

Justus-Liebig-Universität Gießen
Fachbereich 09
Agrarwissenschaften,
Ökotrophologie und Umweltmanagement
Institut für Ernährungswissenschaft

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und antioxidativen Kapazität von antioxidativ wirksamen Substanzen aus Rotwein, rotem Traubensaftkonzentrat, sortenreinem Apfelsaft und einem „Antiox“-Getränk beim Menschen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Öcotrophologie

von
Gabriele Netzel (geb. Strass)
aus Brisbane, Australien

Vorsitzender: Herr Prof. Dr. Sven Schubert
1. Gutachterin: Frau Prof. Dr. Irmgard Bitsch
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Clemens Kunz

Tag der mündlichen Prüfung: 25. März 2011

Inhaltsverzeichnis

Vorbemerkung

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Literaturübersicht	4
2.1	Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) für den menschlichen Organismus	4
2.1.1	Bildung, Einteilung und Wirkungen der ROS	4
2.1.2	ROS in der Pathogenese degenerativer Erkrankungen	4
2.2	Schutzmechanismen des menschlichen Organismus gegenüber ROS	5
2.2.1	Antioxidatives Verteidigungssystem	5
2.2.2	Antioxidative Kapazität in Plasma und Urin	6
2.2.3	<i>In vitro</i> Tests für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität	7
2.2.4	Harnsäure	10
2.2.5	Vitamin C	11
2.2.6	Malondialdehyd als Biomarker für die Lipidperoxidation und oxidativen Stress	12
2.3	Polyphenole	12
2.3.1	Struktur, Vorkommen und alimentäre Zufuhr der Polyphenole	12
2.3.2	Antioxidative Eigenschaften der Polyphenole und ihre strukturellen Voraussetzungen	17
2.3.3	Absorption der Polyphenole	18
2.3.4	Metabolismus der Polyphenole	21
2.3.4.1	Konjugationen durch körpereigene Enzyme	21
2.3.4.2	Metabolisierung durch Enzyme der Kolonbakterien	22
2.4	Roter Traubensaft, Rotwein und Apfelsaft als Lieferanten von bioaktiven Polyphenolen	23
2.4.1	Polyphenolprofile und “Polyphenollieferanten“	23
2.4.2	Bioaktivität	26
3	Material und Methoden	31
3.1	Analytik	31
3.1.1	Chemikalien und Geräte	31
3.1.2	Bestimmung der antioxidativen Kapazität	32
3.1.2.1	Photosensibilisierte Chemolumineszenz (PCL)	32

3.1.2.2	Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)	32
3.1.2.3	Gesamtphenole nach Folin-Ciocalteu	33
3.1.3	HPLC-Methoden	33
3.1.3.1	Anthocyane – Humanstudie I	33
3.1.3.2	Polyphenole – Humanstudie II	34
3.1.3.3	Hippursäure	35
3.1.3.4	Ascorbinsäure und Harnsäure	35
3.1.3.5	Malondialdehyd (MDA)	35
3.1.3.6	HPLC-ESI-MS/MS Analytik (extern)	37
3.2	Humanstudien	37
3.2.1	Studiengetränke	38
3.2.2	Humanstudie I: rotes Traubensaftkonzentrat vs. Rotwein	39
3.2.2.1	Vorstudie	39
3.2.2.2	Hauptstudie	41
3.2.3	Humanstudie II: “Apfelsäfte“	43
3.2.3.1	Studie - Apfelsäfte	43
3.2.3.2	Studie – Urin	43
3.2.4	Humanstudie III: “Antiox“-Getränk	45
3.3	Pharmakokinetik und Statistik	47
4	Ergebnisse	49
4.1	Humanstudie I: rotes Traubensaftkonzentrat vs. Rotwein	49
4.1.1	Vorstudie	49
4.1.2	Hauptstudie	50
4.2	Humanstudie II	56
4.2.1	Studie-Apfelsäfte	56
4.2.2	Studie-Urin	58
4.3	Humanstudie III: “Antiox-Getränk“	60
5	Diskussion	65
5.1	Anthocyane (Humanstudie I)	65
5.1.1	Anthocyankonzentrationen in Plasma und Urin	65
5.1.2	Einfluss der Lebensmittelmatrix (Zuckergehalt, Alkohol) auf die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen/Polyphenolen	65
5.1.3	Anthocyanmetaboliten	67
5.2	Antioxidative Kapazität (Humanstudie III und II)	70

5.2.1	Antioxidative Kapazität im Plasma	70
5.2.2	Antioxidative Kapazität im Urin	73
5.3	Ascorbinsäure (Humanstudie II und III)	74
5.4	Harnsäure (Humanstudie II und III)	74
5.5	Malondialdehyd (Humanstudie III)	77
5.6	Polyphenole und Metaboliten im Urin (Humanstudie II)	80
5.7	Hippursäure (Humanstudie II und III)	82
5.7.1	Hippursäureausscheidung im Urin	82
5.7.2	Hippursäure als potentieller Biomarker für mit der Nahrung zugeführte Polyphenole	85
6	Resümee und Ausblick	87
7	Zusammenfassung	90
8	Literaturverzeichnis	93
9	Anhang	113
 Danksagung		
 Eidesstattliche Erklärung		

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	ROS im menschlichen Organismus (Halliwell et al. 1995a)	4
Tab. 2:	Determinanten der antioxidativen Plasmakapazität (Halliwell und Gutteridge 1990; Polidori et al. 2001; Halliwell und Gutteridge 2004)	7
Tab. 3:	Substitutionsmuster der Anthocyanidine (Mazza und Kay 2008; Maza und Miniati 1993) *Me = Methyl	15
Tab. 4:	Vorkommen von Polyphenolen (Alonso-Salces et al. 2004; Crozier et al. 2009; Foley et al. 1999; Gu et al. 2004; Manach et al. 2004; Mazza und Kay 2008) und alimentäre Zufuhr	17
Tab. 5:	Am Polyphenolmetabolismus beteiligte Kolonbakterien	23
Tab. 6:	Polyphenolprofile von Äpfeln (Crozier et al. 2009; Tsao et al. 2003) und roten Weintrauben (Cantos et al. 2002; Mazza und Miniati 1993; Mazza 1995)	24
Tab. 7:	Studiengetränke (Humanstudien I-III)	38
Tab. 8:	applizierte Anthocyanmengen (Humanstudie I/Vorstudie)	40
Tab. 9:	Probandenkollektiv (Humanstudie I/Hauptstudie)	41
Tab. 10:	applizierte Anthocyanmengen (Humanstudie I/Hauptstudie)	42
Tab. 11:	Probandenkollektiv (Humanstudie II/Studie-Urin)	44
Tab. 12:	applizierte Antioxidantien (Humanstudie II/Studie-Urin)	44
Tab. 13:	Probandenkollektiv (Humanstudie III)	46
Tab. 14:	applizierte Antioxidantien (Humanstudie III)	46
Tab. 15:	Gesamt-Anthocyane ($C_{\max}$ und $t_{\max}$) im Plasma eines gesunden Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK	50
Tab. 16:	Anthocyanexkretions-Parameter im Urin eines gesunden Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK	50
Tab. 17:	Pharmakokinetische Parameter von Anthocyanen ermittelt im Urin von neun gesunden Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK und 400 ml Rotwein.	52
Tab. 18:	Pharmakokinetische Parameter von Anthocyanen ermittelt im Plasma von neun Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK und 400 ml Rotwein.	54
Tab. 19:	Analysierte Substanzen/bestimmte Parameter im 24 Std. Urin von acht Probanden nach Zufuhr von 700 ml Wasser (Kontrolle) oder 700 ml WTWAS	59
Tab. 20:	Plasma AUC's der antioxidativen Kapazität (PCL, FRAP und Gesamtphenole) sowie von Ascorbinsäure nach Zufuhr von 400 ml Antiox-Getränk oder 400 ml Wasser (Kontrolle) bei sechs gesunden Probanden.	63
Tab. 21:	Antioxidative Kapazität (PCL, FRAP und Gesamtphenole), Malondialdehyd, Ascorbinsäure, Harnsäure und Hippursäure im 24 Std. Urin von sechs gesunden Probanden nach Zufuhr von 400 ml Antiox-Getränk oder 400 ml Wasser (Kontrolle).	63

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Rolle des oxidierten LDL (ox-LDL) im frühen Stadium der Atherogenese (modifiziert nach Berliner und Heinecke 1996, Cobbold et al. 2002)	5
Abb. 2:	Fructosekatabolismus und Harnsäurebildung (Lotito und Frei 2006). Fructose-1-p: Fructose-1-Phosphat; AMP, ADP und ATP: Adenosinmonophosphat, Adenosindiphosphat und Adenosintriphosphat; Pi: anorganisches Phosphat; IMP: Inosinmonophosphat; PNP: Purinnukleosidphosphorylase	11
Abb. 3:	Struktur bedeutender Vertreter der Phenolsäuren (Fleuriet und Macheix 2003)	13
Abb. 4:	Struktur bedeutender Untergruppen der Flavonoide und ihre Ableitung vom Flavangrundgerüst (Richter 1996)	14
Abb. 5:	Anthocyanstrukturen bei unterschiedlichem pH-Wert und deren Farbe, am Beispiel von Cyanidin-3-Glukosid (Lapidot et al. 1999)	16
Abb. 6:	Absorption von Polyphenol-/Flavonoidglykosiden (Crozier et al. 2009; Mazza und Kay 2008; Németh et al. 2003)	19
Abb. 7:	Schematische Darstellung der Metabolisierung von Catechin durch die Kolonmikroflora (Hollman und Katan 1997; Meselhy et al. 1997)	23
Abb. 8:	prinzipieller Reaktionsmechanismus des PCL-Tests (Prior et al. 2005)	32
Abb. 9:	Reduktion des Eisen(III)-Tripyridyltriazin-Komplexes zur Eisen(II)-Form (Huang et al. 2005)	32
Abb. 10:	prinzipieller Reaktionsmechanismus des Gesamtphenol-Tests nach Folin-Ciocalteu (Prior et al. 2005)	33
Abb. 11:	Studiendesign (Humanstudie I/Vorstudie); Standardmahlzeit (ein Weißbrötchen)	40
Abb. 12:	Studiendesign (Humanstudie I/Hauptstudie); Standardmahlzeit: 1 Weißbrötchen mit 30g Käse (Gouda)	42
Abb. 13:	Studiendesign (Humanstudie II/Studie-Urin); Standardmahlzeiten: Mahlzeit 1 – 1 Weißbrötchen; Mahlzeit 2 – 2 Weißbrötchen mit 60g Käse (Gouda); Mahlzeit 3 – 2 Weißbrötchen mit 60g Käse (Gouda)	45
Abb.14:	Studiendesign (Humanstudie III); Standardmahlzeiten: Mahlzeit 1 – 1 Weißbrötchen; Mahlzeit 2 – 2 Weißbrötchen mit 60g Käse (Gouda); Mahlzeit 3 – 2 Weißbrötchen mit 60 g Käse (Gouda)	47
Abb. 15:	Konzentrations-Zeit-Verlauf der Anthocyane im Plasma eines gesunden Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK (333,1 mg Gesamt-Anthocyane)	49
Abb. 16:	Anthocyanexkretion (Menge/Zeitintervall) im Urin eines gesunden Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK (333,1 mg Gesamt-Anthocyane)	49
Abb. 17:	repräsentative HPLC-Chromatogramme (HPLC-DAD bei 520 nm) von Plasma nüchtern (P-0), Plasma 1 Std. nach RTSK-Zufuhr (P-1), Plasma 1 Std. nach Rotwein-Zufuhr (P-2), Urin nüchtern (U-0), Urin 2 Std. nach RTSK-Zufuhr (U-1) und Urin 2 Std. nach Rotwein-Zufuhr (U-2); Peaks: (1) Del-3-Gluk, (2) Cya-3-Gluk, (3) Pet-3-Gluk, (4) Peo-3-Gluk und (5) Mal-3-Gluk; *nicht weiter identifizierte Metaboliten. Die mittels HPLC-ESI-MS/MS ermittelten Massen (Urin) waren wie folgt: (1) Del-3-Gluk (m/z 465 → 303), (2) Cya-3-Gluk (m/z 449 → 287), (3) Pet-3-Gluk (m/z 479 → 317), (4) Peo-3-Gluk (m/z 463 → 301) und (5) Mal-3-Gluk (m/z 493 → 331).	51
Abb. 18:	Individuelle Exkretionsprofile von Anthocyanen im Urin von neun Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK (A) und 400 ml Rotwein (B); dargestellt sind die Konzentrationen für die jeweiligen Sammelintervallmittelpunkte	53
Abb. 19:	Individuelle Konzentrations-Zeit-Verläufe von Anthocyanen im Plasma von neun Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK (A) und 400 ml Rotwein (B)	55

Abb. 20:	PCL-Werte (Studie-Apfelsäfte); Werte sind ascorbinsäurekorrigiert	56
Abb. 21:	FRAP-Werte (Studie-Apfelsäfte); Werte sind ascorbinsäurekorrigiert	56
Abb. 22:	Gesamtphenol-Werte (Studie-Apfelsäfte); Werte sind ascorbinsäurekorrigiert	57
Abb. 23:	Polyphenolgehalte der untersuchten Mostapfelsorten (Studie-Apfelsäfte); Summe aus: Phloridzin, Phloretin-Xyloglukosid, Chlorogensäure, Cumaroylchinasäuren (3-, 4- und 5-Cumaroylchinasäure), Procyanidin B2 und Epicatechin (nur für Weißen-Trierer-Weinapfelsaft und Echter Bohnapfelsaft)	57
Abb. 24:	Korrelationen zwischen antioxidativer Kapazität und analysierten Polyphenolen (Studie-Apfelsäfte)	58
Abb. 25:	repräsentatives HPLC-Chromatogramm (HPLC-DAD bei 280 nm) einer Urinprobe nach Zufuhr von 700 ml WTWAS; Peaks: (1) Hippursäure, (2) und (3) Phloretin-Monoglukurone, (4) Phloretin. Die mittels HPLC-ESI-MS/MS ermittelten Massen waren wie folgt: (1) Hippursäure (m/z 178 → 134), (2) und (3) Phloretin-Monoglukurone (m/z 449 → 273) und (4) Phloretin (m/z 273 → 167).	59
Abb. 26:	relative Veränderungen der analysierten Substanzen/bestimmten Parameter (24 Std. Urin) nach WTWAS im Vergleich zur Kontrolltestung ("Kontrollwerte" als Bezugswerte =100%); Daten: arith. Mittelwerte ± StAbw. (n = 8 Probanden); *p ≤ 0,05	60
Abb. 27:	Konzentrations-Zeit-Verläufe der antioxidativen Kapazität im Plasma, ermittelt mittels PCL-Test, nach Zufuhr von 400 ml Antiox-Getränk oder 400 ml Wasser (Kontrolle); Daten: arith. Mittelwerte ± StAbw. (n = 6 Probanden); TE: Trolox Equivalents	61
Abb. 28:	Konzentrations-Zeit-Verläufe der antioxidativen Kapazität im Plasma, ermittelt mittels FRAP-Test, nach Zufuhr von 400 ml Antiox-Getränk oder 400 ml Wasser (Kontrolle); Daten: arith. Mittelwerte ± StAbw. (n = 6 Probanden)	61
Abb. 29:	Konzentrations-Zeit-Verläufe der antioxidativen Kapazität im Plasma, ermittelt mittels Gesamtphenol-Test, nach Zufuhr von 400 ml Antiox-Getränk oder 400 ml Wasser (Kontrolle); Daten: arith. Mittelwerte ± StAbw. (n = 6 Probanden); GAE: Gallic Acid Equivalents; GP: Gesamtphenole	62
Abb. 30:	Konzentrations-Zeit-Verläufe der Ascorbinsäure im Plasma nach Zufuhr von 400 ml Antiox-Getränk oder 400 ml Wasser (Kontrolle); Daten: arith. Mittelwerte ± StAbw. (n = 6 Probanden)	62
Abb. 31:	relative Veränderungen der analysierten Substanzen/bestimmten Parameter (24 Std. Urin) nach Zufuhr von Antiox-Getränk im Vergleich zur Kontrolltestung ("Kontrollwerte" als Bezugswerte =100%); Daten: arith. Mittelwerte ± StAbw. (n = 6 Probanden); *p ≤ 0,05 (Antiox-Getränk vs. Kontrolle)	64

VORBEMERKUNG

Aus den praktischen Arbeiten die im Rahmen zu der vorliegenden Dissertation durchgeführt wurden, sind bisher die folgenden Publikationen entstanden:

1. Netzel M, **Strass G**, Bitsch I, Könitz R, Christmann M, Bitsch R (2002): Rotweinanthocyane und ihre Bioverfügbarkeit für den Menschen. *Ernährung/ Nutrition* 26 (2): 58-63.
2. Netzel M, **Strass G**, Bitsch I, Könitz R, Christmann M, Bitsch R (2003): Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wine. *Journal of Food Engineering* 56 (2-3): 223-228.
3. Frank T, Netzel M, **Strass G**, Bitsch R, Bitsch I (2003): Bioavailability of anthocyanidin-3-glycosides following consumption of red wine and red grape juice. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 81 (5): 423-435.
4. Bitsch R, Netzel M, Frank T, **Strass G**, Bitsch I (2004): Bioavailability and biokinetics of anthocyanins from red grape juice and red wine. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 5: 293-298.
5. Netzel M, **Netzel G**, Ott U, Bitsch I, Bitsch R, Frank T (2007): Biological antioxidant activity of a beverage containing polyphenols and ascorbic acid. *Ernährung/Nutrition* 31(3): 102-109.

Die Publikationen 3, 5 und im geringeren Umfang 2 sowie die bisher noch nicht publizierte Apfelsaftstudie (in den nachfolgenden Kapiteln als Humanstudie II bezeichnet) bilden die Basis der vorliegenden Dissertation. Auf die entsprechenden Publikationen wird in den jeweiligen Kapiteln verwiesen. Da es sich um keine kumulative Arbeit handelt, ist die vorliegende Dissertation "klassisch" in die Kapitel *Einleitung und Zielsetzung*, *Literaturübersicht*, *Material und Methoden* sowie *Ergebnisse und Diskussion* gegliedert. Die einzelnen Kapitel, insbesondere *Einleitung und Zielsetzung*, *Literaturübersicht* und *Diskussion*, wurden mit aktueller Literatur ergänzt.

1 Einleitung und Zielsetzung

Vom Traubenextrakt zum Teebeutel, Antioxidantien und Polyphenole sind auch 2010 in aller Munde und immer noch ein “Top“ Thema. Die jede Woche neu erscheinenden Publikationen, die sich mit Antioxidantien, antioxidativer Kapazität und/oder Polyphenolen befassen, kann kaum noch bewältigt werden. Huang und Kollegen haben schon 2005 auf das enorm gestiegene Interesse an Antioxidantien hingewiesen: innerhalb einer Dekade (1993 - 2003) hat sich die Zahl der Publikationen über Antioxidantien/oxidativen Stress fast vervierfacht (Huang et al. 2005). Auch die Marktdaten zeigen eindeutig nach oben: der weltweite Markt mit Antioxidantien hat sein Volumen von 400 Mio. US\$ in 2004 auf 438 Mio. US\$ in 2007 vergrößert. Der Anteil der Polyphenole/Flavonoide betrug ca. 200 Mio. US\$ (1*). Weiterhin wurden 2008 in Europa 135 Produkte auf den Markt gebracht, im Vergleich zu 37 in 2006, die auf dem Produktlabel auf den Antioxidantien Gehalt bzw. auf Antioxidantien hinweisen (2*). Dieser Trend hält wohl ungeachtet der ablehnenden Haltung der EFSA (European Food Safety Authority) hinsichtlich antioxidativer Health Claims an.

Unter einem Antioxidans versteht man nach einer Definition von Halliwell et al. (1995a) jede Substanz, die im Vergleich zu einem oxidierbaren Substrat in niedrigerer Konzentration vorhanden ist und dessen Oxidation signifikant verzögert oder verhindert. Solche oxidativen Reaktionen finden im menschlichen Organismus statt und sind nachweislich an der Entstehung von verschiedenen Zivilisationskrankheiten wie z.B. Atherosklerose (Diaz et al. 1997) beteiligt. Folglich ist von großem Interesse, inwieweit über die Zufuhr von Antioxidantien aus der Nahrung das antioxidative Verteidigungssystem des Menschen verstärkt, und damit diesen degenerativen Erkrankungen möglicherweise entgegengewirkt werden kann.

Neben den klassischen antioxidativen Eigenschaften von Polyphenolen – protektive Wirkung durch abfangen von freien Radikalen – weisen immer mehr Studien auf signifikante biologische Aktivitäten dieser Substanzen und ihrer Metaboliten auf zellulärer Ebene hin (Crozier et al. 2009; Fernandez-Pancho et al. 2008). Interessant ist, dass für diese zellmodulierenden Effekte Konzentrationen erforderlich sind, die durchaus über eine normale Ernährung erreicht werden können (Fernandez-Pancho 2008).

*Anmerkung: aus Gründen der Übersicht wurden sämtliche Internetquellen nummeriert und sind im Literaturverzeichnis zu finden.

Der natürliche Polyphenolkomplex, wie er in Früchten und anderen pflanzlichen Lebensmitteln vorliegt, wird als optimal zusammengesetzte Mischung von Antioxidantien und Synergisten angesehen (Eberhardt et al. 2000; Liu 2003; Nicoli et al. 2000; Osman et al. 2001). Neben den Früchten selbst, kommen im Hinblick auf die Zufuhr von Polyphenolen und anderen Antioxidantien, besonders deren Säfte in Frage. Apfelsaft z.B. ist einer der beliebtesten Fruchtsäfte in Deutschland und vielen anderen europäischen Ländern und demnach ein bedeutender Polyphenollieferant. Rote Trauben, roter Traubensaft und Rotwein gehören mit zu den wichtigsten Anthocyan Quellen in einer westlichen Ernährung (Mazza & Kay 2009). Anthocyane gehören zu den Polyphenolen bzw. Flavonoiden und sind für die meisten roten, blauen und violetten Farben von Früchten und Gemüse sowie deren Produkte verantwortlich. Neben klassischen Fruchtsäften und Weinen können aber auch Getränke auf der Basis von Fruchtextrakten bzw. polyphenolreiche Getränkemischungen als Polyphenol- und Antioxidantien-Lieferanten dienen.

Die Bioverfügbarkeit dieser antioxidativ wirksamen Substanzen aus der Lebensmittelmatrix ist eine Grundvoraussetzung für deren potentielle Bioaktivität *in vivo*. Verschiedene Matrixkomponenten, wie z.B. Alkohol, Zucker und Ballaststoffe, können die Bioverfügbarkeit dieser Substanzen und somit deren potentielle biologische Wirkungen signifikant beeinflussen. Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität (Summe aus endogenen und exogenen Antioxidantien) in biologischen Flüssigkeiten wie z.B. Plasma und Urin, kann als eine Art Biomarker für aus der Nahrung bioverfügbare Antioxidantien genutzt werden (Fernandez-Pancho et al. 2008; Wachtel-Gabor et al. 2004). Die antioxidative Kapazität in Plasma und Urin zusammen mit weiteren Parametern (wie z.B. Biomarker für oxidativen Stress, Plasma- und Urinkonzentrationen der entsprechenden Polyphenole/Antioxidantien sowie deren Metaboliten) können wertvolle Daten in klinischen Studien hinsichtlich der *in vivo* Bioaktivität dieser Substanzen liefern (Huang et al. 2005).

In der vorliegenden Dissertation wurden in drei verschiedenen Humanstudien die folgenden Fragestellungen geprüft:

1. Gibt es Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von Anthocyanen (Monoglukoside) aus Rotwein und rotem Traubensaftkonzentrat?
→ Anthocyane in Plasma und Urin wurden mittels HPLC-DAD und LC-ESI-MS/MS bestimmt.

2. Wird durch die Zufuhr eines polyphenolreichen Apfelsafts, hergestellt aus sortenreinen Mostäpfeln, die antioxidative Kapazität im Urin erhöht?
→ Die antioxidative Kapazität (PCL, FRAP und Gesamtphenole) sowie Ascorbinsäure (HPLC-DAD), Harnsäure (quantitativ bedeutendes endogenes Antioxidans; HPLC-DAD), Hippursäure (Polyphenolmetabolit und potentieller Biomarker für die Zufuhr von Polyphenolen) und Polyphenole (HPLC-DAD und LC-ESI-MS/MS) wurden im Urin bestimmt.

3. Wird durch die Zufuhr eines polyphenol- und ascorbinsäurereichen Getränks der antioxidative Status verbessert?
→ Die antioxidative Kapazität (PCL, FRAP und Gesamtphenole) sowie Ascorbinsäure (HPLC-DAD), Harnsäure (quantitativ bedeutendes endogenes Antioxidans; HPLC-DAD), Malondialdehyd (Biomarker für oxidativen Stress; HPLC-Fluoreszenz) und Hippursäure (Polyphenolmetabolit und potentieller Biomarker für die Zufuhr von Polyphenolen; HPLC-DAD) wurden in Plasma und/oder Urin bestimmt.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) für den menschlichen Organismus

2.1.1 Bildung, Einteilung und Wirkungen der ROS

Aerobe Stoffwechselvorgänge, die Aktivität der Peroxisomen, körpereigene Abwehrprozesse und exogene Noxen führen zur Bildung von ROS im Organismus (Ames et al. 1993). Zu diesen reaktiven Intermediaten zählen sowohl freie Radikale als auch nichtradikalische Verbindungen (Tab. 1).

Tab. 1: ROS im menschlichen Organismus (Halliwell et al. 1995a)

radikalische ROS		nichtradikalische ROS	
$O_2^{\bullet -}$	Superoxidradikal	1O_2	Singulett-Sauerstoff
$OH^{\bullet}$	Hydroxylradikal	H_2O_2	Wasserstoffperoxid
$RO^{\bullet}$	Alkoxyradikal	LOOH	Lipidperoxid
$RO_2^{\bullet}$	Peroxyradikal	HOCl	Hypochlorsäure
$NO^{\bullet}$	Stickoxidradikal	$ONOO^{\bullet}$	Peroxynitrit
$NO_2^{\bullet}$	Stickstoffdioxidradikal	HNO_2	Hydrogennitrit

Unter physiologischen Bedingungen üben sie spezifische, für die Integrität des Organismus wichtige Funktionen aus. Hierzu zählen z.B. die intrazelluläre Abtötung von Mikroorganismen durch phagocytierende Zellen des Immunsystems und die Regulation des Gefäßtonus (Benzie 1996). Eine Überproduktion von ROS stellt jedoch eine Gefahr für körpereigene Strukturen dar. Man spricht vom sogenannten oxidativen Stress, wenn durch übermäßige Bildung von ROS oder durch einen Mangel an Antioxidantien das Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen in Richtung Oxidation verschoben ist (Grune 2002). Dieser kann eine Schädigung von Biomolekülen wie Proteinen, DNA und Lipiden zur Folge haben und langfristig zu einer Reihe von degenerativen Erkrankungen führen (Ames et al. 1993, Halliwell und Gutteridge 2004).

2.1.2 ROS in der Pathogenese degenerativer Erkrankungen

Die Theorie der Beteiligung von oxidativem Stress an der Pathogenese degenerativer Erkrankungen ist heute allgemein anerkannt. Initialschritt der Atherogenese und folglich

der kardiovaskulären Erkrankungen ist die Oxidation von Low-Density-Lipoproteinen (LDL) (Abb. 1) (Diaz et al. 1997). Oxidative Schäden sind über verschiedene Mechanismen an der Entstehung von Krebs beteiligt (Dreher und Junod 1996). In der Pathogenese von Diabetes sind freie Radikale involviert. Sie treiben die Autoimmun-Zerstörung der B-Zellen voran (Oberley 1988) und beeinträchtigen die Insulinwirkung (Ceriello 2000). Katarakte des Auges sind zurückzuführen auf eine oxidative Schädigung von Proteinen der Linse durch freie Radikale (Davies 1990). Nicht zuletzt konnte eine Beteiligung von ROS an Entzündungsprozessen bei Asthma (Greene 1995) und Arthritis (Darlington und Stone 2001) nachgewiesen werden.

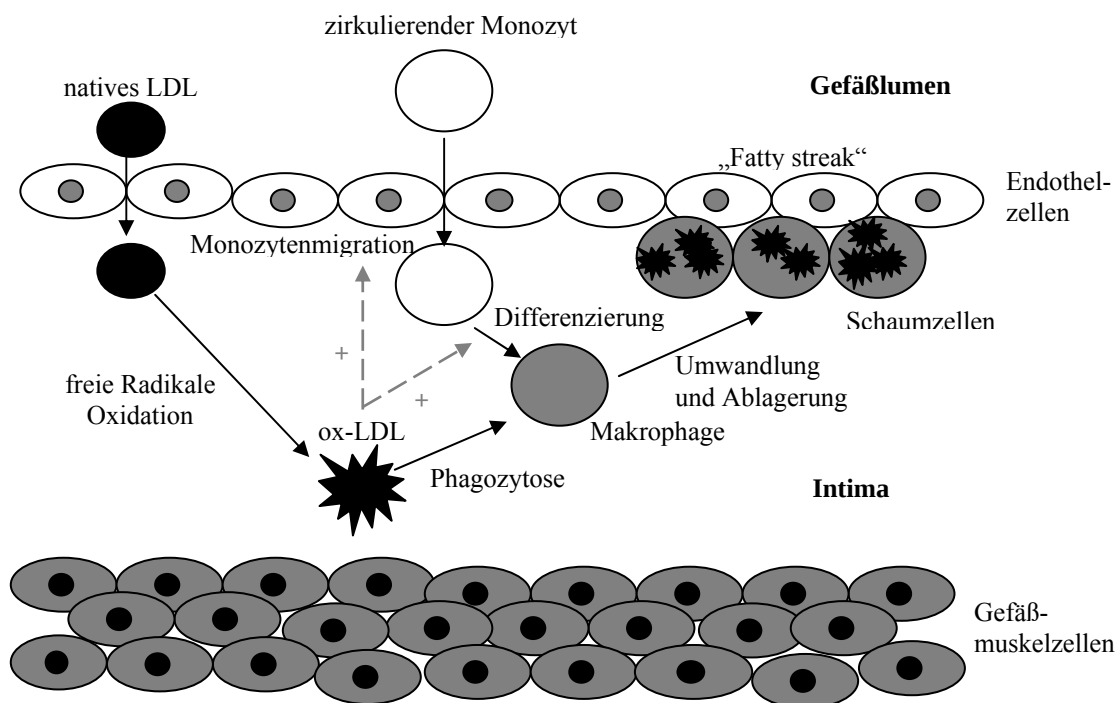


Abb. 1: Rolle des oxidierten LDL (ox-LDL) im frühen Stadium der Atherogenese (Berliner und Heinecke 1996, Cobbold et al. 2002)

2.2 Schutzmechanismen des menschlichen Organismus gegenüber ROS

2.2.1 Antioxidatives Verteidigungssystem

Der unkontrollierten Bildung von ROS steht ein Netzwerk verschiedener Schutzmechanismen gegenüber. Dieses antioxidative Verteidigungssystem ist sehr vielfältig. Es setzt sich zusammen aus Makromolekülen, niedermolekularen Verbindungen sowie antioxidativen Enzymen (Cao und Prior 1998), die spezielle Aufgaben wahrnehmen

und sich in ihrer Wirkung ergänzen. Endogene Schutzmechanismen werden unterstützt durch Antioxidantien der Nahrung. Hierzu zählen insbesondere die antioxidativen Vitamine C und E sowie die Carotinoide und Polyphenole als Vertreter der sekundären Pflanzenstoffe (Watzl und Leitzmann 1999). Die enge Beziehung zwischen Ernährung und antioxidativer Verteidigung bietet einen möglichen Ansatzpunkt für die Prävention degenerativer Erkrankungen.

Antioxidative Mechanismen extrazellulärer Flüssigkeiten wie dem Plasma unterscheiden sich von denen des Intrazellularraums. Dominierende intrazelluläre Verteidigungsstrategie ist die Inaktivierung von $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 durch die Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase (Halliwell und Gutteridge 2004). Die Abwesenheit bzw. geringe Konzentration dieser antioxidativen Enzyme in extrazellulären Flüssigkeiten (Halliwell und Gutteridge 2004) gewährleistet die physiologische Funktion von $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 als interzelluläre Signalmoleküle (Halliwell et al. 1995b). Schädigenden Wirkungen dieser ROS wird im Extrazellularraum vor allem durch die Verhinderung ihrer Umwandlung in das wesentlich reaktivere $OH^{\bullet}$ entgegengewirkt (Halliwell und Gutteridge 1990).

2.2.2 Antioxidative Kapazität in Plasma und Urin

Die „antioxidative Plasmakapazität“ ist ein mittels verschiedener *in vitro* Methoden bestimmbarer Parameter, der die Fähigkeit des Plasmas, vor oxidativen Prozessen zu schützen, erfasst. Sie resultiert aus den spezifischen Wirkungen der einzelnen Plasma-Antioxidantien (Tab. 2) sowie deren Synergismen. Metallbindungsproteine kontrollieren die Konzentration an freien Eisen- und Kupferionen. Damit blockieren sie deren katalytische Aktivität in der Haber-Weiss-Reaktion (Younes 2004) und schützen so vor der Bildung des hochreaktiven $OH^{\bullet}$ aus $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 . Hämbindungsproteine wirken den prooxidativen Aktivitäten der Hämgruppe (Halliwell und Gutteridge 2004) entgegen. Endogene und exogene (aus der Nahrung stammende) niedermolekulare Verbindungen entfalten ihre antioxidativen Wirkungen unter anderem durch Abfangen von ROS.

Tab. 2: Determinanten der antioxidativen Plasmakapazität (Halliwell und Gutteridge 1990, Polidori et al. 2001, Halliwell und Gutteridge 2004)

Plasma-Antioxidans*	Wirkungsweise
Metallbindungsproteine	
Transferrin	Bindung von Eisenionen
Laktoferrin	Bindung von Eisenionen
Albumin	Bindung von Eisen- und Kupferionen, Abfangen von HOCl und ONOO ⁻ , Bindung von Häm
Caeruloplasmin	Bindung von Kupferionen, Oxidation von Fe ²⁺ zu Fe(III) ohne Freisetzung schädigender ROS
Hämbindungsproteine	
Haptoglobin	Bindung von Hämoglobin
Hämopexin	Bindung von Häm
endogene niedermolekulare Verbindungen	
Harnsäure	Abfangen von RO ₂ [•] , HOCl, Bindung von Eisen- und Kupferionen
Bilirubin	Abfangen von RO ₂ [•]
exogene niedermolekulare Verbindungen	
Vitamin E	Abbruch der radikalen Kettenreaktion durch Abfangen von RO ₂ [•] , RO [•] , Schutz der Lipoproteine vor Oxidation
Vitamin C	Abfangen von O ₂ ^{•-} , RO ₂ [•] , HOCl, ¹ O ₂ , OH [•] , Reduktion von α-Tocopherol- und Harnsäureradikalen
β-Carotin u. a. Carotinoide	Abfangen von ¹ O ₂
Polyphenole	Bindung von Eisen- und Kupferionen, Abfangen von OH [•] , ONOO ⁻ , HOCl

*Harnsäure, Vitamin C, Polyphenole und deren Metaboliten sind auch im Urin hinsichtlich ihrer antioxidativen Kapazität von Bedeutung

Die Messung der antioxidativen Plasmakapazität ist eine vielfach eingesetzte Methode, um den Einfluss von Ernährungsinterventionen auf den antioxidativen Status des Menschen zu untersuchen (Morton et al. 2000). Alternativ oder in Kombination kann die antioxidative Kapazität des Urins bestimmt werden (Wachtel-Galor et al. 2004).

2.2.3 *In vitro* Tests für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Die gängigen *in vitro* Tests zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Lebensmitteln und biologischen Flüssigkeiten wie z.B. Blutplasma, Serum und Urin lassen sich basierend auf deren chemischen Reaktionsmechanismus in zwei Kategorien gliedern: Tests die entweder auf einer Wasserstoffatom-Transfer Reaktion (kurz HAT; aus dem englischen übernommen: hydrogen atom transfer) oder auf einer Elektronen-Transfer (ET) Reaktion basieren (Huang et al. 2005; Prior et al. 2005). Typische HAT-Tests sind z.B. der Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)-Test und der Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter (TRAP)-Test aber auch der Chemilumineszenz (CL)-Test sowie der

Photochemilumineszenz (PCL)-Test werden zu dieser Gruppe gezählt; typische ET-Tests sind z.B. der Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)-Test, der Gesamtphenol (total phenols)-Test nach Folin-Ciocalteu und der Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)-Test.

All diese Testsysteme basieren einzig auf chemischen Reaktionen *in vitro* und die erhaltenen Daten sind deshalb mit Vorsicht zu interpretieren, insbesondere wenn physiologische Effekte untersucht werden sollen. Auch haben sämtliche in der Literatur beschriebene Tests zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität abhängig vom Reaktionsmechanismus mehr oder weniger stark ausgeprägte Schwächen, wie z.B.:

- mangelnde Spezifität basierend auf den testspezifischen chemischen Reaktionsmechanismen (z.B. reagieren nicht-phenolische Substanzen wie Ascorbinsäure, Harnsäure, Cystein und Proteine mit dem Folin-Ciocalteu Reagenz im Gesamtphenol-Test)
- Nutzung von im menschlichen Körper nicht vorkommender Radikale (z.B. DPPH[•], ABTS^{•+})
- unphysiologischer pH-Bereich (z.B. pH 3,5 beim FRAP-Test)
- einfache und klar definierte chemische Reaktionen *in vitro* vs. Komplexen physiologischen Vorgängen *in vivo*

(Huang et al. 2005; Prior et al. 2005; Schlesier et al. 2002).

In der Regel werden deshalb auch mindestens zwei, auf unterschiedlichen Reaktionsmechanismen basierende Methoden, verwendet, wie dies bereits 2002 von Schlesier und Kollegen gefordert wurde (Schlesier et al. 2002).

Prior und Kollegen favorisieren z.B. den ORAC- und Gesamtphenoltest (Huang et al. 2005; Prior et al. 2005), während die Arbeitsgruppe um Serafini häufiger den TRAP- und FRAP-Test verwendet (Serafini et al. 2009). Beide Arbeitsgruppen sind auf dem Gebiet “Antioxidative Kapazität bzw. Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität” führend.

Es ist somit auch nicht verwunderlich, dass in der Literatur über entsprechend kontroverse Ergebnisse berichtet wird. Fernandez-Panchon et al. haben in einer sehr umfangreichen und gut recherchierten Übersichtsarbeit über die antioxidative Aktivität von phenolischen Verbindungen (*Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From In Vitro Results to In Vivo Evidence*) u.a. 41 Kurzzeitstudien über den Effekt von polyphenol-/antioxidantienhaltigen Lebensmitteln und Getränken auf die antioxidative Kapazität im

Plasma zusammengefasst (Fernandez-Pancho et al. 2008). Abhängig vom verwendeten Testsystem wurden z.T. völlig kontroverse Ergebnisse erzielt. Cao und Kollegen konnten z.B. nach Konsum von 240 g Erdbeeren mittels ORAC und FRAP eine signifikante Erhöhung der antioxidativen Kapazität im Plasma der Probanden messen, während mit dem ABTS-Test kein Effekt nachweisbar war (Cao et al. 1998). Über einen ähnlichen Befund wird auch in der Studie von Vinson et al. berichtet: nach Zufuhr von 200 mg Traubenkernextrakt konnte mittels ABTS-Test eine signifikante Erhöhung der antioxidativen Kapazität im Plasma gemessen werden, mittels FRAP jedoch nicht (Vinson et al. 2001).

Huang und Kollegen (Huang et al. 2005) weisen in ihrem Übersichtsartikel, der sich mit der Chemie der antioxidativen Testsysteme befasst (*The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*), jedoch ausdrücklich darauf hin, dass wenn

- die genannten “Schwächen“ bei der Interpretation der Ergebnisse in Betracht gezogen werden,
- mindestens zwei verschiedene Tests (mit unterschiedlichem Reaktionsmechanismus) verwendet werden,
- die Durchführung entsprechend standardisiert wird,
- mit Daten über die Bioverfügbarkeit der entsprechenden Zielsubstanzen (z.B. spezifisches Polyphenol/Antioxidans) sowie validen Biomarkern für oxidativen Stress kombiniert werden,

diese *in vitro* Tests durchaus ein wertvolles und hilfreiches “Instrument“ für klinische Studien darstellen (Huang et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität sowohl in den Studiengetränken als auch in den biologischen Proben (Plasma und Urin) deshalb die folgenden Methoden/Tests verwendet: Gesamtphenole nach Folin-Ciocalteu (ET-Test; einfach, schnell, reproduzierbar, leicht zu automatisieren, sehr populär (Huang et al. 2005; Prior et al. 2005)), FRAP (ET-Test; einfach, schnell, reproduzierbar, leicht zu automatisieren, sehr populär (Huang et al. 2005; Prior et al. 2005)) und PCL (HAT-Test; Nutzung des Superoxid-Radikals, das auch im menschlichen Organismus vorkommt; Bestimmung der antioxidativen Kapazität im nanomolaren-Bereich (die meisten antioxidativen Testsysteme arbeiten im mikromolaren-Bereich) (Prior et al. 2005; Schlesier et al. 2002)).

Die spezifischen Reaktionsmechanismen sowie Details für die Durchführung der Tests sind im nachfolgenden Kapitel “Material und Methoden“ bzw. im Anhang beschrieben.

Wenn nicht explizit darauf hingewiesen wird, steht antioxidative Kapazität für hydrophile antioxidative Kapazität.

An dieser Stelle soll auch noch ein kurzer Kommentar zum Gesamtphenol-Test nach Folin-Ciocalteu gemacht werden. Wie Huang und Kollegen sehr treffend schreiben, ist der Gesamtphenol-Test mittels Folin-Ciocalteu (FC) Reagenz der wohl beliebteste Test zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität. Aufgrund seines Namens wird dieser Test jedoch oft missverständlich gebraucht bzw. die erhaltenen Ergebnisse missverständlich interpretiert (Huang et al. 2005). Wie bereits erwähnt wurde, ist der Gesamtphenol-Test ein klassischer ET-Test und misst die reduzierende Kapazität einer Probe. Eine detaillierte Polyphenolanalyse mittels HPLC kann dieser Test selbstverständlich nicht ersetzen, obwohl dies manche Studien suggerieren. Trotzdem hat sich der Gesamtphenol-Test nach FC mittlerweile als eine Art “Routinetest“ in Studien mit phenolischen Antioxidantien etabliert (Huang et al. 2005). Auch die Verwendung von Gallussäure als Kalibriersubstanz und die Berechnung der Ergebnisse in Gallussäure-Äquivalenten tragen hierzu bei.

2.2.4 Harnsäure

Harnsäure ($C_5H_4N_4O_3$) ist nicht nur das Endprodukt des Purinabbaus im menschlichen Körper sondern auch, wie bereits in Tabelle 2 beschrieben, ein quantitativ bedeutendes endogenes Antioxidans (Fernandez-Pancho et al. 2008; Löffler et al. 2007). Darüber hinaus fungiert sie als eine Schlüsselsubstanz bei der Entstehung von Gichtkrankungen. Weiterhin konnte nach Zufuhr von polyphenolreichen Studiengetränken/-mahlzeiten ein fruktosevermittelter Harnsäureanstieg im Plasma von Probanden beobachtet werden (Lotito und Frei 2004 & 2006). Der folgende Stoffwechselweg ist hierfür verantwortlich: der schnelle Metabolismus von Fruktose durch Fruktokinase führt zu einer Verminderung von hepatischem ATP und anorganischem Phosphat. Beide Substanzen sind wichtige Inhibitoren von 5'-Nukleotidase und AMP-Deaminase. Diese Reaktion wiederum erhöht den Abbau von AMP zu Harnsäure (Bode et al. 1973; Heukenkamp und Zollner 1971; Mänpää et al. 1968; Perheentupa und Raivio 1967). In Abbildung 2 ist dieser Stoffwechselweg schematisch dargestellt.

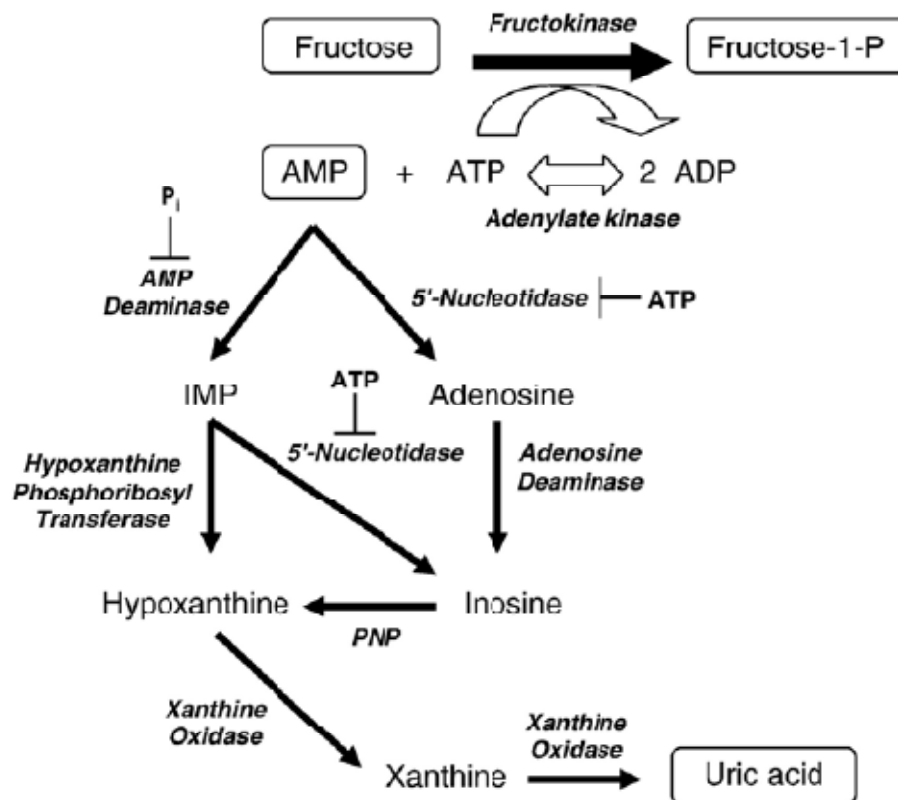


Abb. 2: Fruktosekatabolismus und Harnsäurebildung (Lotito & Frei 2006). Fructose-1-p: Fruktose-1-Phosphat; AMP, ADP und ATP: Adenosinmonophosphat, Adenosindiphosphat und Adenosintriphosphat; P_i : anorganisches Phosphat; IMP: Inosinmonophosphat; PNP: Purinnukleosidphosphorylase

Da praktisch sämtliche gängigen Tests zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität Harnsäure miterfassen, sollte diese in allen Studien, die die antioxidative Kapazität *in vivo* untersuchen, analysiert werden.

2.2.5 Vitamin C

Vitamin C bildet in Form der Ascorbinsäure und der Dehydroascorbinsäure ein Redoxsystem. Es vermag mittels seiner antioxidativen Kapazität, die Lipidperoxidation durch wasserlösliche Peroxidradikale nahezu komplett zu verhindern (Biesalski et al 1997; Löffler et al. 2007). Eine wichtige Rolle spielt Vitamin C in der synergistischen Wirkung mit Vitamin E, welches nach der Reaktion mit Lipidperoxiden durch Vitamin C regeneriert wird (Hailer 1994). Über einen Antioxidans-Mechanismus hemmt Vitamin C u.a. die Bildung von krebserregenden Nitrosaminen, wodurch es besonders vor Krebserkrankungen des Gastrointestinaltraktes und des Pankreas schützen kann (Watzl und Leitzmann 1999).

Wenn nicht speziell darauf hingewiesen wird, werden in den nachfolgenden Kapiteln die Begriffe Ascorbinsäure und Vitamin C synonym verwendet.

2.2.6 Malondialdehyd als Biomarker für die Lipidperoxidation und oxidativen Stress

Malondialdehyd (MDA) ist ein natürlich vorkommender Dialdehyd bestehend aus drei Kohlenstoffatomen mit der Strukturformel $\text{HOC-CH}_2\text{-CHO}$ (Bones-Taurel und Guerin 1992). MDA ist einer der hauptsächlich vorkommenden sekundären Oxidationsprodukte von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Körperflüssigkeiten oder Geweben, weshalb die Bildung von MDA als allgemein anerkannter Index für die Lipidperoxidation gilt (Bonnetfont et al. 1989; Fukunaga 1998). MDA im Urin wird häufig in Tier- und Humanstudien als ein nichtinvasiver Biomarker für die Bestimmung der Lipidperoxidation, verursacht durch oxidativen Stress, verwendet (Korchazhkina et al. 2003).

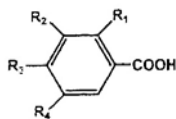
2.3 Polyphenole

2.3.1 Struktur, Vorkommen und alimentäre Zufuhr der Polyphenole

Die Polyphenole stellen eine der größten und verbreitetsten Gruppen sekundärer Pflanzenstoffe dar und sind ein integraler Bestandteil unserer Ernährung. Mehrere hundert solcher, auf der Struktur des Phenols basierender Verbindungen, konnten bisher in essbaren Pflanzen identifiziert werden (Crozier et al. 2009; Manach et al. 2004; Mazza und Kay 2008). Sie werden überwiegend den beiden Hauptgruppen der Phenolsäuren und Flavonoiden (Konishi et al. 2005) zugeordnet.

Zu den Phenolsäuren zählen die Derivate der Benzoesäure und der Zimtsäure (Abb. 3). Sie liegen in der Natur kaum in freier Form vor, sondern sind vorwiegend über Esterbindungen mit Zellwandkomponenten (Cellulose, Lignin, Proteine), organischen Säuren oder Zuckern verknüpft (Liu 2004).

Hydroxybenzoesäuren



$R_1=R_2=R_4=H, R_3=OH$

$R_1=R_4=H, R_2=R_3=OH$

$R_1=R_4=H, R_2=OCH_3, R_3=OH$

$R_1=H, R_2=R_3=R_4=OH$

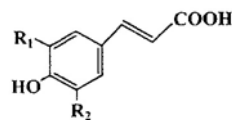
p-Hydroxybenzoesäure

Protocatechusäure

Vanillinsäure

Gallussäure

Hydroxyzimtsäuren



$R_1=R_2=H$

$R_1=OH, R_2=H$

$R_1=OCH_3, R_2=H$

$R_1=OCH_3, R_2=OCH_3$

p-Cumarsäure

Kaffeesäure

Ferulasäure

Sinapinsäure

Abb. 3: Struktur bedeutender Vertreter der Phenolsäuren (Fleuriet und Macheix 2003)

Die Flavonoide, die die größte Gruppe unter den Polyphenolen darstellen, leiten sich vom Flavan (2-Phenyl-benzodihydropyran) ab (Herrmann 1993). Aufgrund des Oxidationsgrades des heterozyklischen Ringes und dessen funktioneller Reste (Beecher 2003) ergeben sich verschiedene Untergruppen (Abb. 4). Die strukturelle Vielfalt der Flavonoide lässt sich durch Unterschiede in Anzahl, Anordnung und Substitution der phenolischen Hydroxylgruppen erklären (Rice-Evans 2004). Mit Ausnahme der Flavanole (Crozier et al. 2009; Manach et al. 2004) kommen die Flavonoide in der Natur überwiegend als Glykoside vor. Bisher konnten mehr als 80 verschiedene Zucker in Flavonoidglykosiden nachgewiesen werden (Watzl und Rechkemmer 2001); häufige Monosaccharide sind Glukose, Galaktose, Rhamnose und Xylose (Rice-Evans et al. 1996).

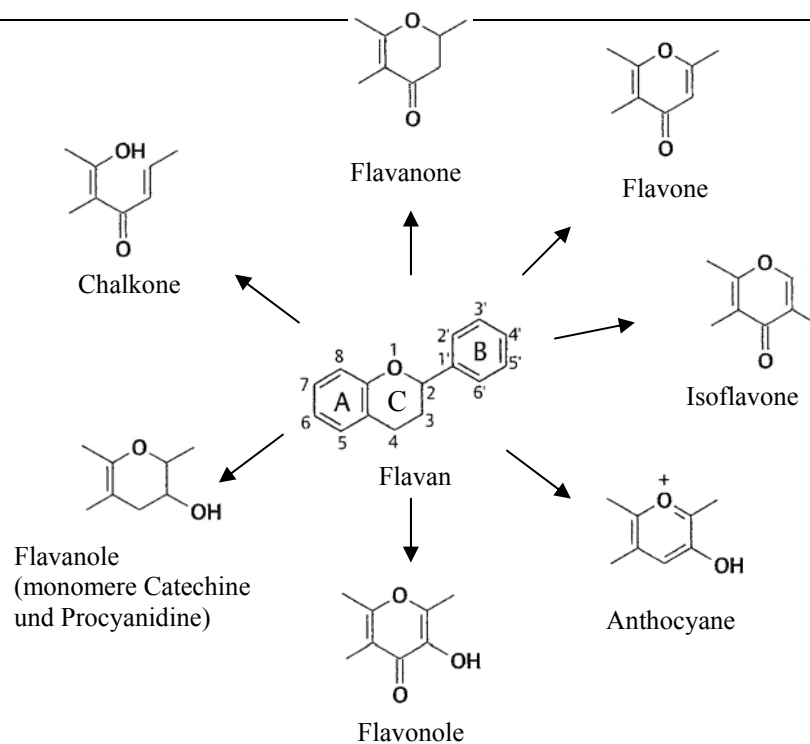


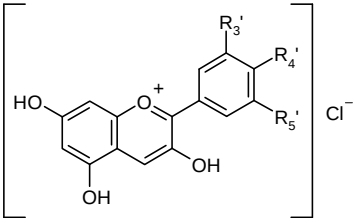
Abb. 4: Struktur bedeutender Untergruppen der Flavonoide und ihre Ableitung vom Flavangrundgerüst (Richter 1996)

Polyphenole sind in allen Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs vertreten, wobei Polyphenolprofil und -gehalt von genetischen Faktoren, Umweltfaktoren, Erntezeitpunkt, Lagerung sowie Lebensmittelverarbeitung und -zubereitung beeinflusst werden (Watzl und Rechkemmer 2001). Höchste Konzentrationen sind in den Randschichten der Pflanzen zu finden (Manach et al. 2004), da ihre Biosynthese durch Licht stimuliert wird (Watzl und Rechkemmer 2001) und sie eine wichtige Rolle bei Interaktionen zwischen Pflanzen und ihrer biotischen sowie abiotischen Umwelt spielen (Halliwell und Gutteridge 2004). Während die Untergruppe der Flavonole ubiquitär in pflanzlichen Produkten vorkommt, sind andere charakteristisch für bestimmte Lebensmittel (z.B. Flavanone in Zitrusfrüchten, Isoflavone in Sojaprodukten, Dihydrochalcone in Äpfeln, Anthocyane in Beerenobst) (Tab. 4) (Crespy et al. 2002; Crozier et al. 2009; Mazza und Kay 2008; Scalbert und Williamson 2000).

Aufgrund der Bedeutung der Anthocyane für die vorliegende Arbeit (Anthocyane als die charakteristischen Flavonoide in rotem Traubensaft und Rotwein; Humanstudie I) und als die größte Gruppe wasserlöslicher Farbpigmente in Früchten, Gemüse und Pflanzen, soll diese Flavonoid-Untergruppe nachfolgend etwas detaillierter beschrieben werden. Die wichtigsten Anthocyan-Quellen in der westlichen Ernährung sind rote Trauben, roter Traubensaft, Rotwein, Blaubeeren, Kirschen, Himbeeren, Erdbeeren, schwarze

Johannisbeeren und Blutorange (Mazza und Kay 2008). Bereits 100 g dieser Beeren können bis zu 500 mg Anthocyane enthalten (Mazza und Miniati 1993). Mittlerweile wurden mehr als 550 verschiedene Anthocyane identifiziert, wobei in Pflanzen hauptsächlich Cyanidin-, Delphinidin-, Malvidin-, Pelargonidin-, Peonidin- und Petunidin-Glykoside zu finden sind (Crozier et al. 2009; Mazza und Kay 2008). Anthocyane stimmen untereinander mit den Hydroxylgruppen am 5. und 7. C-Atom überein und unterscheiden sich durch das Substitutionsmuster im B-Ring (Tab. 3). Gemeinsam ist auch oft das Vorhandensein der OH-Gruppe am C3-Atom, deren Glykosylierung als Voraussetzung für die Stabilität des Moleküls betrachtet wird (Böhm 1998). Chemisch gesehen sind Anthocyane Glykoside, die durch verdünnte Säuren oder enzymatisch in die Farbstoffkomponente Anthocyanidin (Aglykon) und einen Zuckerrest gespalten werden können. Der Zuckerrest, in der Regel zwei Monosaccharide oder ein Disaccharid, ist meist an C3- bzw. C5-Stellung gebunden und wird teilweise mit Hydroxyzimtsäure acyliert. Bei allen bisher bekannten Aglykonen besteht die Grundstruktur aus einem 2-Phenylbenzopyran, welches an den Positionen 3, 4', 5 und 7 durch Hydroxylgruppen substituiert ist (Crozier et al. 2009; Mazza und Kay 2008; Mazza und Miniati 1993).

Tab. 3: Substitutionsmuster der Anthocyanidine (Mazza und Kay 2008; Mazza und Miniati 1993) *Me = Methyl

				
	R3'	R4'	R5'	Summenformel
Pelargonidin	H	OH	H	C ₁₅ H ₁₁ ClO ₅
Cyanidin	OH	OH	H	C ₁₅ H ₁₁ ClO ₆
Delphinidin	OH	OH	OH	C ₁₅ H ₁₁ ClO ₇
Päonidin	OMe*	OH	H	C ₁₆ H ₁₃ ClO ₆
Petunidin	OH	OH	OMe	C ₁₆ H ₁₃ ClO ₇
Malvidin	OMe	OH	OMe	C ₁₇ H ₁₅ ClO ₇

Anthocyane sind auch für die Lebensmittelindustrie aufgrund ihres Färbepotentials äußerst attraktiv. Ihre Stabilität ist jedoch stark von äußeren Einflüssen, wie Licht, Sauerstoff, Temperatur, pH-Wert, Metallionen, Enzyme und Ascorbinsäure abhängig (Baublis 1994; Fossen et al. 1998; Iversen 1999). Bei einem pH-Wert von 3 oder niedriger liegen die

Anthocyane als Flavylumkation vor. Steigt der pH-Wert, konkurrieren Kinetik und Thermodynamik zwischen der Hydrationsreaktion des Flavylumkations und einem Protonentransfer zwischen den aziden Hydroxylgruppen der Aglykone. Bei pH 4-5 entsteht eine farblose Pseudobase, während bei pH 6-7 eine violette chinoidale Base entstehen kann. Aus beiden Substanzen entsteht durch Ringöffnung ein Chalcon (Abb. 5) (Fossen et al. 1998; Lapidot et al. 1999; Mazza und Miniati 1993).

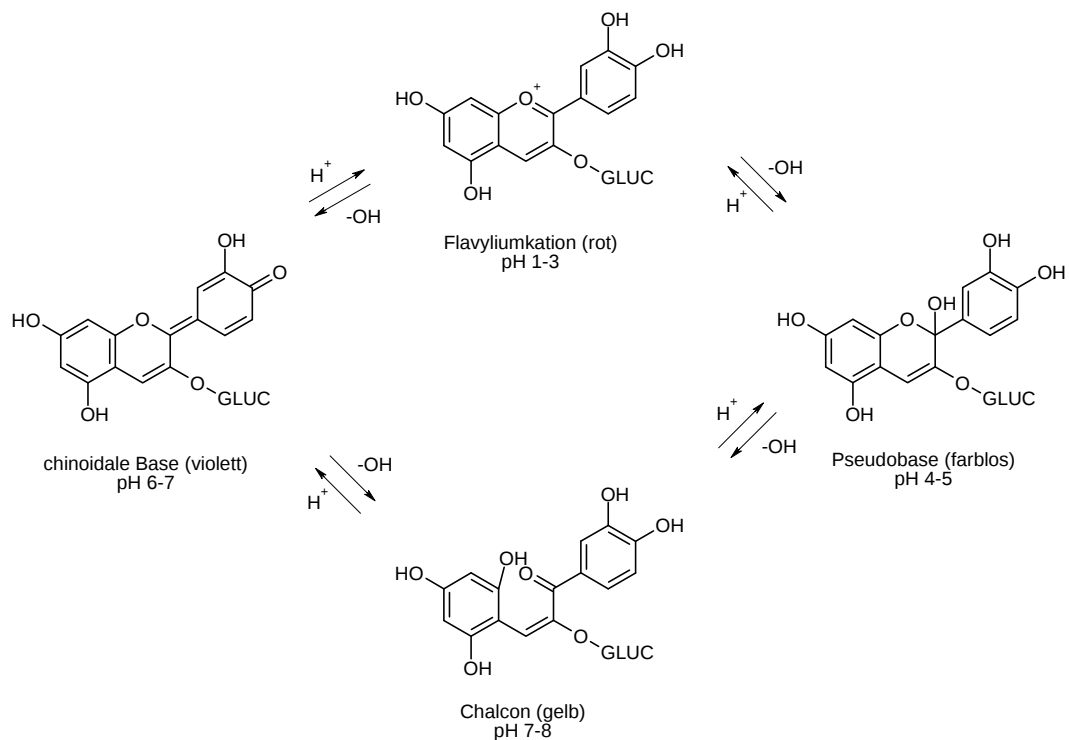


Abb. 5: Anthocyanstrukturen bei unterschiedlichem pH-Wert und deren Farbe, am Beispiel von Cyanidin-3-Glukosid (Lapidot et al. 1999)

Die alimentäre Polyphenol-/Anthocyanaufnahme lässt sich anhand von Verzehrerhebungen unter Berücksichtigung von Daten zum Polyphenolgehalt in Lebensmitteln ableiten. Hertog et al. (1995) konnten zeigen, dass zum Teil große Unterschiede in der Flavonoidzufuhr verschiedener Länder bestehen. Aber auch innerhalb einer Bevölkerungsgruppe kann die Schwankungsbreite beachtlich sein (Hertog et al. 1993). Kulturelle Einflüsse, Ernährungsgewohnheiten sowie individuelle Vorlieben spielen hierbei eine Rolle. Im Durchschnitt setzt sich die täglich zugeführte Polyphenolmenge aus einem Drittel Phenolsäuren und zwei Dritteln Flavonoiden zusammen (Scalbert und Williamson 2000). Tabelle 4 enthält eine Übersicht über Zufuhrmengen einzelner Polyphenolgruppen für verschiedene Länder.

Tab. 4: Vorkommen von Polyphenolen (Alonso-Salces et al. 2004; Crozier et al. 2009; Foley et al. 1999; Gu et al. 2004; Manach et al. 2004; Mazza und Kay 2008) und alimentäre Zufuhr

Polyphenolgruppe	bedeutende Vertreter	Vorkommen	alimentäre Zufuhr [mg/d]	
Hydroxy-benzoesäuren	p-Hydroxybenzoesäure, Protocatechusäure, Gallussäure	Zwiebel, Brombeere, schwarzer Rettich, schwarzer Tee	11	(Deutschland) [1]
Hydroxy-zimtsäuren	p-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure	Kaffee, Kirsche, Apfel, Weintraube, Brokkoli, Blaubeere, Getreide	211	(Deutschland) [1]
Flavonole	Kämpferol, Quercetin, Myricetin	Zwiebel, Grünkohl,	12	(Deutschland) [2]
		Blaubeere, Lauch,	4	(Finnland) [3]
		Brokkoli, Apfel	16	(Japan) [4]
Flavone	Luteolin, Apigenin	Sellerie, Petersilie	<1	(Finnland, Japan) [3, 4]
			1-2	(Dänemark) [5]
Flavanole				
a) Catechine	Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin	schwarzer Tee, Rotwein, Aprikose, Schokolade	8	(Deutschland) [2]
b) Procyanidine	Procyanidin B2	Apfel, Weintraube, Schokolade	20-50	(Dänemark) [5]
			4	(Deutschland) [2]
			58	(USA) [6]
Flavanone	Naringenin, Hesperetin, Eriodictyol	Zitrusfrüchte	13	(Deutschland) [2]
			6-12	(Dänemark) [5]
			20	(Finnland) [3]
Isoflavone	Daidzein, Genistein, Glycitein	Sojabohne	<1	(USA, Holland) [7, 8]
			47	(Japan) [4]
Anthocyane	Cyanidin, Delphinidin, Malvidin	Beerenobst, Rotwein, rote Weintraube, Aubergine	3	(Deutschland) [2]
			6-60	(Dänemark) [5]
			82	(Finland) [9]
			180-215	(USA) [9]
Dihydrochalcone	Phloretin, Phloridzin	Apfel	<1	(Deutschland) [2]

[1] = Radtke et al. 1998, [2] = Linseisen et al. 1997, [3] = Knekt et al. 2002, [4] = Arai et al. 2000, [5] = Dragsted et al. 1997, [6] = Gu et al. 2004, [7] = De Kleijn et al. 2001, [8] = Boker et al. 2002, [9] Mazza und Kay 2008

2.3.2 Antioxidative Eigenschaften der Polyphenole und ihre strukturellen

Voraussetzungen

Die antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole beruhen vor allem auf ihrer Fähigkeit, freie Radikale abzufangen und prooxidative Übergangsmetalle zu binden (Sugihara et al. 1999). Neben diesen klassischen Aktivitäten weisen sie weitere antioxidative Mechanismen auf. Hierzu zählen die Inhibierung und die Modulation der Genexpression von Enzymen (Kim et al. 2004), deren Aktivität zur Bildung von ROS führt (z.B.

Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen), sowie die Beeinflussung von Signaltransduktionskaskaden (Williams et al. 2004).

Insbesondere für die Gruppe der Flavonoide konnten antioxidative Eigenschaften in zahlreichen *in vitro* Untersuchungen (Bors et al. 1990, Burda und Oleszek 2001, Cao et al. 1997, Peng und Kuo 2003, Rice-Evans et al. 1996, Sugihara et al. 1999) nachgewiesen und folgende strukturelle Voraussetzungen abgeleitet werden:

- zwei ortho-ständige Hydroxylgruppen am B-Ring in Position 3'4'
- eine 2,3-Doppelbindung in Verbindung mit einer 4-Carbonylgruppe am C-Ring
- eine Hydroxylgruppe in Position 3 in Verbindung mit einer 2,3-Doppelbindung am C-Ring
- das Vorkommen unsubstituierter Hydroxylgruppen (Glykosilierung oder Methylierung führt zur Verminderung der antioxidativen Eigenschaften)
- das Vorkommen von Metallbindungsdomänen zur Bildung von Chelaten mit Übergangsmetallen: eine 3'4'-Dihydroxygruppierung am B-Ring oder eine 3-Hydroxy- und 4-Carbonylgruppe am C-Ring oder eine 5-Hydroxy- und 4-Carbonylgruppe am C-Ring (Hider et al. 2001).

Ozgová et al. (2003) zeigten, dass in unterschiedlichen Testsystemen verschiedene Strukturmerkmale essentiell für die antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole sind. Struktur-Wirkungs-Beziehungen sollten daher immer im Kontext des jeweiligen verwendeten prooxidativen Systems betrachtet werden.

2.3.3 Absorption der Polyphenole

Die Absorption der Polyphenole wird durch ihre chemische Struktur bestimmt. Da die Polyphenole in Lebensmitteln überwiegend in Form hydrophiler Glykoside (Flavonoide), in Form von Estern (Hydroxyzimtsäuren) oder Polymeren (Procyanidine) vorliegen (Crozier et al. 2009, Manach et al. 2004), können sie die Darmmukosa nicht ohne weiteres passieren.

In zahlreichen Human- (u.a. Erlund et al. 2000, Sesink et al. 2001) und Rattenstudien (u.a. Chang et al. 2005, Crespy et al. 2002, Mullen et al. 2002) konnten nach einer oralen Supplementierung mit Flavonoidglykosiden keine intakten Glykoside im Plasma detektiert werden. Dies spricht für eine Hydrolyse als notwendigen Schritt im Absorptionsprozess.

Németh et al. (2003) isolierten aus der Dünndarmmukosa des Menschen zwei β -Glukosidasen: die Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) und die zytosolische β -Glukosidase (CBG). Day et al. (1998 & 2000) wiesen nach, dass Flavonoidglykoside als Substrate dieser Enzyme fungieren.

Aus diesen Erkenntnissen lassen sich zwei mögliche Absorptionswege ableiten:

- Als membranständiges Enzym auf der luminalen Seite des Dünndarmepithels ermöglicht die LPH eine Hydrolyse der Glykoside vor der Absorption mit anschließender passiver Diffusion des freigesetzten Aglykons.
- Die intrazelluläre Hydrolyse der Glykoside durch die CBG setzt eine aktive Aufnahme des intakten Glykosids über epitheliale Transportsysteme voraus.

Im Rahmen von *in vitro* Studien an isoliertem Rattendünndarm (Gee et al. 2000, Wolfram et al. 2002) und an humanen Caco-2 Zellen (Walgren et al. 2000) konnte der Natrium-abhängige Glukose-Transporter SGLT1 als ein solches Transportsystem identifiziert werden. Unterschiede in der Effizienz der Absorption bestehen bei Flavonoidglykosiden in Abhängigkeit der Art des Zuckerrestes (Manach et al. 2005), der Anzahl der Zuckerreste (Gee et al. 2000), nicht aber der Position der Zuckerreste (Arts et al. 2004). Abbildung 6 fasst die gegenwärtigen Erkenntnisse zur Absorption von Flavonoidglykosiden zusammen.

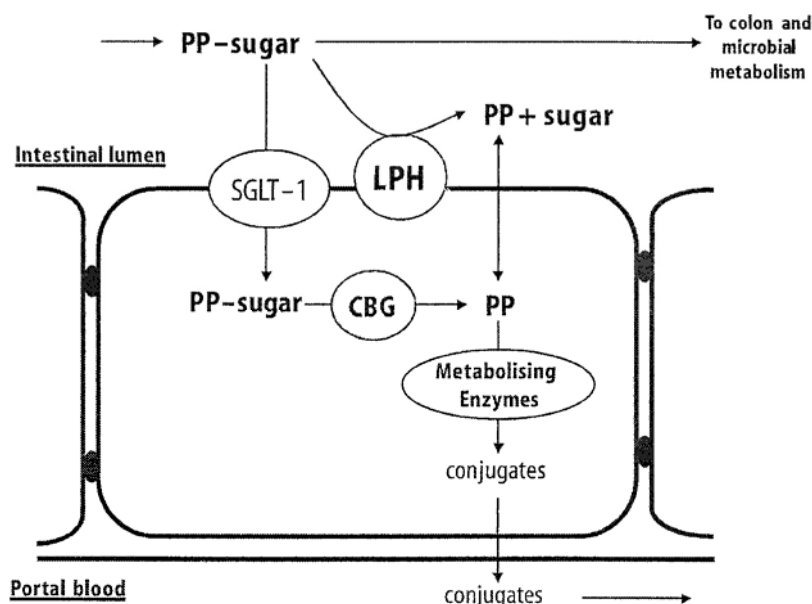


Abb. 6: Absorption von Polyphenol-/Flavonoidglykosiden (Crozier et al. 2009; Mazza und Kay 2008; Németh et al. 2003). PP-sugar = Polyphenol-Glykosid; PP = Polyphenol-Aglykon; CBG = Cytosolische β -Glukosidase; LPH = Laktase-Phlorizin-Hydrolase; SGLT-1 = Natrium-Abhängiger Glukose Transporter 1; Metabolising Enzymes = Catechol-O-Methyltransferase (COMT); Sulfotransferase (SULT); UDP-Glukuronosyltransferase (UDP-GT)

Im Gegensatz zu allen anderen Flavonoidglykosiden werden Anthocyane scheinbar auch ohne einen Hydrolyseschritt, also als intakte Glykoside, absorbiert. In zahlreichen Humanstudien konnten intakte Anthocyane in Blut und/oder Urin nachgewiesen werden (Bitsch et al. 2004; Cooney et al. 2004; Kay et al. 2004 & 2005; McGhie et al. 2003; Milbury et al. 2002; Mülleider et al. 2002; Netzel et al. 2001; Wu et al. 2002), während in anderen Studien hauptsächlich Metaboliten gefunden wurden (Felgines et al. 2003; Lehtonen et al. 2009). Walle (2004) führt diesen Unterschied auf die spezielle Struktur der Anthocyane als positiv geladenes Oxonium-Ion zurück (vgl. Abb. 5). Aber auch die Instabilität von Anthocyanmetaboliten während der Lagerung von biologischem Probenmaterial könnte für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein. Felgines und Kollegen konnten z.B. einen signifikanten Abbau von Pelargonidin-Metaboliten in gelagerten Urinproben beobachten (Felgines et al. 2003).

Das in Abbildung 6 beschriebene Absorptionsmodell wird auch für die Anthocyane angenommen (Crozier et al. 2009; Mazza und Kay 2008). Ob die intakten Glykoside mittels passiver Diffusion oder aber via einem aktiven Transportmechanismus (z.B. mit Hilfe des SGLT1) absorbiert werden, muß letztendlich noch geklärt werden. Auch in welchem Ausmaß der organische Anionentransporter Bilitranslocase an der Anthocyanabsorption beim Menschen beteiligt ist, muß in weiteren Studien geprüft werden (Mazza und Kay 2008; Passamonti et al. 2002).

Untersuchungen zur Absorption von Hydroxyzimtsäureestern wurden vor allem mit Chlorogensäure, einem Kaffeesäureester, durchgeführt. Die Aufnahme von intakter Chlorogensäure konnte in Interventionsstudien nicht (Azuma et al. 2000, Nardini et al. 2002) oder nur in geringem Umfang (Gonthier et al. 2003, Olthof et al. 2001) nachgewiesen werden. Andreasen et al. (2001) wiesen im gesamten Darmabschnitt des Menschen Esterasen nach, die die Hydrolyse von Hydroxyzimtsäureestern katalysieren. Freie Hydroxyzimtsäuren, wie die Kaffeesäure, werden transzellulär über den Monocarboxylsäure-Transporter (MCT) aufgenommen (Konishi et al. 2003, Konishi und Kobayashi 2004). Die Absorption intakter Hydroxyzimtsäureester scheint dagegen auf parazellulärem Weg zu erfolgen (Konishi und Kobayashi 2005). Eine große Bedeutung bei der Absorption der Hydroxyzimtsäureester haben auch die Bakterien des Kolons. Gonthier et al. (2003) zeigten im Rattenversuch, dass nach Chlorogensäurezufuhr Metabolite bakteriellen Ursprungs die Hauptformen in Plasma und Urin darstellen.

Die Procyanidine sind aus den monomeren Flavanolen (-)-Epicatechin und (+)-Catechin aufgebaut (da Silva Porto et al. 2003). Aufgrund ihrer polymeren Natur und ihres hohen Molekulargewichtes ist ihre Absorptionsfähigkeit eingeschränkt. Die Absorption von Procyanidindimeren und -trimeren konnte sowohl *in vitro* (Déprez 1999 zitiert nach Déprez et al. 2000) als auch *in vivo* (Holt et al. 2002, Sano et al. 2003, Tsang et al. 2005) nachgewiesen werden. Für polymere Verbindungen mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von sieben ist die Darmmukosa dagegen undurchlässig (Déprez 1999 zitiert nach Déprez et al. 2000). Mit der Nahrung aufgenommene Procyanidine gelangen überwiegend in den unteren Darmabschnitt und werden durch die Mikroflora gespalten (Déprez et al. 2000). Die dabei gebildeten Phenolsäuren können im Kolon absorbiert werden.

2.3.4 Metabolismus der Polyphenole

2.3.4.1 Konjugationen durch körpereigene Enzyme

Die Polyphenole unterliegen im menschlichen Körper einem intensiven Metabolismus. Sie zirkulieren im Plasma vorwiegend als Konjugate mit Glukuronsäure, Schwefelsäure und Methylgruppen (Crozier et al. 2009; Piskula und Terao 1998). Transferasen, die die Konjugation der Polyphenole katalysieren, konnten in verschiedenen Geweben des Menschen nachgewiesen werden, mit höchsten Enzymaktivitäten in Darm, Leber und Niere (Piskula und Terao 1998). In der Darmmukosa erfolgt eine Konjugation primär mit Glukuronsäure (Spencer et al. 1999). Anhand eines *in vitro* Modells konnte gezeigt werden, dass diese Glukuronide in der Leber weiter methyliert oder nach Hydrolyse durch endogene β -Glukuronidasen mit Schwefelsäure konjugiert werden (O’Leary et al. 2003). Die Konjugation erhöht die Wasserlöslichkeit der Polyphenole und leitet ihre Ausscheidung über den Urin oder die Galle ein (Manach et al. 2004). Mit der Gallenflüssigkeit in den Darm sezernierte Polyphenolkonjugate können nach ihrer Hydrolyse erneut absorbiert (enterohepatischer Kreislauf) (Manach et al. 2004) und damit ihre Verweildauer im Körper verlängert werden.

Für die *in vivo* Wirkung der Nahrungspolyphenole ist von Interesse, inwieweit Konjugationsreaktionen ihre antioxidativen Eigenschaften beeinflussen. Halliwell et al. (2005) vermuten, dass diese aufgrund einer Blockierung radikalabfangender Hydroxylgruppen vermindert werden. Die wenigen bisher verfügbaren Studien weisen auf

einen zumindest partiellen Erhalt der antioxidativen Eigenschaften hin (Miyake et al. 2000, da Silva et al. 1998, Shirai et al. 2001).

2.3.4.2 Metabolisierung durch Enzyme der Kolonbakterien

Die Metabolisierung der Polyphenole durch die Bakterien des Kolons ist von großer Bedeutung. Aufgrund der eingeschränkten Absorptionsfähigkeit der Polyphenole im Dünndarm findet sie in beachtlichem Umfang statt. Die gebildeten Metabolite sind in Plasma und Urin nachweisbar (Crozier et al. 2009; Rechner et al. 2002) und können daher möglicherweise biologische Wirkungen im menschlichen Organismus entfalten (Unno et al. 2003).

Bakterielle Enzyme katalysieren die Freisetzung von Hydroxyzimtsäuren und Flavonoidaglykonen durch Spaltung von Estern, Glykosiden und Glukuroniden (Aura et al. 2002, Couteau et al. 2001). Im Unterschied zu körpereigenen Enzymen katalysieren sie auch den Abbau des Polyphenolgrundgerüsts. Die Struktur der hierbei gebildeten einfachen Phenolsäuren wird dabei allein vom Grundgerüst des Polyphenols bestimmt (Rechner et al. 2004). Degradationsprodukte wie Phenyl- und Hydroxyphenylderivate der Benzoesäure, der Essigsäure, der Propionsäure und der Valeriansäure entstehen so aus mit der Nahrung zugeführten Polyphenolen (Aura et al. 2002 & 2005, Déprez et al. 2000, Rechner et al. 2004). Auch Anthocyane können durch die Kolonmikroflora in eine Vielzahl von Phenolsäuren (wie z.B. Protocatechu-, Vanillin-, Homovanillin-, *p*-Hydroxybenzoe-, 3,4-Dihydroxyphenylpropion- und *m*-Hydroxyphenylpropionsäure) ab- und umgebaut werden (Aura et al. 2005; Fleischhut et al. 2006; Forester und Waterhouse 2008; Keppler und Humpf 2007; Nurmi et al. 2009; Seeram et al. 2001). Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass die Urinexkretion an Hippursäurederivaten/Hippursäure die aller anderen Metaboliten deutlich übersteigt und schließen daraus, dass die Hippursäure das Endprodukt des Polyphenolmetabolismus darstellt (DuPont et al. 2002; Mulder et al. 2005; Rechner et al. 2002). Meselhy und Kollegen sowie Hollman und Katan haben diesen Metabolismus bereits 1997 exemplarisch für Catechin beschrieben: das in das Kolon gelangte Catechin wird von der dort ansässigen anaeroben Mikroflora nach Fragmentierung über verschiedene Zwischenprodukte zur Benzoesäure metabolisiert. Letztere wird dann in der Leber mit Glycin konjugiert und als Hippursäure renal eliminiert (Abb. 7).

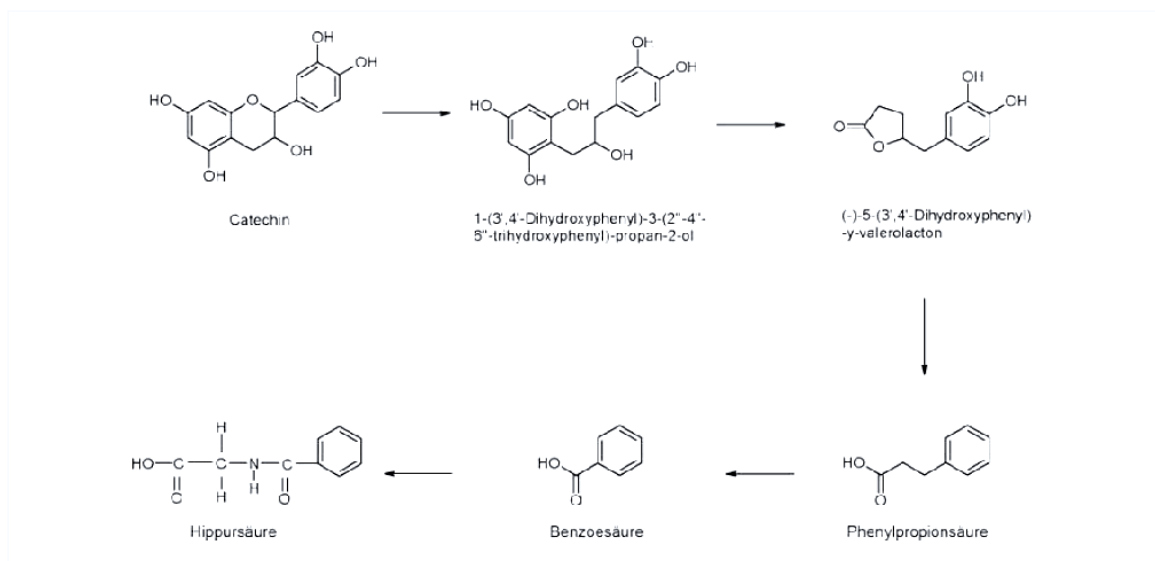


Abb. 7: Schematische Darstellung der Metabolisierung von Catechin durch die Kolonmikroflora (Hollman und Katan 1997; Meselhy et al. 1997)

Einige Kolonbakterien, die an der Metabolisierung der Polyphenole beteiligt sind, konnten bereits identifiziert werden (Tab. 5).

Tab. 5: Am Polyphenolmetabolismus beteiligte Kolonbakterien

Bakterium	nachgewiesene Enzymaktivität	Referenz
Bacteroides distasonis	α -Rhamnosidase, β -Galaktosidase, β -Glukosidase	Bokkenheuser et al. 1987
Bacteroides ovatus	β -Glukosidase	Bokkenheuser et al. 1987
Bacteroides uniformis	β -Glukosidase	Bokkenheuser et al. 1987
Bifidobacterium lactis	Esterase	Couteau et al. 2001
Escherichia coli	Esterase	Couteau et al. 2001
Eubacterium ramulus	α -Glukosidase, β -Glukosidase	Schneider und Blaut 2000
Lactobacillus gasseri	Esterase	Couteau et al. 2001

2.4 Roter Traubensaft, Rotwein und Apfelsaft als Lieferanten von bioaktiven Polyphenolen

2.4.1 Polyphenolprofile und "Polyphenollieferanten"

Fruchtsäfte (wie z.B. Apfel- und Traubensaft) aber auch Rotwein stellen neben Obst und Gemüse eine beachtenswerte Quelle für Polyphenole in der in unseren Breiten vorwiegend praktizierten, sogenannten westlichen Ernährung ("Western Diet"), dar. Ihr Polyphenolprofil wird in erster Linie von den zur Herstellung verwendeten Früchten bestimmt.

Anthocyane stellen in roten Weintrauben den Hauptanteil der Polyphenolfraction (Cantos et al. 2002). Sie sind sowohl für die charakteristische Färbung der Trauben als auch der daraus hergestellten Produkte (wie z.B. Traubensaft oder Rotwein) verantwortlich. Malvidin-3-Glukosid ist generell das quantitativ wichtigste Anthocyan, gefolgt von den 3-Monoglukosiden von Peonidin, Petunidin, Delphinidin und Cyanidin (Fernandez-Lopez et al. 1998; Kallithraka et al. 2005; Mazza und Miniati 1993; Yokotsuka und Nishino 1990). Die meisten *Vitis vinifera* Trauben (mit Ausnahme von Pinot Noir) enthalten außerdem noch Acetylglukoside, Cumaroylglukoside und Kaffeylglukoside von Malvidin, Peonidin, Petunidin, Delphinidin und Cyanidin (Mazza und Miniati 1993; Mazza 1995).

In Äpfeln (Chinnici et al. 2004; Crozier et al. 2009; Vrhovsek et al. 2004) und Apfelsäften (Alonso-Salces et al. 2004, Guyot et al. 2003) dominieren die Flavanole in Form von oligomeren Procyanidinen und die Hydroxyzimtsäuren. Eine für Äpfel spezifische Flavonoidgruppe sind die Dihydrochalcone (Crozier et al. 2009; le Guernevé et al. 2004). Sie werden daher zum Nachweis von Verfälschungen reiner Apfelprodukte genutzt. In Tabelle 6 sind die in roten Weintrauben und Äpfeln identifizierten Polyphenole zusammengefaßt.

Tab. 6: Polyphenolprofile von Äpfeln (Crozier et al. 2009; Tsao et al. 2003) und roten Weintrauben (Cantos et al. 2002; Mazza und Miniati 1993; Mazza 1995)

Äpfel	rote Weintrauben
Hydroxyzimtsäuren Chlorogensäure, p-Cumarchinasäure	Hydroxyzimtsäuren Caftaräure, Cutarsäure, Fertarsäure
Flavanole a) Catechine: Catechin, Epicatechin b) Procyanidine: Procyanidin B1, B2 und weitere nicht identifizierte Procyanidine	Flavanole a) Catechine: Catechin, Epigallocatechin, Gallocatechin b) Procyanidine: Procyanidin B1, B2, B4, C1
Flavonole Quercetin 3-Galaktosid, Quercetin 3-Glukosid, Quercetin 3-Xylosid, Quercetin 3-Arabinosid, Quercetin 3-Rhamnosid	Flavonole Quercetin 3-Glukuronid, Quercetin 3-Rutinosid, Quercetin 3-Glukosid, Kämpferol 3-Galaktosid, Kämpferol 3-Glukosid, Isorhamnetin 3-Glukosid
Anthocyane Cyanidin 3-Galaktosid (nur in Schale roter Apfelsorten)	Anthocyane Malvidin 3-Glukosid, Peonidin 3-Glukosid, Petunidin 3-Glukosid, Delphinidin 3-Glukosid und Cyanidin 3-Glukosid sowie Acetyl-, Cumaryl- und Kaffeylglukoside von Malvidin, Peonidin, Petunidin, Delphinidin und Cyanidin
Dihydrochalcone Phloridzin, Phloretin 2'-Xyloglukosid, 3-Hydroxy-phloretin 2'-Xyloglukosid, 3-Hydroxyphloretin 2'-Glukosid	

Polyphenolgehalt und Polyphenolprofil von Apfelsaft, Traubensaft und Rotwein können in Abhängigkeit der Herstellungstechnologie von denen der frischen Früchte abweichen. Guyot et al. (2003) zeigten, dass bei der konventionellen Gewinnung von Apfelsaft 58 % der Polyphenole im Trester zurückbleiben. Durch den Einsatz verbesserter Verfahren wie der alkoholischen Extraktion lässt sich der Erhalt der Polyphenole deutlich verbessern (van der Sluis et al. 2004). Die Extrahierbarkeit der Polyphenole wird von deren Wasserlöslichkeit bestimmt. Dihydrochalcone und Hydroxyzimtsäuren werden in größerem Umfang in den Saft transferiert als höhermolekulare Procyanidine (Guyot et al. 2003), wodurch sich das Polyphenolmuster des Apfelsaftes gegenüber dem der Frucht ändert. Zudem können beim Pressvorgang Polyphenole aus nicht verzehrbaren Anteilen (Kerngehäuse, Kerne und Schale) gelöst werden.

Dass die verwendeten Technologien bei der Verarbeitung von Trauben zu Saft bzw. Modifikationen bei der Weinbereitung einen erheblichen Einfluss auf den Polyphenolgehalt des jeweiligen Endprodukts haben, ist in der Literatur ebenfalls gut dokumentiert (Crozier et al. 2009, Mazza 1995, Mazza und Kay 1993). So können z.B. die Flavanole aus den flavanolreichen Weintraubenkernen durch quetschen der Kerne extrahiert werden und in das jeweilige Endprodukt übergehen (Escribano-Bailón et al. 1992; Meyer et al. 1997).

Neben der Herstellungstechnologie beeinflusst auch die Sorte einer Frucht die Polyphenolzusammensetzung des Endprodukts. Alonso-Salces und Kollegen (2004) untersuchten 29 sortenreine Apfelsäfte und stellten eine Variation des Polyphenolgehaltes um den Faktor acht sowie deutliche Unterschiede im Gehalt einzelner Polyphenole fest (Alonso et al. 2004). Thielen et al. konnten beim Vergleich von Apfelsäften, hergestellt aus Mostapfelsorten und Tafeläpfeln, ebenfalls deutliche Unterschiede hinsichtlich der antioxidativen Kapazität und des Polyphenolgehalts messen. Die TEAC- und Gesamtphenol-Werte sowie die Polyphenolgehalte (HPLC) waren in den Mostapfelsäften ~3,3, ~2,5 und ~5,1fach höher als in den Tafelapfelsäften (Thielen et al. 2006).

Die Anthocyangehalte in verschiedenen Traubensorten bzw. daraus hergestellten Weinen variieren ebenfalls sehr stark. So wurden z.B. in Rotweinen, hergestellt aus Cabernet Sauvignon-Trauben, Anthocyankonzentrationen von 78 mg/l gemessen, während in Rotweinen aus Merlot-Trauben 355 mg/l gefunden wurden (Frankel et al. 1995; Gambelli und Santaroni 2004; Gonzales-Neves et al. 2001; Gutierrez et al. 2005; Landrault et al. 2001; Mazza et al. 1999; Zafrilla et al. 2003).

Während der Lagerung von Apfel- und Traubensäften sowie von Rotwein kann es in Abhängigkeit der Lagerbedingungen zu Bräunungs- und Abbaureaktionen kommen. Folglich verändern sich der Polyphenolgehalt und das Polyphenolprofil auch vom Zeitpunkt der Herstellung bis zum Konsum durch den Verbraucher (Dietrich et al. 2003, Iversen 1999, Mazza und Miniati 1993; van der Sluis et al. 2005).

Neben klassischen Fruchtsäften und Weinen können aber auch Getränke auf der Basis von Fruchtextrakten bzw. polyphenolreiche Getränkemischungen als Polyphenol- bzw. Antioxidantienlieferanten dienen. In einer aktuellen Publikation von Borges und Kollegen konnten diese demonstrieren, dass ein polyphenolreiches Studiengetränk (bestehend aus Grüntee Flavan-3-olen, Zitrusflavanonen, Trauben-Procyanidinen, Chlorogensäure, Apfel-Dihydrochalkonen und Traubenanthocyanen) ein durchaus effizientes “Vehikel“ für bioverfügbare Polyphenole darstellen kann (Borges et al. 2010).

Da Polyphenole normalerweise nicht als isolierte Einzelsubstanzen verzehrt werden, sondern als Teil von Mahlzeiten mit komplexer Zusammensetzung (Kohlenhydrate, Fette, Proteine, Ballaststoffe, Ethanolgehalt, andere Phytochemikalien), kann die Lebensmittelmatrix einen signifikanten Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen haben (Cermak et al. 2009; Mazza und Kay 2008). Generell konnte beobachtet werden, dass der Mensch Isoflavone und Gallussäure am besten absorbiert, gefolgt von Catechinen, Flavanonen und Quercetin-Glukosiden. Die niedrigsten Absorptionsraten wurden für Procyanidine, galloylierte Teecatechine und Anthocyane gemessen (Manach et al. 2005). Die potentielle Bedeutung der *in vivo* Metaboliten (insbesondere der im Kolon gebildeten Abbauprodukte) hinsichtlich Absorption und Bioverfügbarkeit, wurde in diesen Studien jedoch meist nur am Rande berücksichtigt.

2.4.2 Bioaktivität

Neben den klassischen antioxidativen Eigenschaften von Polyphenolen – protektive Wirkung *in vivo* durch abfangen von freien Radikalen – weisen immer mehr Studien auf signifikante biologische Aktivitäten der Polyphenole und ihrer Metaboliten auf zellulärer Ebene hin (Crozier et al. 2009; Fernandez-Panchon et al. 2008). Interessant ist, dass für diese zellmodulierenden Effekte Konzentrationen erforderlich sind, die durchaus über eine normale Ernährung erreicht werden können (Fernandez-Panchon 2008). Rechner und Kroner konnten in ihren Studien antithrombotische Wirkungen mit physiologisch

relevanten Konzentrationen von Delphinidin-3-Rutinosid, Cyanidin-3-Glukosid, Cyanidin-3-Rutinosid und Malvidin-3-Glukosid sowie deren vermeintlichen Kolonmetaboliten (Dihydroferulasäure, 3-(3-Hydroxyphenyl)propionsäure, 3-Hydroxyphenylelessigsäure und 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylelessigsäure) erzielten (Rechner und Kroner 2005). In einer anderen Studie konnte mit Quercetin-Metaboliten (Quercetin-3-Glukuronid und Quercetin-3'-Sulfat) sowohl eine Inhibierung als auch Aktivierung der Angiogenese beobachtet werden. Diese Befunde können wichtige Einblicke in den potentiellen antiatherosklerotischen Mechanismus von Flavonolen geben (Donnini et al. 2006). Weiterhin sind Wechselwirkungen von verschiedenen Polyphenolen mit dem Nuklear-Faktor kappa B (NF-kB) Signalweg, Aktivator-Protein-1 (AP-1), Phase II Enzymen, Nuklear-Transkriptionsfaktor Erythroid 2p45 (NF-E2) verwandten Faktor 2 (Nrf2) und dem mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) Signalweg beschrieben worden (Crozier et al. 2009).

Ein besonders breites Bioaktivitätsspektrum zeigten insbesondere die Anthocyane; u.a. waren dies antioxidative (Fukumoto und Mazza 2000; Mazza et al. 2002), antientzündliche (Wang und Mazza 2002; Youdim et al. 2002), antimikrobielle (Pisha und Pezzuto 1994), antikarzinogene (Kamei et al. 1995; Kang et al. 2003; Katsube et al. 2003) und neuroprotektive (Galli et al. 2002, Youdim et al. 2000) Effekte sowie Verbesserung der Sehkraft (Matsumoto et al. 2003, Mercier et al. 1965) und Induktion von Apoptose (Katsube et al. 2003).

Einige ausgewählte *in vivo* Studien zur potentiellen Bioaktivität von Weintrauben, Traubensaft, Rotwein und Äpfeln sind nachfolgend zusammengefasst.

Antiatherogene Wirkung

Auger et al. (2004) untersuchten den Einfluss polyphenolreicher Extrakte der Weintraube auf die Entstehung von Atherosklerose bei Hamstern. Zu einer cholesterinreichen Basisdiät erhielten die Hamster Weintraubenextrakte in einer Dosierung entsprechend dem Polyphenolgehalt von zwei Gläsern Rotwein. Die Entwicklung von Atherosklerose in der Aorta wurde durch Extrakte aus Weintraubenkernen im Mittel um 66 %, durch Extrakte aus Weintraubenmark um 34 % gehemmt. Ähnliche antiatherogene Wirkungen konnten Vinson et al. (2001) für roten Traubensaft, Rotwein und alkoholfreien Rotwein im Hamstermodell feststellen.

Ein entscheidender Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose ist die oxidative Modifizierung von LDL. Untersuchungen zeigen, dass Apfelsäfte (Henn und Stehle 1998, Pearson et al. 1999) und Traubensäfte (Frankel et al. 1998, Henn und Stehle 1998, Miyagi et al. 1997) die Oxidation von humanem LDL *in vitro* inhibieren bzw. verzögern. Interventionsstudien verdeutlichen, dass solche Wirkungen auch für die *in vivo* Situation relevant sind. In einer Humanstudie von O'Byrne et al. (2002) erhielten die Probanden über einen Zeitraum von zwei Wochen 10 ml Traubensaft pro Tag und kg Körpergewicht. Nach der Interventionsphase konnte eine signifikant erhöhte Resistenz des LDL gegenüber einer *ex vivo* Oxidation festgestellt werden. Stein und Kollegen (Stein et al. 1999) konnten ähnliches beobachten, Miyagi et al. (1997) jedoch nicht.

Erhöhte Serumlipidwerte stellen einen Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose dar. Tier- und Humanstudien weisen auf lipidsenkende und damit antiatherogene Wirkungen von Äpfeln (Aprikian et al. 2001, Aprikian et al. 2003, Leontowicz et al. 2002, Leontowicz et al. 2003) und Weintrauben (Auger et al. 2004, O'Byrne et al. 2002) hin. Leontowicz et al. (2002) zeigten im Rattenversuch, dass eine Supplementierung mit Äpfeln dem Plasmalipid-erhöhenden Effekt einer cholesterinreichen Diät signifikant entgegengewirkt werden kann. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war der Gesamtcholesteringehalt in der Apfelgruppe um 20 % vermindert, der LDL-Gehalt um 33 % und der Triglycerid-Gehalt um 17 %. Der HDL-Gehalt wurde durch die Supplementierung nicht beeinflusst. Aprikian et al. (2003) konnten nachweisen, dass der lipidsenkende Effekt von Äpfeln sowohl auf den löslichen Ballaststoff Pektin als auch auf die Polyphenolfraction zurückzuführen ist. Über die zugrunde liegenden Mechanismen liegen bisher nur wenige Studien vor. An Zellkulturmodellen konnte demonstriert werden, dass eine Hemmung der Lipoproteinsekretion im Enterocyten zum hypolipidämischen Effekt von Apfelpolyphenolen beiträgt (Vidal et al. 2005).

Für Traubensaft konnten weitere antiatherogene Wirkungen nachgewiesen werden, die auf eine Verminderung der Thrombocytenaggregation (Keevil et al. 2000) sowie auf gefäßerweiternde Effekte (Stein et al. 1999) zurückzuführen sind.

Antikarzinogene Wirkung

In einer Studie an Ratten zeigten Liu et al. (2005), dass der Konsum von Äpfeln vor der Entstehung von Brustkrebstumoren schützen kann. Liu und Kollegen behandelten Ratten mit dem Karzinogen 7,12-Dimethylbenz[α]anthracen (DMBA). Die Supplementierung mit

Extrakten ganzer Äpfel erfolgte in drei Dosierungen entsprechend dem Verzehr von ein, drei und sechs Äpfeln pro Tag beim Menschen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte die Tumorzinzidenz um 17 %, 39 % und 44 % gesenkt werden. Jung et al. (2005) wiesen im Rattenversuch ähnliche antikarzinogene Wirkungen für roten Traubensaft nach. Neben antioxidativen Wirkmechanismen spielt die Hemmung der Zellproliferation bei der Krebsprävention eine bedeutende Rolle. Im Rahmen von *in vitro* Studien mit humanen HepG2 Leberkrebszellen und Caco-2 Kolonkrebszellen konnte gezeigt werden, dass Äpfel (Eberhardt et al. 2000, Sun et al. 2002, Wolfe et al. 2003) und rote Weintrauben (Sun et al. 2002) antiproliferative Eigenschaften besitzen. Äpfel wiesen im Vergleich mit zehn weiteren häufig konsumierten Obstsorten die dritthöchste antiproliferative Aktivität auf. Sie hemmten die Proliferation der HepG2 Zellen stärker als rote Weintrauben (Sun et al. 2002). Die Aussagekraft solcher *in vitro* Zellkulturmodelle ist jedoch sehr eingeschränkt und die Ergebnisse sollten mit Vorsicht interpretiert werden, insbesondere dann, wenn komplexe *in vivo* Vorgänge erklärt werden sollen. *In vitro* Untersuchungen von Lapidot et al. (2002) lassen z.B. vermuten, dass die Polyphenole des Apfels nicht direkt antiproliferativ wirken, sondern die beobachtete antiproliferative Wirkung auf der versuchsbedingten Bildung von H₂O₂ und anschliessenden Reaktion mit dem Zellkulturmedium basiert. Eine aktuellere Studie von Liu und Sun (2003) konnte diese Befunde jedoch nicht bestätigen.

Weitere Wirkungen

Äpfel und Weintrauben üben möglicherweise eine günstige Wirkung auf den Glukosemetabolismus aus. Die orale Zufuhr von lyophilisierten Äpfeln führte bei übergewichtigen Zucker-Ratten zu einer signifikanten Verminderung der Glukoseausscheidung im Harn. Bei normalgewichtigen Zucker-Ratten war dieser Effekt nicht signifikant (Aprikian et al. 2002). Pinent et al. (2004) konnten bei diabetischen Ratten eine antihyperglykämische Wirkung von procyanidinreichen Extrakten aus Weintraubenkernen nachweisen. Procyanidine scheinen insulinähnliche Aktivitäten zu besitzen. An insulinsensitiven Zellen stimulierten sie die Translokation des Glukosetransporters-4 in die Plasmamembran sowie die Aufnahme von Glukose in die Zelle (Pinent et al 2004).

In einer Pilotstudie mit 24 Patienten mit atopischer Dermatitis konnten antiallergische Effekte von Äpfeln festgestellt werden. Ein Teil der Patienten erhielt über einen Zeitraum

von acht Wochen Supplemente aus kondensierten Apfeltanninen (Procyanidine). Die Standardtherapie wurde während der Studie beibehalten. Bereits nach zweiwöchiger Supplementierungsdauer waren Allergiesymptome bzw. Begleiterscheinungen wie Juckreiz und Schlafstörungen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert (Kojima et al. 2000). Ein integraler Schritt in der allergischen Reaktion des Soforttyps ist die Freisetzung von Histamin aus Basophilen und Mastzellen. Diese Freisetzung kann durch kondensierte Tannine aus Äpfeln gehemmt werden (Kanda et al. 1998).

Abschließend muss jedoch noch einmal deutlich darauf hingewiesen werden, dass die Mehrzahl dieser “Bioaktivitätsstudien“ nicht am Menschen und nicht mit polyphenolreichen Lebensmitteln (→ Alltagssituation) durchgeführt wurden, sondern auf *in vitro* Experimenten (Zellkulturen) und Tierstudien mit isolierten Einzelsubstanzen basieren.

3 MATERIAL UND METHODEN

In diesem Kapitel sind sowohl die gesamten analytischen Untersuchungen als auch die drei Humanstudien zusammengefasst. Damit trotz der umfangreichen Untersuchungen die “Übersicht“ gewährleistet bleibt, wurde die folgende Kapitelgliederung gewählt:

3.1 Analytik – hier werden vorab sämtliche, in den drei Humanstudien verwendeten analytischen Methoden beschrieben.

3.2 Humanstudien – hier werden im Anschluss an den “Analytik Teil“ die drei Humanstudien, einschließlich Fragestellungen/Zielsetzungen, Studiendesign und Methodik, beschrieben.

3.1 Analytik

3.1.1 Chemikalien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien hatten entweder analytische oder HPLC Reinheit. Sämtliche Lösungen wurden mit H₂O-bidest. angesetzt. Weitere Details zu den verwendeten Chemikalien, Methoden und Geräten (einschließlich dem eingesetzten HPLC-System) sind nachfolgend bzw. im Anhang (A.1) aufgeführt.

Standardsubstanzen: Malvidin-3-Glukosid (Mal-3-Gluk), und Cyanidin-3-Glukosid (Cya-3-Gluk) (Roth, Karlsruhe); Petunidin-3-Glukosid (Pet-3-Gluk) und Delphinidin-3-Glukosid (Del-3-Gluk) (Polyphenols AS, Sandnes, Norwegen); Peonidin-3-Glukosid (Peo-3-Gluk), (AG Prof. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig); Chlorogensäure, Gallussäure-Monohydrat, Vanillinsäure, Kaffeesäure, Epicatechin, Phloridzin, Phloretin, Hippursäure, L-Ascorbinsäure und Harnsäure von Merck (Darmstadt); p-Cumaroylchinasäure und Phloretin-2'-Xylosylglukosid (AG Prof. Dietrich, Institut für Önologie und Getränkeforschung, Forschungsanstalt Geisenheim, Geisenheim); Malonaldehyde-bis(dimethylacetal), Thiobarbitursäure, Butylhydroxytoluol (BHT), Trolox ((±)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), Eisen(II)-Sulfat heptahydrat, Eisen(III)-Chloride hexahydrat und Folin-Ciocalteu Reagenz von Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

3.1.2 Bestimmung der antioxidativen Kapazität

3.1.2.1 Photosensibilisierte Chemolumineszenz (PCL)

Prinzip der Methode: Bei diesem Verfahren wird eine durch ROS hervorgerufene, zeitlich stabile Chemilumineszenz erzeugt. Superoxidradikale ($\text{O}_2^{\bullet-}$) werden durch optische Anregung eines Photosensibilisators (S) (z.B. Luminol) gebildet. Bei der Disproportionierung zweier Radikale wird ein Teil der Energie in Form von Lichtquanten frei, so dass die Radikale chemiluminometrisch detektiert werden können. Antioxidantien “löschen” durch Abfangen (“scavenging”) der ROS die Chemilumineszenz-Erscheinung aus. Die dadurch entstehende Lagphase ist ein Maß für die antioxidative Kapazität der untersuchten Probe. Diese wird mit Hilfe einer Trolox-Kalibriergeraden berechnet und in mmol oder μmol “Trolox Equivalents” (TE) angegeben. (Popov und Lewin 1999; Schlesier et al. 2002) Weitere Details zur Methode sind im Anhang (A.1.1.1) aufgeführt. Eingesetzt in Humanstudie II und III für: Apfelsäfte, Antiox-Getränk, Plasma und Urin.



Abb. 8: prinzipieller Reaktionsmechanismus des PCL-Tests (Prior et al. 2005)

3.1.2.2 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Prinzip der Methode: Der FRAP-Test basiert auf den reduzierenden Eigenschaften von Antioxidantien. In deren Gegenwart wird bei niedrigem pH-Wert der Eisen(III)-Tripyridyltriazin-Komplex zur entsprechenden Eisen(II)-Form dieses Komplexes reduziert (Abb. 9). Letzterer weist eine intensiv blaue Farbe auf und kann photometrisch bei 595 nm gemessen werden. Anhand einer Eisen(II)-Sulfat-Kalibrierung wird der FRAP-Wert für die Proben in Fe^{2+} -Äquivalenten ermittelt. (Schlesier et al. 2002; Benzie & Strain 1996).

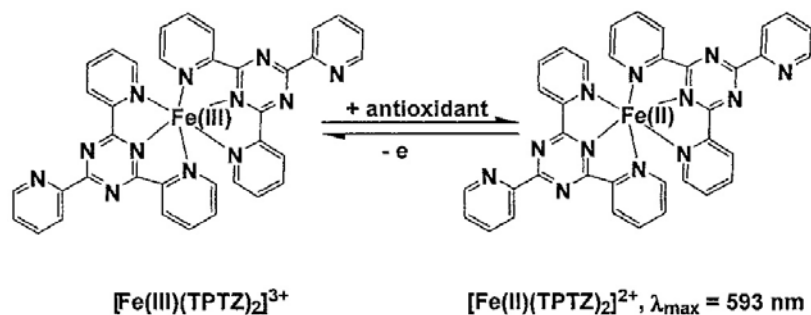


Abb. 9: Reduktion des Eisen(III)-Tripyridyltriazin-Komplexes zur Eisen(II)-Form (Huang et al. 2005)

Weitere Details zur Methode sind im Anhang (A.1.1.2) aufgeführt. Eingesetzt in Humanstudie II und III für: Apfelsäfte, Antiox-Getränk, Plasma und Urin.

3.1.2.3 Gesamtphenole nach Folin-Ciocalteu

Prinzip der Methode: Die Bestimmung beruht auf der Redoxreaktion der Phenole im alkalischen Milieu mit Wolframat und Molybdat zu einem blauen Farbkomplex. Die Extinktion dieses Farbkomplexes kann bei 750 nm gemessen werden. Die Gesamtphenolgehalte/-konzentrationen in den Proben werden gewöhnlich mittels einer Gallussäure-Kalibriergeraden ermittelt und in “Gallic Acid Equivalents“ (GAE) angegeben. (Schlesier et al. 2002; Singleton & Rossi 1965) Während in den Saft- und Urinproben die Gesamtphenolgehalte direkt bestimmt werden können, ist bei den Plasmaproben eine Aufbereitung zur Extraktion der Polyphenole und Fällung der Plasmaproteine notwendig. Die Hydrolyse der konjugierten Polyphenole und deren Freisetzung aus Lipidbindungen wird durch Inkubation mit Salzsäure- und Natriumhydroxid-Lösung erreicht. Die Plasmaproteine werden mit m-Phosphorsäure gefällt. (Serafini et al. 1998) Weitere Details zur Methode sind im Anhang (A.1.1.3) aufgeführt. Eingesetzt in Humanstudie I, II und III für: Rotwein, rotes Traubensaftkonzentrat, Apfelsäfte, Antiox-Getränk, Plasma und Urin.

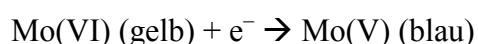
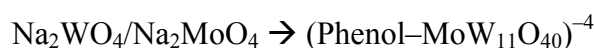


Abb. 10: prinzipieller Reaktionsmechanismus des Gesamtphenol-Tests nach Folin-Ciocalteu (Prior et al. 2005)

3.1.3 HPLC-Methoden

3.1.3.1 Anthocyane – Humanstudie I

Analyten: Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Pet-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Mal-3-Gluk.

Studiengetränke: 'Lemberger' Rotwein und rotes Traubensaftkonzentrat; die Studiengetränke wurden mit einem Gemisch aus H₂O/Acetonitril/Ameisensäure (81:10:9, v/v/v) verdünnt (1:50) und vor der Analyse für 5 Minuten bei 20000 g zentrifugiert.

Plasma: EDTA-Plasma (3 ml) wurde mit Trifluoressigsäure (TFA) stabilisiert, zentrifugiert (5 Minuten bei 20000 g) und der Überstand über eine zuvor mit Methanol und Ameisensäure aktivierte Sep-Pak C18-Festphasenkartusche (Waters, Milford, USA) extrahiert (Miyazawa et al. 1999).

Urin: der mit Ameisensäure stabilisierte Urin (7 bzw. 14 ml) wurde im Rotationsverdampfer unter Vakuum konzentriert, mit einem Gemisch aus H₂O/Acetonitril/Ameisensäure (81:10:9, v/v/v) rückverdünnt und vor der Analyse für 10 Minuten bei 20000 g zentrifugiert (Netzel et al. 2001).

Jeweils 100 µl Probe (Saft/Plasma/Urin) wurden für die HPLC-Analyse verwendet. Die Trennung erfolgte über eine RP-C18 Säule (Hyperchrome Prontosil Eurobond C18; 250 x 4 mm, 5 µm ID; Bischoff, Leonberg) mit einem Gemisch aus H₂O/Acetonitril/Ameisensäure (81:10:9, v/v/v; pH 1,6) als mobile Phase. Die eluierten Substanzen wurden bei 520 nm detektiert und mit Hilfe von individuellen Kalibriergeraden für jedes Anthocyan quantifiziert. (Miyazawa et al. 1999, Netzel et al. 2001) Weitere Details zur Methode sind im Anhang (A.1.2.1) aufgeführt. Eingesetzt in Humanstudie I für: rotes Traubensaftkonzentrat, Rotwein, Plasma und Urin.

3.1.3.2 Polyphenole – Humanstudie II

Analyten: Chlorogensäure, Epicatechin, Cumaroylchinasäuren, Phloretin-2-Xyloglukosid, Phloridzin, Phloretin, Procyanidin B2.

Studiengetränke: vier naturtrübe, sortenreine Apfelsäfte; die Apfelsäfte wurden mit 2%iger Essigsäure in H₂O verdünnt (1:5) und vor der Analyse für 5 Minuten bei 20000 g zentrifugiert.

Urin: der mit Ameisensäure stabilisierte Urin wurde zentrifugiert (5 Minuten bei 20000 g und Raumtemperatur) und über eine zuvor mit Methanol und Ameisensäure aktivierte Sep-Pak C18-Festphasenkartusche (Waters, Milford, USA) extrahiert (Felgines et al. 2003).

Jeweils 100 µl Probe (Saft/Urin) wurden für die HPLC-Analyse verwendet. Die Trennung erfolgte über eine RP-C18 Säule (Hyperchrome Prontosil Eurobond C18; 250 x 4 mm, 5 µm ID; Bischoff, Leonberg) mit einem Gradienten aus H₂O, Acetonitril und Essigsäure. Die eluierten Substanzen wurden bei 280, 320 und 360 nm detektiert und mit Hilfe von individuellen Kalibriergeraden für jedes Polyphenol quantifiziert. (Schieber et al. 2001) Weitere Details zur Methode sind im Anhang (A.1.2.2) aufgeführt. Eingesetzt in Humanstudie II für: Apfelsäfte und Urin.

3.1.3.3 Hippursäure

Direktinjektion der *Urinproben* nach konzentrationsabhängiger Verdünnung mit H₂O (1:100 bis 1:500) und anschließender Zentrifugation (5 Minuten bei 20000 *g* und Raumtemperatur). Jeweils 100 µl Probe wurden für die HPLC-Analyse verwendet. Die Trennung erfolgte über eine RP-C18 Säule (Hyperchrome Prontosil Eurobond C18; 250 x 4 mm ID, 5 µm; Bischoff, Leonberg) mit einem Gemisch aus Acetonitril/H₂O/Essigsäure (35:63:2, v/v/v; pH 2.0) als mobile Phase. Hippursäure wurde bei 235 nm detektiert und mit Hilfe einer externen Hippursäure Kalibriergeraden quantifiziert. (Kubota et al. 1988) Weitere Details zur Methode sind im Anhang (A.1.2.3) aufgeführt. Eingesetzt in Humanstudie II und III für: Urin.

3.1.3.4 Ascorbinsäure und Harnsäure

Plasma und Urin: die mit 10 %iger Meta-Phosphorsäure stabilisierten Plasmaproben (250 µl m-H₃PO₄/250 µl Plasma) bzw. mit 20 %iger Meta-Phosphorsäure versetzten Urinproben (100 µl m-H₃PO₄/ml Urin) wurden zentrifugiert (5 Minuten bei 20000 *g* und Raumtemperatur) und die Überstände mit H₂O verdünnt (1:50). Jeweils 100 µl Probe wurden für die HPLC-Analyse verwendet. Die Trennung erfolgte über eine RP-C18 Säule (Hyperchrome Prontosil Eurobond C18; 250 x 4 mm, 5 µm ID; Bischoff, Leonberg) mit einem Gemisch aus H₂O und Schwefelsäure als mobile Phase. Die eluierten Substanzen wurden bei 245 nm detektiert und mit Hilfe von externen Kalibriergeraden (L-Ascorbinsäure und Harnsäure) quantifiziert. (Ross 1994; Vazquez-Oderiz et al. 1994) Weitere Details zur Methode sind im Anhang (A.1.2.4) aufgeführt.

Ascorbinsäure in den Studiengetränken (Apfelsäfte und Antiox-Getränk): die Getränkeproben wurden zentrifugiert (5 Minuten bei 20000 *g*), verdünnt und wie bereits für Plasma und Urin beschrieben, analysiert.

Eingesetzt in Humanstudie II und III für: Apfelsäfte, Antiox-Getränk, Plasma und Urin.

3.1.3.5 Malondialdehyd (MDA)

Urin wurde mit Thiobarbitursäure und Butylhydroxytoluol versetzt, inkubiert (45 Minuten bei 95°C), auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (10 Minuten bei 20000 *g* und Raumtemperatur). Der Überstand wurde mit H₂O verdünnt (1:5 bis 1:10). Jeweils 100 µl Probe wurden für die HPLC-Analyse verwendet. Die Trennung erfolgte über eine RP-C18 Säule (Hyperchrome Prontosil Eurobond C18; 125 x 4 mm, 5 µm ID; Bischoff, Leonberg) mit einem Gemisch aus Methanol und 50 mM Natriumphosphatpuffer (35:65, v/v; pH 7.0)

als mobile Phase. Das eluierte MDA wurde fluorimetrisch (Anregung: 515 nm; Emission: 553 nm) detektiert und mit Hilfe einer externen MDA Kalibriergeraden quantifiziert. (Volpi & Tarugi 1998) Weitere Details zur Methode sind im Anhang (A.1.2.5) aufgeführt. Eingesetzt in Humanstudie III für: Urin.

Anmerkungen zu den verwendeten Methoden:

- Generell wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt (dies gilt sowohl für die antioxidativen Tests als auch für die HPLC-Analytik). Sämtliche Proben (Studiengetränke, Plasma und Urin) die nicht sofort analysiert werden konnten, d.h. am Tag ihrer Aufbereitung, wurden bei -80°C zwischengelagert.
- Die Getränke-, Plasma- und Urinproben wurden vor ihrer Analyse verdünnt, so dass sämtliche Bestimmungen (antioxidative Kapazität) und Analysen (HPLC) innerhalb der linearen Mess- bzw. Arbeitsbereiche durchgeführt wurden.
- PCL, FRAP und Gesamtphenole: Vor jeder Messserie ("Probencharge") wurde eine komplette Kalibrierung durchgeführt: vier verschiedene Kalibrierkonzentrationen für PCL, fünf für FRAP und GP und jeweils drei Wiederholmessungen pro Kalibrierkonzentration; verwendete Standardsubstanzen: Trolox für PCL, Fe(II)-Sulfat für FRAP und Gallussäure-Monohydrat für Gesamtphenole.
- HPLC-Analytik: Für jede zu analysierende Substanz (s. 3.1.3.1-3.1.3.5) wurde eine komplette Kalibrierung mit der entsprechenden Reinsubstanz durchgeführt: sechs verschiedene Kalibrierkonzentrationen und jeweils drei Wiederholmessungen pro Kalibrierkonzentration.
- Die detektierten Substanzen (HPLC) wurden mit Hilfe von Retentionszeiten, Aufstockverfahren ("spiken" der Proben mit den entsprechenden Standardsubstanzen) sowie über die spezifischen UV/VIS-Spektren (Diodenarray-Detektion; Ausnahme MDA) identifiziert (s. auch "3.1.3.6 HPLC-ESI-MS/MS Analytik").

Weitere Details zu den Methoden sind im Anhang (A.1) zu finden.

3.1.3.6 HPLC-ESI-MS/MS Analytik (extern)

Probenaliquote (Urinproben von Humanstudie I und II) wurden zusätzlich mittels HPLC-ESI-MS/MS analysiert. Die Identität der mittels HPLC-DAD/-UV/VIS detektierten Substanzen sollte dadurch bestätigt bzw. vorhandene Metaboliten identifiziert werden. Das dafür notwendige Probenmaterial wurde tiefgefroren (-24°C) an Herrn Dr. Dietmar Kammerer (Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, LS Lebensmittel pflanzlicher Herkunft) gesendet. Herr Dr. Kammerer hat dort die entsprechenden LC-MS Analysen durchgeführt. Von Humanstudie I konnte aus technischen Gründen (nicht genügend Probenmaterial) leider kein Blutplasma nach Hohenheim gesendet werden. Die Identifikation der im Plasma nach Rotwein und rotem Traubensaftkonzentrat detektierten Substanzen basiert somit “nur“ auf den typischen UV/VIS Spektren (erfasst mittels Diodenarray-Detektion), den spezifischen Retentionszeiten sowie dem “Spiken“ von Plasmaproben mit den entsprechenden Standardsubstanzen (Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Pet-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Mal-3-Gluk). Weitere Details zur LC-MS Analytik sind im Anhang (A.1.2.6) aufgeführt.

3.2 Humanstudien

Nachfolgend sind die drei durchgeführten Humanstudien in chronologischer Reihenfolge (I-III) aufgeführt. Die jeweilige Zielsetzung, Studiendesign und verwendete Analytik wird für jede Studie kurz beschrieben. Die Humanstudien wurden bei den zuständigen Ethikkommissionen der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie der Friedrich-Schiller-Universität Jena angemeldet, beraten und genehmigt.

Humanstudie I (*rotes Traubensaftkonzentrat vs. Rotwein*) wurde in der Klinik für Innere Medizin III der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt; **Humanstudie II** (*Urinstudie mit naturtrübem sortenreinen Apfelsaft*) und **Humanstudie III** (*Antiox-Getränk*) fanden im Forschungszentrum Lobeda, einem Teilbereich des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena, statt. Erfahrene Ambulanzschwestern und Ärzte haben in den Humanstudien I und III mitgewirkt.

3.2.1 Studiengetränke

In den drei Humanstudien wurden insgesamt vier verschiedene Studiengetränke eingesetzt (Tab. 7).

Tab. 7: Studiengetränke (Humanstudien I-III)

Humanstudien	Getränke
I	Rotwein und rotes Traubensaftkonzentrat 'Lemberger' und ein kommerziell erhältliches Konzentrat aus rotem Traubensaft
II	naturtrüber und sortenreiner Apfelsaft Weißer-Trierer-Weinapfelsaft
III	Antiox-Getränk Mischung aus Blaubeeren-, Holunderbeeren- und schwarzem Johannisbeerenkonzentrat, sowie Extrakten aus Hagebutten, Hibiskus, Brombeeren, Schwarzbeerblättern, schwarzer Karotte und Ascorbinsäure

Anmerkungen zur Tabelle:

Humanstudie I: 'Lemberger' Rotwein: Geisenheimer Mäuerchen (Lese Herbst 2001), Kombination aus Maischeerwärmung und Maischegärung (Maischeerwärmung bei 65°C und 24 Std. Standzeit, anschließend offene Büttengärung für zwei Wochen), Gehalt an SO₂ und Ethanol: 60 mg/l und 91 g/l; produziert und geliefert von der FA Geisenheim, Fachgebiet Kellerwirtschaft, AG Prof. Christmann. Details zu den verschiedenen Weinbereitungsverfahren und deren Einfluss auf den Polyphenolgehalt der Weine wurde in der folgenden Publikation "Netzel M, **Strass G**, Bitsch I, Könitz R, Christmann M, Bitsch R (2003) *Effect of grape processing on selected antioxidant phenolics in red wine*, *Journal of Food Engineering* 56, 223-228", beschrieben.

Rotes Traubensaftkonzentrat: kommerziell erhältliches Konzentrat, bezogen von der Fa. Wild GmbH, Eppelheim.

Humanstudie II: die im Rahmen von Humanstudie II (*Studie-Apfelsäfte* und *Studie-Urin*) verwendeten sortenreinen und naturtrüben Apfelsäfte wurden in der FA Geisenheim, Fachgebiet Weinanalytik und Getränkeforschung, AG Prof. Dietrich, aus "alten" (traditionellen) Mostapfelsorten hergestellt.

Humanstudie III: das in Humanstudie III verwendete Getränkepulver zur Herstellung des Antiox-Getränks wurde von der Fa. Dr. B. Scheffler Nachf. GmbH & Co. KG, Bergisch Gladbach, geliefert. Die vollständige Zutatenliste, soweit vom Hersteller verfügbar, ist im Anhang (A.2.3.1) aufgeführt.

3.2.2 Humanstudie I: rotes Traubensaftkonzentrat vs. Rotwein

Humanstudie I gliedert sich in eine Vorstudie (ein Getränk [rotes Traubensaftkonzentrat] und ein Proband) zur Prüfung des Studiendesigns und in eine Hauptstudie mit neun Probanden und zwei Getränken (rotes Traubensaftkonzentrat und Rotwein; s. 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Die Ergebnisse der Hauptstudie wurden im *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* publiziert (Frank T, Netzel M, **Strass G**, Bitsch R, Bitsch I (2003) *Bioavailability of anthocyanidin-3-glucosides following consumption of red wine and red grape juice, Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 81, 423-435).

3.2.2.1 Vorstudie

Ziel:

Bestimmung der Bioverfügbarkeit von Anthocyanen aus rotem Traubensaftkonzentrat (Vorstudie mit einem Probanden)

Studiendesign:

Ein (1) klinisch gesunder Proband (männl., Nichtraucher, 34 Jahre, BMI 26,3 kg/m²) erhielt an einem Versuchstag 400 ml verdünntes rotes Traubensaftkonzentrat (RTSK; Tab. 8) zusammen mit einer Standardmahlzeit (praktisch Vitamin C- und polyphenolfrei). Nüchtern sowie über einen Zeitraum von 5 Std. nach Getränkezufuhr wurde 8mal Blut zur Plasmagewinnung entnommen. Urin wurde nüchtern sowie in 10 Intervallen über einen Zeitraum von 10 Std. nach Getränkekonsum gesammelt und bis zur Analyse bei -80°C gelagert (Abb. 11). Am Versuchstag war während der zehnstündigen Versuchsdauer nur der Konsum von Trinkwasser erlaubt. Der Proband wurde über die einzuhaltende Nüchternphase (mind. 10 Std. vor Versuchsbeginn) und die am Vorversuchstag zu meidenden Getränke/ Lebensmittel ausführlich instruiert.

Tab. 8: applizierte Anthocyanmengen (Humanstudie I/Vorstudie)

Anthocyane	Dosis/400 ml RTSK ¹
Cya-3-Gluk (mg)	5,2
Del-3-Gluk (mg)	57,9
Mal-3-Gluk (mg)	151,4
Peo-3-Gluk (mg)	96,1
Pet-3-Gluk (mg)	22,5
Gesamt-Anthocyane (mg) ²	333,1

¹150 ml Konzentrat wurden mit 250 ml Wasser verdünnt. ²Summe aus Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk.

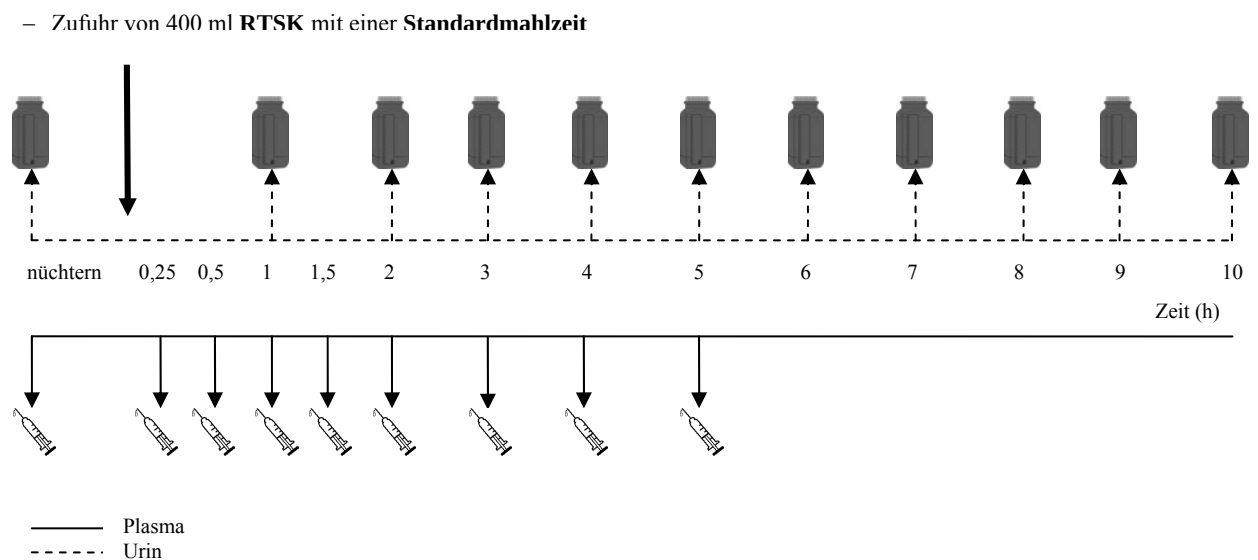


Abb. 11: Studiendesign (Humanstudie I/Vorstudie); Standardmahlzeit: 1 Weißbrötchen mit 30g Käse (Gouda)

Analytik:

Bestimmung der Hauptanthocyane der roten Traube (Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk) in RTSK, Plasma und Urin mittels HPLC-DAD.

3.2.2.2 Hauptstudie

Fragestellung:

Gibt es Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von Anthocyanen (Monoglukoside) aus Rotwein und rotem Traubensaftkonzentrat?

(beide Studiengetränke wurden äquivalent hinsichtlich ihres Anthocyangehalts dosiert)

Studiendesign:

Neun (9) klinisch gesunde Probanden beiderlei Geschlechts (Tab. 9) erhielten an zwei Versuchstagen entweder 400 ml Rotwein oder 400 ml verdünntes RTSK (Tab. 10) zusammen mit einer Standardmahlzeit (praktisch Vitamin C- und polyphenolfrei). Nüchtern sowie über einen Zeitraum von 3 Std. nach Getränkezufuhr wurde 6mal Blut zur Plasmagewinnung entnommen. Urin wurde nüchtern sowie in 7 Intervallen über einen Zeitraum von 7 Std. nach Getränkekonsum gesammelt und bis zur Analyse bei -80°C gelagert (Abb. 12). An beiden Versuchstagen war während der siebenstündigen Versuchsdauer nur der Konsum von Trinkwasser erlaubt. Damit an den Versuchstagen auch “identische“ Rahmenbedingungen gewährleistet waren, wurden die Probanden über die einzuhaltenden Nüchternphasen (mind. 10 Std. vor Versuchsbeginn) und die am jeweiligen Vorversuchstag zu meidenden Getränke/ Lebensmittel ausführlich instruiert.

Tab. 9: Probandenkollektiv (Humanstudie I/Hauptstudie)

♀	n = 5
♂	n = 4
Alter (Jahre)	24 – 34
BMI (kg/m ²)	22,5 ± 2,7
klinisch gesund	n = 9
Nichtraucher	n = 9

Tab. 10: applizierte Anthocyanmengen (Humanstudie I/Hauptstudie)

Anthocyane	Dosis/400 ml RTSK ¹	Dosis/400 ml Rotwein
Cya-3-Gluk (mg)	3,1	2,4
Del-3-Gluk (mg)	49,8	38,2
Mal-3-Gluk (mg)	130,7	184,6
Peo-3-Gluk (mg)	83,2	18,0
Pet-3-Gluk (mg)	16,8	36,4
Gesamt-Anthocyane (mg) ²	283,5	279,6

¹120 ml Konzentrat wurden mit 280 ml Wasser verdünnt. ²Summe aus Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk.

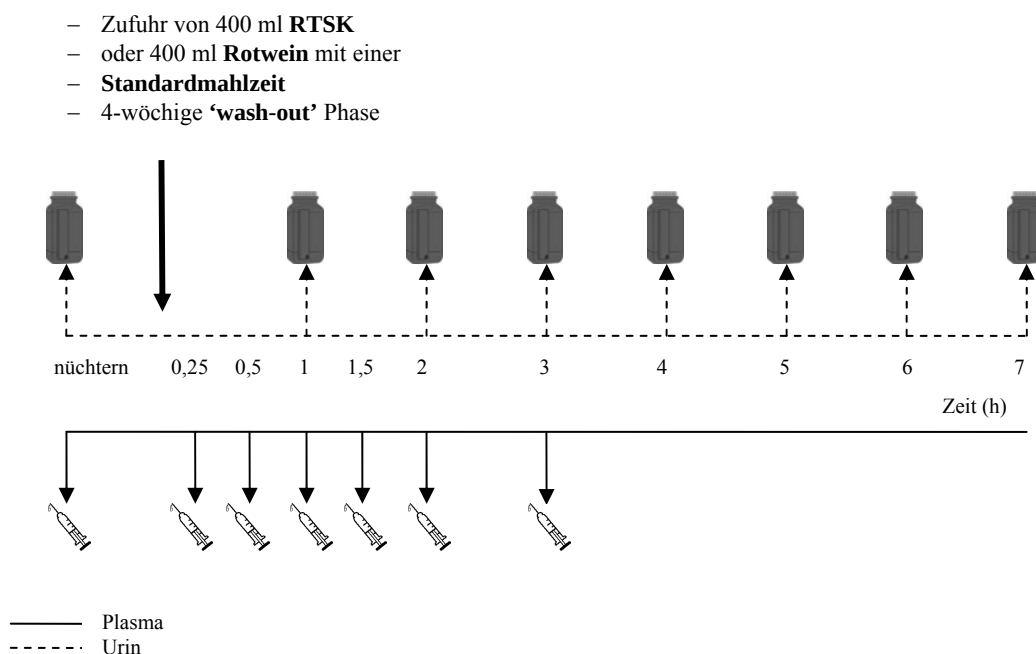


Abb. 12: Studiendesign (Humanstudie I/Hauptstudie); Standardmahlzeit: 1 Weißbrötchen mit 30g Käse (Gouda)

Analytik:

Bestimmung der Hauptanthocyane der roten Traube (Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk) in RTSK, Rotwein, Plasma und Urin mittels HPLC-DAD. Aliquote der Urinproben wurden zusätzlich mittels HPLC-ESI-MS/MS analysiert.

Anmerkung: die Gesamtphenol-Werte fuer RTSK, Rotwein und Plasma sind im Anhang (A.2.1.5) aufgeführt.

3.2.2 Humanstudie II: “Apfelsäfte“

Humanstudie II gliedert sich in zwei Studien: *Studie-Apfelsäfte* und *Studie-Urin*. In erstgenannter Studie wurden vier naturtrübe sortenreine Apfelsäfte des gleichen Jahrgangs bzgl. der “Parameter“ antioxidative Kapazität und antioxidativ wirksame Substanzen untersucht. In der sich anschließenden *Studie-Urin* wurde bei klinisch gesunden Probanden die renale Exkretion von Apfelsaft-Antioxidantien bestimmt. Hierfür wurde der “beste Apfelsaft“ aus der *Studie-Apfelsäfte* eingesetzt; d.h., der Apfelsaft mit dem höchsten Antioxidantiengehalt.

3.2.2.1 Studie-Apfelsäfte

Ziel:

Vergleich von vier naturtrüben sortenreinen Apfelsäften des gleichen Jahrgangs hinsichtlich der “Parameter“ antioxidative Kapazität und antioxidativ wirksame Substanzen.

Probenmaterial:

Weißer-Trierer-Weinapfelsaft, Erbachhofer-Apfelsaft, Kaiser-Wilhelm-Apfelsaft und Bohnapfelsaft. Alle Apfelsäfte wurden aus Äpfeln des Erntejahrgangs 2001 hergestellt.

Analytik:

- antioxidative Kapazität [PCL-Test, FRAP-Test und Gesamtphenole nach Folin-Ciocalteu]
- Polyphenole: Chlorogensäure, Cumaroylchinasäuren, Phloridzin, Phloretin-2-xyloglucosid, Epicatechin, Procyanidin B2 [HPLC-DAD]
- Ascorbinsäure [HPLC-DAD]

3.2.2.2 Studie-Urin

Fragestellung:

Wird durch die Zufuhr eines sortenreinen und polyphenolreichen Apfelsafts die antioxidative Kapazität im Urin erhöht?

Anmerkung bzw. “Vorwegnahme“ von Ergebnissen: die höchste antioxidative Kapazität sowie der höchste Polyphenolgehalt konnte im Weißen-Trierer-Weinapfelsaft gemessen werden (s. Kapitel 4.2.1). Dieser Apfelsaft wurde deshalb für die nachfolgend beschriebene Urinstudie verwendet.

Studiendesign:

Acht (8) klinisch gesunde Probanden (Tab. 11) erhielten in einem randomisierten cross-over Design entweder Weißen-Trierer-Weinapfelsaft (WTWAS; 700 ml) oder Trinkwasser ("antioxidantienfreie" Kontrolle; 700 ml) zusammen mit einer Standardmahlzeit. Urin wurde nüchtern sowie in 5 Intervallen über einen Zeitraum von 24 Std. nach Getränkekonsum gesammelt (Abb. 13) und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Während der beiden Versuchstage war nur der Genuss von Trinkwasser sowie der Verzehr von 2 weiteren Standardmahlzeiten (praktisch Vitamin C- und polyphenolfrei) erlaubt. Damit an beiden Versuchstagen auch "identische" Rahmenbedingungen gewährleistet waren, wurden die Probanden über die einzuhaltenden Nüchternphasen (mind. 10 Std. vor Versuchsbeginn) und die am jeweiligen Vorversuchstag zu meidenden Getränke/Lebensmittel ausführlich instruiert.

Tab. 11: Probandenkollektiv (Humanstudie II/Studie-Urin)

♀	n = 8
Alter (Jahre)	23-29
BMI (kg/m^2)	$22,9 \pm 3,6$
Klinisch gesund	n = 8
Nichtraucher	n = 8

Tab. 12: applizierte Antioxidantien (Humanstudie II/Studie-Urin)

Antioxidative Kapazität/Antioxidantien	Dosis/700 ml WTWAS
Antioxidative Kapazität ¹ :	
PCL (mmol TE)	10,7
FRAP (mmol Fe^{2+})	9,8
Gesamtphenole (mg GAE)	1107
Polyphenole:	
Phloridzin (mg)	68,5
Phloretin-Xyloglukosid (mg)	6,7
Epicatechin (mg)	9,0
Procyanidin B2 (mg)	21
Chlorogensäure (mg)	229,7
Cumaroylchinasäuren ² (mg)	12,2
Ascorbinsäure (mg)	99

¹die Werte der antioxidativen Tests wurden Ascorbinsäure bereinigt;

²Summe aus 3-, 4- und 5-Cumaroylchinasäure; TE: Trolox Äquivalents; GAE: Gallic Acid Equivalents.

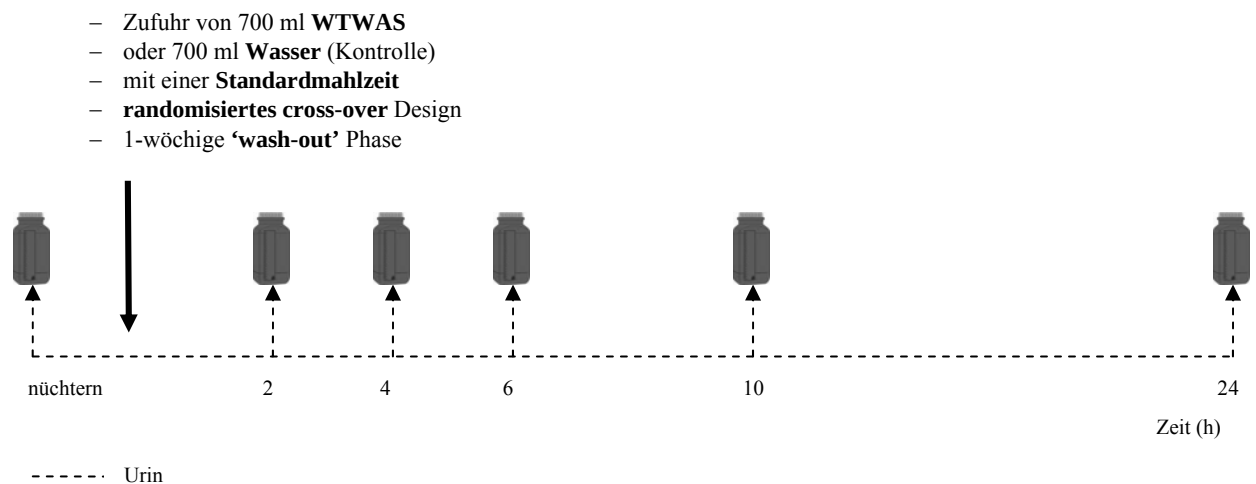


Abb. 13: Studiendesign (Humanstudie II/Studie-Urin); Standardmahlzeiten: Mahlzeit 1 – 1 Weißbrötchen; Mahlzeit 2 – 2 Weißbrötchen mit 60g Käse (Gouda); Mahlzeit 3 – 2 Weißbrötchen mit 60g Käse (Gouda)

Analytik:

In Studiensaft (WTWAS) und Urin wurden die folgenden Parameter und Substanzen bestimmt:

- antioxidative Kapazität [WTWAS und Urin: PCL-Test, FRAP-Test und Gesamtphenole nach Folin-Ciocalteu]
- Polyphenole [WTWAS: HPLC-DAD; Urin: HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS/MS]
- Hippursäure [Urin: HPLC-DAD und HPLC-ESI-MS/MS]
- Ascorbinsäure [WTWAS und Urin: HPLC-DAD]
- Harnsäure [Urin: HPLC-DAD]

3.2.3 Humanstudie III: “Antiox“-Getränk

Die Ergebnisse dieser Studie wurden in der Zeitschrift *Ernährung/Nutrition* publiziert (Netzel M, **Netzel G**, Ott U, Bitsch I, Bitsch R, Frank T (2007) *Biological antioxidant activity of a beverage containing polyphenols and ascorbic acid*, *Ernährung/Nutrition*, 31, 102-109).

Fragestellung:

Wird durch die Zufuhr eines polyphenol- und ascorbinsäurereichen Getränks der antioxidative Status verbessert?

Studiendesign:

Sechs (6) klinisch gesunde Probanden beiderlei Geschlechts (Tab. 13) erhielten in einem randomisierten cross-over-Design entweder 400 ml eines polyphenol- und ascorbinsäurereichen Getränks („Antiox“-Getränk) oder 400 ml Trinkwasser („antioxidantienfreie“ Kontrolle; Tab. 14) zusammen mit einer Standardmahlzeit (praktisch Vitamin C- und polyphenolfrei). Nüchtern sowie über einen Zeitraum von 10 Std. nach Getränkezufuhr wurde 11mal Blut zur Plasmagewinnung entnommen. Zusätzlich wurden die 24 Std.-Urine gesammelt (Abb. 14). An den Studientagen war nur der Genuss von Trinkwasser sowie der Verzehr von 2 weiteren Standardmahlzeiten (praktisch Vitamin C- und polyphenolfrei) erlaubt. Damit an den Versuchstagen auch identische „Rahmenbedingungen“ gewährleistet waren, wurden die Probanden über die einzuhaltenden Nüchternphasen (mind. 10 Std. vor Versuchsbeginn) und die am jeweiligen Vorversuchstag zu meidenden Getränke/ Lebensmittel ausführlich instruiert.

Zur Sättigung der Vitamin C Körperspeicher erhielt jeder Proband vor Studienbeginn vierzehn Tage lang ein Vitamin C Supplement (180 mg Ascorbinsäure/Tag). Vierundzwanzig Stunden vor dem ersten Studientag wurde das Supplement abgesetzt. Zwischen den beiden Versuchstagen wurde die Supplementierung mit Vitamin C, wie bereits beschrieben, fortgesetzt.

Tab. 13: Probandenkollektiv (Humanstudie III)

♀	n = 5
♂	n = 1
Alter (Jahre)	22 – 26
BMI (kg/m ²)	22,8 ± 3,7
Klinisch gesund	n = 6
Nichtraucher	n = 6

Tab. 14: applizierte Antioxidantien (Humanstudie III)

Antioxidative Kapazität/Antioxidantien	Dosis/400 ml Antiox-Getränk
PCL (mmol TE)	3,53
FRAP (mmol Fe ²⁺)	10,6
Gesamtphenole (mg GAE)	780
Ascorbinsäure (mg)	97,6

TE: Trolox Equivalents; GAE: Gallic Acid Equivalents.

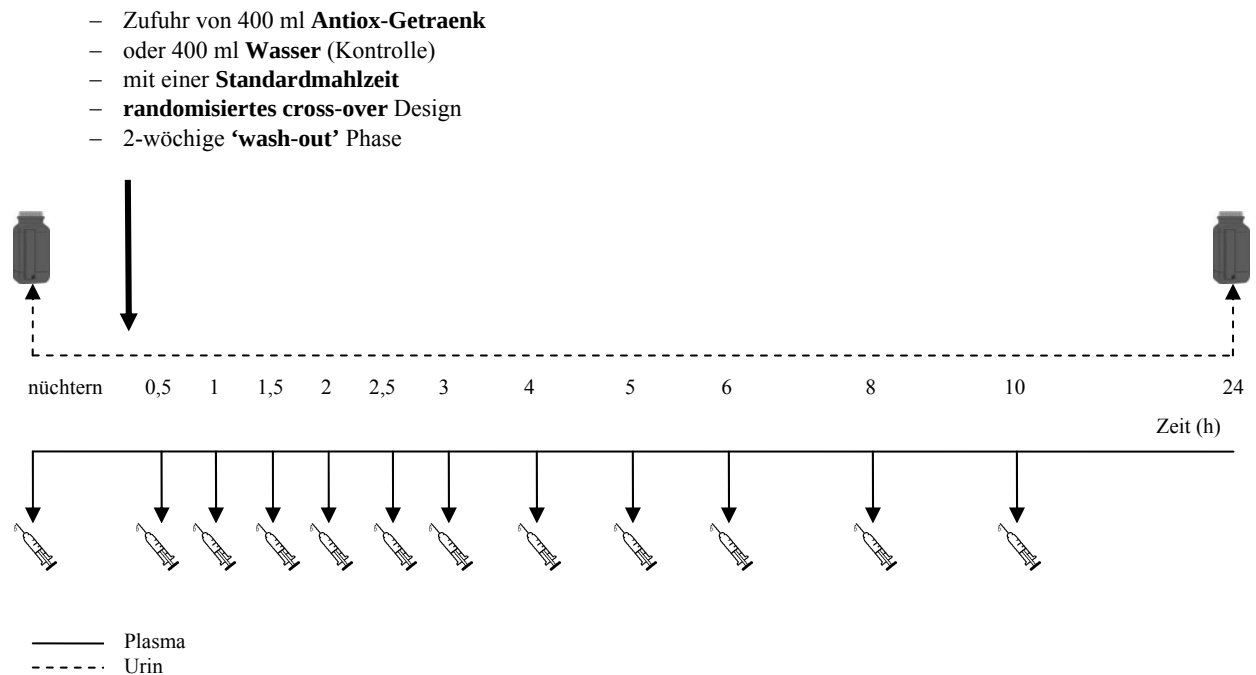


Abb.14: Studiendesign (Humanstudie III); Standardmahlzeiten: Mahlzeit 1 – 1 Weißbrötchen; Mahlzeit 2 – 2 Weißbrötchen mit 60g Käse (Gouda); Mahlzeit 3 – 2 Weißbrötchen mit 60 g Käse (Gouda)

Analytik:

In Studiengetränk (Antiox-Getränk), Plasma und Urin wurden die folgenden Parameter und Substanzen bestimmt:

- antioxidative Kapazität [Antiox-Getränk, Plasma und Urin: PCL-Test, FRAP-Test und Gesamtphenole nach Folin-Ciocalteu]
- Malondialdehyd [Urin: HPLC-Fluoreszenz]
- Hippursäure [Urin: HPLC-DAD]
- Ascorbinsäure [Antiox-Getränk, Plasma und Urin: HPLC-DAD]
- Harnsäure [Plasma und Urin: HPLC-DAD]

3.3 Pharmakokinetik und Statistik

Humanstudie I (nicht randomisiert; Hauptanthocyane der roten Traube):

Kompartimentunabhängige pharmakokinetische Berechnungen nach gängigen Standardmethoden (Cawello 1999; Yamaoka et al. 1978) wurden mit Hilfe des Software-

Pakets WinNonlin Professional, Version 3.3 (Pharsight Co., Mountain View, CA, USA), durchgeführt. Die folgenden pharmakokinetischen Parameter wurden hierbei erfasst: Urin: $R_{\max}$: maximale Exkretionsrate im Urin; $t_{\max,R}$: Zeitpunkt von $R_{\max}$; $Ae(0-7)$: ausgeschiedene Menge im Urin über 7 Std. (t_0 bis $t_{7\text{Std.}}$); $Ae(0-7)/\text{Dosis}$: ausgeschiedene Menge im Urin über 7 Std. dosisnormalisiert; $X_e(0-7)$: relative Exkretion im Urin über 7 Std. im Verhältnis zur applizierten Dosis. Plasma: $C_{\max}$: maximale Konzentration im Plasma; $t_{\max}$: Zeitpunkt von $C_{\max}$; $AUC(0-3)$: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von t_0 bis $t_{3\text{Std.}}$; $AUC(0-3)/\text{Dosis}$: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von t_0 bis $t_{3\text{Std.}}$ dosisnormalisiert. Die relative Bioverfügbarkeit von Anthocyanen (Rotwein vs. RTSK) wurde auf Äquivalenz, auf der Basis der 90% Konfidenzintervalle, getestet (Ein-Proben t Test der log-Transformierten intraindividuellen Unterschiede der dosisnormalisierten Daten). Zuvor wurde die angenommene Verteilung der Daten (log-Normalverteilte intraindividuelle Unterschiede) mit Hilfe des Shapiro-Wilk Tests bestätigt. Unterschiede wurden bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant akzeptiert. Die statistische Evaluierung der Daten wurde mit Hilfe von SAS System for Windows, Version 8.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA), durchgeführt.

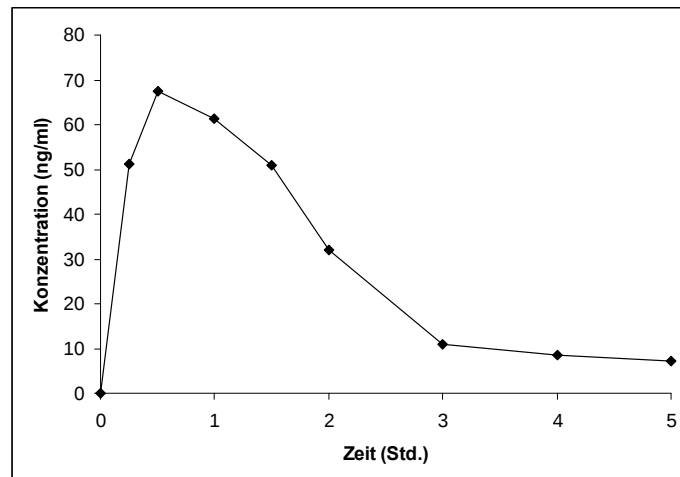
Humanstudien II und III (randomisiert): Die im Plasma ermittelten Daten, FRAP-, PCL-, Gesamtphenol- und Ascorbinsäure-AUCs (Flächen unter den Konzentrations-Zeit-Kurven (t_0 - $t_{10\text{Std.}}$) die über den Nüchternkonzentrationen liegen) sowie die im 24 Std. Urin (t_0 - $t_{24\text{Std.}}$) gemessene antioxidative Kapazität (FRAP, PCL und Gesamtphenole) bzw. ausgeschiedene Substanzen (MDA, Ascorbinsäure, Harnsäure und Hippursäure), wurden einer Varianzanalyse (ANOVA) unterzogen. Alle pharmakokinetischen (kompartimentunabhängig) und statistischen Berechnungen wurden mit dem Software-Paket WinNonline, Versionen 4.1 und 5.0 (Pharsight Co.), durchgeführt. Unterschiede wurden bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant akzeptiert.

4 Ergebnisse

4.1 Humanstudie I: rotes Traubensaftkonzentrat vs. Rotwein

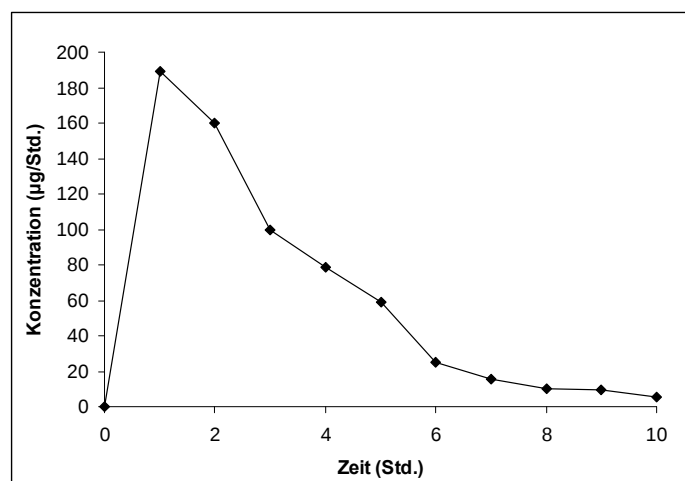
4.1.1 Vorstudie

In den Abbildungen 15 und 16 sowie in den Tabellen 15 und 16 sind die Ergebnisse der Vorstudie mit rotem Traubensaftkonzentrat (RTSK) und einem gesunden Probanden dargestellt. Das RTSK wurde mit Trinkwasser (1:2,6) verdünnt.



[#]Summe aus Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk

Abb. 15: Konzentrations-Zeit-Verlauf der Anthocyane[#] im Plasma eines gesunden Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK (333,1 mg Gesamt-Anthocyane)



[#]Summe aus Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk

Abb. 16: Anthocyan[#]-Exkretion (Menge/Zeitintervall) im Urin eines gesunden Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK (333,1 mg Gesamt-Anthocyane)

Tab. 15: Gesamt-Anthocyane ($C_{\max}$ und $t_{\max}$) im Plasma eines gesunden Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK

Anthocyane	Dosis (mg/Proband)	$C_{\max}$ (ng/ml)	$t_{\max}$ (Std.)
Gesamt-Anthocyane [#]	333,1	67,5	0,5
$C_{\max}$: maximale Konzentration im Plasma; $t_{\max}$: Zeitpunkt von $C_{\max}$; [#] Summe aus Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk			

Tab. 16: Anthocyanexkretions-Parameter im Urin eines gesunden Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK

Anthocyane	Dosis (mg/Proband)	$R_{\max}$ (µg/Std.)	$t_{\max,R}$ (Std.)	Ae(0-10) (µg)	Xe (0-10) (%)
Gesamt Anthocyane [#]	333,1	189,3	1	653	0,20

$R_{\max}$: maximale Exkretionsrate im Urin; $t_{\max,R}$: Zeitpunkt von $R_{\max}$; Ae(0-10): ausgeschiedene Menge im Urin über 10 Std. (t_0 bis $t_{10\text{Std.}}$); Xe (0-10): relative Exkretion im Urin über 10 Std. im Verhältnis zur applizierten Dosis; [#]Summe aus Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk

In den Plasma und Urinproben des Probanden konnten die fünf Hauptanthocyane der roten Traube nach RTSK-Zufuhr detektiert und quantifiziert werden. In den Nüchternproben (vor RTSK-Zufuhr) waren keine Anthocyane nachweisbar. Drei bzw. sieben Std. nach RTSK konnten nur noch minimale Anthocyan-Konzentrationen im Plasma bzw. Urin detektiert werden. Basierend auf den Ergebnissen der Vorstudie wurde das Versuchsdesign für die Hauptstudie entsprechend modifiziert: Entnahme von Blutproben zur Plasmagewinnung – nüchtern sowie über 3 Std. nach Zufuhr von RTSK und Rotwein; Sammeln von Urinproben – nüchtern sowie über 7 Std. nach Zufuhr von RTSK und Rotwein. Durch diese Modifikation des Studiendesigns sollte einerseits die Belastung der Probanden verringert werden und andererseits das Probenvolumen in der Hauptstudie reduziert werden, ohne die wissenschaftliche Aussagekraft der Studie zu beeinträchtigen.

4.1.2 Hauptstudie

Abbildung 17 zeigt typische HPLC-Chromatogramme der analysierten Plasma- und Urinproben. In den Abbildungen 18 und 19 sowie in den Tabellen 17 und 18 sind die Ergebnisse der Hauptstudie mit RTSK und Rotwein dargestellt.

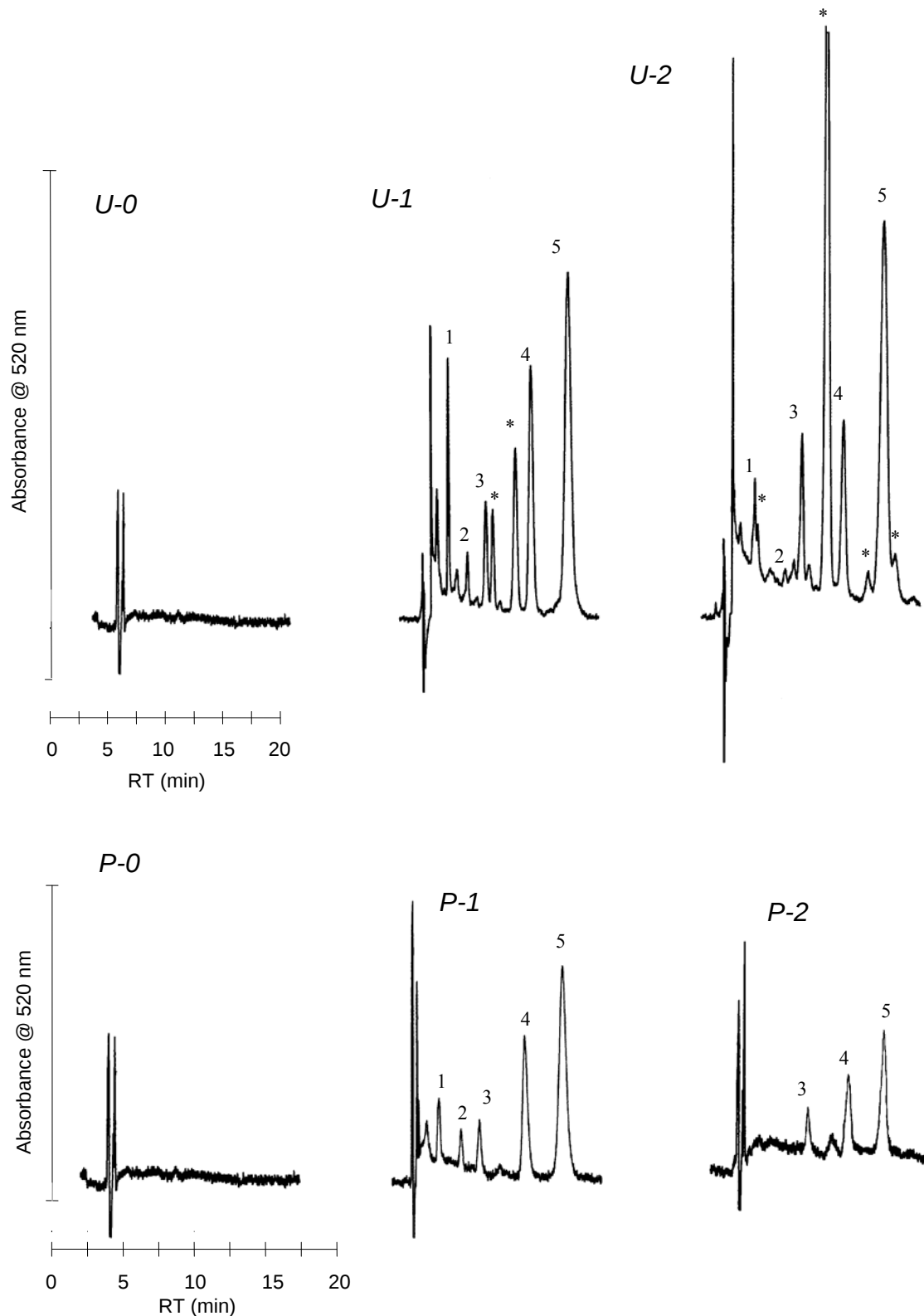
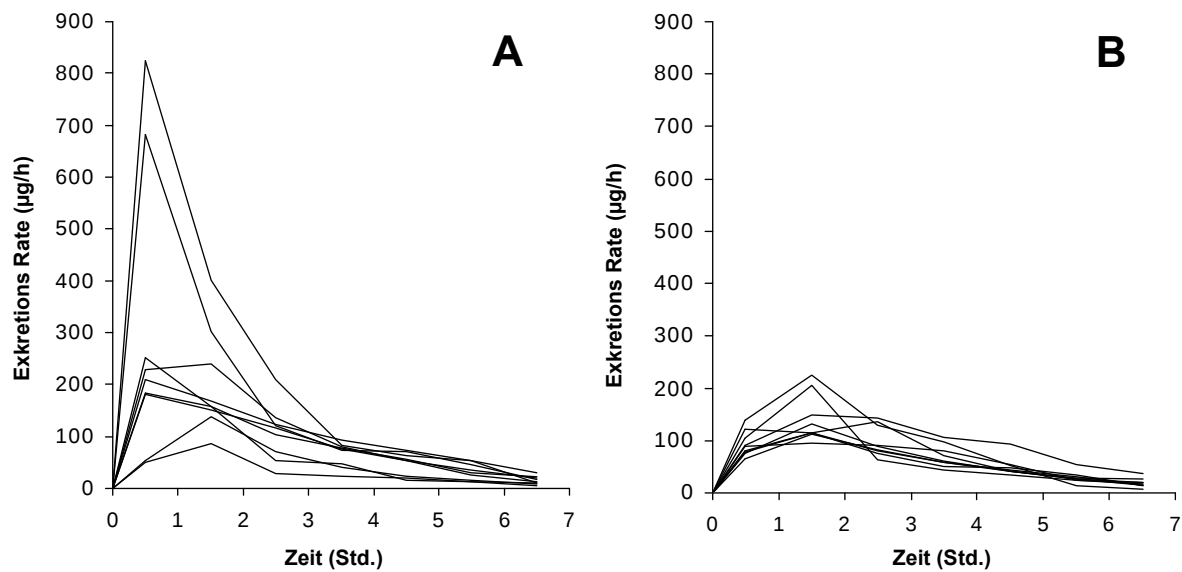


Abb. 17: repräsentative HPLC-Chromatogramme (HPLC-DAD bei 520 nm) von Plasma nüchtern (P-0), Plasma 1 Std. nach RTSK-Zufuhr (P-1), Plasma 1 Std. nach Rotwein-Zufuhr (P-2), Urin nüchtern (U-0), Urin 2 Std. nach RTSK-Zufuhr (U-1) und Urin 2 Std. nach Rotwein-Zufuhr (U-2); Peaks: (1) Del-3-Gluk, (2) Cya-3-Gluk, (3) Pet-3-Gluk, (4) Peo-3-Gluk und (5) Mal-3-Gluk; *nicht weiter identifizierte Metaboliten. Die mittels HPLC-ESI-MS/MS ermittelten Massen (Urin) waren wie folgt: (1) Del-3-Gluk (m/z 465 $\rightarrow$ 303), (2) Cya-3-Gluk (m/z 449 $\rightarrow$ 287), (3) Pet-3-Gluk (m/z 479 $\rightarrow$ 317), (4) Peo-3-Gluk (m/z 463 $\rightarrow$ 301) und (5) Mal-3-Gluk (m/z 493 $\rightarrow$ 331).

Tab. 17: Pharmakokinetische Parameter von Anthocyanen ermittelt im Urin von neun gesunden Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK und 400 ml Rotwein.

	RTSK ¹					‘Lemberger’ Rotwein				
	R _{max}	t _{max,R}	Ae(0-7)	Xe(0-7)	Ae(0-7)/Dosis	R _{max}	t _{max,R}	Ae(0-7)	Xe(0-7)	Ae(0-7)/Dosis
	[µg/Std.]	[Std.] ^a	[µg]	[%]	[µg/mg]	[µg/Std.]	[Std.] ^a	[µg]	[%]	[µg/mg]
Cya-3-Gluk	1,26 (75,8)	0,5 (0,5-1,5)	2,88 (72,1)	0,09 (72,1)	0,92 (72,1)	0,66 (117)	2,5 (1,5-4,5)	1,45 (67,3)	0,06 (67,3)	0,61 (67,3)
Del-3-Gluk	39,6 (91,1)	0,5 (0,5-1,5)	101,9 (72,5)	0,20 (72,5)	2,05 (72,5)	14,9 (51,5)	0,5 (0,5-1,5)	47,7 (26,9)	0,12 (26,9)	1,25 (26,9) [#]
Mal-3-Gluk	86,7 (126)	0,5 (0,5-1,5)	236,3 (95,7)	0,18 (95,7)	1,81 (95,7)	60,2 (33,4)	1,5 (1,5-2,5)	206,8 (31,7)	0,11 (31,7)	1,12 (31,7)
Peo-3-Gluk	86,0 (79,1)	0,5 (0,5-1,5)	240,5 (65,8)	0,29 (65,8)	2,89 (65,8)	44,1 (43,7)	0,5 (0,5-1,5)	151,5 (31,5)	0,84 (31,5)	8,41 (31,5)*
Pet-3-Gluk	20,2 (45,8)	0,5 (0,5-1,5)	53,4 (31,1)	0,32 (31,1)	3,19 (31,1)	20,5 (52,5)	1,5 (1,5-1,5)	66,4 (47,5)	0,18 (47,5)	1,82 (47,5)*
Gesamt-Anthocyane ²	241,4 (82,3)	0,5 (0,5-1,5)	653,6 (66,6)	0,23 (66,6)	2,31 (66,6)	137,6 (29,2)	1,5 (1,5-2,5)	491,0 (19,8)	0,18 (19,8)	1,76 (19,8)

Daten: geometrische Mittelwerte (mit geometrischen Variationskoeffizienten (%)); ^aMedian (Bereich); R_{max}: maximale Exkretionsrate im Urin; t_{max,R}: Zeitpunkt von R_{max}; Ae(0-7): ausgeschiedene Menge im Urin über 7 Std. (t₀ bis t_{7Std.}); Ae(0-7)/Dosis: ausgeschiedene Menge im Urin über 7 Std. dosisnormalisiert; Xe (0-7): relative Exkretion im Urin über 7 Std. im Verhältnis zur applizierten Dosis; ¹120 ml Konzentrat wurden mit 280 ml Wasser verdünnt; ²Summe aus Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk; *p < 0,05; [#]p = 0,052.



[#]Summe aus Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk.

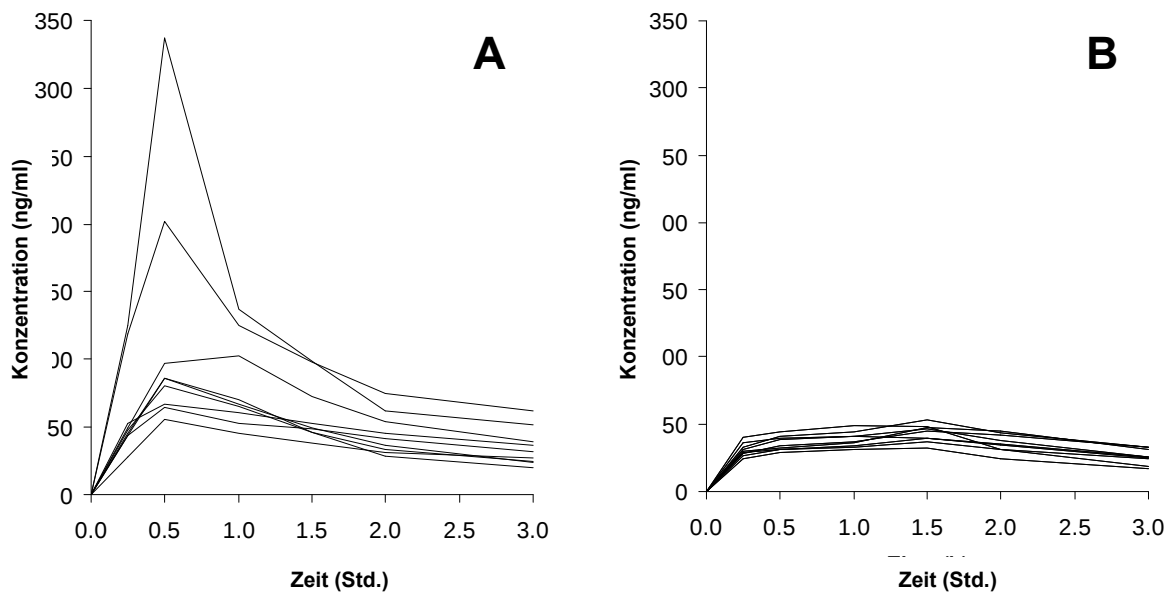
Abb. 18: Individuelle Exkretionsprofile von Anthocyanen[#] im Urin von neun Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK (A) und 400 ml Rotwein (B); dargestellt sind die Konzentrationen für die jeweiligen Sammelintervallmittelpunkte.

Nach Zufuhr von RTSK und Rotwein konnten die Hauptanthocyane der roten Traube (Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk) im Urin von neun gesunden Probanden identifiziert und quantifiziert werden. Die Gesamt-Anthocyanexkretion (7 Std. Urin) betrug 0,23% für RTSK bzw. 0,18% für Rotwein. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Die dosisnormalisierte Ausscheidung von Peo-3-Gluk war nach Rotwein signifikant ($p < 0,05$) höher als nach RTSK, während die dosisnormalisierte Ausscheidung von Pet-3-Gluk nach RTSK signifikant ($p < 0,05$) höher war als nach Lemberger Rotwein. Der Unterschied in der Ausscheidung von Del-3-Gluk (dosisnormalisiert) war an der Signifikanzgrenze von 5% ($p = 0,052$). Im Nüchternurin (vor Zufuhr der beiden Studiengetränke) konnten keine Anthocyane nachgewiesen werden.

Tab. 18: Pharmakokinetische Parameter von Anthocyanen ermittelt im Plasma von neun Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK und 400 ml Rotwein.

	RTSK ¹				‘Lemberger’ Rotwein			
	C _{max} [ng/ml]	t _{max} [Std.] ^a	AUC(0-3) [ng·Std./ml]	AUC(0-3)/Dosis [ng·Std./ml/mg]	C _{max} [ng/ml]	t _{max} [Std.] ^a	AUC(0-3) [ng·Std./ml]	AUC(0-3)/Dosis [ng·Std./ml/mg]
Cya-3-Gluk	0,42 (118)	0,5 (0,5-0,5)	0,60 (82,9)	0,19 (82,9)	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
Del-3-Gluk	6,12 (66,7)	0,5 (0,5-1,0)	11,9 (55,0)	0,24 (55,0)	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
Mal-3-Gluk	48,8 (87,6)	0,5 (0,5-1,0)	71,7 (60,4)	0,55 (60,4)	18,5 (24,0)	1,5 (1,0-1,5)	40,4 (21,2)	0,22 (21,2)
Peo-3-Gluk	27,3 (51,0)	0,5 (0,5-,5)	49,7 (36,2)	0,60 (36,2)	12,6 (16,1)	1,5 (1,0-1,5)	30,7 (17,7)	1,71 (17,7)
Pet-3-Gluk	16,1 (40,5)	0,5 (0,5-0,5)	31,5 (30,5)	1,88 (30,5)	12,3 (16,2)	1,5 (0,5-1,5)	29,1 (15,1)	0,80 (15,1)
Gesamt-Anthocyane ^{2,3}	100,1 (64,2)	0,5 (0,5-1,0)	168,4 (42,3)	0,59 (42,3)	42,9 (16,0)	1,5 (1,0-1,5)	100,8 (14,4)	0,36 (14,4)

Daten: geometrische Mittelwerte (mit geometrischen Variationskoeffizienten (%)); ^aMedian (Bereich); C_{max}: maximale Konzentration im Plasma; t_{max}: Zeitpunkt von C_{max}; AUC(0-3): Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von t₀ bis t_{3Std.}; AUC(0-3)/Dosis: Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von t₀ bis t_{3Std.} dosisnormalisiert; ¹120 ml rotes Traubensaftkonzentrat wurden mit 280 ml Wasser verdünnt; ²Summe aus Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk (RTSK); ³Summe aus Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk (Rotwein); n. n.: nicht nachweisbar



¹Summe aus Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk nach Zufuhr von RTSK (A)

²Summe aus Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk nach Zufuhr von Rotwein (B)

Abb. 19: Individuelle Konzentrations-Zeit-Verläufe von Anthocyanen^{1,2} im Plasma von neun Probanden nach Zufuhr von 400 ml RTSK (A) und 400 ml Rotwein (B).

Nach Zufuhr von RTSK konnten die Hauptanthocyane der roten Traube (Cya-3-Gluk, Del-3-Gluk, Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk) im Plasma von neun gesunden Probanden identifiziert und quantifiziert werden, während nach Zufuhr des Lemberger Rotweins nur Mal-3-Gluk, Peo-3-Gluk und Pet-3-Gluk nachgewiesen werden konnten. Nach RTSK konnten bereits nach 0,5 Std. die maximalen Plasma-Anthocyankonzentrationen gemessen werden, während $C_{\max}$ nach Rotwein “erst“ nach 1,5 Std. erreicht wurde. Auch waren die $C_{\max}$ und AUC(0-3)-Werte der Anthocyane nach RTSK generell höher als nach Rotwein, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p > 0,05$). Peo-3-Gluk war die einzige Ausnahme: nach Rotwein konnte eine 2,9-fach höhere dosisnormalisierte AUC(0-3) sowie ein 2,1-fach höherer dosisnormalisierter $C_{\max}$ -Wert im Vergleich zu RTSK gemessen werden. Generell waren die interindividuellen Schwankungen der AUC(0-3)- und $C_{\max}$ -Werte nach RTSK höher als nach Rotwein. Im Nüchternplasma (vor Zufuhr der beiden Studiengetränke) konnten keine Anthocyane detektiert werden.

4.2 Humanstudie II

4.2.1 Studie-Apfelsäfte

In den Abbildungen 20 bis 22 sind die PCL-, FRAP- und Gesamtphenol-Werte der vier sortenreinen naturtrüben Apfelsäfte dargestellt. Die Konzentrationen der analysierten Polyphenole sind in Abbildung 23 aufgeführt, die Korrelationen zwischen antioxidativer Kapazität und analysierten Polyphenolen werden in Abbildung 24 gezeigt. Die Werte der antioxidativen Tests wurden ascorbinsäurekorrigiert; d.h., der Anteil der Ascorbinsäure an der antioxidativen Kapazität, bestimmt mit den drei verschiedenen Tests (PCL, FRAP und Gesamtphenole), wurde subtrahiert. Der “Ascorbinsäureanteil” wurde mit Hilfe von L-Ascorbinsäure-Kalibriergeraden zuvor für jeden Test ermittelt.

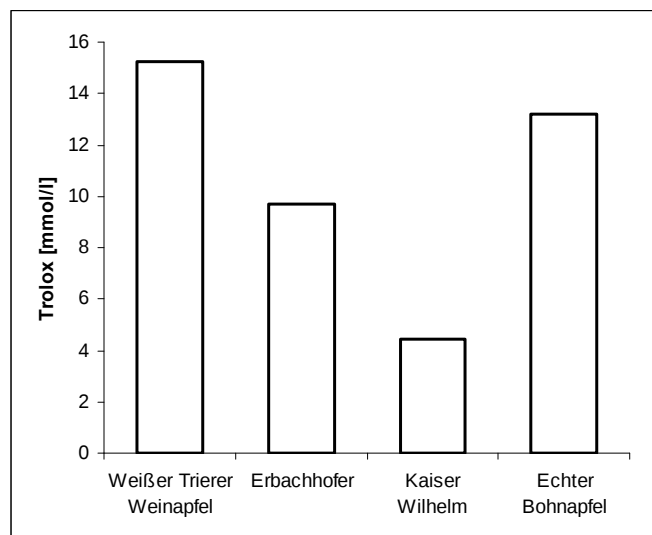


Abb. 20: PCL-Werte (Studie-Apfelsäfte); Werte sind ascorbinsäurekorrigiert.

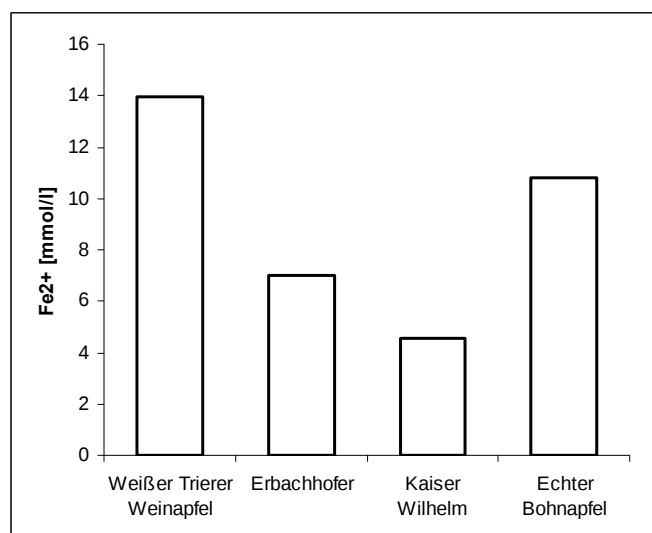


Abb. 21: FRAP-Werte (Studie-Apfelsäfte); Werte sind ascorbinsäurekorrigiert.

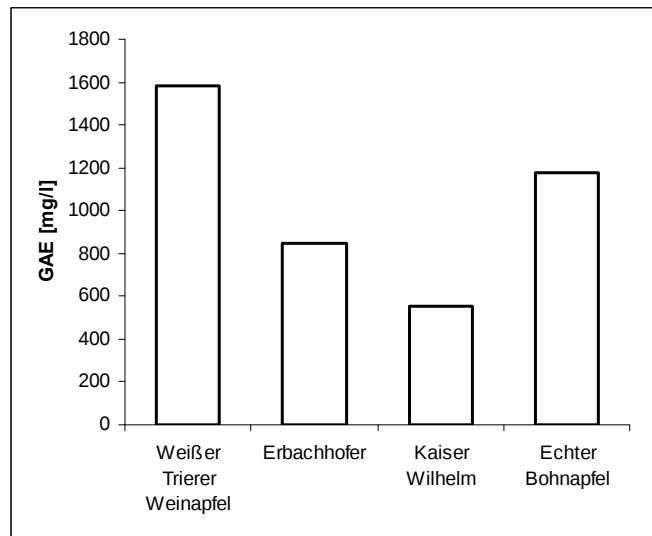


Abb. 22: Gesamtphenol-Werte (Studie-Apfelsäfte); Werte sind ascorbinsäurekorrigiert.

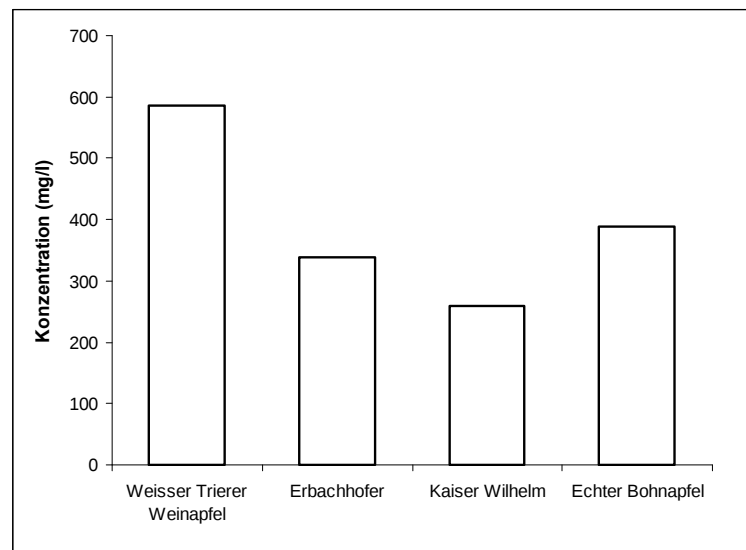


Abb. 23: Polyphenolgehalte der untersuchten Mostapfelsorten (Studie-Apfelsäfte); Summe aus: Phloridzin, Phloretin-Xyloglukosid, Chlorogensäure, Cumaroylchinasäuren (3-, 4- und 5-Cumaroylchinasäure), Procyanidin B2 und Epicatechin (nur für Weißen-Trierer-Weinapfelsaft und Echten Bohnapfelsaft).

Epicatechin konnte im Erbachhofer- und Kaiser-Wilhelm-Apfelsaft nur in Spuren nachgewiesen werden, während Procyanidin B2 in diesen beiden Säften überhaupt nicht detektiert wurde.

Die Ascorbinsäurekonzentrationen betrugen 128, 1,4, 1,0 und 7,0 mg/l für Weißen-Trierer-Weinapfelsaft, Erbachhofer, Kaiser-Wilhelm und Echten Bohnapfelsaft.

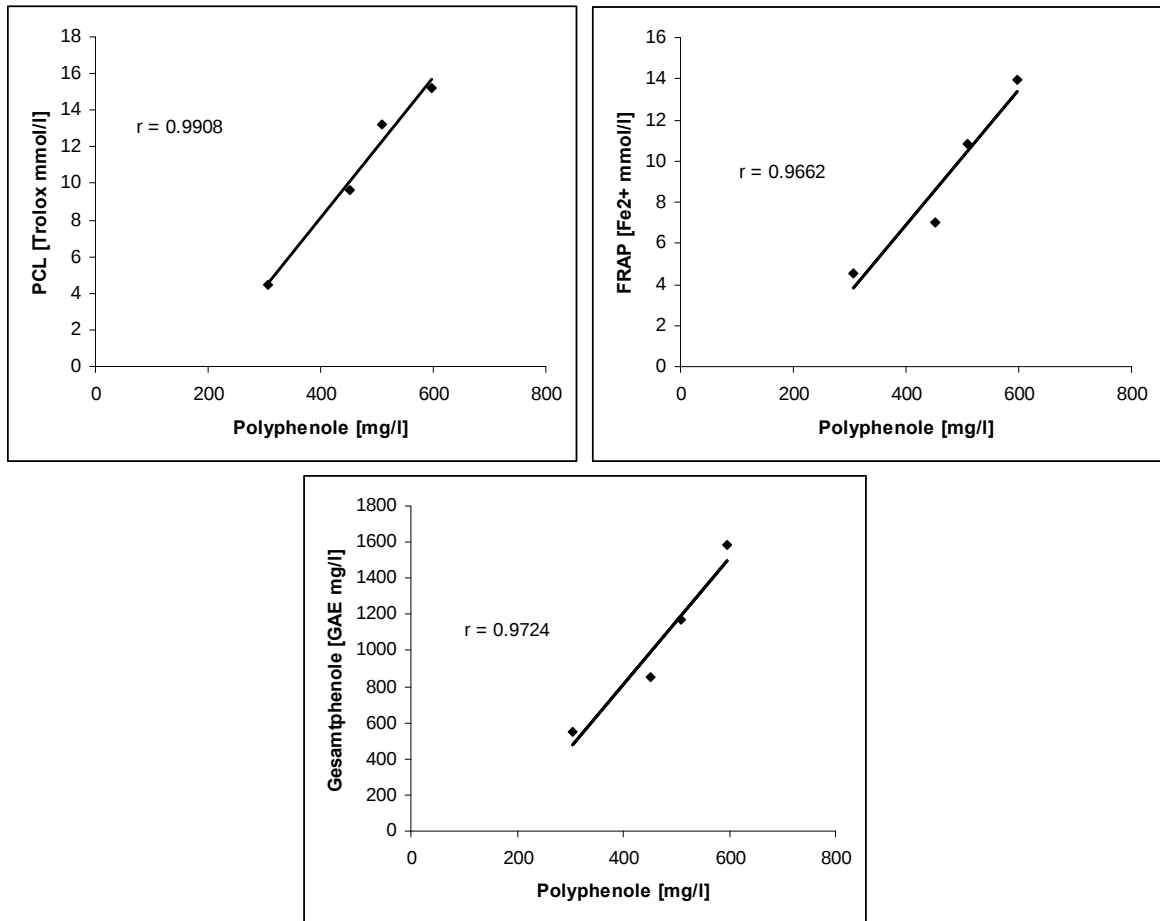


Abb. 24: Korrelationen zwischen antioxidativer Kapazität und analysierten Polyphenolen (Studie-Apfelsäfte)

Im Weißen-Trierer-Weinapfelsaft (WTWAS) konnte die höchste antioxidative Kapazität sowie der höchste Polyphenolgehalt gemessen werden. Dieser Apfelsaft wurde deshalb für die anschließend durchgeführte Urinstudie (s. 4.2.2) verwendet. Eine positive Korrelation zwischen den antioxidativen Tests (PCL, FRAP und Gesamtphenole) und den mittels HPLC bestimmten Polyphenolen (r : 0,966-0,990), konnte ebenfalls beobachtet werden.

4.2.2 Studie-Urin

Abbildung 25 zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm einer Urinprobe nach Zufuhr von WTWAS. In Tabelle 19 sind die im 24 Std. Urin analysierten Substanzen/bestimmten Parameter zusammengefasst. Die relativen Veränderungen nach WTWAS im Vergleich zur Kontrolltestung sind in Abbildung 26 dargestellt.

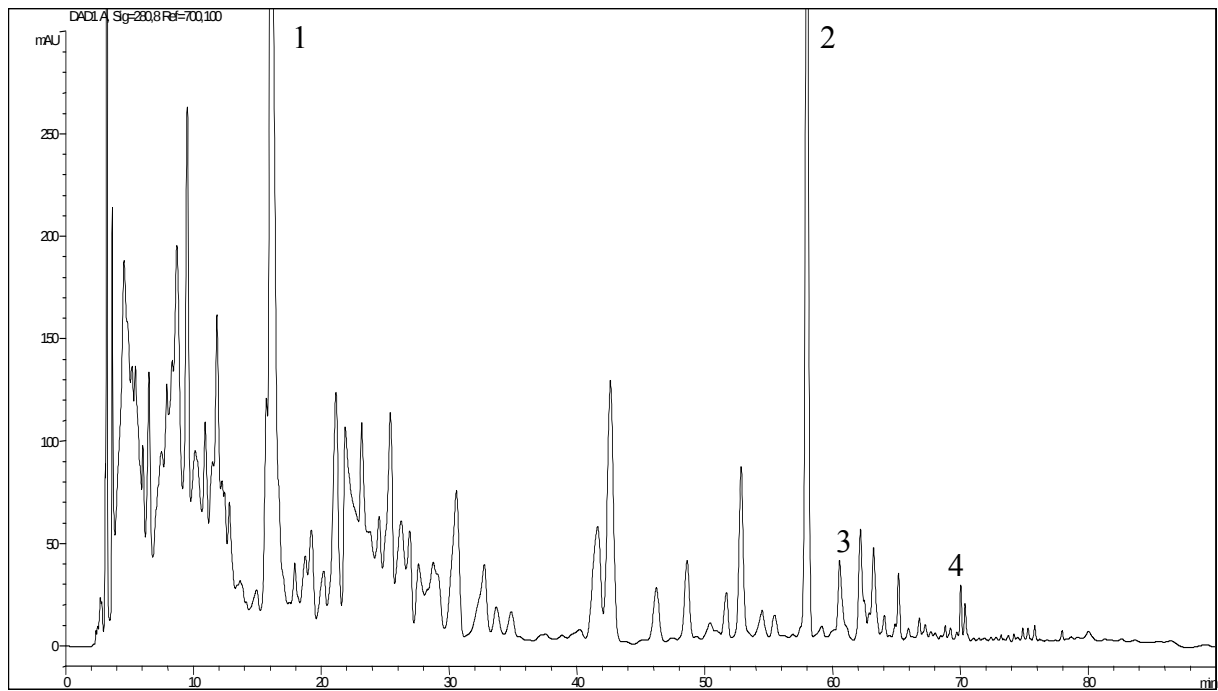


Abb. 25: repräsentatives HPLC-Chromatogramm (HPLC-DAD bei 280 nm) einer Urinprobe nach Zufuhr von 700 ml WTWAS; Peaks: (1) Hippursäure, (2) und (3) Phloretin-Monoglucuronide, (4) Phloretin. Die mittels HPLC-ESI-MS/MS ermittelten Massen waren wie folgt: (1) Hippursäure (m/z 178 $\rightarrow$ 134), (2) und (3) Phloretin-Monoglucuronide (m/z 449 $\rightarrow$ 273) und (4) Phloretin (m/z 273 $\rightarrow$ 167).

Tab. 19: Analytierte Substanzen/bestimmte Parameter im 24 Std. Urin von acht Probanden nach Zufuhr von 700 ml Wasser (Kontrolle) oder 700 ml WTWAS

Parameter/Substanzen	Kontrolle (Wasser)	WTWAS
Antioxidative Kapazität ¹ :		
PCL (mmol TE/24 Std.) ²	1,86 $\pm$ 0,38	2,69 $\pm$ 0,49*
FRAP (mmol Fe ²⁺ /24 Std.) ²	2,26 $\pm$ 0,30	3,06 $\pm$ 0,38*
Gesamtphenole (mg GAE/24 Std.) ²	425 $\pm$ 72	580 $\pm$ 76*
Polyphenole und Metaboliten ¹ :		
Phloretin (mg/24 Std.)	n. n.	0,31 $\pm$ 0,15
Phloretin-Monoglucuronide (mg/24 Std.)	n. n.	1,72 $\pm$ 0,71
Hippursäure (mg/24 Std.) ¹	232 $\pm$ 125	719 $\pm$ 194*
Harnsäure (mg/24 Std.) ¹	479 $\pm$ 48,4	473 $\pm$ 47,0
Ascorbinsäure (mg/24 Std.) ¹	25,49 $\pm$ 13,92	73,89 $\pm$ 17,51*

¹Daten: arith. Mittelwerte $\pm$ StAbw. (n = 8 Probanden); ²die Werte sind ascorbinsäure- und harnsäurekorrigiert; n.n.: nicht nachweisbar; TE: Trolox-Equivalents; GAE: Gallic Acid Equivalents; *p $\leq$ 0,05.

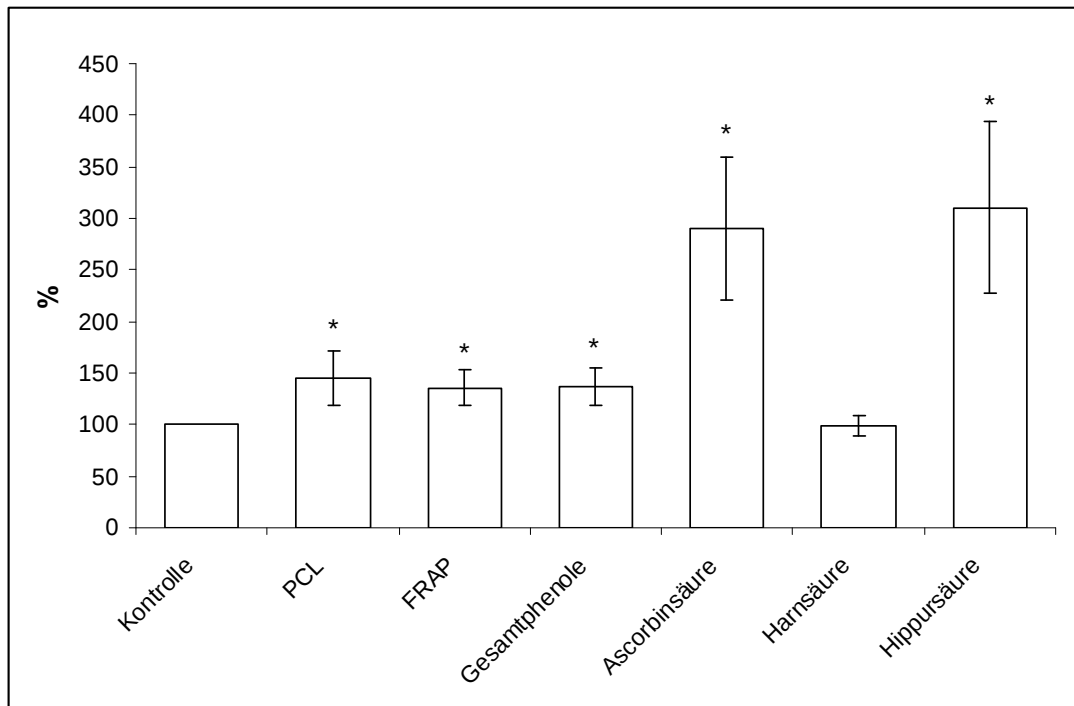


Abb. 26: relative Veränderungen der analysierten Substanzen/bestimmten Parameter (24 Std. Urin) nach WTWAS im Vergleich zur Kontrolltestung (“Kontrollwerte“ als Bezugswerte =100%); Daten: arith. Mittelwerte $\pm$ StAbw. (n = 8 Probanden); *p $\leq$ 0,05 (WTWAS vs. Kontrolle).

Im Vergleich zur Kontrolltestung (700 ml Trinkwasser) konnte nach WTWAS (700 ml) eine signifikant (p<0,05) erhöhte antioxidative Kapazität (PCL, FRAP und Gesamtphenole) im 24 Std. Urin gemessen werden, unabhängig von der Harnsäure- und Ascorbinsäurekonzentration. Weiterhin konnten in den WTWAS-Urinproben Phloretin (Aglykonform der Phloretin-Glykoside) sowie zwei Phloretin-Monoglukurone nachgewiesen werden. Hippursäure war nach WTWAS ebenfalls signifikant (p<0,05) erhöht. Die Harnsäureausscheidung im 24 Std. Urin war in beiden Testungen praktisch gleich, während die Ascorbinsäure nach WTWAS signifikant (p<0,05) erhöht war (im Vergleich zur Kontrolle). Anmerkung: die unkorrigierten (d.h. mit Ascorbin- und Harnsäure) PCL-, FRAP- und Gesamtphenol-Werte der 24 Std. Urine sind im Anhang (A.2.2.2) aufgeführt.

4.3 Humanstudie III: “Antiox“-Getränk

Die Abbildungen 27-30 zeigen die Konzentrations-Zeit-Verläufe der antioxidativen Kapazität im Plasma, ermittelt mittels PCL-, FRAP- und Gesamtphenol-Test, sowie der Plasma-Ascorbinsäure nach Zufuhr des Antiox-Getränks bzw. Wasser (Kontrolle). In den Tabellen 20 und 21 sind die in Plasma und Urin ermittelten Parameter bzw. analysierten

Substanzen dargestellt. Abbildung 31 zeigt die relativen Veränderungen im Urin nach Zufuhr des Antiox-Getränks (im Vergleich zur Kontrolle).

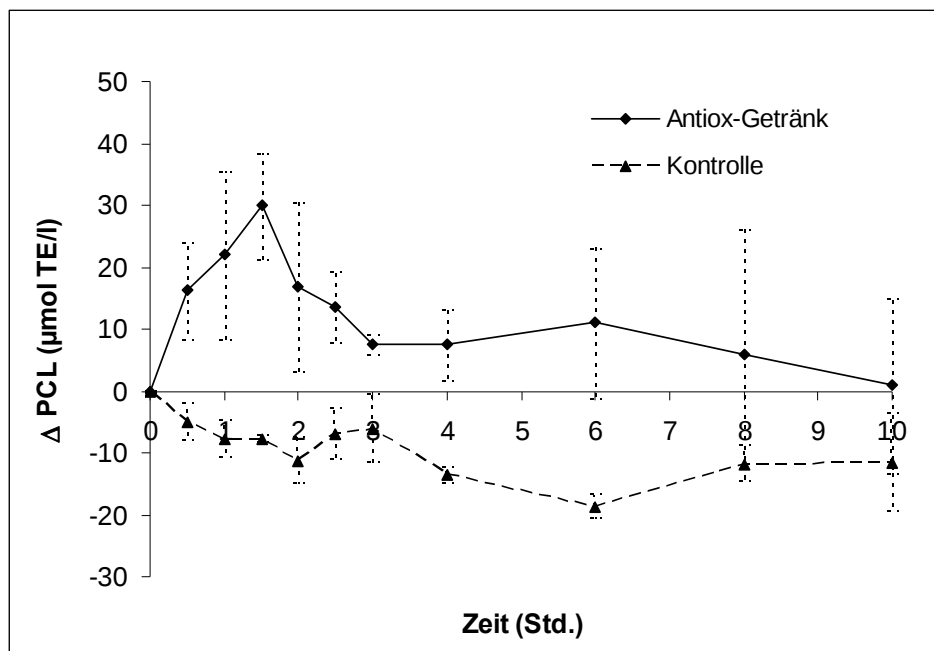


Abb. 27: Konzentrations-Zeit-Verläufe der antioxidativen Kapazität im Plasma, ermittelt mittels PCL-Test, nach Zufuhr von 400 ml Antiox-Getränk oder 400 ml Wasser (Kontrolle); Daten: arith. Mittelwerte $\pm$ StAbw. (n = 6 Probanden); TE: Trolox Equivalents.

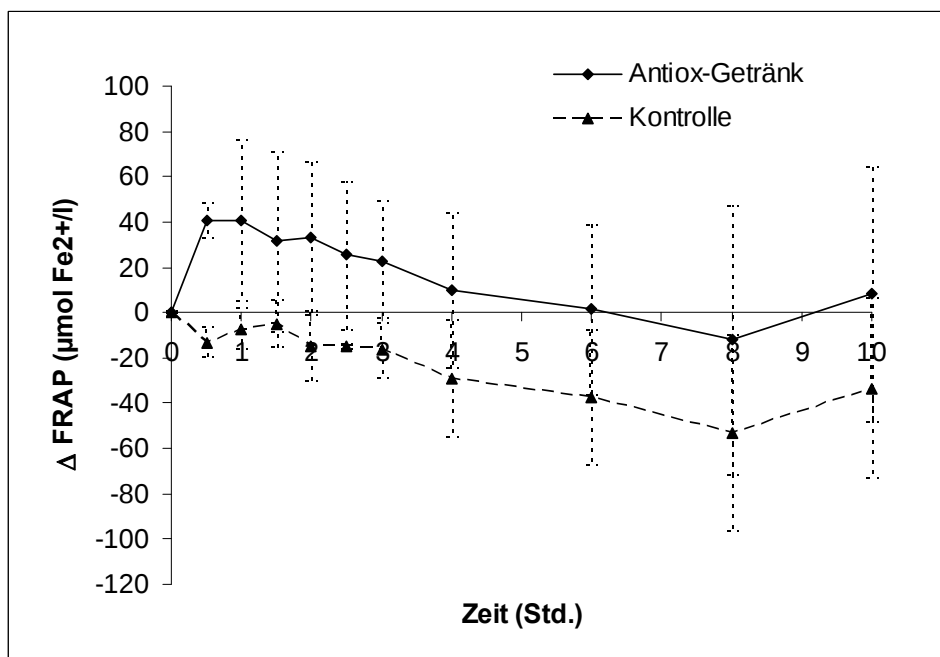


Abb. 28: Konzentrations-Zeit-Verläufe der antioxidativen Kapazität im Plasma, ermittelt mittels FRAP-Test, nach Zufuhr von 400 ml Antiox-Getränk oder 400 ml Wasser (Kontrolle); Daten: arith. Mittelwerte $\pm$ StAbw. (n = 6 Probanden).

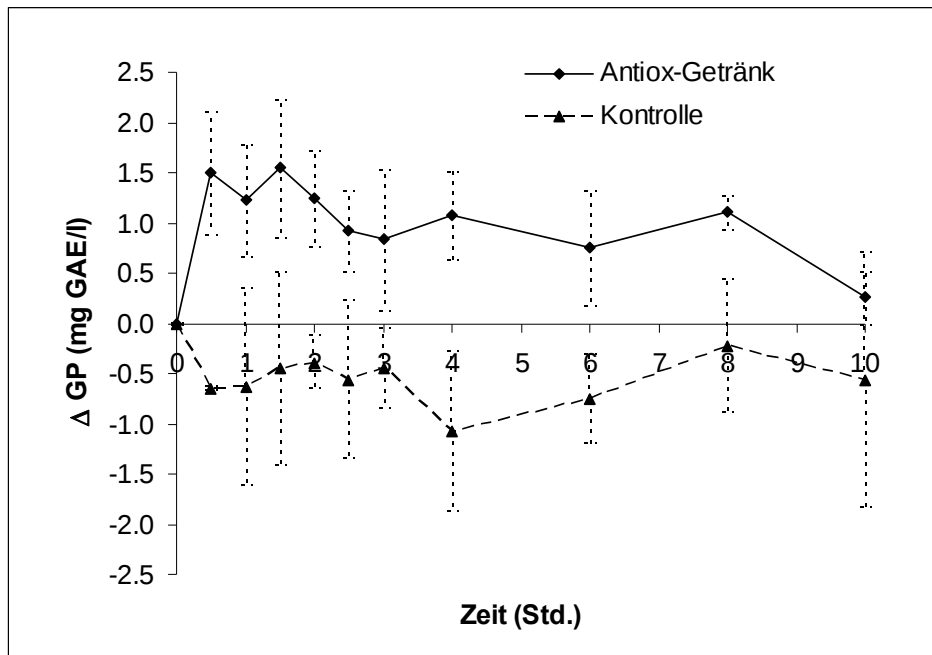


Abb. 29: Konzentrations-Zeit-Verläufe der antioxidativen Kapazität im Plasma, ermittelt mittels Gesamtphenol-Test, nach Zufuhr von 400 ml Antiox-Getränk oder 400 ml Wasser (Kontrolle); Daten: arith. Mittelwerte $\pm$ StAbw. (n = 6 Probanden); GAE: Gallic Acid Equivalents; GP: Gesamtphenole.

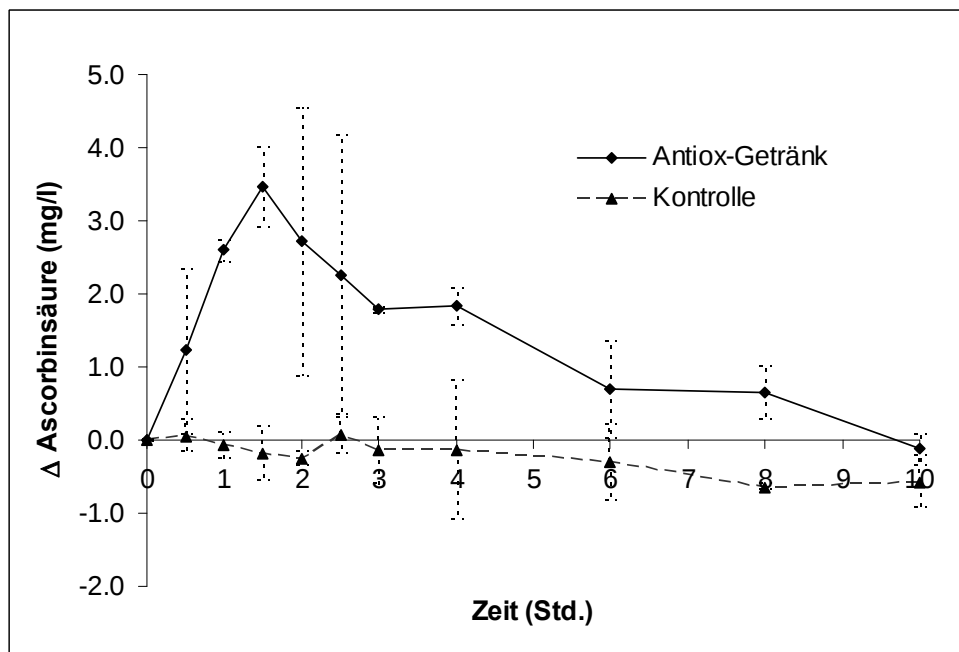


Abb. 30: Konzentrations-Zeit-Verläufe der Ascorbinsäure im Plasma nach Zufuhr von 400 ml Antiox-Getränk oder 400 ml Wasser (Kontrolle); Daten: arith. Mittelwerte $\pm$ StAbw. (n = 6 Probanden).

Tab. 20: Plasma AUC's der antioxidativen Kapazität (PCL, FRAP und Gesamtphenole) sowie von Ascorbinsäure nach Zufuhr von 400 ml Antiox-Getränk oder 400 ml Wasser (Kontrolle) bei sechs gesunden Probanden.

Parameter/Substanzen	Kontrolle	Antiox-Getränk
PCL ($\mu\text{mol TE*Std./l}$)	$0,63 \pm 1,07$	121 ± 117
FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}\text{*Std./l}$)	$44,6 \pm 103$	228 ± 373
Gesamtphenole (mg GAE*Std./l)	$1,01 \pm 1,46$	$9,59 \pm 7,13^*$
Ascorbinsäure (mg*Std./l)	$1,80 \pm 1,96$	$15,9 \pm 12,6^*$

AUC: *Area Under the Curve* über der Basislinie; Basislinie: die jeweilige Plasma-Konzentration zum Zeitpunkt $t = 0$ Std. (vor Zufuhr der Studiengetränke/nüchtern); Daten: arith. Mittelwerte $\pm$ StAbw. ($n = 6$ Probanden); $*p \leq 0,05$.

Die Plasma PCL- und FRAP-AUCs zeigten nach Antiox-Getränk zwar eine Tendenz für eine erhöhte antioxidative Kapazität, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p > 0,05$). Die Plasma Gesamtphenol und Ascorbinsäure AUC's waren hingegen signifikant ($p < 0,05$) nach Zufuhr des Antiox-Getränks erhöht (im Vergleich zur Kontrolle). In beiden Testungen konnten keine signifikanten Effekte auf die Plasma Harnsäurekonzentrationen gemessen werden (s. Anhang, A.2.3.3).

Tab. 21: Antioxidative Kapazität (PCL, FRAP und Gesamtphenole), Malondialdehyd, Ascorbinsäure, Harnsäure und Hippursäure im 24 Std. Urin von sechs gesunden Probanden nach Zufuhr von 400 ml Antiox-Getränk oder 400 ml Wasser (Kontrolle).

Parameter/ Substanzen	Kontrolle	Antiox-Getränk
PCL (mmol TE/24 Std.)	$1,71 \pm 0,14$	$2,44 \pm 0,51^*$
FRAP (mmol Fe^{2+} /24 Std.)	$6,15 \pm 0,73$	$7,91 \pm 0,71^*$
Gesamtphenole [#] (mg GAE/24 Std.)	$259 \pm 56,4$	$345 \pm 22,5^*$
MDA ($\mu\text{mol}/24$ Std.)	$1,65 \pm 0,57$	$1,22 \pm 0,37^*$
Ascorbinsäure (mg/24 Std.)	$11,1 \pm 3,1$	$47,8 \pm 24,3^*$
Harnsäure (mg/24 Std.)	306 ± 108	305 ± 144
Hippursäure (mg/24 Std.)	$149 \pm 46,7$	$321 \pm 88,7^*$

Daten: arith. Mittelwerte $\pm$ StAbw. ($n = 6$ Probanden); $*p \leq 0,05$; [#]ascorbinsäure- und harnsäurekorrigiert

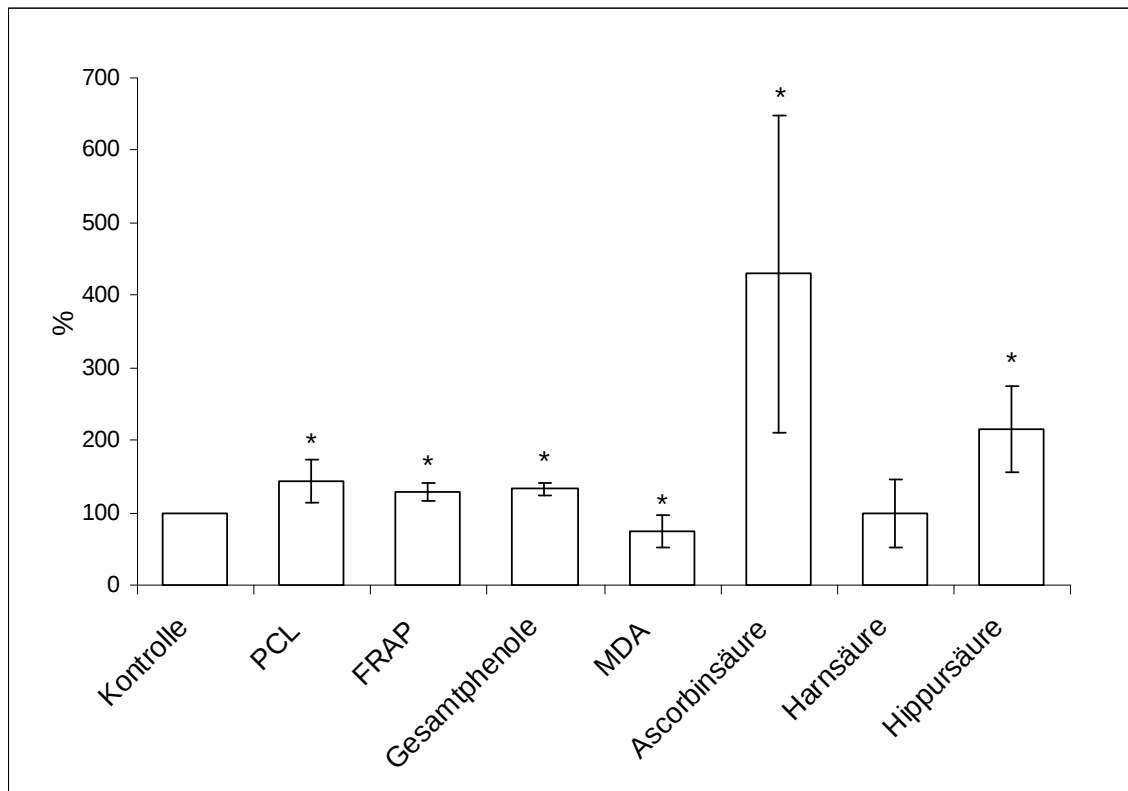


Abb. 31: relative Veränderungen der analysierten Substanzen/bestimmten Parameter (24 Std. Urin) nach Zufuhr von Antiox-Getränk im Vergleich zur Kontrolltestung ("Kontrollwerte" als Bezugswerte =100%); Daten: arith. Mittelwerte $\pm$ StAbw. (n = 6 Probanden); *p $\leq$ 0,05 (Antiox-Getränk vs. Kontrolle).

Im Vergleich zur Kontrolltestung (400 ml Trinkwasser) konnte nach Antiox-Getränk (400 ml) eine signifikant erhöhte antioxidative Kapazität (PCL, FRAP und Gesamtphenole) im 24 Std. Urin gemessen werden, unabhängig von der Harnsäure. Diese blieb in beiden Testungen praktisch unverändert. Ascorbinsäure und Hippursäure waren nach Zufuhr des Antiox-Getränks ebenfalls signifikant erhöht (+330% bzw. +115% im Vergleich zur Kontrolle), während Malondialdehyd signifikant erniedrigt war (-26% im Vergleich zur Kontrolle). Anmerkung: die unkorrigierten (d.h. mit Ascorbin- und Harnsäure) Gesamtphenol-Werte der 24 Std. Urine sind im Anhang (A.2.3.6) aufgeführt.

5 Diskussion

5.1 Anthocyane (Humanstudie I)

5.1.1 Anthocyankonzentrationen in Plasma und Urin

Die in Humanstudie I nach Zufuhr von RTSK und Rotwein gemessenen Anthocyanmengen in Plasma und Urin der neun Probanden liegen in einem Bereich, wie er auch in der Literatur berichtet wird: Manach et al. (2005) sowie Mazza und Kay (2008) haben in ihren Übersichtsartikeln insgesamt 30 publizierte Bioverfügbarkeitsstudien mit anthocyanreichen Früchten und Getränken zusammengefasst. Bei den Studienprobanden konnten Plasma $C_{\max}$ -Werte von 0,0024 bis 592 nmol/l gemessen werden, während die relative Urinexkretion (ausgeschiedene Menge im Vergleich zur zugeführten Dosis) zwischen 0,02 und 5,1 % lag. Die entsprechenden Daten in Humanstudie I betrugen 222,7 und 95,2 nmol/l (Plasma $C_{\max}$ -Werte für Gesamt-Anthocyane nach RTSK und Rotwein; umgerechnet von ng/ml), sowie 0,23 und 0,18 % (relative Anthocyanexkretion im Urin nach RTSK und Rotwein).

Lapidot und Kollegen fanden nach Zufuhr von Rotwein einen der höchsten bisher publizierten Anthocyangehalte im Urin von gesunden Probanden: 12 Std. nach Konsum von 300 ml Rotwein wurden bis zu 5,1 % der Anthocyanosis von 218 mg im Urin wiedergefunden (Lapidot et al. 1998). Neben genuinen Rotweinthocyanen konnten die Autoren auch potentielle *in vivo* Metaboliten mit einem Absorptionsmaximum von 487 nm detektieren. Eine weitere Identifizierung mittels LC-MS wurde jedoch nicht durchgeführt.

5.1.2 Einfluss der Lebensmittelmatrix (Zuckergehalt, Alkohol) auf die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen/Polyphenolen

Bub et al. haben in ihrer Humanstudie die Bioverfügbarkeit von Malvidin-3-Glukosid (M-3-G) aus rotem Traubensaft, Rotwein und alkoholfreiem Rotwein verglichen (Bub et al. 2001). Die Autoren verabreichten jeweils 500 ml der drei genannten Studiengetränke, die 117 mg (roter Traubensaft), 68 mg (Rotwein) und 58 mg (alkoholfreier Rotwein) M-3-G enthielten, an sechs gesunde männliche Probanden. Die relative Exkretion von M-3-G im 6-Std. Urin war mit ~0,03 % deutlich geringer als in der Rotweinstudie von Lapidot et al. (1998) und in Humanstudie I. Hinsichtlich der Bioverfügbarkeit von M-3-G (AUC 0-6 Std.) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Rotwein und der alkoholfreien Variante beobachtet werden. Die ~2fach höheren AUC-Werte (M-3G) nach rotem Traubensaft können auf die ~2fach höhere M-3-G Konzentration im Saft zurückgeführt werden. Die Autoren schlussfolgern deshalb, dass Alkohol keinen Effekt auf die

absorbierte Menge und somit Bioverfügbarkeit von M-3-G hat. Basierend auf den Plasma $t_{\max}$ -Werten von M-3-G (50 Min. nach Rotwein, 90 Min. nach alkoholfreiem Rotwein und 120 Min. nach rotem Traubensaft), vermuten Bub und Kollegen jedoch einen “absorptionsbeschleunigenden“ Effekt des Alkohols. Aber auch der hohe Glukosegehalt im Traubensaft könnte für die signifikant höheren $t_{\max}$ -Werte verantwortlich sein. Die Autoren begründen dies mit einem möglichen “Wettstreit“ zwischen dem Malvidin-Glukosid und der Glukose am intestinalen Natrium-abhängigen Glukose Transporter 1 (SGLT-1).

In Humanstudie I konnten diese Beobachtungen hinsichtlich $t_{\max}$ nicht gemacht werden. Die Untersuchungsperiode im Plasma wurde ja aufgrund der Ergebnisse des Vorversuchs auf drei Std. verkürzt (schonender für die Probanden). Dieser Zeitraum erwies sich im Nachhinein als zu kurz, so dass die Plasma AUC-Werte etwas vorsichtiger interpretiert werden sollten und eher als unterstützende/ergänzende Daten anzusehen sind. Die $t_{\max}$ -Werte jedenfalls waren sowohl für die individuellen Anthocyane als auch für die Gesamt-Anthocyane nach Zufuhr von RTSK deutlich kleiner als nach Rotwein (0,5 Std. vs. 1,5 Std.). Ein beschleunigender Effekt des Alkohols oder ein verzögernder Effekt der Glukose hinsichtlich der intestinalen Absorption dieser Glukoside konnte nicht beobachtet werden. Beim Vergleich der Urin- und Plasma-Daten scheint die Bioverfügbarkeit der Anthocyane aus RTSK tendenziell ($p > 0,05$) höher zu sein als aus Rotwein.

Levanon und Kollegen vermuten, basierend auf ihren Probandenstudien mit Weißwein und Saft, dass die normalerweise auftretende postprandiale Magenmotilität durch Wein inhibiert wird (Levanon et al. 2002). Dies wiederum kann die Magenentleerung verzögern und somit auch die intestinale Absorption von Zucker und Glukosiden. Die Ergebnisse in Humanstudie I lassen dies vermuten. Ob der Zuckergehalt im Traubensaft über den SGLT1 tatsächlich die Absorption von Anthocyan-Glukosiden behindert oder gar hemmt ist ebenfalls nicht gesichert. Nach Inkubation der Mukosa mit Glukose konnte z. B. eine schnelle Zunahme des SGLT1 Proteins beobachtet werden (Ferraris 2001). Dadurch könnten sowohl Zucker/Glukose als auch Anthocyan-Glukoside gleichzeitig und ohne sich gegenseitig zu behindern absorbiert werden.

Jedoch sind die Studienergebnisse hinsichtlich dieser Problematik weiterhin kontrovers. Der gleichzeitige Verzehr von Holundbeerkonzentrat und Saccharose führte in der Humanstudie von Mülleider et al. (2002) zu einer verzögerten und geringeren Anthocyanexkretion (6-Std. Urin) im Vergleich zum saccharosefreien Konzentrat. In einer weiteren Studie von Nielsen und Kollegen (Nielsen et al. 2003) konnten diese hinsichtlich der Bioverfügbarkeit von Anthocyanen aus schwarzem Johannisbeersaft und dem

gleichzeitigen Verzehr von Reiskuchen keine Unterschiede feststellen (bis 4 Std. nach Verzehr). Jedoch war die Anthocyanabsorption mit Reiskuchen verzögert ($t_{\max}$ von 90 Min. mit Reiskuchen vs. 45 Min. ohne). Die Autoren vermuten dass die verzögerte Absorption mit Reiskuchen auf eine verzögerte Magenentleerung zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse von zwei aktuellen Studien von Neilson et al. (2009 [Mensch] & 2010 [Tiermodell/Ratte]) weisen jedoch darauf hin, dass Saccharose die Pharmakokinetik von Epicatechin/Catechin sowie die Bildung von Phase II Metaboliten modulieren kann, was letztendlich zu höheren Plasmakonzentrationen an Gesamt-Flavanolen (Summe aus Epicatechin/Catechin und Metaboliten) führt. In den Studien wurden kakaohaltiges Konfekt und entsprechende Getränke mit normalem Zuckergehalt (Referenz), hohem Zuckergehalt und Milchprotein verwendet.

Um mehr Klarheit hinsichtlich des Einflusses der Lebensmittelmatrix (Zuckergehalt, Alkohol) auf die Absorption und Bioverfügbarkeit von Anthocyanen/Polyphenolen zu erhalten, sind weitere Humanstudien gefordert.

5.1.3 Anthocyanmetaboliten

Bei den in Humanstudie I im Urin sowohl nach RTSK als auch nach Rotwein detektierten Metaboliten handelt es sich höchstwahrscheinlich um Anthocyankonjugate (Glukuronide und/oder Sulfate). Obwohl die detektierten Substanzen nicht weiter identifiziert wurden, spricht für ihre "Konjugat-Identität", dass diese ein anthocyanähnliches Absorptionsspektrum zeigten und bei einer Wellenlänge > 500 nm detektiert werden konnten. Dies sind charakteristische Eigenschaften für Anthocyane bzw. Anthocyankonjugate (Felgines et al. 2003; Kay et al. 2003; Mazza & Kay 2008; Mazza & Miniati 1993). Auch in anderen Humanstudien wurden Anthocyankonjugate, meist Monoglukuronide und Monosulfate, detektiert. So konnten z. B. nach Zufuhr von Erdbeeren (Felgines et al. 2003), Holunderbeerenextrakt (Wu et al. 2002), Aroniabeerenextrakt (Kay et al. 2003) und Preiselbeeren (Lehtonen et al. 2010) verschiedene Glukuronid- und Sulfat-Konjugate der mit den Früchten/Extrakten verabreichten Anthocyane im Urin der Probanden identifiziert werden.

Interessant sind auch die Befunde hinsichtlich Peo-3-Gluk und Cya-3-Gluk. Die relative Urinexkretion von Peo-3-Gluk war nach RTSK hoch (0,29 %) und nach Rotwein am höchsten (0,84 %), während diese für Cya-3-Gluk am geringsten war (0,09 % nach RTSK und 0,06 % nach Rotwein). Anzunehmen ist deshalb, dass Cya-3-Gluk via Catechol-O-Methyltransferase (COMT) zu Peo-3-Gluk methyliert wird. Dieser Stoffwechselweg für

Cyanidin-Glukoside wurde auch von anderen vermutet bzw. beschrieben (Kay et al. 2004; Wu et al. 2002).

Die Erfassung, Identifizierung und Quantifizierung von *in vivo* Metaboliten in biologischen Proben wie Blutplasma, Urin und Faeces, gewinnt mehr und mehr an Bedeutung. Manach und Kollegen haben bereits 2005 darauf hingewiesen, dass die "offensichtlich" geringe Bioverfügbarkeit der Anthocyane vielleicht doch nicht so gering ist, wie vermutet wird. Die Autoren begründen ihre Aussage damit, dass wichtige *in vivo* Metaboliten bisher einfach ignoriert bzw. nicht erkannt wurden und dass die verwendeten Analysenmethoden für die Erfassung von Anthocyanmetaboliten nicht optimal sind (Manach et al. 2005).

Felgines et al. konnten z. B. in ihrer Erdbeerstudie beobachten, dass sich sämtliche Pelargonidin-Metaboliten signifikant abgebaut haben bzw. komplett verschwunden waren (mit der Ausnahme von Pelargonidin-3-Glukosid), wenn Urinproben nicht sofort analysiert sondern zuerst tiefgefroren gelagert wurden (Felgines et al. 2003). Die Autoren vermuten, dass sowohl der Gefrier- (Bindung von Metaboliten an ein beim frieren gebildetes Präzipitat) als auch der Auftauprozess (Abbau von labilen Metaboliten) dafür verantwortlich sind. Auch in Humanstudie I wurde das Probenmaterial bei -80°C bis zur HPLC-Analyse zwischengelagert. Ein signifikanter Abbau von ursprünglich in den "frischen" Urin- und Plasmaproben enthaltenen Metaboliten ist deshalb auch hier denkbar. Dass wichtige *in vivo* Metaboliten "übersehen" bzw. nicht erfasst werden ist aufgrund der bereits beschriebenen anthocyan-spezifischen pH-abhängigen Strukturen (rotes Flavylumkation bei pH 1-3, farblose Carbinolpseudobase bei pH $\geq$ 4) gut möglich. In den meisten Studien werden die Anthocyane mittels UV-VIS Detektion erfasst, nach vorheriger Überführung in das rote Flavylum-Kation durch ansäuern des Probenmaterials. Es ist aber durchaus möglich, dass nicht alle Formen in das Flavylum-Kation überführt werden können, da diese bereits mit anderen Plasma- oder Urinkomponenten reagiert haben bzw. an diese gebunden sind (Crozier et al. 2009; Manach et al. 2005; Mazza & Kay 2008).

Sowohl Manach und Kollegen als auch Mazza und Kay weisen mehrfach auf die potentielle biologische Bedeutung der durch die intestinale Mikroflora gebildeten Metaboliten/Abbauprodukte hin (Manach et al. 2005; Mazza und Kay 2008). In verschiedenen *in vitro* Studien mit simulierter fäkaler Fermentation (Aura et al. 2005; Fleschhut et al. 2006; Forester et al. 2008; Keppler et al. 2005; Seeram et al. 2001) sowie in einer kürzlich publizierten Humanstudie (Nurmi et al. 2009) konnte gezeigt werden,

dass Anthocyane zu zahlreichen Phenolsäuren (wie z. B. Protocatechu-, Vanillin-, Homovanillin-, *p*-Hydroxybenzoe-, 3,4-Dihydroxyphenylpropion-, *m*-Hydroxyphenylpropionsäure) ab- und umgebaut werden können. Vitaglione und Kollegen haben z. B. Protocatechusäure als den wichtigsten Metaboliten von Cyanidin-Glukosiden im Serum von gesunden Probanden identifiziert. Da Protocatechusäure auch ein bedeutendes antioxidatives Potential besitzt (Seeram et al. 2001), kann dieser Metabolit durchaus zu den biologischen Wirkungen, die den Anthocyanen zugeschrieben werden, beitragen (Vitaglione et al. 2007).

Es wird deutlich, dass den Anthocyanmetaboliten eine Schlüsselfunktion zukommt, sowohl hinsichtlich einer “realistischen“ Einschätzung der Anthocyanbioverfügbarkeit als auch hinsichtlich deren Bioaktivität. Auch Williamson und Kollegen haben bereits 2005 auf die Schlüsselfunktion von Metaboliten im Hinblick auf potentielle biologische Wirkungen applizierter Polyphenolen hingewiesen (Williamson et al. 2005).

Das nicht erfassen der Anthocyanmetaboliten nach Zufuhr von RTSK und Rotwein stellt aus heutiger Sicht eine signifikante Limitierung von Humanstudie I dar, die die wissenschaftliche Aussagekraft der Studie leider einschränkt. Die Identifizierung und Quantifizierung von Metaboliten in Humanstudie I hätte mit Sicherheit ein detaillierteres Bild über die “tatsächliche“ Bioverfügbarkeit der fünf Traubenanthocyane sowie über mögliche Effekte von Alkohol (Rotwein) oder Glukose (RTSK) auf die intestinale Absorption und die für den Metabolismus der Anthocyane verantwortlichen Enzyme (u. a. COMT, SULT und UDP-GT) ergeben.

In allen zukünftigen Studien, die die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen untersuchen, sollten deshalb die *in vivo* Metaboliten im Fokus stehen. Damit aber hinsichtlich der Identifikation von Anthocyanmetaboliten ein wirklicher Fortschritt erzielt werden kann, ist der Einsatz von markierten Anthocyanmolekülen notwendig (Crozier et al. 2009; Manach et al. 2005; Mazza und Kay 2008). Stabilisotopen-Verdünnungsmethoden wurden z. B. bei der Identifizierung und Quantifizierung von Folatderivaten und deren Kataboliten erfolgreich eingesetzt (Mönch et al. 2010).

5.2 Antioxidative Kapazität (Humanstudie III und II)

5.2.1 Antioxidative Kapazität im Plasma

In Humanstudie III war nach Zufuhr des Antiox-Getränks die Gesamtphenolkonzentration im Plasma der Probanden signifikant um das 9,5-fache, im Vergleich zur Kontrolle, erhöht

(AUC über der Nüchternkonzentration). Im FRAP- und PCL-Test konnte ebenfalls ein Trend zu erhöhten AUC-Werten nach Aufnahme des Antiox-Getränks beobachtet werden, jedoch waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die PCL-, FRAP- und Gesamtphenol-Werte im Nüchternplasma der Probanden lagen alle in einem Konzentrationsbereich, wie er auch von anderen Autoren berichtet wird: PCL: eigene Studie: 98,3-120,7 $\mu\text{mol TE/l}$ (s. Anhang, Tab. A7), Literaturdaten: 162-275 $\mu\text{mol TE/l}$ (Lupp et al. 2004); FRAP: eigene Studie: 576,2-629,5 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{l}$ (s. Anhang, Tab. A8), Literaturdaten: 510-1634 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{l}$ (Benzie & Strain 1996; Bub et al. 2003; Torabian et al. 2009; Wachtel-Galor et al. 2004); Gesamtphenole: eigene Studie: 10,3-13,1 mg GAE/l (s. Anhang, Tab. A9), Literaturdaten: 6,84- ~9,9 mg GAE/l (Duthie et al. 1998 & 2006).

In zahlreichen Studien wird über eine erhöhte antioxidative Kapazität im Plasma (AKP) von Probanden nach Zufuhr von polyphenol- bzw. antioxidantienreichen Früchten, Getränken und anderen Lebensmitteln berichtet: so z. B. nach Orangensaft (Ko et al. 2005 [Dichlorofluoreszin/DCFH]), Cranberry-Saft (Pedersen et al. 2000 [FRAP und Gesamtphenole]), naturtrüber Apfelsaft (Bitsch et al. 2001 [TRAP]), Tee (Langley-Evans 2000 [FRAP]; Leenen et al. 2000 [FRAP]; Kimura et al. 2002 [FRAP]), Rotwein (Fernandez-Pachon et al. 2005 [ORAC und FRAP]; Cartron et al. 2003 [Chemilumineszens]; Arendt et al. 2005 [ABTS/TEAC]), alkoholfreiem Rotwein (Alberti-Fidanza et al. 2003 [ORAC]; Serafini et al. 1998 [FRAP und Gesamtphenole]; Cartron et al. 2003 [Chemilumineszens]; Arendt et al. 2005 [ABTS/TEAC]), Whiskey (Duthie et al. 1998 [FRAP und Gesamtphenole]), Spinat und Erdbeeren (Cao et al. 1998 [ORAC und FRAP]), Weizenkleie (Price et al. 2008 [FRAP und Gesamtphenole]), Blaubeeren (Kay und Holub 2002 [ORAC]; Prior et al. 2007 [ORAC]; Serafini et al. 2009 [FRAP und TRAP]), Granatapfelextrakt (Mertens-Talcott et al. 2006 [ORAC]), sowie Acai-Pulpe (Mertens-Talcott et al. 2008 [ORAC]).

Zu ergänzen wäre noch, dass Ko und Kollegen nicht nur nach Zufuhr von Orangensaft, sondern auch nach Trauben-, Pfirsich-, Pflaumen-, Kiwi- und Melonensaft (jeweils 150 ml) einen signifikanten Anstieg der AKP beobachten konnten (Ko et al. 2005).

Die beschriebenen Effekte hinsichtlich der AKP beziehen sich nur auf Kurzzeitstudien bzw. Einmalgaben der entsprechenden Studiengetränke/-mahlzeiten.

Ähnlich wie in Humanstudie III, nach Konsum von 400 ml des ascorbinsäurehaltigen Antiox-Getränks, konnten auch Pedersen und Kollegen (Pedersen et al. 2000) nach Zufuhr

von 500 ml Cranberry-Saft einen signifikanten Anstieg der Ascorbinsäurekonzentration im Plasma von neun gesunden Frauen messen. Dieser Anstieg korrelierte positiv mit einem praktisch zeitgleich verlaufenden Anstieg der Plasma FRAP-Werte. Interessanterweise konnte nach Zufuhr von Blaubeersaft (enthielt keine messbare Ascorbinsäure) kein Effekt auf die AKP beobachtet werden, trotz 2,1 bzw. 2,9fach höherer FRAP- und Gesamtphenol-Werte pro 500 ml Saft. Die Autoren kamen deshalb zu dem Schluss, dass die nach Cranberry-Saft signifikant erhöhte AKP größtenteils auf die ebenfalls erhöhte Plasma-Ascorbinsäure zurückzuführen ist. Auch die Plasma-Gesamtphenole (‘‘Folin-Ciocalteu Methode‘‘) waren nur nach Cranberry-Saft signifikant erhöht. Beide Studien, Pedersen et al. 2000 und Humanstudie III, sind hinsichtlich der über die Studiengetränke zugeführten Ascorbinsäuremengen durchaus vergleichbar: ~135 mg mit dem Cranberry-Saft bei Pedersen und Kollegen bzw. ~98 mg mit dem Antiox-Getränk in Humanstudie III. Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen erhöhter Plasma-Ascorbinsäure und erhöhter AKP kann deshalb auch für Humanstudie III angenommen werden.

Ascorbinsäure ist nicht nur ein effizienter ‘‘Fänger‘‘ einer Vielzahl von oxidierenden Substanzen in Plasma und Zellen (Sies et al. 1992) sondern leistet auch einen signifikanten Beitrag bei der Neutralisierung von Phenoxylradikalen, die bei der Reaktion von Polyphenolen mit Radikalen entstehen (Clifford 2004).

Für die beobachteten Effekte hinsichtlich AKP in Humanstudie III, nach Genuss des Antiox-Getränks, ist aber nicht nur die aus dem Antiox-Getränk stammende Ascorbinsäure verantwortlich, sondern mit Sicherheit auch darin enthaltene und bioverfügbare Polyphenole und deren *in vivo* Metaboliten.

Leider liegt keine detaillierte Analyse des Polyphenolprofils des Antiox-Getränks vor. Jedoch kann aufgrund der Zusammensetzung des Getränkepulvers (Mischung aus Blaubeeren-, Holunderbeeren- und schwarzem Johannisbeerkonzentrat, sowie Extrakten aus Hagebutten, Hibiskus, Brombeeren, Schwarzbeerblättern und schwarzer Karotte) ein signifikanter Anthocyananteil angenommen werden (überwiegend Cyanidin- und Delphinidin-Glykoside). Aufgrund der relativ geringen Bioverfügbarkeit von Anthocyanen ist deren potentieller Beitrag, als genuine Substanzen, zur AKP eher gering, wenn nicht sogar vernachlässigbar. Wie bereits erwähnt wurde, konnte Vitaglione und Kollegen (Vitaglione et al. 2007) in ihrer Studie mit 6 gesunden Probanden nachweisen, dass Protocatechusäure der Hauptmetabolit von mit Blutorangensaft zugeführten Cyanidin-Glukosiden war (6 Std. nach Zufuhr wurden ca. 44 % der applizierten Cyandin-Glukoside als Protocatechusäure im Plasma der Probanden wiedergefunden). Antioxidativ wirksame

Metaboliten wie Protocatechusäure könnten das in verschiedenen Humanstudien beobachtete “Phänomen“ erklären, dass die erhöhte AKP nicht mit den geringen bzw. vernachlässigbaren Konzentrationen an Anthocyanen bzw. daraus gebildeten Glukuronid- und Sulfat-Konjugaten korrelierte. Auch andere Autoren haben berichtet, dass Polyphenolmetaboliten durchaus einen signifikanten Anteil an der antioxidativen Kapazität *in vivo* haben können (Harada et al. 1999; Moon et al. 2001; Natsume et al. 2004).

Aber nicht nur Anthocyane und/oder deren Metaboliten sondern auch andere mit dem Antiox-Getränk zugeführte Flavonoide und Phenolsäuren können zur AKP der Probanden beitragen. Cao und Kollegen (Cao et al. 1998) konnten in ihrer Studie mit acht älteren Frauen ($66,9 \pm 0,6$ Jahre) demonstrieren, dass der Anstieg der AK im Serum nach Verzehr von Erdbeeren und Spinat genauso stark war, wie nach Zufuhr einer Megadosis Ascorbinsäure (1250 mg). Die Autoren schlossen daraus, dass phenolische Verbindungen, die aus den aufgenommenen Testmahlzeiten absorbiert wurden, dafür verantwortlich sein müssen. Die verabreichten Testmahlzeiten sowie Ascorbinsäure wurden äquimolar hinsichtlich ihrer antioxidativen Kapazität dosiert (3,7 mmol TE im ORAC-Test). Auch Pedersen et al. weisen in ihrer Diskussion darauf hin, dass die erhöhten Plasma FRAP-Werte nach Zufuhr des Cranberry-Safts vermutlich sowohl auf Ascorbinsäure als auch auf im Plasma zirkulierende phenolische Verbindungen basieren (Pedersen et al. 2000).

Serafini und Kollegen konnten sowohl nach Zufuhr von 113 ml alkoholfreiem Rotwein (Serafini et al. 1998) als auch nach Verzehr von 200 g Blaubeeren (Serafini et al. 2009) Ascorbinsäure als verantwortliche Substanz für den beobachteten Anstieg der AKP ausschließen (die Plasma-Ascorbinsäurespiegel blieben praktisch unverändert).

Mertens-Talcott und Kollegen (2006 & 2008) sowie Price et al. 2008 haben geschlussfolgert, dass die erhöhte AKP der Probanden nach Zufuhr von Granatapfelextrakt und Acai-Pulpe sowie Weizenkleie auf die absorbierten phenolischen Verbindungen und/oder deren Metaboliten zurückzuführen ist.

5.2.2 Antioxidative Kapazität im Urin

In Humanstudie II und III konnte nach Zufuhr des naturtrüben WTWAS bzw. des Antiox-Getränks eine signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Exkretion von antioxidativ wirksamen Substanzen im 24 Std. Urin der Probanden gemessen werden: in Humanstudie II waren dies +44% im PCL-, +29 % im FRAP- und +36 % im Gesamtphenol-Test; in Humanstudie III waren dies +43 % im PCL-, +29 % im FRAP- und +33 % im Gesamtphenol-Test (jeweils im Vergleich zur Kontrolltestung).

Über ähnliche Befunde wird auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet: Price et al. (2008) konnten eine signifikant erhöhte Exkretion an Antioxidantien, erfasst mittels FRAP- und Gesamtphenol-Test, im Urin (gesammelt über vier Std.) von 18 gesunden Probanden nach Verzehr von Weizenkleie messen. In den Studien von Roura und Mitarbeitern (Roura et al. 2006 & 2007) konnte gezeigt werden, dass die antioxidative Kapazität (als TEAC) sowie der Gesamtphenolgehalt (bestimmt mittels einer modifizierten Folin-Ciocalteu Methode) im Urin von 21 bzw. 36 gesunden Probanden, nach Zufuhr eines polyphenolreichen Kakaotrinks, signifikant erhöht waren. Nach Zufuhr von Rotwein und einem 12 Jahre alten Whiskey (jeweils 100 ml) beobachtete Duthie et al. (1998) bei neun gesunden männlichen Probanden eine signifikant erhöhte Gesamtphenolkonzentration im Urin vier Std. postapplikativ, im Vergleich zu einer Kontrolltestung (Rotwein und gereifter Whiskey wurden hier durch einen praktisch polyphenolfreien frisch hergestellten Schnaps ersetzt). Auch Cao und Kollegen berichten über gleichlautende Ergebnisse: im Vergleich zu einer Kontrolltestung war bei acht älteren Frauen nach Verzehr von Erdbeeren, Spinat und Vitamin C die Konzentration an Antioxidantien im 24 Std. Urin, erfasst mittels ORAC-Test, signifikant erhöht (Cao et al. 1998). In einer Übersichtsarbeit von Tepel et al. (2002) wird darüber berichtet, dass bei einer akuten Verschlechterung der Nierenfunktion durch Medikamente, Kontrastmittel oder bei Ischämie-/Reperfusionsschäden, prophylaktisch applizierte Antioxidantien eine weitere Schädigung verhindern. Somit könnte eine erhöhte Antioxidantienkonzentration im Urin durchaus von therapeutischer Relevanz sein, hinsichtlich eines Schutzes von funktionellem Nierengewebe.

Die Bedeutung der Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Plasma und Urin sowie deren Interpretation, insbesondere im Hinblick auf physiologische Effekte/Vorgänge, wird abschließend in "Resümee und Ausblick" kommentiert.

5.3 Ascorbinsäure (Humanstudie II und III)

Die Ascorbinsäureexkretion im 24 Std. Urin der Probanden war in beiden Humanstudien nach Zufuhr der jeweiligen Studiengetränke signifikant, im Vergleich zur Kontrolltestung erhöht (~3fach nach WTWAS in Humanstudie II und ~4,3fach nach Antiox-Getränk in Humanstudie III). In Humanstudie II wurden die potentiellen Effekte der Ascorbinsäure auf die antioxidative Kapazität sowohl in den Studiensäften (*Studie-Appfelsäfte*) als auch im Urin der Probanden (*Studie-Urin*) "neutralisiert" (Korrektur der PCL-, FRAP- und Gesamtphenolwerte um den jeweiligen Ascorbinsäureanteil). Ascorbinsäure (200 mg/l;

Thielen et al. 2006) wurde dem Saft als Oxidationsschutz direkt nach dem Pressen der Äpfel zugesetzt und war somit kein “natives“ Antioxidans. Der Fokus in Humanstudie II war, wie bereits erwähnt, auf die phenolischen Verbindungen gerichtet. Anmerkung: die unkorrigierte antioxidative Kapazität (d.h. mit Ascorbin- und Harnsäure) der 24-Std. Urine ist in Anhang (A.2.2.2) aufgeführt.

In Humanstudie III hingegen war Ascorbinsäure ein signifikanter oder besser “nativer“ Bestandteil des Antiox-Getränks und die “Gesamtkomposition“, polyphenolreiche Fruchtextrakte und zugesetzte Ascorbinsäure, sollten hier untersucht werden. Die erhöhten PCL- und FRAP-Werte im Urin nach Antiox-Getränk sind sicherlich zu einem Großteil auf den um ~37 mg höheren Ascorbinsäuregehalt des 24 Std. Urins zurückzuführen. Die Gesamtphenol-Werte wurden wie in Humanstudie II, ascorbinsäurekorrigiert. Anmerkung: die unkorrigierten Gesamtphenol Werte (d.h. mit Ascorbin- und Harnsäure) sind im Anhang (A.2.3.6) aufgeführt.

5.4 Harnsäure (Humanstudie II und III)

Praktisch alle der gängigen antioxidativen Testsysteme erfassen nicht nur exogen zugeführte Antioxidantien, wie z. B. Polyphenole und Ascorbinsäure, sondern auch endogene Substanzen mit antioxidativer Wirkung, wie z. B. Harnsäure, Albumin und Bilirubin. All diese Substanzen sind an der individuellen antioxidativen Kapazität des Plasmas (AKP) beteiligt. Harnsäure ist hierbei aus verschiedenen Gründen ein “besonderes“ endogenes Antioxidans:

- quantitativ bedeutend in Plasma und Urin
- Schlüsselsubstanz für die Entstehung von Gichtkrankungen
- fruktosevermittelter Harnsäureanstieg nach Zufuhr von polyphenolreichen Studiengetränken/-mahlzeiten (Bedeutung: die beobachtete erhöhte AKP nach Zufuhr dieser Getränke/Mahlzeiten war nicht auf die absorbierten Polyphenole/Antioxidantien bzw. deren Metaboliten zurückzuführen, sondern beruhte auf den erhöhten Harnsäurekonzentrationen)

Ein statistisch signifikanter Anstieg von Harnsäure im Plasma konnte z. B. nach Zufuhr von Kaffee (Natella et al. 2002) und Rotwein (Arendt et al. 2005) gemessen werden. In anderen Studien wurde eine starke Korrelation zwischen FRAP-Werten und Harnsäurekonzentrationen im Plasma von Probanden nach Aufnahme von Rotwein

(Fernandez-Pachon et al. 2005) bzw. nach dem Verzehr von Äpfeln (Lotito & Frei 2004) beobachtet. Lotito und Frei sind deshalb zu dem Schluss gekommen, dass die erhöhte AKP nach Zufuhr von Lebensmitteln und Getränken, die neben Polyphenolen auch Fruktose oder fruktosehaltige Zucker enthalten, nicht auf die absorbierten Polyphenole und/oder deren *in vivo* Metaboliten beruht, sondern höchstwahrscheinlich auf einen durch Fruktose verursachten Harnsäureanstieg zurückzuführen ist (Lotito & Frei 2004 & 2006).

Jedoch sind die publizierten Studienergebnisse hinsichtlich Harnsäure durchaus kontrovers. Nach Zufuhr von alkoholfreiem Rot- und Weißwein (Serafini et al. 1998), einem Polyphenolextrakt aus Tee (Kimura et al. 2002), Bier oder alkoholfreiem Bier (Ghiselli et al. 2000) sowie procyanidinreicher Schokolade (Rein et al. 2000), konnten keine Effekte auf die Harnsäurekonzentrationen im Plasma von Probanden beobachtet werden.

Aber auch aktuellere Humanstudien berichten ähnliches: die mit den Früchten applizierte Fruktosemenge in der Humanstudie von Prior und Kollegen (Prior et al. 2007) war um 65-89% geringer als die mit den Äpfeln zugeführte Fruktosemenge in der Studie von Lotito und Frei (Lotito & Frei 2004). Prior et al. (2007) schlussfolgern deshalb aus ihren Ergebnissen, dass die mit den Studienmahlzeiten applizierte Fruktose nur einen minimalen Einfluss auf die Harnsäurebiosynthese hat und deshalb nicht für den signifikanten postprandialen Anstieg der antioxidativen Kapazität im Plasma der Probanden verantwortlich sein kann. Mertens-Talcott et al. (2008) und Serafini et al. (2009) konnten Harnsäure als Ursache für den beobachteten Anstieg der antioxidativen Plasmakapazität, nach Zufuhr von Acai-Saft und Acai-Pulpe bzw. Blaubeeren, ebenfalls ausschließen.

Roura und Kollegen (Roura et al. 2007) berichten über ähnliche Befunde hinsichtlich antioxidativer Kapazität und Harnsäure im Urin: das konsumierte Kakaogetränk hat die Harnsäuremengen im Urin der 21 gesunden Probanden nicht erhöht (im Vergleich zur Kontrolltestung). Die Autoren schlussfolgern aus ihren Studienergebnissen deshalb, dass die nach Konsum des Kakaogetränks signifikant erhöhte antioxidative Kapazität im Urin der Probanden nicht auf einen Anstieg an Harnsäure zurückzuführen ist, sondern höchstwahrscheinlich auf die im Urin ausgeschiedenen Metaboliten der zugeführten Kakaoflavonoide beruht.

Eine erhöhte Harnsäurekonzentration in Plasma und Urin, als Indikator für eine gesteigerte Harnsäurebiosynthese, verursacht durch die applizierten Studiengetränke bzw. darin enthaltenen Fruktose, konnte weder nach Zufuhr von Apfelsaft (Humanstudie II) noch nach Antiox-Getränk (Humanstudie III), beobachtet werden.

Harnsäure als Ursache für die erhöhte antioxidative Kapazität in Plasma und Urin nach Zufuhr der beiden Studiengetränke, WTWAS und Antiox-Getränk, kann somit ausgeschlossen werden. Außerdem wurden die PCL-, FRAP- und Gesamtphenol-Werte in Humanstudie II (Urin) nicht nur ascorbinsäure-, sondern auch um harnsäurekorrigiert. In Humanstudie III wurden die Gesamtphenol-Werte im Urin ebenfalls ascorbinsäure- und harnsäurekorrigiert. Obwohl der Gesamtphenol-Test nach Folin-Ciocalteu, wie bereits in der Literaturübersicht erwähnt wurde, ein klassischer ET-Test ist, hat er doch basierend auf seiner Anwendung und Kalibrierung (normalerweise mit Gallussäure oder Catechin) eine Art “Sonderstellung“ unter den antioxidativen Tests. Durch Korrektur der Werte um Ascorbinsäure und Harnsäure sollten die Gesamtphenol-Werte der Bezeichnung “Gesamtphenole“ gerechter werden.

Weiterhin betrug die mit dem sortenreinen Apfelsaft in Humanstudie II aufgenommene Fruktosemenge lediglich 34,2 g pro Proband, während in der “Apfel-Studie“ von Lotito und Frei (Lotito & Frei 2004) jeder Proband 63,9 g Fruktose via den Studienäpfeln (5 Red Delicious Äpfel) konsumierte. Die deutlich geringere Fruktosemenge (ca. 47 % im Vergleich zu Lotito und Frei) sowie die unterschiedliche Altersstruktur der Probandenkollektive könnten für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein. Die Probanden in Humanstudie II und III waren im Durchschnitt mehr 10 Jahre jünger als in der Studie von Lotito und Frei (25 bzw. 23 Jahre in Humanstudie II und III vs. 36 Jahre bei Lotito & Frei).

Briviba und Kollegen konnten eine Stunde nach Verzehr von konventionell angebauten Äpfeln ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Harnsäure im Plasma der Probanden messen (Briviba et al. 2007). Die von den Probanden verzehrte Menge an Äpfel war jedoch relativ groß (1 kg).

Die Harnsäurekonzentrationen in Plasma und 24 Std. Urin lagen sowohl in Humanstudie II als auch in Humanstudie III im Normbereich (Plasma: 3,24 - 3,93 mg/dl (s. Anhang, A.2.3.4), Normbereich: 2,4 - 7,0 mg/dl [Goetz & Rabast 1999]; Urin: 0,305 - 0,480 g/24 Std. (s. Anhang, Tab. A5 und A16), Normbereich: 0,4 - 0,7 g/24 Std. [Löffler et al. 2007]) und zeigten keine signifikanten Schwankungen.

Um diese komplexe und auch kontroverse “Beziehung“ zwischen mit der Nahrung bzw. Studienmahlzeiten/-getränken zugeführten Fruktose und deren Metabolismus zu Harnsäure detailliert zu untersuchen, wären Humanstudien mit genau definierten Altersklassen und Fruktosedosierungen äußerst hilfreich. Es könnte damit geprüft werden, welchen Einfluss

die Variablen “Alter“ und “Dosierung“ oder die Kombination aus Beiden auf den Metabolismus von oral zugeführte Fruktose zu Harnsäure hat.

Über den Fruktosegehalt in dem in Humanstudie III applizierten Antiox-Getränk liegen leider keine Daten vor. Die Harnsäurespiegel in Plasma und Urin wurden jedoch, wie bereits beschrieben, an beiden Versuchstagen präzise mittels HPLC kontrolliert.

Auch hinsichtlich anderer endogener Antioxidantien sind die publizierten Studienergebnisse eher kontrovers: Während Arendt und Kollegen (Arendt et al. 2005) eine signifikante Veränderung der Albumin- und Bilirubinkonzentrationen nach Konsum von Rotwein und alkoholfreiem Rotwein beobachten konnten, haben Serafini und Kollegen (Serafini et al. 1998) keinerlei Effekte auf SH-gruppenenthaltende Verbindungen, nach Zufuhr von alkoholfreiem Rot- und Weißwein, messen können. Glutathion, ein weiteres endogenes Antioxidans, blieb nach Zufuhr von Bier und alkoholfreiem Bier ebenfalls unverändert (Ghiselli et al. 2000).

5.5 Malondialdehyd (Humanstudie III)

Im Vergleich zur Kontrolltestung war Malondialdehyd (MDA) nach Zufuhr des Antiox-Getränks (Humanstudie III) im 24 Std. Urin um 26% erniedrigt ($p < 0,05$). MDA im Urin wird, wie bereits in der Literaturübersicht erwähnt, häufig in Tier- und Humanstudien als ein nichtinvasiver Biomarker für die Bestimmung der Lipidperoxidation, verursacht durch oxidativen Stress, verwendet (Korchazhkina et al. 2003). Da die Bildung von MDA Konsequenzen für die Entstehung von Atherosklerose und Krebs (via der Bildung von mutagenen DNA-Addukten) hat, kann eine verminderte MDA-Konzentration im Organismus durchaus einen positiven Gesundheitseffekt haben (Gorelik et al. 2005, 2007 & 2008; Marnett 1999).

Weinbrenner et al. (2008) berichten über ähnliche Befunde. In deren Humanstudie mit 12 gesunden Männern (doppelblind/randomisiert/cross-over) erhielten diese zu einer antioxidantienarmen Studiendiät, vier tagelang Olivenöle (25 ml/Tag) mit unterschiedlichen Polyphenolgehalten (niedrig [10 mg/kg], moderat [133 mg/kg] und hoch [486 mg/kg]). Der Konsum der Olivenöle führte dosisabhängig (linearer Trend) zu verminderten MDA-Konzentrationen im 24 Std. Urin der Probanden (im Vergleich zum Basiswert vor der Intervention). Das Olivenöl mit dem höchsten Polyphenolgehalt führte zu einer ca. 60%igen MDA-Reduktion im Urin. Die Autoren konnten außerdem eine dosisabhängige Konzentrationszunahme von Olivenpolyphenolen (bestimmt wurden

Tyrosol, Hydroxytyrosol und 3-O-Methylhydroxytyrosol [biologischer Metabolit von Hydroxytyrosol]) in Plasma und Urin der Probanden nach Zufuhr der drei Olivenöle beobachten. Weinbrenner und Mitarbeiter schlussfolgern deshalb, dass die im Olivenöl enthaltenen Polyphenole den oxidativen/antioxidativen Status bei gesunden Probanden, die eine antioxidantienarme Diät konsumieren, modulieren können (*in vivo* Wirkung).

Eine verminderte MDA-Konzentration im Organismus kann aber auch andere Ursachen haben: Gorelik und Kollegen haben im *FASEB Journal* eine sehr interessante Interpretation ihrer Studienergebnisse publiziert (Gorelik et al. 2008). Die Autoren konnten in der von ihnen durchgeführten Humanstudie, mit zehn gesunden Probanden, eine signifikant erniedrigte MDA-Konzentration im Urin 6 Std. nach Verzehr von Truthahnschnitzel mit Rotwein im Vergleich zu einer Kontrolltestung (Rotwein war hier durch Trinkwasser ersetzt) nachweisen. Die Testmahlzeiten und Getränke wurden im randomisierten cross-over Design verabreicht. Die Autoren interpretieren ihre Studienergebnisse wie folgt: Die signifikant verminderte MDA-Akkumulation *in vivo* (bei den Probanden wurden zusätzlich auch Plasmaproben untersucht), die nach Zusatz von Rotwein und den darin enthaltenen Polyphenolen beobachtet wurde, kann einerseits in einer durch die Rotweinpolyphenole verhinderten Lipidperoxidation im sauren Milieu des Magens begründet liegen, andererseits kann die Absorption von MDA aber auch durch die Bildung von sog. Polyphenol-Aldehyd-Addukten verhindert bzw. behindert werden. Gorelik et al. vermuten hier einen ähnlichen Reaktionsmechanismus wie für Polyphenole und Methylglyoxal (Lo et al. 2006; Totlani et al. 2006).

Die Autoren gehen in der Interpretation ihrer Studienergebnisse sogar soweit, dass sie von einer völlig neuen Funktion von Rotweinpolyphenolen sprechen, nämlich der Verhinderung der Absorption des Lipotoxins MDA. Weiterhin postulieren sie, dass durch diese neue Betrachtungsweise – der Gastrointestinaltrakt als der eigentliche Wirkort für die mit der Nahrung zugeführten Polyphenole – das bisherige Verständnis über den *in vivo* Wirkmechanismus von Polyphenolen/Antioxidantien revidiert werden muss. Auch die potentiellen Mechanismen, die für das “French paradox“ sowie für die “gesunde“ Mediterrane und Japanische Ernährung verantwortlich sind, würden sich so besser erklären lassen. Die von Gorelik et al. gemachten Vermutungen bzw. Schlussfolgerungen sind hochinteressant und durchaus plausibel, jedoch bleiben die Autoren den analytischen Nachweis schuldig (es werden nur MDA Plasma- und Urin-Konzentrationen präsentiert).

In eine aktuellen Studie von Li et al., mit einem ähnlichen Studiendesign wie bei Gorelik et al. (2008), konnte durch die Verwendung einer antioxidantienreichen Gewürzmischung bei

Hamburgern, sowohl eine signifikante Reduktion von MDA in den Testhamburgern als auch in Plasma und Urin der Probanden gemessen werden (Li et al. 2010). Elf gesunde Probanden (fünf Frauen und sechs Männer) erhielten randomisiert zwei verschiedene Testhamburger, einen Kontrollburger ohne Gewürzmischung und einen "Gewürzburger" der eine spezifische antioxidantienreiche Mischung aus gemahlenen Gewürznelken, Zimt, Oregano, Rosmarin, Ingwer, schwarzem Pfeffer, Paprika und Knoblauchpulver enthielt (11,25 g/250 g Gesamtrohgewicht). Die MDA-Konzentrationen in den Gewürzburgern waren um 71%, im Vergleich zu den Kontrollburgern, in den Urinproben um 49% (6 Std. Urin), im Vergleich zur Kontrolltestung, erniedrigt. Auch im Plasma konnte eine Reduktion von MDA nach Verzehr der Gewürzburger, im Vergleich zu den Kontrollburgern, beobachtet werden. Die Autoren ziehen aus ihren Ergebnissen deshalb die folgenden Schlüsse: der Zusatz von antioxidantienreichen Gewürzen kann einerseits beim Kochen/Braten von Fleischprodukten eine ernährungsphysiologisch nützliche Funktion ausüben (signifikante Reduktion von Lipidperoxidations-Produkten im verzehrfertigen Fleischprodukt) und andererseits kann der Verzehr von Fleischprodukten, mit zugesetzten antioxidantienreichen Gewürzen, zu einer verminderten *in vivo* Bildung von Lipidperoxidations-Produkten führen. Diese MDA reduzierenden Effekte könnten in der Summe ein risikosenkendes Potential bzgl. der Entstehung von Atherosklerose und bestimmten Krebsarten besitzen (Li et al. 2010).

Da in Humanstudie III, parallel zu den verminderten MDA-Urinkonzentrationen nach Antiox-Getränk, auch erhöhte ($p < 0,05$) PCL-, FRAP, Gesamtphenol-, und Ascorbinsäurewerte im Urin, sowie erhöhte Plasma-AUCs für Gesamtphenole und Ascorbinsäure (Trends für PCL und FRAP) beobachtet wurden, lässt dies auf eine verminderte renale Synthese und/oder systemische MDA-Bildung schließen. Ähnlich wie bei Weinbrenner et al. (2004) beschrieben, könnten die aus dem Antiox-Getränk absorbierten Antioxidantien bzw. deren *in vivo* Metaboliten (erfasst mittels PCL-, FRAP- und Gesamtphenol-Test sowie Ascorbinsäure) den oxidativen/antioxidativen Status der gesunden Studienprobanden modulieren (potentiell reduzierende Wirkung auf den oxidativen Stress *in vivo*). Über die exakten Reaktionsmechanismen können leider keine weiteren Aussagen gemacht werden, da detaillierte Plasma- und Urinanalysen (individuelle Polyphenole und gebildete *in vivo* Metaboliten sowie potentielle Reaktionsprodukte zwischen Polyphenolen und Lipidperoxiden) in Humanstudie III nicht durchgeführt wurden. Aus heutiger Sicht wäre dies sicherlich sehr aufschlussreich gewesen.

5.6 Polyphenole und Metaboliten im Urin (Humanstudie II)

Im Urin der acht Probanden konnten nach Zufuhr von WTWAS zwei Phloretinmonoglukuronide sowie Phloretin identifiziert und quantifiziert werden. Die Wiederfindung im 24 Std. Urin lag mit 4,4 % (Summe aus Phloretin und den quantifizierbaren Monoglukuroniden) in einem Bereich, wie er auch von anderen Autoren berichtet wird (0,31-21 %; DuPont et al. 2002; Krogholm et al. 2004; Marks et al. 2009; Sembries et al. 2006). Sembries und Kollegen haben nach Zufuhr von Extraktionssäften aus Äpfeln mit 0,31 % über die niedrigste und DuPont et al. mit 21 % (nach Zufuhr von Cider) über die höchste Wiederfindung im 24 Std. Urin von gesunden Probanden berichtet. Marks et al. 2009 und Krogholm et al. 2004 fanden mit 5,0 und 5,5 % fast die gleichen Mengen im 24 Std. Urin der Probanden wie wir in Humanstudie II, nach Zufuhr des sortenreinen und naturtrüben Weißen-Trierer-Weinapfelsafts (WTWAS).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Humanstudie II nach WTWAS, konnten auch in der Studie von Marks et al. nach Genuss von 500 ml Cider, sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Ileostomie-Probanden, Phloretinmonoglukuronide als die wichtigsten Dihydrochalkonmetaboliten im Urin identifiziert werden. Im Gegensatz zu Humanstudie II, konnten Marks und Kollegen jedoch kein Phloretin im Urin der Probanden (gesunde und Ileostomie) nachweisen. Zwei Gründe könnten hierfür eine Rolle spielen: (1) Die mit dem WTWAS in Humanstudie II applizierte Dosis an Dihydrochalkonen war mit $\sim 170 \mu\text{mol}/700 \text{ ml}$ deutlich höher als bei Marks et al. mit $46 \mu\text{mol}/500 \text{ ml}$. Es ist deshalb durchaus möglich, dass Phloretin, entstanden aus den zugeführten Phloretinglukosiden nach Hydrolyse *in vivo*, nicht vollständig konjugiert und in geringen Mengen im Urin, zusammen mit den Glukuroniden, ausgeschieden wurde. Sowohl Marks et al. (2009) als auch Kahle et al. (2007) konnten in ihren Studien mit Ileostomie-Probanden nach Cider- bzw. Apfelsaft-Zufuhr Phloretin in der Ileostomieflüssigkeit der Probanden nachweisen. Bei Marks et al. war jedoch bereits im Cider Phloretin nachweisbar, mit $78 \text{ nmol}/500 \text{ ml}$, jedoch deutlich weniger als in der Ileostomieflüssigkeit ($2411 \text{ nmol}/24 \text{ Std.}$). Im Gegensatz zu Marks et al., konnten Kahle und Kollegen in ihrem Studienapfelsaft kein Phloretin nachweisen (auch im WTWAS war kein Phloretin nachweisbar).

(2) Es ist aber auch möglich, dass das Aglykon Phloretin aus Phloretinkonjugaten entstanden ist, ähnlich wie dies Felgines et al. (2003) für Pelargondin (Anthocyanidin) beschreiben. Nach Verzehr von 200 g Erdbeeren konnten die Autoren im Urin von 6 gesunden Probanden, neben Pelargonidinmetaboliten (hauptsächlich Glukuronide) und

Pelargonidin-3-Glukosid (Hauptanthocyan der Erdbeere,) auch kleine Mengen des Aglykons Pelargondin nachweisen. Da Anthocyanidine (Aglykone) in physiologischen pH Bereichen äußerst instabil sind, ist die Herkunft des “Urin-Pelargonidins“ aus dem Intestinaltrakt eher unwahrscheinlich. Felgines und Kollegen vermuten deshalb, dass sich das im Urin detektierte Pelargonidin wahrscheinlich erst im Urin, durch die Aktivität von β -Glukuronidase und Sulfatase, aus den entsprechenden Konjugaten gebildet hat. Das Vorkommen beider Enzyme im Nierengewebe und Urin wurde in der Literatur beschrieben (Borghoff et al. 1985; Grompe et al. 1992).

An dieser Stelle sollte noch erwähnt werden, dass in den Studien von DuPont et al. (2002), Krogholm et al. (2004) und Sembries et al. (2006), die Urinproben enzymatisch, mittels β -Glukuronidase und Sulfatase, behandelt wurden und das entstandene Aglykon Phloretin für die Berechnung der relativen Exkretion benutzt wurde.

Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass die geringen Mengen an Phloretin (0,31 mg) und Phloretinmonoglukuroniden (1,72 mg) im 24 Std. Urin der Probanden nach WTWAS-Zufuhr, für die erhöhte antioxidative Kapazität im Urin verantwortlich sind. In Humanstudie II wurde mit Sicherheit auch nur ein “Bruchteil“ der mit dem Urin ausgeschiedenen *in vivo* Metaboliten erfasst. Crozier und Kollegen weisen in ihrem Übersichtsartikel (*Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health*) darauf hin, dass aus jedem Phenol/Polyphenol unter Umständen bis zu 20 *in vivo* Metaboliten gebildet werden können, wie dies bereits für Quercetin-Glykoside nachgewiesen wurde (Crozier et al. 2009). Wenn sich unter den Metaboliten Substanzen wie Protocatechusäure, mit einem starken antioxidativen Potential befinden, können diese durchaus signifikant zur antioxidativen Kapazität, nicht nur im Plasma, sondern auch im Urin beitragen. Die Absolutmengen an gebildeten Metaboliten (entscheidend für deren potentielle Bioaktivität) können jedoch stark variieren und hängen sowohl vom individuellen genetischen Profil als auch von der individuellen intestinalen Mikroflora ab (Crozier et al. 2009).

5.7 Hippursäure (Humanstudie II und III)

5.7.1 Hippursäureausscheidung im Urin

In Humanstudie II und III konnte jeweils eine signifikant erhöhte Hippursäureausscheidung im 24 Std. Urin nach Zufuhr der jeweiligen Studiengetränke gemessen werden: ~487 mg/24 Std. nach WTWAS und ~172 mg/24 Std. nach Antiox-

Getränk, jeweils zur antioxidantienfreien Kontrolle (Trinkwasser). Hippursäure stellt somit in beiden Humanstudien den mengenmäßig wichtigsten “Metaboliten“ dar. Auch von anderen Autoren wird über eine signifikant erhöhte Hippursäureausscheidung im 24 Std. Urin, nach Zufuhr von polyphenolreichen Getränken und Früchten, berichtet. Clifford et al. (2000) beschreibt einen massiven Anstieg von Hippursäure im 24 Std. Urin von gesunden Probanden nach Zufuhr von schwarzem Tee. Nach Konsum von acht Tassen schwarzem Tee/Tag konnte eine um 1,5 mmol/24 Std. erhöhte Hippursäureausscheidung gemessen werden. In einer vergleichbaren Studie von Olthof und Mitarbeitern wurde eine um 1,9 mmol/24 Std. gesteigerte Hippursäureexkretion im Urin von 20 gesunden Probanden beobachtet, die ca. 4 g Schwarzteemasse/Tag und Person konsumierten (Olthof et al. 2003).

Mulder et al. haben in einer neueren Studie, publiziert im *American Journal of Clinical Nutrition*, den Einfluss von Grüntee- und Schwarzteekonsum auf die Hippursäureausscheidung bei 17 gesunden männlichen Probanden detailliert untersucht (Mulder et al. 2005). Die Autoren haben hierbei einen ganz interessanten Ansatz bzw. “Rechenmodell“ verwendet: die nach Teekonsum zusätzlich ausgeschiedene Menge an Hippursäure wurde ins Verhältnis zur zugeführten Menge an Polyphenolen, bestimmt mit der Folin-Ciocalteu Methode, gesetzt. Mulder und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen Grüntee- und Schwarzteekonsum und der korrespondierenden Menge an zusätzlich ausgeschiedener Hippursäure beobachten. Die Probanden bekamen die Studiengetränke, Grün- und Schwarztee (äquivalent zu 12 Tassen Tee/Tag), sowie Koffein als Kontrolle, im randomisierten cross-over Design zugeteilt. Die tägliche Polyphenoldosis in der zugeführten Schwarzteemasse betrug 9,08 mmol Gallic Acid Equivalents (GAE) und die korrespondierende Menge an zusätzlich ausgeschiedener Hippursäure im Urin betrug 1,86 mmol/24 Std. (entspricht ca. 20% der zugeführten Polyphenoldosis). Das gleiche Rechenmodell mit Grüntee ergab folgende Daten: die mit dem Tee zugeführte Polyphenoldosis von 13,3 mmol GAE/Tag resultierte in einer um 2,33 mmol/24 Std. erhöhten Hippursäureausscheidung (entspricht ca. 18% der zugeführten Polyphenoldosis).

In Humanstudie III konnte ein ähnlicher Effekt bezüglich der zugeführten Dosis an “Polyphenolen“, bestimmt mit der Folin-Ciocalteu Methode, und der gemessenen Zunahme an Hippursäure im 24 Std. Urin beobachtet werden: die Zufuhr von 400 ml Antiox-Getränk (4,59 mmol GAE) führte zu einer zusätzlichen Exkretion von 0,97 mmol Hippursäure/24 Std. (ca. 21% der zugeführten “Polyphenol“-Dosis). Die mit dem Antiox-

Getränk zugeführten Polyphenole, scheinen demnach in ähnlicher Weise und Ausmaß von der intestinalen Kolonmikroflora metabolisiert zu werden, wie die in Grün- und Schwarztee enthaltenen phenolischen Verbindungen.

Die nach Apfelsaftkonsum (Humanstudie II) berechnete Zunahme an Hippursäure im 24 Std. Urin, deutet auf eine deutlich höhere Biotransformation der im Apfelsaft enthaltenen Polyphenole hin: die mit der Folin-Ciocalteu Methode bestimmte Menge an Apfelsaftpolyphenolen betrug 6,51 mmol GAE, während die renale Hippursäureexkretion/24 Std. um 2,72 mmol im Vergleich zu Kontrolle erhöht war (entspricht ca. 42% der "Polyphenol"-Dosis).

DuPont et al. berichten ebenfalls über einen massiven Hippursäureanstieg im 24 Std. Urin von sechs gesunden Probanden beiderlei Geschlechts, nach Zufuhr von 1,1 Liter Cider (Apfelwein). Ein fast 3facher Anstieg an Hippursäure konnte im Vergleich zu einer am Vorversuchstag durchgeführten Kontrolltestung gemessen werden (DuPont et al. 2002).

In der WTWAS-Studie konnte ein ähnlicher Anstieg beobachtet werden: ~3fach mehr Hippursäure wurde im 24 Std. Urin nach WTWAS im Vergleich zur Kontrolle gemessen.

In der Studie von DuPont et al. wurde kein Gesamtphenolwert nach Folin-Ciocalteu bestimmt, so dass die für Tee, WTWAS und das Antiox-Getränk durchgeführten Berechnungen (ratio: zugeführte Polyphenoldosis vs. Zunahme an ausgeschiedener Hippursäure im 24 Std. Urin), hier leider nicht durchgeführt werden konnten.

Die deutlich höhere Biotransformation von Apfelsaftpolyphenolen in Hippursäure nach WTWAS (Humanstudie II), im Vergleich zu den von Mulder et al. (2005) berichteten Werten (Grün- und Schwarztee), kann einerseits im unterschiedlichen Polyphenolprofil von Apfel bzw. Apfelsaft und Tee, andererseits aber auch in der Dosis bzw. Applikationsweise begründet liegen.

In Humanstudie II wurde der Apfelsaft als Einmaldosis (~20 Min. Trinkzeit) appliziert, während in der Teestudie von Mulder et al. die Grün- und Schwarzteedosen auf jeweils 6 Eingrammpäckchen, zugeführt in 2-3 stündigen Intervallen, verteilt waren.

Die Höhe der verabreichten Polyphenoldosis kann durchaus das Metabolitenprofil *in vivo* signifikant beeinflussen (Spencer et al. 2008). Nach sehr hohen (pharmakologischen) Dosen an Catechin, konnte intaktes/unmetabolisiertes Catechin im Plasma von Probanden nachgewiesen werden, während nach Gabe von "normalen" ernährungsphysiologischen Dosen via Rotwein, ausschließlich Catechinmetaboliten (konjugierte Formen) detektiert wurden (Bell et al. 2000; Hackett et al. 1983). Für das "Auftauchen" von unmetabolisiertem Catechin im Plasma, nach sehr hohen Dosierungen, wird eine Sättigung

der Phase I und II Enzyme vermutet. Weiterhin wurde bei ansteigenden Polyphenoldosen eine Verschiebung des “Metabolisierungsprofils“ (Tiermodell), von Sulfatierung zu Glukuronidierung, beobachtet (Koster et al. 1981). Es ist deshalb durchaus denkbar, dass nach WTWAS (hohe Einzeldosis an Polyphenolen) im Vergleich zu niedrigeren Dosen (Einzeldosis oder Mehrfachdosen) ein relativ größerer Anteil nicht metabolisierter Polyphenole das Kolon erreicht und dort, von der vorhandenen Mikroflora, mit ihrem enormen katalytischen Potential ($\sim 10^{12}$ Mikroorganismen/cm³), zu einer Vielzahl von Metaboliten um- und abgebaut wird (wobei, wie bereits beschrieben, auch Hippursäure entsteht).

Auf den ersten Blick überraschend sind die Ergebnisse in Humanstudie III: nach Antiox-Getränk konnte eine ähnliche Biotransformationsrate der konsumierten Polyphenole zu Hippursäure, wie nach Zufuhr von Grün- und Schwarztee, beobachtet werden ($\sim 21\%$ nach Antiox-Getränk vs. 18 und 20% nach Grün- und Schwarztee; Mulder et al. 2005).

Die im Antiox-Getränk enthaltenen Anthocyane, aufgrund der Zusammensetzung des Getränkepulvers mengenmäßig bestimmend, können durch die intestinale Mikroflora, wie im Diskussionsteil für Humanstudie I beschrieben, zu zahlreichen Phenolsäuren ab- und umgebaut werden. Die Bildung von Hippursäure aus diesen Phenolsäuren, ähnlich wie von Mulder et al. (2005) für Catechin beschrieben (s. Literaturübersicht), ist durchaus denkbar. Da auch in Humanstudie III die verabreichte Dosis an Polyphenolen via des Antiox-Getränks deutlich höher war als bei Mulder et al. (4,59 [Antiox-Getränk] vs. 2,2 bzw. 1,5 mmol GAE für Grün- bzw. Schwarztee/Portion), die Biotransformationsrate zu Hippursäure jedoch praktisch gleich war, wäre es aufschlussreich gewesen, zusätzlich Faecesproben der Probanden zu untersuchen. D.h., zu untersuchen, wie viel Prozent der zugeführten Anthocyane unverändert im Faeces wiederzufinden sind. Rückschlüsse, ob die via Antiox-Getränk zugeführten Anthocyane in gleichem Ausmaß, wie z. B. Polyphenole in Tee oder Apfelsaft, von der Kolonmikroflora metabolisiert werden, wären dann möglich gewesen.

5.7.2 Hippursäure als potentieller Biomarker für mit der Nahrung zugeführte Polyphenole

Nicht nur nach Tee, Cider, naturtrübem Apfelsaft und Antiox-Getränk, sondern auch nach Zufuhr von Chlorogensäure (wichtigste Phenolsäure im Kaffee; Olthof et al. 2003), getrocknetem Cranberry-Saft (Valentova et al. 2007) sowie nach dem Verzehr von Blaubeeren und Kirschen (Toromanovic et al. 2008), konnte bei gesunden Probanden

beiderlei Geschlechts eine signifikante Zunahme von Hippursäure im Urin gemessen werden.

Hippursäure kann demnach als eine Art “allgemeiner“ bzw. “unspezifischer“ Biomarker, für die mit der Nahrung zugeführten Polyphenole, betrachtet werden. Rückschlüsse auf bestimmte Lebensmittel oder gar individuelle Polyphenole können, basierend auf den vorliegenden Ergebnissen (eigene Studien und Literaturdaten), jedoch nicht gemacht werden.

Spencer und Mitarbeiter haben 2008 eine Übersichtsarbeit publiziert, die sich detailliert mit der Problematik von biologischen Biomarkern, für die Bestimmung von mit der Nahrung zugeführten Polyphenolen, befasst (Titel: *Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research*; Spencer et al. 2008).

Damit sich ein Polyphenolmetabolit auch als Biomarker (Polyphenolzufuhr) eignet, wird dessen Spezifität als eine grundlegende Voraussetzung gefordert. Mit anderen Worten – der ausgewählte Metabolit sollte in Plasma oder Urin ausschliesslich nach Zufuhr eines bestimmten Polyphenols auftauchen und nicht auch aus anderen, mit der Nahrung konsumierten Substanzen bzw. endogen, entstehen (Spencer et al. 2008).

Hippursäure und Hydroxyhippursäure eignen sich zum Beispiel nicht als Biomarker für mit der Nahrung konsumierte Kaffeesäure: beide Verbindungen/Metaboliten können sowohl aus Chinasäure und aromatischen Aminosäuren (wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin) als auch aus anderen Polyphenolen im Körper gebildet werden (Spencer et al. 2008).

Die Problematik hinsichtlich der Verwendung von Hippursäure als spezifischen/validen *in vivo* Biomarker für individuelle Nahrungspolyphenole ist somit offensichtlich.

Trotzdem könnte Hippursäure, wie bereits erwähnt, als eine Art “Summenmetabolit“ oder “Allgemeiner Biomarker“ für die Zufuhr von Polyphenolen (als Summe) benutzt werden.

Weitere Humanstudien, die die folgenden Kriterien adressieren, könnten hierbei Klarheit schaffen:

- ausreichend große Probandenzahlen (Probandenzahl sollte entsprechend der Anzahl der Testungen pro Studie berechnet werden)
- adäquates Studiendesign (z. B. randomisiert, cross-over, doppelblind, placebokontrolliert, standardisierte Ernährung der Probanden in der Vorversuchsphase, standardisierte Dauer der Vorversuchsphase und

Hauptversuchsphase, identische Ein- und Ausschlusskriterien für die Studienteilnehmer)

- Einfluss von Geschlecht und Alter (d.h., Probandenauswahl basierend auf Geschlecht und Alter/Altersgruppe)
- detaillierte Analyse der zugeführten Polyphenole (individuelle Verbindungen) mittels HPLC; Berechnung der Ratio *“zugeführte Polyphenole (HPLC) : zusätzlich ausgeschiedene Hippursäure (Urin)“*

Urin als Matrix (nicht invasiv, leicht zugänglich, Probenmengen im Literbereich) und Hippursäure als Biomarker (analytisch leicht zu bestimmen, Konzentrationen im mg-Bereich), wären eine kostengünstige und vielversprechende Kombination, insbesondere für Bioverfügbarkeits- und/oder Interventionsstudien mit großen Probandenzahlen.

Es bleibt noch zu erwähnen, dass die im 24 Std. Urin der Probanden gemessenen Hippursäuremengen, sowohl in der Kontrolle als auch nach Zufuhr der entsprechenden Studiengetränke (Humanstudie II und III), im in der Literatur beschriebenen Normbereich liegen (0,1-1,0 g/24 Std.; Löffler et al. 2007). Dieser kann, abhängig von der Ernährung, entsprechend stark variieren.

6 Resümee und Ausblick

Nach Zufuhr eines polyphenolreichen Mostapfelsafts sowie eines polyphenol- und ascorbinsäurehaltigen Mischgetränks (Antiox-Getränks), war die antioxidative Kapazität im 24 Std. Urin von gesunden Probanden signifikant, im Vergleich zu einer Kontrolltestung, erhöht. Im Plasma (nur Antiox-Getränk) waren die Ergebnisse nicht ganz so eindeutig; eine klare Tendenz für eine erhöhte antioxidative Kapazität nach Antiox-Getränk konnte auch hier beobachtet werden (signifikant jedoch nur für Gesamtphenole). Im Urin konnten nach Antiox-Getränk zusätzlich verminderte Malondialdehydkonzentrationen gemessen werden. Zusammengefasst lässt dies eine, zumindest kurzfristige, Verbesserung des antioxidativen Status der Probanden vermuten. Aber was bedeutet das?

Insbesondere beim Verfassen der vorliegenden Dissertation und damit verbunden, der intensiven Literaturrecherche, habe ich mir diese kritische Frage immer öfter gestellt. Nach meinen Recherchen gibt es bisher keinen “geprüften“ Zusammenhang zwischen kurzfristig erhöhter antioxidativer Kapazität in Plasma und/oder Urin und einem verminderten Risiko an einer bestimmten Zivilisationskrankheit zu erkranken. Auch Scalbert und Kollegen weisen auf diesen Sachverhalt bereits 2005 hin (Scalbert et al. 2005). Weiterhin wurde das “ultimative“ antioxidative Testsystem, mit welchem die Komplexen physiologischen Vorgänge *in vivo* erfasst werden können, noch nicht entwickelt und wird es höchstwahrscheinlich in naher Zukunft auch nicht. Ob die anfänglich hochgelobten, auf Zellbasis operierenden Tests, wie z.B. der CAA-Test (Wolfe et al. 2008) oder CAP-e Test (Honzel et al. 2008) einen wirklichen Fortschritt bieten, bleibt abzuwarten. Die Limitationen der gängigen “chemischen“ Tests wurden ja bereits im vorherigen Kapitel diskutiert.

Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Plasma und Urin zusammen mit weiteren Parametern (wie z.B. Biomarker für oxidativen Stress, Plasma- und Urinkonzentrationen der entsprechenden Polyphenole/Antioxidantien sowie deren Metaboliten), können aber durchaus wertvolle Daten in klinischen Studien liefern. Huang et al. (2005) weisen in ihrem Übersichtsartikel explizit darauf hin. Auch kann das antioxidative Netzwerk, wie es z. B. in biologischen Flüssigkeiten vorkommt (synergistische/antagonistische Wirkungen zwischen endogenen und exogenen Antioxidantien), durch die Bestimmung der antioxidativen Kapazität als “Summe“, u.U. besser erfasst werden, als durch die Bestimmung individueller Antioxidantien (Fernandez-Panchon et al. 2008). Weiterhin ist

die analytische Erfassung individueller Antioxidantien, z.B. im Blutplasma, aufgrund der hohen Anzahl heterogener Verbindungen äußerst aufwendig (Kosten, Zeit, Instrumente).

Ich möchte mich deshalb auch der Aussage von Fernandez-Panchon und Kollegen (Fernandez-Panchon et al. 2008) anschließen, die in ihrer Schlussfolgerung darauf hinweisen, dass die erhöhte antioxidative Kapazität im Plasma, nach Zufuhr von bestimmten Lebensmitteln, ein Indiz dafür sein kann, dass die darin enthaltenen Polyphenole ihre antioxidative Wirkung *in vivo* entfalten.

In Humanstudie II und III wurde wie von Huang et al. (2005) gefordert, nicht nur die antioxidative Kapazität in Plasma und Urin als Einzelparameter bestimmt, sondern in Verbindung mit Ascorbinsäure, Harnsäure, Malondialdehyd, Polyphenole/Metaboliten und Hippursäure. Der starke Anstieg von Hippursäure im Urin nach Zufuhr des Mostapfelsafts sowie des Antiox-Getränks weisen auf eine intensive Metabolisierung/Biotransformation der mit den beiden Studiengetränken applizierten Polyphenole hin.

Dass die intakten oder genuinen Polyphenole, wie sie in Pflanzen, Früchten oder Lebensmitteln vorkommen, allein für die beobachteten bzw. vermuteten biologischen Effekte verantwortlich sind, ist aufgrund ihrer relativ geringen Bioverfügbarkeit eher unwahrscheinlich. Die analytische Erfassung und Identifizierung von *in vivo* Metaboliten, gebildet aus den mit der Nahrung oder Supplementen zugeführten Polyphenolen, wird daher immer drängender. Insbesondere das Kolon mit seiner enormen katabolischen Aktivität, bedingt durch die dort ansässige bakterielle Mikroflora, gewinnt mehr und mehr an Bedeutung. Viele dieser sog. Kolonmetaboliten besitzen immer noch freie -OH Gruppen und können somit zur antioxidativen Kapazität *in vivo* beitragen (Scalbert & Williamson 2000). Spezifische Metaboliten könnten auch als Biomarker für die Zufuhr von bestimmten polyphenolhaltigen Lebensmitteln bzw. individuellen Polyphenolen genutzt werden. Diese Metaboliten, wenn nachweisbar in leicht zugänglichen nichtinvasiven Kompartimenten wie z. B. Urin, könnten in Ernährungs-/Verzehrsstudien wertvolle Informationen, hinsichtlich der Aufnahme von Polyphenolen, liefern. Spencer und Kollegen sehen hierfür ein enormes Potential (Spencer et al. 2008). Um dies zu verwirklichen, sind weitere Humanstudien gefordert, in denen sowohl Blut, Urin und Faeces als auch die Atemluft (respiratorische Exkretion über die Lunge) untersucht werden sollten. Solange die Anzahl und chemische Struktur der *in vivo* gebildeten Metaboliten jedoch nur bruchstückhaft bekannt sind, bleiben die metabolischen Stoffwechselwege der verschiedenen Polyphenolgruppen und als Konsequenz, ihre biologische Bedeutung, mehr oder weniger eine "Black-Box". Insbesondere für die Bioverfügbarkeit der Anthocyane,

die bisher als eine der niedrigsten unter den Flavonoiden eingestuft wird (Manach et al. 2005), könnte dies zu einer Neubewertung ihrer physiologischen Relevanz führen. Der breite Einsatz von markierten Substanzen könnte hinsichtlich der Identifikation von *in vivo* Metaboliten einen echten Meilenstein darstellen. Führende Arbeitsgruppen fordern dies schon seit längerem (u. a. Crozier et al. 2009; Mazza & Kay 2008; Manach et al. 2005). Die identifizierten Metaboliten könnten dann, mit entsprechenden *in vitro* Tests (Zellkulturen) und Tiermodellen, auf ihre Bioaktivität und ihr präventives Potential gegenüber der Entstehung von chronischen Erkrankungen untersucht werden.

Publikationen von Felgines et al. (2010), mit radioaktiv markiertem Cyanidin-3-Glukosid (Untersuchungen zum Metabolismus am Tiermodell), von van Dorsten et al. (2010), mit polyphenolreichen Extrakten (Metabolitenprofile im Urin von 58 Probanden wurden mit ¹H-NMR Spektroskopie und GC-MS erfasst) sowie von Williamson und Clifford (2010), die in einem Review die physiologische Bedeutung von Kolonmetaboliten (z. B. Benzoessäuren, Phenylelessigsäuren und Phenylpropionsäuren) herausheben, sind drei aktuelle Beispiele, die sich mit der "Polyphenol-Metaboliten-Thematik" befassen.

Es bleibt spannend!

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden in drei verschiedenen Humanstudien, drei unterschiedliche Fragestellungen, hinsichtlich der Bioverfügbarkeit von antioxidativ wirksamen Substanzen (Polyphenole und Ascorbinsäure), geprüft:

1. Gibt es Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von Anthocyanen (Monoglukoside) aus Rotwein und rotem Traubensaftkonzentrat?
2. Wird durch die Zufuhr eines sortenreinen und polyphenolreichen Apfelsafts die antioxidative Kapazität im Urin erhöht?
3. Wird durch die Zufuhr eines polyphenol- und ascorbinsäurereichen Getränks der antioxidative Status verbessert?

Die Studien und Ergebnisse können wir folgt zusammengefasst werden:

Zu (1):

Neun gesunde Probanden beiderlei Geschlechts erhielten in einem vierwöchigen Abstand entweder 400 ml Rotwein (279,6 mg Gesamt-Anthocyane; Summe aus Cyanidin-3-Glukosid, Delphinidin-3-Glukosid, Malvidin-3-Glukosid, Peonidin-3-Glukosid und Petunidin-3-Glukosid) oder 400 ml rotes Traubensaftkonzentrat (RTSK; verdünnt; 283,5 mg Gesamt-Anthocyane). Urin wurde nüchtern sowie in 7 Intervallen über einen Zeitraum von 7 Std. nach Zufuhr der beiden Studiengetränke gesammelt (0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 und 6-7 Stunden). Zusätzlich wurde Blut zur Plasmagewinnung nüchtern sowie 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, und 3 Std. nach Getränkezufuhr entnommen. Nach Zufuhr von RTSK und Rotwein konnten die 5 Hauptanthocyane der roten Traube im Urin der Probanden identifiziert und quantifiziert werden (HPLC-DAD und LC-ESI-MS/MS). Innerhalb von 7 Std. wurden 0,23 (RTSK) bzw. 0,18 % (Rotwein) der zugeführten Dosis ausgeschieden. Der Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant ($p \geq 0,05$). Im Plasma konnten nach Zufuhr von RTSK, wie im Urin, alle 5 Anthocyane gefunden werden, während nach Rotwein nur Malvidin-3-Glukosid, Peonidin-3-Glukosid und Petunidin-3-Glukosid nachgewiesen werden konnten (HPLC-DAD). Die Plasma AUC (Area under the Curve) und $C_{\max}$ -Werte der Gesamt-Anthocyane waren nach RTSK tendenziell höher als nach Rotwein (AUC (dosisnormalisiert): 0,59 vs. 0,36 ng*Std./ml/mg; $C_{\max}$: 100,1 vs. 42,9 ng/ml), jedoch ohne statistische Signifikanz ($p \geq 0,05$). Weiterhin wurden in den Urinproben Anthocyanmetaboliten detektiert, vermutlich handelt es sich hierbei um

Glukuronid- und Sulfatkonjugate. Eine weitere Identifikation mittels LC-MS wurde jedoch nicht durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Bioverfügbarkeit der untersuchten Anthocyane aus Rotwein oder RTSK konnte nicht festgestellt werden. Aufgrund der relativ geringen Bioverfügbarkeit der intakten (genuinen) Anthocyane aus beiden Studiengetränken sind physiologische Wirkungen eher unwahrscheinlich. Da Anthocyanmetaboliten, insbesondere die der Kolonmikroflora, hinsichtlich ihrer potentiellen Bioaktivität immer mehr Interesse wecken, sollten diese deshalb in zukünftigen Humanstudien/Bioverfügbarkeitsstudien im Fokus stehen.

Zu (2):

In einer Vorstudie wurden vier sortenreine und naturtrübe Apfelsäfte, hergestellt aus traditionellen Mostapfelsorten des gleichen Jahrgangs, hinsichtlich der „Parameter“ antioxidative Kapazität und Polyphenole untersucht. Von diesen vier Mostapfelsäften hatte der Weiße-Trierer-Weinapfelsaft (WTWAS) sowohl die höchste antioxidative Kapazität (bestimmt mittels PCL-, FRAP- und Gesamtphenol-Test) als auch den höchsten Polyphenolgehalt (HPLC-DAD). Dieser Apfelsaft wurde für die im Anschluss durchgeführte Urin-Studie verwendet. In dieser Studie erhielten acht gesunde weibliche Probanden entweder 700 ml WTWAS oder 700 ml Wasser (Kontrolle) in einem randomisierten cross-over Design, mit einer einwöchigen Auswaschphase zwischen den beiden Testungen. Der Urin wurde nüchtern sowie in 5 Intervallen über einen Zeitraum von 24 Std. nach Zufuhr der Studiengetränke gesammelt. In den Urinproben wurde die antioxidative Kapazität (PCL, FRAP und Gesamtphenole), Polyphenole (HPLC-DAD und LC-ESI-MS/MS), Ascorbinsäure und Harnsäure (HPLC-DAD) sowie Hippursäure (Polyphenolmetabolit und potentieller Biomarker für den Konsum von Polyphenolen; HPLC-DAD und LC-ESI-MS/MS) bestimmt. Nach Zufuhr von WTWAS waren im Vergleich zur Kontrolle sowohl die antioxidative Kapazität (PCL [+44 %], FRAP [+29 %] und Gesamtphenole [+36 %]) als auch Hippursäure (ca. 3fach) und Ascorbinsäure (ca. 3fach) signifikant ($p \leq 0,05$) erhöht. Harnsäure (quantitativ bedeutendes endogenes Antioxidans) blieb praktisch unverändert. Zusätzlich wurden die Werte der antioxidativen Tests um den jeweiligen Ascorbinsäure- und Harnsäureanteil korrigiert. Glukuronidkonjugate des Phloretins ($1,72 \pm 0,71$ mg) sowie Phloretin (Aglykon; $0,31 \pm 0,15$ mg) konnten im Urin nach WTWAS ebenfalls nachgewiesen werden. Die Wiederfindung (Summe aus Glukuroniden und Aglykon) betrug 4,4 % im Vergleich zur zugeführten Dosis an Phloretinglykosiden (berechnet als Phloretin). Die starke Zunahme

an Hippursäure sowie die Detektion von Phloretinlukuroniden und Phloretin weisen auf eine intensive Metabolisierung der mit dem WTWAS zugeführten Polyphenole hin. Aufgrund der relativ geringen Konzentrationen an Phloretin und Phloretinlukuroniden sind für die erhöhte antioxidative Kapazität im Urin der Probanden nach WTWAS höchstwahrscheinlich weitere, in dieser Studie nicht erfasste Metaboliten, verantwortlich.

Zu (3):

Bei sechs gesunden Probanden beiderlei Geschlechts wurde die Wirkung eines polyphenol- und ascorbinsäurereichen Getränks (Antiox-Getränk) auf den antioxidativen Status (erfasst mittels PCL-, FRAP- und Gesamtphenol-Test), die Ascorbin- und Harnsäurespiegel (HPLC-DAD) sowie auf die renale Exkretion von Malondialdehyd (MDA, Biomarker für oxidativen Stress; HPLC-Fluoreszenz) und Hippursäure (Polyphenolmetabolit und potentieller Biomarker für den Konsum von Polyphenolen; HPLC-DAD) untersucht. Die Probanden erhielten entweder 400 ml des Antiox-Getränks oder 400 ml Wasser (Kontrolle) in einem randomisierten cross-over Design mit einer zweiwöchigen Auswaschphase zwischen den beiden Testungen. Blut zur Plasmagewinnung wurde nüchtern sowie 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 8 und 10 Std. nach Zufuhr der Studiengetränke entnommen. Zusätzlich wurde der 24 Std. Urin gesammelt. Nach Zufuhr des Antiox-Getränks waren im Vergleich zur Kontrolle sowohl die Gesamtphenole als auch die Ascorbinsäure (Area under the Curve [AUC]) im Blutplasma signifikant erhöht. Eine Tendenz ($p > 0,05$) zu erhöhten Plasma FRAP- und PCL-Werten (AUC) konnte ebenfalls beobachtet werden. Im Vergleich zu Wasser war nach Antiox-Getränk eine signifikant erhöhte Ausscheidung von Ascorbinsäure (+330 %), Gesamt-Antioxidantien (erfasst im PCL- (+43 %), FRAP- (+29 %) und Gesamtphenol (+33 %)-Test) und Hippursäure (+115 %) im 24 Std. Urin messbar. Weiterhin war die MDA-Ausscheidung nach Antiox-Getränk signifikant vermindert (-26 % im Vergleich zur Kontrolle). Harnsäure, als quantitativ bedeutendes endogenes Antioxidans, blieb in beiden Testungen (Antiox-Getränk und Kontrolle) praktisch unverändert. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass durch die Zufuhr des Antiox-Getränks (400 ml) der antioxidative Status kurzfristig verbessert werden kann.

8 Literaturverzeichnis

- Alberti-Fidanza A, Burini G, Antonelli G, Murdolo G, Perriello G: Acute effects of lyophilised red wine on total antioxidant capacity in healthy volunteers. *Diabetes Nutrition and Metabolism* 2003;16:65-71
- Alonso-Salces RM, Barranco A, Abad B, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F: Polyphenolic profiles of basque cider apple cultivars and their technological properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004;52:2938-2952
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993;90:7915-7922
- Andreasen MF, Kroon PA, Williamson G, Garcia-Conesa MT: Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001;49:5679-5684
- Aprikian O, Busserolles J, Manach C, Mazur A, Morand C, Davicco MJ, Besson C, Rayssiguier Y, Rémésy C: Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. *Journal of Nutrition* 2002;132:1969-1976
- Aprikian O, Duclos V, Guyot S, Besson C, Manach C, Bernalier A, Morand C, Rémésy C, Demigné C: Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids. *Journal of Nutrition* 2003;133:1860-1865
- Aprikian O, Levrat-Verny MA, Besson C, Busserolles J, Rémésy C, Demigné C: Apple favourably affects parameters of cholesterol metabolism and of antioxidative protection in cholesterol-fed rats. *Food Chemistry* 2001;75(4):445-452
- Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinai N: Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *Journal of Nutrition* 2000;130:2243-2250
- Arendt BM, Ellinger S, Kekic K, Geus L, Fimmers R, Spengler U, Mueller WU, Goerlich R: Single and repeated moderate consumption of native or dealcoholized red wine show different effects on antioxidant parameters in blood and DNA strand breaks in peripheral leukocytes in healthy volunteers: A randomized controlled trial [ISRCTN68505294]. *Nutrition Journal* 2005;4:33-43
- Arts ICW, Sesink ALA, Faassen-Peters M, Hollman PCH: The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *British Journal of Nutrition* 2004;91:841-847
- Auger C, Gerain P, Laurent-Bichon F, Portet K, Bornet A, Caporiccio B, Cros G, Teissedre PL, Rouanet JM: Phenolics from commercialized grape extracts prevent early atherosclerotic lesions in hamsters by mechanisms other than antioxidant effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004;52:5297-5302
- Aura AM, Martin-Lopez P, O'Leary KA, Williamson G, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K, Santos-Buelga C: In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European Journal of Nutrition* 2005;44:133-142

- Aura AM, O’Leary KA, Williamson G, Ojala M, Bailey M, Puupponen-Pimiä R, Nuutila AM, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K: Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50:1725-1730
- Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, Terao J: Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000;48:5496-5500
- Baublis A, Spomer A, Berber-Jimenez MD: Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *Journal of Food Sciences* 1994;59(6):1219-1221
- Beecher GR: Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutrition* 2003;133:3248S-3254S
- Bell JRC, Donovan JL, Wong R, Waterhouse AL, German JB, Walzem RL, Kasim-Karakas SE: (p)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000;71:103–108
- Benzie IFF: Lipid peroxidation: A review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 1996;47:233-261
- Benzie IFF, Strain JJ: The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry* 1996;239:70-76
- Berliner JA, Heinecke JW: The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biology & Medicine* 1996;20:707-727
- Biesalski HK, Schrezenmeir J, Weber P, Weiss HJ: Vitamine: Physiologie, Pathophysiologie, Therapie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1997
- Bitsch I, Janssen M, Netzel M, Strass G, Frank T: Bioavailability of anthocyanidin-3-glycosides following consumption of elderberry extract and blackcurrant juice. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2004;42(5):293-300.
- Bitsch R, Netzel M, Carlé E, Strass G, Kesenheimer B, Herbst M, Bitsch I: Bioavailability of antioxidative compounds from Brettacher apple juice in humans. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2001;1:245-249
- Bode JC, Zelder O, Rumpelt HJ, Wittkamp U: Depletion of liver adenosine phosphates and metabolic effects of intravenous infusion of fructose or sorbitol in man and in the rat. *European Journal of Clinical Investigation* 1973;3:436-441
- Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke A: Flavonols, flavones and anthocyanins as native antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 1998;37(2):147-163
- Boker LK, van der Schouw YT, de Kleijn MJJ, Jacques PF, Grobbee DE, Peeters PHM: Intake of dietary phytoestrogens by Dutch women. *Journal of Nutrition* 2002; 132:1319-1328
- Bokkenheuser VD, Shackleton CHL, Winter J: Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. *Biochemical Journal* 1987;248:953-956

- Bonnefont D, Legrand A, Peynet J, Emerit J, Delattre J, Galli A: Distribution of thiobarbituric acid – reactive substances in lipoproteins and proteins in serum. *Clinical Chemistry* 1989;35(10):2054-2058
- Bonnes-Taourel D, Guerin MC: Is malondialdehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? *Biochemical Pharmacology* 1992;44(5):985-998
- Borges G, Mullen W, Mullan A, Lean MEJ, Roberts SA, Crozier A: Bioavailability of multiple components following acute ingestion of a polyphenol-rich juice drink. *Molecular Nutrition & Food Research* 2010;54:S268-S277
- Borghoff SJ, Birnbaum LS: Age-related changes in glucuronidation and deglucuronidation in liver, small intestine, lung, and kidney of male Fischer rats. *Drug Metabolism and Disposition* 1985;13:62–67
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M: Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* 1990;186:343-355
- Briviba K, Stracke BA, Rufer CE, Watzl B, Weibel FP, Bub A: Effect of consumption of organically and conventionally produced apples on antioxidant activity and DNA damage in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55(19):7716-7721
- Bub A, Watzl B, Blockhaus M, Briviba K, Liegibel U, Müller H, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G: Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2003;14:90-98
- Bub A, Watzl B, Heeb D, Rechkemmer G, Briviba K: Malvidin-3-glucoside bioavailability in humans after ingestion of red wine, dealcoholized red wine and red grape juice. *European Journal of Nutrition* 2001;40:113-120
- Burda S, Oleszek W: Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001;49:2774-2779
- Cantos E, Espin JC, Tomas-Barberan FA: Varietal differences among the polyphenol profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50:5691-5696
- Cao G, Prior RL: Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 1998;44:1309-1315
- Cao G, Sofic E, Prior RL: Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine* 1997;22:749-760
- Cartron E, Fouret G, Carbonneau MA, Lauret C, Michel F, Monnier L, Descomps B, Leger CL: Red-wine beneficial long-term effect on lipids but not on antioxidant characteristics in plasma in a study comparing three types of wine - Description of two O-methylated derivatives of gallic acid in humans. *Free Radical Research* 2003;37(9):1021-1035
- Cawello W: Parameters for compartment-free pharmacokinetics. Shaker-Verlag, Aachen 1999
- Ceriello A: Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 2000;49:27-29
- Cermak R, Durazzo A, Maiani G, Böhm V, Kammerer DR, Carle R, Wiczowski W, Piskula MK, Galensa R: The influence of postharvest processing and storage of foodstuffs on the bioavailability of flavonoids and phenolic acids. *Molecular Nutrition & Food Research* 2009;53: S184-S193

- Chang Q, Zuo Z, Chow MS, Ho WK: Difference in absorption of the two structurally similar flavonoid glycosides, hyperoside and isoquercitrin, in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2005;59:549-555
- Chinnici F, Bendini A, Gaiani A, Riponi C: Radical scavenging activities of peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004;52:4684-4689
- Clifford MN, Copeland EL, Bloxside JP, Mitchell LA: Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. *Xenobiotica* 2000;30(3):317-326
- Clifford MN: Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Medica* 2004;70:1103-1114
- Cobbold CA, Sherratt JA, Maxwell SRJ: Lipoprotein oxidation and its significance for atherosclerosis: A mathematical approach. *Bulletin of Mathematical Biology* 2002; 64:65-95
- Cooney JM, Jensen DJ, McGhie TK: LC-MS identification of anthocyanins in boysenberry extract and anthocyanin metabolites in human urine following dosing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2004;84(3): 237-245
- Couteau D, McCartney AL, Gibson GR, Williamson G, Faulds CB: Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of Applied Microbiology* 2001;90:873-881
- Crespy V, Aprikian O, Morand C, Besson C, Manach C, Demigné C, Rémésy C: Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. *Journal of Nutrition* 2002; 132:3227-3230
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN: Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports* 2009;26(8): 1001-1043
- Darlington LG, Stone TW: Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *British Journal of Nutrition* 2001;85:251-269
- Da Silva EL, Piskula MK, Yamamoto N, Moon JH, Terao J: Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. *FEBS Letters* 1998;430:405-408
- Da Silva Porto PAL, Laranjinha JAN, De Freitas VAP: Antioxidant protection of low density lipoprotein by procyanidins: Structure/activity relationships. *Biochemical Pharmacology* 2003;66:947-954
- Davies KJA: Protein oxidation and proteolytic degradation. General aspects and relationship to cataract formation. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1990; 264:503-511
- Day AJ, Du Pont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJC, Morgan MRA, Williamson G: Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Letters* 1998;436:71-75
- Day AJ, Javier Cañada F, Díaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plump GW, Morgan MRA, Williamson G: Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters* 2000; 468:166-170
- De Kleijn MJJ, van der Schouw YT, Wilson PWF, Adlercreutz H, Mazur W, Grobbee DE, Jacques PF: Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: The Framingham Study. *Journal of Nutrition* 2001;131:1826-1832

- Déprez S, Brezillon C, Rabot S, Philippe C, Mila I, Lapierre C, Scalbert A: Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *Journal of Nutrition* 2000;130:2733-2738
- Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF: Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *The New England Journal of Medicine* 1997;337:408-416
- Dietrich H, Rechner A, Patz CD: Einfluss der Verarbeitungstechnik auf die phenolischen Antioxidantien von Fruchtsäften. *Flüssiges Obst* 2003;70:714-721
- Donnini S, Finetti F, Lusini L, Morbidelli L, Cheynier V, Barron D, Williamson G, Waltenberger J, Ziche M: Divergent effects of quercetin conjugates on angiogenesis. *British Journal of Nutrition* 2006;95:1016-1023
- Dragsted LO, Strube M, Leth T: Dietary levels of plant phenols and other non-nutritive components: Could they prevent cancer? *European Journal of Cancer Prevention* 1997; 6:522-528
- Dreher D, Junod AF: Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of Cancer* 1996;32A:30-38
- DuPont MS, Bennett RN, Mellon FA, Williamson G: Polyphenols from alcoholic apple cider are absorbed, metabolized and excreted by humans. *Journal of Nutrition* 2002; 132:172-175
- Duthie GG, Pedersen MW, Gardner PT, Morrice PC, Jenkinson AM, McPhail DB, Steele GM: The effect of whisky and wine consumption on total phenol content and antioxidant capacity of plasma from healthy volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition* 1998;52(10):733-736
- Duthie SJ, Jenkinson AM, Crozier A, Mullen W, Pirie L, Kyle J, Yap LS, Christen P, Duthie GG: The effects of cranberry juice consumption on antioxidant status and biomarkers relating to heart disease and cancer in healthy human volunteers. *European Journal of Nutrition* 2006;45(2):113-122
- Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH: Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 2000; 405:903-904
- Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Mäenpää J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A: Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2000;56:545-553
- Escribano-Bailón T, Gutiérrez-Fernández Y, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C: Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tina del Pais grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992;40:1794-1799
- Esterbauer H, Cheeseman KH: Determination of aldehydic lipid-peroxidation products - malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* 1990;186:407-421
- Felgines C, Krisa S, Mauray A, Besson C, Lamaison JL, Scalbert A, Merillon JM, Texier O: Radiolabelled cyanidin 3-O-glucoside is poorly absorbed in the mouse. *British Journal of Nutrition* 2010;103(12):1738-1745
- Felgines C, Talavéra S, Gonthier MP, Texier O, Scalbert A, Lamaison JL, Rémésy C: Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *Journal of Nutrition* 2003;133:1296-1301

- Fernandez-Lopez JA, Almela L, Munoz JA, Hidalgo V, Carreno J: Dependence between colour and individual anthocyanin content in ripening grapes. *Food Research International* 1998;31:667-672
- Fernandez-Pachon MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC: Antioxidant capacity of plasma after red wine intake in human volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53(12):5024-5029
- Fernandez-Panchon MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC: Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2008;48(7), 649-671
- Fleschhut J, Kratzer F, Rechkemmer G, Kulling SE: Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition* 2006;45(1):7-18
- Fleuriet A, Macheix JJ: Phenolic acids in fruits and vegetables. In: Rice-Evans CA, Packer L (Hrsg): *Flavonoids in Health and Disease*. Marcel Dekker, New York, Basel, 1. Auflage 2003;1-41
- Foley S, Navaratnam S, McGarvey DJ, Land EJ, Truscott TG, Rice-Evans CA: Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 1999;26:1202-1208
- Forester SC, Waterhouse AL: Identification of Cabernet Sauvignon anthocyanin gut microflora metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56:9299-9304
- Fossen T, Cabrita L, Andersen OM: Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry* 1998;63(4):435-440
- Frankel EN, Bosanek CA, Meyer AS, Silliman K, Kirk LL: Commercial grape juices inhibit the in vitro oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998;46:834-838
- Frankel EN, Waterhouse AL, Tesseidre PL: Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995;43:890-894
- Fukumoto LR, Mazza G: Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000;48(8):3597-3604
- Fukunaga K, Yoshida M, Nakazono N: A simple, rapid, highly sensitive and reproducible quantification method for plasma malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography* 1998;12(5):300-303
- Galli RL, Shukitt-Hale B, Youdim KA, Joseph JA: Fruit polyphenolics and brain aging: nutritional interventions targeting age-related neuronal and behavioral deficits. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;959:128-132
- Gambelli L, Santaroni GP: Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. *Journal of Food Composition and Analysis* 2004;17:613-618
- Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plump GW, Williamson G: Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *Journal of Nutrition* 2000;130:2765-2771

- Ghiselli A, Natella F, Guidi A, Montanari L, Fantozzi P, Scaccini C: Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2000;11:76–80
- Gonthier MP, Verny MA, Besson C, Rémésy C, Scalbert A: Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *Journal of Nutrition* 2003;133:1853-1859
- Gonzalez-Neves G, Gomez-Cordoves C, Barreiro L: Anthocyanic composition of Tannat, Cabernet Sauvignon and Merlot young red wines from Uruguay. *Journal of Wine Research* 2001;12:125-133
- Gorelik S, Lapidot T, Shaham I, Granit R, Ligumsky M, Kohen R, Kanner J: Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: health implications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:3397-402
- Gorelik S, Kohen R, Ligumsky M, Kanner J: Saliva plays a dual role in oxidation process in stomach medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007;458:236-43
- Gorelik S, Ligumsky M, Kohen R, Kanner J. A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products. *FASEB Journal* 2008;22:41–46
- Götz ML, Rabast U: Diättherapie – Lehrbuch mit Anwendungskonzepten. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1999
- Greene LS: Asthma and oxidant stress: Nutritional, environmental, and genetic risk factors. *Journal of the American College of Nutrition* 1995;14:317-324
- Grompe M, Pieretti M, Caskey CT, Ballabio A: The sulfatase gene family: cross-species PCR cloning using the MOPAC technique. *Genomics* 1992;12:755–760
- Grune T: Antioxidantien. In: Biesalski HK, Köhrle J, Schümann K (Hrsg): Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002:50-56
- Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, Beecher G, Holden J, Haytowitz D, Gebhardt S, Prior RL: Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *Journal of Nutrition* 2004;134:613-617
- Gutierrez IH, Lorenzo ESP, Espinosa AV: Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry* 2005;92(2):269-283
- Guyot S, Marnet N, Sanoner P, Drilleau JF: Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51:6240-6247
- Hackett AM, Griffiths LA, Broillet A, Wermeille M: The metabolism and excretion of (p)-[C-14] cyanidanol-3 in man following oral administration. *Xenobiotica* 1983;13:279–286
- Halliwel B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma OI: The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 1995a;33:601-617
- Halliwel B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York, 3. Auflage, 2004

- Halliwell B, Gutteridge JMC: The antioxidants of human extracellular fluids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1990;280:1-8
- Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI: Free radicals and antioxidants in food and in vivo: What they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1995b;35:7-20
- Halliwell B, Rafter J, Jenner A: Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: Direct or indirect effects? Antioxidant or not? *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81:268S-276S
- Harada M, Kan Y, Naoki H, Fukui Y, Kageyama N, Nakai M, Miki W, Kiso Y: Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 1999;63(6):973-977
- Henn T, Stehle P: Gesamtphenolgehalt und antioxidative Kapazität handelsüblicher Getränke. *Ernährungs-Umschau* 1998;45:308-313
- Herrmann K: In pflanzlichen Lebensmitteln vorkommende Flavonoide als Antioxidantien. *Gordian* 1993;93:108-111
- Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D: Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutrition and Cancer* 1993;20:21-29
- Heuckenkamp PU, Zollner N: Fructose-induced hyperuricaemia. *Lancet* 1971;1:808-809
- Hider RC, Liu ZD, Khodr HH: Metal chelation of polyphenols. *Methods in Enzymology* 2001;335:190-203
- Hollman PC, Katan MB: Absorption, metabolism and bioavailability of flavonoids. In: Rice-Evans C, Packer L, eds. *Flavonoids in health and disease*. New York: Marcel Dekker, 1997:483-522
- Holt RR, Lazarus SA, Cameron Sullards M, Yan Zhu Q, Schramm DD, Hammerstone JF, Fraga CG, Schmitz HH, Keen CL: Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavonol-rich cocoa. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002;76:798-804
- Honzel D, Carter SG, Redman KA, Schauss AG, Endres JR, Jensen GS: Comparison of Chemical and Cell-Based Antioxidant Methods for Evaluation of Foods and Natural Products: Generating Multifaceted Data by Parallel Testing Using Erythrocytes and Polymorphonuclear Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56(18):8319–8325
- Huang D, Ou B, Prior RL: The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:1841-1856
- Iversen CK: Black currant nectar: Effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. *Journal of Food Science* 1999;64:37-41
- Jung KJ, Wallig MA, Singletary KW: Purple grape juice inhibits 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. *Cancer Letters* 2006;233(2):279-288

- Kahle K, Huemmer W, Kempf M, Scheppach W, Erk T, Richling E: Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55:10605-10614
- Kallithraka S, Arvanitoyannis I, El-Zajouli A, Kefalas P: The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. *Food Chemistry* 2001;75(3):355-363.
- Kamei H, Kojima T, Hasegawa M, Koide T, Umeda T, Yukawa T, Terabe K: Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro. *Cancer Investigation* 1995;13:590-594
- Kanda T, Akiyama H, Yanagida A, Tanabe M, Goda Y, Toyoda M, Teshima R, Saito Y: Inhibitory effects of apple polyphenol on induced histamine release from RBL-2H3 cells and rat mast cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1998;62:1284-1289
- Kang SY, Seeram NP, Nair MG, Bourquin LD: Tart cherry anthocyanins inhibit tumor development in Apc(min) mice and reduce proliferation of human colon cancer cells. *Cancer Letters* 2003;194:13-19
- Katsube N, Iwashita K, Tsushida T, Yamaki K, Kobori M: Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51(1):68-75.
- Kay CD, Holub BJ: The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *British Journal of Nutrition* 2002;88(4):389-397
- Kay CD, Mazza G, Holub BJ, Wang J: Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *British Journal of Nutrition* 2004;91(6):933-942.
- Kay CD, Mazza G, Holub BJ: Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *Journal of Nutrition* 2005;135(11):2582-2588.
- Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD: Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *Journal of Nutrition* 2000;130:53-56
- Keppler K, Humpf HU: Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganisms in Medical Chemistry* 2005;13:5195-5205
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS: Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences* 2004;96:229-245
- Kimura M, Umegaki K, Kasuya Y, Sugisawa A, Higuchi M: The relation between single / double or repeated tea catechin ingestions and plasma antioxidant activity in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 2002;56:1186-1193
- Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A: Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002;76:560-568
- Ko SH, Choi SW, Ye SK, Cho BL, Kim HS, Chung MH: Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. *Journal of Medicinal Food* 2005; 8:41-46
- Kojima T, Akiyama H, Sasai M, Taniuchi S, Goda Y, Toyoda M, Kobayashi Y: Anti-allergic effect of apple polyphenol on patients with atopic dermatitis: A pilot study. *Allergology International* 2000;49:69-73

- Konishi Y, Hitomi Y, Yoshida M, Yoshioka E: Pharmacokinetic study of caffeic and rosmarinic acids in rats after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:4740-4746
- Konishi Y, Kobayashi S: Transepithelial transport of chlorogenic acid, caffeic acid, and their colonic metabolites in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004;52:2518-2526
- Konishi Y, Kobayashi S: Transepithelial transport of rosmarinic acid in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2005;69:583-591
- Konishi Y, Kobayashi S, Shimizu M: Transepithelial transport of p-coumaric acid and gallic acid in Caco-2 cell monolayers. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2003; 67:2317-2324
- Koster H, Halsema I, Scholtens E, Knippers M, Mulder GJ: Dose-dependent shifts in the sulfation and glucuronidation of phenolic-compounds in the rat in vivo and in isolated hepatocytes – the role of saturation of phenolsulfotransferase. *Biochemical Pharmacology* 1981;30:2569-2575
- Krogholm KS, Haraldsdottir J, Knuthsen P, Rasmussen SE: Urinary total flavonoid excretion but not 4-pyridoxic acid or potassium can be used as a biomarker for the intake of fruits and vegetables. *Journal of Nutrition* 2004;134(2):445-451
- Kubota K, Horai Y, Kushida K, Ishizaki T: Determination of benzoic-acid and hippuric-acid in human-plasma and urine by high-performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 1988;425(1):67-75.
- Landrault N, Pouchet P, Ravel P, Gasc F, Cros G, Teissedre PL: Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001;49(7):3341-3348.
- Langley-Evans SC: Consumption of black tea elicits an increase in plasma antioxidant potential in humans. *International Journal of Food Science and Nutrition* 2000;51:309-315
- Lapidot T, Harel S, Granit R, Kanner J: Bioavailability of red wine anthocyanins as detected in human urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998;46(10):4297-4302.
- Lapidot T, Harel S, Akiri B, Granit R, Kanner J: pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999;47(1):67-70.
- Lapidot T, Walker MD, Kanner J: Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? Generation of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50:3156-3160
- Leenen R, Roodenburg AJC, Tijburg LBM, Wiseman SA: A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000;54(1):87-92
- Le Guernevé C, Sanoner P, Drilleau JF, Guyot S: New compounds obtained by enzymatic oxidation of phloridzin. *Tetrahedron Letters* 2004;45:6673-6677
- Lehtonen HM, Rantala M, Suomela JP, Viitanen M, Kallio H: Urinary Excretion of the Main Anthocyanin in Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*), Cyanidin 3-O-Galactoside, and Its Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009;57(10):4447-4451.

- Leontowicz H, Gorinstein S, Lojek A, Leontowicz M, Číž M, Soliva-Fortuny R, Park YS, Jung ST, Trakhtenberg S, Martin-Belloso O: Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002;13:603-610
- Leontowicz M, Gorinstein S, Leontowicz H, Krzeminski R, Lojek A, Katrich E, Číž M, Martin-Belloso O, Soliva-Fortuny R, Haruenkit R, Trakhtenberg A: Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51:5780-5785
- Levanon D, Goss B, Chen JDZ: Inhibitory effect of white wine on gastric myoelectrical activity and the role of vagal tone. *Digestive Diseases and Sciences* 2002;47(11):2500-2505
- Li Z, Henning SM, Zhang Y, Zerlin A, Li L, Gao K, Lee RP, Karp H, Thames G, Bowerman S, Heber D: Antioxidant-rich spice added to hamburger meat during cooking results in reduced meat, plasma, and urine malondialdehyde concentrations. *American Journal of Clinical Nutrition* 2010;91:1180-1184
- Linseisen J, Radtke J, Wolfram G: Flavonoidzufuhr Erwachsener in einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 1997;36:403-412
- Liu RH, Sun J: Antiproliferative activity of apples is not due to phenolic-induced hydrogen peroxide formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51:1718-1723
- Liu RH: Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *Journal of Nutrition* 2004;134:3479S-3485S
- Liu RH, Liu J, Chen B: Apples prevent mammary tumors in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:2341-2343
- Lo CY, Li S, Tan D, Pan MH, Sang S, Ho CT: Trapping reactions of reactive carbonyl species with tea polyphenols in simulated physiological conditions. *Molecular Nutrition & Food Research* 2006;50:1118-1128
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 8. Auflage, 2007
- Lotito SB, Frei B: The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine* 2004; 37: 251-258
- Lotito SB, Frei B: Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology & Medicine* 2006;41(12):1727-1746.
- Lupp A, Welz A, Kuhn UD, Böhm V: Supplementation with tomato oleoresin or synthetic lycopene: influence on the antioxidative capacity in blood of healthy volunteers. *Ernährung/Nutrition*, 2004;28(12):495-502
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L: Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 2004;79:727-747
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81:230-242

- Mänpää PH, Raivio KO, Kekomäki MP: Liver adenine nucleotides: fructose-induced depletion and its effect on protein synthesis. *Science* 1968;161:1253-1254
- Marks SC, Mullen W, Borges G, Crozier A: Absorption, Metabolism, and Excretion of Cider Dihydrochalcones in Healthy Humans and Subjects with an Ileostomy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009;57(5):2009-2015
- Marnett LJ: Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research* 1999;424:83-95
- Matsumoto H, Nakamura Y, Tachibana S, Kawamura S, Hirayama M: Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51(12):3560-3563
- Mazza G: anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1995;35(4):341-371
- Mazza G, Kay CD, Cottrell T, Holub BJ: Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50(26):7731-7737
- Mazza G, Kay CD: Bioactivity, Absorption, and Metabolism of Anthocyanins, 228-262 pp. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK. 2008
- Mazza G, Miniati E: Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. CRC Press, Inc. Boca Raton, USA 1993
- McGhie TK, Ainge GD, Barnett LE, Cooney JM, Jensen DJ: Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51(16):4539-4548
- Mercier A, Perdriel G, Rozier J, Cheralaud J: Note concerning the action of anthocyanin glycosides on the human electroretinogram. *Bulletin des Sociétés d'Ophthalmologie de France* 1965;65:1049-1053
- Mertens-Talcott SU, Jilma-Stohlawetz P, Rios J, Hingorani L, Derendorf H: Absorption, metabolism, and antioxidant effects of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenols after ingestion of a standardized extract in healthy human volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006;54(23):8956-8961
- Mertens-Talcott SU, Rios J, Jilma-Stohlawetz P, Pacheco-Palencia LA, Meibohm B, Talcott ST, Derendorf H: Pharmacokinetics of Anthocyanins and Antioxidant Effects after the Consumption of Anthocyanin-Rich Acai Juice and Pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in Human Healthy Volunteers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56(17):7796-7802
- Meslehy MR, Nakamura N, Hattori M: Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chemical and Pharmacological Bulletin (Tokyo)* 1997;45:888-893
- Meyer AS, Yi OS, Pearson DA, Waterhouse AL, Frankel EN: Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997;45:1638-1643
- Milbury PE, Cao GH, Prior RL, Blumberg J: Bioavailability of elderberry anthocyanins. *Mechanisms of Ageing and Development* 2002;123(8):997-1006.

- Miyagi Y, Miwa K, Inoue H: Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. *The American Journal of Cardiology* 1997; 80:1627-1631
- Miyake Y, Shimoi K, Kumazawa S, Yamamoto K, Kinae N, Osawa T: Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of eriocitrin-treated rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000;48:3217-3224
- Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K: Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999;47(3):1083-1091
- Mönch S, Netzel M, Netzel G, Rychlik M: Quantitation of folates and their catabolites in blood plasma, erythrocytes, and urine by stable isotope dilution assays. *Analytical Biochemistry* 2010;398(2):150-160
- Moon JH, Tsushida T, Nakahara K, Terao J: Identification of quercetin 3-O-beta-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radical Biology & Medicine* 2001;30(11):1274-1285
- Morton LW, Caccetta RAA, Puddey IB, Croft KD: Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: Relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2000;27:152-159
- Mulder TP, Rietveld AG, van Amelsvoort JM: Consumption of both black tea and green tea results in an increase in the excretion of hippuric acid into urine. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81(1):256S-260S
- Mülleider U, Murkovic M, Pfannhäuser W: Urinary excretion of cyanidin glycosides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2002;53(1-3):61-66
- Mullen W, Graf BA, Caldwell ST, Hartley RC, Duthie GG, Edwards CA, Lean ME, Crozier A: Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-(14C)]quercetin-4'-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50:6902-6909
- Natella F, Belelli F, Gentili V, Ursini F, Scaccini C: Grape seed proanthocyanidins prevent plasma postprandial oxidative stress in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50(26):7720-7725
- Natsume M, Osakabe N, Yasuda A, Baba S, Tokunaga T, Kondo K, Osawa T, Terao J: In vitro antioxidative activity of (-)-epicatechin glucuronide metabolites present in human and rat plasma. *Free Radical Research* 2004;38(12):1341-1348
- Nardini M, Cirillo E, Natella F, Scaccini C: Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50:5735-5741
- Neilson AP, George JC, Janle EM, Mattes RD, Rudolph R, Matusheski NV, Ferruzzi MG: Influence of chocolate matrix composition on cocoa flavan-3-ol bioaccessibility in vitro and bioavailability in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009;57(20):9418-9426
- Neilson AP, Sapper TN, Janle EM, Rudolph R, Matusheski NV, Ferruzzi MG: Chocolate Matrix Factors Modulate the Pharmacokinetic Behavior of Cocoa Flavan-3-ol Phase II Metabolites Following Oral Consumption by Sprague-Dawley Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010;58(11):6685-6691

- Németh K, Plump GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA: Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition* 2003;42:29-42
- Netzel M, Strass G, Janssen M, Bitsch I, Bitsch R: Bioactive anthocyanins detected in human urine after ingestion of blackcurrant juice. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 2001;20:89-95
- Nicoli MC, Calligans S, Manzocco L: Effect of enzymatic and chemical oxidation on the antioxidant capacity of catechin model systems and derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000;48:4576-4580
- Nielsen ILF, Dragsted LO, Ravn-Haren G, Freese R, Rasmussen SE: Absorption and excretion of black currant anthocyanins in humans and Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51(9):2813-2820
- Nurmi T, Mursu J, Heinonen M, Nurmi A, Hiltunen R, Voutilainen S: Metabolism of Berry Anthocyanins to Phenolic Acids in Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009;57(6):2274-2281
- Oberley LW: Free radicals and diabetes. *Free Radical Biology & Medicine* 1988;5:113-124
- O'Byrne DJ, Devaraj S, Grundy SM, Jialal I: Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids and α -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002;76:1367-1374
- O'Leary KA, Day AJ, Needs PW, Mellon FA, O'Brien NM, Williamson G: Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: the role of human β -glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochemical Pharmacology* 2003;65:479-491
- Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB: Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Journal of Nutrition* 2001;131:66-71
- Olthof MR, Hollman PCH, Buijsman M, van Amelsvoort JMM, Katan MB: Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *Journal of Nutrition* 2003;133(6):1806-1814
- Osman H, Shanmuganayagam D, Wiebe D, Folts J: Varying antiplatelet / antioxidant properties of flavonoid plant extracts. *FASEB Journal* 2000;14:A660
- Ozgová Š, Heřmánek J, Gut I: Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. *Biochemical Pharmacology* 2003;66:1127-1137
- Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F: The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 296(3):631-636
- Pearson DA, Tan CH, German JB, Davis PA, Gershwin ME: Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. *Life Science* 1999;64:1913-1920
- Pedersen CB, Kyle J, Jenkinson AM, Gardner PT, McPhail DB, Duthie GG: Effects of blueberry and cranberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of healthy female volunteers. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000;54(5):405-408

- Peng IW, Kuo SM: Flavonoid structure affects the inhibition of lipid peroxidation in Caco-2 intestinal cells at physiological concentrations. *Journal of Nutrition* 2003; 133:2184-2187
- Perheentupa J, Raivio K: Fructose-induced hyperuricaemia. *Lancet* 1967;2:528-531
- Pinent M, Blay M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Ardevol A: Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology* 2004;145:4985-4990
- Pisha E, Pezzuto JM: Fruits and vegetables containing compounds that demonstrate pharmacological activity in humans. *Economic and Medicinal Plant Research* 2006;6:189-233
- Piskula MK, Terao J: Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *Journal of Nutrition* 1998;128:1172-1178
- Polidori MC, Stahl W, Eichler O, Niestroj I, Sies H: Profiles of antioxidants in human plasma. *Free Radical Biology & Medicine* 2001;30:456-462
- Popov I, Lewin G: Antioxidative homeostasis: Characterization by means of chemiluminescent technique. *Methods in Enzymology* 1999;300:437-456
- Price RK, Welch RW, Lee-Manion AM, Bradbury I, Strain JJ: Total phenolics and antioxidant potential in plasma and urine of humans after consumption of wheat bran. *Cereal Chemistry* 2008;85(2):152-157
- Prior RL, Wu XL, Schaich K: Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53(10):4290-4302
- Prior RL, Go LW, Wu XL, Jacob RA, Sotoudeh G, Kader AA, Cook RA: Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. *Journal of the American College of Nutrition* 2007;26(2):170-181
- Radtke J, Linseisen J, Wolfram G: Phenolsäurezufuhr Erwachsener in einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* 1998;37:190-197
- Rechner AR, Kroner C: Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thrombosis Research* 2005;116:327-334
- Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA: The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology & Medicine* 2002;33:220-235
- Rechner AR, Smith MA, Kuhnle G, Gibson GR, Debnam ES, Srai SKS, Moore KP, Rice-Evans CA: Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology & Medicine* 2004;36:212-225
- Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG: Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *Journal of Nutrition* 2000;130:2109S-2114S
- Rice-Evans C: Flavonoids and isoflavones: Absorption, metabolism, and bioactivity. *Free Radical Biology & Medicine* 2004;36:827-828

- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 1996;20:933-956
- Richter G: *Biochemie der Pflanzen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage, 1996
- Ross MA: Determination of ascorbic acid and uric acid in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1994;657:197-200
- Roura E, Andres-Lacueva C, Estruch R, Lamuela-Raventos RM: Total polyphenol intake estimated by a modified Folin-Ciocalteu assay of urine. *Clinical Chemistry* 2006;52(4):749-752
- Roura E, Almajano MP, Bilbao MLM, Andres-Lacueva C, Estruch R, Lamuela-Raventos RM: Human urine: Epicatechin metabolites and antioxidant activity after cocoa beverage intake. *Free Radical Research* 2007;41(8): 943-949
- Sano A, Yamakoshi J, Tokutake S, Tobe K, Kubota Y, Kikuchi M: Procyanidin B1 is detected in human serum after intake of proanthocyanidin-rich grape seed extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2003;67:1140-1143
- Scalbert A, Williamson G: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 2000;130:2073S-2085S
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L: Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2005;45(4):287-306
- Schieber A, Keller P, Carle R: Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 2001;910(2):265-273
- Schneider H, Blaut M: Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. *Archives of Microbiology* 2000;173:71-75
- Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R: Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research* 2002;36:177-187
- Seeram NP, Bourquin LD, Nair MG: Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001;49:4924-4929
- Sembries S, Dongowski G, Mehrländer K, Will F, Dietrich H: Physiologische Wirkungen von Extraktionssäften aus Äpfeln, Weinbeeren und Roten Beten in vitro und am Menschen. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 2006;102(6):350-365
- Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A: Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutrition* 1998;128:1003-1007
- Serafini M, Testa MF, Villano D, Pecorari M, van Wieren K, Azzini E, Brambilla A, Maiani G: Antioxidant activity of blueberry fruit is impaired by association with milk. *Free Radical Biology & Medicine* 2009;46(6):769-774
- Sesink ALA, O'Leary KA, Hollman PCH: Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *Journal of Nutrition* 2001;131:1938-1941

- Shirai M, Moon JH, Tsushida T, Terao J: Inhibitory effect of a quercetin metabolite, Quercetin-3-O- β -D-glucuronide, on lipid peroxidation in liposomal membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001;49:5602-5608
- Sies H, Stahl W, Sundquist AR: Antioxidant functions of vitamins: Vitamin E and C, beta-carotene and other carotenoids. *Annals of the New York Academy of Science* 1992;669:7-20
- Singleton VL, Rossi JA: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 1965;16:144-158
- Spencer JPE, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C: The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Letters* 1999;458:224-230
- Spencer JPE, Mohsen MMA, Minihane AM, Mathers JC: Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition* 2008;99(1):12-22
- Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD: Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999;100:1050-1055
- Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K: Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with α -linoleic acid. *Free Radical Biology & Medicine* 1999;27:1313-1323
- Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH: Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50:7449-7454
- Tepel M, van der Giet M, Zidek W: Antioxidative therapy and vascular diseases. *Medizinische Klinik* 2002;97(3):144-151
- Thielen C, Ludwig M, Patz CD, Will F, Dietrich H, Netzel G, Netzel M, Bitsch R, Bitsch I: Characterization of juices of different apple cultivars. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 2006;102(9):426-435
- Torabian S, Haddad E, Rajaram S, Banta J, Sabate J: Acute effect of nut consumption on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and lipid peroxidation. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 2009;22(1):64-71
- Toromanovic J, Kovac-Besovic E, Sapcanin A, Tahirovic I, Rimpapa Z, Kroyer G, Sofic E: Urinary hippuric acid after ingestion of edible fruits. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 2008;8(1):38-43
- Totlani VM, Peterson DG: Epicatechin carbonyl-trapping reactions in aqueous maillard systems: identification and structural elucidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006;54:7311-7318
- Tsang C, Auger C, Mullen W, Bornet A, Rouanet JM, Crozier A, Teissedre PL: The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats. *British Journal of Nutrition* 2005;94:170-181
- Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H: Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51:6347-6353

- Unno T, Tamenoto K, Yayabe F, Kakuda T: Urinary excretion of 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)- γ -valerolactone, a ring-fission metabolite of (-)-epicatechin, in rats and its in vitro antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51:6893-6898
- Valentova K, Stejskal D, Bednar P, Vostalova J, Cihalik C, Vecerova R, Koukalova D, Kolar M, Reichenbach R, Sknouril L, Ulrichova J, Simanek V: Biosafety, antioxidant status, and metabolites in urine after consumption of dried cranberry juice in healthy women: A pilot double-blind placebo-controlled trial. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55(8):3217-3224
- Van der Sluis AA, Dekker M, Skrede G, Jongen WMF: Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 2. Effect of novel production methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004;52:2840-2848
- Van der Sluis AA, Dekker M, van Boekel MAJS: Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 3. Stability during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53:1073-1080
- Van Dorsten FA, Grun CH, van Velzen EJJ, Jacobs DM, Draijer R, van Duynhoven JPM: The metabolic fate of red wine and grape juice polyphenols in humans assessed by metabolomics. *Molecular Nutrition & Food Research* 2010;54(7):897-908
- Vazquez Oderiz ML, Vazquez Blanco ME, Lopez Hernandez J, Simal Lozano J, Romero Rodriguez MA: Simultaneous determination of organic acids and vitamin C in green beans by liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 1994;77:1056-1059
- Vidal R, Hernandez-Vallejo S, Pauquai T, Texier O, Rousset M, Chambaz J, Demignot S, Lacorte JM: Apple procyanidins decrease cholesterol esterification and lipoprotein secretion in Caco-2/TC7 enterocytes. *Journal of Lipid Research* 2005;46:258-268
- Vinson JA, Teufel K, Wu N: Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis* 2001;156:67-72
- Vitaglione P, Donnarumma G, Napolitano A, Galvano F, Gallo A, Scalfi L, Fogliano V: Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *Journal of Nutrition* 2007;137(9):2043-2048
- Volpi N, Tarugi P: Improvement in the high-performance liquid chromatography malondialdehyde level determination in normal human plasma. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 1998;713(2):433-437
- Vrhovsek U, Rigo A, Tonon D, Mattivi F: Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004;52:6532-6538
- Wachtel-Galor S, Tomlinson B, Benzie IFF: Ganoderma lucidum ("Lingzhi"), a Chinese medicinal mushroom: biomarker responses in a controlled human supplementation study. *British Journal of Nutrition* 2004;91:263-269
- Walgren RA, Lin JT, Kinne RKH, Walle T: Cellular uptake of dietary flavonoid Quercetin 4'- β -Glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2000;294:837-843
- Walle T: Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine* 2004;36:829-837

- Wang J, Mazza G: Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50(4):850-857
- Watzl B, Leitzmann C: *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Hippokrates Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, 1999
- Watzl B, Rechkemmer G: Flavonoide. *Ernährungsumschau* 2001;48:499-503
- Weinbrenner T, Montserrat F, de la Torre R, Saez GT, Rijken P, Tormos C, Coolen S, Albaladejo MF, Abanades S, Schroder H, Marrugat J, Covas MI: Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *Journal of Nutrition* 2004;134:2314-2321
- Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C: Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine* 2004;36:838-849
- Williamson G, Clifford MN: Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition* 2010;104:S48-S66
- Williamson G, Manach C: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81(1):243S-255S
- Wolfe K, Wu X, Liu RH: Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51:609-614
- Wolfe KL, Kang X, He X, Dong M, Zhang Q, Liu RH: Cellular Antioxidant Activity of Common Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008;56(18):8418-8426
- Wolffram S, Blöck M, Ader P: Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border Membrane of rat small intestine. *Journal of Nutrition* 2002;132:630-635
- Wu XL, Cao GH, Prior RL: Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *Journal of Nutrition* 2002;132(7):1865-1871
- Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T: Statistical moments in pharmacokinetics. *Journal of Pharmacokinetic and Biopharmacology* 1978;616:547-558
- Yokotsuka K, Nishino N: Extraction of anthocyanins from muscat bailey A grape skins. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1990;69:328-334
- Youdim KA, Shukitt-Hale B, Martin A, Wang H, Denisova N, Bickford PC, Joseph JA: Short-term dietary supplementation of blueberry polyphenolics: beneficial effects on aging brain performance and peripheral function. *Nutritional Neuroscience* 2000;3:383-397
- Youdim KA, McDonald J, Kalt W, Joseph JA: Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2002;13(5):282-288
- Younes M: Freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies. In: Marquardt H, Schäfer S (Hrsg): *Lehrbuch der Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2004:117-131
- Zafrilla P, Morillas J, Mulero J, Cayuela JM, Martinez-Cacha A, Pardo F, Nicolas JML: Changes during storage in conventional and ecological wine: Phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003;51(16):4694-4700

Referenzen aus dem Internet

- 1 <http://www.nutraingredients-usa.com/content/view/print/239659>; Antioxidants: The rise of polyphenols. Abgerufen am 16.03.2009
- 2 <http://www.nutraingredients-usa.com/content/view/print/239202>; The growth of brand 'antioxidant'. Abgerufen am 11.03.2009

9 Anhang

Inhaltsverzeichnis

A.1 Arbeitsvorschriften/Methoden

A.1.1 Antioxidative Tests

- A.1.1.1 PCL
- A.1.1.2 FRAP
- A.1.1.3 Gesamtphenole (Folin-Ciocalteu)
- A.1.1.4 Validierung

A.1.2 HPLC-Methoden

- A.1.2.1 Anthocyane (Humanstudie I)
- A.1.2.2 Polyphenole (Humanstudie II)
- A.1.2.3 Hippursäure
- A.1.2.4 Ascorbinsäure und Harnsäure
- A.1.2.5 Malondialdehyd
- A.1.2.6 HPLC-ESI-MS/MS (extern durchgeführt)

A.2 Roh- und Einzeldaten

A.2.1 Humanstudie I

- A.2.1.1 Probandenprofile
- A.2.1.2 Anthocyane: individuelle Plasmakonzentrationen
- A.2.1.3 Anthocyane: individuelle Plasma AUCs, $C_{\max}$ - und $t_{\max}$ -Werte
- A.2.1.4 Anthocyane: individuelle Urinwerte
- A.2.1.5 Gesamtphenole: Plasmakonzentrationen nach RTSK und Rotwein

A.2.2 Humanstudie II

- A.2.2.1 Probandenprofile
- A.2.2.2 PCL, FRAP und Gesamtphenole im Urin: mit Ascorbin- & Harnsäure (unkorrigiert) und abzüglich Ascorbin- & Harnsäure (korrigiert)
- A.2.2.3 Hippursäure, Harnsäure und Ascorbinsäure: individuelle Urinwerte

A.2.3 Humanstudie III

- A.2.3.1 Zutatenliste Antiox-Getränk
- A.2.3.2 Probandenprofile
- A.2.3.3 PCL, FRAP, Gesamtphenole und Ascorbinsäure: individuelle Plasmakonzentrationen und AUCs
- A.2.3.4 Harnsäure: individuelle Plasmakonzentrationen
- A.2.3.5 PCL, FRAP, MDA, Ascorbinsäure, Harnsäure und Hippursäure: individuelle Urinwerte
- A.2.3.6 Gesamtphenole im Urin: mit Ascorbin- & Harnsäure (unkorrigiert) und abzüglich Ascorbin- & Harnsäure (korrigiert)

A.1 Arbeitsvorschriften

A.1.1 Antioxidative Tests

A.1.1.1 PCL (Popov und Lewin 1999; Schlesier et al. 2002)

Geräte und Hilfsmittel

- Photochem® (Analytik Jena AG)
- Reagenzglasschüttler (MS1 Minishaker IKA®)
- Reaktionsröhrchen

Chemikalien

- ACW-Kit bestehend aus Reagenz 1 (ACW Diluent), Reagenz 2 (Carbonat-Puffer (0,1 mol/l; pH 10,5)), Reagenz 3 (Luminol (Photosensibilisator und Detektorsubstanz)) (Analytik Jena AG)
- Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure) (Aldrich)
- Natriumchlorid (NaCl) (Riedel-de Haën)
- H₂O-bidest. (Millipore Milli-Q® Synthesis A10)

Durchführung

a) herzustellende Lösungen

- isotone Kochsalzlösung (156 mmol/l)
- Trolox-Stammlösung (2,5 mmol/l)
Trolox-Standardreihe: Trolox-Stammlösung mit H₂O-bidest. auf folgende Konzentrationen verdünnen: 25 µmol/l; 50 µmol/l; 100 µmol/l; 250 µmol/l
- Reagenz 3-Arbeitslösung:
Reagenz 3 mit 750 µl Reagenz 2 mischen

b) Probenansatz

Die aufgetauten Saft- und Urinproben werden mit H₂O-bidest., die Plasmaproben mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt und auf Eis gelagert. Die Ansätze werden in die Reaktionsröhrchen pipettiert. Nach Zugabe von 25 µl Reagenz 3-Arbeitslösung werden die Ansätze geschüttelt und mittels Photochem®-Gerät (Jena-Analytik) gemessen.

Pipettierschema:

	BW	S1 - S4	Probe
Reagenz 1	1500 µl	1500 µl	1500 µl
Reagenz 2	1000 µl	1000 µl	1000 µl
H ₂ O bidest.	10 µl	-	-
Trolox-Standards	-	10 µl	-
Probe	-	-	10 µl

Auswertung

Die Software „PCLsoft“ berechnet aus der resultierenden Lumineszenzkurve eine Lagphase. Anhand der Lagphasen der Trolox-Standards wird eine Kalibriergerade erstellt, mit deren Hilfe die antioxidative Kapazität der Probe im Vergleich zu Trolox berechnet werden kann.

A.1.1.2 FRAP (Benzie und Strain 1996; Schlesier et al. 2002)**Geräte und Hilfsmittel**

- pH-Meter (WTW Microprocessor pH-Meter 537)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter (595 nm) (Anthos Labtec Instruments, Krefeld, Germany)
- Mikrotiterplatten (96 wells)

Chemikalien

- Natriumacetat-Trihydrat ($\text{NaOOC}_2\text{H}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$)
- konzentrierte Essigsäure ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)
- Salzsäure (32 %ig)
- TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-triazin)
- Eisen(III)-Chlorid-Hexahydrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)
- Eisen(II)-Sulfat-Heptahydrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)
- H_2O -bidest.

Durchführung**a) herzustellende Lösungen**

- 300 mM Acetatpuffer (pH 3,6)
- 40 mM Salzsäure-Lösung
- 10 mM TPTZ-Lösung
- 20 mM Eisen(III)-Chloridlösung
- FRAP-Reagenz:
Acetatpuffer: Eisen(III)-Chloridlösung:TPTZ-Lösung (10:10:1;v/v/v)
- 5 mM Eisen(II)-Sulfat-Stammlösung:
Eisen(II)-Sulfat-Standardreihe: 500 $\mu\text{mol/l}$; 625 $\mu\text{mol/l}$; 1000 $\mu\text{mol/l}$; 1667 $\mu\text{mol/l}$; 2500 $\mu\text{mol/l}$

b) Probenansatz

Die aufgetauten Saft- und Urinproben werden mit H_2O -bidest. verdünnt, die Plasmaproben werden unverdünnt eingesetzt. Die Ansätze werden gemäß dem nachfolgenden Schema in die Vertiefungen (wells) der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe des FRAP-Reagenz wird die Messung sofort gestartet (10 Sek. schütteln, 470 Sek. Wartezeit, Messung der Extinktion bei 595 nm nach insgesamt 8 Min.).

Pipettierschema:

	BW	S1 – S5	Probe
H_2O-bidest.	40 μl	30 μl	30 μl
Fe(II)-Standards	-	10 μl	-
Probe	-	-	10 μl
FRAP-Reagenz	200 μl	200 μl	200 μl

Auswertung

Anhand der Eisen(II)-Sulfat-Kalibrierung lässt sich die antioxidative Kapazität der Probe berechnen.

A.1.1.3 Gesamtphenole nach Folin-Ciocalteu (Singleton und Rossi 1965; Schlesier et al. 2002)

Geräte und Hilfsmittel

- Eppendorf-Schüttler (Eppendorf-Mixer 5432)
- Wasserbad (GFL®)
- Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 C)
- Spektrophotometer Uvidec610 (Jasco, Groß-Umstadt, Germany)
- Kunststoffküvetten (Makro, 1cm Schichtdicke)

Chemikalien

- Salzsäure (HCl)
- Natriumhydroxid (NaOH)
- Methanol (CH₃OH)
- m-Phosphorsäure (m-H₃PO₄)
- Aceton (CH₃COCH₃)
- Natriumcarbonat-Decahydrat (Na₂CO₃ * 10 H₂O)
- Folin-Ciocalteu-Reagenz
- Gallussäure-Monohydrat
- H₂O-bidest.

Durchführung

a) herzustellende Lösungen

- 1 M Salzsäure-Lösung (1,0 mol/l)
- 2 M Natriumhydroxid-Lösung in 75% Methanol
- 750 mM Meta-Phosphorsäure-Lösung (m-H₃PO₄)
- Aceton:Wasser (1:1; v/v)
- Natriumcarbonat-Lösung:
40,5 g Na₂CO₃ * 10 H₂O in 200 ml H₂O-bidest.
- 10% Folin-Ciocalteu-Reagenz
- Gallussäure-Stammlösung (0,558 mmol/l):
10,5 mg Gallussäure-Monohydrat in 100 ml HPLC-H₂O

b) Plasmaaufbereitung (Serafini et al. 1998)

Zu 100 µl Plasma werden 200 µl HCl (1,0 mol/l) gegeben und 60 Sek. geschüttelt. Die Probe wird 30 Min. bei 37 °C inkubiert (Wasserbad), anschließend mit 200 µl NaOH (2,0 mol/l in 75 % Methanol) versetzt, 2 Min. geschüttelt und nochmals 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Nach einem zweiminütigem Mischvorgang erfolgt die Proteinfällung durch Zugabe von 200 µl m-H₃PO₄ (0,75 mol/l). Die Probe wird 60 Sek. geschüttelt und bei 10280 g 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Rückstand wird mit 200 µl Aceton/Wasser (1+1; v/v) versetzt und 5 Min. bei 10280 g zentrifugiert. Die Überstände werden vereinigt, nochmals zentrifugiert (5 Min. bei 10280 g) und davon 200 µl Aliquote zur Analyse verwendet.

c) Probenansatz

Die aufbereiteten Plasmaproben werden unverdünnt zur Analyse verwendet. Die aufgetauten Urin- und Saftproben müssen mit H₂O-bidest. verdünnt werden. Die Ansätze werden gemäß dem nachfolgenden Schema in die Küvetten pipettiert. Die Messung der Extinktion erfolgt nach einer zweistündigen Reaktionszeit bei 750 nm.

Pipettierschema:

	BW	S1	S2	S3	S4	S5	Probe
c [mg/l]	0	21	42	63	84	105	-
Gallussäure-Stammlösung	-	40 µl	80 µl	120 µl	160 µl	200 µl	-
H₂O-bidest.	200 µl	160 µl	120 µl	80 µl	40 µl	-	-
Probe	-	-	-	-	-	-	200 µl
Folin-Reagenz	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Na₂CO₃-Lösung	0,8 ml	0,8 ml	0,8 ml	0,8 ml	0,8 ml	0,8 ml	0,8 ml

Auswertung

Anhand der Gallussäure-Verdünnungsreihe wird eine Kalibriergerade erstellt, über die sich der Gesamtphenolgehalt der untersuchten Probe berechnen lässt.

A.1.1.4 Validierung

R^2 für Kalibriergeraden (PCL, FRAP, Gesamtphenole): $\geq 0,997$; max. Schwankungen in der Messserie ($n = 5$) (PCL, FRAP, Gesamtphenole): $\leq 10 \%$.

A.1.2 HPLC Methoden

A.1.2.1 Anthocyane (Humanstudie I) (Miyazawa et al. 1999; Netzel et al. 2001)

Geräte und Hilfsmittel

- HPLC-System:
 - Pumpe: L-6200 A (Merck Hitachi)
 - Autosampler: AS-2000 A (Merck Hitachi)
 - Detektoren: L-4250 UV-Vis (Merck Hitachi)
PDA 990 (Waters, Eschborn)
 - Integrator: D-2500 (Merck Hitachi)
 - Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18, 4x4 mm, 5 µm (Merck)
 - Analytische Säule: Hyperchrome Prontosil Eurobond C18, 250x4 mm, 5 µm (Bischoff)

Chemikalien

- Ameisensäure, konzentriert
- Acetonitril
- H₂O-bidest.
- Standards:
 - Cyanidin 3-Glukosid
 - Delphinidin 3-Glukosid
 - Peonidin 3-Glukosid
 - Petunidin 3-Glukosid
 - Malvidin 3-Glukosid

Durchführung

a) herzustellende Lösungen

- Mobile Phase:
 - A: H₂O-bidest.:Ameisensäure:Acetonitril (87:10:3; v:v:v)
 - B: Acetonitril: H₂O-bidest.:Ameisensäure (50:40:10; v:v:v)
- Standard-Lösungsmittel: 2%ige Ameisensäure
- Kalibriergeraden und Validierung:

Für jedes Anthocyan wurde eine separate Kalibrierung durchgeführt (n = 6 Konzentrationen, 3 Wiederholungen/Konzentration; r^2 (Durchschnitt) = 0,998; Konzentrationsbereich: 0,65 - 800 ng/ml; Wiederfindung: ≥ 79 %; max. Schwankungen in der Messreihe (n = 5): $\leq 10,4$ %)

b) HPLC Bedingungen

- Flow: 0,8 ml/Min.
- Injektionsvolumen: 100 µl
- Raumtemperatur
- Wellenlänge: 520 nm
- Gradient:

Min.	%A	%B
0	90	10
10	75	25
15	69	31
20	60	40
30	50	50
40	0	100
45	0	100
50	90	10

c) Aufarbeitung der Plasmaproben (Anthocyane) (Miyazawa et al. 1999)**Geräte und Hilfsmittel**

- SepPacPlus C18-Kartuschen
- Rotationsverdampfer
- Reaktionsgefäße
- Vacuum Manifold

Chemikalien

- Methanol
- Ameisensäure
- Trifluoressigsäure (TFA)
- Dichlormethan
- Benzol
- H₂O-bidest.

Durchführung**1) herzustellende Lösungen**

- 1,5 M Ameisensäure
- 0,44 M Trifluoressigsäure in H₂O-bidest.
- 0,44 M Trifluoressigsäure in Methanol

2) Extraktion

Die Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgte mittels Festphasenextraktion, die in Abbildung A1 dargestellt ist. Die Kartuschen werden mit 10 ml Methanol aktiviert und mit 10 ml 1,5 M Ameisensäure equilibriert. Anschließend wird 1 ml Plasma auf die Kartusche gegeben und mit nacheinander mit jeweils 10 ml 1,5M Ameisensäure, Dichlormethan und Benzol gewaschen. Die Elution erfolgt mit 10 ml 0,44 M methanolischer Trifluoressigsäure. Das Eluat wird bei 30°C unter Vakuum bis zur Trockne eingengt und mit 250 µl HPLC Mobiler Phase wieder aufgenommen. Hundert µl davon wurden für die HPLC-Analyse verwendet.

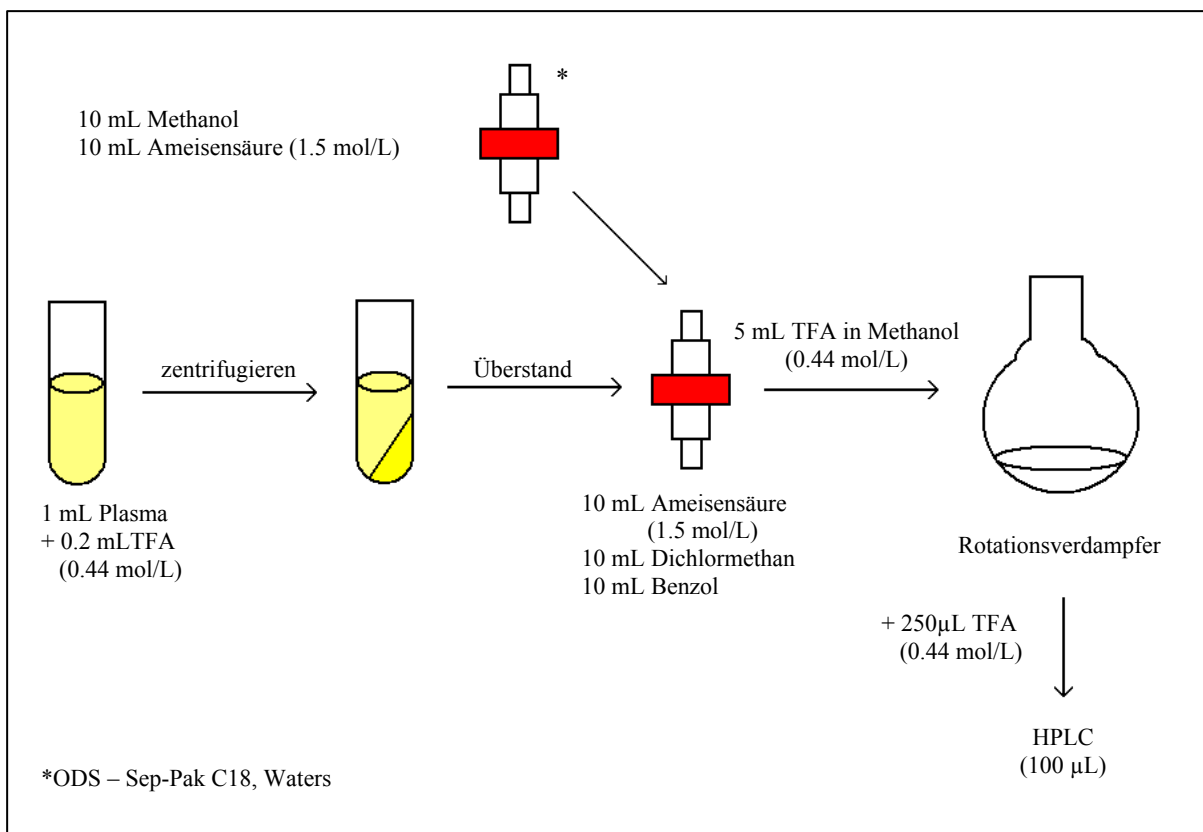


Abb. A1: Plasmaaufbereitung mittels Festphasenextraktion (Anthocyane; schematisch)

d) Aufarbeitung der Urinproben (Anthocyane) (Netzel et al. 2001)

Geräte und Hilfsmittel

- Rotationsverdampfer
- Reaktionsgefäße (Eppendorf)

Chemikalien

- Methanol
- Acetonitril
- HCL (32%)
- H₂O-bidest.
- Ameisensäure

Durchführung

herzustellende Lösungen

- Equilibrierlösung: 1 % HCl
- Elutionslösung: 1 % methanolische HCl
- Lösung für Rückverdünnung der einrotierten Proben: 81 % H₂O, 9 % Ameisensäure, 10 % Acetonitril

Auswertung

Die Konzentrationen der individuellen Anthocyane wurden mit Hilfe der erstellten Kalibriergeraden berechnet.

A.1.2.2 Polyphenole (Humanstudie II) (Schieber et al. 2001)

Geräte und Hilfsmittel

- Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- HPLC-System:
 - Pumpe: L-6200 A (Merck Hitachi)
 - Autosampler: AS-2000 A (Merck Hitachi)
 - Detektoren: L-4250 UV-Vis (Merck Hitachi)
PDA 990 (Waters, Eschborn)
 - Integrator: D-2500 (Merck Hitachi)
 - Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18, 4x4 mm, 5 µm (Merck)
 - Analytische Säule: Hyperchrome Prontosil Eurobond C18, 250x4 mm, 5 µm (Bischoff)

Chemikalien

- Essigsäure, konzentriert
- Acetonitril
- H₂O-bidest.
- Standards:
 - Chlorogensäure
 - Phloridzin
 - Phloretin
 - Phloretin-2-Xyloglukosid
 - p-Cumaroylchinasäure
 - Epicatechin
 - Procyanidin B2

Durchführung

a) herzustellende Lösungen

- Mobile Phasen:
 - A: H₂O-bidest.:Essigsäure (konz.) (98:2; v:v)
 - B: Acetonitril: H₂O-bidest.:Essigsäure (50:49:1; v:v:v)
- Standard-Lösungsmittel: Methanol / Essigsäure / H₂O-bidest. (50:5:45; v:v:v)
- Kalibriergeraden und Validierung:

Für jedes Polyphenol wurde eine separate Kalibrierung durchgeführt (n = 6 Konzentrationen, 3 Wiederholungen/Konzentration; r^2 (Durchschnitt) = 0,997; Konzentrationsbereich: 1,0 - 1600 ng/ml; Wiederfindung: ≥ 85 %; max. Schwankungen in der Messreihe (n = 5): $\leq 9,8$ %)

b) HPLC Bedingungen

- Flow: 1,0 ml/Min.
- Injektionsvolumen: 100 µl
- Raumtemperatur
- Wellenlängen: 280 nm, 320 nm und 360 nm
- Gradient:

Min.	%A	%B
0	90	10
55	45	55
60	0	100
65	90	10
70	90	10

c) Aufarbeitung der Urinproben (Polyphenole) (Felgines et al. 2003)**Geräte und Hilfsmittel**

- SepPacVac C18-Kartuschen (Waters)
- Rotationsverdampfer
- Reaktionsgefäße (Eppendorf)

Chemikalien

- Methanol
- Acetonitril
- HCL (32%)
- H₂O-bidest.
- Ameisensäure

Durchführung**1) herzustellende Lösungen**

- Equilibrierlösung: 1 % HCL
- Elutionslösung: 1 % methanolische HCL
- Lösung für Rückverdünnung der einrotierten Proben: 81 % H₂O, 9 % Ameisensäure, 10 % Acetonitril

2) Extraktion

Die Aufarbeitung der Urinproben erfolgte mittels Festphasenextraktion, die in Abbildung A2 dargestellt ist. Die Kartuschen werden mit 10 ml Methanol aktiviert und mit 10 ml 1%iger HCL-Lösung equilibriert. Anschließend werden 18 ml Urin auf die Kartusche gegeben und mit 10 ml 1 % HCL-Lösung gewaschen. Die Elution erfolgt mit 10 ml methanolischer HCL-Lösung (1%). Das Methanol/Polyphenol/HCL-Gemisch wird bei 38°C unter Vakuum auf etwa 1 ml eingengt. Hundert µl davon wurden für die HPLC-Analyse verwendet.

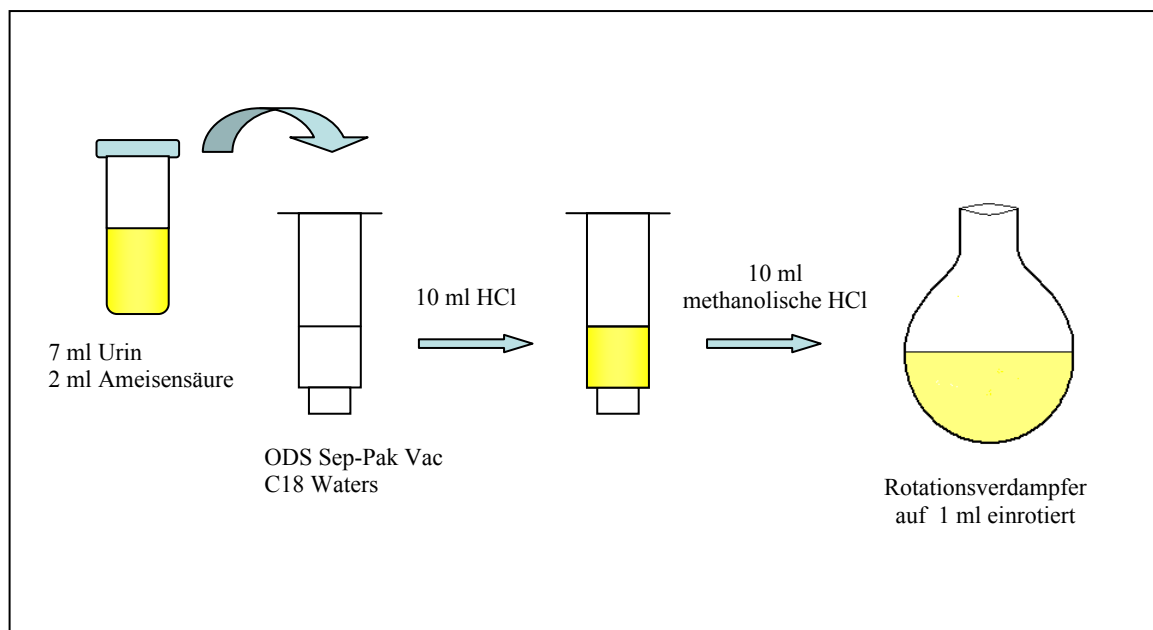


Abb. A2: Urinaufbereitung mittels Festphasenextraktion (Polyphenole; schematisch)

Auswertung

Die Konzentrationen der individuellen Polyphenole wurden mit Hilfe der erstellten Kalibriergeraden berechnet.

A.1.2.3 Hippursäure (Kubota et al. 1988)

Geräte und Hilfsmittel

- Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- HPLC-System:
 - Pumpe: L-6200 A (Merck Hitachi)
 - Autosampler: AS-2000 A (Merck Hitachi)
 - Detektoren: L-4250 UV-Vis (Merck Hitachi)
PDA 990 (Waters, Eschborn)
 - Integrator: D-2500 (Merck Hitachi)
 - Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18, 4x4 mm, 5 µm (Merck)
 - Analytische Säule: Hyperchrome Prontosil Eurobond C18, 250x4 mm, 5 µm (Bischoff)

Chemikalien

- H₂O-bidest. (Millipore Milli-Q® Synthesis A10)
- Essigsäure (konzentriert)
- Acetonitril
- Standard: Hippursäure

a) herzustellende Lösungen

- Mobile Phase:
Acetonitril: H₂O-bidest.:Essigsäure (35:63:2, v/v/v)
- Standardlösungsmittel (Mobile Phase)
- Kalibriergeraden und Validierung:
Kalibrierung (n = 6 Konzentrationen, 3 Wiederholungen/Konzentration; $r^2 = 0,998$;
Konzentrationsbereich: 10 - 1500 µg/ml; Wiederfindung: $\geq 88 \%$; max. Schwankungen in
der Messreihe (n = 5): $\leq 10,1 \%$

b) HPLC Bedingungen

- Flow: 1,0 ml/Min.
- Injektionsvolumen: 100 µl
- Raumtemperatur
- Wellenlänge: 235 nm
- Isokratisch (Analysenzeit: 15 Min.)

c) Probenaufbereitung

Die Urinproben wurden mit H₂O-bidest. verdünnt (1:100 bis 1:500) und anschließend zentrifugiert (5 Min., 20000 g).

Auswertung

Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der erstellten Hippursäure-Kalibriergeraden berechnet.

A.1.2.4 Ascorbinsäure und Harnsäure (Ross 1994; Vasquez-Oderiz et al. 1994)

Geräte und Hilfsmittel

- Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- HPLC-System:
 - Pumpe: L-6200 A (Merck Hitachi)
 - Autosampler: AS-2000 A (Merck Hitachi)
 - Detektoren: L-4250 UV-Vis (Merck Hitachi)
PDA 990 (Waters, Eschborn)
 - Integrator: D-2500 (Merck Hitachi)
 - Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18, 4x4 mm, 5 µm (Merck)
 - Analytische Säule: Hyperchrome Prontosil Eurobond C18, 250x4 mm, 5 µm (Bischoff)

Chemikalien

- Meta-Phosphorsäure (m-H₃PO₄)
- Natriumhydroxid (NaOH)
- Ascorbinsäure
- Harnsäure
- Schwefelsäure (H₂SO₄)
- H₂O-bidest.

Durchführung

a) herzustellende Lösungen

- m-H₃PO₄ (5 %, 10 %, 20 %)
- NaOH-Lösung (15 %)
- Mobile Phase:
 - H₂O-bidest. mit H₂SO₄ ansäuern (pH 2,2)
- Standardlösungsmittel für Ascorbinsäure: 5%ige m-H₃PO₄
- Standardlösungsmittel für Harnsäure: 0.1%ige NaOH
- Kalibriergeraden und Validierung:

Für Ascorbinsäure und Harnsäure wurde eine separate Kalibrierung durchgeführt (n = 6 Konzentrationen, 3 Wiederholungen/Konzentration; r^2 (Durchschnitt) = 0,997; Konzentrationsbereiche: Ascorbinsäure: 0,6 - 600 µg/ml, Harnsäure: 8 - 8000 µg/ml;

Wiederfindung (beide Substanzen): $\geq 82 \%$; max. Schwankungen in der Messreihe ($n = 5$)
(beide Substanzen): $\leq 10,3 \%$

b) HPLC Bedingungen

- Flussrate: 0,8 ml/Min.
- Injektionsvolumen: 100 μ l
- Raumtemperatur
- Wellenlänge: 245 nm
- Isokratisch (Analysenzeit: 25 Min.)

c) Probenaufbereitung und -ansatz

Die mit 10 %iger m-H₃PO₄ stabilisierten Plasmaproben (250 μ l m-H₃PO₄/250 μ l Plasma) bzw. die mit 20 %iger m-H₃PO₄ versetzten Urinproben (100 μ l m-H₃PO₄/ml Urin) wurden zentrifugiert (5 Min., 20000 g) und mit H₂O-bidest. verdünnt. Die Studiengetränke wurden zentrifugiert (5 Min., 20000 g) und mit 5%iger m-H₃PO₄ verdünnt.

Auswertung

Die Ascorbinsäure- und Harnsäurekonzentrationen wurden mit Hilfe der erstellten Ascorbinsäure- und Harnsäure-Kalibriergeraden berechnet.

A.1.2.5 Malondialdehyd (Volpi & Tarugi 1998)

Geräte und Hilfsmittel

- Reaktionsgefäße (Eppendorf)
- HPLC-System:
 - Pumpe: L-6200 A (Merck Hitachi)
 - Autosampler: AS-2000 A (Merck Hitachi)
 - Detektoren: L-4250 UV-Vis (Merck Hitachi)
PDA 990 (Waters, Eschborn)
 - Integrator: D-2500 (Merck Hitachi)
 - Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18, 4x4 mm, 5 μ m (Merck)
 - Analytische Säule: Hyperchrome Prontosil Eurobond C18, 125x4 mm, 5 μ m (Bischoff)

Chemikalien

- Natriumacetat Trihydrat
- Dinatriumhydrogenphosphat
- 2-Thiobarbitursäure,4,6-Dihydroxypyrimidin-2-thiol (TBA)
- Butyliertes Hydroxytoluen (BHT)
- Ethanol
- o-Phosphorsäure (85%)
- Methanol
- Malonaldehyd-bis(dimethylacetal)
- 1% ige Schwefelsäure

Durchführung

a) herzustellende Lösungen

- 1 M Natriumacetat-Puffer pH 3,5
- 0,2% (w/v) TBA in 1 M Natriumacetat-Puffer (TBA-Lösung)
- 5% BHT in 96% Ethanol (BHT-Lösung)

- 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0
- Mobile Phase:
 - 35% Methanol 50mM:Natrium-Phosphat-Puffer (pH 7,0) (35:65; v:v)
- Standard Stammlösung (c=60,7 mmol/l): 1 ml TMP (1,1,3,3-Tetramethoxypropan 99%, [Sigma] Malonaldehyde-bis(dimehtylacetal) ($\rho=0,997\text{g/ml}$) auf 100 ml mit 1% iger Schwefelsäure auffüllen, 2 Std. bei Zimmertemperatur zur vollständigen Hydrolyse stehen lassen (Esterbauer et al. 1990)
- Kalibriergeraden und Validierung:
Kalibrierung (n = 6 Konzentrationen, 3 Wiederholungen/Konzentration; $r^2 = 0,996$; Konzentrationsbereich: 0,15 - 3,0 $\mu\text{mol/l}$; Wiederfindung: $\geq 83 \%$; max. Schwankungen in der Messreihe (n = 5): $\leq 9,7 \%$

b) HPLC Bedingungen

- Flow: 1 ml/Min.
- Injektionsvolumen: 100 μl
- Raumtemperatur
- Ex: 515 nm; Em: 553 nm
- Isokratisch (Analysenzeit: 15 Min.)

c) Probenaufbereitung

Urinproben (bzw. MDA-Standards) werden bei Raumtemperatur aufgetaut, geschüttelt und wie folgt verdünnt:

- 100 μl Urin (bzw. MDA Standard)
- + 1 ml TBA-Lösung
- + 10 μl BHT-Lösung

Reaktionsansätze gut mischen und 45 Min. bei 95°C im Wasserbad inkubieren. Anschließend die Proben unter fließendem Wasser abkühlen und zentrifugieren (10 Min. bei 20000 g). Ein Volumen von 100 μl wurde für die HPLC Analyse verwendet.

Auswertung

Die MDA-Konzentrationen wurden mit Hilfe der erstellten MDA-Kalibriergeraden berechnet.

A.1.2.6 HPLC-ESI-MS/MS (extern durchgeführt)

Die LC-MS Analysen wurden, wie im Kapitel "Material und Methoden" erwähnt, von Herrn Dr. Dietmar Kammerer (Universität Hohenheim, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, LS Lebensmittel pflanzlicher Herkunft) durchgeführt.

Nachfolgend sind deshalb nur die Basisparameter der Methode aufgeführt:

A. Anthocyane (Humanstudie I)

- Mobile Phase/Eluent: 81 % H₂O-bidest., 10 % Acetonitril, 9 % Ameisensäure (v/v/v); isokratisch
- Analysendauer (total): 45 Min.
- Flow: 1 ml/Min.
- Detektion (DAD): 520 nm
- MS-System: Esquire 3000+; Ion Trap
- MS-Bedingungen: ESI positiv; Auto-Fragmentierung bzw. manuelle Isolierung und Fragmentierung einzelner Ionen; Nebulizer: 70 psi; Dry Gas: 12 l/Min.; Dry Temp.: 365°C; Trap Drive: 49,1; Octopole RF: 189,3 Vpp; Lens 1: -5,8 V; Lens 2: 72,0 V; Capillary Exit: 144,3 V; HV Capillary: 4025 V; Scan-Bereich: 50-1000 m/z; Auto MS² bzw. manuelle Fragmentierung der Monoglukoside

B. Polyphenole (Humanstudie II)

- Mobile Phasen/Eluenten: A (20 ml Essigsäure/l); B (5 ml Essigsäure + 500 ml Acetonitril/l); Gradientenelution
- Analysendauer (total): 90 Min.
- Flow: 1 ml/Min.
- Detektion (DAD): 280 nm, 320 nm, 370 nm; Spectra 200 - 600 nm
- MS-System: Esquire 3000+; Ion Trap
- MS-Bedingungen: ESI negativ; Auto-Fragmentierung bzw. manuelle Isolierung und Fragmentierung einzelner Ionen; Nebulizer: 70 psi; Dry Gas: 12 l/Min.; Dry Temp.: 365°C; Trap Drive: 49,8; Octopole RF: 120 Vpp; Lens 2: 60,0 V; Capillary Exit: -121,0 V; HV Capillary: 4000 V; Scan-Bereich: 50-1000 m/z; Fragmentierungsampl.: 1,0 V

A.2 Roh- und Einzeldaten**A.2.1 Humanstudie I (Hauptstudie)****A.2.1.1 Probandenprofile**

Proband	Geschlecht	Alter	Gewicht (kg)	Größe (m)	BMI
A	♀	30	57	1,67	20,4
B	♀	27	69	1,62	26,3
C	♂	26	71	1,90	19,7
D	♂	27	78	1,77	24,9
E	♀	27	66	1,81	20,2
F	♂	34	76	1,70	26,3
G	♂	29	76	1,81	23,2
H	♀	24	57	1,68	20,2
I	♀	25	65	1,73	21,7
Ø		27,7	68,3	1,74	22,5
STABW		3,0	7,8	0,01	2,7

A.2.1.2 Anthocyane: individuelle Plasmakonzentrationen (ng/ml)

RTSK							
Proband	0	15	30	60	90	120	180
A	0	124,6	337,0	136,6	98,9	61,7	51,3
B	0	118,8	202,3	124,7	98,2	74,7	61,9
C	0	52,7	66,9	60,5	52,8	45,5	36,4
D	0	49,7	97,1	102,9	72,2	54,4	38,6
E	0	43,5	64,4	52,8	48,8	41,0	31,8
F	0	27,7	55,8	45,6	38,1	31,1	26,8
G	0	47,4	80,5	65,0	46,3	33,3	24,4
H	0	45,1	86,3	66,9	49,3	36,7	23,8
I	0	44,0	86,3	70,3	46,1	28,6	20,2
Lemberger							
Proband	0	15	30	60	90	120	180
A	0	26,0	30,9	33,9	38,9	35,4	25,6
B	0	28,0	34,0	36,7	44,5	41,3	32,5
C	0	29,3	31,4	32,6	36,6	31,2	23,8
D	0	33,2	40,9	43,7	52,9	43,0	33,1
E	0	29,7	32,3	35,8	47,7	44,7	31,5
F	0	36,2	39,0	41,3	46,6	37,9	25,4
G	0	40,2	44,2	49,1	48,3	31,4	18,5
H	0	23,9	29,0	31,4	32,1	23,9	17,1
I	0	31,1	38,2	41,3	38,9	34,1	24,7

A.2.1.3 Anthocyane: individuelle Plasma AUCs, C_{max}- und t_{max}-Werte

Proband	RTSK			Lemberger		
	AUC (0-3) (ng*Std./ml)	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (Std.)	AUC (0-3) (ng*Std./ml)	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (Std.)
A	347,19	337,01	0,50	93,95	38,95	1,50
B	303,96	202,33	0,50	107,76	44,56	1,50
C	147,29	66,93	0,50	89,11	36,64	1,50
D	196,49	102,90	1,00	120,93	52,99	1,50
E	134,85	80,53	0,50	108,21	49,15	1,00
F	132,48	64,40	0,50	108,92	46,69	1,50
G	106,39	55,75	0,50	110,68	47,76	1,50
H	141,13	86,29	0,50	75,20	32,14	1,50
I	133,09	86,26	0,50	100,22	41,30	1,00

A.2.1.4 Anthocyane: individuelle Urinwerte (µg/Std.)

RTSK									
Proband	0	1	2	3	4	5	6	7	Gesamt
A	0	823,47	401,34	210,05	82,39	63,44	53,89	11,83	1646,4
B	0	681,02	302,77	121,72	73,17	71,01	45,67	16,34	1311,7
C	0	251,45	158,23	53,78	47,79	15,07	12,7	9,92	548,9
D	0	228,23	239,57	136,25	79	53,12	26,34	13,03	775,5
E	0	54,57	137,79	71,82	40,65	23,5	14,84	9,56	352,7
F	0	50,46	86,11	28,37	23,545	19,66	12,59	4,36	225,1
G	0	182,38	157,05	104,56	73,85	55,76	30,53	21,64	625,8
H	0	181,05	150,98	116,65	76,06	53,71	33,74	18,82	631,0
I	0	210,42	168,84	122,01	93,76	72,75	53,113	30,51	751,4

Lemberger									
Proband	0	1	2	3	4	5	6	7	Gesamt
A	0	138,37	226,00	129,17	96,76	51,26	13,21	6,02	660,8
B	0	90,71	148,72	142,26	106,15	93,72	54,54	37,26	673,4
C	0	89,77	96,22	91,39	79,61	53,44	24,16	19,22	453,8
D	0	120,96	114,81	135,94	70,92	42,09	28,35	24,96	538,0
E	0	104,82	206,53	62,63	43,95	35,11	23,72	17,76	494,5
F	0	78,29	115,68	74,90	50,07	47,55	34,13	12,55	413,1
G	0	76,21	130,97	89,06	60,98	40,87	26,61	18,75	443,4
H	0	79,99	114,23	79,90	57,71	44,18	29,60	16,13	421,7
I	0	65,76	112,37	83,04	57,97	40,22	25,77	14,76	399,9

A.2.1.5 Gesamtphenole: Plasmakonzentrationen nach RTSK und Rotwein**Tab. A1:** Gesamtphenole im Plasma (unkorrigiert) – Einzelwerte (mg GAE/l Plasma)

RTSK							
Proband	0	15	30	60	90	120	180
A	11,3	13,8	16,3	13,0	11,9	12,9	15,1
B	13,2	14,3	18,3	14,3	11,9	11,7	10,6
C	14,3	12,2	16,7	11,8	10,9	10,6	12,5
D	12,7	14,8	17,6	12,9	14,6	17,4	12,9
E	17,6	27,4	29,0	26,8	19,4	15,5	15,5
F	14,2	16,4	17,5	15,3	14,5	14,0	14,2
G	15,7	18,8	20,6	17,7	15,4	15,1	15,3
H	16,5	21,3	22,5	18,8	17,2	16,7	16,5
I	17,1	20,9	23,0	17,9	17,1	14,8	17,9
MW	14,7	17,8	20,2	16,5	14,8	14,3	14,5
±STABW	2,1	4,8	4,1	4,6	2,8	2,3	2,2
Rotwein							
Proband	0	15	30	60	90	120	180
A	11,4	11,4	13,4	12,1	10,1	14,3	11,4
B	10,6	11,0	13,1	10,9	11,4	10,2	11,5
C	13,5	12,5	14,4	10,3	12,2	9,8	9,7
D	15,7	16,1	19,5	15,4	13,6	12,3	13,4
E	13,7	14,2	18,5	14,8	13,9	13,6	13,3
F	12,5	13,8	15,9	14,0	12,8	12,7	12,7
G	11,1	12,0	13,6	12,9	12,5	12,7	13,5
H	10,9	12,3	14,2	12,0	11,7	11,4	11,6
I	13,1	13,3	16,0	8,8	11,0	10,1	11,2
MW	12,5	12,9	15,4	12,4	12,2	11,9	12,0
±STABW	1,7	1,6	2,3	2,2	1,3	1,6	1,3

Tab. A2: Pharmakokinetische Parameter (Gesamtphenole im Plasma)

Getränk	Dosis/Proband (mg GAE)	Nüchternkonz.¹ (mg GAE/l)	C_{max}¹ (mg GAE/l)	relative Änderung² (%)
RTSK	402	14,7 ± 2,1	20,2 ± 4,1*	+37
Rotwein	704	12,5 ± 1,7	15,4 ± 2,3*	+23

¹arith. Mittelwerte ± StAbw.; (n = 9); ²im Vergleich zur Nüchternkonzentration; *p ≤ 0,05

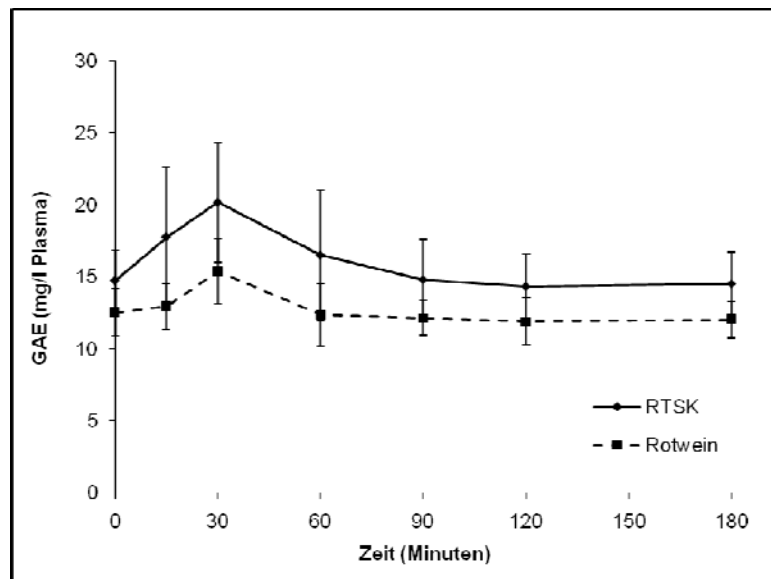


Abb. A3: Gesamtphenole: Konzentrations-Zeit-Profile im Plasma nach RTSK und Rotwein (arith. Mittelwerte $\pm$ StAbw., $n = 9$)

A.2.2 Humanstudie II**A.2.2.1 Probandenprofile**

Proband	Geschlecht	Alter	Gewicht (kg)	Größe (m)	BMI
A	♀	23	60	1,52	26,0
B	♀	24	61	1,68	21,6
C	♀	24	61	1,75	19,9
D	♀	27	72	1,58	28,8
E	♀	24	51	1,60	19,9
F	♀	29	69	1,62	26,3
G	♀	23	58	1,64	21,6
H	♀	28	55	1,69	19,3
Ø		25,3	60,9	1,64	22,9
STABW		2,4	6,9	0,07	3,59

A.2.2.2 PCL, FRAP und Gesamtphenole im Urin: mit Ascorbin- & Harnsäure (unkorrigiert) und abzüglich Ascorbin- & Harnsäure (korrigiert)
Tab. A3 (I): PCL im Urin – Einzelwerte (µmol TE/24 Std.)

	AA-HS korrigiert		unkorrigiert	
	WTWAS	Kontrolle	WTWAS	Kontrolle
A	2957,9	2025,4	4364,9	2644,1
B	3289,0	1636,7	4792,7	3210,4
C	2525,8	1852,4	4778,3	2546,9
D	1949,8	2398,8	4553,2	3243,3
E	3049,8	1875,0	4652,5	2853,3
F	2639,0	1107,9	4585,2	3164,6
G	2061,5	1860,1	4401,3	3044,4
H	3059,6	2135,1	4372,7	2915,9
MW	2691,6	1861,4	4562,6	2952,9
±STABW	488,4	379,7	172,9	260,6

Tab. A3 (II): FRAP im Urin – Einzelwerte ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/24 \text{ Std.}$)

	AA-HS korrigiert		unkorrigiert	
	WTWAS	Kontrolle	WTWAS	Kontrolle
A	3514,9	2810,5	4811,4	3596,7
B	3172,9	2152,8	4720,9	3960,6
C	2706,9	2553,4	5107,8	3618,1
D	2460,5	2162,9	5090,9	3633,7
E	3037,8	2153,4	5022,2	3930,4
F	3038,5	1923,4	5108,8	3789,6
G	2962,5	1979,6	5109,1	3780,7
H	3616,3	2323,7	4907,1	3447,1
MW	3063,8	2257,5	4984,8	3719,6
±STABW	382,5	297,0	153,2	176,5

Tab. A3 (III): Gesamtphenole im Urin – Einzelwerte (mg GAE/24 Std.)

	AA-HS korrigiert		unkorrigiert	
	WTWAS	Kontrolle	WTWAS	Kontrolle
A	696,0	465,3	789,9	517,1
B	508,8	408,9	687,3	682,9
C	604,9	545,6	913,0	612,3
D	466,1	401,4	867,0	607,7
E	634,6	421,9	903,1	631,5
F	610,2	319,8	898,8	801,0
G	507,2	351,7	890,5	605,3
H	607,9	481,9	668,5	594,5
MW	580,0	424,6	827,2	631,5
±STABW	76,7	72,4	100,9	82,3

Tab. A3 (IV): PCL, FRAP und Gesamtphenole im 24 Std. Urin (Übersicht): unkorrigiert (mit Ascorbin- & Harnsäure) und korrigiert (abzüglich Ascorbin- & Harnsäure)

	mit Ascorbin- & Harnsäure		ohne Ascorbin- & Harnsäure	
	Kontrolle	WTWAS	Kontrolle	WTWAS
Gesamtphenole (mg GAE/24 Std.)	631,5 ± 82,3*	827,2 ± 100,9	424,6 ± 72,4*	580,0 ± 76,7
PCL ($\mu\text{mol TE}/24 \text{ Std.}$)	2952,9 ± 260,6*	4562,6 ± 172,9	1861,4 ± 379,7*	2691,6 ± 488,4
FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/24 \text{ Std.}$)	3719,6 ± 176,6*	4984,8 ± 153,2	2257,5 ± 297,0*	3063,8 ± 382,5

Daten: arith. Mittelwerte ± StAbw. (n = 8); * $p \leq 0,05$ (Kontrolle vs. WTWAS)

A.2.2.3 Hippursäure, Harnsäure und Ascorbinsäure: individuelle Urinwerte**Tab. A4:** Hippursäure (mg/24 Std.)

Proband	WTWAS	Kontrolle
A	445,5	167,9
B	962,7	461,6
C	853,8	237,9
D	894,3	183,6
E	630,5	148,7
F	454,9	136,4
G	745,6	131,6
H	765,8	384,6

Tab. A5: Harnsäure (mg/24 Std.)

Proband	WTWAS	Kontrolle
A	436,6	386,8
B	476,2	516,8
C	493,4	452,1
D	534,0	468,1
E	472,4	509,4
F	457,0	534,6
G	527,6	513,1
H	390,7	458,1

Tab. A6: Ascorbinsäure (mg/24 Std.)

Proband	WTWAS	Kontrolle
A	85,14	18,35
B	71,54	25,69
C	79,91	16,5
D	60,92	24,05
E	80,42	19,82
F	105,17	59,01
G	54,50	22,70
H	53,55	17,76

A.2.3 Humanstudie III

A.2.3.1 Zutatenliste Antiox-Getränk

Zucker, Maltodextrin, Dextrose,
 Saftkonzentrat (8,8 %) [Heidelbeersaft-, Holunderbeersaft- und Johannisbeersaftkonzentrate],
 Schwarzes Karottenpulver (2,4 %),
 Säuerungsmittel (Citronensäure),
 Apfelpektin,
 Guarkernmehl,
 Hibiskusextrakt (1,2 %), Himbeerblätterextrakt (0,59 %), Hagebuttenextrakt (0,59 %),
 Brombeerblätterextrakt (0,59 %), Aroma, Vitamin C, Säuerungsmittel (Natriumcitrat).

Eine Portionspackung (15 g Instantpulver) enthielt ca.180 mg Polyphenole (Folin-Ciocalteu Methode) und ca. 25 mg Vitamin C (HPLC).

A.2.3.2 Probandenprofile

Proband	Geschlecht	Alter	Gewicht (kg)	Größe (m)	BMI
A	♂	23	83	1,67	29,8
B	♀	24	62	1,63	23,3
C	♀	23	51	1,62	19,4
D	♀	26	63	1,68	22,3
E	♀	22	56	1,68	19,8
F	♀	25	59	1,63	22,2
Ø		23,8	62,33	1,65	22,8
STABW		1,5	11,02	0,03	3,7

A.2.3.3 PCL, FRAP, Gesamtphenole und Ascorbinsäure: individuelle Plasmakonzentrationen und AUCs

Tab. A7: PCL(µmol TE/l bzw. AUC in µmol TE * Std./l)

Antiox-Getränk						
Zeit (Std.)	A	B	C	D	E	F
0	142,55	86,12	74,50	107,21	88,84	90,67
0,5	177,68	91,18	95,38	112,70	104,42	105,83
1	195,16	102,58	99,65	121,04	95,11	107,91
1,5	192,05	125,71	103,75	126,94	109,36	111,35
2	190,48	96,81	98,92	115,08	93,15	96,10
2,5	170,31	103,09	99,23	114,11	87,79	96,92
3	152,94	94,66	91,00	118,78	87,68	90,45
4	160,48	99,72	86,74	118,28	79,62	91,02
6	179,11	111,29	93,14	107,85	79,80	84,47
8	188,99	99,84	65,83	110,06	78,34	82,36
10	172,42	90,21	67,90	106,29	80,85	77,62
AUC	337	153	124	58,5	23,1	32,5

Kontrolle						
Zeit (Std.)						
0	180,57	112,80	105,68	135,77	93,99	95,59
0,5	179,29	110,92	87,08	134,63	86,75	95,89
1	181,62	96,78	96,52	124,01	86,20	92,49
1,5	176,97	98,68	98,99	121,19	84,58	96,73
2	177,59	102,39	81,75	121,66	79,21	94,17
2,5	181,72	107,11	84,13	128,07	84,78	96,71
3	185,69	106,10	84,63	128,74	85,85	96,59
4	165,89	102,76	73,57	125,90	79,94	94,25
6	158,06	99,70	70,91	111,85	78,41	92,79
8	175,99	92,78	91,12	123,27	83,72	86,49
10	181,34	96,88	77,87	132,87	76,14	89,87
AUC	2,60	0,00	0,00	0,00	0,00	1,50

Tab. A8: FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{l}$ bzw. AUC in $\mu\text{mol Fe}^{2+*} \text{ Std./l}$)

Antiox-Getränk						
Zeit (Std.)	A	B	C	D	E	F
0	808,65	646,10	452,53	478,95	543,95	527,25
0,5	865,30	694,90	546,15	485,85	564,85	545,70
1	934,75	673,95	533,40	494,20	529,80	536,55
1,5	933,25	665,35	506,30	487,55	517,05	536,90
2	921,88	662,05	528,70	468,50	533,00	542,50
2,5	910,50	663,70	511,00	476,15	520,60	527,80
3	894,80	664,00	501,30	481,00	514,60	537,80
4	897,75	644,45	457,10	476,80	506,10	536,55
6	890,40	649,90	448,55	452,15	509,65	516,65
8	918,6	650,75	426,3	437,9	478,15	475,45
10	938,25	657,75	454,75	466,05	494,45	495,9
AUC	972	105	223	14,9	8,34	43,5

Kontrolle						
Zeit (Std.)						
0	940,95	685,60	582,05	487,75	510,05	570,31
0,5	947,95	651,75	565,85	482,15	485,95	561,30
1	955,12	672,85	543,35	492,95	489,30	577,90
1,5	959,60	678,20	548,95	480,10	508,50	568,95
2	960,07	661,45	548,10	477,30	476,10	562,25
2,5	924,30	677,90	542,00	489,45	494,20	558,70
3	959,25	653,10	540,65	491,70	474,20	560,95
4	961,95	660,10	494,85	497,10	430,20	557,00
6	977,20	619,55	493,85	455,45	478,80	526,15
8	973,20	643,35	480,90	460,65	400,00	497,85
10	987,62	652,40	467,55	453,70	453,15	558,90
AUC	254	0,00	0,00	11,4	0,00	2,48

Tab. A9: Gesamtphenole (mg GAE/l bzw. AUC in mg GAE * Std./l)

Antiox-Getränk						
Zeit (Std.)	A	B	C	D	E	F
0	11,10	9,52	11,08	10,11	11,89	8,20
0,5	13,43	11,52	12,25	11,53	13,79	8,35
1	13,03	11,25	12,65	10,43	13,43	8,47
1,5	13,52	11,64	13,29	10,19	13,72	8,81
2	12,33	12,14	11,97	9,98	14,00	8,95
2,5	13,28	11,87	11,13	10,95	12,06	8,14
3	13,68	11,12	11,17	10,36	12,77	7,83
4	13,14	10,95	12,56	10,17	12,87	8,66
6	13,88	10,60	11,41	10,02	12,19	8,32
8	11,83	12,55	12,13	10,95	12,50	8,60
10	10,96	12,18	10,56	10,41	11,71	7,64
AUC	17,0	19,6	7,63	3,45	7,60	2,26

Kontrolle						
Zeit (Std.)						
0	10,79	12,50	10,85	13,96	13,09	17,62
0,5	11,54	11,43	9,34	13,02	12,73	16,87
1	11,01	11,88	10,80	14,09	12,80	14,45
1,5	11,39	11,97	11,08	13,97	12,56	15,11
2	11,37	11,91	10,14	13,78	12,62	16,66
2,5	11,17	12,28	10,68	13,29	12,42	15,57
3	10,42	12,10	10,90	13,48	12,83	16,35
4	10,44	12,45	10,48	12,69	11,29	15,00
6	11,55	11,44	9,08	13,59	13,93	14,72
8	10,92	12,40	11,17	13,90	13,11	15,94
10	11,81	11,52	11,50	12,78	13,04	14,76
AUC	8,11	0,00	1,09	0,04	1,15	0,00

Tab. A10: Ascorbinsäure (mg/l bzw. AUC in mg * Std./l)

Antiox-Getränk						
Zeit (Std.)	A	B	C	D	E	F
0	4,90	5,68	5,09	9,59	9,19	6,75
0,5	5,78	5,91	5,61	12,81	11,45	7,00
1	8,23	7,78	9,40	12,29	12,02	7,09
1,5	10,15	11,95	9,17	14,71	7,75	8,32
2	4,72	7,77	10,45	15,40	6,88	12,33
2,5	5,18	7,99	9,78	15,97	5,40	10,43
3	7,28	6,91	9,16	12,37	7,53	8,74
4	8,55	5,57	9,00	12,63	8,94	7,56
6	4,52	6,03	8,53	12,44	7,24	6,67
8	5,44	6,19	8,42	12,05	6,32	6,75
10	4,89	5,94	6,83	10,26	5,89	6,71
AUC	12,5	9,26	33,7	29,5	2,31	8,32

Kontrolle						
Zeit (Std.)						
0	4,67	5,21	4,89	8,17	10,73	11,79
0,5	4,56	4,84	5,33	7,92	10,31	12,83
1	4,69	4,88	5,12	7,44	10,10	12,76
1,5	4,47	5,08	4,25	7,07	11,54	11,93
2	4,63	5,24	4,42	7,81	10,73	11,12
2,5	4,85	5,18	5,01	7,13	11,02	12,71
3	4,65	5,28	4,01	6,91	11,26	12,49
4	3,86	5,06	3,62	7,14	12,14	12,77
6	4,62	5,44	3,00	7,62	10,24	12,72
8	3,61	5,98	3,50	7,40	10,93	10,16
10	4,08	5,73	3,31	6,31	11,14	11,45
AUC	0,0771	2,45	0,30	0,00	3,28	4,66

A.2.3.4 Harnsäure: individuelle Plasmakonzentrationen (mg/l)

Antiox-Getränk							
Zeit (Std.)	A	B	C	D	E	F	MW ± StAbw
0	36,3	30,1	37,8	36,8	42,6	34,0	36,2 ± 3,7
0,5	32,1	33,9	36,6	40,0	43,2	23,4	34,8 ± 6,3
1	30,3	33,1	42,0	37,6	48,1	29,8	36,8 ± 6,5
1,5	26,2	45,0	39,5	43,5	34,6	32,2	36,8 ± 6,5
2	27,7	29,7	42,0	40,4	33,8	43,2	36,1 ± 6,0
2,5	29,0	25,3	40,0	36,4	25,9	39,7	32,7 ± 6,2
3	33,1	30,4	36,9	42,0	37,4	34,5	35,7 ± 3,6
4	36,4	30,5	41,9	33,4	38,1	23,7	33,9 ± 5,8
6	45,4	32,0	33,8	34,6	36,9	23,0	34,2 ± 6,6
8	30,2	43,3	36,8	39,0	32,3	27,4	34,8 ± 5,4
10	28,6	28,0	34,3	34,7	34,2	34,4	32,3 ± 2,9

Kontrolle							
Zeit (Std.)							
0	44,1	37,8	34,7	35,2	42,9	26,3	36,8 ± 5,9
0,5	40,8	28,6	38,1	41,6	41,4	27,4	36,3 ± 6,0
1	55,2	27,1	37,1	42,7	36,1	28,0	37,7 ± 9,4
1,5	40,8	33,1	34,2	37,2	40,6	24,9	35,1 ± 5,4
2	43,8	36,6	33,1	41,4	40,7	26,8	37,0 ± 5,7
2,5	43,4	38,9	40,2	46,1	39,9	27,5	39,3 ± 5,8
3	43,3	45,8	34,2	31,7	39,9	26,6	36,9 ± 6,7
4	49,2	27,6	32,5	36,8	41,6	27,5	35,8 ± 7,7
6	42,8	23,8	27,4	41,8	36,8	26,3	33,1 ± 7,6
8	43,8	29,8	25,9	45,5	36,8	24,9	34,4 ± 8,1
10	44,5	44,6	25,0	34,2	35,6	27,3	35,1 ± 7,5

A.2.3.5 PCL, FRAP, MDA, Ascorbinsäure, Harnsäure und Hippursäure: individuelle Urinwerte**Tab. A11:** PCL (mmol TE/24 Std.)

Proband	Antiox-Getränk	Kontrolle
A	1,53	1,49
B	2,39	1,60
C	2,35	1,70
D	2,59	1,74
E	3,00	1,79
F	2,77	1,90

Tab. A12: FRAP (mmol Fe²⁺/24 Std.)

Proband	Antiox-Getränk	Kontrolle
A	8,41	5,97
B	8,85	7,03
C	8,03	6,96
D	6,85	6,10
E	7,92	5,12
F	7,43	5,75

Tab. A13: Gesamtphenole (mg GAE/24 Std.)

Proband	Antiox-Getränk	Kontrolle
A	376,2	366,5
B	366,6	218,3
C	332,9	239,6
D	334,7	221,8
E	316,5	231,7
F	339,7	273,7

Tab. A14: MDA ($\mu\text{mol}/24 \text{ Std.}$)

Proband	Antiox-Getränk	Kontrolle
A	1,16	1,42
B	1,51	1,80
C	1,54	2,63
D	1,52	1,80
E	0,99	1,07
F	0,64	1,17

Tab. A15: Ascorbinsäure ($\text{mg}/24 \text{ Std.}$)

Proband	Antiox-Getränk	Kontrolle
A	39,01	11,54
B	35,11	16,88
C	40,96	8,39
D	29,53	9,55
E	96,19	11,24
F	46,30	9,13

Tab. A16: Harnsäure ($\text{mg}/24 \text{ Std.}$)

Proband	Antiox-Getränk	Kontrolle
A	221,72	217,56
B	597,43	246,20
C	238,09	485,66
D	247,95	392,18
E	259,82	262,00
F	267,14	232,44

Tab. A17: Hippursäure ($\text{mg}/24 \text{ Std.}$)

Proband	Antiox-Getränk	Kontrolle
A	310,11	156,95
B	426,52	182,91
C	264,52	151,63
D	183,26	77,90
E	345,05	115,03
F	393,84	208,06

A.2.3.6 Gesamtphenole im Urin: mit Ascorbin- & Harnsäure (unkorrigiert) und abzüglich Ascorbin- & Harnsäure (korrigiert)

Tab. A18: Gesamtphenole im Urin – Einzelwerte (mg GAE/24 Std.)

	AA-HS korrigiert		unkorrigiert	
	AntiOx	Kontrolle	AntiOx	Kontrolle
A	334,7	366,5	416,6	413,5
B	316,5	231,7	526,2	321,3
C	366,6	273,7	517,6	488,4
D	376,2	218,3	520,7	394,7
E	339,7	239,6	502,9	362,8
F	332,9	221,8	485,8	300,4
MW	345*	259	495*	380,2
±STABW	22,5	56,4	41,1	68,1

*p ≤ 0,05 (Kontrolle vs. AntiOx)

FÖRDERHINWEIS UND DANKSAGUNG

Humanstudie I und II wurden aus Mitteln der industriellen Gemeinschaftsforschung (Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie via AiF) über den Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) gefördert. AiF-Projekt Nr. 12225 BG (Humanstudie I) und AiF-Projekt Nr. 13431 BG (Humanstudie II).

Humanstudie III wurde von der Firma Dr. B. Scheffler Nachf. GmbH & Co. KG, Bergisch Gladbach, gefördert.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Irmgard Bitsch für die Überlassung des Themas und ihre wertvolle und andauernde Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn em. Prof. Dr. Roland Bitsch danke ich für die wertvolle fachliche Unterstützung während meiner Zeit an der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Herrn Dr. Thomas Frank danke ich für die Hilfe bei der pharmakokinetischen und statistischen Auswertung der Daten.

Frau Dipl. troph. Caroline Krotz und Frau Dipl. troph. Anke Rossberg danke ich für die Hilfe bei den Laboranalysen.

Bei Frau Prof. Dr. Monika Christmann und Herrn Prof. Dr. Helmut Dietrich möchte ich mich für die Bereitstellung des Lemberger Rotweins sowie der sortenreinen Apfelsäfte bedanken.

Herrn Dr. Dietmar R. Kammerer möchte ich für die HPLC-ESI-MS/MS Analysen danken.

Den Ambulanzschwestern der Klinik für Innere Medizin III der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie Frau PD Dr. Undine Ott und den Ambulanzschwestern der Klinik für Innere Medizin III der Friedrich-Schiller-Universität Jena möchte ich ganz besonders für die Unterstützung und Mitarbeit bei den Humanstudien danken.

Herrn Prof. Dr. Clemens Kunz danke ich für die Übernahme des Co-Referats.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere eidesstattlich, dass ich vorstehende Angaben über die bei der Abfassung meiner Dissertation benutzten Hilfsmittel, über erhaltene Hilfen sowie über frühere Begutachtungen meiner Dissertation, über frühere Meldungen zur Promotion und über die Einreichung der Dissertation zu anderen Prüfungen oder als Preisarbeit, nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

Brisbane, den 06.12.2011

G. Netzel

Gabriele Netzel