

Bioverfügbarkeit und Metabolismus von beta-Carotin und ausgewählten Vitamin E-Verbindungen

von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Oec. troph. Anne-Kathrin Kiene

geboren am 09.02.1979
in Bremen

2007

Referent: Prof. Dr. Andreas Hahn

Koreferent: Prof. Dr. Wilhelm Stahl

Tag der Promotion: 30. November 2007

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis | III |
| 1. Einleitung und Ziel der Arbeit..... | 1 |
| 2. Literaturübersicht..... | 3 |
| 2.1 Nahrungsergänzungsmittel | 3 |
| 2.2 Carotinoide..... | 6 |
| 2.2.1 Vorkommen und Chemie..... | 6 |
| 2.2.2 Stoffwechsel | 9 |
| 2.2.3 Funktionen..... | 10 |
| 2.2.4 Bedarf und Mangel | 11 |
| 2.2.5 Toxizität | 12 |
| 2.3 Vitamin E..... | 14 |
| 2.3.1 Vorkommen und Chemie..... | 14 |
| 2.3.2 Stoffwechsel | 17 |
| 2.3.3 Funktionen..... | 18 |
| 2.3.4 Bedarf und Mangel | 19 |
| 2.3.5 Toxizität | 20 |
| 3. Material und Methoden | 21 |
| 3.1 Material und Geräte | 21 |
| 3.1.1 Chemikalien..... | 21 |
| 3.1.2 Geräte zur HPLC-Analytik | 21 |
| 3.1.3. Sonstige Geräte..... | 22 |
| 3.2 Methoden | 23 |
| 3.2.1 Analytische Verfahren zur Bestimmung von Carotinoiden,Retinol,..... Retinylpalmitat und alpha-Tocopherol in Serum und Chylomikronen | 23 |
| 3.2.2 Bestimmung des Polymorphismus SNP1 im BCO-Gen..... | 26 |
| 3.2.3 Analytische Verfahren zur Bestimmung von alpha-Tocopherylphosphat.. | 26 |
| 3.2.4 Validierung | 28 |
| 3.2.5 Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient von alpha-Tocopherylphosphat... | 30 |
| 3.2.6 Stabilität von alpha-Tocopherylphosphat im Serum | 31 |
| 3.2.7 Analytische Verfahren zur Bestimmung von Tocotrienol und Tocopherol in Serum | 31 |
| 3.2.8 Bestimmung der Hauteigenschaften..... | 32 |

| | |
|---|----|
| 3.3 Humanstudien | 35 |
| 3.3.1 Untersuchungen zur Metabolisierung von beta-Carotin in Abhängigkeit des Polymorphismus SNP1 im beta-Carotin Oxygenase-Gen (BCO-Gen) | 35 |
| 3.3.2 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von alpha-Tocopheryolphosphat beim Menschen | 36 |
| 3.3.3 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Tocotrienolen und deren Einfluss auf Hauteigenschaften beim Menschen | 37 |
| 4. Ergebnisse und Diskussion | 39 |
| 4.1 Untersuchungen zur Metabolisierung von beta-Carotin in Abhängigkeit..... des Polymorphismus SNP1 im beta-Carotin Oxygenase-Gen (BCO-Gen) | 39 |
| 4.1.1 Analytische Verfahren zur Bestimmung von Carotinoiden, Retinol, Retinylpalmitat und alpha-Tocopherol in Serum und Chylomikronen | 39 |
| 4.1.2 Bestimmung des Polymorphismus SNP1 im BCO-Gen..... | 41 |
| 4.1.3 Beta-Carotin Humanstudie | 41 |
| 4.2 Diskussion..... | 52 |
| 4.2.1 Analytische Verfahren zur Bestimmung von Carotinoiden, Retinol, Retinylpalmitat und alpha-Tocopherol in Serum und Chylomikronen | 52 |
| 4.2.2 Analyse des SNP1 im BCO-Gen | 53 |
| 4.2.3 Beta-Carotin Humanstudie | 55 |
| 4.3 Alpha-Tocopheryolphosphat | 57 |
| 4.3.1 Methodenentwicklung zur Bestimmung von alpha-Tocopheryolphosphat..... in Chylomikronen und Serum | 58 |
| 4.3.2 Bestimmung von alpha-Tocopheryolphosphat in Serum- und Chylomikronenproben | 60 |
| 4.3.3 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von alpha-Tocopheryolphosphat beim Menschen | 62 |
| 4.3.4 Untersuchungen zum Einfluss von alpha-Tocopheryolphosphat auf die Hämostase | 71 |
| 4.4 Diskussion..... | 73 |
| 4.4.1 Methodenentwicklung zur Bestimmung von alpha-Tocopheryolphosphat..... in Chylomikronen und Serum | 73 |
| 4.4.2 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und Kinetik von alpha-Tocopheryolphosphat beim Menschen | 74 |

| | |
|---|------|
| 4.5 Cross-over Studie zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit von | |
| Tocotrienolen aus verschiedenen Nahrungssupplementen beim Menschen.... | 79 |
| 4.5.1 Analyse der Nahrungssupplemente..... | 79 |
| 4.5.2 Analyse von Tocotrienol- und Tocopherol in Serum mittels HPLC | 82 |
| 4.5.3 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Tocotrienolen | |
| (Einmalapplikation) | 83 |
| 4.5.4 Untersuchungen zum Einfluss einer 12 Wochen Supplementierung | |
| mit TocoPlus auf Hautstruktur und -funktion beim Menschen | 91 |
| 4.6 Diskussion..... | 97 |
| 4.6.1 Analytische Verfahren zur Bestimmung von alpha-, delta-, | |
| gamma-Tocotrienol und alpha-Tocopherol in Serum..... | 97 |
| 4.6.2 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Tocotrienolen | 97 |
| 4.6.3 Untersuchungen zum Einfluss einer 12 Wochen Supplementierung | |
| mit TocoPlus auf Hautstruktur und -funktion beim Menschen | 99 |
| 5. Zusammenfassung | 102 |
| 5. Summary | 105 |
| 6. Literaturverzeichnis | VIII |

Abkürzungen

| | |
|-------------|---|
| ADI | Acceptable daily intake |
| ATBC Studie | Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study |
| AU | Arbitrary units |
| AUC | Area under the curve |
| BCO | Beta-Carotin Oxygenase |
| BF | periphärer Blutfluss |
| BG | Blutflussgeschwindigkeit |
| BHT | 2,6-Di-tertiär-butyl-4-methylphenol |
| EDTA | Ethylen-diamin-tetra-acetat |
| EU | Europäische Union |
| HPLC | Hochdruckflüssigkeitschromatographie |
| ICH | International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use |
| IE | Internationale Einheiten |
| IS | Interner Standard |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| LFGB | Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch |
| MED | Minimale erythembildende Dosis |
| NG | Nachweisgrenze |
| PHV | Peakhöhenverhältnis |
| PTT | Partielle Thromboplastinzeit |
| RÄ | Retinol Äquivalente |
| rHb | relative Hämoglobinkonzentration |

| | |
|------|-----------------------------------|
| SELS | Surface Evaluation of Living Skin |
| S-O2 | Sauerstoffsättigung |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism |
| TÄ | Tocopherol Äquivalente |
| TEWL | Transepidermaler Wasserverlust |
| TBME | t-Butyl-methyl-Ether |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TTP | Tocopherol Transferprotein |
| UV | Ultraviolett |
| VIS | Visible |
| VLDL | Very Low Density Lipoprotein |
| WHO | World Health Organisation |

1. Einleitung und Ziel der Arbeit

Mittlerweile verwendet ein erheblicher Teil der Bevölkerung Nahrungsergänzungsmittel, um die Versorgung mit Nährstoffen zu verbessern und häufig in der Erwartung, einen Beitrag zur langfristigen Gesunderhaltung zu leisten. Inzwischen wird davon ausgegangen, dass etwa jeder dritte Erwachsene täglich oder gelegentlich zu solchen Supplementen greift. Am Markt weit verbreitet sind Präparate mit den Inhaltsstoffen beta-Carotin sowie Vitamin E. Obwohl beide Substanzen ohne Zweifel zu den am meisten untersuchten Vitaminen zählen, finden sich dennoch zahlreiche, bislang nicht geklärte Fragestellungen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten drei neue Aspekte zu Stoffwechsel und Wirkungen von beta-Carotin und Vitamin E untersucht werden. Diese ergaben sich aus unterschiedlichen Hintergründen.

So lagen zunächst neue Befunde zum Stoffwechsel des Beta-Carotins vor, die eine mögliche Bedeutung individueller metabolischer Faktoren wahrscheinlich machte. Im Jahr 2002 ist es Lindqvist & Andersson gelungen die Sequenz der Beta-Carotin-Oxygenase (BCO) beim Menschen aufzuklären.

Nach Resorption wird das Provitamin in der Darmmukosazelle oxidativ durch BCO gespalten, reduziert und anschließend vornehmlich als Retinylpalmitat in Chylomikronen mit der Lymphe zum Blut transportiert. Über den Gehalt an beta-Carotin und Retinylester in Chylomikronen nach Einnahme des Provitamins lassen sich somit Rückschlüsse auf Absorption und Metabolismus der Muttersubstanz ziehen.

Inzwischen ist nachgewiesen, dass ein genetischer Polymorphismus auf dem beta-Carotin-Oxygenase (BCO) Gen existiert (von Lintig, persönliche Mitteilung), dieser wird als SNP1 bezeichnet (single nucleotide polymorphism 1) und betrifft die Base 786 des Gens. An dieser Stelle kann ein Austausch von Adenin gegen Thymin (A→T) vorliegen, der im Protein die Substitution der Aminosäure Arginin 262 durch Serin zur Folge hat. Der Austausch könnte einen Einfluss auf die Aktivität der BCO haben und somit auf die Metabolisierung von beta-Carotin. Das Phänomen der Low- und High-Responder (Borel 1998), deren beta-Carotinspiegel in den Chylomikronen nach Gabe der Substanz entsprechend wenig oder stark ansteigen, könnte mit diesem genetischen Polymorphismus verbunden sein. Inwieweit diese genetische

Variation die Metabolisierung von beta-Carotin im Menschen beeinflusst, ist nicht bekannt und sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden.

Der zweite Aspekt dieser Arbeit beschäftigt sich mit einer bislang wenig untersuchten Vitamin E-Verbindung, dem alpha-Tocopherylphosphat. Alpha-Tocopherylphosphat ist ein Phosphorsäureester des alpha-Tocopherols und in den USA bereits als Nahrungsergänzungsmittel zugelassen, in der EU jedoch nicht. In der wissenschaftlichen Literatur gibt es bislang keine veröffentlichten Studien zur Wirkung von alpha-Tocopherylphosphat am Menschen. Über Bioverfügbarkeit, Bildung und Metabolismus der Verbindung ist bisher also nichts bekannt. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Substanz auch im Organismus des Menschen vorkommt und eventuell an der Regulation zellulärer Signalwege beteiligt sein könnte (Negis 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um alpha-Tocopherylphosphat in menschlichem Serum und Chylomikronen zu analysieren. Durch Anwendung dieser Methode wurde untersucht, ob die Substanz direkt bioverfügbar ist oder endogen aus alpha-Tocopherol gebildet wird. Darüber hinaus wurde die Bioverfügbarkeit von Vitamin E aus Tocopherylphosphat abgeschätzt.

Der dritte Aspekt betrifft die Tocotrienole, diese zählen zu den E-Vitameren und kommen in einigen Nahrungsmitteln in relativ hohen Konzentrationen vor. Im Vergleich zu den in der Substitution des Chromanrings analogen Tocopherolen weisen sie drei zusätzliche Doppelbindungen in der Phytylseitenkette auf. Neben antioxidativen Wirkungen sind den Tocotrienolen auch zelluläre Effekte auf regulatorischer Ebene zugeschrieben worden. Es konnte in Versuchen mit topisch verabreichten Tocotrienolen eine Verbesserung von Hauteigenschaften gezeigt werden (Fuchs 2003). Bei Ratten kam es zu einer vermehrten Einlagerung von Tocotrienolen in die Haut, nach oraler Gabe von Tocotrienolen (Iskeda 1999). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass auch oral verabreichte Tocotrienole beim Menschen kutane Wirkungen zeigen könnten. Aus diesem Grund wurden sowohl Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit, als auch zum Einfluss auf Hauteigenschaften von Tocotrienolen, durchgeführt.

2. Literaturübersicht

2.1 Nahrungsergänzungsmittel

Nahrungsergänzungsmittel werden als Lebensmittel aus Konzentraten von Nährstoffen oder anderen Substanzen mit ernährungsphysiologischer Wirkung definiert (NEM-Liste 2007).

Nahrungsergänzungsmittel sind z.B. Vitamine, Mineralstoffe, Aminosäuren und/oder Pflanzenauszüge, die in meist höher dosierter Form in Verkehr gebracht werden und dazu bestimmt sind, die Zufuhr dieser Stoffe im Rahmen der normalen Ernährung zu ergänzen. Sie dienen nicht dazu, vermehrt Energie und Hauptnährstoffe zuzuführen, sondern die Ernährung mit Mikronährstoffen und anderen physiologisch bedeutsamen Nahrungsbestandteilen zu ergänzen (Hahn et al. 2005)

Während in den USA oder in Asien die Nahrungsergänzung bereits seit Jahrzehnten als gewinnbringender Markt etabliert ist, hat sich die Nachfrage auf dem europäischen Markt erst seit Beginn der 80er Jahre rasch entwickelt. Der Verbrauch an Nahrungsergänzungsmitteln steigt seit Jahren stetig an, so wurden 2004 in Deutschland 383 Millionen Euro für Vitamin- und Mineralstoffpräparate ausgegeben (Bundesfachverband der Arzneimittelhersteller e.V. 2005). 33% der Frauen und 26% der Männer in Deutschland supplementieren Vitamine und Mineralstoffe.

Die unzureichende oder fehlerhafte Versorgung mit essentiellen Mikronährstoffen über die Nahrung nimmt in der 3. Welt zwar zu, ist in Mitteleuropa jedoch selten. Ausgeprägte Mangelzustände sind hier stark rückläufig. Sie können sich aber in entsprechenden Risikogruppen finden, z. B. bei erhöhtem Bedarf in Phasen starken Wachstums und in der Schwangerschaft, bei Krankheitszuständen und hohem Alter, bei Konsum einseitiger Diäten oder bei genetisch bedingten Stoffwechselstörungen. In Deutschland herrscht ein endemischer Jodmangel, ebenso ist die weitgehende Unterversorgung mit Selen und Zink nachgewiesen. Hier bietet sich die Nahrungsergänzung an (Grunert 2005). Gleiches gilt für Stoffe, deren positive gesundheitliche Wirkungen nachgewiesen sind. Bestimmte Omega-3-Fettsäuren, die hauptsächlich in fettem Seefisch vorkommen oder Phytoöstrogene aus Soja können

nicht immer in ausreichend wirkenden Mengen aus der täglichen Ernährung aufgenommen werden.

Das steigende Interesse an Mikronährstoffen hängt auch mit der rapiden Expansion unseres Wissens über deren molekulare Funktionen, sowie über die genetisch regulierten Mechanismen, zur Anpassung von Resorption, Verteilung und Ausscheidung an wechselnden Bedarfs- und Versorgungssituationen zusammen.

Nach langjährigen Diskussionen wurde im Sommer 2002 auf europäischer Ebene erstmals eine Richtlinie für Nahrungsergänzungsmittel erlassen (RL 2002/46/EG), die von Mitgliedstaaten der EU in nationales Recht umgesetzt wurde (Hahn 2005). In Deutschland erfolgte dies in Form der im Mai 2004 in Kraft getretenen „Verordnung über Nahrungsergänzungsmittel und zur Änderung der Verordnung über vitaminisierte Lebensmittel“ (Grunert 2005). Es wird u.a. festgelegt, was Nahrungsergänzungsmittel sind und welche Inhaltsstoffe, Konzentrate von Nährstoffen und sonstige Stoffe, mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung beinhaltet sind.

Die Verordnung sagt dazu im § 1:

(1) Nahrungsergänzungsmittel im Sinn dieser Verordnung ist ein Lebensmittel, das

1. dazu bestimmt ist, die allgemeine Ernährung zu ergänzen.
2. ein Konzentrat von Nährstoffen oder sonstigen Stoffen mit ernährungsspezifischer oder physiologischer Wirkung allein oder in Zusammensetzung darstellt und
3. in dosierter Form, insbesondere in Form von Kapseln, Pastillen, Tabletten, Pillen und anderen ähnlichen Darreichungsformen, Pulverbeuteln, Flüssigkeitsampullen, Flaschen mit Tropfeinsätzen und ähnlichen Darreichungsformen von Flüssigkeiten und Pulvern zur Aufnahme in abgemessenen kleinen Mengen in den Verkehr gebracht wird.

(2) Nährstoffe im Sinne dieser Verordnung sind Vitamine und Mineralstoffe, einschließlich Spurenelemente.

Für die Nährstoffe Vitamine, Mineralstoffe und Spurenelemente existieren spezifische Vorschriften, für sonstige Stoffe hingegen nicht. Viele Verbraucher sind sich nicht darüber im Klaren, dass Nahrungsergänzungsmittel keine Arzneimittel sind und

dadurch keiner Registrierungs- und Zulassungspflicht unterliegen. Für die gesundheitliche Unbedenklichkeit ist der Hersteller auf der Basis des LMBG verantwortlich (Bundesinstitut für Risikobewertung 2007). Werbliche und krankheitsbezogene Aussagen sowie Wirkversprechen sind bei Nahrungsergänzungsmitteln nicht erlaubt. Sie erfüllen den Tatbestand der hier nicht erlaubten gesundheitsbezogenen Werbung.

2.2 Carotinoide

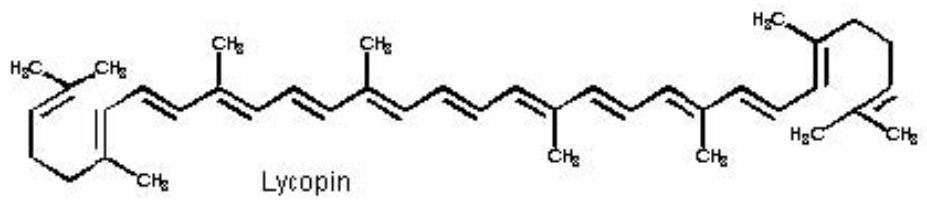
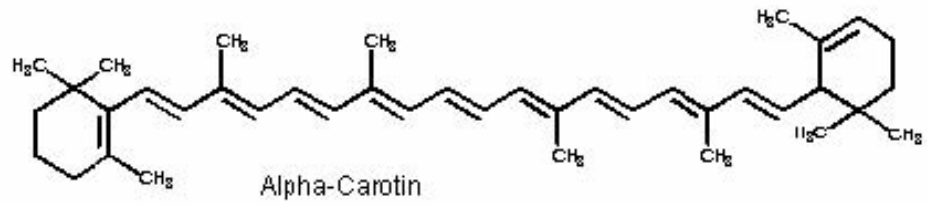
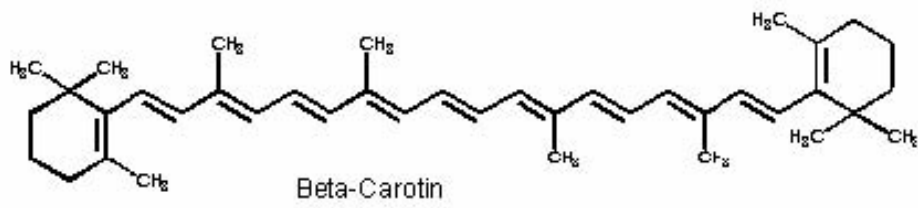
2.2.1 Vorkommen und Chemie

Die Carotinoide zählen zu einer Gruppe von Pigmenten, die von höheren Pflanzen und einigen Mikroorganismen synthetisiert werden. Sie sind im Pflanzenreich weit verbreitet, bis heute sind mehr als 700 Carotinoide identifiziert worden. Einige Carotinoide können durch intramolekulare Spaltung in Vitamin A überführt werden (Hahn et al. 2005). Solche Carotinoide werden auch als Provitamin A oder Provitamin A-Verbindungen bezeichnet. Provitamin A-Carotinoide tragen in ihrer Struktur einen beta-Ionenring. Von allen Carotinoiden besitzt beta-Carotin die höchste Provitamin A-Wirksamkeit.

Carotinoide sind Tetraterpene (C_{40} -Isoprenoide), d.h. sie setzen sich formal aus acht Isopreneinheiten (C_5) zusammen und besitzen daher ein Grundgerüst aus 40 Kohlenstoffatomen. Dieses Grundgerüst kann an den Enden zyklische Gruppen (Ringe) enthalten und um sauerstoffenthaltende funktionelle Gruppen erweitert sein. Die Stoffklasse der Carotinoide teilt sich in zwei Untergruppen. Reine Kohlenwasserstoffmoleküle werden den Carotinen zugeordnet, während Xanthophylle (Isler 1971) mindestens ein weiteres Sauerstoffatom enthalten. Funktionelle Sauerstoffgruppen der Xanthophylle sind Alkohol-, Keto-, Aldehyd-, Epoxid-, oder Ethergruppierungen; einige Hydroxycarotinoide kommen auch verestert mit Fettsäuren vor (Nau & Stahl 2007). Durch den Einbau eines oder mehrerer Sauerstoffatome sind die Xanthophylle weniger lipophil als die Carotine. Die unterschiedliche Lipophilie der Carotine und Xanthophylle beeinflusst ihr Löseverhalten in organischen Lösungsmitteln und ihre Ausrichtung in Lipiddoppelmembranen (Britton 1995, Subczynski et al. 1992).

Die Hauptcarotinoide im Blut des Menschen sind in Abbildung 1 dargestellt.

Carotine



Xantophylle

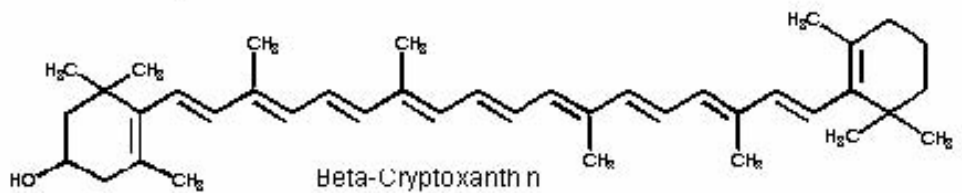
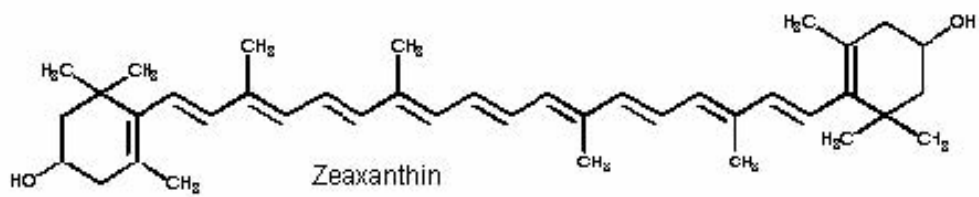
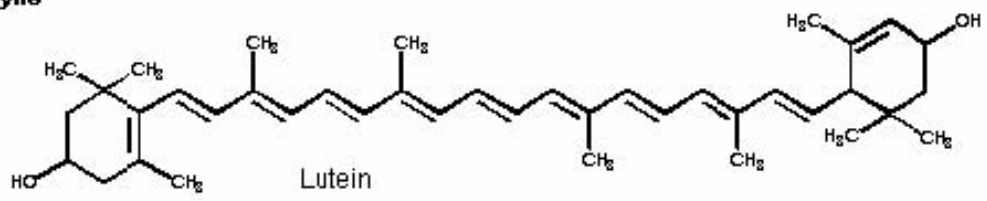


Abbildung 1: Hauptcarotinoide im Blut des Menschen

Der Großteil des täglichen Vitamin A-Bedarfs eines Menschen wird über Provitamin A-Carotinoide aus Früchten und Gemüse gedeckt. Es ist bekannt, dass der Vitamin A-Bedarf auch vollständig über Carotinoide bei rein pflanzlicher Ernährung gedeckt werden kann. Die typische gelb-rote Farbe der Carotinoide (bedingt durch das System konjugierter Doppelbindungen) zeigt sich in vielen Obst- und Gemüsesorten (Tomate, Karotte, Paprika, Zitrusfrüchte, Melone). Aber auch grüne Gemüse, wie Brokkoli, Spinat und Erbsen enthalten beachtliche Mengen an Carotinoiden, die Farbe wird allerdings durch die des Chlorophylls überdeckt. In Tabelle 1 sind Carotinoidgehalte von einigen Früchten und Gemüsen aufgelistet (Mangels et al. 1993). Die Konzentrationen unterliegen großen Schwankungen, abhängig von Standort, Reifegrad und Sorte. Im Allgemeinen ist der Carotinoidgehalt in Gemüse höher als in Obst.

Tabelle 1: Carotinoidgehalte einiger Obst- und Gemüsesorten in mg/100 g Feuchtgewicht (nach Mangels et al. 1993)

| | beta-Carotin | alpha-Carotin | Lutein und Zeaxanthin | Lycopin |
|------------------|--------------|---------------|-----------------------|----------|
| Gemüse | | | | |
| Brokkoli | 0,5-1,1 | 0,1 | 1,8- 2,1 | |
| Rosenkohl | 0,3- 1,1 | 0,1 | 0,9- 1,6 | |
| Karotte | 1,8- 14,7 | 0,5- 8,5 | 0,3 | |
| Bohne (grüne) | 0,2- 0,8 | 0,1 | 0,4- 1,1 | |
| Kohl | 2,8- 14,6 | | 14,7- 39,6 | |
| Kopfsalat | 1,0- 1,5 | | 1,8 | |
| Erbsen (grün) | 0,1- 1,3 | 0,1 | 1,1- 2,4 | |
| Spinat | 3,0- 6,7 | | 4,4- 15,9 | |
| Paprika (grün) | 0,1- 0,3 | 0,1 | 0,7 | |
| Tomate | 0,1- 0,7 | | 0,1 | 0,9-4,2 |
| Obst | | | | |
| Aprikose | 0,6- 6,4 | | | |
| Orange | 0- 0,5 | 0,1 | 0,1 | |
| Pfirsich | 0,1- 0,4 | 0,1 | 0,1 | |
| Mango | 0,1- 3,7 | | | |
| Wassermelone | 0,2 | | | 2,3- 7,2 |
| Guave | 0,4-1,2 | | | 5,3- 5,5 |
| Grapefruit (rot) | 0,3- 2,3 | | | 3,4 |

2.2.2 Stoffwechsel

Carotinoide werden genauso wie andere über die Nahrung aufgenommene lipophile Verbindungen resorbiert (Olson 1994, Parker 1996). Carotinoide und Nahrungslipide bilden zusammen mit Gallensäuren Mizellen, die eine Aufnahme dieser lipophilen Substanzen im Dünndarm fördern (Parker 1997). Die Provitamin A Verbindung beta-Carotin wird schon im Dünndarm von dem Enzym Beta-Carotin-Oxygenase (BCO) an der zentralen Doppelbindung in zwei Retinalmoleküle gespalten und nachfolgend zu Retinol reduziert (Biesalski et al. 2002). Nach der Veresterung mit Fettsäuren, vorwiegend Palmitinsäure, erfolgt ein Einbau der Retinylester in Chylomikronen. Anschließend erfolgt die Ausschleusung via Lymphbahnen in das Blut. Nach dem Abbau der Chylomikronen zu Chylomikronenremnants werden diese in die Leber aufgenommen (Biesalski 1999). In der Leber werden Carotinoide in Lipoproteine eingebaut, über die eine Verteilung der Substanzen im Organismus erfolgt. Die Analyse von beta-Carotin und Retinylpalmitat in Chylomikronen lässt somit Rückschlüsse zur Aufnahme und Metabolisierung der Muttersubstanz in der Mukosazelle zu.

Der Resorptionsvorgang der Carotinoide ist kurz in Abbildung 2 dargestellt.

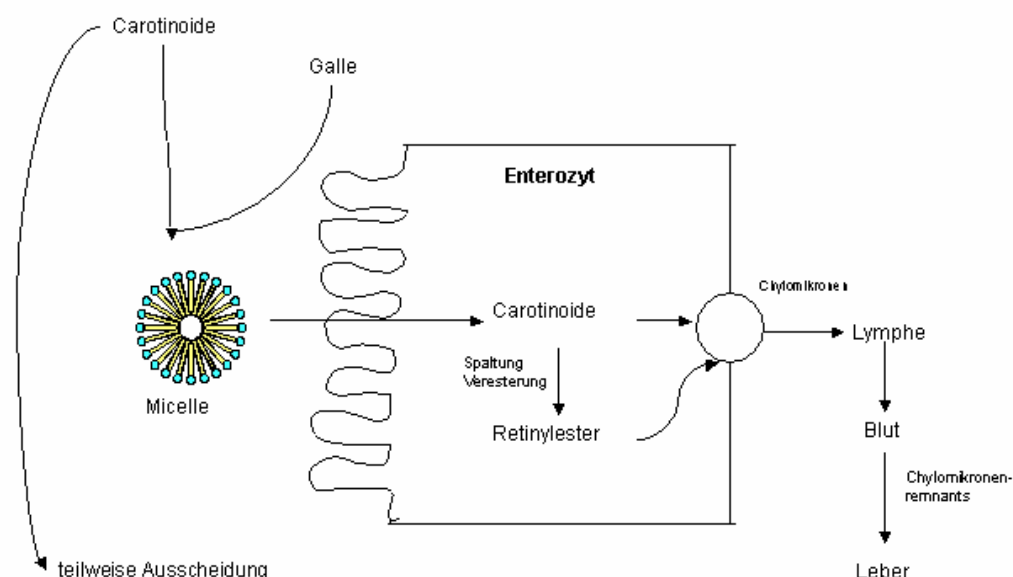


Abbildung 2: Schematische Darstellung von Aufnahme und Transport der Carotinoide (Eigene Darstellung)

Genetische Varianten von relevanten Proteinen könnten zu Veränderungen der Resorption und des Metabolismus von beta-Carotin und anderen Carotinoiden beitragen. In der Literatur sind sogenannte Low- und High-Responder beschrieben (Borel et al. 1998), entsprechend des Anstiegs der beta-Carotinkonzentrationen im Serum nach Gabe eines beta-Carotinpräparates.

Eine wichtige Rolle bei der Beurteilung der Bioverfügbarkeit spielt die Form, in der Carotinoide vorliegen. Mit zunehmender Kristallgröße nimmt die Verfügbarkeit im Allgemeinen ab; aus öligen Lösungen oder Suspensionen ist die Bioverfügbarkeit der Carotinoide in der Regel besser (Nau & Stahl 2007). Die Bioverfügbarkeit ist vermindert bei unvollständiger Freisetzung der Substanz aus der Lebensmittelmatrix, unzureichender Lipidzufuhr, vermindertem Gallenfluss, Anwesenheit von Fettersatzstoffen oder Ballaststoffen (van het Hof et al. 2000). Voraussetzung für die Resorption ist zunächst das Herauslösen aus der Lebensmittelmatrix. Daher ist die Resorptionsrate von der Beschaffenheit der Lebensmittelmatrix und der Art und Weise wie Carotinoide darin eingebunden sind, ausschlaggebend (Dimitrov et al. 1988). Die gleichzeitige Aufnahme von Fett spielt eine bedeutende Rolle, deshalb wirken Substanzen störend, die die Fettverdauung und –resorption beeinträchtigen, so wie unverdauliche fettähnliche Verbindungen (Westrate & Van het Hof 1995) und bestimmte Medikamente (Colestyramin u.ä.). Mit steigender Dosis nimmt die relative Bioverfügbarkeit von beta-Carotin ab.

2.2.3 Funktionen

Antioxidantien: Carotinoide gehören zu den wichtigsten nicht enzymatischen Antioxidantien und sind insbesondere an der Entgiftung von Singulett-Sauerstoff und Peroxylradikalen beteiligt. Zu den wirksamsten Carotinoiden gehören beta-Carotin und Lycopin (Sies & Stahl 1995). Die antioxidativen Effekte werden in Zusammenhang mit möglichen präventiven Wirkungen von Carotinoiden bei der Pathogenese von Herz-Kreislauferkrankungen und bestimmten Krebsformen gebracht (Etminan et al. 2004 & Giovannucci et al. 2002).

Interzelluläre Kommunikation: Carotinoide, auch solche ohne Provitamin A-Eigenschaft wie Canthaxanthin oder Lycopin sind in der Lage, die interzelluläre Kommunikation über Gap junctions zu verstärken. Stimulatorische Wirkungen der Carotinoide auf die Kommunikation über Gap Junctions werden in Zusammenhang mit ihren krebspräventiven Eigenschaften gesehen (Stahl et al. 1997).

Provitamin A-Wirkung: Die bestuntersuchte biologische Wirkung der Carotinoide ist die Provitamin A-Wirkung. 1 mg Retinol entsprechen 6 mg all-trans-beta-Carotin oder 12 mg anderer Provitamin A-Carotinoide (DACH 2000) .

Sonnenschutzwirkung: Die Einnahme von beta-Carotin führt zu einem Anstieg des Carotinoidspiegels der Haut und wirkt photoprotektiv. Als biochemischer Mechanismus des Hautschutzes werden antioxidative Effekte der Carotinoide diskutiert (Sies & Stahl 2004).

Immunsystem: In experimentellen Modellen wurde gezeigt, dass beta-Carotin die Proliferation der T- und B-Zellen, die Anzahl der T-Helferzellen, sowie die Aktivität der natürlichen Killerzellen erhöht (Biesalski et al. 2002).

2.2.4 Bedarf und Mangel

Das Retinoläquivalent (RÄ) wurde eingeführt, um die unterschiedlichen Vitamin A-Verbindungen und Carotinoide miteinander vergleichen zu können. Ein RÄ entspricht 1 mg Retinol oder 6 mg beta-Carotin bzw. 12 mg anderer Provitamin A-Carotinoide (DGE 2000, Elmadfa et al. 2004). Für männliche Erwachsene wird eine tägliche Zufuhr von 1 mg RÄ, für Frauen von 0,8 mg von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung empfohlen. Diese Werte beinhalten einen Sicherheitszuschlag von 60%, um physiologische Schwankungen abzudecken. Aus Lebensmittelquellen nimmt der deutsche Erwachsene im Durchschnitt täglich 2- 5 mg an beta-Carotin auf, als

Lebensmittelzusatzstoff nochmals 1-2 mg, zusammen also 3- 7 mg (Pelz, et al., 1998). Die Aufnahme von beta-Carotin über Obst und Gemüse wird allgemein als gesund und ernährungsphysiologisch sinnvoll erachtet (z.B. im Hinblick auf eine mögliche Krebsprophylaxe).

Beta-Carotin ist das wichtigste Provitamin A-Carotinoid in der Nahrung. Von großer Bedeutung sind Carotinoide bei der Prävention von Vitamin A-Mangelerkrankungen, die besonders in Drittweltländern verbreitet sind (Biesalski et al. 2002). Mangel an Vitamin A führt zu ophtalmologischen Störungen (Xerophthalmie), erhöhter Sterblichkeit und verzögertem Wachstum und Entwicklung (WHO 2002).

Die WHO schätzt, dass zwischen 100 und 140 Millionen Kinder weltweit Vitamin A-Mangelsymptome zeigen (WHO 2002). Um den Vitamin A-Mangel in Entwicklungsländern zu bekämpfen, wurde ein genetisch veränderter Reis entwickelt, der beta-Carotin enthält („golden rice“). Obwohl bisher nur geringe Mengen von beta-Carotin im Reis angereichert werden konnten, (1,5- 3 µg/g), ergaben sich beträchtliche positive gesundheitliche Effekte (Zimmermann et al. 2004)- und dies, obwohl gerade in den Entwicklungsländern auch ein Mangel von Fetten in der Nahrung vorherrscht, somit eine effektive Resorption von beta-Carotin aus dem Verdauungstrakt erschwert wird.

2.2.5 Toxizität

In Langzeitstudien mit beta-Carotin wurde bei starken Rauchern und/oder Asbestarbeitern ein um bis zu 20 % erhöhtes Lungenkrebsrisiko gezeigt (The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group 1994 & Rautalati 1997, Goodman et al. 2004). Probanden, die beta-Carotin allein oder mit Vitamin E zusammen bekommen haben, wiesen ein signifikant höheres Lungenkrebsrisiko auf. Anzumerken ist aber, dass bei der ATBC Studie eine 10fach höhere Dosis an beta-Carotin verabreicht wurde, als normalerweise mit der Nahrung aufgenommen wird (ausgehend von einer Dosis von 2 mg /Tag). Eine genauere Betrachtung der Interventionsstudien mit beta-Carotin zeigt, dass bei beiden Studien mit ungünstigem Effekt auf das Krebsrisiko extrem hohe Plasmaspiegel (4-6 µmol/L) am Studienende

erreicht wurden. Alle Studien bei denen keine toxikologischen Auffälligkeiten berichtet wurden, zeigen am Studienende deutlich geringere Plasmaspiegel (1-2 $\mu\text{mol/L}$). Letztere liegen im Bereich der oberen fünf Perzentile der USA. Empfohlen wird in der Literatur, Plasmaspiegel von ca. 0,4-0,5 $\mu\text{mol beta-Carotin/L}$ anzustreben (Akbaraly et al. 2007).

Zu den biochemischen Mechanismen, die für eine erhöhte Inzidenz von Lungenkrebs bei Hochrisikogruppen unter beta-Carotinsupplementierung verantwortlich sind, ist nur wenig bekannt. Es wird diskutiert, dass Störungen der Expression von Retinsäurerezeptoren, prooxidative Effekte von beta-Carotin, Veränderungen der Zellkommunikation, Beeinflussung der Resorption anderer Mikronährstoffe oder ein veränderter Metabolismus der Carotinoide eine Rolle spielen (Biesalski et al. 2002).

2.3 Vitamin E

2.3.1 Vorkommen und Chemie

Vitamin E ist ein gemeinsamer Name für in der Natur vorkommende Tocopherole und Tocotrienole, mit alpha- und gamma-Tocopherol als den Hauptkomponenten im menschlichen Blut und Gewebe (Lindsay et al. 2002). Es ist eine Gruppe von acht Stoffen (alpha-, beta-, gamma- und delta-Tocopherol und alpha-, beta-, gamma- und delta-Tocotrienol), welche sich in der Position der Methylgruppen im Chromanring unterscheiden (Lodge 2005). Vitamin E-Verbindungen kommen in der Natur als reine Isomere vor. Das in Supplementen benutzte synthetische alpha-Tocopherol ist eine racemische Mischung und besteht aus verschiedenen Kombinationen von Stereoisomeren (Brigelius-Flohé 2006). In Nahrungsmitteln wird Tocopherol oftmals in Form verschiedener Ester eingesetzt. Die am häufigsten verkauften Ester von alpha-Tocopherol sind alpha-Tocopherylacetat und alpha-Tocopherylsuccinat. In Abbildung 3 sind einige Tocopherole, Tocotrienole und Tocopherylester abgebildet.

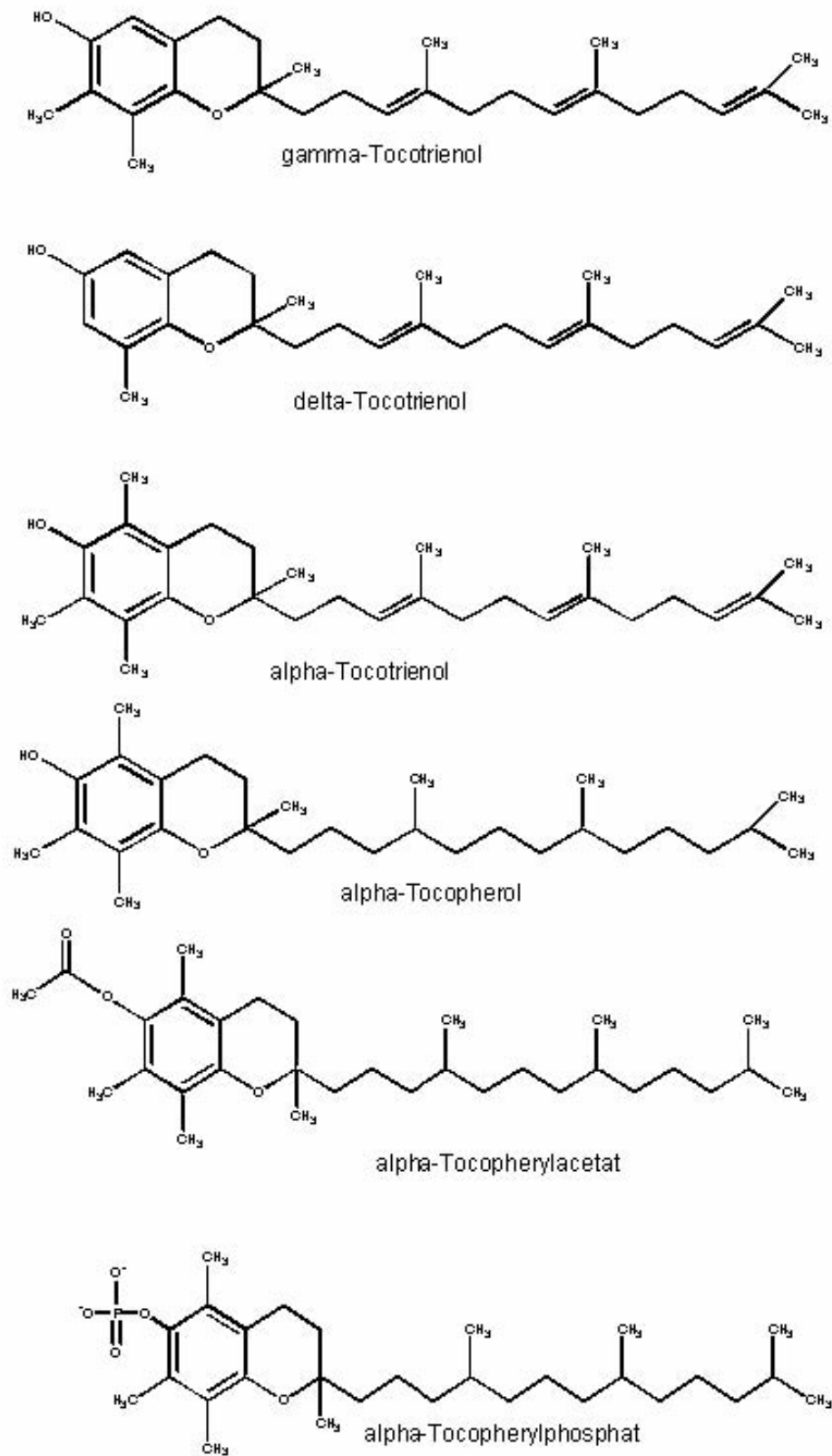


Abbildung 3: Ausgewählte Tocopherole, Tocotrienole und Tocopherylester

Alpha-Tocopherylphosphat (Phosphorsäureester des alpha-Tocopherols) ist ein in den USA zugelassenes Nahrungssupplement. Alpha-Tocopherylphosphat ist wasserlöslich und relativ stabil im sauren oder im basischen Milieu. Zu Bioverfügbarkeit und Metabolismus dieser Substanz beim Menschen ist nur wenig bekannt. Ein Vorteil von wasserlöslichen Vitamin E-Derivaten ist, dass sie wässrigen Lebensmittelmatrizen zugefügt werden können.

Tocopherole und Tocotrienole werden ausschließlich von Pflanzen synthetisiert. Große Mengen an Vitamin E finden sich vor allem in Nahrungsmitteln mit einem hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren. Gute Vitamin E-Quellen sind daher pflanzliche Öle. Tocotrienole kommen wesentlich seltener und in geringeren Konzentrationen in unserer Nahrung vor. Nur Palmöl, Reis, Hafer und Gerste enthalten bedeutende Mengen. In Tabelle 2 sind Vitamin E Gehalte einiger Lebensmittel gezeigt (Mohr 2006).

Tabelle 2: Vitamin E Gehalte einiger Lebensmittel in mg/100 g Feuchtgewicht (Mohr, 2006)

| Lebensmittel | errechnete biologische Wirksamkeit als D-alpha-Tocopheroläquivalent (DACH) |
|-------------------------|--|
| Weizenkeimöl | 75- 279 |
| Maisöl | 22- 56 |
| Baumwollsaatöl | 54 |
| Sonnenblumenkerne | 51 |
| Sonnenblumenöl | 29 |
| Mandeln | 23- 28 |
| Sojaöl | 25 |
| Lupinenöl | 15 |
| Erdnüsse | 14 |
| Sesam, Leinöl, Olivenöl | bis 7 |

2.3.2 Stoffwechsel

Aufnahme und Transport von Vitamin E erfolgt auf dem gleichen Weg wie andere mit Nahrung aufgenommene lipophile Verbindungen (Brigelius-Flohe 2006, Traber 1994).

Vitamin E wird zusammen mit Fetten und unter Einfluss von Gallensäuren in Mizellen im Dünndarm resorbiert (Borel 2001 & Kayden 1993). Tocopherylester, wie z.B. alpha-Tocopherylacetat und alpha-Tocopherylsuccinat, werden im Dünndarm von Pankreaslipasen und/oder Esterasen der Darmmukosa hydrolysiert. Messungen am Menschen ergaben, dass nur 20- 50 % des mit der Nahrung aufgenommenen alpha-Tocopherols resorbiert werden (Biesalski et al. 2002). Mit steigender Dosis sinkt die relative Aufnahme. Die Resorption von gamma-Tocopherol liegt unter der des alpha-Tocopherols (Wallat 1986). In der Dünndarmmukosa wird Vitamin E in Chylomikronen eingebaut und gelangt über Lymphe ins Blut. Unter Einwirkung der Lipoproteinlipase werden die Triglyceride der Chylomikronen hydrolysiert, wobei Chylomikronremnants entstehen (Hahn et al. 2005). Ein Teil des Vitamin E gelangt mit den freien Fettsäuren in die peripheren Gewebe, der größte Teil verbleibt jedoch in den Chylomikronenremnants. In der Leber wird Vitamin E unter Beteiligung des alpha-Tocopherol Transferproteins (TTP) in „Very low density lipoproteine“ (VLDL) eingebaut. Das in Lipoproteinen vorhandene Vitamin E bestimmt im Wesentlichen die Plasmakonzentration (Biesalski, 1995). Zu den Zielzellen wird Vitamin E in lipoproteingebundener Form transportiert. Vitamin E gelangt nach Lipolyse der VLDL teilweise direkt in die peripheren Gewebe, ein Großteil verbleibt jedoch in den aus VLDL gebildeten LDL. Die rezeptorvermittelte Endozytose stellt daher einen wichtigen Mechanismus der zellulären Aufnahme von Vitamin E dar (Hahn et al., 2005).

Der Vitamin E-Pool im Organismus besteht zu 80% aus alpha-Tocopherol (Burton & Traber 1990, Brigelius-Flohe & Traber 1999). Es wurde gezeigt, dass frisch absorbiertes alpha-Tocopherol vorhandenes alpha-Tocopherol in der Zirkulation ersetzt (Traber et al. 1994), maximale Plasmakonzentrationen werden 9- 12 Std. nach der Einnahme erreicht (Traber et al. 1998). Die Vitamin E-Aufnahme in die Erythrozyten verläuft langsamer, mehrere Studien zeigen eine maximale Konzentration erst nach 24 Std. Die biologische Aktivität der Tocopherole, Tocotrienole, sowie die der optischen Isomere des alpha-Tocopherols unterscheiden

sich. RRR-alpha-Tocopherol ist die aktivste Form des Vitamin E. Die gamma-Form wird zwar genauso gut im Darm resorbiert, doch nach 24 Std ist vorzugsweise die α -Form im Plasma angereichert. Eine Ursache hierfür ist, die Spezifität des alpha-Tocopherol bindenden Transferproteins (alpha-TTP), welches speziell das alpha-Tocopherol in der Leber in VLDLs einbaut und diese im Serum zirkulieren (Traber & Arai 1999). Alpha-TTP bindet bevorzugt alpha-Tocopherol, die Affinität zu anderen Vitamin E Formen ist wesentlich geringer: 38% für beta-, 9% für gamma- und 2% für delta-Tocopherol. Die Affinität für die synthetische SRR Form beträgt 11% und für alpha-Tocotrienol 12% im Vergleich zum RRR-alpha-Tocopherol (Hosomi et al. 1997).

Die zweite Ursache für die vermehrte Anreicherung von alpha-Tocopherol im Serum ist dessen relativ langsamer Abbau. Alle Tocopherole und Tocotrienole werden über den gleichen Mechanismus abgebaut, nämlich über die beta-Oxidation der Seitenkette. Die metabolische Abbaurate variiert jedoch stark (Brigelius-Flohé 2006). Die Bioverfügbarkeit von Vitamin E hängt, wie schon erwähnt, auch von der Menge Fett, das zusammen mit Vitamin E aufgenommen wird, ab. Wieviel Fett für die optimale Aufnahme notwendig ist, ist noch unklar (Cohn 1997 & Leonard et al. 2004). Dimitrov et al. (1991) beschrieb einen höheren Anstieg des Plasma alpha-Tocopherols, wenn das Supplement mit einer fettreichen, im Vergleich zu einer fettarmen Mahlzeit aufgenommen wurde. Auch Jeanes et al. (2004) beschrieb Anstiege des alpha-Tocopherols in Chylomikronen nach Gabe eines Vitamin E-Präparats zu Toast mit Butter (17,5 g Fett), Müsli mit Vollmilch (17,5 g Fett), Müsli mit entrahmter Milch (2,7 g Fett) oder Wasser (0 g Fett). Der Anstieg von Vitamin E war nach der Toast/Butter Mahlzeit mit Abstand am höchsten, gefolgt von Müsli mit Vollmilch, die Aufnahme mit den weiteren Mahlzeiten war deutlich geringer.

2.3.3 Funktionen

Antioxidantien: Die antioxidative Wirkung von Vitamin E wurde schon in den frühen 30er Jahren erkannt. Die Redox-aktive Gruppe des Vitamin E ist die Hydroxygruppe an Position sechs im Chromanring. In tierischen Zellen ist alpha-Tocopherol ein

Bestandteil aller biologischen Membranen. Man nimmt an, dass seine wichtigste biologische Funktion darin besteht, Membranlipide, Lipoproteine und Depofette vor dem Abbau durch Lipidperoxidation zu schützen (Esterbauer et al. 1991 und Esterbauer et al. 1992).

Einfluss auf die Hämostase: In mehreren Studien wurde gezeigt, dass alpha-Tocopherol Einfluss auf die Regulation der Eicosanoidsynthese hat (Steiner 1991, Jandak 1989, Gisinger 1988). Dies wird mit einer Hemmung der Thromboxansynthese und der Thrombozytenaggregation in Zusammenhang gebracht.

Hautparameter: In Humanstudien wurde gezeigt, dass eine Langzeitsupplementierung von alpha-Tocopherol, in Kombination mit Carotinoiden, oder Vitamin C zur Verbesserung der Hautstruktur (Dicke, Dichte und Faltigkeit) beiträgt und photoprotektiv wirkt (Heinrich et al. 2006 & Stahl et al. 2000).

2.3.4 Bedarf und Mangel

Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfiehlt für Erwachsene eine tägliche Aufnahme von 18 internationalen Einheiten (IE), dies entspricht 12 mg alpha-Tocopherol. Diese Menge berücksichtigt eine Zufuhr von 14- 19 g mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Für jedes zusätzlich aufgenommene Gramm mehrfach ungesättigter Fettsäuren ergibt sich ein Mehrbedarf von 0,5 mg alpha-Tocopherol. Während der Schwangerschaft und Stillzeit sollte die Zufuhr auf 20 bzw. 25 IE gesteigert werden.

Ein Vitamin E-Mangel ist unter normalen Ernährungsbedingungen nicht zu erwarten, nur bei bestimmten Krankheitsbildern, wie z.B. chronisch gastrointestinale Erkrankungen, die mit einer Lipidmalabsorption einhergehen, sowie Mutationen im TTP, können zu Mangelerscheinungen führen. Nur bei schwersten Mangelzuständen

an Vitamin E, kann es zu Funktionsstörungen in der Skelettmuskulatur und neuromuskulären Ausfallerscheinungen kommen (Hahn et al. 2005).

2.3.5 Toxizität

Orale Vitamin E-Gaben bis 100 mg/Tag gelten als toxikologisch unbedenklich; Dosen bis 200 mg werden auch langfristig ohne Nebenwirkungen toleriert (Kästner & Kappus 1990, Kappus & Diplock 1992). Selbst in Konzentrationen bis zu 1 g, also fast dem 100fachen der Empfehlung, wurden keine unerwünschten Wirkungen beschrieben. Die DGE empfiehlt dennoch auf eine Langzeitanwendung von über 400 mg/Tag zu verzichten. Sehr hohe Vitamin E-Dosen über einen längeren Zeitraum, können zu einer verlangsamtem Blutgerinnung führen (Steiner 1991, Jandak 1989, Gisinger 1988). Die Cyclooxygenase wird gehemmt, diese ist notwendig, um Arachidonsäure zu Prostaglandin und später zu Thromboxan umzuwandeln. Thromboxan wird für die Aggregation der Blutplättchen gebraucht.

3. Material und Methoden

3.1 Material und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Alpha-Tocopherylphosphat dinatrium Salz wurde von Sigma (Deisenhofen, D) bezogen. Alpha- und delta-Tocopherol wurde von Henkel (Düsseldorf, D) bereitgestellt. Protease (Pronase E von *Streptomyces griseus*) war von Merck (Darmstadt, D). TRIS-Puffer wurde von Roth (Karlsruhe, D) bezogen. Alle anderen Chemikalien waren von Merck, Sigma, oder Fluka (Buchs, Schweiz) und hatten p.A.- oder HPLC-Qualität. Stickstoff der Reinheit 5.0 war von Linde (Höllriegelskreuth, D). Wasser wurde membranfiltriert (Millipore, Eschborn, D).

Das beta-Carotin Supplement für die Humanstudien wurde freundlicherweise von Allied Biotech Corp. (Taipei, Taiwan) zur Verfügung gestellt. Das Weizenkeimöl wurde von Naturata (Brackenheim, D) bezogen. Alpha-Tocopherylphosphat Kapseln wurden von Nature's Bounty (New York, U.S.A.) geliefert. Tocomin und alpha-, delta und gamma-Tocotrienolstandards wurden freundlicherweise von Carotech (Malaysia) bereitgestellt. Tocotrienolkapseln wurden von wHc-Service GmbH (Neuenbürg, D) zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Geräte zur HPLC-Analytik

(alle Merck-Hitachi, Darmstadt, D)

Pumpe: L-7100 Pump
Detektoren: L-4200 UV/Vis Detektor
L-7420 UV/Vis Detektor
Interface: D-7000
Autosampler: L-2200
Säulen: Suplex pKb-100; 5µm Supelco (Bellefonte; Pennsylvania; U.S.A.)
LiChroCART 250-4; RP 18e (5µm), Merck

3.1.3. Sonstige Geräte

Zentrifuge: Hettich Universal 30 RF (Hettich, Tuttlingen, D)

Ultraschallbad: Sonorex Super Digital DK 255 (Bandelin, Berlin, D)

Photometer: UV/Vis Spectrophotometer DU 530 (Beckmann, München, D)

Vortex: Reax 2000 (Heidolph, Heidelberg)

Corneometer: CM 825, Courage & Khazaka Electronics (Köln, D)

TEWA-Meter: TM 300, Courage & Khazaka Electronics (Köln, D)

Surface Evaluation of Living Skin; Visioscan, Courage & Khazaka Electronics (Köln, D)

Hochfrequenz Ultrasound B-Scan: Derma Scan C, Cortex Technology (Dänemark)

O2C-Systems: Lea Instruments (Gießen, D)

Chromameter: CM300, Minolta (Ahrensburg, D)

Solarsimulator: SOL 3, Hönle (München, D)

3.2 Methoden

3.2.1 Analytische Verfahren zur Bestimmung von Carotinoiden, Retinol, Retinylpalmitat und alpha-Tocopherol in Serum und Chylomikronen

Serum

Blut wurde ohne Antikoagulantienzusatz entnommen und für 20 min bei Raumtemperatur zum Gerinnen stehengelassen. Anschließend wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 2000 UPM Serum gewonnen. Entweder wurde dies direkt zur Chylomikronenpräparation verwendet oder bei -20°C eingefroren.

Chylomikronen

Chylomikronen wurden nach der Methode von Terpstra et al. 1981 und Terpstra 1985 präpariert. 2 ml Serum wurden vorsichtig mit 50 mg Saccharose, 770 mg Kaliumbromid (KBr) und 200 μl Ethylenglycol gemischt. Dadurch erhielt die Mischung eine Dichte von $\rho_{20} = 1,250\text{ kg/L}$. Die Mischung wurde mit 2 ml KBr-Lösung der Dichte $\rho_{20} = 1,225\text{ kg/L}$, 4 ml KBr $\rho_{20} = 1,100\text{ kg/L}$ und mit 4 ml H_2O überschichtet und für 40 min bei $155\,000 \times g$ bei 20°C zentrifugiert (L8-60M Ultrazentrifuge, Beckmann, D mit einem SW 41 Rotor). Die aufschwimmenden Chylomikronen wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen, gewogen und bis zur Analyse bei -70°C gelagert.

Alle Analysen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt, soweit genügend Probenmaterial vorhanden war. Zur Probenaufbereitung wurden 150 μl Serum bzw. 500 μl Chylomikronensuspension eingesetzt, mit Puffer A ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer [50mM]+ EDTA [5mM] pH 7,4) auf 1 ml ergänzt und nach Zugabe von 100 μl internem Standard (IS) wurden vorhandene Proteine mit 1 ml 2-Propanol ausgefällt. 6 ml Extraktionsmittel (Dichlormethan/Hexan/BHT 10%ig in Ethanol, 16,7/83,2/0,1) wurden zugegeben, die Luft im Reagenzglas durch N_2 ersetzt und die Carotinoide 1 min durch kräftiges Schütteln (Vortex) in die lipophile Phase extrahiert. Die Probe wurde 5 min im Ultraschallbad (SonorexSuper, Bandelin, Berlin, D) behandelt, erneut 30 s kräftig geschüttelt und anschließend die Phasen durch Zentrifugation

(Universalzentrifuge 30 RF, Hettlich, Tuttlingen, D) bei 2000 x g für 10 min getrennt. 5 ml der organischen Phase wurden abgenommen, die Lösemittel unter N₂ entfernt, Rückstand in Fließmittel aufgenommen und die Probe mittels HPLC direkt analysiert.

Carotinoidstandards

Stammlösungen wurden 1:200, Arbeitslösungen 1:11 mit n-Hexan verdünnt und die Extinktion im Photometer gegen n-Hexan bei den entsprechenden Wellenlängen gemessen. Zur Berechnung der Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz wurden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet (Britton 1995):

| | |
|--------------------|---|
| Lutein | $\epsilon_{450} = 136\,600 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$ |
| Zeaxanthin | $\epsilon_{450} = 132\,912 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$ |
| beta-Cryptoxanthin | $\epsilon_{450} = 136\,000 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$ |
| Lycopin | $\epsilon_{450} = 184\,575 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$ |
| alpha-Carotin | $\epsilon_{450} = 145\,500 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$ |
| beta-Carotin | $\epsilon_{450} = 139\,000 \text{ [M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{]}$ |

Kalibrierung

Aus den Carotinoidarbeitslösungen wurden drei Kalibrierungsproben so hergestellt, dass ein Konzentrationsverhältnis von K1: K2: K3 = 10: 3: 1 erhalten wurde. Dabei entsprachen die Konzentrationen der Carotinoide in K2 etwa der in den Proben erwarteten Carotinoidkonzentrationen. Aus definierten Mengen der Carotinoidarbeitslösungen wurde ein Standardmix in 2-Propanol hergestellt, für K2 1: 3 und für K 1: 10 mit 2-Propanol verdünnt. Von diesen Kalibrierungsproben wurden je 1 ml eingesetzt, 20 µl IS, 1000 µl Puffer A und 6 ml Extraktionsmittel zugegeben und die Kalibrierungsproben weiter gemeinsam mit den zu analysierenden Proben und einer Qualitätskontrollprobe wie oben aufgeführt, aufgearbeitet.

Kalibrierungsgeraden

Die Konzentration von Carotinoiden in Serum und Chylomikronen wurde mit Kalibrierungsgeraden berechnet. Dazu wurden die in den Kalibrierungsproben eingesetzten Konzentrationen der Carotinoide gegen ihre Peakhöhenverhältnisse (PHV) aufgetragen (PHV= Peakhöhe des Carotinoids/Peakhöhe des IS). Mit linearer Regressionsanalyse wurde durch die Punkte (0/0) , ($[K3]/PHV_{K3}$), ($[K2]/PHV_{K2}$) und ($[K1]/PHV_{K1}$) eine Ausgleichsgerade gelegt und Korrelationskoeffizient und für die Kalibrierungsproben die prozentuale Abweichung der errechneten von der gemessenen Konzentration bestimmt. Kalibrierungsgeraden wurden nur verwendet, wenn der Korrelationskoeffizient größer als 0,998 war und für K3 die berechnete nicht mehr als 15% von der gemessenen Konzentration abwich. Für jede Analysenserie wurde eine eigene Kalibrierung durchgeführt.

Die Probenaufgabe erfolgte mittels Autosampler durch Injektion von 50µl der Analysenlösung. Die HPLC-Bedingungen waren:

| | |
|---------------|---|
| Säule: | Suplex pKb-100; 5µm Supelco (Bellefonte; Pennsylvania; U.S.A.) |
| Mobile Phase: | A: MethanolAcetonitril/Isopropanol 54/44/2 v/v/v B: MethanolAcetonitril/Isopropano/Wasser 54/44/2/15 v/v/v/v |
| Gradient: | 0- 5 Min 64 %A, 36 % B 5- 15 Min 64 % A - 100% A 15- 27 Min 100% A 27- 30 Min 64 % A, 36 % B |
| Fluß: | 1ml/min |
| Temperatur: | Raumtemperatur |
| Detektion: | UV 450 nm für Carotinoide UV 292 nm für Tocopherole |

3.2.2 Bestimmung des Polymorphismus SNP1 im BCO-Gen

Am Institut für Biologie I in der Universität Freiburg wurde DNA (aus Blutproben) von 15 Probanden auf genetische Variabilitäten innerhalb des BCO-Gens überprüft. Speziell wurde ein „single nucleotid polymorphism“ (SNP1), der sich auf die Base 786 bezieht, untersucht. Dieser bezeichnet den Austausch der Base A durch T, was dazu führt, dass im funktionellen Protein an Position 262 die Aminosäure ein Arginin durch Serin ersetzt wird.

Die genomische DNA wurde isoliert und mit folgenden Primern das DNA-Stück in Exon 6 (16q23.1), auf dem der SNP1 lokalisiert ist, amplifiziert und anschliessend sequenziert:

Mel Exon6 up: 5'-GCT GAG TGG AAG GTC TCA G-3'

Mel Exon6 down: 5'-CCA TCC AGC TTC AGA ACT TG-3'

Im Hinblick auf den SNP1 Polymorphismus sind drei unterschiedliche Allelkombinationen möglich: Gruppe homozygot AA, homozygot TT und heterozygot AT.

3.2.3 Analytische Verfahren zur Bestimmung von alpha-Tocopherylphosphat

Alpha-Tocopherylphosphat Standardlösungen

Standardlösungen von alpha-Tocopherylphosphat wurden durch Lösen der Festsubstanz in Isopropanol/Wasser (1/1,v/v) hergestellt. Um zu Überprüfen, wie stabil die Standardlösung ist, wurde sie bei unterschiedlicher Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer analysiert. Die Standardlösungen wurden für maximal zwei Wochen benutzt und vor Versuchsbeginn am Photometer vermessen und die Konzentration mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes errechnet.

Für alpha-Tocopherylphosphat wurden keine Extinktionskoeffizienten in der Literatur gefunden. Deshalb wurden die Extinktionskoeffizienten experimentell bestimmt. Drei Standardlösungen mit unterschiedlicher Konzentration wurden in Wasser, und Isopropanol hergestellt. Die Lösungen wurden in Dreifachbestimmung mit UV bei 285 nm gemessen und der Extinktionskoeffizient mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt.

Bestimmung von alpha-Tocopherylphosphat in Serum-, Chylomikronen- und Erythrozytenproben

Eine Methode zur Messung von alpha-Tocopherylphosphat in Serum-, Chylomikronen- und Erythrozytenproben wurde entwickelt und validiert.

0,2 mg Erythrozyten wurden in ein Greiner Röhrchen pipettiert, 150 µl Pronase (40 µg/ml) zugeführt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden 1,5 ml Natriumchlorid (NaCl) (5%) und 1 ml Trichloressigsäure (TCA) (10%) zugegeben und gemischt. Serum- (200 µL) oder Chylomikronenproben (500 µL) wurden wie Erythrozytenproben aufgearbeitet, außer dass auf die Zugabe von Pronase und die Inkubation verzichtet wurde. 5 ml Tertiärbutylmethylether (TBME) wurden zur Probe pipettiert und die Mischung eine Minute geschüttelt und danach bei 5000 UPM und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Greiner Röhrchen pipettiert. Zum Rückstand wurden 3 mL TBME gegeben und das Röhrchen eine Minute auf einem Vortexer geschüttelt und anschließend wieder bei 5000 UPM zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals abgenommen und die Überstände vereinigt. Unter einem Stickstoffstrom wurde die Probe getrocknet. Das Röhrchen wurde mit Diethylether nachgespült und die etherische Phase erneut unter Stickstoff getrocknet. Der Rückstand wurde in 250 µL Isopropanol/Wasser (1/1, v/v) gelöst, in braune Autosamplervials gefüllt und mittels HPLC analysiert. Die Konzentration des alpha-Tocopherylphosphats in der Probe wurde mittels einer Regressionsgeraden bestimmt.

Die HPLC-Bedingungen waren:

Säule: LiChroCART RP-18e, 25cmx4,6mm, 5µm (E. Merck, Darmstadt, D)
Mobile Phase: Acetonitril/Isopropanol/Essigsäure/Wasser 20/60/3/17 v/v/v/v
Gradient: Isokratisch
Fluß: 1ml/min
Temperatur: Raumtemperatur
Detektion: UV 286 nm

3.2.4 Validierung

Die Instrumentelle-, wie auch die Methodvalidierung dieser neu entwickelten Methode wurde in Anlehnung an die ICH Richtlinien (International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, ICH Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Methodology) durchgeführt.

Linearität:

Die Linearität für alpha-Tocopherylphosphat wurde mit fünf verschiedenen Konzentrationen überprüft. Sie lagen im Bereich von 0,2-20 µmol/L alpha-Tocopherylphosphat. Die Linearität bezieht sich auf das Verhältnis von Peakfläche zu Konzentration.

Präzision:

Fünf Standardlösungen wurden an drei unterschiedlichen Tagen unter den gleichen analytischen Bedingungen in Dreifach-Bestimmung vermessen.

Injektionswiederholbarkeit:

Die Sensitivität/Präzision der HPLC-Anlage wurde durch Mehrfachinjektion getestet. Dazu wurden zwei Standardlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen zehnmal injiziert und die Konzentrationen über die Peakflächen bestimmt.

Nachweis- und Bestimmungsgrenze:

Die Nachweisgrenze (NG) ist die niedrigste Konzentration des zu untersuchenden Stoffes, die detektiert und vom Grundrauschen unterschieden werden kann.

Die Bestimmungsgrenze (BG) ist die niedrigste Konzentration des zu untersuchenden Stoffes, die in einer Probe mit definierter Genauigkeit gemessen werden kann.

Nachweisgrenze (NG):

- NG ist ermittelt durch:
- $NG=3.3\sigma/S$
- σ = Standardabweichung der Punkte von der Kalibrierungsgeraden
- S= Steigung der Kalibrierungsgeraden.
- Die Steigung ist aus der Kalibrierungsgeraden des Standards ermittelt worden.

Bestimmungsgrenze (BG):

- BG ist ermittelt durch:
- $BG=10\sigma/S$
- σ = Standardabweichung der Punkte von der Kalibrierungsgeraden
- S= Steigung der Kalibrierungsgeraden.

Die Steigung ist aus der Kalibrierungsgeraden des Standards ermittelt worden.

Retentionzeit:

Die Stabilität der Retentionszeit von alpha-Tocopherylphosphat in Standardlösung, sind im Serum wurde in 40 HPLC-Läufen überprüft.

Wiederfindung:

Die Wiederfindung wurde für alpha-Tocopherylphosphat an fünf Tagen mit jeweils vier Proben überprüft. Dafür wurden bekannte Mengen an alpha-Tocopherylphosphat vor der Probenaufbereitung zum Serum gegeben. Die Bestimmung des Verlustes durch die Aufarbeitung erfolgte nach HPLC Analyse.

3.2.5 Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient von alpha-Tocopherylphosphat

In der Pharmazie benutzt man zur Bestimmung des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ein System, bestehend aus n-Oktanol-1 und einem Puffer mit einem pH-Wert, der dem am natürlichen Resorptionsort möglichst nahe kommt.

Die Temperatur wird auf 37°C gehalten. Dieses System simuliert die Verteilung von Stoffen in vivo zwischen den entsprechenden Körperflüssigkeiten und den Lipiden der biologischen Membranen (Koch & Ritschel, 1987).

Alpha-Tocopherylphosphat wurde in der wässrigen Phase (TRIS-Puffer pH 7,8) gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. n-Oktanol-1 wurde hinzugefügt und im Wasserbad bei 37°C, bis zur Erreichung der Gleichgewichtsverteilung, geschüttelt. Sowohl die wässrige, als auch die lipophile Phase wurde vorher mit dem jeweils anderen Lösungsmittel gesättigt, um nachträgliche Volumensänderungen zu vermeiden. Die Bestimmung der alpha-Tocopherylphosphatkonzentration wurde in der wässrigen Phase vorgenommen. Die Berechnung erfolgte nach:

$$P = \frac{(c_0 - c) * V_w}{c_0 * V_L}$$

- P Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient
- c₀ Konzentration in der Wasserphase vor Beginn des Experimentes
- c Konzentration in der Wasserphase nach Einstellung des Gleichgewichtes
- V_w Volumen der Wasserphase
- V_L Volumen der lipophilen Phase

Aus dem Koeffizienten lässt sich auf das Verhalten der Stoffe während der Resorption schließen.

Außerdem wird ein Hinweis auf die mögliche Speicherung des Wirkstoffs im Körper gegeben. Da der Körperfettanteil beim Menschen im Durchschnitt zwischen 12-28% liegt, bei Adipositas sogar bei 50% und mehr, werden lipophile Wirkstoffe in beträchtlichen Mengen im Körperfett gespeichert.

3.2.6 Stabilität von alpha-Tocopherylphosphat im Serum

Die Stabilität von alpha-Tocopherylphosphat im Serum wurde in dotiertem Serum untersucht. Die Stabilität wurde ausgetestet, um zu ermitteln, ob alpha-Tocopherylphosphat im Serum durch Phosphatasen gespalten wird. Drei unterschiedliche Konzentrationen alpha-Tocopherylphosphats wurden zu frisch hergestellten Serum gegeben und in Dreifachbestimmung analysiert. Diese Seren wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (20° C) aufgearbeitet (nach 15 min, 30 min, 60 min und 120 min) und die Konzentrationen verglichen.

3.2.7 Analytische Verfahren zur Bestimmung von Tocotrienol und Tocopherol in Serum

Die simultane Bestimmung von delta-, gamma-, alpha-Tocotrienol und gamma-Tocopherol und alpha-Tocopherol in Serum erfolgte in Anlehnung an Yap, et al. (1999). Diese Methode wurde adaptiert und optimiert. 250 µl Serum wurden in ein Eppendorf Röhrchen pipettiert und durch Hinzufügen von 500 µl einer Acetonitril/Tetrahydrofuran Mischung (3:2, v/v) deproteiniert. Das Gemisch wurde für 2,5 min gemischt und danach bei 15000 UPM für 20 min zentrifugiert. 100 µl des Überstands wurden direkt auf die Säule injiziert.

Standardkurven wurden erstellt, indem Serum mit bekannter Mengen an delta-, gamma-, und alpha-Tocotrienol (alpha-Tocotrienol 100- 6500 nmol/L, gamma-

Tocotrienol 80-18000 nmol/L und delta-Tocotrienol 38-2400 nmol/L) dotiert wurden. Die Standards wurden bei -20°C in dunklen Flaschen aufbewahrt und waren für mindestens drei Monate stabil. Die Plasmastandards wurden auch benutzt um die “within-day” und “between-day” Präzision der Methode zu bestimmen. Die Wiederfindung wurde bestimmt, indem Lösungen von alpha-, gamma-, delta-Tocotrienol und von gamma- und alpha-Tocopherol in Methanol direkt aufgespritzt wurden und mit den Peakflächen von aufgearbeiteten Plasmaproben verglichen wurden.

Die HPLC-Bedingungen waren:

| | |
|---------------|--|
| Säule: | LiChroCART RP-18e, 25cmx 4,6mm, 5 μm (E. Merck, Darmstadt, D) |
| Mobile Phase: | Methanol |
| Gradient: | Isokratisch |
| Fluß: | 1ml/min |
| Temperatur: | Raumtemperatur |
| Detektion | UV 292 nm |

3.2.8 Bestimmung der Hauteigenschaften

Hauthydration und Transepidermaler Wasserverlust (TEWL)

Die Hauthydration wurde corneometrisch (Corneometer CM 825, Corage & Khazaka Electronics, Köln, D) bestimmt. Hierbei wurde mittels einer kapazitiven Methode die Hautfeuchtigkeit gemessen. Die Messwerte sind in AU (arbitrary units) angegeben (Heinrich U, et al 2003).

Der TEWL wurde mit einem TEWA-Meter (TM 300, Courage & Khazaka Electronics, Köln, D) gemessen und ist in g/hm^2 angegeben.

Struktur und Textur der Haut

Die Charakterisierung der Hautoberflächen erfolgte über die SELS-Methode (Surface Evaluation of Living Skin, Visioscan, Courage & Khazaka Electronics, Köln, D), welche auf der photographischen Darstellung lebender Haut unter Speziallicht und elektronischer Verarbeitung und Analyse des Bildes basiert. Ein definiertes Testfeld wurde ausgewählt und die Parameter Faltigkeit, Rauigkeit, Glätte und Schuppung in AU gemessen (Tronnier et al 1999).

Hautdicke und -dicke

Zur Bestimmung der Hautdicke und -dicke wurde ein Hochfrequenz Ultraschall (B) Verfahren (20 MHz) mit 2-D-Konfiguration (Derma Scan C, Cortex Technology, Dänemark) eingesetzt. Mit diesem Verfahren wird auf nicht invasivem Wege die Differenzierung einzelner Gewebestrukturen ermöglicht. Den verschiedenen Echoamplituden werden 256 Falschfarben zugeordnet, helle Farben entsprechen einer hohen und dunkle Farben einer schwachen Reflektion. So können geringe Unterschiede im Reflektionsverhalten von Geweben sichtbar gemacht werden.

Parameter der Mikrozirkulation des kutanen und subkutanen Blutflusses

Flussgeschwindigkeit (BV), Sauerstoffsättigung (S-O₂), peripherer Blutfluss (BF) und die relative Hämoglobinkonzentration rHb wurden mit Hilfe des O₂C-Systems (Lea Instruments, Gießen, D) gemessen. Mittels einer Glasfasersonde wurden die Durchblutungsparameter zeitgleich in zwei getrennten Schichten (1 und 8 mm) tiefenselektiv in einer Messung erfasst. Die Bestimmung von rHb und S-O₂ erfolgt photometrisch simultan über eine Sonde. Die Bestimmung von BV und BF basieren auf dem Doppler-Effekt, wobei durch Erythrozytenbewegung eine Verschiebung in der Frequenz des detektierten Laserlichts entsteht; mit steigender Erythrozytenzahl nimmt das Signal zu. Die Sauerstoffsättigung wird in %, alle anderen Messgrößen in AU (arbitrary units) angegeben.

Sensitivität der Haut

Ein Nicotinat-Test wurde durchgeführt, um die Sensitivität der Haut zu charakterisieren. $5 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ einer 0,25 %ige Nicotinatlösung wurden auf den Unterarm der Probanden appliziert und die Erythembildung (Rötung der Haut) gemessen (Chromameter CM300, Minolta, Ahrensburg, D).

Induktion des Erythems durch Licht und Messung der Hautrötung

Dorsale Hautbereiche im Bereich der Scapularegion wurden jeweils nur einmal mit einem Solarsimulator (SOL 3, Hönle, München, D) bestrahlt. Die spektrale Verteilung des Simulators entsprach der des Tageslichts.

Für jeden Probanden wurde eine minimale Dosis ermittelt, bei der gerade eine Erythembildung auftritt (MED). Am Tag 0 der Studie, nach 6 Wochen und 12 Wochen erfolgte dann eine Bestrahlung mit der individuellen 1,25 fachen MED. Die Bildung eines Erythems (Hautrötung) wurde vor und 24 Std. nach Bestrahlung mit einem Chromatometer gemessen (Chromatometer CR 300, Minolta, Ahrensburg, D). Die Differenz des chromatometrisch festgestellten Rötungswertes vor und 24 Std nach der Bestrahlung, ergab den Δa -Wert als Indikator für das Ausmaß des Erythems.

3.3 Humanstudien

3.3.1 Untersuchungen zur Metabolisierung von beta-Carotin in Abhängigkeit des Polymorphismus SNP1 im beta-Carotin Oxygenase-Gen (BCO-Gen)

Am Institut für Biologie I in der Universität Freiburg wurde DNA (aus Blutproben) von 15 Probanden auf genetische Variabilität innerhalb des BCO-Gens überprüft. Ob diese Variabilitäten Auswirkung auf die Umsetzung von β -Carotin hat, wurde in der nachfolgenden Humanstudie untersucht.

An der Studie nahmen 9 Probanden (zwei Männer, sieben Frauen, Alter zwischen 25 und 52 Jahren) teil, sie wurden angewiesen 2 Tage vor der Studie und am Versuchstag keine carotinoidhaltigen Lebensmittel zu sich zu nehmen. Morgens wurden eine Einmaldosis von 2 mg beta-Carotin (Allied Biotech Corp. Taipei, Taiwan) und 30 mL Weizenkeimöl Naturata (Brackenheim, D) mit zwei Brötchen verabreicht. Nach sechs Stunden wurde ein Mittagessen von 200 g gekochten Nudeln (eifrei) gereicht. Blutabnahmen waren bei t= 2 Std, 4 Std, 5 Std, 6 Std und 8 Std.

Nur Serum wurde behalten Blutkuchen verworfen. Chylomikronen wurden nach Tepstra et al. 1981 und Tepstra et al. 1985 aufbereitet. Chylomikronen und Serum wurden direkt analysiert.

Gemessen wurde beta-Carotin und zusätzlich Retinol, Retinyl Palmitat, Lycopin, Lutein, Cryptoxanthin, Zeaxanthin, alpha- Carotin, alpha-Tocopherol und gamma-Tocopherol.

3.3.2 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von alpha-Tocopherylphosphat beim Menschen

An der Studie nahmen fünf weibliche Probandinnen, im Alter von 25- 48 Jahren teil. Sie nahmen bis zu drei Wochen vor der Studie keine Vitaminpräparate ein. Eine Einmaldosis von 400 IE alpha-Tocopherylphosphat in Kapselform (Bestandteile der Kapsel: Glycerin, Gelatine und Karamel) wurde verabreicht. Dazu wurde ein Frühstück von zwei Brötchen mit 80 g Hüttenkäse und 30 g Erdbeermarmelade gereicht. Nach 6 Std wurde ein Mittagessen von 200 g Hartweizennudeln ohne Ei eingenommen. Nach 11 Std durften die Probandinnen wieder frei ihre Mahlzeiten wählen. Sie wurden angewiesen auf Lebensmittel mit hohem Tocopherol-, beta-Carotin- und Retinolgehalt zu verzichten. Zum Zeitpunkt 0 Std, 1 Std, 3 Std, 6 Std, 11 Std, 24 Std und 48 Std wurden Blutproben abgenommen. Serum und Chylomikronen wurden isoliert und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Der Quick- und PTT-Wert und die Thrombozytenaggregation wurden sofort bestimmt.

Die Studie wurde nach einer Auswaschphase von drei Wochen mit einer Dosis von 800 IE alpha-Tocopherylphosphats wiederholt. Drei von den fünf Probandinnen nahmen an der Wiederholungsstudie teil. Alle anderen Parameter des Studiendesigns waren gleich.

Eine Langzeitstudie, mit drei der fünf Probandinnen wurde, mit einer täglichen Dosis von 800 IE alpha-Tocopherylphosphat über einen Zeitraum von 28 Tagen durchgeführt. Blutproben wurden am Tag 0, Tag 14, Tag 28 entnommen. Die Ernährung während der 28 Tage war frei. Quick- und PTT-Test und Messungen der Thrombozytenaggregation wurden am Tag 0, Tag 14 und Tag 28 durchgeführt.

Nach einer weiteren Auswaschphase von drei Wochen nahmen die drei Probandinnen eine tägliche Dosis von 800 IE alpha-Tocopherol über einen Zeitraum von vier Wochen zu sich, um die Bioverfügbarkeit der beiden E-Vitamine miteinander zu vergleichen.

Die Serumproben wurden auf alpha-Tocopherylphosphat untersucht und wie in 2.2.3 beschrieben in Dreifach-Bestimmung aufgearbeitet. Die Analyse erfolgte mit dem

dort beschriebenen HPLC System. Alpha-Tocopherol wurde in den Serum- und Chylomikronenproben wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben analysiert. Alle von einer Versuchsperson stammenden Proben wurden in jeweils einer Analysenserie analysiert.

3.3.3 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Tocotrienolen und deren Einfluss auf Hauteigenschaften beim Menschen

Hierzu wurden zwei Studien durchgeführt. Eine Cross-over Verfügbarkeitsstudie mit zwei unterschiedlichen Nahrungssupplementen und eine Studie in Kooperation mit dem Institut für experimentelle Dermatologie der Universität Witten-Herdecke. Bei dieser wurde die Supplementierung von Tocotrienolen und deren Effekte auf das Hautbild beim Menschen untersucht.

Zwei verschiedene Nahrungssupplemente mit gemischten Tocotrienolen als Hauptkomponenten wurden bei der Cross-over-Studie zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit eingesetzt:

Tocomin 50%, Carotech (Malaysia), enthielt gemischte Tocotrienole mit alpha-Tocopherol in einer pflanzlichen Ölsuspension. Die Wirksubstanzen wurden aus der Palmfrucht (*Elaeis guineensis*) extrahiert und aufkonzentriert.

TocoPlus, wHc-service GmbH (Neuenbürg, D) enthielt ebenfalls gemischte Tocotrienole und alpha-Tocopherol, allerdings dient in diesem Präparat Maisstärke als Matrix. Die Vitamere in diesem Präparat wurden auch aus der Palmfrucht (*Elaeis guineensis*) extrahiert und aufkonzentriert.

Die Studie wurde mit 6 Probandinnen (30- 50 Jahre) durchgeführt. Eine Einmaldosis (129 mg gemischte Tocotrienole und Tocopherole) von je einem Präparat wurde in Kombination mit einem Frühstück von zwei Brötchen mit 30 g Butter und 30 g Erdbeermarmelade gereicht. Nach 6 Std gab es ein Mittagessen von 200 g Hartweizennudeln ohne Ei. Nach 11 Std durften die Probandinnen wieder frei ihre Mahlzeiten wählen, außer dass sie angewiesen wurden auf Lebensmittel mit hohem Tocopherol-, beta-Carotin- und Retinolgehalt zu verzichten. Die Zeitpunkte der

Blutentnahme waren 0 Std, 1 Std, 3 Std, 4 Std, 5 Std, 7 Std, 11 Std und 24 Std. Alpha-, delta- und gamma-Tocotrienol und gamma- und alpha-Tocopherol wurden im Serum mittels HPLC nach 2.2.6 bestimmt.

Eine weitere Studie zur Bioverfügbarkeit der Tocotrienole und deren Einfluss auf kosmetische und photoprotektive Hauteigenschaften, wurde in Kooperation mit dem Institut für experimentelle Dermatologie der Universität Witten-Herdecke durchgeführt.

An dieser Studie nahmen 6 Erwachsene mit trockener sensitiver Haut teil, die zum Hauttyp II (weiße Haut, blond oder hellbraunes Haar, blaue oder hellbraune Augen und leichte Hautbräunung) zählten (Pathak 1982). Die Probanden wurden vom Institut für experimentelle Dermatologie der Universität Witten-Herdecke rekrutiert und jeder Proband stimmte der Teilnahme an der Studie schriftlich zu. Das Studiendesign wurde von der Ethikkommission der Universität Witten-Herdecke genehmigt. Folgende Kriterien wurden an die Probanden gestellt: ein guter allgemeiner Gesundheitszustand, keine Malabsorption, kein pathogener Lipidmetabolismus und keine Lebererkrankungen. Die Teilnehmer waren Nichtraucher, nicht schwanger oder in einer Laktationsphase. Ferner nahmen sie während der Studie keine Vitaminpräparate ein. Photosensibilisierende Erkrankungen der Teilnehmer waren nicht bekannt. Einen Monat vor Beginn der Studie wurden intensive Sonnenbestrahlungen vermieden. Die Probanden nahmen 3 Kapseln TocoPlus wHc-Service (Neuenbürg, D) zu den Mahlzeiten über einen Zeitraum von 12 Wochen zu sich. Drei Kapseln pro Tag, entsprachen einer Tagesdosis von 129 mg gemischten Tocotrienolen und Tocopherolen. Vor der Einnahme der Kapseln, nach 6 Wochen und nach 12 Wochen wurden Hautparameter untersucht und Blutproben entnommen.

Hautparameter wurden wie in 2.2.8 beschrieben gemessen.

Alpha-, beta-, und gamma-Tocotrienole und gamma- und alpha-Tocopherole wurden mittels HPLC nach 2.2.7 bestimmt.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchungen zur Metabolisierung von beta-Carotin in Abhängigkeit des Polymorphismus SNP1 im beta-Carotin Oxygenase-Gen (BCO-Gen)

In der folgenden Humanstudie wurde untersucht, ob der Polymorphismus SNP1 im BCO-Gen Auswirkung auf die Umsetzung von beta-Carotin im Menschen hat und dies im Zusammenhang mit den in Kapitel 1.2.2 genannten interindividuellen Unterschieden in der Bioverfügbarkeit von beta-Carotin (Low- und High-Responder) steht.

4.1.1 Analytische Verfahren zur Bestimmung von Carotinoiden, Retinol, Retinylpalmitat und alpha-Tocopherol in Serum und Chylomikronen

Die Probenaufarbeitung und Messung wurde wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben durchgeführt.

Die Analyse der Verbindungen aus Serum- und Chylomikronenproben erfolgte mittels der HPLC. Carotinoide (Lutein, Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Lycopin, alpha-Carotin und beta-Carotin) wurden bei 450 nm detektiert, Retinol, gamma-Tocopherol, alpha-Tocopherol und Retinylpalmitat bei einer Detektionswellenlänge von 292 nm vermessen.

In Abbildung 4 ist ein typisches HPLC-Chromatogramm einer Analyse der Carotinoide in Serum abgebildet. Die Methode erlaubt die Analyse der Hauptcarotinoide im Serum des Menschen innerhalb einer Analysenlaufzeit von etwa 30 min.

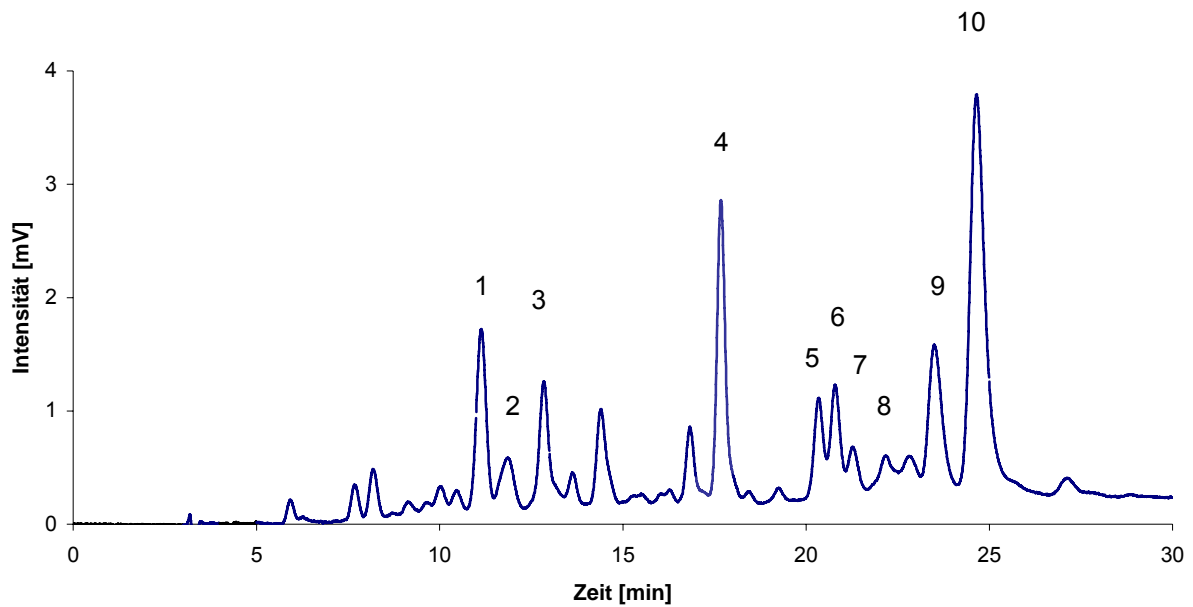


Abb. 4: Typisches HPLC-Chromatogramm der Carotinoanalyse einer Serumprobe, 1= Lutein, 2= Zeaxanthin, 3= Interner Standard (beta-apo-8'-carotenol), 4= Cryptoxanthin, 5= all-trans-Lycopin, 6= 5-cis-Lycopin, 7= cis-Isomer des Lycopins, 8= cis-Isomer des Lycopins, 9= alpha-Carotin, 10= beta-Carotin

In Abbildung 5 ist ein typisches HPLC-Chromatogramm zur Analyse von Retinol, gamma-Tocopherol, alpha-Tocopherol und Retinylpalmitat in Serum gezeigt. Die Probenaufarbeitung und Messung erfolgte wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben

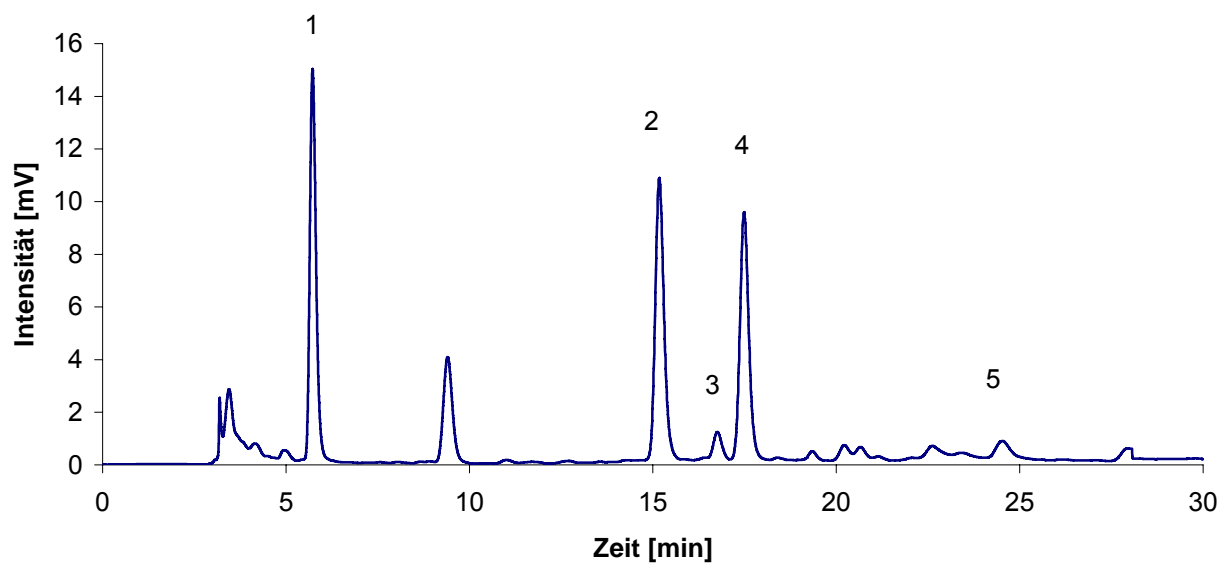


Abb. 5: Typisches HPLC-Chromatogramm der Analyse von Retinol und Tocopherol einer Serumprobe 1= Retinol, 2= Interner Standard (delta-Tocopherol), 3= gamma-Tocopherol, 4= alpha-Tocopherol, 5= Retinylpalmitat

4.1.2 Bestimmung des Polymorphismus SNP1 im BCO-Gen

In einer ausgewählten Population (n= 15) wurde der Polymorphismus SNP1 im BCO-Gen untersucht. Die Bestimmung erfolgte durch DNA Sequenzierung eines mittels PCR amplifizierten Genabschnitts in Kooperation mit dem Institut für Biologie I der Universität Freiburg (Details siehe Kapitel 2.2.2). Der Polymorphismus betrifft die Base 786 des BCO-Gens (16q23.1), die entweder Adenin oder Thymin sein kann. Ein Austausch 786 A → T führt im Protein zur Substitution der Aminosäure Arginin an Position 262 durch Serin. Aufgrund der möglichen Allelkombination ergeben sich drei mögliche Genotypen: heterozygot AT, homozygot AA und homozygot TT.

In der ausgewählten Population waren 9 Probanden heterozygot AT, 4 homozygot AA und 2 homozygot TT (n = 15) (siehe auch Tabelle 3).

| Gruppe homozygot-TT | Gruppe homozygot-AA | Gruppe heterozygot-AT |
|------------------------|------------------------|--------------------------|
| n= 2 | n= 4 | n= 9 |

Tabelle 3: Zuordnung der Probanden in Gruppen entsprechend des Polymorphismus SNP1 im BCO-Gen

Aus der Gruppe heterozygot AT nahmen vier, aus der Gruppe homozygot AA drei und aus der Gruppe homozygot TT zwei Probanden an der Bioverfügbarkeitsstudie teil.

4.1.3 Beta- Carotin Humanstudie

Chylomikronen

In der Studie zur Bioverfügbarkeit von beta-Carotin wurden morgens eine Einmaldosis von 2 mg beta-Carotin Allied Biotech Corp. (Taipei, Taiwan) gereicht, gleichzeitig erhielten die Probanden 30 mL Weizenkeimöl Naturata (Brackenheim, D) und zwei Brötchen.

Sechs Stunden nach Versuchsbeginn wurde ein Mittagessen bestehend aus 200 g gekochten Nudeln (eifrei) gereicht. Blutabnahmen waren nach 2 Std, 4 Std, 5 Std, 6 Std und 8 Std.

Die Chylomikronenfraktion wurde auf beta-Carotin, Retinylpalmitat, und alpha-Tocopherol in allen drei Probandengruppen (homozygot TT, homozygot AA und heterozygot AT) untersucht.

Die Ergebnisse der Chylomikronenanalyse der Gruppe heterozygot AT sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Beta-Carotin-, Retinylpalmitat-, und alpha-Tocopherolkonzentrationen (nmol/L \pm SD) in Chylomikronen nach Gabe von 2 mg beta-Carotin, Gruppe heterozygot AT (n= 4)

| | 2 Std | 4 Std | 5 Std | 6 Std | 8 Std |
|---------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| beta-Carotin [nmol/L] | 2,7 \pm 3,5 | 3,4 \pm 2,6 | 4,9 \pm 3,8 | 1,5 \pm 0,21 | 3,3 \pm 3,1 |
| Retinylpalmitat [nmol/L] | 1,0 \pm 0,54 | 2,4 \pm 0,53 | 3,2 \pm 0,79 | 1,2 \pm 0,92 | 0,7 \pm 0,17 |
| alpha-Tocopherol [nmol/L] | 0,95 \pm 0,91 | 1,9 \pm 0,79 | 2,3 \pm 1,97 | 0,86 \pm 0,71 | 1,2 \pm 0,73 |

Die Ergebnisse für die Analyte in Chylomikronen der Gruppe homozygot TT sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tab. 5: Beta-Carotin-, Retinylpalmitat-, und alpha-Tocopherolkonzentrationen (nmol/L), in Chylomikronen, nach Gabe von 2 mg beta-Carotin, Gruppe homozygot TT (n= 2)

| | 2 Std | 4 Std | 5 Std | 6 Std | 8 Std |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| beta-Carotin [nmol/L] | 1,8 | 6,3 | 6,4 | 3,7 | 2,5 |
| Retinylpalmitat [nmol/L] | 0,77 | 4,3 | 3,2 | 2,0 | 0,7 |
| alpha-Tocopherol [nmol/L] | 0,44 | 2,2 | 2,0 | 1,3 | 0,69 |

Die Ergebnisse für die Analyte in Chylomikronen der Gruppe homozygot AA sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab. 6: Beta-Carotin-, Retinylpalmitat-, und alpha-Tocopherolkonzentrationen (nmol/L± SD) in Chylomikronen nach Gabe von 2 mg beta-Carotin, Gruppe homozygot AA (n= 3)

| | 2 Std | 4 Std | 5 Std | 6 Std | 8 Std |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| beta-Carotin [nmol/L] | 1,2 ±0,28 | 1,9 ±0,56 | 1,5 ±0,80 | 1,2 ±0,43 | 0,85 ±0,79 |
| Retinylpalmitat [nmol/L] | 3,7 ±2,3 | 3,1 ±1,7 | 3,1 ±2,2 | 3,1 ±3,5 | 2,1 ±3,2 |
| alpha-Tocopherol [nmol/L] | 1,1 ±0,74 | 1,2 ±0,78 | 1,0 ±0,81 | 0,75 ±0,31 | 0,39 ±0,14 |

In allen drei Gruppen kam es zu einem Anstieg von alpha-Tocopherol in den Chylomikronen. Dieser Anstieg ist auf den Gehalt von alpha-Tocopherol im Weizenkeimöl (56 mg/ 30 mL) zurückzuführen, welches die Probanden zu sich genommen haben. 56 mg alpha-Tocopherol entsprechen der ca. 4fachen Menge der empfohlenen Tagesdosis an Vitamin E (DGE 2000). Nach Angaben des Herstellers und eigenen Untersuchungen enthielt das beta-Carotin Supplement kein Vitamin E.

In Abbildung 6 sind die zeitabhängigen beta-Carotinkonzentrationen in Chylomikronen der Gruppen heterozygot AT, homozygot AA und homozygot TT zum direkten Vergleich aufgetragen. Zum Zeitpunkt t= 0 Std wurde keine Serumprobe entnommen, da die Probanden nüchtern waren und daher keine Chylomikronen im Blut vorhanden sind.

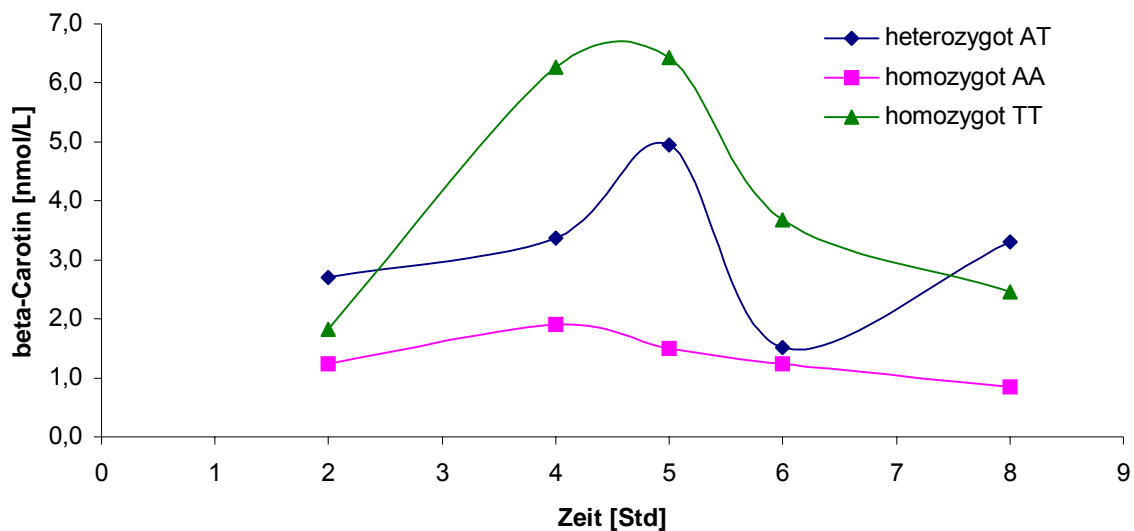


Abb. 6: Verlauf der beta-Carotinkonzentration in Chylomikronen in den Gruppen: heterozygot AT (n= 4), homozygot AA(n= 3) und homozygot TT(n= 2) nach Gabe von 2 mg beta-Carotin

Beta-Carotin erreichte in der Gruppe homozygot TT nach 4-5 Stunden ein Maximum von ca. 6,4 nmol/L. In der Gruppe heterozygot AT wurde nach 5 Stunden ein Maximum von 4,9 nmol/L und in der Gruppe homozygot AA nach 4 Stunden ein Maximum von nur 1,9 nmol/L gemessen.

In Abbildung 7 sind die Retinylpalmitatkonzentrationen in Chylomikronen der Gruppen heterozygot AT, homozygot AA und homozygot TT zusammengefasst.

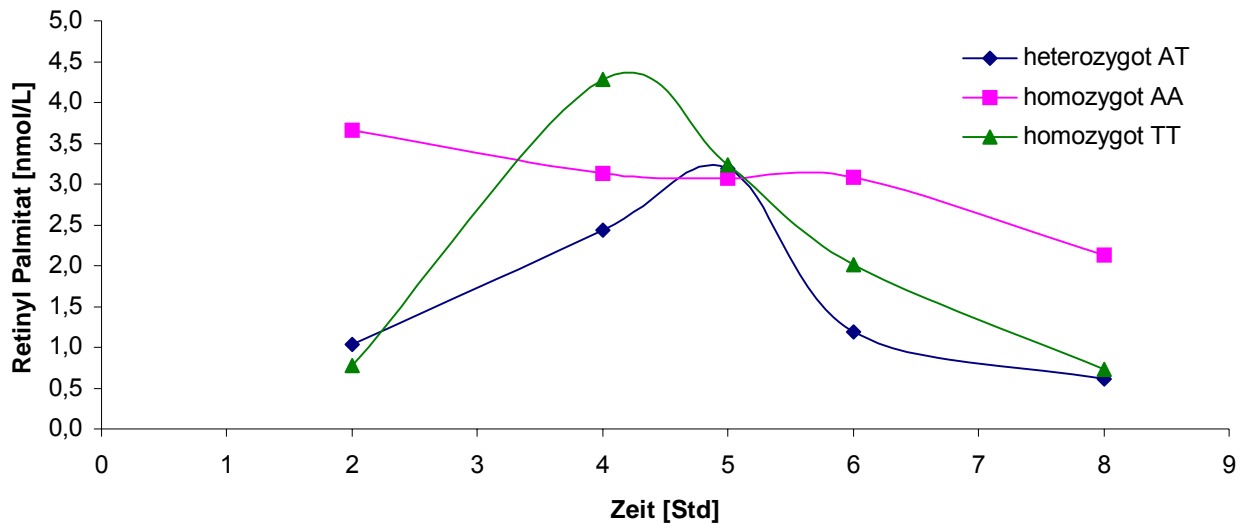


Abb. 7: Verlauf der Retinylpalmitatkonzentration in Chylomikronen in den Gruppen: heterozygot AT ($n=4$), homozygot AA ($n=3$) und homozygot TT ($n=2$) nach Gabe von 2 mg beta-Carotin

Die Konzentration an Retinylpalmitat in den Chylomikronen hatte in der Gruppe homozygot AA schon nach 2 Stunden ein Maximum von ca. 3,7 nmol/L Serum erreicht und blieb die nächsten vier Stunden relativ konstant, nach acht Stunden war der Wert auf 2,1 nmol/L abgefallen. In der Gruppe homozygot TT stieg die Konzentration an Retinylpalmitat nach vier Stunden auf ein Maximum von 4,3 nmol/L und fiel bis zum Zeitpunkt $t=8$ Std wieder auf den Ausgangswert ab. In der Gruppe heterozygot AT erreichte die Retinylpalmitatkonzentration nach 4 Stunden ein Maximum von 3,2 nmol/L und fiel ebenfalls bis zum Zeitpunkt $t=8$ Std auf den Ausgangswert ab.

Die Unterschiede im Konzentrationsverlauf und der Konzentrationsmaxima an beta-Carotin und Retinylpalmitat in den Gruppen lassen vermuten, dass beta-Carotin unterschiedlich verstoffwechselt wird. Zur weiteren Auswertung werden die jeweiligen AUCs (area under the curve) berechnet.

In Tabelle 7 sind die Flächen unter der Kurve (AUC 0- 8 Std) zum zeitabhängigen Konzentrationsverlauf von beta-Carotin, Retinylpalmitat und alpha-Tocopherol in Chylomikronen der einzelnen Probanden aus der Gruppe heterozygot AT, dargestellt. Diese wurden mittels der Trapezoidalmethode errechnet. Je größer die AUC, desto größer ist die über die Chylomikronen transportierte Stoffmenge. Das

Verhältnis der AUC-Werte von beta-Carotin zu Retinylpalmitat liegt in der Gruppe heterozygot AT bei allen vier Probanden über 1 (Mittelwert= 2,2).

Tab. 7: AUC (0- 8 Std) von Beta-Carotin , Retinylpalmitat und alpha-Tocopherol in Chylomikronen und deren Verhältnisse zueinander, nach Gabe von 2 mg beta-Carotin, Gruppe heterozygot AT (n= 4)

| Proband (Nr.) | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|------|------|------|------|
| AUC Beta – Carotin [Std x nmol/L] | 20,9 | 49,7 | 5,7 | 18,4 |
| AUC Retinyl Palmitat [Std x nmol/L] | 7,2 | 17,7 | 2,8 | 17,6 |
| AUC Alpha-Tocopherol [Std x nmol/L] | 5,7 | 14,9 | 4,3 | 12,7 |
| AUC AUC Beta-Carotin/Alpha-Tocopherol | 3,7 | 3,3 | 1,3 | 1,5 |
| AUC AUC Retinyl Palmitat/Alpha-Tocopherol | 1,3 | 1,2 | 0,65 | 1,4 |
| AUC AUC Beta-Carotin/ Retinyl-Palmitat | 2,9 | 2,8 | 2 | 1,1 |

In Tabelle 8 sind die AUC Werte des beta-Carotins, des Retinylpalmitats und des alpha-Tocopherols der Gruppe homozygot AA aufgeführt. Die drei Analyte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Das Verhältnis von beta-Carotin zu Retinylpalmitat liegt bei allen Probanden der Gruppe homozygot AA unter 1 (Mittelwert= 0,6).

Tab. 8: AUC (0- 8 Std) von beta-Carotin, Retinylpalmitat und alpha-Tocopherol in Chylomikronen und deren Verhältnisse zueinander, nach Gabe von 2 mg beta-Carotin, Gruppe homozygot AA(n= 3)

| Proband (Nr.) | 5 | 6 | 7 |
|---|------|------|------|
| AUC beta – Carotin [Std x nmol/L] | 5,5 | 10,9 | 8,9 |
| AUC Retinyl Palmitat [Std x nmol/L] | 6,5 | 40,3 | 12,2 |
| AUC Alpha-Tocopherol [Std x nmol/L] | 8,1 | 2,6 | 15,8 |
| AUC AUC beta-Carotin/alpha-Tocopherol | 0,68 | 4,2 | 0,57 |
| AUC AUC Retinyl Palmitat/alpha-Tocopherol | 0,8 | 15,7 | 0,77 |
| AUC AUC beta-Carotin/ Retinyl-Palmitat | 0,84 | 0,27 | 0,73 |

In Tabelle 9 sind die AUC Werte des beta-Carotins, des Retinylpalmitats und des alpha-Tocopherols der Gruppe homozygot TT, abgebildet. Die drei Analyte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Das Verhältnis von beta-Carotin zu Retinylpalmitat liegt in der Gruppe homozygot TT bei beiden Probanden über 1 (Mittelwert= 2,0).

Tab. 9: AUC (0- 8 Std) von beta-Carotin, Retinylpalmitat und alpha-Tocopherol und deren Verhältnisse zueinander, nach Gabe von 2 mg beta-Carotin, Gruppe homozygot TT (n= 2)

| Proband (Nr.) | 8 | 9 |
|--|------|------|
| AUC beta – Carotin [Std x nmol/L] | 30,9 | 23,9 |
| AUC Retinyl Palmitat [Std x nmol/L] | 12,3 | 17,7 |
| AUC Alpha-Tocopherol [Std x nmol/L] | 7,7 | 9,9 |
| AUC AUC beta-Carotin/alpha-Tocopherol | 4 | 2,4 |
| AUC AUC Retinyl Palmitate/alpha-Tocopherol | 0,4 | 0,74 |
| AUC AUC beta-Carotin/ Retinyl-Palmitat | 2,5 | 1,4 |

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass beta-Carotin in Abhängigkeit eines Polymorphismus im BCO-Gen (SNP 1) unterschiedlich verstoffwechselt wird. In der Gruppe von Individuen, die auf beiden Allelen an Position 786 des BCO-Gens ein Adenin tragen (homozygot AA) liegt das Verhältnis der AUC beta-Carotin in Chylomikronen zur AUC Retinylpalmitat in Chylomikronen bei 0,6. Dagegen findet sich in den Gruppen die auf einem (heterozygot AT) oder beiden Allelen (homozygot TT) ein Thymin an Position 786 des BCO-Gens tragen ein Verhältnis der AUC beta-Carotin in Chylomikronen zu Retinylpalmitat in Chylomikronen von deutlich über 1.

Serum

Neben den Chylomikronen wurden auch die Serumproben für die Bioverfügbarkeitsstudie analysiert.

In Tabelle 10 sind die Carotinoid- (Lutein, Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Lycopin gesamt, alpha-Carotin und beta-Carotin), alpha-Tocopherol-, gamma-Tocopherol-, Retinol- und Retinylpalmitatkonzentrationen im Serum, nach Gabe von 2 mg beta-Carotin mit 30 mg Weizenkeimöl, der Gruppe heterozygot AT, zusammengefasst.

Tab. 10: Carotinoid- (Lutein, Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Lycopin gesamt, alpha-Carotin und beta-Carotin), alpha-Tocopherol-, gamma-Tocopherol-, Retinol- und Retinylpalmitatkonzentrationen im Serum nach Gabe von 2 mg beta-Carotin, (\bar{x} , \pm SD) Gruppe heterozygot AT

| Heterozygot AT | 2 Std | 4 Std | 5 Std | 6 Std | 8 Std |
|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Lutein [μ mol/L] | 0,188 \pm 0,097 | 0,206 \pm 0,111 | 0,244 \pm 0,122 | 0,233 \pm 0,103 | 0,252 \pm 0,115 |
| Zeaxanthin [μ mol/L] | 0,062 \pm 0,033 | 0,064 \pm 0,041 | 0,078 \pm 0,046 | 0,077 \pm 0,039 | 0,080 \pm 0,044 |
| Cryptoxanthin [μ mol/L] | 0,166 \pm 0,060 | 0,150 \pm 0,022 | 0,182 \pm 0,059 | 0,178 \pm 0,047 | 0,196 \pm 0,068 |
| Lycopin gesamt [μ mol/L] | 0,314 \pm 0,193 | 0,297 \pm 0,153 | 0,316 \pm 0,102 | 0,327 \pm 0,115 | 0,337 \pm 0,096 |
| alpha-Carotin [μ mol/L] | 0,031 \pm 0,018 | 0,039 \pm 0,026 | 0,048 \pm 0,027 | 0,041 \pm 0,022 | 0,046 \pm 0,025 |
| beta-Carotin [μ mol/L] | 0,099 \pm 0,065 | 0,113 \pm 0,083 | 0,133 \pm 0,083 | 0,114 \pm 0,059 | 0,127 \pm 0,073 |
| alpha-Tocopherol [μ mol/L] | 27,200 \pm 6,294 | 28,046 \pm 2,680 | 28,340 \pm 2,312 | 31,162 \pm 5,684 | 31,139 \pm 3,202 |
| gamma-Tocopherol [μ mol/L] | 1,811 \pm 0,215 | 1,691 \pm 0,283 | 1,569 \pm 0,193 | 1,580 \pm 0,240 | 1,524 \pm 0,215 |
| Retinol [μ mol/L] | 1,215 \pm 0,262 | 1,233 \pm 0,248 | 1,140 \pm 0,278 | 1,378 \pm 0,348 | 1,318 \pm 0,319 |
| Retinylpalmitat [μ mol/L] | 0,020 \pm 0,007 | 0,019 \pm 0,008 | 0,018 \pm 0,006 | 0,020 \pm 0,007 | 0,018 \pm 0,005 |

In Tabelle 11 sind die Carotinoid- (Lutein, Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Lycopin gesamt, alpha-Carotin und beta-Carotin), alpha-Tocopherol-, gamma-Tocopherol-, Retinol- und Retinylpalmitatkonzentrationen im Serum nach Gabe von 2 mg beta-Carotin, der Gruppe homozygot AA dargestellt.

Tab. 11: Carotinoid- (Lutein, Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Lycopin gesamt, alpha-Carotin und beta-Carotin), alpha-Tocopherol-, gamma-Tocopherol-, Retinol- und Retinylpalmitatkonzentrationen im Serum nach Gabe von 2 mg beta-Carotin, (\bar{x} , \pm SD) Gruppe homozygot AA

| Homozygot AA | 2 Std | 4 Std | 5 Std | 6 Std | 8 Std |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Lutein [$\mu\text{mol/L}$] | 0,279 $\pm 0,112$ | 0,292 $\pm 0,124$ | 0,286 $\pm 0,124$ | 0,278 $\pm 0,138$ | 0,283 $\pm 0,123$ |
| Zeaxanthin [$\mu\text{mol/L}$] | 0,067 $\pm 0,022$ | 0,070 $\pm 0,025$ | 0,069 $\pm 0,026$ | 0,067 $\pm 0,030$ | 0,057 $\pm 0,003$ |
| Cryptoxanthin [$\mu\text{mol/L}$] | 0,192 $\pm 0,083$ | 0,185 $\pm 0,076$ | 0,178 $\pm 0,066$ | 0,181 $\pm 0,088$ | 0,181 $\pm 0,083$ |
| Lycopin gesamt [$\mu\text{mol/L}$] | 0,582 $\pm 0,096$ | 0,561 $\pm 0,075$ | 0,527 $\pm 0,148$ | 0,384 $\pm 0,128$ | 0,420 $\pm 0,221$ |
| alpha-Carotin [$\mu\text{mol/L}$] | 0,045 $\pm 0,035$ | 0,044 $\pm 0,040$ | 0,038 $\pm 0,030$ | 0,035 $\pm 0,032$ | 0,038 $\pm 0,037$ |
| beta-Carotin [$\mu\text{mol/L}$] | 0,127 $\pm 0,018$ | 0,124 $\pm 0,036$ | 0,111 $\pm 0,011$ | 0,095 $\pm 0,034$ | 0,114 $\pm 0,026$ |
| alpha-Tocopherol [$\mu\text{mol/L}$] | 34,212 $\pm 16,315$ | 34,010 $\pm 15,180$ | 34,034 $\pm 17,058$ | 31,627 $\pm 16,587$ | 34,477 $\pm 21,465$ |
| gamma-Tocopherol [$\mu\text{mol/L}$] | 1,839 $\pm 0,257$ | 1,622 $\pm 0,336$ | 1,603 $\pm 0,357$ | 1,544 $\pm 0,342$ | 1,497 $\pm 0,387$ |
| Retinol [$\mu\text{mol/L}$] | 1,501 $\pm 0,046$ | 1,427 $\pm 0,167$ | 1,391 $\pm 0,073$ | 1,318 $\pm 0,012$ | 1,301 $\pm 0,007$ |
| Retinylpalmitat [$\mu\text{mol/L}$] | 0,019 $\pm 0,001$ | 0,020 $\pm 0,005$ | 0,021 $\pm 0,004$ | 0,019 $\pm 0,003$ | 0,027 $\pm 0,005$ |

In Tabelle 12 sind die Carotinoid- (Lutein, Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Lycopin gesamt, alpha-Carotin und beta-Carotin), alpha-Tocopherol-, gamma-Tocopherol-, Retinol- und Retinylpalmitatkonzentrationen im Serum nach Gabe von 2 mg beta-Carotin, der Gruppe homozygot TT dargestellt.

Tab. 12: Carotinoid- (Lutein, Zeaxanthin, Cryptoxanthin, Lycopin gesamt, alpha-Carotin und beta-Carotin), alpha-Tocopherol-, gamma-Tocopherol-, Retinol- und Retinylpalmitatkonzentrationen im Serum über acht Stunden nach Gabe von 2 mg beta-Carotin, (\bar{x} , \pm SD) Gruppe homozygot TT

| Homozygot TT | 2 Std | 4 Std | 5 Std | 6 Std | 8 Std |
|---|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Lutein [$\mu\text{mol/L}$] | 0,234 $\pm 0,053$ | 0,234 $\pm 0,045$ | 0,248 $\pm 0,050$ | 0,230 $\pm 0,069$ | 0,230 $\pm 0,071$ |
| Zeaxanthin [$\mu\text{mol/L}$] | 0,071 $\pm 0,003$ | 0,076 $\pm 0,007$ | 0,080 $\pm 0,005$ | 0,066 $\pm 0,015$ | 0,074 $\pm 0,005$ |
| Cryptoxanthin [$\mu\text{mol/L}$] | 0,631 $\pm 0,422$ | 0,603 $\pm 0,392$ | 0,628 $\pm 0,416$ | 0,565 $\pm 0,497$ | 0,590 $\pm 0,445$ |
| Lycopin gesamt [$\mu\text{mol/L}$] | 0,524 $\pm 0,228$ | 0,538 $\pm 0,253$ | 0,527 $\pm 0,247$ | 0,449 $\pm 0,109$ | 0,481 $\pm 0,161$ |
| alpha-Carotin [$\mu\text{mol/L}$] | 0,030 $\pm 0,005$ | 0,030 $\pm 0,003$ | 0,028 $\pm 0,001$ | 0,040 $\pm 0,010$ | 0,027 $\pm 0,005$ |
| beta-Carotin [$\mu\text{mol/L}$] | 0,212 $\pm 0,085$ | 0,218 $\pm 0,073$ | 0,204 $\pm 0,062$ | 0,221 $\pm 0,070$ | 0,200 $\pm 0,085$ |
| alpha-Tocopherol [$\mu\text{mol/L}$] | 39,763 $\pm 5,460$ | 41,147 $\pm 4,708$ | 32,672 $\pm 18,176$ | 38,870 $\pm 11,382$ | 34,754 $\pm 11,613$ |
| gamma-Tocopherol [$\mu\text{mol/L}$] | 1,904 $\pm 0,561$ | 1,737 $\pm 0,424$ | 1,638 $\pm 0,349$ | 1,465 $\pm 0,143$ | 1,392 $\pm 0,256$ |
| Retinol [$\mu\text{mol/L}$] | 1,672 $\pm 0,090$ | 1,711 $\pm 0,188$ | 1,469 $\pm 0,096$ | 1,205 $\pm 0,447$ | 1,231 $\pm 0,341$ |
| Retinylpalmitat [nmol/L] | 0,027 $\pm 0,004$ | 0,019 $\pm 0,001$ | 0,029 $\pm 0,002$ | 0,024 $\pm 0,001$ | 0,025 $\pm 0,005$ |

Im Verlauf der Studie wurde keine statistisch signifikante Änderung der einzelnen Analyte gemessen.

Der beta-Carotingehalt im Serum lag in den Gruppen heterozygot AT und homozygot AA bei etwa 0,11 $\mu\text{mol/L}$ Serum. In der Gruppe homozygot TT lag der beta-Carotingehalt im Serum im Durchschnitt etwa doppelt so hoch, bei 0,21 $\mu\text{mol/L}$.

Der Retinylpalmitatgehalt lag im Durchschnitt in der Gruppe heterozygot AT bei 0,019 $\mu\text{mol/L}$ Serum, in der Gruppe homozygot AA im Durchschnitt bei 0,021 $\mu\text{mol/L}$ Serum und in der Gruppe homozygot TT im Durchschnitt bei 0,025 $\mu\text{mol/L}$ Serum.

Der Retinolgehalt in der Gruppe heterozygot AT lag im Durchschnitt bei 1,27 $\mu\text{mol/L}$ Serum, in der Gruppe homozygot AA im Durchschnitt bei 1,39 $\mu\text{mol/L}$ Serum und in der Gruppe homozygot TT im Durchschnitt bei 1,46 $\mu\text{mol/L}$ Serum.

4.2 Diskussion

4.2.1 Analytische Verfahren zur Bestimmung von Carotinoiden, Retinol, Retinylpalmitat und alpha-Tocopherol in Serum und Chylomikronen

Carotinoide, Retinol, Retinylpalmitat und alpha-Tocopherol in Chylomikronen und Serum der Probanden wurden nach Extraktion mittels HPLC bestimmt (Gärtner 1997). Die verwendete Methode ermöglichte die Erfassung aller Hauptcarotinoide (beta-Carotin, alpha-Carotin, Lycopin, Zeaxanthin, Lutein, Cryptoxanthin) im Blut des Menschen. Die HPLC-Chromatogramme zeigten bei einer Detektionswellenlänge von 450 nm für Carotinoide und bei einer Detektionswellenlänge von 292 nm für Retinol, Retinylpalmitat und alpha-Tocopherol basisliniengetrennte Signale aller Analyte. Die Trennung der strukturell verwandten Xantophylle Lutein und Zeaxanthin gelingt mit vielen HPLC-Methoden nicht, jedoch konnten diese Carotinoide hier hinreichend getrennt und sicher quantifiziert werden. Die hier vorgestellte Methode kann routinemäßig zur Carotinoid-, alpha-Tocopherol-, Retinol- und Retinylpalmitatanalytik in Serum und Chylomikronen angewandt werden und ist den meisten in der Literatur beschriebenen Methoden ebenbürtig wenn nicht überlegen (Unlu et al. 2007, Olmedilla-Alonso et al. 2005).

4.2.2 Analyse des SNP1 im BCO-Gen

Der entscheidende Schritt bei der endogenen Bildung von Vitamin A ist die oxidative Spaltung von Provitamin A durch die beta-Carotin-Oxygenase. Eine Enzymaktivität, welche diese Umwandlung katalysiert, wurde erstmals von Olson und Goodman (Olson & Hayaishi 1965; Goodman & Huang 1965) in Homogenisaten aus Dünndarmepithelien der Ratte beschrieben. Das Enzym katalysiert eine oxidative Spaltung der C-15,C-15'-Doppelbindung von β -Carotin, was zur Bildung von zwei Molekülen Retinal führt. Experimente von Goodman et al. (1966) und Fidge et al. (1969) zeigten, dass es sich um ein lösliches, cytosolisches Enzym handelt. Die größte Aktivität des Enzyms wurde in der Dünndarmmukosa und in Jejunum-Enterocyten gemessen, von manchen Gruppen wurde daneben auch eine Aktivität in der Leber, Lunge, Niere und Gehirn beschrieben (Duszka et al. 1996; van Vliet et al. 1996; During et al. 1996). Trotz der physiologischen Relevanz der Synthese von Vitamin A, gelang es nicht, eine Carotin-Oxygenase bis zur Homogenität zu reinigen. Es fehlten daher jegliche molekulare Daten über das oder die Enzyme, die die oxidative Spaltung der Carotinoide in Tieren katalysieren. Lindqvist und Andersson gelang es 2002 dieses Enzym im Menschen zu identifizieren und biochemisch als lösliche β,β -Carotin-15,15'-Oxygenase zu charakterisieren (Lindqvist & Andersson 2002).

Als Polymorphismus bezeichnet man im Fachgebiet Genetik das Auftreten einer Genvariante in einer Population. Definitionsgemäß muss die Auftretenshäufigkeit der Genvariante größer als ein Prozent sein, andernfalls wird von einer Mutation gesprochen.

Genetische Polymorphismen, die Einfluss auf endogene Metabolismen haben und von ernährungswissenschaftlicher Bedeutung sind, sind bekannt. Z.B. wird Laktoseintoleranz, von der 25% der Bundesbürger in Deutschland betroffen sind, in den meisten Fällen z.B. auf einen Polymorphismus zurückgeführt.

Normalerweise wird das in der Nahrung enthaltene Disaccharid Milchzucker (Laktose) im Dünndarm abgebaut. Dabei spaltet das im Dünndarm gebildete Enzym Laktase die Laktosemoleküle in seine Bestandteile Galaktose und Glukose. Nur diese Monosaccharide können einzeln effektiv durch die Dünndarmwand resorbiert werden. Kommt es zu einem Mangel an dem Enzym Laktase bleiben die

Laktosemoleküle ungespalten und können nicht resorbiert werden. Laktose gelangt dadurch unverdaut in den Dickdarm, wo sie von Darmbakterien vergoren wird. Es werden primäre und sekundäre Formen der Laktasedefizienzien unterschieden. Zu den primären Formen zählen der endemisch vorkommende (adulte) Laktasemangel, der entwicklungsbedingte Laktasemangel bei Frühgeborenen und der kongenitale Laktase-mangel (autosomal-rezessive Erkrankung). Der endemisch vorkommende (adulte) Laktasemangel stellt weltweit die häufigste Form der Laktoseintoleranz dar und hat eine genetische Ursache: an der Stelle 13910 vor dem Laktase-Gen (LCT) gibt es einen T/C-Polymorphismus und an der Stelle 2218 einen A/G-Polymorphismus, der die Menge an gebildeter Laktase festlegt. Bei einer sekundären Form, die im höheren Lebensalter als Folge anderer Erkrankungen (z. B. Morbus Crohn oder Zöliakie) auftritt, ist der Laktasemangel nur vorübergehend manifestiert und nach Regenerierung des Darmepithels reversibel. Auch ein Polymorphismus ist für den Mangel an Acetaldehyddehydrogenase für die Unverträglichkeit von Alkohol bei gewissen Individuen verantwortlich. Diese erleben einen als unangenehm empfundenen *Flush* und meiden deswegen Alkohol. Dieser Polymorphismus ist v.a. bei Orientalen häufig.

Auch genetische Polymorphismen mit Einfluss auf die Metabolisierung von Arzneistoffen sind bekannt (Collette et al. 2002) und haben je nach Häufigkeit Bedeutung für Arzneimittelsicherheit und Wirksamkeit. Die Bedeutung eines genetischen Polymorphismus hängt ab von der therapeutischen Breite des Arzneimittels, von der Stellung des Enzyms im Gesamtmetabolismus und von der möglichen Bildung aktiver Metaboliten des betreffenden Arzneimittels.

1956 wurde der Zusammenhang zwischen Erleiden eines hämolytischen Ikterus nach Behandlung mit den Antimalariamitteln Primaquin und Chloroquin auf einen Mangel des Enzyms Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase (G6PD) zurückgeführt, welcher auch für die hämolytischen Krisen nach Fava-Bohnen verantwortlich ist. Dieses x-chromosomal vererbte Enzym spielt ebenfalls in der Behandlung mit vielen Pharmaka, wie z.B. mit Sulfonamiden, Dapson, Nitrofurantoin, Chinidin, Thiopental, Probenecid und Acetylsalicylsäure, eine Rolle. In der mitteleuropäischen Bevölkerung weisen weniger als 0,05 % einen Mangel an G6PD auf, in einigen Mittelmeerländern bis zu 50 % (Pirmohamed et al. 2001, Xie et al. 2001).

Untersuchungen am Institut für Biologie I haben ergeben, dass es im beta-Carotin-Oxygenase (BCO) Gen des Menschen einen Polymorphismus bezüglich der Basenanordnung in Position 786 gibt (von Lintig, persönliche Mitteilungen). Austausch der Base Adenin durch Thymin führt zum Ersatz eines Arginins an Position 262 des Proteins durch die Aminosäure Serin.

Die genomische DNA wurde isoliert und mit folgenden Primern das DNA-Stück in Exon 6 (16q23.1), auf dem der SNP1 lokalisiert ist, amplifiziert und anschliessend sequenziert:

Es ergaben sich drei mögliche Allelkombinationen mit den Einteilungen: Gruppe heterozygot AT, homozygot AA und homozygot TT.

Neun der untersuchten Probanden waren heterozygot AT, 4 homozygot AA und 2 homozygot TT (n = 15).

Obwohl nur eine kleine ausgewählte Population untersucht worden ist und diese natürlich nicht repräsentativ sein kann, deutet das Ergebnis darauf hin, dass eine Variabilität im BCO-Gen relativ häufig ist. Sollte diese Variabilität Einfluss auf den Metabolismus von beta-Carotin haben, ist anzunehmen, dass eine relativ große Bevölkerungsgruppe betroffen ist. Zudem könnte der Polymorphismus Einfluss auf die individuelle Versorgung mit Vitamin A haben.

4.2.3 Beta-Carotin Humanstudie

Es wurden 2 mg beta-Carotin mit 30 mL Weizenkeimöl verabreicht. Die Gehalte der Analyte im Serum wurden zu Beginn der Studie als Basiswert ermittelt und dann zu den Zeitpunkten 2 Std, 4 Std, 5 Std, 6 Std und 8 Std gemessen. Die durchschnittlichen Basiswerte aller Analyte in den drei Gruppen stimmten mit den in der Literatur beschriebenen Werten (Sies et al. 1992, Khachik et al. 1997, Paetau et al. 1998, Morrissey et al. 1999) überein. Die Gehalte der Carotinoide, des Retinols, Retinylpalmitats und alpha-Tocopherols im Serum veränderten sich im Verlauf der Studie nicht. Dies ist auf die geringe Dosis von beta-Carotin (2 mg) zurückzuführen.

Selbst bei höheren Dosen (Borel et al. 1998) von 120 mg beta-Carotin/Tag kam es innerhalb der ersten Stunden nach Applikation zu keinem Anstieg im Serum (Borel et al. 1998).

Die Metabolisierung von beta-Carotin findet z.T. schon in der Darmmukosa statt, deshalb war es wichtig die Gehalte der Analyte in den Chylomikronen zu bestimmen. Im Gegensatz zum Serum konnte in den Chylomikronen ein Anstieg von beta-Carotin in allen drei Gruppen gemessen werden; in der homozygoten TT Gruppe lag das Maximum von beta-Carotin nach 4-5 Stunden bei ca. 6,4 nmol/L Serum, in der heterozygoten AT Gruppe bei 5,0 nmol/L und in der homozygoten AA Gruppe nach 4 Stunden nur bei 1,9 nmol/L.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass Individuen der Gruppe homozygot AA beta-Carotin besser verstoffwechseln, als Individuen der Gruppe homozygot TT und heterozygot AT. Dies zeigt sich auch im Vergleich der AUCs.

Die AUC des beta-Carotins der Gruppe homozygot AA ist kleiner, als die der anderen beiden Gruppen.

Das Verhältnis der AUCs von beta-Carotin und Retinylpalmitat in der homozygoten Gruppe AA lag unter 1. Es lag also mehr Retinylpalmitat, als beta-Carotin in den Chylomikronen vor. In den Gruppen homozygot TT und heterozygot AT lag das Verhältnis von beta-Carotin und Retinylpalmitat über 1. Es lag also mehr beta-Carotin, als Retinylpalmitat in den Chylomikronen vor.

Dies lässt vermuten, dass die Mutation von A→T die Funktion des Enzyms beeinträchtigt.

In der Literatur sind sogenannte Low- and High-Responder für beta-Carotin beschrieben worden (Borel et al. 1998). Diese Variabilität wurde bisher mit interindividuellen Unterschieden bei der intestinalen Aufnahme, durch ein ineffizientes Einbauen von beta-Carotin in Chylomikronen oder durch eine Variabilität im Lipoprotein-Metabolismus begründet. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Humanstudie kann vermutet werden, dass beim Phänomen Low- and High-Responder auch ein Polymorphismus (SNP1) im BCO-Gen eine Rolle spielen könnte und die relativ niedrigen beta-Carotin Konzentrationen in Chylomikronen der sogenannten Low-Responder teilweise auf eine extensive Umwandlung von beta-Carotin in Vitamin A zurückzuführen sind.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass der beta-Carotinspiegel im Serum in der Gruppe homozygot TT fast doppelt so hoch war, wie in der Gruppe homozygot AA und heterozygot AT. Dies deutet wieder auf unterschiedliche Umwandlungsraten von beta-Carotin in Vitamin A hin. Die unterschiedliche Umwandlungsrate von beta-Carotin verursacht allerdings keinen Unterschied im Retinolgehalt des Serums zwischen den drei Gruppen, obwohl beta-Carotin der Hauptlieferant für Retinol ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Pilotstudie lassen noch keinen endgültigen Schluss auf die Beurteilung des SNP1 Polymorphismus für die Vitamin A und beta-Carotinversorgung zu. Die Studie muss auf ein größeres Probandenkollektiv ausgedehnt werden, um die Häufigkeit des Polymorphismus in verschiedenen Bevölkerungsgruppen zu belegen.

4.3 Alpha-Tocopherylphosphat

Alpha-Tocopherylphosphat ist in den USA als Nahrungsergänzungsmittel zugelassen. Es ist der Phosphorsäuremonoester von alpha-Tocopherol. Tierstudien lassen vermuten, dass alpha-Tocopherylphosphat anders als bisher eingesetzte Ester des alpha-Tocopherols (alpha-Tocopherylacetat, alpha-Tocopherylsuccinat) eine spezielle Stellung im Stoffwechsel haben könnte (Azzi et al. 2004). Die herkömmlichen Ester von alpha-Tocopherol (z.B. Tocopherylacetat) werden durch Esterasen gespalten und nur das alpha-Tocopherol wird über die Chylomikronen aufgenommen. Im Gegensatz dazu konnte alpha-Tocopherylphosphat intakt im Serum von Kaninchen (Negis et al. 2006) nachgewiesen werden. Zu Bioverfügbarkeit und Metabolismus dieser Substanz beim Menschen existieren bisher keine Studien. Es sollte in einer Humanstudie geklärt werden, ob nach Gabe von alpha-Tocopherylphosphat die Muttersubstanz und/oder das Spaltprodukt alpha-Tocopherol in Chylomikronen und Serum nachweisbar ist.

4.3.1 Methodenentwicklung zur Bestimmung von alpha-Tocopherylphosphat in Chylomikronen und Serum

Extinktionskoeffizient

Wie in Kapitel 2.2.3 erläutert, wurden die molaren Extinktionskoeffizienten für alpha-Tocopherylphosphat, in Wasser und 2-Propanol bestimmt. In Tabelle 13 sind diese mit Standardabweichung und Variationskoeffizient dargestellt.

Tab.13: Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten des alpha-Tocopherylphosphat bei 286 nm in Wasser und 2-Propanol, mit Standardabweichung und Variationskoeffizient

| Alpha-Tocopherylphosphat | MW [-] | SD [-] | VC [%] | <i>n</i> |
|---|-----------|-----------|-----------|----------|
| Wasser ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) | 1618 | 75 | 4,69 | 12 |
| 2-Propanol ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) | 864 | 52 | 5,69 | 12 |

Validierung

Die Instrumentelle-, wie auch die Methodvalidierung dieser neu entwickelten Methode wurde in Anlehnung an die ICH Richtlinien (International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, ICH Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Methodology) durchgeführt.

Die Linearität für alpha-Tocopherylphosphat wurde mittels fünf verschiedenen Konzentrationen überprüft. Sie lagen im Bereich von 0,2-20 $\mu mol/L$ alpha-Tocopherylphosphat Standard. Die Korrelationskoeffizienten der Regressionsgeraden von Konzentration zu Signalintensität lagen im Bereich von 0,999- 0,9995.

Zur Bestimmung der Präzision wurde die Analysenwiederholbarkeit durchgeführt. Dafür wurden fünf Standardlösungen an unterschiedlichen Tagen unter den gleichen analytischen Bedingungen in Dreifachbestimmung vermessen. Der Variationskoeffizient betrug 6,9 % bei allen Konzentrationen.

Die Bestimmungsgrenze (BG) ist die niedrigste Konzentration des zu untersuchenden Stoffes, die in einer Probe mit akzeptabler Genauigkeit gemessen werden kann. Sie lag für alpha-Tocopherylphosphat bei 0,1 µmol/L.

Die Retentionszeit von alpha-Tocopherylphosphat in Standardlösung, wurde in Serumproben mit 40 HPLC-Läufen (gleiche stationäre Phase, verschiedene Säulen A und B) überprüft. Die Retentionszeit schwankte zwischen ca. 8-11 min. Die Schwankung der Retentionszeit war gering in Läufen, die mit derselben Säule durchgeführt wurden.

Die Wiederfindung wurde für alpha-Tocopherylphosphat an fünf verschiedenen Tagen mit jeweils vier Proben unterschiedlicher Konzentration überprüft. Die Wiederfindung aus Serum lag sie zwischen 80- 94%.

Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient

In der Pharmazie benutzt man zur Bestimmung des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten ein System, bestehend aus n-Oktanol-1 und einem Puffer mit dem pH, der dem am natürlichen Resorptionsort möglichst nahe kommt. In diesem Fall wurde TRIS-Puffer mit einem pH von 7,8 verwendet.

Der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient wurde, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, gemessen.

Die photometrische Bestimmung der Tocopherylphosphatkonzentration wurde nur in der wässrigen Phase vorgenommen.

In Tabelle 14 ist der ermittelte Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizient, mit Variationskoeffizient und Standardabweichung, dargestellt.

Tab. 14.: Bestimmung des Oktanol/Wasser-Verteilungskoeffizienten von *alpha*-Tocopherylphosphat, mit Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient

| MW | P | SD | VC | <i>n</i> |
|------|-----------|-------|------|----------|
| [-] | [-] | [-] | [%] | |
| 0,22 | 0,20-0,24 | 0,014 | 1,82 | 5 |

4.3.2 Bestimmung von *alpha*-Tocopherylphosphat in Serum- und Chylomikronenproben

Zur Identifizierung des *alpha*-Tocopherylphosphats wurde die Retentionszeit des Standards mit der im dotierten Plasma verglichen. Quantifiziert wurde über eine externe Kalibrierung.

Alpha-Tocopherylphosphatstandard wurde in 2-Propanol gelöst und direkt auf die HPLC (Säule A) injiziert. Die Detektion erfolgte mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 286 nm. Die Laufzeit des Chromatogramms betrug 15 Minuten. Die Retentionszeit lag bei ca. 11 min für *alpha*-Tocopherylphosphat. In Abbildung 8 ist ein HPLC-Chromatogramm des Standards gezeigt.

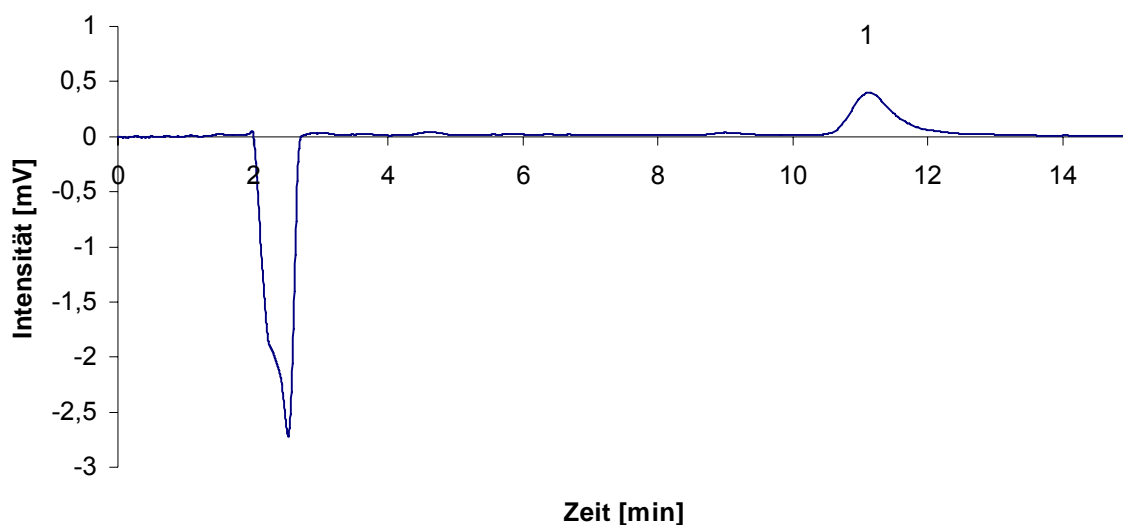


Abb. 8: HPLC-Chromatogramm eines *alpha*-Tocopherylphosphatstandards , 1= *alpha*-Tocopherylphosphat

In Abbildung 9 ist ein HPLC-Chromatogramm dargestellt, das Serum zeigt, welches mit alpha-Tocopherylphosphat dotiert worden ist. Die Aufarbeitung wurde, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, durchgeführt.

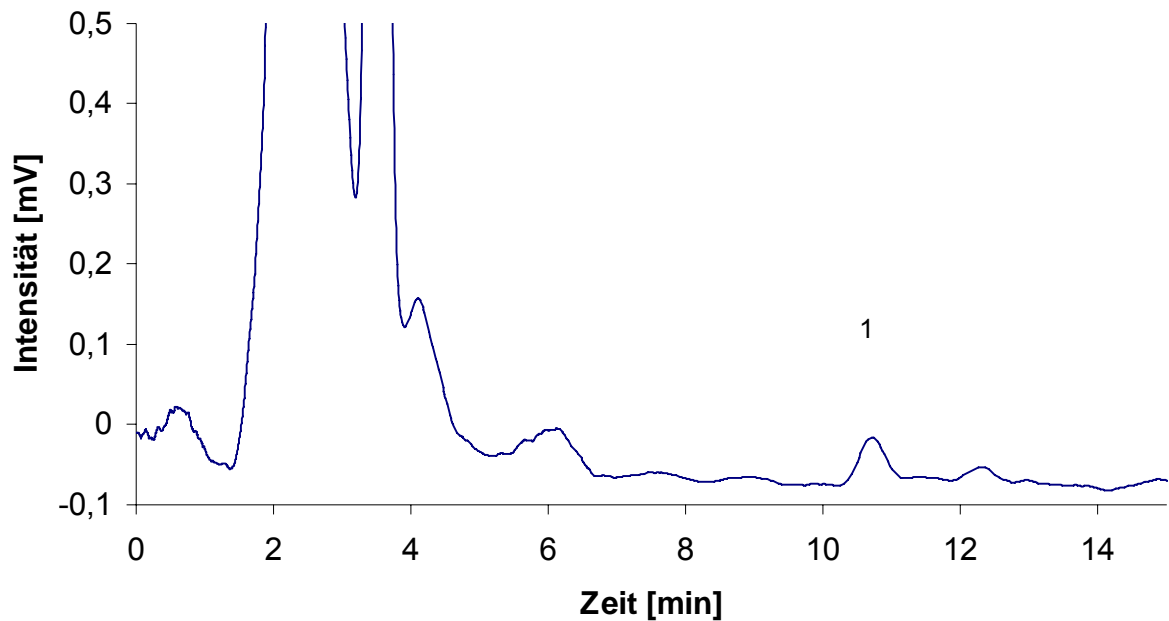


Abb. 9: HPLC-Chromatogramm; Serum dotiert mit alpha-Tocopherylphosphat, 1= alpha-Tocopherylphosphat

Chylomikronen- und Serumproben wurden, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, aufgearbeitet. Alle Analysen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt, falls ausreichend Probenmaterial vorhanden war.

Stabilität von alpha-Tocopherylphosphat in Serum

Die Stabilität des alpha-Tocopherylphosphats wurde im Serum gemessen. Dazu wurde frisch gewonnenes Serum mit alpha-Tocopherylphosphat dotiert. Die Stabilität des alpha-Tocopherylphosphats wurde überprüft, um zu sehen, ob die Substanz im

Serum z.B. durch dort vorhandene Phosphatasen in alpha-Tocopherol und Phosphat gespalten wird. Die Stabilität alpha-Tocopherylphosphats im Serum wurde zu vier Zeitpunkten nach Zugabe (15 min, 30 min, 60 min, 120 min) gemessen.

Bei keiner der drei Konzentrationen konnte eine Abnahme des alpha-Tocopherylphosphats in Serum im Laufe der Inkubation beobachtet werden. Die Substanz war über den untersuchten Zeitraum stabil.

4.3.3 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von alpha-Tocopherylphosphat beim Menschen

Einmalgabe von alpha-Tocopherylphosphat

Zwei Studien wurden durchgeführt, in denen die Probanden Einzeldosen von alpha-Tocopherylphosphat zu sich nahmen. Die erste Dosis betrug 400 IE alpha-Tocopherylphosphat. Nach einer Auswaschphase von vier Wochen wurde die Studie mit einer Einzeldosis von 800 IE alpha-Tocopherylphosphat wiederholt.

Untersucht wurden alpha-Tocopherylphosphat und alpha-Tocopherol in Serum und Chylomikronen der Probanden.

In beiden Studien konnte zu keinem Zeitpunkt in den Chylomikronen alpha-Tocopherylphosphat detektiert werden. Nur ein Anstieg von alpha-Tocopherol war in den Chylomikronen in beiden Studien messbar. In Abbildung 10 ist der Verlauf der alpha-Tocopherolkonzentration in Chylomikronen dargestellt.

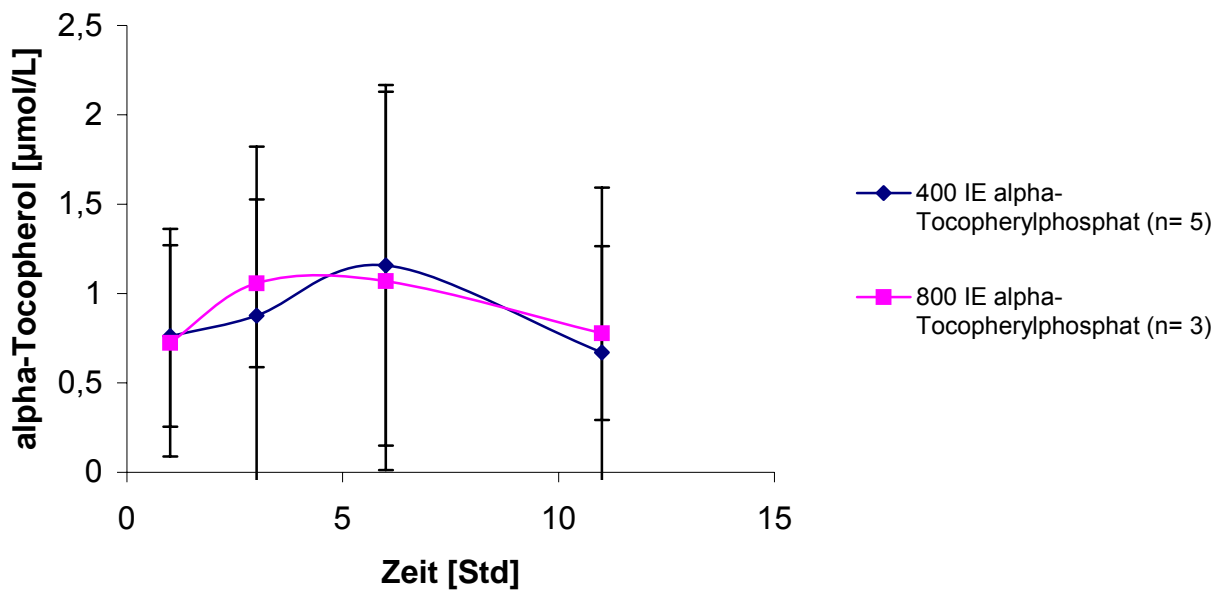


Abb. 10: Alpha-Tocopherol in Chylomikronen, nach Einmalgabe von 400 IE und 800 IE alpha-Tocopherylphosphat (\bar{x} , $\pm SD$)

Eine Stunde nach Applikation lag die Konzentration an alpha-Tocopherol bei 0,64 (800 IE alpha-Tocopherylphosphat) und 0,76 $\mu\text{mol/L}$ (400 IE alpha-Tocopherylphosphat) Serum und stieg auf ein Maximum von 1,06 (400 IE alpha-Tocopherylphosphat) und 1,16 $\mu\text{mol/L}$ (800 IE alpha-Tocopherylphosphat) nach sechs Stunden. Nach elf Stunden fiel die Konzentration an alpha-Tocopherol auf 0,67 (800 IE alpha-Tocopherylphosphat) und 0,49 $\mu\text{mol/L}$ (400 IE alpha-Tocopherylphosphat).

In Abbildung 11 ist die Konzentration des alpha-Tocopherols im Serum, nach Gabe von 400 IE und 800 IE über 48 Std gezeigt.

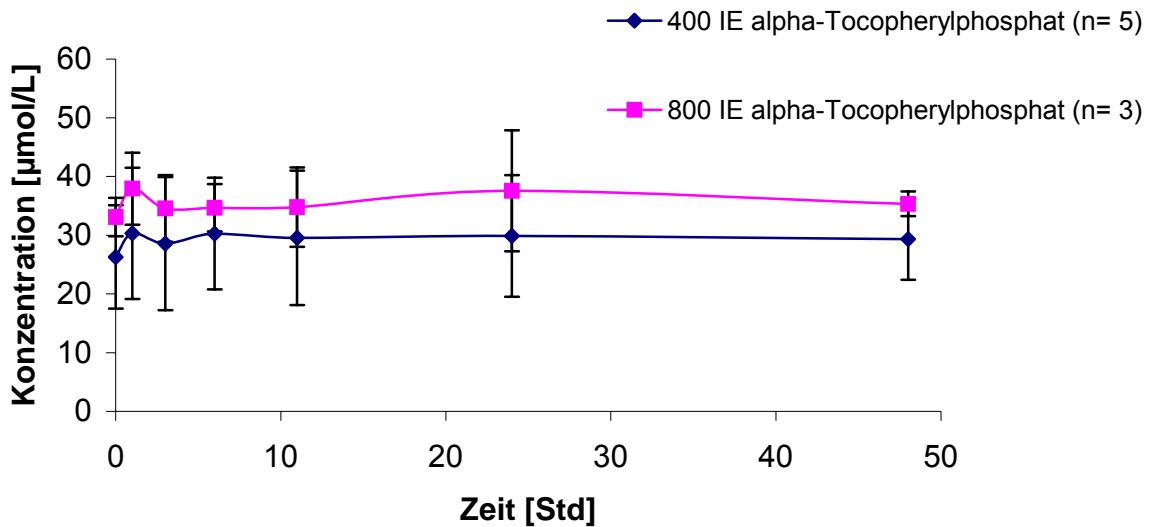


Abb. 11: Alpha-Tocopherol im Serum nach Einmalgabe von 400 IE und 800 IE alpha-Tocopherylphosphat (\bar{x} , $\pm SD$)

Der Ausgangswert des alpha-Tocopherols lag in beiden Studien bei einem Basisgehalt von durchschnittlich 26,5- 33,3 $\mu\text{mol/L}$ Serum. Nach der Einmalgabe von 400 IE bzw. 800 IE alpha-Tocopherylphosphat war in keiner der beiden Gruppen ein statistisch signifikanter Anstieg an alpha-Tocopherol zu verzeichnen.

In den HPLC-Chromatogrammen, die mit Säule A gemessen wurden, zeigte sich ein Signal mit der Retentionszeit zwischen 10 und 11 min. Die Retentionszeit verschob sich auf 8- 9 min bei Messungen mit Säule B. Aufgrund von Vergleichs- und Dotierungsexperimenten mit synthetischem alpha-Tocopherylphosphat wurden die jeweiligen Signale dieser Substanz zugeordnet.

Alpha-Tocopherylphosphat war in allen Serumproben schon zu den Zeitpunkten $t= 0$ vorhanden. Die Basiswerte lagen zwischen 0,43 und 0,77 $\mu\text{mol/L}$ Serum.

Nach Applikation einer Einmaldosis von 400 IE oder 800 IE alpha-Tocopherylphosphats konnte kein statistisch signifikanter Anstieg des alpha-Tocopherylphosphats im Serum nachgewiesen werden.

In Abbildung 12 ist der Verlauf der Konzentration des alpha-Tocopherylphosphats im Serum über 48 Std abgebildet.

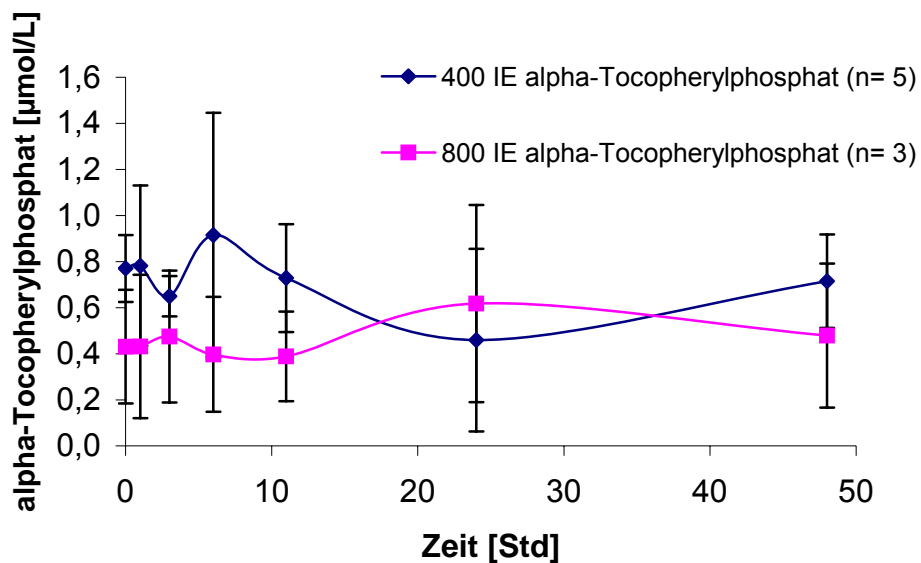


Abb. 12: Alpha-Tocopherylphosphat im Serum nach Einmalgabe von 400 IE und 800 IE alpha-Tocopherylphosphat (\bar{x} , $\pm SD$)

Langzeitsupplementierung mit alpha-Tocopherylphosphat

Nachdem kein Anstieg von alpha-Tocopherylphosphat im Serum, nach Gabe der Einzeldosen nachzuweisen war, wurde mit den gleichen Probanden eine Studie mit Mehrfachdosierung (800 IE alpha-Tocopherylphosphat täglich) über einen Zeitraum von vier Wochen durchgeführt.

In Tabelle 14 ist die Konzentration von alpha-Tocopherol im Serum zu den Zeitpunkten $t=0$, nach 14 Tagen und nach 28 Tagen dargestellt.

Tab. 14: Alpha-Tocopherolkonzentration im Serum, nach täglicher Einnahme von alpha-Tocopherylphosphat (800IE) über 4 Wochen

| Alpha-Tocopherol [µmol/L] | Tag 0 | Tag 14 | Tag 28 |
|------------------------------|-------|--------|--------|
| Proband 1 | 32,9 | 56,6 | 55,6 |
| Proband 2 | 22,5 | 25,6 | 28,2 |
| Proband 3 | 28,6 | 42,0 | 39,1 |

In Abbildung 13 ist der Verlauf der alpha-Tocopherolkonzentration im Serum über vier Wochen abgebildet. Alpha-Tocopherol hatte einen Basiswert von 22,5- 32,9 µmol/L und stieg nach vier Wochen Supplementierung auf Werte von 28,2- 55,6 µmol/L an

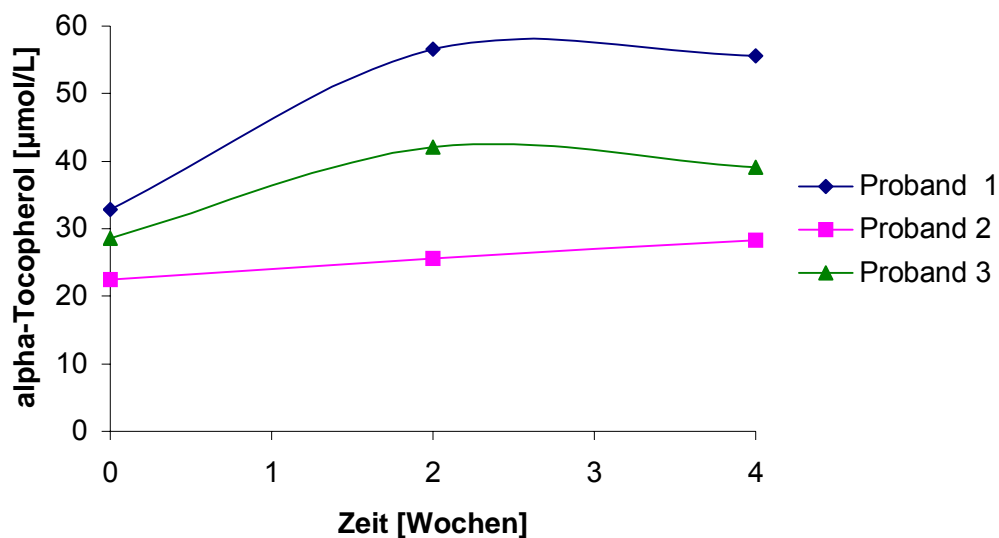


Abb 13.: Verlauf der individuellen Serum alpha-Tocopherolkonzentration bei drei Probanden über einen Zeitraum von vier Wochen; tägliche Gabe von 800 IE alpha-Tocopherylphosphat über 4 Wochen

In Tabelle 15 ist die Serum alpha-Tocopherylphosphatkonzentration, nach täglicher Gabe von alpha-Tocopherylphosphat, dargestellt.

Tab. 15: Alpha-Tocopherylphosphatkonzentration im Serum, nach täglicher Einnahme von alpha-Tocopherylphosphat (800 IE) über 4 Wochen

| Alpha-Tocopherylphosphat [$\mu\text{mol/L}$] | Tag 0 | Tag 14 | Tag 28 |
|---|-------|--------|--------|
| Proband 1 | 0,26 | 2,7 | 4,5 |
| Proband 2 | 2,4 | 11,2 | 18,6 |
| Proband 3 | 1,9 | 10,7 | 18,9 |

Alpha-Tocopherylphosphat im Serum hatte einen Basiswert zwischen 0,26- 2,4 $\mu\text{mol/L}$ und stieg nach vier Wochen täglicher Gabe von 800 IE alpha-Tocopherylphosphat auf 4,5- 18,9 $\mu\text{mol/L}$. Dieser Gehalt nach vier Wochen entspricht im Durchschnitt dem 11,5 fachen des Ausgangswertes. In Abbildung 14 ist der Verlauf der alpha-Tocopherylphosphatkonzentration in Serum nochmals graphisch dargestellt.

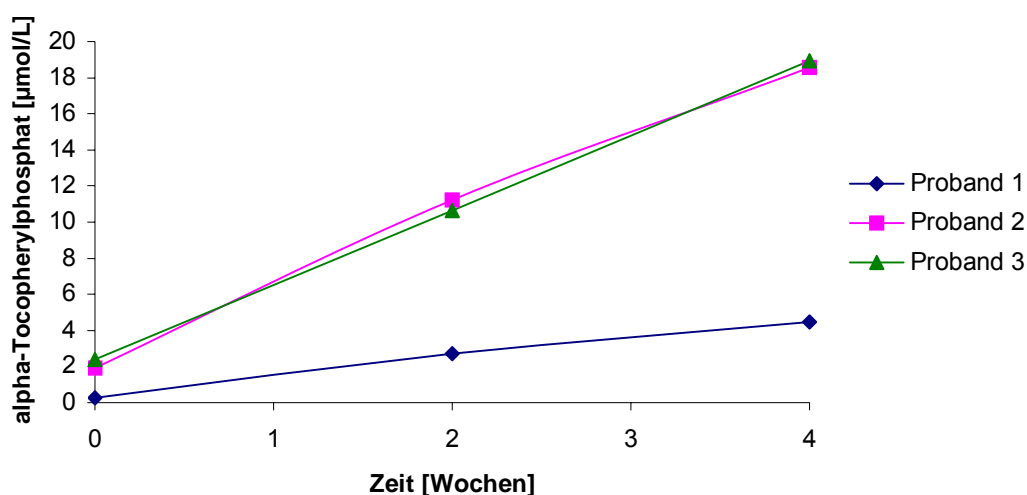


Abb. 14: Verlauf der individuellen alpha-Tocopherylphosphatkonzentration im Serum von drei Probanden über einen Zeitraum von vier Wochen; tägliche Gabe von 800 IE alpha-Tocopherylphosphat

Der Anstieg des alpha-Tocopherylphosphats im Serum wird auch durch die in Abbildung 15 gezeigten HPLC-Chromatogramme verdeutlicht.

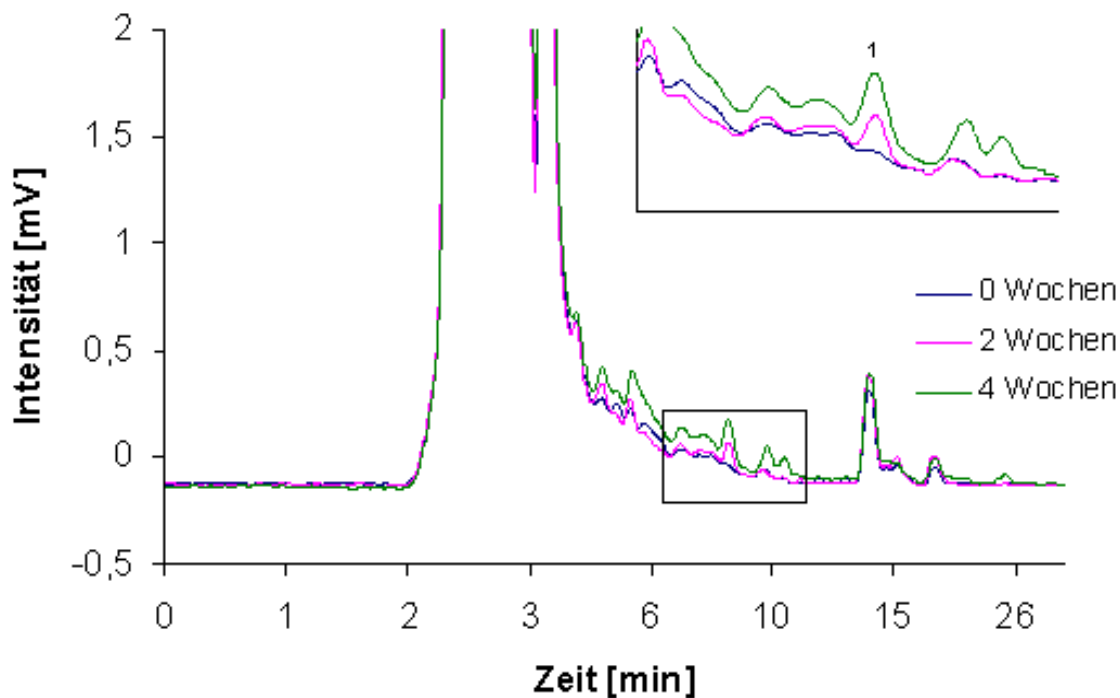


Abb. 15.: HPLC-Chromatogramme aus der Supplementierungsstudie über 4 Wochen mit 800 IE alpha-Tocopherylphosphat täglich, 1= alpha-Tocopherylphosphat, Serumproben von Proband 2

Langzeitsupplementierung mit alpha-Tocopherol

Es wurde eine weitere Studie, nach einer Auswaschphase von vier Wochen, durchgeführt. Die gleichen Probanden nahmen 800 IE alpha-Tocopherol täglich über einen Zeitraum von vier Wochen zu sich. In dieser Studie sollte einerseits geklärt werden, ob alpha-Tocopherylphosphat auch nach Gabe der Muttersubstanz alpha-Tocopherol im Serum ansteigt und somit auf eine endogene Bildung der Substanz geschlossen werden kann und andererseits ob die Bioverfügbarkeit von alpha-Tocopherylphosphat mit der des alpha-Tocopherols vergleichbar ist.

Die Konzentrationen von alpha-Tocopherol im Serum nach Gabe von 800 IE alpha-Tocopherol über vier Wochen sind in Tabelle 16 dargestellt.

Der alpha-Tocopherolgehalt im Serum stieg bei den drei Probanden von 22,0- 41,4 $\mu\text{mol/L}$ auf 50,9 – 84,9 $\mu\text{mol/L}$ Serum, nach vier Wochen an.

Tab. 16.: Alpha-Tocopherolkonzentrationen im Serum, bei täglicher Gabe von 800 IE alpha-Tocopherol über 4 Wochen

| Alpha-Tocopherol [$\mu\text{mol/L}$] | Tag 0 | Tag 14 | Tag 28 |
|---|-------|--------|--------|
| Proband 1 | 41,4 | 92,2 | 84,9 |
| Proband 2 | 22,0 | 42,8 | 50,9 |
| Proband 3 | 34,0 | 78,8 | 75,7 |

In Abbildung 16 ist der Verlauf der Serumkonzentration von alpha-Tocopherol dargestellt.

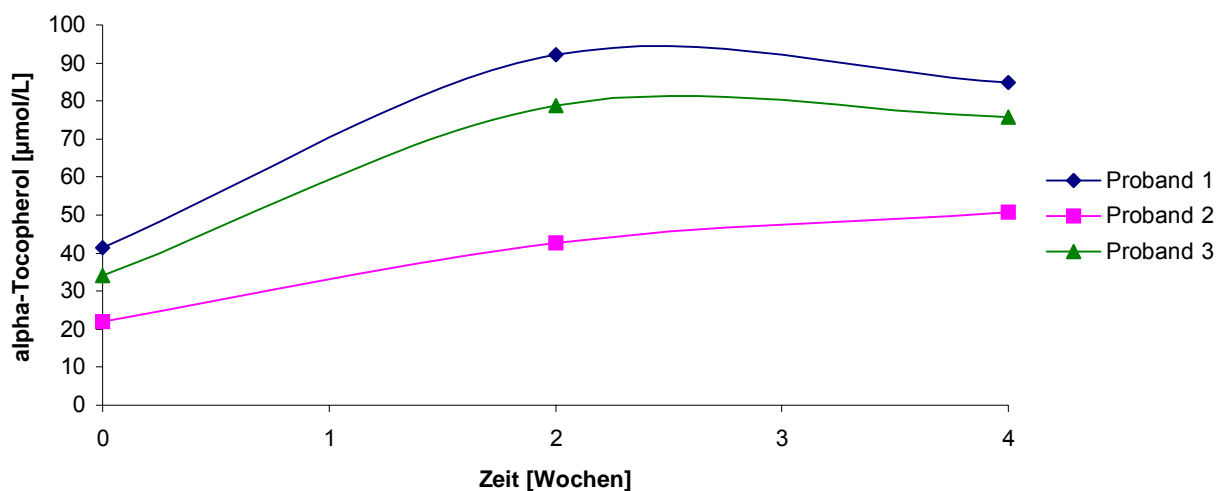


Abb.16: .. Verlauf der individuellen Serum alpha-Tocopherolkonzentration bei drei Probanden über einen Zeitraum von vier Wochen; tägliche Gabe von 800 IE alpha-Tocopherol über 4 Wochen

Alpha-Tocopherylphosphat im Serum stieg nach Gabe von täglich 800 IE alpha-Tocopherol über den Zeitraum von vier Wochen, bei den drei Probanden von 0,49- 2,3 $\mu\text{mol/L}$ auf 2,7- 8,4 $\mu\text{mol/L}$ an. In Tabelle 16 sind diese Konzentrationen dargestellt.

Tab. 16: Alpha-Tocopherylphosphatkonzentrationen im Serum, bei täglicher Gabe von 800 IE alpha-Tocopherol täglich über 4 Wochen

| Alpha-Tocopherylphosphat [$\mu\text{mol/L}$] | Tag 0 | Tag 14 | Tag 28 |
|---|-------|--------|--------|
| Proband 1 | 0,49 | 2,6 | 2,8 |
| Proband 2 | 2,3 | 3,8 | 8,4 |
| Proband 3 | 0,7 | 2,7 | 2,7 |

In Abbildung 17 ist der Verlauf der alpha-Tocopherylphosphatkonzentrationen graphisch dargestellt.

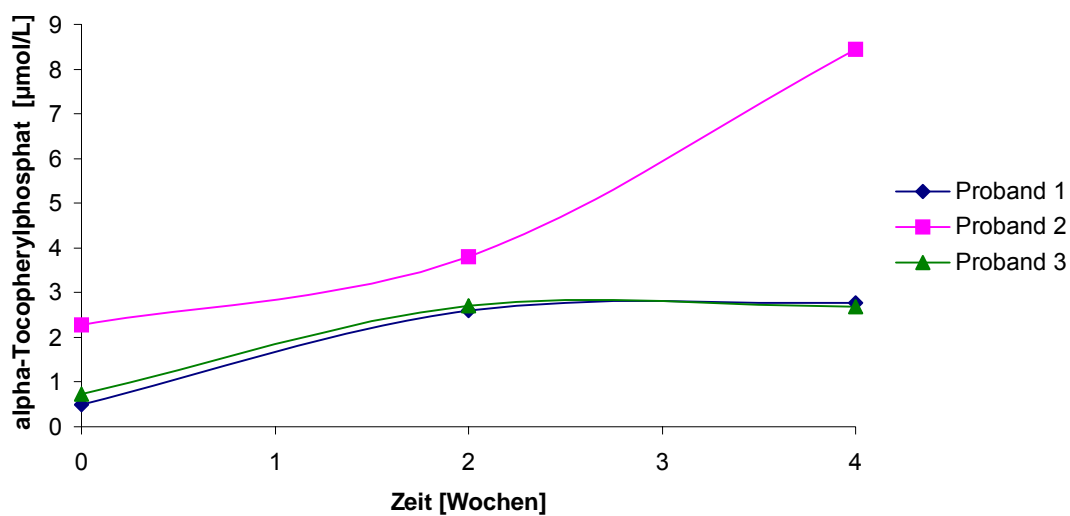


Abb. 17: Verlauf der individuellen alpha-Tocopherylphosphatkonzentration im Serum von drei Probanden über einen Zeitraum von vier Wochen; tägliche Gabe von 800 IE alpha-Tocopherylphosphat

Die AUCs von alpha-Tocopherylphosphat und alpha-Tocopherol (Mittelwerte n=3) in Serum wurden berechnet. Sie sind in Tabelle 17 dargestellt. Sie wurden mittels der Trapezoidalmethode ermittelt. Nach Supplementierung mit alpha-Tocopherol war die AUC des alpha-Tocopherols ca. zwei Drittel größer, als die AUC nach Supplementierung mit alpha-Tocopherylphosphat. Nach Supplementierung mit alpha-Tocopherylphosphat war die AUC des alpha-Tocopherylphosphats ungefähr 2,5 fach so groß, wie nach Supplementierung mit alpha-Tocopherol. Insgesamt lässt sich sagen, dass der Gesamtspiegel von alpha-Tocopherylphosphat und alpha-Tocopherol nach der Supplementierung mit alpha-Tocopherol höher war, als nach Supplementierung mit alpha-Tocopherylphosphat.

Tab.17: Mittelwert der AUCs mit Standardabweichung von alpha-Tocopherol und alpha-Tocopherylphosphats nach Supplementierung mit alpha-Tocopherylphosphat und alpha-Tocopherol

| Wochen x $\mu\text{mol/L}$ | (800IE/Tag) Alpha-Tocopherylphosphat | (800 IE/Tag) Alpha-Tocopherol |
|---------------------------------|---|----------------------------------|
| AUC Alpha-Tocopherylphosphat | 31,9 $\pm 18,8$ | 11,9 $\pm 5,6$ |
| AUC Alpha-Tocopherol | 151,8 $\pm 49,9$ | 240,4 $\pm 72,9$ |

4.3.4 Untersuchungen zum Einfluss von alpha-Tocopherylphosphat auf die Hämostase

Es gibt mehrere Veröffentlichungen die darauf hinweisen, dass die Supplementierung mit alpha-Tocopherol die Hämostase beim Menschen beeinflusst (Jandak et al. 1989, Steiner 1991). Zu alpha-Tocopherylphosphat gibt es eine Studie, in der „in-vitro“ gezeigt wurde, dass auch alpha-Tocopherylphosphat möglicherweise Einfluss auf die Hämostase beim Menschen hat (Scardi et al. 1956). Die Wirkung einer Supplementierung mit alpha-Tocopherylphosphat auf die Hämostase haben wir

im Rahmen der vorliegenden Studie überprüft. Die Thrombozytenaggregation, der Quick-Wert und die Partielle-Thromboplastinzeit (PTT) wurden gemessen. In Tabelle 18 sind diese Ergebnisse dargestellt.

Der Referenzbereich für den Thromboplastintest nach Quick liegt zwischen 70-130 %. Alle Ergebnisse, nach Einmaldosis, wie auch nach der Vierwochensupplementierung mit alpha-Tocopherylphosphat, lagen in diesem Referenzbereich.

Die partielle Thromboplastinzeit hat einen Referenzbereich von 26- 36 Sekunden. Alle Werte der in der Studie untersuchten Proben lagen in diesem Bereich.

Tab. 18: Mittelwerte der PTT- und Quickwerte mit Standardabweichung

| | MW | SD | n |
|------------|--------|------|----|
| PTT (Sek.) | 28,96 | 2,00 | 65 |
| Quick (%) | 101,78 | 8,12 | 65 |

Die Ergebnisse der Thrombozyten-Aggregation lagen bei allen Probanden im Normalbereich. Die Supplementierung mit alpha-Tocopherylphosphat führte zu keiner Veränderung.

4.4 Diskussion

4.4.1 Methodenentwicklung zur Bestimmung von alpha-Tocopherylphosphat in Chylomikronen und Serum

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode zur Bestimmung von alpha-Tocopherylphosphat in Serum und Chylomikronen entwickelt. In der wissenschaftlichen Literatur war zu Beginn der Studie keine Analysenmethode beschrieben. Die etablierte Methode für alpha-Tocopherol konnte für die Analyse von alpha-Tocopherylphosphat nicht verwendet werden. Die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Tocopherolextraktion aus Serum und Chylomikronen verfahren alle nach dem gleichen Prinzip: Tocopherole werden mit einem mit Wasser nicht-mischbaren Lösungsmittel (z.B. Hexan) extrahiert, die organische Phase abgetrennt, das Lösungsmittel abgedampft und die Probe anschließend für die HPLC-Analytik im Fließmittel wieder gelöst (Hatam et al. 1979). Alpha-Tocopherylphosphat ist gut wasserlöslich, wie auch die eigenen Untersuchungen zum Oktanol/Wasserverteilungskoeffizienten zeigen und relativ stabil bei saurem- und alkalischem pH-Wert. Eigene Voruntersuchungen haben ergeben, dass die Substanz eine ausgeprägte Proteinaffinität aufweist und somit mit gängigen Analyseprotokollen (Extraktion mit organischem Lösungsmittel) nicht zu isolieren ist. Die hier entwickelte Methode ist so aufgebaut, dass zu der Probe NaCl zugegeben wird, um das an Proteine gebundene alpha-Tocopherylphosphat freizusetzen. Im Anschluß wird mit TCA angesäuert, um Proteine zu fällen und Phosphatreste zu protonieren. Danach wird mit TBME extrahiert. Die zwei Phasen werden getrennt, die organische Phase gesammelt und das Lösungsmittel abgedampft. Der Rückstand mit dem Fließmittel wieder aufgenommen.

Wiederfindungsraten von 80- 94 % wurden mit der neu entwickelten Methode erreicht.

Die Bestimmungsgrenze lag bei 0,1 µmol/L Serum für alpha-Tocopherylphosphat. Hierfür ist u. a. auch der im Vergleich zu Tocopherol geringe Extinktionskoeffizient verantwortlich, der für alpha-Tocopherylphosphat in 2-Propanol bei 864 und für

alpha-Tocopherol in 2-Propanol bei 3267 liegt. Der niedrige Extinktionskoeffizient führt zu geringerer Nachweisempfindlichkeit in der UV-Detektion von alpha-Tocopherylphosphat im Vergleich zu alpha-Tocopherol.

Die Bestimmungsgrenzen sind jedoch ausreichend für eine sichere Bestimmung von alpha-Tocopherylphosphat im Serum, in den in der folgenden Studie erreichten Konzentrationen. Die Bestimmungsgrenze liegt deutlich niedriger als der Basisgehalt (0,43- 0,77 $\mu\text{mol/L}$ Serum) im Serum.

Bei der Messung des Oktanol-Wasser-Koeffizienten zeigte sich, dass sich ca. 80 % des vorliegenden alpha-Tocopherylphosphats in der wässrigen Phase verteilen. Im menschlichen Körper wird alpha-Tocopherylphosphat somit auch zum Großteil in der fettfreien Masse verteilt sein. Die Stabilitätskontrolle, die durch Zugabe von alpha-Tocopherylphosphat zu frischem Serum durchgeführt wurde, ergab keine Abnahme des Gehaltes an alpha-Tocopherylphosphat im Serum während zwei Stunden. Somit kann ein Abbau im Blut durch Phosphatasen ausgeschlossen werden.

4.4.2 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und Kinetik von alpha-Tocopherylphosphat beim Menschen

Einmalgabe von alpha-Tocopherylphosphat

Im Rahmen der Untersuchungen wurden zwei Studien durchgeführt, in denen die Probanden jeweils Einzeldosen von alpha-Tocopherylphosphat zu sich nahmen. Es sollte überprüft werden, ob es zu einer intakten Aufnahme von alpha-Tocopherylphosphat ins Serum kommt. In der wissenschaftlichen Literatur sind bisher keine Werte von alpha-Tocopherylphosphat in Serum von Menschen angegeben. Es ist aber bekannt, dass alpha-Tocopherylphosphat in geringen Mengen in Pflanzen- und Tiergeweben, als auch in Nahrungsmitteln enthalten ist (Gianello et al., 2005). Bei Kaninchen hat Negis (2006) einen Basisgehalt von alpha-Tocopherylphosphat im Serum festgestellt.

Die erste Dosis entsprach 400 IE alpha-Tocopherylphosphat. Nach einer Auswaschphase von vier Wochen wurde die Studie mit einer Einzeldosis von 800 IE alpha-Tocopherylphosphat wiederholt.

Die Gehalte an alpha-Tocopherylphosphat und alpha-Tocopherol wurden zu Beginn der Studien als Basiswert ermittelt und dann zu den Zeitpunkten 2 Std, 4 Std, 5 Std, 6 Std und 8 Std gemessen.

Es konnte ein Basiswert für alpha-Tocopherylphosphat im Bereich zwischen 0,43- 0,77 µmol/L Serum gemessen werden. In Kaninchen hat Negis (2006) ähnliche Basisgehalte von 0,18- 0,31 µmol/L Serum gemessen. Durch die Basisgehalte ergab sich die Frage, ob die Substanz durch die Nahrung aufgenommen wird, oder Tocopherol endogen phosphoryliert wird.

Für alpha-Tocopherol lagen die Basiswerte in der vorliegenden Studie im Bereich von 26,5- 33,3 µmol/L im Serum des Menschen. Serum alpha-Tocopherol Konzentrationen unter 11,6 µmol/L werden als zu niedrig, zwischen 11,6-16,2 µmol/L als niedrig und über 16,2 µmol/L als normal eingestuft (Morrissey. & Sheehy 1999). Ein optimaler Serum alpha-Tocopherolspiegel, zum Schutz vor Herz-Kreislaufkrankungen und Krebs wird mit > 30 µmol/L Serum (Morrissey & Sheehy 1999) geschätzt.

Nach Einmaldosis veränderten sich die Gehalte an alpha-Tocopherylphosphat und alpha-Tocopherol im Serum nicht, was vermutlich auf die geringe Gesamtdosis zurückzuführen ist.

In den Chylomikronen konnte zu keinem Zeitpunkt alpha-Tocopherylphosphat detektiert werden. Nur alpha-Tocopherol konnte in den Chylomikronen gemessen werden. Dieser Anstieg war jedoch dosisunabhängig (nach 400 IE und 800 IE vergleichbar), dies deutet auf eine begrenzte Spaltung von alpha-Tocopherylphosphat in alpha-Tocopherol hin. Der Gehalt an alpha-Tocopherol in den Chylomikronen stieg nur auf 1,06- 1,16 µmol/L an. Borel et al. (2001) zeigten einen Anstieg von bis zu 4 µmol/L alpha-Tocopherol in Chylomikronen nach Gabe von 400 IE alpha-Tocopherol.

Eine Aufnahme von alpha-Tocopherylphosphat über den Chylomikronenpathway kann somit ausgeschlossen werden. Es bleibt die Möglichkeit, dass alpha-Tocopherylphosphat periportal resorbiert oder endogen gebildet wird. Welche der genannten Möglichkeiten in Frage kommt, sollte mittels der folgenden Langzeitsupplementierungen überprüft werden.

Langzeitsupplementierung mit alpha-Tocopherylphosphat

Nachdem kein Anstieg des alpha-Tocopherylphosphats im Serum zu verzeichnen war, wurde eine Supplementierung mit 800 IE alpha-Tocopherylphosphat über einen Zeitraum von vier Wochen durchgeführt. Hiermit sollte überprüft werden, ob es unter einer Langzeitsupplementierung mit akkumulierend hohen Dosen des Esters zu einem Anstieg im Serum kommt.

Nach der Langzeitsupplementierung stieg der Gehalt an alpha-Tocopherylphosphat von einem durchschnittlichen Basiswert von 1,5 µmol/L Serum auf 14,0 µmol/L Serum nach 28 Tagen. Der Gehalt an alpha-Tocopherylphosphat entspricht zu Beginn ca. 5% des alpha-Tocopherols im Serum und stieg nach 4 Wochen (tägliche Gabe von 800 IE alpha-Tocopherylphosphat) auf ca. 30% an. Alpha-Tocopherol selbst stieg von einem durchschnittlichen Basiswert von 26,0 µmol/L im Serum auf 41,3 µmol/L im Serum nach 28 Tagen Supplementierung an. In einer Studie von Dimitrov (1991) lag der durchschnittliche Gehalt von alpha-Tocopherol im Serum von acht Probanden bei 17 µmol/L und stieg nach 28 Tagen mit täglicher Gabe von 660 IE alpha-Tocopherol auf 35 µmol/L.

Bei der Supplementierung mit alpha-Tocopherylphosphat bei Ratten, stieg auch der Gehalt an alpha-Tocopherylphosphat in der Leber und im Fettgewebe und es ließ sich ein Anstieg von alpha-Tocopherol im Serum feststellen (Ogru et al. 2003).

Anzumerken ist, dass bei den Probanden in unserer Studie relativ gesehen entweder der Gehalt an alpha-Tocopherylphosphat oder der an alpha-Tocopherol im Serum stark anstieg. Bei zwei Probanden ist der Gehalt an alpha-Tocopherylphosphat stark angestiegen, dafür aber der Gehalt an alpha-Tocopherol kaum. Bei dem dritten Probanden stieg der Gehalt an alpha-Tocopherol im Serum stark an, dafür aber der Gehalt an alpha-Tocopherylphosphat kaum. Dieses Ergebnis deutet auf interindividuelle Unterschiede im Tocopherolmetabolismus hin. Es sind genetische Unterschiede im Metabolismus von Vitamin E bekannt, wie z.B. eine unterschiedliche Aktivität des alpha-Tocopherol Transferproteins (TTP).

Mittels Langzeitsupplementierung konnte gezeigt werden, dass es zu einem Anstieg von alpha-Tocopherylphosphat im Serum kommt. Damit ist aber noch nicht geklärt worden, ob der Phosphatester des Tocopherols periportal resorbiert oder endogen gebildet wird. Um dies zu klären wurde die folgende Langzeitsupplementierung durchgeführt.

Langzeitsupplementierung mit alpha-Tocopherol

Es wurde nach einer Auswaschphase von vier Wochen eine zweite Langzeitsupplementierung über 28 Tage, mit 800 IE alpha-Tocopherol pro Tag, durchgeführt. Hier sollte überprüft werden, ob es nur zu einem Anstieg von alpha-Tocopherol oder auch von alpha-Tocopherylphosphat im Serum kommt, also zu einer endogenen Bildung von alpha-Tocopherylphosphat. Gleichzeitig sollte die Bioverfügbarkeit von Tocopherol aus alpha-Tocopherylphosphat mit der des alpha-Tocopherols verglichen werden.

Der Gehalt an alpha-Tocopherol stieg von einem durchschnittlichen Basiswert von 33,4 µmol/L Serum auf durchschnittlich 87,2 µmol/L Serum nach 28 Tagen. Es kam auch zu einem Anstieg von alpha-Tocopherylphosphat von durchschnittlich 1,2 µmol/L auf 4,6 µmol/L im Serum nach 28 Tagen. Aufgrund dieses Ergebnis kann auf eine endogene Phosphorylierung von alpha-Tocopherol geschlossen werden, da es zu einem Anstieg von alpha-Tocopherylphosphat im Serum kam, ohne dass alpha-Tocopherylphosphat supplementiert worden ist.

Es wurde vermutet, dass alpha-Tocopherylphosphat die Speicherform von alpha-Tocopherol in Ratten darstellen könnte (Gianello et al. 2005), und eine aktive Rolle in regulatorischen Effekten auf der zellulären Ebene übernimmt (Munteanu et al. 2004; Negis et al. 2005)

Das Interesse an alpha-Tocopherylphosphat ist gewachsen, seitdem es in Pflanzen- und Tiergeweben entdeckt worden ist und somit als eine natürliche Form von Vitamin E gilt (Gianello et al. 2005). Das Institut für Medizin (IOM) hat eine Höchstmenge für Vitamin E publiziert, diese entspricht 1000 mg (2326 µmol)/Person/Tag von alpha-Tocopherol (McDermott 2000), oder den molaren Äquivalenten seiner Ester (Hathcock et al., 2005). Alpha-Tocopherylphosphat allerdings ist bis jetzt noch nicht als Vitamin E Supplement vom IOM klassifiziert worden (Libinaki 2006).

Wenn die AUCs von alpha-Tocopherylphosphat und alpha-Tocopherol der beiden Langzeitstudien miteinander verglichen werden, war die AUC des alpha-Tocopherols um ca. zwei Drittel größer nach Supplementierung mit alpha-Tocopherol, als die AUC nach Supplementierung mit alpha-Tocopherylphosphat. Nach Supplementierung mit einer vergleichbaren Dosis an alpha-Tocopherylphosphat war die AUC des alpha-

Tocopherylphosphats um ungefähr das 2,5 fache größer, als nach Supplementierung mit alpha-Tocopherol.

Insgesamt lässt sich sagen, dass unter den hier gewählten Bedingungen die Bioverfügbarkeit von Tocopherol aus alpha-Tocopherol besser ist, als die aus alpha-Tocopherylphosphat. Wenn die AUCs der jeweiligen Studie addiert werden, liegt die AUC nach Supplementierung von alpha-Tocopherol um ungefähr Eindrittel höher, als die nach Supplementierung von alpha-Tocopherylphosphat.

Eine eindeutige Identifizierung von alpha-Tocopherylphosphat im Serum mittels vergleichender Spektroskopie steht noch aus. Es ist während dieser Studie nicht gelungen ausreichende Mengen des alpha-Tocopherylphosphats in genügender Reinheit für die entsprechenden Untersuchungen zu isolieren.

Einfluss von alpha-Tocopherylphosphat auf die Hämostase

Ein Einfluss von alpha-Tocopherylphosphat auf die Hämostase konnte weder bei der Studie mit Einmaldosis, noch nach Langzeitsupplementierung mit alpha-Tocopherylphosphat festgestellt werden. Die Werte des Quick-, PT-Tests und der Thrombozytenaggregation veränderten sich nicht und blieben während der Studien in den Referenzbereichen. Als Thrombozytenaggregation wird der Vorgang der Zusammenlagerung (Aggregation) von Blutplättchen (Thrombozyten) bezeichnet. Sie gehört zum zellulären Teil der Blutgerinnung und dient dem Verschluss von verletzten Blutgefäßen. Der Quickwert, auch Thromboplastinzeit genannt, ist ein Maß der Funktionsleistung des extrinsischen Systems der Blutgerinnung. Er wurde als labormedizinischer Parameter vom US-amerikanischen Arzt Armand James Quick erstmals beschrieben. Er steht damit im Gegensatz zur Partial Thromboplastin Time (PTT), die Aufschluss über die Funktionsleistung des intrinsischen Systems gibt.

Somit wurden mit den drei durchgeführten Tests die komplette Gerinnungskaskade überprüft.

Die Vermutung, dass alpha-Tocopherylphosphat einen Einfluss auf die Blutgerinnung hat, beruht auf Ergebnissen in vitro von Navazio (1955). Der Einfluss von alpha-Tocopherol auf die Hämostase ist bislang auch nicht geklärt. Es gibt widersprüchliche Veröffentlichungen (Steiner 1991, Dereska 2005, Gisinger 1988, Jandak 1989), ob die Blutgerinnung durch Supplementierung von alpha-Tocopherol gehemmt wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch unsere Studie gezeigt worden ist, dass alpha-Tocopherylphosphat, bei einer Dosis von bis zu 800 IE über einen Zeitraum von vier Wochen, keinen Einfluss auf die Blutgerinnung im Menschen hat.

4.5 Cross-over Studie zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit von Tocotrienolen aus verschiedenen Nahrungssupplementen beim Menschen

4.5.1 Analyse der Nahrungssupplemente

Zwei verschiedene Nahrungssupplemente mit gemischten Tocotrienolen als Hauptkomponenten wurden bei der Cross-over-Studie zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit eingesetzt:

Tocomin 50%, Carotech (Malaysia), enthielt ein Gemisch von Tocotrienolen sowie alpha-Tocopherol in einer Pflanzenölsuspension. Die Wirksubstanzen selbst wurden aus der Palmfrucht (*Elaeis guineensis*) extrahiert und aufkonzentriert.

TocoPlus, wHc-service GmbH (Neuenbürg, D) bestand auch aus gemischten Tocotrienolen und alpha-Tocopherol, in diesem Präparat war Maisstärke die Matrix. Die Vitamere dieses Präparates wurden auch aus der Palmfrucht (*Elaeis guineensis*) extrahiert und aufkonzentriert. In den Studien bestand eine Einzeldosis (bzw. Tagesdosis) aus 129 mg gemischter Tocotrienole und Tocopherole. Die Zusammensetzung der beiden Präparate war in Bezug auf den Gehalt an E-Vitaminen gleich (siehe Tabelle 19). Der Phytosterolgehalt und der Gehalt an Squalen war in Tocomin 50% höher als im TocoPlus.

Tab. 19: Zusammensetzung von einer Dosisseinheit Tocomin 50 % und TocoPlus

| | Tocomin 50 % | TocoPlus |
|-------------------------------------|--------------|----------|
| Gesamt Tocotrienole/ Tocopherole | 129 mg | 129 mg |
| d-alpha-Tocotrienol | 30,00 mg | 30,00 mg |
| d-gamma-Tocotrienol | 54,00 mg | 54,00 mg |
| d-delta-Tocotrienol | 15,00 mg | 15,00 mg |
| d-alpha-Tocopherol | 30,00 mg | 30,00 mg |
| Squalen | 26,00 mg | 18,00 mg |
| Phytosterole | 9,00 mg | 5,00 mg |

Zur Überprüfung der Vitaminzusammensetzung wurden die Präparate in Acetonitril:Tetrahydrofuran (3:2) gelöst und 100 µl des Gemisches direkt auf die HPLC-Säule injiziert. Die Vitamere wurden mittels HPLC, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben, getrennt. Die Tocotrienole/Tocopherole wurden mittels UV-Detektor bei einer Detektionswellenlänge von 292 nm nachgewiesen. Alle Analyte konnten in einem Lauf detektiert werden; die Laufzeit betrug 15 Minuten. Die Retentionszeiten lagen bei ca. 5,5 min für delta-Tocotrienol, ca. 6,5 min für gamma-Tocotrienol, ca. 7 min für alpha-Tocotrienol und ca. 11 min für alpha Tocopherol. In Abbildung 18 ist ein typisches HPLC-Chromatogramm des Präparates Tocomin 50 % und in Abbildung 19 ein HPLC-Chromatogramm des Präparates TocoPlus dargestellt.

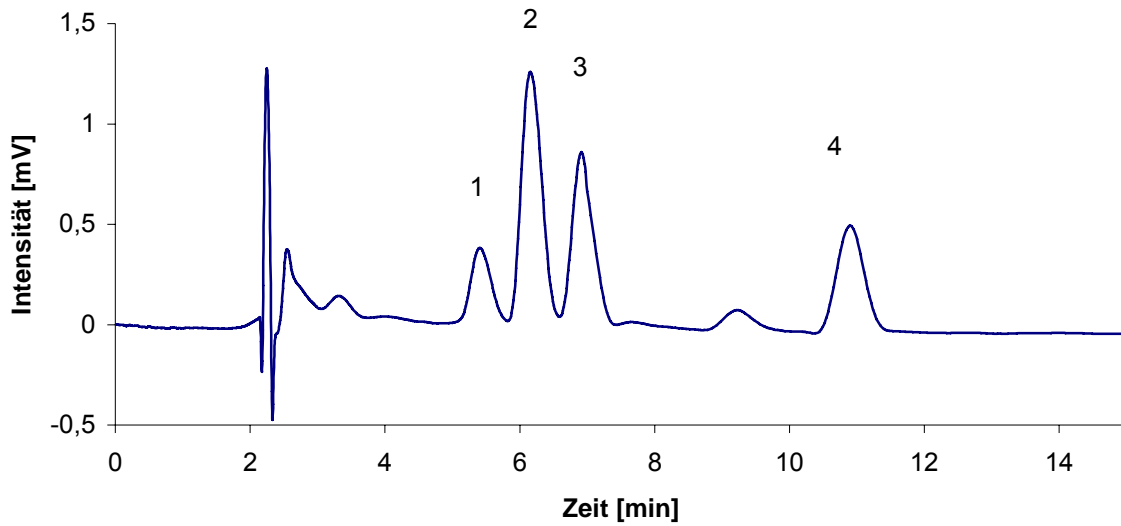


Abb. 18: HPLC-Chromatogramm einer Serumprobe von Tocomin 50 %, 1= delta-Tocotrienol, 2= gamma-Tocotrienol, 3= alpha-Tocotrienol, 4= alpha-Tocopherol

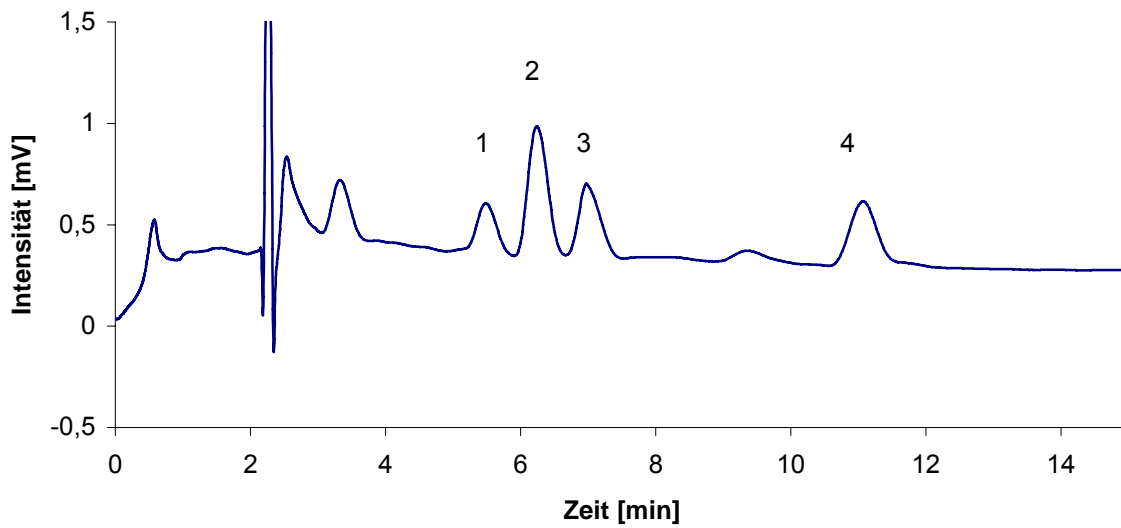


Abb. 19: HPLC-Chromatogramm von TocoPlus, 1= delta-Tocotrienol, 2= gamma-Tocotrienol, 3= alpha-Tocotrienol, 4= alpha-Tocopherol

4.5.2 Analyse von Tocotrienol- und Tocopherol in Serum mittels HPLC

Delta-Tocotrienol, gamma-Tocotrienol, alpha-Tocotrienol und alpha-Tocopherol wurden Serum zugesetzt. Die Proben wurden aufgearbeitet und mittels HPLC, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben, vermessen. Alle Analyte waren basisliniengetreunt und konnten über die Peakfläche ausgewertet werden. Die Identifizierung der verschiedenen Tocotrienole und Tocopherole in Verumproben erfolgte anhand der Retentionszeiten von Standards. Quantifiziert wurde über eine externe Kalibrierung.

Ein HPLC-Chromatogramm einer dotierten Serumprobe ist in Abbildung 20 dargestellt.

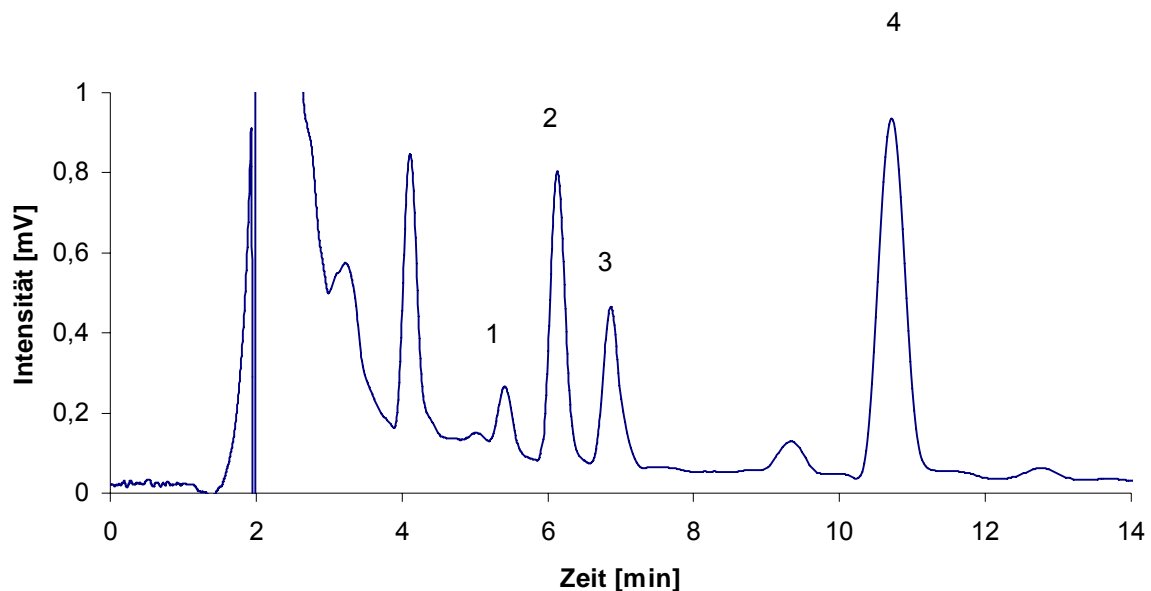


Abb. 20: HPLC-Chromatogramm eines dotierten Serums, 1= delta-Tocotrienol, 2= gamma-Tocotrienol, 3= alpha-Tocotrienol, 4= alpha-Tocopherol

4.5.3 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Tocotrienolen (Einmalapplikation)

An der Cross-over Studie nahmen 6 Probanden teil. Sie erhielten jeweils eine Dosis von 129 mg gemischten Tocotrienolen und alpha-Tocopherol aus den verschiedenen Supplementen. Die Blutabnahmen waren zum Zeitpunkt 0, nach 1 Std, 3 Std, 4 Std, 5 Std, 7 Std, 11 Std und 24 Std. Der Gehalt an Tocotrienolen und alpha-Tocopherol in Serum wurde mittels HPLC und UV-Detektion bestimmt. Abbildung 21 zeigt ein typisches HPLC-Chromatogramm einer Serumprobe (4 Stunden nach Gabe von 129 mg gemischten Tocotrienolen/alpha-Tocopherol).

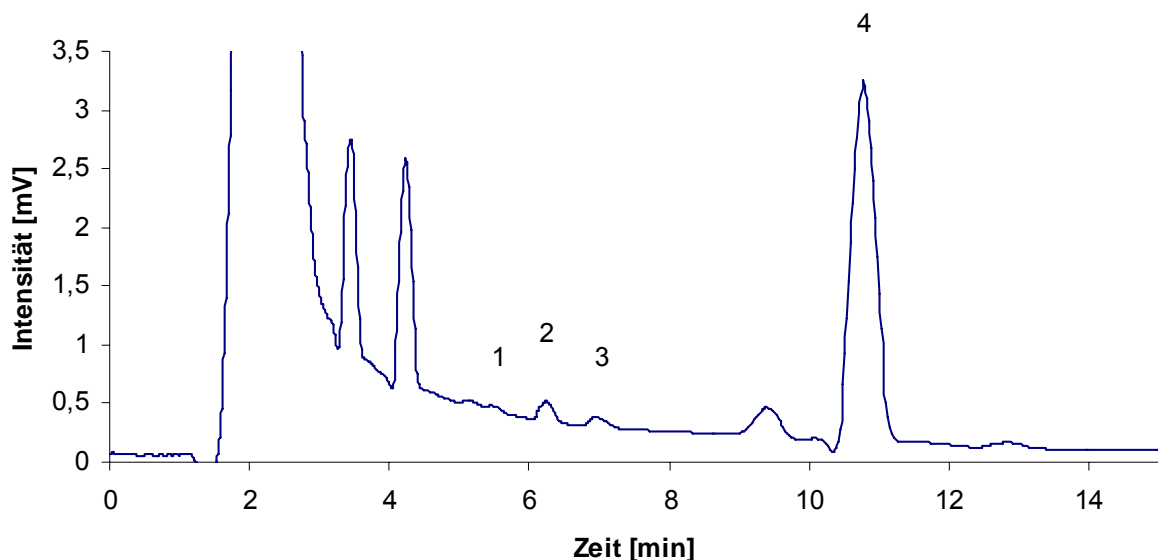


Abb. 21: HPLC-Chromatogramm vier Stunden nach der Einnahme eines Tocotrienol/Tocopherolpräparates, 1= delta-Tocotrienol, 2= gamma-Tocotrienol, 3= alpha-Tocotrienol, 4= alpha-Tocopherol

Die im Serum bestimmten Konzentrationen der Tocotrienole und des alpha-Tocopherols, nach Einmalgabe von Tocomin 50 %, sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tab. 20: Mittelwerte der Serumkonzentrationen der Tocotrienole und Tocopherol nach Gabe einer Dosis von 129 mg Tocomin (\pm SD, n= 6)

| Zeit [Std] | 0 | 1 | 3 | 4 | 5 | 7 | 11 | 24 |
|--------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| α -Tocotrienol [nmol/L] | 505 \pm 296 | 1709 \pm 1125 | 2541 \pm 1193 | 2317 \pm 1186 | 2170 \pm 720 | 1587 \pm 1376 | 1245 \pm 833 | 640 \pm 628 |
| γ -Tocotrienol [nmol/L] | 5893 \pm 2112 | 12924 \pm 4885 | 11735 \pm 8333 | 13663 \pm 5587 | 13958 \pm 5696 | 16311 \pm 3789 | 11295 \pm 5874 | 8239 \pm 4705 |
| δ -Tocotrienol [nmol/L] | 658 \pm 608 | 1213 \pm 446 | 1413 \pm 787 | 1422 \pm 649 | 972 \pm 359 | 1322 \pm 469 | 905 \pm 256 | 664 \pm 539 |
| α -Tocopherol [nmol/L] | 36910 \pm 6921 | 26722 \pm 19057 | 34169 \pm 18155 | 32731 \pm 16318 | 36507 \pm 17950 | 25650 \pm 15492 | 31562 \pm 23288 | 40436 \pm 14495 |

Der Mittelwert der Ausgangskonzentration an alpha-Tocotrienol lag etwa bei 500 nmol/L Serum. Nach nur drei Stunden stieg der Gehalt an alpha-Tocotrienol auf ein Maximum von ca. 2500 nmol/L an und fiel nach 24 Std auf ungefähr 600 nmol/L ab.

Für gamma-Tocotrienol wurde ein mittlerer Basiswert von 6000 nmol/L Serum bestimmt. Nach sieben Stunden stieg die Konzentration auf ein Maximum von 16311 nmol/L und fiel nach 24 Std auf 8239 nmol/L ab.

Die Basiskonzentration von delta-Tocotrienol war 700 nmol/L Serum. Drei Stunden nach Applikation war der Serumgehalt auf ein Maximum von 1400 nmol/L angestiegen und fiel nach 24 Std auf 700 nmol/L ab.

Für alpha-Tocopherol wurde kein statistisch signifikanter Anstieg der Konzentration im Serum gemessen.

Die im Serum gemessenen Tocotrienol- und alpha-Tocopherolgehalte, nach Gabe einer Dosis Tocomin, sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tab. 21 : Mittelwerte der Serumkonzentrationen der Tocotrienole und des alpha-Tocopherols nach Gabe einer Dosis von 129 mg TocoPlus (\pm SD, n= 6)

| Zeit [Std] | 0 | 1 | 3 | 4 | 5 | 7 | 11 | 24 |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| α -Tocotrienol [nmol/L] | 519 \pm 734 | 818 \pm 722 | 995 \pm 27 | 1438 \pm 865 | 1618 \pm 990 | 1695 \pm 1212 | 614 \pm 83 | 360 \pm 508 |
| γ -Tocotrienol [nmol/L] | 8321 \pm 1806 | 6449 \pm 4196 | 8225 \pm 4910 | 12308 \pm 6434 | 14194 \pm 5395 | 15154 \pm 7895 | 5783 \pm 5960 | 6927 \pm 6406 |
| δ -Tocotrienol [nmol/L] | 516 \pm 409 | 777 \pm 736 | 914 \pm 567 | 965 \pm 481 | 648 \pm 589 | 1119 \pm 336 | 766 \pm 602 | 414 \pm 71 |
| α -Tocopherol [nmol/L] | 35851 \pm 10679 | 33356 \pm 10862 | 34840 \pm 14242 | 31322 \pm 20935 | 29846 \pm 21372 | 28376 \pm 20325 | 34918 \pm 16502 | 25987 \pm 16573 |

Alpha-Tocotrienol hatte im Mittelwert eine Basiskonzentration von ca. 500 nmol/L Serum. Nach sieben Stunden stieg der Serumgehalt auf das Maximum von ungefähr 1700 nmol/L an und fiel nach 24 Std auf etwa 400 nmol/L ab.

Für gamma-Tocotrienol wurde ein mittlerer Basiswert von etwa 8000 nmol/L Serum bestimmt. Sieben Stunden nach Gabe stieg die Serumkonzentration auf ein Maximum von ca. 15000 nmol/L und nach 24 Std fiel die Konzentration auf ungefähr 7000 nmol/L ab.

Delta-Tocotrienol hatte eine Basiskonzentration von ca. 500 nmol/L im Serum. Sieben Stunden nach Applikation stieg der Serumgehalt auf ein Maximum von ungefähr 1000 nmol/L und fiel nach 24 Std auf etwa 400 nmol/L ab.

Alpha-Tocopherol stieg im Verlauf der Studie im Serum nicht signifikant an.

In Abbildung 22 sind die Serumkonzentrationen in nmol/L Serum von alpha-, gamma- und delta-Tocotrienol über einen Zeitraum von 24 Stunden, nach Gabe von einer Einzeldosis (129 mg) Tocomin 50 %, graphisch dargestellt.

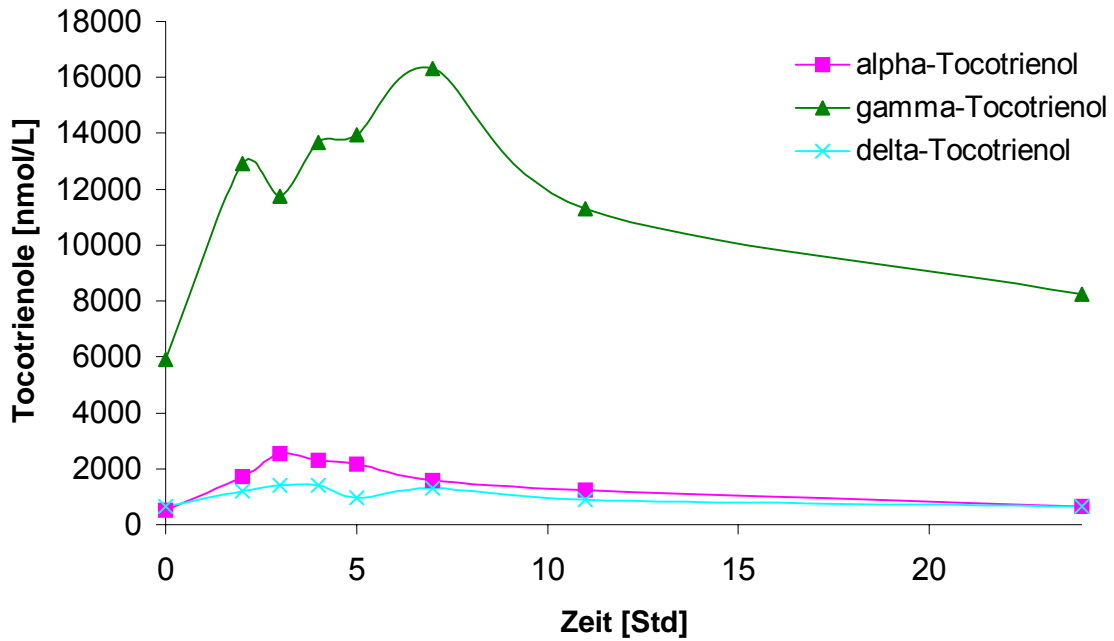


Abb. 22: Mittelwerte der Serumkonzentrationen von alpha-, gamma-, delta-Tocotrienol über einen Zeitraum von 24 Std nach Gabe einer Dosis Tocomin (n= 6)

In Abbildung 23 sind die Serumkonzentrationen in nmol/L Serum von alpha-, gamma-, und delta-Tocotrienol über einen Zeitraum von 24 Stunden abgebildet, nach Gabe einer Dosis TocoPlus, graphisch dargestellt.

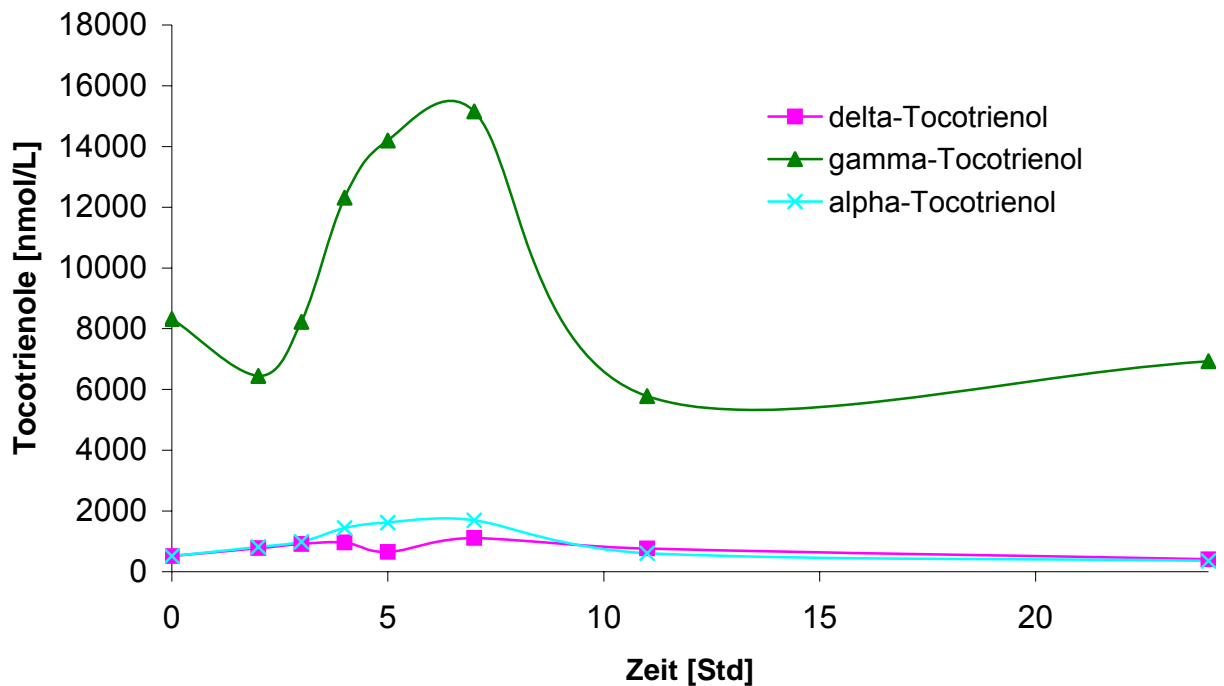


Abb. 23: Mittelwerte der Serumkonzentrationen von alpha-, gamma- und delta-Tocotrienol über einen Zeitraum von 24 Std nach Gabe einer Dosis TocoPlus (n=6)

In Tabelle 22 sind die Maximalkonzentrationen (C_{MAX}) der einzelnen Analyte und die entsprechenden Zeitpunkte (T_{MAX}), zum Vergleich für beide Präparate zusammenfassend dargestellt. Das Maximum des alpha-Tocotrienolgehalts im Serum nach Gabe des Tocomins war bei drei Stunden und lag bei ca. 2500 nmol/L Serum, das Maximum nach Gabe von TocoPlus war bei sieben Stunden und lag bei ungefähr 1700 nmol/L Serum.

Die Maxima der gamma-Tocotrienolkonzentration nach Gabe des Tocomins, als auch nach Gabe von TocoPlus lagen bei sieben Stunden, die Maximalkonzentrationen waren beide im Bereich von 15000- 16000 nmol/L Serum.

Das Maximum der delta-Tocotrienolkonzentration nach Gabe von Tocomin war nach drei Stunden erreicht und betrug bei ca. 1400 nmol/L Serum, nach Gabe von TocoPlus nach sieben Stunden und lag bei ungefähr 1100 nmol/L.

Tab. 22 : Maximalkonzentrationen von alpha-, gamma- und delta-Tocotrienol im Serum nach Gabe einer Dosis Tocomin und TocoPlus; mit Zeitpunkten der Maximalkonzentrationen

| | TocoPlus | | Tocomin | |
|-------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|------------------------|
| | C _{MAX} [nmol/L] | T _{MAX} [Std] | C _{MAX} [nmol/L] | T _{MAX} [Std] |
| Alpha-Tocotrienol | 1695 | 7 | 2541 | 3 |
| Gamma-Tocotrienol | 15154 | 7 | 16311 | 7 |
| Delta-Tocotrienol | 1119 | 7 | 1422 | 4 |

In Tabelle 23 sind die Flächen unter der Kurve (AUC 2- 8 Std) dargestellt. Diese wurden mittels der Trapezoidalmethode errechnet. AUCs wurden herangezogen, um die Bioverfügbarkeit der einzelnen E-Vitamere aus beiden Produkte miteinander zu vergleichen. Je größer die AUC, desto besser die Bioverfügbarkeit des Stoffes.

Tab. 23: AUCs des alpha-, gamma- und delta-Tocotrienols, nach Gabe einer Dosis Tocomin und TocoPlus (129 mg)

| AUC (Std x nmol/L) | TocoPlus | Tocomin | AUC Tocomin/AUC TocoPlus |
|-----------------------|----------|---------|--------------------------|
| Alpha-Tocotrienol | 19250 | 46870 | 2,4 |
| Gamma-Tocotrienol | 199461 | 270128 | 1,3 |
| Delta-Tocotrienol | 15752 | 21077 | 1,3 |

Die AUCs der einzelnen Tocotrienole nach Gabe von Tocomin 50 % waren größer, als nach Gabe von TocoPlus.

4.5.4 Untersuchungen zum Einfluss einer 12 Wochen Supplementierung mit TocoPlus auf Hautstruktur und -funktion beim Menschen

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss von Tocotrienolen auf Hautstruktur und -funktion, über eine Supplementierungsdauer von 12 Wochen untersucht. An der Studie nahmen 6 Erwachsene mit trockener sensibler Haut vom Hauttyp II teil (helle Haut, blondes oder hellbraunes Haar, blaue oder hellbraune Augen) (Pathak 1982). Die Probanden nahmen 3 Kapseln TocoPlus (=129 mg gemischte Tocotrienole und alpha-Tocopherol) täglich über einen Zeitraum von 12 Wochen ein und die Serumkonzentrationen der Analyte (alpha-, gamma- und delta-Tocotrienol) wurden

zu den Zeitpunkten t= 0, 6 Wochen und 12 Wochen bestimmt. Die im Serum gemessenen Tocotrienol- und alpha-Tocopherolgehalte (Mittelwerte und Standardabweichungen) sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tab. 24: Serumkonzentrationen der Tocotrienole und des Tocopherol nach Supplementierung mit TocoPlus (129 mg) täglich über einen Zeitraum von 12 Wochen; (\pm SD, n= 6)

| Zeit [Tag] | 0 | 42 | 84 |
|----------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| alpha-Tocotrienol [nmol/L] | 172,5 \pm 135,2 | 2471 \pm 580,5 | 1634 \pm 1071,3 |
| gamma-Tocotrienol [nmol/L] | 622,6 \pm 497,9 | 3739 \pm 1614,9 | 11846 \pm 5238,9 |
| delta-Tocotrienol [nmol/L] | 135,5 \pm 126,5 | 727,3 \pm 311,1 | 1149 \pm 445,6 |
| alpha-Tocopherol [nmol/L] | 26464 \pm 8555 | 30757 \pm 5455 | 30498 \pm 13636 |

Alpha-Tocotrienol lag in dieser Studie mit einer Basiskonzentration von ca. 170 nmol/L (Mittelwert) im Serum vor. Nach sechs Wochen Supplementierung stieg der Gehalt im Serum auf ungefähr 2500 nmol/L an und lag nach 12 Wochen bei etwa 1600 nmol/L.

Gamma-Tocotrienol hatte einen Basisgehalt von ca. 600 nmol/L im Serum. Nach sechs Wochen Supplementierung stieg die Serumkonzentration auf ungefähr 3700 nmol/L an und lag nach 12 Wochen bei etwa 12000 nmol/L.

Die mittlere Basiskonzentration von delta-Tocotrienol lag bei ca. 140 nmol/L im Serum. Zum Zeitpunkt Woche 6 der Studie stieg der Serumgehalt auf etwa 700 nmol/L an und war nach ungefähr 12 Wochen auf 1000 nmol/L weiter gestiegen.

Alpha-Tocopherol hatte einen Basisgehalt (Mittelwert) von ca. 26000 nmol/L im Serum. Nach sechs Wochen Supplementierung mit Tocomin stieg der Serumgehalt

auf ungefähr 30800 nmol/L an und war nach 12 Wochen in einem ähnlichen Bereich (ca. 30500 nmol/L).

In Abbildung 24 sind die Konzentrationsverläufe von alpha-Tocotrienol, gamma-Tocotrienol und delta-Tocotrienol über einen Zeitraum von 12 Wochen graphisch dargestellt.

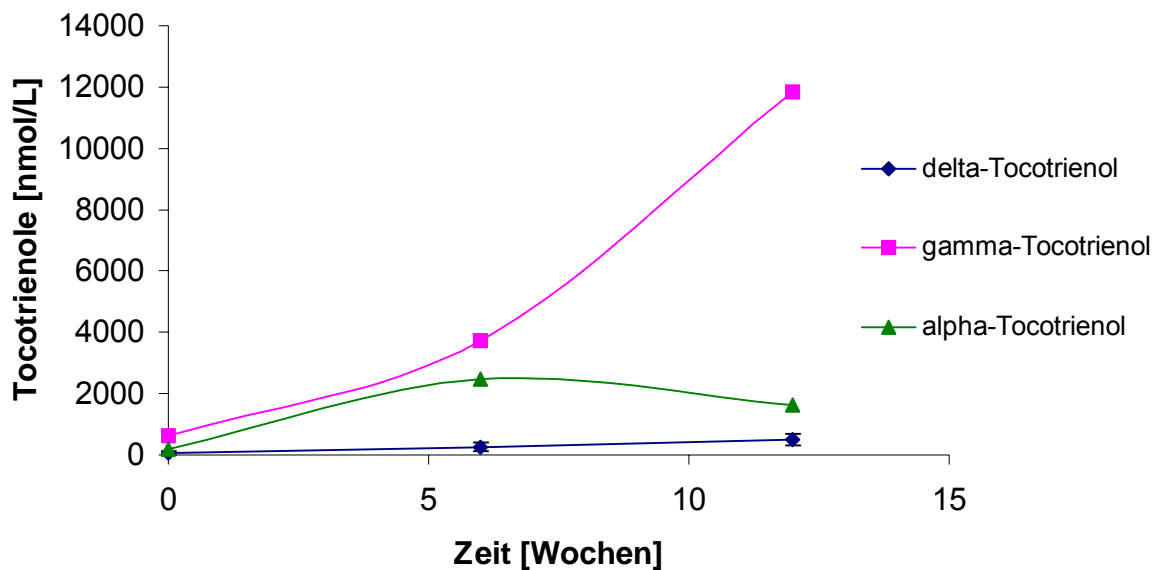


Abb. 24: Verlauf der Serumkonzentrationen von alpha-, gamma-, delta-Tocotrienol über einen Zeitraum von 12 Wochen, nach täglicher Gabe von TocoPlus (n= 6)

In Abbildung 25 ist der Verlauf der alpha-Tocopherolkonzentration im Serum, nach täglicher Gabe von TocoPlus, dargestellt.

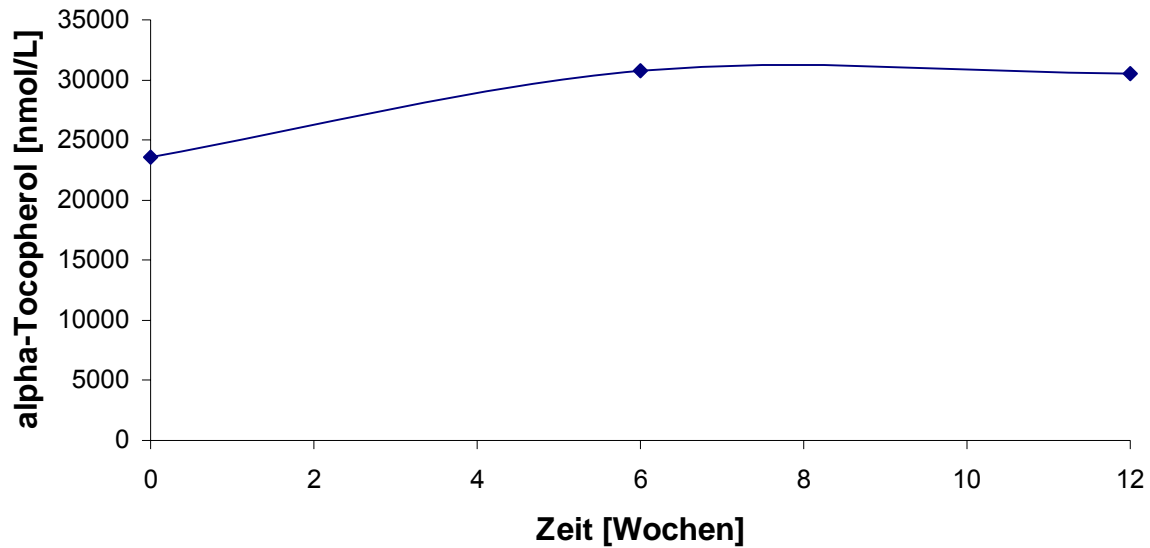


Abb. 25: Verlauf der Serumkonzentration von alpha-Tocopherol über einen Zeitraum von 12 Wochen, nach täglicher Gabe von TocoPlus (n= 6)

Messung der Hautparameter

Wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben, sind im Verlauf der Supplementierung mit TocoPlus mehrere Hautparameter untersucht worden, um mögliche Strukturveränderungen der Haut unter Tocotrienolgaben zu bestimmen. Die durchgeführten Messungen sind im Folgenden aufgeführt.

- Messung des photoprotektiven Effektes nach Bestrahlung mit 1,25 mittlerer erythembildender Dosis (a-Werte), Bildung eines Erythems wurde vor und nach 24 Std. nach Bestrahlung mit einem Chromatometer (Chromatometer CR 300, Minolta, Ahrensburg, D) als jeweiliger a-Wert gemessen und als differenzieller Δ a-Wert angegeben
- Messung der Hautdicke und Hautdichte mit dem Ultraschall-B-Scan; verschiedene Echoamplituden wurden 256 Falschfarben zugeordnet, helle Farben entsprechen einer hohen und dunkle Farben einer schwachen Reflektion (in Pixeln); geringe Unterschiede im Reflektionsverhalten von Geweben werden so sichtbar

- Hautfeuchtigkeit mit dem Corneometer; in relativen Messeinheiten den AU (arbitrary units) wurde mittels einer kapazitiven Methode die Hautfeuchtigkeit gemessen
- Messung des transepidermalen Wasserverlustes mit dem TEWA-Meter; Wasserverdunstung wurde direkt an der Hautoberfläche mittels Spezialsonde gemessen
- Messung der kapillären Hautdurchblutung (O2C), diese beinhaltet Flussgeschwindigkeit (BV), Sauerstoffsättigung (S-O2), peripherer Blutfluss (BF) und die relative Hämoglobinkonzentration (rHb)
- Messung der Hautempfindlichkeit mit dem Nikotinsäureester-Modell; Nicotinatlösung wurde auf den Unterarm der Probanden appliziert und die Erythembildung nach einer bestimmten Zeit mit dem Chromameter gemessen
- Oberflächenstruktur der Haut mit dem SELS-Verfahren (Surface Evaluation of Living Skin), graphische Darstellung lebender Haut unter Speziallicht und elektronischer Verarbeitung und Analyse des Bildes

Messungen der Ultrastruktur der Haut mittels B-Scan wiesen nach 12 Wochen Supplementierung im Vergleich zu $t=0$ eine Erhöhung der Hautdicke um durchschnittlich 5,5% bzw. der Hautdichte um durchschnittlich 7% auf.

Die Veränderungen in der Hautdicke sind in Abbildung 26 und die der Hautdichte in Abbildung 27 dargestellt.

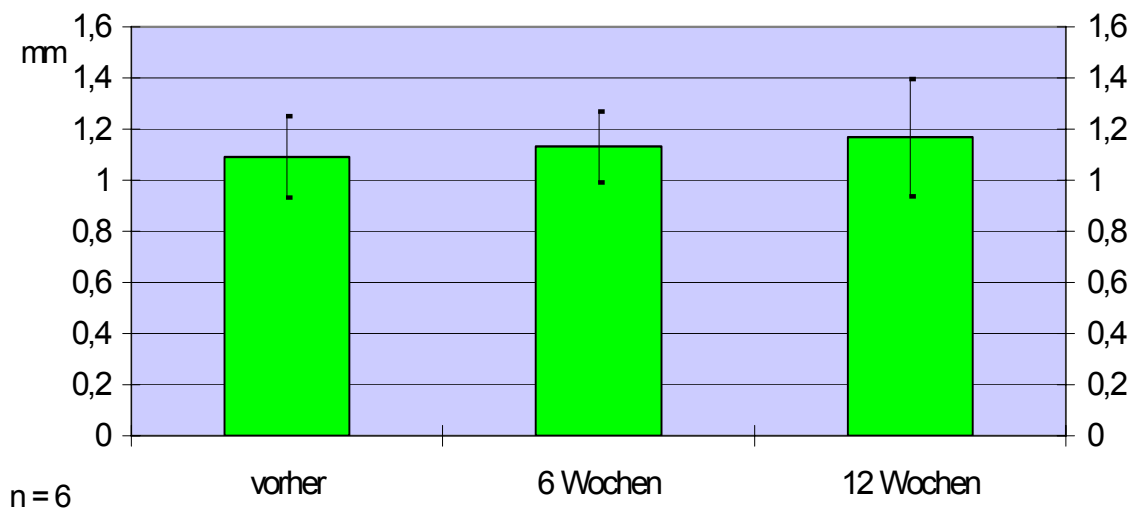


Abb. 26: Zunahme der Hautdicke nach der Supplementierung von TocoPlus über 12 Wochen

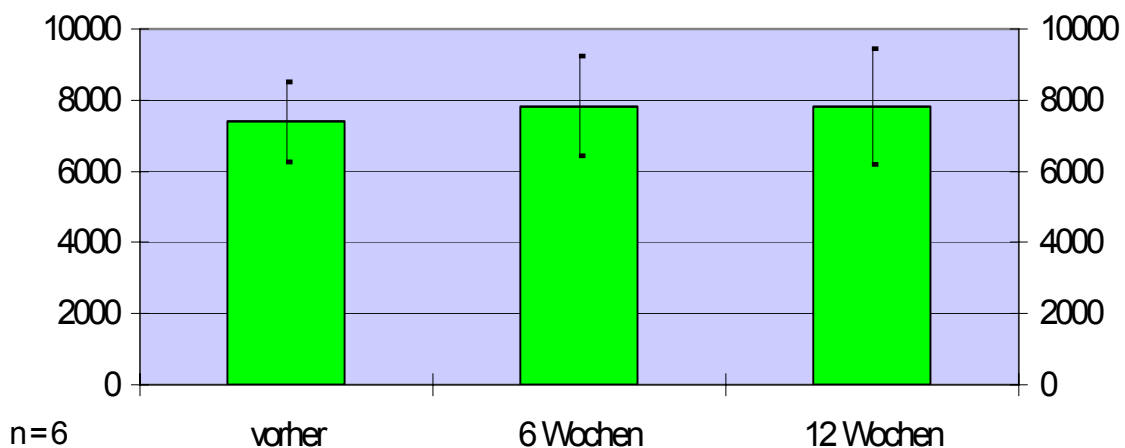


Abb. 27: Zunahme der Hautdichte mit Supplementierung mit TocoPlus über 12 Wochen; in Pixeln

Bei allen übrigen Hautparametern lagen die Endwerte 12 Wochen nach Einnahme der Kapseln tendenziell eher ungünstiger, als zu Beginn der Studie.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Verlauf der 12 wöchigen Einnahme des Prüfpräparates TocoPlus Kapseln keine nennenswerten Veränderungen der hautphysiologischen Parameter erzielt werden konnten.

Nebenwirkungen unerwünschter Art im Verlauf der Prüfung traten nicht auf, keine der beteiligten Probandinnen führten hierbei Angaben über Begleiterscheinungen auf.

4.6 Diskussion

4.6.1 Analytische Verfahren zur Bestimmung von alpha-, delta-, gamma-Tocotrienol und alpha-Tocopherol in Serum

Die Methode zur Analyse von alpha-, delta-, gamma-Tocotrienol und alpha-, gamma-Tocopherol wurde in Anlehnung an eine in der Literatur beschriebene Methode modifiziert und etabliert (Yap 1999, Podda 1996).

Die verwendete Methode ermöglichte die direkte Injektion der Probe in die HPLC, ohne dass Extraktionsmittel vorher abgedampft und die Probe mit Fließmittel wieder aufgenommen wird. Aufgrund der geringen Verluste bei der Aufarbeitung dieser direkten Methode wurde kein interner Standard (IS) verwendet. In Modifikation könnte delta-Tocopherol als IS verwendet werden, da diese Verbindung in der Regel nicht in nennenswerten Mengen im menschlichen Serum vorhanden ist. Alle Analyte waren bei einer Detektionswellenlänge von 292 nm basisliniengetrennt. Die Peaks konnten somit über die Fläche ausgewertet werden. Die hier etablierte Methode kann routinemäßig zur Analytik von alpha-, delta-, gamma-Tocotrienol und alpha-, delta-, gamma-Tocopherol in Serum angewandt werden.

4.6.2 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Tocotrienolen

Zwei verschiedene Nahrungssupplemente mit gemischten Tocotrienolen als Hauptkomponenten wurden bei der Cross-over-Studie zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit eingesetzt:

Beide Präparate Tocomin 50%, Carotech (Malaysia) und TocoPlus wHc-service GmbH (Neuenbürg, D), enthielten ein Gemisch von Tocotrienolen. Als weiteres E-Vitamin war alpha-Tocopherol vorhanden. Die Wirksubstanzen wurden aus der

Palmfrucht (*Elaeis guineensis*) extrahiert und aufkonzentriert. Bei Tocomin 50%, Carotech (Malaysia) diente als Matrix eine Pflanzenölsuspension, TocoPlus, wHc-service GmbH (Neuenbürg, D) enthielt als Matrix Maisstärke.

In den Studien enthielt eine Einmaldosis (bzw. Tagesdosis) 129 mg gemischter Tocotrienole und Tocopherole. Es ist bekannt, dass die Resorptionsrate der lipophilen Vitamine abhängig von der Matrix ist, in der sie eingebunden sind und von der dazu aufgenommenen Fettmenge (Yap 2000, Jeanes 2004, Leonard 2004). Mit dieser Studie sollte überprüft werden, inwieweit sich die Matrix bzw. der Lipidanteil der Matrix auf die Bioverfügbarkeit der Tocotrienole auswirkt.

Die Basiswerte für die Tocotrienole und für alpha-Tocopherol im Serum der Probanden wurden gemessen und stimmten mit Literaturwerten überein (Yap 1999).

Die Kinetik der Tocotrienole unterschied sich zu denen der Tocopherole. In unserer Studie lagen die höchsten Konzentrationen der Tocotrienole zwischen vier und sieben Stunden nach oraler Gabe im Serum. Bei den Tocopherolen ist die maximale Menge nach ca. 12 Stunden (Burton 1990) im Serum erreicht.

Die Bioverfügbarkeit der Präparate verglichen wir mittels der AUCs des Serums von 0- 24 Stunden, die durch die Trapezoidalermittlung ermittelt wurden. Die AUC des alpha-Tocotrienols nach Gabe von Tocomin 50 % war 2,4 fach so hoch, wie nach Gabe von TocoPlus. Die AUC von gamma-Tocotrienol war 1,3 fach größer nach Gabe von Tocomin 50 %, als nach Gabe von TocoPlus. Die AUC des delta-Tocotrienols war 1,3 fach höher nach Gabe von Tocomin 50 %, als nach Gabe von TocoPlus.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Bioverfügbarkeit der Tocotrienole aus Tocomin um 50 % höher ist als aus TocoPlus.

Vitamin E-Absorption ist von mehreren Faktoren abhängig. Einmal sind Gallensalze und Pankreasenzyme zur Absorption wichtig. Patienten mit z.B. zystischer Fibrose oder Pankreatitis und somit einer verminderten Sekretion dieser beiden Faktoren, zeigen eine Vitamin E-Malabsorption (Traber & Sies 1996).

Die gleichzeitige Aufnahme von Fett mit Vitamin E ist für eine gute Absorption notwendig, da durch das Fett die Gallensekretion und die Sekretion der pankreatischen Enzyme (mit Lipase und Esterase) stimuliert wird und es somit zur Bildung von Mizellen kommt (Stahl et al. 2002). Der Fettgehalt in der Nahrung kann gering sein. Roodenburg et al. zeigte in Studien, dass der Anstieg der Plasmakonzentration von alpha-Tocopherol identisch nach Gabe von Mahlzeiten mit

einem Fettgehalt von 3 oder 36 g waren (Roddenburg et al. 2000). Für die Aufnahme von Vitamin E in Nahrungssupplementen scheint die Fettmenge relevanter zu sein. Die Resorption von Vitamin E ist auch von der Art des Fettes abhängig, welches mit aufgenommen wird. Zum Beispiel ist die Absorption wesentlich effizienter, wenn mittelkettige Fettsäuren, anstatt langkettige Fettsäuren zusätzlich mit der Nahrung bereitgestellt werden (Gallo-Torres 1980).

Die Matrix, in der Vitamin E eingebunden ist, ist ein kritischer Parameter bei der Aufnahme. In manchen Fällen ist die Verbindung so fest in die Matrix eingebunden, dass nur Teile bei der Resorption herausgelöst werden können. In unserer Studie kann die unterschiedliche Bioverfügbarkeit der beiden Nahrungssupplemente auf Matrixeffekte zurückgeführt werden. Wahrscheinlich können die Tocotrienole, die in die Maisstärkematrix (TocoPlus) eingebunden sind, nicht komplett freigesetzt werden und somit kommt es zu Verlusten bei der Resorption.

Die Tocotrienole von Tocomin 50 % liegen in einer pflanzlichen Ölsuspension vor. Die ölige Matrix selbst fördert die Resorption von Tocotrienolen, auch durch die Stimulierung der Gallenproduktion und der Produktion von Pankreassaft.

4.6.3 Untersuchungen zum Einfluss einer 12 Wochen Supplementierung mit TocoPlus auf Hautstruktur und -funktion beim Menschen

In den letzten Jahren wuchs das Interesse an Tocotrienolen wegen ihres cholesterinsenkenden Effektes, den positiven Auswirkungen auf die Haut (nur topische Applikation), den antioxidativen Eigenschaften und der antikanzerogenen und tumorsuppressiven Wirkung (Patel 2006, Das 2005, Schaffer 2005, Rasool 2006).

Tocotrienole haben positive Auswirkungen auf Hauteigenschaften, wie eine verminderte Lipidperoxidation, wenn sie auf die Haut aufgetragen werden (Weber et al. 2003, Yap et al. 2002), bisher wurden aber noch keine Studien durchgeführt, um

zu prüfen, ob die positiven Auswirkungen auch zustande kommen, wenn Tocotrienole oral supplementiert werden.

Der photoprotektive Effekt von vielen Antioxidantien in Supplementierung (Sies et al. 1995), wie auch kosmetische Effekte von z.B. omega-3-Fettsäuren Supplementierung, sind bereits in mehreren Studien gezeigt worden (Sies et al. 2004).

Bei Mikronährstoffen, wie z.B. beta-Carotin und Lycopin wurden positive Hauteffekte, kosmetische, als auch photoprotektive, nach oraler Gabe, nachgewiesen (Heinrich et al. 2006, Stahl et al. 2005, Stahl et al. 2005).

Ikedo et al. führte eine Studie mit Ratten und Nacktmäusen durch. Den Tieren wurde über acht Wochen eine Diät verabreicht, bei der das Futter mit 48,8 mg/ kg alpha-Tocopherol, 45,8 mg/ kg alpha-Tocotrienol und 71,4 mg/ kg gamma-Tocotrienol angereichert war. Alpha-Tocopherol, alpha-Tocotrienol und gamma-Tocotrienol konnten in der Haut gemessen werden. In Leber, Nieren und Plasma konnte nur alpha-Tocopherol detektiert werden.

An der vorliegenden Humanstudie nahmen sechs Probanden teil. Diese nahmen 3 Kapseln TocoPlus (=129 mg gemischte Tocotrienole und alpha-Tocopherol) täglich über einen Zeitraum von 12 Wochen ein. Blutabnahmen und Hautuntersuchungen waren zu Beginn der Studie, nach sechs und 12 Wochen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Tierstudie konnte eine deutliche Anreicherung der Tocotrienole im Serum der Probanden gemessen werden. Alpha-Tocotrienol stieg von durchschnittlich 173 auf 1634 nmol/L Serum und delta-Tocotrienol von 135,5 auf 1149 nmol/L Serum. Bei diesen beiden Substanzen war eine Sättigung des Plasmaspiegels nach schon vier Wochen zu erkennen. Gamma-Tocotrienol stieg von durchschnittlich 622 nmol/L auf 3739 nmol/L nach sechs und auf 11846 nmol/L nach 12 Wochen. Bei dieser Substanz konnte keine Sättigung des Plasmaspiegels gesehen werden.

Trotz des Anstiegs im Serum, lässt sich zusammenfassend sagen, dass im Verlauf der 12 wöchigen Einnahme des Prüfpräparates TocoPlus keine nennenswerten Veränderungen der hautphysiologischen Parameter erzielt werden konnten, weder auf kosmetischer, noch auf photoprotektiver Ebene. Lediglich die Messungen der Hautstruktur mittels B-Scan wiesen eine Verbesserung der Hautdicke um durchschnittlich 5,5% bzw. der Hautdicke um durchschnittlich 7% auf. Diese Verbesserung war allerdings statistisch nicht signifikant.

Auch in Studien mit alpha-Tocopherol (400 IE/Tag über sechs Monate oder 3000 IE/Tag über sieben Wochen) ergaben sich keine signifikante Verbesserung in der Photoprotektion der Haut (Werninghaus et al. 1994, Fuchs et al. 2003). Parameter, die die Bioverfügbarkeit von Tocopherol in der menschlichen Haut festlegen, sind bis jetzt nicht bekannt. Die MED korreliert nicht mit dem Gehalt an Tocopherol in der Haut (Fuchs et al. 2003). In Kombination mit Vitamin C hatte Tocopherol (alpha-Tocopherol 1000 IE mit Vitamin C 2000 mg über eine Woche oder alpha-Tocopherol 3000 IE und 3000 mg Vitamin C über sieben Wochen) die MED signifikant erhöht (Eberlein-König et al. 1998 und Fuchs et al. 1998). In in-vitro Studien wurde festgestellt, dass Vitamin C Tocopherol vom Tocopheryloxylradikal regeneriert und das Radikal zur wässrigen Schicht transferiert, wo es schließlich durch antioxidative Enzyme eliminiert wird (Wefers 1998). Eine Studie, bei der allein Vitamin C supplementiert worden ist (500 mg/ Tag über acht Wochen), führte auch zu keinem Effekt auf die MED (McArdle et al. 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Supplementierung allein mit E-Vitaminen keinen positiven Effekt auf die Haut, weder auf kosmetischer, noch photoprotektiver Ebene, hat.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der Arbeit wurden Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von lipophilen Mikronährstoffen (beta-Carotin und Vitamin E Verbindungen) am Menschen durchgeführt.

1. Bioverfügbarkeit von beta-Carotin unter Einfluss des Polymorphismus SNP1 im beta-Carotin-Oxygenase Gen

Beta-Carotin ist die wichtigste Provitamin-A Verbindung und trägt entscheidend zur Versorgung des Organismus mit Retinol bei. Nach Resorption wird das Provitamin in der Darmmukosazelle oxidativ gespalten, reduziert und dann vornehmlich als Retinylpalmitat in Chylomikronen mit der Lymphe zum Blut transportiert. Über den Gehalt an beta-Carotin und Retinylester, in Chylomikronen nach Einnahme des Provitamins, lassen sich somit Rückschlüsse auf Absorption und Metabolismus der Muttersubstanz ziehen. Die Spaltung von beta-Carotin wird durch das Enzym beta-Carotin-Oxygenase (BCO) katalysiert, das auf dem langem Arm des Chromosoms 16 kodiert ist und dessen Sequenz erst kürzlich aufgeklärt wurde. Bekannt ist ein genetischer Polymorphismus der BCO, bezeichnet als SNP1 (single nucleotide polymorphism 1), der die Base an Position 786 betrifft. Hier kann ein Austausch Adenin gegen Thymin (A→T) vorliegen, der im Protein die Substitution der Aminosäure Arginin 262 durch Serin zur Folge hat. Inwieweit diese genetische Variation die Metabolisierung von beta-Carotin im Menschen beeinflusst ist nicht bekannt.

Zur Untersuchung der Frage wurde die Genvariante bei 15 Probanden bestimmt. Für die anschließende Studie wurden ausgewählte Teilnehmer entsprechend der möglichen Allelkombinationen gruppiert: Gruppe heterozygot AT (n=4), Gruppe homozygot AA (n=3), Gruppe homozygot TT (n=2). Nach Gabe einer Einzeldosis von 2 mg beta-Carotin wurde im Zeitraum 2- 8 Std nach Applikation Blut entnommen und in Chylomikronen und Serum der Gehalt an beta-Carotin und Retinylpalmitat bestimmt. C_{max} und AUC für beta-Carotin in Chylomikronen waren am höchsten in der Gruppe homozygot TT, niedriger in der Gruppe heterozygot AT und am niedrigsten in der Gruppe homozygot AA. Das Verhältnis AUC-beta-Carotin zu AUC-Retinylpalmitat lag in den Gruppen homozygot TT und heterozygot AT im

Mittel über 2, in der Gruppe homozygot AA jedoch deutlich unter 1. Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass die Genvariante Adenin an Position 786 des BCO Gens mit einer höheren Enzymaktivität assoziiert ist als die Variante 786-Thymin und der Polymorphismus Einfluß auf die Bereitstellung von Retinol aus der Provitaminverbindung hat. Auch das Phänomen der Low- and High-Responder, deren beta-Carotinspiegel in Chylomikronen nach Gabe der Substanz entsprechend wenig oder stark ansteigen, könnte mit dem genetischen Polymorphismus verbunden sein.

2. Bioverfügbarkeit von Tocopherylphosphat

Alpha-Tocopherylphosphat ist in den USA als Nahrungsergänzungsmittel zugelassen und wurde als Vitamin E-Derivat in Pflanzen gefunden. Es gibt Hinweise, dass die Substanz auch im Organismus des Menschen vorkommt und eventuell an der Regulation zellulärer Signalwege beteiligt ist. Zu Bioverfügbarkeit, Bildung und Metabolismus der Verbindung ist nur wenig bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob die Substanz direkt bioverfügbar ist oder endogen aus Tocopherol gebildet wird. Darüber hinaus wurde die Bioverfügbarkeit von Vitamin E aus Tocopherylphosphat abgeschätzt.

Die Untersuchungen zeigten, dass alpha-Tocopherylphosphat bereits in geringen Mengen im Blut des Menschen vorhanden ist. Dabei liegen die Konzentrationen mit etwa 0,2-2 $\mu\text{mol/L}$ Serum deutlich unter denen des alpha-Tocopherols (20-40 $\mu\text{mol/L}$). Nach Gabe einer Einmaldosis Tocopherylphosphat (400 bzw. 800 IE) war der Ester in Chylomikronen nicht nachweisbar, jedoch stieg die Konzentration des freien alpha-Tocopherols an. Keine Änderungen wurden im Serum gemessen. Ein Anstieg des Tocopherylphosphats auf bis zu 18 $\mu\text{mol/L}$ war jedoch nach Mehrfachapplikation des Esters (28 Tage; 800 IE/Tag) zu verzeichnen. Gleichzeitig stieg auch die Konzentration an freiem alpha-Tocopherol. Um zu untersuchen ob Tocopherylphosphat endogen aus Tocopherol gebildet wird, wurde unter Mehrfachapplikation von Tocopherol (28 Tage; 800 IE/Tag) der Serumspiegel des Phosphatesters und der Muttersubstanz verfolgt. Auch nach Gabe von Tocopherol stieg die Konzentration des Tocopherylphosphats im Serum an. Im Vergleich war die Bioverfügbarkeit von alpha-Tocopherol nach Gabe der Muttersubstanz höher als nach Applikation des Esterderivates. Aus den Untersuchungen läßt sich folgern, dass Tocopherylphosphat nicht (oder nur in sehr geringem Maß) intakt resorbiert wird,

aber nach Esterspaltung als Tocopherolquelle dient. Das im Organismus des Menschen vorhandene Tocopherylphosphat wird durch endogene Phosphorylierung von alpha-Tocopherol gebildet. Der Prozess ist vermutlich abhängig von dem Angebot an alpha-Tocopherol. Untersuchungen der einzelnen Probanden lassen auf interindividuelle Unterschiede in der Bildung von Tocopherylphosphat schliessen.

3. Bioverfügbarkeit von Tocotrienolen; Effekt auf Hautstruktur und –funktion

Tocotrienole zählen zu den E-Vitaminen und kommen in einigen Nahrungsmitteln in relativ hohen Konzentrationen vor. Im Vergleich zu den in der Substitution des Chromanringes analogen Tocopherolen weisen sie drei zusätzliche Doppelbindungen in der Phytylseitenkette auf. Neben antioxidativen Wirkungen sind den Tocotrienolen auch zelluläre Effekte auf regulatorischer Ebene zugeschrieben worden. Versuche mit topisch verabreichten Tocotrienolen die zur Verbesserung von Hauteigenschaften führten, lassen vermuten, dass auch oral verabreichte Tocotrienole kutane Wirkungen zeigen.

Nach Applikation eines Gemisches verschiedener Vitamin E-Verbindungen (alpha-, gamma-, delta-Tocotrienol und alpha-Tocopherol) über einen Zeitraum von 12 Wochen (gesamt 129 mg/Tag), konnte ein Anstieg der einzelnen Verbindungen im Serum nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Ausgangswert war die Konzentration von alpha- und delta-Tocotrienol 10-fach, die des gamma-Tocotrienols 20-fach erhöht. Dagegen stieg der Serumspiegel des alpha-Tocopherols nur geringfügig an. Mit den Serumwerten korreliert war eine Erhöhung der Hautdichte und Hautdicke. Für andere Parameter, wie Feuchtigkeit, transepidermaler Wasserverlust, Oberflächenbeschaffenheit, kapilläre Durchblutung, Empfindlichkeit und Lichtschutz konnte keine Verbesserung erzielt werden. Im Gegensatz zu anderen Mikronährstoffen (Carotinoide, Flavonoide, essentielle Fettsäuren) ist die orale Applikation von Tocopherolen und Tocotrienolen nur bedingt geeignet Hauteffekte zu erzielen. Aus einer vergleichenden Studie zur Bioverfügbarkeit von Tocotrienolen aus Präparaten gleicher Zusammensetzung mit unterschiedlicher Matrix kann gefolgert werden, dass Matrixeffekte die Bioverfügbarkeit stark beeinflussen. Die Lipophilie der Matrix scheint hier besonderen Einfluß zu nehmen.

Schlagwörter: Mikronährstoffe, Vitamin E, beta-Carotin

5. Summary

The present thesis deals with studies on the bioavailability of lipophilic micronutrients (beta-carotene and vitamin E compounds) in humans.

1. Bioavailability of beta-carotene: relation to the polymorphism SNP1 in the beta-carotene-oxygenase gene

Beta-Carotene is the most prominent provitamin-A compound and significantly contributes to the supply of the human organism with retinol. Following absorption the provitamin is oxidatively cleaved, reduced and further transported as retinylpalmitate in chylomicrons finally reaching systemic circulation. Thus, absorption and metabolism of the parent compound can be evaluated analyzing the levels of beta-carotene and retinylesters in chylomicrons after application of the provitamin. beta-Carotene cleavage is mediated by the enzyme beta-carotene-oxygenase (BCO) which is coded on the long arm of chromosome 16 and has been sequenced recently. A genetic polymorphism in the BCO affects the base at position 786 and has been assigned as SNP1 (single nucleotide polymorphism 1). It is characterized by the exchange of adenine against thymine (A→T) which finally results in a substitution of arginine 262 by serine in the functional protein. It is yet unknown if this amino acid exchange influences the activity of the enzyme in humans.

In the present study the genetic variant was determined in 15 subjects. According to the possible allele combination selected volunteers were assigned to the following study groups: group heterozygote AT (n=4), group homozygote AA (n=3), group homozygote TT (n=2). After application of a single dose of 2 mg beta-carotene blood was withdrawn between 2-8 h and the levels of beta-carotene and retinylpalmitate was determined in chylomicrons and serum. In chylomicrons C_{max} and AUC were highest in the group homozygote TT, lower in the group heterozygote AT and lowest in the group homozygote AA. The ratio AUC beta-carotene to AUC retinylpalmitate was about 2 in the groups homozygote TT und heterozygote AT but below 1 in the group homozygote AA. The present data suggest that BCO with the variant adenine at position 786 exhibits a higher enzymatic activity compared to the variant thymine 786. This polymorphism may influence the availability of vitamin from its precursor beta-carotene with impact on human retinol supply. Also the phenomenon of low and

high-responders whose beta-carotene chylomicron levels differentially increase after a comparable dose of the compound may be at least in part depend on variations regarding the polymorphism in the BCO.

2. Bioavailability of tocopherylphosphate

alpha-Tocopherylphosphate is distributed as a supplement in the United States and has also been determined as a derivative of vitamin E in plants. There is evidence the compound is also present in the human organism and that it is involved the regulation of cellular signaling. However, little is known with respect to its bioavailability, formation, and metabolism in humans.

In the present human study it was investigated whether the compound is directly available or generated endogenously from tocopherol. Further on, the bioavailability of tocopherol was estimated when tocopherylphosphate was used as a precursor.

The study shows that small amounts of tocopherylphosphate are already present in human blood. Baseline concentrations are between 0.2-2 $\mu\text{mol/L}$ serum and thus, significantly lower than alpha-tocopherol (20-40 $\mu\text{mol/L}$).

After a single dose of tocopherylphosphate (400 resp. 800 IU), the ester was not detectable in chylomicrons. However, the concentration of alpha-tocopherol increased in this lipoprotein. No change was measured in serum. Upon application of multiple doses of tocopherylphosphate (28 d; 800 IU/d), serum levels of the ester increased up to 18 $\mu\text{mol/L}$. This increase was paralleled by elevated levels of free alpha-tocopherol. To investigate whether tocopherylphosphate is formed endogenously via phosphorylation, alpha-tocopherol was given in multiple dosing (28 d; 800 IU/d) and serum levels of the phosphate ester and the parent compound were analyzed. Even after application of alpha-tocopherol, tocopherylphosphate was increased in serum. The bioavailability of tocopherol was higher when free tocopherol was given as compared to tocopherylphosphate as a source.

The data suggest that tocopherylphosphate is not (or poorly) absorbed intact. However, the ester is cleaved and the released tocopherol is taken up following the fat absorption pathway.

Tocopherylphosphate which is present in the human organism is likely formed by phosphorylation of tocopherol. This process is apparently affected by the amount

tocopherol available; there are likely interindividual differences regarding the efficacy of tocopherylphosphate generation.

3. Bioavailability of tocotrienols; effects on skin texture and function

Tocotrienols are members of the vitamin E family and are found in some dietary items in quite high amounts. In contrast to the tocopherols they carry three carbon-carbon double bonds in the phytyl side chain. They are efficient antioxidants but also exhibit regulatory effects on cellular signaling pathways. It has been shown that topically applied tocopherols improve skin properties and thus it was speculated that they may also reveal skin effects when orally applied.

After oral application of a mixture of different E vitamers (alpha-, gamma, delta-tocotrienol und alpha-tocopherol) over a period of 12 wk (129 mg/d) increasing levels of all single compounds were determined in human serum. Compared to baseline, alpha- and delta tocotrienol was increased 10-fold, levels of gamma-tocotrienol were elevated 20-fold. However, serum levels of alpha-tocopherol hardly rose. Skin density and skin thickness were improved during the study. Other parameters related to skin health such as moisture, transepidermal water loss, skin surface, capillary blood flow, sensitivity, or photoprotection were not affected. In contrast to other micronutrients like carotenoids, flavonoids or essential fatty acids vitamin E compounds are of limited value to improve skin conditions via oral application. According to the results of a single dose study, tocotrienols are more bioavailable when they are provided in lipophilic matrix.

Key words: micronutrients, vitamin E, beta-carotene

6. Literaturverzeichnis

- Akbaraly NT, Faure H, Gourlet V, Favier A, Berr C (2007) Plasma carotenoid levels and cognitive performance in an elderly population: results of the EVA Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62(3):308-16.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. New York: Garland Publishing.
- Biesalski HK, Grimm P (1999) , *Taschenatlas der Ernährung*, Thieme Stuttgart
- Biesalski HK, Köhrle J, Schümann K (2002) *Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe*. Thieme Stuttgart
- Borel P, Grolier P, Mekki N, Boirie Y, Rochette Y, Le Roy B, Alexandre-Gouabau MC, Lairon D, Azais-Braesco V (1998) Low and high responders to pharmacological doses of beta-carotene: proportion in the population, mechanisms involved and consequences on beta-carotene metabolism. *J Lipid Res* 39; 2250- 2260
- Borel P, Tyssandier NM, Grolier P, Rochette Y, Alexandre-Gouabau MC, Lairon D, Azais-Braesco V (1998) Chylomicron beta-carotene and retinyl-palmitate responses are dramatically diminished when men ingest beta-carotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides. *J Nut* 20; 001- 007
- Borel P, Berengere P, Armand M, Tyssandier V, Grolier P, Alexandre-Gouabau MC, Andre M, Senft M, Peyrot J, Jaussan V, Lairon D, Azais-Braesco V (2001) Processing of vitamin A and E in the human gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280; G95- G103
- Brigelius-Flohe R & Traber MG (1999) Vitamin E: function and metabolism. *Faseb J* 13; 1145-1155
- Brigelius-Flohé R (2006) Bioactivity of vitamin E. *Nutrition research reviews* 19; 174-186
- Bundesfachverband der Arzneimittelhersteller e.V (2005) *Der Arzneimittelmarkt in Deutschland in Zahlen 2004*. Bundesfachverband der Arzneimittelhersteller e.V Wissenschafts- und Wirtschaftsdienst, Bonn
- Bundesinstitut für Risikobewertung, verfügbar von www.bfr.bund.de
- Britton G (1995) Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J* 95; 1551-8

- Burton GW & Traber MG (1990) Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr* 10; 357-82
- Catenmiller JJM, West CE (1998) Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Ann Rev Nutr* 18: 19-38
- Cheeseman KH, Holley AE, Kelly FJ, Wasil M, Hughes L, Burton G (1995) Biokinetics in Humans of RRR- α -tocopherol: The free phenol, acetate ester, and succinate ester forms of vitamin E. *Free Rad Biol & Med* 5; 591-598
- Cohn W (1997) Bioavailability of vitamin E. *Eur J Clin Nutr* 51; 80-85
- Collette D, Thürmann PA (2002) Unerwünschte Arzneimittelwirkungen. *Dtsch Med Wochenschr* 127; 1025-1028
- DACH (2000) Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Umschau Braus 1. Auflage.
- Das S, Powell SR, Wang P, Divald A, Nesaretnam K, Tosaki A, Cordis GA, Maulik N, Dipak K (2005) Cardioprotection with palm tocotrienol: antioxidant activity of tocotrienol is linked with its ability to stabilize proteasomes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289; 361- 367
- Dereska NH, McLemore EC, Tessier DJ, Bash DS, Brophy CM (2006) Short-term, moderate dosage vitamin E supplementation may have no effect on platelet aggregation, coagulation profile, and bleeding time in healthy individuals. *J Surg Res* 132; 121- 129
- Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), Österreichische Gesellschaft für Ernährung (ÖGE), Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung (SVE), eds. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr: Vitamin E. Frankfurt am Main Umschau 2000
- Dimitrov NV, Meyer C, Ullrey DE, Chenoweth W, Michelakis A, Maloe W, Boone C, Fink G (1988): Bioavailability of beta-carotene in humans. *Am J Clin Nutr* 48; 298-304
- Dimitrov NV, Meyer C, Gilliland D, Ruppenthal M, Chenoweth W, Malone W (1991) Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E. *A J C N* 53; 723-729
- During A, Nagao A, Hoshino C, Terao J (1996) Assay of beta-carotene 15,15'-dioxygenase activity by reverse-phase high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem* 241; 199-205

- Duszka C, Grolier P, Azim EM, Alexandre-Gouabau MC, Borel P, Azais-Braesco V (1996) Rat intestinal beta-carotene dioxygenase activity is located primarily in the cytosol of mature jejunal enterocytes J Nutr 126; 2550-2556
- Eberlein-König B, Placzek M, Przybilla B (1998) Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d-alpha-tocopherol (vitamin E). J Am Acad Dermatol 38; 45-48
- Elmadfa I, Bosse W (1985) Vitamin E: Eigenschaften, Wirkungsweise und therapeutische Bedeutung. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Elmadfa I, Aign W, Muskat E, Fritzsche D (2004) Die große GU Nährwert Kalorien Tabelle, GU
- Esterbauer H, Puhl H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Rabl H (1991) Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. Ann Med 23; 573- 581
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidation modification of LDL. Free Radic Biol Med 13; 341-90
- Etminan M, Takkouche B, Caamano-Isorna F (2004) The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer. a meta-analysis of observational studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 13; 340-345
- Fidge NH, Smith FR, Goodman DS (1969) Vitamin A and carotenoids. The enzymic conversion of beta-carotene into retinal in hog intestinal mucosa. Biochem J 114; 689-694
- Fuchs J (1998) Potentials and limitations of the natural antioxidants RRR-alpha-tocopherol, L-ascorbic acid and beta-carotene in cutaneous photoprotection. Free Radic Biol Med. 25; 1006-1012
- Fuchs J, Weber S, Podda M, Groth N, Herrling T, Packer L, Kaufmann R (2003) HPLC Analysis of Vitamin E Isoforms in Human Epidermis: Correlation with Minimal Erythema Dose and Free Radical Scavenging Activity. Free Rad Biol & Med 34; 330- 336
- Gallo-Torres HE (1980) Absorption, transport and metabolism. In Machlin, L.J. (Ed.), Vitamin E: A Comprehensive Treatise. Marcel Dekker, New York, pp. 170-192
- Gärtner C (1997) Dissertation, Universität Potsdam
- Gianello R, Libinaki R, Azzi A, Gavin PD, Negis Y, Zingg JM, Holt P, Keah HH, Griffey A, Smallridge A, West SM & Ogru E (2005) Alpha-tocopheryl phosphate: a novel, natural form of vitamin E. Free Radic Biol Med 39; 970-976

- Giovanucci E (2002) A review of epidemiologic studies of tomatoes, lycopene, and prostate cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 94; 391-398
- Gisinger C, Jeremy J, Speiser P, Mikhailidis D, Dandona P, Schernthaner G (1988) Effect of vitamin E supplementation on platelet thromboxane A2 production in Type I diabetic patients *Diabetes* 37; 1260-1264
- Goodman DS, Huang HS (1965) Biosynthesis of Vitamin A with rat intestinal enzymes. *Science* 149; 879-880
- Goodman DS, Huang HS, Shiratori T (1966) Mechanism of the biosynthesis of vitamin A from beta-carotene. *J. Biol. Chem.* 241; 1929-1932
- Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Meyskens FL, Omenn GS, Valanis B, Williams LH Jr. (2004) The Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial: incidence of lung cancer and cardiovascular disease mortality during 6-year follow-up after stopping beta-carotene and retinol supplements. *J Nat Cancer Inst.* 23; 1743-50
- Grunert P (2005) *Nahrungsergänzungsmittel- eine Orientierungshilfe* Lüchow Verlag, Stuttgart
- Hahn A, Ströhle A, Wolters M (2005), *Ernährung. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH*
- Hathcock JN, Azzi A, Blumberg, J Bray, Dickinson A, Frei B, Jialal I, Johnston CS, Kelly FJ, Kraemer K, Packer L, Parthasarathy S, Sies H, Traber M (2005) Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *Am J Clin Nutr* 81; 736-745
- Hatam LJ, Kayden HJ (1979) A high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood. *Journal of Lipid Research* 20; 639- 645
- Heinrich U, Tronnier H, Stahl W, Bejot M, Maurette JM (2006) Antioxidant supplements improve parameters related to skin structure in humans. *Skin Pharmacol Physiol* 19(4); 224-31
- Heinrich U, Gärtner C, Wiebusch M, Eichler O, Sies H, Tronnier H, Stahl W
Supplementation of beta-Carotene or a similar amount of mixed carotenoids protects humans from UV-induced erythema. *J Nutr* 2003 133; 98-101
- Hessel S (2006) Dissertation, Universität Freiburg
- van Het Hof KH, West CE, Weststrate JA, Hautvast JG (2000) Dietary factors that affect the bioavailability of carotenoids. *J Nutr* 130; 503- 506

- Hosomi A, Arita M, Sato Y, Kiyose C, Ueda T, Igarashi O, Arai H, Inoue K (1997) Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett.* 409; 105-108
- Iskeda S, Niwa T, Yamashita K (1999) Selective uptake of dietary tocotrienols into rat skin. *J Nutr Sci Vitaminol* 46; 141- 143
- Isler O (1971) *Carotenoids* (Isler O, ed) Birkhäuser, Basel
- Jandak J, Steiner M, Richardson PD (1989) Alpha-Tocopherol, an effective inhibitor of platelet adhesion. *Blood* 73; 141-149
- Jeanes YM, Wendy LH, Ellard S, Lee E, Lodge JK (2004) The absorption of vitamin E is influenced by the amount of fat in meal and the food matrix *British Journal of nutrition* 92; 575-579
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LA (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31; 671-701
- Kappus H, Diplock AT (1992) Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report. *Free Rad Biol Med* 13; 54- 74
- Kästner W, Kappus H (1990) Sicherheit bei Einnahme von Vitamin E. *Toxikologische Aspekte und Verträglichkeit bei oraler Aufnahme. Veris* 2; 1-24
- Kayden HJ & Traber MG (1993) Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res* 34; 343- 358
- Khachik F, Spangler CJ, Smith JC Jr (1997) Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum, *Anal Chem* 69; 1873-1881
- Koch, Ritschel (1987) *Synopsis der Biopharmazie und Pharmakokinetik*, Ecomed, 92-94
- Leonard SW, Good CK, Gugger ET, Traber MG (2004) Vitamin E bioavailability from fortified breakfast cereal is greater than that from encapsulated supplements. *Am J Clin Nutr* 79; 86-92
- Libinaki R, Ogru E, Gianello R, Bolton L, Geytenbeek S (2006) Evaluation of the safety of mixed tocopheryl phosphates (MTP)-A formulation of a-tocopheryl phosphate plus a-di-tocopheryl phosphate. *Food Chem Toxicol* 44 916-932
- Lindqvist A, Andersson S (2002) Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-Monooxygenase. *J Biol Chem* 277; 23942-23948

- Lindsay DG, Astley SB (2002) European research on the functional effects of dietary antioxidants- EUROFEDA Mol Asp Med 23; 1-38
- Lodge JK (2005) Vitamin E bioavailability in humans. J Plant Physiol.162(7); 790-6
Review
- Mangels AR, Holden JM, Beecher GR, Forman MR, Lanza E (1993) Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytical data. J Am Diet Assoc. 1993;93; 284-96
- McArdle F, Rhodes LE, Parslew R, Jack CI, Friedmann PS, Jackson MJ (2002) UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: effects of oral vitamin C supplementation. Free Radic Biol Med 33; 1355-1362
- McDermott JH (2000) Antioxidant nutrients: current dietary recommendations and research update. J Am Pharm Assoc. 40; 785-799
- Mohr P (2006) Gesund durch Nahrungsergänzungsmittel- So wirkt die orthomolekulare Medizin 3. Auflage Jopp-Verlag Zürich
- Morrissey PA & Sheehy PJA (1999) Optimal nutrition: vitamin E. Proceedings of the nutrition society 58; 459-468
- Munteanu A, Zingg JM, Ogru E, Libinaki R, Gianello R, West S, Negis Y & Azzi A (2004) Modulation of cell proliferation and gene expression by alpha-tocopheryl phosphates: relevance to atherosclerosis and inflammation. Biochem Biophys Res Commun 318; 311-316
- Navazio F, Fioretti P (1955) Effeto Dell'Alfa-Tocoferolo-Fosfato Sul Tasso Plasmatico Dei Carotenii. Boll Soc Ital Biol Sper. 31(5); 552-4
- Nau H, Stahl W (2007) Vitamin A und Carotinoide. Handbuch der Lebensmitteltoxikologie Wiley-VCH Verlag Weinheim
- Negis Y, Zingg, JM Ogru, E, Gianello R, Libinaki R & Azzi A (2005) On the existence of cellular tocopheryl phosphate, its synthesis, degradation and cellular roles: a hypothesis. IUBMB Life 57, 23-25
- Negis Y, Nurgül A, Özer N, Ogru E, Libinaki R., Gianello R, Azzi A, Zingg JM (2006) The effect of tocopheryl phosphates on atherosclerosis progression in rabbits fed with a high cholesterol diet. Archives of Biochemistry and Biophysics (Article in press)
- NEM-Liste 2007, CD-ROM Nahrungsergänzungsmittel-Verzeichnis für Deutschland
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
- http://www.naturalproductsassoc.org/site/PageServer?pagename=rr_bg_tocphosphat

- Ogru E, Libinaki RG, West S, Munteanu A, Zingg JM, Azzi A (2003) Modulation of cell proliferation and gene expression by alpha-tocopheryl phosphates. *Ann N Y Acad Sci* 1031;405-411
- Olmedilla-Alonso B, Granado-Lorencio F, Blanco-Navarro I (2005) Carotenoids, retinol, and tocopherols in blood: comparability between serum and plasma (Li-heparin) values. *Clin Biochem* 38; 444-449
- Olson JA and Hayaishi O (1965) The enzymatic cleavage of beta-carotene into vitamin A by soluble enzymes of rat liver and intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54:1364-1370
- Olson JA (1994): Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in humans. *Pure Appl Chem* 66; 1011-6
- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Cherniack MG, Brodtkin CA, Hammar S Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial. *Journal of the national cancer institute* 88; 1550-1559
- Packer L, Hiramatsu M, Yoshikawa T (1995) Antioxidant food supplements in human health. Academic Press
- Paetau I, Khachik F, Brown ED, Beecher GR, Kramer TR, Chittams J, Clevidence BA (1998) Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentration of lycopene and related tomato carotenoids in humans. *Am J Clin Nutr* 68; 1187- 1195
- Parker RS (1996) Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J* 10; 542-51
- Parker RS (1997) Bioavailability of carotenoids. *Eur J Clin Nutr.* 51; 80-90
- Patel V, Khanna S, Sashwati R, Ezziddin O, Sen CK Natural vitamin E alpha-Tocotrienol: Retention in vital organs in response to long-term oral supplementation and withdrawal. *Free Radical Research* 40; 763-771
- Pathak MA (1982) Sunscreens: topical and systematic approaches for protection of human skin against harmful effects of solar radiation. *J Am Acad Dermatol* 7; 285-312
- Pelz R, Schmidt-Faber B, Hesecker P (1998) Die Carotinoidzufuhr in der nationalen Verzehrsstudie, *Z Ernährungswiss* 37; 319- 327

- Pirmohamed M, Park BK (2001) Genetic susceptibility to adverse drug reactions. *Trends Pharmacol Sci* 22: 298-305
- Pirmohamed M (2001) Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Br J Clin Pharmacol* 52; 345-347
- Podda M, Weber C, Traber MG, Packer, L (1996) Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinone. *Journal of lipid Research* 37; 893-901
- Radosavac D, Graf P, Polidori MC, Sies H, Stahl W (2002) Tocopherol metabolites 2,5,7,8-tetra-methyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (alpha-CEHC) and 2,7,8-trimethyl-2-(2'-carboxyethyl)-6-hydroxychroman (gamma-CEHC) in human serum after a single dose of natural vitamin E. *Eur J Nutr* 41; 119-124
- Rahmani B, Jampol LM, Feder RS (2003) Clinicopathologic reports, case reports, and small case series: peripheral pigmented corneal ring: a new finding in hypercarotenemia. *Arch Ophtalmol* 121; 403-407
- Reinert A, Rohrmann S, Becker N, Linseisen J (2007) Lifestyle and diet in people using dietary supplements. *Eur J Nutr* 46; 165-173
- Rauthalati M, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR, Huttunen JK, Heinonen OP (1997) Beta-Carotene did not work; aftermath of the ATBC study. *Cancer Lett* 114 (1-2); 235-236
- Roodenburg AJ, Leenen R, het Hof KH, Weststrate JA, Tijburg LB (2000) Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alpha-carotene, beta-carotene, and vitamin E in humans. *Am J Clin Nutr* 71; 1187- 1193
- Roxborough HE, Burton GW, Kelly FJ (2000) Inter- and intra-individual variation in plasma and red blood cell vitamin E after supplementation *Free Radic Res* 33; 437-445
- Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, Machlin LW (2001) *Handbook of Vitamins* CRC Press Third edition.
- Schaffer S, Müller WE, Eckert GP (2005) Tocotrienols: constitutional effects in aging and disease. *American Society for Nutritional Sciences* 22; 151- 154
- Sies H, Stahl W, Sundquist AR (1992) Antioxidant functions of vitamins. *Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. Ann N Y Acad Sci* 669; 7-20
- Sies H, Stahl W (1995) Vitamin E and C, beta-Carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 62; 1315S-1321S

- Sies H, Stahl W (2004) Nutritional protection against skin damage from sunlight, *Annu Rev Nutr* 24; 173- 200
- Scardi V, Boeri E (1956) Alcune proprietà dell`a-tocoferilfosfato e dell`a-tocoferolo Istituto di fisiologia umana dell`università di Napoli, 57-63
- Stahl W, van den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, Gärtner C, Haenen G, Hollmann P, Holst B, Kelly FJ, Polidori M-C, Rice-Evans C, Southon S, van Vliet T, Vina-Ribes J, Williamson G, Astley S (2002) Bioavailability and metabolism. *Molecular aspects of medicine* 23; 39-100
- Stahl W, Heinrich U, Aust O, Tronnier H, Sies H (2005) Lycopene rich products and dietary photoprotection. *Photochem Photobiol Sci* 5(2); 238-42
- Stahl W, Sies H (2005) Bioactivity and protective effects of natural carotenoids *Biochim Biophys Acta*. 1740(2); 101-7
- Stahl W, Heinrich U, Jungmann H, Sies H, Tronnier H (2000) Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am J Clin Nutr*. 71(3); 795-8
- Stahl W, Nicolai S, Briviba K, Hanusch M, Broszeit G, Peters M, Martin HD, Sies H (1997): Biological activities of natural and synthetic carotenoids: Induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. *Carcinogenesis* 18; 89-92
- Steijns LSW, van der Weide J (1998) Ultrarapid drug metabolism: PCR based detection of CYP2D6 gene duplication. *Clin Chem* 44: 914- 917
- Steiner M (1991) Influence of Vitamin E on platelet function in humans. *Journal of the American College of Nutrition* 10; 466-473
- Subczynski WK, Markowska E, Gruzcecki WI, Siewewiesiuk, J (1992) Effects of polar carotenoids on dimyristoylphosphatidyl choline membranes: a spin-label-study. *Biochim Biophys Acta* 1105; 97-108
- Terpstra AHM, Woodward CJH, Sanchez-Muniz FJ (1981) Improved techniques for the separation of serum lipoproteins by density gradient ultracentrifugation: Visualizing by prestaining and rapid separation of serum lipoproteins from small volumes of serum. *Anal Biochem* 111; 149-57
- Terpstra AHM (1985) Isolation of serum chylomicrons prior to density gradient ultracentrifugation of other serum lipoprotein classes. *Anal Biochem* 150; 221-227

- The Alpha-Tocopherol and Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group (1994) The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence on lung cancers in male smokers. *N Engl J Med* 330 (15); 1029-1035
- Touvier, M, Kesse, E, Clavel-Chapelon, F, Boutron-Ruault, M-C (2005) Dual Association of beta-Carotene with risk of Tobacco-related cancers in a cohort of french women. *Journal of the national cancer institute* 97; 1338-1344
- Traber, MG, Ramakrishnan, R, Kayden, HJ (1994) Human plasma vitamin E kinetics demonstrate rapid recycling of plasma RRR- α -tocopherol *Proc Nat Acad Sci* 91; 10005-10008
- Traber MG, Sies H (1996) Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annu Rev Nutr* 16; 321- 347
- Traber MG, Rader D, Acuff RV, Ramakrishnan R, Brewer BH, Kayden HJ (1998) Vitamin E dose-response studies in humans with use of deuterated RRR- α -tocopherol *Am J Clin Nutr* 68; 847-853
- Traber MG, Arai H (1999) Molecular mechanism of vitamin E transport. *Annu Rev Nutr* 19; 343-355
- Traber MG, Ingold KU, Burton GW, Kayden HJ (1988) Absorption and transport of deuterium-substituted 2R,4'R,8'R- α -tocopherol in human lipoproteins *Lipids* 23; 791-797
- Tronnier H, Wiebusch M, Heinrich U, Stute R (1999) Surface evaluating of living skin. *Adv Exp Med Biol* 455; 507-516
- Unlu NZ, Bohn T, Francis D, Clinton SK, Schwartz SJ (2007) Carotenoid absorption in humans consuming tomato sauces obtained from tangerine or high -beta-carotene varieties of tomatoes. *J Agric Food Chem* 55; 597-603
- van Vliet T (1996) Absorption of beta-carotene and other carotenoids in humans and animal models. *Eur J Clin Nutr* 50; S32-37
- von Lintig J and Vogt K. (2000) Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. *J Biol Chem* 275:11915-11920.
- von Lintig J, Dreher A, Kiefer C, Wernet MF and Vogt K. (2001) Analysis of the blind *Drosophila* mutant ninaB identifies the gene encoding the key enzyme for vitamin A formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 98:1130-1135
- Weber SU, Thiele JJ, Han N, Luu C , Valacchi G, Weber S, Packer L (2002) Topical alpha-Tocotrienol supplementation inhibits lipid peroxidation but fails to

- mitigate increased transepidermal water loss after benzoyl peroxide treatment of human skin. *Free Radical Biology & Medicine* 34; 170- 176
- Wefers H, Sies H (1988) The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur J Biochem* 174; 353-357
- Werninghaus, K, Meydani, M, Bhawan, J, Margolis, R, Blumberg, JB, Glichrest, BA (1994) Evaluation of the photoprotective effect of oral vitamin E supplementation. *Arch. Dermatol* 130; 1257-61
- Westrate JA, Van het Hof KH (1995) Sucrose polyester and plasma carotenoid concentrations in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 62; 591-597
- Wallat S (1986) Zur biologischen Wirksamkeit von Vitamin E. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*. 88; 485-490
- World Health Organization. *The world health report 2002: Reducing risks, promoting life*, Genf, Schweiz
- Xie HG, Kim RB, Wood AJJ, Stein M (2001) Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41; 815-850.
- Yap SP, Julianto T, Wong JW, Yuen KH (1999) Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocotrienols in human plasma. *J Chr* 735; 279-283
- Yap SP, Yuen KH, Wong JW (2000) Pharmacokinetics and bioavailability of alpha-, gamma- und delta-tocotrienols under different food status. *J P P* 53; 67- 71
- Yap SP, Yuen KH (2004) Influence of lipolysis and droplet size on tocotrienol absorption from self-emulsifying formulations. *I J Pharm* 281; 67-78
- Zimmermann R, Stein A, Qaim M (2004) Agrartechnologie zur Bekämpfung von Mikronährstoffmangel? Ein gesundheitsökonomischer Bewertungsansatz. *Agrarwirtschaft* 53; 67- 76

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Wilhelm Stahl danken, der mir viel Geduld und Vertrauen entgegengebracht und mich in schwierigen Situationen mit seiner Diskussionsbereitschaft und seinen wertvollen Ratschlägen zum Weitermachen motiviert hat. Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Sies, für vielfältige Anregungen und die Überlassung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut. Herrn Professor Dr. Andreas Hahn spreche ich meinen besonderen Dank aus, für die Übernahme des Gutachtens und seiner unkomplizierten und hilfreichen Unterstützung meines Promotionsverfahrens an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover.

Weiterhin bedanke ich mich bei meiner Arbeitsgruppe, besonders bei Silke De Spirt und Tanja Wagener für das Korrekturlesen, die chemischen Ratschläge, das rege Interesse und die lustige Unterhaltung. Bei Heide Krahl und Dr. Maria Cristina Polidori bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung während der Humanstudien und der Anfangszeit im Labor.

Selbstverständlich danke ich auch allen meinen Probanden, ohne deren Mitwirkung eine erfolgreiche Durchführung der Studien nicht zustande gekommen wäre.

Auch meinen Freunden, besonders Julia Zoch, Tobias Bog und Sophia Frischholz möchte ich für Ihr Zuhören und die moralische Unterstützung danken.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie für Ihr Vertrauen und den bedingungslosen Rückhalt, den ich immer wieder bei Ihr finden kann.

Lebenslauf

Angaben zur Person

| | | | |
|----------|------------------------------------|----------------|---------------------|
| Adresse: | Kölnerstr. 359 40227 Düsseldorf | Geburtsdatum: | 09. Februar 1979 |
| | | Geburtsort: | Bremen |
| Telefon: | 0163/2 57 46 26 | Nationalität: | Deutsch |
| Email: | AnneKiene@t-online.de | Familienstand: | ledig, keine Kinder |

Hochschulausbildung

- 04/2006** **MBA, Teilzeit**
Fachhochschule Koblenz
- 06/2005-09/2007** **Doktorarbeit**
Universität Düsseldorf, Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Organisation, Betreuung und Durchführung von Humanstudien mit
Mikronährstoffen
Titel der Arbeit: Bioverfügbarkeit und Metabolismus von beta-
Carotin und ausgewählten Vitamin E-Verbindungen
- 08/2004–05/2005** **Diplomarbeit**
Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, Schweiz
Unterstützt durch ein Stipendium vom DAAD (Deutscher
Akademischer Austauschdienst) und der ETH.
Experimentelle Arbeit: Fortification of staple foods with multiple
nutrients including vitamin A
- 10/1999-07/2004** **Studium der Oecotrophologie**
Rheinische Friedrich Wilhelm Universität Bonn, Deutschland
Universidad de Barcelona, Spanien
Universidad de Monterrey, Mexiko
- 07/1995– 07/1998** **Abitur**
Gymnasium Lehrte, Deutschland

Berufliche Erfahrung

- 08/2005-08/2007** **Leitung von Ernährungsseminaren und Einzelberatung**
Reha-Klinik Leverkusen und IKK Nordrhein
Seminarleitung von allgemeinen Ernährungsaufklärungskursen, Fit-Kids, Gewichtsreduktionskursen und Einzelberatung im Präventivbereich
- 06/2005-09/2007** **Wissenschaftliche Angestellte**
Universität Düsseldorf, Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
Organisation und Betreuung von Humanstudien mit Mikronährstoffen;
Beinhaltete das Entwerfen und Stellen der Anträge an die Ethikkommission, Auswahl des Studiendesigns, Probandensuche und Betreuung, Analytik der Proben, wissenschaftliche Ausarbeitung dieser, Präsentation und Veröffentlichung der Ergebnisse
- 02/2003-05/2003** **Universität Barcelona, Institut für Lebensmittelmikrobiologie, Spanien**
Charakterisierung von grampositiven Bakterien isoliert aus Weinproben
- 02/2001-03/2001** **ETH Zürich, Institut für Lebensmittelwissenschaften, Schweiz**
Praktikum im Team zur Entwicklung der "Schweizerischen Nährwertdatenbank"
- 07/1999– 09/1999** **Seminarbetrieb UGB Gesundheitsförderung Hannover, Deutschland**
Praktikum im Bereich der Ernährungsberatung
Literaturrecherche, Vorbereiten Seminaren, Präsentationsübungen
- 09/1998– 04/1999** **Freiwilliges Soziales Jahr, Psychiatrisches Klinikum Warendorff**

Sprachkenntnisse

| | |
|-------------|--------------------|
| Spanisch | verhandlungssicher |
| Englisch | verhandlungssicher |
| Französisch | Grundkenntnisse |

EDV-Kenntnisse

| | |
|------------------------|----------------------|
| Microsoft Office Paket | sehr gute Kenntnisse |
|------------------------|----------------------|

Hobbys und Interessen

Teilnahme an Konversationskursen in Spanisch und Englisch
Individuelle Reisen und „Work Camps“ (Thailand, Brasilien, Mexiko, Malaysia, Russland, Kuba, USA, Südafrika, Argentinien, Uruguay, Chile, China, Mauritius, etc.)
Leitung von Freizeitunternehmungen mit Patienten aus einem psychiatrischen Klinikum
Skifahren, Laufen, Kochen