

**Vorkommen, Bioverfügbarkeit und Metabolismus von
Lycopin
und dessen Wirkung gegen
oxidativen Stress**

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-Lebensmittelchemikerin Tina Sicilia
aus Mannheim

Dekan: Prof. Dr. M. Kappes
Referent: Prof. Dr. S. E. Kulling
Korreferent: Prof. Dr. M. Metzler
Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.04

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Juli 2001 und November 2004 in der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittel und Ernährung am Institut für Ernährungsphysiologie angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Stoffklasse der Carotinoide mit dem Schwerpunkt Lycopin	1
1.1.1	Vorkommen	1
1.1.2	Struktur und Biosynthese.....	2
1.1.3	Eigenschaften	5
1.1.4	Bioverfügbarkeit.....	6
1.1.5	Stoffwechsel	7
1.1.6	Carotinoide im Blut und die Verteilung in den Organen	8
1.1.7	Metabolismus.....	9
1.1.8	Wirkung von Lycopin für die Gesundheit	10
1.1.9	Wirkmechanismen	11
1.1.9.1	Wirkung als Antioxidans	11
1.1.9.2	Beeinflussung der Zell-Zell-Kommunikation	12
1.1.9.3	Weitere Wirkmechanismen	12
1.1.10	Tiermodelle für die Carotinoid-Forschung.....	13
1.2	Phenolsäuren und Flavonoide	14
1.2.1	Struktur der Phenolsäuren und ihr Vorkommen in Tomaten	14
1.2.2	Bioverfügbarkeit und Wirkung von Phenolsäuren	15
1.2.3	Struktur der Flavonoide und ihr Vorkommen in Tomaten.....	16
1.2.4	Bioverfügbarkeit und Wirkung von Flavonoiden.....	17
1.2.5	Analytik der Phenolsäuren und Flavonoide aus Obst und Gemüse.....	18
1.3	Die Tomate und ihre Inhaltsstoffe	19
1.4	Isoprostane - Biomarker für oxidativen Stress	19
1.4.1	Oxidativer Stress	19
1.4.2	Struktur und Bildung von Isoprostanen.....	20
1.4.3	Biologische Aktivität des 8-iso PGF _{2α}	23
1.4.4	Erhöhte Isoprostan-Werte in Urin und Plasma.....	24
1.4.5	Analytik der Isoprostane mittels GC/MS mit negativer chemischer Ionisation (NCI)	24
1.4.6	Vergleich des 8-iso PGF _{2α} mit Malondialdehyd (MDA) als Biomarker für oxidativen Stress	27
2	PROBLEMSTELLUNG	28
3	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1	Geräte und Materialien	29

3.1.1	Geräte.....	29
3.1.2	Chemikalien.....	30
3.1.2.1	Standards.....	30
3.1.2.2	Enzyme.....	31
3.1.2.3	HPLC-Fließmittel.....	31
3.1.2.4	Sonstige Lösungsmittel.....	31
3.1.2.5	Säuren.....	31
3.1.2.6	Salze.....	32
3.1.2.7	Gase.....	32
3.1.2.8	Sonstige Chemikalien.....	32
3.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	32
3.1.4	Tomaten.....	33
3.1.5	Materialien, Tiere und Futter der Tierstudien.....	36
3.1.5.1	Supplemente für die Intervention.....	36
3.1.5.2	Studie mit Ratten.....	36
3.1.5.3	Studie mit Frettchen.....	37
3.1.6	Supplemente für die Humanstudie.....	37
3.2	Methoden.....	38
3.2.1	Bestimmung verschiedener Inhaltsstoffe in Tomaten.....	38
3.2.1.1	Anbau, Ernte und Verarbeitung der Tomaten.....	38
3.2.1.2	Extraktion der Carotinoide, Tocopherole und Phaeophytine aus Tomaten ..	38
3.2.1.3	Enzymatische Bestimmung von Zitronensäure und L-Äpfelsäure sowie von Glucose, Fructose und Saccharose.....	39
3.2.1.4	Bestimmung phenolischer Verbindungen aus Tomaten.....	41
3.2.2	Versuchsdesigns der Interventionsstudien.....	42
3.2.2.1	Studie mit präruminanten Kälbern.....	42
3.2.2.2	Studie mit Ratten.....	42
3.2.2.3	Studie mit Frettchen.....	43
3.2.2.4	Humanstudie.....	44
3.2.3	Analytik der Carotinoide in Plasma und Organen.....	45
3.2.3.1	Extraktion der Carotinoide aus Plasma.....	45
3.2.3.2	Extraktion der Carotinoide aus den Organen.....	46
3.2.4	<i>In vitro</i> -Metabolismusstudien.....	46
3.2.4.1	Herstellung von Kälbermikrosomen und Kälbercytosol.....	46
3.2.4.2	Proteinbestimmung.....	47
3.2.4.3	Inkubation von Lycopin mit Mikrosomen und NADPH als Kofaktor.....	48
3.2.4.4	Inkubation von Lycopin mit Cytosol und NADH als Kofaktor.....	49
3.2.4.5	Inkubation mit Pansensaft.....	50
3.2.5	Bestimmung von Isoprostanen in Körperflüssigkeiten.....	52
3.2.5.1	Isolierung der Isoprostane aus Urin mit Ethylacetat und HPLC- Fraktionierung.....	52
3.2.5.2	Isolierung des 8-iso PGF _{2α} aus Urin mit Immunaффinitätschromatographie (IAC).....	52
3.2.5.3	Isolierung des 8-iso PGF _{2α} aus Plasma mit IAC (Methode 1).....	53
3.2.5.4	Isolierung des 8-iso PGF _{2α} aus Plasma mit IAC (Methode 2).....	53
3.2.5.5	Bestimmung des 8-iso PGF _{2α} aus Urin mit Enzymimmunoassay (EIA).....	54
3.2.5.6	Bestimmung des 8-iso PGF _{2α} aus Plasma mit EIA.....	55
3.2.6	Sonstige Methoden.....	55
3.2.6.1	Überprüfung der Stabilität des Lycopins in den Versuchsdiäten.....	55
3.2.6.2	Bestimmung von Malondialdehyd in Urin und Plasma.....	56
3.2.6.3	Bestimmung von Kreatinin in Urin am Reflotron®.....	56

3.2.7	Messanalytik	57
3.2.7.1	HPLC-Trennung für Carotinoide	57
3.2.7.2	Externe Kalibrierung der Carotinoide an der HPLC	58
3.2.7.3	Externe Kalibrierung der Phaeophytine a und b an der HPLC	58
3.2.7.4	Externe Kalibrierung der Tocopherole α und γ an der HPLC.....	59
3.2.7.5	HPLC-Trennung für Phenolsäuren und Flavonoide sowie deren Konjugate	59
3.2.7.6	Externe Kalibrierung der Phenolsäuren und Flavonoide an der HPLC.....	60
3.2.7.7	HPLC-Trennung für Isoprostane.....	60
3.2.7.8	HPLC-Trennung für Malondialdehyd	61
3.2.7.9	LC/MS-Bedingungen für die Carotinoidanalytik	61
3.2.7.10	LC/MS-Bedingungen für die Phenolsäure- und Flavonoidanalytik	62
3.2.7.11	GC/MS-Bedingungen.....	63
3.2.7.12	GC/MS/MS-Bedingungen	64
3.2.7.13	Externe Kalibrierung des 8-iso PGF _{2α} an der GC/MS mit internem Standard d ₄ -8-iso PGF _{2α}	65
3.2.8	Statistik	65
4	ERGEBNISSE	67
4.1	Vorkommen von Carotinoiden: Analyse von verschiedenen Tomatensorten	67
4.2	Bestimmung weiterer Inhaltsstoffe von Tomaten	74
4.2.1	Vitamin E-Bestimmung	74
4.2.2	Enzymatische Bestimmung der Fruchtsäuren	75
4.2.3	Bestimmung von freien und gebundenen Phenolsäuren und von Flavonoiden	76
4.2.3.1	Bestimmung der freien Phenolsäuren und Flavonoide und deren Konjugate im Extrakt.....	76
4.2.3.2	Etablierung einer geeigneten Hydrolysemethode zur Spaltung der Phenolsäure- und Flavonoidkonjugate	82
4.2.3.3	Quantifizierung der gebundenen Phenolsäuren und Flavonoide nach enzymatischer Hydrolyse.....	85
4.3	Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Lycopin: Untersuchungen an drei Tiermodellen	88
4.3.1	Studie mit präurinant Kälbern	88
4.3.1.1	Carotinoidanalyse im Plasma	88
4.3.1.2	Struktur der Lycopinmetabolite	90
4.3.1.3	<i>In vitro</i> -Metabolismusstudien zur Bildung der Lycopinmetabolite	92
4.3.2	Studie mit Ratten	92
4.3.2.1	Analyse der Supplemente und deren Stabilität im Tierfutter.....	92
4.3.2.2	Die Ergebnisse des Vorversuchs.....	93
4.3.2.3	Die Ergebnisse des Hauptversuchs.....	95
4.3.3	Studie mit Frettchen.....	98
4.4	Wirkung von Lycopin gegen oxidativen Stress: Isoprostane als Biomarker	103
4.4.1	Bestimmung der Nachweisgrenze für das 8-iso PGF _{2α} an der GC/MS.....	103
4.4.2	Etablierung einer Methode zur Analyse der Isoprostane im Urin	103

4.4.3	Isolierung des 8-iso PGF _{2α} aus Urin mit Immunaffinitätschromatographie (IAC) und Messung mit GC/MS - Etablierung der Methode	106
4.4.3.1	Intra-assay-Reproduzierbarkeit.....	108
4.4.3.2	Inter-assay-Reproduzierbarkeit.....	108
4.4.3.3	Bestimmung der Wiederfindung des 8-iso PGF _{2α} in der Matrix	109
4.4.4	Isolierung des 8-iso PGF _{2α} aus Plasma mit IAC und Messung mit GC/MS - Etablierung einer Methode	110
4.4.4.1	Inter-assay-Reproduzierbarkeit.....	112
4.4.4.2	Inter-assay-Reproduzierbarkeit mit Messung an der GC/MS/MS.....	114
4.4.5	Humanstudie.....	114
4.4.5.1	Analyse der Carotinoide im Plasma.....	114
4.4.5.2	Bestimmung des 8-iso PGF _{2α} im Urin mit IAC und GC/MS sowie mit Enzymimmunoassay (EIA).....	115
4.4.5.3	Bestimmung von 8-iso PGF _{2α} im Plasma mit IAC und GC/MS/MS sowie mit EIA	116
4.4.5.4	Vergleich der 8-iso PGF _{2α} -Gehalte nach GC/MS/(MS)-Messung mit denen des EIA	118
4.4.5.5	Bestimmung von Malondialdehyd (MDA) im Urin und Plasma	119
4.4.5.6	Vergleich der MDA-Gehalte mit den 8-iso PGF _{2α} -Gehalten nach GC/MS/(MS)-Messung im Urin und Plasma	120
5	DISKUSSION	122
5.1	Analyse verschiedener Tomatensorten	122
5.2	Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Lycopin bei verschiedenen Tiermodellen und beim Mensch	124
5.2.1	Tiermodell präruminantes Kalb	124
5.2.2	Struktur der Lycopinmetabolite beim präruminanten Kalb	125
5.2.3	Tiermodell Ratte	128
5.2.4	Tiermodell Frettchen.....	130
5.2.5	Vergleich der Tiermodelle untereinander und mit dem Mensch.....	133
5.2.6	Mögliche Gründe für die Unterschiede in der Biokinetik der beiden Lycopinformulierungen.....	135
5.3	Bestimmung des 8-iso Prostaglandin F_{2α}.....	136
5.3.1	Bewertung der etablierten Methoden.....	136
5.3.2	Vergleich der Ergebnisse der GC/MS-Messung mit denen des EIA.....	137
5.3.3	Vergleich der Gehalte von 8-iso PGF _{2α} mit denen von Malondialdehyd ...	139
5.3.4	Einfluss einer Lycopinintervention bei Rauchern auf Marker für oxidativen Stress	139
6	ZUSAMMENFASSUNG	142
7	LITERATURVERZEICHNIS	144

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
BHT	2,6-Di-tert.-butyl-p-kresol
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
COX	Cyclooxygenase
DAD	Diodenarraydetektor
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DC	Dünnschichtchromatographie
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
EIA	Enzymimmunoassay
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI	Electrospray-Ionisation
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
HDL	High Density Lipoprotein, Lipoproteine hoher Dichte
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IAC	Immunaффinitätschromatographie
KG	Körpergewicht
LC	Liquid Chromatography
LDL	Low Density Lipoprotein, Lipoproteine geringer Dichte
MDA	Malondialdehyd
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
NADH	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid reduziert Dinatriumsalz Hydrat
NADP	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat Dinatriumsalz
NCI	Negative chemische Ionisation
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFB-Br	Pentafluorbenzylbromid
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PTV	Programmed Temperature Vaporizer

SGPT	Serum-Glutamin-Pyruvat-Transaminase
SIM	Selected ion monitoring
SRM	Selected reaction monitoring
U/min	Umdrehungen/Minute
UV	UV-Detektor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein, Lipoproteine sehr geringer Dichte

1 Einleitung

1.1 Die Stoffklasse der Carotinoide mit dem Schwerpunkt Lycopin

1.1.1 Vorkommen

Die Carotinoide sind eine in der Natur weit verbreitete Farbstoffklasse zu der mehr als 600 verschiedene Verbindungen gehören. Sie können ausschließlich von höheren Pflanzen, Algen, Bakterien und Pilzen synthetisiert werden und gelangen über die Nahrung in den tierischen und menschlichen Organismus. Carotinoide sind in vielen Teilen der Pflanze zu finden. Eindrucksvolle Beispiele für das Vorkommen sind z. B. die gelb gefärbten Blütenblätter der Sonnenblume, rote und gelbe Früchte wie die Tomate oder Orange und orange gefärbte Wurzeln wie die Karotte. Oft wird die Farbe der Carotinoide jedoch von der grünen Farbe der Chlorophylle überdeckt. Sie kommt erst zum Vorschein, wenn die Chlorophylle abgebaut werden, wie das bei Laubblättern im Herbst der Fall ist.

Auch die Farbe vieler Tiere wird bestimmt durch die mit der Nahrung zugeführten Carotinoide. Dies zeigt sich beispielsweise in der Farbe der Federn wie beim Flamingo oder der Haut und dem Fleisch wie beim Goldfisch und Lachs (Britton et al., 1995).

Lycopin kommt hauptsächlich in Tomaten und Tomatenprodukten wie Tomatensaft, Tomatenmark oder Ketchup vor und ist für die rote Farbe verantwortlich. Es ist aber auch in anderen Früchten zu finden (s. Tab. 1-1). Tomaten und ihre Produkte stellen jedoch die Hauptaufnahmequelle von Lycopin für den Menschen dar.

Tab. 1-1: Vorkommen von Lycopin (Shi und Le Maguer, 2000).

Pflanze	Lycopin-Gehalt [mg/100 g Nassgewicht]
Tomate	0,7 - 20
Wassermelone	2,3 - 7,2
Guave	5,2 - 5,3
Grapefruit (pink)	0,3 - 3,4
Papaya	0,1 - 5,3
Karotte	0,6 - 0,8
Kürbis	0,4 - 0,5
Süßkartoffel	0,02 - 0,1

1.1.2 Struktur und Biosynthese

Der Großteil der Carotinoide sind Tetraterpene, die aus acht Isopreneinheiten aufgebaut sind. Es werden sauerstofffreie Carotinoide, die Carotine, von den sauerstoffhaltigen, den Xantophyllen, unterschieden. Die Xantophylle liegen in der Natur häufig mit Fettsäuren verestert vor.

Die Biosynthese geht vom Isopentenylidiphosphat (IDP) und seinem Isomer dem Dimethylallyldiphosphat aus, die durch Prenyltransferase miteinander zum Geranyl-diphosphat reagieren. Durch weitere Reaktion mit IDP wird zunächst Farnesyl- und Geranylgeranyl-diphosphat (GGDP) gebildet. Bei der Reaktion zweier GGDP-Moleküle entsteht schließlich das Tetraterpen Phytoen (s. Abb. 1-1). Es besitzt nur drei konjugierte Doppelbindungen und ist deshalb farblos (Britton, 1998).

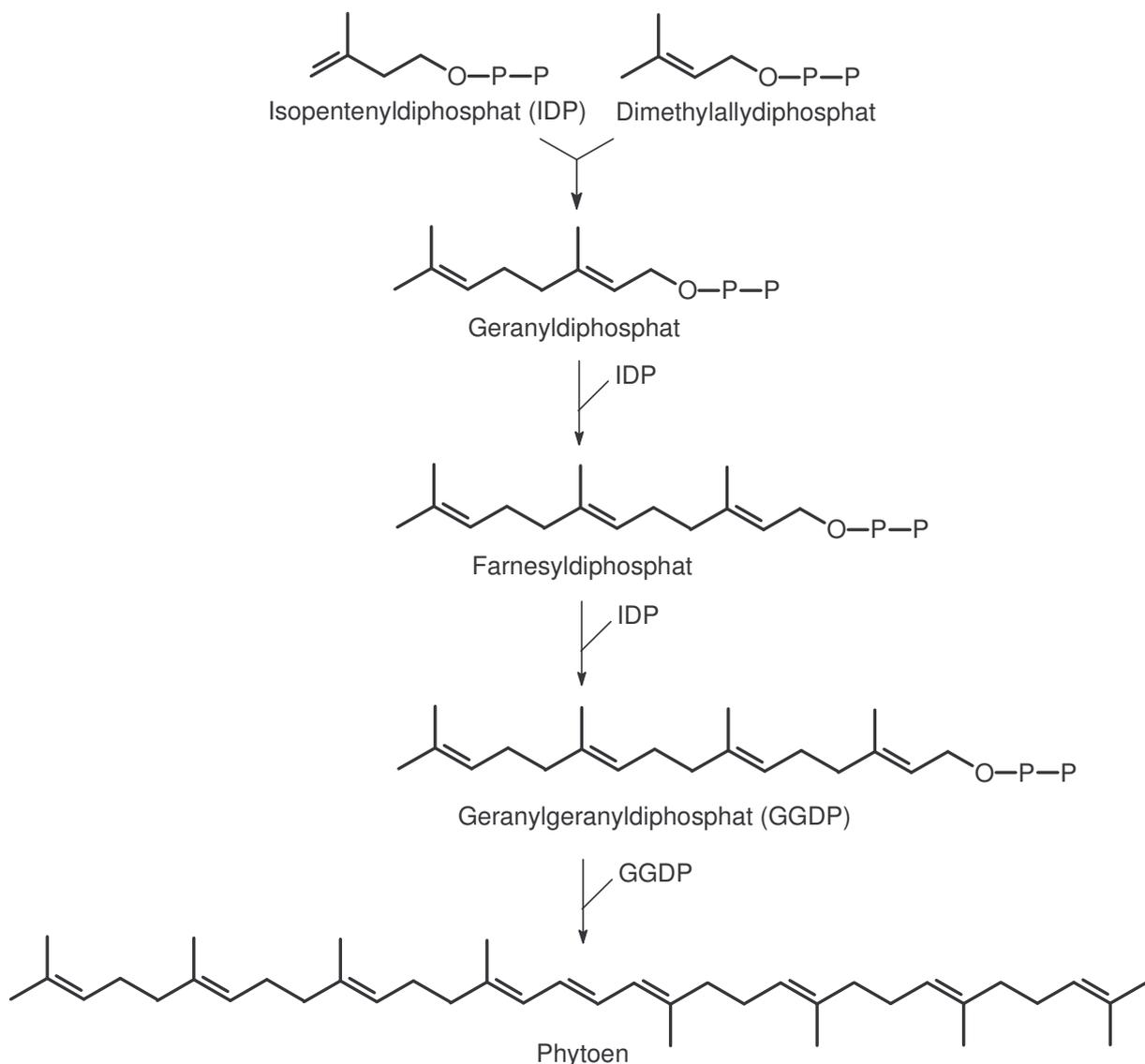


Abb. 1-1: Biosynthese von Phytoen.

In mehreren Dehydrierungen, bei denen jeweils zwei Wasserstoffatome entfernt werden, wird das konjugierte System um zwei Doppelbindungen erweitert. Die Dehydrierungen gehen vom Phytoen über Phytofluen, ζ -Carotin, Neurosporin bis zum Lycopin mit insgesamt 11 konjugierten Doppelbindungen.

Anschließend findet die Ringbildung am Ende der Kohlenstoffkette ausgehend von Neurosporin oder Lycopin zum γ - oder δ -Carotin mit einem Ring und weiter zu β -Carotin, α -Carotin oder ε -Carotin mit zwei Ringen statt. Die Biosynthese der Xantophylle erfolgt zunächst durch Hydroxylierung von β - oder α -Carotin zum β -Cryptoxanthin und Zeaxanthin bzw. Lutein (Britton, 1998). Zur Struktur der Carotinoide siehe Abb. 1-2.

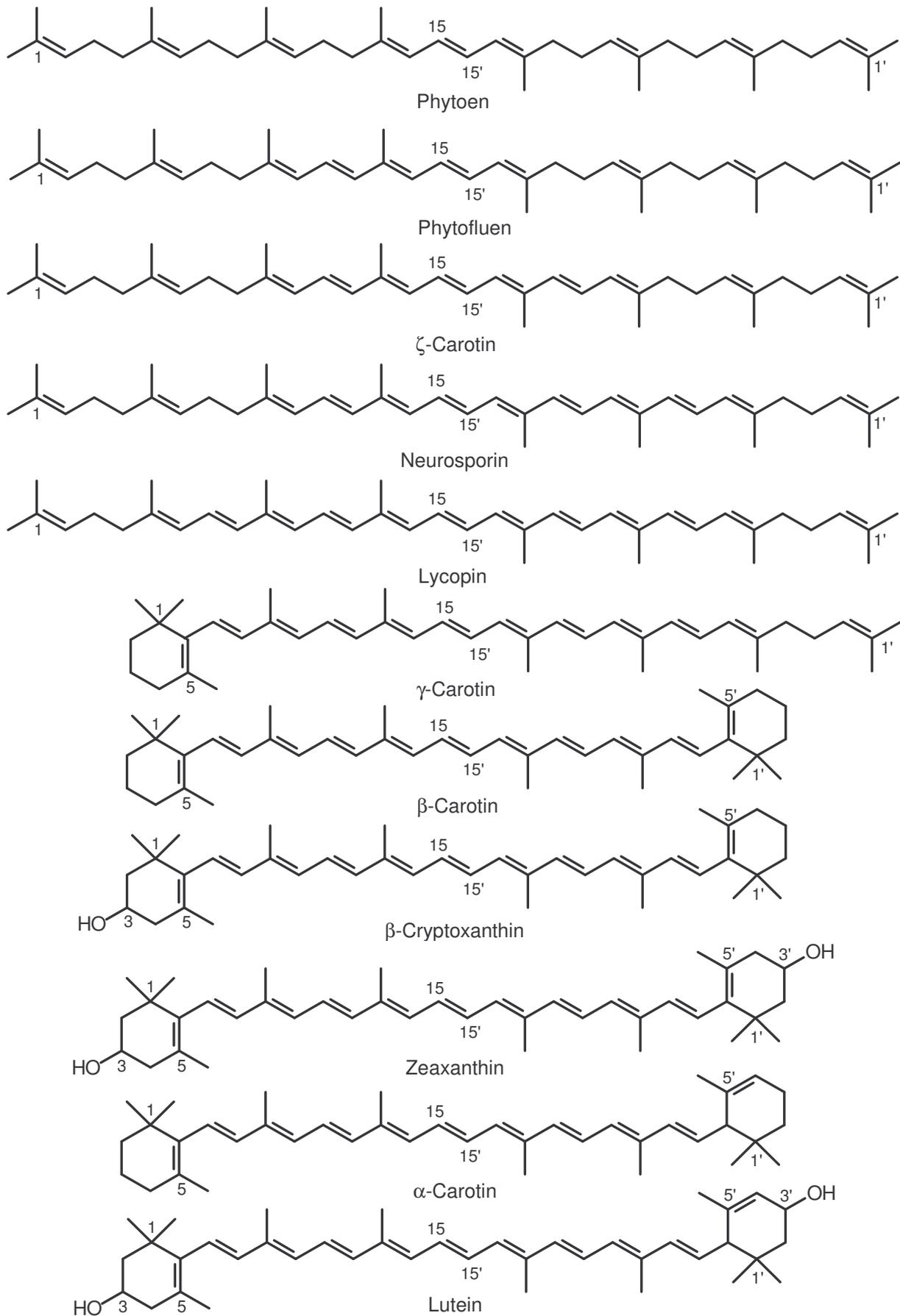


Abb. 1-2: Strukturformeln einiger Carotinoide in der *all-trans*-Form.

1.1.3 Eigenschaften

Aufgrund ihrer langen Kohlenstoffkette sind Carotinoide, vor allem die Carotine, äußerst unpolare Verbindungen, die deshalb gut mit unpolaren Lösungsmitteln wie z. B. Hexan aus Lebensmitteln oder Körperflüssigkeiten extrahierbar sind.

Die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen ist verantwortlich für die Farbe der Carotinoide. Phytoen und Phytofluen mit nur drei bzw. fünf konjugierten Doppelbindungen sind farblos, während die Carotinoide mit sieben und mehr Doppelbindungen meistens gelb oder wie das Lycopin rot gefärbt sind.

Alle Carotinoide haben ein charakteristisches UV/VIS-Spektrum mit drei mehr oder weniger ausgeprägten Spitzen (Feinstruktur). Die Feinstruktur wird durch mehrere Faktoren bestimmt, u. a. durch die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen und durch die Endgruppe der Kohlenstoffkette. Phytoen mit drei konjugierten Doppelbindungen hat im Vergleich zu Lycopin mit 11 konjugierten Doppelbindungen eine schwach ausgeprägte Feinstruktur. Genauso verhält es sich mit β -Carotin, das zwei zyklische Endgruppen besitzt (Britton, 1995) (s. Abb. 1-3).

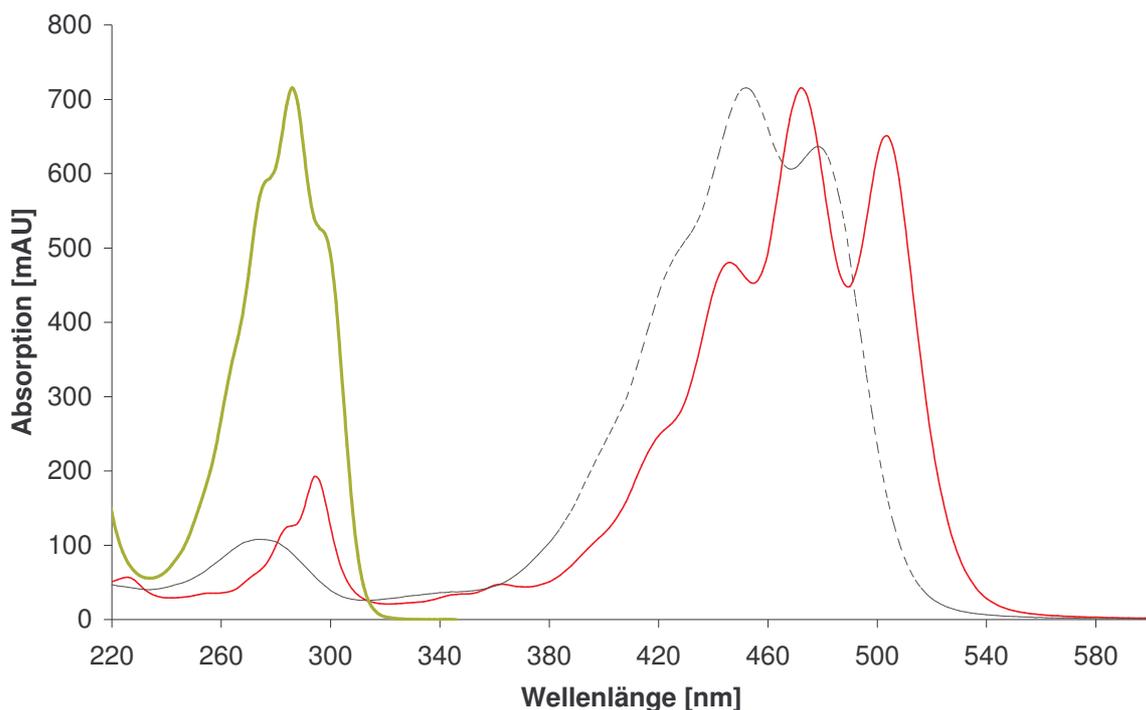


Abb. 1-3: UV/VIS-Spektren von — Phytoen, ---- β -Carotin und — Lycopin.

Carotinoide, insbesondere Lycopin, sind empfindlich gegenüber Licht, Hitze, Sauerstoff und Säuren. Im Licht und unter Wärmeeinwirkung isomerisieren die all-*trans* Carotinoide zu den *cis*-Carotinoiden (s. Abb. 1-4). Durch Sauerstoff werden sie z. B. zu Epoxiden oxidiert. Die Oxidation wird durch Hitze und Anwesenheit von Metallionen wie Cu^{2+} und Fe^{3+}

beschleunigt. Durch Säuren werden die Carotinoide zum Teil völlig zerstört (Shi und Le Maguer, 2000).

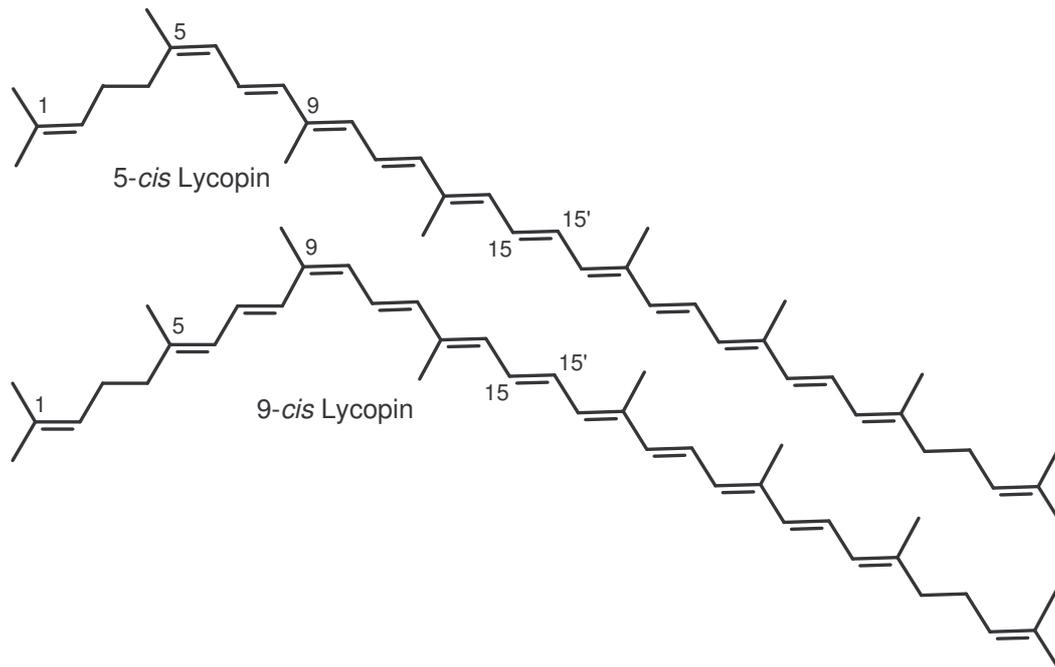


Abb. 1-4: *Cis*-Isomere von Lycopin.

1.1.4 Bioverfügbarkeit

Voraussetzung für eine Verstoffwechslung der Carotinoide ist ihre Bioverfügbarkeit, die von vielen verschiedenen Faktoren abhängt. Sie wird beeinflusst durch die Menge der verzehrten Carotinoide, Wechselwirkungen verschiedener Carotinoide untereinander, durch die verzehrte Menge an Fett, den Verarbeitungsgrad des Lebensmittels und durch die Matrix, in die die Carotinoide eingebunden sind (van het Hof et al., 2000). Die prozentuale Carotinoidaufnahme aus der Nahrung sinkt mit steigender Carotinoidmenge und ist ebenfalls geringer bei bereits hohen Plasmaspiegeln (Müller et al., 1999; Diwadkar-Navsariwala et al., 2003).

Bei einer kombinierten Einnahme von β -Carotin und Lycopin wurde die Resorption von β -Carotin nicht beeinflusst, die Resorption von Lycopin jedoch gesteigert (Johnson et al., 1997). In Frettchen hingegen sank die Resorption von β -Carotin bei gleichzeitiger Gabe von Lycopin (White et al., 1993). Eine kombinierte Einnahme von β -Carotin mit Lutein führte zu einer Reduktion der β -Carotin-Resorption, die kombinierte Einnahme mit Lycopin dagegen nicht (van den Berg und van Vliet, 1998). In einer früheren Studie führte die gleichzeitige Einnahme von β -Carotin mit Lutein zwar zur einer Reduktion der Lutein-Resorption

wohingegen die β -Carotin-Resorption bei einigen Probanden gesteigert wurde bei anderen gemindert (Kostic et al., 1995). Diese wenigen Studien zeigen deutlich, dass sich Carotinoide gegenseitig auf unterschiedliche Art und Weise in ihrer Resorption beeinflussen.

Nahrungsfette sind für die Resorption von Carotinoiden essentiell, da sie zur Ausschüttung von Gallensäuren führen, die mit den Nahrungsfetten und Carotinoiden Mizellen bilden, die durch die Darmmucosa diffundieren (s. Kapitel 1.1.5). Beim Verzehr der Carotinoide ohne Fette wie z. B. bei rohem Gemüse werden kaum Gallensäuren ausgeschüttet, die Carotinoide nur geringfügig resorbiert und größtenteils mit den Fäzes ausgeschieden.

In Früchten und Gemüse liegen die Carotinoide in kristalliner Form in den Chromoplasten vor. Um resorbiert zu werden muss zunächst die umliegende Zellstruktur zerstört werden, damit die Carotinoide freigesetzt werden können. Dies wird z. B. durch mechanische Verarbeitung oder Erhitzen des Lebensmittels erleichtert. So ist die Bioverfügbarkeit der Carotinoide aus Saft oder Mark höher als aus dem Rohgemüse (Gärtner et al., 1997).

1.1.5 Stoffwechsel

Die Aufnahme der Carotinoide erfolgt über die gleichen Wege im Verdauungstrakt wie bei den Fetten. Im Dünndarm werden die Carotinoide und Nahrungsfette mit Gallensäuren emulgiert und in Mizellen verpackt, die passiv durch die Darmmucosa diffundieren können. In den Mucosazellen wird ein Teil der Provitamin-A-Carotinoide in Vitamin A umgewandelt, welches dann zusammen mit den Carotinoiden, Nahrungsfetten und Apoproteinen in Chylomikronen eingelagert wird, die über die Lymphe in die Blutbahn gelangen. Nach dem Übertritt in die Blutbahn werden die Chylomikronen zu so genannten Chylomikronen-Remnants abgebaut. Ein Teil der in den Chylomikronen gebundenen Carotinoide wird freigesetzt und gelangt direkt in das extrahepatische Gewebe. Der Großteil der Carotinoide verbleibt jedoch in den Chylomikronen-Remnants, die von der Leber aufgenommen werden. In der Leber werden die Carotinoide entweder im Falle der Provitamin-A-Carotinoide zu Vitamin A metabolisiert oder in Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL) eingelagert, die wieder zurück in den Blutkreislauf abgegeben werden. Durch fortschreitende Hydrolyse der Triglyceride entstehen aus den VLDLs die cholesterinreichen Lipoproteine geringer Dichte (LDL). Über die LDLs erfolgt hauptsächlich die Verteilung der Carotinoide im Organismus vor allem der sehr unpolaren Carotinoide wie Lycopin und β -Carotin. Die polareren Carotinoide wie Lutein und Zeaxanthin werden gleichermaßen in LDLs und Lipoproteinen hoher Dichte (HDL) transportiert. Die HDLs werden in der Leber und im Darm gebildet.

Die Aufnahme der Carotinoide in die Gewebe erfolgt wahrscheinlich über den LDL-Rezeptor. Dies würde auch erklären, dass Gewebe, die reich mit LDL-Rezeptoren ausgestattet sind, wie die Nebenniere, die höchsten Carotinoid-Konzentrationen aufweisen (Schweigert, 1998).

1.1.6 Carotinoide im Blut und die Verteilung in den Organen

Im Humanserum konnten bisher 34 verschiedene Carotinoide identifiziert werden. Bei 13 der 34 Carotinoide handelt es sich um Isomere von Lutein, Zeaxanthin, β -Cryptoxanthin, Lycopin und β -Carotin und bei acht um Metabolite von Lutein oder Zeaxanthin und Lycopin. Hauptsächlich kommt im Plasma β -Carotin (0,04-2,3 μ M) und Lycopin (0,05-1,4 μ M) vor, gefolgt von Lutein (0,1-1,3 μ M) und β -Cryptoxanthin (0,03-0,70 μ M) (Watzl und Bub, 2001). Interessanterweise können im Serum keine Epoxid-Carotinoide wie das Violaxanthin identifiziert werden, da diese wahrscheinlich nicht im Darm resorbiert werden. Wie die angegebenen Konzentrationsbereiche zeigen, gibt es große individuelle Schwankungen in den Carotinoid-Konzentrationen. Durch Intervention können die Plasmaspiegel der Carotinoide erhöht werden. Dies ist jedoch nicht beliebig möglich, da bei einer bestimmten Plasmakonzentration eine Sättigung auftritt (Diwadkar-Navsariwala et al., 2003).

Die höchsten Carotinoid-Konzentrationen der Organe werden beim Menschen in der Nebenniere, den Hoden und der Leber gefunden (Stahl et al., 1992). Die Verteilung der Carotinoide auf die verschiedenen Organen ist zum Teil recht unterschiedlich. So wird in der Leber bevorzugt Lutein angereichert, in der Lunge Phytoen, in der Brust ζ -Carotin und in der Prostata, den Hoden, der Nebenniere, dem Dickdarm und der Haut hauptsächlich Lycopin (Khachik et al., 2002; Kaplan et al., 1990). Auffällig ist auch eine Anreicherung von Lutein und Zeaxanthin in der Macula lutea des Auges. Interessanterweise liegt hier Lutein in der gleichen isomeren Form wie in der Nahrung vor, Zeaxanthin dagegen als *meso*-Form, welches in der Nahrung nicht zu finden ist. Es könnte sich hierbei eventuell um einen Lutein-Metaboliten handeln (Bernstein et al., 2001).

Im Plasma und in den Geweben kommen nicht nur *all-trans* Carotinoide, sondern zu einem Großteil ihre *cis*-Isomere. Dies sind insbesondere die 9-, 13- und 15-*cis* Isomere sowie bei Lycopin zusätzlich das 5-*cis* Isomer (Krinsky et al., 1990, Stahl et al., 1992). Bei Lycopin machen die *cis*-Isomere im Plasma mehr als 50% des Gesamtlycopins aus. Es überwiegt das 5-*cis* mit 28% gefolgt von 13- und 15-*cis* mit zusammen 12% und anderen *cis*-Isomeren mit 16% (Schierle et al., 1997). Bei β -Carotin tragen die *cis*-Isomere 13- und 15-*cis* hingegen nur zu maximal 5% bei (Stahl et al., 1992). 9-*cis* β -Carotin kann im Plasma nicht detektiert

werden in Organen dagegen schon. Der hohe Anteil von *cis*-Isomeren des Lycopins im Plasma ist möglicherweise auf eine Isomerisierung des *all-trans* Lycopin unter sauren Bedingungen im Magen zurück zuführen (Re et al., 2001). Da *cis*-Isomere besser in Gallensäuremizellen löslich sind als *all-trans* Lycopin, wird auch eine bessere Resorption der Isomere im Vergleich zum *all-trans* Lycopin diskutiert (Boileau et al., 1999). Dies erklärt jedoch nicht die Unterschiede in der Verteilung der verschiedenen Isomere in bestimmten Organen. In den Hoden beispielsweise ist drei bis fünfmal mehr *all-trans* Lycopin als *cis*-Isomere vorhanden, wohingegen in der Leber, der Niere und der Nebenniere das *all-trans* Lycopin nur 40% ausmacht. Bei β -Carotin sind die Verhältnisse in allen Organen etwa gleich. Hier dominiert *all-trans* β -Carotin mit 60-90% deutlich (Stahl et al., 1992).

1.1.7 Metabolismus

Die Provitamin-A-Carotinoide werden größtenteils in der Darmmucosa, der Leber, der Niere, der Lunge oder im Fettgewebe zu Vitamin A metabolisiert. Nur aus etwa 60 der über 600 Carotinoide kann Vitamin A gebildet werden. Die häufigsten Provitamin-A-Carotinoide in der Nahrung sind β -Carotin, α -Carotin, γ -Carotin und β -Cryptoxanthin. Die Spaltung zu Vitamin A erfolgt entweder zentral durch 15,15'-Carotinoid-Dioxygenase zu zwei Molekülen Retinal oder durch asymmetrische Spaltung unter Bildung von einem Apocarotenal, aus dem durch Kettenverkürzung schrittweise Retinal gebildet wird.

Über den Metabolismus von Nicht-Provitamin-A-Carotinoiden ist dagegen nur wenig bekannt. Im Humanserum wurden neben den *all-trans*-Carotinoiden und ihrer Isomere auch zwei Metabolite von Lycopin und sechs von Lutein und Zeaxanthin identifiziert. Bei den Lycopinmetaboliten handelte es sich um zwei Oxidationsprodukte, das 2,6-Cyclolycopin-1,5-diol A und B. Bei den Lutein- und Zeaxanthinmetaboliten handelte es sich um zwei Dehydrierungsprodukte von Lutein, die wahrscheinlich im Sauren entstehen, um zwei Monoketocarotinoide, ein Diketocarotinoid und ein Dihydroxycarotinoid. (Khachik et al., 1997 und 1995).

Die Oxidation von Lycopin läuft vermutlich über das Lycopin-5,6-epoxid, das aufgrund seiner Instabilität zum 2,6-Cyclolycopin-1,5-epoxid weiterreagiert. Dieses hydrolysiert durch enzymatische oder Säurehydrolyse zum 2,6-Cyclolycopin-1,5-diol A und B. Ob diese beiden Metabolite tatsächlich *in vivo* aus Lycopin gebildet werden oder über die Nahrung ins Blut gelangen, ist noch nicht geklärt, denn geringe Mengen dieser Verbindungen konnten aus Tomaten und Tomatenprodukten extrahiert werden (Khachik et al., 1997, 1998a und b).

1.1.8 Wirkung von Lycopin für die Gesundheit

Die Wirkung der Carotinoide als Vitamin A ist die bisher einzige nachgewiesene Funktion für Mensch und Tier. Alle weiteren Wirkungen, die die Carotinoide entfalten, besitzen hingegen keinen Funktionscharakter (Watzl und Bub, 2001).

Die ersten Beobachtungen zur biologischen Wirksamkeit von Lycopin stammen bereits aus dem Jahr 1959, wo Ernster et al. eine höhere Überlebensrate von bestrahlten Mäusen festgestellt haben, denen Lycopin intraperitoneal verabreicht wurde, sowie eine verbesserte Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen (Forssberg et al., 1959 und Lingen et al., 1959).

Mittlerweile haben zahlreiche epidemiologische Studien gezeigt, dass ein erhöhter Konsum von Tomaten und Tomatenprodukten bzw. erhöhte Lycopinplasmaspiegel das Risiko mindern an bestimmten Krebsarten zu erkranken. Dies wurde vor allem für Lungen-, Magen-, Prostata- und Brustkrebs gezeigt. Hinweise gibt es aber auch für Kolorektal-, Mund-, Speiseröhren-, Bauchspeicheldrüsen-, Blasen-, Gebärmutterhals- und Eierstock-Krebs (Giovanucci, 1999). Diese antikanzerogene Wirkung konnten auch in Tier- und Zellkulturstudien bestätigt werden. So hemmt Lycopin das Zellwachstum von Gebärmutterkrebs-, Brustkrebs-, Lungenkrebs- oder Leukämie-Zellen (Levy et al., 1995; Countryman et al., 1991). Im Tiermodell führte die Verabreichung von Lycopin z. B. zur Reduktion von induzierten „Aberrant Crypt foci“ in Sprague-Dawley-Ratten (Narisawa et al., 1996) und zur Reduktion von induziertem Brustkrebs (Sharoni et al., 1997). In Fischer 344-Ratten konnte eine Hemmung der induzierten Blasenkrebs-Karzinogenese beobachtet werden (Okajima et al., 1998). In Mäusen führte die Intervention mit Lycopin zu einer verminderten Entwicklung von induzierten Lungenadenomen (Kim et al., 1997).

Humane Interventionsstudien, in denen die Wirksamkeit gegen Krebs gezeigt werden konnte, existieren bisher nur wenige. In drei verschiedenen Studien mit einer Intervention von Lycopin oder Tomatenextrakt bei Prostatakrebs-Patienten konnte u. a. eine signifikante Reduktion der Konzentration an Prostata-spezifischem Antigen im Plasma gezeigt werden, welches ein klinischer Marker für Prostatakrebs darstellt (Ansari und Gupta, 2003; Kucuk et al., 2002; Chen et al., 2001). Kucuk et al. stellten zudem eine Erhöhung der Konzentration des Proteins Connexin (s. Kapitel 1.1.9.2) im malignem Gewebe fest. Insbesondere aus dieser Studie kann abgeleitet werden, dass Lycopin möglicherweise eine Antitumorwirkung besitzt und Standardkrebstherapien wie Bestrahlung oder Chemotherapie unterstützen kann

Die positive Wirkung von Lycopin für die menschliche Gesundheit geht über die antikanzerogene Wirkung hinaus. In einer Makrophagen-Zelllinie konnte gezeigt werden,

dass β -Carotin und Lycopin die Cholesterinbiosynthese bis zu 70% hemmen und gleichzeitig die LDL-Rezeptoraktivität erhöht wird (Fuhrman et al., 1997). Diese Carotinoide besitzen somit eventuell eine Cholesterin senkende Wirkung. Aufgrund dessen sowie aufgrund einer verminderten LDL-Oxidation (s. Kapitel 1.1.9.1) wird eine präventive Wirkung bei Atherosklerose und Herz-Kreislauf-Erkrankungen diskutiert. Epidemiologische Studien zeigen ein vermindertes Herzinfarkttrisiko bei hohen Lycopinplasmaspiegeln im Fettgewebe (Kohlmeier et al., 1997) und bei niedrigen Plasmaspiegeln eine erhöhte Sterblichkeit an chronischen Herzerkrankungen (Kristenson et al., 1997).

1.1.9 Wirkmechanismen

1.1.9.1 Wirkung als Antioxidans

Als Bestandteil des Photosystems der Pflanze sind Carotinoide nicht nur für die Lichtabsorption wichtig, sondern wirken auch protektiv durch ihre Fähigkeit Singulett-Sauerstoff zu quenchen, der in den photosynthetisch aktiven Chloroplasten entsteht (Frank und Cogdell, 1996). Lycopin ist unter den Carotinoiden der effektivste Quencher für Singulett-Sauerstoff. Die Quenchingkonstante ist etwa doppelt so hoch wie die von β -Carotin und zehnmal höher als die von α -Tocopherol (Di Mascio et al., 1989).

Darüber hinaus können die Carotinoide als so genannte „chain breaking antioxidants“ wirken, indem sie mit freien Lipidperoxyl-Radikalen zu Resonanz-stabilisierten Carotinoid-Radikalen reagieren und so die autokatalytisch verlaufende Kettenreaktion der Lipidperoxidation unterbrechen. Von den Carotinoid-Radikalen kann jedoch auch eine prooxidative Wirkung ausgehen, wenn diese entweder mit Sauerstoff zu Peroxyl-Carotinoid-Radikalen weiterreagieren oder wenn ein Oxoradikal aus dem Carotinoid-Radikal unter Bildung eines Carotinoid-Epoxids eliminiert wird (Bast et al., 1998).

Für Lycopin konnte gezeigt werden, dass es Wasserstoffperoxid und Stickstoffdioxid inaktivieren (Lou et al., 1995, Bohm et al., 1995), sowie Stickstoffdioxid- (NO_2^{\cdot}), Thiyl- (RS^{\cdot}) und Sulphonyl-Radikale (RSO_2^{\cdot}) abfangen kann (Mortensen et al., 1997).

Aufgrund ihrer antioxidativen Wirkung sind die Carotinoide in der Lage humane LDLs *in vitro* vor Oxidation zu schützen. Diese Schutzwirkung ist allerdings nicht in allen Testsystemen zu beobachten. Zum Teil zeigen die Carotinoide keine Wirkung oder sogar eine erhöhte Oxidation (Oshima et al., 1996; Romanchik et al., 1997). Dies zeigt dass die Beziehung zwischen Carotinoid-Konzentration und LDL-Oxidation relativ komplex ist.

In einer Interventionsstudie mit Lycopin konnte gezeigt werden, dass die Wirkung als Antioxidans unmittelbar verbunden ist mit dem Schutz von Biomolekülen wie Lipiden, Lipoproteinen, Proteinen und der DNA vor oxidativen Schäden. Die Konzentration aller gemessenen Biomarker wurde durch die Lycopinintervention gesenkt (Agarwal und Rao, 2001).

1.1.9.2 Beeinflussung der Zell-Zell-Kommunikation

Carotinoide sind in der Lage die Zell-Zell-Kommunikation über so genannte „Gap junctions“ zu verstärken. Gap junctions sind kanalartige Verbindungen zwischen zwei Zellen über die ein Austausch von Nähr- und Botenstoffen erfolgen kann. Sie bestehen aus dem Protein Connexin, dessen mRNA-Synthese die Carotinoide stimulieren.

Eine wichtige Funktion, die den Gap junctions zugeschrieben wird, ist die Beteiligung an der Regulation von Wachstum- und Entwicklungsprozessen. Während normale Zellen durch Gap junctions in Kontakt miteinander stehen, weisen Tumorzellen nur eine geringe interzelluläre Kommunikation auf (Zhang et al., 1991 und 1992).

1.1.9.3 Weitere Wirkmechanismen

Es wird vermutet, dass Lycopin die durch Karzinogene ausgelöste Phosphorylierung von regulatorischen Proteinen wie dem Rb- oder p53-Protein hemmt und einen Zellzyklusarrest zwischen G0- und G1-Phase herbeiführen kann (Matsushima et al., 1995).

Der Schutz vor induzierten neoplastischen Läsionen durch Lycopin in Rattenleber, wird auf eine Veränderung des Cytochrom-P450 2 E1-Isoenzym zurück geführt, das zur Aktivierung des Kanzerogens Diethylnitrosamin nötig ist (Astorg et al., 1997). Durch die Veränderung kann keine Aktivierung stattfinden. Gleichermäßen führte eine Lycopinintervention zur Reduktion der Enzymaktivität von Nitrosodimethylamin-N-demethylase, die für die Aktivierung des Prokanzerogens N-Nitrosodimethylamin verantwortlich ist (Gradelet et al., 1996).

Carotinoide sind auch in der Lage, auf bestimmte Parameter des Immunsystems zu wirken. So konnte gezeigt werden, dass die Intervention mit Tomaten- und Karottensaft zu einer Erhöhung der Aktivität der natürlichen Killerzellen und Lymphozyten-Proliferation führt und die Bildung von Interleukin-2 und TNF α verstärkt (Watzl et al., 1999 und 2003).

1.1.10 Tiermodelle für die Carotinoid-Forschung

Tiermodelle zur Untersuchung von Carotinoiden müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen, da die Carotinoidaufnahme, der Transport und Metabolismus zumindest sehr ähnlich wie beim Menschen ablaufen sollten. Ein ideales Tiermodell sollte deshalb die Carotinoide als intakte Moleküle bei Gabe einer physiologischen Dosis absorbieren. Die Carotinoide sollten im Organismus in gleicher Weise wie beim Menschen im Serum und in den Organen verteilt werden. Zusätzlich ist es von Vorteil, wenn die Tiere leicht verfügbar, gut zu handhaben und nicht zu teuer sind.

In der Literatur sind mehrere Tiermodelle beschrieben, die diese Voraussetzungen mehr oder weniger gut erfüllen. Darunter gehören die klassischen Labortiere Ratte und Maus, das Frettchen, die mongolische Wüstenrennmaus, das präruminante Kalb und die Primaten. Präruminante Kälber sind Kälber, die noch keine ausgebildete Pansenflora besitzen. Sie werden ausschließlich von Milch ernährt, die direkt in den Labmagen gelangt, der in etwa dem Magen des Menschen entspricht. Sie kauen noch nicht wieder und sind in ihrer Verdauung dem Menschen sehr ähnlich (Lee et al., 1999).

Im Hinblick auf Carotinoidresorption und Metabolismus sind am besten die Wüstenrennmaus, das Frettchen und das präruminante Kalb geeignet. Diese Tiermodelle sind allerdings bisher nicht etabliert zur Untersuchung von Krankheiten wie Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Vitamin A-Mangel oder zu Untersuchungen zum Immunsystem. Hierfür werden deshalb die klassischen Labortiere Ratte und Maus herangezogen, an denen solche Untersuchungen durchgeführt werden können. Der Nachteil dieser beiden Modelle ist jedoch, dass sie Carotinoide, die in physiologischen Dosen verabreicht werden, nicht als intakte Moleküle resorbieren. Um die Carotinoide im Plasma anzureichern, müssen daher weitaus höhere Dosen verabreicht werden.

Entscheidende Vorteile des präruminanten Kalbs sind zum einen die Möglichkeit nach einer Intervention ausreichend Blut abzunehmen, ohne dass die Tiere getötet werden müssen, sofern keine Organe untersucht werden sollen. Zum anderen besteht die Möglichkeit auch während einer Intervention ausreichend Blut abzunehmen, um Konzentrationsverläufe zu untersuchen. Präruminante Kälber sind allerdings im Vergleich sehr teuer, nicht leicht in großer Anzahl zu bekommen und nicht einfach zu handhaben, da bestimmte Einrichtungen für ihre Haltung erforderlich sind (Lee et al., 1999).

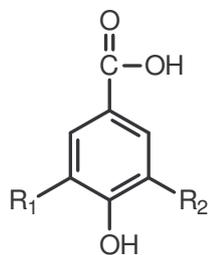
1.2 Phenolsäuren und Flavonoide

Phenolsäuren und Flavonoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die im Pflanzenreich weit verbreitet sind. Die Flavonoide liegen größtenteils in Form ihrer Glycoside vor, die Phenolsäuren entweder glycosidisch gebunden oder verestert mit verschiedenen Zuckern oder organischen Säuren. Die am häufigsten vorkommende Phenolsäure ist die Chlorogensäure. Phenolsäuren und Flavonoide treten häufig in den Randschichten der Pflanzen auf und tragen zur Stabilität der Zellwände in den Schalen bei. Früchte und Gemüse sollten daher am besten ungeschält verzehrt werden.

1.2.1 Struktur der Phenolsäuren und ihr Vorkommen in Tomaten

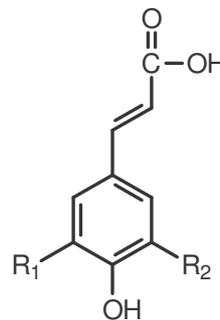
Die Phenolsäuren werden unterschieden in Hydroxybenzoesäure-Verbindungen, die in Tomaten nicht vorkommen, und in Hydroxyzimtsäure-Verbindungen. An freien Hydroxyzimtsäuren werden in der Tomate die Kaffeesäure, Ferulasäure und *p*-Cumarsäure detektiert (s. Abb. 1-5).

Hydroxybenzoesäuren



Gallussäure	$R_1=OH, R_2=OH$
Syringasäure	$R_1=OCH_3, R_2=OCH_3$
Vanillinsäure	$R_1=OCH_3, R_2=H$

Hydroxyzimtsäuren



<i>p</i> -Cumarsäure	$R_1=H, R_2=H$
Ferulasäure	$R_1=H, R_2=OCH_3$
Kaffeesäure	$R_1=H, R_2=OH$

Abb. 1-5: Häufige Hydroxybenzoe- und Hydroxyzimtsäuren.

Kaffeesäure kommt außerdem in gebundener Form zum einen mit Chinasäure verestert als Chlorogensäure und Cryptochlorogensäure vor (s. Abb. 1-6) und zum anderen als Kaffeesäureglucosid. *p*-Cumarsäure und Ferulasäure werden sowohl als Glucosid als auch als Glucoseester detektiert, die Verbindungen der Ferulasäure jedoch nur in Spuren (s. Abb. 1-7) (Mattila und Kumpulainen, 2002; Winter und Herrmann, 1986).

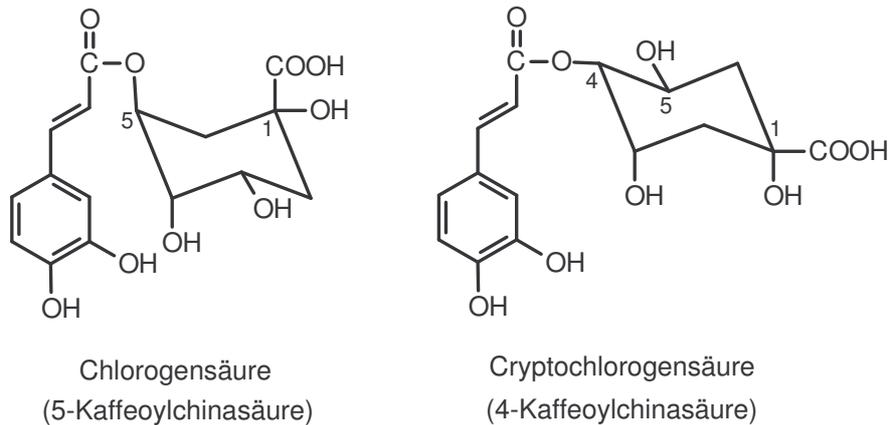


Abb. 1-6: Struktur von Chlorogen- und Cryptochlorogensäure.

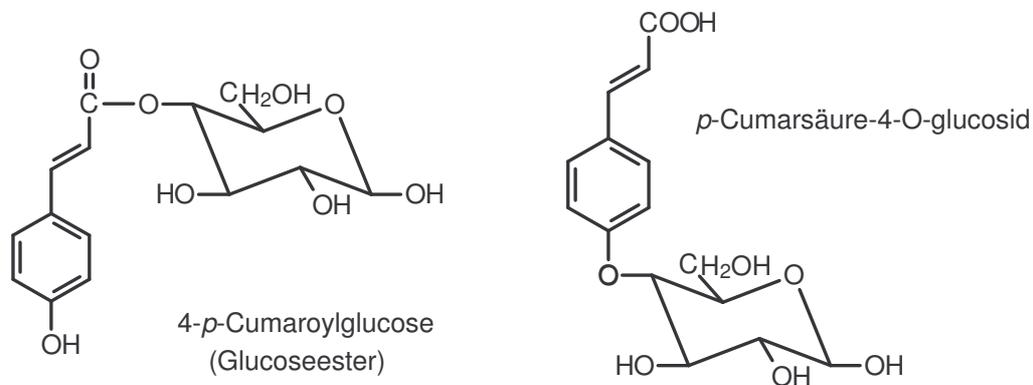


Abb. 1-7: Struktur von 4-*p*-Cumaroylglucose und *p*-Cumarsäure-4-O-Glucosid als Beispiele für einen Phenolsäure-Glucoseester und ein Phenolsäure-Glucosid.

1.2.2 Bioverfügbarkeit und Wirkung von Phenolsäuren

Freie Phenolsäuren können sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm resorbiert werden. Im Gegensatz dazu werden veresterte und glycosidisch gebundene Phenolsäuren im Dünndarm vermutlich nicht resorbiert, da bisher nicht bekannt ist, dass der Mensch Esterasen bzw. β -Glucosidase besitzt, die diese Ester bzw. Glycoside spalten können. Eine Metabolisierung findet also ausschließlich durch Enzyme der Mikroflora des Dickdarms statt, wo die freigesetzten Phenolsäuren resorbiert werden können.

Phenolsäuren vermögen während der Nahrungszubereitung und im Gastrointestinaltrakt die Bildung von Kanzerogenen zu hemmen. So unterdrücken die *p*-Cumarsäure und Chlorogensäure die Nitrosaminbildung *in vitro*. Für die krebsprotektive Wirkung der

Phenolsäuren liegen nur Tierstudien aber keine Humanstudien vor. Für Kaffee- und Ferulasäure wurde z. B. eine hemmende Wirkung auf die Entstehung von induziertem Magenkrebs festgestellt. Die protektive Wirkung wird auf folgende Mechanismen zurück geführt: Hemmung von Phase-I-Enzymen, die mögliche Prokanzerogene aktivieren können, Wechselwirkung mit aktivierten Kanzerogenen, die diese inaktivieren, Wechselwirkung mit der DNA, um die Bindung von Kanzerogenen zu verhindern, Induktion von Phase-II-Enzymen zur Verbesserung der Ausscheidung und antioxidative Eigenschaften (Watzl und Rechkemmer, 2001).

1.2.3 Struktur der Flavonoide und ihr Vorkommen in Tomaten

Die Flavonoide bestehen grundsätzlich aus drei Kohlenstoffringen mit zwei aromatischen (A- und B-Ring) und einem O-heterozyklischen (C-Ring). Anhand struktureller Unterschiede am C-Ring werden die Flavonoide in sechs Untergruppen eingeteilt. Dies sind die Flavonole wie Quercetin und Kämpferol, die Flavanole wie Catechin und Epicatechin, die Flavanone wie Naringenin und Hesperidin, die Flavone wie Apigenin und Luteolin, die Anthocyanidine wie Malvidin und Cyanidin und die Isoflavone wie Genistein und Daidzein (s. Abb. 1-8). Zucker werden bei Flavonen bevorzugt an Position 7 gebunden, bei Flavonolen bevorzugt an Position 3.

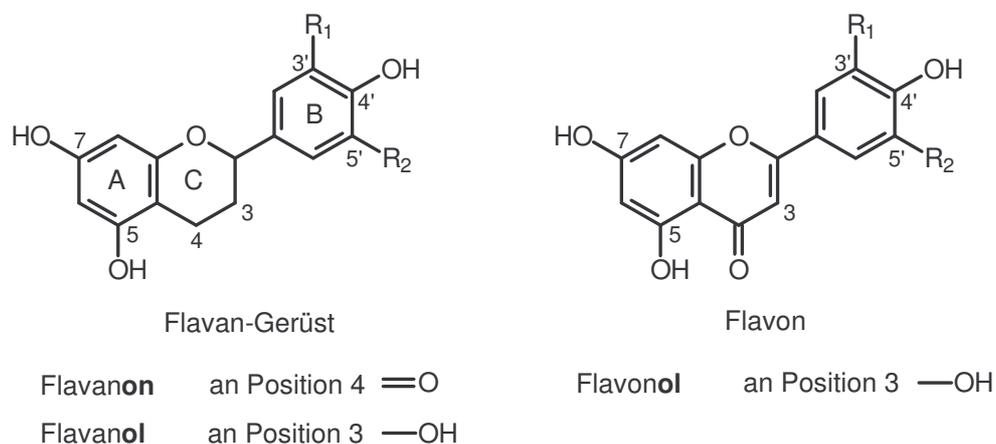


Abb. 1-8: Strukturen einiger Flavonoide.

In Tomaten wurden bislang jedoch nur die glycosidisch gebundenen Flavonole Rutin, ein Rutinpentosid, das nicht genauer bestimmt werden konnte (Mauri et al., 1999), Quercetin-3-rhamnosyldiglucosid, Kämpferol-3-rutinosid und Kämpferol-3-rhamnosyldiglucosid identifiziert (Wöldecke und Herrmann, 1974), sowie das Flavanon Naringenin (Minoggio et al.,

2003) (s. Abb. 1-9). Nach Säurehydrolyse konnten die freien Flavonoide Quercetin, Kämpferol und Myricetin detektiert werden (Tokusoglu et al., 2003).

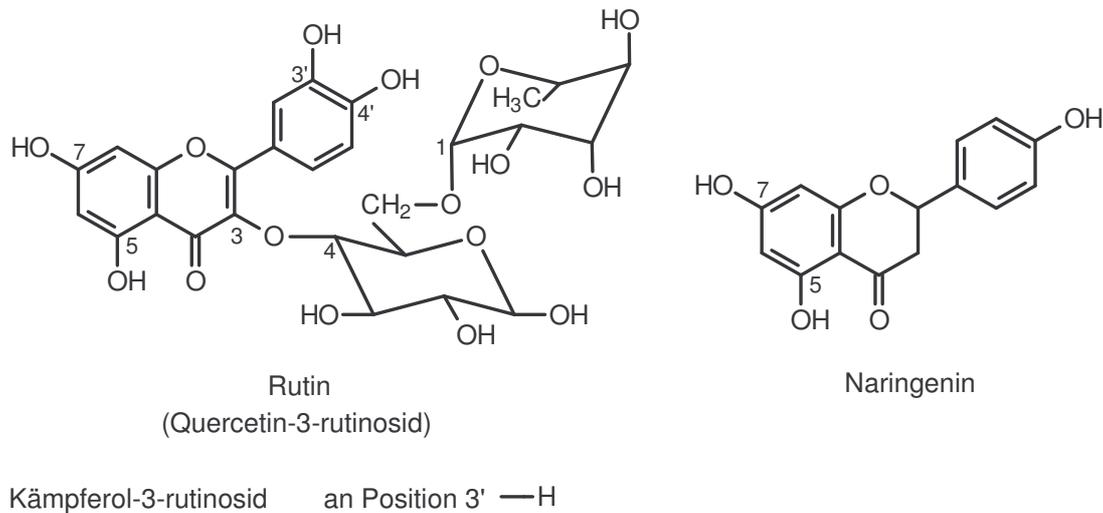


Abb. 1-9: Struktur von Rutin und Naringenin.

1.2.4 Bioverfügbarkeit und Wirkung von Flavonoiden

Da die Anthocyanidine und Isoflavone aufgrund ihrer Strukturunterschiede spezielle Eigenschaften und Wirkungen zeigen, werden diese im Folgenden unter dem Begriff Flavonoide ausgeschlossen. Die freien Flavonoide werden im Dünndarm durch passive Diffusion resorbiert. Die Glycoside gelangen wie bei den Phenolsäuren in den Dickdarm und werden dort durch Enzyme der Dickdarmflora hydrolysiert. Zur Resorption bestimmter Flavonoidglucoside wie dem Quercetin-4'-glucosid oder Quercetin-3-glucosid gibt es zwei Möglichkeiten. Sie können entweder durch aktiven Transport im Dünndarm resorbiert und dann durch eine relativ unspezifische β -Glucosidase gespalten werden oder sie werden durch die Membran-gebundene Lactase-Phlorizin-Hydrolase zunächst in die Aglycone gespalten und über passive Diffusion resorbiert (Day et al., 1998, 2000, 2003).

Die Ergebnisse epidemiologischer Studien weisen auf eine inverse Korrelation zwischen Flavonidaufnahme und dem Risiko für verschiedene Krankheiten wie z. B. Lungenkrebs oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen hin. Daneben wurden die Flavonoide in zahlreichen *In vitro*-Studien und Tierstudien untersucht.

In Tierexperimenten zeigte sich eine Schutzwirkung der Flavonoide gegenüber Dickdarm-, Brust-, und Hautkrebs. Als Wirkmechanismen werden die gleichen wie die der Phenolsäuren diskutiert, sowie die Fähigkeit der Induktion der Apoptose, der Hemmung der Zellproliferation

von Krebszellen durch Hemmung der Expression von Protoonkogenen oder Enzymen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, und der Fähigkeit immunmodulatorisch zu wirken (Watzl und Rechkemmer, 2001).

1.2.5 Analytik der Phenolsäuren und Flavonoide aus Obst und Gemüse

Zur Analyse der freien Verbindungen und ihrer Konjugate werden diese zunächst meist mit Aceton oder Methanol oder einem Gemisch des Lösungsmittels aus dem Lebensmittel extrahiert. Nach Aufkonzentrierung des Extrakts kann dieser mit der HPLC oder nach Derivatisierung mit der GC analysiert werden (Robbins, 2003).

Um den Anteil der konjugierten Verbindungen zu ermitteln bzw. alle Verbindungen in ihrer freien Form zu analysieren, müssen die Phenolsäure- und Flavonoid-Konjugate gespalten werden. Dies kann entweder im Basischen, im Sauren (Robbins, 2003) oder durch enzymatische Spaltung erfolgen. Für die enzymatische Hydrolyse ist in der Literatur der Einsatz von Amylasen, Cellulasen, Pektinasen und Esterasen beschrieben (Robbins, 2003; Schmidlein und Herrman, 1975) sowie der Einsatz von β -Glucosidase (Bremner et al., 2000) und β -Glucuronidase (Sicilia et al., 2003). Am häufigsten wird allerdings die Hydrolyse mit Säure durchgeführt. Die Angaben in der Literatur zu Konzentration, Hydrolysetemperatur und -dauer unterscheiden sich zum Teil erheblich voneinander. Unglücklicherweise gibt es für die Extraktion und Hydrolyse keine Standardmethode (Robbins, 2003). So können die optimalen Hydrolysebedingungen sogar von Pflanze zu Pflanze unterschiedlich sein (Hertog et al., 1992). Bei der Säurehydrolyse und Verseifung ist zu beachten, dass es je nach Hydrolysebedingungen zu Verlusten kommen kann. Kaffeesäure wird beispielsweise durch zehnmütiges Erhitzen in 1%iger Natronlauge oxidativ zerstört (Schmidlein und Herrman, 1975). Gleichmaßen ist auch Chlorogensäure bei hohen pH-Werten instabil (Friedmann und Jürgens, 2000). Im Pflanzenextrakt sind die Verbindungen dagegen stabiler, da die dort anwesenden Zucker die Zerstörung aufgrund ihrer reduzierenden Eigenschaften hemmen. Die Kaffeesäure bzw. Chlorogensäure ist wegen ihrer beiden Hydroxylgruppen in meta- und para-Stellung besonders instabil. Für Quercetin wurde ebenfalls ein Abbau zu Protocatechusäure nach Verseifung und Säurehydrolyse beschrieben. Quercetin besitzt wie die Kaffeesäure zwei benachbarte Hydroxylgruppen im B-Ring (Schmidlein und Herrman, 1975). Über die enzymatische Hydrolyse sind bisher keine Nachteile beschrieben.

1.3 Die Tomate und ihre Inhaltsstoffe

Die Tomate (*Lycopersicon esculentum*) gehört zur botanischen Familie der Nachtschattengewächse und stammt ursprünglich aus Südamerika. Ihre rote Farbe wird durch das Lycopin hervorgerufen mit Gehalten bis zu 20 mg/100 g Nassgewicht. Sie besteht zu etwa 95% aus Wasser. Daneben bilden die Zucker Fructose und Glucose die Hauptinhaltsstoffe mit durchschnittlich 2,4 g/100 g Nassgewicht und sind für den Süßgeschmack der Tomaten verantwortlich. Weitere Hauptbestandteile sind Glutaminsäure mit 337 mg/100 g, Zitronensäure mit 328 mg/100 g, die im Wesentlichen für den sauren pH-Wert verantwortlich ist, und Kalium mit 242 mg/100 g. Unter den Vitaminen dominiert das Vitamin C mit 25 mg/100 g Nassgewicht deutlich vor den Tocopherolen mit nur 0,9 mg/100g. (Souci, Fachmann, Kraut, 2000)

Neben rundlichen und eiförmigen Früchten gibt es Sorten mit kleinen birnenförmigen Beeren (var. *pyriforme*) und die kleinen rundlichen Kirschtomaten (var. *cerasiforme*) (Franke, 1997). Die meisten Tomatensorten sind rot. Es existieren allerdings auch Sorten anderer Farben (s. Kapitel 3.1.4).

1.4 Isoprostane - Biomarker für oxidativen Stress

Isoprostane sind spezifische Produkte der Lipidperoxidation und kommen in allen Körperflüssigkeiten und Geweben in detektierbaren Mengen vor. In Tierstudien konnte gezeigt werden, dass ihre Bildung bei oxidativem Stress ansteigt und durch Antioxidantien beeinflusst wird. Ihre Konzentration *in vivo* ist unabhängig von dem Lipidgehalt der Nahrung. Da es sich um äußerst stabile Verbindungen handelt, eignen sie sich hervorragend als Biomarker.

1.4.1 Oxidativer Stress

Unter oxidativem Stress wird ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien im Organismus verstanden, das zu Seiten der Oxidantien verschoben ist. Oxidantien sind beispielsweise Radikale wie das Hydroxyl-Radikal (OH^\bullet), das Superoxidradikal-Anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), das Alkoxy- oder Peroxyl-Radikal (RO^\bullet , RO_2^\bullet), das Stickstoffoxid- oder Stickstoffdioxid-Radikal (NO^\bullet , NO_2^\bullet) aber auch andere reaktive Verbindungen wie Wasserstoffperoxid, Ozon, Hypochlorit, Singulett-Sauerstoff, Distickstofftrioxid und -tetroxid (Halliwell, 1997). Demgegenüber stehen die Antioxidantien wie Vitamin C und E, die Carotinoide, phenolische

Verbindungen, Glutathion, Ubichinol und Harnsäure sowie Enzyme, die mit den Oxidantien reagieren und sie unschädlich machen wie die Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase.

Die reaktiven Oxidantien entstehen zum einen endogen bei bestimmten im Körper ablaufenden Prozessen wie der Zellatmung in den Mitochondrien, bei Entzündungsreaktionen und Durchblutungsstörungen, in Phagocyten oder beim Abbau von DNA-Basen. Hinzu kommen die exogen zugeführten Oxidantien z. B. in Form von Umweltschadstoffen und Ozon, kanzerogenen Verbindungen oder Zigarettenrauch (Langseth, 1995).

1.4.2 Struktur und Bildung von Isoprostanen

Isoprostane sind die Isomere der Prostaglandine und werden wie diese aus Arachidonsäure gebildet. Während Prostaglandine in einer enzymatischen Reaktion durch Cyclooxygenase (COX) gebildet werden, entstehen die Isoprostane in einer durch Radikale induzierten Peroxidation der Arachidonsäure. In einem ersten Schritt wird durch den Angriff eines freien Radikals ein bis-allylisches Wasserstoffatom aus Arachidonsäure abgespalten und es entsteht eines von drei möglichen Arachidonyl-Radikalen. Im zweiten Schritt kommt es zur Anlagerung von Sauerstoff unter Entstehung eines Peroxyl-Radikals. Anschließend erfolgen eine Endozyklisierung zu einem bicyklischen Endoperoxid-Radikal und die erneute Anlagerung von Sauerstoff zum bicyklischen Endoperoxid. Schließlich führt die Reduktion des Endoperoxids durch Glutathion zum so genannten F₂-Isoprostan (s. Abb. 1-10) (Roberts und Morrow, 2000).

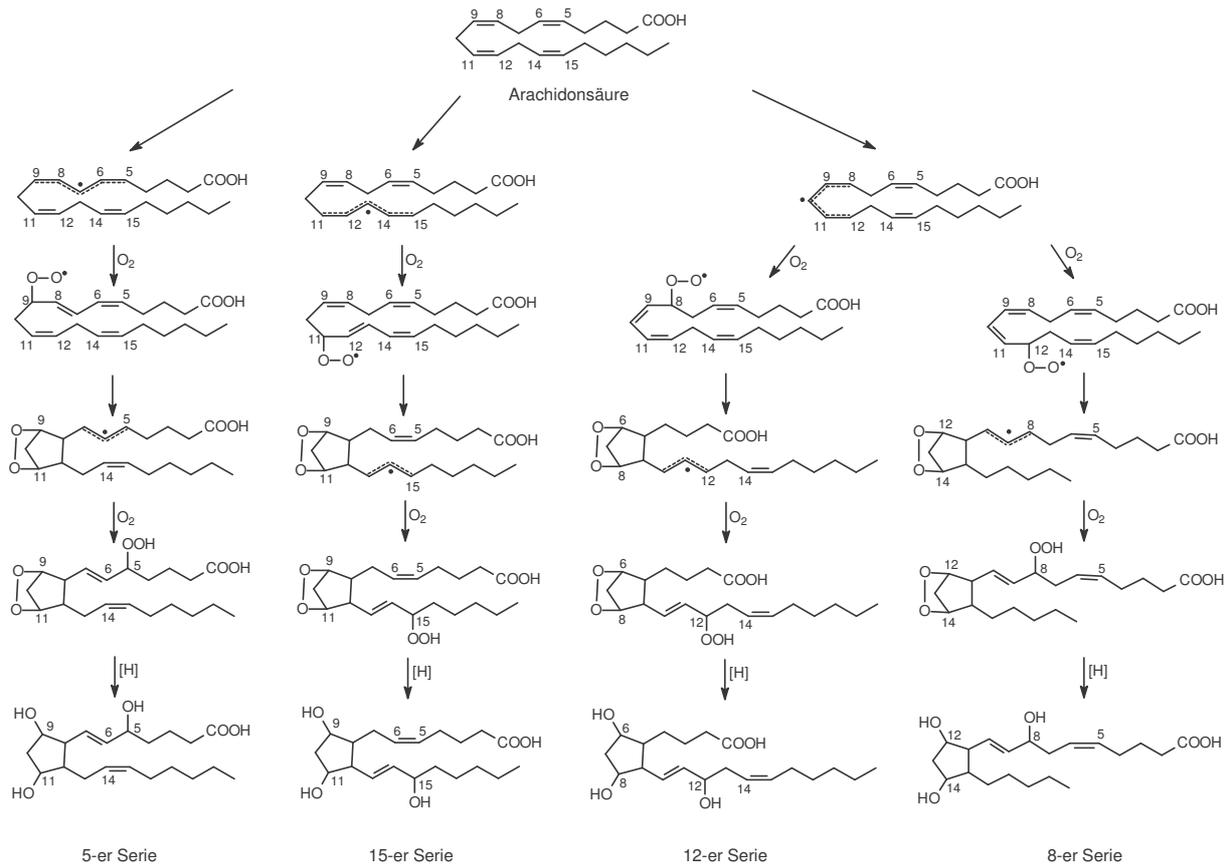


Abb. 1-10: Bildung der Isoprostane über den Endoperoxid-Weg.

Neben der Bildung über das Endoperoxid ist nach der ersten Anlagerung des Sauerstoffs auch die Bildung eines Dioxetans möglich. Ein Endoperoxid entsteht dann erst nach der zweiten Addition des Sauerstoffs (s. Abb. 1-11).

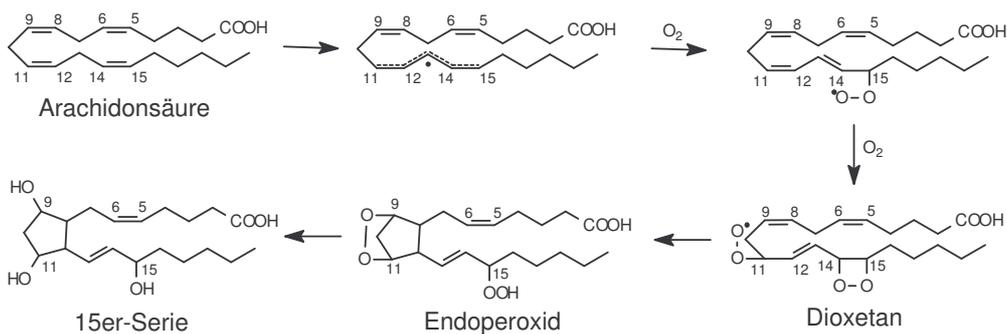


Abb. 1-11: Bildung der Isoprostane über den Dioxetan/ Endoperoxid-Weg am Beispiel der 15-er Serie (Mezzetti et al., 2000).

Wie Abb. 1-10 zeigt, können vier verschiedene F₂-Isoprostan-Regioisomere entstehen, die je nach Nomenklatur unterschiedlich bezeichnet werden (s. Tab. 1-2). Jedes Regioimer kann acht racemische Diastereomere bilden, was bedeutet, dass 16 Isomere pro Regioisomer gebildet werden können. Bei insgesamt vier Regioisomeren mit jeweils 16 Isomeren macht

das eine Gesamtzahl von 64 möglichen Verbindungen. Die Bildung der Isoprostane der Klassen I und IV sind jedoch begünstigt (Waugh et al., 1997).

Tab. 1-2: Nomenklatur der Isoprostane.

nach Taber et al., 1997		nach Rokach et al., 1997
Klasse	Systematische Bezeichnung	Systematische Bezeichnung
I	5-F _{2t} -IsoP	iPF _{2α} -VI
II	12-F _{2t} -IsoP	iPF _{2α} -V
III	8-F _{2t} -IsoP	iPF _{2α} -IV
IV	15-F _{2t} -IsoP	iPF _{2α} -III

In Tab. 1-2 sind die beiden Nomenklaturmöglichkeiten gezeigt, die in der Literatur verwendet werden. Bei der Nomenklatur nach Taber et al. steht die Zahl für die Position der Hydroxylgruppe in der Seitenkette. Die Zahl 2 im Index steht für die Anzahl der Doppelbindungen in den Seitenketten, das t für die Stellung der Seitenketten im Bezug zu den Hydroxylgruppen des Cyclopentan-Rings. t steht für *trans* und c für *cis*. Normalerweise stehen die Hydroxylgruppen des Cyclopentan-Rings in α -Stellung, d. h. nach unten im Bezug auf den Ring. Bei der Nomenklatur nach Rokach et al. steht die 2 im Index ebenfalls für die Anzahl der Doppelbindung in den Seitenketten. Das α im Index bezieht sich auf die Stellung der Hydroxylgruppen im Cyclopentan-Ring im Bezug zum Ring, α für nach unten und β für nach oben.

Das am besten untersuchte und am häufigsten quantifizierte Isoprostan, das eine biologische Aktivität besitzt, ist das iPF_{2 α} -III, obwohl die Konzentration des iPF_{2 α} -VI in Plasma und Urin etwa vier bis achtfach höher ist (Pratico et al., 1998). In der Literatur wird für das iPF_{2 α} -III oder das 15-F_{2t}-IsoP meistens die ursprüngliche Bezeichnung 8-iso Prostaglandin F_{2 α} (8-iso PGF_{2 α}) verwendet. Das iso steht für die Stellung der Seitenkette an Position 8 bezogen auf das entsprechende Prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) (s. Abb. 1-12).

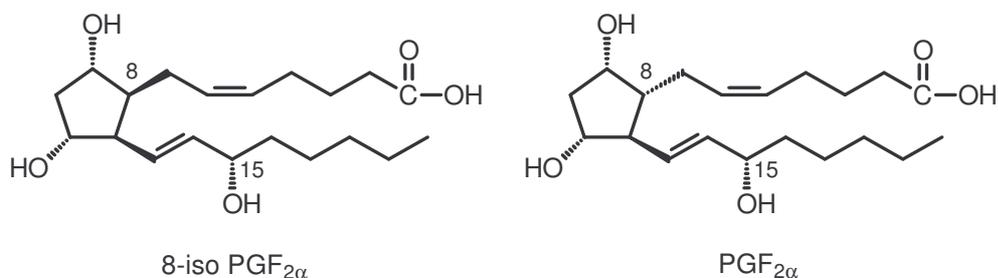


Abb. 1-12: Struktur von 8-iso PGF_{2 α} und PGF_{2 α} .

In der Literatur gibt es Hinweise dafür, dass das 8-iso PGF_{2α} nicht ausschließlich über eine Radikal-induzierte Lipidperoxidation gebildet wird, sondern auch bei der enzymatischen Reaktion mit COX 1 und 2 (Pratico et al., 1995 und 1996a) entsteht. Bei diesen Reaktionen entsteht das 8-iso PGF_{2α} jedoch immer nur als Nebenprodukt und sollte deshalb bei der *in vivo* Biosynthese zu vernachlässigen sein. In einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit mit einem Ischämie/Reperfusion-Modell in der Rattenniere wurde erneut gezeigt, dass die 8-iso PGF_{2α}-Synthese auch enzymatisch durch COX-1 erfolgt. Während der Ischämie stieg die 8-iso PGF_{2α}-Konzentration parallel zur PGF_{2α}-Konzentration an und fiel während der Reperfusion wieder ab. Die PGF_{2α}-Konzentration war jedoch immer etwa zehnfach höher als die 8-iso PGF_{2α}-Konzentration. Allein durch COX-1- nicht aber durch COX-2-Inhibitoren konnte sowohl die Bildung des 8-iso PGF_{2α} als auch die des PGF_{2α} gehemmt werden (Favreau et al., 2004).

Der Großteil der Arachidonsäure liegt in den Zellmembranen mit Phospholipiden verestert vor. Die Isoprostane werden im Gegensatz zu den Prostaglandinen zunächst *in situ*, d. h. verestert mit Phospholipiden aus der Arachidonsäure gebildet und dann teilweise durch Phospholipasen ins Plasma freigesetzt und über den Urin ausgeschieden (Morrow et al., 1992a).

1.4.3 Biologische Aktivität des 8-iso PGF_{2α}

Aufgrund der ähnlichen Struktur zu dem Prostaglandin F_{2α} liegt eine biologische Aktivität des 8-iso PGF_{2α} nahe. Es ist beschrieben, dass das 8-iso PGF_{2α} dosisabhängig eine Veränderung der Gestalt von Thrombozyten bewirkt, Calcium und Inositolphosphat aus intrazellulären Speichern freisetzen und zur reversiblen Aggregation führen kann (Pratico et al., 1996b; Morrow et al., 1992b).

Im Tierversuch mit Ratten konnte gezeigt werden, dass das 8-iso PGF_{2α} zur Vasokonstriktion (Gefäßverengung) der Blutgefäße der Niere führt, wodurch die glomeruläre Filtrationsrate und der renale Plasmafluss zunächst reduziert werden und dann völlig zum Erliegen kommen (Morrow et al., 1990; Takahashi et al., 1992). Eine Vasokonstriktion konnte ebenfalls an der Pulmonalarterie von Kaninchen und Ratten beobachtet werden, sowie eine Bronchokonstriktion in der Lunge der Ratte (Morrow et al., 1997).

An den glatten Gefäßmuskelzellen der Aorta führte das 8-iso PGF_{2α} zur Induktion der Zellteilung und zur Freisetzung von Endothelin-1 in der Ratte. Endothelin-1 führt nach seiner Freisetzung zur Vasokonstriktion. Die Effekte wurden durch eine Beeinflussung der

Signaltransduktion und der DNA-Synthese ausgelöst (Fukunaga et al., 1993; Yura et al., 1999).

Die Aktivität des 8-iso PGF_{2α} wird hierbei im Wesentlichen durch Wechselwirkung mit dem Thromboxan A₂ (TXA₂)/Endoperoxid (PGH₂)-Rezeptor vermittelt (Takahashi et al., 1992).

1.4.4 Erhöhte Isoprostan-Werte in Urin und Plasma

In der Literatur werden Konzentrationsbereiche für Isoprostane im Plasma gesunder Menschen zwischen 42 und 443 pg/ml (Ohashi et al., 2000 bzw. Dillon et al., 2002) und für Urin zwischen 95 und 1300 pg/mg Kreatinin (Pratico et al., 1998 bzw. Morrow et al., 1995) beschrieben.

Bei bestimmten Lebensbedingungen und Krankheiten steigt die Konzentration im Urin und Plasma an. So erhöht ein vermehrter Alkoholkonsum dosisabhängig die Ausscheidung des 8-iso PGF_{2α} im Urin. Bei Patienten mit alkoholbedingter Leberzirrhose oder alkoholinduzierter Hepatitis konnte ebenfalls eine erhöhte 8-iso PGF_{2α}-Konzentration im Urin festgestellt werden (Meagher et al., 1999; Aleynik et al., 1998).

Raucher, die durch den Zigarettenrauch täglich einer hohen Konzentration an freien Radikalen ausgesetzt sind, zeigen erwartungsgemäß erhöhte Werte in Urin und Plasma. Ob ein Zusammenhang der Werte und dem Alter, der Dauer des Rauchens und der Anzahl der Zigaretten pro Tag besteht, wird kontrovers diskutiert (Obata et al., 2000; Reilly et al., 1996; Morrow et al., 1995).

Oxidative Prozesse spielen bei der Entwicklung zahlreicher Krankheiten eine entscheidende Rolle. Es ist daher zu erwarten, dass auch die Isoprostan-Werte im Urin und Plasma dieser Patienten erhöht sind. Bei folgenden Krankheiten wurden erhöhte Isoprostan-Werte in der Literatur beschrieben: Atherosklerose (Patrono et al., 1997), Diabetes mellitus Typ 1 und 2 (Davi et al., 1999), Hypercholesterämie (Reilly et al., 1998), Präeklampsie (McKinney et al., 2000) und Alzheimer (Pratico et al., 1998) um nur einige zu nennen.

1.4.5 Analytik der Isoprostane mittels GC/MS mit negativer chemischer Ionisation (NCI)

Um eine weitere Lipidperoxidation in Plasma- und Gewebeproben zu vermeiden, ist zunächst die sachgemäße Lagerung der Proben äußerst wichtig. Die Proben sollten bei -70 °C gelagert werden und aufgetaute Proben nicht wieder eingefroren werden. Ein Zusatz

von Antioxidantien wie BHT oder Triphenylphosphin ist ratsam, da diese die Lipide auch bei der Probenaufarbeitung vor Oxidation schützen. Die Lagerung und Aufarbeitung von Urin ist dagegen unproblematisch, da dieser so gut wie keine Lipide enthält (Morrow et al., 1999).

Zur Detektion der Isoprostane in Urin und Plasma sind im Wesentlichen drei Methoden in der Literatur beschrieben. Die Isoprostane können entweder im Enzymimmunoassay (EIA) gemessen werden (Wang et al., 1995) oder mit der GC bzw. HPLC in Kombination mit Massenspektrometrie (MS) (Morrow et al., 1999 bzw. Ohashi und Yoshikawa, 2000). Die hierzu veröffentlichten Methoden unterscheiden sich hauptsächlich in der Probenaufarbeitung.

Für die Aufreinigung der Proben sind die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat beschrieben (Walter et al., 2000), die Festphasenextraktion mit C18-, Si- oder NH₂-Säulen (Morrow et al., 1999 bzw. Nourooz-Zadeh, 1999), die Dünnschichtchromatographie (Morrow et al., 1999), die Immunaффinitätschromatographie (Bachi et al., 1996) und eine Fraktionierung über die HPLC mit einer C18- (Mori et al., 1999) oder NH₂-Säule (Walter et al., 2000). Die Aufreinigung umfasst immer eine Kombination aus mindestens zwei der beschriebenen Methoden.

Da in dieser Arbeit zur Detektion der Isoprostane die GC/MS und der EIA verwendet wurden, wird im Folgenden nur die GC/MS-Methodik näher erläutert, zur Methodik des EIA siehe Kapitel 3.2.5.5. Zur Detektion mit GC/MS wird hauptsächlich die negative chemische Ionisation (NCI) mit Methan beschrieben, selten wird auch die Elektronenstoßionisation angewandt (EI) (Obata et al., 2000). Im Falle der Isoprostan-Analytik ist die NCI der EI aufgrund der besseren Empfindlichkeit überlegen.

Bei der NCI wird am häufigsten der Elektroneneinfang zur Ionisierung des Probenmoleküls verwendet. Hierbei wird zunächst das Reaktandgas z. B. Methan durch energiereiche aus dem Filament der Ionenquelle austretende Elektronen ionisiert. Die beiden entstandenen freien Elektronen haben eine niedrigere Energie als das ursprüngliche Elektron (s. Abb. 1-13 a). Probenmoleküle mit Heteroatomen wie Stickstoff, Schwefel und vor allem die Halogene können diese Elektronen einfangen und werden selbst negativ geladen. Beim dissoziativen Elektroneneinfang, wie er im Falle der derivatisierten Isoprostane stattfindet, zerfällt das Probenmoleküle bei der Elektroneneinfang-Reaktion und es entsteht ein negativ geladener Molekülrest, der im MS detektiert wird, und ein neutrales Molekülradikal (s. Abb. 1-13 b).



Abb. 1-13: Ionisierungsreaktionen bei der NCI: a) Ionisierung des Methangases, b) dissoziativer Elektroneneinfang eines Probenmoleküls MX.

Von Natur aus sind die Isoprostane nicht flüchtig. Um sie aber dennoch mit GC/MS messen zu können werden sie zuvor durch Derivatisierung zu flüchtigen Verbindungen umgesetzt. Damit sie mit NCI durch dissoziativen Elektroneneinfang ionisiert werden, werden die Isoprostane zuerst mit Pentafluorbenzylbromid (PFB-Br) und anschließend mit *N,O*-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) derivatisiert. Bei der ersten Derivatisierung reagiert die Carboxylgruppe des Isoprostans unter Bildung eines PFB-Br-Esters. Bei der zweiten Derivatisierung reagieren dann alle OH-Gruppen des Moleküls mit dem BSTFA zu Trimethylsilylethern (s. Abb. 1-14). Beim dissoziativen Elektroneneinfang zerfällt die Verbindung in das neutrale Pentafluorbenzyl-Radikal und das negative Carboxylat, das im MS detektiert wird.

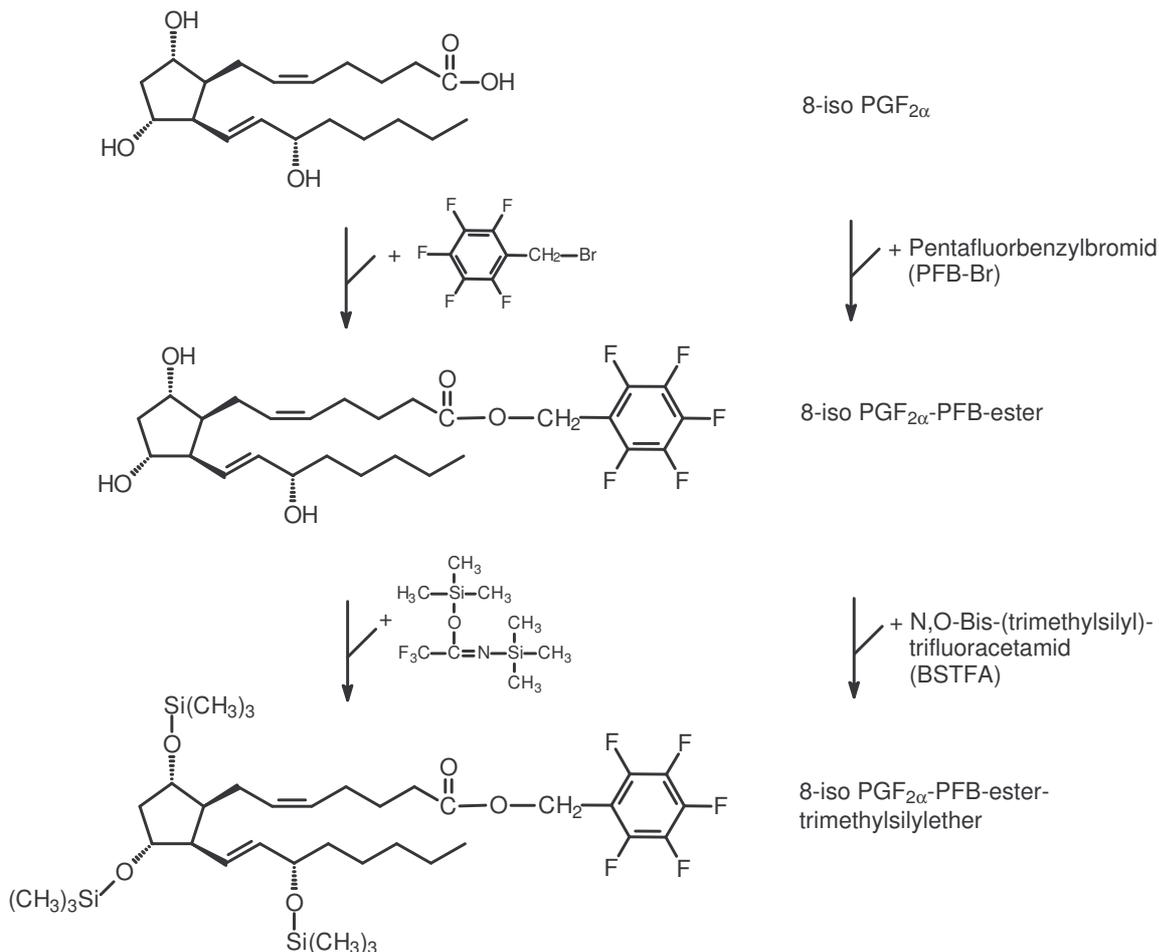


Abb. 1-14: Derivatisierungsreaktionen von 8-iso PGF_{2α}.

1.4.6 Vergleich des 8-iso PGF_{2α} mit Malondialdehyd (MDA) als Biomarker für oxidativen Stress

MDA entsteht in erster Linie beim Zerfall von Lipidhydroperoxiden, die bei der Lipidperoxidation gebildet werden. Es wird aber auch als Nebenprodukt bei der Thromboxan-Synthese gebildet. Ein Vergleich der Bildung des MDA und des 8-iso PGF_{2α} zeigt die Unterschiede der beiden Marker auf. Bei der Oxidation von Rattenlebermikrosomen *in vitro* wurde etwa 25000mal mehr MDA als 8-iso PGF_{2α} gebildet. Allerdings korrelierten der relative Anstieg und der zeitliche Verlauf der Bildung der beiden Verbindungen stark. Um die Bildung des MDA mit der Bildung des 8-iso PGF_{2α} unter oxidativem Stress *in vivo* zu vergleichen, wurden Ratten Tetrachlorkohlenstoff verabreicht, das in der Leber oxidative Schäden induziert. Gleichzeitig wurde auch die Konzentration der Serum-Glutamin-Pyruvat-Transaminase (SGPT) als Marker für einen Leberschaden bestimmt. Die Konzentration des 8-iso PGF_{2α} stieg um etwa das 85-fache an, die der SGPT um etwa das 80-fache, wohingegen die MDA-Konzentration nur um weniger als das dreifache anstieg.

Diese beiden Versuche zeigen, dass zwar die relativen Zunahmen der Konzentrationen bei der Bildung des MDA und des 8-iso PGF_{2α} über die Zeit gut übereinstimmen, die absoluten Konzentrationen, die unter oxidativem Stress gebildet werden, jedoch nicht. Da die Zunahme des 8-iso PGF_{2α} in etwa der Zunahme der SGPT entspricht, scheint das 8-iso PGF_{2α} ein besserer Marker für oxidativen Stress als das MDA zu sein (Roberts und Morrow, 1999).

MDA wird als rötliches Reaktionsprodukt der Thiobarbitursäure entweder über die Absorption oder die Fluoreszenz bestimmt. Die Thiobarbitursäure reagiert jedoch nicht ausschließlich mit MDA, sondern auch mit anderen Aldehyden, Kohlenhydraten und Aminosäuren, mit denen es Reaktionsprodukte mit einer entsprechenden Absorption bilden kann, die zum Teil auch nicht über HPLC voneinander getrennt werden können. Hinzu kommt, dass die Reaktion unter drastischen Bedingungen (95 °C, 40 min) durchgeführt wird, unter denen bislang noch intakte Lipidhydroperoxide zerfallen können, neues MDA generiert wird, das im Test mit gemessen wird (Moore und Roberts, 1998). Ein Vergleich mit einer GC/MS-Methode zur Bestimmung des MDA lässt darauf schließen, dass der Thiobarbitursäure-Test die tatsächliche MDA-Konzentration um mehr als das Zehnfache überschätzt (Meagher und FitzGerald, 2000).

Die dargestellten Unterschiede des 8-iso PGF_{2α} im Vergleich zum MDA, sowie die Schwächen des Thiobarbitursäure-Tests, stellen die Bestimmung des MDA als Marker für oxidativen Stress in Frage.

2 Problemstellung

Das Carotinoid Lycopin gewann in neuerer Zeit immer größeres Interesse der Forschung aufgrund der Ergebnisse vieler epidemiologischer Studien, in denen eine inverse Korrelation zwischen dem Verzehr von Tomaten und Tomatenprodukten bzw. dem Lycopinplasma-spiegel und dem Risiko für Krebs und Herz-Kreislauf-Erkrankungen gezeigt werden konnte.

Da Tomaten und ihre Produkte die Hauptaufnahmekategorie für Lycopin darstellen, sollten zunächst die Lycopin- bzw. Carotinoidgehalte in verschiedenen hauptsächlich roten Tomatensorten untersucht werden. Anhand weiterer Inhaltsstoffe wie Zucker, Fruchtsäuren oder Flavonoide sollten die verschiedenen Sorten charakterisiert und miteinander verglichen werden.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Bioverfügbarkeit und dem Metabolismus von Lycopin, die in Tierstudien nach Verabreichung zweier verschiedener Lycopin-formulierungen genauer untersucht werden sollten. Für die Tierstudien sollten die Tiermodelle prä-ruminantes Kalb, Frettchen und Ratte verwendet werden, die für die Untersuchung von Carotinoiden etabliert sind.

Im letzten Teil der Arbeit geht es um die Wirksamkeit von Lycopin gegen oxidativen Stress, die bei Probanden einer Interventionsstudie, in der ein Tomatenextrakt eingenommen wurde, nachgewiesen werden sollte. Als Biomarker für oxidativen Stress sollte das 8-iso PGF_{2α} herangezogen werden. Bevor die Urin und Plasmaproben gemessen werden konnten, musste zunächst eine geeignete Methode etabliert werden um das 8-iso PGF_{2α} aus Urin und Plasma zu isolieren und mit GC/MS zu quantifizieren.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Materialien

3.1.1 Geräte

Elvehjem-Potter	Braun
Evaporatorzentrifuge Maxi dry plus	Heto
Kreatininmessgerät Reflotron®	Boehringer Mannheim
Mikrotiterplatten-Lesegerät Thermo max	Molecular Devices
Photometer Lambda 15	Perkin-Elmer
Rotationsverdampfer Laborota 4003-digital	Heidolph
Ultraschallbad Transsonic T570/H	Elma
Ultraturrax Typ T25	Janke, Kunkel
Ultrazentrifuge Optima XL-100K	Beckmann
Wasserbad WB22	Memmert
Zentrifuge GS-GKR	Beckmann Coulter

HPLC für die Phenolsäureanalytik und MDA-Bestimmungen:

Anlage von Shimadzu mit Systemcontroller SCL-10A VP, 2 Pumpen LC-10AT VP, Autoinjektor SIL-10AD VP, DAD-Detektor SPD-M10A VP und Fluoreszenzdetektor RF-10A XL.

HPLC für die Carotinoidanalytik:

Anlage von Shimadzu mit Systemcontroller SCL-10A VP, Pumpe LC-10AT VP, Niederdruckgradientenfluss-Kontrolleinheit FCV-10AL, Degaser DGU-14A VP, Autoinjektor SIL-10AD VP, Säulenofen CTO-10 AS VP, DAD-Detektor SPD-M10A VP.

LC/MS:

Anlage von Agilent Technologies mit HPLC 1100 mit binärer Pumpe G1312A, Degaser G1322A, Autoinjektor G1329, Säulenofen G1316A, Wellenlängendetektor G1314A, DAD-Detektor G1315A und Quadrupol MS-Detektor G1946.

GC/MS:

Anlage von Agilent Technologies mit GC HP 6890, Autoinjektor HP 7683 und Quadrupol-MS-Detektor HP 5973.

GC/MS/MS:

Anlage von ThermoQuest Finnigan mit GC Trace 2000 und Triple Stage Quadrupol-MS-Detektor TSQ 7000.

3.1.2 Chemikalien

3.1.2.1 Standards

Chlorophyll a	Fluka
Chlorophyll b	Fluka
DL- α -Tocopherol	VWR
(+)- γ -Tocopherol	Fluka

Carotinoide:

all- <i>trans</i> β -Carotin	Fluka
all- <i>trans</i> Lutein	Roth
all- <i>trans</i> Lycopin	Geschenk der Firma BASF AG, Ludwigshafen
Phytoen	Geschenk der Firma LycoRed, Beer-Sheeva, Israel im Gemisch mit Phytofluen

Flavonoide und Phenolsäuren:

Chlorogensäure	Fluka
<i>p</i> -Cumarsäure	Roth
Ferulasäure	Roth
Kaffeesäure	Roth
Naringenin	Fluka
Rutin	Roth

Isoprostane:

8-iso Prostaglandin F _{2α}	Alexis bzw. Cayman Chemical
8-iso Prostaglandin F _{2α-d₄}	Alexis bzw. Cayman Chemical

3.1.2.2 Enzyme

Isocitrat-Dehydrogenase 7 U/mg prot.	Sigma
Pronase E 4000000 PU/g	Fluka
β -Glucosidase 6,3 U/mg	Fluka
β -Glucuronidase 367500 U/g	Sigma
Enzym-Kits für die Bestimmung von Zitronensäure, Äpfelsäure und Glucose, Fructose und Saccharose	R-Biopharm

3.1.2.3 HPLC-Fließmittel

Methanol Rotisolv [®] HPLC	Roth
Tert.-Butylmethylether Chromasolv [®]	Riedel-de-Haën
Acetonitril HPLC Gradient Grade	Promochem

3.1.2.4 Sonstige Lösungsmittel

Aceton Rotisolv [®] HPLC	Roth
<i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid	Fluka
Dichlormethan zur Synthese	VWR
Diethylether Uvasol [®]	VWR
Dimethylsulfoxid	Sigma
Ethanol p.a. absolut	VWR
Essigsäureethylester Rotisolv [®] Pestilyse	Roth
Hexan Rotisolv [®] Pestilyse	Roth
Tetrahydrofuran LiChrosolv [®]	VWR

3.1.2.5 Säuren

Ameisensäure Rotipur [®] >98%	Roth
<i>o</i> -Phosphorsäure Rotipur [®] >85%	Roth
Salzsäure 32%	VWR
Trifluoressigsäure zur Synthese	VWR

3.1.2.6 Salze

2,6-Di-tert.-Butylhydroxytoluol	Sigma
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Sigma
DL-Isocitronensäure Trinatriumsalz	Sigma
L(+)-Ascorbinsäure	Riedel-de-Haën
NADH	Fluka
NADP	Fluka

Alle sonstigen Salze waren von VWR.

3.1.2.7 Gase

Helium 5.0	Messer Griesheim
Stickstoff	Messer Griesheim
Methan 5.5	AGA Gas

3.1.2.8 Sonstige Chemikalien

Curcumin	Fluka
Daidzein	TCI Tokyo Kasei Kogyo
1,4-Dithiothreitol	Boehringer Mannheim
N-Ethyl-diisopropylamin	Fluka
Glycerin p.a.	VWR
DC Biorad Proteinassay	Biorad
2,3,4,5,6-Pentafluorbenzylbromid	Aldrich
1,1,3,3-Tetraethoxypropan	Fluka
2-Thiobarbitursäure	VWR

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner
Mikrotiterplatte	Greiner
EDTA-Monovette	Sarstedt
Rundfilter 595 Ø 150 mm	Schleicher, Schüll
C18-Festphasensäulen	Waters

8-Isoprostan-Immunaﬃnitätssäulen
8-Isoprostan-EIA-Kit
Hummeln zur Bestäubung der Tomaten

Alexis bzw. Cayman Chemical
Alexis bzw. Cayman Chemical
W. Neudorff GmbH KG, Emmerthal

3.1.4 Tomaten

Alle Samen waren von Manfred Hahm-Hartmann, Wilhelm-Löhe-Str. 5, 95176 Konradsreuth.

Rote Stabtomaten:



Abb. 3-1: oben links Tres Cantos, oben rechts Roter Pfirsich, unten links Fence Row Cherry.

Gelbe/weiße Stabtomaten:



Abb. 3-2: links Weißer Pfirsich, rechts Goldene Königin.

Bunte Stabtomaten:



Abb. 3-3: oben links Tigerella, oben rechts Green Zebra, Mitte links Black Russian, Mitte rechts Cherokee Purple, unten links Black Zebra, unten rechts Early Yellow Stripe.

Rote Fleischtomaten:



Abb. 3-4: links Gregoris Altai, rechts Lithuanian Crested.

Bunte Fleischtomaten:



Abb. 3-5: Schwarze Sarah.

Eiförmige Tomaten:



Abb. 3-6: oben links Santa Cruz Cado Gigante, oben rechts linke Seite Black Russian (bunte Stabtomate), rechte Seite Purple Russian, unten links Opalka, unten rechts Miss Kennedy.

Cherrytomaten:

Abb. 3-7: links Mirabell, rechts Tomatito de Jalapa.

Die Sorten Goldene Königin, Weißer Pfirsich und Mirabell werden im Folgenden als gelbe Sorten bezeichnet, die Sorte Green Zebra als grüne Sorte. Die Sorten Miss Kennedy, Black Russian, Black Zebra, Schwarze Sarah, Cherokee Purple und Purple Russian werden unter rot-grüne Sorten zusammengefasst, da sie entweder eine eher bräunliche statt rote Färbung zeigen, am Stielansatz grün oder braun gefärbt sind oder grün gestreift sind. Alle übrigen Sorten fallen unter die Bezeichnung rote Sorten.

3.1.5 Materialien, Tiere und Futter der Tierstudien

3.1.5.1 Supplemente für die Intervention

Lycovit[®] 10% Beadlets (BASF AG, Ludwigshafen): Die Beadlets bestehen aus 10% Lycopin, das synthetisch hergestellt wurde. Das Lycopin wurde mit Stärke, Gelatine, Saccharose, α -Tocopherol und Vitamin C zu Beadlets formuliert.

Lyc-O-Mato[®] Beads 5% (LycORed Natural Products Industries Ltd., Beer-Sheva, Israel): Die Beads bestehen zu 5% aus Lycopin, das durch Extraktion aus Tomaten gewonnen wurde. Daher sind noch Phytoen (0,5%), Phytofluen (0,4%) und α -Tocopherol (1,2%) enthalten. Das Lycopin wurde mit Gelatine, Zuckern, Vitamin C und E zu Beads formuliert.

3.1.5.2 Studie mit Ratten

Tiere: Wistar Han männlich Crl:WI (Glx/BRL/Han) 126-150 g von Charles River Deutschland, Sulzfeld

Tierfutter: Ratten/Mäuse-Haltungsdiät, Mehl einfach vermahlen von ssniff Spezialdiäten, Soest

Versuchsdiäten: Die Lycopinformulierungen LycoVit und Lyc-O-Mato wurden kurz vor Versuchsbeginn auf der Analysenwaage genau eingewogen und mit einer Küchenmaschine unter das Futter gemischt. Die Futtermischungen wurden über den Versuchszeitraum im Kühlschrank aufbewahrt.

Mischung **A:** 0,2 g LycoVit wurden in 500 g Futter eingemischt. Dies entsprach einer Lycopinkonzentration von 0,04 mg/g Futter.

Mischung **B:** 2 g LycoVit wurden in 500 g Futter eingemischt. Dies entsprach einer Lycopinkonzentration von 0,4 mg/g Futter.

Mischung **C:** 4 g Lyc-O-Mato wurden in 500 g Futter eingemischt. Dies entsprach einer Lycopinkonzentration von 0,4 mg/g Futter.

Die Konzentration, Homogenität und Stabilität des Lycopins in den Mischungen wurde mittels HPLC überprüft (s. 3.2.6.1).

3.1.5.3 Studie mit Frettchen

Tiere: weibliche Frettchen, die im Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin gezüchtet wurden.

Tierfutter: Frettchen Zucht/Haltungsdiät, als Mehl von altromin GmbH, Lage

Katzenfutter Allco Cat von ALLCO Heimtierbedarf GmbH, Co. KG, Morsum-Wulmstorf

Versuchsdiäten: Zunächst wurden die Lycopinformulierungen genau eingewogen und mittels einer Küchenmaschine unter das mehliges Frettchenfutter gemischt. Die Futtermischungen wurden über den Versuchszeitraum im Kühlschrank aufbewahrt.

Mischung **D:** 6,375 g LycoVit wurden in 1,5 kg Futter eingemischt. Dies entsprach einer Lycopinkonzentration von 0,425 mg/g Futter.

Mischung **E:** 12,75 g Lyc-O-Mato wurden in 1,5 kg Futter eingemischt. Dies entsprach einer Lycopinkonzentration von 0,425 mg/g Futter.

Die Konzentration, Homogenität und Stabilität des Lycopins in den Mischungen wurde mittels HPLC überprüft (s. 3.2.6.1).

3.1.6 Supplemente für die Humanstudie

Lyc-O-Mato[®]-Kapseln: Die Kapseln sind aus Gelatine. Sie enthalten 5 mg Lycopin in Sojaöl. Das Lycopin wurde wie bei den Beads durch Extraktion aus Tomaten gewonnen. Die

Kapseln enthalten außer Lycopin 0,5 mg Phytoen, 0,4 mg Phytofluen und 1,8 mg α -Tocopherol.

Placebo-Kapseln: Die Kapseln entsprechen den Lyc-O-Mato[®]-Kapseln. Sie enthalten anstatt des Lycopins Eisenoxid zur Farbgebung.

3.2 Methoden

3.2.1 Bestimmung verschiedener Inhaltsstoffe in Tomaten

3.2.1.1 Anbau, Ernte und Verarbeitung der Tomaten

Die Tomatensamen wurden Ende Februar ausgesät, Ende März pikiert und getopft und Mitte Mai in das Gewächshaus mit Mutterboden gesetzt. Etwa sechs Wochen später in der Blüte der Tomatenpflanzen wurden Hummeln zur Bestäubung eingesetzt. Die Tomaten wurden in reifem Zustand etwa ab Juli geerntet. Mehrere Früchte einer Sorte wurden zusammen in einer Haushaltsküchenmaschine homogenisiert und in 100 ml Gläschen mit 100 μ l 100 mM EDTA-Lösung und 200 μ l 800 mM BHT-Lösung abgefüllt und bis zur Analyse bei -20 °C eingefroren.

3.2.1.2 Extraktion der Carotinoide, Tocopherole und Phaeophytine aus Tomaten

Die Phaeophytine entstehen aus den entsprechenden Chlorophyllen im Sauren (Tomatenhomogenisat pH=5) durch Abspaltung des Magnesium-Ions aus dem Porphyrin-Ring. Da sie ähnlich unpolar sind wie die Carotinoide und Tocopherole, werden sie bei der Extraktion mit extrahiert.

Etwa 1,5 g des Tomatenhomogenisats wurden jeweils mit 50 μ l EDTA-Lösung und 5 ml Aceton mit 0,01% BHT mit dem Ultraturrax so oft extrahiert bis die Acetonphase farblos blieb. Zwischen den Extraktionen wurde 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert, damit sich die festen Bestandteile absetzen und die Acetonphase in ein Zentrifugenröhrchen überführt werden konnte. Die vereinigten Acetonphasen wurden mit 5 ml gesättigter NaCl-Lösung versetzt und zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere Phase Acetonphase wurde in einen 100 ml Rundkolben abgenommen und am Rotationsverdampfer bei etwa 200 mbar abrotiert bis nur noch eine wässrige Phase übrig war. Die wässrige Phase wurde nun zweimal mit je 2 ml Hexan mit 0,01% BHT extrahiert, die vereinigten Hexanphasen in den Rundkolben überführt und unter dem Stickstoffstrom abgeblasen.

Für die HPLC-Analyse wurde der Rückstand in 500 µl THF angelöst und mit Aceton mit 0,01% BHT quantitativ in einen 10 ml Messkolben (bei roten und rot-braunen Tomaten) bzw. 2 ml Messkolben (bei gelben und grüner Tomate) überführt.

3.2.1.3 Enzymatische Bestimmung von Zitronensäure und L-Äpfelsäure sowie von Glucose, Fructose und Saccharose

Probenvorbereitung

Etwa 1 g Tomatenhomogenisat wurden in einen 10 ml Messkolben eingewogen, mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt und 10 min im Ultraschallbad extrahiert. Der Extrakt wurde filtriert und unverdünnt für die jeweilige enzymatische Bestimmung mit dem entsprechenden Enzym-Kit eingesetzt. Die Durchführung erfolgte wie in der jeweiligen Arbeitsanweisung beschrieben.

Prinzip der Bestimmung von Zitronensäure

Citrat wird durch Citrat-Lyase in Oxalacetat und Acetat gespalten (1).



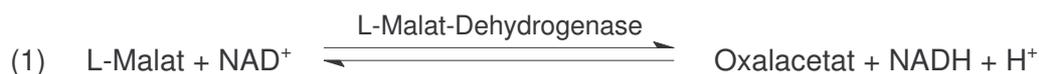
In Gegenwart von L-Malat-Dehydrogenase und L-Lactat-Dehydrogenase werden Oxalacetat und dessen Carboxylierungsprodukt Pyruvat durch NADH zu L-Malat bzw. L-Lactat reduziert (2,3).



Die Menge des verbrauchten NADH ist der Menge an Citrat äquivalent. NADH wird photometrisch bei 340 nm gemessen.

Prinzip der Bestimmung von L-Äpfelsäure

L-Äpfelsäure wird durch NAD⁺ in Gegenwart von L-Malat-Dehydrogenase zu Oxalacetat oxidiert (1).



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite des L-Malat, wird aber durch Abfangen des Oxalacetat in einer nachgeschalteten Reaktion auf die Seite des Oxalacetats verschoben. Hierbei reagiert das Oxalacetat in Anwesenheit von Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) mit L-Glutamat zu L-Aspartat und 2-Oxoglutarat (2).



Die während der Reaktion gebildete Menge NADH ist der Menge an L-Äpfelsäure äquivalent. NADH wird photometrisch bei 340 nm gemessen.

Zur Bestimmung wurden nicht wie in der Arbeitsanweisung beschrieben 100 µl Probelösung und 900 µl bidest. H₂O eingesetzt, sondern 150 µl Probelösung und 850 µl bidest. H₂O.

Prinzip der Bestimmung von Saccharose, D-Glucose und D-Fructose

D-Glucose wird bei pH 7,6 durch Hexokinase unter ATP-Verbrauch phosphoryliert (1).



Das entstehende D-Glucose-6-phosphat (G-6-P) wird von NADP in Gegenwart von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) zu D-Gluconat-6-phosphat unter Bildung von NADPH oxidiert (2).



Die während der Reaktion gebildete Menge NADPH ist der Menge an D-Glucose äquivalent. NADPH wird photometrisch bei 340 nm gemessen.

D-Fructose wird ebenfalls durch Hexokinase unter ATP-Verbrauch phosphoryliert (3).



Nach Ablauf der Reaktion wird das entstandene D-Fructose-6-phosphat durch Phosphoglucose-Isomerase (PGI) in D-Glucose-6-phosphat überführt (4).



Das D-Glucose-6-phosphat wird wie unter (2) beschrieben weiter umgesetzt. Die bei dieser Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der Menge an D-Fructose äquivalent.

Saccharose wird durch β-Fruktosidase bei pH 4,6 zu D-Glucose und D-Fructose hydrolysiert (5).



Die entstandene D-Glucose wird wie oben beschrieben als Gesamt-D-Glucose bestimmt. Der Gehalt an Saccharose errechnet sich aus der Differenz der D-Glucose-Konzentration vor und nach enzymatischer Spaltung mit β-Fruktosidase.

3.2.1.4 Bestimmung phenolischer Verbindungen aus Tomaten

Phenolsäuren und Flavonoide liegen in der Tomate größtenteils konjugiert als Glycoside, Glucose- oder Chinasäureester vor. Die Bestimmung der Konjugate und freien Verbindungen erfolgte daher in drei Schritten. Zunächst wurden alle Konjugate und freien Verbindungen extrahiert und mit HPLC bzw. LC/MS analysiert. In einem weiteren Schritt wurden nun die Konjugate enzymatisch gespalten. Dies erfolgte zum einen durch Hydrolyse mit β -Glucosidase, bei der ausschließlich die Glucoside und Glucoseester hydrolysiert wurden, und zum anderen mit einem Gemisch aus β -Glucosidase und β -Glucuronidase, bei der alle β -Glycoside und Ester hydrolysiert wurden.

Extraktion

Etwa 5 g Tomatenhomogenisat wurden mit 20 ml Methanol 1 Stunde im Ultraschallbad bei 50 °C extrahiert. Der Extrakt wurde anschließend in einen 100 ml Rundkolben filtriert und der Rückstand im Filter gut mit Methanol nachgespült. Das Methanol wurde am Rotationsverdampfer bei 40 °C und 100 mbar abrotiert, der wässrige Rest in einen 5 ml Messkolben überführt und mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Für die HPLC-Analyse der freien Säuren und Flavonoide sowie aller Konjugate wurden etwa 500 μ l entnommen, abzentrifugiert und je 100 μ l des Überstandes mit Programm 1 und 2 injiziert (s. 3.2.7.5).

Enzymatische Spaltung mit β -Glucosidase

500 μ l des wässrigen Extrakts wurden mit 500 μ l Natriumacetat-Puffer (0,15 M, pH 5) versetzt und 1 mg β -Glucosidase zugefügt. Der Ansatz wurde 1,5 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Für die HPLC-Analyse wurden feste Bestandteile abzentrifugiert und 100 μ l des Überstandes mit Programm 2 injiziert.

Enzymatische Spaltung mit β -Glucosidase und β -Glucuronidase

500 μ l des wässrigen Extrakts wurden mit 500 μ l Natriumacetat-Puffer (0,15 M, pH 5) versetzt und 1 mg β -Glucosidase und 10 mg β -Glucuronidase zugefügt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Für die HPLC-Analyse wurden feste Bestandteile abzentrifugiert und 100 μ l des Überstandes mit Programm 2 injiziert.

3.2.2 Versuchdesigns der Interventionsstudien

3.2.2.1 Studie mit präruminanten Kälbern

16 milchernährte präruminante Kälber im Alter von ca. 3 Wochen wurden nach einer Eingewöhnungszeit von 3 Tagen in 2 Interventionsgruppen eingeteilt. Die Kälber wurden während des ganzen Tierversuchs mit einem Milchaustauschfutter (125 g/l) in zwei Mahlzeiten von etwa 4 l/Mahlzeit gefüttert. Beide Gruppen erhielten während der Interventionsphase von 14 Tagen eine Dosis von je 15 mg Lycopin pro Tier und Tag, das mit der Morgentränke verabreicht wurde. An die Intervention schloss sich eine Depletionsphase von Tag 15 bis Tag 24 an, in der kein Lycopin mehr verabreicht wurde. Blutentnahmen erfolgten an Tag 0 vor der Intervention sowie an den Tagen 14 (letzter Tag der Intervention), 15, 16, 18, 21 und 24. Die Interventionsgruppe 1 erhielt das Lycopin in Form von LycoVit, Gruppe 2 in Form von Lyc-O-Mato.

Die Planung und Durchführung des Tierversuchs erfolgte vollständig durch die BASF AG. Wir führten ausschließlich die Analytik der Carotinoide im Plasma der verschiedenen Blutentnahmen durch.

3.2.2.2 Studie mit Ratten

Vorversuch:

In einem Vorversuch mit insgesamt 9 Tieren (männliche Wistar Ratten, 130-145 g) sollte zunächst eine geeignete Dosis an Lycopin für den Hauptversuch bestimmt werden.

Nachdem die Tiere einzeln in Käfige eingestallt wurden, erfolgte eine 14-tägige Eingewöhnung und Adaptation an ein gegenläufiges Lichtregime (Dunkelphase 9-21 Uhr, Hellphase 21-9 Uhr). Die Tiere wurden in dieser Zeit mit lycopinfreiem Futter gefüttert und durften ad libitum trinken.

Für die Intervention wurden die Tiere in 3 Versuchsgruppen eingeteilt:

Gruppe **1**: Die Tiere (n=3) bekamen eine Dosis von 0,2 mg Lycopin/kg Körpergewicht pro Tag über die Versuchsdiet Mischung A (LycoVit) (s. 3.1.5.2) verabreicht.

Gruppe **2**: Die Tiere (n=3) bekamen eine Dosis von 2 mg Lycopin/kg Körpergewicht pro Tag über die Versuchsdiet Mischung B (LycoVit) verabreicht.

Gruppe **3**: Die Tiere (n=3) bekamen eine Dosis von 5 mg Lycopin/kg Körpergewicht pro Tag über die Versuchsdiet Mischung B (LycoVit) verabreicht.

Während der Interventionsphase über 14 Tage wurden die Tiere jeden Morgen gewogen, um die entsprechende Menge der Versuchsdiet für jedes Tier zu berechnen. Etwa 30 min vor

Beginn der Dunkelphase wurde den Tieren ihr lycopinfreies Standardfutter für 4,5 Stunden entzogen. Danach wurde den Tieren die entsprechende Dosis Lycopin in Form der Versuchsdäten bereitgestellt (etwa 1-3 g Diät je nach Gruppe und Körpergewicht). Nachdem die Versuchsdät aufgefressen war, wurde wieder das lycopinfreie Standardfutter gefüttert. Die Tränkung erfolgte ad libitum.

Hauptversuch:

Der Ablauf des Hauptversuchs erfolgte gleichermaßen wie beim Vorversuch beschrieben. Hier wurden allerdings insgesamt 18 männliche Wistar Ratten in 3 Versuchsgruppen eingeteilt:

LV: Die Tiere (n=7) bekamen eine Dosis von 5 mg Lycopin/kg Körpergewicht pro Tag über Versuchsdät Mischung B (LycoVit) (s. 3.1.5.2) verabreicht.

LM: Die Tiere (n=7) bekamen eine Dosis von 5 mg Lycopin/kg Körpergewicht pro Tag über Versuchsdät Mischung C (Lyc-O-Mato) verabreicht.

K: Die Tiere (n=3) erhielten nur das Standardfutter ohne Zusatz von Lycopin.

Blut- und Leberentnahme:

Bei beiden Versuchen wurden am Tag nach der 14-tägigen Intervention die Tiere mit CO₂ betäubt und durch Decapitation getötet. Zunächst erfolgte die Blutentnahme durch Entbluten in eine EDTA-Monovette. Danach wurde die Leber entnommen, in Zentrifugenröhrchen im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Aus dem Blut wurde sofort das Plasma durch Zentrifugation 10 min bei 1854 x g, 4 °C gewonnen und daraus die Carotinoide extrahiert.

3.2.2.3 Studie mit Frettchen

Der Tierversuch mit den Frettchen entsprach vom Design dem Hauptversuch mit den Ratten. Es wurden 18 weibliche Frettchen getrennt in Käfigen gehalten und für die Interventionsphase von 14 Tagen in drei Gruppen eingeteilt.

LV: Die Tiere (n=7) bekamen eine Dosis von 5 mg Lycopin/kg Körpergewicht pro Tag über die Versuchsdät Mischung D (LycoVit) (s. 3.1.5.3) verabreicht.

LM: Die Tiere (n=7) bekamen eine Dosis von 5 mg Lycopin/kg Körpergewicht pro Tag über die Versuchsdät Mischung E (Lyc-O-Mato) verabreicht.

K: Die Tiere (n=4) erhielten nur das Standardfutter ohne Zusatz von Lycopin.

Während der Interventionsphase wurden die Tiere jeden Morgen gewogen und anhand des Körpergewichtes die entsprechende Menge der Versuchsdät berechnet. Für die Fütterung der Frettchen, die immer gegen 8 Uhr erfolgte, wurde die berechnete Menge der

Versuchsdiät mit einem halben Esslöffel des homogenisierten Katzenfutters und 5 ml Wasser vermischt und dem Tier bereit gestellt. Nachdem diese Portion aufgefressen war, bekamen die Tiere erneut einen halben Esslöffel Katzenfutter zu fressen. Das mehliges Frettchenfutter musste mit dem Katzenfutter vermischt werden, da die Tiere das Frettchenfutter allein nicht gefressen haben. Die Tränkung erfolgte immer ad libitum.

Blut- und Organentnahme:

Am Tag nach der 14-tägigen Intervention wurden die Tiere mit Ketamin/Rompun betäubt. Die Blutentnahme erfolgte durch Bauchschnitt und Entbluten in eine EDTA-Monovette über die Vena cava. Danach wurden die Organe entnommen, in kleine Plastikbeutel separat verpackt und bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Aus dem Blut wurde sofort das Plasma durch Zentrifugation 10 min bei 1854 x g, 4 °C gewonnen und ebenfalls bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

Die Durchführung des Tierversuchs erfolgte am Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin unter der Leitung von Frau Reimer und Herrn Wolff.

3.2.2.4 Humanstudie

Das Studiendesign entsprach einer randomisierten Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie mit cross-over-Design, bei der 25 Raucher teilnahmen, die in zwei Versuchsgruppen eingeteilt wurden. Nach einer zweiwöchigen Depletionsphase, in der auf carotinoidhaltige Obst- und Gemüsesorten verzichtet werden musste, begann die zweiwöchige Interventionsphase, in der jeder Teilnehmer drei Kapseln nach dem Abendessen einnehmen musste. Die Probanden der einen Versuchsgruppe nahmen die Kapseln mit Lyc-O-Mato ein, die Probanden der anderen Versuchsgruppe die Placebo-Kapseln. Danach wurde getauscht, so dass jeder Proband zwei Wochen die Kapseln mit Lyc-O-Mato und zwei Wochen die Placebo-Kapseln einnahm. Während der gesamten Interventionsphase musste ebenfalls auf carotinoidhaltige Obst- und Gemüsesorten verzichtet werden. Direkt vor der Intervention sowie nach jeder Versuchsphase wurden morgens nüchtern Blutproben entnommen und das Plasma durch Zentrifugation abgetrennt (10 min, 4 °C, 1854 g). Das Plasma wurde in 1 ml Portionen aliquotiert, je 10 µl einer BHT-Lösung in Methanol (c=1 mg/ml) zugefügt und bei -80 °C aufbewahrt.

Acht Probanden (s. Tab. 3-1), die zuerst das Placebo einnahmen, gaben vor und nach der Intervention mit Lyc-O-Mato zusätzlich zu den Blutproben auch Urinproben ab. Diese wurden bei -20 °C aufbewahrt. Ausschließlich das Plasma und der Urin dieser Probanden wurden für die im Folgenden beschriebenen Analysen verwendet. Da vor Beginn der Humanstudie die

Messung des 8-iso Prostaglandin $F_{2\alpha}$ im Plasma mittels Enzymimmunoassay nicht geplant war, reichte bei drei der acht Probanden das Plasma hierfür nicht mehr.

Tab. 3-1: Anthropometrische Daten der acht Probanden.

Proband	Alter [Jahre]	Zigaretten [Anzahl pro Tag]	Größe [m]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m ²]	Körperfett [%]
2	46	30	1,73	84,2	28,1	27,8
11	47	50	1,78	97,0	30,6	28,4
35	19	20	1,94	90,4	24,0	11,0
37	27	20	1,72	76,9	26,0	22,7
38	48	30	1,80	77,2	24,0	15,1
39	39	40	1,80	91,0	28,1	21,0
48	45	30	1,66	87,5	31,8	28,5
58	49	25	1,79	88,8	27,7	27,8

3.2.3 Analytik der Carotinoide in Plasma und Organen

3.2.3.1 Extraktion der Carotinoide aus Plasma

Zur Extraktion der Carotinoide aus Kälberplasma wurde 1 ml Plasma verwendet. Bei Ratten- und Frettchenplasma reichte jedoch 1 ml nicht aus, da die Carotinoidkonzentrationen zu gering für die HPLC-Analytik gewesen wären. Es wurde daher das ganze Plasma, das aus dem Ratten- bzw. Frettchenblut gewonnen werden konnte zur Extraktion eingesetzt. Dies waren bei der Ratte durchschnittlich 2 bis 3 ml und beim Frettchen 5 bis 6 ml.

Zunächst wurden die Proteine aus dem Plasma gefällt. Hierzu wurde 1 ml Plasma mit 1 ml K_2HPO_4 -Lösung (2 mM K_2HPO_4 , 1,4 mM Ascorbinsäure, 0,85 mM EDTA mit KOH auf pH 7,4 eingestellt) und 1 ml eiskaltem Ethanol gemischt und die Proteine 1 Stunde bei -20 °C ausgefällt. Die Carotinoide wurden dann insgesamt dreimal mit je 2 ml eiskaltem Extraktionsmittel 5 Minuten im Ultraschallbad extrahiert und zur Phasentrennung 5 Minuten bei 4000 U/min, 0 °C zentrifugiert. Die organischen Phasen wurden im Zentrifugenröhrchen gesammelt und unter Stickstoff abgeblasen. Für die HPLC-Analyse wurde der Rückstand in 200 μ l Aceton/Dichlormethan (10:1 mit 0,01% BHT) gelöst und 50 μ l davon injiziert.

Um für die Messung am LC/MS bzw. LC/NMR eine größere Menge der Plasmacarotinoide zu extrahieren, wurden 20 ml Plasma mit 2,5 ml K_2HPO_4 -Lösung und 7 ml eiskaltem Ethanol gemischt und die Proteine über Nacht im Eisfach bei -20 °C ausgefällt. Es wurde insgesamt viermal mit je 5 ml Extraktionsmittel extrahiert, die organischen Phasen im 100 ml Messkolben gesammelt und am Rotationsverdampfer (25 °C , 150 mbar) abrotiert. Eine Trennung der einzelnen Isomere bzw. Metabolite erfolgte durch Fraktionierung an der HPLC.

Die entsprechenden Fraktionen wurden aus mehreren Injektionen im Spitzkolben gesammelt und das Fließmittel am Rotationsverdampfer abrotiert.

Die LC/NMR-Messungen erfolgten an der Universität Tübingen im Arbeitskreis von Prof. Dr. Albert.

3.2.3.2 Extraktion der Carotinoide aus den Organen

Die bei -80 °C aufbewahrten Organe wurden über Nacht im Kühlschrank aufgetaut und etwa 2 bis 3 g in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen. In einer Lösung aus 5 ml Ethanol, 5 mg BHT und 50 µl 100 mM EDTA-Lösung wurde die Leber zunächst mit einer Schere grob zerkleinert und dann mit dem Ultraturrax homogenisiert. Nach Zugabe von 5 ml gesättigter NaCl-Lösung wurde das Organhomogenisat dreimal mit je 5 ml Extraktionsmittel extrahiert, die organischen Phasen im Spitzkolben gesammelt und am Rotationsverdampfer abrotiert. Der Rückstand wurde für die HPLC-Analyse in 225 µl oder 500 µl Aceton/Dichlormethan (10:1 mit 0,01% BHT) aufgenommen.

3.2.4 *In vitro*-Metabolismusstudien

3.2.4.1 Herstellung von Kälbermikrosomen und Kälbercytosol

Eine Kälberleber eines frischgeschlachteten Tieres wurde direkt vom Schlachthof abgeholt und auf Eis transportiert. Zunächst wurde die Leber auf Eis in einem Gefäß mit Mic-I-Puffer mit der Schere in kleinere Stücke zerteilt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit einem Stück von etwa 30 g. Dieses wurde auf Eis in einem Gefäß mit Mic-I-Puffer mit der Schere zerkleinert und dann mit der dreifachen Menge Mic-I-Puffer (90 ml) unter Eiskühlung im Elvehjem-Potter homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 9000 g, 4 °C 15 Minuten zentrifugiert, um grobe Zellbestandteile (nicht aufgebrochene Zellen, Mitochondrien, Zellkerne) abzutrennen. Der Überstand (so genannte S9-Fraktion) wurde abgenommen und erneut 60 Minuten bei 105000 g, 4 °C zentrifugiert. Das überstehende Cytosol wurde abgenommen und in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Rückstand (Mikrosomenpellet) wurde vorsichtig in etwas Mic-I-Puffer aufgeschüttelt bis nur noch ein glasiger Glykogenfleck zurück blieb. Die Mikrosomensuspension wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und eine Stunde bei 105000 g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Mic-II-Puffer (0,75 ml/g Leber) aufgenommen,

aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Mic-I-Puffer:

11,18 g KCl	0,15 M
6,06 g Tris	0,05 M
372 mg Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	1 mM

lösen und mit HCl konz. auf pH 7,4 einstellen, mit H₂O auf 1 l auffüllen.

Mic-II-Puffer:

5,96 g HEPES	25 mM
558 mg Na ₂ EDTA • 2 H ₂ O	1,5 mM
154 mg 1,4-Dithiothreitol	1 mM
5,84 g NaCl	100 mM

lösen, mit NaOH-Lösung auf pH 7,6 einstellen, 115 ml Glycerin (87%) zugeben und mit H₂O auf 1 l auffüllen.

3.2.4.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte mittels BIO-RAD DC Protein Assay modifiziert nach Lowry auf einer Mikrotiterplatte. Der Test beruht darauf, dass Proteine in alkalischer Lösung einen Kupfer-Protein-Komplex mit Cu²⁺-Ionen bilden und diese zu Cu⁺-Ionen reduzieren (Biuret-Reaktion). Der entstandene Protein-Cu⁺-Komplex reduziert dann das so genannte Folin-Reagenz (Na₂MoO₄- und Na₂WO₄-Lösung), was durch einen Farbumschlag von gelb nach blau sichtbar wird.

BIO-RAD DC-Reagenzien:

Reagenz A:	alkalische Kupfertartrat-Lösung
Reagenz B:	verdünntes Folin-Reagenz
Reagenz S:	Natriumdodecylsulfat-Lösung
	Lyophilisiertes Rinderserumalbumin

Für die Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin wurde das Lyophilisat in 20 ml dest. H₂O gelöst (c=1,4 mg/ml) und daraus drei weitere Verdünnungen (1, 0,6 und 0,2 mg/ml) in PBS-Puffer hergestellt.

Die Proben wurden ebenfalls drei Mal in PBS-Puffer verdünnt und gemessen.

PBS-Puffer:

8,77 g NaCl (0,15 M) in 900 ml dest. H₂O lösen, 10 ml Lösung A zugeben und mit Lösung B auf pH 7,3 einstellen.

Lösung A: 2,76 g NaH₂PO₄ • H₂O in 100 ml dest. H₂O

Lösung B: 3,56 g Na₂HPO₄ • H₂O in 100 ml dest. H₂O

Zur Messung wurden je drei mal 5 µl eines Standards oder der Probe oder PBS-Puffer (Leerwert) mit 25 µl Arbeitsreagenz (20 µl Reagenz S + 1 ml Reagenz A) und 200 µl Reagenz B gemischt, 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 650 nm am Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

3.2.4.3 Inkubation von Lycopin mit Mikrosomen und NADPH als Kofaktor

Die Inkubation einer Verbindung mit Mikrosomen in einem Puffer stellt ein *in vitro*-Testsystem zur Untersuchung des oxidativen Metabolismus dar. Mikrosomen sind kleine Bläschen, die sich beim Homogenisieren von Zellen aus Ribosomen und Endoplasmatischem Reticulum (ER) formen. Am ER sind verschiedene Oxidasen und Cytochrom-P450-Monooxygenasen gebunden.

Alle mikrosomalen Umsetzungen wurden in einem Gesamtvolumen von 2 ml Kaliumphosphatpuffer 100 mM pH 7,4 durchgeführt. Das NADPH-generierende System wurde direkt vor Versuchsbeginn hergestellt. Folgender Ansatz ergibt ein Gesamtvolumen von 395 µl und reicht für 5 Inkubationsansätze.

Tab. 3-2: Zusammensetzung des NADPH-generierenden Systems.

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration im Ansatz
Isocitrat-Dehydrogenase (20 U/ml)	250 µl	0,9 U
Isocitrat (2,33 M)	45 µl	9,4 mM
NADP ⁺	12,5 mg	1,21 mM
Magnesiumchlorid (1 M)	50 µl	4,3 mM
Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7,4)	50 µl	

Nach Vorlage der entsprechenden Menge Kaliumphosphatpuffer wurde die Probelösung und 2 mg mikrosomales Protein zugegeben und 5 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 70 µl NADPH-generierendes System gestartet und die Ansätze 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml Extraktionsmittel abgestoppt und extrahiert und zur besseren Phasentrennung 5 min bei

4000 U/min zentrifugiert. Die Ansätze wurden dann erneut mit 1 ml Extraktionsmittel extrahiert, die vereinten organischen Phasen unter dem Stickstoffstrom abgeblasen und für die HPLC-Analyse in 200 µl Aceton mit 0,01% BHT aufgenommen.

Als Kontrolle wurden vollständige Ansätze mit hitzedenaturierten Mikrosomen bzw. ohne NADPH-generierendes System inkubiert und aufgearbeitet. Ein vollständiger Ansatz ohne Probelösung wurde als Blindwert verwendet.

Als Probelösung wurden 100 µl einer 100 nM Lycopinlösung in Aceton mit 0,01% BHT eingesetzt. Da die Löslichkeit von Lycopin jedoch in dem wässrigen Inkubationsansatz äußerst schlecht war, wurden stattdessen noch 500 µl aus Humanplasma isolierte Lipoproteine sowie 250 µl Tomatensaft pH 7 verwendet.

Um die Aktivität der Mikrosomen zu überprüfen, diente ein Inkubationsansatz mit 10 µl einer 10 mM Lösung von Daidzein in DMSO. Von Daidzein ist bekannt, dass es zu verschiedenen Hydroxylierungsprodukten umgesetzt wird (Kulling et al., 2000). Dieser Ansatz wurde im Folgenden mit Ethylacetat extrahiert und zur HPLC-Analyse in 200 µl 50%igem Methanol aufgenommen.

3.2.4.4 Inkubation von Lycopin mit Cytosol und NADH als Kofaktor

Die Inkubation einer Verbindung mit Cytosol wird zur Untersuchung des reduktiven Metabolismus verwendet, denn im Cytosol befinden sich verschiedene Reduktasen.

Alle cytosolischen Umsetzungen wurden in einem Gesamtvolumen von 2 ml Kaliumphosphatpuffer 100 mM pH 7,4 durchgeführt. Nach Vorlage der entsprechenden Menge Kaliumphosphatpuffer wurde die Probelösung, 4 mg cytosolisches Protein und 100 µl 0,2 M NADH-Lösung zugegeben und 70 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml Extraktionsmittel abgestoppt und extrahiert und zur besseren Phasentrennung 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Die Ansätze wurden dann erneut mit 1 ml Extraktionsmittel extrahiert. Die vereinten organischen Phasen wurden unter dem Stickstoffstrom abgeblasen und für die HPLC-Analyse in 200 µl Aceton mit 0,01% BHT aufgenommen.

Als Kontrolle wurden vollständige Ansätze mit hitzedenaturiertem Cytosol bzw. ohne NADH inkubiert und aufgearbeitet. Ein vollständiger Ansatz ohne Probelösung diente als Blindwert.

Als Probelösung wurden 100 µl einer 100 nM Lycopinlösung in Aceton mit 0,01% BHT eingesetzt. Da die Löslichkeit von Lycopin jedoch in dem wässrigen Inkubationsansatz äußerst schlecht war, wurde stattdessen noch 500 µl Tomatensaft pH 7 verwendet.

Um die Aktivität des Cytosols zu überprüfen, diente ein Inkubationsansatz mit 20 µl einer 10 mM Lösung von Curcumin in Methanol. Von Curcumin ist bekannt, dass es zu

verschiedenen Reduktionsprodukten umgesetzt wird (Ireson et al., 2002). Dieser Ansatz wurde im Folgenden mit Ethylacetat extrahiert und zur HPLC-Analyse in 200 µl Methanol aufgenommen.

3.2.4.5 Inkubation mit Pansensaft

Die Inkubation mit Pansensaft wird ebenfalls zur Untersuchung des reduktiven Metabolismus unter Sauerstoffausschluss durchgeführt. Die Reduktion einer Verbindung erfolgt in diesem Fall durch die im Pansensaft vorkommende Mikroflora.

Für die Inkubation mit Pansensaft wurden folgende Lösungen benötigt (Steingass und Menke, 1986):

Mengenelementlösung:

3,77 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

3,1 g KH_2PO_4

0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

in 500 ml H_2O lösen.

Puffer (pH 8):

17,5 g NaHCO_3

2 g $\text{NH}_4(\text{HCO}_3)$

in 500 ml H_2O lösen.

Spurenelementlösung:

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 $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

in 25 ml H_2O lösen.

Reduktionslösung:

240 mg $\text{Na}_2\text{S} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in 40 ml H_2O lösen und 1,7 ml 1 N NaOH zugeben.

Die Reduktionslösung wird erst direkt vor Versuchsbeginn frisch hergestellt.

Der Pansensaft wurde der Kuh über eine Fistel entnommen und in einer vorgewärmten Thermoskanne aufbewahrt. Die Inkubationsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 150 ml durchgeführt. In einem Erlenmeyerkolben mit Stopfen und Schlauch (s. Abb. 3-8) wurden 48 ml H_2O , 24 ml Puffer, 24 ml Mengenelementlösung und 12 µl Spurenelementlösung miteinander gemischt, mit CO_2 begast und im Wasserbad bei 39 °C vorgewärmt.

Nacheinander wurden nun 5 ml Reduktionslösung, die Probelösung und 50 ml Pansensaft zugegeben, der Erlenmeyerkolben verschlossen und die Ansätze bei 39 °C 1-15 h lang inkubiert.

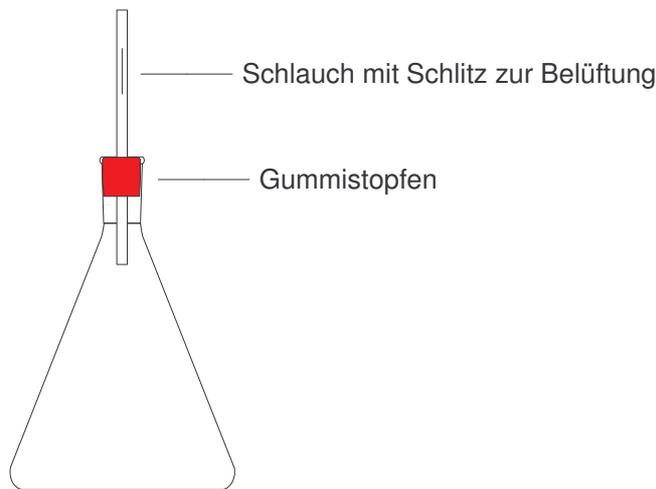


Abb. 3-8: Erlenmeyerkolben mit Stopfen und Schlauch.

Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 ml 1 M Phosphorsäure gestoppt und der Ansatz in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Ansätze wurden je 2 Mal mit 7 ml Extraktionsmittel extrahiert und zur besseren Phasentrennung bei 0 °C und 4000 U/min zentrifugiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und unter dem Stickstoffstrom abgeblasen. Der Rückstand wurde für die HPLC-Analyse in 1 ml Aceton mit 0,01% BHT aufgenommen.

Vollständige Ansätze ohne Pansensaft bzw. ohne Probelösung dienten als Kontrollen.

Als Probelösung wurden 2 mg Lycopin in 1 ml THF eingesetzt. Da die Löslichkeit von Lycopin jedoch in dem wässrigen Inkubationsansatz äußerst schlecht war, wurden stattdessen noch 1 ml Lycopinliposomen oder eine halbe zerdrückte Tomate verwendet.

Um die Aktivität des Pansensafts zu überprüfen, diente ein Inkubationsansatz mit 4 mg Daidzein in 1 ml DMSO. Es ist bekannt, dass Daidzein unter anaeroben Bedingungen zu verschiedenen Reduktionsprodukten umgesetzt wird (Chang und Nair, 1995). Dieser Ansatz wurde im Folgenden mit Ethylacetat extrahiert und zur HPLC-Analyse in 1 ml 50%igem Methanol aufgenommen.

3.2.5 Bestimmung von Isoprostanen in Körperflüssigkeiten

3.2.5.1 Isolierung der Isoprostane aus Urin mit Ethylacetat und HPLC-Fraktionierung

Der bei -20 °C aufbewahrte Urin wurde aufgetaut und die festen Bestandteile bei 4000 U/min 5 min abzentrifugiert. 2 ml des Überstandes wurden mit 10 ng des internen Standards 11 β -PGF_{2 α} versetzt und mit 1 M HCl auf pH 2-3 eingestellt. Die Isoprostane wurden dreimal mit je 3 ml kaltem Ethylacetat extrahiert und die organischen Phasen in einem 25 ml Spitzkolben gesammelt. Das Ethylacetat wurde am Rotationsverdampfer (80 mbar, 30 °C) abrotiert und der Rückstand für die HPLC-Fraktionierung in 70 μ l Ethanol gelöst. Die gesamte Lösung wurde in die HPLC injiziert und die Fraktion von 15,8 bis 17,4 min gesammelt. Die gesammelte HPLC-Fraktion wurde in der Evaporatorzentrifuge zur Trockene eingeeengt und der Rückstand mit 40 μ l PFB-Br-Lösung (10% in Acetonitril) und 20 μ l DIPEA-Lösung (10% in Acetonitril) 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad derivatisiert. Das Lösungsmittel wurde unter dem Stickstoffstrom abgeblasen und der Rückstand für die nächste HPLC-Fraktionierung in 25 μ l Acetonitril aufgenommen. Die gesamte Lösung wurde in die HPLC injiziert und die Fraktion von 22,3 min bis 23,7 min gesammelt. Die gesammelte Fraktion wurde in der Evaporatorzentrifuge zur Trockene eingeeengt, der Rückstand mit 20 μ l BSTFA derivatisiert und 1 μ l in die GC/MS injiziert.

3.2.5.2 Isolierung des 8-iso PGF_{2 α} aus Urin mit Immunaффinitätschromatographie (IAC)

Probenvorbereitung

Der bei -20 °C aufbewahrte Urin wurde aufgetaut und die festen Bestandteile bei 4000 U/min 5 min abzentrifugiert. 1 ml des zentrifugierten Urins wurde nun mit 600 pg des internen Standards d₄-8-iso PGF_{2 α} versetzt.

Immunaффinitätschromatographie

Da die IAC-Säulen in Puffer aufbewahrt wurden, wurde dieser vor der Probenaufgabe zunächst austropfen gelassen. Es wurde 1 ml des vorbereiteten Urins auf die Säule aufgegeben und durchtropfen gelassen. Die Säule wurde nacheinander mit 2 ml IAC-Puffer und 2 ml bidest. Wasser gewaschen und das 8-iso PGF_{2 α} und der interne Standard mit 2 ml Elutionslösung (abs. Ethanol/Wasser 95:1) in ein Zentrifugenröhrchen eluiert. Die Säule wurde nun mit 5 ml bidest. Wasser und 5 ml IAC-Puffer regeneriert und bis zur nächsten

Benutzung in 1-2 ml IAC-Puffer im Kühlschrank aufbewahrt. Das Eluat wurde unter Stickstoff im Wasserbad bei 50 °C zur Trockene eingeeignet und dann für die GC/MS-Analyse derivatisiert.

IAC-Puffer:

17,42 g $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ + 3,22 g KH_2PO_4 + 0,5 g NaN_3 + 29,2 g NaCl mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen (pH sollte 7,4 sein).

Derivatisierung des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ für die GC/MS-Analyse

Zunächst wurde in einer ersten Derivatisierungsreaktion die Carboxylgruppe des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ verestert. Hierzu wurde der Rückstand aus der Immunaффinitätschromatographie in 100 μ l 3,3%iger PFB-Br-Lösung in Acetonitril und 10 μ l DIPEA aufgenommen und 45 min im Wasserbad bei 37 °C derivatisiert. Die Derivatisierungslösung wurde dann unter dem Stickstoffstrom abgeblasen. Um für die GC/MS-Analyse die verbleibenden Salzreste zu entfernen, wurde der Rückstand in 700 μ l bidest. Wasser aufgenommen und zweimal mit je 750 μ l Diethylether extrahiert. Die Etherphasen wurden in einem GC-Vial gesammelt und der Ether unter dem Stickstoffstrom abgeblasen. In einer zweiten Derivatisierungsreaktion wurden nun die freien OH-Gruppen mit 20 μ l BSTFA zu Trimethylsilylethern umgesetzt. Es wurde immer eine Reaktionszeit von mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank gewährt bevor 1 μ l dieser Lösung in die GC/MS injiziert wurde.

3.2.5.3 Isolierung des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ aus Plasma mit IAC (Methode 1)

1 ml Plasma wurden mit 300 pg des internen Standards d_4 -8-iso $PGF_{2\alpha}$ versetzt und mit 1 ml 2,5 M KOH 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad verseift. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl und 1 M KH_2PO_4 -Lösung auf etwa pH 7 eingestellt und 2 ml IAC-Puffer zugefügt. Die IAC und die anschließenden Derivatisierungen erfolgten wie für Urin beschrieben.

3.2.5.4 Isolierung des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ aus Plasma mit IAC (Methode 2)

2 ml Plasma wurden mit 150 pg des internen Standards d_4 -8-iso $PGF_{2\alpha}$ versetzt und mit 1 ml 3,5 M KOH 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad verseift. Nach der Verseifung wurde 1 ml Ethanol zugefügt und zweimal mit je 1,5 ml Heptan die Lipide extrahiert. Die Heptanphasen wurden verworfen. Der pH-Wert der wässrigen Lösung wurde mit 5 M HCl und 1 M KH_2PO_4 -Lösung auf pH 2-3 eingestellt und die Isoprostane dreimal mit je 1,5 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetatphasen wurden unter dem Stickstoffstrom bei 50 °C

abgeblasen und der Rückstand in 50 μl Ethanol gelöst. Es wurden 750 μl IAC-Puffer und 500 μl Dichlormethan zugefügt, um noch verbleibende störende Verunreinigungen zu extrahieren. Die obere Pufferphase wurde abgenommen und für die IAC verwendet. Die Durchführung der IAC und die anschließenden Derivatisierungen wurden wie für Urin beschrieben durchgeführt.

3.2.5.5 Bestimmung des 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ aus Urin mit Enzymimmunoassay (EIA)

Prinzip

Der Enzymimmunoassay basiert auf dem kompetitiven Prinzip. D.h. es konkurriert das 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ aus der Probe und ein zugesetztes 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Acetylcholinesterase-Konjugat (Tracer) um die Bindung an ein 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ -spezifisches Antiserum, welches wiederum an einen auf einer 96- Lochplatte immobilisierten Antikörper bindet (s. Abb. 3-9).

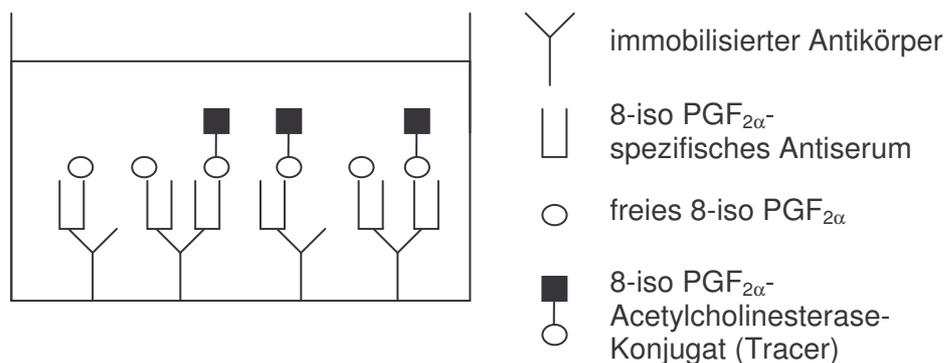


Abb. 3-9: Bindungsschema der verschiedenen Komponenten im EIA.

Da die Konzentration des Tracers immer konstant bleibt, die Menge des 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ aus den Proben jedoch variiert, ist die Menge des Tracers, die mit dem Antiserum bindet, umgekehrt proportional zur 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration der Probe. Alle Substanzen, die nicht reagieren, werden ausgewaschen und dann ein für die Acetylcholinesterase spezifisches Substrat, das so genannte Ellmans Reagenz, zugegeben. Das Ellmans Reagenz besteht aus Acetylthiocholin und 5,5'-Dithio-*bis*-(2-nitrobenzoesäure). In Gegenwart der Acetylcholinesterase des Tracers wird das Acetylthiocholin zu Acetat und Thiocholin gespalten, welches mit 5,5'-Dithio-*bis*-(2-nitrobenzoesäure) zu dem gelben Produkt 5-Thio-2-nitrobenzoesäure reagiert, dessen Extinktion photometrisch gemessen wird. Die Extinktion ist proportional zur gebundenen Tracer-Menge bzw. umgekehrt proportional zur 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Menge der Probe.

Probenvorbereitung

1 ml Urin wurde mit 1 M Natriumacetat-Puffer pH 4 auf pH 4 eingestellt und über eine C18-Festphasensäule aufgereinigt. Die Säule wurde zunächst mit 5 ml Methanol und 5 ml bidest. Wasser konditioniert, dann wurde der saure Urin aufgegeben, mit 5 ml ultrar reinem Wasser und 5 ml Hexan gewaschen und schließlich mit 5 ml Ethylacetat mit 1% Methanol eluiert. Das Eluat wurde in der Evaporatorzentrifuge zur Trockene eingengt und der Rückstand für den EIA in 1 ml EIA-Puffer gelöst. Aus dieser Lösung musste je nach 8-iso PGF_{2α}-Konzentration noch eine 1:5 bis 1:20-Verdünnung mit EIA-Puffer hergestellt werden, damit die Messwerte innerhalb der Kalibriergerade liegen.

Durchführung

Die Durchführung des EIA erfolgte genau wie in dem beiliegenden Handbuch beschrieben. Bei jeder Messung wurde eine Kalibriergerade erstellt und alle Proben wurden jeweils doppelt am Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 405 nm gemessen.

3.2.5.6 Bestimmung des 8-iso PGF_{2α} aus Plasma mit EIA

Probenvorbereitung

Aus 1 ml Plasma wurden zunächst die Proteine mit 1 ml kaltem Ethanol 30 min bei -20 °C gefällt. Die Proteine wurden abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Proteinpellet mit 0,5 ml Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde zu dem anderen hinzugefügt und das Ethanol unter dem Stickstoffstrom abgeblasen. Um die Isoprostane aus den Phospholipiden freizusetzen, wurde die wässrige Lösung mit 590 µl 3,5 M KOH 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad verseift. Mit 5 M HCl und 1 M Natriumacetat-Puffer pH 4 wurde der pH-Wert auf etwa 4 eingestellt. Hierbei fielen erneut Proteine aus, die abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde wie für Urin beschrieben (s. 3.2.5.5) mit einer C18-Festphasensäule weiter aufgereinigt. Für den EIA wurde der Rückstand in 500 µl EIA-Puffer gelöst.

3.2.6 Sonstige Methoden

3.2.6.1 Überprüfung der Stabilität des Lycopins in den Versuchsdiäten

Da Lycopin sehr empfindlich gegenüber Sauerstoff und Licht ist, musste überprüft werden, ob das Lycopin in den Versuchsdiäten über den Zeitraum der Intervention im Kühlschrank stabil ist. Hierzu wurde direkt nach der Herstellung der Versuchsdiät und 14 Tage danach je

dreimal folgender Ansatz analysiert: Es wurde 1 g der Futtermischung eingewogen, 5 mg Pronase zugefügt und in 5 ml Natriumphosphatpuffer 0,1 M, pH 7,4 und 1 ml 1 M CaCl₂-Lösung aufgeschlämmt und 2 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit je 2 ml Extraktionsmittel solange extrahiert bis die organische Phase farblos war (ca. zehn Mal). Die organischen Phasen wurden im Spitzkolben gesammelt und das Extraktionsmittel am Rotationsverdampfer abrotiert. Für die HPLC-Analyse wurde der Rückstand in 300 µl THF angelöst, mittels Aceton mit 0,01% BHT in einen 10 ml Messkolben überführt und 20 µl davon injiziert.

3.2.6.2 Bestimmung von Malondialdehyd in Urin und Plasma

Prinzip

MDA wird im Sauren mit zwei Molekülen 2-Thiobarbitursäure zu einem fluoreszierenden Addukt umgesetzt, welches mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion quantifiziert wird (s. Abb. 3-10).

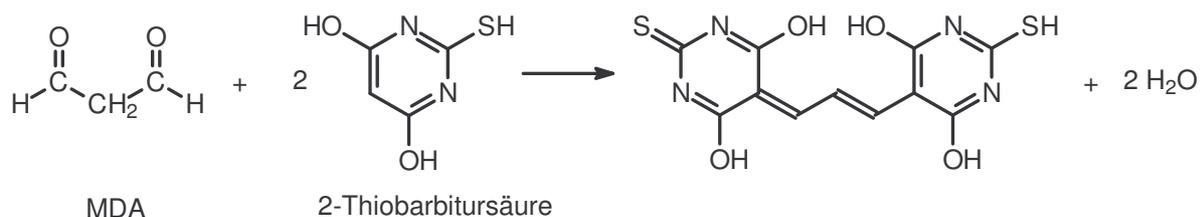


Abb. 3-10: Reaktion von MDA mit 2-Thiobarbitursäure.

50 µl Urin oder Plasma wurden mit 200 µl bidest. Wasser, 10 µl einer 10 mM BHT-Lösung in Methanol, 180 µl einer 20%igen Trifluoressigsäure und 250 µl einer 1,4%igen Thiobarbitursäure-Lösung vermischt und 40 min bei 95 °C im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurden die Inkubationsansätze 10 min bei 10000 U/min abzentrifugiert und 50 µl des Überstandes in die HPLC injiziert. Parallel zu den Proben wurde eine Kalibriergerade erstellt, für die anstelle des Urins oder Plasmas bidest. Wasser sowie vier Verdünnungen (0,25-2 µM) einer 1,1,3,3-Tetraethoxypropan-Stammlösung (100 µM) eingesetzt wurden. Die Trifluoressigsäure und die Tetraethoxypropan-Stammlösung wurden immer frisch hergestellt.

3.2.6.3 Bestimmung von Kreatinin in Urin am Reflotron[®]

Prinzip

Kreatinin wird in einer Reaktionskette mit drei verschiedenen Enzymen letztlich zu Wasserstoffperoxid, Glycin und Formaldehyd umgesetzt. Der Wasserstoffperoxid reagiert mit

einem Indikator zu Wasser und einem Farbstoff. Bei einer Wellenlänge von 642 nm wird in einer Endpunktsbestimmung die Remission (Absorption + Reflexion) gemessen, die proportional zur ursprünglichen Kreatinin-Konzentration abgenommen hat. Auf einem Teststreifen sind die Enzyme, Cofaktoren und der Indikator enthalten.

Durchführung

Da der Messbereich der Methode zwischen 0,5 und 10 mg Kreatinin/dl liegt, muss der Urin zunächst 1:21 mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) und je nach Konzentration auch noch stärker verdünnt werden. Von dem verdünnten Urin werden 32 µl auf das Testfeld des Teststreifens pipettiert und der Messwert am Gerät abgelesen.

3.2.7 Messanalytik

3.2.7.1 HPLC-Trennung für Carotinoide

Säule:	YMC C30, 250 x 4,6 mm i. D., 5 µm (YMC Europe GmbH, Schermbeck)	
Vorsäule:	YMC C30, 10 x 4,0 mm i. D., 5 µm (YMC Europe GmbH, Schermbeck)	
Mobile Phase:	A=tert.-Butylmethylether B= Methanol C= bidest. Wasser	
Flussrate:	1 ml/min	
Injektionsvolumen:	50 µl	
Säulenofen:	27 °C	
Autoinjektor:	10 °C	
Gradienten:		
Programm A:	0 min	81,0% B, 4% C
	70 min	21,1% B, 4% C
Programm B:	0 min	81,0% B, 4% C
	30 min	4,0% B, 4% C
Detektion:	DAD (286, 348, 450 nm)	

Programm A wurde für die Analyse der Tomatenextrakte verwendet, Programm B für alle weiteren Analysen.

3.2.7.2 Externe Kalibrierung der Carotinoide an der HPLC

Da die käuflichen Carotinoidstandards sehr teuer und schlecht einzuwiegen sind, wurde die Konzentration einer Carotinoidstammlösung über die Messung am Photometer bestimmt. Hierzu wurde eine geringe Menge des Standards in THF angelöst und mit Aceton mit 0,01% BHT verdünnt. Zur photometrischen Bestimmung wurde ein Teil der Stammlösung in Hexan so verdünnt, dass am Photometer eine Extinktion zwischen 0,4 und 0,9 gemessen werden konnte. Bei der Messung von Phytoen wurde das Aceton zunächst unter Stickstoff abgeblasen, da es bei 286 nm nicht mehr durchlässig ist. Der Rückstand wurde dann in Hexan aufgenommen. Alle Messungen erfolgten bei entsprechender in der Tabelle aufgeführter Wellenlänge gegen Hexan.

Die Konzentration der Stammlösung wurde über das Lambert-Beer'sche-Gesetz berechnet.

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

c= Konzentration [mol/l]

E= Extinktion

ε = molarer Extinktionskoeffizient [l/mol•cm]

d= Schichtdicke [cm]

Tab. 3-3: Extinktionskoeffizienten verschiedener Carotinoide (Britton, 1995).

Carotinoid	Wellenlänge [nm]	Molarer Extinktionskoeffizient [mol/l•cm]
Lycopin	472	185213
β -Carotin	450	139044
Lutein	450	136600
Phytoen	286	49800

Aus der Stammlösung wurden mindestens fünf Verdünnungen für die Kalibrierung in Aceton mit 0,01% BHT hergestellt und an der HPLC gemessen.

3.2.7.3 Externe Kalibrierung der Phaeophytine a und b an der HPLC

Da es keine Phaeophytinstandards zu kaufen gibt, wurden die entsprechenden Chlorophylle a und b verwendet, die durch Säure zu den Phaeophytinen umgesetzt werden können. Zunächst wurde die Konzentration einer Chlorophyll-Stammlösung, wie bei den Carotinoiden beschrieben, photometrisch bestimmt. Die Stammlösung wurde mit Aceton mit 0,01% BHT angesetzt und ein Teil zur Messung am Photometer in Aceton verdünnt. Die Messungen erfolgten bei entsprechender Wellenlänge gegen Aceton.

Tab. 3-4: Extinktionskoeffizienten von Chlorophyll a und b (Porra, 1991).

Standard	Wellenlänge [nm]	Molarer Extinktionskoeffizient [mol/l•cm]
Chlorophyll a	429,6	100390
Chlorophyll b	455,8	131910

Nach der photometrischen Bestimmung wurde die Stammlösung mit 10 µl 1 M HCl versetzt und daraus die Verdünnungen in Aceton mit 0,01% BHT für die Kalibrierung hergestellt. Das Phaeophytin a wurde bei 408 nm, das Phaeophytin b bei 436 nm detektiert.

3.2.7.4 Externe Kalibrierung der Tocopherole α und γ an der HPLC

Die Kalibrierung erfolgte gleichermaßen wie bei den Carotinoiden beschrieben. Es wurde zunächst eine Tocopherol-Stammlösung in Ethanol hergestellt und deren Konzentration über die Messung am Photometer bei entsprechender Wellenlänge berechnet.

Tab. 3-5: Absorptionskoeffizienten von Tocopherol α und γ (Budavari, 1996).

Standard	Wellenlänge [nm]	Absorptionskoeffizient [dl/g•cm]
α -Tocopherol	294	71
γ -Tocopherol	298	92,8

Aus der Stammlösung wurden Verdünnungen in Aceton mit 0,01% BHT hergestellt und an der HPLC gemessen.

3.2.7.5 HPLC-Trennung für Phenolsäuren und Flavonoide sowie deren Konjugate

Säule:	Prontosil 120-3-C18-ace-EPS, 250 x 4,0 mm i. D., 3 µm (Bischoff Analystechnik und -geräte, Leonberg)	
Vorsäule:	Prontosil 120-3-C18-ace-EPS, 20 x 4,0 mm i.D., 3 µm (Bischoff Analystechnik und -geräte, Leonberg)	
Mobile Phase:	A=Acetonitril B= 0,1%ige Ameisensäure in bidest. Wasser	
Flussrate:	0,8 ml/min	
Injektionsvolumen:	100 µl	
Autoinjektor:	Raumtemperatur	
Gradienten:		
Programm 1:	0 min	85% B
	50 min	70% B
	60 min	50 % B

	80 min	43,3% B
Programm 2:	0 min	95% B
	40 min	75% B
Detektion:	DAD (320, 370 nm)	

Programm 1 wurde für die Analyse der freien Phenoläuren, Flavonoide und deren Konjugate im Extrakt sowie nach enzymatischer Spaltung mit β -Glucosidase bzw. β -Glucosidase und β -Glucuronidase verwendet. Programm 2 wurde für die Analyse der Phenolsäureglucoside, -glucoseester und -chinasäureester aus dem Extrakt verwendet.

3.2.7.6 Externe Kalibrierung der Phenolsäuren und Flavonoide an der HPLC

Für die Kalibrierung wurden zunächst 10 und 1 mM Stammlösungen in Methanol von Rutin, Naringenin, Chlorogensäure, Kaffeesäure, Ferulasäure und *p*-Cumarsäure angesetzt. Jeweils gleiche Volumina der einzelnen Stammlösungen wurden nun zusammenpipettiert und mit 1% iger Trifluoressigsäure auf 1 ml ergänzt, so dass Verdünnungen von 10 bis 500 μ M hergestellt wurden.

Tab. 3-6: Pipettierschema zum Ansatz der Kalibrierstandards.

Konzentration [μ M]	Stammlösung [mM]	Volumen [μ l]	Volumen 1% TFA [μ l]
500	10	50	700
250	10	25	850
150	10	15	910
100	10	10	940
50	1	50	700
25	1	25	850
10	1	10	940

Jeweils 100 μ l der 7 Verdünnungen wurden in die HPLC injiziert und die Peakflächen der einzelnen Substanzen bei verschiedenen Wellenlängen ausgewertet. Chlorogensäure, Kaffeesäure und Ferulasäure wurden bei 320 nm detektiert, Rutin bei 350 nm, *p*-Cumarsäure bei 310 nm und Naringenin bei 290 nm.

3.2.7.7 HPLC-Trennung für Isoprostane

Säule:	Vydac C18, 250 x 4,6 mm i. D., 5 μ m (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Mobile Phase:	A=Acetonitril

B=0,05%ige Essigsäure in bidest. Wasser

Flussrate: 1 ml/min

Gradient: 0 min 90% B
15 min 50% B
20 min 0% B
25 min 0% B

Detektion: DAD (205 nm)

3.2.7.8 HPLC-Trennung für Malondialdehyd

Säule: Lichrosorb RP 18, 125 x 4,0 mm i. D., 5 µm
(Phenomenex, Aschaffenburg)

Vorsäule: Nova-Pak C18, 5 x 5 mm i. D., 4 µm
(Waters, Eschborn)

Mobile Phase: A=Acetonitril
B=20 mM KH₂PO₄-Lösung pH 6,5

Flussrate: 1 ml/min

Autoinjektor: Raumtemperatur

Gradient: isokratisch, 90% B

Detektion: Fluoreszenzdetektor Anregung: 515 nm (Plasma), 503 nm (Urin)
Emission: 550 nm bzw. 548 nm

3.2.7.9 LC/MS-Bedingungen für die Carotinoidanalytik

HPLC:

Säule: YMC C30, 250 x 4,6 mm i. D., 5 µm
(YMC Europe GmbH, Schermbeck)

Vorsäule: YMC C30, 10 x 4,0 mm i. D., 5 µm
(YMC Europe GmbH, Schermbeck)

Mobile Phase: A=tert.-Butylmethylether
B= Methanol

Flussrate: 0,9 ml/min

Autoinjektor: 10 °C

Gradient: 0 min 80% B
30 min 4% B

40 min 0% B
 Detektion: DAD (450 nm)

MS:

Atmospheric pressure ionisation (APCI) im positiven Modus

Trocknungsgasfluss: 6 l/min
 Versprüherdruck: 30 psig
 Trocknungsgastemperatur: 250 °C
 Verdampfer­temperatur: 400 °C
 Koronastromstärke: 10 µA
 Kapillarspannung: 2500 V
 Fragmentorspannung 70 V

3.2.7.10 LC/MS-Bedingungen für die Phenolsäure- und Flavonoidanalytik

HPLC:

Säule: Prontosil 120-3-C18-ace-EPS, 250 x 4,0 mm i. D., 3 µm
 (Bischoff Analy­sentech­nik und -gerä­te, Leonberg)
 Vorsäule: Prontosil 120-3-C18-ace-EPS, 20 x 4,0 mm i. D., 3 µm
 (Bischoff Analy­sentech­nik und -gerä­te, Leonberg)
 Mobile Phase: A=Acetonitril
 B= 0,1 % Ameisensäure in bidest. Wasser
 Flussrate: 0,7 ml/min
 Injektionsvolumen: 100 µl
 Autoinjektor: Raumtemperatur
 Gradienten:
 Programm 1: 0 min 85% B
 50 min 70% B
 60 min 50 % B
 80 min 43,3% B
 Programm 2: 0 min 95% B
 40 min 75% B
 Detektion: DAD (320 nm und 370 nm)

Programm 1 wurde für die Analyse der freien Phenoläuren, Flavonoide und deren Konjugate im Extrakt sowie nach enzymatischer Spaltung mit β-Glucosidase bzw. β-Glucosidase und

β -Glucuronidase verwendet. Programm 2 wurde für die Analyse der Phenolsäureglucoside, -glucoseester und -chinasäureester aus dem Extrakt verwendet.

MS:

Electrospray ionisation (ESI) im negativen Modus

Trocknungsgasfluss:	12 l/min
Versprüherdruck:	60 psig
Trocknungsgastemperatur:	350 °C
Kapillarspannung:	3500 V
Fragmentorspannung	95 V

3.2.7.11 GC/MS-Bedingungen

Säule: HP-5MS, 30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m Filmdicke
(Agilent Technologies, Waldbronn)

Trägergas: Helium, Fluss 0,8 ml/min

Injektor: 250 °C
Pulsed splitless

Temperaturprogramm:

Anfangstemperatur:	50 °C
Isotherme 1	1 min
Aufheizrate 1	20 °C/min
Temperatur 2	260 °C
Aufheizrate 2	5 °C/min
Temperatur 3	300 °C
Isotherme 3	5 min

Negative Chemical Ionization (NCI)

Reaktandgas:	Methan: Vordruck 1,8 bar, Anteil 40 %
Ionenquellentemperatur:	150 °C
Interface:	280 °C
Quadrupoltemperatur:	106 °C
Ionisierungsenergie:	150 eV

SIM-Modus von $[M-PFB]^-$ bei m/z 569 für 8-iso $PGF_{2\alpha}$ und bei m/z 573 für d_4 -8-iso $PGF_{2\alpha}$

3.2.7.12 GC/MS/MS-Bedingungen

Die GC/MS/MS-Analysen wurden am Institut für klinische Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Säule: Optima 1-MS, 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke
(Macherey-Nagel, Düren)

Trärgas: Helium, 1,2 ml/min

Injektor: PTV, splitless

Anfangstemperatur: 70 °C

Injektion: Druck: 1,24 bar

Zeit: 0,2 min

Verdampfung: Druck: 1,24 bar

Rate: 10 °C/s

Temperatur: 250 °C

Transfer: Druck: 1,24 bar

Rate: 10 °C/s

Temperatur: 280 °C

Zeit: 2 min

Ausheizen: Rate: 10 °C/s

Temperatur: 300 °C

Zeit: 4 min

Ofen-Temperaturprogramm:

Anfangstemperatur: 80 °C

Isotherme 1 1,5 min

Aufheizrate 1 8 °C/min

Temperatur 2 340 °C

Isotherme 2 2 min

Negative Chemical Ionization (NCI)

Reaktandgas: Methan, 530 Pa

Ionenquellentemperatur: 180 °C

Interface: 290 °C

Ionisierungsenergie: 200 eV

Kollisions-aktivierte Dissoziation:

Argon, 0,15 Pa

Kollisionsenergie 25 eV

SRM-Modus von $[M\text{-PFB-3x TMSOH}]^-$ bei m/z 299,26 für 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ und m/z 303,27 für d_4 -8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ die aus den Elternionen m/z 569,25 bzw. 573,31 generiert wurden

3.2.7.13 Externe Kalibrierung des 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ an der GC/MS mit internem Standard d_4 -8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$

Es wurden zunächst Stammlösungen in Ethanol von 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($c=3,545$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und von d_4 -8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($c=50$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) hergestellt. Für die Kalibrierstandards wurden jeweils 25 μl der d_4 -8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Lösung und verschiedene Volumina der 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Lösung in ein GC-Vial pipettiert (s. Tab. 3-7) und das Ethanol unter dem Stickstoff abgeblasen. Die Isoprostane wurden 45 min bei 37 °C im Wasserbad mit 100 μl 3,3 %iger PFB-Br-Lösung in Acetonitril und 10 μl DIPEA derivatisiert. Die Derivatisierungslösung wurde unter dem Stickstoff abgeblasen und der Rückstand in 20 μl BSTFA aufgenommen. Es wurde eine Derivatisierungszeit von mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank gewährt bevor 25 μl Heptan zugefügt wurden und 1 μl jeden Standards in die GC/MS injiziert wurde.

Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden die Peakflächen von 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ (m/z 569) und von d_4 -8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ (m/z 573) ausgewertet, das Flächenverhältnis gebildet und gegen die Menge an 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ aufgetragen.

Tab. 3-7: Pipettierschema zum Ansatz der Kalibrierstandards.

Standard	Volumen der 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ - Stammlösung [μl]	Menge des 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ [μg]
1	6	21,3
2	43	152,4
3	88	312,0
4	176	623,9
5	280	992,6
6	353	1251,4
7	455	1613,0

3.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Tierstudien und Humanstudie erfolgte mit dem Statistikprogramm StatView, Version 5.0 (SAS Institute Inc., 1998). Gruppenunterschiede in

der Studie mit präruminanten Kälbern am Tag 15 wurden durch ungepaarten t-Test berechnet. Gruppenunterschiede im Ratten- und Frettchenversuch wurden durch ANOVA ermittelt. Die Interventionseffekte auf die Marker des oxidativen Stress in der Humanstudie wurden mittels gepaartem t-Test bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde auf 95% bzw. $P \leq 0.05$ gesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Vorkommen von Carotinoiden: Analyse von verschiedenen Tomatensorten

Alle 20 verschiedenen Tomatensorten, die in Kapitel 3.1.4 abgebildet sind, wurden auf ihre Carotinoidgehalte hin analysiert. Abb. 4-1 zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm eines Carotinoideextraktes einer roten Tomate bei verschiedenen Detektionswellenlängen.

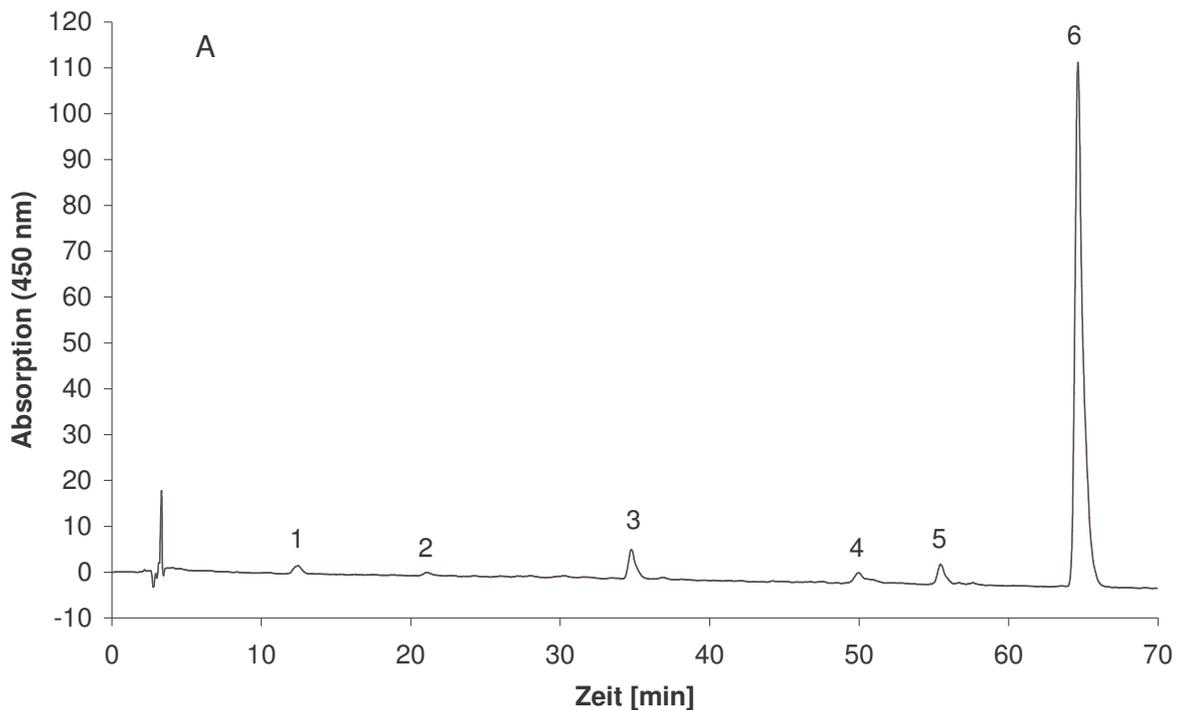


Abb. 4-1 A: HPLC-Chromatogramm eines Carotinoideextraktes der Sorte Gregoris Altai bei 450 nm. 1 *all-trans* Lutein, 2 2,6-Cyclolycopin-1,5-diol, 3 *all-trans* β -Carotin, 4 13-*cis* Lycopin, 5 Lycopin-1,2-epoxid, 6 *all-trans* Lycopin.

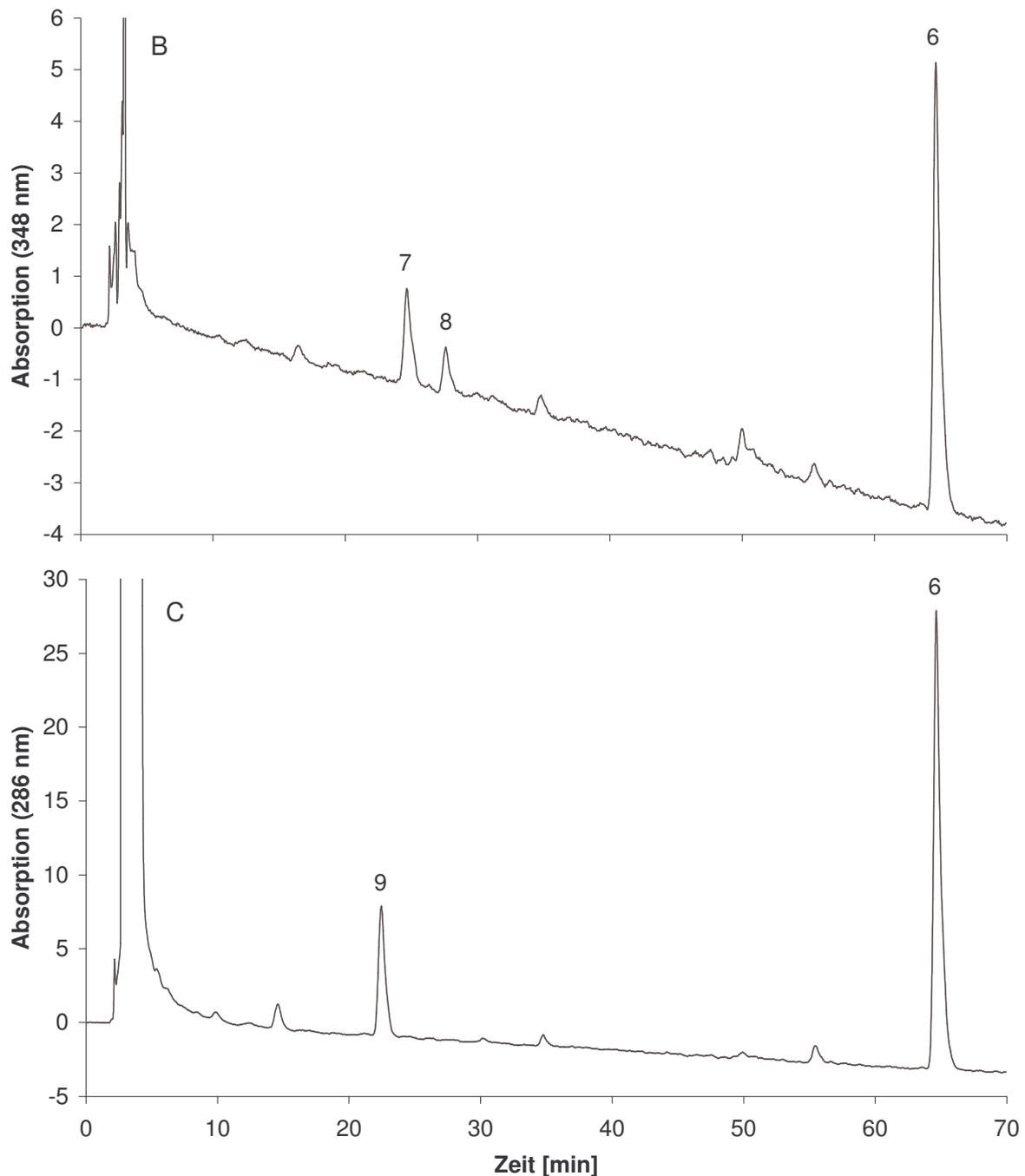


Abb. 4-1 B und C: HPLC-Chromatogramme eines Carotinoideextrakts der Sorte Gregoris Altai bei 348 nm (B) und 286 nm (C). 6 *all-trans* Lycopin, 7 Phytofluen a, 8 Phytofluen b, 9 Phytoen.

Bei den roten und rot-grünen Tomatensorten überwog deutlich das *all-trans* Lycopin mit Werten bis zu 9 mg/100 g Nassgewicht. In wesentlich geringeren Mengen kamen Phytoen, β -Carotin, Lycopin-1,2-epoxid, Phytofluen a und b und Lutein vor. Außerdem wurden die Lycopinisomere 9-*cis* und 13-*cis*, sowie das Lycopinoxidationsprodukt 2,6-Cyclolycopin-1,5-diol detektiert, die hauptsächlich bei der Extraktion aus *all-trans* Lycopin entstehen und

natürlicherweise gar nicht oder nur in Spuren in Tomaten vorkommen (s. Tab. 4-1 und Tab. 4-2).

In den rot-grünen Tomatensorten sowie in der gelb gestreiften Tigerella und Early Yellow Stripe wurden neben den Carotinoiden noch Phaeophytine detektiert, die im sauren Tomatenhomogenisat aus den entsprechenden Chlorophyllen entstehen. Bei Tigerella und Early Yellow Stripe kamen ausschließlich Phaeophytin a und b vor, wobei in allen rot-grünen Sorten noch ein weiteres Phaeophytin detektiert werden konnte, das als Phaeophytin a' bezeichnet wurde, da es das gleiche UV/VIS-Spektrum wie Phaeophytin a besitzt.

Tab. 4-1: Carotinoid- und Phaeophytin-Gehalte der roten Tomatensorten in mg/100 g Nassgewicht. n.n. = nicht nachweisbar.

	Tomatito de Jalapa	Opalka	Roter Pfirsich	Fence Row Cherry	Gregoris Altai
Lutein	0,25	0,05	0,06	0,10	0,07
β-Carotin	0,79	0,29	0,54	0,80	0,21
9- <i>cis</i> β-Carotin	0,07	n.n.	n.n.	0,04	0,01
all-trans Lycopin	9,00	8,91	7,53	5,35	5,24
9- <i>cis</i> Lycopin	0,05	0,04	0,18	0,05	0,06
13- <i>cis</i> Lycopin	0,30	0,21	0,34	0,25	0,14
Gesamtlycopin	9,35	9,16	8,05	5,65	5,45
Lycopin-1,2-epoxid	0,14	0,22	0,24	0,14	0,21
Phytoen	1,30	0,81	1,01	1,02	0,80
Phytofluen a	0,34	0,19	0,13	0,26	0,12
Phytofluen b	0,07	0,05	0,06	n.n.	0,05
Phaeophytin a	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Phaeophytin b	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
2,6-Cyclolycopin-1,5-diol	0,04	0,04	0,05	0,02	0,03

	Santa Cruz Cado G.	Lithuanian Crested	Tres Cantos	Tigerella	Early Yellow Stripe
Lutein	0,05	0,07	0,04	0,12	0,08
β-Carotin	0,61	0,26	0,14	0,76	0,36
9- <i>cis</i> β-Carotin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
all-trans Lycopin	3,95	3,60	1,76	6,72	4,26
9- <i>cis</i> Lycopin	0,04	0,04	0,03	0,05	0,05
13- <i>cis</i> Lycopin	0,19	0,16	0,09	0,23	0,19
Gesamtlycopin	4,19	3,80	1,88	7,01	4,50
Lycopin-1,2-epoxid	0,08	0,11	0,08	0,14	0,06
Phytoen	1,04	0,62	0,81	1,19	0,83
Phytofluen a	0,23	0,07	0,18	0,21	0,10
Phytofluen b	0,04	0,03	n.n.	0,09	0,07
Phaeophytin a	n.n.	n.n.	n.n.	0,18	0,13
Phaeophytin b	n.n.	n.n.	n.n.	0,12	0,11
2,6-Cyclolycopin-1,5-diol	0,04	0,03	0,02	0,02	0,01

Tab. 4-2: Carotinoid- und Phaeophytin-Gehalte der rot-grünen Tomatensorten in mg/100 g Nassgewicht. n.n. = nicht nachweisbar.

	Miss Kennedy	Black Russian	Black Zebra	Schwarze Sarah	Cherokee Purple	Purple Russian
Lutein	0,07	0,10	0,17	0,06	0,12	0,13
β -Carotin	0,35	0,37	0,26	0,15	0,20	0,15
9- <i>cis</i> β -Carotin	0,06	0,01	0,04	0,03	0,01	n.n.
all- <i>trans</i> Lycopin	8,95	7,83	5,56	4,44	3,31	1,99
9- <i>cis</i> Lycopin	0,07	0,06	0,03	0,06	0,03	0,02
13- <i>cis</i> Lycopin	0,29	0,20	0,16	0,15	0,12	0,09
Gesamtlycopin	9,30	8,09	5,75	4,65	3,46	2,10
Lycopin-1,2-epoxid	0,18	0,14	0,11	0,12	0,07	0,04
Phytoen	0,74	0,53	0,77	0,67	0,52	0,32
Phytofluen a	0,12	0,07	0,11	0,07	0,08	0,05
Phytofluen b	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Phaeophytin a	0,21	0,31	0,90	0,18	0,61	0,63
Phaeophytin a'	0,15	0,27	0,44	0,12	0,28	0,33
Phaeophytin b	0,17	0,16	0,43	0,12	0,27	0,26
2,6-Cyclolycopin-1,5-diol	0,04	0,01	0,03	0,04	0,02	0,01

Wie aus Tab. 4-1 und Tab. 4-2 ersichtlich, unterschieden sich die verschiedenen Tomaten recht deutlich in den einzelnen Carotinoidgehalten voneinander. Tomatito de Jalapa hatte die höchsten Gehalte an all-*trans* Lycopin, Phytoen, β -Carotin, Phytofluen a und Lutein, Tres Cantos mit Ausnahme von Phytoen die niedrigsten Gehalte. Es kann jedoch nicht generell gesagt werden, dass eine Tomate mit hohem Lycopingehalt, auch hohe Gehalte der anderen Carotinoide aufweist und umgekehrt.

Die rot-grünen Sorten unterschieden sich bis auf die Phaeophytine nicht in den Carotinoidgehalten von den roten Sorten. Miss Kennedy hatte ungefähr den gleichen Lycopingehalt wie Tomatito. Ähnlich niedrige Carotinoidgehalte wie Tres Cantos besaß Purple Russian. Die höchste Phaeophytin-Konzentration war in Black Zebra zu finden, die niedrigste in der Schwarzen Sarah.

In den gelben Tomaten kam Lycopin nur in Spuren vor. Hier überwogen die Carotinoide Lutein und β -Carotin, deren Gehalte jedoch immer noch geringer waren als in den roten und rot-grünen Tomaten (s. Abb. 4-2).

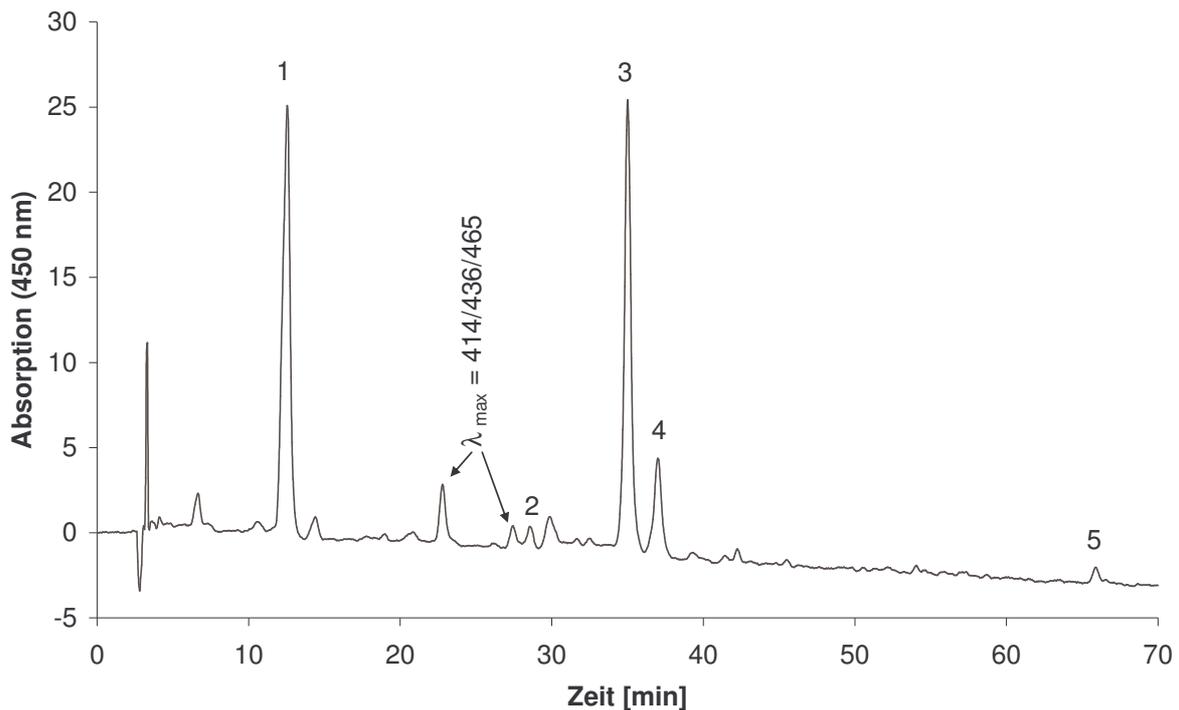


Abb. 4-2: HPLC-Chromatogramm eines Carotinoideextrakts der Sorte Weißer Pfirsich. 1 all-*trans* Lutein, 2 Phaeophytin b, 3 all-*trans* β -Carotin, 4 9-*cis* β -Carotin, 5 all-*trans* Lycopin.

Neben den im Chromatogramm bezeichneten Carotinoiden fielen in allen Carotinoideextrakten der gelben Tomaten vor allem zwei weitere Peaks auf, die die UV-Maxima 414/436/465 besaßen. Wurde der Carotinoideextrakt verseift, so verschwanden diese Peaks und es entstand ein neuer Peak bei etwa 7,5 min mit genau den gleichen UV-Maxima. Bei diesem Peak handelte es sich demnach um ein freies Carotinoide, das durch die Verseifung aus den entsprechenden Fettsäureestern entstanden sein muss. Durch Vergleich mit z. B. gelbem Paprika-Extrakt liegt die Vermutung nahe, dass es sich um das Xanthophyll Violaxanthin handelt.

In der grünen Tomate Green Zebra dominierten die Chlorophylle bzw. Phaeophytine, die für die grüne Farbe verantwortlich sind. Im HPLC-Chromatogramm eines Carotinoideextrakts von Green Zebra wurde neben den Phaeophytinen auch Chlorophyll b detektiert, das mit Lutein koeluiert (s. Abb. 4-3 A). Die eigene Fruchtsäure der Tomate scheint in diesem Fall nicht ausgereicht zu haben, um alle Chlorophylle in die entsprechenden Phaeophytine umzusetzen.

Um das Lutein bzw. das Chlorophyll b als Phaeophytin auswerten zu können, wurde zunächst das Chlorophyll durch Zusatz von Salzsäure zu Phaeophytin umgesetzt. Hierbei

wurden allerdings die Carotinoide β -Carotin und Lycopin zerstört. Lutein isomerisierte, was daran zu erkennen war, dass neue Peaks bei 14,7, 16,9 und 19,4 min im Chromatogramm auftauchten, die ein Lutein ähnliches Spektrum besaßen (s. Abb. 4-3 B). Wurde anstelle von Säure Kalilauge zugesetzt, so wurden zwar die Chlorophylle und Phaeophytine zerstört, die Carotinoide blieben dagegen erhalten (s. Abb. 4-3 C).

Von den Carotinoiden war in Green Zebra am meisten Lutein vorhanden, β -Carotin kam in etwas geringerer Menge vor, Lycopin nur in Spuren.

Tab. 4-3: Carotinoid- und Phaeophytin-Gehalte der gelben und grünen Tomatensorten in $\mu\text{g}/100$ g Nassgewicht.

	Goldene Königin	Mirabell	Weißer Pfirsich	Green Zebra
Lutein	58	54	55	120
β -Carotin	53	50	42	32
9- <i>cis</i> β -Carotin	13	15	12	5
all- <i>trans</i> Lycopin	15	6	2	1
Phaeophytin a	9	36	32	1228
Phaeophytin b		7	9	342
Phaeophytin a'				13

Die Lutein- und β -Carotin-Gehalte unterschieden sich in den gelben Tomaten kaum (s. Tab. 4-3). Die Goldene Königin enthielt im Vergleich das meiste Lycopin aber dafür am wenigsten Phaeophytine.

In Green Zebra war der Lutein-Gehalt etwa doppelt so hoch wie in den gelben Tomaten. Es überwogen allerdings deutlich mit 1,5 mg/100 g Nassgewicht die Phaeophytine.

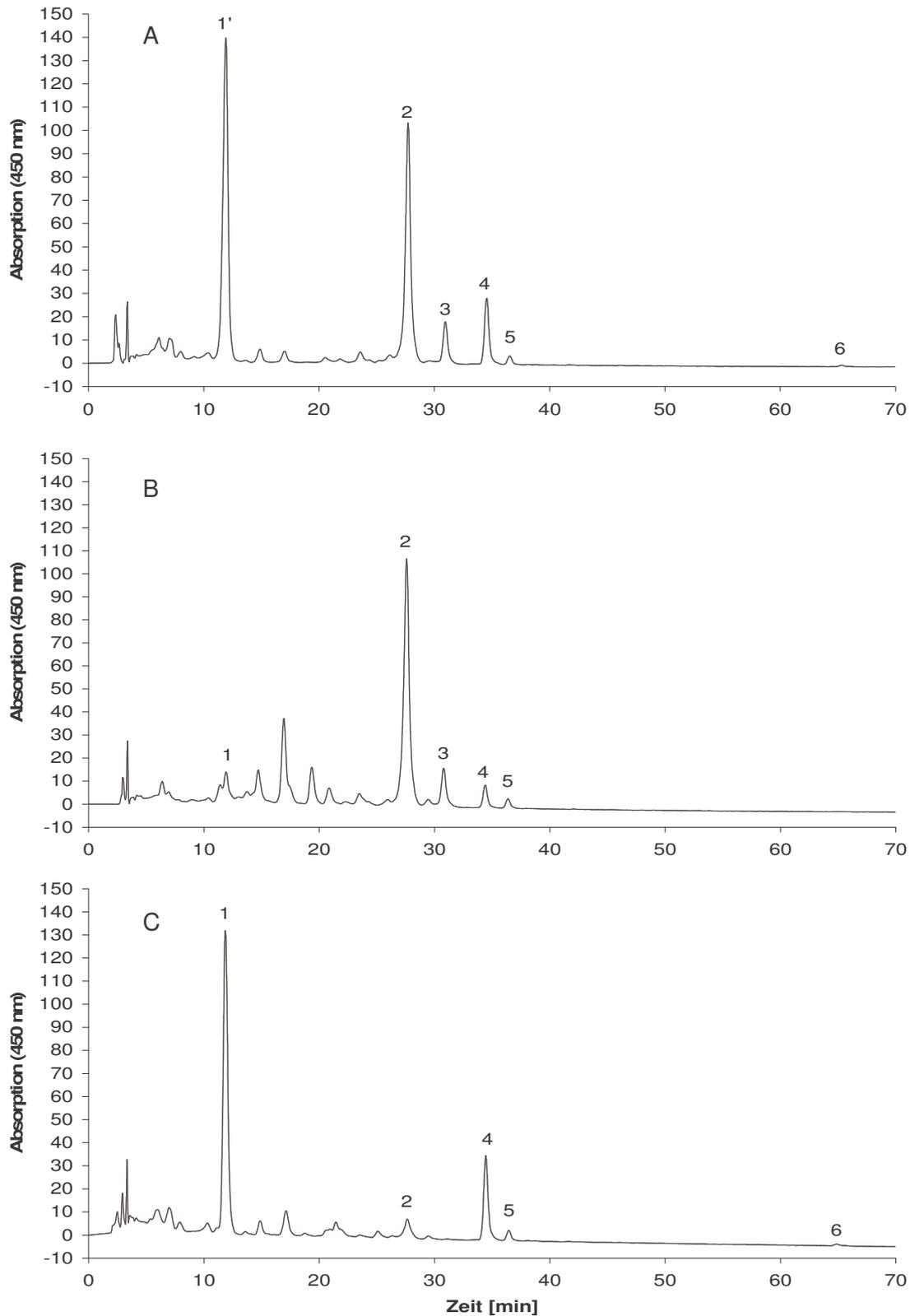


Abb. 4-3: HPLC-Chromatogramme eines Carotinoideextrakts der Sorte Green Zebra. A Extrakt, B Extrakt mit Salzsäure, C Extrakt mit Kalilauge. 1' Lutein mit Chlorophyll b, 1 Lutein, 2 Phaeophytin a, 3 Phaeophytin b, 4 all-*trans* β -Carotin, 5 9-*cis* β -Carotin, 6 all-*trans* Lycopin.

4.2 Bestimmung weiterer Inhaltsstoffe von Tomaten

4.2.1 Vitamin E-Bestimmung

Bei der Extraktion mit Hexan werden nicht nur die Carotinoide extrahiert, sondern auch alle Fette und fettähnlichen Inhaltsstoffe, wie die Tocopherole. Die Tocopherole sind insofern von Bedeutung, da sie neben dem wasserlöslichen Vitamin C die wichtigsten Vitamine in Tomaten sind (s. Tab. 4-4).

Tab. 4-4: Gehalte von α - und γ -Tocopherol in mg/100 g Nassgewicht in den 20 Tomatensorten. Die niedrigsten und höchsten Gehalte sowie die Mittelwerte sind hervorgehoben.

	α -Tocopherol	γ -Tocopherol	Gesamt tocopherol
Early Yellow Stripe	0,91	0,25	1,16
Fence Row Cherry	1,38	0,75	2,13
Gregoris Altai	0,70	0,10	0,80
Lithuanian Crested	0,88	0,05	0,93
Opalka	1,11	0,24	1,36
Roter Pfirsich	0,85	0,40	1,25
Santa Cruz Cado Gigante	0,37	1,00	1,37
Tigerella	1,02	0,41	1,43
Tomatito de Jalapa	2,16	1,12	3,28
Tres Cantos	0,74	0,10	0,84
Black Russian	1,33	0,38	1,71
Black Zebra	1,28	0,32	1,59
Cherokee Purple	0,98	0,23	1,21
Miss Kennedy	2,03	0,48	2,51
Purple Russian	0,89	0,23	1,12
Schwarze Sarah	1,01	0,14	1,16
Goldene Königin	0,86	0,35	1,22
Mirabell	0,73	0,99	1,72
Weißer Pfirsich	1,05	0,37	1,42
Green Zebra	0,84	0,34	1,18
Mittelwert	1,06	0,41	1,47
Standardabweichung	0,42	0,31	0,73

In den meisten Tomatensorten kam mindestens doppelt so viel α -Tocopherol wie γ -Tocopherol vor. Ausnahmen bildeten die Sorten Santa Cruz Cado Gigante und Mirabell, die weniger α - als γ -Tocopherol enthielten. Die Gehalte von α -Tocopherol lagen im Bereich von 0,37 bis 2,16 mg/100 g und die von γ -Tocopherol von 0,05 bis 1,12 mg/100 g Nassgewicht. Sie waren unabhängig von der Tomatenfarbe und vom Carotinoidgehalt. Die Cherrytomate Tomatito de Jalapa und die rot-grüne Miss Kennedy wiesen allerdings sowohl die höchsten Lycopingehalte als auch die höchsten Tocopherolgehalte auf.

4.2.2 Enzymatische Bestimmung der Fruchtsäuren

Alle 20 Tomatensorten wurden zum einen auf ihre Zuckergehalte analysiert und zum anderen auf ihre Gehalte an Zitronensäure und L-Äpfelsäure, die den größten Beitrag zu den Fruchtsäuren leisten.

Es fiel auf, dass sich die verschiedenen Tomaten in ihren Glucose/Fructose-Gehalten und damit in ihrem Süßgeschmack nur gering voneinander unterschieden (2,0–2,4 g/100 g) (s. Tab. 4-5). Größere Unterschiede gab es bei Saccharose (45-170 mg/100 g), was allerdings wegen der hohen Fructose/Glucose-Gehalte nicht ins Gewicht fiel. Ebenfalls größere Unterschiede bestanden bei den Fruchtsäuren. Die Gehalte von Zitronensäure (238-611 mg/100 g), aber vor allem von Äpfelsäure (19-102 mg/100 g) unterschieden sich z. T. um das Fünffache. Dies machte sich im Geschmack der Tomaten jedoch kaum bemerkbar, da die Zucker in den Gehalten deutlich überwogen.

Tab. 4-5: Gehalte von L-Äpfelsäure, Zitronensäure und Saccharose in mg/100 g Nassgewicht sowie Fructose/Glucose in g/100 g Nassgewicht. Die niedrigsten und höchsten Gehalte sowie die Mittelwerte sind hervorgehoben.

	L-Äpfelsäure	Zitronensäure	Saccharose	Σ Glucose + Fructose
Early Yellow Stripe	93	554	138	2,4
Fence Row Cherry	53	422	104	2,3
Gregoris Altai	23	539	123	2,2
Lithuanian Crested	24	418	138	2,3
Opalka	19	417	79	2,4
Roter Pfirsich	24	603	45	2,3
Santa Cruz Cado Gigante	34	238	120	2,2
Tigerella	82	551	100	2,2
Tomatito de Jalapa	42	611	84	2,3
Tres Cantos	44	442	73	2,3
Black Russian	30	353	87	2,4
Black Zebra	19	334	119	2,3
Cherokee Purple	30	477	170	2,0
Miss Kennedy	25	344	61	2,1
Purple Russian	54	361	59	2,2
Schwarze Sarah	21	485	93	2,1
Goldene Königin	102	494	95	2,3
Mirabell	46	607	56	2,4
Weißer Pfirsich	63	312	54	2,1
Green Zebra	41	523	90	2,3
Mittelwert	43	454	94	2,3
Standardabweichung	25	108	33	0,1

4.2.3 Bestimmung von freien und gebundenen Phenolsäuren und von Flavonoiden

4.2.3.1 Bestimmung der freien Phenolsäuren und Flavonoide und deren Konjugate im Extrakt

In allen Tomatensorten wurden die freien Phenolsäuren Kaffeesäure, Ferulasäure und Cumarsäure sowie das freie Flavonoid Naringenin quantifiziert. An konjugierten Phenolsäuren wurden zum einen die mit Chinasäure veresterte Chlorogensäure, Cryptochlorogensäure und in einigen Sorten auch 5-Cumaroylchinasäure detektiert und zum anderen verschiedene mit Glucose konjugierte Cumarsäure- und Kaffeesäureglucoside bzw. Glucoseester (s. Abb. 4-4A). An konjugierten Flavonoiden wurden Rutin und ein Rutinpentosid sowie die entsprechenden Kämpferol-Verbindungen Kämpferolrutinosid und Kämpferolrutinopentosid identifiziert (s. Abb. 4-4B). Es wurde jedoch nur das Rutin und Rutinpentosid quantifiziert, da die anderen Verbindungen in wesentlich geringere Konzentration enthalten waren. In allen Sorten überwogen deutlich die konjugierten Verbindungen insbesondere die Phenolsäureglucoside.

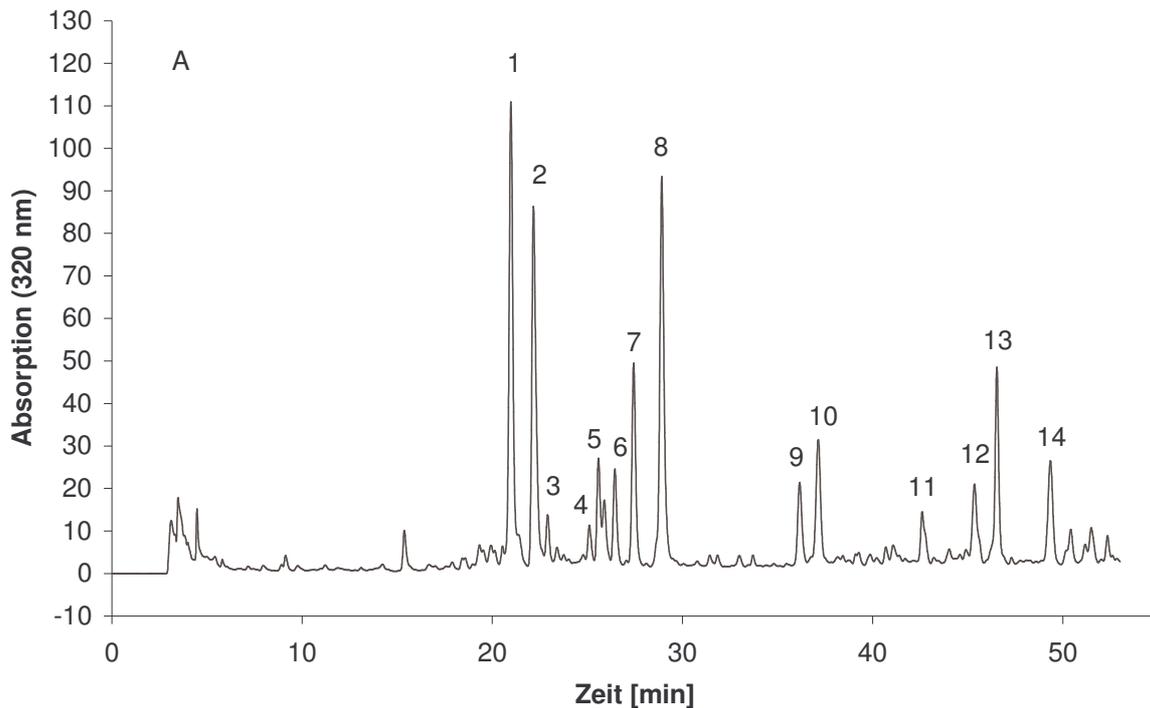


Abb. 4-4 A: HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extrakts der Sorte Roter Pfirsich bei 320 nm. 1 Cumarsäureglucosid, 2 Kaffeesäureglucosid, 3, 4, 5 Kaffeesäureglucoside oder -ester, 6 Cumaroylglucose, 7 Cryptochlorogensäure, 8 Chlorogensäure, 9 5-Cumaroylchinasäure, 10 Kaffeesäure, 11 Rutinpentosid, 12 Ferulasäure, 13 Rutin, 14 Cumarsäure.

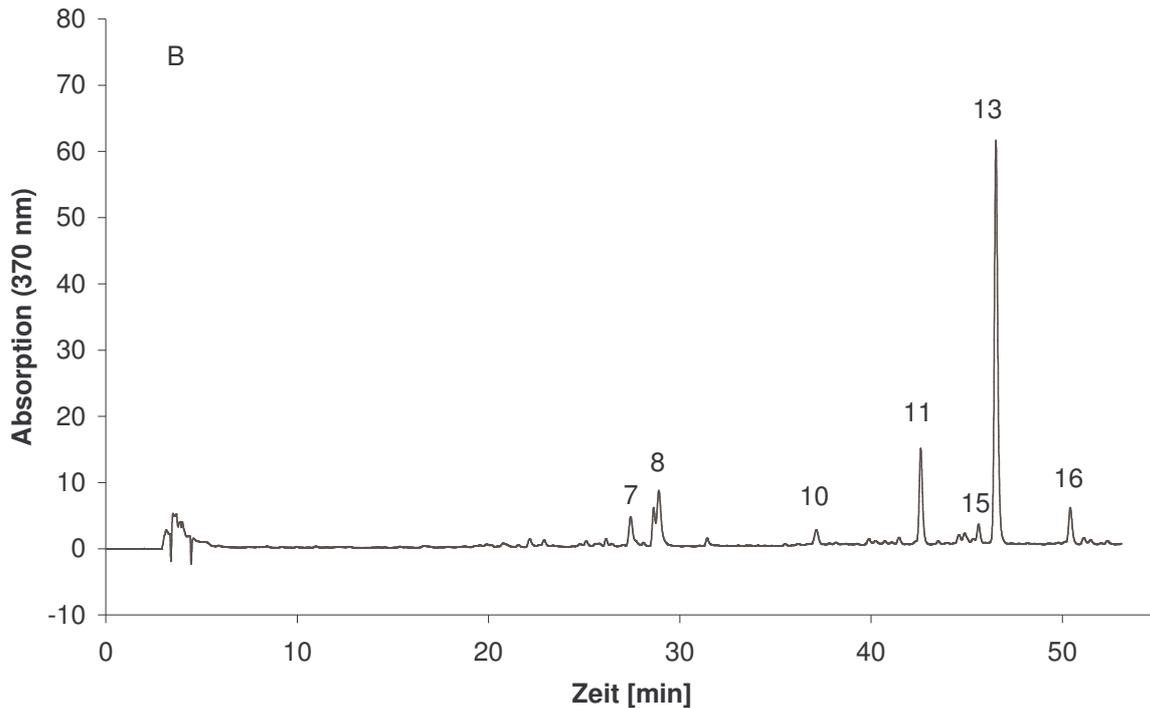


Abb. 4-4 B: HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extrakts der Sorte Roter Pfirsich bei 370 nm. 7 Cryptochlorogensäure, 8 Chlorogensäure, 10 Kaffeesäure, 11 Rutinpentosid, 13 Rutin, 15 Kämpferolrutinopentosid, 16 Kämpferolrutinosid.

Die Zuordnung der Peaks zu den entsprechenden Verbindungen erfolgte durch LC/ESI-MS-Messungen, Vergleich mit Literaturangaben und Vergleich der Tomatenextrakte mit Extrakten aus anderen Früchten (Herrmann, 1989). Dies ist im Folgenden genauer für die einzelnen Peaks beschrieben.

Durch Messung der Extrakte mit LC/ESI-MS konnte bestimmt werden, dass es sich bei den Peaks 1 bis 6 jeweils um Cumarsäure + Glucose bzw. Kaffeesäure + Glucose handelt. Es konnte jedoch hierbei nicht unterschieden werden, ob es sich um die jeweiligen Glucoside oder Glucoseester handelt. Die Zuordnung der Peaks 1 und 2 erfolgte daher zum einen aufgrund der Veröffentlichung von Herrmann 1989, in der beschrieben ist, dass das Kaffeesäure- und Cumarsäureglucosid zu etwa gleichen Mengen in Tomaten vorkommt und zum anderen durch Vergleich des Tomatenextraktes mit Extrakten aus der roten Johannisbeere und Heidelbeere, die beide das gleiche Cumarsäureglucosid enthalten. Für die Peaks 3 bis 5 konnten keine entsprechenden Verbindungen in anderen Fruchtexttrakten gefunden werden. Die Zuordnung des Peaks 6 erfolgte durch Vergleich mit einem Erdbeerextrakt, in dem hauptsächlich Cumaroylglucose vorkommt. Die Peaks 7 und 8 zeigten bei der LC/ESI-MS-Messung jeweils die gleichen Molekülmassen für Kaffeoylchinasäure jedoch etwas andere Fragmentierungen (s. Abb. 4-5 und Abb. 4-6). Es

handelte sich hierbei also um Isomere. Durch Vergleich mit Apfelextrakt, in dem hauptsächlich Chlorogensäure (5-Kaffeoylchinasäure) vorkommt, Anisextrakt, in dem hauptsächlich Chlorogensäure neben Cryptochlorogensäure (4-Kaffeoylchinasäure) und Neochlorogensäure (3-Kaffeoylchinasäure) vorkommt und Pflaumenextrakt, in dem hauptsächlich Neochlorogensäure vorkommt, konnte Peak 7 als Cryptochlorogensäure und Peak 8 als Chlorogensäure identifiziert werden.

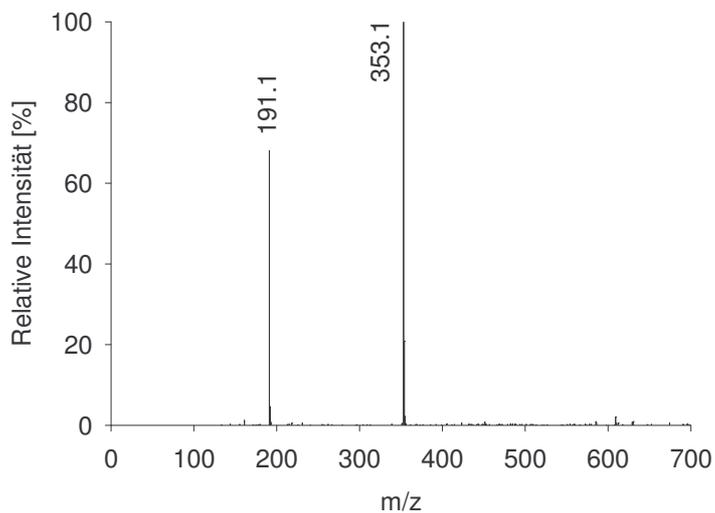


Abb. 4-5: Massenspektrum von Chlorogensäure. m/z 353,1 entspricht $[M-H]^-$, m/z 191,1 entspricht $[Chinasäure-H]^-$.

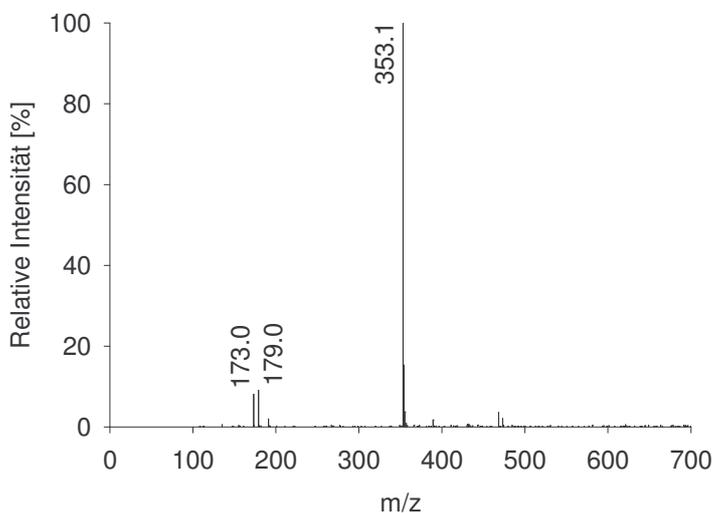


Abb. 4-6: Massenspektrum von Cryptochlorogensäure. m/z 353,1 entspricht $[M-H]^-$, m/z 179,0 entspricht $[Kaffeesäure-H]^-$, m/z 173,0 entspricht $[Chinasäure-H_2O-H]^-$ bzw. $[M-Kaffeesäure-H]^-$.

Abb. 4-7 zeigt ebenfalls eine HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extrakts der Sorte Roter Pfirsich. Die HPLC-Analyse erfolgte allerdings mit einem anderen Fließmittel-

gradienten (Programm 1) wie bei Abb. 4-4 (s. 3.2.7.5). Hier war nun auch Naringenin (Peak 11) zu detektieren, welches sehr spät von der Säule eluiert.

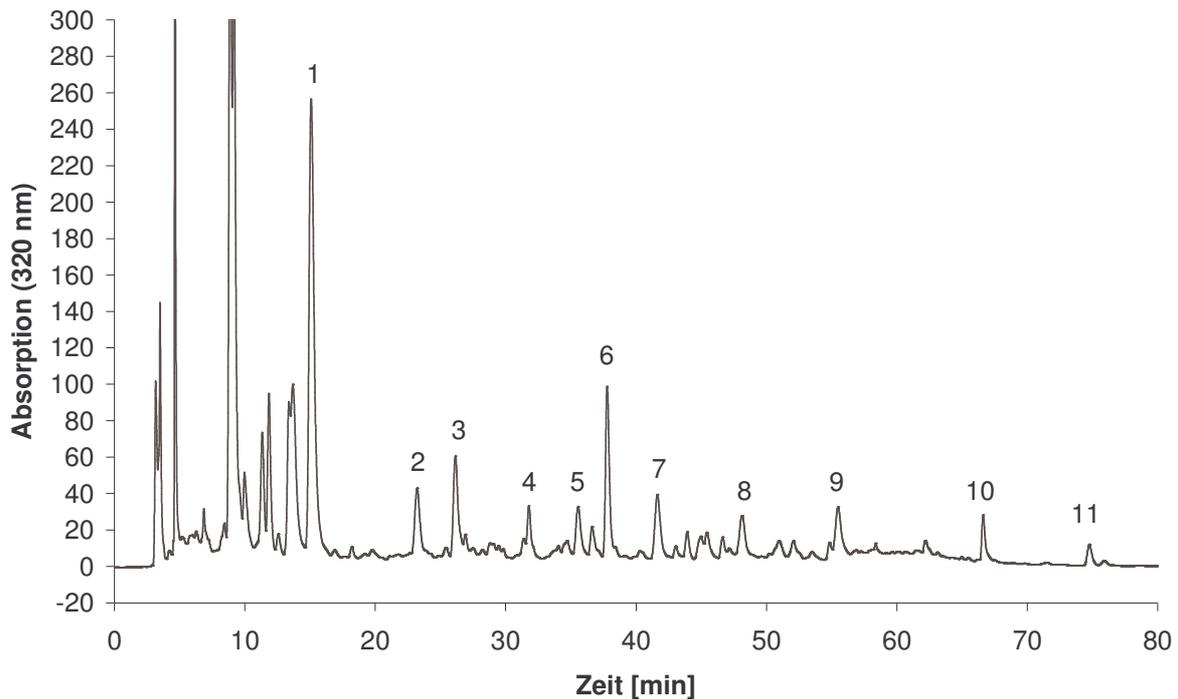


Abb. 4-7: HPLC-Chromatogramm eines methanolischen Extrakts der Sorte Roter Pfirsich. 1 Chlorogensäure, 2 5-Cumaroylchinasäure, 3 Kaffeesäure, 4 Rutinpentosid, 5 Ferulasäure, 6 Rutin, 7 Cumarsäure, 8 unbekannter Peak, 9 Chinasäure + 2 Kaffeesäuren, 10 Chinasäure + 3 Kaffeesäuren, 11 Naringenin.

Die Phenolsäureglucoside und -ester eluieren unter diesen Bedingungen sehr schnell nacheinander in den ersten 15 Minuten. Peak 8 war in etwa der Hälfte der Tomatensorten zu detektieren, vor allem aber in Tomatito und Fence Row Cherry. Die Verbindung besaß das gleiche UV/VIS-Spektrum und die gleiche Molekülmasse wie Ferulasäure jedoch ein anderes Fragmentierungsmuster. Es musste sich hierbei also um ein Konstitutionsisomer der Ferulasäure handeln. Die Peaks 9 und 10 konnten ebenfalls in etwa der Hälfte der Tomatensorten detektiert werden. Die Verbindungen zeigten beide ein der Chlorogensäure ähnliches UV/VIS-Spektrum. Die Verbindung von Peak 9 hatte die Molekülmasse 516. Ihr Massenspektrum zeigte mit Ausnahme des Molekülpeaks die Massenfragmente 353 und 179 analog zur Cryptochlorogensäure. Es könnte sich hierbei um eine Chinasäure handeln, die mit zwei Molekülen Kaffeesäure konjugiert ist. Die Verbindung von Peak 10 besaß die Molekülmasse 678, eine um 162 Masseneinheiten höhere Molekülmasse als Verbindung 9. Somit könnte es sich um eine Chinasäure mit drei konjugierten Kaffeesäure-Molekülen handeln. Die Verbindungen 9 und 10 waren hauptsächlich in Tomatito enthalten.

Die Chromatogramme der Tomatenextrakte der anderen 19 Tomatensorten unterschieden sich qualitativ kaum von den hier dargestellten. Es wurden hauptsächlich quantitative Unterschiede gefunden.

Quantifiziert wurden alle in Abb. 4-4 und Abb. 4-7 eindeutig identifizierten Phenolsäuren, Flavonoide und deren Konjugate. Von den Phenolsäureglucosiden bzw. -estern wurde allerdings nur das Cumarsäure- und Kaffeesäureglucosid (Abb. 4-4, Peak 1 und 2) quantifiziert, da diese mengenmäßig überwogen.

Tab. 4-6: Gehalte der Phenolsäuren, Flavonoide und deren Konjugate in den Extrakten in mg/100 g. Die niedrigsten und höchsten Gehalte sowie die Mittelwerte sind hervorgehoben. n.n. = nicht nachweisbar.

	Cumarsäure-Glucosid	Kaffeesäure-Glucosid	Kaffeesäure	Ferulasäure	Cumarsäure
Early Yellow Stripe	5,26	2,62	0,57	0,68	0,59
Fence Row Cherry	3,43	2,11	0,53	0,20	0,26
Gregoris Altai	1,01	0,33	0,24	0,23	0,23
Lithuanian Crested	0,96	0,36	0,20	0,14	0,11
Opalka	0,56	0,58	0,23	0,28	0,12
Roter Pfirsich	2,01	1,32	0,29	0,17	0,21
Santa Cruz C. G.	0,10	0,17	0,20	0,11	0,41
Tigerella	2,75	2,60	0,44	0,45	0,20
Tomatito de Jalapa	1,38	1,23	0,42	n.n.	0,31
Tres Cantos	1,32	0,52	0,23	0,19	0,17
Black Russian	0,81	0,44	0,13	0,18	0,23
Black Zebra	1,45	0,52	0,16	0,31	0,14
Cherokee Purple	1,97	1,06	0,21	0,24	0,14
Miss Kennedy	1,59	0,62	0,19	0,18	0,27
Purple Russian	2,69	1,18	0,32	0,20	0,67
Schwarze Sarah	1,40	0,70	0,13	0,07	0,07
Goldene Königin	3,71	2,15	0,40	0,41	0,30
Mirabell	2,25	4,58	0,38	0,07	0,06
Weißer Pfirsich	1,81	1,95	0,24	0,31	0,17
Green Zebra	3,08	2,45	0,22	0,46	0,19
Mittelwert	1,98	1,38	0,29	0,26	0,24
Standardabw.	1,23	1,12	0,13	0,15	0,16

	Cryptochlorogensäure	Chlorogensäure	5-Cumaroyl-chinasäure	Rutin-pentosid	Rutin	Naringenin
Early Yellow Stripe	0,70	0,41	0,09	0,49	0,51	0,02
Fence Row Cherry	1,29	0,66	0,11	1,19	1,27	0,43
Gregoris Altai	0,29	0,05	0,03	0,25	0,20	0,003
Lithuanian Crested	0,76	1,34	0,12	0,26	0,26	0,01
Opalka	0,45	0,11	n.n.	0,31	0,91	0,15
Roter Pfirsich	0,89	1,65	0,37	0,53	1,78	0,20
Santa Cruz C. G.	0,37	0,07	n.n.	0,92	1,10	0,27
Tigerella	1,01	0,51	n.n.	0,34	0,61	0,08
Tomatito de Jalapa	1,62	8,09	1,06	0,33	1,93	0,82
Tres Cantos	0,37	0,29	0,04	0,28	0,51	0,59
Black Russian	0,39	0,09	n.n.	1,20	1,31	0,08
Black Zebra	0,35	0,07	n.n.	0,06	0,10	0,05
Cherokee Purple	0,60	0,74	n.n.	0,38	0,40	0,02
Miss Kennedy	0,49	0,17	n.n.	0,79	0,91	0,06
Purple Russian	0,36	0,05	0,12	0,57	0,43	0,02
Schwarze Sarah	0,47	0,18	0,04	0,38	0,42	n.n.
Goldene Königin	0,73	0,12	0,28	0,51	1,24	0,15
Mirabell	1,39	2,00	0,37	0,43	1,03	0,27
Weißer Pfirsich	0,41	0,04	n.n.	n.n.	n.n.	0,02
Green Zebra	0,28	0,06	0,07	0,17	0,16	0,09
Mittelwert	0,66	0,84	0,22	0,49	0,79	0,17
Standardabw.	0,39	1,80	0,29	0,32	0,54	0,22

Beim Großteil der Tomaten überwogen das Cumarsäure- und Kaffeesäure-Glucosid mit durchschnittlich 1,98 bzw. 1,38 mg/100 g Nassgewicht (s. Tab. 4-6). Cryptochlorogensäure, Chlorogensäure, Rutin und das Rutinpentosid kamen in etwas geringeren Mengen mit durchschnittlich 0,5-0,8 mg/100 g vor. Am wenigsten waren die freien Phenolsäuren mit Gehalten um die 0,25 mg/100 g enthalten. Bei den Sorten Tomatito de Jalapa, Santa Cruz Cado Gigante, Black Russian und Tres Cantos traf diese Verteilungsmuster nicht ganz zu. Bei Tomatito waren die Gehalte von Cryptochlorogensäure aber vor allem von Chlorogensäure (8,1 mg/100 g) um das etwa Sechsfache höher als die der Phenolsäure-Glucoside. Bei Santa Cruz Cado Gigante und Black Russian überwogen Rutin und Rutinpentosid, und Tres Cantos enthielt sowohl im Vergleich unter den Tomaten als auch im Vergleich mit den anderen Verbindungen viel Naringenin.

Ansonsten unterschieden sich die Tomaten recht stark in den einzelnen Gehalten der verschiedenen Phenolsäuren und Flavonoide. Die Farbe der Tomate hatte keinen Einfluss.

4.2.3.2 Etablierung einer geeigneten Hydrolysemethode zur Spaltung der Phenolsäure- und Flavonoidkonjugate

Zur Bestimmung der gebundene Phenolsäuren und Flavonoide musste zunächst eine geeignete Hydrolysemethode gefunden werden, um die Konjugate ohne Verluste oder Artefaktbildung in die freien Verbindungen zu spalten. In der Literatur sind verschiedene Methoden für die Hydrolyse mit Säure, Base oder Enzymen beschrieben.

Die Säurehydrolyse

Bevor die Hydrolyse mit dem Tomatenextrakt durchgeführt wurde, wurden zunächst einige Versuche mit Standardsubstanzen durchgeführt. Diese Versuche wurden bei einer Endkonzentration von 1,2 M HCl durchgeführt.

1. Eine 200 µM Chlorogensäure-Lösung wurde hydrolysiert
 - a) bei 37 °C, 1,5 Stunden.
 - b) bei 37 °C, 3 Stunden.
 - c) bei 100 °C, 15 Minuten.

Bei allen drei Umsetzungen waren im HPLC-Chromatogramm mehrere Chlorogensäure-ähnliche Peaks zu detektieren. Es fand jedoch keine Spaltung zu Kaffeesäure statt.

2. Wurde eine Mischung aus Kämpferol-3-glucosid und Rutin 1 Stunde bei 100 °C hydrolysiert, so entstand zwar Kämpferol aber kein Quercetin.
3. Eine Mischung aus Kaffeesäure, Ferulasäure, Cumarsäure und den Flavonoiden Quercetin und Naringenin wurde 1 Stunde bei 100 °C hydrolysiert. Danach waren nur noch geringe Mengen Ferulasäure und Cumarsäure zu detektieren, die anderen Verbindungen waren zerstört.

Diese Vorversuche mit den Standards zeigten bereits, dass die verschiedenen Phenolsäuren und Flavonoide zum einen unterschiedlich empfindlich gegenüber Säure sind und zum anderen, dass nicht alle Glycoside und Ester zu den entsprechenden freien Verbindungen umgesetzt werden. Die Ergebnisse dieser Versuche konnten jedoch nur bedingt auf den Tomatenextrakt übertragen werden, da im Extrakt noch andere Verbindungen enthalten sind, die eventuell als Schutzstoffe wirksam sein können. Es wurden daher verschiedene Hydrolysebedingungen mit dem Tomatenextrakt getestet (s. Tab. 4-7).

Tab. 4-7: Ergebnisse der Säurehydrolysen bei unterschiedlichen Bedingungen.

Endkonzentration HCl [mol/l]	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Ergebnis
1,2	37	60	keine Hydrolyse
1,2	100	210	alle Phenolsäuren und Flavonoide zerstört
1,2	100	90	nur Kaffee- und Cumarsäure
1,2	100	60	mehr Kaffee- und Cumarsäure; Ferulasäure
1,2	100	30	etwa gleich viel Kaffee- und Cumarsäure wie zuvor; Quercetin
1,2	100	15	mehr Kaffee-, Cumar- und Ferulasre wie zuvor; mehr Quercetin wie zuvor; Naringenin
0,6	100	30	gleich viel Kaffee-, Cumar- und Ferulasre wie zuvor; gleich viel Quercetin und Naringenin wie zuvor

Die Verseifung

In Vorversuchen wurde bestätigt, dass Chlorogensäure oder Kaffeesäure sofort zerstört werden, wenn diese mit Lauge versetzt werden. Wurde jedoch ein Tomatenextrakt 2 Stunden bei 37 °C mit 1 M Kalilauge inkubiert, so konnte anschließend Kaffeesäure in vergleichbaren Mengen wie nach der Säurehydrolyse detektiert werden. Neben Kaffeesäure konnte Ferulasäure und Cumarsäure, sowie Rutin und Rutinpentosid detektiert werden. Es sind jedoch zwei neue Peaks entstanden, von denen der eine ein Kaffeesäure-ähnliches UV/VIS-Spektrum besaß und der andere ein Cumarsäure-ähnliches UV/VIS-Spektrum. Diese beiden Peaks konnten jedoch nicht identifiziert werden.

Die enzymatische Hydrolyse

Für die enzymatische Hydrolyse wurde aufgrund von Erfahrungen mit Isoflavon- und Lignanglycosiden ein Gemisch aus β -Glucosidase und β -Glucuronidase verwendet. Es musste zunächst überprüft werden, wie spezifisch diese Enzyme spalten bzw. welche der im Tomatenextrakt vorhandenen Verbindungen gespalten werden. Außerdem musste sichergestellt werden, dass die schon vorhandenen und neu gebildeten freien Verbindungen über die Inkubationszeit hinweg stabil sind. Um die Stabilität der Verbindungen zu testen, wurden verschiedene Standardlösungen mit den Enzymen über verschiedene Zeiträume inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit dem Enzym-Mix (β -Glucosidase + β -Glucuronidase) Cumarsäure und Ferulasäure stabil sind, Kaffeesäure jedoch um 50% abgebaut wird. Schon nach nur 6 Stunden war ein geringer Abbau von Kaffeesäure zu erkennen. Bei der Inkubation von Kaffeesäure mit β -Glucosidase allein fand über 3 Stunden kein Abbau von Kaffeesäure statt. Für Rutin zeigte sich, dass es nur mit dem Enzym-Mix nicht aber mit β -Glucosidase allein zu Quercetin gespalten werden kann. Nach 2 Stunden war die Umsetzung abgeschlossen und kein Rutin mehr vorhanden

aber auch nur etwa 50% des zu erwartenden Quercetins. Während Rutin noch zu Quercetin umgesetzt wurde, muss das entstandene Quercetin schon wieder abgebaut worden sein. Dass Quercetin instabil ist, bestätigte sich bei der Inkubation von Quercetin in Enzym-Mix über 24 Stunden, denn nach der Inkubationszeit konnte kein Quercetin mehr detektiert werden. Wie für Rutin gezeigt verhielt es sich gleichermaßen bei der Inkubation von Chlorogensäure. Mit β -Glucosidase allein fand keine Spaltung statt. Bei der Inkubation mit Enzym-Mix war nach 21 Stunden die Chlorogensäure vollständig hydrolysiert, allerdings auch nur 50% der zu erwartenden Kaffeesäure vorhanden. Dieses Ergebnis war jedoch nicht verwunderlich, Kaffeesäure hatte sich bereits in Enzym-Lösung als nicht stabil erwiesen. Für die enzymatische Umsetzung mit Tomatenextrakt zeigten sich für die Spezifität der Enzyme zunächst die in der Tabelle dargestellten Ergebnisse.

Tab. 4-8: Qualitative Ergebnisse für die im Tomatenextrakt enthaltenen Substanzen nach enzymatischer Umsetzung. - bedeutet, dass keine Umsetzung statt fand.

Substanz im Extrakt	nach Umsetzung mit β -Glucosidase	nach Umsetzung mit Enzym-Mix
Glucosid	Phenolsäure	Phenolsäure
Glucoseester	Phenolsäure	Phenolsäure
Cryptochlorogensäure	-	-
Chlorogensäure	-	Kaffeesäure
5-Cumaroylchinasäure	-	Cumarsäure
Rutin	-	Quercetin
Rutinpentosid	-	-

Die Spaltung der Konjugate zu den freien Phenolsäuren und Flavonoiden verliefen unterschiedlich schnell. So wurden die Kaffeesäureglucoside mit β -Glucosidase schon innerhalb einer Stunde vollständig zu Kaffeesäure umgesetzt. Die Umsetzung des Tomatenextraktes mit Enzym-Mix dagegen war für die meisten Verbindungen nach vier Stunden noch nicht abgeschlossen. Die Umsetzung von Rutin zu Quercetin schien jedoch schon beendet zu sein, denn bei längerer Inkubationszeit sank die Quercetinkonzentration im Extrakt anstatt weiter anzusteigen. Die maximal gebildete Menge Quercetin entsprach aber keineswegs der zu erwartenden Menge. Hiermit bestätigte sich im Tomatenextrakt was für einen Rutin-Standard bereits gezeigt wurde.

Wie bei der Verseifung beschrieben entstanden auch hier jedoch nur bei der Umsetzung mit Enzym-Mix mit steigender Inkubationszeit die beiden Kaffeesäure- bzw. Cumarsäure-ähnlichen Verbindungen.

Vergleich der verschiedenen Hydrolysemethoden

Von den drei beschriebenen Hydrolysemethoden ist die enzymatische Hydrolyse die schonendste, da sie bei 37 °C und pH 5 durchgeführt wird. Bei der Säurehydrolyse spielen

die Säurekonzentration, die Temperatur und die Hydrolysezeit eine wichtige Rolle. Im Prinzip müssten die Hydrolysebedingungen für die verschiedenen Phenolsäuren und Flavonoide einzeln optimiert werden. Die Verseifung ist insofern problematisch da einerseits Chlorogensäure und Kaffeesäure im basischen instabil sind und andererseits im hohen Ausmaß zwei nicht identifizierte neue Verbindungen entstanden.

Beim Vergleich der enzymatischen Umsetzung des Tomatenextraktes (Inkubation über Nacht, 37 °C, pH 5) mit der Verseifung (2 Stunden, 37 °C, KOH) und der Säurehydrolyse (15 Minuten, 100 °C, 1,2 M HCl) auf die entstehenden freien Verbindungen hin zeigte sich, dass die Konzentrationen für die phenolischen Säuren und Naringenin nach der enzymatischen Umsetzung am höchsten waren. Zwar entstanden auch hier die beiden nicht identifizierten Verbindungen, jedoch in wesentlich geringerer Menge als bei der Verseifung.

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse aus den Versuchen mit Standardlösungen und Tomatenextrakten wurde für die Hydrolyse die enzymatische Umsetzung gewählt. Unter Berücksichtigung der Spezifität der einzelnen Enzyme und Stabilität der phenolischen Säuren und Flavonoiden, wurde beschlossen, dass Rutin und Rutinpentosid im Extrakt quantifiziert werden sollte und nicht nach Spaltung als Quercetin. Alle anderen phenolischen Säuren und Flavonoide mit Ausnahme von Kaffeesäure sollten sowohl im Extrakt als auch nach Umsetzung mit dem Enzym-Mix quantifiziert werden. Kaffeesäure sollte im Extrakt als auch nach Umsetzung mit β -Glucosidase ausgewertet werden, da hierbei die Chinasäureester wie Chlorogensäure nicht gespalten werden.

4.2.3.3 Quantifizierung der gebundenen Phenolsäuren und Flavonoide nach enzymatischer Hydrolyse

Nach enzymatischer Hydrolyse mit β -Glucosidase wurde die Kaffeesäure quantifiziert und als Kaffeesäure gesamt bezeichnet. Es muss berücksichtigt werden, dass hierbei nur die glucosidisch gebundene Kaffeesäure erfasst wurde, da z. B. die Chinasäureester nicht gespalten wurden. Alle anderen Phenolsäuren und Flavonoide wurden nach enzymatischer Hydrolyse mit dem Enzym-Mix quantifiziert.

In allen Tomatensorten waren die Gehalte der Phenolsäuren und Flavonoide gesamt, wenn auch bei einigen Sorten nur geringfügig, höher als die der freien Verbindungen (s. Tab. 4-9). Das bedeutete, dass in den Extrakten auch Konjugate von Ferulasäure und Naringenin enthalten sein mussten, die nicht identifiziert werden konnten.

Tab. 4-9: Gehalte der Phenolsäuren und Flavonoide gesamt und gebunden nach enzymatischer Spaltung in mg/100 g. Die kleinsten, größten und Mittelwerte sind hervorgehoben. n.n. = nicht nachweisbar.

	Kaffeensäure gesamt	Kaffeensäure gebunden	Ferulasäure gesamt	Ferulasäure gebunden
Early Yellow Stripe	2,59	2,03	0,82	0,13
Fence Row Cherry	2,09	1,56	0,40	0,20
Gregoris Altai	0,53	0,29	0,27	0,04
Lithuanian Crested	0,50	0,30	1,13	0,99
Opalka	0,69	0,46	0,52	0,23
Roter Pfirsich	1,48	1,19	0,35	0,18
Santa Cruz Cado G.	0,30	0,10	0,17	0,05
Tigerella	2,46	2,02	0,71	0,26
Tomatito de Jalapa	1,45	1,02	n.n.	n.n.
Tres Cantos	0,62	0,40	0,34	0,14
Black Russian	0,66	0,53	0,42	0,25
Black Zebra	0,96	0,79	0,53	0,22
Cherokee Purple	1,64	1,43	0,52	0,28
Miss Kennedy	0,77	0,58	0,50	0,32
Purple Russian	1,23	0,91	0,30	0,11
Schwarze Sarah	0,76	0,64	0,33	0,26
Goldene Königin	1,97	1,57	0,46	0,05
Mirabell	3,46	3,08	0,46	0,39
Weißer Pfirsich	1,85	1,61	0,39	0,09
Green Zebra	1,96	1,74	0,82	0,36
Mittelwert	1,40	1,11	0,50	0,24
Standardabw.	0,85	0,72	0,23	0,08

	Cumarsäure gesamt	Cumarsäure gebunden	Naringenin gesamt	Naringenin gebunden
Early Yellow Stripe	4,25	3,66	0,03	0,004
Fence Row Cherry	2,78	2,52	0,68	0,24
Gregoris Altai	0,95	0,72	0,02	0,01
Lithuanian Crested	0,19	0,07	0,02	0,005
Opalka	1,00	0,87	0,56	0,41
Roter Pfirsich	1,96	1,74	0,54	0,35
Santa Cruz Cado G.	0,56	0,15	0,55	0,28
Tigerella	2,29	2,09	0,29	0,21
Tomatito de Jalapa	2,11	1,80	2,75	1,93
Tres Cantos	1,25	1,07	1,32	0,73
Black Russian	1,41	1,18	0,19	0,11
Black Zebra	1,15	1,01	0,16	0,12
Cherokee Purple	1,59	1,45	0,03	0,01
Miss Kennedy	2,01	1,74	0,15	0,09
Purple Russian	2,84	2,17	0,03	0,01
Schwarze Sarah	1,18	1,11	0,01	0,01
Goldene Königin	2,95	2,64	0,47	0,31
Mirabell	2,09	2,03	1,99	1,72
Weißer Pfirsich	1,86	1,69	0,02	0,003
Green Zebra	4,00	3,81	0,30	0,22
Mittelwert	1,92	1,68	0,51	0,33
Standardabw.	1,06	0,90	0,73	0,50

Der Anteil der gebundenen Verbindungen bewegte sich im Bereich von 10 bis knapp 100 %. Im Durchschnitt nahm der Anteil der gebundenen Verbindungen von Ferulasäure über Naringenin, Kaffeesäure bis zur Cumarsäure hin von 48% bis 87% zu. Auffällig waren die Sorten Mirabell und Schwarze Sarah, bei denen der Anteil der gebundenen Verbindungen aller Phenolsäuren und Flavonoide immer über 85 bzw. 78% lag.

4.3 Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Lycopin: Untersuchungen an drei Tiermodellen

4.3.1 Studie mit präruminanten Kälbern

4.3.1.1 Carotinoidanalyse im Plasma

An Tag 0 vor der Intervention konnte in beiden Versuchsgruppen nur β -Carotin detektiert werden. Nach der Intervention wurden in beiden Versuchsgruppen zusätzlich zu β -Carotin all-*trans* Lycopin, das Lycopinisomere 5-*cis* sowie drei weitere Metabolite detektiert (s. Abb. 4-8).

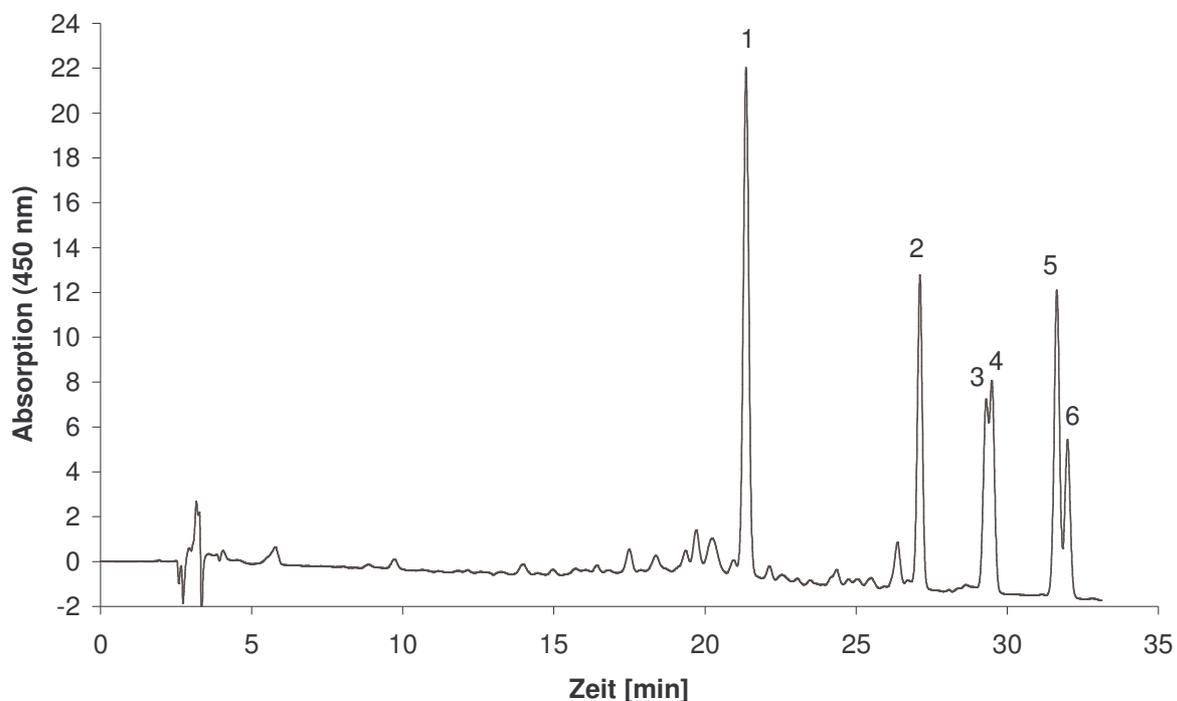


Abb. 4-8: HPLC-Chromatogramm eines Kälberplasmaextrakts nach Intervention. 1 all-*trans* β -Carotin, 2 Lycopinmetabolit a, 3 Lycopinmetabolit b, 4 Lycopinmetabolit c, 5 all-*trans* Lycopin, 6 5-*cis* Lycopin.

Die Konzentrationen von all-*trans*, 5-*cis* Lycopin und der Metabolite erreichten in der LycoVit-Gruppe am Tag 15 (ein Tag nach der letzten Lycopingabe) ihr Maximum und fielen dann stetig bis zum Tag 21 unter die Nachweisgrenze ab. In der Lyc-O-Mato-Gruppe waren die Konzentrationen am Tag 14 und 15 fast gleich. In beiden Gruppen waren die Gehalte von all-*trans* Lycopin doppelt so hoch wie von 5-*cis* Lycopin, aber nur minimal höher als die der Metabolite. Die Metabolite a und b+c kamen in etwa gleichen Konzentration vor (s. Tab. 4-10).

Tab. 4-10: Plasmakonzentrationen in nmol/l vor und nach Intervention von Lyc-O-Mato bzw. LycoVit. Gesamtlycopin ist die Summe aus *all-trans*, *5-cis*, *9-cis*, und *13-cis* Lycopin. n.n. = nicht nachweisbar

Lyc-O-Mato-Gruppe:

Tag	<i>all-trans</i> Lycopin	<i>5-cis</i> Lycopin	Σ <i>all-trans</i> + <i>5-cis</i> Lycopin
0	n.n.	n.n.	n.n.
14	22 ± 10	12 ± 6	33 ± 16
15	23 ± 10	11 ± 5	34 ± 14
16	16 ± 9	9 ± 4	25 ± 13
18	10 ± 6	6 ± 3	16 ± 9
21	n.n.	n.n.	n.n.
24	n.n.	n.n.	n.n.

Tag	Metabolit a	Metabolit b+c	Σ Metabolite	Gesamtlycopin
0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
14	19 ± 9	19 ± 9	38 ± 18	72 ± 32
15	19 ± 10	19 ± 9	38 ± 19	72 ± 33
16	19 ± 9	18 ± 8	37 ± 17	61 ± 29
18	17 ± 9	13 ± 7	30 ± 16	46 ± 25
21	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
24	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

LycoVit-Gruppe:

Tag	<i>all-trans</i> Lycopin	<i>5-cis</i> Lycopin	Σ <i>all-trans</i> + <i>5-cis</i> Lycopin
0	n.n.	n.n.	n.n.
14	76 ± 27	42 ± 15	117 ± 42
15	90 ± 31	50 ± 17	140 ± 48
16	64 ± 24	35 ± 13	98 ± 37
18	50 ± 21	27 ± 12	77 ± 33
21	n.n.	n.n.	n.n.
24	n.n.	n.n.	n.n.

Tag	Metabolit a	Metabolit b+c	Σ Metabolite	Gesamtlycopin
0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
14	64 ± 19	65 ± 18	129 ± 37	247 ± 77
15	72 ± 22	74 ± 21	146 ± 43	286 ± 89
16	68 ± 20	64 ± 19	132 ± 39	230 ± 75
18	75 ± 25	64 ± 22	139 ± 47	216 ± 76
21	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
24	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Bei den angegebenen Gehalten von *all-trans* Lycopin und *5-cis* Lycopin muss berücksichtigt werden, dass diese beiden Verbindungen chromatographisch nicht getrennt werden konnten. Es ist daher sinnvoller die Summe beider Substanzen zu bewerten. *5-cis* Lycopin und die drei Metabolite wurden in ihrem jeweiligen UV-Maximum ausgewertet und über die *all-trans*

Lycopin-Kalibrierung quantifiziert. Zur Veranschaulichung wurden die Werte in Abb. 4-9 dargestellt.

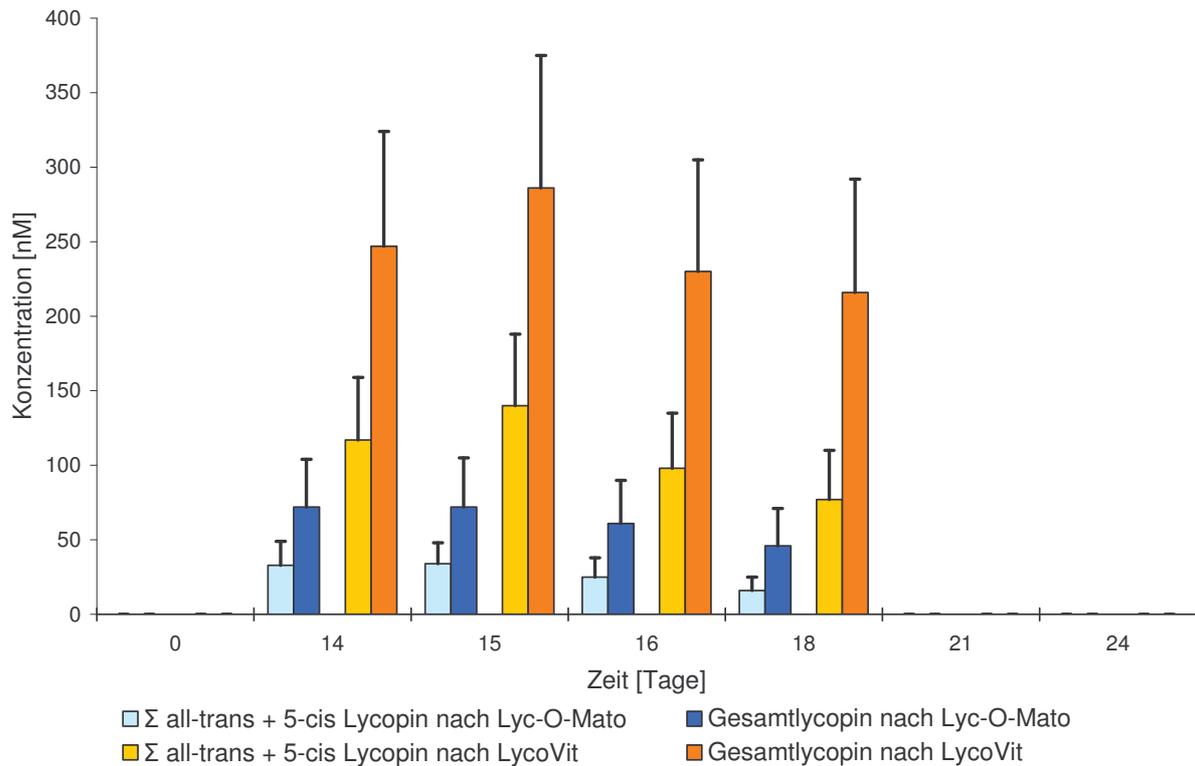


Abb. 4-9: Lycopinplasmakonzentrationen vor und nach Intervention.

Aus Abb. 4-9 wird deutlich, dass die drei Lycopinmetabolite etwa 50% des Gesamtlycopins in beiden Versuchsgruppen ausmachten und sie demnach nicht zu vernachlässigen sind. Die Plasmakonzentrationen in der LycoVit-Gruppe waren etwa um den Faktor vier signifikant (P-Wert <0,001) höher als in der Lyc-O-Mato-Gruppe, was somit auf eine vierfach höhere Aufnahme des LycoVits im Vergleich zu Lyc-O-Mato hindeutete.

4.3.1.2 Struktur der Lycopinmetabolite

Die Metabolite b+c zeigen ein um 17 nm hypsochrom verschobenes UV/VIS-Spektrum im Vergleich zu *all-trans* Lycopin, was bedeutet, dass das konjugierte System eine Doppelbindung weniger enthalten muss. Der Metabolit a zeigt ein um 34 nm hypsochrom verschobenes UV/VIS-Spektrum, was auf das Fehlen zweier konjugierter Doppelbindungen schließen lässt (s. Abb. 4-10).

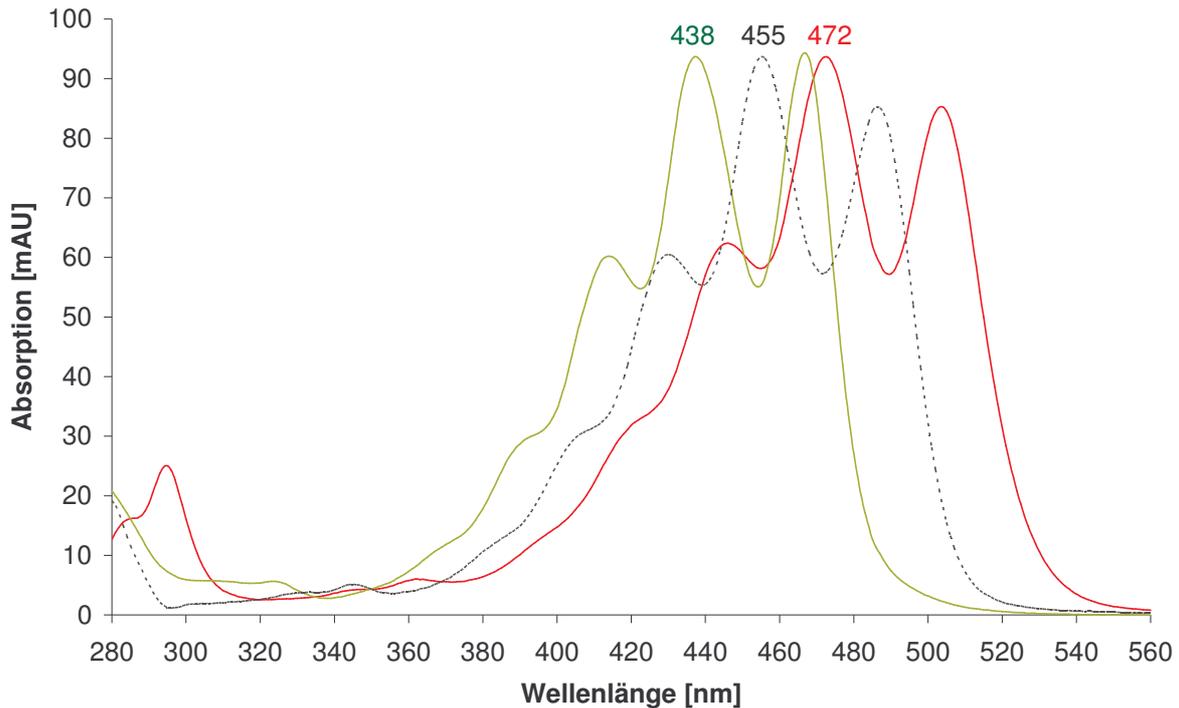


Abb. 4-10: UV/VIS-Spektren von — Metabolit a, ---- Metabolit b+c und — all-*trans* Lycopin.

Die LC/APCI-MS-Messungen ergaben für die Metabolite b+c eine Molekülmasse von 538 und für den Metabolit a von 540. Das sind 2 bzw. 4 Masseneinheiten mehr als all-*trans* Lycopin.

Die hypsochrom verschobenen UV/VIS-Spektren und die um 2 bzw. 4 Masseneinheiten höhere Molekülmassen lassen vermuten, dass es sich bei den Metaboliten um Lycopinreduktionsprodukte handelt, die anstatt 11 wie das all-*trans* Lycopin nur 10 bzw. 9 konjugierte Doppelbindungen enthalten. Als Vergleichssubstanz stand das Carotinoid Neurosporin (s. Abb. 1-2) zur Verfügung, welches 9 konjugierte Doppelbindungen besitzt. Das UV/VIS-Spektrum von Neurosporin zeigt die gleiche Feinstruktur wie das des Metaboliten a, es ist allerdings um 2 nm bathochrom verschoben.

Bei einem Cochromatogramm des extrahierten Kälberplasmas mit Neurosporin eluierte das Neurosporin nur 0,2 Minuten vor dem Metaboliten a. Der Metabolit a muss demnach eine dem Neurosporin sehr ähnliche Struktur haben.

Eine Strukturaufklärung mittels LC/NMR-Messung im Arbeitskreis von Prof. Albert in Tübingen ist leider nicht gelungen. Dies war zum einen schwierig aufgrund der geringen Konzentrationen der Metabolite, die im Plasma enthalten waren und zum anderen aufgrund der im Vergleich großen Mengen an Lipiden, die bei der Extraktion mit den Carotinoiden mitextrahiert wurden und die NMR-Messung störten.

4.3.1.3 *In vitro*-Metabolismusstudien zur Bildung der Lycopinmetabolite

Die *in vitro*-Versuche mit Mikrosomen, Cytosol oder Pansensaft sollten dazu dienen, die im Plasma detektierten Lycopinmetabolite aus Lycopin zu bilden, um Aufschluss über deren Bildung *in vivo* zu bekommen.

In keinem der verwendeten Testsysteme konnte jedoch ein Umsatz des Lycopins, das in verschiedenen Formulierungen eingesetzt wurde, zu Metaboliten beobachtet werden. Bei den für die jeweilige Positivkontrolle verwendeten Verbindungen hingegen zeigte sich in allen Testsystemen der erwartete Umsatz zu verschiedenen Metaboliten. Es musste also davon ausgegangen werden, dass die im Plasma detektierten Metabolite weder oxidativ noch reduktiv in der Leber gebildet wurden und auch eine Reduktion durch eine eventuell doch schon ausgebildete Pansenflora der Kälber auszuschließen war.

4.3.2 Studie mit Ratten

4.3.2.1 Analyse der Supplemente und deren Stabilität im Tierfutter

Eine Analyse des Tierfutters zur Gewährleistung der gleichmäßigen Verteilung der Lycopin-formulierungen im Futter und zur Überprüfung ihrer Stabilität über den Versuchszeitraum, zeigte, dass die beiden Formulierungen LycoVit und Lyc-O-Mato unterschiedliche Anteile von all-*trans* Lycopin und *cis*-Isomeren enthielten (s. Abb. 4-11 und Abb. 4-12).

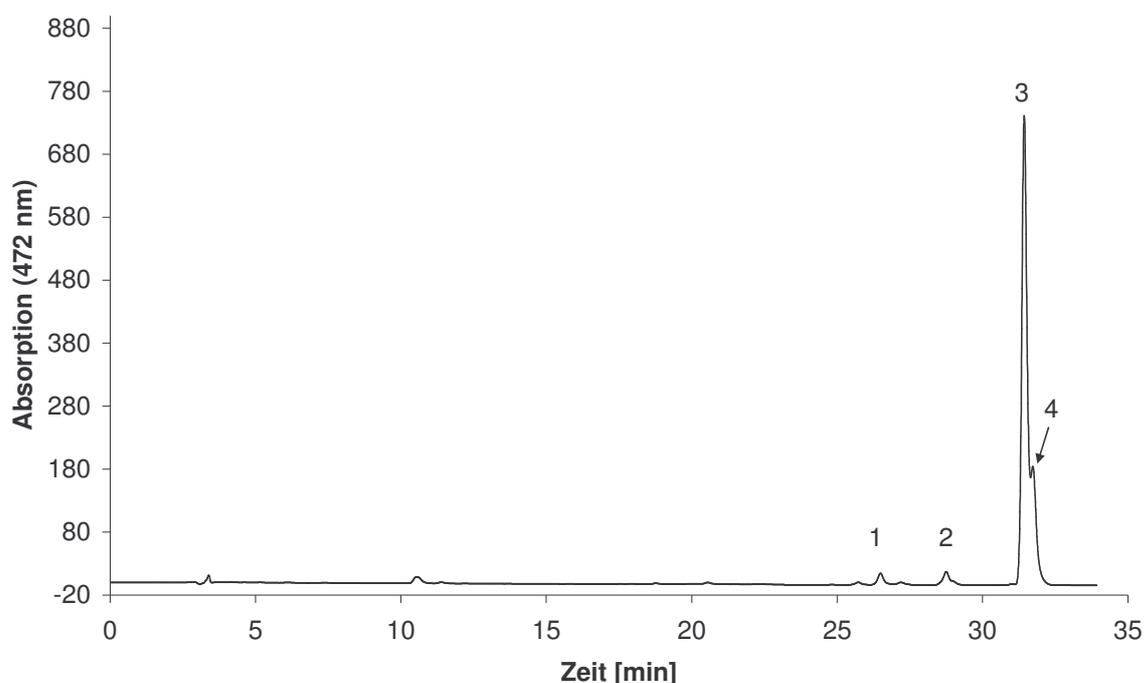


Abb. 4-11: Futter mit LycoVit: 1 13-*cis* Lycopin, 2 9-*cis* Lycopin, 3 all-*trans* Lycopin, 4 5-*cis* Lycopin.

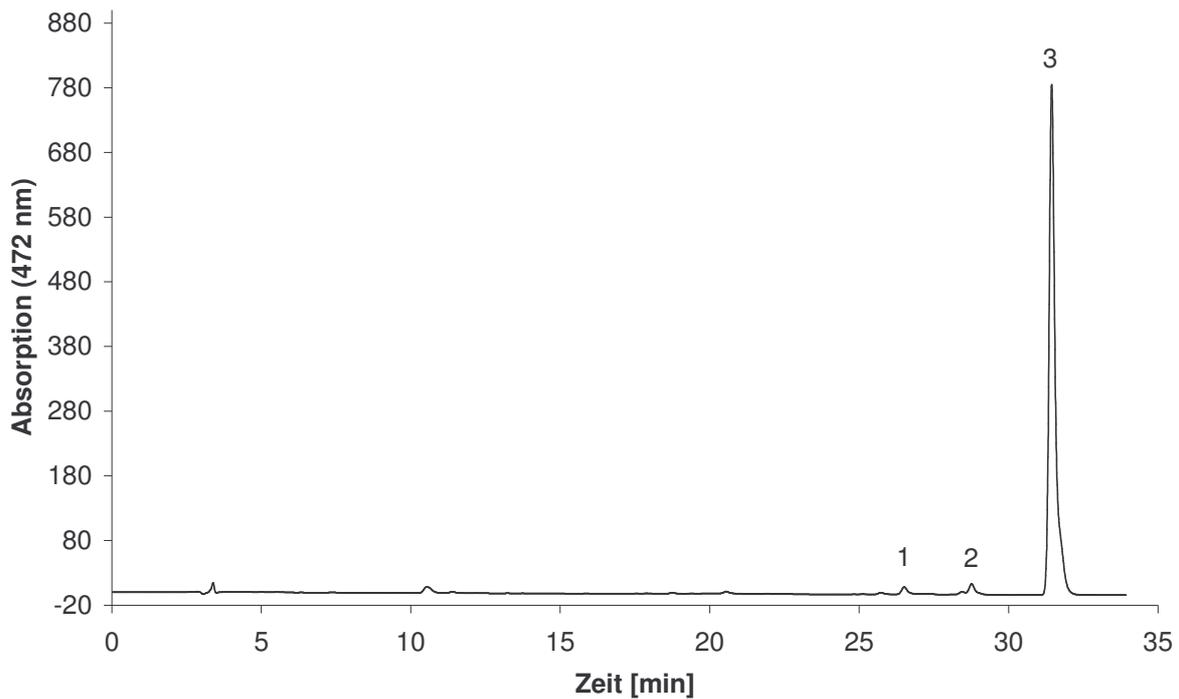


Abb. 4-12: Futter mit Lyc-O-Mato: 1 13-*cis* Lycopin, 2 9-*cis* Lycopin, 3 all-*trans* Lycopin.

Lycovit enthielt zu 73% all-*trans* Lycopin, zu 19% 5-*cis* Lycopin und zu 8% andere *cis*-Isomere. Lyc-O-Mato enthielt zu 95% all-*trans* Lycopin und zu 5% andere *cis*-Isomere, aber kein 5-*cis* Lycopin.

Beide Lycopinformulierungen erwiesen sich über den Versuchszeitraum bei Aufbewahrung des Futters im Kühlschrank als stabil.

4.3.2.2 Die Ergebnisse des Vorversuchs

Zur Ermittlung einer geeigneten Lycopindosis für den Hauptversuch, wurden zunächst drei verschiedene Dosen in einem Vorversuch getestet. Um die Anzahl der Versuchstiere klein zu halten, wurde nur die synthetische Lycopinformulierung Lycovit eingesetzt. Die Lycopinkonzentrationen im Plasma und in der Leber sind in Tab. 4-11 dargestellt.

Tab. 4-11: Lycopinkonzentrationen im Plasma und Leber nach 14-tägiger Intervention in nmol/l bzw. ng/g. Gesamtlycopin ist die Summe aus *all-trans*, *5-cis*, *9-cis*, und *13-cis* Lycopin. n.n. = nicht nachweisbar.

Ratte	Dosis [mg/kg Körpergewicht]	Plasma [nmol/l]	Leber [ng/g]
		Σ <i>all-trans</i> + <i>5-cis</i> Lycopin	Gesamtlycopin
1	0,2	n.n.	96
2	0,2	n.n.	56
3	0,2	n.n.	188
4	2	0,5	1170
5	2	1,8	351
6	2	10,1	983
7	5	2,6	2924
8	5	34,3	1804
9	5	30,4	1975

Im Plasma wurden nur *all-trans* und *5-cis* Lycopin detektiert (s. Abb. 4-13), während in der Leber noch zusätzlich Spuren von β -Carotin sowie die Lycopinisomere *9-cis* und *13-cis* nachweisbar waren.

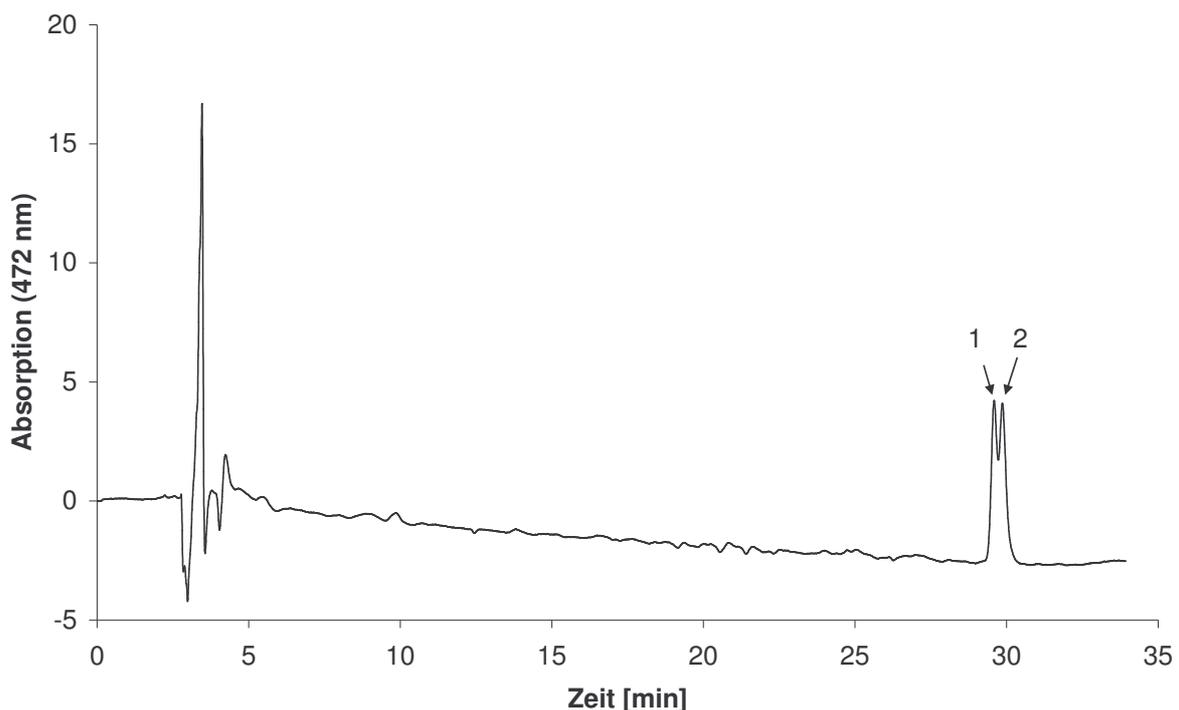


Abb. 4-13: HPLC-Chromatogramm eines Rattenplasma-Extrakts nach Intervention. 1 *all-trans* Lycopin, 2 *5-cis* Lycopin.

Eine Dosis von 0,2 mg/kg Körpergewicht reichte nicht aus, um *all-trans* und *5-cis* Lycopin im Plasma zu detektieren, auch die Gehalte in der Leber waren recht gering. Wie aus Tab. 4-11 ersichtlich, waren große individuelle Schwankungen in den Konzentrationen der verschiedenen Dosisgruppen vor allem im Plasma vorhanden. Es war dennoch eine

Dosisabhängigkeit zumindest bei den Gesamtlycopin-Gehalten in der Leber zu erkennen. Der Einsatz einer 10-fach höheren Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht führte zu 7,5-fach höheren Gehalten von Gesamtlycopin in der Leber. Eine weitere Erhöhung der Dosis um den Faktor 2,5 von 2 auf 5 mg/kg Körpergewicht führte zu 2,7-fach höheren Gesamtlycopin-Gehalten.

Für den Hauptversuch wurde eine Dosis von 5 mg Lycopin/kg Körpergewicht festgelegt, da selbst die Dosis von 2 mg/kg Körpergewicht noch zu gering war, um Plasmawerte zu erreichen, die analytisch gut erfasst werden konnten. Bei Plasmakonzentrationen von etwa 2 nmol/l lagen die Messsignale nur knapp über der Nachweisgrenze.

4.3.2.3 Die Ergebnisse des Hauptversuchs

Die beiden Interventionsgruppen des Hauptversuchs setzten sich aus je sieben Tieren zusammen und bekamen entweder LycoVit oder Lyc-O-Mato verabreicht. Die Kontrollgruppe bestand aus vier Tieren. Sowohl im Plasma der Kontrolltiere als auch im Plasma der Lyc-O-Mato-Gruppe konnte nach Intervention kein Lycopin detektiert werden. Die Plasmakonzentrationen aus *all-trans* und *5-cis* Lycopin lagen in der LycoVit-Gruppe bei $2,3 \pm 1,6$ nmol/l mit Werten von 1,1 bis 6,3 nmol/l. Es überwog bei allen Tieren das *5-cis* Lycopin mit einem Anteil von etwa 61% des Gesamtlycopins.

In der Leber wurde wie erwartet bei den Kontrolltieren kein Lycopin detektiert. Es waren ausschließlich Spuren von β -Carotin vorhanden. Bei der LycoVit- und Lyc-O-Mato-Gruppe wurden neben β -Carotin in der Leber das *all-trans* Lycopin und die Isomere *5-cis*, *9-cis* und *13-cis* detektiert (s. Abb. 4-14 und Abb. 4-15).

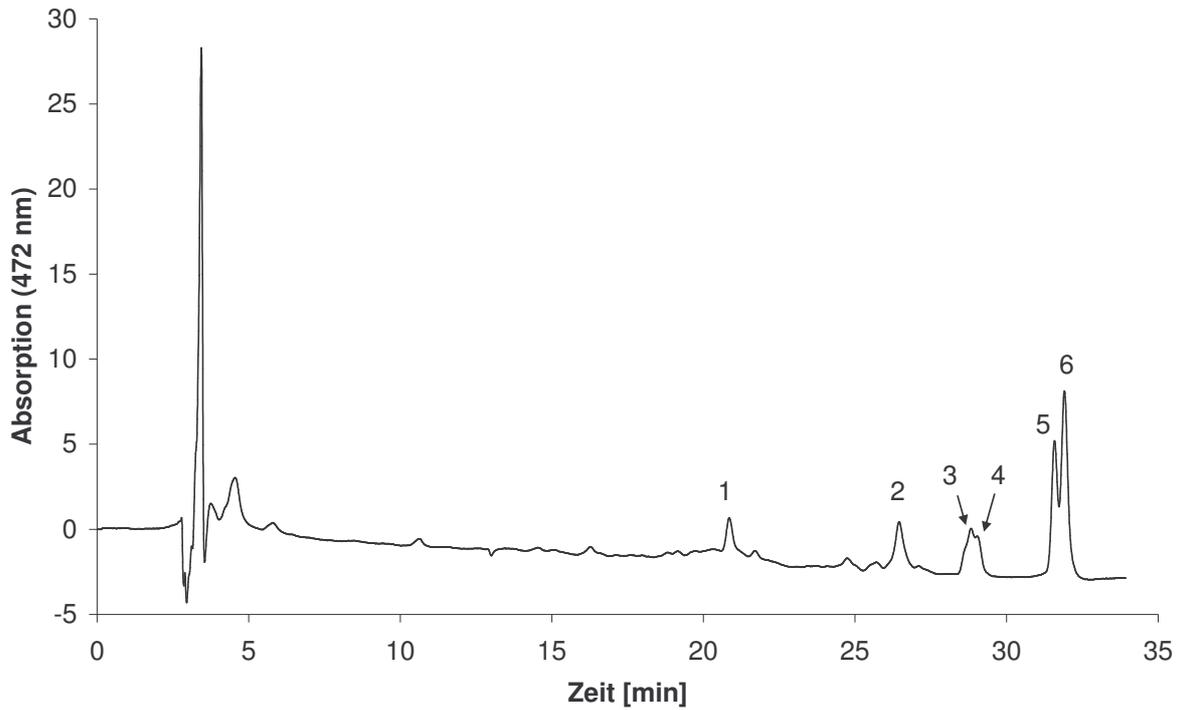


Abb. 4-14: HPLC-Chromatogramm eines Rattenleber-Extrakts nach Lyc-O-Mato-Intervention. 1 β -Carotin, 2 13-*cis* Lycopin, 3 oder 4 9-*cis* Lycopin, 5 all-*trans* Lycopin, 6 5-*cis* Lycopin.

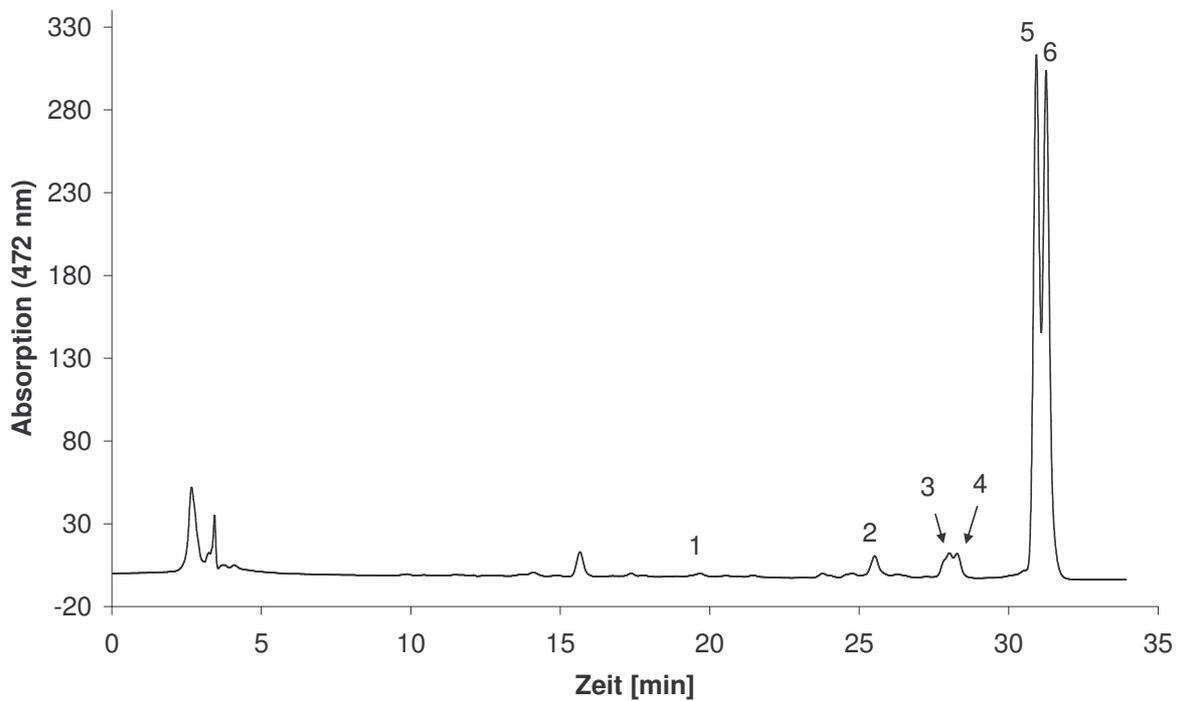


Abb. 4-15: HPLC-Chromatogramm eines Rattenleber-Extrakts nach LycoVit-Intervention. 1 β -Carotin, 2 13-*cis* Lycopin, 3 oder 4 9-*cis* Lycopin, 5 all-*trans* Lycopin, 6 5-*cis* Lycopin.

Beim Vergleich der beiden Chromatogramme miteinander fällt auf, dass nach LycoVit-Intervention deutlich mehr Lycopin in der Leber zu detektieren war und dass mehr *all-trans* Lycopin im Vergleich zu den *cis*-Isomeren vorhanden ist. Die unterschiedliche Verteilung des Lycopins auf die verschiedenen Isomere könnte auf eine unterschiedliche Metabolisierung der beiden Lycopinformulierungen hindeuten.

In Tab. 4-12 sind die quantitativen Ergebnisse dargestellt. Die Peaks 3 und 4 wurden zusammen als 9-*cis* Lycopin quantifiziert.

Tab. 4-12: Lycopinkonzentrationen der drei Versuchsgruppen in der Leber in ng/g nach Intervention. Gesamtlycopin ist die Summe aus *all-trans*, 5-*cis*, 9-*cis* und 13-*cis* Lycopin. n.n. = nicht nachweisbar.

Gruppe	<i>all-trans</i> Lycopin	5- <i>cis</i> Lycopin	Σ <i>all-trans</i> + 5- <i>cis</i> Lycopin
Kontrolle	n.n.	n.n.	
Lyc-O-Mato	23 ± 10	31 ± 15	54 ± 24
LycoVit	926 ± 149	1027 ± 169	1953 ± 312

Gruppe	9- <i>cis</i> Lycopin	13- <i>cis</i> Lycopin	Gesamtlycopin
Kontrolle	n.n.	n.n.	
Lyc-O-Mato	14 ± 7	14 ± 7	82 ± 38
LycoVit	145 ± 27	148 ± 25	2247 ± 324

In den Versuchsgruppen Lyc-O-Mato und LycoVit traten in der Leber neben β -Carotin, *all-trans* und 5-*cis* Lycopin zusätzlich in etwa gleichen Mengen das 9-*cis* und 13-*cis* Isomer auf. Der Anteil der einzelnen Isomere am Gesamtlycopin war jedoch unterschiedlich. In beiden Interventionsgruppen dominierte durchschnittlich das 5-*cis* Lycopin vor *all-trans* Lycopin und den anderen Isomeren. In der LycoVit-Gruppe lag der Anteil des *all-trans* Lycopins am Gesamtlycopin bei 41%, in der Lyc-O-Mato-Gruppe dagegen nur bei 28%. Dies lag daran, dass bei einigen Tieren der LycoVit-Gruppe mehr *all-trans* als 5-*cis* Lycopin im Leber-Extrakt enthalten war (s. Abb. 4-14).

Mit Gehalten von durchschnittlich 82 ng/g unterschied sich die Lyc-O-Mato-Gruppe nicht signifikant von der Kontroll-Gruppe (P-Wert 0,54), die LycoVit-Gruppe mit Gehalten um 2250 ng/g dagegen schon (P-Wert <0,001).

Beim Gesamtlycopin war die Konzentration in der LycoVit-Gruppe signifikant (P-Wert <0,001) um das 27-fache höher als in der Lyc-O-Mato-Gruppe, was auf eine erheblich bessere Aufnahme von LycoVit im Vergleich zu Lyc-O-Mato schließen lässt.

4.3.3 Studie mit Frettchen

Die Lycopinformulierungen Lyc-O-Mato und Lyc-O-Vit, die mit dem mehligem Frettchenfutter vermischt wurden, erwiesen sich im Futter über den Versuchszeitraum bei Aufbewahrung im Kühlschrank als stabil.

Die Durchführung des Versuchs war identisch mit dem Hauptversuch der Ratten. Je sieben Frettchen wurden LycoVit bzw. Lyc-O-Mato gefüttert. Vier Tiere dienten als Kontrolle. Im Plasma der Kontrollgruppe konnte neben β -Carotin *all-trans* und *5-cis* Lycopin in Spuren detektiert werden. Es stammte vermutlich aus dem Katzenfutter, mit dem das mehliges Frettchenfutter für die Fütterung vermischt wurde (s. 3.2.2.3), denn das Katzenfutter enthielt geringe Mengen *all-trans* und *5-cis* Lycopin. Im Plasma der Interventionsgruppen konnten zusätzlich zu *all-trans* und *5-cis* Lycopin die Isomere *9-cis* und *13-cis* in etwa gleichen Mengen detektiert werden. Die Konzentrationen des *9-cis* und *13-cis* Isomers sowie des Gesamtlycopins im Plasma der Interventionsgruppen wiesen keine Unterschiede auf. Ausschließlich das Verhältnis von *all-trans* Lycopin zu *5-cis* Lycopin unterschied sich in den beiden Gruppen (s. Tab. 4-13).

Tab. 4-13: Lycopinkonzentrationen im Plasma der drei Versuchsgruppen in nmol/l. n.n. = nicht nachweisbar.

Gruppe	<i>all-trans</i> Lycopin	<i>5-cis</i> Lycopin	Σ <i>all-trans</i> + <i>5-cis</i> Lycopin
Kontrolle	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2
Lyc-O-Mato	29 ± 16	6 ± 4	35 ± 19
LycoVit	22 ± 6	12 ± 4	34 ± 10

Gruppe	<i>9-cis</i> Lycopin	<i>13-cis</i> Lycopin	Gesamtlycopin
Kontrolle	n.n.	n.n.	0,3 ± 0,2
Lyc-O-Mato	4 ± 3	5 ± 2	44 ± 24
LycoVit	5 ± 2	5 ± 1	44 ± 13

In der LycoVit-Gruppe lag der Anteil des *all-trans* Lycopins am Gesamtlycopin durchschnittlich bei 50%, in der Lyc-O-Mato-Gruppe etwas höher bei 66%, was auch in den HPLC-Chromatogrammen zu erkennen ist (s. Abb. 4-16 und Abb. 4-17).

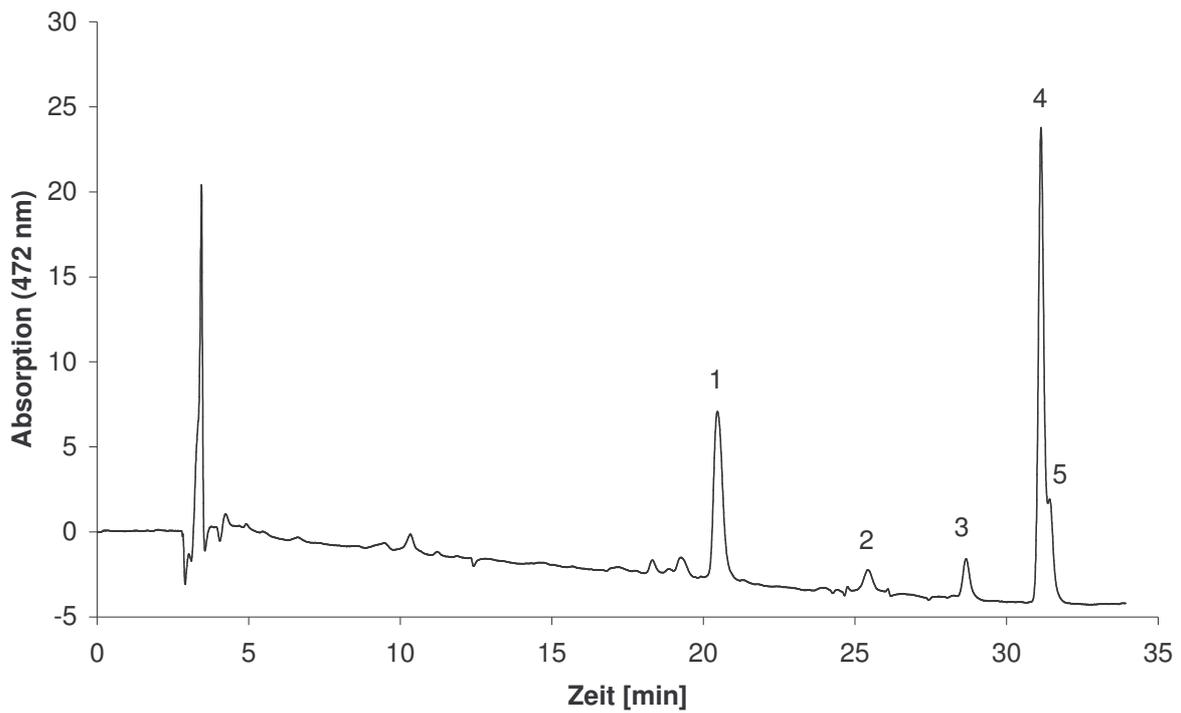


Abb. 4-16: HPLC-Chromatogramm eines Fretchenplasma-Extrakts nach Lyc-O-Mato-Intervention. 1 β -Carotin, 2 13-*cis* Lycopin, 3 9-*cis* Lycopin, 5 all-*trans* Lycopin, 6 5-*cis* Lycopin.

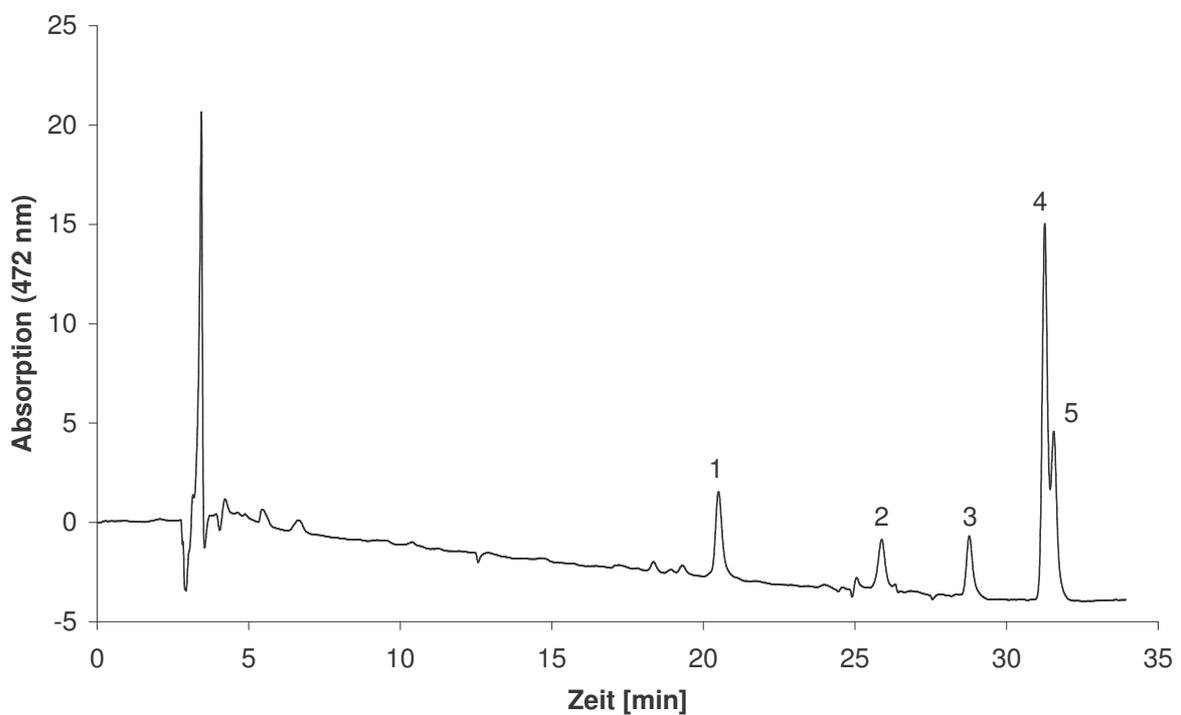


Abb. 4-17: HPLC-Chromatogramm eines Fretchenplasma-Extrakts nach LycoVit-Intervention. 1 β -Carotin, 2 13-*cis* Lycopin, 3 9-*cis* Lycopin, 5 all-*trans* Lycopin, 6 5-*cis* Lycopin.

Das unterschiedliche Verhältnis von *all-trans* zu *5-cis* Lycopin in den beiden Interventionsgruppen deutet auf eine unterschiedliche Metabolisierung der beiden Lycopin-formulierungen hin.

Bei Analyse der Lunge, Niere und Leber konnten in der Kontrollgruppe neben β -Carotin nur in der Leber geringe Mengen an *all-trans* und *5-cis* Lycopin detektiert werden. In den beiden Interventionsgruppen waren außerdem in den Organen die beiden Lycopinisomere *9-cis* und *13-cis* enthalten, sowie weitere nicht identifizierte Isomere (Peak 2 und 4) (s. Abb. 4-18). Das *13-cis* Isomer konnte in der Niere der Lyc-O-Mato-Gruppe jedoch nicht detektiert werden.

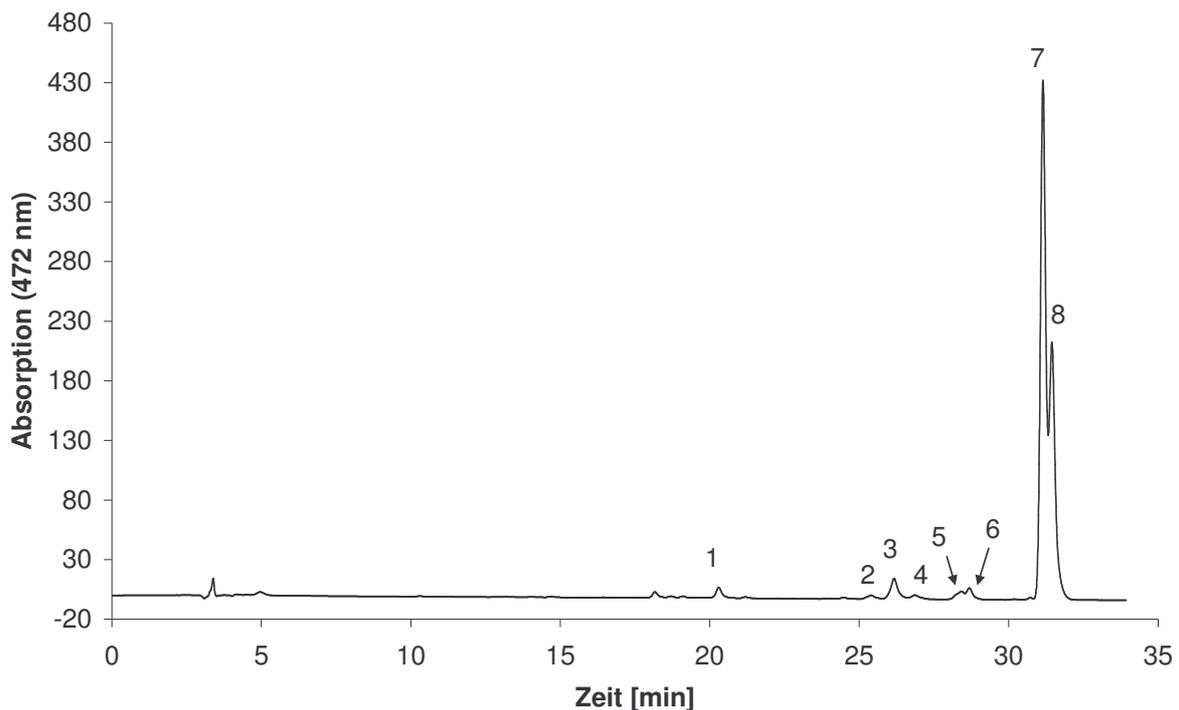


Abb. 4-18: HPLC-Chromatogramm eines Frettchenleber-Extraktes nach LycoVit-Intervention. 1 β -Carotin, 2 nicht identifiziertes Lycopinisomer, 3 *13-cis* Lycopin, 4 nicht identifiziertes Lycopinisomer, 5 oder 6 *9-cis* Lycopin, 7 *all-trans* Lycopin, 8 *5-cis* Lycopin.

Die höchsten Lycopingehalte waren in der Leber zu finden (s. Tab. 4-14), die Gehalte in der Lunge und Niere waren dagegen sehr niedrig (s. Tab. 4-15 und Tab. 4-16). Lunge und Niere wiesen in etwa die gleichen Lycopingehalte auf. Die Peaks 2, 3 und 4 wurden zusammen als *13-cis* Lycopin quantifiziert und die Peaks 5 und 6 als *9-cis*.

Tab. 4-14: Lycopinkonzentrationen in der Leber der drei Versuchsgruppen in $\mu\text{g/g}$. n.n. = nicht nachweisbar.

Gruppe	all-trans Lycopin	5-cis Lycopin	Σ all-trans + 5-cis Lycopin
Kontrolle	0,005 \pm 0,002	0,003 \pm 0,001	0,008 \pm 0,003
Lyc-O-Mato	1,0 \pm 0,4	0,4 \pm 0,1	1,4 \pm 0,5
LycoVit	8,3 \pm 3,5	4,7 \pm 2,0	13,0 \pm 5,5

Gruppe	9-cis Lycopin	13-cis Lycopin	Gesamtlycopin
Kontrolle	n.n.	n.n.	0,008 \pm 0,003
Lyc-O-Mato	0,2 \pm 0,06	0,2 \pm 0,09	1,8 \pm 0,7
LycoVit	0,9 \pm 0,4	0,6 \pm 0,2	14,5 \pm 6,0

Tab. 4-15: Lycopinkonzentrationen in der Lunge der drei Versuchsgruppen in ng/g . n.n. = nicht nachweisbar.

Gruppe	all-trans Lycopin	5-cis Lycopin	Σ all-trans + 5-cis Lycopin
Kontrolle	n.n.	n.n.	
Lyc-O-Mato	3,7 \pm 1,2	0,9 \pm 0,4	4,7 \pm 1,6
LycoVit	5,8 \pm 1,8	3,5 \pm 0,9	9,2 \pm 2,7

Gruppe	9-cis Lycopin	13-cis Lycopin	Gesamtlycopin
Kontrolle	n.n.	n.n.	
Lyc-O-Mato	1,0 \pm 0,7	1,1 \pm 0,3	6,8 \pm 2,3
LycoVit	1,8 \pm 0,5	1,6 \pm 0,1	12,6 \pm 2,9

Tab. 4-16: Lycopinkonzentrationen in der Niere der drei Versuchsgruppen in ng/g . n.n. = nicht nachweisbar.

Gruppe	all-trans Lycopin	5-cis Lycopin	Σ all-trans + 5-cis Lycopin
Kontrolle	n.n.	n.n.	
Lyc-O-Mato	3,3 \pm 1,3	1,0 \pm 0,4	4,2 \pm 1,7
LycoVit	5,5 \pm 2,4	4,1 \pm 1,1	9,7 \pm 3,3

Gruppe	9-cis Lycopin	13-cis Lycopin	Gesamtlycopin
Kontrolle	n.n.	n.n.	
Lyc-O-Mato	1,3 \pm 1,0	n.n.	5,7 \pm 2,6
LycoVit	2,6 \pm 1,0	1,3 \pm 0,6	13,5 \pm 3,5

Die Gesamtlycopingehalte waren in beiden Interventionsgruppen im Bezug auf die Kontrollgruppe in allen Organen signifikant höher (P-Werte $<0,001$) mit Ausnahme der Gehalte der Lyc-O-Mato-Gruppe in der Leber (P-Wert 0,47). Auch die Gehalte der Interventionsgruppen unterschieden sich im Gegensatz zum Plasma in allen Organen signifikant (P-Wert $<0,001$). Hierbei lagen die Gehalte der LycoVit-Gruppe in der Leber um das Achtfache höher und in der Lunge und der Niere um etwa das Doppelte. Dies deutete auf eine unterschiedliche Aufnahme der beiden Lycopinformulierungen hin.

Der Anteil des all-trans Lycopins am Gesamtlycopin war wie im Plasma auch in der Lunge und Niere der beiden Gruppen verschieden. In der Lunge lag er bei durchschnittlich 45% in

der LycoVit-Gruppe im Vergleich zu 55% in der Lyc-O-Mato-Gruppe und in der Niere bei 40% im Vergleich zu 59%, was auf einen unterschiedlichen Metabolismus des Lycopins der beiden Lycopinformulierungen in diesen Organen schließen ließ.

4.4 Wirkung von Lycopin gegen oxidativen Stress: Isoprostane als Biomarker

4.4.1 Bestimmung der Nachweisgrenze für das 8-iso PGF_{2α} an der GC/MS

Um einen Anhaltspunkt zu bekommen, welche Konzentration des 8-iso PGF_{2α} mindestens nötig ist um noch ein ausreichend hohes Signal an der GC/MS zu bekommen, wurde die Nachweisgrenze mit einer Standard-Lösung bestimmt (s. Abb. 4-19).

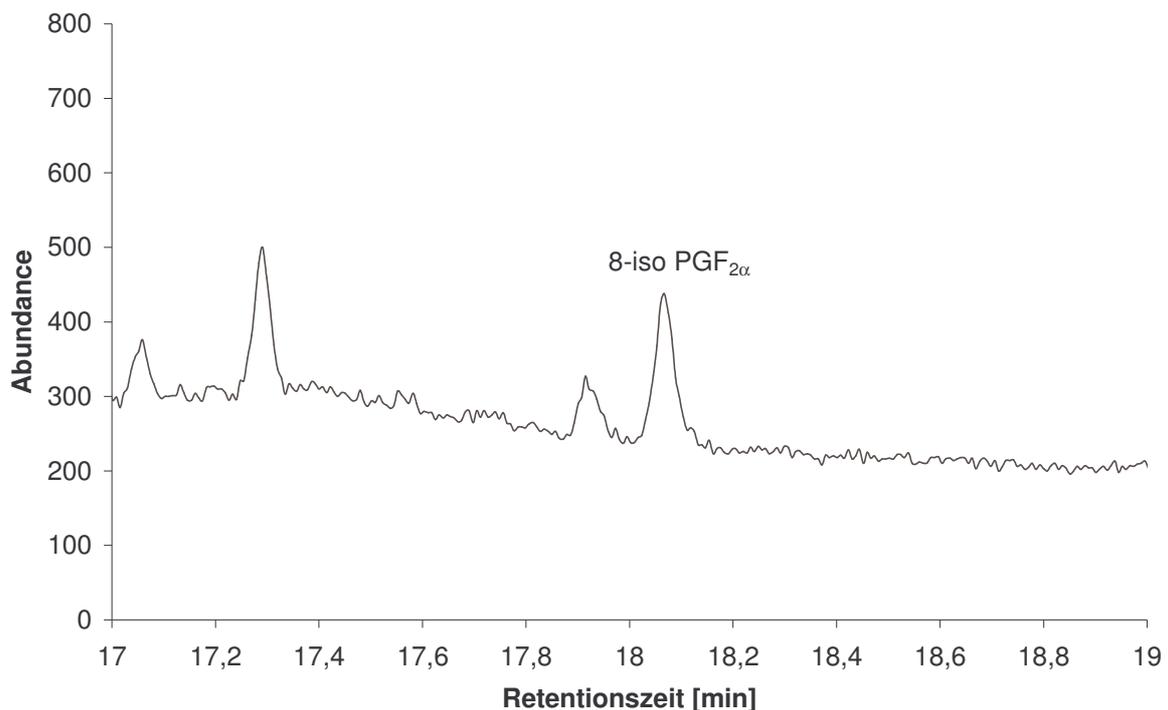


Abb. 4-19: GC-Chromatogramm eines 8-iso PGF_{2α}-Standards mit der Konzentration von 4 pg/μl.

Bei einer Injektionsmenge von 4 pg lag das Signal/Rausch-Verhältnis bei etwa 5. Die Nachweisgrenze (Signal/Rausch-Verhältnis 3) müsste demnach bei ca. 2,5 pg liegen.

4.4.2 Etablierung einer Methode zur Analyse der Isoprostane im Urin

Zunächst musste eine geeignete Methode gefunden werden, um die Isoprostane aus Urin zu isolieren und entsprechend aufzureinigen, damit eine Messung mittels GC/MS möglich ist. Hierfür wurden zunächst folgende Aufreinigungsmethoden auf ihre Eignung untersucht.

1. Die Isoprostane wurden mit Ethylacetat aus dem Urin extrahiert, der Extrakt unter Stickstoff abgeblasen und der Rückstand in die HPLC injiziert. Die 8-iso PGF_{2α}-Fraktion wurde gesammelt, zur Trockene eingeeengt und nach Derivatisierung gemessen.

Im GC-Chromatogramm waren sehr viele Peaks zu erkennen, die z. T. nicht basislinien getrennt waren. Eine genaue Zuordnung des 8-iso PGF_{2α} gelang nicht.

2. Anstelle der Ethylacetat-Extraktion wurde eine C18-Festphasen-Extraktion durchgeführt, was jedoch zu keiner Verbesserung führte. Das 8-iso PGF_{2α} konnte auch hier keinem Peak eindeutig zugeordnet werden.

3. Nach der Ethylacetat-Extraktion (s. 1.) wurde zusätzlich eine Aufreinigung mittels einer C18-Festphasen-Säule eingeschoben.

Auch der zusätzliche Aufreinigungsschritt durch die Festphasenextraktion brachte keine Verbesserung des GC-Chromatogramms. Das 8-iso PGF_{2α} konnte keinem Peak zugeordnet werden, da zu etwa der gleichen Zeit noch zu viele andere Verbindungen eluierten (s. Abb. 4-20).

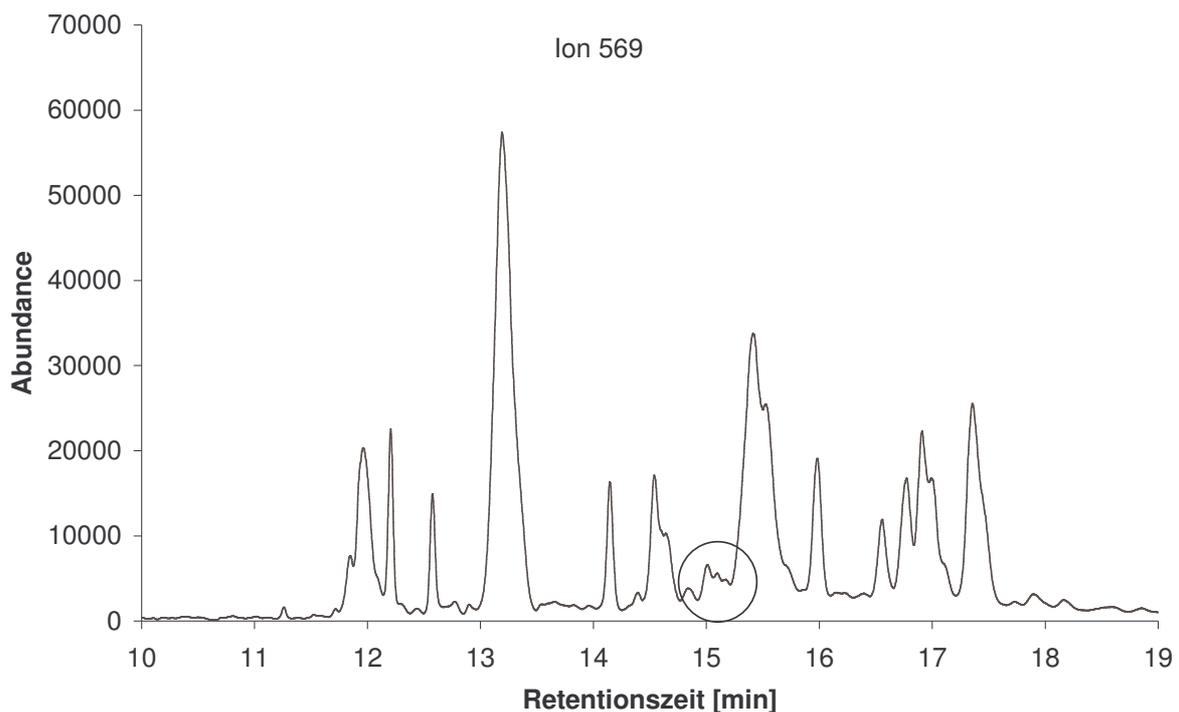


Abb. 4-20: GC-Chromatogramm eines aufgearbeiteten Urins. Innerhalb des Kreises müsste das 8-iso PGF_{2α} liegen.

4. Die Isoprostane wurden mit Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel unter dem Stickstoff abgeblasen und der Rückstand mit Pentafluorbenzylbromid derivatisiert. Es erfolgte eine Fraktionierung auf einer HPLC-Säule als 8-iso PGF_{2α}-Pentafluorbenzylbromid-

Ester. Die GC-Chromatogramme waren vergleichbar mit Abb. 4-20, das 8-iso PGF_{2α} konnte immer noch nicht eindeutig zugeordnet werden.

5. Zuletzt wurden die Isoprostane mit Ethylacetat extrahiert, mittels HPLC fraktioniert, die 8-iso PGF_{2α}-Fraktion zum Pentafluorbenzylbromid-Ester derivatisiert und dann erneut mittels HPLC fraktioniert, schließlich weiter derivatisiert und mittels GC/MS gemessen (s. Abb. 4-21).

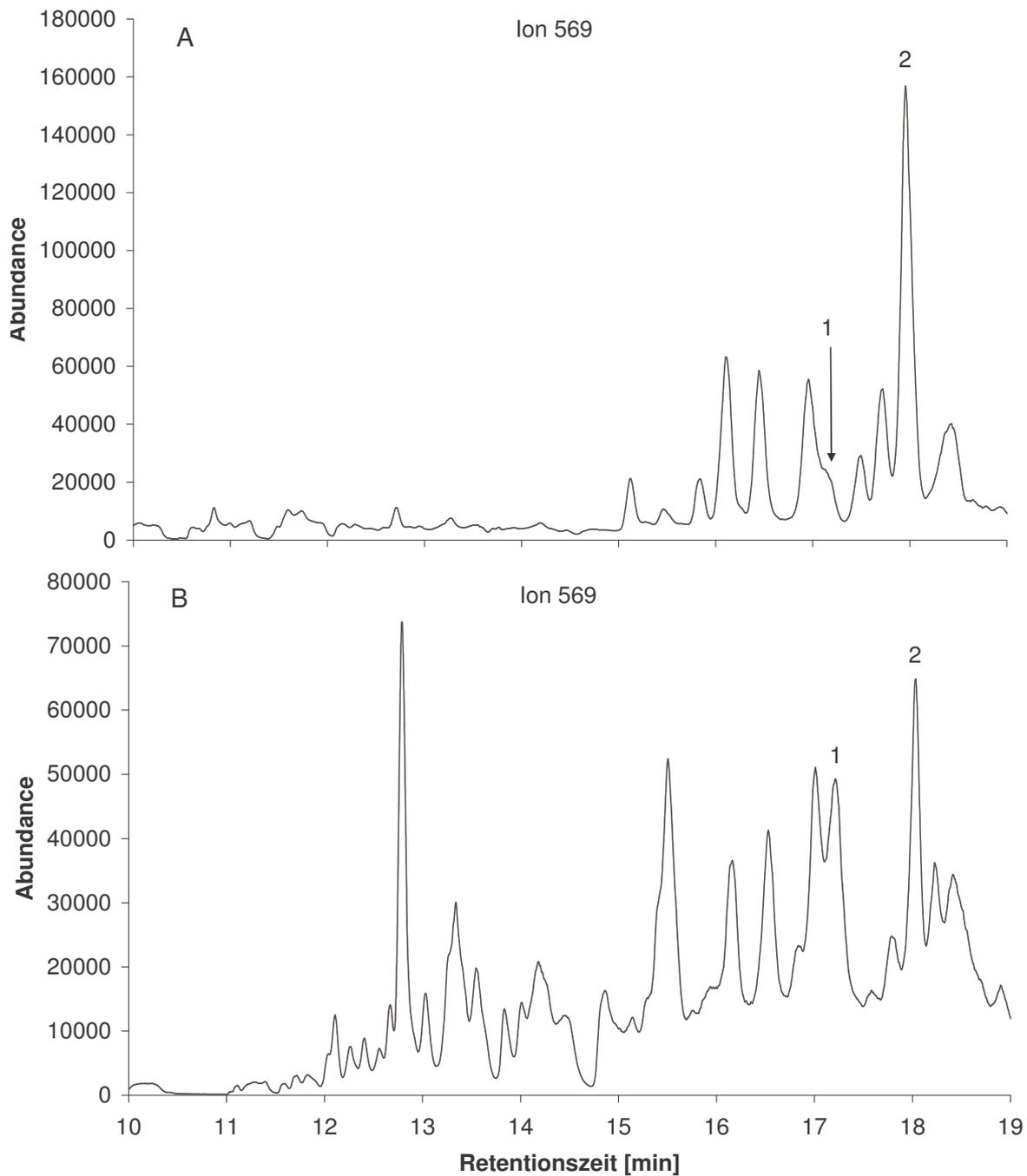


Abb. 4-21: GC-Chromatogramme von zwei verschiedenen Urinen (A und B), die nach der gleichen Methode aufgearbeitet wurden. 1 8-iso PGF_{2α}, 2 11β-PGF_{2α} als interner Standard.

Wie in Abb. 4-21 A und B ersichtlich, waren auch nach der aufwändigen Aufreinigung im Chromatogramm mehrere Peaks zu detektieren. Bei der Retentionszeit von 8-iso PGF_{2α} erschien im Urin A reproduzierbar ein Peak mit Schulter. Wurde der Urin vor der Aufarbeitung mit einem 8-iso PGF_{2α}-Standard versetzt, so wurde aus dem Peak mit Schulter ein Doppelpeak. Das 8-iso PGF_{2α} eluierte folglich in der Schulter. Dieser Peak mit Schulter sah bei anderen Urinen wie z. B. Urin B völlig anders aus. Hier wurden anstelle des Peaks mit Schulter drei nicht getrennte aufeinander folgende Peaks detektiert. Da der Peak, der dem das 8-iso PGF_{2α} entsprach in verschiedenen Urinen nicht reproduzierbar war und nicht von anderen Peaks zu trennen, war diese Methode der Aufreinigung für die Bestimmung des 8-iso PGF_{2α} aus Urin ungeeignet. Dass die Methode an sich überhaupt funktionierte, konnte mit einem 8-iso PGF_{2α}-Standard gezeigt werden. Hierzu wurde eine Standardlösung genauso aufgearbeitet wie Urin und die Wiederfindung des 8-iso PGF_{2α} bestimmt. Die Wiederfindung lag im Durchschnitt bei $73 \pm 4\%$, was für eine Aufarbeitung mit einer Extraktion und zwei HPLC-Fraktionierungen durchaus akzeptabel war.

Da die Aufreinigung des Urins mit dieser Methode zu keinem sauberen und eindeutig auswertbaren GC-Chromatogramm geführt hat, musste eine neue Methode gefunden werden, um die Isoprostane selektiver aus dem Urin zu isolieren. Eine selektive Isolierung gelang mit der Immunaffinitätschromatographie, für die die Ergebnisse im Folgenden dargestellt sind.

4.4.3 Isolierung des 8-iso PGF_{2α} aus Urin mit Immunaffinitätschromatographie (IAC) und Messung mit GC/MS - Etablierung der Methode

Im Gegensatz zur Aufreinigung des Urins mittels Extraktion und HPLC-Fraktionierung, wurde bei der IAC das 8-iso PGF_{2α} selektiv über auf einem Gel immobilisierte Antikörper aus dem Urin isoliert. Die selektive Isolierung zeigte sich in der Qualität des GC-Chromatogramms, in dem zu der entsprechenden Retentionszeit nur ein Peak zu detektieren war (s. Abb. 4-22).

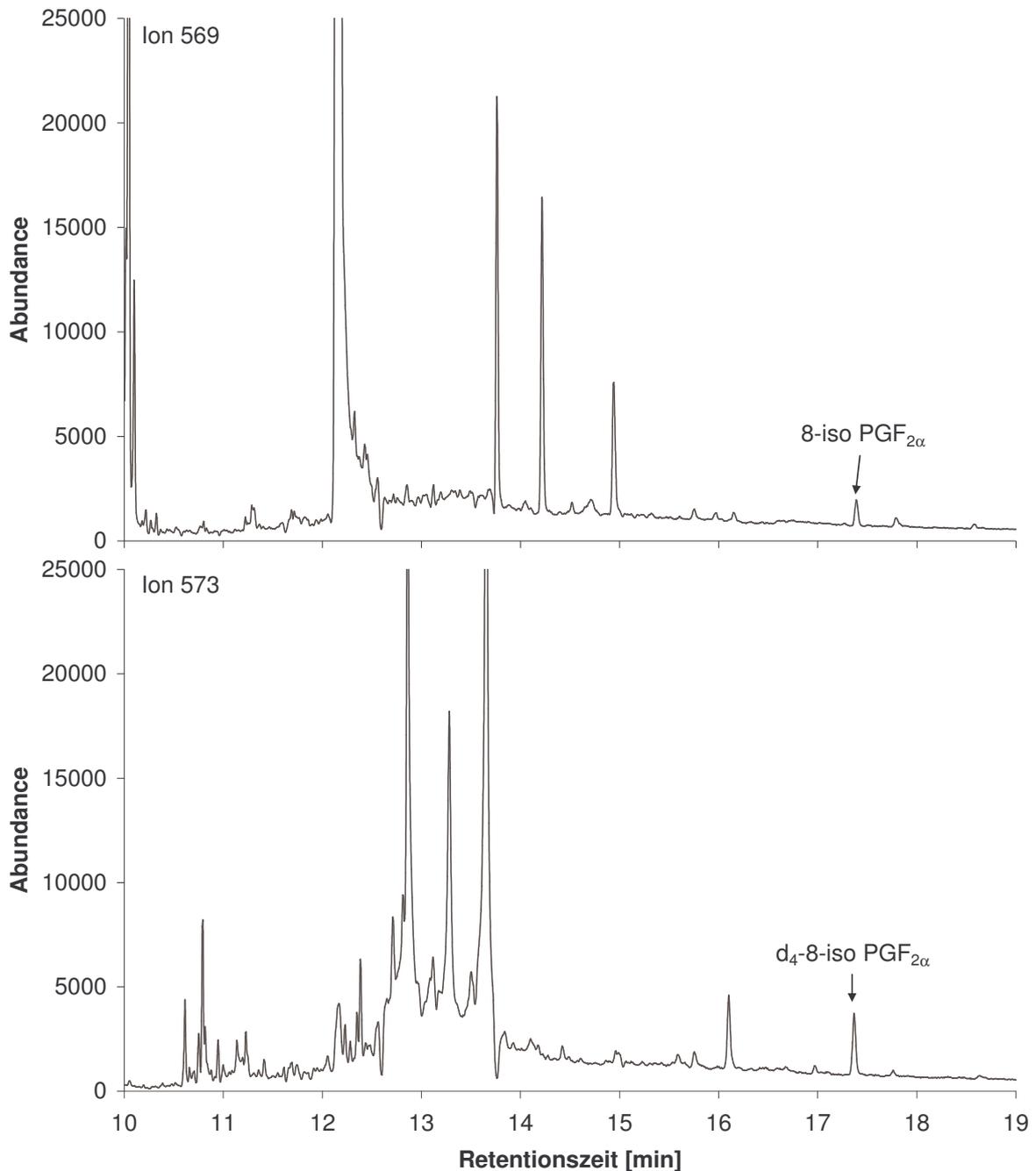


Abb. 4-22: GC-Chromatogramm eines mit IAC aufgearbeiteten Urins. Oben das Ion 569 für 8-iso PGF_{2α} und unten das Ion 573 für das d₄-8-iso PGF_{2α}.

Der vierfach deuterierte Standard d₄-8-iso PGF_{2α} hatte eine um 0,02 min kürzere Retentionszeit als das 8-iso PGF_{2α}. Beide Signale konnten eindeutig zugeordnet werden, da weder zur gleichen Retentionszeit noch direkt davor oder danach andere Verbindungen von der Säule eluiert wurden. Beide Signale lagen deutlich über der Nachweisgrenze und waren damit gut auszuwerten.

4.4.3.1 Intra-assay-Reproduzierbarkeit

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Messung einer aufgearbeiteten Probe, wurde eine Urinprobe mittels IAC aufgereinigt und nach Derivatisierung zehn Mal mit GC/MS gemessen.

Tab. 4-17: Ergebnisse von zehn GC/MS-Messungen einer aufgearbeiteten Urinprobe.

Messung	8-iso PGF _{2α} [pg/ml]
1	601
2	591
3	572
4	574
5	586
6	565
7	550
8	578
9	563
10	561
Mittelwert	574
St.abw.	15,4
CV	2,7%

Die Reproduzierbarkeit der GC/MS-Messung einer Probe ist mit einem Variationskoeffizienten von 2,7% als sehr gut anzusehen.

4.4.3.2 Inter-assay-Reproduzierbarkeit

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Aufarbeitung und Messung einer Probe, wurden zweimal je fünf Proben eines Urins mittels IAC aufgereinigt und nach Derivatisierung mit GC/MS gemessen.

Tab. 4-18: Ergebnisse der Messungen nach Aufarbeitung von jeweils fünf gleichen Urinproben.

Urin 1		Urin 2	
Probe	8-iso PGF _{2α} [pg/ml]	Probe	8-iso PGF _{2α} [pg/ml]
1	673	1	489
2	703	2	511
3	677	3	526
4	668	4	500
5	645	5	471
Mittelwert	673		499
St.abw.	21		21
CV	3,1%		4,2%

Die Reproduzierbarkeit der gesamten Methode, d.h. Aufarbeitung des Urins und Messung mit GC/MS ist aufgrund der Variationskoeffizienten von 3,1 bzw. 4,2% als sehr gut zu bewerten. Die Variationskoeffizienten liegen nur geringfügig über dem der Intra-assay-Reproduzierbarkeit.

4.4.3.3 Bestimmung der Wiederfindung des 8-iso PGF_{2α} in der Matrix

Zur Bestimmung der Wiederfindung in der Matrix wurde ein Urin mit 149 pg und mit 298 pg 8-iso PGF_{2α} aufgestockt, jeweils vier mal aufgearbeitet und die Wiederfindung des zugesetzten 8-iso PGF_{2α} bestimmt.

Tab. 4-19: Ergebnisse der Messungen von Urin ohne und mit Zusatz von 8-iso PGF_{2α}.

Urin ohne Zusatz	
Probe	8-iso PGF _{2α} [pg/ml]
1	453
2	438
3	441
4	457
Mittelwert	447

Urin + 149 pg 8-iso PGF _{2α}			
Probe	8-iso PGF _{2α} [pg/ml]	Differenz zu Urin ohne Zusatz	Wiederfindung
1	616	169	113%
2	608	161	108%
3	605	158	106%
4	617	170	114%
Mittelwert	612	164	110%

Urin + 298 pg 8-iso PGF _{2α}			
Probe	8-iso PGF _{2α} [pg/ml]	Differenz zu Urin ohne Zusatz	Wiederfindung
1	752	305	102%
2	722	275	92%
3	714	267	90%
4	765	318	107%
Mittelwert	738	291	98%

Anhand der Ergebnisse konnte zum einen erneut die Reproduzierbarkeit der Methode bestätigt und zum anderen die Wiederfindung bestimmt werden. Bei einem Zusatz von 150 pg 8-iso PGF_{2α} lag die Wiederfindung bei durchschnittlich 110%, was bedeutete, dass der gemessene Wert etwas über dem tatsächlichen Wert lag. Dies könnte entweder an einer Ungenauigkeit des einpipettierten Volumens der Standard-Lösung gelegen haben oder an

der Kalibriergerade. Bei einem Zusatz von 300 pg lag die Wiederfindung durchschnittlich bei 98%, was optimal war, da hier genau das zugesetzte 8-iso PGF_{2α} wieder gefunden wurde. Da die Wiederfindung insgesamt 104% betrug, konnte davon ausgegangen werden, dass das zugesetzte 8-iso PGF_{2α} mit keinen anderen Bestandteilen des Urins oder Materialien wechselwirkte, die während der Aufarbeitung benutzt wurden. Dies hätte zu Wiederfindungen deutlich unter 100 % geführt.

4.4.4 Isolierung des 8-iso PGF_{2α} aus Plasma mit IAC und Messung mit GC/MS - Etablierung einer Methode

Im Plasma liegt der Großteil der Isoprostane verestert mit Phospholipiden vor. Um die Gesamtisoprostane (freie + veresterte) bestimmen zu können, müssen diese Ester zuvor gespalten werden. Die beiden im Folgenden nur kurz beschriebenen Methoden sind im Methodenteil ausführlich erklärt.

Methode 1:

Zunächst wurde das Plasma mit KOH verseift, der pH-Wert neutral eingestellt und mit der IAC aufgereinigt. Um die Reproduzierbarkeit zu testen, wurden jeweils vier Proben des gleichen Plasmas über eine IAC-Säule aufgereinigt und gemessen.

Tab. 4-20: Reproduzierbarkeit der Aufarbeitung einer Plasmaproben über IAC.

	Probe	A (8-iso PGF _{2α})	A (Interner Standard)	8-iso PGF _{2α} [pg/ml]
Säule 1	1	21810	63211	108
	2	18644	37364	156
	3	9197	26347	109
	4	10305	19259	167
Säule 2	5	27805	80253	108
	6	16187	40780	124
	7	-	-	
	8	-	-	

Aus den Ergebnissen wurde deutlich, dass die Werte einerseits recht stark schwankten und andererseits die Flächen von 8-iso PGF_{2α} und dem Internen Standard, die an der GC/MS bestimmt wurden, mit jeder Benutzung der IAC-Säule erheblich abnahmen. Bei der ersten Benutzung der IAC-Säule 1 ist das Messsignal von 8-iso PGF_{2α} sogar schon unter der Nachweisgrenze. Bei Probe 7 konnte schon nach der dritten Benutzung der IAC-Säule weder 8-iso PGF_{2α} noch der interne Standard detektiert werden. Daraus wurde geschlossen,

dass noch zu viele Störsubstanzen im Plasma vorhanden waren, die die IAC-Säule so stark verschmutzen, dass die Wiederfindung mit jeder weiteren Benutzung deutlich schlechter wird. Um dies zu vermeiden, wurde daher nach der Verseifung noch ein Extraktionsschritt eingeschoben.

Ob die Wiederfindung auch bei einer Standardlösung mit jeder weiteren Benutzung der IAC-Säule abnimmt oder ob dies tatsächlich ein Problem der Probenmatrix ist, wurde überprüft, indem drei Proben einer 8-iso PGF_{2α}-Standardlösung nacheinander über die gleiche IAC-Säule aufgearbeitet wurden. Die Wiederfindungen nahmen auch hier von zunächst 85% auf 68% nach der zweiten und dritten Benutzung ab. Allerdings war eine Wiederfindung von 85% für die erste Benutzung schon recht schlecht. Dies machte sich beim Urin jedoch nicht weiter bemerkbar, da dort genug Isoprostane im Vergleich zum Plasma enthalten sind. Die Verschlechterung der Wiederfindung um 17% nach der zweiten Benutzung war hier nicht so deutlich wie beim Plasma. Dort waren es 40%.

Methode 2:

Das Plasma wurde zunächst verseift, neutrale Lipide mit Heptan extrahiert und verworfen, dann der pH-Wert auf ca. 3 eingestellt und die Isoprostane mit Ethylacetat extrahiert. Das Ethylacetat wurde unter dem Stickstoffstrom abgeblasen und der Rückstand in Puffer aufgenommen, störende Proteinreste mit Dichlormethan abgetrennt und die Pufferphase zur IAC verwendet.

Zunächst sollte die Wiederfindung des 8-iso PGF_{2α} bei den jeweiligen Extraktionsschritten geprüft werden.

1. Extraktion des 8-iso PGF_{2α} aus einer basischen bzw. neutralen Lösung mit Heptan.
⇒ Das 8-iso PGF_{2α} ging nicht in die Heptanphase über.
2. Extraktion des 8-iso PGF_{2α} aus Puffer pH 7,4 mit Dichlormethan.
⇒ Das 8-iso PGF_{2α} ging zu kleiner 5% in die Dichlormethan-Phase über.
3. Extraktion des 8-iso PGF_{2α} aus einer 1 M KH₂PO₄-Lösung pH 3 mit Ethylacetat.
⇒ Bei vier Bestimmungen lag die Wiederfindung zwischen 98 und 103%. Das 8-iso PGF_{2α} ging also vollständig in die Ethylacetat-Phase über.
4. Die Wiederfindung der gesamten Methode bis zur IAC-Aufreinigung mit allen Extraktionsschritten betrug etwa 70%.
5. Die Wiederfindung der Methode mit der IAC müsste demnach etwa bei 40-55% je nach Benutzung der IAC-Säule gelegen haben (70% Wiederfindung bis zur IAC abzüglich des Verlustes von 15-30% bei der IAC).

Zuletzt sollte überprüft werden, wie genau der pH-Wert eingestellt werden muss, damit die Isoprostane in die Ethylacetatphase übergehen. Hierfür wurde eine 8-iso PGF_{2 α} -Lösung in Puffer pH 7,4 angesetzt, in Natriumacetat-Puffer pH 5, in 1 M KH₂PO₄-Lösung pH 3 und in 1 M Salzsäure pH 0. Bei der Ethylacetat-Extraktion aus pH 7,4 gingen nur 7% des 8-iso PGF_{2 α} in die organische Phase über, bei pH 5 waren es schon 86%, bei pH 3 91% und bei pH 1 110%. Daraus konnte geschlossen werden, dass es bereits ausreicht, wenn der pH-Wert für die Extraktion auf kleiner 5 eingestellt wird.

Aufgrund der Ergebnisse mit dem 8-iso PGF_{2 α} -Standard schien die Methode geeignet zu sein, das Plasma für die IAC aufzureinigen. Die Isoprostane gingen in die Ethylacetat-Phase über, nicht jedoch in die Heptan- oder Dichlormethan-Phase.

4.4.4.1 Inter-assay-Reproduzierbarkeit

Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Plasmaaufarbeitung und Messung wurde mit je 4 ml Plasma durchgeführt, denn wie sich gezeigt hatte, lagen die Messsignale bei 2 ml Plasma für das 8-iso PGF_{2 α} bereits unter der Nachweisgrenze.

Tab. 4-21: Ergebnisse der Messungen nach Aufarbeitung von jeweils sieben gleichen Plasmaproben.

Probe	8-iso PGF _{2α} [pg/ml]
1	21
2	25
3	25
4	21
5	15
6	21
7	26
Mittelwert	22
St.abw.	3,8
CV	17%

Obwohl für die Aufarbeitung 4 ml Plasma benutzt wurden, lagen die Messwerte insbesondere nach der 3. oder 4. Benutzung einer IAC-Säule an der Nachweisgrenze (s. Abb. 4-23). Dies war jedoch nicht verwunderlich bei Plasmawerten von nur 20 pg/ml. Bei einer Plasmaprobe mit 20 pg/ml 8-iso PGF_{2 α} wären das bei 4 ml Plasma insgesamt 80 pg. Diese würden nach der Aufreinigung und Derivatisierung in 20 μ l Lösungsmittel zur Injektion in die GC/MS aufgenommen werden, was dann einer Konzentration von 4 pg/ μ l entspräche. Würde eine Wiederfindung von etwa 50% berücksichtigt, so läge die 8-iso PGF_{2 α} -

Konzentration bei 2 pg/ μ l und die absolute Menge bei einer Injektion von 2 μ l bei 4 pg. Die Nachweisgrenze, die mit einem 8-iso PGF_{2 α} -Standard bestimmt wurde, lag bei ca. 2,5 pg.

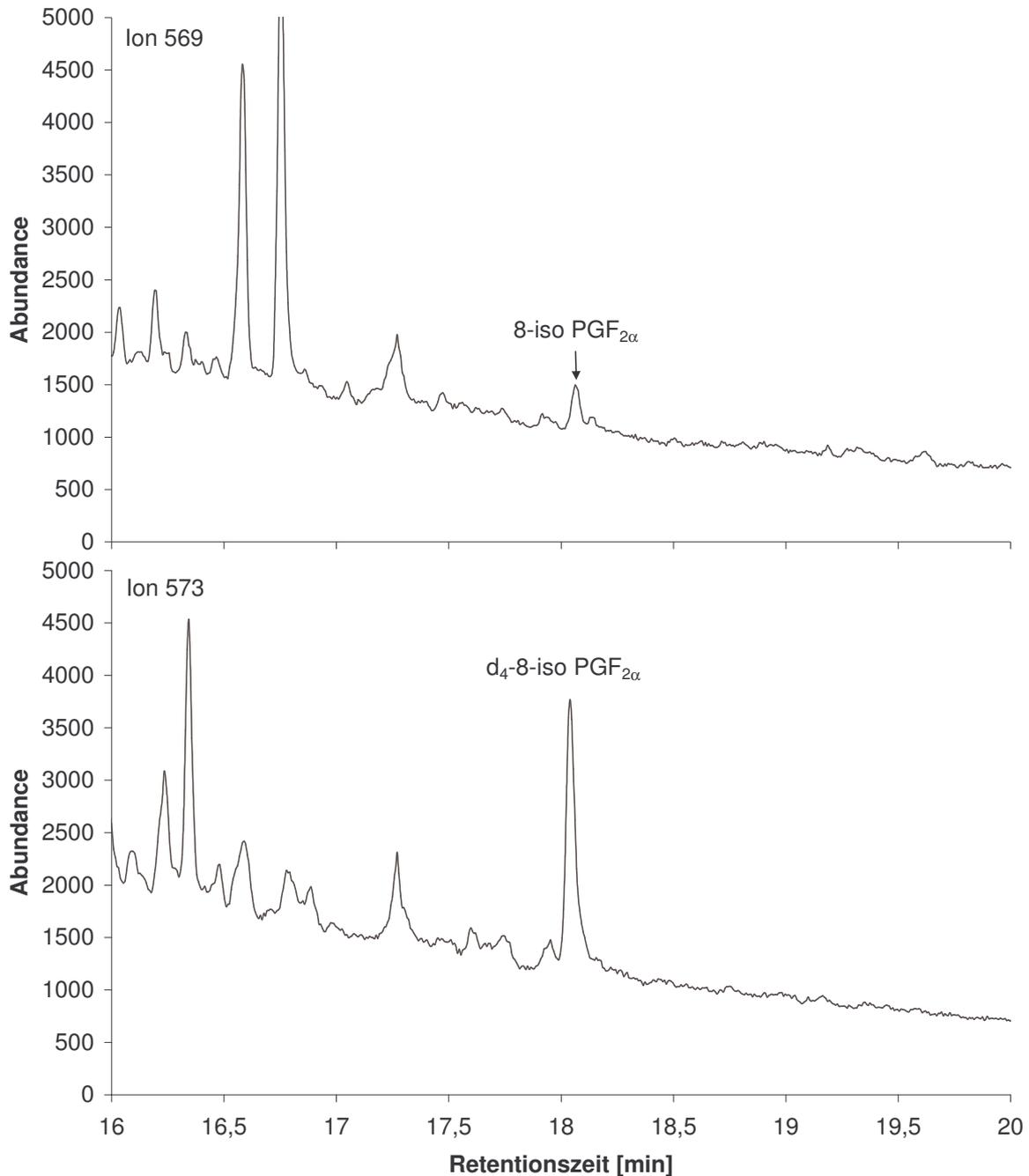


Abb. 4-23: GC-Chromatogramm einer mit Methode 2 aufgearbeiteten Plasmaprobe. Oben das Ion 569 für 8-iso PGF_{2 α} und unten das Ion 573 für das d₄-8-iso PGF_{2 α} .

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass diese Methode zur Aufarbeitung zwar funktionierte, dass jedoch selbst 4 ml Plasma nicht ausreichten, um deutlich über der Nachweisgrenze zu messen.

4.4.4.2 Inter-assay-Reproduzierbarkeit mit Messung an der GC/MS/MS

Um das Problem der Nachweisgrenze zu lösen, wurden die folgenden Proben mittels GC/MS/MS bei einer Arbeitsgruppe in Hannover gemessen, da hier empfindlicher mit GC/MS gemessen werden konnte. Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden zehnmal je 2 ml desselben Plasmas aufgearbeitet und gemessen.

Tab. 4-22: Reproduzierbarkeit nach Aufarbeitung von jeweils 10 gleichen Plasmaproben.

Probe	8-iso PGF _{2α} [pg/ml]
1	24
2	28
3	30
4	38
5	30
6	30
7	28
8	35
9	31
10	25
Mittelwert	30
St.abw.	4,2
CV	14%

Die gemessenen Konzentrationen für die Plasmaprobe schwankten von 24 bis 38 pg/ml recht stark, was sich auch im Variationskoeffizient von 14% widerspiegelte. Dies war jedoch nicht ganz unerwartet, da bei Plasmawerten von nur 30 pg/ml die prozentuale Schwankung höher ist als bei Werten von z. B. 500 pg/ml im Urin.

4.4.5 Humanstudie

4.4.5.1 Analyse der Carotinoide im Plasma

Nach der 14-tägigen Intervention mit Lyc-O-Mato sind die Lycopinplasmaspiegel der acht Probanden signifikant (P-Wert <0,001) im Durchschnitt von 117 ± 61 nmol/l um etwa das Zehnfache auf 1110 ± 220 nmol/l angestiegen.

4.4.5.2 Bestimmung des 8-iso PGF_{2α} im Urin mit IAC und GC/MS sowie mit Enzymimmunoassay (EIA)

Um das 8-iso PGF_{2α} mittels GC/MS genau zu quantifizieren, wurde zunächst eine Kalibriergerade (s. Abb. 4-24) benötigt. Die Kalibriergerade wurde mit Standardlösungen erstellt, bei denen die Menge des internen Standards konstant gehalten, die Menge des 8-iso PGF_{2α} variiert wurde.

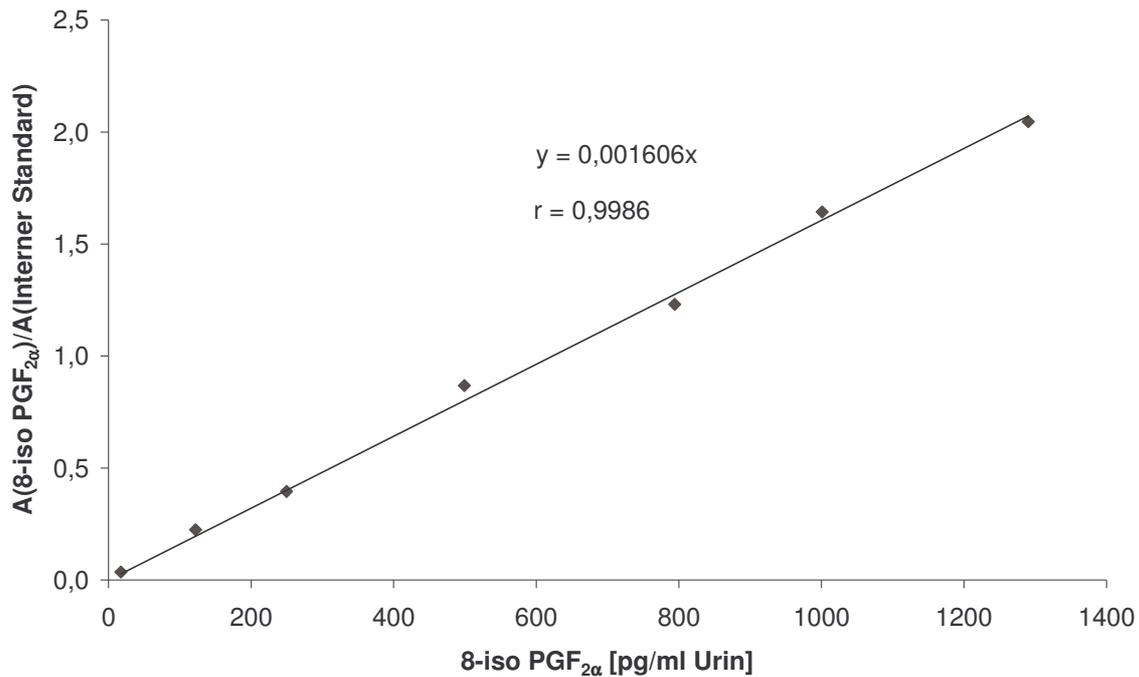


Abb. 4-24: Kalibriergerade zur Bestimmung des 8-iso PGF_{2α} bei Zusatz von 1000 pg d₄-8-iso PGF_{2α} als interner Standard.

Auf der y-Achse wurde das Flächenverhältnis von 8-iso PGF_{2α} zu d₄-8-iso PGF_{2α} angegeben, auf der x-Achse die Menge des 8-iso PGF_{2α} im Urin, wenn vor der Aufarbeitung 1000 pg d₄-8-iso PGF_{2α} zugesetzt wurden.

Zum Vergleich der Ergebnisse der GC/MS-Messung wurden alle Proben auch mit der Alternativmethode, dem EIA, gemessen (s. Abb. 4-25). Von den Urinen wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Da die Urine unterschiedlich stark verdünnt waren, wurde die Menge des 8-iso PGF_{2α} nicht auf das Volumen, sondern auf mg Kreatinin im Urin bezogen.

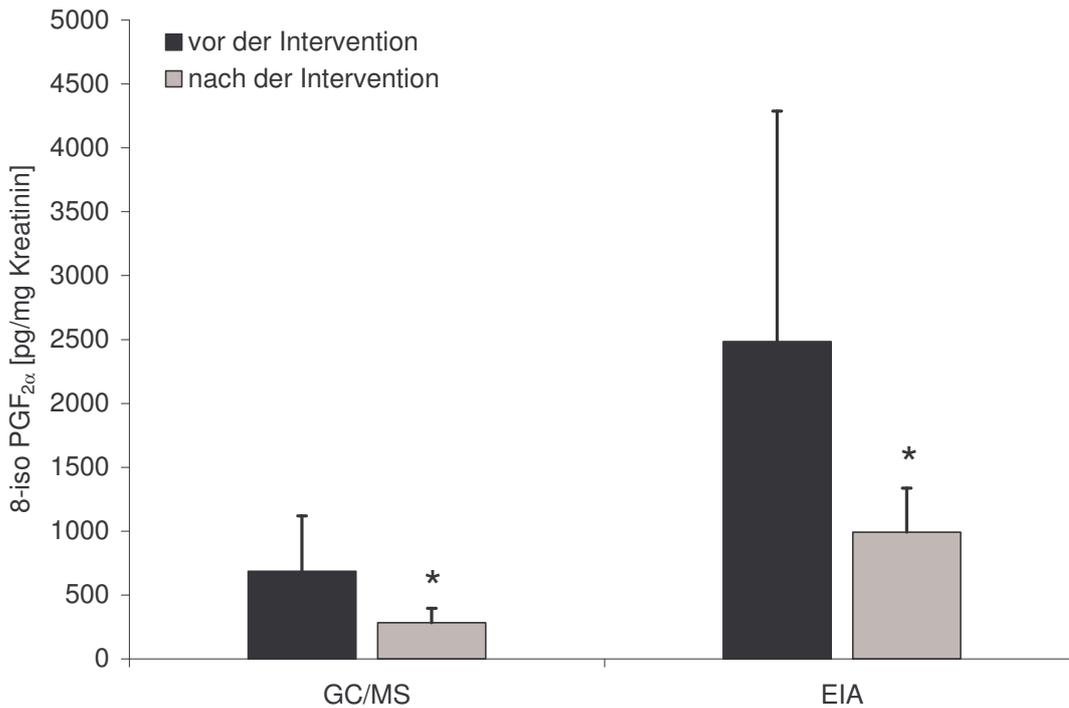


Abb. 4-25: 8-iso PGF_{2α}-Konzentrationen vor und nach Lycopinintervention im Urin nach GC/MS- und EIA-Messung. * P-Wert <0,05 verglichen vor und nach der Intervention.

Wie die Fehlerbalken zeigen, gab es große individuelle Unterschiede in den 8-iso PGF_{2α}-Gehalte der acht Probanden, die nach der Intervention nicht mehr ganz so stark ausgeprägt waren. Die Gehalte reichten vor der Intervention von 231 bis 1447 pg/mg Kreatinin bzw. von 1018 bis 5706 pg/mg Kreatinin im EIA und nach der Intervention von 147 bis 450 pg/mg Kreatinin bzw. von 585 bis 1546 pg/mg/Kreatinin. Sehr auffällig waren die etwa 3,5-fach höheren 8-iso PGF_{2α}-Gehalte nach EIA-Messung im Vergleich zur GC/MS-Messung (s. dazu 4.4.5.4). Bei beiden Messungen waren die Gehalte nach der Intervention signifikant niedriger als vor der Intervention (P-Werte <0,05). Sie sanken durch die Intervention von 685 ± 435 bzw. 2484 ± 1804 pg/mg Kreatinin im EIA auf 284 ± 112 bzw. 991 ± 345 pg/mg Kreatinin um etwa 60%.

4.4.5.3 Bestimmung von 8-iso PGF_{2α} im Plasma mit IAC und GC/MS/MS sowie mit EIA

Da die Reproduzierbarkeit der Bestimmung mittels GC/MS/MS im Plasma mit einem Variationskoeffizienten von 14% bei den niedrigen Plasmawerten akzeptabel war, wurde das 8-iso PGF_{2α} auch im Plasma der Probanden bestimmt. Wie bei den Urinproben wurden auch die Plasmaproben zum Vergleich zusätzlich mit dem EIA gemessen (s. Abb. 4-26). Da dies

vor Beginn der Humanstudie so nicht geplant war, konnte für die EIA-Messung nur das Plasma von fünf Probanden verwendet werden, da bei drei der Probanden nicht mehr genügend vorhanden war.

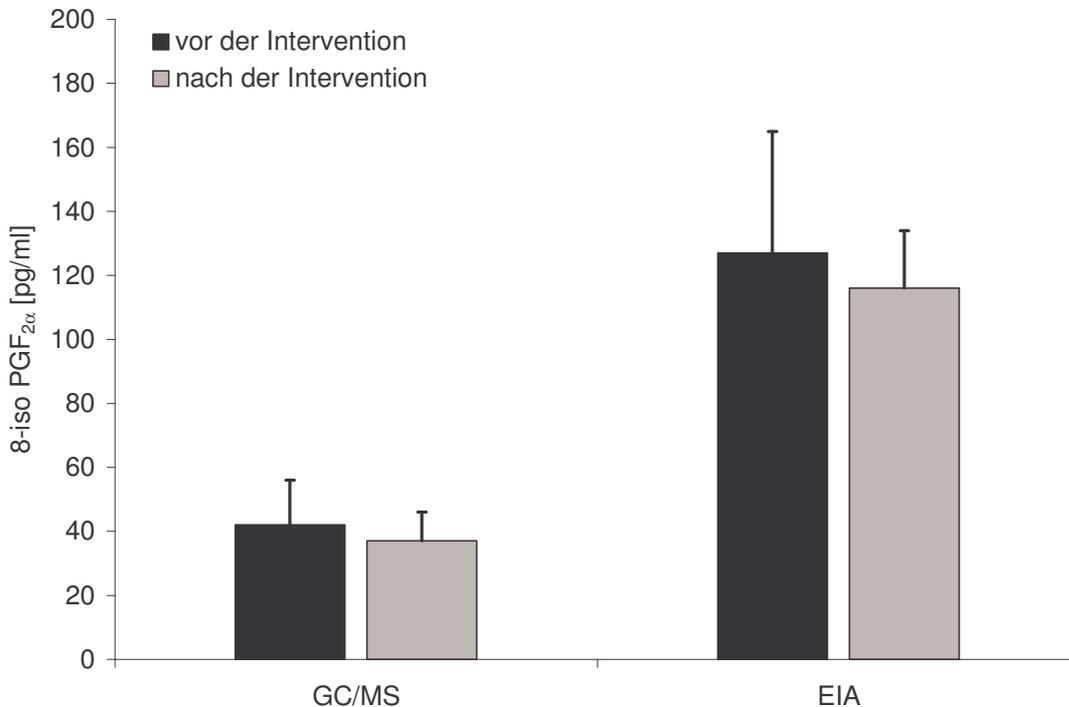


Abb. 4-26: 8-iso PGF_{2α}-Konzentrationen vor und nach Lycopinintervention im Plasma nach GC/MS/MS- und EIA-Messung.

Die 8-iso PGF_{2α}-Gehalte der Probanden lagen vor der Intervention zwischen 25 und 67 pg/ml bzw. zwischen 82 und 173 pg/ml nach EIA-Messung. Nach der Intervention lagen die Gehalte zwischen 25 und 51 pg/ml bzw. zwischen 85 und 129 pg/ml. Die individuellen Unterschiede waren wie im Urin auch hier nach der Intervention nicht mehr ganz so groß wie vor der Intervention. Die 8-iso PGF_{2α}-Gehalte nach der EIA-Messung waren etwa dreifach höher als die Werte nach GC/MS/MS-Messung (s. dazu 4.4.5.4). Die Gehalte nach der Intervention waren zwar nach beiden Messungen durchschnittlich um etwa 12% niedriger, jedoch nicht signifikant (P-Wert 0,14 bzw. 0,44). Sie sanken von 42 ± 14 bzw. 127 ± 38 pg/ml im EIA auf 37 ± 9 bzw. 116 ± 18 pg/ml.

4.4.5.4 Vergleich der 8-iso PGF_{2α}-Gehalte nach GC/MS/(MS)-Messung mit denen des EIA

Beim Vergleich der entsprechenden Messwerte der beiden Methoden miteinander ergab sich eine Korrelation von $r=0,940$ für die Werte im Urin und eine Korrelation von $r=0,848$ für die Werte im Plasma (s. Abb. 4-27 und Abb. 4-28). Die Korrelation der Messwerte im Urin war also etwas größer als die der Werte im Plasma.

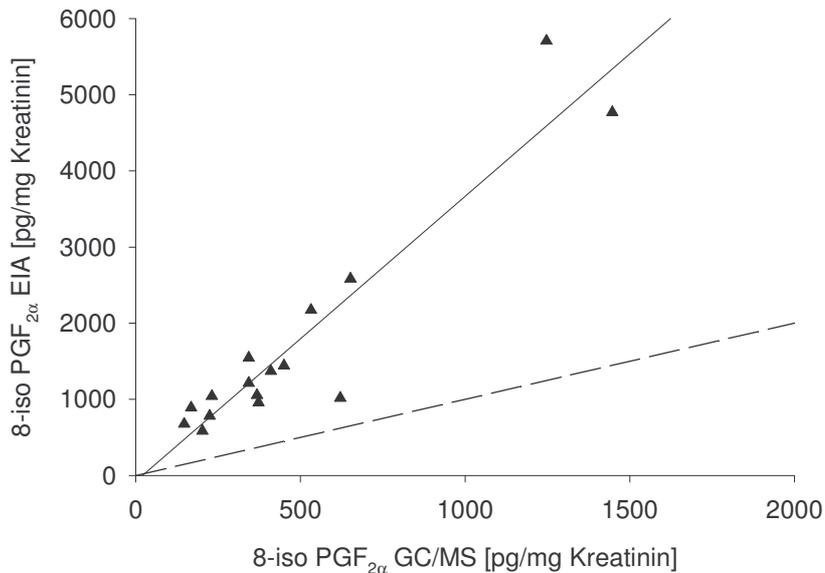


Abb. 4-27: Korrelation der Messergebnisse für 8-iso PGF_{2α} im Urin nach Messung mit GC/MS und EIA. — Regressionsgerade: $y=3,7x - 76,2$; $r=0,940$, ---- Gerade: $y=x$.

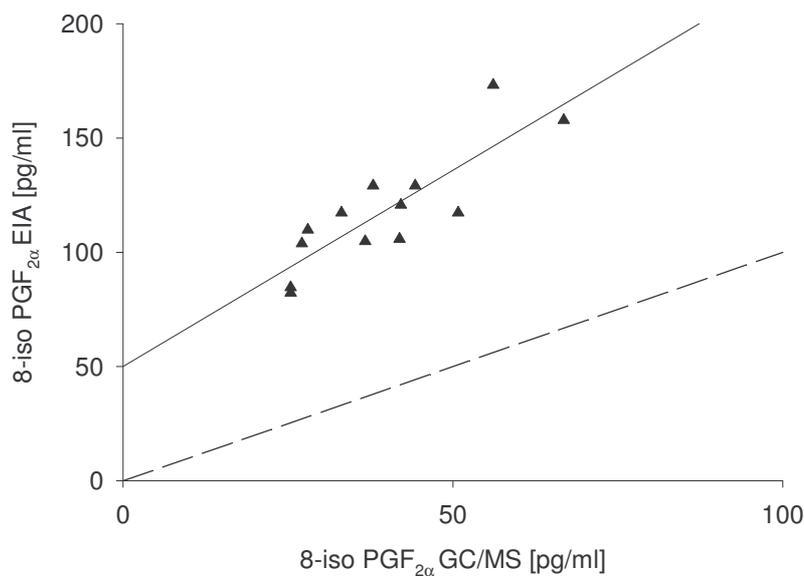


Abb. 4-28: Korrelation der Messergebnisse für 8-iso PGF_{2α} im Plasma nach Messung mit GC/MS/MS und EIA. — Regressionsgerade: $y=1,7x + 50$; $r=0,848$, ---- Gerade: $y=x$.

Die 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Werte im Urin, die mit EIA gemessen wurden, waren im Durchschnitt um etwas das 3,5-fach höher, die Werte im Plasma um etwa das 3-fache. Optimalerweise müssten die Messwerte auf den gestrichelten Geraden $y=x$ in den Abbildungen liegen, denn dann wären die Ergebnisse nach GC/MS und EIA identisch.

4.4.5.5 Bestimmung von Malondialdehyd (MDA) im Urin und Plasma

Zum Vergleich des 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ mit einem anderen Marker für oxidativen Stress wurde bei allen Probanden das MDA im Urin und Plasma bestimmt (s. Abb. 4-29).

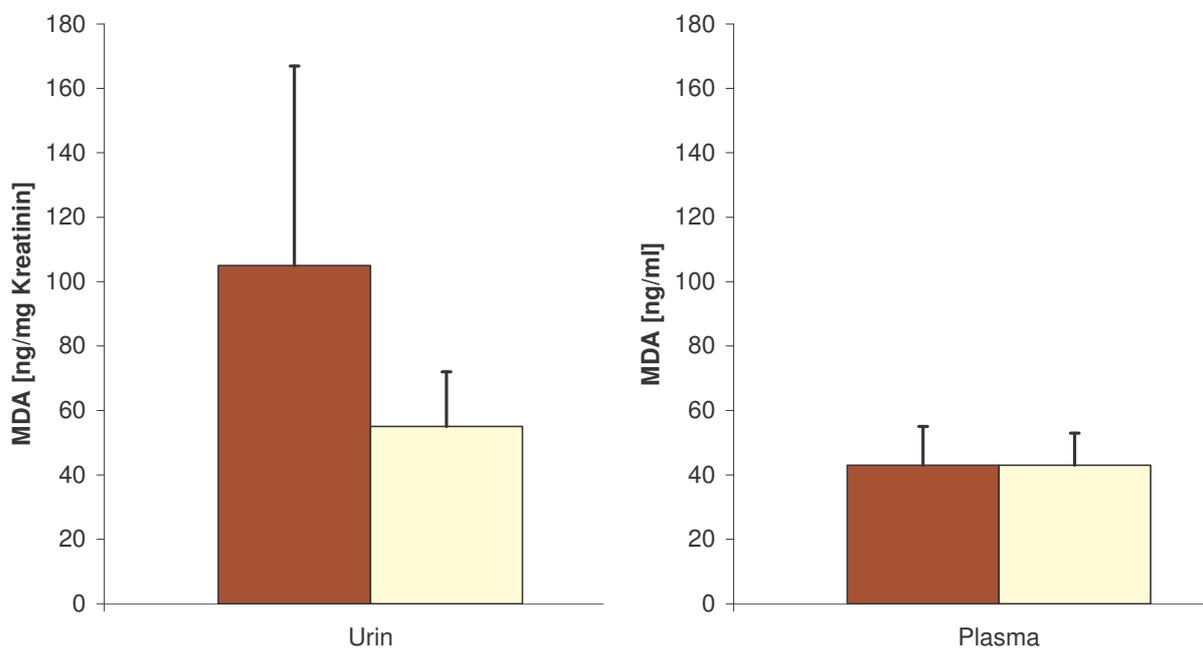


Abb. 4-29: MDA-Gehalte im Urin und Plasma vor (■) und nach (□) Lycopinintervention.

Bei den MDA-Gehalten zeigten sich im Urin ebenfalls deutliche individuelle Unterschiede, die nach der Intervention nicht mehr so ausgeprägt waren. Die Gehalte lagen zwischen 57 und 247 ng/mg Kreatinin vor der Intervention und zwischen 35 und 83 ng/mg Kreatinin nach der Intervention. Durch die Intervention sanken die MDA-Gehalte um etwa die Hälfte von 105 ± 63 auf 55 ± 17 ng/mg Kreatinin. Dies war jedoch nur in der Tendenz signifikant (P-Wert 0,066). Sie waren insgesamt etwa 150-fach bzw. 40-fach (EIA) höher als die 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gehalte.

Die Intervention hatte dagegen keinen Einfluss auf die MDA-Gehalte im Plasma, denn diese waren vor und nach der Intervention gleich (44 ± 12 bzw. 43 ± 11 ng/ml). Die individuellen Unterschiede waren nicht so stark ausgeprägt wie im Urin und vor und nach der Intervention etwa gleich. Vor der Intervention lagen die Gehalte zwischen 33 und 67 ng/ml und nach der

Intervention zwischen 33 und 58 ng/ml. Sie unterschieden sich zwischen den Probanden maximal um Faktor zwei. Die MDA-Gehalte waren etwa 1000-fach bzw. 360-fach (EIA) höher als die 8-iso PGF_{2α}-Gehalte.

4.4.5.6 Vergleich der MDA-Gehalte mit den 8-iso PGF_{2α}-Gehalten nach GC/MS/(MS)-Messung im Urin und Plasma

Werden die entsprechenden Messwerte für MDA mit denen für 8-iso PGF_{2α} miteinander verglichen, so ergibt sich eine Korrelation von $r=0,821$ für die Werte im Urin und eine Korrelation von $r=0,589$ für die Werte im Plasma (s. Abb. 4-30 und Abb. 4-31).

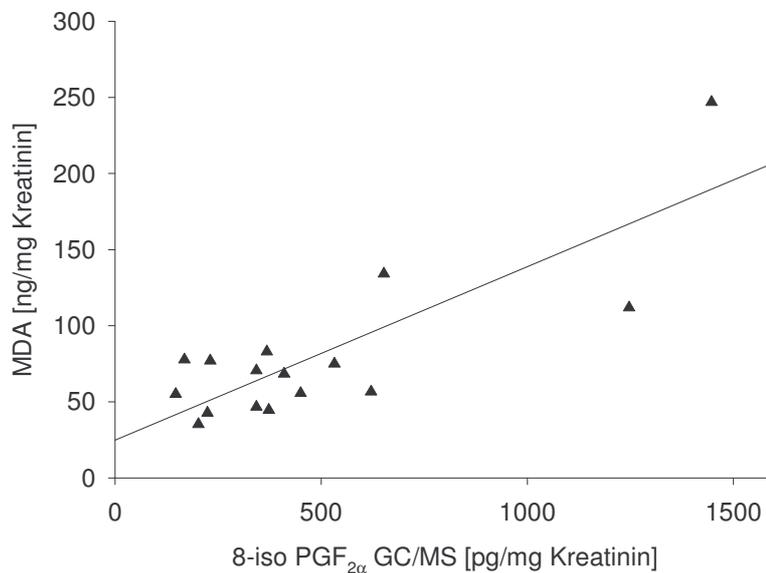


Abb. 4-30: Vergleich der MDA-Gehalte im Urin mit den nach 8-iso PGF_{2α}-Gehalten nach Messung mit GC/MS. — Regressionsgerade: $y = 0,11x + 24,8$; $r = 0,821$.

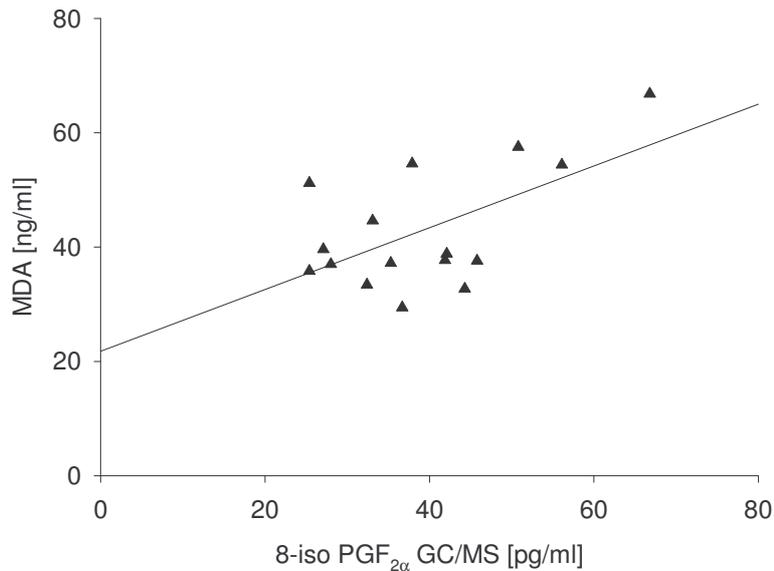


Abb. 4-31: Vergleich der MDA-Gehalte im Plasma mit den nach 8-iso PGF_{2α}-Gehalten nach Messung mit GC/MS/MS. — Regressionsgerade: $y = 0,54x + 21,8$; $r = 0,589$.

Es zeigt sich auch hier eine bessere Korrelation für die Messungen im Urin als für die Messungen im Plasma. Dies war zu erwarten, da sich die MDA-Gehalte im Plasma durch die Intervention völlig anders geändert haben als im Urin. Die MDA-Werte im Urin sind im Durchschnitt um das 150-fache höher als die 8-iso PGF_{2α}-Gehalte und im Plasma um das 1000-fache. Es muss berücksichtigt werden, dass die MDA-Gehalte jeweils in ng angegeben, die 8-iso PGF_{2α}-Gehalte dagegen in pg.

5 Diskussion

5.1 Analyse verschiedener Tomatensorten

Die Ergebnisse der Untersuchungen der 20 verschiedenen Tomatensorten auf ihre Gehalte an Carotinoiden, Tocopherolen, Fruchtsäuren und Phenolsäuren zeigen, dass sich die verschiedenen Sorten zum Teil erheblich in den jeweiligen Gehalten unterscheiden.

Die Carotinoid-Gehalte der gelben und grünen Tomaten liegen deutlich unter denen der roten und rot-grünen Sorten. In allen roten und rot-grünen Sorten überwiegt Lycopin mit Gehalten von 1,9 bis 9,4 mg/100 g Nassgewicht. Die weiteren Carotinoide kommen in deutlich geringeren Mengen vor und unterscheiden sich ebenfalls in ihren Gehalten (Phytoen 0,5-1,3, Phytofluen 0,05-0,4, β -Carotin 0,1-0,8, Lutein 0,04-0,3, Lycopin-1,2-epoxid 0,04-0,2 und 2,6-Cyclolycopin-1,5-diol 0,01-0,05 mg/100 g Nassgewicht). Wird Lycopin außer Betracht gelassen, kann keine allgemeine Reihenfolge für das Vorkommen der weiteren Carotinoide aufgestellt werden, da diese in den verschiedenen Sorten unterschiedlich ist. Die für die roten und rot-grünen Tomatensorten bestimmten Carotinoid-Gehalte stimmen sehr gut mit den in der Literatur beschriebenen Gehalten überein (s. Tab. 1-1). Die Carotinoide ζ -Carotin, γ -Carotin und Neurosporin, die auch in Tomaten vorkommen, konnten zwar nachgewiesen aber nicht quantifiziert werden. Sie koeluiieren bei der HPLC-Trennung mit anderen Carotinoiden, die in größerer Menge enthalten sind bzw. während der aufwändigen Carotinoid-Extraktion entstehen. ζ -Carotin koeluiert mit β -Carotin, γ -Carotin und Neurosporin koeluiieren mit 13-*cis* Lycopin.

Die α - und γ -Tocopherol-Gehalte liegen zwischen 0,4 und 2,2 bzw. zwischen 0,05 und 1,1 mg/100 g Nassgewicht. Die Höchstgehalte liegen damit um Faktor zwei höher als in der Literatur bisher beschrieben. Abushita et al. (2000) bestimmten in 30 verschiedenen roten Tomatensorten α -Tocopherol mit Gehalten von 0,1 bis 1,1 mg/100g Nassgewicht und γ -Tocopherol mit Gehalten von 0,09 bis 0,5 μ g/100 g. In „Zusammensetzung der Lebensmittel“ (Souci, Fachmann, Kraut, 2000) ist für α -Tocopherol eine Schwankungsbreite von 0,3 bis 1,2 und für γ -Tocopherol ein Mittelwert von 0,1 mg/100 g Nassgewicht angegeben.

Die durch enzymatische Bestimmung ermittelten Gehalte von 19 bis 102 mg/100 g Nassgewicht für L-Äpfelsäure (20-230 mg/100 g) und von 238 bis 611 mg/100 g für Zitronensäure (130-680 mg/100g) sowie die Gehalte der Zucker Glucose und Fructose von 2,0 bis 2,4 g/100 g (2,1-3,3 g/100 g) und Saccharose von 45 bis 170 mg/100 g Nassgewicht (7-140 mg/100 g) liegen ebenfalls in den in der Literatur beschriebenen Bereichen. Die Werte aus Souci, Fachmann, Kraut (2000) sind in Klammern angegeben.

Auch die Gehalte der freien Phenolsäuren, Flavonoide und deren Konjugate sowie der Gesamtphenolsäure- bzw. Flavonidgehalt nach Hydrolyse stimmen gut mit den Literaturwerten überein, wie ein Vergleich in Tab. 5-1 zeigt.

Tab. 5-1: Gehalte von Phenolsäure, Flavonoide und deren Konjugate im Tomatenextrakt sowie nach Hydrolyse in die Aglykone in mg/100 g Nassgewicht.

Verbindung	Schmidtlein et al., 1975	Matilla et al., 2002	Winter et al., 1986	Herrmann, 1989
Chlorogensäure		2,4 ± 0,1	1,2 - 3,1	1,2 - 7,1
Cryptochlorogensäure		1,2 ± 0,06	0,5 - 1,1	0,6 - 1,1
Kaffeesäure		0,15 ± 0,02		
Ferulasäure				
<i>p</i> -Cumarsäure				
<i>p</i> -Cumarsäure gesamt	0,8 - 1,6	0,95 ± 0,07		
Ferulasäure gesamt	0,2 - 0,7	0,3 ± 0,02		
<i>p</i> -Cumaroylglucose			0,6 - 1,9	0,4 - 1,9
Kaffeesäureglucosid			2,1 - 4,8	1,5 - 4,8
<i>p</i> -Cumarsäureglucosid			1,9 - 6,8	1,9 - 6,8
Ferulasäureglucosid			0,8 - 1,5	0,8 - 1,5

Verbindung	Minoggio et al., 2003	Mauri et al., 1999	Raffo et al., 2002	Ergebnisse dieser Arbeit
Chlorogensäure	0,2 ± 0,03		0,9	0,04 - 8,1
Cryptochlorogensäure				0,3 - 1,6
Kaffeesäure	0,03 ± 0,01		0,13	0,1 - 0,6
Ferulasäure	0,01 ± 0,01		0,12	0,1 - 0,7
<i>p</i> -Cumarsäure			0,30	0,1 - 0,7
<i>p</i> -Cumarsäure gesamt				0,2 - 4,3
Ferulasäure gesamt				0,3 - 1,1
<i>p</i> -Cumaroylglucose				
Kaffeesäureglucosid				0,2 - 4,6
<i>p</i> -Cumarsäureglucosid				0,1 - 5,3
Ferulasäureglucosid				
Rutin	0,74 ± 0,12	6,8 ± 0,3	0,40	0,1 - 1,9
Rutinpentosid	0,32 ± 0,06	2,3 ± 0,2		0,06 - 1,2
Naringenin	0,68 ± 0,16			0,0 - 0,8
Naringenin gesamt			3,2	0,01 - 2,8

Die von Mauri et al. (1999) beschriebenen Werte für Rutin und Rutinpentosid erscheinen im Vergleich etwas hoch. Häufig werden diese beiden Verbindungen nicht als solche, sondern nach Hydrolyse als Quercetin quantifiziert (Stewart et al., 2000; Crozier et al., 1997). Werden die hier bestimmten Werte über die Molmassen umgerechnet und als Quercetin quantifiziert (0,1-1,4 mg/100 g Nassgewicht), so stimmen diese gut mit den Werten von Stewart et al. und Crozier et al. (0,1-1,3 bzw. 0,2-1,1 mg/100 g Nassgewicht) überein.

Bei der Analyse der Tomatensorten ist insbesondere die Cherrytomate Tomatito de Jalapa aufgefallen. Sie weist die höchsten Carotinoid-, Tocopherol- und Zitronensäure-Gehalte auf

und enthält mit 8 mg/100 g Nassgewicht etwa zehnmal mehr Chlorogensäure als alle untersuchten Tomatensorten durchschnittlich enthalten.

5.2 Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Lycopin bei verschiedenen Tiermodellen und beim Mensch

5.2.1 Tiermodell präruminantes Kalb

Nach der Intervention mit Lyc-O-Mato und LycoVit konnten in beiden Gruppen im Plasma *all-trans* Lycopin, *5-cis* Lycopin sowie drei Lycopinmetabolite detektiert werden. Zudem wurde β -Carotin nachgewiesen, dass aus der Nahrung der Tiere stammen muss, da dieses auch schon vor der Intervention im Plasma detektiert wurde. Bei den drei Metaboliten handelt es sich wahrscheinlich um Verbindungen, die durch Reduktion aus *all-trans* bzw. *5-cis* Lycopin gebildet wurden. Da keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen und es nicht gelungen ist, sie *in vitro* mit Pansensaft oder Lebercytosol herzustellen, bleibt die Frage nach ihrer Entstehung weiterhin unbeantwortet. Es könnte sein, dass die Metabolite entweder bereits im Dünndarm durch spezifische Reduktasen gebildet werden oder erst im Dickdarm durch die Darmflora. Oshima et al. (1999) konnten in Ratten zeigen, dass Lycopin sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm resorbiert wird. Eine Resorption der Metabolite wäre also im Dünndarm und Dickdarm möglich. Aufgrund der erhaltenen UV/VIS-Spektren und Molekülmassen können für alle drei Metabolite Strukturvorschläge gemacht werden, die in Kapitel 5.2.2 vorgestellt werden. Eine genaue Strukturaufklärung mittels LC/NMR ist nicht gelungen.

Die höchsten Lycopinplasmakonzentrationen wurden bei den Kälbern einen Tag nach der letzten Lycopingabe gemessen. An den darauf folgenden Tagen nahm die Konzentration stetig ab. Eine Woche nach der letzten Lycopingabe konnte kein Lycopin mehr im Plasma detektiert werden. Dass die höchsten Lycopinplasmaspiegel nicht am Tag der letzten Lycopingabe sondern erst einen Tag danach gemessen wurden, scheint auf den ersten Blick ungewöhnlich. Es ist jedoch vorstellbar, dass durch eine weitere Futteraufnahme am Tag nach der letzten Lycopingabe noch im Darmlumen vorhandenes, bis zu diesem Zeitpunkt nicht resorbiertes Lycopin, zusammen mit neuem Nahrungsfett resorbiert wird und in den Blutkreislauf gelangt. Dies würde die Erhöhung der Lycopinkonzentration im Plasma auch ohne erneute Lycopingabe erklären. Eine ähnliche Beobachtung konnte in einer Humanstudie, in der Produkte einer Lycopinkarotte verabreicht wurden, gemacht werden. Dort stieg die Lycopinkonzentration in den Chylomikronen nach einer weiteren

Nahrungsaufnahme ohne Lycopin erneut an. Dazu muss die Verweildauer des Lycopins im Magen-Darm-Trakt zumindest gleichlang oder länger sein als die Zeit bis zur nächsten Futteraufnahme. Bei einer Einmalgabe von Lycopin wurde die höchste Plasmakonzentration erst 16 Stunden nach der Verabreichung des Lycopins gemessen, was auf eine deutlich verzögerte Plasmaantwort schließen lässt (Bierer et al., 1995).

Mit präruminanten Kälbern wurden bisher keine Interventionsstudien über einen längeren Zeitraum mit Lycopin oder anderen Carotinoiden durchgeführt. Ein Literaturvergleich ist dahingehend also nicht möglich. In einer Studie, in der eine Einmalgabe von Lycopin erfolgte, wurden weder *cis*-Isomere des Lycopins unterschieden noch eventuelle Metabolite (Bierer et al., 1995).

Ein überraschendes Ergebnis dieser Studie waren die deutlichen Unterschiede der Lycopinplasmakonzentrationen der beiden Interventionsgruppen. Die Konzentrationen der LycoVit-Gruppe waren etwa viermal höher als die der Lyc-O-Mato-Gruppe. Werden die Lycopinplasmaspiegel als Maß für die Bioverfügbarkeit verwendet, so ist LycoVit mit synthetisch hergestelltem Lycopin beim präruminanten Kalb viermal besser bioverfügbar als Lyc-O-Mato mit Lycopin natürlichen Ursprungs. Dieser Aspekt wird in Kapitel 5.2.6 gesondert diskutiert.

5.2.2 Struktur der Lycopinmetabolite beim präruminanten Kalb

Die Metabolite b und c zeigen ein um 17 nm hypsochrom verschobenes UV/VIS-Spektrum im Vergleich zum *all-trans* Lycopin und eine um zwei Masseneinheiten höhere Molekülmasse. Aufgrund dieser Eigenschaften liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Reduktionsprodukte handelt, die eine konjugierte Doppelbindung weniger als *all-trans* Lycopin besitzen (s. Kapitel 4.3.1.2). Da *all-trans* Lycopin ein symmetrisches Molekül ist und kein Stereozentrum besitzt, wären als Reduktionsprodukte in diesem Fall zwei Enantiomere möglich, 5(*R*),6- und 5(*S*),6-Dihydrolycopin, da das C-Atom 5 durch die Reduktion zum Stereozentrum wird (s. Abb. 5-1). Diese beiden Enantiomere wären allerdings auf der HPLC-Säule nicht zu trennen. Da im Chromatogramm jedoch zwei Metabolite mit ähnlichen Eigenschaften zu detektieren sind, die ähnlich wie *all-trans* Lycopin und 5-*cis* Lycopin nicht auf der HPLC-Säule getrennt werden, wäre es gut vorstellbar, dass einer der beiden Metabolite aus 5-*cis* Lycopin gebildet wird. Als Reduktionsprodukte von 5-*cis* Lycopin wären ebenfalls zwei Enantiomere denkbar, 5'(*R*),6'- und 5'(*S*),6'-Dihydro-5-*cis*-lycopin (s. Abb. 5-2).

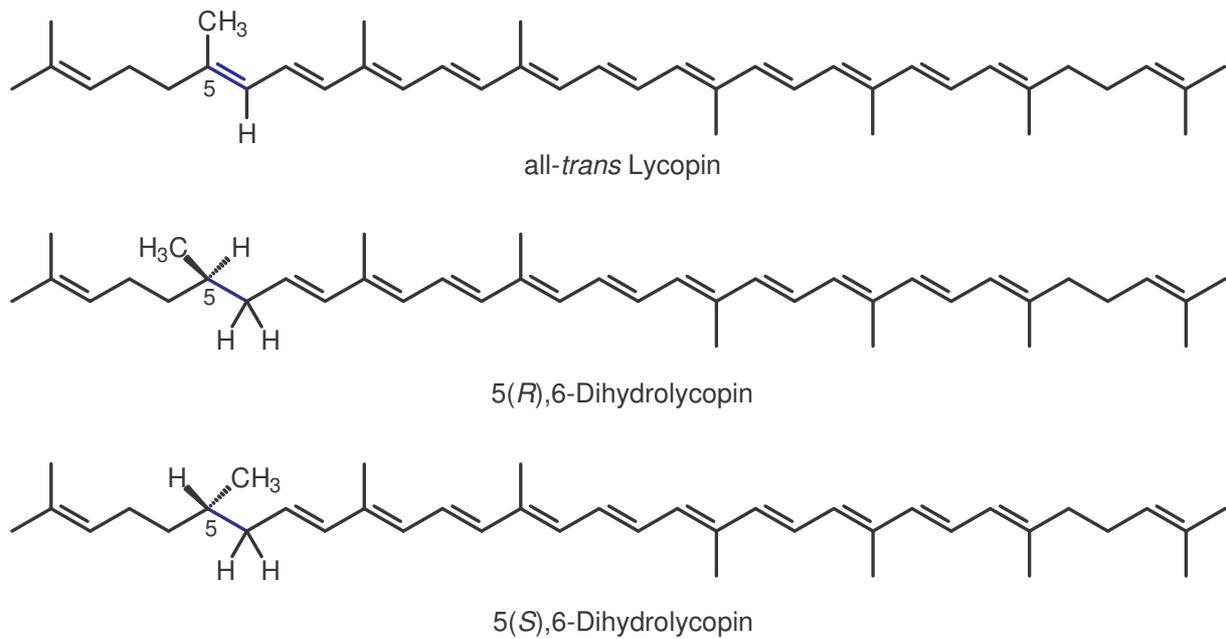


Abb. 5-1: Strukturvorschläge für die Metaboliten b und c: 5(*R*),6- und 5(*S*),6-Dihydrolycopin im Vergleich zum all-*trans* Lycopin.

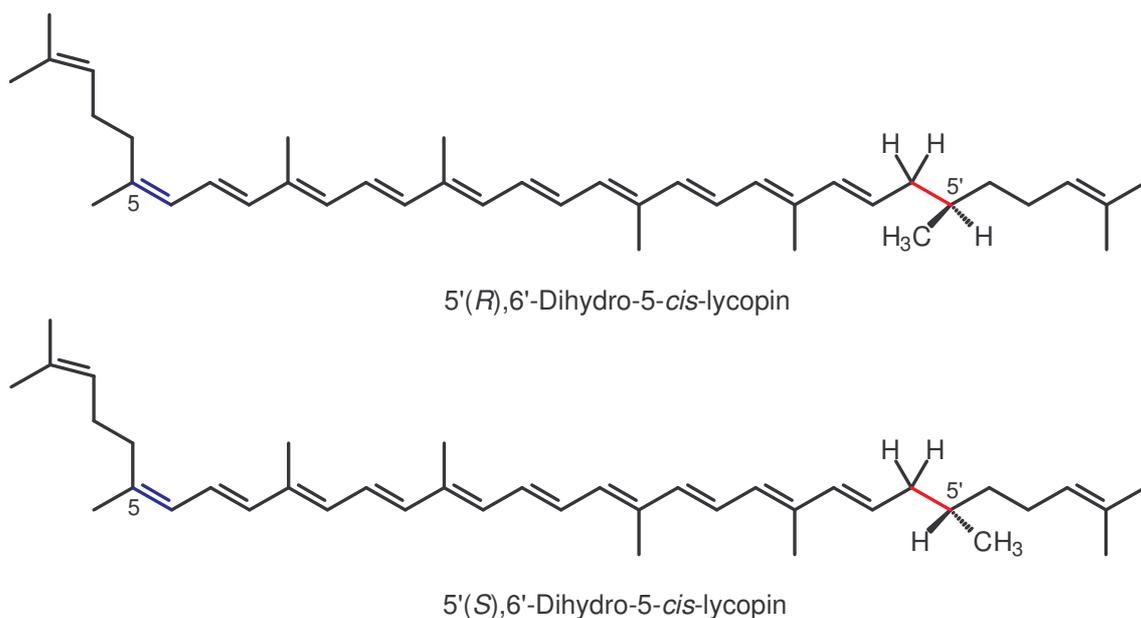


Abb. 5-2: Strukturvorschläge für die Metaboliten b und c: 5'(*R*),6'- und 5'(*S*),6'-Dihydro-5-*cis*-lycopin.

Der Metabolit a besitzt ein um 34 nm hypsochrom verschobenes UV/VIS-Spektrum im Vergleich zum all-*trans* Lycopin und eine um vier Masseneinheiten höhere Molekülmasse. Für den Metaboliten a, der wahrscheinlich durch Reduktion zweier Doppelbindungen aus all-*trans* Lycopin entsteht, besteht die Möglichkeit, dass die zweite Reduktion an Position 7 und 8 erfolgt oder an Position 5' und 6'. Im ersten Fall wären wiederum zwei Enantiomere denkbar, 5(*R*),6,7,8- und 5(*S*),6,7,8-Tetrahydrolycopin. Würde die zweite Reduktion an

Position 5' und 6' erfolgen, so gäbe es insgesamt drei mögliche Reduktionsprodukte: Zwei Enantiomere, 5(*R*),6,5'(*R*),6'- und 5(*S*),6,5'(*S*),6'-Tetrahydrolycopin, und eine *meso*-Verbindung.

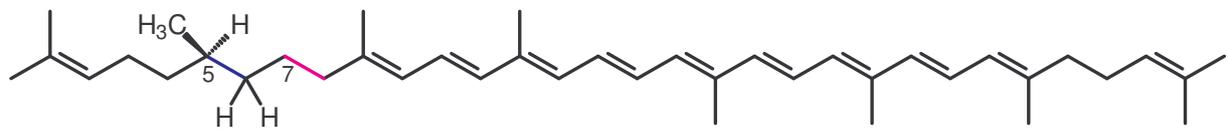
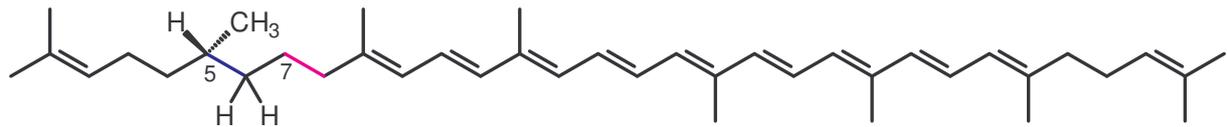
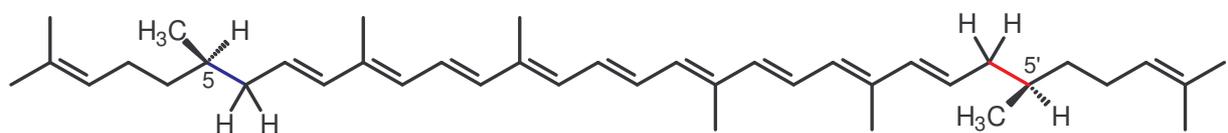
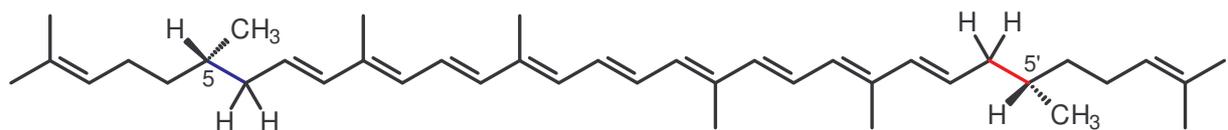
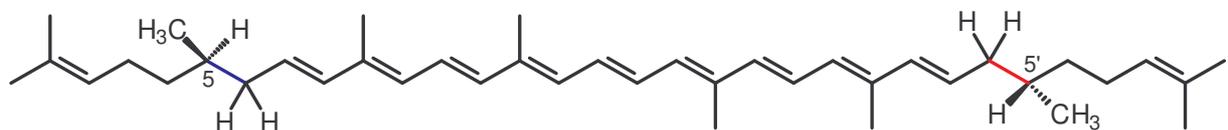
5(*R*),6,7,8-Tetrahydrolycopin5(*S*),6,7,8-Tetrahydrolycopin5(*R*),6,5'(*R*),6'-Tetrahydrolycopin5(*S*),6,5'(*S*),6'-Tetrahydrolycopin*meso*-5,6,5',6'-Tetrahydrolycopin

Abb. 5-3: Strukturvorschläge für den Metaboliten a.

Es ist denkbar, dass der Metabolit a statt aus *all-trans* Lycopin aus 5-*cis* Lycopin gebildet wird. In diesem Fall wären nur zwei Enantiomere möglich, 5'(*R*),6',7',8'- und 5'(*S*),6',7',8'-5-*cis*-Tetrahydrolycopin (s. Abb. 5-4).

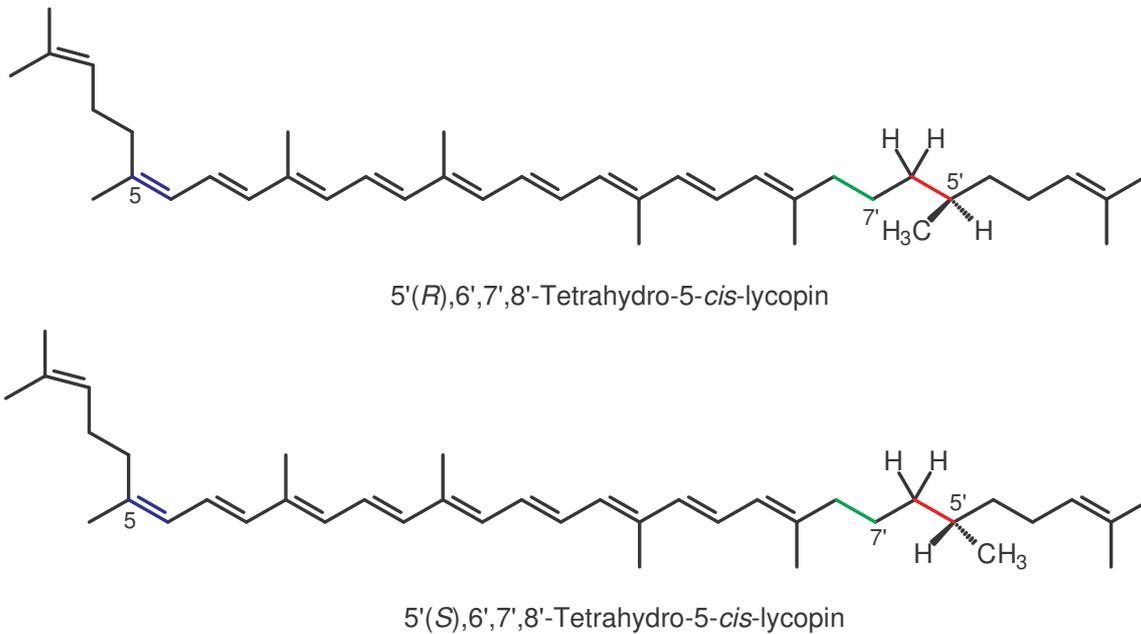


Abb. 5-4: Strukturvorschläge für den Metaboliten a.

Für die Metaboliten b und c wären also insgesamt vier Stereoisomere bzw. zwei Diastereomere, 5,6-Dihydrolycopin und 5',6'-Dihydro-5-*cis*-lycopin, möglich. Diese beiden Verbindungen würden mit der zur Analytik verwendeten HPLC-Säule getrennt werden und könnten daher den beiden detektierten Peaks im Chromatogramm entsprechen. Um aufzuklären, ob es sich bei den Verbindungen um das *R*- oder *S*-Enantiomer handelt, müsste einer Trennung mit einer chiralen HPLC-Säule erfolgen.

Für den Metaboliten a kommen insgesamt sieben Stereoisomere bzw. vier Diastereomere in Frage. Es ist jedoch nur ein Peak im Chromatogramm zu detektieren. Eine Zuordnung kann daher nicht erfolgen.

Die genaue Aufklärung der Struktur der Metabolite könnte entweder über die Messung mit NMR erfolgen, was sich als sehr schwierig erwies, oder über einen Vergleich der Metabolite mit Referenzsubstanzen, die zunächst in einer aufwändigen Synthese hergestellt werden müssten.

5.2.3 Tiermodell Ratte

Nach der Lycopinintervention bei der männlichen Wistar-Ratte mit einer Dosis von 5 mg Lycopin/kg Körpergewicht über einen Zeitraum von 14 Tagen konnte nur in der LycoVit-Gruppe im Plasma all-*trans* und 5-*cis* Lycopin in sehr geringen Konzentrationen von durchschnittlich 2,3 nmol/l detektiert werden. Die gemessenen Konzentrationen im Hauptversuch waren geringer als nach dem Vorversuch erwartet. Es bestätigte sich im Hauptversuch die niedrige Plasmakonzentration einer Ratte und nicht die erheblich höhere

Konzentration, die bei zwei Ratten auftrat. In der Lyc-O-Mato-Gruppe konnte kein Lycopin detektiert werden, da die Konzentrationen vermutlich unter der Nachweisgrenze lagen. In der Leber konnte in beiden Interventionsgruppen *all-trans*, *5-cis*, *9-cis* und *13-cis* Lycopin detektiert werden. Zudem wurde β -Carotin nachgewiesen, das aus der Nahrung oder dem Streu in den Käfigen der Tiere stammen muss, da dies in gleicher Konzentration auch in den Tieren der Kontrollgruppe detektiert wurde. Die Lycopinisomere *9-cis* und *13-cis* können entweder wie das *5-cis* Isomer *in vivo* oder bei der Extraktion gebildet worden sein, denn *all-trans* Lycopin ist sehr empfindlich und isomerisiert sehr leicht zum *9-* bzw. *13-cis* Lycopin.

Die Gesamtyycopin-Gehalte unterschieden sich in beiden Interventionsgruppen erheblich voneinander. In der Leber der LycoVit-Gruppe konnten durchschnittlich 27-fach höhere Gehalte gemessen werden als in der Lyc-O-Mato-Gruppe, was auf eine wesentlich bessere Aufnahme von LycoVit hindeutet.

Interventionsstudien mit einem ähnlichen Versuchsdesign sind bislang nicht in der Literatur beschrieben. Auch ein Vergleich mit anderen Lycopin-Interventionsstudien ist schwierig, da meist mehrere Parameter wie z. B. Rattenstamm, Dauer oder Dosis nicht übereinstimmen (s. Tab. 5-2). Die Studie in dieser Arbeit zeigt aber deutlich, dass vor allem die Form der Supplementierung eine wichtige Rolle spielt.

Tab. 5-2: Vergleich verschiedener Interventionstudien mit Lycopin bei Ratten. Literatur: 1 Breinholt et al., 2000, 2 Boileau et al., 2000, 3 Zhao et al., 1998, 4 Ferreira et al., 2000.

Literatur	Stamm	Geschlecht	Supplement	Dauer [Wochen]	Dosis [mg/kg KG]
1	Wistar	weiblich	Lycopin in Maisöl	2	5
2	F344	männlich	10% wasserdisp. beadlets	8	2,6
3	F344	männlich	Betaten	10	3,8
4	F344	männlich	Lyc-O-Mato in Maisöl	9	4,6

Literatur	Gabe	Gesamtyycopin in	
		Plasma oder Serum [nM]	Leber [ng/g]
1	Schlundierung	32 ± 10	
2	Futter	82 ± 30	8590 ± 2147
3	Futter	318 ± 91	4200
4	oral	22,4 ± 9,3	5648 ± 604

Breinholt et al., die Lycopin in kristalliner Form vermischt mit Maisöl zwei Wochen lang verabreicht haben, beschreiben Lycopinplasmakonzentrationen von 32 ± 10 nmol/l, was etwa dem 14-fachen der Plasmakonzentration der Studie dieser Arbeit entspricht. Dagegen detektierten Ferreira et al. auch nach einer neunwöchigen Intervention mit Lyc-O-Mato, das mit Maisöl vermischt verabreicht wurde, nur Plasmakonzentrationen von $22,4 \pm 9,3$ nmol/l. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass zumindest Lyc-O-Mato schlechter bioverfügbar ist als kristallines Lycopin.

Die Lycopingehalte, die in diesen Interventionsstudien in der Leber gemessen wurden, liegen deutlich über den Konzentrationen dieser Arbeit (Lyc-O-Mato-Gruppe 82 ± 38 ng/g, LycoVit-Gruppe 2247 ± 324 ng/g). Dies liegt vermutlich an der Dauer der Intervention, die mit acht bis zehn Wochen viel länger war.

Boileau et al. (2000) untersuchten auch das Verhältnis der Lycopinisomere in Serum und Leber. Sie beschreiben einen steigenden Anteil der *cis*-Isomere mit steigender Dosis. Bei einer Dosis von 1 mg Lycopin/Tag lag der Anteil der *cis*-Isomere im Serum bei 60%, bei einer Dosis von 100 mg/Tag deutlich höher bei 74%. In der Studie dieser Arbeit wurde in der LycoVit-Gruppe ein Anteil von 61% im Plasma bei einer Dosis gemessen, die etwa 1 mg/Tag entsprach, was demnach gut übereinstimmt. Ferreira et al. (2000) dagegen detektierten einen Anteil von 75% *cis*-Isomere im Plasma bei einer vergleichbaren Dosis.

In der Leber lag in der Studie dieser Arbeit in der LycoVit-Gruppe der Anteil des all-*trans* Lycopins bei 41% und der Anteil des 5-*cis* Isomers bei 46%, was sehr gut mit den von Boileau et al. beschriebenen Werten von 37% bzw. 44% übereinstimmt. In der Lyc-O-Mato-Gruppe dagegen lag der Anteil des all-*trans* Lycopins bei 28% und der des 5-*cis* bei 38%, was sich stark von dem von Ferreira et al. beschriebenen all-*trans* Anteil von 72% unterscheidet. In dieser Literatur wird das 5-*cis* Isomer nicht erwähnt, was möglicherweise daran liegt, dass es nicht vom all-*trans* Lycopin getrennt werden konnte. Werden nämlich die Anteile der *cis*-Isomere ohne 5-*cis* miteinander verglichen so sind diese relativ ähnlich mit 28% bzw. 34% bei der Studie dieser Arbeit.

Sowohl der große Unterschied in den Lycopingehalten der Leber der beiden Interventionsgruppen als auch die unterschiedlichen Anteile der Lycopinisomere, lassen schlussfolgern, dass sich die Biokinetik (Aufnahme, Verteilung, Metabolismus, Ausscheidung) des Lycopins aus LycoVit deutlich von der des Lycopins aus Lyc-O-Mato unterscheidet (s. Kapitel 5.2.6).

5.2.4 Tiermodell Frettchen

Nach der Lycopinintervention wurden im Plasma der beiden Interventionsgruppen in etwa die gleichen Lycopinkonzentrationen von 44 nmol/l gemessen. In Plasma, Leber, Niere und Lunge konnten all-*trans*, 5-*cis*, 9-*cis* und 13-*cis* Lycopin detektiert werden. Zudem wurde in allen Gruppen β -Carotin in gleicher Konzentration nachgewiesen, das aus dem Futter der Tiere stammt. Geringe Mengen wurden sowohl im Katzenfutter als auch im Frettchenfutter gefunden. Die höchsten Lycopingehalte wurden in beiden Interventionsgruppen in der Leber detektiert, danach folgten mit großem Abstand die Nieren und die Lunge. Ein ähnliches Verhältnis wurde in Studien mit β -Carotin beschrieben, in denen die Gehalte in der Leber

deutlich höher lagen als in der Niere und Lunge, die in etwa gleich niedrige Gehalte aufwiesen (Ribaya-Mercado et al., 1992 und Gugger et al., 1992).

In der Literatur wurden bislang zwei Interventionsstudien mit Lycopin beschrieben, in denen jeweils nur eine Lycopinformulierung eingesetzt wurde. Ferreira et al. (2000) verabreichten Lyc-O-Mato über einen Zeitraum von neun Wochen in einer Dosis von 4,6 mg/kg Körpergewicht. Sie untersuchten Plasma und Leber. Liu et al. (2003) fütterten LycoVit ebenfalls über neun Wochen in einer Dosis von 4,3 mg/kg Körpergewicht und untersuchten Plasma und Lunge. Die gemessenen Lycopingehalte dieser Studien und der Studie dieser Arbeit sind zum besseren Vergleich in Tab. 5-3 dargestellt.

Tab. 5-3: Vergleich der Lycopingehalte zweier Interventionsstudien mit den Gehalten der Studie dieser Arbeit.

Quelle	Supplement	Dosis [mg/kg KG]	Dauer [Wochen]	Gesamtlycopin in		
				Plasma [nmol/l]	Leber [µg/g]	Lunge [ng/g]
Liu et al., 2003	LycoVit	4,3	9	373 ± 60	-	622 ± 78
Ferreira et al., 2000	Lyc-O-Mato	4,6	9	11 ± 8	0,3 ± 0,2	
Studie dieser Arbeit	Lyc-O-Mato	5	2	44 ± 24	1,8 ± 0,7	6,8 ± 2,3
Studie dieser Arbeit	LycoVit	5	2	44 ± 13	14,5 ± 6,0	12,6 ± 2,9

Aufgrund der Interventionsdauer von neun Wochen im Gegensatz zu zwei Wochen in dieser Arbeit ist ein Vergleich der Literaturwerte nur sehr eingeschränkt möglich, da sich Lycopin in den Organen anreichert und bei einer längeren Versuchsdauer eine größere Anreicherung zu erwarten ist. Die Plasmakonzentrationen von Liu et al. liegen etwa 8,5-fach höher als die Konzentrationen der Studie dieser Arbeit und die Gehalte in der Lunge sogar 50-fach, was vermutlich auf die sieben Wochen längere Interventionsphase zurückzuführen ist. Die Werte von Ferreira et al. erscheinen dagegen sehr niedrig, denn Liu et al. detektierten nach gleicher Interventionsdauer mit LycoVit 34-fach höhere Konzentrationen im Plasma. Auch in der Studie dieser Arbeit wurden nach einer zweiwöchigen Intervention mit Lyc-O-Mato bereits viermal höhere Plasmakonzentrationen und 6-fach höhere Gehalte in der Leber gemessen als bei Ferreira et al. nach neunwöchiger Intervention. Wie bereits beim Tiermodell Ratte erläutert, sollten diese großen Unterschiede nicht so kritisch gesehen werden, denn es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Parameter wie z. B. das Geschlecht, das Alter und das Gewicht der Tiere die Resorption des Lycopins beeinflussen können.

Auch wenn ein direkter Vergleich der absoluten Lycopingehalte im Plasma und den Organen der verschiedenen Studien aufgrund der unterschiedlichen Interventionsdauer und eingesetzten Formulierungen sehr schwierig ist, so kann zumindest die Verteilung des Gesamtlycopins auf die verschiedenen Isomere miteinander verglichen werden. In Plasma

und Leber der Lyc-O-Mato-Gruppe ist der Anteil von *all-trans* Lycopin am Gesamtlycopin in dieser Studie identisch mit dem Anteil in der Studie von Ferreira et al. Er beträgt 66% im Plasma und 57% in der Leber. Werden die Ergebnisse der LycoVit-Gruppe mit den Ergebnissen von Liu et al. verglichen, so stimmen auch hier die Anteile des *all-trans* Lycopins im Plasma mit 50% in dieser Studie bzw. 54% bei Liu et al. gut überein. In der Lunge dagegen ist dies nicht der Fall. In dieser Studie wurde ein Anteil von 45% *all-trans* Lycopin gemessen, bei Liu et al. ein Anteil von 66%.

Die Lycopingehalte der LycoVit-Gruppe waren im Gegensatz zum Plasma in allen drei Organen höher als die der Lyc-O-Mato-Gruppe. In der Leber waren die Gehalte achtmal so hoch, in der Niere und Lunge etwa doppelt so hoch wie die Gehalte der Lyc-O-Mato-Gruppe. Diese Ergebnisse sind insofern interessant, da hier im Gegensatz zu den anderen beiden Tiermodellen keine Unterschiede in der Lycopinkonzentration im Plasma der beiden Interventionsgruppen auftraten, sondern nur in den untersuchten Organen. Dies könnte beispielsweise daran liegen, dass das Lycopin aus LycoVit besser als aus Lyc-O-Mato resorbiert wird, die Plasmakurven sich mit der Zeit allerdings angleichen und somit die Konzentrationen zum Zeitpunkt der Blutentnahme gleich wären (s. Abb. 5-5). Die resorbierte Menge an Lycopin, die der Fläche unter der Kurve entspricht, wäre bei LycoVit größer, was sich in den höheren Lycopingehalten der Organe widerspiegeln würde. Ein ähnlicher Verlauf der Plasmakurven wurde von Diwadkar-Navsariwala et al. (2003) für verschiedene Lycopindosen beim Menschen gezeigt. Der Zeitpunkt der Blutentnahme kann also darüber entscheiden, ob Konzentrationsunterschiede im Plasma zweier Probanden oder Gruppen, gemessen werden können, deren Plasmakurven sich voneinander unterscheiden.

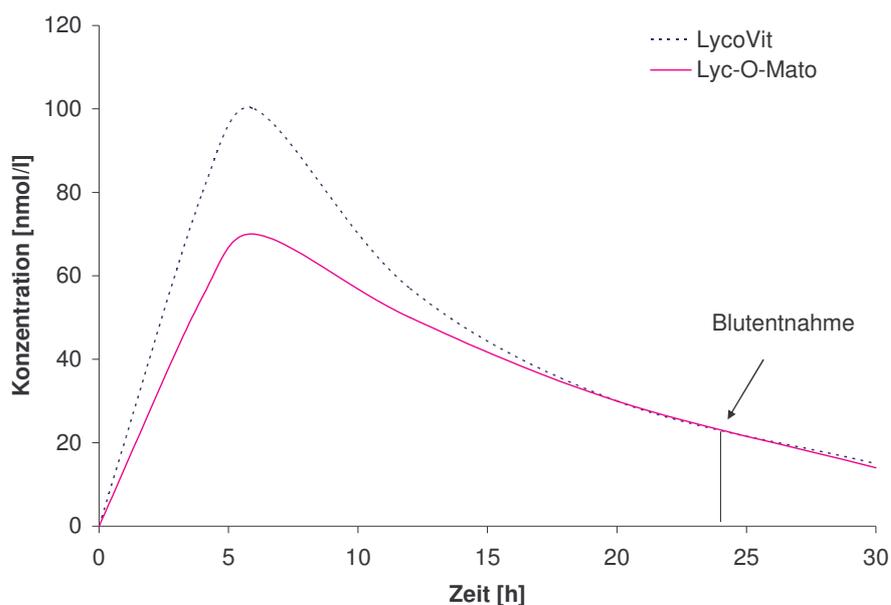


Abb. 5-5: Möglicher zeitlicher Verlauf der Plasmakonzentration nach Gabe von Lycopin in Form von LycoVit und Lyc-O-Mato.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie geht hervor, dass die Konzentration im Plasma nur den aktuellen Versorgungszustand zum Zeitpunkt der Blutentnahme widerspiegelt, die Gehalte in den Organen jedoch die Versorgung über einen längeren Zeitraum. Soll eine Aussage über die Bioverfügbarkeit einer Verbindung getroffen werden, so ist eine Untersuchung der Organe unumgänglich, da die Konzentration im Plasma keine Auskunft über die absolut resorbierten Mengen bzw. die Akkumulation in den Organen gibt.

5.2.5 Vergleich der Tiermodelle untereinander und mit dem Mensch

Die Bioverfügbarkeit von Lycopin in den Formulierungen Lyc-O-Mato und LycoVit wurde auch in einer Humanstudie mit ähnlichem Design wie das der beschriebenen Tierversuche untersucht (Hoppe et al., 2003). Hierzu wurden 36 Probanden in eine Kontrollgruppe und zwei Interventionsgruppen (je n=12) aufgeteilt. Die Lycopindosis betrug 15 mg/Tag, was etwa einer Dosis von 0,2 mg/kg Körpergewicht entspricht. Die Probanden nahmen Lycopin über 28 Tage entweder in Form von Lyc-O-Mato oder LycoVit in Gelatine kapseln ein. Die Ergebnisse der gemessenen Plasmakonzentrationen dieser Studie und das Verhältnis der Isomere ist zusammen mit den Ergebnissen der Tierstudien in Tab. 5-4 dargestellt. Über den Anteil des 5-*cis* Lycopins im Humanplasma können keine Angaben gemacht werden, da dieses in der Veröffentlichung nicht separat aufgeführt wurde.

Tab. 5-4: Vergleich der Lycopinkonzentrationen und Isomerenverhältnisse in Plasma und Leber bei verschiedenen Spezies.

Plasma:

Intervention	Spezies	Dosis [mg/kg KG]	Gesamt-lycopin [nM]	% all-trans	% 5-cis	% andere cis	% Metabolite
Lyc-O-Mato	Ratte	5	-				
	Frettchen	5	44 ± 24	66	13	21	-
	Kalb	0,2	72 ± 33	32	15	-	53
	Mensch	0,2	950 ± 200	66	?	34	-
LycoVit	Ratte	5	2,3 ± 1,6	39	61	-	-
	Frettchen	5	44 ± 13	50	28	22	-
	Kalb	0,2	286 ± 89	31	17	-	52
	Mensch	0,2	910 ± 300	58	?	42	-

Leber:

			[ng/g]			
Lyc-O-Mato	Ratte	5	82 ± 38	28	38	34
	Frettchen	5	1791 ± 667	57	20	23
LycoVit	Ratte	5	2247 ± 324	41	46	13
	Frettchen	5	14480 ± 6018	57	32	11

Die Plasmakonzentrationen von Ratte und Frettchen lagen auch bei 25-fach höherer Dosierung weit unter denen des Menschen. Beim präruminanten Kalb wurde in der LycoVit-

Gruppe eine halb so hohe Plasmakonzentrationen im Vergleich zum Menschen erreicht. Das präruminante Kalb unterscheidet sich aber aufgrund der auftretenden Metabolite erheblich vom Menschen und auch von den anderen Tierspezies. Es eignet sich daher nicht für weitere Untersuchungen mit Lycopin und auch für die Untersuchungen anderer Carotinoide sollte dessen Eignung als Tiermodell in Frage gestellt werden.

Das Frettchen und die Ratte unterscheiden sich, obwohl die gleiche Dosis verabreicht wurde, zum einen in den Lycopingehalten in Plasma und Leber, und zum anderen in der Isomerenverteilung. Das Frettchen weist im Plasma und der Leber deutlich höhere Lycopinkonzentrationen als die Ratte auf, was allerdings im Gegensatz zu den Ergebnissen von Ferreira et al. steht, wo dies gerade umgekehrt der Fall war. In einer Studie mit β -Carotin bei Ratten und Frettchen wurden wie in der vorliegenden Studie beim Frettchen deutlich höhere Konzentrationen im Serum und der Leber als bei der Ratte detektiert (Ribaya-Mercado et al., 1989). Dies zeigt, dass es äußerst schwierig ist, allgemein gültige Aussagen z. B. zu Plasmakonzentrationen über verschiedene Spezies im Vergleich zu treffen.

In der Humanstudie konnten keine Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der beiden Lycopin-formulierungen festgestellt werden, da die Lycopinplasmakonzentrationen nach der Intervention in beiden Gruppen etwa gleich waren. Auch beim Frettchen waren die Konzentrationen im Plasma gleich. Es zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in der Bioverfügbarkeit aufgrund der unterschiedlichen Lycopingehalte in den untersuchten Organen. Dies könnte in gleicher Weise beim Menschen der Fall gewesen sein, dessen Organe jedoch nicht untersucht werden konnten. Beim Frettchen waren die Lycopingehalte in der Niere und Lunge in etwa gleich, in der Leber als Hauptspeicherorgan bedeutend höher. Eine ähnliche Verteilung von Lycopin wird auch beim Menschen beobachtet. Die Lycopingehalte in Niere und Lunge sind in etwa identisch, die Gehalte in der Leber um bis zu zehnfach höher (Agarwal und Rao, 2000). Das Frettchen zeichnet sich außerdem durch das fast identische Verhältnis von *all-trans* und *cis*-Isomeren vor allem in der Lyc-O-Mato-Gruppe als geeignetes Tiermodell zur Untersuchung von Lycopin aus.

Ob das unterschiedliche Verhältnis der Lycopinisomere im Plasma und den Organen der beiden Interventionsgruppen mit Ausnahme des präruminanten Kalbs aus dem höheren Anteil der *cis*-Isomere in LycoVit herrührt oder in einem unterschiedlichen Metabolismus des Lycopins der beiden Lycopinformulierungen begründet ist, ist schwer zu sagen. Falls das Isomeren-Verhältnis einen Einfluss auf die Verhältnisse *in vivo* hat, so wäre zu erwarten, dass in der LycoVit-Gruppe der Anteil des *all-trans* Lycopins geringer ist als der der *cis*-Isomere. Dies ist jedoch weder im Plasma des präruminanten Kalbs noch in der Leber von Ratte und Frettchen der Fall.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit muss die Schlussfolgerung aus der Humanstudie in Frage gestellt werden, dass das synthetische Lycopin in LycoVit und das natürliche in Lyc-O-Mato identische Lycopinquellen darstellen und sich nicht in ihrer Bioverfügbarkeit unterscheiden. Die Lycopinkonzentration im Humanplasma alleine scheint kein geeigneter Parameter zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit zu sein.

5.2.6 Mögliche Gründe für die Unterschiede in der Biokinetik der beiden Lycopinformulierungen

In allen Tierstudien zeigten sich deutliche Unterschiede in der Biokinetik des Lycopins aus den beiden Formulierungen Lyc-O-Mato und LycoVit. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, denn die chemische Struktur des *all-trans* Lycopins, das aus Tomaten extrahiert wird, ist identisch mit der Struktur des synthetisierten *all-trans* Lycopins. Es ist daher anzunehmen, dass die Ursache der beobachteten Unterschiede in der Art der Formulierung begründet ist. LycoVit enthält 10% Lycopin, das von einer Hülle aus Maisstärke, Gelatine, Saccharose, α -Tocopherol und Ascorbylpalmitat umgeben ist. Lyc-O-Mato enthält dagegen nur 5% Lycopin, das durch eine Hülle aus Gelatine, Zucker, Vitamin E und Ascorbylpalmitat stabilisiert wird, wofür Maisstärke nicht verwendet wurde. Dass sich die beiden Hüllen auch in ihren Eigenschaften unterscheiden, konnte bereits bei der Analytik festgestellt werden. Damit eine Extraktion des Lycopins aus LycoVit möglich war, musste die Matrix zuvor mit dem Enzym Pronase aufgeschlossen werden. Dies war für die Extraktion aus Lyc-O-Mato nicht notwendig. Zudem enthalten die beiden Formulierungen unterschiedliche Anteile von Lycopin. Um die gleiche Menge Lycopin aus Lyc-O-Mato aufzunehmen wie aus LycoVit, muss zunächst die doppelte Menge der Matrix, in die das Lycopin eingebettet ist, aufgeschlossen werden. Dies könnte ein Grund für die geringere Resorption von Lyc-O-Mato sein, denn wie in der Einleitung (Kapitel 1.1.4) bereits erläutert, hat die Matrix einen wesentlichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Carotinoide.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Isomerenverteilung des Lycopins, die sich, wie unter 4.3.2.1 gezeigt, in beiden Formulierungen unterscheidet. LycoVit enthält neben *all-trans* Lycopin etwa 27% *cis*-Isomere, Lyc-O-Mato dagegen nur 5%. Wird angenommen, dass die *cis*-Isomere des Lycopins besser bioverfügbar sind als *all-trans* Lycopin (Boileau et al., 1999), so könnte der höhere Anteil an *cis*-Isomeren in LycoVit ein weiterer Grund für die bessere Resorption von LycoVit im Vergleich zu Lyc-O-Mato sein.

Die beschriebenen Matrixeffekte, die möglicherweise eine unterschiedliche Resorption der beiden Formulierungen zur Folge hätten, erklären jedoch nur die Unterschiede in den Lycopingehalten, die in den Organen der beiden Interventionsgruppen zu beobachten sind.

Sie können hingegen nicht die verschiedenen Anteile der Isomere im Plasma und den Organen der beiden Gruppen erklären. Wie bereits unter 5.2.5 erläutert, wäre zu erwarten, dass sich ein erhöhter Anteil an *cis*-Isomeren in LycoVit auch in einem höheren Anteil an *cis*-Isomeren im Plasma und den Organen widerspiegelt. Dies ist zwar im Plasma, in der Lunge und Niere vom Frettchen und im Plasma vom Mensch der Fall, im Plasma des prädominanten Kalbs und in der Leber von Ratte und Frettchen ist jedoch der Anteil an *cis*-Isomeren in der LycoVit-Gruppe gleich niedrig oder sogar niedriger als in der Lyc-O-Mato-Gruppe. Es ist allerdings denkbar dass die verschiedenen Isomere, wie sie in den Formulierungen vorliegen, unterschiedlich gut resorbiert werden und dass das Verhältnis entscheidend ist für die weitere Metabolisierung und Speicherung der Lycopinisomere im Körper. Dies würde dann erklären, warum sich die Isomerenverhältnisse im Plasma und den Organen der beiden Interventionsgruppen zum Teil voneinander unterscheiden.

5.3 Bestimmung des 8-iso Prostaglandin F_{2α}

5.3.1 Bewertung der etablierten Methoden

In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Bestimmung des 8-iso Prostaglandin F_{2α} (8-iso PGF_{2α}) in Urin und Plasma beschrieben, die häufig eine aufwändige Aufreinigung mittels HPLC oder Dünnschichtchromatographie (DC) beinhalten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher eine möglichst leicht durchzuführende und kostengünstige Methode etabliert werden. Die Immunaffinitätschromatographie (IAC) erwies sich als eine sehr einfache und schnelle Methode zur Isolierung des 8-iso PGF_{2α} aus Urin, da der Urin ohne vorherige Aufreinigung direkt auf die IAC-Säule gegeben werden kann. Der Rückstand des Eluats wird nach Derivatisierung und Extraktion mit GC/MS gemessen. Es fallen somit aufwändige Aufreinigungsschritte wie die Flüssig-Flüssig-Extraktion oder Festphasenextraktion in Kombination mit HPLC oder DC weg. Eine IAC-Säule ist zwar in der Anschaffung etwa zehnmal so teuer wie eine Festphasensäulen, sie kann aber im Gegensatz dazu bis zu siebenmal bei Urin und bis zu viermal bei Plasma ohne das Auftreten von Memory-Effekten wieder benutzt werden. Somit sind die Materialkosten in etwa identisch mit einer Aufreinigung über zwei Festphasensäulen. Die Zeit, die dafür aufgewendet werden muss, ist allerdings deutlich geringer. Die Messung mit GC/MS hat gegenüber dem Enzymimmunoassay (EIA) zum einen den Vorteil, dass sie erheblich kostengünstiger ist, sofern ein Gerät zur Verfügung steht. Zum anderen wird mittels GC/MS ausschließlich das 8-iso PGF_{2α} gemessen. Beim EIA können, abhängig von der Matrix, bestimmte Inhaltsstoffe die Messung stören bzw. Kreuzreaktionen auftreten (s. 5.3.2). Die Reproduzierbarkeit der Proben-

aufarbeitung und GC/MS-Messung ist sehr gut (CV 3-4%) und vergleichbar mit der anderer Methoden. Die etablierte Methode stellt daher eine gute, schnelle und einfache Alternative zu bisher beschriebenen Methoden ohne IAC dar (s. auch Tsikas et al., 2003).

Die Bestimmung des 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Plasma ist etwas schwieriger, da die Konzentration etwa zehnmal geringer ist als im Urin. Es war daher nicht möglich, das 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ mit GC/MS bei mehrmaliger Nutzung der IAC-Säule zu messen, da die Empfindlichkeit des GC/MS für diese geringen Mengen nicht ausreichte. Mit jeder weiteren Benutzung einer IAC-Säule wird die Wiederfindung des 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ deutlich schlechter und so wird schnell die Nachweisgrenze erreicht. Die Quantifizierung im Plasma wurde daher mittels GC/MS/MS durchgeführt, mit der aufgrund der Selektion der relevanten Ionen im ersten MS und des geringeren Untergrundes im zweiten MS empfindlicher gemessen werden konnte. Eine IAC-Säule konnte jedoch auch hier nur maximal viermal benutzt werden. Die Methode für die Isolierung des 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ aus Plasma setzt sich aus einer Verseifung und drei Flüssig-Flüssig-Extraktionen zusammen, die vor der IAC durchgeführt werden. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde der Festphasenextraktion vorgezogen, um weitere Materialkosten für die Festphasensäulen zu sparen. Die Methode ist somit zwar kostengünstiger als eine Kombination mit einer Festphasenextraktion, aber wesentlich zeitintensiver. Die gesamte Methode mit der IAC ist im Vergleich zu der Methode mit einer Kombination aus zwei Festphasensäulen (Nourooz-Zadeh, 1999) wahrscheinlich ähnlich zeitintensiv aber teurer. Im Vergleich zu den anderen beschriebenen Methoden mit Festphasenextraktion in Kombination mit DC oder HPLC ist sie in ihrem Zeit- und Kostenaufwand ähnlich, aber viel einfacher durchzuführen. Die Reproduzierbarkeit der Probenaufarbeitung und Messung war nicht so gut wie beim Urin (CV 14% bzw. 3-4% bei Urin), was sicher auch an den sehr niedrigen Plasmakonzentrationen lag. Die etablierte Methode mit Flüssig-Flüssig-Extraktionen und IAC stellt dennoch eine gute, einfach durchzuführende Alternative zum Großteil der bisher beschriebenen Methoden dar.

5.3.2 Vergleich der Ergebnisse der GC/MS-Messung mit denen des EIA

Die 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gehalte, die mit EIA bestimmt wurden, lagen für Urin etwa 3,5mal und für Plasma 3mal höher als die Gehalte der GC/MS/(MS)-Messung. Bei der Bestimmung mit GC/MS/(MS) wurde das 8-iso $\text{PGF}_{2\alpha}$ zuvor mit IAC spezifisch isoliert und anhand der Peakfläche quantifiziert. Bei der Bestimmung mit EIA wird der Urin bzw. das Plasma zuvor nur über eine unspezifische Festphasenextraktion vorgereinigt, bei der ähnliche

Verbindungen nicht abgetrennt werden. Die Quantifizierung erfolgt über bestimmte Antigen-Antikörper-Reaktionen photometrisch. Da bei der Messung mit EIA das 8-iso PGF_{2α} zuvor nicht spezifisch isoliert wird, können bei der Antigen-Antikörper-Reaktion zum einen noch störende Inhaltsstoffe aus der Matrix enthalten sein und zum anderen kann es zu Kreuzreaktionen mit ähnlichen Verbindungen wie anderen Isoprostanen oder Prostaglandinen kommen. Der Hersteller des EIA-Kits gibt folgende Spezifikationen an: 100% für 8-iso PGF_{2α}, 20,6% für 8-iso PGF_{3α}, 1,8% für 8-iso PGE₂, 1,7% für 2,3-Dinor-8-iso PGF_{1α}, 1,6% für 8-iso PGE₁, 0,7% für PGF_{1α}, 0,7% für PGF_{3α} und weniger als 0,4% für andere Eicosanoide. Dies kann jedoch unmöglich für alle, vor allem nicht für die Isoprostane anderer Klassen, getestet worden sein, da diese zum Teil bisher nur identifiziert, aber nicht isoliert wurden. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Gehalte nach EIA-Messung höher sind als nach GC/MS/(MS)-Messung. Die geringen Unterschiede zwischen Urin und Plasma sind möglicherweise auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Matrices zurückzuführen. Dass mit beiden Messmethoden gleiche bzw. ähnliche Verbindungen gemessen werden, zeigt die gute Korrelation von $r=0,94$ für Urin und $r=0,85$ für Plasma. Es ist jedoch davon abzuraten absolute Gehalte miteinander zu vergleichen, die mit verschiedenen Messmethoden bestimmt wurden.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Bessard et al. (2001) beschrieben, die die Messung mit EIA mit denen der GC/MS für Urin verglichen, der zuvor über zwei Festphasenextraktionen aufgereinigt wurde. Die Gehalte nach EIA-Messung waren durchschnittlich etwa 3mal höher als nach GC/MS-Messung. Die Messwerte ($n=30$) zeigten eine gute Korrelation mit $r=0,86$.

Auch Proudfoot et al. (1999) kommen zu dem Schluss, dass die 8-iso PGF_{2α}-Gehalte, die mit verschiedenen Messmethoden im Urin bestimmt werden, nicht übereinstimmen. Sie fanden allerdings bei niedrigen Konzentrationen höhere Gehalte nach GC/MS-Messung und eine schlechtere Korrelation der Messwerte ($n=14$) mit $r=0,63$. Dies könnte eventuell an der Koelution des 8-iso PGF_{2α} mit PGF_{2α} und anderen Isoprostanen auf der GC-Säule liegen. Eine Koelution erklärt möglicherweise auch die nur dreifach höheren Werte nach EIA-Messung bei Bessard et al., sowie die etwas schlechtere Korrelation der Messwerte im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Denn eine Koelution kann bei der Isolierung des 8-iso PGF_{2α} mit IAC ausgeschlossen werden, da andere Eicosanoide, wenn überhaupt, nur in geringen Mengen mit isoliert werden.

5.3.3 Vergleich der Gehalte von 8-iso PGF_{2α} mit denen von Malondialdehyd (MDA)

Das 8-iso PGF_{2α} und das MDA als Biomarker für oxidativen Stress wurde bisher in zahlreichen Studien bei Rauchern in Urin und Plasma bestimmt. Die 8-iso PGF_{2α}-Gehalte in Urin (685 ± 435 pg/mg Kreatinin) und Plasma (42 ± 14 pg/ml) dieser Studie sind fast identisch mit den Gehalten der Studie von Ohashi et al. (426 ± 56 pg/mg Kreatinin bzw. 42 ± 2 pg/ml). Sie liegen in dem Bereich verschiedener 8-iso PGF_{2α}-Gehalte, die in der Literatur für Raucher beschrieben sind (u. a. Tsikas et al., 2003; Morrow et al., 1995). Die MDA-Gehalte in Urin (105 ± 62 ng/mg Kreatinin) sind im Durchschnitt etwas niedriger als die von Jacob et al. beschriebenen Gehalte bei Rauchern (158 ± 53 ng/mg). Die Gehalte im Plasma (43 ± 12 ng/ml) sind dagegen etwas höher (32 ± 14 ng/ml). Sie liegen ebenfalls im Bereich der MDA-Gehalte, die in der Literatur beschrieben sind (u. a. Nielsen et al., 1997; Polidori et al., 2003).

Die gute Korrelation ($r=0,82$) der 8-iso PGF_{2α}-Gehalte mit den MDA-Gehalten im Urin zeigt, dass MDA durchaus ein geeigneter Marker für oxidativen Stress sein kann. Die beiden Verbindungen stellen zwar verschiedene Endpunkte der Lipidperoxidation dar, werden jedoch beide durch oxidativen Stress in ähnlichem Ausmaß gebildet und durch die Lycopinintervention beeinflusst.

Die schlechte Korrelation der Gehalte der beiden Verbindungen im Plasma könnte zum einen an den relativ niedrigen 8-iso PGF_{2α}-Konzentrationen liegen, die mit einem größeren Fehler behaftet sind als im Urin, und zum anderen kann während der Inkubation des Plasmas mit Thiobarbitursäure im Plasma neues MDA aus Lipidhydroperoxiden generiert werden, die im wässrigen Urin nicht enthalten sind (s. Kapitel 1.4.6). Die MDA-Gehalte im Plasma könnten dadurch verfälscht werden.

5.3.4 Einfluss einer Lycopinintervention bei Rauchern auf Marker für oxidativen Stress

Die 14-tägige Intervention mit etwa 15 mg Lycopin in Form von Lyc-O-Mato führte zu einem signifikanten Anstieg der Lycopinkonzentration im Plasma, wie dies auch in zahlreichen Interventionsstudien bereits beschrieben wurde (Watzl et al., 2003; Visioli et al., 2003; Paetau et al., 1998). Gleichzeitig sank die Konzentration im Urin von 8-iso PGF_{2α} signifikant und von MDA in der Tendenz signifikant um 59% bzw. 48%. Im Plasma blieben die Konzentrationen dagegen unverändert. Die Intervention mit Lyc-O-Mato führte also bei den

acht Rauchern zu einer Reduktion des oxidativen Stress', die zumindest anhand der Konzentrationen im Urin bestimmt werden konnte. Es ist möglich, dass die Konzentrationen im Plasma unverändert blieben, weil überschüssiges 8-iso PGF_{2α} bzw. MDA entweder sehr schnell metabolisiert wird oder mit anderen Biomolekülen reagiert und sich so der Analytik entzieht oder weil es über den Urin ausgeschieden wird, was die höheren Urinkonzentrationen vor der Intervention erklären würde.

Eine ähnlich signifikante Reduktion der 8-iso PGF_{2α}-Konzentration um 53% im Urin wurde von Visioli et al. nach einer dreiwöchigen Intervention mit Tomatenprodukten (etwa 8 mg Lycopin/Tag) bei Nichtraucherinnen beobachtet. Der MDA-Spiegel im Plasma blieb wie in der Studie dieser Arbeit unverändert. Auch eine dreiwöchige Intervention mit 20 mg Lycopin/Tag in Form von Wassermelone oder Tomatensaft zeigte keinen Effekt auf die MDA-Konzentration im Plasma (Collins et al., 2004). Diese blieb nach einer zweiwöchigen Intervention mit Tomatensaft im Plasma und Fäzes ebenfalls unbeeinflusst (Briviba et al., 2004).

Ferretti und Flanagan konnten im Gegensatz zu dieser Studie nach vierwöchiger Lycopinintervention mit 80 mg/Tag bei Nichtrauchern keinen Effekt auf die 8-iso PGF_{2α}-Konzentration im Urin beobachten. Sie bezogen ihre Werte allerdings auf die Ausscheidung pro Tag und nicht pro mg Kreatinin, was die Werte eventuell etwas verfälscht, da das täglich ausgeschiedene Urinvolumen je nach Menge der zugeführten Flüssigkeit variieren kann.

Die zitierten Studien, die jedoch alle mit Nichtrauchern durchgeführt wurden, bestätigen das Ergebnis dieser Arbeit, dass eine Intervention mit Lycopin die MDA-Konzentration im Plasma nicht beeinflusst. Entsprechende Interventionsstudien mit Rauchern, bei denen MDA oder 8-iso PGF_{2α} bestimmt wurde, wurden bislang nicht beschrieben.

Im Rahmen der Humanstudie, aus der in dieser Arbeit bei acht Probanden das 8-iso PGF_{2α} und MDA in Urin und Plasma bestimmt wurde, wurden auch die DNA-Strangbrüche mittels Comet-Assay gemessen (Briviba et al., 2004). Hierbei zeigte sich bei den acht Probanden eine signifikante Reduktion der DNA-Strangbrüche um 40% (P-Wert 0,03), die allerdings, wenn das gesamte Kollektiv von 25 Probanden betrachtet wurde, zwar immer noch 39% betrug, aber nicht mehr signifikant war (P-Wert 0,12). Im Comet-Assay werden unter alkalischen Bedingungen Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie apurine Stellen erfasst (Collins et al., 1997). Während reaktive Sauerstoffspezies meist zu oxidativen DNA-Schäden führen, können Hydroxyl-Radikale jedoch direkt einen Einzelstrangbruch bewirken (Fairbairn et al., 1995). Einzelstrangbrüche bzw. apurine Stellen treten auch kurzzeitig bei der DNA-Reparatur auf, bei der Nucleotide bzw. Basen herausgeschnitten werden, die schadhaft sind. Die Anzahl der DNA-Strangbrüche lässt somit indirekt auf das Ausmaß des oxidativen Stress' schließen.

Verschiedene Studien, in denen das 8-iso PGF_{2α} oder MDA im Urin oder Plasma von Nichtrauchern bestimmt wurden, liefern zum Teil kontroverse Ergebnisse, aus denen kein eindeutiger Einfluss des Lycopins auf den oxidativen Stress abgeleitet werden kann. Die Ergebnisse der Humanstudie dieser Arbeit, die Reduktion der 8-iso PGF_{2α} und MDA-Konzentration im Urin und die Reduktion der DNA-Strangbrüche lassen allerdings auf eine protektive Wirkung des Lycopins auf den oxidativen Stress zumindest bei Rauchern schließen.

6 Zusammenfassung

Um das **Vorkommen** von Carotinoiden insbesondere des Lycopins in verschiedenen Tomatensorten zu untersuchen, wurden 20 Sorten mit teilweise unterschiedlicher Farbe und Form ausgewählt, im Gewächshaus angebaut und nach der Ernte analysiert. Die verschiedenen Sorten unterschieden sich sowohl in ihren Carotinoidgehalten als auch in den Gehalten an Tocopherolen, Fruchtsäuren, Phenolsäuren und Flavonoiden quantitativ und zum Teil auch qualitativ. In den roten und rot-grünen Sorten überwog deutlich Lycopin mit Gehalten bis zu 9 mg/100 g Nassgewicht. In den gelben Sorten und der grünen Sorte Green Zebra dagegen kam Lycopin nur in Spuren mit Gehalten um 10 µg/100 g Nassgewicht vor. In diesen Sorten dominierten in etwa fünffach höheren Konzentrationen β -Carotin und Lutein. In der grünen Sorte Green Zebra kamen neben Lutein und β -Carotin hauptsächlich Chlorophylle bzw. Phaeophytine vor, die auch in den rot-grünen Sorten zu finden waren. Die gelben und grünen Sorten enthielten etwa 100-mal weniger Carotinoide als die roten und rot-grünen Sorten.

Die Farbe der Tomaten hatte hingegen keinen Einfluss auf die Phenolsäure- und Flavonoid-Gehalte. Ihre Gehalte lagen bei maximal 8 bzw. 2 mg/100 g Nassgewicht. In allen Sorten war hauptsächlich ein Cumarsäure- und Kaffeesäureglucosid, Cryptochlorogensäure und Chlorogensäure sowie Rutin und ein Rutinpentosid enthalten.

Die **Bioverfügbarkeit** und der **Metabolismus** von Lycopin wurden in drei Tierstudien mit den Tiermodellen präruminantes Kalb, Ratte und Frettchen untersucht. In diesen Studien wurden jeweils zwei Lycopinformulierungen Lyc-O-Mato[®] und LycoVit[®] verabreicht und die Konzentrationen in Plasma und Organen gemessen. Bei allen Tierspezies zeigten sich deutliche Unterschiede sowohl in der Bioverfügbarkeit der Formulierungen als auch in dem Verhältnis der detektierten Lycopinisomere. Das Frettchen erwies sich als das Tiermodell, das dem Menschen am ähnlichsten ist. Zum einen konnten wie in der von unseren Kooperationspartnern durchgeführten Humanstudie keine Unterschiede in den Plasmakonzentrationen der beiden Interventionsgruppen festgestellt werden und zum anderen stimmte das Verhältnis der Lycopinisomere in beiden Gruppen mit dem Verhältnis wie sie beim Menschen vorkommen fast exakt überein. Das präruminante Kalb erwies sich als ungeeignet für die Untersuchungen mit Lycopin, da hier drei Metabolite des Lycopins im Plasma auftraten, die weder beim Mensch noch bei den anderen Tierspezies detektiert werden konnten. Bei diesen Metaboliten handelt es sich vermutlich um Verbindungen, die durch Reduktion aus all-*trans* Lycopin oder 5-*cis* Lycopin entstehen.

Die Ergebnisse der drei durchgeführten Tierstudien widerlegen somit die aus der Humanstudie gezogene Schlussfolgerung, dass natürliches Lycopin aus Lyc-O-Mato® und synthetisches Lycopin aus LycoVit® identische Lycopinquellen darstellen.

Die **Wirkung von Lycopin gegen oxidativen Stress** wurde anhand der Biomarker 8-iso Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-iso $PGF_{2\alpha}$) und Malondialdehyd (MDA) in einer Humanstudie mit Rauchern quantifiziert. Für die Bestimmung des 8-iso $PGF_{2\alpha}$ in Urin und Plasma wurde eine Methode etabliert, bei der das 8-iso $PGF_{2\alpha}$ über Immunaффinitätschromatographie isoliert und mittels GC/MS/(MS) gemessen wird. Durch die Intervention mit Lycopin in Form von Lyc-O-Mato konnte der 8-iso $PGF_{2\alpha}$ -Spiegel signifikant und der MDA-Spiegel im Urin in der Tendenz signifikant um 59 bzw. 48% gesenkt werden. Im Plasma dagegen blieb die MDA-Konzentration durch die Intervention unverändert und auch die 8-iso $PGF_{2\alpha}$ -Konzentration wurde nur minimal gesenkt.

Ein Vergleich der Ergebnisse nach GC/MS/(MS)-Messung mit den Ergebnissen, die mit der Alternativmethode, dem Enzymimmunoassay (EIA), bestimmt wurden, ergab eine gute Korrelation mit $r=0,94$ für die Werte im Urin und $r=0,85$ für die Werte im Plasma. Die Gehalte nach der EIA-Messung lagen jedoch im Urin 3,5-fach und im Plasma 3-fach höher als nach der Messung mit GC/MS/(MS). Da im EIA vermutlich noch andere Isoprostane erfasst werden, ist die hier etablierte Methode, mit der ausschließlich das 8-iso $PGF_{2\alpha}$ gemessen wird, dem EIA vorzuziehen.

7 Literaturverzeichnis

Abushita, A.A., Daood, H.G., Biacs, P.A. (2000) Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors. *J Agric Food Chem*, **48**, 2075-2081.

Agarwal, S., Rao, A.V. (2000) Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ*, **163**, 739-744.

Agarwal, A., Shen, H., Agarwal, S., Rao, A.V. (2001) Lycopene Content of Tomato Products: Its Stability, Bioavailability and In Vivo Antioxidant Properties. *J Med Food*, **4**, 9-15.

Aleynik, S.I., Leo, M.A., Aleynik, M.K., Lieber, C.S. (1998) Increased circulating products of lipid peroxidation in patients with alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res*, **22**, 192-196.

Ansari, M.S., Gupta, N.P. (2003) A comparison of lycopene and orchidectomy vs orchidectomy alone in the management of advanced prostate cancer. *BJU Int*, **92**, 375-378.

Astorg, P., Gradelet, S., Berges, R., Suschetet, M. (1997) Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. *Nutr Cancer*, **29**, 60-68.

Bachi, A., Zuccato, E., Baraldi, M., Fanelli, R., Chiabrando, C. (1996) Measurement of urinary 8-Epi-prostaglandin F2alpha, a novel index of lipid peroxidation in vivo, by immunoaffinity extraction/gas chromatography-mass spectrometry. Basal levels in smokers and nonsmokers. *Free Radic Biol Med*, **20**, 619-624.

Bast, A., Haenen, G.R., van den Berg, R., van den Berg, H. (1998) Antioxidant effects of carotenoids. *Int J Vitam Nutr Res*, **68**, 399-403.

Bernstein, P.S., Khachik, F., Carvalho, L.S., Muir, G.J., Zhao, D.Y., Katz, N.B. (2001) Identification and quantitation of carotenoids and their metabolites in the tissues of the human eye. *Exp Eye Res*, **72**, 215-223.

Bessard, J., Cracowski, J.L., Stanke-Labesque, F., Bessard, G. (2001) Determination of isoprostaglandin F2alpha type III in human urine by gas chromatography-electronic impact mass spectrometry. Comparison with enzyme immunoassay. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **754**, 333-343.

Bierer, T.L., Merchen, N.R., Erdman, J.W., Jr. (1995) Comparative absorption and transport of five common carotenoids in preruminant calves. *J Nutr*, **125**, 1569-1577.

- Boileau, A.C., Merchen, N.R., Wasson, K., Atkinson, C.A., Erdman, J.W., Jr. (1999) Cis-lycopene is more bioavailable than trans-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. *J Nutr*, **129**, 1176-1181.
- Boileau, T.W., Clinton, S.K., Erdman, J.W., Jr. (2000) Tissue lycopene concentrations and isomer patterns are affected by androgen status and dietary lycopene concentration in male F344 rats. *J Nutr*, **130**, 1613-1618.
- Breinholt, V., Lauridsen, S.T., Daneshvar, B., Jakobsen, J. (2000) Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Lett*, **154**, 201-210.
- Bremner, P.D., Blacklock, C.J., Paganga, G., Mullen, W., Rice-Evans, C.A., Crozier, A. (2000) Comparison of the phenolic composition of fruit juices by single step gradient HPLC analysis of multiple components versus multiple chromatographic runs optimised for individual families. *Free Radic Res*, **32**, 549-559.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (1995) Carotenoids today and challenges for the future. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Hrsg) *Carotenoids: Isolation and analysis*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, Vol. 1A, 13-26.
- Britton, G. (1995) UV/Visible Spectroscopy. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Hrsg) *Carotenoids: Spectroscopy*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, Vol. 1B, 13-62.
- Britton, G. (1998) Overview of carotenoid biosynthesis. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Hrsg) *Carotenoids: Biosynthesis and metabolism*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, Vol. 3, 13-148.
- Briviba, K., Schnabele, K., Rechkemmer, G., Bub, A. (2004) Supplementation of a diet low in carotenoids with tomato or carrot juice does not affect lipid peroxidation in plasma and feces of healthy men. *J Nutr*, **134**, 1081-1083.
- Briviba, K., Kulling, S.E., Moseneder, J., Watzl, B., Rechkemmer, G., Bub, A. (2004) Effects of supplementing a low-carotenoid diet with a tomato extract for 2 weeks on endogenous levels of DNA single strand breaks and immune functions in healthy nonsmokers and smokers. *Carcinogenesis*, August 12.
- Budavari, S. (Hrsg.) (1996) *The Merck Index: An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, Merck, Co., Inc., Whitehouse Station, NJ.

- Chang, Y.C., Nair, M.G. (1995) Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. *J Nat Prod*, **58**, 1892-1896.
- Chen, L., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Duncan, C., Sharifi, R., Ghosh, L., van Breemen, R., Ashton, D., Bowen, P.E. (2001) Oxidative DNA damage in prostate cancer patients consuming tomato sauce-based entrees as a whole-food intervention. *J Natl Cancer Inst*, **93**, 1872-1879.
- Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinská, M., Kennedy, G., Stetina, R. (1997) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*, **375**, 183-193.
- Collins, J.K., Arjmandi, B.H., Claypool, P.L., Perkins-Veazie, P.M., Baker, R.A., Clevidence, B.A. (2004) Lycopene from two food sources does not affect antioxidant or cholesterol status of middle-aged adults. *Nutr J*, **3**, 15.
- Countryman, C., Bankson, D., Collins, S., Mar, B., Lin, W. (1991) Lycopene inhibits the growth of the HL-60 promyelotic leukemia cell line. *Clin Chem*, **37**, 1056.
- Crozier, A., Lean, M.E.J., McDonald, M.S., Black, C. (1997) Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery. *J Agric Food Chem*, **45**, 590-595.
- Davi, G., Ciabattoni, G., Consoli, A., Mezzetti, A., Falco, A., Santarone, S., Pennese, E., Vitacolonna, E., Bucciarelli, T., Costantini, F., Capani, F., Patrono, C. (1999) In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*, **99**, 224-229.
- 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**, 71-75.
- Day, A. J.; Canada, F. J.; Diaz, J. C.; Kroon, P. A.; McLauchlan, R.; Faulds, C. B.; Plumb, G. W.; Morgan, M. R.; Williamson, G. (2000) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett*, **468**, 166-170.
- Day, A. J.; Gee, J. M.; DuPont, M. S.; Johnson, I. T.; Williamson, G. (2003) Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem Pharmacol* **65**, 1199-1206.

- Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H. (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*, **274**, 532-538.
- Dillon, S.A., Lowe, G.M., Billington, D., Rahman, K. (2002) Dietary supplementation with aged garlic extract reduces plasma and urine concentrations of 8-iso-prostaglandin F(2 alpha) in smoking and nonsmoking men and women. *J Nutr*, **132**, 168-171.
- Diwadkar-Navsariwala, V., Novotny, J.A., Gustin, D.M., Sosman, J.A., Rodvold, K.A., Crowell, J.A., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Bowen, P.E. (2003) A physiological pharmacokinetic model describing the disposition of lycopene in healthy men. *J Lipid Res*, **44**, 1927-1939.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*, **339**, 37-59.
- Favreau, F., Petit-Paris, I., Hauet, T., Dutheil, D., Papet, Y., Mauco, G., Tallineau, C. (2004) Cyclooxygenase 1-dependent production of F2-isoprostane and changes in redox status during warm renal ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med*, **36**, 1034-1042.
- Ferreira, A.L., Yeum, K.J., Liu, C., Smith, D., Krinsky, N.I., Wang, X.D., Russell, R.M. (2000) Tissue distribution of lycopene in ferrets and rats after lycopene supplementation. *J Nutr*, **130**, 1256-1260.
- Ferretti, A., Flanagan, V.P. (1997) Isolation and measurement of urinary 8-iso-prostaglandin F2alpha by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **694**, 271-276.
- Forsberg, A., Lingen, C., Ernster, L., Lindberg, O. (1959) Modification of the x-irradiation syndrome by lycopene. *Exp Cell Res*, **16**, 7-14.
- Frank, H.A., Cogdell, R.J. (1996) Carotenoids in photosynthesis. *Photochem Photobiol*, **63**, 257-264.
- Franke, W. (1997) *Nutzpflanzenkunde*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Friedman, M., Jurgens, H.S. (2000) Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, **48**, 2101-2110.
- Fuhrman, B., Elis, A., Aviram, M. (1997) Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, **233**, 658-662.

- Fukunaga, M., Makita, N., Roberts, L.J., 2nd, Morrow, J.D., Takahashi, K., Badr, K.F. (1993) Evidence for the existence of F2-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **264**, C1619-1624.
- Gärtner, C., Stahl, W., Sies, H. (1997) Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am J Clin Nutr*, **66**, 116-122.
- Giovannucci, E. (1999) Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 317-331.
- Gradelet, S., Astorg, P., Leclerc, J., Chevalier, J., Vernevault, M.F., Siess, M.H. (1996) Effects of canthaxanthin, astaxanthin, lycopene and lutein on liver xenobiotic-metabolizing enzymes in the rat. *Xenobiotica*, **26**, 49-63.
- Gugger, E.T., Bierer, T.L., Henze, T.M., White, W.S., Erdman, J.W., Jr. (1992) Beta-carotene uptake and tissue distribution in ferrets (*Mustela putorius furo*). *J Nutr*, **122**, 115-119.
- Halliwell, B. (1997) Antioxidants: The basics- what they are and how to evaluate them. In: Sies, H. (Hrsg.) *Antioxidants in disease mechanisms and therapy*. Academic Press, San Diego, 3-20.
- Herrmann, K. (1989) Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **28**, 315-347.
- Hertog, M.G.L., Hollmann, P.C.H., Venema, D.P. (1992) Optimization of a Quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. *J Agric Food Chem*, **40**, 1591-1598.
- Hoppe, P.P., Kramer, K., Van Den Berg, H., Steenge, G., Van Vliet, T. (2003) Synthetic and tomato-based lycopene have identical bioavailability in humans. *Eur J Nutr*, **42**, 272-278.
- Ireson, C.R., Jones, D.J., Orr, S., Coughtrie, M.W., Boocock, D.J., Williams, M.L., Farmer, P.B., Steward, W.P., Gescher, A.J. (2002) Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**, 105-111.
- Jacob, R.A., Aiello, G.M., Stephensen, C.B., Blumberg, J.B., Milbury, P.E., Wallock, L.M., Ames, B.N. (2003) Moderate antioxidant supplementation has no effect on biomarkers of oxidant damage in healthy men with low fruit and vegetable intakes. *J Nutr*, **133**, 740-743.

- Johnson, E.J., Qin, J., Krinsky, N.I., Russell, R.M. (1997) Ingestion by men of a combined dose of beta-carotene and lycopene does not affect the absorption of beta-carotene but improves that of lycopene. *J Nutr*, **127**, 1833-1837.
- Kaplan, L.A., Lau, J.M., Stein, E.A. (1990) Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs. *Clin Physiol Biochem*, **8**, 1-10.
- Khachik, F., Beecher, G.R., Smith, J.C., Jr. (1995) Lutein, lycopene, and their oxidative metabolites in chemoprevention of cancer. *J Cell Biochem Suppl*, **22**, 236-246.
- Khachik, F., Pfander, H., Traber, B. (1998a) Proposed Mechanism for the Formation of Synthetic and naturally Occuring Metabolites of Lycopene in Tomato Products and Human Serum. *J Agric Food Chem*, **46**, 4885-4890.
- Khachik, F., Steck, A., Niggli, U.A., Pfander, H. (1998b) Partial Synthesis and Structural Elucidation of the Oxidative Metabolites of Lycopene Identified in Tomato Paste , Tomato Juice, and Human Serum. *J Agric Food Chem*, **46**, 4874-4884.
- Khachik, F., Spangler, C.J., Smith, J.C., Jr., Canfield, L.M., Steck, A., Pfander, H. (1997) Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem*, **69**, 1873-1881.
- Khachik, F., Carvalho, L., Bernstein, P.S., Muir, G.J., Zhao, D.Y., Katz, N.B. (2002) Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Exp Biol Med (Maywood)*, **227**, 845-851.
- Kim, D.J., Takasuka, N., Kim, J.M., Sekine, K., Ota, T., Asamoto, M., Murakoshi, M., Nishino, H., Nir, Z., Tsuda, H. (1997) Chemoprevention by lycopene of mouse lung neoplasia after combined initiation treatment with DEN, MNU and DMH. *Cancer Lett*, **120**, 15-22.
- Kohlmeier, L., Kark, J.D., Gomez-Gracia, E., Martin, B.C., Steck, S.E., Kardinaal, A.F., Ringstad, J., Thamm, M., Masev, V., Riemersma, R., Martin-Moreno, J.M., Huttunen, J.K., Kok, F.J. (1997) Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC Study. *Am J Epidemiol*, **146**, 618-626.
- Kostic, D., White, W.S., Olson, J.A. (1995) Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and beta-carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *Am J Clin Nutr*, **62**, 604-610.

- Krinsky, N.I., Russett, M.D., Handelman, G.J., Snodderly, D.M. (1990) Structural and geometrical isomers of carotenoids in human plasma. *J Nutr*, **120**, 1654-1662.
- Kristenson, M., Zieden, B., Kucinskiene, Z., Elinder, L.S., Bergdahl, B., Elwing, B., Abaravicius, A., Razinkoviene, L., Calkauskas, H., Olsson, A.G. (1997) Antioxidant state and mortality from coronary heart disease in Lithuanian and Swedish men: concomitant cross sectional study of men aged 50. *BMJ*, **314**, 629-633.
- Kucuk, O., Sarkar, F.H., Djuric, Z., Sakr, W., Pollak, M.N., Khachik, F., Banerjee, M., Bertram, J.S., Wood, D.P., Jr. (2002) Effects of lycopene supplementation in patients with localized prostate cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*, **227**, 881-885.
- 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**, 4963-4972.
- Langseth, L. (1995) Oxidants, antioxidants and disease prevention, ILSI Press, Brüssel.
- Lee, C.M., Boileau, A.C., Boileau, T.W., Williams, A.W., Swanson, K.S., Heintz, K.A., Erdman, J.W., Jr. (1999) Review of animal models in carotenoid research. *J Nutr*, **129**, 2271-2277.
- Levy, J., Bosin, E., Feldman, B., Giat, Y., Miinster, A., Danilenko, M., Sharoni, Y. (1995) Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. *Nutr Cancer*, **24**, 257-266.
- Lingen, C., Ernster, L., Lindberg, O. (1959) The promoting effect of lycopene on the non-specific resistance of animals. *Exp Cell Res*, **16**, 384-393.
- Liu, C., Lian, F., Smith, D.E., Russell, R.M., Wang, X.D. (2003) Lycopene supplementation inhibits lung squamous metaplasia and induces apoptosis via up-regulating insulin-like growth factor-binding protein 3 in cigarette smoke-exposed ferrets. *Cancer Res*, **63**, 3138-3144.
- Matilla, P., Kumpulainen, J. (2002) Determination of Free and Total Phenolic Acids in Plant-Derived Foods by HPLC with Diode-Array Detection. *J Agric Food Chem*, **50**, 3660-3667.
- Matsushima-Nishiwaki, R., Shidoji, Y., Nishiwaki, S., Yamada, T., Moriwaki, H., Muto, Y. (1995) Suppression by carotenoids of microcystin-induced morphological changes in mouse hepatocytes. *Lipids*, **30**, 1029-1034.

- Mauri, P.L., Iemoli, L., Gardana, C., Riso, P., Simonetti, P., Porrini, M., Pietta, P.G. (1999) Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric characterization of flavonol glycosides in tomato extracts and human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **13**, 924-931.
- McKinney, E.T., Shouri, R., Hunt, R.S., Ahokas, R.A., Sibai, B.M. (2000) Plasma, urinary, and salivary 8-epi-prostaglandin f2alpha levels in normotensive and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*, **183**, 874-877.
- Meagher, E.A., Barry, O.P., Burke, A., Lucey, M.R., Lawson, J.A., Rokach, J., FitzGerald, G.A. (1999) Alcohol-induced generation of lipid peroxidation products in humans. *J Clin Invest*, **104**, 805-813.
- Meagher, E.A., FitzGerald, G.A. (2000) Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic Biol Med*, **28**, 1745-1750.
- Mezzetti, A., Cipollone, F., Cucurullo, F. (2000) Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: isoprostanes as new markers on an old paradigm. *Cardiovasc Res*, **47**, 475-488.
- Minoggio, M., Bramati, L., Simonetti, P., Gardana, C., Iemoli, L., Santangelo, E., Mauri, P.L., Spigno, P., Soressi, G.P., Pietta, P.G. (2003) Polyphenol pattern and antioxidant activity of different tomato lines and cultivars. *Ann Nutr Metab*, **47**, 64-69.
- Moore, K., Roberts, L.J., 2nd (1998) Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res*, **28**, 659-671.
- Mori, T.A., Croft, K.D., Puddey, I.B., Beilin, L.J. (1999) An improved method for the measurement of urinary and plasma F2-isoprostanes using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*, **268**, 117-125.
- Morrow, J.D., Hill, K.E., Burk, R.F., Nammour, T.M., Badr, K.F., Roberts, L.J., 2nd (1990) A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 9383-9387.
- Morrow, J.D., Awad, J.A., Boss, H.J., Blair, I.A., Roberts, L.J., 2nd (1992a) Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10721-10725.

Morrow, J.D., Minton, T.A., Roberts, L.J., 2nd (1992b) The F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins*, **44**, 155-163.

Morrow, J.D., Frei, B., Longmire, A.W., Gaziano, J.M., Lynch, S.M., Shyr, Y., Strauss, W.E., Oates, J.A., Roberts, L.J., 2nd (1995) Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med*, **332**, 1198-1203.

Morrow, J.D., Roberts, L.J. (1997) The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res*, **36**, 1-21.

Morrow, J.D., Roberts, L.J., 2nd (1999) Mass spectrometric quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. *Methods Enzymol*, **300**, 3-12.

Mortensen, A., Skibsted, L.H., Sampson, J., Rice-Evans, C., Everett, S.A. (1997) Comparative mechanisms and rates of free radical scavenging by carotenoid antioxidants. *FEBS Lett*, **418**, 91-97.

Müller, H., Bub, A., Watzl, B., Rechkemmer, G. Plasma concentrations of carotenoids in healthy volunteers after intervention with carotenoid-rich foods. *Eur J Nutr*, **38**, 35-44.

Narisawa, T., Fukaura, Y., Hasebe, M., Ito, M., Aizawa, R., Murakoshi, M., Uemura, S., Khachik, F., Nishino, H. (1996) Inhibitory effects of natural carotenoids, alpha-carotene, beta-carotene, lycopene and lutein, on colonic aberrant crypt foci formation in rats. *Cancer Lett*, **107**, 137-142.

Nielsen, F., Mikkelsen, B.B., Nielsen, J.B., Andersen, H.R., Grandjean, P. (1997) Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem*, **43**, 1209-1214.

Nourooz-Zadeh, J. (1999) Gas chromatography-mass spectrometry assay for measurement of plasma isoprostanes. *Methods Enzymol*, **300**, 13-17.

Obata, T., Tomaru, K., Nagakura, T., Izumi, Y., Kawamoto, T. (2000) Smoking and oxidant stress: assay of isoprostane in human urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **746**, 11-15.

- Ohashi, N., Yoshikawa, M. (2000) Rapid and sensitive quantification of 8-isoprostaglandin F2alpha in human plasma and urine by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **746**, 17-24.
- Okajima, E., Tsutsumi, M., Ozono, S., Akai, H., Denda, A., Nishino, H., Oshima, S., Sakamoto, H., Konishi, Y. (1998) Inhibitory effect of tomato juice on rat urinary bladder carcinogenesis after N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine initiation. *Jpn J Cancer Res*, **89**, 22-26.
- Oshima, S., Ojima, F., Sakamoto, H., Ishiguro, Y., Terao, J. (1996) Supplementation with carotenoids inhibits singlet oxygen-mediated oxidation of human plasma low-density lipoprotein. *J Agric Food Chem*, **44**, 2306-2309.
- Oshima, S., Inakuma, T., Narisawa, T. (1999) Absorption and distribution of lycopene in rat colon. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, **45**, 129-134.
- Paetau, I., Khachik, F., Brown, E.D., Beecher, G.R., Kramer, T.R., Chittams, J., Clevidence, B.A. (1998) Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. *Am J Clin Nutr*, **68**, 1187-1195.
- Patrono, C., FitzGerald, G.A. (1997) Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 2309-2315.
- Polidori, M.C., Mecocci, P., Stahl, W., Sies, H. (2003) Cigarette smoking cessation increases plasma levels of several antioxidant micronutrients and improves resistance towards oxidative challenge. *Br J Nutr*, **90**, 147-150.
- Porra, R.J. (1991) Recent advances and re-assessments in chlorophyll extraction and assay procedures for terrestrial, aquatic, and marine organisms, including recalcitrant algae In: Scheer, H. (Hrsg.) *Chlorophylls*. CRC Press, Boca Raton.
- Pratico, D., Barry, O.P., Lawson, J.A., Adiyaman, M., Hwang, S.W., Khanapure, S.P., Iuliano, L., Rokach, J., FitzGerald, G.A. (1998) IPF2alpha-I: an index of lipid peroxidation in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3449-3454.
- Pratico, D., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A. (1995) Cyclooxygenase-dependent formation of the isoprostane, 8-epi prostaglandin F2 alpha. *J Biol Chem*, **270**, 9800-9808.

- Pratico, D., FitzGerald, G.A. (1996a) Generation of 8-epiprostaglandin F2alpha by human monocytes. Discriminate production by reactive oxygen species and prostaglandin endoperoxide synthase-2. *J Biol Chem*, **271**, 8919-8924.
- Pratico, D., Smyth, E.M., Violi, F., FitzGerald, G.A. (1996b) Local amplification of platelet function by 8-Epi prostaglandin F2alpha is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J Biol Chem*, **271**, 14916-14924.
- Proudfoot, J., Barden, A., Mori, T.A., Burke, V., Croft, K.D., Beilin, L.J., Puddey, I.B. (1999) Measurement of urinary F(2)-isoprostanes as markers of in vivo lipid peroxidation-A comparison of enzyme immunoassay with gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Biochem*, **272**, 209-215.
- Raffo, A., Leonardi, C., Fogliano, V., Ambrosino, P., Salucci, M., Gennaro, L., Bugianesi, R., Giuffrida, F., Quaglia, G. (2002) Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Cv. Naomi F1) harvested at different ripening stages. *J Agric Food Chem*, **50**, 6550-6556.
- Re, R., Fraser, P.D., Long, M., Bramley, P.M., Rice-Evans, C. (2001) Isomerization of lycopene in the gastric milieu. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**, 576-581.
- Reilly, M., Delanty, N., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A. (1996) Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation*, **94**, 19-25.
- Reilly, M.P., Pratico, D., Delanty, N., DiMinno, G., Tremoli, E., Rader, D., Kapoor, S., Rokach, J., Lawson, J., FitzGerald, G.A. (1998) Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation*, **98**, 2822-2828.
- Ribaya-Mercado, J.D., Holmgren, S.C., Fox, J.G., Russell, R.M. (1989) Dietary beta-carotene absorption and metabolism in ferrets and rats. *J Nutr*, **119**, 665-668.
- Ribaya-Mercado, J.D., Fox, J.G., Rosenblad, W.D., Blanco, M.C., Russell, R.M. (1992) Beta-carotene, retinol and retinyl ester concentrations in serum and selected tissues of ferrets fed beta-carotene. *J Nutr*, **122**, 1898-1903.
- Riso, P., Visioli, F., Erba, D., Testolin, G., Porrini, M. (2004) Lycopene and vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection. *Eur J Clin Nutr*, **58**, 1350-1358.

- Robbins, R.J. (2003) Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem*, **51**, 2866-2887.
- Roberts, L.J., Morrow, J.D. (2000) Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med*, **28**, 505-513.
- Rokach, J., Khanapure, S.P., Hwang, S.W., Adiyaman, M., Lawson, J.A., FitzGerald, G.A. (1997) Nomenclature of isoprostanes: a proposal. *Prostaglandins*, **54**, 853-873.
- Romanchik, J.E., Harrison, E.H., Morel, D.W. (1997) Addition of lutein, lycopene or beta-crotene to LDL or serum in vitro: effects on carotenoid distribution, LDL composition, and LDL oxidation. *J Nutr Biochem*, **8**, 681-688.
- Schierle, J., Bretzel, W., Bühler, I., Faccin, N., Hess, D., Steiner, K., Schüep, W. (1997) Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chem*, **59**, 459-465.
- Schmidlein, H., Herrmann, K. (1975) Über die Phenolsäuren des Gemüses. *Z Lebensm Unters Forsch*, **159**, 139-148.
- Schweigert, F.J. (1998) Metabolism of carotenoids in mammals. In: Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (Hrsg) *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, Vol. 3, 249-284.
- Sharoni, Y., Giron, E., Rise, M., Levy, J. (1997) Effects of lycopene-enriched tomato oleoresin on 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced rat mammary tumors. *Cancer Detect Prev*, **21**, 118-123.
- Shi, J., Le Maguer, M. (2000) Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Crit Rev Biotechnol*, **20**, 293-334.
- Sicilia, T., Niemeyer, H.B., Honig, D.M., Metzler, M. (2003) Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds. *J Agric Food Chem*, **51**, 1181-1188.
- Souci, S.W., Fachmann, W., Kraut, H. (Hrsg.) (2000) *Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen*, Medpharm Scientific Publisher, Stuttgart.
- Stahl, W., Schwarz, W., Sundquist, A.R., Sies, H. (1992) cis-trans isomers of lycopene and beta-carotene in human serum and tissues. *Arch Biochem Biophys*, **294**, 173-177.

Stahl, W., Sies, H. (1992) Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *J Nutr*, **122**, 2161-2166.

Steingass, H., Menke, K.H. (1986) Schätzung des energetischen Futterwertes aus der in vitro mit Pansensaft bestimmten Gasbildung und der chemischen Analyse. *Übers Tierernähr*, **14**, 251-270.

Stewart, A.J., Bozonnet, S., Mullen, W., Jenkins, G.I., Lean, M.E., Crozier, A. (2000) Occurrence of flavonols in tomatoes and tomato-based products. *J Agric Food Chem*, **48**, 2663-2669.

Taber, D.F., Morrow, J.D., Roberts, L.J., 2nd (1997) A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins*, **53**, 63-67.

Takahashi, K., Nammour, T.M., Fukunaga, M., Ebert, J., Morrow, J.D., Roberts, L.J., 2nd, Hoover, R.L., Badr, K.F. (1992) Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *J Clin Invest*, **90**, 136-141.

Tokusoglu, Ö., Ünal, M.K., Yildirim, Z. (2003) HPLC-UV and GC-MS characterization of the flavonol aglycons quercetin, kaempferol, and myricetin in tomato pastes and other tomato-based products. *Acta Chromatographica*, **13**, 196-207.

Tonucci, L.H., Holden, J.M., Beecher, G.R., Khachik, F., Davis, C.S., Mulokozi, G. (1995) Carotenoid Content of Thermally Processed Tomato-Based Food. *J Agric Food Chem*, **43**, 579-586.

Tsikas, D., Schwedhelm, E., Suchy, M.T., Niemann, J., Gutzki, F.M., Erpenbeck, V.J., Hohlfeld, J.M., Surdacki, A., Frolich, J.C. (2003) Divergence in urinary 8-iso-PGF(2alpha) (iPF(2alpha)-III, 15-F(2t)-IsoP) levels from gas chromatography-tandem mass spectrometry quantification after thin-layer chromatography and immunoaffinity column chromatography reveals heterogeneity of 8-iso-PGF(2alpha). Possible methodological, mechanistic and clinical implications. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **794**, 237-255.

van den Berg, H., van Vliet, T. (1998) Effect of simultaneous, single oral doses of beta-carotene with lutein or lycopene on the beta-carotene and retinyl ester responses in the triacylglycerol-rich lipoprotein fraction of men. *Am J Clin Nutr*, **68**, 82-89.

van Het Hof, K.H., West, C.E., Weststrate, J.A., Hautvast, J.G. (2000) Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr*, **130**, 503-506.

- Visioli, F., Riso, P., Grande, S., Galli, C., Porrini, M. (2003) Protective activity of tomato products on in vivo markers of lipid oxidation. *Eur J Nutr*, **42**, 201-206.
- Walter, M.F., Blumberg, J.B., Dolnikowski, G.G., Handelman, G.J. (2000) Streamlined F2-isoprostane analysis in plasma and urine with high-performance liquid chromatography and gas chromatography/mass spectroscopy. *Anal Biochem*, **280**, 73-79.
- Wang, Z., Ciabattini, G., Creminon, C., Lawson, J., Fitzgerald, G.A., Patrono, C., Macclouf, J. (1995) Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. *J Pharmacol Exp Ther*, **275**, 94-100.
- Watzl, B., Bub, A., Brandstetter, B.R., Rechkemmer, G. (1999) Modulation of human T-lymphocyte functions by the consumption of carotenoid-rich vegetables. *Br J Nutr*, **82**, 383-389.
- Watzl, B., Bub, A. (2001) Carotinoide. *Ernährungs-Umschau*, **48**, 71-74.
- Watzl, B., Rechkemmer, G. (2001) Phenolsäuren. *Ernährungs-Umschau*, **48**, 413-416.
- Watzl, B., Rechkemmer, G. (2001) Flavonoide. *Ernährungs-Umschau*, **48**, 499-503.
- Watzl, B., Bub, A., Briviba, K., Rechkemmer, G. (2003) Supplementation of a low-carotenoid diet with tomato or carrot juice modulates immune functions in healthy men. *Ann Nutr Metab*, **47**, 255-261.
- Waugh, R.J., Morrow, J.D., Roberts, L.J., 2nd, Murphy, R.C. (1997) Identification and relative quantitation of F2-isoprostane regioisomers formed in vivo in the rat. *Free Radic Biol Med*, **23**, 943-954.
- White, W.S., Peck, K.M., Bierer, T.L., Gugger, E.T., Erdman, J.W., Jr. (1993) Interactions of oral beta-carotene and canthaxanthin in ferrets. *J Nutr*, **123**, 1405-1413.
- Winter, M., Herrmann, K. (1986) Esters and Glucosides of Hydroxycinnamic Acids in Vegetables. *J Agric Food Chem*, **34**, 616-620.
- Wöldecke, M., Herrmann, K. (1974) Flavonole und Flavone der Tomaten und des Gemüsepaprikas. *Z Lebensm Unters Forsch*, **155**, 216-219.
- Yura, T., Fukunaga, M., Khan, R., Nassar, G.N., Badr, K.F., Montero, A. (1999) Free-radical-generated F2-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int*, **56**, 471-478.

Zhang, L.X., Cooney, R.V., Bertram, J.S. (1991) Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis*, **12**, 2109-2114.

Zhang, L.X., Cooney, R.V., Bertram, J.S. (1992) Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res*, **52**, 5707-5712.

Zhao, Z., Khachik, F., Richie, J.P., Jr., Cohen, L.A. (1998) Lycopene uptake and tissue disposition in male and female rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, **218**, 109-114.

Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

T. Sicilia, S.E. Kulling, P. P. Hoppe, K. Krämer, A. Bub, G. Rechkemmer
Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Lycopin beim präuminanten Kalb
32. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2003 in München

T. Sicilia, S. E. Kulling, P. P. Hoppe, K. Krämer, A. Bub, G. Rechkemmer
Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Lycopin am Tiermodell Ratte und Kalb im Vergleich
zum Menschen
Kolloquium der Bundesforschungsanstalt für Ernährung, Karlsruhe im September 2003

T. Sicilia, S. E. Kulling, P. P. Hoppe, K. Krämer, A. Bub, G. Rechkemmer
Vergleich der Bioverfügbarkeit zweier Lycopinformulierungen am Tiermodell präuminantes
Kalb
41. DGE-Kongress 2004 in Freising-Weihenstephan

K. Krämer, N. Musaeus, U. Oberfrank, G. Krennrich, U. Obermüller-Jevic, H. van den Berg,
T. van Vliet, T. Sicilia, S. Kulling, G. Rechkemmer, K. Putzbach, K. Albert, P. P. Hoppe
Animal Models for Studying Carotenoid Bioavailability
The 5th Gordon Research Conference on Carotenoids 2004 in Ventura, Kalifornien

T. Sicilia, F. Kratzer, S. E. Kulling
Bestimmung von Phenolsäuren und Flavonoiden in Tomaten
33. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2004 in Bonn

T. Sicilia, F. Kratzer, S. E. Kulling
Bestimmung von Carotinoiden in verschiedenen Tomatensorten
33. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2004 in Bonn

Dank

Ich danke

- Herrn Prof. Dr. Rechkemmer für die Bereitstellung des interessanten Themas, über das ich meine Doktorarbeit im Rahmen des Carotinoid-Leitprojekts angefertigt habe.
- insbesondere meiner Betreuerin Prof. Dr. Sabine Kulling für ihre Unterstützung und guten Ideen.
- Dr. Achim Bub für die Betreuung in Sachen Isoprostane.
- Serap Demirel, Frank Kratzer und Susanne Müller für die tatkräftige Unterstützung im Labor und Eva Hoch für die Durchführung der EIAs.
- meinen Doktorandenkollegen, allen voran Jens Fleschhut, die bei jeglichen Fragen oder Problemen mit Rat und Tat zu helfen versuchten.
- Ute Wagner und Herrn Dr. Koller für die Unterstützung in Sachen GC/MS.
- dem Institut für klinische Pharmakologie insbesondere D. Tsikas, F. Gutzki und M. Suchy für die Einführung in die IAC und die Durchführung der GC/MS/MS-Analysen.
- Dr. Bernhard Watzl für den Einsatz beim Tierversuchsantrag für den Frettchen-Tierversuch.
- Dr. Stephan Barth und Anja Waldheim für ihre Hilfe beim Ratten-Tierversuch.
- Frau Reimer und Herrn Wolff vom BfR für die Durchführung des Frettchen-Tierversuchs.
- der BASF AG für die Finanzierung des Frettchen-Tierversuchs und Dr. Klaus Krämer für die gute Zusammenarbeit.
- Prof. Dr. Steingaß vom Institut für Tierernährung, Hohenheim für den frischen Pansensaft.
- A. Lienau und K. Putzbach vom Arbeitskreis Prof. Dr. Albert der Uni Tübingen für die Durchführung der LC/NMR-Messungen.
- allen Kollegen des IEPs für ihre Unterstützung und die lockere und gute Arbeitsatmosphäre.
- dem Labor „Meyer-Miebach“, das bei fehlenden Utensilien eine bewährte Anlaufstelle war.
- den Basketballern Stephan Barth, Achim Bub, Bernhard Watzl, Benaja Strauss und Peter Koch für die hart umgekämpften Spiele dienstags nachmittags.
- allen anderen Kollegen der BFEL, die den Labor- und Bürokratiealltag mit ihrem Einsatz erleichterten

und meinem Freund Andreas Jung für die tatkräftige Unterstützung bei allen computer-technischen Angelegenheiten.

Lebenslauf

Name: Tina Sicilia
Geburtsdatum: 14.11.1976
Geburtsort: Mannheim
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1983 - 1987 Pestalozzi-Grundschule in Mannheim
1987 - 1996 Liselotte-Gymnasium in Mannheim
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

Oktober 1996 - Juni 2001 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe
Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemikerin
Juli 2001-Dezember 2004 Promotion an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Karlsruhe im Institut für Ernährungsphysiologie