/MS analysiert (HPLC-Systeme 1 und 2, vgl. 6.2.1.5), da die entstehenden Glucuronide instabil sind.

Alle Inkubationen wurden als Dreifachbestimmungen ausgeführt. Als Positivkontrolle diente die Glucuronidierung von Quercetin, Negativkontrollen wurden entweder in Abwesenheit von UDPGA oder durch Einsatz hitzedenaturierter Mikrosomen durchgeführt.

#### Glucuronidierungen mit rekombinanten Glucuronyltransferasen

Die Bedingungen für die Glucuronidierung mit den einzelnen Isoenzymen wurden zu der hier beschriebenen Methode auf maximale Glucuronidierungsausbeuten in Anlehnung an Boersma et al. [303] und Doerge et al. [311] optimiert. In einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  fanden sich in 50 mM TRIS-Puffer (pH 7,4) 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM 1,4-Dithiothreitol, 2,5  $\mu\text{g}$  Alamethicin (zur Erhöhung der Aktivität) und 1 mM UDPGA. Durch Zugabe des Substrates (Cy3glc in einer Endkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  bzw. Cy mit der Endkonzentration 1mM) und jeweils 50  $\mu\text{g}$  Isoenzym-Protein wurde die Reaktion gestartet und nach 30 min durch Zugabe von 40  $\mu\text{l}$  TCA-Lösung (20% in Wasser) gestoppt. Wie bei der Glucuronidierung mit Mikrosomen erfolgte unmittelbar danach die Neutralisation mit 25  $\mu\text{l}$  1 M NaOH und nach Zentrifugation (5 min bei 7000  $\times$  g) die Analyse mittels HPLC/DAD/MS (HPLC-Systeme 1 und 2, vgl. 6.2.1.5). Die Isoenzym-Aliquote wurden dabei maximal drei Mal verwendet, indem sie bei 37°C aufgetaut und nach der Zugabe schnell wieder bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert wurden.

Die Durchführung der Inkubationen mit den rekombinanten menschlichen UDP-Glucuronyltransferasen 1A1, 1A3, 1A4, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10 und 2B7 fand jeweils als Vierfachbestimmung statt. Aus diesen Werten berechnete sich der Mittelwert und die Standardabweichung für den Anteil des jeweiligen Glucuronids an der Gesamtheit der bei 520 nm absorbierenden Substanzen. Zur Bestimmung des insgesamt gebildeten Glucuronid-Anteils wurde die Summe dieser Einzelwerte gebildet, wobei sich die entsprechende Standardabweichung dann über die Fehlerfortpflanzung ergab. Als Positivkontrolle der Inkubation diente auch hier die in der Literatur beschriebene Glucuronidierung von Quercetin [303], während Negativkontrollen wie bei der mikrosomalen Glucuronidierung in Abwesenheit von UDPGA durchgeführt wurden.

#### 6.2.4 *in vivo*-Studien

Die in den *in vivo*-Studien gewonnenen biologischen Proben wie Urin und Plasma sollten möglichst schnell nach Entnahme analysiert werden, da sie Abbau-, Zerfalls- und Adsorptionsprozessen unterliegen [397]. Erfordert das hohe Probenaufkommen eine Lagerung, so sollte diese bei  $-80^{\circ}\text{C}$  erfolgen. Die hier angegebenen Wiederfindungsraten der Anthocyane wurden anhand des Cy3glc jeweils in Dreifachbestimmungen bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Die Wiederfindung der Phenolsäuren wurde für PCS durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

##### 6.2.4.1 Tierversuche

###### Studiendesign

Abbildung 6.67 illustriert den Ablauf der tierexperimentellen Studien. Der Tierversuch wurde mit männlichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt, die zum Zeitpunkt der Schlundsondierung ca. 200 g schwer waren.

Nach einer dreitägigen Adaptationsphase, bei der die Ratten paarweise bei freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten wurden, fand die Umstellung auf eine flavonoid- und phenolsäurefreie Spezialdiät statt. Dieses Spezialfutter der Firma *Altromin* auf der Basis von Casein mit Sonnenblumenöl und Saccharose als Kohlenhydratträger sowie Cellulose als Ballaststoff wurde mittels HPLC und GC auf die Abwesenheit gängiger Flavonoide (Anthocyane, Quercetin, Isoflavone, Catechin) und Phenolsäuren (PCS, VS, SS, 4-Hydroxybenzoesäure, Gallussäure) untersucht und ebenfalls *ad libitum* verabreicht. Nach der Sicherstellung der Akzeptanz dieser Spezialdiät wurden die Ratten am Tag 7 in Stoffwechsellkäfige umgesetzt, die das getrennte Sammeln von Urin- und Fäzesproben ermöglichen. Zunächst wurden Basalwerte von Urin und Fäzes gesammelt und nach Volumen- bzw. Gewichtsbestimmung bei

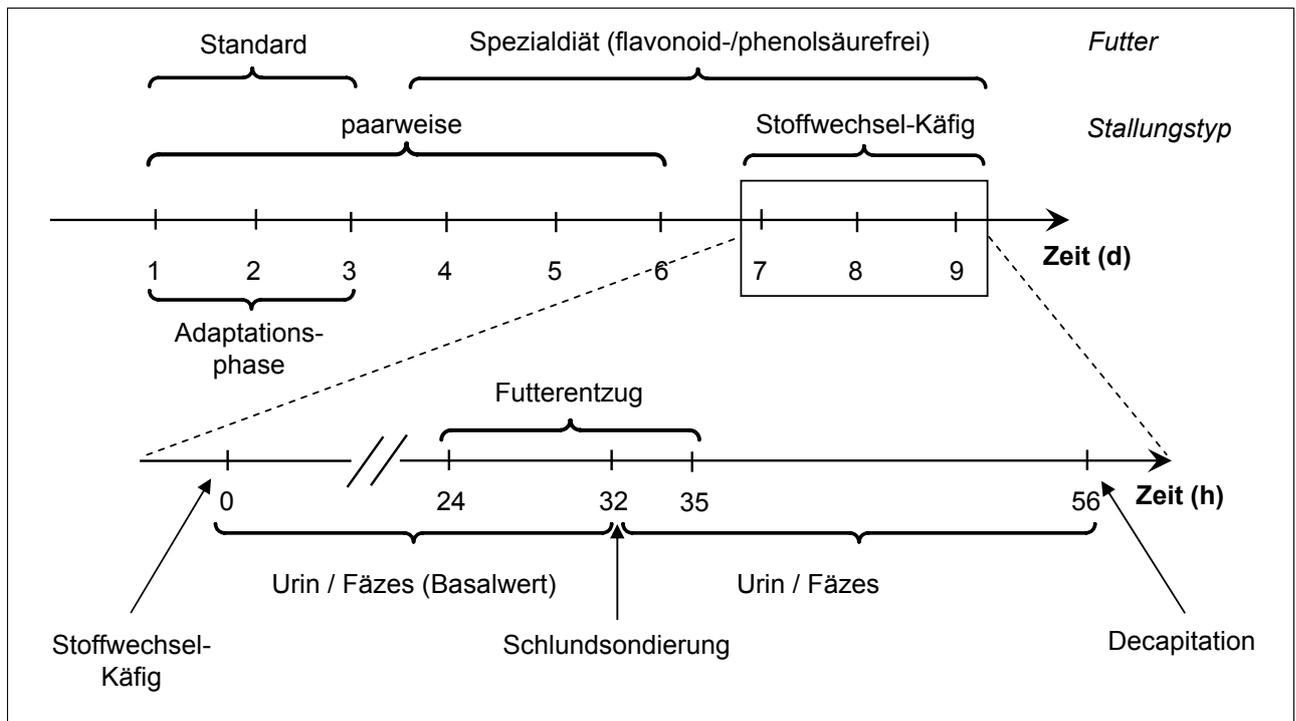


Abbildung 6.67: Studiendesign des Tierversuchs

–80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Acht Stunden vor der Schlundsondierung wurde den Ratten der Zugang zu Futter entzogen, während Wasser die ganze Zeit zur Verfügung stand. Den Ratten wurden folgende Substanzen über eine Schlundsonde verabreicht:

Substanz	Menge	n
Kontrolle A	Natrium-hydrogencarbonat-Lösung (0,1 M)	3
Kontrolle B	Citronensäure (0,1%, m/v)	3
Cy3glc	10 mg (in 1,5 ml 0,1% Citronensäure)	2
Cy3glc	30 mg (in 1,5 ml 0,1% Citronensäure)	2
Malvin	10 mg (in 1,5 ml 0,1% Citronensäure)	2
Malvin	15 mg (in 1,5 ml 0,1% Citronensäure)	2
PCS	15 mg (in 1,5 ml 0,1 M Natrium-hydrogencarbonat-Lösung)	5
SS	15 mg (in 1,5 ml 0,1 M Natrium-hydrogencarbonat-Lösung)	5
VS	15 mg (in 1,5 ml 0,1 M Natrium-hydrogencarbonat-Lösung)	4

Die verabreichten Anthocyane Cy3glc und Malvin wurden dabei mittels HSCCC isoliert und wie unter 6.2.1.2 beschrieben charakterisiert; PCS, VS und SS waren kommerziell erworben (vgl. 6.1.2.1). Drei Stunden nach Aufnahme der Substanzen wurde den Ratten wieder Zugang zu Futter gewährt. Die Sammlung von Urin und Fäzes begann mit der Schlundsondierung und endete 24 Stunden später, wobei die Sammlung in zwei Fraktionen erfolgte

(0–8 h, 8–24 h). Nach Decapitation der Ratten wurde das Blut in EDTA-Röhrchen überführt (ca. 5–8 ml) und Plasma durch die 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 1850 g gewonnen. Anschließend wurden Leber, Niere, Magen, Dünn- und Dickdarm entnommen, mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und wie Plasma, Fäzes und Urin bis zur weiteren, möglichst baldigen Analyse bei –80°C gelagert.

## **Analytik**

### *Urin*

Das Urin wurde unmittelbar nach der Sammlung und Volumenbestimmung (Fraktion 1: 1,1–6,2 ml; Fraktion 2: 3,5–19,8 ml) aliquotiert und bei –80°C aufbewahrt.

Die Proben der Tiere, denen Anthocyane verabreicht wurden, bzw. die entsprechenden Kontrolltiere wurden auf Anthocyane mittels HPLC und auf die Phenolsäuren PCS und VS sowie deren Metabolite mittels GC untersucht. Zur Anthocyan-Analytik wurden 500  $\mu$ l Urin mit 50  $\mu$ l Phosphorsäure (85%) versetzt, zentrifugiert (3000 g, 5 min) und mittels Festphasenextraktion aufgereinigt (vgl. 6.2.1.3). Die Probe wurde in 120  $\mu$ l TFA (1%, v/v) gelöst und mit den HPLC-Systemen 1 und 2 analysiert (vgl. 6.2.1.5). Die Analytik der Phenolsäuren erfolgte mittels GC/MS mit und ohne enzymatische Spaltung durch  $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase. Hierzu wurden in Abwesenheit von Enzymen 500  $\mu$ l Urin mit 50  $\mu$ l Phosphorsäure (85%) versetzt und nach SPE-Aufreinigung (vgl. 6.2.1.3) und Lösen in 100  $\mu$ l Methanol in Gegenwart des internen Standards derivatisiert und gaschromatographisch analysiert (vgl. 6.2.1.6). Die Inkubation zur enzymatische Spaltung erfolgte bei 37°C mit 500  $\mu$ l Urin und 300  $\mu$ l Natriumacetat-Puffer (pH 5,0; 0,15 M) in Gegenwart von 130  $\mu$ l Aluminiumnitrat-Lösung (2 M in Wasser) und jeweils 1 mg  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase. Nach 2 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu$ l Phosphorsäure (85%) gestoppt und nach Zentrifugation (3000 g, 5 min), SPE-Aufreinigung (vgl. 6.2.1.3) und Derivatisierung der GC/MS-Analyse (vgl. 6.2.1.6) zugeführt. Die Wiederfindung dieser Methode lag für Anthocyane bei (84 $\pm$ 4)%, für die Phenolsäuren bei (88 $\pm$ 7)% ohne Zugabe von Enzymen und bei (79 $\pm$ 5)% mit enzymatischer Spaltung.

Die Analytik der Urine der Phenolsäure-supplementierten Ratten wurde ebenfalls mit und ohne enzymatische Spaltung durchgeführt. Zur Aufarbeitung in Abwesenheit von Enzymen wurden 500  $\mu$ l Urin mit 50  $\mu$ l Phosphorsäure (85%) versetzt und einer Festphasenextraktion unterzogen (vgl. 6.2.1.3). Die enzymatische Spaltung der Proben erfolgte durch Inkubation von 500  $\mu$ l Urin, 300  $\mu$ l Natriumacetat-Puffer (pH 5,0; 0,15 M) und jeweils 1 mg  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase bei 37°C. Die Reaktion wurde nach 2 h durch Zugabe von 200  $\mu$ l Phosphorsäure (85%) gestoppt, die Probe nach Zentrifugation (3000 g, 5 min)

mittels Festphasenextraktion aufgereinigt (vgl. 6.2.1.3). Die Proben wurden nach der SPE-Behandlung in 500  $\mu\text{l}$  Methanol gelöst und in Abhängigkeit der jeweiligen Sammelfraktion verdünnt, um den Konzentrationsbereich der detektierten Substanzen in den Kalibrationsbereich der GC/MS-Methode zu verschieben: Proben der Urinfraction 1 (0–8 h) wurden dabei 1:60 und Proben der Urinfraction 2 (8–24 h) 1:10 mit Methanol verdünnt; Proben der Basalwerte wurden unverdünnt eingesetzt. 30  $\mu\text{l}$  dieser Lösungen wurden dann nach Zugabe des internen Standards und Derivatisierung mittels GC/MS analysiert (vgl. 6.2.1.6), wobei stets die phenolischen Säuren VS, PCS, SS und als Kontrollwert 2,4-Dihydroxybenzoesäure quantifiziert wurden. Traten Glycin-Addukte auf, wurden diese – aus Mangel an Referenzsubstanzen – mit den Kalibriergeraden der freien Form quantifiziert. Die Wiederfindung ohne enzymatische Umsetzung lag – wie oben erwähnt – bei  $(88\pm 7)$  bzw. in Gegenwart von Enzymen bei  $(81\pm 4)\%$ .

### *Plasma*

Das durch Zentrifugation des Vollblutes gewonnene Plasma wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Plasma-Proben der Anthocyan-supplementierten Ratten und ihrer Kontrolltiere wurden auf Anthocyane und phenolische Säuren untersucht. Zur Anthocyan-Analytik wurden 1 ml Plasma mit 100  $\mu\text{l}$  Phosphorsäure (85%) versetzt, nach Zentrifugation (3000 g, 5 min) und Festphasenextraktion (vgl. 6.2.1.3) in 120  $\mu\text{l}$  TFA (1%, v/v) angelöst und mittels HPLC analysiert (Injektionsvolumen: 100  $\mu\text{l}$ ). Die Untersuchung auf phenolische Säuren fand nur ohne enzymatische Spaltung statt, da es bei Zugabe der Aluminium-Lösung zu einer Niederschlags- und Gelbfärbung der Probe kam. Es wurden 800  $\mu\text{l}$  Plasma mit 80  $\mu\text{l}$  Phosphorsäure (85%) versetzt und nach einer SPE-Aufreinigung (vgl. 6.2.1.3) und Lösen in 100  $\mu\text{l}$  Methanol in Gegenwart des internen Standards derivatisiert und gaschromatographisch analysiert (vgl. 6.2.1.6).

Das Plasma der Phenolsäure-supplementierten Ratten wurde mit und ohne Enzym-Spaltung untersucht. Die Aufarbeitung ohne enzymatischen Zusatz fand wie für die Anthocyan-supplementierten Ratten beschrieben statt. In Gegenwart von jeweils 1 mg  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase wurden 800  $\mu\text{l}$  Plasma unter Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  Natriumacetat-Puffer für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion mit 150  $\mu\text{l}$  Phosphorsäure (85%), Zentrifugation (3000 g, 5 min) und SPE-Aufreinigung (vgl. 6.2.1.3) wurden 30  $\mu\text{l}$  der in 200  $\mu\text{l}$  Methanol angelösten Probe mit internem Standard versetzt, derivatisiert und gaschromatographisch analysiert (vgl. 6.2.1.6).

Durch Adsorptionsvorgänge an Plasmaproteine ist die Wiederfindungsrate der Anthocyane von der Lagerdauer des Plasmas abhängig. Während bei sofortiger Analyse von zugesetztem Cy3glc Wiederfindungen von  $(76\pm 4)\%$  erreicht wurden, sanken diese Werte unter der hier aufgrund des Studiendesigns nötigen Lagerungszeit von mindestens 12 Stunden auf  $(38\pm 6)\%$ .

Die Wiederfindungsrate von PCS zeigte keine Affinität zu Proteinen und keine zeitliche Abhängigkeit und lag bei  $(83\pm 3)\%$ .

### *Fäzes*

Es wurden nur die Fäzes-Proben der Cy3glc- und Malvin-supplementierten Ratten untersucht. Hierzu wurden die beiden Sammel-Fraktionen (0–8 h, 8–24 h) zunächst gewogen (Fraktion 1: 4,8–18,5 g; Fraktion 2: 25,6–44,5 g) und separat im Stomacher homogenisiert. Wegen der fraglichen Homogenität aufgrund des Auftretens dunkel gefärbter, stark zusammenhängender „Plaques“ wurden jeweils drei Aliquote dieser Homogenisate (ca. 0,15 g für Fraktion 1 und ca. 0,35 g für Fraktion 2) anschließend getrennt und unabhängig mit 2 ml Methanol, das 1% Salzsäure enthielt (v/v), versetzt, mit einem konisch zulaufenden Stößel mechanisch und anschließend 30 min im Ultraschallbad bearbeitet. Dieser Vorgang wurde insgesamt vier Mal wiederholt. Nach Reduktion der organischen Phasen in der Evaporatorzentrifuge bis zur Trockene wurden die Proben in 200  $\mu\text{l}$  (Fraktion 1) bzw. 100  $\mu\text{l}$  (Fraktion 2) TFA (1%, v/v) angelöst und mit den HPLC-Systemen 1 und 2 analysiert (Injektionsvolumen: 50  $\mu\text{l}$ ) (vgl. 6.2.1.5). Wiederfindungen dieser Methode wurden durch Zugabe von Cy3glc zu Fäzes-Aliquoten der Kontrolltiere bestimmt und lagen aufgrund von Wechselwirkungen der Anthocyane mit Fäzesbestandteilen nur bei  $(50\pm 9)\%$ .

### *Organe*

Auch hier wurden nur die Organe (Leber, Niere, Magen, Dünn- und Dickdarm) der Anthocyan-supplementierten Ratten untersucht, wobei nach der Massenbestimmung zunächst eine Homogenisierung mit dem Ultra-Turax bei 8000 U/min stattfand, während der es auch zu einem ersten, groben Aufschluss der Zellen kam. Anschließend wurden Aliquote dieses Homogenates zum weiteren Aufschluss mit ca. der vierfachen Menge (v/m) 1 M HCl, die 0,5% Triton-X enthielt, versetzt und für 45 min einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Die Extraktion der Anthocyane erfolgte wie unter 6.2.1.4 beschrieben mit vier Mal 2 ml Butanol. Die vereinten organischen Phasen wurden in der Evaporatorzentrifuge bis zur Trockene reduziert, in 200  $\mu\text{l}$  TFA (1%, v/v) angelöst und flüssigchromatographisch analysiert (Injektionsvolumen: 100  $\mu\text{l}$ ). Wiederfindungen dieser Methode wurden durch Zugabe von Cy3glc zu Organ-Aliquoten der Kontrolltiere in Einfachmessungen bestimmt und lagen bei 51% (Leber), 57% (Niere), 55% (Magen), 43% (Dünndarm) bzw. 46% (Dickdarm).

## **Auswertung**

### *Allgemein*

Von den zu den einzelnen Tieren bestimmten Analysenwerten wurden die Mittelwerte der Kontrolltiere abgezogen. Die dadurch entstehenden Differenzen für jedes einzelne Tier als

Absolutmenge (in mol) wurden dann zu der verabreichten Stoffmenge der Substanz in Bezug gesetzt, wodurch zum einen die Bioverfügbarkeiten bestimmt, zum anderen aber auch die Ratten, denen unterschiedliche Mengen verabreicht wurden, verglichen werden konnten. Diese Werte wurden schließlich zu einem Mittelwert mit Standardabweichung zusammengefasst. Da die 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure sowie die Glycinaddukte der PCS und VS kommerziell nicht erhältlich waren, wurde die Quantifizierung als VS bzw. freie PCS und VS vorgenommen. Analog wurden Peonidin- und Cyanidin-monoglucuronid als Peo3glc bzw. Cy3glc quantifiziert.

#### Fäzes

Je Ratte und Sammelfraktion (Leerwert, 0–8 h, 8–24 h) wurden drei Proben analysiert. Aus diesen Werten wurden Mittelwerte mit Standardabweichung berechnet. Diese Mittelwerte der verschiedenen Ratten wurden dann zu einem Mittelwert aller Ratten zusammengefasst, die Standardabweichung mittels Fehlerfortpflanzung berechnet. Die Gesamtwiederfindung ergab sich dann aus der Summe der verschiedenen Sammelfraktionen und der Metabolite, wobei sich die Standardabweichung wiederum über die Fehlerfortpflanzung errechnete.

### 6.2.4.2 Humanversuch

#### Studiendesign

Da die Isolierung großer Mengen reiner und isolierter Anthocyane sehr schwierig ist, wurde der hier durchgeführte Humanversuch als Placebo-kontrollierte Pilotstudie mit zwei gesunden Probanden konzipiert:

Proband	Geschlecht	Alter [Jahre]	KG [kg]	BMI [ $\frac{kg}{m^2}$ ]
A	männlich	27	80	22,2
B	männlich	27	71	22,9

Die Studie begann mit einer dreitägigen Depletionsphase, in der auf flavonoid- und phenolsäurehaltige Lebensmittel verzichtet wurde. Die tägliche Nahrungsaufnahme bestand aus:

- 500 g Baguette
- 180 g Hartweizennudeln (ohne Eier)
- Mineralwasser *ad libitum*

Am Versuchstag selbst wurde nur Baguette und Mineralwasser konsumiert. Der Versuch begann in nüchternem Zustand mit der Sammlung des Urin-Basalwertes, zwei Stunden nach der Verrichtung des Morgenurins. Als Anthocyan wurde wie im Tierversuch Cy3glc verabreicht,

das ebenfalls mittels CCC aus Brombeeren isoliert (vgl. 6.2.1.2) und dessen Reinheit, wie dort beschrieben, bestimmt wurde. Die zugeführten Cy3glc-Mengen lagen im ernährungsrelevanten Bereich (vgl. 1.7.1) und wurden wie folgt verabreicht:

Proband	$m_{Cy3glc}$ [mg]	$n_{Cy3glc}$ [mol]	Applikationsform
A	201,8	449100	oral, gelöst in Wasser
B	227,1	505700	oral, in Weichgelatine kapseln

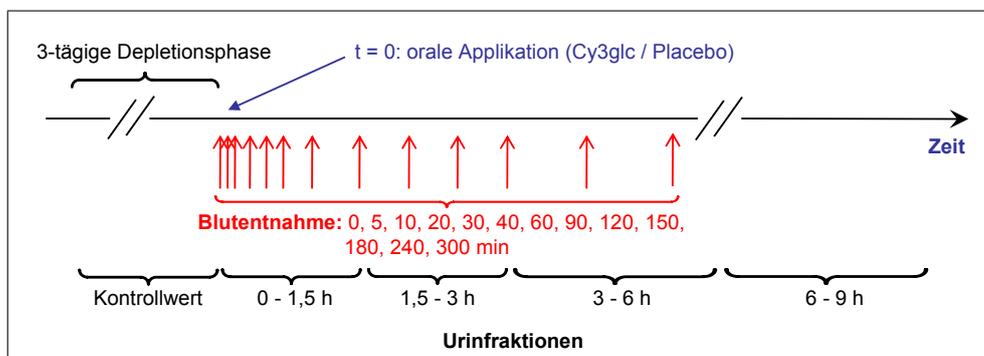
Bis eine Stunde nach Aufnahme der Anthocyane wurde auf die Aufnahme anderer Nahrungsmittel verzichtet. Mineralwasser stand die ganze Zeit zur freien Verfügung.

Unmittelbar vor Aufnahme des Anthocyan und nachfolgend zu den in Tabelle 6.20 angegebenen Zeitpunkten erfolgte die Entnahme von je  $2 \times 9$  ml, zu den mit \* gekennzeichneten Zeitpunkten von  $3 \times 9$  ml Blut. Die Blutentnahme wurde über einen Verweilkatheder ermöglicht, die Blutgerinnung durch EDTA unterbunden. Urinwerte wurden für die angegebenen Sammelperioden bestimmt (Tab. 6.20).

**Tabelle 6.20:** Zeitplan der Blutabnahme und Urinsammlung im Humanversuch

Matrix	Zeitpunkte der Probennahme
Blut	0*, 5, 10, 20*, 30, 40*, 60*, 90, 120*, 150, 180*, 240*, 300* min
Urin	Basalwert; 0 bis 1,5 h; 1,5 bis 3 h; 3 bis 6 h; 6 bis 9 h

Zwei Monate nach Durchführung des Versuchs fand die Placebo-Kontrollstudie statt, bei der statt in Wasser gelöstem Cy3glc reines Wasser und statt mit Cy3glc befüllter Weichgelatine kapseln leere Kapseln aufgenommen wurden. Abbildung 6.68 fasst das Studiendesign zusammen.



**Abbildung 6.68:** Studiendesign des Humanversuchs

## Analytik

### Urin

Nach Bestimmung des Volumens und des Kreatiningehaltes wurde der Urin unmittelbar nach der Sammlung fraktionsweise aliquotiert, und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Um starke Verdünnungseffekte durch sehr unterschiedliche Volumina in den einzelnen Urinfraktionen (45–805 ml) auszugleichen, wurden die konzentrierteren Fraktionen mit geringem Volumen und hohen Kreatininkonzentrationen vor der weiteren Aufarbeitung in etwa auf die Kreatininkonzentration der Fraktion mit dem geringsten Kreatininwert mit Wasser verdünnt.

Zur Aufreinigung mittels Festphasenextraktion für die Anthocyan-Analytik wurden 5 ml mit 500  $\mu\text{l}$  Phosphorsäure (85%) versetzt und nach Zentrifugation (3000 g, 5 min) wie unter 6.2.1.3 beschrieben behandelt. Nach Anlösen in 125  $\mu\text{l}$  TFA (1%, v/v) erfolgte die Analyse mittels HPLC/DAD und HPLC/MS (Injektionsvolumen: 100  $\mu\text{l}$ ). Zur Identifizierung der gefundenen Metabolite wurden neben Retentionszeiten- und Absorptionsspektrenvergleichen auch Cochromatographieuntersuchungen durch Aufstocken der Lösungen mit vermuteten Substanzen vorgenommen. Darüber hinaus wurde die Fraktion der interessierenden Substanzen oder einzelne Peaks durch wiederholte (10fache) HPLC-Analyse und Auffangen der Lösung im betreffenden Zeitfenster gesammelt. Nach Entfernen des Lösungsmittels an der Evaporatorzentrifuge wurde der trockene Rückstand in 125  $\mu\text{l}$  TFA (1%, v/v) aufgenommen und mit Hilfe von LC-MS-Messungen (Injektionsvolumen: 100  $\mu\text{l}$ ) bei zwei verschiedenen Fragmentorspannungen (100 und 200 V) gemessen. Wiederfindungen dieser Methode wurden durch Zugabe von Cy3glc zu Urinproben des Basalwertes bestimmt und lagen bei  $(76\pm 4)\%$ .

Die Phenolsäure-Analytik mittels GC/MS erfolgte mit und ohne enzymatische Spaltung der erwarteten Phase-II-Metabolite. Ohne Zugabe spaltender Enzyme wurden 5 ml Urin in Analogie zur Anthocyan-Analyse aufgearbeitet und nach der Festphasenextraktion in 200  $\mu\text{l}$  MeOH aufgenommen. Ein 30  $\mu\text{l}$ -Aliquot wurde dann mit internem Standard versetzt, im  $\text{N}_2$ -Strom zur Trockene eingengt und nach Derivatisierung mit 30  $\mu\text{l}$  BSTFA gaschromatographisch analysiert (vgl. 6.2.1.6). Die Wiederfindung lag bei  $(89\pm 4)\%$ .

Bei der Analyse der Phenolsäuren nach enzymatischer Spaltung wurden 5 ml Urin mit 3 ml Natriumacetat-Puffer (pH 5,0; 0,15 M), jeweils 3 mg  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase und 1,3 ml Aluminiumnitrat-Lösung (2 M in Wasser) zur Verhinderung der Spaltung der Anthocyan-Glucoside und -Glucuronide versetzt und 2 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1000  $\mu\text{l}$  Phosphorsäure (85%) gestoppt und mittels Festphasenextraktion aufgearbeitet (vgl. 6.2.1.3). Alle weiteren Schritte entsprachen denen der Analyse ohne enzymatische Spaltung, wobei die Wiederfindungsrate bei  $(73\pm 7)\%$  lag.

## Plasma

Unmittelbar nach Blutentnahme wurde das Vollblut bei 4°C mit 1850 g für 10 min zentrifugiert und das im Überstand gewonnene Plasma für weitere Aufreinigungsschritte aliquotiert und sofort weiter aufgearbeitet. Während die Anthocyane in allen gewonnenen Plasmawerten bestimmt wurden, beschränkte sich die Analyse der phenolischen Säuren auf die Werte zu den Zeitpunkten: 0, 20, 40, 60, 120, 180, 240 und 300 min.

Zur Anthocyan-Analytik wurden jeweils 4 ml Plasma mit 400 µl Phosphorsäure (85%) versetzt und nach Zentrifugation (3000 g, 5 min) einer Festphasenextraktion (vgl. 6.2.1.3) unterzogen. Die Proben wurden danach in 125 µl TFA (1%, v/v) angelöst und mittels HPLC-Testsystem 1 (HPLC/DAD) und 2 (HPLC/MS) analysiert (Injektionsvolumen: 100 µl). Da die Adsorption an Plasmaproteine die Wiederfindungsrate v.a. mit längerer Lagerzeit verringert, wurden die Proben sofort aufgearbeitet, so dass Wiederfindungsraten von (73±6)% erreicht wurden, die jedoch die schon im Körper gebundenen Anthocyane nicht erfasst.

Die Phenolsäure-Analytik fand mit 3 ml Plasma statt, das in analoger Weise nach Ansäuern mit 300 µl Phosphorsäure (85%) und Zentrifugation mittels Festphasenextraktion gereinigt und aufkonzentriert wurde. Nach Lösen in 100 µl MeOH wurden 80 µl entnommen, mit internem Standard versetzt, im N<sub>2</sub>-Strom zur Trockene eingengt und nach Derivatisierung mit 30 µl BSTFA gaschromatographisch analysiert (vgl. 6.2.1.6). Die PCS hatte eine Wiederfindungsrate von (73±4)%. Die Analyse des Plasmas nach enzymatischer Spaltung unter Zugabe einer Aluminium-Lösung zur Verhinderung der Anthocyan-Glucosid/Glucuronid-Spaltung konnte nicht durchgeführt werden, da es bei Zugabe der Aluminium-Lösung zu einer Niederschlags- und Gelbildung der Probe kam.

## Auswertung

### *Allgemeines*

Anthocyan-Derivate, zu denen keine Referenzsubstanzen kommerziell zu beziehen waren (Peonidin-/Cyanidin-monoglucuronid) und nicht identifizierte Substanzen mit Anthocyanartigen Spektren wurden bei der Quantifizierung als Cy3glc-Äquivalente behandelt. Die Auswertung erfolgte stets – im Plasma und im Urin, für Anthocyane wie auch für die Phenolsäuren – durch Abzug der Placebo-Werte von den entsprechenden Werten des Versuchs nach Aufnahme von Cy3glc.

### *Plasma*

Durch Auftragen der zu den definierten Zeitpunkten gemessenen Plasma-Konzentrationen gegen die Zeit erhält man den Konzentrationsverlauf der betreffenden Substanz über die Versuchsdauer. Die Fläche unter der Kurve (berechnet mit Hilfe der Auswertesoftware *SigmaPlot*) gibt die im Plasma gefundene Gesamtkonzentration über den Zeitraum an. Um

Rückschlüsse auf eine Absolutmenge zu bekommen und damit eine Kalkulation der im Plasma wiedergefundenen Menge Cy3glc vornehmen zu können, muss die Plasma-Menge im Körper bekannt sein. Diese lässt sich über das Körpergewicht (KG) und den im Blut bestimmten Hämatokrit-Wert (Hkt) für männliche Probanden nach folgender Formel berechnen:

$$V_{Plasma}[l] = \left(0,041 \times KG[kg] + 1,53\right) \left(1 - \frac{Hkt}{100}\right)$$

Multipliziert man das so errechnete Plasmavolumen mit der aus der Fläche erhaltenen Substanz-Gesamtkonzentration, erhält man die im Plasma detektierte Gesamtstoffmenge der untersuchten Substanz. Diese kann dann mit der verabreichten Stoffmenge in Bezug gesetzt werden.

## 6.2.5 Antioxidativitäts-Assays

### 6.2.5.1 TEAC-Assay

Der ursprüngliche TEAC-Assay (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay*) von Miller et al. [398] beruht auf der photometrischen Bestimmung der Verhinderung einer Radikalbildungsreaktion aus ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) Diammoniumsalz, vgl. Abb. 6.69) durch ein Antioxidans.

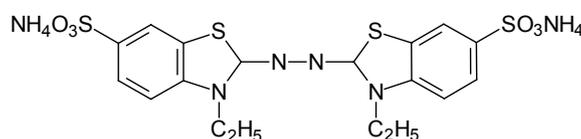


Abbildung 6.69: Strukturformel von ABTS

Da aber die Radikalbildung über komplexe Reaktionsabläufe erfolgt, kann das eingesetzte Antioxidans nicht nur mit dem ABTS-Radikal, sondern auch mit anderen Komponenten reagieren, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert. Bei der hier durchgeführten modifizierten Form nach Re et al. [268] wurde daher zunächst das türkisfarbene ( $\lambda_{max}=735$  nm) ABTS-Radikal vor der eigentlichen Reaktion generiert (vgl. Abb. 6.70), indem eine wässrige Lösung von 1,75 mM ABTS über Nacht bei RT mit einer 0,61 mM Lösung von Kaliumperoxodisulfat inkubiert und max. sieben Tage nach der Herstellung verwendet wurde. Von dieser Stammlösung wurde täglich eine Verdünnung mit einer Extinktion von 0,70 ( $\pm 0,2$ ) hergestellt.

Bei der Reaktion des ABTS-Radikals mit Antioxidantien wie z.B. phenolischen Verbindungen findet eine H-Abstraktion statt [268, 399]. Das reduzierte ABTS-Molekül zeigt keine Absorption bei der Messwellenlänge. Weitere Reaktionen zu radikalischen und nicht-radikalischen Produkten werden angenommen, sind aber noch nicht aufgeklärt (vgl. Abb. 6.70).

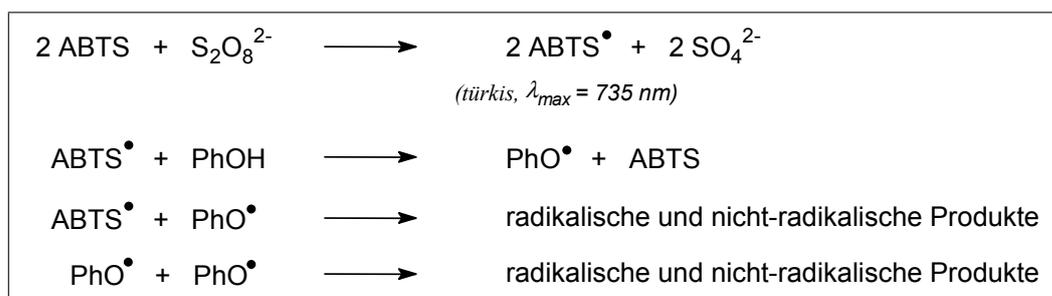


Abbildung 6.70: Prinzip des TEAC-Assays nach [268, 399]

Die Extinktionsabnahme in Abhängigkeit von der Konzentration des Antioxidans und der Reaktionszeit wird zur Berechnung der antioxidativen Kapazität herangezogen. Trolox dient als Referenz.

Die Reaktionsansätze wurden auf Mikrotiterplatten pipettiert und setzten sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	Menge
verdünnte ABTS-Radikal-Lösung	300 $\mu\text{l}$
Probelösung (in entsprechender Konzentration)	30 $\mu\text{l}$

Die Probelösung wurde auf einer Mikrotiterplatte vorgelegt (Mittelwertbildung aus drei Messungen), der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe des bei 37°C vorinkubierten ABTS<sup>•</sup>-Reagenzes. Die Reaktion wurde bei 37°C durchgeführt.

Bei den Kinetik-Messungen erfolgte die Extinktionsbestimmung zu folgenden Zeitpunkten: 15 s, 30 s, 45 s, 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 40 min, 50 min und 60 min. Zur Auswertung wurde der Prozentsatz der Ausgangskonzentration berechnet. Zur quantitativen Auswertung wurde nach den Ergebnissen der Kinetik-Untersuchungen der TEAC-Wert nach 40 min berechnet. Der TEAC-Wert ist definiert als die Trolox-Konzentration (in mmol/l), die die äquivalente Kapazität besitzt wie 1 mmol/l der untersuchten Substanz [398]. Je größer also der TEAC-Wert, desto höher die antioxidative Kapazität. Bei jeder Messung lief zur Kalibrierung eine Trolox-Standardreihe (10–250  $\mu\text{M}$ ) mit. Berechnet man anhand der für Trolox erhaltenen Kalibriergeraden die äquivalenten Trolox-Konzentrationen für die entsprechend eingesetzten Konzentrationen der zu testenden Substanzen (s. Tab. 6.21) und trägt diese gegen die Konzentration auf, so erhält man Geraden. Aus den durch lineare Regression erhaltenen Geradengleichungen lassen sich dann die zu 1 mmol/l der jeweiligen Substanz äquivalenten Trolox-Konzentrationen (TEAC-Wert) berechnen. Die kalkulierten TEAC-Werte stellen Mittelwerte aus jeweils mindestens fünf unabhängigen Messungen dar.

Tabelle 6.21: Eingesetzte Probenkonzentrationen im TEAC-Assay

Substanz	Konzentration der Lösung [ $\mu\text{M}$ ]	Konzentration im Reaktionsansatz [ $\mu\text{M}$ ]
Trolox	10 / 50 / 100 / 200 / 250	0,91 / 4,55 / 9,09 / 18,18 / 22,73
ASC	10 / 50 / 100 / 150 / 200	0,91 / 4,55 / 9,09 / 13,64 / 18,18
FS	10 / 25 / 50 / 75 / 100	0,91 / 2,27 / 4,55 / 6,82 / 9,09
SS	10 / 25 / 50 / 100 / 150	0,91 / 2,27 / 4,55 / 9,09 / 13,64
Cy	1 / 5 / 10 / 25 / 40	0,09 / 0,45 / 0,91 / 2,27 / 3,64
Cy3glc	5 / 10 / 20 / 30 / 40	0,45 / 0,91 / 1,82 / 2,73 / 3,64
Peo	1 / 5 / 10 / 25 / 50	0,09 / 0,45 / 0,91 / 2,27 / 4,55
Peo3glc	5 / 10 / 20 / 30 / 40	0,45 / 0,91 / 1,82 / 2,73 / 3,64
PCS	10 / 25 / 50 / 100 / 150	0,91 / 2,27 / 4,55 / 9,09 / 13,64
VS	10 / 25 / 50 / 100 / 150	0,91 / 2,27 / 4,55 / 9,09 / 13,64

Die Ascorbinsäure- und Anthocyanstammlösungen wurden vor der Messung frisch hergestellt. Die restlichen Stammlösungen wurden im Gefrierschrank gelagert und vor der Verwendung zu o.g. Konzentrationen verdünnt.

### 6.2.5.2 FRAP-Assay

Auch der von Benzie & Strain [400] entwickelte und von Pulido et al. [401] modifizierte FRAP-Assay (*Ferric Reducing Activity of Plasma Assay* bzw. *Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay*) wurde auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Reaktion beruht auf der  $\text{Fe}^{3+}$ -reduzierenden Aktivität einer antioxidativ wirksamen Substanz, die im  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -Tripyridyltriazin(TPTZ)-Redoxsystem durch einen farbigen Eisenkomplex sichtbar gemacht wird: Während der  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ-Komplex bräunlich ist, besitzt der  $\text{Fe}^{2+}$ -Komplex eine blaue Farbe, deren Bildung photometrisch bei 585 nm verfolgt werden kann (vgl. Abb.6.71).

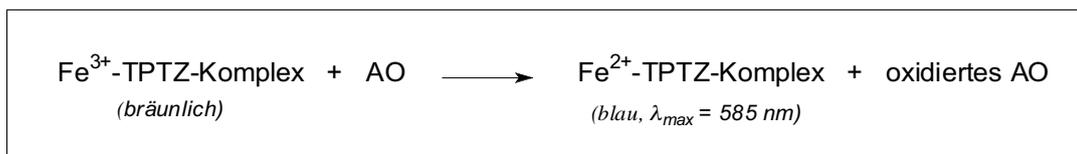


Abbildung 6.71: Prinzip des FRAP-Assays (AO=Antioxidans)

Die Extinktionszunahme in Abhängigkeit von der Konzentration des Antioxidans und der Reaktionszeit wird zur Berechnung der antioxidativen Kapazität herangezogen. Die  $\text{Fe}^{3+}$ -reduzierende Aktivität der Testsubstanzen wird mit der von Referenzsubstanzen (Trolox, ASC und FS) verglichen.

Die Reaktionsansätze bestanden aus folgenden Komponenten:

Reagenzien	Menge
bidest. $\text{H}_2\text{O}$	30 $\mu\text{l}$
Probelösung bzw. $\text{H}_2\text{O}$ als Reagenzienblindwert	10 $\mu\text{l}$

Die Probelösung und das Wasser wurde auf einer Mikrotiterplatte vorgelegt (Mittelwertbildung aus drei Messungen), der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 300  $\mu\text{l}$  des bei  $30^\circ\text{C}$  vorinkubierten FRAP-Reagenzes, das sich wie folgt zusammensetzt:

Reagenzien	Menge
Acetat-Puffer (pH 3,6)	25 ml
TPTZ (10 mM in 40 mM HCl)	2,5 ml
$\text{FeCl}_3$ (20 mM in $\text{H}_2\text{O}$ )	2,5 ml

Die Reaktion wurde bei einer Temperatur von  $30^\circ\text{C}$  durchgeführt.

Zunächst wurde wiederum die Reaktionskinetik untersucht. Dazu wurden Messungen nach 4, 10, 20, 30, 60 und 90 min vorgenommen. Die Auswertung erfolgte über die Extinktionswerte zu den jeweiligen Zeitpunkten.

Zur quantitativen Auswertung wurde nach den Ergebnissen der Kinetik-Untersuchungen als Messzeitpunkte 10 und 60 min festgelegt. Die Auswertung erfolgte über den Vergleich mit einer  $\text{Fe}(\text{II})$ -sulfat-Lösung. Hierzu wurde zunächst eine Kalibriergerade im Konzentrationsbereich von 100 bis 1750  $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  erstellt, bei der die gemessene Absorption gegen die Konzentration aufgetragen wurde. Die Lösungen wurden in bidest.  $\text{H}_2\text{O}$  angesetzt.

Von den zu untersuchenden Substanzen wurden je nach Reaktivität die in Tabelle 6.22 aufgeführten Konzentrationen eingesetzt, so dass die resultierende Absorption der Messlösungen im Bereich der Kalibriergeraden lag. Auch hier wurden die Ascorbinsäure- und Anthocyanstammlösungen vor der Messung frisch hergestellt. Die restlichen Stammlösungen wurden im Gefrierschrank gelagert und vor der Verwendung entsprechend verdünnt.

Als Vergleichsgröße wird die *Equivalent Concentration 1* ( $\text{EC}_1$ ) berechnet. Die  $\text{EC}_1$  ist definiert als die Konzentration eines Antioxidans, die eine  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ-reduzierende Fähigkeit

**Tabelle 6.22:** Eingesetzte Probenkonzentrationen im FRAP-Assay

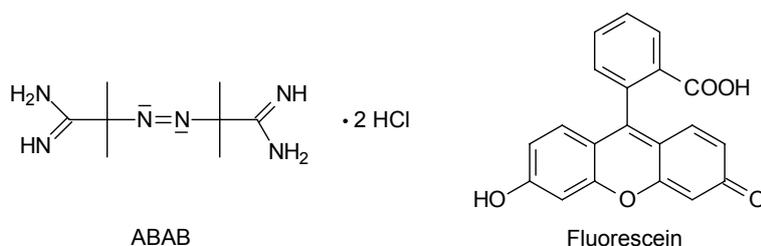
Substanz	Konzentration der Lösung [ $\mu\text{M}$ ]	Konzentration im Reaktionsansatz [ $\mu\text{M}$ ]
FeSO <sub>4</sub>	100 / 250 / 500 / 750 / 1000 / 1500 / 1750	2,94 / 7,35 / 14,71 / 22,06 / 29,41 / 44,12 / 50,75
Trolox	10 / 50 / 100 / 200 / 400 / 600	0,29 / 1,47 / 2,94 / 5,88 / 11,76 / 17,65
ASC	10 / 50 / 100 / 200 / 400 / 600 / 800	0,29 / 1,47 / 2,94 / 5,88 / 11,76 / 17,65 / 23,53
FS	50 / 100 / 250 / 500 / 750 / 1000	1,47 / 2,94 / 7,35 / 14,71 / 22,06 / 29,41
SS	50 / 100 / 200 / 300 / 400 / 500	1,47 / 2,94 / 5,88 / 8,82 / 11,76 / 14,71
Cy	5 / 25 / 50 / 100 / 250	0,15 / 0,74 / 1,47 / 2,94 / 7,35
Cy3glc	5 / 10 / 25 / 50 / 100 / 200	0,15 / 0,29 / 0,74 / 1,47 / 2,94 / 5,88
Peo	5 / 25 / 50 / 100 / 250 / 350	0,15 / 0,74 / 1,47 / 2,94 / 7,35 / 11,29
Peo3glc	5 / 10 / 25 / 50 / 100 / 250 / 500	0,15 / 0,29 / 0,74 / 1,47 / 2,94 / 7,35 / 14,71
PCS	10 / 25 / 50 / 100 / 200	0,29 / 0,74 / 1,47 / 2,94 / 5,88
VS	100 / 250 / 500 / 1000 / 2000 / 3500 / 5000	2,94 / 7,35 / 14,71 / 29,41 / 58,82 / 102,94 / 147,06

besitzt, die 1 mM FeSO<sub>4</sub> entspricht [401]. Je kleiner also der EC<sub>1</sub>-Wert einer Substanz, desto höher ist ihre antioxidative Kapazität. Nach Auswertung der Kinetik-Untersuchungen wurde dieser EC<sub>1</sub>-Wert für 10 und 60 min Reaktionszeit bestimmt (EC<sub>1</sub>(10) und EC<sub>1</sub>(60)). Zwischen der Absorption bei 585 nm und der Konzentration bestand bei allen getesteten Substanzen ein linearer Zusammenhang, so dass die 1 mM FeSO<sub>4</sub> entsprechende Konzentration direkt aus der Regressionsgeraden ermittelt werden konnte. Die berechneten EC<sub>1</sub>-Werte stellen Mittelwerte aus jeweils mindestens fünf unabhängigen Messungen dar.

### 6.2.5.3 ORAC-Assay

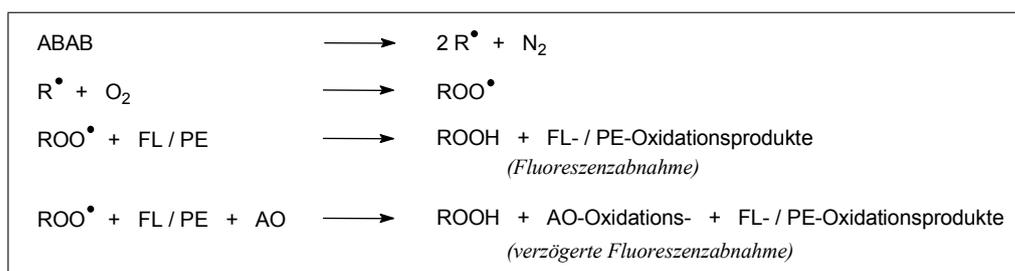
Der ORAC-Assay (*Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay*) ist eine fluorimetrische Methode, mittels derer die Reaktivität von Antioxidantien gegenüber Peroxylradikalen ROO• gemessen wird. Diese gehören zu den häufigsten ROS in biologischen Systemen.

In der ursprünglich von Cao et al. [402–404] beschriebenen Methode wurde R-Phycoerythrin (PE) als fluoreszierendes Indikatorprotein eingesetzt. Da für diesen Fluoreszenzfarbstoff jedoch einige nachteilige Effekte wie Photolabilität, chargenabhängige Fluoreszenzeigenschaften und nicht zuletzt auch eine Wechselwirkung mit Polyphenolen und Proteinen beschrieben sind [274], wurde der hier benutzte ORAC-Assay zusätzlich in der Variante nach Ou et al. [274] mit Fluorescein (FL) (Abb. 6.72) als einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt und die Ergebnisse anschließend gegenüber gestellt.



**Abbildung 6.72:** Strukturformeln von ABAP und Fluorescein

Das Reaktionsprinzip ist für beide Farbstoffe identisch und ist in Abbildung 6.73 dargestellt. Das als Radikalstarter eingesetzte 2,2-Azobis(2-amidinopropan) Dihydrochlorid (ABAP, Abb. 6.72) wird thermolytisch unter Abgabe von  $\text{N}_2$  in Alkylradikale gespalten, die mit gelöstem  $\text{O}_2$  zu Peroxylradikalen reagieren. Diese kontinuierlich gebildeten  $\text{ROO}^\bullet$  reagieren mit dem Fluoreszenzfarbstoff, was zu einer Fluoreszenzabnahme führt, deren Verlauf bis zum vollständigen Fluoreszenzverlust verfolgt wird. In Gegenwart eines Antioxidans, das einen Teil der gebildeten Peroxylradikale abfängt, ist diese Fluoreszenzabnahme verzögert. Das Ausmaß dieser Verzögerung dient als Maß für die antioxidative Wirkung.



**Abbildung 6.73:** Prinzip des ORAC-Assays (AO=Antioxidans)

Bei der Reaktion des antioxidativ wirksamen Agens mit dem Peroxylradikal handelt es sich um einen H-Abstraktionsmechanismus, bei dem ein Wasserstoffatom in erster Linie von den aromatischen Hydroxylgruppen abgespalten wird. Die in der Reaktion von  $\text{ROO}^\bullet$  mit FL entstehenden Reaktionsprodukte wurden von Ou et al. [274] beschrieben.

Der Reaktionsansatz wurde auf Mikrotiterplatten pipettiert, im Platten-Lesegerät gemessen und setzte sich wie folgt zusammen:

- bei Verwendung von PE als Fluoreszenzfarbstoff

Reagenzien	Menge
Probelösung bzw. Puffer als Reagenzienblindwert	15 $\mu\text{l}$
R-Phycoerythrin (15,5 nM in 750 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,0)	250 $\mu\text{l}$
ABAP (275 mM in 750 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,0)	35 $\mu\text{l}$

- bei Verwendung von Fluorescein als Fluoreszenzfarbstoff

Reagenzien	Menge
Probelösung bzw. Puffer als Reagenzienblindwert	15 $\mu\text{l}$
Fluorescein (100 nM in 75 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4)	250 $\mu\text{l}$
ABAP (275 mM in 75 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4)	35 $\mu\text{l}$

Als Messbeginn wurde der Zeitpunkt nach Zugabe des ABAP zum Reaktionsansatz festgelegt, der nach 5-minütiger Vorinkubation der restlichen Reagenzien bei 37°C erfolgt. Die Lösungen der Fluoreszenzfarbstoffe wurde täglich frisch hergestellt. Die ABAP-Lösung wurde jeweils ca. 1,5 h vor Beginn der Messreihe frisch hergestellt und bis zur Verwendung bei RT im Dunkeln gelagert. Die Lösung sollte nicht länger als 7 h verwendet werden, da sich aufgrund von Hydrolysereaktionen die ABAP-Konzentration verändert [405]. Wie bei den beiden anderen Tests auch wurden auch hier die Ascorbinsäure- und Anthocyanstammlösungen vor der Messung frisch hergestellt; die anderen Stammlösungen wurden im Gefrierschrank gelagert und vor der Verwendung zu den in Tabelle 6.23 aufgeführten Konzentrationen verdünnt.

**Tabelle 6.23:** Eingesetzte Probenkonzentrationen im ORAC-Assay

Substanz	Konzentration der Lösung [ $\mu\text{M}$ ]	Konzentration im Reaktionsansatz [ $\mu\text{M}$ ]
Trolox	12,5 / 25,0 / 50,0 / 75,0 / 100,0	0,63 / 1,25 / 2,50 / 3,75 / 5,00
ASC	50 / 100 / 200 / 250	2,50 / 5,00 / 10,00 / 12,50
FS	5 / 10 / 20 / 30	0,25 / 0,50 / 1,00 / 1,50
SS	5 / 10 / 25 / 50	0,25 / 0,50 / 1,25 / 2,50
Cy	2 / 4 / 6 / 8	0,10 / 0,20 / 0,30 / 0,40
Cy3glc	2,5 / 5 / 7,5 / 10	0,13 / 0,25 / 0,38 / 0,50
Peo	2 / 4 / 6 / 8	0,10 / 0,20 / 0,30 / 0,40
Peo3glc	2,5 / 5 / 7,5 / 10	0,13 / 0,25 / 0,38 / 0,50
PCS	5 / 7,5 / 15 / 20	0,25 / 0,38 / 0,75 / 1,00
VS	5 / 10 / 20 / 30	0,25 / 0,50 / 1,00 / 1,50

Die Reaktion fand im auf 37°C temperierten Fluorimeter statt. Die Fluoreszenzintensität wurde im Abstand von 1 min 80 min lang gemessen. Die Messparameter wurden anhand der Absorptions- und Emissionsspektren wie folgt festgelegt:

	<b>R-Phycoerythrin</b>	<b>Fluorescein</b>
Excitationswellenlänge $\lambda_{Ex}$	485 nm	485 nm
Emissionswellenlänge $\lambda_{Em}$	595 nm	535 nm
Slit	3 nm	3 nm
Gain	Optimal	Optimal
Aquisition rate	1 min <sup>-1</sup>	1 min <sup>-1</sup>

Zunächst wurde die Stabilität der beiden Fluoreszenzfarbstoffe sowohl in Gegenwart und Abwesenheit der Testsubstanzen als auch unter Einsatz verschiedener prozentualer Mengen des Lösungsmittels der Stammlösungen, Methanol, untersucht. Anschließend wurden die Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen (Tab. 6.23) eingesetzt.

Durch Darstellung der relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die Messzeitpunkte werden Fluoreszenzintensitätsverläufe erhalten, die die antioxidative Wirkung der eingesetzten Testsubstanzen beschreiben. Zur Quantifizierung dieser Wirkung wurde zunächst die Fläche unter der Kurve (AUC = area under the curve) ermittelt. In dieser Größe werden sowohl Ausmaß als auch Dauer der Verzögerung der Fluoreszenzabnahme erfasst. Wird von der so erhaltenen Fläche die Blindwertfläche unter Verwendung von Puffer anstelle eines Antioxidans abgezogen, ergeben sich die entsprechenden Nettoflächen (*net AUC*):

$$\boxed{\text{net AUC} = \text{AUC}(\text{Probe}) - \text{AUC}(\text{Blind})}$$

Wird die net AUC gegen die Konzentration der in den Assay eingesetzten Probelösungen aufgetragen, so ergeben sich Geraden. Bei jeder Messung lief zur Kalibrierung eine Trolox-Standardreihe (12,5–100  $\mu\text{M}$ ) mit. Berechnet man anhand der für Trolox erhaltenen Kalibriergeraden die äquivalente Trolox-Konzentration für die entsprechend eingesetzten Konzentrationen der zu testenden Substanzen (s. Tab. 6.23) und trägt diese gegen die Konzentration auf, so erhält man – analog zu der TEAC-Wert-Bestimmung – auch hier Geraden. Aus den durch lineare Regression erhaltenen Geradengleichungen lassen sich dann die zu 1 mmol/l der jeweiligen Substanz äquivalenten Trolox-Konzentrationen berechnen. Je größer dieser Wert, desto höher die antioxidative Kapazität. Die kalkulierten Werte stellen Mittelwerte aus jeweils mindestens fünf unabhängigen Messungen dar.

#### 6.2.5.4 Synergismusuntersuchungen

Bei der Durchführung der Synergismusuntersuchungen wurden die beiden Phenolsäuren PCS und VS zusammen mit Cy3glc in verschiedenen, bei den einzelnen Tests näher beschriebenen Konzentrationsverhältnissen in Kombination eingesetzt ( $n = 4$ ) und mit der Summe der für die jeweiligen Konzentrationen in Einzelinkubationen ( $n = 4$ ) ermittelten Werten verglichen. Zur Berechnung der Signifikanz der Abweichungen wurden vier Zufallskombinationen der Einzelinkubations-Werte mit den vier Messwerten der Kombinationsuntersuchung mittels *ungepaarten Student's t-Test* verglichen.

#### 6.2.5.5 Statistische Methoden zur Signifikanzüberprüfung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch Anwendung der Statistik-Software StatView, wobei neben dem *ungepaarten Student's t-Test* zusätzlich die Varianzanalyse (ANOVA) mit dem *Post Hoc Test Games-Howell* für Varianzungleichheit durchgeführt wurde.



# A Anhang

## A.1 Übersichtsdaten

**Tabelle A.24:** Übersicht über verschiedene Humanstudien aus der Literatur zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen

Quelle	n	Dosis	$t_{max}$ (Plasma)	$c_{max}$ (Plasma)	$t_{max}$ (Urin)	% im Urin	Lit.
Beerextrakt	5	345/189/439 mg			2 h	< 0,1%	[333]
Holunderbeerextrakt (12 g)	4	720 mg AC				0,077%/4 h	[227]
Holunderbeerextrakt (12 g)	4	11 mg AC/kg KG	1,1–1,2 h	97 nM		0,055%/8 h	[223]
Holunderbeerextrakt (12 g)	4	720 mg AC	72 min	97 nM	0–2 h	0,055%/24 h	[236]
Holunderbeerextrakt (30 ml)	6	147 mg AC				0,37%/7 h	[237]
Holunderbeerkonzentrat	16	1,9 g AC			1–2 h	0,035%/6 h	[230]
Holunderbeersaft (sprühgetrocknet)	7	500 mg AC			3–4 h	0,01–0,04%	[231]
Heidelbeeren (gefriergetrocknet)	5	1,2 g AC	4 h	11–36 nM			[406]
Heidelbeeren (190 g)	6	690 mg AC				0,004%/6 h	[227]
Johannisbeerkonzentrat	8	3,58 mg AC/kg KG	1,25–1,75h	115 nM	<4 h	0,06–0,11%/8 h	[226]
Johannisbeersaft	17	12 mg AC/kg KG	0,75 h	32–107 nM		0,045–0,072%	[228]
Johannisbeersaft (330 ml)	10	1,04 g AC	1 h	3,5–51 nM	1–1,5 h	0,007–0,133%	[229]
Johannisbeersaft (200 ml)	4	153 mg AC			2 h	0,02–0,05%/5 h	[224]
Johannisbeersaft (137 ml)	6	145 mg AC				0,04%/7 h	[237]
Rotwein (500 ml)	6	68 mg Mal3glc	0,83 h	1,4 nM	< 3 h	0,016%/6 h	[220]
Rotwein (300 ml)	6	218 mg AC			< 6 h	1,5–5,1%/12 h	[66]
Rotwein (400 ml)	9	280 mg AC	1,5 h	32–49 ng/ml	1,5 h	0,18%/7 h	[233]
roter Traubensaft (500 ml)	6	117 mg Mal3glc	2 h	2,8 nM		0,019%/6 h	[220]
roter Traubensaft (400 ml)	9	284 mg AC	0,5 h	337 ng/ml	0,5 h	0,23%/7 h	[233]
Extrakt aus roten Früchten (1,6 g)	12	2,7 mg Cy3glc/kg KG	1 h	29 nM			[218]
Erdbeeren (200 g)	6	84 mg Pel3glc			2–4 h	1,8%/24 h	[316]

**Tabelle A.25:** Anteil verschiedener Metabolite an der verabreichten Menge Cyanidin-3-*O*-glucosid im Tierversuch

	Cy3glc		Peo3glc		Cy-monoglucuronid		Peo-monoglucuronid	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0–8	0,059	0,0338	0,038	0,0128	0,0014	0,00045	0,0086	0,0099
8–24	0,002	0,0007	0,001	0,0002	0,0002	0,0002	0,0005	0,0002

**Tabelle A.26:** Übersichtsdaten aus den Urinwerten des Humanversuchs (Proband A/Proband B)

Metabolit	Leerwert	% der aufgenommenen Menge Cy3glc					Anteil an Gesamt-Anthocyanmenge [%]
		0–1,5 h	1,5–3 h	3–6 h	6–9 h		
Cy3glc	0,0000/0,0000	0,0159/0,0085	0,0055/0,0048	0,0026/0,0016	0,0009/0,0004	33,5/26,9	
Cy-glucuronid	0,0000/0,0000	0,0009/0,0072	0,0033/0,0041	0,0015/0,0018	0,0004/0,0004	19,1/23,9	
Peo3glc	0,0000/0,0000	0,0022/0,0016	0,0024/0,0014	0,0009/0,0005	0,0005/0,0003	8,2/6,2	
Peo-glucuronid	0,0000/0,0000	0,0064/0,0056	0,0050/0,0037	0,0022/0,0014	0,0007/0,0004	19,5/18,3	
Cy	0,0000/0,0000	0,0015/0,0007	0,0005/0,0007	0,0005/0,0002	0,0003/0,0001	3,9/2,7	
Peak 1	0,0000/0,0000	0,0021/0,0015	0,0013/0,0014	0,0018/0,0017	0,0014/0,0017	9,0/10,2	
Peak 2	0,0000/0,0000	0,0010/0,0018	0,0006/0,0018	0,0007/0,0005	0,0003/0,0003	3,5/7,1	
Peak 3	0,0000/0,0000	0,0005/0,0007	0,0003/0,0005	0,0008/0,0008	0,0010/0,0009	3,3/4,7	
<b>Summe</b>	0,0000/0,0000	0,0305/0,0276	0,0189/0,0184	0,011/0,0085	0,0055/0,0045	100/100	

## A.2 Massenspektren

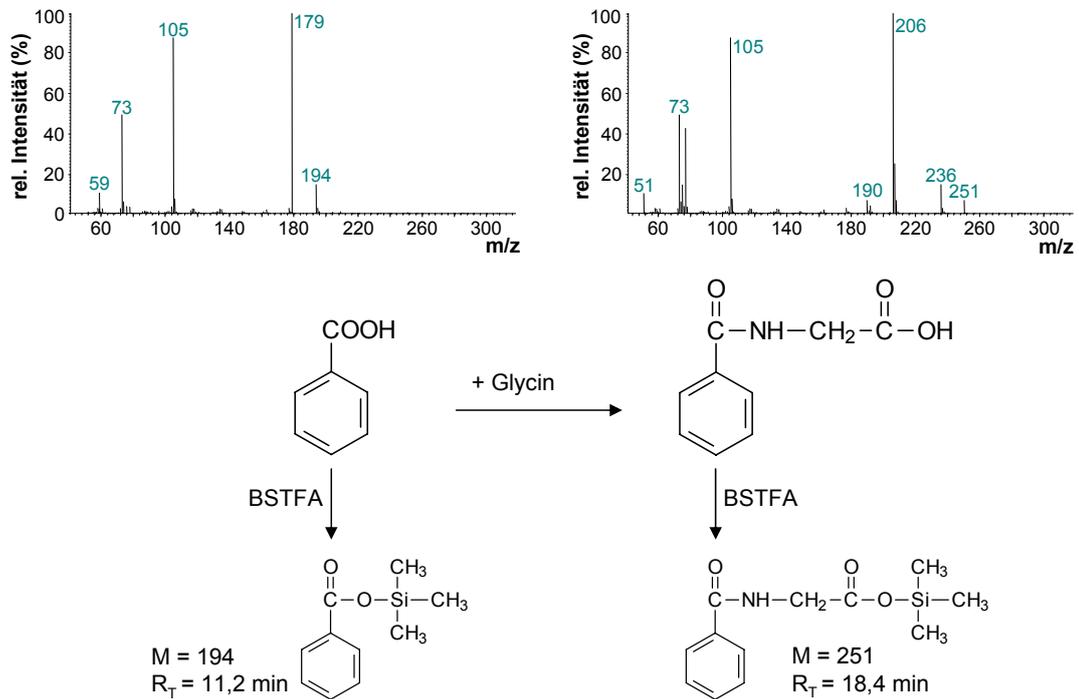


Abbildung A.74: Aminosäure-Konjugation (Glycinaddukt-Bildung) der Benzoesäure zur Hippursäure und die entsprechenden Massenspektren

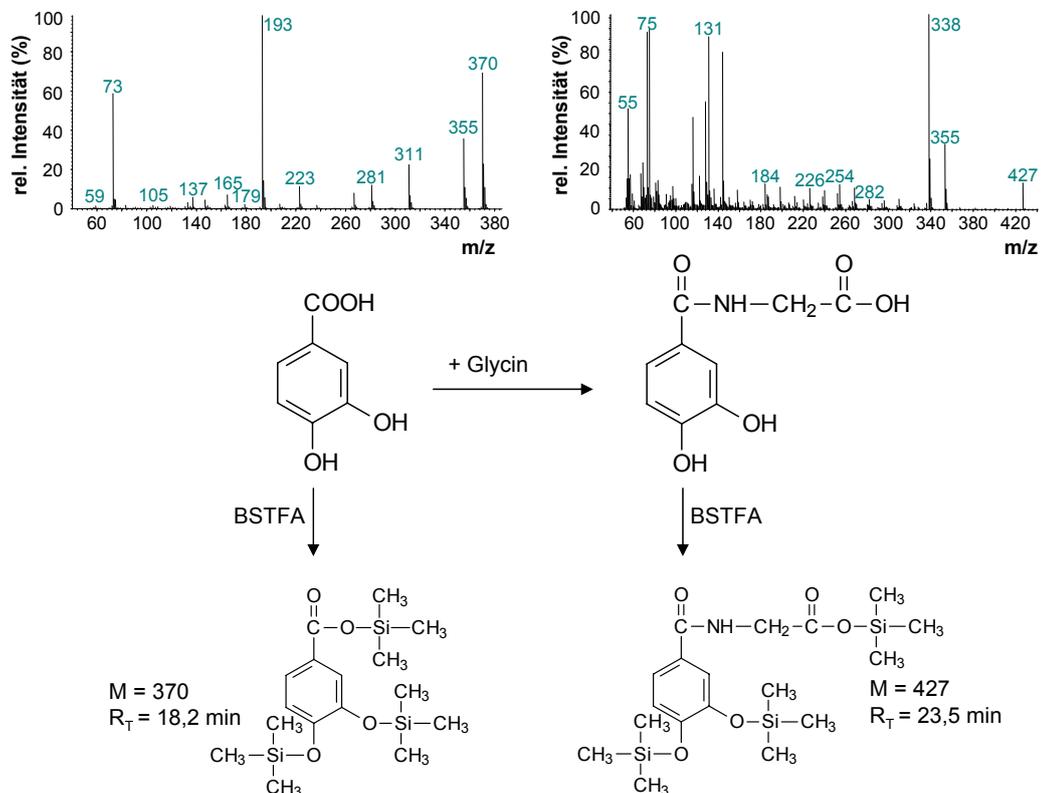
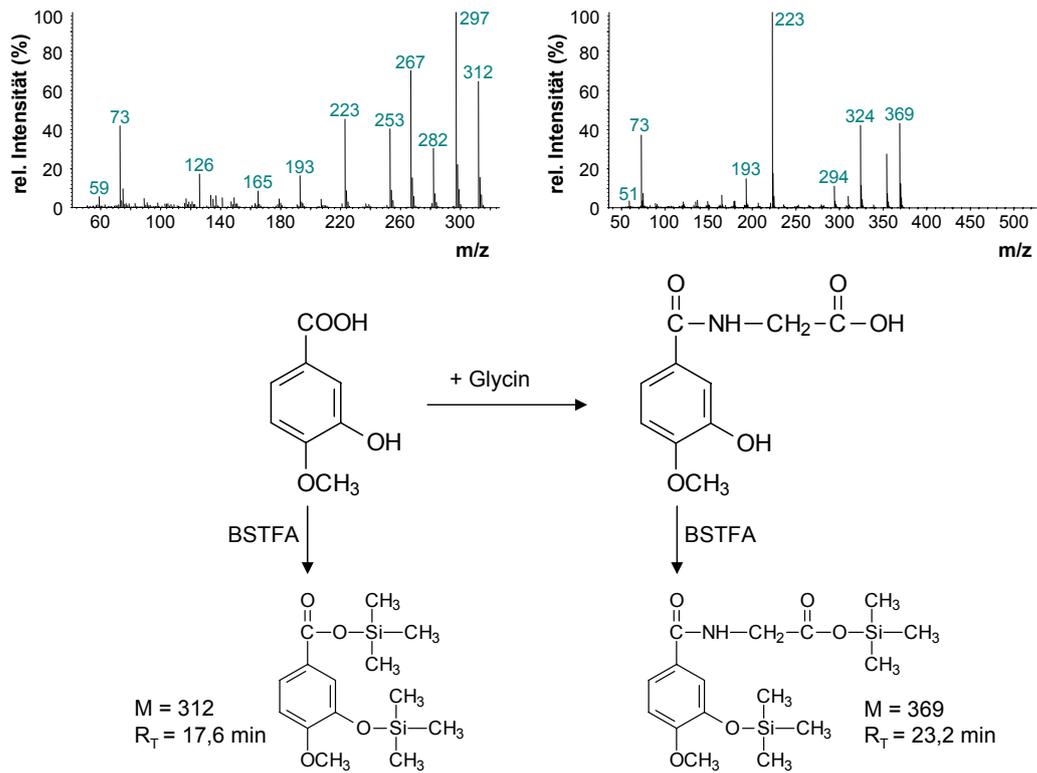


Abbildung A.75: Massenspektrum der Protocatechusäure (links) und des vermuteten Glycinadduktes der Protocatechusäure (rechts) (nach BSTFA-Derivatisierung)



**Abbildung A.76:** Massenspektrum der Vanillinsäure (links) und des vermuteten Glycinadduktes der Vanillinsäure (rechts) (nach BSTFA-Derivatisierung)

## A.3 Sonstiges

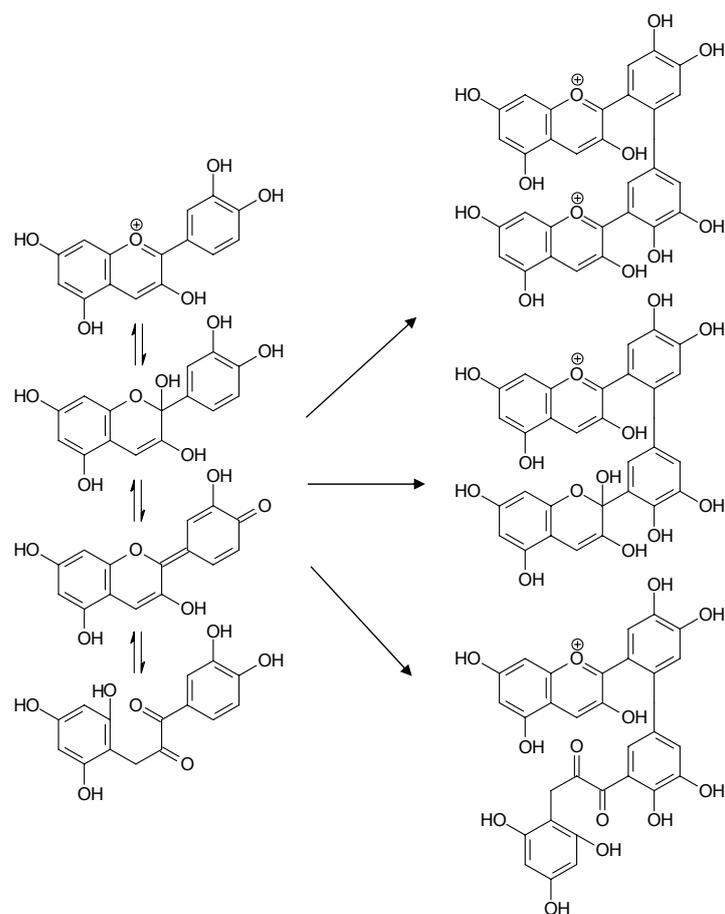


Abbildung A.77: Theorie zur Anthocyan-Dimeren-Bildung aus der chinoiden Form anhand dreier Beispiele

## B Abbildungsverzeichnis

1.1	Strukturformel von Flavan . . . . .	2
1.2	Biosyntheseweg der verschiedenen Flavonoide . . . . .	2
1.3	Grundkörper der Anthocyane und die wichtigsten Anthocyanidine in der Natur . . . . .	3
1.4	Struktur verschiedener, natürlich vorkommender Anthocyane . . . . .	4
1.5	Strukturelle Veränderung der Anthocyane in Abhängigkeit vom pH-Wert . . . . .	5
1.6	Zerfall-Mechanismus der Anthocyanidine . . . . .	6
1.7	Komplexbildung der Anthocyane mit dreiwertigen Metallionen . . . . .	6
1.8	Absorptionsspektren typischer Anthocyane . . . . .	7
1.9	Auswahl diskutierter Mechanismen der Krebs-Chemoprävention durch Anthocyane . . . . .	18
1.10	Vergleich der Plasmakinetik verschiedener Flavonoide . . . . .	21
1.11	Vergleich der Bioverfügbarkeit verschiedener Flavonoide . . . . .	22
3.12	Repräsentatives HPLC/DAD-Chromatogramm der Trennung von Anthocyan-3-Glucosiden und bestimmter phenolischer Säuren sowie deren Absorptionsspektren . . . . .	28
3.13	Massenspektrum des Hauptanthocyans der Radieschenschale . . . . .	29
3.14	Struktur und MS-Fragmentierungsmuster des Hauptanthocyans der Radieschenschale . . . . .	30
3.15	Massenspektrum des Hauptanthocyans des Rotkohls . . . . .	30
3.16	Struktur und MS-Fragmentierungsmuster des Hauptanthocyans des Rotkohls . . . . .	31
3.17	Selektive Hemmung der enzymatischen Spaltung von Anthocyan-mono- und -diglucosiden bei gleichzeitiger Spaltung von Daidzin und Isoquercitin . . . . .	33
3.18	HPLC-Chromatogramm des Abbauprozesses von Cyanidin im Testsystem I . . . . .	34
3.19	HPLC/APCI-ES-Massenspektren der Abbauprodukte des Cyanidins im Testsystem I . . . . .	35
3.20	Stabilität von Cyanidin bei unterschiedlichen pH-Werten im Testsystem II und stabilisierender Effekt von Al <sup>3+</sup> . . . . .	36
3.21	Stabilität von Pelargonidin, Peonidin und Cyanidin bei pH 7,4 im Testsystem II und stabilisierender Effekt von Al <sup>3+</sup> . . . . .	36
3.22	Enzymatische Spaltung verschiedener Anthocyane mit Glucuronidase . . . . .	37
3.23	Zeitabhängiger Abbau eines Anthocyan-Monoglucosids am Beispiel des Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosids bei Inkubation mit humaner Darmflora . . . . .	38
3.24	Zeitabhängiger Abbau eines Anthocyan-Diglucosids am Beispiel des Cyanins bei Inkubation mit humaner Darmflora . . . . .	39

3.25	Repräsentative Chromatogramme des Abbaus der Anthocyane aus dem Radieschenschalenextrakt bei verschiedenen Detektionswellenlängen . . . . .	40
3.26	Angenommener Abbaumechanismus der acylierten Anthocyane der Radieschenschale . . . . .	41
3.27	HPLC-Chromatogramm der Cyanidin-Methylierung mit SAM/COMT und die Massenspektren der gebildeten Substanzen . . . . .	42
3.28	HPLC-Chromatogramm der Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid-Methylierung mit SAM/COMT und die Massenspektren der gebildeten Substanzen . . . . .	42
3.29	HPLC-Trennung der Cyanidin-Glucuronidierung durch mikrosomale Inkubation sowie die Absorptions- und Massenspektren der gebildeten Substanzen .	44
3.30	HPLC-Trennung der Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid-Glucuronidierung durch mikrosomale Inkubation . . . . .	45
3.31	Absorptions- und Massenspektren der gebildeten Substanzen bei der Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid-Glucuronidierung . . . . .	46
3.32	Absolutmengen der im Urin gefundenen Protocatechusäure-Metabolite . . .	49
3.33	Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Protocatechusäure . . . . .	50
3.34	Absolutmengen der im Urin gefundenen Vanillinsäure-Metabolite . . . . .	51
3.35	Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Vanillinsäure . . . . .	52
3.36	Absolutmengen der im Urin gefundenen Syringasäure-Metabolite . . . . .	53
3.37	Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse von Rattenurin nach Verabreichung von Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid . . . . .	54
3.38	Zeitlicher Verlauf der im Urin der Ratten gefundenen Anthocyan-Metabolite nach Verabreichung von Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid und ihr Anteil an der verabreichten Substanzmenge . . . . .	54
3.39	Zeitlicher Verlauf der im Urin der Ratten gefundenen phenolischer Säuren nach Verabreichung von Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid (ohne enzymatische Spaltung)	55
3.40	Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse von Rattenfäzes nach Verabreichung von Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid . . . . .	56
3.41	HPLC-Chromatogramm der Analyse eines Rattendickdarmes nach Verabreichung von Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid . . . . .	56
3.42	HPLC-Chromatogramm der Analyse eines Rattenmagens nach Verabreichung von Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid . . . . .	57
3.43	Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse von Rattenurin nach Verabreichung von Malvin . . . . .	57
3.44	Zeitlicher Verlauf der im Urin der Ratten gefundenen phenolischen Säuren nach Verabreichung von Malvin (ohne enzymatische Spaltung) . . . . .	58

3.45	Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse von Rattenfäzes nach Verabreichung von Malvin . . . . .	59
3.46	HPLC-Chromatogramm der Analyse eines Rattendickdarmes nach Verabreichung von Malvin . . . . .	59
3.47	Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse des Humanurins nach Aufnahme von Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosids am Beispiel von Proband A . . . . .	60
3.48	Absorptions- und Massenspektren der identifizierten Substanzen im Humanurin	61
3.49	Prozentualer Anteil der unterschiedlichen Anthocyan-Derivate in den verschiedenen Urinfraktionen der beiden Probanden A und B bezogen auf die aufgenommene Menge Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid . . . . .	62
3.50	Protocatechu- und Vanillinsäure als Urin-Metabolite von Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid	63
3.51	Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse des Humanplasmas nach Aufnahme von Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid am Beispiel von Proband A . . . . .	64
3.52	Veränderung des Peaks von Peonidin-monoglucuronid im Laufe des Beobachtungszeitraums (am Beispiel von Proband B) . . . . .	65
3.53	Plasma-Anthocyan-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit nach Aufnahme von Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid . . . . .	65
3.54	Gegenüberstellung der Gesamtanthocyan-Konzentration im Plasma bei Proband A und B nach Aufnahme von Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid in Wasser oder in Weichgelatine kapseln . . . . .	66
3.55	Plasma-Konzentrationen an Protocatechu- und Vanillinsäure in Abhängigkeit von der Zeit nach Aufnahme von Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid . . . . .	67
3.56	Strukturformeln der Referenzsubstanzen Ferulasäure, Syringasäure, Trolox und Ascorbinsäure . . . . .	68
3.57	Reaktionsverlauf des TEAC-Assays bei 30°C mit verschiedenen Antioxidantien	69
3.58	Vergleich der Reaktionsverläufe im TEAC-Assay bei 30 bzw. 37°C am Beispiel des Peonidin-3- <i>O</i> -glucosids . . . . .	69
3.59	TEAC-Werte der unterschiedlichen Testsubstanzen . . . . .	70
3.60	Graphische Darstellung der Ergebnisse der Synergismusuntersuchungen im TEAC-Assay . . . . .	72
3.61	Reaktionsverlauf des FRAP-Assays mit verschiedenen Antioxidantien . . . . .	73
3.62	EC <sub>1</sub> -Werte des FRAP-Assays der unterschiedlichen Testsubstanzen . . . . .	74
3.63	Graphische Darstellung der Ergebnisse der Synergismusuntersuchungen im FRAP-Assay bei einer Reaktionszeit von 60 min . . . . .	76
3.64	Trolox-Äquivalente der unterschiedlichen Testsubstanzen im ORAC-Assay beim Einsatz der beiden Fluoreszenzfarbstoffe Phycoerythrin und Fluorescein	77

---

3.65 Graphische Darstellung der Ergebnisse der Synergismusuntersuchungen im ORAC-Assay bei einer Reaktionszeit von 60 min . . . . .	79
4.66 Metabolismus des Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosids . . . . .	89
6.67 Studiendesign des Tierversuchs . . . . .	123
6.68 Studiendesign des Humanversuchs . . . . .	128
6.69 Strukturformel von ABTS . . . . .	131
6.70 Prinzip des TEAC-Assays . . . . .	132
6.71 Prinzip des FRAP-Assays . . . . .	133
6.72 Strukturformeln von ABAP und Fluorescein . . . . .	136
6.73 Prinzip des ORAC-Assays . . . . .	136
A.74 Aminosäure-Konjugation (Glycinaddukt-Bildung) der Benzoessäure zur Hippursäure und die entsprechenden Massenspektren . . . . .	143
A.75 Massenspektrum der Protocatechusäure und des vermuteten Glycinadduktes der Protocatechusäure . . . . .	143
A.76 Massenspektrum der Vanillinsäure und des vermuteten Glycinadduktes der Vanillinsäure . . . . .	144
A.77 Theorie zur Anthocyan-Dimeren-Bildung aus der chinoiden Form anhand dreier Beispiele . . . . .	145

## C Tabellenverzeichnis

1.1	Beim Zerfall wichtiger Anthocyanidine entstehende Carbonsäuren . . . . .	5
1.2	Anthocyane in verschiedenen Lebensmitteln . . . . .	9
1.3	Anthocyane in verschiedenen Säften und anderen Getränken . . . . .	11
3.4	Fragmentierungsmuster verschiedener Anthocyane bei geeigneter Fragmentor- spannung . . . . .	32
3.5	Prozentualer Anteil der beiden Glucuronide des Cyanidins in Abhängigkeit vom verwendeten Enzymsystem . . . . .	47
3.6	Prozentualer Anteil der vier Glucuronide des Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosids in Ab- hängigkeit vom verwendeten Enzymsystem . . . . .	47
3.7	Prozentualer Anteil der Haupt-Anthocyan-Metabolite an der Gesamtmenge der detektierten Anthocyan-Derivate . . . . .	64
3.8	Zusammenfassung der prozentualen Wiederfindungen der verschiedenen Me- tabolite im Plasma nach Verzehr von Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid . . . . .	67
3.9	Kombinationen der eingesetzten Substanzen in den Synergismusuntersuchun- gen des TEAC-Assays und die Ergebnisse der Kombinationsuntersuchung und der Summe der Einzelinkubationsuntersuchungen . . . . .	72
3.10	Kombinationen der eingesetzten Substanzen in den Synergismusuntersuchun- gen des FRAP-Assays und die Ergebnisse der Kombinationsuntersuchung und der Summe der Einzelinkubationsuntersuchungen . . . . .	75
3.11	Kombinationen der eingesetzten Substanzen in den Synergismusuntersuchun- gen des ORAC-Assays und die Ergebnisse der Kombinationsuntersuchung und der Summe der Einzelinkubationsuntersuchungen . . . . .	78
3.12	Übersicht über die antioxidativen Eigenschaften der untersuchten Substanzen	79
4.13	Vorkommen der verwendeten Isoenzyme in unterschiedlichen Geweben . . . . .	86
4.14	Überblick über die Wiederfindungsraten des verabreichten Cyanidin-3- <i>O</i> - glucosids in den untersuchten Proben des Humanversuchs und des Tierversuchs	90
6.15	Verwendete Geräte . . . . .	105
6.16	Allgemein verwendete Chemikalien . . . . .	106
6.17	Verwendete Chemikalien bei den <i>in vitro</i> -Untersuchungen . . . . .	108
6.18	Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien bei den <i>in vivo</i> - Untersuchungen . . . . .	109
6.19	Verwendete Chemikalien bei den Untersuchungen zur antioxidativen Wirkung	109
6.20	Zeitplan der Blutabnahme und Urinsammlung im Humanversuch . . . . .	128
6.21	Eingesetzte Probenkonzentrationen im TEAC-Assay . . . . .	133
6.22	Eingesetzte Probenkonzentrationen im FRAP-Assay . . . . .	135

6.23 Eingesetzte Probenkonzentrationen im ORAC-Assay . . . . .	137
A.24 Übersicht über verschiedene Humanstudien aus der Literatur zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen . . . . .	141
A.25 Anteil verschiedener Metabolite an der verabreichten Menge Cyanidin-3- <i>O</i> -glucosid im Tierversuch . . . . .	142
A.26 Übersichtsdaten aus den Urinwerten des Humanversuchs (Proband A/Proband B) . . . . .	142

## D Literaturverzeichnis

- [1] Keli, S. O., Hertog, M. G., Feskens, E. J., & Kromhout, D. (1996), Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med*, **156**(6), 637–642.
- [2] Steinmetz, K. A., Kushi, L. H., Bostick, R. M., Folsom, A. R., & Potter, J. D. (1994), Vegetables, fruit, and colon cancer in the Iowa Women’s Health Study. *Am J Epidemiol*, **139**(1), 1–15.
- [3] Steinmetz, K. A. & Potter, J. D. (1993), Food-group consumption and colon cancer in the Adelaide Case-Control Study. I. Vegetables and fruit. *Int J Cancer*, **53**(5), 711–719.
- [4] Liu, S., Manson, J. E., Lee, I. M., Cole, S. R., Hennekens, C. H., Willett, W. C., & Buring, J. E. (2000), Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: the Women’s Health Study. *Am J Clin Nutr*, **72**(4), 922–928.
- [5] La Vecchia, C. & Tavani, A. (1998), Fruit and vegetables, and human cancer. *Eur J Cancer Prev*, **7**(1), 3–8.
- [6] Tavani, A. & La Vecchia, C. (1995), Fruit and vegetable consumption and cancer risk in a Mediterranean population. *Am J Clin Nutr*, **61**(6), 1374–1377.
- [7] Steinmetz, K. A. & Potter, J. D. (1991), Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control*, **2**(5), 325–357.
- [8] Block, G., Patterson, B., & Subar, A. (1992), Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer*, **18**(1), 1–29.
- [9] Steinmetz, K. A. & Potter, J. D. (1996), Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc*, **96**(10), 1027–1039.
- [10] La Vecchia, C. (2001), Diet and human cancer: a review. *Eur J Cancer Prev*, **10**(2), 177–181.
- [11] Witte, J. S., Longnecker, M. P., Bird, C. L., Lee, E. R., Frankl, H. D., & Haile, R. W. (1996), Relation of vegetable, fruit, and grain consumption to colorectal adenomatous polyps. *Am J Epidemiol*, **144**(11), 1015–1025.
- [12] Kuhnau, J. (1976), The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet*, **24**, 117–191.
- [13] Harborne, J. (1988), The Flavonoids: Recent Advances, 299–343.
- [14] Cooper-Driver, G. A. (2001), Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry*, **56**(3), 229–236.
- [15] Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003), Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, **64**(5), 923–933.
- [16] Murkovic, M. (2001), Anthocyane und ihre Wirkung. *ERNO*, **2**(4), 230–237.
- [17] Tatsuzawa, F., Saito, N., Murata, N., Shinoda, K., Shigihara, A., & Honda, T. (2003), 6-Hydroxypelargonidin glycosides in the orange-red flowers of *Alstroemeria*. *Phytochemistry*, **62**(8), 1239–1242.
- [18] Clifford, M. (2000), Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, **80**, 1063–1072.
- [19] Harborne, J. B. & Williams, C. A. (2001), Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep*, **18**(3), 310–333.

- [20] Fossen, T., Slimestad, R., & Andersen, M. O. (2003), Anthocyanins with 4'-glucosidation from red onion, *Allium cepa*. *Phytochemistry*, **64**(8), 1367–1374.
- [21] Merken, H. M. & Beecher, G. R. (2000), Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J Agric Food Chem*, **48**(3), 577–599.
- [22] Mazza, G. & Miniati, E. (1993), Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains. *CRC Press Boca Raton*.
- [23] Reiersen, B., Kiremire, B. T., Byamukama, R., & Andersen, M. O. (2003), Anthocyanins acylated with gallic acid from chenille plant, *Acalypha hispida*. *Phytochemistry*, **64**(4), 867–871.
- [24] Lu, T. S., Saito, N., Yokoi, M., Shigihara, A., & Honda, T. (1992), Acylated pelargonidin glycosides in the red-purple flowers of *Pharbitis nil*. *Phytochemistry*, **31**(1), 289–295.
- [25] Nakayama, M., Koshioka, M., Yoshida, H., Kan, Y., Fukui, Y., Koike, A., & Yamaguchi, M. (2000), Cyclic malyl anthocyanins in *Dianthus caryophyllus*. *Phytochemistry*, **55**(8), 937–939.
- [26] Bloor, S. J. (1998), A macrocyclic anthocyanin from red/mauve carnation flowers. *Phytochemistry*, **49**(1), 225–228.
- [27] Jurd, L. (1972), Some advances in the chemistry of anthocyanin-type plant pigments. *Adv Food Res Suppl*, 123–142.
- [28] Belitz, H. D. & Grosch, W. (1992), Lehrbuch der Lebensmittelchemie. *Springer-Verlag, Heidelberg (4. Auflage)*.
- [29] Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, R., & Kanner, J. (1999), PH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *J Agric Food Chem*, **47**(1), 67–70.
- [30] Brouillard, R. & Delaporte, B. (1977), Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *J Am Chem Soc*, **99**(26), 8461–8468.
- [31] Markakis, P. (1974), Anthocyanins and their stability in foods. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, 437–456.
- [32] Seeram, N. P., Bourquin, L. D., & Nair, M. G. (2001), Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *J Agric Food Chem*, **49**(10), 4924–4929.
- [33] Harper, K. A. (1968), Structural changes of flavylum salts. IV. Polarographic and spectrophotometric examination of pelargonidin chloride. *Aust J Chem*, **21**, 221.
- [34] Bridle, P. & Timberlake, F. (1997), Anthocyanins as natural food colours - selected aspects. *Food Chemistry*, **58**(1), 103–109.
- [35] Giusti, M. M., Rodriguez-Saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (1999), Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *J Agric Food Chem*, **47**(11), 4631–4637.
- [36] Giusti, M. & Wrolstad, R. (1996), Characterization of red radish anthocyanins. *J Food Sci*, **61**(2), 322–326.
- [37] Asen, S., Stewart, R. N., & Norris, K. H. (1972), Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, **11**, 1139–1144.
- [38] Malien-Aubert, C., Dangles, O., & Amiot, M. J. (2001), Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *J Agric Food Chem*, **49**(1), 170–176.

- [39] Mazza, G. & Brouillard, R. (1990), The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solution. *Phytochemistry*, **29**, 1097–1100.
- [40] Mazza, G. & Brouillard, R. (1987), Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chem*, **25**(3), 207–225.
- [41] Eiro, M. J. & Heinonen, M. (2002), Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *J Agric Food Chem*, **50**(25), 7461–7466.
- [42] Figueiredo, P., Elhabiri, M., Toki, K., Saito, N., Dangles, O., & Brouillard, R. (1996), New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry*, **41**(1), 301–308.
- [43] Bloor, S. J. & Falshaw, R. (2000), Covalently linked anthocyanin-flavonol pigments from blue Agapanthus flowers. *Phytochemistry*, **53**(5), 575–579.
- [44] Dangles, O., Saito, N., & Brouillard, R. (1993), Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry*, **34**(1), 119–124.
- [45] Fossen, T., Slimestad, R., Ovstedal, D. O., & Andersen, O. M. (2000), Covalent anthocyanin-flavonol complexes from flowers of chive, *Allium schoenoprasum*. *Phytochemistry*, **54**(3), 317–323.
- [46] Harborne, J. B. & Williams, C. A. (2000), Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**(6), 481–504.
- [47] Prior, R., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., & Mainland, C. (1998), Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J Agric Food Chem*, **46**, 2686–2693.
- [48] Jeppsson, N. (2000), The effects of fertilizer rate on vegetative growth, yield and fruit quality, with special respect to pigments, in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) vs. 'Viking'. *Scientia Horticulturae*, **83**, 127–137.
- [49] Koeppen, B. H. & Herrmann, K. (1977), Flavonoid glycosides and hydroxycinnamic acid esters of blackcurrants (*Ribes nigrum*). Phenolics of fruits 9. *Z Lebensm Unters Forsch*, **164**(4), 263–268.
- [50] Degenhardt, A., Knapp, H., & Winterhalter, P. (2000), Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, **48**(2), 338–343.
- [51] Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., & Heinonen, M. (2001), Berry phenolics and their antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, **49**(8), 4076–4082.
- [52] Sellappan, S., Akoh, C. C., & Krewer, G. (2002), Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *J Agric Food Chem*, **50**(8), 2432–2438.
- [53] Moyer, R. A., Hummer, K. E., Finn, C. E., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002), Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *vaccinium*, *rubus*, and *ribes*. *J Agric Food Chem*, **50**(3), 519–525.
- [54] Costantino, L., Albasini, A., Rastelli, G., & Benvenuti, S. (1992), Activity of polyphenolic crude extracts as scavengers of superoxide radicals and inhibitors of xanthine oxidase. *Planta Med*, **58**(4), 342–344.
- [55] Bohm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B., & Kroke, A. (1998), Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Z Ernährungswiss*, **37**(2), 147–163.

- [56] Kikoku, Y., Fukuhara, K., Saito, I., & Oota, H. (1995), Identification and high performance chromatographic determination of strawberry anthocyanin pigments. *J Jpn Soc Food Sci Technol*, **42**(2), 118–123.
- [57] Meyers, K. J., Watkins, C. B., Pritts, M. P., & Liu, R. H. (2003), Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries. *J Agric Food Chem*, **51**(23), 6887–6892.
- [58] Wang, S. Y. & Lin, H. S. (2000), Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J Agric Food Chem*, **48**(2), 140–146.
- [59] Nyman, N. A. & Kumpulainen, J. T. (2001), Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*, **49**(9), 4183–4187.
- [60] Eder, R. (1996), Pigments. In: *Food Analysis (Ed.: L. Nollet)*, Marcel Dekker, New York, 937–1014.
- [61] Chandra, A., Rana, J., & Li, Y. (2001), Separation, Identification, Quantification, and Method Validation of Anthocyanins in Botanical Supplement Raw Materials by HPLC and HPLC-MS. *J Agric Food Chem*, **49**, 3515–3521.
- [62] Timberlake, C. F. & Henry, B. S. (1988), Anthocyanins as natural food colorants. *Prog Clin Biol Res*, **280**, 107–121.
- [63] Pierpoint, W. S. (1986), Flavonoids in the human diet. *Prog Clin Biol Res*, **213**, 125–140.
- [64] Baublis, A., Spomer, A., & Berber-Jimenez, M. (1994), Anthocyanin Pigments: Comparison of Extract Stability. *Journal of Food Science*, **59**(6), 1219–1233.
- [65] Gao, L. & Mazza, G. (1995), Characterization, quantitation, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries. *J Agric Food Chem*, **43**, 343–346.
- [66] Lapidot, T., Harel, S., Granit, R., & Kanner, J. (1998), Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. *J Agric Food Chem*, **46**, 4297–4302.
- [67] Mazza, G. (1995), Anthocyanins in grapes and grape products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **35**(4), 341–371.
- [68] Wang, H., Coa, G., & Prior, R. (1997), Oxygen Radical Absorbing Capacity of anthocyanins. *J Agric Food Chem*, **45**, 304–309.
- [69] Nielsen, I. L., Haren, G. R., Magnussen, E. L., Dragsted, L. O., & Rasmussen, S. E. (2003), Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and antioxidative potency. *J Agric Food Chem*, **51**(20), 5861–5866.
- [70] German, J. B. & Walzem, R. L. (2000), The health benefits of wine. *Annu Rev Nutr*, **20**, 561–593.
- [71] Yamasaki, H., Uefuji, H., & Sakihama, Y. (1996), Bleaching of the red anthocyanin induced by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys*, **332**(1), 183–186.
- [72] Tsuda, T., Shiga, K., Ohshima, K., Kawakishi, S., & Osawa, T. (1996), Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem Pharmacol*, **52**(7), 1033–1039.
- [73] Takahashi, A., Takeda, K., & Ohnishi, T. (1991), Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centaurea cyanus* cells in culture. *Plant Cell Physiol*, **32**, 541–547.

- [74] Simmonds, M. S. (2003), Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry*, **64**(1), 21–30.
- [75] Marrs, K. A., Alfenito, M. R., Lloyd, A. M., & Walbot, V. (1995), A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature*, **375**(6530), 397–400.
- [76] Dixon, R. A. & Paiva, N. L. (1995), Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*, **7**(7), 1085–1097.
- [77] Sies, H. (1991), Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*, **91**(3C), 31–38.
- [78] Richter, C., Park, J. W., & Ames, B. N. (1988), Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**(17), 6465–6467.
- [79] Sevanian, A. & Hochstein, P. (1985), Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr*, **5**, 365–390.
- [80] Davies, K. J. (1987), Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem*, **262**(20), 9895–9901.
- [81] Harman, D. (2003), The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal*, **5**(5), 557–561.
- [82] Stadtman, E. R. & Berlett, B. S. (1997), Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol*, **10**(5), 485–494.
- [83] Stadtman, E. R. (1992), Protein oxidation and aging. *Science*, **257**(5074), 1220–1224.
- [84] Cutler, R. G. (1991), Antioxidants and aging. *Am J Clin Nutr*, **53**(1), 373–379.
- [85] Cutler, R. G. (1992), Genetic stability and oxidative stress: common mechanisms in aging and cancer. *Exs*, **62**, 31–46.
- [86] Spector, A. (1995), Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. *FASEB J*, **9**(12), 1173–1182.
- [87] Pool-Zobel, B. L., Bub, A., Schroder, N., & Rechkemmer, G. (1999), Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *Eur J Nutr*, **38**(5), 227–234.
- [88] Tedesco, I., Russo, G.-L., Nazzaro, F., Russo, M., & Palumbo, R. (2001), Antioxidant effect of red wine anthocyanins in normal and catalase-inactive human erythrocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **12**, 505–511.
- [89] Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., & Packer, L. (2002), Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem*, **50**(1), 166–171.
- [90] Gardner, P., Andersen, O. M., Ramirez Tortosa, C., & Duthie, G. (2002), Antioxidant potential of anthocyanins in vitro and in vivo. In: *Bioactive compounds in plant foods: COST Action 916: Bioactive plant cell wall components in nutrition and health*, 289–290.
- [91] Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi, S., Kawakishi, S., & Osawa, T. (1994), Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin-3-O-beta-D-Glucoside and Cyanidin. *J Agric Food Chem*, **42**, 2407–2410.
- [92] Satué-Gracia, M., Heinonen, M., & Frankel, E. (1997), Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *J Agric Food Chem*, **45**, 3362–3367.

- [93] Gieseg, S. P. & Esterbauer, H. (1994), Low density lipoprotein is saturable by pro-oxidant copper. *FEBS Lett*, **343**(3), 188–194.
- [94] Gabrielska, J., Oszmianski, J., Komorowska, M., & Langner, M. (1999), Anthocyanin extracts with antioxidant and radical scavenging effect. *Z Naturforsch [C]*, **54**(5-6), 319–324.
- [95] Noda, Y., Kaneyuki, T., Igarashi, K., Mori, A., & Packer, L. (1998), Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, **102**(2), 175–187.
- [96] Noda, Y., Kneyuki, T., Igarashi, K., Mori, A., & Packer, L. (2000), Antioxidant activity of nasunin, an anthocyanin in eggplant peels. *Toxicology*, **148**(2-3), 119–123.
- [97] Gardner, H. W. (1979), Lipid hydroperoxide reactivity with proteins and amino acids: a review. *J Agric Food Chem*, **27**, 220–229.
- [98] Otero, P., Viana, M., Herrera, E., & Bonet, B. (1997), Antioxidant and prooxidant effects of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and flavonoids on LDL submitted to different degrees of oxidation. *Free Radic Res*, **27**(6), 619–626.
- [99] Yagi, K. (1987), Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipids*, **45**(2-4), 337–351.
- [100] Tsuda, T., Ohshima, K., Shunro, K., & Toshihiko, O. (1996), Oxidation products of cyanidin-3-O-beta-D-glucoside with a free radical initiator. *Lipids*, **31**(12), 1259–1263.
- [101] Narayan, M. S., Naidu, K. A., Ravishankar, G. A., Srinivas, L., & Venkataraman, L. V. (1999), Antioxidant effect of anthocyanin on enzymatic and non-enzymatic lipid peroxidation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **60**(1), 1–4.
- [102] Bianchi, L., Lazzè, C., Pizzala, R., Stivala, L., Savio, M., & Prosperi, E. (2003), Anthocyanins protect against oxidative damage in cell cultures. In: *Biologically-active phytochemicals in food - Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function* (edited by W. Pfannhauser, G.R. Fenwick and S. Khokkar, Royal Society of Chemistry).
- [103] Tsuda, T., Kato, Y., & Osawa, T. (2000), Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by anthocyanins. *FEBS Lett*, **484**(3), 207–210.
- [104] Ramirez-Tortosa, C., Andersen, O. M., Gardner, P. T., Morrice, P. C., Wood, S. G., Duthie, S. J., Collins, A. R., & Duthie, G. G. (2001), Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radic Biol Med*, **31**(9), 1033–1037.
- [105] Tsuda, T., Horio, F., Kitoh, J., & Osawa, T. (1999), Protective effects of dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Arch Biochem Biophys*, **368**(2), 361–366.
- [106] Tsuda, T., Horio, F., & Osawa, T. (2000), The role of anthocyanins as an antioxidant under oxidative stress in rats. *Biofactors*, **13**(1-4), 133–139.
- [107] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995), The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radic Res*, **22**(4), 375–383.
- [108] Tsuda, T., Horio, F., & Osawa, T. (1998), Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside increases ex vivo oxidation resistance of serum in rats. *Lipids*, **33**(6), 583–588.
- [109] Joseph, J. A., Shukitt-Hale, B., Denisova, N. A., Bielinski, D., Martin, A., McEwen, J. J., & Bickford, P. C. (1999), Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci*, **19**(18), 8114–8121.

- [110] Joseph, J. A., Denisova, N. A., Arendash, G., Gordon, M., Diamond, D., Shukitt-Hale, B., & Morgan, D. (2003), Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. *Nutr Neurosci*, **6**(3), 153–162.
- [111] Youdim, K. A., Dobbie, M. S., Kuhnle, G., Proteggente, A. R., Abbott, N. J., & Rice-Evans, C. (2003), Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem*, **85**(1), 180–192.
- [112] Maxwell, S., Cruickshank, A., & Thorpe, G. (1994), Red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet*, **344**(8916), 193–194.
- [113] Maxwell, S. (1997), Wine antioxidants and their impact on antioxidant activity in vivo. *Wine: Nutritional and therapeutic benefits*, 150–165.
- [114] Carbonneau, M.-A., Léger, C., Descomps, B., Michel, F., & Monnier, L. (1998), Improvement in the antioxidant status of plasma and low-density lipoprotein in subjects receiving a red wine phenolics mixture. *JAOCS*, **75**(2), 235–240.
- [115] Whitehead, T. P., Robinson, D., Allaway, S., Syms, J., & Hale, A. (1995), Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin Chem*, **41**(1), 32–35.
- [116] Fuhrman, B., Lavy, A., & Aviram, M. (1995), Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr*, **61**(3), 549–554.
- [117] de Rijke, Y. B., Demacker, P. N., Assen, N. A., Sloots, L. M., Katan, M. B., & Stalenhoef, A. F. (1996), Red wine consumption does not affect oxidizability of low-density lipoproteins in volunteers. *Am J Clin Nutr*, **63**(3), 329–334.
- [118] Netzel, M., Straß, G., Kaul, C., Bitsch, I., Dietrich, H., & Bitsch, R. (2002), In vivo antioxidative capacity of a composite berry juice. *Food Research International*, **35**, 213–216.
- [119] Young, J. F., Nielsen, S. E., Haraldsdottir, J., Daneshvar, B., Lauridsen, S. T., Knuthsen, P., Crozier, A., Sandstrom, B., & Dragsted, L. O. (1999), Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr*, **69**(1), 87–94.
- [120] Maatta-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., Mattila, P. H., Gonzalez-Paramas, A. M., & Torronen, A. R. (2004), Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species. *J Agric Food Chem*, **52**(14), 4477–4486.
- [121] Hung, L. M., Chen, J. K., Huang, S. S., Lee, R. S., & Su, M. J. (2000), Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res*, **47**(3), 549–555.
- [122] Zou, J. G., Huang, Y. Z., Chen, Q., Wei, E. H., Hsieh, T. C., & Wu, J. M. (1999), Resveratrol inhibits copper ion-induced and azo compound-initiated oxidative modification of human low density lipoprotein. *Biochem Mol Biol Int*, **47**(6), 1089–1096.
- [123] Ray, P. S., Maulik, G., Cordis, G. A., Bertelli, A. A., Bertelli, A., & Das, D. K. (1999), The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*, **27**(1-2), 160–169.
- [124] Renaud, S. & de Lorgeril, M. (1992), Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **339**(8808), 1523–1526.
- [125] Renaud, S. & Gueguen, R. (1998), The French paradox and wine drinking. *Novartis Found Symp*, **216**, 208–217.

- [126] Iijima, K., Yoshizumi, M., Hashimoto, M., Kim, S., Eto, M., Ako, J., Liang, Y. Q., Sudoh, N., Hosoda, K., Nakahara, K., Toba, K., & Ouchi, Y. (2000), Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation*, **101**(7), 805–811.
- [127] Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., & Teissedre, P. L. (1995), Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J Agric Food Chem*, **43**, 890–894.
- [128] Auger, C., Caporiccio, B., Landrault, N., Teissedre, P. L., Laurent, C., Cros, G., Besancon, P., & Rouanet, J. M. (2002), Red wine phenolic compounds reduce plasma lipids and apolipoprotein B and prevent early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Nutr*, **132**(6), 1207–1213.
- [129] Kadar, A., Robert, L., Miskulin, M., Tixier, J. M., Brechemier, D., & Robert, A. M. (1979), Influence of anthocyanoside treatment on the cholesterol-induced atherosclerosis in the rabbit. *Paroi Arterielle*, **5**(4), 187–205.
- [130] Sato, M., Maulik, N., & Das, D. K. (2002), Cardioprotection with alcohol: role of both alcohol and polyphenolic antioxidants. *Ann N Y Acad Sci*, **957**, 122–135.
- [131] Rifici, V. A., Stephan, E. M., Schneider, S. H., & Khachadurian, A. K. (1999), Red wine inhibits the cell-mediated oxidation of LDL and HDL. *J Am Coll Nutr*, **18**(2), 137–143.
- [132] Rifici, V. A., Schneider, S. H., & Khachadurian, A. K. (2002), Lipoprotein oxidation mediated by J774 murine macrophages is inhibited by individual red wine polyphenols but not by ethanol. *J Nutr*, **132**(9), 2532–2537.
- [133] Criqui, M. H. & Ringel, B. L. (1994), Does diet or alcohol explain the French paradox? *Lancet*, **344**, 1719–1723.
- [134] Johansen, D., Andersen, P. K., Jensen, M. K., Schnohr, P., & Gronbaek, M. (2003), Nonlinear relation between alcohol intake and high-density lipoprotein cholesterol level: results from the Copenhagen City Heart Study. *Alcohol Clin Exp Res*, **27**(8), 1305–1309.
- [135] Gaziano, J. M., Buring, J. E., Breslow, J. L., Goldhaber, S. Z., Rosner, B., VanDenburgh, M., Willett, W., & Hennekens, C. H. (1993), Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. *N Engl J Med*, **329**(25), 1829–1834.
- [136] Wollin, S. D. & Jones, P. J. (2001), Alcohol, red wine and cardiovascular disease. *J Nutr*, **131**(5), 1401–1404.
- [137] Esterbauer, H., Schmidt, R., & Hayn, M. (1997), Relationships among oxidation of low-density lipoprotein, antioxidant protection, and atherosclerosis. *Adv Pharmacol*, **38**, 425–456.
- [138] Esterbauer, H. & Ramos, P. (1996), Chemistry and pathophysiology of oxidation of LDL. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **127**, 31–64.
- [139] Schumacher, M., Eber, B., Tatzber, F., Kaufmann, P., Esterbauer, H., & Klein, W. (1992), LDL oxidation and coronary atherosclerosis. *Lancet*, **340**(8811), 123.
- [140] Halliwell, B. (1993), The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. *Haemostasis*, **23**, 118–126.
- [141] Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., & Witztum, J. L. (1989), Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, **320**(14), 915–924.

- [142] Witztum, J. L. & Steinberg, D. (1991), Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, **88**(6), 1785–1792.
- [143] Chisolm, G. M. & Steinberg, D. (2000), The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med*, **28**(12), 1815–1826.
- [144] Jessup, W. & Kritharides, L. (2000), Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr Opin Lipidol*, **11**(5), 473–481.
- [145] Esterbauer, H., Wag, G., & Puhl, H. (1993), Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bull*, **49**(3), 566–576.
- [146] Jurgens, G., Chen, Q., Ledinski, G., Kager, G., Hammer, A., & Esterbauer, H. (1993), Oxidized lipoproteins and atherogenesis. *Acta Med Austriaca*, **20**(4), 85–89.
- [147] Heinonen, I. M., Lehtonen, P. J., & Hopia, A. I. (1998), Antioxidant Activity of Berry and Fruit Wines and Liqueurs. *J Agric Food Chem*, **46**(1), 25–31.
- [148] Abuja, P., Murkovic, M., & Pfannhauser, W. (1998), Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density lipoprotein oxidation. *J Agric Food Chem*, **46**, 4091–4096.
- [149] Frankel, E. N., Kanner, J., German, J. B., Parks, E., & Kinsella, J. E. (1993), Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, **341**(8843), 454–457.
- [150] Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B., & Kinsella, J. E. (1994), Natural antioxidants in grapes and wines. *J Agric Food Chem*, **42**, 64–69.
- [151] Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., & Scaccini, C. (1998), Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *J Agric Food Chem*, **46**(2), 361–367.
- [152] Wang, H., Nair, M. G., Strasburg, G. M., Chang, Y. C., Booren, A. M., Gray, J. I., & DeWitt, D. L. (1999), Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. *J Nat Prod*, **62**(5), 294–296.
- [153] Seeram, N. P., Momin, R. A., Nair, M. G., & Bourquin, L. D. (2001), Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine*, **8**(5), 362–369.
- [154] Wang, J. & Mazza, G. (2002), Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *J Agric Food Chem*, **50**(4), 850–857.
- [155] Parks, D. A. & Booyse, F. M. (2002), Cardiovascular protection by alcohol and polyphenols: role of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci*, **957**, 115–121.
- [156] Maeda, H. & Akaike, T. (1998), Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Mosc)*, **63**(7), 854–865.
- [157] Akaike, T., Fujii, S., Kato, A., Yoshitake, J., Miyamoto, Y., Sawa, T., Okamoto, S., Suga, M., Asakawa, M., Nagai, Y., & Maeda, H. (2000), Viral mutation accelerated by nitric oxide production during infection in vivo. *FASEB J*, **14**(10), 1447–1454.
- [158] Corder, R., Douthwaite, J., Lees, D., Khan, N., Viseu dos Santos, A., Wood, E., & Carrier, M. (2001), Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature*, **414**, 863–864.
- [159] Detre, Z., Jellinek, H., Miskulin, M., & Robert, A. M. (1986), Studies on vascular permeability in hypertension: action of anthocyanosides. *Clin Physiol Biochem*, **4**(2), 143–149.

- [160] Morazzoni, P. & Bombardelli, E. (1995), *Vaccinium myrtillus* L. *Fitoterapia*, **67**(1), 3–29.
- [161] Youdim, K. A., Martin, A., & Joseph, J. A. (2000), Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, **29**(1), 51–60.
- [162] American Institute for Cancer Research, W. D. (1997), World Cancer Research Fund: Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective.
- [163] Goldbohm, R. A., Hertog, M. G., Brants, H. A. M., van Poppel, G., & van den Brandt, P. A. (1998), Intake of flavonoids and cancer risk: a prospective cohort study. In: *COST 916 Bioactive Plant Cell Wall Components in Nutrition and Health: Polyphenols in Food* (Ed. EU 181689), 166ff.
- [164] Hou, D. X. (2003), Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. *Curr Mol Med*, **3**(2), 149–159.
- [165] Hagiwara, A., Yoshino, H., Ichihara, T., Kawabe, M., Tamano, S., Aoki, H., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., & Shirai, T. (2002), Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine. *J Toxicol Sci*, **27**(1), 57–68.
- [166] Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., & Shirai, T. (2001), Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett*, **171**(1), 17–25.
- [167] Hou, D. X., Kai, K., Li, J. J., Lin, S., Terahara, N., Wakamatsu, M., Fujii, M., Young, M. R., & Colburn, N. (2004), Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure-activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis*, **25**(1), 29–36.
- [168] Hou, D. X., Ose, T., Lin, S., Harazoro, K., Imamura, I., Kubo, M., Uto, T., Terahara, N., Yoshimoto, M., & Fujii, M. (2003), Anthocyanidins induce apoptosis in human promyelocytic leukemia cells: structure-activity relationship and mechanisms involved. *Int J Oncol*, **23**(3), 705–712.
- [169] Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., & Kobori, M. (2003), Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *J Agric Food Chem*, **51**(1), 68–75.
- [170] Fimognari, C., Berti, F., Nusse, M., Cantelli-Forti, G., & Hrelia, P. (2004), Induction of apoptosis in two human leukemia cell lines as well as differentiation in human promyelocytic cells by cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside. *Biochem Pharmacol*, **67**(11), 2047–2056.
- [171] Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J. P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A. J., & Vanden Berghe, D. (1998), Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod*, **61**(1), 71–76.
- [172] Hodnick, W. F., Ahmad, S., & Pardini, R. S. (1998), Induction of oxidative stress by redox active flavonoids. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 439), Ed.: J.A. Manthey, B.S. Buslig, Plenum Press New York / London, 131–150.
- [173] Yoshimoto, M., Okuno, S., Yoshinaga, M., Yamakawa, O., Yamaguchi, M., & Yamada, J. (1999), Antimutagenicity of sweetpotato (*Ipomoea batatas*) roots. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**(3), 537–541.

- [174] Yoshimoto, M., Okuno, S., Yamaguchi, M., & Yamakawa, O. (2001), Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato. *Biosci Biotechnol Biochem*, **65**(7), 1652–1655.
- [175] Edenharter, R., Kurz, P., John, K., Burgard, S., & Seeger, K. (1994), In vitro effect of vegetable and fruit juices on the mutagenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline. *Food Chem Toxicol*, **32**(5), 443–459.
- [176] Edenharter, R., Leopold, C., & Kries, M. (1995), Modifying actions of solvent extracts from fruit and vegetable residues on 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) induced mutagenesis in *Salmonella typhimurium* TA 98. *Mutat Res*, **341**(4), 303–318.
- [177] Konczak-Islam, I., Yoshimoto, M., Hou, D. X., Terahara, N., & Yamakawa, O. (2003), Potential chemopreventive properties of anthocyanin-rich aqueous extracts from in vitro produced tissue of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). *J Agric Food Chem*, **51**(20), 5916–5922.
- [178] Meiers, S., Kemeny, M., Weyand, U., Gastpar, R., von Angerer, E., & Marko, D. (2001), The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor. *J Agric Food Chem*, **49**(2), 958–962.
- [179] Cross, M. & Dexter, T. M. (1991), Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell*, **64**(2), 271–280.
- [180] Kamei, H., Kojima, T., Hasegawa, M., Koide, T., Umeda, T., Yukawa, T., & Terabe, K. (1995), Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Invest*, **13**(6), 590–4.
- [181] Malik, M., Zhao, C., Schoene, N., Guisti, M. M., Moyer, M. P., & Magnuson, B. A. (2003), Anthocyanin-rich extract from *Aronia meloncarpa* E induces a cell cycle block in colon cancer but not normal colonic cells. *Nutr Cancer*, **46**(2), 186–196.
- [182] Nagase, H., Sasaki, K., Kito, H., Haga, A., & Sato, T. (1998), Inhibitory effect of delphinidin from *Solanum melongena* on human fibrosarcoma HT-1080 invasiveness in vitro. *Planta Med*, **64**(3), 216–219.
- [183] Sarma, A. & Sharma, R. (1999), Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. *Phytochemistry*, **52**, 1313–1318.
- [184] Schmitt, E. & Stopper, H. (2001), Estrogenic activity of naturally occurring anthocyanidins. *Nutr Cancer*, **41**(1-2), 145–149.
- [185] Scalbert, A. (1991), Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**(12), 3875–3883.
- [186] Zakay-Rones, Z., Thom, E., Wollan, T., & Wadstein, J. (2004), Randomized study of the efficacy and safety of oral elderberry extract in the treatment of influenza A and B virus infections. *J Int Med Res*, **32**(2), 132–140.
- [187] Tengherdy, T. (1978), Accelerated remission of episodes of Herpes labialis in response to a bioflavonoid-ascorbate supplement. *Nutr Rev*, **36**(10), 300–301.
- [188] Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., Azuma, M., & Knox, Y. M. (2003), Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L. *Phytother Res*, **17**(6), 609–613.
- [189] Knox, Y. M., Suzutani, T., Yoshida, I., Shibaki, T., Ogasawara, M., & Azuma, M. (1998), Antiviral activity of Kurokarin extracts. *Food Processing*, **33**(8), 21–23.
- [190] Knox, Y. M., Hayashi, K., Suzutani, T., Ogasawara, M., Yoshida, I., Shiina, R., Tsukui, A., Terahara, N., & Azuma, M. (2001), Activity of anthocyanins from fruit extract of *Ribes nigrum* L. against influenza A and B viruses. *Acta Virol*, **45**(4), 209–215.

- [191] Kontiokari, T., Sundqvist, K., Nuutinen, M., Pokka, T., Koskela, M., & Uhari, M. (2001), Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *Br Med J*, **322**(7302), 1571.
- [192] Haverkorn, M. J. & Mandigers, J. (1994), Reduction of bacteriuria and pyuria using cranberry juice. *JAMA*, **272**(8), 590.
- [193] Papas, P. N., Bruschi, C. A., & Ceresia, G. C. (1966), Cranberry juice in the treatment of urinary tract infections. *Southwest Med*, **47**(1), 17–20.
- [194] Avorn, J., Monane, M., Gurwitz, J. H., Glynn, R. J., Choodnovskiy, I., & Lipsitz, L. A. (1994), Reduction of bacteriuria and pyuria after ingestion of cranberry juice. *Jama*, **271**(10), 751–4.
- [195] Howell, A. B. (2002), Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **42**(3), 273–278.
- [196] Belleoud, L., Leluan, D., & Boyer, Y. (1966), Study on the effects of anthocyanin glycosides on the night vision of flight personnel. *Commun Soc Fr Physiol Med Aeronaut Cosmonaut*, 17.
- [197] Belleoud, L., Leluan, D., & Boyer, Y. (1966), Study of the effects of anthocyanin glycosides on the nocturnal vision of air traffic controllers. *Red Med Aeronaut Spatiale*, 18.
- [198] Jayle, G. E. & Aubert, L. (1964), Action of Anthocyanin Glycosides on the Scotopic and Mesopic Vision of the Normal Subject. *Therapie*, **19**, 171–185.
- [199] Politzer, M. (1977), Experiences in the medical treatment of progressive myopia. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, **171**(4), 616–619.
- [200] Scharrer, A. & Ober, M. (1981), Anthocyanosides in the treatment of retinopathies. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, **178**(5), 386–389.
- [201] Nakaishi, H., Matsumoto, H., Tominaga, S., & Hirayama, M. (2000), Effects of black current anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans. *Altern Med Rev*, **5**(6), 553–562.
- [202] Matsumoto, H., Nakamura, Y., Tachibanaki, S., Kawamura, S., & Hirayama, M. (2003), Stimulatory effect of cyanidin-3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. *J Agric Food Chem*, **51**, 3560–3563.
- [203] Zadok, D., Levy, Y., & Glovinsky, Y. (1999), The effect of anthocyanosides in a multiple oral dose on night vision. *Eye*, **13**, 734–736.
- [204] Levy, Y. & Glovinsky, Y. (1998), The effect of anthocyanosides on night vision. *Eye*, **12**, 967–969.
- [205] Muth, E. R., Laurent, J. M., & Jasper, P. (2000), The effect of bilberry nutritional supplementation on night visual acuity and contrast sensitivity. *Altern Med Rev*, **5**(2), 164–173.
- [206] Matsui, T., Ebuchi, S., Kobayashi, M., Fukui, K., Sugita, K., Terahara, N., & Matsumoto, K. (2002), Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from Ipomoea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action. *J Agric Food Chem*, **50**(25), 7244–7248.
- [207] Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., & Matsumoto, K. (2001), alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. *J Agric Food Chem*, **49**(4), 1948–1951.

- [208] Matsui, T., Ueda, T., Oki, T., Sugita, K., Terahara, N., & Matsumoto, K. (2001), alpha-Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 2. alpha-Glucosidase inhibition by isolated acylated anthocyanins. *J Agric Food Chem*, **49**(4), 1952–1956.
- [209] Tsuda, T., Horio, F., Uchida, K., Aoki, H., & Osawa, T. (2003), Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *J Nutr*, **133**(7), 2125–2130.
- [210] Gasiorowski, K., Brokos, B., & Tabaka, H. (2000), Evaluation of the immunomodulatory activity of four compounds exerting antimutagenic effects on human lymphocytes in vitro. *Cellular and Molecular Biology Letters*, **5**, 469–481.
- [211] Watzl, B., Bub, A., Briviba, K., & Rechkemmer, G. (2002), Acute intake of moderate amounts of red wine or alcohol has no effect on the immune system of healthy men. *Eur J Nutr*, **41**(6), 264–270.
- [212] Hertog, M. G., Hollman, P. C., Katan, M. B., & Kromhout, D. (1993), Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer*, **20**(1), 21–29.
- [213] Dragsted, L. O., Knuthsen, P., Nielsen, S. E., Strube, M., & Justesen, U. (1996), Polyphenols in Danish foods and their possible health effects. *In: Proceedings of the Symposium on polyphenols and anthocyanins as food colorants and antioxidants (W. Pfannhauser, Ed.)*, 35–44.
- [214] Linseisen, J., Radtke, J., & Wolfram, G. (1997), Flavonoid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey. *Z Ernährungswiss*, **36**(4), 403–412.
- [215] Watzl, B., Briviba, K., & Rechkemmer, G. (2002), Anthocyane. *Ernährungs-Umschau*, **49**(4), 148–150.
- [216] Horwitt, M. (1933), Observations on behavior of the anthocyanin pigment from Concord grapes in the animal body. *Proc Soc Exp Biol Med*, **30**, 949–951.
- [217] Morazzoni, P., Livio, S., Scilingo, A., & Malandrino, S. (1991), Vaccinium myrtillus anthocyanosides pharmacokinetics in rats. *Arzneimittelforschung*, **41**(2), 128–131.
- [218] Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., & Someya, K. (1999), Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J Agric Food Chem*, **47**(3), 1083–1091.
- [219] Tsuda, T., Horio, F., & Osawa, T. (1999), Absorption and metabolism of cyanidin 3-O-beta-D-glucoside in rats. *FEBS Lett*, **449**(2-3), 179–182.
- [220] Bub, A., Watzl, B., Heeb, D., Rechkemmer, G., & Briviba, K. (2001), Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *Eur J Nutr*, **40**, 113–120.
- [221] Andlauer, W., Stumpf, C., Frank, K., & Fürst, P. (2003), Absorption and metabolism of anthocyanin cyanidin-3-glucoside in the isolated rat small intestine is not influenced by ethanol. *Eur J Nutr*, **42**, 217–223.
- [222] Cao, G. & Prior, R. L. (1999), Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. *Clin Chem*, **45**(4), 574–576.
- [223] Cao, G., Muccitelli, H. U., Sanchez-Moreno, C., & Prior, R. L. (2001), Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am J Clin Nutr*, **73**(5), 920–926.

- [224] Netzel, M., Strass, G., Janssen, M., Bitsch, I., & Bitsch, R. (2001), Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **20**(2), 89–95.
- [225] Murkovic, M., Toplak, H., Adam, U., & Pfannhauser, W. (2000), Analysis of anthocyanins in plasma for determination of their bioavailability. *Journal of Food Composition and Analysis*, **13**, 291–296.
- [226] Matsumoto, H., Inaba, H., Kishi, M., Tominaga, S., Hirayama, M., & Tsuda, T. (2001), Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *J Agric Food Chem*, **49**(3), 1546–1551.
- [227] Wu, X., Cao, G., & Prior, R. L. (2002), Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *J Nutr*, **132**(7), 1865–1871.
- [228] Nielsen, I. L., Dragsted, L. O., Ravn-Haren, G., Freese, R., & Rasmussen, S. E. (2003), Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *J Agric Food Chem*, **51**(9), 2813–2820.
- [229] Rechner, A. R., Kuhnle, G., Hu, H., Roedig-Penman, A., van den Braak, M. H., Moore, K. P., & Rice-Evans, C. A. (2002), The metabolism of dietary polyphenols and the relevance to circulating levels of conjugated metabolites. *Free Radic Res*, **36**(11), 1229–1241.
- [230] Mulleder, U., Murkovic, M., & Pfannhauser, W. (2002), Urinary excretion of cyanidin glycosides. *J Biochem Biophys Methods*, **53**, 61–66.
- [231] Murkovic, M., Mülleder, U., Adam, U., & Pfannhauser, W. (2001), Detection of anthocyanins from elderberry juice in human urine. *J Sci Food Agric*, **81**, 934–937.
- [232] McGhie, T. & Ainge, G. (2001), Bioabsorption and excretion of berryfruit anthocyanins in rats and humans. In: *Biologically-active phytochemicals in food - Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function* (edited by W. Pfannhauser, G.R. Fenwick and S. Khokkar, Royal Society of Chemistry), 416–420.
- [233] Frank, T., Netzel, M., Strass, G., Bitsch, R., & Bitsch, I. (2003), Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice. *Can J Physiol Pharmacol*, **81**(5), 423–435.
- [234] Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Fraisse, D., Lamaison, J. L., & Remesy, C. (2002), Blackberry anthocyanins are slightly bioavailable in rats. *J Nutr*, **132**(6), 1249–1253.
- [235] Manach, C. (2003), Comparative bioavailability of polyphenols. *Vortrag bei der 1st International Conference on Polyphenols and Health, Vichy (persönliche Korrespondenz)*.
- [236] Milbury, P. E., Cao, G., Prior, R. L., & Blumberg, J. (2002), Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mech Ageing Dev*, **123**(8), 997–1006.
- [237] Bitsch, I., Janssen, M., Netzel, M., Strass, G., & Frank, T. (2004), Bioavailability of anthocyanidin-3-glycosides following consumption of elderberry extract and blackcurrant juice. *Int J Clin Pharmacol Ther*, **42**(5), 293–300.
- [238] Hollman, P. C., van Trijp, J. M., Buysman, M. N., van der Gaag, M. S., Mengelers, M. J., de Vries, J. H., & Katan, M. B. (1997), Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett*, **418**(1-2), 152–156.
- [239] Setchell, K. D., Faughnan, M. S., Avades, T., Zimmer-Nechemias, L., Brown, N. M., Wolfe, B. E., Brashear, W. T., Desai, P., Oldfield, M. F., Botting, N. P., & Cassidy, A. (2003), Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of <sup>13</sup>C-labeled tracers in premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, **77**(2), 411–419.

- [240] Murkovic, M., Adam, U., & Pfannhauser, W. (2000), Analysis of anthocyanine glycosides in human serum. *Fresenius J Anal Chem*, **366**(4), 379–381.
- [241] Hollman, P. C., de Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J., & Katan, M. B. (1995), Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr*, **62**(6), 1276–1282.
- [242] Morand, C., Manach, C., Crespy, V., & Remesy, C. (2000), Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radic Res*, **33**(5), 667–676.
- [243] Morand, C., Manach, C., Crespy, V., & Remesy, C. (2000), Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model. *Biofactors*, **12**(1-4), 169–174.
- [244] Hollman, P. C., Bijlsman, M., van Gameren, Y., Cnossen, E., de Vries, J., & Katan, M. (1999), The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res*, **31**, 569–573.
- [245] Gee, J. M., DuPont, M. S., Day, A. J., Plumb, G. W., Williamson, G., & Johnson, I. T. (2000), Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr*, **130**(11), 2765–2771.
- [246] Walgren, R. A., Lin, J. T., Kinne, R. K., & Walle, T. (2000), Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J Pharmacol Exp Ther*, **294**(3), 837–843.
- [247] Lee, M. J., Wang, Z. Y., Li, H., Chen, L., Sun, Y., Gobbo, S., Balentine, D. A., & Yang, C. S. (1995), Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **4**(4), 393–399.
- [248] Ueno, I., Nakano, N., & Hirono, I. (1983), Metabolic fate of [14C] quercetin in the ACI rat. *Jpn J Exp Med*, **53**(1), 41–50.
- [249] Fuhr, U. & Kummert, A. L. (1995), The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions? *Clin Pharmacol Ther*, **58**(4), 365–373.
- [250] Bokkenheuser, V. D., Shackleton, C. H., & Winter, J. (1987), Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. *Biochem J*, **248**(3), 953–956.
- [251] Bokkenheuser, V. D. & Winter, J. (1988), Hydrolysis of flavonoids by human intestinal bacteria. *Prog Clin Biol Res*, **280**, 143–145.
- [252] Hollman, P. C. & Katan, M. B. (1998), Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch Toxicol Suppl*, **20**, 237–248.
- [253] Rechner, A. R., Kuhnle, G., Bremner, P., Hubbard, G. P., Moore, K. P., & Rice-Evans, C. A. (2002), The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med*, **33**(2), 220–235.
- [254] Scheline, R. R. (1968), The metabolism of drugs and other organic compounds by the intestinal microflora. *Acta Pharmacol Toxicol*, **26**(4), 332–342.
- [255] Boutin, J. A., Meunier, F., Lambert, P. H., Hennig, P., Bertin, D., Serkiz, B., & Volland, J. P. (1993), In vivo and in vitro glucuronidation of the flavonoid diosmetin in rats. *Drug Metab Dispos*, **21**(6), 1157–1166.
- [256] Hackett, A. M. (1986), The metabolism of flavonoid compounds in mammals. *Prog Clin Biol Res*, **213**, 177–194.

- [257] Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M., & Barnes, S. (1997), Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J Nutr*, **127**(7), 1260–1268.
- [258] Goiffon, J.-P., Brun, M., & Bourrier, M.-J. (1991), High-performance liquid chromatography of red fruit anthocyanins. *J Chromatogr*, **537**, 101–121.
- [259] Matsufuji, H., Otsuki, T., Takeda, T., Chino, M., & Takeda, M. (2003), Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. *J Agric Food Chem*, **51**(10), 3157–3161.
- [260] Giusti, M. M., Ghanadan, H., & Wrolstad, R. E. (1998), Elucidation of the structure and conformation of Red Radish (*Raphanus sativus*) anthocyanins using one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance techniques. *J Agric Food Chem*, **46**, 4858–4863.
- [261] Otsuki, T., Matsufuji, H., Takeda, M., Toyoda, M., & Goda, Y. (2002), Acylated anthocyanins from red radish. *Phytochemistry*, **60**, 79–87.
- [262] Shimizu, T., Ichi, T., Iwabuchi, H., Kato, Y., & Goda, Y. (1996), Structure of diacylated anthocyanins from Red Radish (*Raphanus sativus* L.). *Jpn J Food Chem*.
- [263] Giusti, M. M., Rodriguez-Saona, L. E., Griffin, D., & Wrolstad, R. E. (1999), Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization. *J Agric Food Chem*, **47**(11), 4657–4664.
- [264] Dyrby, M., Westergaard, N., & Stapelfeldt, H. (2001), Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chemistry*, **72**, 431–437.
- [265] Ameer, B., Weintraub, R. A., Johnson, J. V., Yost, R. A., & Rouseff, R. L. (1996), Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clin Pharmacol Ther*, **60**(1), 34–40.
- [266] Strand, L. P. & Scheline, R. R. (1975), The metabolism of vanillin and isovanillin in the rat. *Xenobiotica*, **5**(1), 49–63.
- [267] Dacre, J. C. & Williams, R. T. (1968), The role of the tissues and gut micro-organisms in the metabolism of [<sup>14</sup>C]protocatechuic acid in the rat. Aromatic dehydroxylation. *J Pharm Pharmacol*, **20**(8), 610–618.
- [268] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999), Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, **26**(9-10), 1231–1237.
- [269] Yeh, C. T. & Yen, G. C. (2003), Effects of phenolic acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, **51**(5), 1474–1479.
- [270] Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1996), Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, **20**(7), 933–956.
- [271] Pietta, P. G. (2000), Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*, **63**(7), 1035–1042.
- [272] Davalos, A., Gomez-Cordoves, C., & Bartolome, B. (2004), Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *J Agric Food Chem*, **52**(1), 48–54.
- [273] Kayano, S., Kikuzaki, H., Fukutsuka, N., Mitani, T., & Nakatani, N. (2002), Antioxidant activity of prune (*Prunus domestica* L.) constituents and a new synergist. *J Agric Food Chem*, **50**(13), 3708–3712.

- [274] Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001), Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem*, **49**(10), 4619–4626.
- [275] Cabrita, L., Fossen, T., & Andersen, O. M. (2000), Colour stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solution. *Food Chem*, **68**, 101–107.
- [276] George, F., Figueiredo, P., & Brouillard, R. (1999), Malvin Z-chalcone: An unexpected new open cavity for the ferric cation. *Phytochemistry*, **50**, 1391–1394.
- [277] Boulton, D. W., Walle, U. K., & Walle, T. (1998), Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J Pharm Pharmacol*, **50**(2), 243–249.
- [278] Griffiths, L. A. & Smith, G. E. (1972), Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. Metabolite formation in vivo and by the intestinal microflora in vitro. *Biochem J*, **128**(4), 901–911.
- [279] Griffiths, L. A. & Smith, G. E. (1972), Metabolism of myricetin and related compounds in the rat. Metabolite formation in vivo and by the intestinal microflora in vitro. *Biochem J*, **130**(1), 141–151.
- [280] Manach, C., Morand, C., Demigne, C., Texier, O., Regeat, F., & Remesy, C. (1997), Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett*, **409**(1), 12–16.
- [281] Felgines, C., Texier, O., Morand, C., Manach, C., Scalbert, A., Regeat, F., & Remesy, C. (2000), Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **279**(6), 1148–1154.
- [282] Schneider, H. & Blaut, M. (2000), Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. *Arch Microbiol*, **173**(1), 71–75.
- [283] Kulling, S. E., Honig, D. M., Simat, T. J., & Metzler, M. (2000), Oxidative in vitro metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *J Agric Food Chem*, **48**(10), 4963–4972.
- [284] Winter, J., Moore, L. H., Dowell, V. R., J., & Bokkenheuser, V. D. (1989), C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **55**(5), 1203–1208.
- [285] Deprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapierre, C., & Scalbert, A. (2000), Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *J Nutr*, **130**(11), 2733–2738.
- [286] Gonthier, M. P., Cheynier, V., Donovan, J. L., Manach, C., Morand, C., Mila, I., Lapierre, C., Remesy, C., & Scalbert, A. (2003), Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J Nutr*, **133**(2), 461–467.
- [287] Aura, A. M., O’Leary, K. A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Puupponen-Pimia, R., Nuutila, A. M., Oksman-Caldentey, K. M., & Poutanen, K. (2002), Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *J Agric Food Chem*, **50**(6), 1725–1730.
- [288] Heilmann, J. & Merfort, I. (1998), Current information on the metabolism of flavonoids. I. Absorption and metabolism of flavonols. *Pharm Unserer Zeit*, **27**(2), 58–65.
- [289] Heilmann, J. & Merfort, I. (1998), Current understanding of the metabolism of flavonoids. II. Adsorption and metabolism of flavones, flavonones, flavanes, proanthocyanidins and isoflavonoids. *Pharm Unserer Zeit*, **27**(4), 173–183.

- [290] Justesen, U., Arrigoni, E., Larsen, B., & Amado, R. (2000), Degradation of flavonoid glycosides and aglycones during in vitro fermentation with human faecal flora. *Lebensmittelwissenschaft und Technologie*, **33**, 424–430.
- [291] Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A., & Ames, B. N. (1980), Fecalase: a model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77**(8), 4961–4965.
- [292] Kim, D. H., Jung, E. A., Sohng, I. S., Han, J. A., Kim, T. H., & Han, M. J. (1998), Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res*, **21**(1), 17–23.
- [293] Hrazdina, G. (1971), Reactions of the anthocyanidin-3,5-diglucosides; formation of 3,5-Di-(O-beta-D-Glucosyl)-7-Hydroxycoumarin. *Phytochemistry*, **10**, 1125–1130.
- [294] Tanchev, S. & Ioncheva (1976), Products of thermal degradation of the anthocyanins cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside and cyanidin-3-sophoroside. *Die Nahrung*, **20**(10), 889–893.
- [295] Heider, J. & Fuchs, G. (1997), Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur J Biochem*, **243**(3), 577–596.
- [296] Aura, A., Martin-Lopez, P., O’Leary, K., Williamson, G., Oksman-Caldentey, K., Poutanen, K., & Santos-Buelga, C. (2004), In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *Eur J Nutr*, Online-Publikation.
- [297] Chesson, A., Provan, G., & Stewart, C. (1999), Review: Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *J Sci Food Agric*, **79**, 373–378.
- [298] Hsu, T., Daniel, S. L., Lux, M. F., & Drake, H. L. (1990), Biotransformations of carboxylated aromatic compounds by the acetogen *Clostridium thermoaceticum*: generation of growth-supportive CO<sub>2</sub> equivalents under CO<sub>2</sub>-limited conditions. *J Bacteriol*, **172**(1), 212–217.
- [299] Philipp, B., Kemmler, D., Hellstern, J., Gorny, N., Caballero, A., & Schink, B. (2002), Anaerobic degradation of protocatechuate (3,4-dihydroxybenzoate) by *Thauera aromatica* strain AR-1. *FEMS Microbiol Lett*, **212**(1), 139–143.
- [300] Ichiyanagi, T., Rahman, M. M., Kashiwada, Y., Ikeshiro, Y., Shida, Y., Hatano, Y., Matsumoto, H., Hirayama, M., Tsuda, T., & Konishi, T. (2004), Absorption and metabolism of delphinidin 3-O-beta-D-glucopyranoside in rats. *Free Radic Biol Med*, **36**(7), 930–937.
- [301] Meng, X., Lee, M. J., Li, C., Sheng, S., Zhu, N., Sang, S., Ho, C. T., & Yang, C. S. (2001), Formation and identification of 4’-O-methyl(-)-epigallocatechin in humans. *Drug Metab Dispos*, **29**(6), 789–793.
- [302] Kohri, T., Matsumoto, N., Yamakawa, M., Suzuki, M., Nanjo, F., Hara, Y., & Oku, N. (2001), Metabolic fate of (-)-[4-(3)H]epigallocatechin gallate in rats after oral administration. *J Agric Food Chem*, **49**(8), 4102–4112.
- [303] Boersma, M. G., van der Woude, H., Bogaards, J., Boeren, S., Vervoort, J., Cnubben, N. H., van Iersel, M. L., van Bladeren, P. J., & Rietjens, I. M. (2002), Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chem Res Toxicol*, **15**(5), 662–670.
- [304] Tukey, R. H. & Strassburg, C. P. (2000), Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **40**, 581–616.
- [305] Strassburg, C. P., Nguyen, N., Manns, M. P., & Tukey, R. H. (1999), UDP-glucuronosyltransferase activity in human liver and colon. *Gastroenterology*, **116**(1), 149–160.

- [306] Strassburg, C. P., Manns, M. P., & Tukey, R. H. (1998), Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J Biol Chem*, **273**(15), 8719–8726.
- [307] Day, A. J., Bao, Y., Morgan, M. R., & Williamson, G. (2000), Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic Biol Med*, **29**(12), 1234–1243.
- [308] Mojarrabi, B. & Mackenzie, P. (1998), Characterization of two UDP glucuronosyltransferases that are predominantly expressed in human colon. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**, 704–709.
- [309] Cheng, Z., Radominska-Pandya, A., & Tephly, T. (1999), Studies on the substrate specificity of human intestinal UDP-glucuronosyltransferases 1A8 and 1A10. *Drug Metab Dispos*, **27**(10), 1165–1170.
- [310] Spencer, J. P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E. S., Srai, S. K., & Rice-Evans, C. (1999), The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett*, **458**(2), 224–230.
- [311] Doerge, D., Chang, H., Churchwell, M., & Holder, C. (2000), Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*, **28**, 298–307.
- [312] Kasuya, F., Yamaoka, Y., Osawa, E., Igarashi, K., & Fukui, M. (2000), Difference of the liver and kidney in glycine conjugation of ortho- substituted benzoic acids. *Chem Biol Interact*, **125**(1), 39–50.
- [313] Kasuya, F., Igarashi, K., & Fukui, M. (1999), Characterization of a renal medium chain acyl-CoA synthetase responsible for glycine conjugation in mouse kidney mitochondria. *Chem Biol Interact*, **118**(3), 233–246.
- [314] Matsumoto, H., Hanamura, S., Kawakami, T., Sato, Y., & Hirayama, M. (2001), Preparative-scale isolation of four anthocyanin components of black currant (*Ribes nigrum* L.) fruits. *J Agric Food Chem*, **49**(3), 1541–1545.
- [315] Mulleder, U., Murkovic, M., & Pfannhauser, W. (2001), Metabolism of cyanidin glycosides of elderberry. In: *Biologically-active phytochemicals in food - Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function* (edited by W. Pfannhauser, G.R. Fenwick and S. Khokkar, Royal Society of Chemistry), 421–425.
- [316] Felgines, C., Talavera, S., Gonthier, M. P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J. L., & Remesy, C. (2003), Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *J Nutr*, **133**(5), 1296–1301.
- [317] Walter-Sack, I. & Klotz, U. (1996), Influence of diet and nutritional status on drug metabolism. *Clin Pharmacokinet*, **31**(1), 47–64.
- [318] Caccetta, R. A., Croft, K. D., Beilin, L. J., & Puddey, I. B. (2000), Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. *Am J Clin Nutr*, **71**(1), 67–74.
- [319] Stöhr, H. & Herrmann, K. (1975), Die phenolischen Inhaltsstoffe des Obstes. *Z Lebensm Unters-Forsch*, **159**, 31–37.
- [320] Radtke, J., Linseisen, J., & Wolfram, G. (1998), Phenolsäurezufuhr Erwachsener in einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie. *Z Ernährungswiss*, **37**, 190–197.
- [321] Jacobson, E., Newmark, H., Baptista, J., & Bruce, W. (1983), A preliminary investigation of the metabolism of dietary phenolics in humans. *Nutrition Reports International*, **28**(6).

- [322] Rechner, A. R., Spencer, J. P., Kuhnle, G., Hahn, U., & Rice-Evans, C. A. (2001), Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radic Biol Med*, **30**(11), 1213–1222.
- [323] Morton, L. W., Abu-Amsha Caccetta, R., Puddey, I. B., & Croft, K. D. (2000), Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **27**(3), 152–159.
- [324] Kay, C. D., Mazza, G., Holub, B. J., & Wang, J. (2004), Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *Br J Nutr*, **91**(6), 933–942.
- [325] Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2003), The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Lett*, **544**(1-3), 210–213.
- [326] Passamonti, S., Vrhovsek, U., & Mattivi, F. (2002), The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**(3), 631–636.
- [327] Talavera, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Lamaison, J. L., & Remesy, C. (2003), Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. *J Nutr*, **133**(12), 4178–4182.
- [328] Day, A. J., DuPont, M. S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M. J., Morgan, M. R., & Williamson, G. (1998), Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett*, **436**(1), 71–75.
- [329] Lietti, A. & Forni, G. (1976), Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. II. Aspects of anthocyanins pharmacokinetics in the rat. *Arzneimittelforschung*, **26**(5), 832–835.
- [330] Serafini, M., Ghiselli, A., & Ferro-Luzzi, A. (1996), In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur J Clin Nutr*, **50**(1), 28–32.
- [331] Walle, T., Walle, U. K., & Halushka, P. V. (2001), Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J Nutr*, **131**(10), 2648–2652.
- [332] Yousef, G. G., Seigler, D. S., Grusak, M. A., Rogers, R. B., Knight, C. T., Kraft, T. F., Erdman, J. W., J., & Lila, M. A. (2004), Biosynthesis and characterization of <sup>14</sup>C-enriched flavonoid fractions from plant cell suspension cultures. *J Agric Food Chem*, **52**(5), 1138–1145.
- [333] McGhie, T., Ainge, G., Barnett, L., Cooney, J., & Jensen, D. (2003), Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *J Agric Food Chem*, **51**, 4539–4548.
- [334] Ishii, K., Furuta, T., & Kasuya, Y. (2000), Mass spectrometric identification and high-performance liquid chromatographic determination of a flavonoid glycoside naringin in human urine. *J Agric Food Chem*, **48**(1), 56–59.
- [335] Andlauer, W., Stumpf, C., & Furst, P. (2001), Intestinal absorption of rutin in free and conjugated forms. *Biochem Pharmacol*, **62**(3), 369–374.
- [336] Rice-Evans, C. A. (2000), Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. *Free Radic Res*, **33 Suppl**, 59–66.
- [337] Igarashi, O., Yonekawa, Y., & Fujiyama-Fujihara, Y. (1991), Synergistic action of vitamin E and vitamin C in vivo using a new mutant of Wistar-strain rats, ODS, unable to synthesize vitamin C. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **37**(4), 359–369.
- [338] Strain, J. J. & Mulholland, C. W. (1992), Vitamin C and vitamin E-synergistic interactions in vivo? *Exs*, **62**, 419–422.

- [339] Huang, H. Y., Appel, L. J., Croft, K. D., Miller, E. R., r., Mori, T. A., & Puddey, I. B. (2002), Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, **76**(3), 549–555.
- [340] Laranjinha, J. & Cadenas, E. (1999), Redox cycles of caffeic acid, alpha-tocopherol, and ascorbate: implications for protection of low-density lipoproteins against oxidation. *IUBMB Life*, **48**(1), 57–65.
- [341] Trombino, S., Serini, S., Di Nicuolo, F., Celleno, L., Ando, S., Picci, N., Calviello, G., & Palozza, P. (2004), Antioxidant effect of ferulic acid in isolated membranes and intact cells: synergistic interactions with alpha-tocopherol, beta-carotene, and ascorbic acid. *J Agric Food Chem*, **52**(8), 2411–2420.
- [342] Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997), Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med*, **22**(5), 749–760.
- [343] Husain, S., Cillard, J., & Cillard, P. (1987), Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, **26**(9), 2489–2491.
- [344] Kähkönen, M. P., Heinämäki, J., Hopia, A., & Heinonen, M. (2003), Antioxidant activity of berry anthocyanins. In: *Biologically-active phytochemicals in food - Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function* (edited by W. Pfannhauser, G.R. Fenwick and S. Khokkar, Royal Society of Chemistry), 357–359.
- [345] Terahara, N., Callebaut, A., Ohba, R., Nagata, T., Ohnishi-Kameyama, M., & Suzuki, M. (2001), Acylated anthocyanidin 3-sophoroside-5-glucosides from *Ajuga reptans* flowers and the corresponding cell cultures. *Phytochemistry*, **58**(3), 493–500.
- [346] Tamura, H. & Yamagami, A. (1994), Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from muscat bailey A grape. *J Agric Food Chem*, **42**, 1612–1615.
- [347] Dziedzic, S. Z. & Hudson, B. J. F. (1983), Polyhydroxy chalcones and flavanones as antioxidants for edible oils. *Food Chem*, **12**(3), 205–212.
- [348] Rimbach, G., Weinberg, P. D., de Pascual-Teresa, S., Alonso, M. G., Ewins, B. A., Turner, R., Minihane, A. M., Botting, N., Fairley, B., Matsugo, S., Uchida, Y., & Cassidy, A. (2004), Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Biochim Biophys Acta*, **1670**(3), 229–237.
- [349] Turner, R., Baron, T., Wolfram, S., Minihane, A. M., Cassidy, A., Rimbach, G., & Weinberg, P. D. (2004), Effect of circulating forms of soy isoflavones on the oxidation of low density lipoprotein. *Free Radic Res*, **38**(2), 209–216.
- [350] Vaca, C. E. & Harms-Ringdahl, M. (1989), Interaction of lipid peroxidation products with nuclear macromolecules. *Biochim Biophys Acta*, **1001**(1), 35–43.
- [351] Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B., & Wrolstad, R. E. (2002), Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *J Agric Food Chem*, **50**(21), 6172–6181.
- [352] Rossetto, M., Vanzani, P., Mattivi, F., Lunelli, M., Scarpa, M., & Rigo, A. (2002), Synergistic antioxidant effect of catechin and malvidin 3-glucoside on free radical-initiated peroxidation of linoleic acid in micelles. *Arch Biochem Biophys*, **408**(2), 239–245.
- [353] Hwang, J., Sevanian, A., Hodis, H. N., & Ursini, F. (2000), Synergistic inhibition of LDL oxidation by phytoestrogens and ascorbic acid. *Free Radic Biol Med*, **29**(1), 79–89.
- [354] Frank, J., Kamal-Eldin, A., Lundh, T., Maatta, K., Torronen, R., & Vessby, B. (2002), Effects of dietary anthocyanins on tocopherols and lipids in rats. *J Agric Food Chem*, **50**(25), 7226–7230.

- [355] Sarma, A., Sreelakshimi, Y., & Sharma, R. (1997), Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. *Phytochemistry*, **45**(4), 671–674.
- [356] Tseng, T. H., Wang, C. J., Kao, E. S., & Chu, H. Y. (1996), Hibiscus protocatechuic acid protects against oxidative damage induced by tert-butylhydroperoxide in rat primary hepatocytes. *Chem Biol Interact*, **101**(2), 137–148.
- [357] Ueda, J., Saito, N., Shimazu, Y., & Ozawa, T. (1996), A comparison of scavenging abilities of antioxidants against hydroxyl radicals. *Arch Biochem Biophys*, **333**(2), 377–384.
- [358] Sang, S., Lapsley, K., Jeong, W. S., Lachance, P. A., Ho, C. T., & Rosen, R. T. (2002), Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus* Batsch). *J Agric Food Chem*, **50**(8), 2459–2463.
- [359] Liu, C. L., Wang, J. M., Chu, C. Y., Cheng, M. T., & Tseng, T. H. (2002), In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol*, **40**(5), 635–641.
- [360] Hung, C. Y. & Yen, G. C. (2002), Antioxidant activity of phenolic compounds isolated from *Mesona procumbens* Hemsl. *J Agric Food Chem*, **50**(10), 2993–2997.
- [361] Lee, M. J., Chou, F. P., Tseng, T. H., Hsieh, M. H., Lin, M. C., & Wang, C. J. (2002), Hibiscus protocatechuic acid or esculetin can inhibit oxidative LDL induced by either copper ion or nitric oxide donor. *J Agric Food Chem*, **50**(7), 2130–2136.
- [362] Lin, W. L., Hsieh, Y. J., Chou, F. P., Wang, C. J., Cheng, M. T., & Tseng, T. H. (2003), Hibiscus protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage. *Arch Toxicol*, **77**(1), 42–47.
- [363] Tseng, T. H., Kao, T. W., Chu, C. Y., Chou, F. P., Lin, W. L., & Wang, C. J. (2000), Induction of apoptosis by hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochem Pharmacol*, **60**(3), 307–315.
- [364] Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., Yoshimi, N., & Mori, H. (1993), Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protocatechuic acid in rats. *Cancer Res*, **53**(12), 2775–2779.
- [365] Tanaka, T., Kojima, T., Suzui, M., & Mori, H. (1993), Chemoprevention of colon carcinogenesis by the natural product of a simple phenolic compound protocatechuic acid: suppressing effects on tumor development and biomarkers expression of colon tumorigenesis. *Cancer Res*, **53**(17), 3908–3913.
- [366] Kawamori, T., Tanaka, T., Kojima, T., Suzui, M., Ohnishi, M., & Mori, H. (1994), Suppression of azoxymethane-induced rat colon aberrant crypt foci by dietary protocatechuic acid. *Jpn J Cancer Res*, **85**(7), 686–691.
- [367] Hirose, Y., Tanaka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita, H., Mori, H., Satoh, K., & Hara, A. (1995), Chemoprevention of urinary bladder carcinogenesis by the natural phenolic compound protocatechuic acid in rats. *Carcinogenesis*, **16**(10), 2337–42.
- [368] Nakamura, H., Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K., Miyauchi, M., Son, H. Y., & Hirose, M. (2000), Inhibitory effects of protocatechuic acid on the post-initiation phase of hamster pancreatic carcinogenesis induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. *Anticancer Res*, **20**(5), 3423–3427.
- [369] Tseng, T. H., Hsu, J. D., Lo, M. H., Chu, C. Y., Chou, F. P., Huang, C. L., & Wang, C. J. (1998), Inhibitory effect of Hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Lett*, **126**(2), 199–207.

- [370] Tanaka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Okamoto, K., Mori, H., & Hara, A. (1994), Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary protocatechuic acid during initiation and postinitiation phases. *Cancer Res*, **54**(9), 2359–2365.
- [371] Suzuki, R., Kohno, H., Sugie, S., & Tanaka, T. (2003), Dietary protocatechuic acid during the progression phase exerts chemopreventive effects on chemically induced rat tongue carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev*, **4**(4), 319–326.
- [372] Ohnishi, M., Yoshimi, N., Kawamori, T., Ino, N., Hirose, Y., Tanaka, T., Yamahara, J., Miyata, H., & Mori, H. (1997), Inhibitory effects of dietary protocatechuic acid and costunolide on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res*, **88**(2), 111–119.
- [373] Tanaka, T., Kojima, T., Kawamori, T., & Mori, H. (1995), Chemoprevention of digestive organs carcinogenesis by natural product protocatechuic acid. *Cancer*, **75**(6), 1433–1439.
- [374] Kampa, M., Alexaki, V. I., Notas, G., Nifli, A. P., Nistikaki, A., Hatzoglou, A., Bakogeorgou, E., Kouimtzoglou, E., Blekas, G., Boskou, D., Gravanis, A., & Castanas, E. (2004), Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res*, **6**(2), 63–74.
- [375] Sawa, T., Nakao, M., Akaike, T., Ono, K., & Maeda, H. (1999), Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor-promoter effect of vegetables. *J Agric Food Chem*, **47**(2), 397–402.
- [376] Chiang, L. C., Ng, L. T., Chiang, W., Chang, M. Y., & Lin, C. C. (2003), Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Med*, **69**(7), 600–604.
- [377] Briviba, K., Pan, L., & Rechkemmer, G. (2002), Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. *J Nutr*, **132**(9), 2814–2818.
- [378] Stadler, R. H., Markovic, J., & Turesky, R. J. (1995), In vitro anti- and pro-oxidative effects of natural polyphenols. *Biol Trace Elem Res*, **47**(1-3), 299–305.
- [379] Sahu, S. C. & Gray, G. C. (1996), Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Lett*, **104**(2), 193–196.
- [380] Yoshino, M., Haneda, M., Naruse, M., & Murakami, K. (1999), Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab*, **68**(4), 468–472.
- [381] Wadsworth, T. L. & Koop, D. R. (1999), Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol*, **57**(8), 941–949.
- [382] Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A., & Maatela, J. (1996), Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Bmj*, **312**(7029), 478–481.
- [383] Degenhardt, A., Hofmann, S., Knapp, H., & Winterhalter, P. (2000), Preparative isolation of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and application of the color activity concept to red wine. *J Agric Food Chem*, **48**(12), 5812–5818.
- [384] Schwarz, M., Hillebrand, S., Habben, S., Degenhardt, A., & Winterhalter, P. (2003), Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochemical Engineering Journal*, **14**, 179–189.

- [385] Degenhardt, A., Engelhardt, U. H., Wendt, A. S., & Winterhalter, P. (2000), Isolation of black tea pigments using high-speed countercurrent chromatography and studies on properties of black tea polymers. *J Agric Food Chem*, **48**(11), 5200–5205.
- [386] Winterhalter, P. & Degenhardt, A. (2002), Lebensmittelanalytik - aktuelle Trends: Grundlagen und Anwendungen der Gegenstromverteilungschromatographie. *Lebensmittelchemie*, **56**, 42–45.
- [387] Smolarz, H. (2001), Application of GC-MS Method for analysis of phenolic acids and their esters in chloroformic extracts from some taxons of Polygonum L. genus. *Chem Anal (Warsaw)*, **46**, 439–444.
- [388] Lake, B. (1987), Preparation and characterization of microsomal fractions for studies on xenobiotic metabolism. In: *Biochemical Toxicology: A practical approach*; Snell K, Mullock B, Eds; IRL Press: Oxford, U.K., 1987, 183–215.
- [389] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**(1), 265–275.
- [390] Wang, L. Q., Meselhy, M. R., Li, Y., Qin, G. W., & Hattori, M. (2000), Human intestinal bacteria capable of transforming secoisolariciresinol diglucoside to mammalian lignans, enterodiol and enterolactone. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **48**(11), 1606–1610.
- [391] Meselhy, M. R., Nakamura, N., & Hattori, M. (1997), Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **45**(5), 888–893.
- [392] Guyton, A. C. & Hall, J. E. (1996), Gastrointestinal physiology. In: *Textbook of Medical Physiology, 9th Ed.*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 810–811.
- [393] Karppinen, S., Liukkonen, K., Aura, A., Forssell, P., & Poutanen, K. (2000), In vitro fermentation of polysaccharides of rye, wheat and oat brans and inulin by human faecal bacteria. *J Sci Food Agric*, **80**, 1469–1476.
- [394] Chang, Y. C. & Nair, M. G. (1995), Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. *J Nat Prod*, **58**(12), 1892–1896.
- [395] Kulling, S. E., Honig, D. M., & Metzler, M. (2001), Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo. *J Agric Food Chem*, **49**(6), 3024–3033.
- [396] Nadelmann, L., Tjornelund, J., Hansen, S. H., Cornett, C., Sidelmann, U. G., Braumann, U., Christensen, E., & Christensen, S. B. (1997), Synthesis, isolation and identification of glucuronides and mercapturic acids of a novel antiparasitic agent, licochalcone A. *Xenobiotica*, **27**(7), 667–680.
- [397] Nielsen, I., Nielsen, S. E., Ravn-Haren, G., & Dragsted, L. O. (2003), Detection, stability and redox effects of black currant anthocyanin glycosides in vivo: positive identification by mass spectrometry. In: *Biologically-active phytochemicals in food - Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function* (edited by W. Pfannhauser, G.R. Fenwick and S. Khokkar, Royal Society of Chemistry), 389–393.
- [398] Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993), A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*, **84**(4), 407–412.
- [399] Campos, A. & Lissi, E. (1996), Total antioxidant potential of chilean wines. *Nutrition Research*, **16**(3), 385–389.
- [400] Benzie, I. F. & Strain, J. J. (1996), The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power the FRAP assay. *Anal Biochem*, **239**(1), 70–76.

- [401] Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000), Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem*, **48**(8), 3396–3402.
- [402] Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993), Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med*, **14**(3), 303–311.
- [403] Cao, G. & Prior, R. L., Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods in Enzymology*, **299**, 50–62.
- [404] Cao, G. & Prior, R. L. (1999), Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol*, **299**, 50–62.
- [405] Wahl, R. U., Zeng, L., Madison, S. A., DePinto, R. L., & Shay, B. J. (1998), Mechanistics studies on the decomposition of water soluble azo-radical-initiators. *J Chem Soc*, 2009–2017.
- [406] Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T., & Holub, B. J. (2002), Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J Agric Food Chem*, **50**(26), 7731–7737.

## E Publikationsliste

### Publikationen in Fachzeitschriften

J. Fleschhut, F. Kratzer, G. Rechkemmer, S. E. Kulling

Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro  
*Eur J Nutr*, zur Publikation eingereicht.

J. Fleschhut, A. Bub, G. Rechkemmer, P. Winterhalter, S. E. Kulling

Untersuchungen zum Metabolismus und zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen  
*Lebensmittelchemie*, 57: 140-141, 2003.

I. Szankowski, K. Briviba, J. Fleschhut, J. Schönherr, H. J. Jacobson, H. Kiesecker

Transformation of apple (*Malus domestica* Borkh.) with the stilbene synthase gene from grapevine (*Vitis vinifera* L.) and a PGIP gene from kiwi (*Actinidia deliciosa*)  
*Plant Cell Rep*, 22: 141-149, 2003.

J. Fleschhut, G. Rechkemmer, S. E. Kulling

Zum anaeroben Abbau von Anthocyanen durch die intestinale Mikroflora des Menschen  
*Lebensmittelchemie*, 57: 25, 2003.

### In Vorbereitung

J. Fleschhut, G. Rechkemmer, P. Winterhalter, S. E. Kulling

*In vivo* biotransformation of pure cyanidin-3-glucoside.

### Vorträge

J. Fleschhut, S. E. Kulling (eingeladener Plenarvortrag)

Bioavailability and metabolism of pure cyanidin-3-O-glucoside in humans  
22. International conference on polyphenols, Helsinki, 25.-28.08.2004.

J. Fleschhut, S. E. Kulling

Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Anthocyanen

Lebensmittelchemisches Kolloquium der Universität Hamburg, 14.05.2004.

S. E. Kulling, J. Fleschhut

Metabolismus als Determinanten der biologischen Wirkung von Anthocyanen  
Vortrag im Rahmen des Biomedizinischen Ernährungsseminars  
an der Universität Jena, 13.01.2004.

S. E. Kulling, J. Fleschhut

Metabolismus als Determinanten der biologischen Wirkung von Anthocyanen  
Vortrag im Rahmen der Ringvorlesung „Molekulare Ernährungslehre“  
an der Universität Kaiserslautern, Fachrichtung Lebensmittelchemie, 01.12.2003.

J. Fleschhut, A. Bub, G. Rechkemmer, P. Winterhalter, S. E. Kulling

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und zum Metabolismus von Anthocyanen  
32. Deutscher Lebensmittelchemikertag, München, 08.–10.10.2003.

J. Fleschhut, A. Bub, G. Rechkemmer, P. Winterhalter, S. E. Kulling

Bioverfügbarkeit und Metabolismus als Determinanten der biologischen Aktivität  
von Anthocyanen  
Kolloquium der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe, 09.09.2003.

### **Posterbeiträge auf Fachtagungen**

J. Fleschhut, A. Bub, G. Rechkemmer, P. Winterhalter, S. E. Kulling

Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Cyanidin-3-*O*-glucosid  
41. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, München, 11.–12.03.2004.

J. Fleschhut, A. Bub, G. Rechkemmer, P. Winterhalter, S. E. Kulling

Bioavailability and metabolism of anthocyanins  
1st International Conference on Polyphenols and Health, Vichy, 18.–21.11.2003. Abstract:  
Proceedings of the 1st International Conference on Polyphenols and Health, 281, 2003.

J. Fleschhut, S.E. Kulling, G. Rechkemmer

Anaerober Abbau von Anthocyanen durch Dickdarmbakterien des Menschen  
40. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, Potsdam, 13.–14.03.2003.

J. Fleschhut, G. Rechkemmer, S. E. Kulling

Zum anaeroben Abbau von Anthocyanen durch die intestinale Mikroflora des Menschen  
31. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Frankfurt, 9.–11.09.2002.

## F Danksagungen

Danken möchte ich allen, die auf verschiedene Weise – direkt oder indirekt – zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei

- Sabine Kulling, für eine hervorragende, fachlich kompetente und von Menschlichkeit geprägte Betreuung und die stete wissenschaftliche Förderung.
- Drazen Kostelac, Frank Kratzer, Tina Sicilia, Jutta Möseneder und Conny Hodapp für ihre Freundschaft und ihre Unterstützung in allen Bereichen; ohne sie wäre die Zeit an der BFE um einiges ärmer gewesen.
- den Wissenschaftlern am IEP für ihre offenen Türen und die stete Bereitschaft zur Hilfe in allen Bereichen: Stephan Barth, Karlis Briviba, Achim Bub, Henry Delincee, Prof. Gerhard Rechkemmer und Bernhard Watzl.
- allen (ehemaligen) Mitarbeitern des Instituts für Ernährungsphysiologie für eine extrem schöne Zeit in den zurückliegenden Jahren.
- Prof. Dr. Winterhalter und seinen Mitarbeitern für die Isolierung und Zurverfügungstellung der Anthocyane.
- Mathias Ketzer für seine freundliche Unterstützung bei diversen Computerproblemen.
- Astrid Beinhauer für die Durchführung zahlreicher TEAC- und FRAP-Messungen.
- Michael „Árpi“ Szodorai, Michael Käss und Simone Weis-Heigold für die zahlreichen Tipps im Umgang mit  $\text{\LaTeX}$ .
- allen meinen Freunden für ihr stetes Interesse an meiner Arbeit. Besonders erwähnen möchte ich Stefan Gerhart und Elke Billes-Gerhart sowie Árpi und Anita Szodorai, die mich mit ihrer Freundschaft durch diese Arbeit begleitet und mir den Blick über den Tellerrand zu bewahren geholfen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt

- meiner Freundin Ute für ihr unendliches Verständnis beim Miterleben dieser Zeit, ihre zahlreichen Aufmunterungen und ihren Beistand während jeder Phase dieser Arbeit.
- meinen Eltern und Großeltern, die durch ihre Hilfe und Unterstützung in jeder Hinsicht diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben und denen ich weit mehr verdanke als ich es hier beschreiben kann.

# Lebenslauf

**Name** Jens Fleschhut

**Geburtsdatum** 16. Februar 1976

**Geburtsort** Heilbronn a.N.

**Staatsangehörigkeit** deutsch

## Schulbildung

1982 – 1986 Staufenberg-Grundschule Heilbronn

1986 – 1995 Justinus-Kerner-Gymnasium Heilbronn

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Auszeichnung des „Fond der Chemischen Industrie“

**07/95 – 08/96** Zivildienst

## Studium

10/96 – 05/01 Studium der Lebensmittelchemie und Toxikologie an der  
Universität Karlsruhe (TH)

10/98 Vorprüfung der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

11/00 – 05/01 Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Metzler

Thema: Etablierung eines Modellsystems (Fe-Porphyrin)  
zur Bildung oxidativer Metabolite

Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemiker /  
Zweiter Prüfungsabschnitt der Staatsprüfung für  
Lebensmittelchemiker

Auszeichnung: Procter & Gamble Award 2002

## Dissertation

seit 07/01 Promotion am Institut für Ernährungsphysiologie der

Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel

Thema: Untersuchungen zum Metabolismus, zur Bioverfügbarkeit  
und zur antioxidativen Wirkung von Anthocyanen