

**Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und antioxidativen
Kapazität von Flavonoiden aus Rooiboszubereitungen
nach einmaliger Applikation**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Berufspäd. Till Breiter
geboren am 17.04.1984 in Hannover

2012

Referent: Prof. Dr. Andreas Hahn

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Engelhardt

Tag der Promotion: 17.02.2012

Die Studien wurden im Rahmen des FEI/AIF-geförderten Projektes „Flavonoide in ausgewählten Kräutertees – Bestimmung, Nutrikinetik, Veränderungen bei Extraktion und Lagerung“ (AiF 15303 N), in Kooperation mit dem Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Braunschweig, durchgeführt.

Kurzzusammenfassung

Hintergrund

Rooibostee konnte sich in Deutschland in den letzten Jahren als feste Verbrauchsgröße im Segment der Monoteesorten etablieren. Wertgebende Inhaltsstoffe des Rooibos und seiner wässrigen Extrakte sind die Flavonoide. Ihnen werden im wissenschaftlichen Diskurs gesundheitserhaltende und -fördernde Eigenschaften attestiert, wobei insbesondere ihre antioxidative Wirkung im Vordergrund steht. Im Vergleich zu Flavonoiden aus anderen Tees sind die Rooibosflavonoide bisher nur unzureichend untersucht.

Studienvorhaben

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Daten über die Biokinetik und die antioxidative Wirkung oral applizierter Rooibosflavonoide zu gewinnen. Dazu wurden im Rahmen einer plazebokontrollierten Humanstudie vor und nach einmaliger oraler Applikation verschiedenartiger Rooibosteeprodukte Blutproben entnommen und mittels des ORAC- und FRAP-Assays auf ihre antioxidative Kapazität untersucht. Zudem wurde zu ausgewählten Entnahmezeitpunkten die Plasmakonzentration absorbierter Flavonoide bestimmt, um Informationen über ihre Bioverfügbarkeit zu gewinnen. Während des gesamten Interventionszeitraums waren die Probanden angehalten, flavonoid- und antioxidantienreiche Lebensmittel zu meiden. An den Untersuchungstagen wurde eine kohlenhydratreiche und ebenfalls flavonoid- und antioxidantienarme Studienernährung gereicht, um eine unerwünschte Beeinflussung der antioxidativen Kapazität durch nutritive Antioxidantien zu vermeiden. Parallel zu den Humanuntersuchungen wurde in verschiedenen In-vitro-Versuchen das antioxidative Potenzial von Rooibosflavonoiden in Reinform sowie in einem Gemisch mit Serum erfasst. Hierdurch sollten methodische Limitierungen und physiologische Störgrößen, die eine Messung der antioxidativen Kapazität erschweren bzw. die antioxidative Wirkung absorbierter Flavonoide einschränken, ermittelt werden.

Ergebnisse

Die Bioverfügbarkeit der Rooibosflavonoide war äußerst gering und quantifizierbare Mengen akkumulierten darüber hinaus nur in den Blutproben weniger Probanden. Nach Aufnahme der Rooibosprüfprodukte und der Plazebos war eine Abnahme der antioxidativen Kapazität messbar, die im Gruppenvergleich zu keinem der Entnahmezeitpunkte einen signifikanten Unterschied aufwies. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den parallel durchgeführten In-vitro-Versuchen, in denen die antioxidative Kapazität der Rooibosflavonoide sowohl in Reinform als auch in Mischung mit Serum bestätigt werden konnte. Die antioxidative Kapazität von Flavonoiden und Serum war jedoch nicht additiv, sondern wurde durch Maskierungseffekte limitiert.

Fazit

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen zeigen, dass die Rooibosflavonoide keinen Anstieg der antioxidativen Kapazität des Blutes induzieren konnten, obwohl ihr antioxidatives Potential in vitro bestätigt wurde. Diese Diskrepanz lässt sich in erster Linie über die geringe Bioverfügbarkeit der Rooibosflavonoide erklären. Der Abfall der antioxidativen Kapazität wurde vermutlich durch prooxidative Effekte, die von der an jedem Untersuchungstag applizierten Studienernährung ausgingen, verursacht. Die strikten Ernährungsvorgaben, denen die Probanden während des gesamten Interventionszeitraumes unterlagen und, in deren Folge die Zufuhr exogener Antioxidantien eingeschränkt war, können die Etablierung dieser Effekte begünstigt haben.

Schlagnworte: Rooibostee, Flavonoide, antioxidative Kapazität, Bioverfügbarkeit

Abstract

Background

Rooibos tea has become an established consumer good in the segment of tea brands in Germany in the last few years. Flavonoids are the most important ingredients of rooibos and its aqueous extracts. In the scientific discourse flavonoids are considered as health maintaining and promoting substances due to their antioxidant activity, which is regarded as the most important property. In comparison with flavonoids from other popular types of tea - such as green or black tea – little is known about flavonoids from rooibos tea.

Objective

The aim of this thesis was to investigate the biokinetic and antioxidant potential of oral administered rooibos flavonoids. For this purpose a placebo-controlled human study was conducted. Blood samples were taken before and after the consumption of different rooibos tea products and tested for their antioxidant capacity using the ORAC- and the FRAP-Assay. Furthermore, the concentration of rooibos flavonoids was measured in selected blood samples to investigate their bioavailability. The volunteers were advised to avoid foods and beverages rich in flavonoids and antioxidants throughout the intervention period. During the intervention days, volunteers were provided with defined study meals (rich in carbohydrates, low in flavonoids and antioxidants) to avoid undesirable side effects potentially affecting the measurement of antioxidant capacity. In parallel to the human study, a series of in vitro experiments were performed, measuring the antioxidant potential of rooibos flavonoids in pure form and in mixture with serum. Hereby, methodological limitations and physiological confounding variables complicating the measurement of antioxidant capacity and limiting the antioxidant activity of absorbed flavonoids should be determined.

Results

The bioavailability of rooibos flavonoids was low. Detectable amounts were only traceable in the blood samples of a few volunteers. Surprisingly, the consumption of both the verum and placebo preparations was associated with a loss of antioxidant capacity. There were no significant differences in the antioxidant capacity between the treatment groups at any time-point. These results are in contrast to the in vitro experiments verifying the antioxidant potential of flavonoids in pure form or in mixture with serum. Furthermore, it was shown that the antioxidant capacity of flavonoids and serum present in mixture was not additive but rather limited by masking effects.

Conclusion

The results of this study show that the flavonoids from rooibos tea could not induce an increase in the antioxidant capacity of blood although their antioxidant potential was demonstrated in vitro. This discrepancy may be explained by the low bioavailability of flavonoids. The loss of antioxidant capacity was possibly induced by pro-oxidant effects mediated by the study meals given on each study day. The strict dietary regime the volunteers were avoided to follow throughout the study, maybe resulted in a poor supply of exogenous antioxidants, thereby facilitating the establishment of these pro-oxidant effects.

Key Words: rooibos tea, flavonoids, antioxidant capacity, bioavailability

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Literatur	2
2.1	Rooibos	2
2.2	Flavonoide	2
2.2.1	Strukturklassen	5
2.2.2	Flavonoide des Rooibos	8
2.3	Zufuhr und Bioverfügbarkeit	10
2.3.1	Flavonoid-O-Glykoside / Aglykone	10
2.3.2	Bioverfügbarkeit von Flavonoid-C-Glykosiden aus Rooibos	12
2.4	Absorption und Metabolismus	14
2.4.1	Dünndarm	16
2.4.1.1	Flavonoid-O-Glykoside/Aglykone	16
2.4.1.2	Absorption der Flavonoid-C-Glykoside aus Rooibos	16
2.4.2	Dickdarm	17
2.4.2.1	Flavonoid-O-Glykoside / Aglykone im Dickdarm	17
2.4.2.2	Flavonoid-C-Glykoside im Dickdarm	20
2.4.3	Postabsorptiver Metabolismus	21
2.4.3.1	Flavonoid-O-Glykoside/Aglykone	21
2.4.3.2	Flavonoid-C-Glykoside	24
2.4.4	Exkretion der Flavonoide	25
2.4.4.1	Flavonoid-O-Glykoside/Aglykone	25
2.4.4.2	Flavonoid-C-Glykoside	26
2.4.5	Zusammenfassende Betrachtung des Flavonoidstoffwechsels	26
2.5	Antioxidative Wirkung der Flavonoide	27
2.5.1	Antioxidative Testsysteme	29
2.5.1.1	TEAC/ABTS	31
2.5.1.2	DPPH-Assay	32
2.5.1.3	FRAP	33
2.5.1.4	ORAC	34
2.5.2	Struktur-Aktivitätsbeziehungen	36

2.5.3	Antioxidative Wirkung von Rooibosflavonoiden	39
2.5.3.1	Antioxidative Kapazität von Rooibosflavonoiden in vitro	40
2.5.3.2	Antioxidative Wirkung von Rooibosflavonoiden in vivo	42
3	Material und Methoden	45
3.1	Allgemeines	45
3.2	Versuchsreihe I – Humanstudie	46
3.2.1	Studiendesign.....	46
3.2.2	Studienkollektiv.....	47
3.2.3	Studienablauf.....	48
3.2.4	Prüfprodukte	49
3.2.4.1	Untersuchungsserie I.I	50
3.2.4.2	Untersuchungsserie I.II	51
3.2.5	Analyse des Flavonoidprofils	52
3.2.5.1	Plasmaproben.....	53
3.2.5.2	Urinproben	55
3.2.6	Analyse biochemischer Parameter und der antioxidativen Kapazität	55
3.2.6.1	Biochemische Parameter	56
3.2.6.2	Antioxidative Kapazität	56
3.2.6.2.1	ORAC	57
3.2.6.2.2	FRAP	58
3.2.6.2.3	Berechnung der antioxidativen Gesamtkapazität	58
3.2.7	Statistische Verfahren.....	59
3.3	Versuchsreihe II - In-vitro-Studien.....	60
3.3.1.1	Untersuchungsserie II.I	60
3.3.1.2	Untersuchungsserie II.II	60
3.3.1.3	Untersuchungsserie II.III	61
4	Ergebnisse	62
4.1	Versuchsreihe I – Humanstudie	62
4.1.1	Studienkollektiv.....	62
4.1.2	Bioverfügbarkeit.....	64
4.1.3	Bioverfügbarkeit Untersuchungsserie I.I.....	64
4.1.4	Bioverfügbarkeit Untersuchungsserie I.II.....	68

4.1.5	Antioxidatives Potenzial.....	72
4.1.5.1	ORAC	72
4.1.5.1.1	Untersuchungsserie I.I	72
4.1.5.1.2	Untersuchungsserie I.II	76
4.1.5.2	FRAP	81
4.1.5.2.1	Untersuchungsserie I.I	81
4.1.5.2.2	Untersuchungsserie I.II	85
4.1.6	Zusammenfassung der Messergebnisse zur antioxidativen Kapazität ..	89
4.1.6.1	ORAC	89
4.1.6.2	FRAP	90
4.2	Versuchsreihe II - In vitro-Studien	90
4.2.1	Untersuchungsserien II.I / II.II.....	91
4.2.2	Versuchsreihe II.III.....	91
5	Diskussion	93
5.1	Versuchsreihe I – Humanstudie	94
5.1.1	Studiendesign.....	94
5.1.2	Ergebnisse Humanuntersuchungen /biokinetische Parameter	96
5.1.3	Diskussion der Studienergebnisse unter Berücksichtigung vergleichbarer Humanuntersuchungen	96
5.1.3.1	Studienergebnisse zur Bioverfügbarkeit	97
5.1.3.2	Studienergebnisse zur antioxidativen Kapazität	99
5.1.3.3	Methodische Limitationen.....	106
6	Zusammenfassung und Fazit	108
7	Literaturverzeichnis	110
8	Anhang	127

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur des 2-Phenyl-Chromans (Flavan) als Grundgerüst der Flavonoide....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Biogenese der Flavonoide [CROZIER ET AL. 2006]	4
Abbildung 3: Struktur der Dihydrochalkone im Vergleich zu dem 2-Phenyl-Chroman (Flavan)	5
Abbildung 4: Struktur der Flavonolaglykone Quercetin und Kaempferol.....	7
Abbildung 5: Struktur des Flavonoid-O-Glykosids Quercitrin.....	7
Abbildung 6: Struktur des Flavonoid-C-Glykosids Isovitexin	8
Abbildung 7: Struktur des Aspalathins und Nothofagins.....	9
Abbildung 8: Spaltung von Naringenin zu Phloroglucinol und 4-Hydroxyphenylpropionsäure durch die Dickdarmflora [POSSEMIERS ET AL. 2011].....	18
Abbildung 9: Phenylpropionsäuren als Spaltprodukte der Flavonoiden im Dickdarm	19
Abbildung 10: Phenylelessigsäuren als Spaltprodukte der Flavonoide im Dickdarm.....	19
Abbildung 11: Gastrointestinaler Metabolismus von Isovitexin [ZHANG ET AL. 2007A].....	20
Abbildung 12: Gastrointestinaler Metabolismus von Homoorientin [ZHANG ET AL. 2007A] ...	21
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Flavonoidmetabolismus der Flavonoid-O-Glykoside im Dünndarm	22
Abbildung 14: Propagierter In-vivo-Metabolismus der Flavonoide [nach SPENCER UND RICE-EVANS 2003, RICE-EVANS ET AL. 2000]	27
Abbildung 15: Hydrogen Atom Transfer (HAT).....	28
Abbildung 16: Single Electron Transfer followed by Proton Transfer (SET-PT).....	29
Abbildung 17: Reaktionsprinzip kompetitiver Messmethoden [MAGALHÃES et al. 2008].....	30
Abbildung 18: Reaktionsprinzip nicht-kompetitiver Messmethoden [MAGALHÃES ET AL. 2008]	30
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Reaktionsprinzips des ORAC-Assays [nach MAGALHÃES ET AL. 2008]	35
Abbildung 20: Phenoxyradikalstabilisierung über intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung [AMIC ET AL. 2007].....	37
Abbildung 21: Bildung eines stabilen Quinons nach weiterem Radikalangriff [AMIC ET AL. 2007]	37
Abbildung 22: Antioxidativ wirksame Hydroxygruppen des Aspalathins und des Nothofagins	40
Abbildung 23: 2,4,6-Trihydroxyacetophenon.....	40
Abbildung 24: Studienablauf	48
Abbildung 25: HPLC-MS/MS-Analyse (EIC) des 3 h-Plasmas eines Probanden nach Gabe von 500 mL Rooibostee	54

Abbildung 26: Veränderung der antioxidativen Kapazität (ORAC) nach Aufnahme der Prüf- produkte der Untersuchungsserie I.I, n = 10	74
Abbildung 27: Veränderung der antioxidativen Kapazität nach Aufnahme des frischen und gelagerten Fertiggetränks sowie des Plazebos, n = 12	79
Abbildung 28: Veränderung der antioxidativen Kapazität nach Aufnahme des Rooibostees, der isolierten aktiven Fraktion und des Plazebos, n = 10	83
Abbildung 29: Veränderung der antioxidativen Kapazität nach Aufnahme des frischen und gelagerten Fertiggetränks sowie des Plazebos, n=12.....	87
Abbildung 30: Konzentrationsabhängige antioxidative Kapazität (ORAC) von reinem Rooibostee und von mit Rooibostee versetztem Serum, n = 6.....	91
Abbildung 31: Antioxidative Kapazität von Rooibostee, Serum sowie einem Gemisch aus Serum und Rooibostee, n = 5	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Strukturklassen und Nahrungsquellen von Flavonoiden [CROZIER ET AL. 2009, VEITCH UND GRAYER 2008, CROZIER ET AL. 2006, MANACH ET AL. 2004, BEECHER 2003, ROSS UND KASUM 2002, HOLLMAN UND ARTS 2000, TOMÁS-BARBERÁN UND CLIFFORD 2000, BOHM 1998, BRAVO 1998].....	6
Tabelle 2: Flavonoidgehalt von wässrigen Extrakten aus unfermentierten und fermentierten Rooibos [BRAMATI ET AL. 2003, BRAMATI ET AL. 2002].....	8
Tabelle 3: Nach oraler Applikation von Rooibosprodukten im Urin detektierte Metabolite des Aspalathins	25
Tabelle 4: Antioxidative Testsysteme.....	31
Tabelle 5: Antioxidative Aktivität von Rooibosflavonoiden [KRAFczyk ET AL. 2009, SINJMAN ET AL. 2009, JOUBERT ET AL. 2004].....	41
Tabelle 6: Untersuchungen zur antioxidativen Kapazität von wässrigen Extrakten von Aspalathus Linearis und Camellia Sinensis [JOUBERT ET AL. 2008, VON GADOW ET AL. 1997A].....	42
Tabelle 7: Durchgeführte Versuchsreihen zur Erfassung der Bioverfügbarkeit und antioxidativen Kapazität von Rooibosflavonoiden.....	45
Tabelle 8: Übersicht der Studienphasen, des Studiendesigns und der verabreichten Prüfprodukte	46
Tabelle 9: Verteilung der Prüfprodukte im Cross-over-Design.....	47
Tabelle 10: Exemplarische Darstellung eines Untersuchungstages	49
Tabelle 11: Flavonoidprofil des Rooibostees (n = 12)	50
Tabelle 12: Flavonoidprofil der isolierten aktiven Rooibosfraktion (n = 2).....	51
Tabelle 13: Flavonoidprofil des frischen und gelagerten Fertiggetränks (n = 2).....	52
Tabelle 14: Analyseverfahren der LADR zur Bestimmung der Leber- und Lipidwerte sowie der Harnsäure	56
Tabelle 15: Anthropometrische Daten des Kollektive beider Untersuchungsreihen, Mittelwerte \pm SD (Min.-Max.).....	62
Tabelle 16: Nüchternserumkonzentration von Triacylglyceriden, LDL- und HDL-Cholesterols der Studienkollektive der Versuchsreihe I, Mittelwerte \pm SD (Min.-Max.)	63
Tabelle 17: Leberwerte der Studienkollektive der Versuchsreihe I, Mittelwerte \pm SD (Min.-Max.).....	63
Tabelle 18: Konzentration der Rooibosflavonoide im Plasma nach Gabe des Rooibostees und der isolierten aktiven Fraktion zu den Entnahmezeitpunkten 1.5 und 3 h, Median (Min.-Max.), n = 8	65

Tabelle 19: Individuelle und mittlere Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) der Substanzen Isoorientin, Orientin, Aspalathin und Nothofagin im Plasma zu den Entnahmezeitpunkten 1.5 und 3 h.....	66
Tabelle 20: Prozentualer Anteil der aus den Prüfprodukten in die Plasmaproben übergegangen Aspalathinmenge für ausgewählte Probanden und im Mittel.....	67
Tabelle 21: Menge (μmol) des Aspalathins und seiner Metabolite im Urin nach Gabe des Rooibostees und der isolierten aktiven Fraktion, n = 9	68
Tabelle 22: Konzentration der Rooibosflavonoide im Plasma nach Gabe des frischen und gelagerten Fertiggetränks zu den Entnahmezeitpunkten 0.5, 1.5 und 3 h, Median (Min.-Max.), n = 9.....	69
Tabelle 23: Individuelle und mittlere Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) der Substanzen Isoorientin, Orientin, Aspalathin und Nothofagin im Plasma zu den Entnahmezeitpunkten 1.5 und 3 h.....	70
Tabelle 24: Prozentualer Anteil der aus den Prüfprodukten in die Plasmaproben übergegangen Aspalathinmenge für ausgewählte Probanden und im Mittel.....	71
Tabelle 25: Menge (μmol) des Aspalathins und seiner Metabolite im Urin nach Gabe des frischen und gelagerten Fertiggetränks, n = 4	72
Tabelle 26: Antioxidative Kapazität (ORAC) vor und nach Aufnahme des Placebos, n = 10.....	73
Tabelle 27: Antioxidative Kapazität (ORAC) vor und nach Aufnahme des Rooibostees, n = 10.....	73
Tabelle 28: Antioxidative Kapazität (ORAC) vor und nach Aufnahme der verschiedenen Prüfprodukte im Gruppenvergleich, n = 10.....	74
Tabelle 29: Korrelation zwischen der antioxidativen Kapazität (ORAC) und dem Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 30	75
Tabelle 30: Korrelation zwischen der um die Nüchternwerte bereinigten antioxidativen Kapazität (ORAC) und dem um die Nüchternwerte bereinigten Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 30.....	76
Tabelle 31: Mittlere nüchternwertbereinigte antioxidative Kapazität (ORAC) und mittlere Aspalathinkonzentration von Blutproben der Entnahmezeitpunkte 1.5 und 3 h...	76
Tabelle 32: Antioxidative Kapazität (ORAC) der Serumproben vor und nach Aufnahme des Placebos, n = 12	77
Tabelle 33: Antioxidative Kapazität (ORAC) der Serumproben vor und nach Aufnahme des frischen Fertiggetränks, n = 12.....	77
Tabelle 34: Antioxidative Kapazität (ORAC) der Serumproben vor und nach Aufnahme der Prüfprodukte im Gruppenvergleich, n = 12.....	78

Tabelle 35: Korrelation zwischen der antioxidativen Kapazität (ORAC) und dem Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 36.....	79
Tabelle 36: Korrelation zwischen der um die Nüchternwerte bereinigten antioxidativen Kapazität (ORAC) und dem um die Nüchternwerte bereinigten Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 36.....	80
Tabelle 37: Mittlere nüchternwertbereinigte antioxidative Kapazität (ORAC) und mittlere Aspalathinkonzentration von Blutproben der Entnahmezeitpunkte 0.5, 1.5 und 3 h	80
Tabelle 38: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme des Placebos, n = 10	81
Tabelle 39: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme des Rooibostees, n = 10	82
Tabelle 40: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme der isolierten der verschiedenen Prüfprodukte im Gruppenvergleich, n = 10.....	82
Tabelle 41: Korrelation zwischen der antioxidativen Kapazität (FRAP) und dem Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 30.....	84
Tabelle 42: Korrelation zwischen der um die Nüchternwerte bereinigten antioxidativen Kapazität (FRAP) und dem um die Nüchternwerte bereinigten Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 30.....	84
Tabelle 43: Mittlere nüchternwertbereinigte antioxidative Kapazität (FRAP) und mittlere Aspalathinkonzentration von Blutproben der Entnahmezeitpunkte 1.5 und 3 h... 85	
Tabelle 44: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme des Placebos, n = 12	85
Tabelle 45: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme des frischen Fertiggetränks, n = 12.....	86
Tabelle 46: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme der verschiedenen Prüfprodukte, n = 12.....	86
Tabelle 47: Korrelation zwischen der antioxidativen Kapazität (FRAP) und dem Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 36.....	88
Tabelle 48: Korrelation zwischen der um die Nüchternwerte bereinigten antioxidativen Kapazität (FRAP) und dem um die Nüchternwerte bereinigten Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 36.....	88
Tabelle 49: Mittlere nüchternwertbereinigte antioxidative Kapazität (FRAP) und mittlere Aspalathinkonzentration von Blutproben der Entnahmezeitpunkte 0.5, 1.5 und 3 h	89

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonsäure)
AH	Antioxidans
AiF	Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen e. V.
ALP	Alkalische Phosphatase
ALT	Alaninaminotransferase
AMVN	(2,2'-Azobis[2,4-dimethylvaleronitril])
ANOVA	univariate Varianzanalyse
ANR	Anthocyanidinreduktase
ANS	Anthocyanidin 4-Reduktase
AST	Aspartataminotransferase
AUC	Fläche unter der Kapazität-Zeit-Kurve
β-PE	β-Phycoerythrin
BMI	Body Mass Index, Körpermassenindex
CBG	zytosolische β-Glukosidase
CHI	Chalkonisomerase
CHR	Chalkonreduktase
COMT	Catechol-O-Methyltransferasen
DFR	Dihydroflavonol 4-Reduktase
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Assay
EC	Epicatechin
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
EIC	extrahiertes Ionenchromatogram
ESR	Elektronenspinresonanzspektroskopie
EU	Extension Units
F3'H	Flavonol 3'-Hydroxylase
F3H	Flavanon 3-Hydroxylase
FA	Flavonoidaglykon
FEI	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V.
FEKI	Freiburger Ethikkommission International
FG	Flavonoidglykosid
FI	Fluoreszein
FLS	Flavonolsynthase
FNS	Flavonsynthase
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma

GGT	Gammaglutamyltransferase
GlcA	Glukuronsäure
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HAT	Hydrogen Atom Transfer
HDL	high density lipoproteins, Lipoproteine hoher Dichte
HPLC-DAD	Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Photodiodenarray-Detektor
HPLC-MS/MS	Hochleistungs-Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
IFS	Isoflavosynthase
kJ	Kilojoule
LADR	Laborärztliche Arbeitsgemeinschaft für Diagnostik und Rationalisierung e.V.
LAR	Leukocyanidin 4-Reduktase
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LDL	Low density lipoproteins, Lipoproteine geringerDichte
LDOX	Leukocyanidin Deoxygenase
LPH	Laktase-Phlorizin-Hydrolase
LPH	Laktase-Phlorizin-Hydrolase
MCT-1	Monocarboxylat-Transporter 1
Me	Methyl
MRP-2	Multidrugresistenz assoziiertes Protein 2
ND	Nicht detektiert
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PAL	physical activity level, Grad der körperlichen Aktivität
PH	Zielmolekül
RMCD	methyliertes beta-Zyklodextrin
ROO.	Peroxyradikal
SAR	Struktur-Aktivitätsbeziehungen
SET-PT	Single Electron Transfer followed by Proton Transfer
SGLT-1	natriumabhängiger Glukosetransporter
SPLET	Sequential Proton Loss Electron Transfer
SS	Stilbensynthase
t	Tonne
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-s-triazin-Lösung
TU	Terminal Unit
UGT	UDP-Glucuronosyl-Transferase

1 Einleitung und Zielsetzung

Kräuter- und Früchtetees wurden bereits vor Jahrtausenden zu Genuss- und Heilzwecken konsumiert. Marktdaten zeigen, dass sich diese Produktklasse in Deutschland in den letzten Jahren einer steigenden Beliebtheit erfreut [BECHTHOLD 2005]. Im Zuge des steigenden Absatzes von Kräuter- und Früchtetees konnte sich auch der Rooibostee als feste Verbrauchsgröße im Segment der Monoteesorten etablieren. Insbesondere in den Jahren 2002-2004 nahm der Absatz von Rooibos stetig zu. Während im Jahr 2002 noch 2000 t Rooibos verkauft wurden, stieg diese Menge in den Folgejahren weiter an und erreichte im Jahr 2004 mit 3838 t ein Absatzhoch, das sich in den Folgejahren auf Absatzmengen zwischen 2588-2805 t stabilisierte [WIRTSCHAFTSVEREINIGUNG KRÄUTER- UND FRÜCHTETEEES 2003-2011].

Wertgebende Komponenten des Rooibos und daraus hergestellter Produkte sind die Flavonoide. Sie zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen, die im wissenschaftlichen Diskurs lange Zeit ausschließlich als antinutritive Pflanzenstoffe wahrgenommen wurden. Bei ihrer gesundheitlichen Bewertung standen primär die potenzielle Toxizität sowie die Befähigung zur Einschränkung der Bioverfügbarkeit anderer Nährstoffe im Vordergrund. Inzwischen wird jedoch davon ausgegangen, dass auch die Flavonoide, ähnlich vielen anderen Stoffen in pflanzlichen Lebensmitteln, bei normalen Verzehrsgewohnheiten, gesundheitserhaltende und -fördernde Eigenschaften besitzen [CARLE 2010, HAHN ET AL. 2006, WATZL UND LEITZMANN 1999]. Zumeist steht dabei die antioxidative Wirkung dieser Stoffklasse im Vordergrund, weshalb ihnen vor allem eine protektive Wirkung bei Erkrankungen zugesprochen wird in deren Pathogenese „oxidativer Stress“ ein zentraler Faktor ist.

Da Rooibosflavonoide eine bisher nur wenig untersuchte Stoffklasse sind, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, Daten über ihre Bioverfügbarkeit und ihr antioxidatives Potenzial zu gewinnen. Dieser Zielsetzung folgend wurden verschiedene Studienphasen durchgeführt, in denen die Bioverfügbarkeit und das antioxidative Potenzial der Rooibosflavonoide, *in vitro* und *in vivo*, erfasst wurde.

Im Folgenden wird ein Überblick über die Stoffklasse der Flavonoide und im speziellen die im Rooibos vertretenen Flavonoide gegeben, wobei das Augenmerk vor allem den Aspekten Bioverfügbarkeit und antioxidativer Kapazität liegt. Nach einer Beschreibung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen werden die erzielten Ergebnisse präsentiert und denen anderer Untersuchungen gegenübergestellt.

2 Literatur

2.1 Rooibos

Der Rooibos ist eine in Südafrika heimische Pflanzenart die der Familie der Fabaceae (Hülsenfrüchtler) zugeordnet wird und zu der Unterfamilie der Faboidea (Schmetterlingsblütler) zählt. Er gehört der mehr als 270 Arten umfassenden Gattung *Aspalathus* an.

Zur Teezubereitung und für den menschlichen Verzehr wird vorwiegend die Art *Aspalathus linearis* kommerziell vertrieben. Diese wächst in den Zedernbergen im Südwesten Südafrikas, insbesondere in den Gebieten Citrusdal, Clanwilliam und Nieuwoudtville. Die Sträucher können je nach Spezies eine Höhe von bis zu zwei Metern erreichen [JOUBERT ET AL. 2008A]. Zur Teeproduktion werden die nadelähnlichen Blätter und die Pflanzenstängel des Rooibos eingesetzt. Diese können nach der Ernte fermentiert oder aber direkt getrocknet werden. Während der unfermentierte Tee seine grüne Farbe beibehält und daher auch als grüner Rooibos bezeichnet wird, führt der Fermentationsprozess zu einer Oxidation der enthaltenen Flavonoide und einer nachfolgenden Bräunung.

Neben den Flavonoiden, die die wertgebenden und aus physiologischer Sicht interessantesten Inhaltsstoffe des Rooibos und seiner trinkfähigen wässrigen Extrakte darstellen, sind auch geringe Mengen verschiedener Mineralstoffe (u.a. Kalium, Natrium, Kalzium) enthalten [JOUBERT ET AL. 2008A, MCKAY UND BLUMBERG 2007].

2.2 Flavonoide

Bei den Flavonoiden handelt es sich um sekundäre Pflanzenstoffe. Sie bilden eine Untergruppe der Polyphenole und stellen in der Natur und der menschlichen Ernährung die quantitativ bedeutendste Klasse der Polyphenole dar [CROZIER ET AL. 2009, WATZL UND RECHKEMMER 2001, BRAVO 1998].

Das charakteristische Grundgerüst der Flavonoide ist das 2-Phenyl-Chroman (Flavan). Es besteht aus 15 Kohlenstoffatomen, die sich zu zwei, über einen O-heterozyklischen Ring verbundenen, aromatischen Ringen zusammenlagern (Abbildung 1).

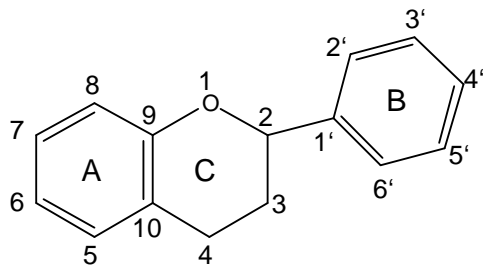


Abbildung 1: Struktur des 2-Phenyl-Chromans (Flavan) als Grundgerüst der Flavonoide

Die Biogenese der Flavonoide erfolgt im Sekundärstoffwechsel der Pflanze. Für die Synthese des Flavonoidgrundgerüsts werden Malonyl-CoA und 4-Coumaroyl-CoA benötigt. Ersteres entsteht, katalysiert durch die Acetyl-CoA-Carboxylase, aus der Carboxylierung von Acetyl-CoA aus dem Kohlenhydratstoffwechsel. 4-Coumaroyl-CoA leitet sich aus Phenylalanin ab, welches im Shikimisäure-Weg gebildet wird. Die Schlüsselreaktion ist die Desaminierung des Phenylalanins durch die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL). Die entstehende Zimtsäure wird letztlich unter Einwirkung der Zimtsäure-4-Hydroxylase zu 4-Coumaroyl umgewandelt und durch die 4-Coumaroyl-CoA-Ligase unter ATP-Verbrauch carboxyliert.

Wie in Abbildung 2 dargestellt, katalysiert die Chalkonsynthase (CHS) im ersten Schritt der Biogenese die stufenweise Kondensation von drei Molekülen Malonyl-CoA mit 4-Coumaroyl-CoA. In dieser Reaktion entsteht ein zyklisches Tetrahydrochalkon. Die nachfolgende enzymatische Isomerisierung durch die Chalkonisomerase (CHI) führt, unter Ausbildung des flavonoidtypischen heterozyklischen C-Rings, zur Entstehung eines Flavanons. Aus diesem können in weiteren Reaktionen die übrigen Flavonoide abgeleitet werden [CROZIER ET AL. 2009, CROZIER ET AL. 2006, HELLER UND FORKMANN 1994].

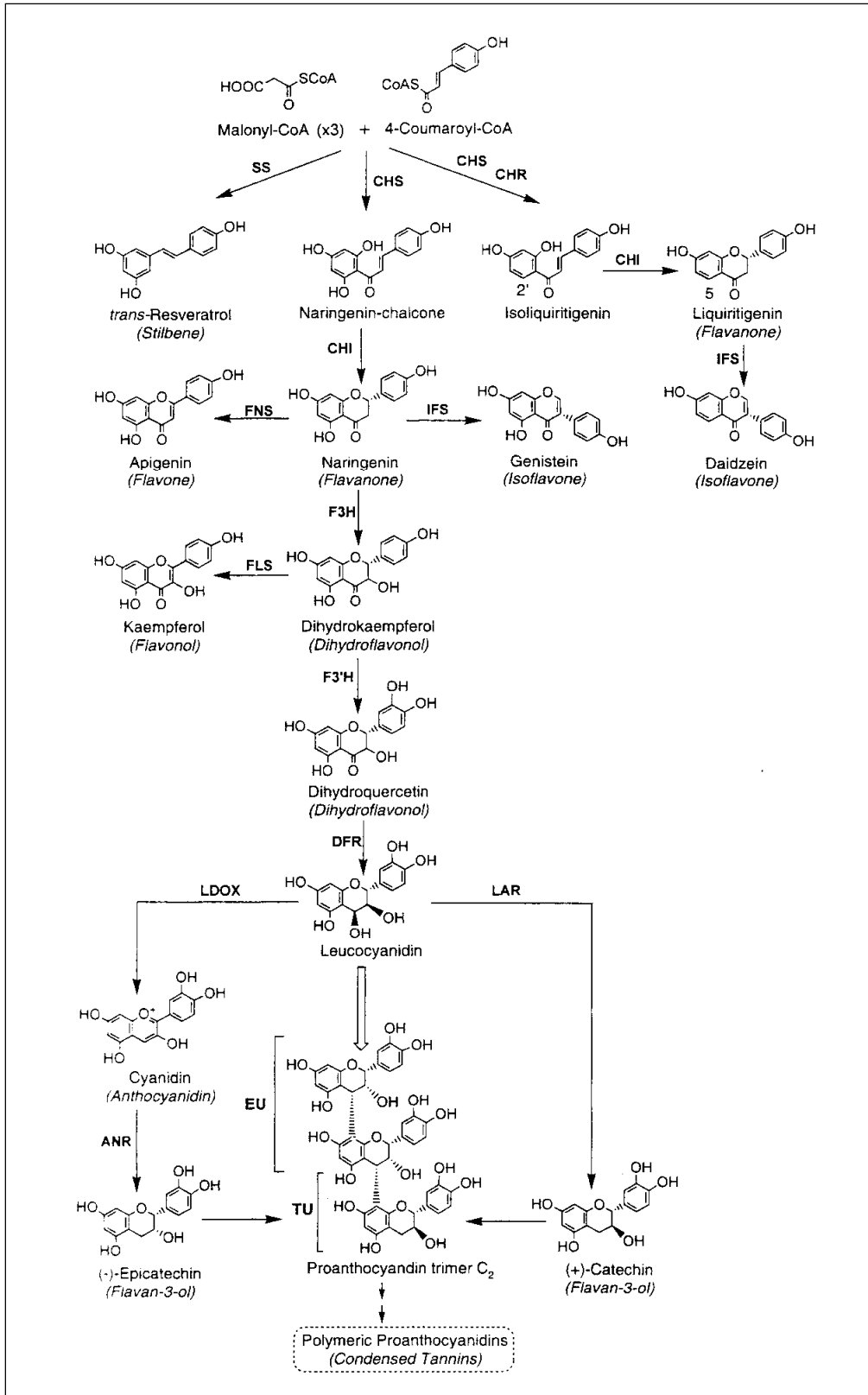
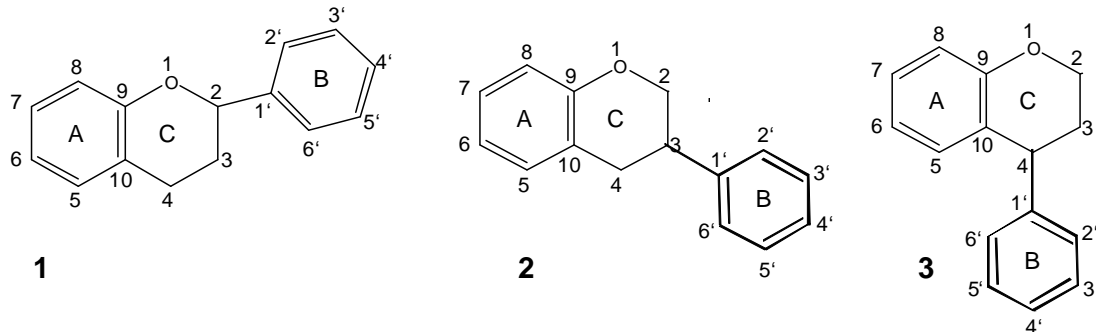


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Biogenese der Flavonoide [CROZIER ET AL. 2006]

SS = Stilbensynthase, CHS = Chalkonsynthase, CHR = Chalkonreduktase, CHI = Chalkonisomerase, IFS = Isoflavosynthase, FNS = Flavonsynthase, FLS = Flavonolsynthase, DFR = Dihydroflavonol 4-Reduktase, ANS = Anthocyanidin 4-Reduktase, F3H = Flavanon 3-Hydroxylase, F3'H = Flavonol 3'-Hydroxylase, LAR = Leucocyanidin 4-Reduktase, LDOX = Leucocyanidin Deoxygenase, ANR = Anthocyanidinreduktase, EU = Extension Units, TU = Terminal Unit

In Abhängigkeit der Stellung des B-Ringes am heterozyklischen C-Ring kann zwischen den Flavonoiden (Bindung an C-2, **1**), den Isoflavonoiden (Bindung an C-3, **2**) und den Neoflavonoiden (Bindung an C-4, **3**) differenziert werden [MARAIS ET AL. 2006].



Basierend auf dem Grad der Oxidation, der Sättigung und den strukturellen Unterschieden am heterozyklischen C-Ring erfolgt außerdem die Einteilung in verschiedene Strukturklassen (Tabelle 1).

2.2.1 Strukturklassen

Insgesamt lassen sich die Flavonoide in 13 verschiedene Strukturklassen differenzieren. In Tabelle 1 sind die gängigsten aufgeführt.

Zu den quantitativ relevantesten Flavonoiden zählen die Isoflavone, die Anthocyanidine, die Flavanone, die Flavonole und die Flavanole; bei letzteren handelt es sich um die in der Natur am weitesten verbreiteten Flavonoide. Bedeutende Mengen an Flavonen wurden hingegen bisher nur in wenigen Lebensmitteln nachgewiesen [CROZIER ET AL. 2006, BRAVO 1998]. Die Chalkone und die Dihydrochalkone sind ebenfalls als Minorkomponenten einzustufen und kommen nur in ausgewählten Pflanzen vor (z. B. Rooibos). Gleichzeitig handelt es sich um die einzigen Flavonoidklassen, in denen der heterozyklische C-Ring offenkettig vorliegt [CROZIER ET AL. 2009, BOHM 1998]. Wie aus der Abbildung 3 ersichtlich wird, weicht die Nomenklatur der Dihydrochalkone zudem von der anderer Flavonoide ab.

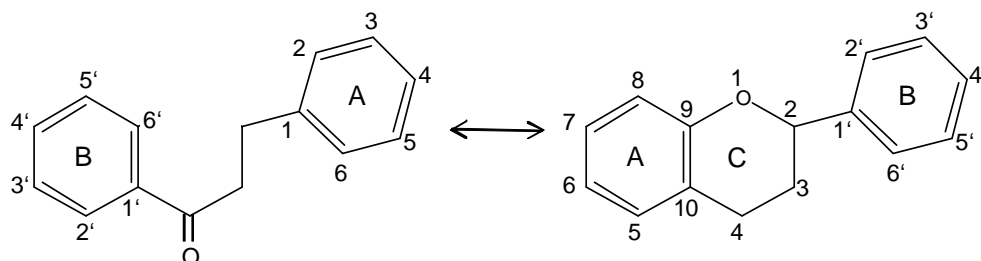
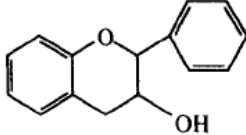
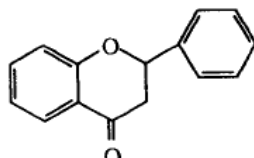
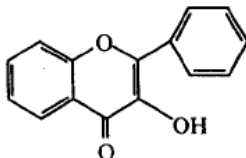
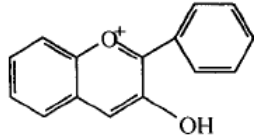
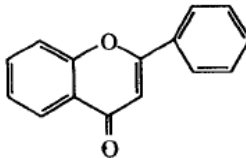
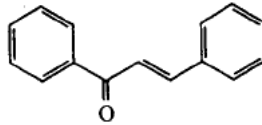
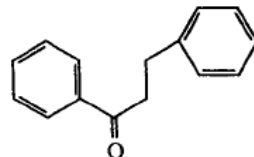


Abbildung 3: Struktur der Dihydrochalkone im Vergleich zu dem 2-Phenyl-Chroman (Flavan)

Tabelle 1: Strukturklassen und Nahrungsquellen von Flavonoiden [CROZIER ET AL. 2009, VEITCH UND GRAYER 2008, CROZIER ET AL. 2006, MANACH ET AL. 2004, BEECHER 2003, ROSS UND KASUM 2002, HOLLMAN UND ARTS 2000, TOMÁS-BARBERÁN UND CLIFFORD 2000, BOHM 1998, BRAVO 1998]

Flavonoidklasse	Grundstruktur
<p>Flavanol z. B.:</p> <ul style="list-style-type: none"> • (-)-Epicatechingallat • (-)-Epigallocatechin • (-)-Epigallocatechingallat <p>Vorkommen: u. a. Grüner / Schwarzer Tee</p>	
<p>Flavanon z. B.:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Naringenin • Eriodictyol • Hesperidin <p>Vorkommen: u. a. Zitrusfrüchte, Pflaumen</p>	
<p>Flavonol z. B.:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Quercetin • Kaempferol • Myricetin <p>Vorkommen: u. a. Zwiebel, Apfel, Beeren</p>	
<p>Anthocyanidine z. B.:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cyanidin • Peonidin • Pelargonidin <p>Vorkommen: u. a. Beeren, Trauben, Wein</p>	
<p>Flavon z. B.:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Luteolin • Apigenin • Diosmetin <p>Vorkommen: u. a. Sellerie, Petersilie, Paprika</p>	
<p>Chalkon z. B.:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Isoliquiritigenin • Chalcononaringenin • Butein <p>Vorkommen: Hopfen, Süßholzwurzel</p>	
<p>Dihydrochalkon z. B.:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pholridzin • Aspalathin • Neohesperidin <p>Vorkommen: u. a. Apfel, Rooibos, Limone</p>	

Innerhalb der verschiedenen Strukturklassen werden die Flavonoide anhand abweichender Hydroxylierungsmuster voneinander unterschieden [BEECHER 2003]. So weist beispielsweise das Flavonol Quercetin Hydroxygruppen in den Positionen 3' und 4' des B-Ringes auf,

während das ebenfalls den Flavonolen zugehörige Kaempferol lediglich eine Hydroxygruppe in Position 4' besitzt und damit über keine Catecholstruktur verfügt (Abbildung 4).

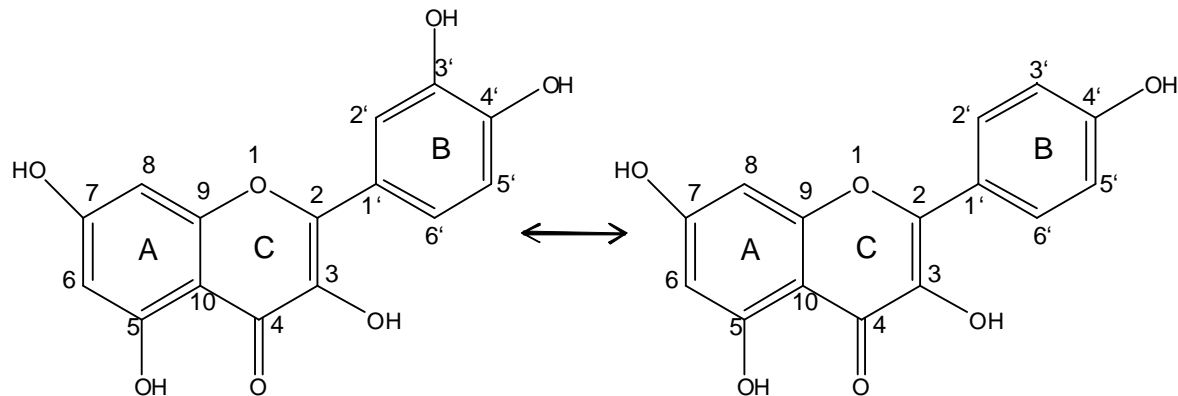


Abbildung 4: Struktur der Flavonolglykone Quercetin und Kaempferol

Die meisten Repräsentanten der unterschiedlichen Strukturklassen liegen jedoch entgegen den in Abbildung 4 dargestellten Verbindungen nicht in freier Form (Aglykone) vor, sondern als O-Glykoside, in denen ein Zucker β -glykosidisch, zumeist in den Positionen 3, 5 und 7 an das Flavonoid gebunden ist. Beispielhaft sei hier auf das in Abbildung 5 dargestellte Flavonol Quercitrin, das Glykosid des Quercetins, verwiesen.

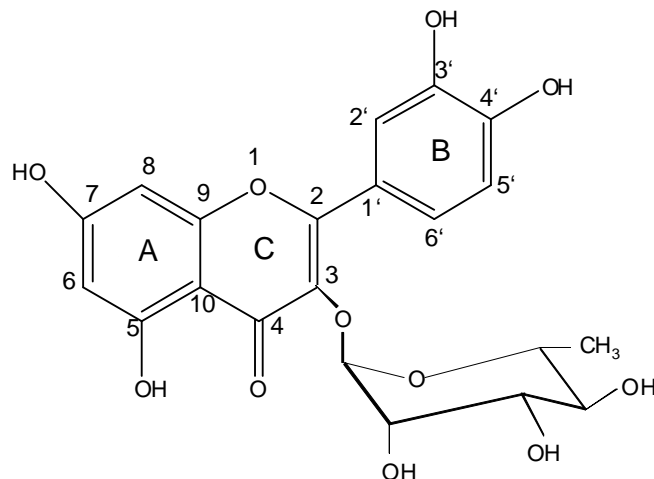


Abbildung 5: Struktur des Flavonoid-O-Glykosids Quercitrin

Bei den in den O-Glykosiden gebundenen Zuckern handelt es sich vorwiegend um Glukose, Rhamnose, Galaktose, Galakturonsäure, Glukuronsäure, Arabinose und Xylose. Die Glukose ist das am häufigsten gebundene Monosaccharid, Rutinose und Neohesperidiose stellen die bedeutendsten Disaccharide dar [CUYCKENS UND CLAEYS 2004, IWASHINA 2000, BOHM 1998]. Eine Ausnahme bilden die Flavanole, die ausschließlich in Form ihrer Aglykone vorliegen (z. B. Catechine).

Neben den Flavonoid-O-Glykosiden existieren auch C-Glykoside, in denen die Glykosylierung über eine säureresistente C-C-Bindung, vorwiegend in den Positionen 6 und 8, erfolgt (Abbildung 6).

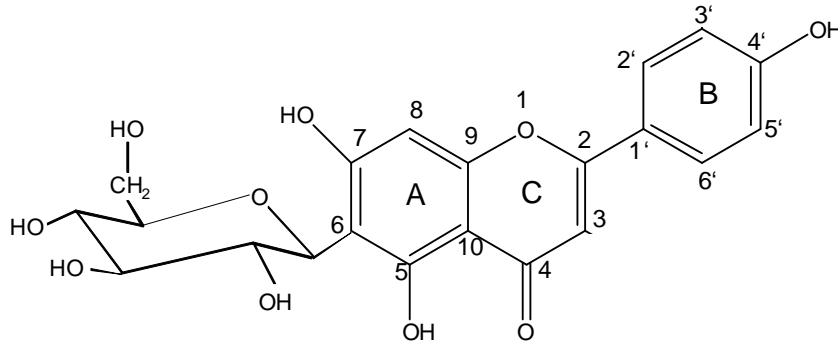


Abbildung 6: Struktur des Flavonoid-C-Glykosids Isovitexin

C-Glykoside sind insbesondere in der Strukturklasse der Flavone von quantitativer Relevanz, kommen aber auch in anderen Strukturklassen, wie z. B. den Dihydrochalkonen (z. B. Aspalathin und Nothofagin), vor [CUYCKENS UND CLAEYS 2004, BEECHER 2003, BOHM 1998].

2.2.2 Flavonoide des Rooibos

Die im Rooibos enthaltenen Flavonoide lassen sich größtenteils als C-Glykoside klassifizieren und gehören den Dihydrochalkonen, Flavonen und Flavonolen an.

In Tabelle 2 ist das Flavonoidprofil eines wässrigen Extraktes aus fermentierten und unfermentierten Rooibos aufgeführt.

Tabelle 2: Flavonidgehalt von wässrigen Extrakten aus unfermentierten und fermentierten Rooibos (mg/g) (60 ml Wasser auf 1 g Droge) [BRAMATI ET AL. 2003, BRAMATI ET AL. 2002]

Flavonoid	Strukturklasse	Bindung	unfermentiert	fermentiert
Aspalathin	Dihydrochalkon	C-Glykosid	49.9	1.23
Orientin	Flavon	C-Glykosid	2.34	1
Isoorientin	Flavon	C-Glykosid	3.57	0.83
Vitexin	Flavon	C-Glykosid	0.50	0.33
Isovitexin	Flavon	C-Glykosid	0.66	0.27
Isoquercitrin/ Hyperoside	Flavonol	O-Glykosid	0.33	0,43
Rutin	Flavonol	O-Glykosid	1.69	1.27
Quercetin	Flavonol	Aglykon	0.04	0.11
Luteolin	Flavon	Aglykon	0.02	0.03

Es ist zu beachten, dass das Flavonoidprofil aufgrund prozessbedingter Schwankungen sowie aufgrund der Fortpflanzung über Samen und der daraus resultierenden genetischen

Variation schwanken kann. Somit können neben den erwähnten Verbindungen auch andere Polyphenole im Rooibos und den daraus hergestellten wässrigen Extrakten enthalten sein. In diesem Zusammenhang ist vor allem das Nothofagin zu erwähnen. Es ist dem Aspalathin strukturell sehr ähnlich und ebenso wie dieses ein Dihydrochalkon. Bei der gebundenen glykosidischen Komponente handelt es sich in beiden Fällen um Glukose (Abbildung 7). Die Verbindungen sind als rooibosexklusiv einzustufen [VAN DER MERWE ET AL. 2010, JOUBERT ET AL. 2009, JOUBERT ET AL. 2005].

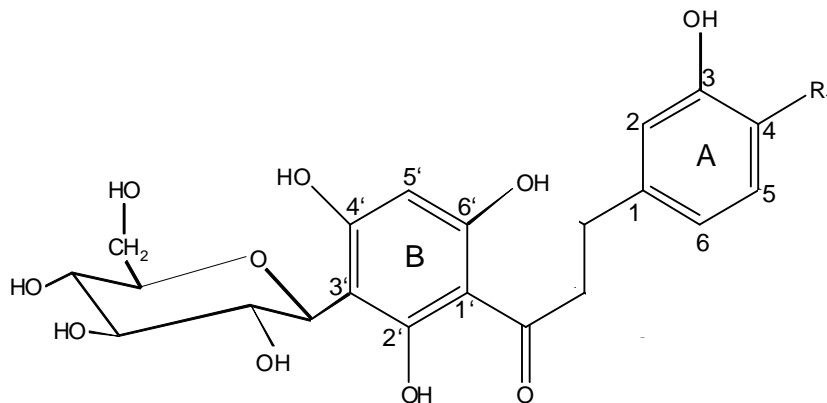


Abbildung 7: Struktur des Aspalathins ($R_1 = \text{OH}$) und Nothofagins ($R_1 = \text{H}$)

Das Aspalathin ist die quantitativ dominierende Verbindung im wässrigen Extrakt aus unfermentierten Rooibos.

In wässrigen Extrakten aus fermentierten Rooibos ist der Gesamtflavonoidgehalt aufgrund oxidativer Veränderungen während des Fermentationsprozess deutlich geringer als in seinem unfermentierten Konterpart, was sich besonders in einem Verlust des Aspalathingehalts manifestiert. Dieses kann beispielsweise zu den korrespondierenden Flavonen Orientin und Isoorientin umgelagert werden [JOUBERT ET AL. 2009, JOUBERT ET AL. 2005, JOUBERT 1996]. Weitere polyphenolische Bestandteile des Rooibos und seiner wässrigen Extrakten zählen in erster Linie zu der Strukturklasse der Flavone. Hierbei sind besonders die Flavonanalogue des Aspalathins, Orientin und Isoorientin sowie Vitexin und Isovitexin zu erwähnen. Die Flavonole Isoquercitrin/Hyperosid und Rutin sind die einzigen von BRAMATI ET AL. [2003, 2002] detektierten O-glykosidisch gebundenen Komponenten. Aglykone (Luteolin, Quercetin) liegen ebenfalls nur in sehr geringen Mengen vor. In einer neueren Untersuchung konnten mit Patuletin-7-Glukosid, Esculin, Safflomin A, Carlinoside, Isocarlinoside, Neocarlinoside, 2''-O- β -Arabinopyranosylorientin, Vicenin-2, Eriodictyol 5,3'-di-O-Glukosid, Quercetin-3-O-arabinoglukosid und Scoparin weitere bisher unbekannte Verbindungen identifiziert werden [ISWALDI ET AL. 2011].

2.3 Zufuhr und Bioverfügbarkeit

Flavonoide haben in der menschlichen Ernährung mengenmäßig nur eine geringe Bedeutung. Die Angaben zur durchschnittlichen Aufnahmemenge variieren in der Literatur zwischen 150-1000 mg/d. Diese großen Schwankungen sind zum einen der Diversität der angewendeten Erfassungsmethoden und zum anderen Unterschieden in den Ernährungsgewohnheiten geschuldet [NEMETH UND PISKULA 2007].

2.3.1 Flavonoid-O-Glykoside / Aglykone

In den USA liegt die durchschnittliche tägliche Aufnahmemenge von Flavonoiden bei ca. 190 mg. Die Flavanole stellen mit 82.5 % der Gesamtflavonidaufnahme die wichtigste Komponente dar. Flavanone (7.6 %) und Flavonole (6.8 %) sind weitere aus quantitativer Sicht bedeutende Bestandteile, während Anthocyanidine (1.6 %), Flavone (0.8 %) und Isoflavone (0.6 %) weniger bedeutsam sind. Chalkone und Dihydrochalkone spielen aus quantitativer Sicht ebenfalls nur eine untergeordnete Rolle [CHUN ET AL. 2007]. Einer neueren Untersuchung folgend liegt die durchschnittlich aufgenommene Flavonoidmenge in den USA mit 207 mg/d geringfügig höher. Sie korreliert dabei mit dem Konsum von Obst, Gemüse, Wein und insbesondere Tee, der die Hauptquelle von Flavonoiden in der Ernährung darstellt. In Abhängigkeit des Teekonsums kann die Menge ingestierter Flavonoide auf > 1 g ansteigen [CHUN ET AL. 2010].

In Deutschland liegt die Gesamtaufnahmemenge dem Ernährungsbericht der DGE aus dem Jahr 2004 zu Folge bei 50-100 mg/d [DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG E.V. 2004]. In Anlehnung an aktuelle Untersuchungen geht die DGE jedoch mittlerweile von einer Aufnahmemenge aus, die deutlich über 50-100 mg/d liegt, wobei genauere Angaben nicht vorliegen [DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG E.V. 2008].

Die Bioverfügbarkeit der Flavonoide ist, unabhängig von der jeweiligen Stoffklasse, als gering einzustufen [CROZIER ET AL. 2009, MANACH ET AL. 2005]. Der Begriff der Bioverfügbarkeit ist der experimentellen Pharmakologie entliehen und gibt an, in welchem Ausmaß und in welcher Geschwindigkeit ein Wirkstoff an seinen Wirkort gelangt [DOST 1968]. Einem Review aus dem Jahre 2004 zur Folge werden lediglich 5-10 % der ingestierten Flavonoide im Dünndarm absorbiert [CLIFFORD 2004]. Nach oraler Applikation physiologischer Mengen (10-200 mg) von Flavonoiden ist zumeist eine Plasmakonzentration von $\leq 1 \mu\text{mol/l}$ messbar, die nur in wenigen Fällen überstiegen wird. Es sind jedoch strukturklassenabhängige Schwankungen der Bioverfügbarkeit zu berücksichtigen, die im Folgenden exemplarisch für die bedeutenden Flavonoidklassen dargestellt werden.

Die **Isoflavone** sind die am besten bioverfügbaren Flavonoide. In den meisten Studien konnten nach oraler Aufnahme von 20-50 mg Isoflavonen Plasmaspiegel zwischen 0.5-1.5 $\mu\text{mol/l}$ detektiert werden. Die Applikation höherer Dosen von bis zu 16 mg/kg Körpergewicht führte vereinzelt zu Plasmaspiegeln von bis zu 27 $\mu\text{mol/l}$. Die maximale Plasmakonzentration wurde zumeist nach 4-6 h, teilweise auch erst nach 8-9 h erreicht. Die Aglykone der Isoflavone weisen möglicherweise eine höhere und schnellere Verfügbarkeit auf als die korrespondierenden Glukoside, die Datenlage ist hier jedoch widersprüchlich [CROZIER ET AL. 2009, KANO ET AL. 2006, MANACH ET AL. 2005, AZMI ET AL. 2000].

Die Plasmaspiegel der **Flavonole** nach oraler Applikation schwanken in Abhängigkeit der strukturellen Merkmale des applizierten Flavonols zwischen $< 1-7 \mu\text{mol/l}$. HOLLMAN ET AL. [1995, 1997] konnten erstmals belegen, dass die Bioverfügbarkeit von Quercetinglukosiden höher lag als die des korrespondierenden Aglykons. Dies wurde in weiteren Studien bestätigt, in denen durch die Applikation von Quercetinglukosiden deutlich höhere Konzentrationen (2-7 $\mu\text{mol/l}$) erzielt wurden, als bei Gabe des korrespondierenden Aglykons (0.1-0.4 $\mu\text{mol/l}$). Neben der Frage, ob ein Zucker gebunden ist, ist vor allem die Struktur des gebundenen Zuckers von regulatorischer Bedeutung. So besitzt Rutin, ein Quercetinglykosid, in dem eine Rutinose gebunden ist, nur den Bruchteil der Bioverfügbarkeit eines Quercetinglukosides und des Aglykons. Zwiebeln, die in erster Linie Quercetinglukoside enthalten, stellen deshalb eine deutlich bessere Quelle für Quercetin dar als Äpfel und Tee, die größtenteils Rutin enthalten. Die maximale Plasmakonzentration von Quercetinglukosiden wird zudem deutlich früher (0.6-0.7 h) erreicht, als dies nach Aufnahme von Rutin der Fall ist (4-9 h) [MANACH ET AL. 2005, MANACH ET AL. 2004, BOYLE ET AL. 2000, CONQUER ET AL. 1998, HOLLMAN ET AL. 1997, HOLLMAN ET AL. 1995]. Die physiologischen Ursachen sind vermutlich in den differierenden Absorptionmechanismen zu sehen. So werden Quercetinglukoside vorwiegend im Dünndarm absorbiert, während das Rutin als Flavonoidrhamnosid primär im Dickdarm verstoffwechselt wird (vgl. 2.4.1).

Der oralen Applikation von **Flavanolen** bzw. flavanolreichen Lebensmitteln folgend werden zumeist Konzentrationen von $< 1 \mu\text{mol/l}$ gemessen. Bei Aufnahme hoher Mengen ($> 200 \text{ mg}$) überschritten die gemessenen Plasmaspiegel in Ausnahmefällen eine Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ und erreichten Werte von bis zu 6 $\mu\text{mol/l}$. Basierend auf Flavanolkonzentrationen im Urin kann angenommen werden, dass die Bioverfügbarkeit der Flavanole möglicherweise höher liegt als die Plasmakonzentrationen vermuten lassen, jedoch aufgrund ihrer schnellen renalen Ausscheidung keine höheren Plasmaspiegel messbar sind. Die Zeit zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration lag in der Regel zwischen 1-2 h. Bei den applizierten Flavanolen handelte sich ausschließlich um Catechine [CROZIER ET AL. 2009, MANACH ET AL. 2005, MANACH ET AL. 2004].

Studien zur Bioverfügbarkeit von **Flavanonen** sind bisher rar gesät. Die Aufnahme hoher Mengen (100-200 mg) führte in diesen Untersuchungen zu Plasmaspiegeln zwischen 1-6 $\mu\text{mol/l}$, während nach Aufnahme geringerer Mengen lediglich Konzentrationen $< 1 \mu\text{mol/l}$ messbar waren. Flavanonglykoside erreichten nach 5-6 h ihre maximalen Plasmaspiegel, die entsprechenden Aglykone bereits nach 2 h. Natürliche Lebensmittel enthalten jedoch, mit Ausnahme von grünem und schwarzem Tee, nur selten signifikante Mengen an Aglykonen [CROZIER ET AL. 2009, MANACH ET AL. 2005, MANACH ET AL. 2003, BUGIANESI ET AL. 2002, ERLUND ET AL. 2001].

Die **Anthocyane** besitzen im Vergleich zu den übrigen Flavonoiden die geringste Bioverfügbarkeit und die Plasmaspiegel liegen, der oralen Applikation folgend, meist im niedrigen nanomolaren Bereich. Selbst nach Konsum höherer Mengen von bis zu 20 mg/kg Körpergewicht waren meist nur vergleichsweise niedrige maximale Konzentrationen von 115 nmol/l messbar.

Die Bioverfügbarkeit von **Dihydrochalkonen** wurde bisher nur rudimentär untersucht. Der oralen Applikation von Phloretin-O-Glukosiden folgend lag die maximale Plasmakonzentration im nanomolaren Bereich. Diese wurde bereits nach 0.6 h erreicht [BORGES ET AL. 2010, MARKS ET AL. 2009].

Die Gesamtheit der bisher vorliegenden Daten zeigt deutlich, dass die Bioverfügbarkeit der Flavonoide gering ist. Neben den strukturabhängigen Schwankungen nehmen auch weitere Faktoren Einfluss auf die Bioverfügbarkeit. Dazu zählen sowohl externe Einflüsse (Sonneneinstrahlung, Reifegrad), die den Flavonoidgehalt im Lebensmittel determinieren, als auch prozessbezogene sowie spezifische, mit der Lebensmittelmatrix, assoziierte Faktoren [D'ARCHIVIO ET AL. 2010].

2.3.2 Bioverfügbarkeit von Flavonoid-C-Glykosiden aus Rooibos

In den bisher veröffentlichten Studien wurde zumeist die Bioverfügbarkeit der quantitativ bedeutenderen Flavonoid-O-Glykoside (z. B. Quercetinglukoside) und ihrer Aglykone (z. B. Quercetin) sowie von Flavonoiden aus grünem und schwarzem Tee (Catechine) untersucht. Bei den in Rooibostee vertretenen Flavonoiden handelt es sich jedoch überwiegend um C-Glykoside (vgl. 2.2.2/3.2.4.1/3.2.4.2), eine Stoffklasse deren Bioverfügbarkeit bisher vergleichsweise schlecht untersucht ist.

In-vitro-Versuche mit Caco-2-Zell-Monolayern zeigten, dass das rooibospezifische C-Glykosid Aspalathin, einem konzentrationsabhängigen Transportprozess folgend, unter Beibehaltung der glykosidischen Struktur, intestinale Epithelzellen passiert. Als optimale Applikationsform erwies sich ein wässriger Extrakt aus grünem Rooibos. Aus diesem wurde

das Aspalathin deutlich effizienter absorbiert als aus einer reinen Aspalathinlösung. Bei Verwendung eines hochkonzentrierten wässrigen Rooibosextrakts (1.9 mg/ml Aspalathinkonzentration) erreichte die Absorptionsrate nahezu 100 % des enthaltenen Aspalathins. Wurden wässrige Lösungen mit einer geringeren Konzentration verwendet, war die Absorptionsrate hingegen signifikant geringer und der Absorptionsprozess stagnierte nach 60 min [HUANG ET AL. 2008].

Diese Ergebnisse konnten in einer tierexperimentellen Studie mit Ratten nicht bestätigt werden. Über eine Sonde applizierte C-Glykoside (u. a. die im Rooibos vorkommenden C-Glykoside Orientin, Vitexin und Isovitexin) waren weder im Plasma noch im Urin der Versuchstiere feststellbar. Der Großteil wurde in den ersten 24 Stunden nach der Applikation über den Fäzes ausgeschieden [ZHANG ET AL. 2007A]. Im Gegensatz dazu bestätigte eine Tieruntersuchung mit Schweinen, übereinstimmend mit den In-vitro-Ergebnissen von HUANG ET AL. [2008], erstmalig die Bioverfügbarkeit von Aspalathin im lebenden Organismus. Die Versuchstiere erhielten über einen Zeitraum von elf Tagen ca. 15 g/d (157-167 mg/kg/d Körpergewicht) Aspalathin. In Urinproben, die am siebten und elften Untersuchungstag gesammelt wurden, konnten sechs Metabolite des Aspalathins detektiert werden. Die Ausscheidungsmenge lag zwischen 0.1-0.9 % des verabreichten Aspalathins. In Blutproben, die den Versuchstieren am siebten und zehnten Tag der Studie entnommen waren, hingegen keine Metabolite nachweisbar [KREUZ ET AL. 2008].

Eine Humanstudie von STALMACH ET AL. [2009A] führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Der Interventionsphase vorgeschaltet waren die zehn Studienteilnehmer angehalten, im Rahmen einer zweitägigen Depletionsphase den Verzehr flavonoidhaltiger Lebensmittel einzustellen. Nach der Entnahme einer Nüchternblutprobe konsumierten die Probanden 500 ml unfermentierten bzw. fermentierten Rooibostee, was einer Flavonoidmenge von 73 bzw. 40 mg entsprach. Weitere Blutentnahmen erfolgten 0.5, 1, 2 und 5 h nach der Aufnahme der Prüfprodukte. Neben den Blutentnahmen wurde in definierten Intervallen (0-5, 5-12 und 12-24 h nach Aufnahme der Prüfprodukte) der Urin gesammelt. Während in den Blutproben keine Metabolite detektiert werden konnten, entsprach die Gesamtmenge der über den Urin ausgeschiedenen Flavonoidmetabolite im Falle des unfermentierten Rooibostees etwa 0.22 % bzw. nach Konsum des fermentierten Rooibostees etwa 0.9 % der applizierten Flavonoide. Der Großteil der Metabolite wurde in der ersten Urinsammelprobe detektiert. Es handelte sich ausschließlich um Metabolite des Aspalathins.

In einer weiteren Humanstudie untersuchten COURTS UND WILLIAMSON [2009] ebenfalls die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus unfermentierten Rooibos. Dazu konsumierten sechs Probanden einer einwöchigen Depletionsphase folgend einmalig 300 ml unfermentierten Rooibostee, der 91.2 mg Aspalathin enthielt. Während der gesamten Depletionsphase

mussten die Probanden die Einnahme von Aspalathin einstellen und drei Tage vor Studienbeginn zusätzlich auf die Einnahme polyphenolhaltiger Produkte verzichten. Urinproben wurden vor bzw. in zweistündigen Abständen bis zu 24 h nach Aufnahme des Prüfproduktes gesammelt. Der Großteil der Flavonoide wurde bis zu sechs Stunden nach Ingestion der Prüfprodukte exkretiert. Die ausgeschiedene Menge an Aspalathinmetaboliten entsprach in etwa 0.74 % des aufgenommenen Aspalathins.

In einer Interventionsstudie aus dem Jahr 2011 führte der sechswöchige Konsum von 1.2 l/d wässrigen Extrakt (164 mg Polyphenole) aus fermentierten Rooibos zu einem Anstieg der Polyphenolspiegel im Plasma (72.3 mg/l auf 89.8 mg/l). Im Vergleich dazu waren die Polyphenolspiegel nach Beendigung einer vierwöchigen Kontrollphase, in der statt des Rooibostees Wasser konsumiert wurde, signifikant geringer (79.8 mg/l). Während der Interventionsphasen waren die Probanden (n=40) angehalten, ihre gewohnte Diät beizubehalten, jedoch den Konsum flavonoidhaltiger Getränke (z. B. Kaffee, Rotwein, Tee) zu vermeiden und den Verzehr flavonoidreicher Lebensmittel (Obst, dunkle Schokolade) einzuschränken [MARNEWICK ET AL. 2011].

Die dargestellten Tier- und Humanstudien legen nahe, dass Flavonoid-C-Glykoside aus Rooibos in geringerem Umfang bioverfügbar sind als Flavonoid-O-Glykoside. Insbesondere nach einmaliger Applikation der entsprechenden Rooibosprüfprodukte waren Rooibosflavonoide nur in Urinproben, jedoch nicht im Blut detektierbar [STALMACH ET AL. 2009A, KREUZ ET AL. 2008]. Die Konzentration der Metabolite im Urin war darüber hinaus nur gering. Ein möglicher Grund für die die geringe Absorption ist die C-glykosidische Bindung. Diese ist gegenüber Säuren resistent und eine Substratspezifität hydrolysierender Enzyme des Dünndarms konnte bisher nur für Flavonoid-O-Glykoside nachgewiesen werden [SANUGUL ET AL. 2005]. Bei der Bewertung der Studienergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden, dass der Metabolitgehalt im Urin nur ein indirektes Maß für die Bioverfügbarkeit einer Substanz ist und andere Ausscheidungswege wie die biliäre Ausscheidung unberücksichtigt lässt.

2.4 Absorption und Metabolismus

Die Absorptionsprozesse sowie der postabsorptive Metabolismus von Flavonoiden wurden zumeist anhand von Flavonoid-O-Glykosiden und Flavanolen, die im Gegensatz zu ersteren ausschließlich als Aglykone vorliegen, untersucht. Daneben existieren jedoch auch verschiedene In-vitro- und In-vivo-Studien, in denen Flavonoid-C-Glykoside zum Einsatz kamen.

Der Metabolismus der Flavonoidglykoside ist ein komplexer Prozess, der sich über sämtliche Organe des Verdauungstraktes erstreckt, wobei Dünn- und Dickdarm sowie die Leber eine zentrale Stellung einnehmen. Da die glykosidische Struktur der Flavonoide auch bei der Anwendung gängiger Zubereitungsmethoden erhalten bleibt [DAY ET AL. 1998], entstammen Aglykone in der Ernährung zumeist nur grünem und schwarzem Tee (Flavanole).

Im Falle der Flavonoid-O-Glykoside konnte gezeigt werden, dass es bereits in der menschlichen Mundhöhle durch Enzyme der Epithelzellen und der bakteriellen Mikroflora zu einer hydrolytischen Spaltung kommen kann [WALLE ET AL. 2005]. Der Umfang der Reaktion unterlag jedoch interindividuellen Schwankungen und die allgemeingültige Bedeutung ist unklar. Zudem waren Flavonoid-O-Glykoside, in denen ein anderer Zucker als Glukose gebunden ist, gegenüber einer oralen Hydrolyse resistent.

In der Mundhöhle freigesetzte und/oder mit der Nahrung aufgenommene Aglykone können, wie vereinzelte Tierversuche unter Verwendung von Quercetin zeigen konnten, zu Teilen bereits im Magen absorbiert werden [CRESPY ET AL. 2002, PISKULA ET AL. 1999]. Die physiologische Bedeutung dieses Absorptionsprozesses ist jedoch als gering einzustufen.

Im Magen unterliegen weder Flavonoid-O- noch Flavonoid-C-Glykoside einer Hydrolyse, weshalb sie den Dünndarm größtenteils intakt erreichen [STALMACH ET AL. 2009A, CRESPY ET AL. 2002, SCALBERT UND WILLIAMSON 2000]. Eine hydrolytische Spaltung wird im Falle ersterer als Voraussetzung für die dortige Absorption angenommen [SPENCER UND RICE-EVANS 2003, SPENCER 2003, AHERNE UND O'BRIEN 2002]. Die Ergebnisse verschiedener Tier- und Humanstudien lassen darauf schließen, dass die Spaltung im Falle der Flavonoid-C-Glykoside keine Voraussetzung ist und sie intakt absorbiert werden [COURTS UND WILLIAMSON 2009, STALMACH ET AL. 2009A, KREUZ ET AL. 2008].

Nicht im Dünndarm aufgenommene Flavonoide erreichen das Kolon und werden dort durch die Mikroflora zu Phenolsäuren abgebaut und absorbiert oder final mit dem Fäzes ausgeschieden.

Postabsorptiv unterliegen die Flavonoide einem extensiven Phase-2-Metabolismus, der dem Organismus primär der Detoxifikation exogener Substanzen dient. In enzymatisch katalysierten Reaktionen wird das Flavonoid mit Glukuronsäure, Sulfat- und/oder Methylgruppen konjugiert und damit in eine wasserlöslichere Form überführt. Anschließend werden die größtenteils konjugierten Flavonoide über die Blutbahn im Organismus verteilt und renal ausgeschieden [CROZIER ET AL. 2009].

2.4.1 Dünndarm

Lange Zeit wurde angenommen, dass ausschließlich die Mikroflora des Dickdarms die für eine Deglykosylierung nötigen Enzyme exprimiert und die Absorption demnach auf diesen beschränkt ist [GRIFFITHS UND BARROW 1972]. Später konnte jedoch nachgewiesen werden, dass auch der Dünndarm über verschiedene hydrolytisch wirksame Enzyme (β -Glukosidasen) verfügt und somit ebenfalls für die Absorption alimentär zugeführter Flavonoide von Bedeutung ist [D'ARCHIVIO ET AL. 2010, CROZIER ET AL. 2009, DONOVAN ET AL. 2006, ARTS ET AL. 2004, HAYS ET AL. 1996].

2.4.1.1 Flavonoid-O-Glykoside/Aglykone

Die Laktase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) ist ein in der Bürstensaummembran lokalisiertes Enzym, das den Aufschluss der O-glykosidischen Bindung katalysieren kann [DAY ET AL. 2003, ARTS ET AL. 2002A, DAY ET AL. 2000]. Die Absorption des entstehenden Aglykons erfolgt vermutlich nachfolgend durch einfache Diffusion [MANACH UND DONOVAN 2004]. Neben der LPH kann die Spaltung der O-glykosidischen Bindung auch durch eine zytosolische β -Glukosidase (CBG) katalysiert werden [DAY ET AL. 1998]. Da diese jedoch intrazellulär lokalisiert ist, muss das Flavonoid-O-Glykosid in einem ersten Schritt in den Enterozyten internalisiert werden [AHERNE UND O'BRIEN 2002]. In Caco-2-Zell-Studien konnte der natriumabhängige Glukosetransporter (SGLT-1) als möglicher Transporter identifiziert werden [WOLFFRAM ET AL. 2002, WALGREN ET AL. 2000]. In-vitro-Untersuchungen mit zellfreien Extrakten aus dem menschlichen Dünndarm haben ergeben, dass beide β -Glukosidasen an der Spaltung der Flavonoid-O-Glykoside beteiligt sind. Die gängigen In-vitro-Methoden bieten jedoch keine Möglichkeit, zwischen den beiden Enzymen zu differenzieren und somit die individuelle Bedeutung des einzelnen Enzyms zu ermitteln [NEMETH ET AL. 2003].

Im Falle der Flavanole, die bereits als Aglykone vorliegen ist eine Einwirkung der Enzyme keine Voraussetzung für die Absorption [SPENCER 2003]. Diese erfolgt analog zu den aus Flavonoid-O-Glykosiden freigesetzten Aglykonen durch einfache Diffusion oder möglicherweise über den Monocarboxylat-Transporter-1 (MCT-1) [LAMBERT ET AL. 2007B, VAIDYANATHAN UND WALLE 2003].

2.4.1.2 Absorption der Flavonoid-C-Glykoside aus Rooibos

Eine Sensitivität der beschriebenen, deglykosylierenden Enzymsysteme wurde bisher nur für Flavonoid-O-Glykoside belegt. Eine Spaltung der C-glykosidischen Bindung im Dünndarm ist aufgrund ihrer erhöhten Resistenz gegenüber einer Hydrolyse durch Glukosidasen nicht anzunehmen [MA ET AL. 2007, SANUGUL ET AL. 2005, PRASAIN ET AL. 2004].

In-vitro-Untersuchungen von HUANG ET AL. [2008] zeigten jedoch, dass Aspalathin eine Caco-2-Zell-Monolayer unter Beibehaltung der glykosidischen Struktur, einem konzentrationsabhängigen Transportprozess folgend, passieren kann. Dies wurde sowohl in Tier- [KREUZ ET AL. 2008] als auch in Humanstudien [COURTS UND WILLIAMSON 2009, STALMACH ET AL. 2009A] anhand der detektierten Metabolite bestätigt. COURTS UND WILLIAMSON [2009] mutmaßen, dass die Absorption über den SGLT-1 erfolgt. Die geringen Exkretionsmengen und die Tatsache, dass im Blut keine quantifizierbaren Mengen akkumulierten, lassen jedoch darauf schließen, dass die Absorption auf diesem Weg gering ist (vgl. 2.3.2).

Im Widerspruch zu den aufgeführten Studien ergaben tierexperimentelle Untersuchungen von ZHANG ET AL. [2007A], dass die im Rooibos und seinen wässrigen Extrakten vorkommenden C-Glykoside Orientin, Vitexin und Isovitexin in ihrer ursprünglichen Form nicht im Dünndarm bioverfügbar sind.

2.4.2 Dickdarm

Nicht im Dünndarm absorbierte Flavonoide erreichen den Dickdarm. Dieser ist dicht mit Mikroorganismen von hoher katalytischer Aktivität besiedelt. Es handelt sich dabei um mehr als 400 verschiedene Bakterienspezies und insgesamt bis zu 10^{13} Bakterienzellen. Trotz verschiedener Überschneidungen und Ähnlichkeiten weist die Zusammensetzung der Darmflora hohe interindividuelle Unterschiede auf, weshalb auch der Flavonoidstoffwechsel im Dickdarm individuellen Schwankungen unterliegt. Generell nimmt der Dickdarm eine bedeutende Stellung im Stoffwechsel der Flavonoide ein [POSSEMIERS ET AL. 2011, D'ARCHIVIO ET AL. 2010, WILLIAMSON UND CLIFFORD 2010, NEMETH UND PISKULA 2007, CLIFFORD 2004, HIGDON UND FREI 2003, BLAUT ET AL. 2003, RICE-EVANS ET AL. 2000].

Zu den polyphenolischen Substraten der Dickdarmflora zählen:

- nicht im Dünndarm absorbierte Flavonoid-O-Glykoside und Aglykone (in erster Linie Catechine)
- über das Multidrug Resistenz-assoziierte Protein 2 (MRP-2) rücktransportierte Flavonoidaglykone sowie deren Phase-2-Metabolite
- Flavonoidrhamnose (z. B. Rutin)
- über die Galle exkretierte hydrophile Phase-2-Flavonoidkonjugate
- Flavonoid-C-Glykoside.

2.4.2.1 Flavonoid-O-Glykoside / Aglykone im Dickdarm

Die Mikroflora des Dickdarms exprimiert Glukuronidasen, Sulfatasen und Glykosidasen und vermag damit die jeweiligen Aglykone aus den Flavonoidglykosiden freizusetzen. Diese

können nachfolgend absorbiert werden oder es kommt, wie In-vitro-Studien mit humanen Darmbakterien zeigen konnten, in Folge der weiteren enzymatischen Einwirkung zur Öffnung des heterocyclischen C-Rings und zur Bildung phenolischer Spaltprodukte. Diese Reaktionen erfolgen vermutlich gemäß des in Abbildung 8 dargestellten Schemas, das die Bildung phenolischer Spaltprodukte beispielhaft anhand des Naringenins zeigt.

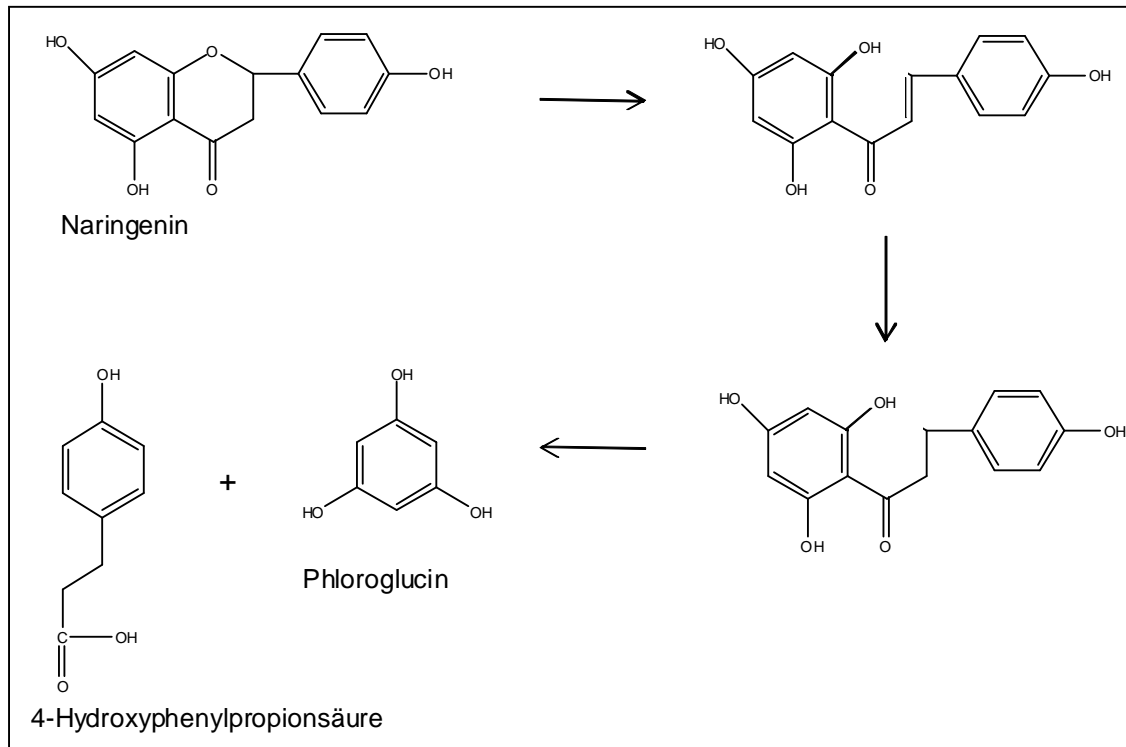


Abbildung 8: Spaltung von Naringenin zu Phloroglucin und 4-Hydroxyphenylpropionsäure durch die Dickdarmflora [POSSEMIERS ET AL. 2011]

Weitere in In-vitro-Versuchen mit humanen Darmbakterien (u. a. *Eubacterium Ramulus* und Darmbakterien der Gattung *Clostridium* und *Bacteroides*) unter Verwendung von Flavonoid-O-Glykosiden (Quercitrin, Rutin, Naringin) und verschiedenen Aglykonen (Quercetin, Luteolin, Orientin, Kaempferol, Naringenin) detektierte Spaltprodukte konnten als Phenylpropion- (3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure, 3-Phenylpropionsäure) (Abbildung 9) und Phenylessigsäuren (4-Hydroxyphenylessigsäure, 3-Hydroxyphenylessigsäure, 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure) identifiziert werden (Abbildung 10) [POSSEMIERS ET AL. 2011, RECHNER ET AL. 2004, BLAUT ET AL. 2003, BRAUNE ET AL. 2001, SCHNEIDER UND BLAUT 2000, WINTER ET AL. 1989, BOKKENHEUSER ET AL. 1987].

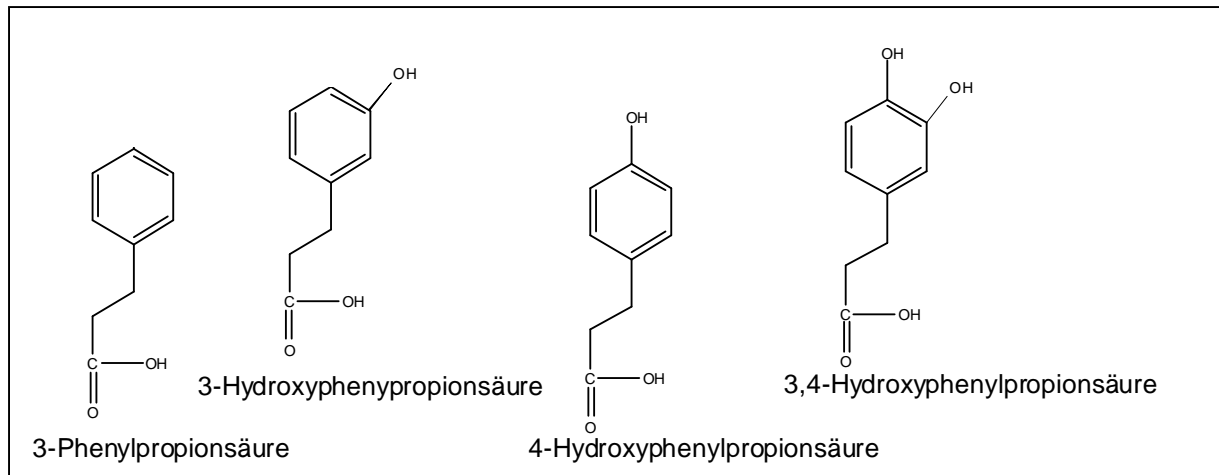


Abbildung 9: Phenylpropionsäuren als Spaltprodukte der Flavonoiden im Dickdarm [POSSEMIERS ET AL. 2011, RECHNER ET AL. 2004, BLAUT ET AL. 2003, BRAUNE ET AL. 2001, SCHNEIDER UND BLAUT 2000, WINTER ET AL. 1989, BOKKENHEUSER ET AL. 1987]

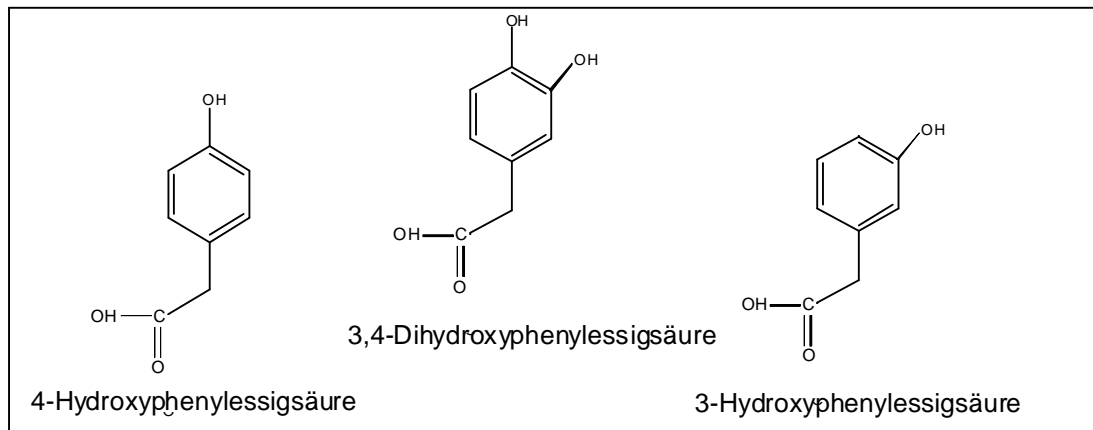


Abbildung 10: Phenylelessigsäuren als Spaltprodukte der Flavonoide im Dickdarm [POSSEMIERS ET AL. 2011, RECHNER ET AL. 2004, BLAUT ET AL. 2003, BRAUNE ET AL. 2001, SCHNEIDER UND BLAUT 2000, WINTER ET AL. 1989, BOKKENHEUSER ET AL. 1987]

In Humanstudien waren nach oraler Einnahme von Flavonoid-O-Glykosiden übereinstimmend mit den In-vitro-Versuchen sowohl Hydroxyphenylpropion- als auch Hydroxyphenylelessigsäuren im Blut und Urin detektierbar. Weiterhin wurden im Urin auch Hydroxyhippursäuren identifiziert. Diese werden vermutlich postabsorptiv in der Leber aus den im Dickdarm entstandenen Phenylpropionsäuren gebildet [CLIFFORD 2004, OLTHOF ET AL. 2003, JAGANATH ET AL. 2006, OLTHOF ET AL. 2003, RECHNER ET AL. 2002, SAWAI ET AL. 1987]. Die Aufnahme der Spaltprodukte erfolgt möglicherweise über den MCT-1 [CLIFFORD 2004].

2.4.2.2 Flavonoid-C-Glykoside im Dickdarm

Der Metabolismus der Flavonoid-C-Glykoside im Dickdarm gleicht im Prinzip dem der O-Glykoside, ist bei ersteren jedoch möglicherweise von größerer Bedeutung. KREUZ ET AL. [2008] und STALMACH ET AL. [2009A] nehmen an, dass die Rooibosflavonoide aufgrund ihrer C-glykosidischen Bindung den Dickdarm größtenteils intakt erreichen, wo sie durch die Mikroflora zu phenolischen Säuren abgebaut und teilweise absorbiert werden. Diese Annahme wird durch verschiedene Tierstudien bestätigt. So wurden nach oraler Applikation von Flavonoid-C-Glykosiden (u. a. Orientin, Vitexin, Isovitexin, Aspalathin) die jeweiligen Aglykone sowie phenolischen Säuren im Urin und Fäzes der Versuchstiere identifiziert [KREUZ ET AL. 2008, ZHANG ET AL. 2007A].

SANUGUL ET AL. [2005] konnten *in vitro* die humanphysiologische Relevanz dieser Ergebnisse bestätigen und zeigen, dass humane Darmbakterien in der Lage sind Flavonoid-C-Glykoside aufzuspalten. Erster Schritt ist dabei die hydrolytische Spaltung der glykosidischen Bindung durch die Mikroflora. In Folgereaktionen wird das freigesetzte Aglykon zu Phenolsäuren abgebaut. Im Falle des Isovitexin konnte auf diesem Weg das korrespondierende Aglykon Apigenin sowie Phloroglucin und 4-Hydroxyphenylpropionsäure gebildet werden (Abbildung 11).

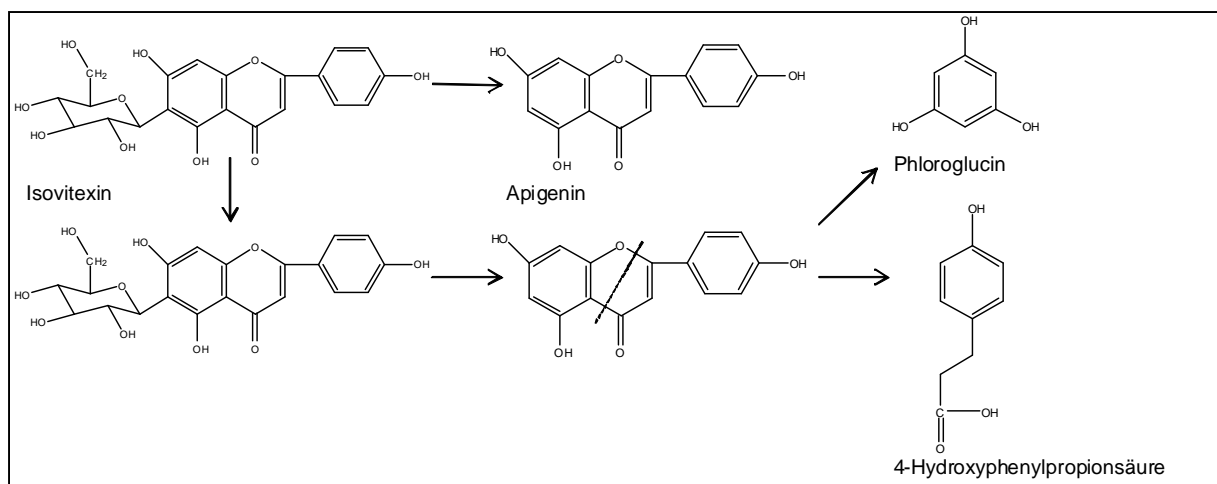


Abbildung 11: Gastrointestinaler Metabolismus von Isovitexin [ZHANG ET AL. 2007A]

Ausgehend von dem Flavonoid-C-Glykosid Homoorientin entstand neben dem korrespondierenden Aglykon Luteolin ebenfalls Phloroglucin sowie 3,4-Dihydroxyphenylpropionsäure (Abbildung 12).

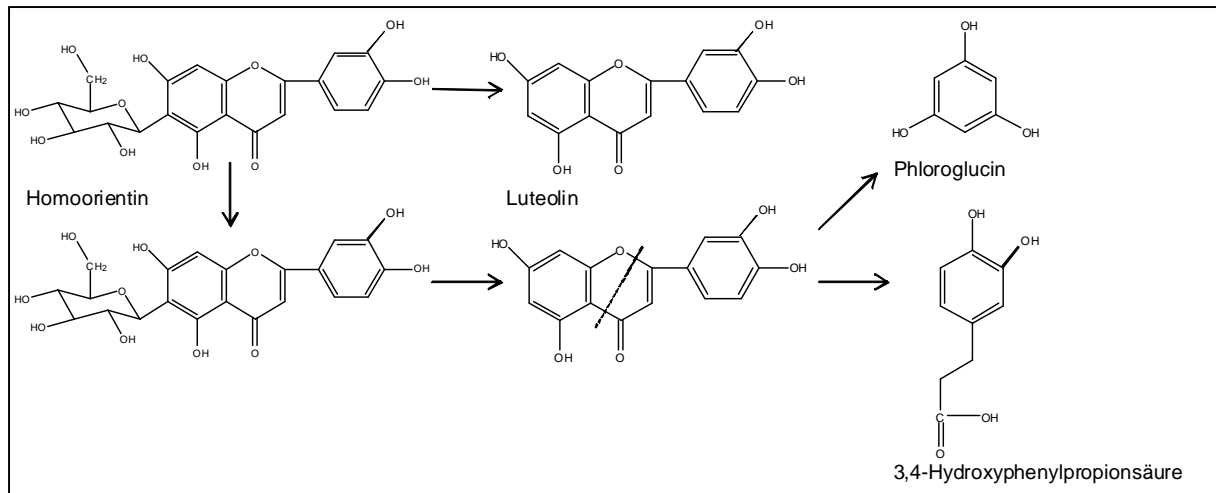


Abbildung 12: Gastrointestinaler Metabolismus von Homoorientin [ZHANG ET AL. 2007A]

Die dargestellten Mechanismen und Spaltprodukte gelten zudem auch für die Flavonoid-C-Glykoside Vitexin und Orientin, die sich von dem Isovitexin bzw. dem Homoorientin lediglich durch die Position des Zuckers im Molekül unterscheiden [ZHANG ET AL. 2007A].

2.4.3 Postabsorptiver Metabolismus

Im Folgenden soll der postabsorptive Metabolismus der Flavonoide dargestellt werden. Der Großteil solcher mechanistischen Untersuchungen erfolgte dabei anhand von Flavonoid-O-Glykosiden und Aglykonen (v. a. Quercetin, Catechine). Zahlreiche Erkenntnisse leiten sich zudem aus in Human- und Tierstudien detektierten Metaboliten ab. In In-vitro-Versuchen generierte und nach oraler Applikation von C-Glykosiden in Tier- und Humanstudien erfasste Metabolite lassen darauf schließen, dass diese ähnlich metabolisiert werden wie die zuvor genannten.

2.4.3.1 Flavonoid-O-Glykoside/Aglykone

Die Flavonoide unterliegen im postabsorptiven Stoffwechsel einem extensiven Phase-2-Metabolismus. Neben der Leber ist besonders der Dünndarm für diesen First-Pass-Metabolismus der Flavonoide verantwortlich (Abbildung 13) [LIU UND HU 2007, LAMBERT ET AL. 2007B, MANACH ET AL. 2004].

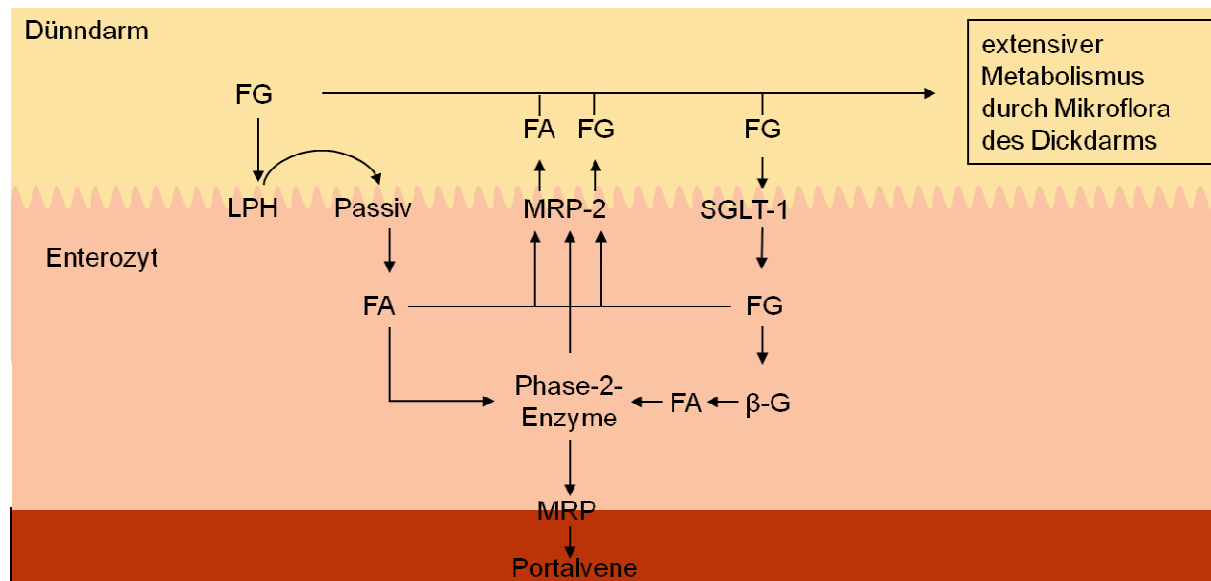


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Flavonoidmetabolismus der Flavonoid-O-Glykoside im Dünndarm

FG = Flavonoidglykosid, FA = Flavonoidaglykon, LPH = Laktase-Phlorizin-Hydrolase, MRP-2 = Multidrug Resistenz-assoziiertes Protein 2, SGLT-1 = Natriumabhängiger Glukosetransporter, β -G = zytosolische β -Glukosidase

Ein Großteil der absorbierten Flavonoide wird im Enterozyten glukuronidiert [DONOVAN ET AL. 2006]. Diese Reaktion wird durch eine UDP-Glucuronosyl-Transferase (UGT), ein membrangebundenes Enzym, das im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, katalysiert. Die UGT überträgt Glukuronsäure u. a. auf Xenobiotika sowie zahlreiche Nahrungsbestandteile, zu denen auch die Polyphenole zählen [SPENCER ET AL. 1999, PISKULA UND TERA0 1998]. PETRI ET AL. [2003] erbrachten in einer Humanstudie unter Verwendung einer In-vivo-Perfusionstechnik (Loc-I-Gut[®]) den direkten Nachweis einer intestinalen Glukuronidierung oral aufgenommener Flavonoid-O-Glykoside. Zu den bevorzugten Positionen der Glukuronidierung zählen die Hydroxygruppen in 7, 3, 3' und 4' [BOERSMA ET AL. 2002].

Neben Glukuronidierungen konnten in Tierstudien auf intestinaler Ebene auch Methylierungen und im begrenzten Umfang Sulfatierungen nachgewiesen werden [DONOVAN ET AL. 2006, DONOVAN ET AL. 2001, KUHNLE ET AL. 2000, CRESPI ET AL. 1999, PISKULA UND TERA0 1998]. MULLEN ET AL. [2006] detektierten übereinstimmend damit in einer Humanstudie nach oraler Ingestion von Quercetin neben glukuronidierten ebenfalls sulfatierte Metabolite im Plasma der Probanden. Ausgehend vom Detektionszeitpunkt vermuten die Autoren, dass die Sulfatierung auf intestinaler Ebene stattfindet. Diese Annahme wird durch In-vitro-Studien (Caco-2-Zell-Modell) gestützt [VAIDYANATHAN UND WALLE 2002, WALLE ET AL. 1999A]. Bei den katalysierenden Enzymen handelt es sich um zytosolisch lokalisierte Sulfotransferasen, die eine Sulfatgruppe von 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat auf die Hydroxygruppe des Flavonoids übertragen [HUANG ET AL. 2009].

Tierversuche zeigten, dass die Sulfatierung im Vergleich zur Glukuronidierung ein Stoffwechselweg mit einer vergleichsweise höheren Affinität, jedoch niedrigeren Kapazität ist. Eine steigende Ingestionsdosis an Flavonoiden führt demnach zu einer Verschiebung von Sulfatierungs- zu Glukuronidierungsreaktionen [KOSTER ET AL. 1981].

Neben den beschriebenen Reaktionen ist auch die Methylierung von Flavonoiden von Relevanz [GRAEFE ET AL. 2001, OLTHOF ET AL. 2000]. Diese Reaktion wird durch Catechol-O-Methyltransferasen (COMT) katalysiert. Das Enzym ist in zahlreichen Geweben lokalisiert, die Aktivität jedoch in der Leber und den Nieren am höchsten [D'ARCHIVIO ET AL. 2007]. Die Voraussetzung für die Enzymaktivität und gleichzeitig auch die Zielstruktur der Enzymwirkung ist die Catecholstruktur im B-Ring der Flavonoide. Es existieren keine Belege für Methylierungen anderer Hydroxygruppen im Molekül [DAY ET AL. 2004].

Einem Review aus dem Jahre 2004 folgend ist davon auszugehen, dass lediglich 5-10 % der im Dünndarm absorbierten Flavonoide die Zirkulation in unmetabolisierter Form erreichen. Dies verdeutlicht die hohe Effektivität enterozytärer Metabolisierungsreaktionen [CLIFFORD 2004]. Vom Enterozyten aus erreichen die Flavonoide, gebunden an das Plasmaprotein Albumin, über die Portalvene die Leber [BOLLI ET AL. 2010, DONOVAN ET AL. 2006, DANGLES ET AL. 2001]. Wie In-vitro-Untersuchungen im Caco-2-Zell-Modell zeigten, erfolgt der basolaterale Efflux durch Multidrug Resistenz-assoziierte Proteine (MRP 1 und MRP 3), die der Familie der ABC-Transporter zugehörig sind [ZHANG ET AL. 2007B]. Die Transmembranproteine, insbesondere die Isoform MRP-2, bewirken aufgrund ihrer apikalen Lokalisation jedoch auch einen luminalen Efflux, der die Bioverfügbarkeit limitiert [LAMBERT ET AL. 2007A, WALLE 2004, WALGREN ET AL. 2000, WALLE ET AL. 1999B]. In-situ-Perfusionsstudien von CRESPI ET AL. [2003] zu Folge schwankte die auf diesem Weg ausgeschiedene Menge, in Abhängigkeit vom jeweiligen Flavonoid, zwischen 10-50 %. PETRI ET AL. [2003] haben die humanphysiologische Relevanz dieses Phänomens bestätigt. Flavonoide bzw. Flavonoidaglykone, die über MRP-2 ausgeschieden werden, erreichen zumeist den Dickdarm, wo sie weiteren Abbauprozessen durch die dortige Mikroflora unterworfen sind.

Die weitere Verstoffwechslung der Flavonoidmetabolite in der Leber ist noch nicht abschließend geklärt. Untersuchungen mit Hep-G2-Zellen und tierexperimentelle Studien lassen jedoch darauf schließen, dass Methylierungen, Sulfatierungen und Glukuronidierungen auch hier die dominierenden Reaktionen darstellen [STALMACH ET AL. 2009A, O'LEARY ET AL. 2003, DAY ET AL. 2001, GALIJATOVIC ET AL. 1999, PISKULA UND TERAO 1998]. Neben diesen Phase-2-Reaktionen kann es auf hepatischer Ebene auch zu Deglukuronidierungen kommen, die von Reglukuronidierungen in anderen Positionen und Sulfatierungen gefolgt sind [MULLEN ET AL. 2006, O'LEARY ET AL. 2003]. In dem Großteil der

Humanstudien, in denen Flavonoid-O-Glykoside und/oder Flavanole verabreicht wurden, stellten die einfach glukuronidierten Metabolite die zirkulierende Hauptfraktion dar. Sulfatierte Metabolite machten ebenfalls einen beachtlichen Anteil der Metabolite aus [BRAND ET AL. 2010, CROZIER ET AL. 2009, LAMBERT ET AL. 2007B, MULLEN ET AL. 2006, DUPONT ET AL. 2004, MANACH ET AL. 2004, MENG ET AL. 2004, MANACH ET AL. 2003, SHELNUTT ET AL. 2002, DAY ET AL. 2001, SETCHELL ET AL. 2001, WALLE ET AL. 2001].

Verschiedene experimentelle Tieruntersuchungen ergaben, dass die Leber nicht nur an der Metabolisierung der Flavonoide, sondern über die Bildung der Galle auch direkt an ihrer Exkretion beteiligt ist. Auf diesem Weg ausgeschiedene Phase-2-metabolisierte Flavonoide erreichen den Dünn- und Dickdarm und unterliegen, insbesondere im letzteren, einer Reabsorption. Ähnlich verschiedenen Pharmaka kommt es somit zu einer enterohepatischen Zirkulation, die zu längeren Verweilzeiten der Flavonoide im Organismus führen kann [CRESPY ET AL. 2003, CHEN ET AL. 2003, LIU ET AL. 2003, SFAKIANOS ET AL. 1997]. Tierexperimentelle Untersuchungen mit Ratten haben gezeigt, dass die biliäre Ausscheidung im Falle der Catechine bis zu 40 % der oral verabreichten Catechinmenge erreichte [HOLLMAN UND KATAN 1998]. Daten aus Humanstudien verdeutlichen die humanphysiologische Relevanz des enterohepatischen Kreislaufs im Flavonoidstoffwechsel. Nach der Ingestion von Flavonoid-O-Glykosiden konnten im Plasma zwei separate Anstiege der Flavonoidkonzentration detektiert werden. Ein solcher Plasmaverlauf ist charakteristisch für Substanzen, die dem enterohepatischen Kreislauf unterliegen [MANACH ET AL. 2003; SETCHELL ET AL. 2001].

2.4.3.2 Flavonoid-C-Glykoside

Wie unter 2.4.3.1 beschrieben nehmen Phase-2-Reaktionen im Stoffwechsel der Flavonoid-O-Glykoside und Aglykone eine zentrale Position ein.

Die Ergebnisse aus In-vitro-Studien lassen vermuten, dass dies auch für die Flavonoid-C-Glykoside gilt. VAN DER MERWE ET AL. [2010] konnten zeigen, dass mikrosomale und zytosolische Fraktionen der Rattenleber eine Glukuronidierung und eine Sulfatierung von Aspalathin und eine Glukuronidierung von Nothofagin bewirken. In Versuchen von COURTS UND WILLIAMSON [2009] bestätigte sich die Relevanz von Phase-2-Reaktionen auch unter Verwendung humaner intestinaler und hepatischer zellfreier zytosolischer Extrakte.

Die humanphysiologische Relevanz von Phase-2-Metabolisierungen wurde außerdem durch in Tier- und Humanstudien im Urin detektierte Flavonoidmetabolite belegt [COURTS UND WILLIAMSON 2009, STALMACH ET AL. 2009A, KREUZ ET AL. 2008]. In diesen Untersuchungen zählten methyliertes und glukuronidiertes Aspalathin, Aspalathin in Reinform sowie sulfatierte Metabolite zu den dominierenden Metaboliten (Tabelle 3). Nahezu alle Verbindungen

besaßen die charakteristische C-glykosidische Bindung. Eine Ausnahme stellte das von KREUZ ET AL. [2008] nachgewiesene Aglykon des Aspalathins dar, dass möglicherweise aus einer Spaltung der C-Glykosidischen Bindung im Dickdarm resultiert. Zudem konnte mit dem Eriodictyol ein weiteres Flavonoidaglykon nachgewiesen werden, das in Folge oxidativer Prozesse aus dem Aglykon des Aspalathins entstanden sein kann.

Tabelle 3: Nach oraler Applikation von Rooibosprodukten im Urin detektierte Metabolite des Aspalathins

Studien	Detektierte Metabolite
KREUZ ET AL. [2008]	<ul style="list-style-type: none"> • Aspalathin • Me-O-Aspalathin • Aspalathin-O-GlcA • Me-O-Aspalathin-O-GlcA • Aspalathin-O-GlcA (Aglykon) • Me-O-Eriodictyol-O-GlcA
COURTS U. WILLIAMSON [2009]	<ul style="list-style-type: none"> • Me-O-Aspalathin • Me-O-Aspalathin-O-GlcA
STALMACH ET AL. [2009A]	<ul style="list-style-type: none"> • Me-O-Aspalathin-O-GlcA • Aspalathin-O-Sulfat • Me-O-Aspalathin-O-Sulfat • Aspalathin-O-GlcA • Eriodictyol-O-Sulfat

Me = Methyl, GlcA = Glukuronsäure

2.4.4 Exkretion der Flavonoide

Die Flavonoide können auf verschiedenen Wegen ausgeschieden werden, wobei die Exkretion über den Fäzes aufgrund ihrer geringen Bioverfügbarkeit häufig die Hauptausscheidungsroute darstellt. Absorbierte Flavonoide und ihre Metabolite werden renal und partiell auch biliär exkretiert.

2.4.4.1 Flavonoid-O-Glykoside/Aglykone

WALLE ET AL. [2001] konnten in einer Humanstudie nach oraler Applikation von Chrysin im Fäzes der Studienteilnehmer deutlich höhere Mengen des Flavons ermitteln als im Urin. Basierend auf tierexperimentellen Untersuchungen und Caco-2-Zell-Studien ist anzunehmen, dass neben der geringen Bioverfügbarkeit auch der MRP-2 vermittelte Efflux sowie die biliäre Ausscheidung hierzu beigetragen haben [WALLE ET AL. 2001, 1999A]. HOLLMAN UND KATAN [1998] haben sowohl Tier- als auch Humanstudien ausgewertet, in denen die Exkretion von Flavonoiden untersucht wurde. Dabei konnten sie ebenfalls feststellen, dass im Großteil der Studien die Ausscheidung über den Fäzes die quantitativ bedeutendere Route darstellte. Im Falle der Catechine wurde in Tierversuchen gezeigt, dass die Ausscheidungsroute zudem in Abhängigkeit des jeweiligen Catechins differierte; so

erfolgte die Ausscheidung von Epigallocatechingallat (EGCG) nahezu ausschließlich über die Galle, während die Exkretion von Epigallocatechin (EGC) und Epicatechin (EC) auch über den Urin geschah [CHEN ET AL. 1997]. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus Humanstudien, in denen im Urin der Studienteilnehmer nach oraler Applikation von grünem Tee größtenteils EGC und EC erfasst wurden, während EGCG nicht bzw. nur in Spuren vorlag. Die Menge der im Urin detektierten Metabolite war jedoch in Bezug zur applizierten Menge nur gering [LEE 2002, STALMACH ET AL. 2010, STALMACH ET AL. 2009B]. Einer Studie mit Ileostomierten ergab, dass die Menge renal ausgeschiedener Catechine geringer war, als die in der ilealen Flüssigkeit detektierte Menge. Bei Gesunden wäre diese vom Dünndarm in den Dickdarm übergegangen [STALMACH ET AL. 2009B].

2.4.4.2 Flavonoid-C-Glykoside

In experimentellen Tierstudien konnte belegt werden, dass oral applizierter C-Glykoside, vermutlich aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit, primär über die Fäzes ausgeschieden werden. Im Urin waren nur vergleichsweise wenige Metabolite enthalten [ZHANG ET AL. 2007A, MA ET AL. 2007]. In Humanstudien wurden nach der Aufnahme von Flavonoid-C-Glykosiden zumeist ebenfalls nur sehr geringe Menge der Flavonoide im Urin detektiert [COURTS UND WILLIAMSON 2009, STALMACH ET AL. 2009A].

2.4.5 Zusammenfassende Betrachtung des Flavonidstoffwechsels

Wie in den vorhergegangenen Abschnitten dargestellt, ist der Metabolismus der Flavonoide ein komplexer Prozess, der sich über sämtliche Organe des Verdauungstraktes erstreckt, wobei Dünn- und Dickdarm sowie die Leber eine zentrale Stellung einnehmen

Das in Abbildung 14 dargestellte Schema des humanen Flavonid-Stoffwechsels fasst die prä- und postabsorptiven Mechanismen, denen die Flavonoid-O- und C-Glykoside sowie die Flavanole unterliegen, zusammen.

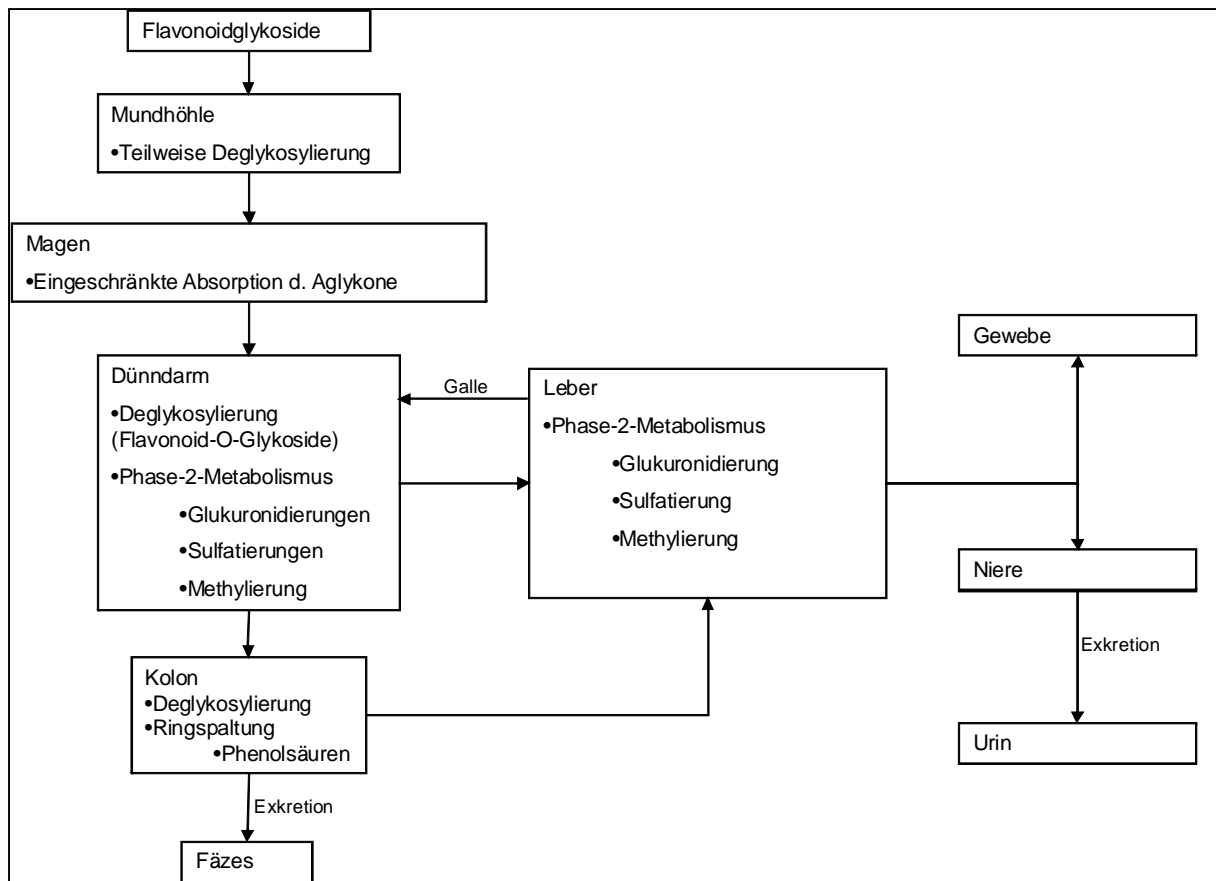


Abbildung 14: Propagierter In-vivo-Metabolismus der Flavonoide [nach SPENCER UND RICE-EVANS 2003, RICE-EVANS ET AL. 2000]

2.5 Antioxidative Wirkung der Flavonoide

Lange Zeit galten die sekundären Pflanzenstoffe, zu denen auch die Flavonoide zählen, lediglich als antinutritive Pflanzenstoffe, die eine maximale Verwertung der Nährstoffe einschränken (z. B. Herabsetzung der Proteinverdaubarkeit). Mit zunehmender Kenntnis ihres gesundheitsfördernden Potentials kam es jedoch zu einem Paradigmenwechsel und einer Neubewertung ihrer gesundheitlichen Bedeutung. Im Zuge dessen wird inzwischen davon ausgegangen, dass auch Flavonoide ähnlich vielen anderen Pflanzeninhaltsstoffen, normale Verzehrsgewohnheiten vorausgesetzt, gesundheitsfördernde und -erhaltende Eigenschaften besitzen [CARLE 2010, HAHN ET AL. 2006, WATZL UND LEITZMANN 1999]. Hierbei steht häufig die in zahlreichen In-vitro-Versuchen belegte antioxidative Wirkung im Mittelpunkt.

Die Flavonoide sind aufgrund ihrer strukturellen Merkmale in der Lage, Radikale und reaktive Sauerstoffspezies, wie z. B. das Superoxid-, Peroxyl-, Alkoxy- und Hydroxylradikal zu neutralisieren [DEGRAFT-JOHNSON ET AL. 2007, RICE-EVANS ET AL. 2000, RICE-EVANS 2001, COTELLE 2001, PIETTA 2000, SHACKELFORD ET AL. 2000, PRIOR UND CAO 1999]. Im menschlichen Organismus können diese Moleküle verschiedene Biomoleküle oxidativ

schädigen und sind somit an der Pathogenese von Erkrankungen wie Atherosklerose und Krebs beteiligt. Flavonoiden wird deshalb vor allem eine protektive Wirkung bei Erkrankungen zugesprochen, in denen „oxidativer Stress“ ein zentraler Faktor in der Pathogenese ist. Epidemiologische Studien zeigen, dass eine inverse Beziehung zwischen der Aufnahme von flavonoidreichen Produkten und der Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen, Krebs und Diabetes besteht [ARTS UND HOLLMAN 2005, MARON 2004, KNEKT ET AL. 2002].

Die Befähigung eines Flavonoids als Antioxidans zu agieren, resultiert aus:

- der Fähigkeit, Metalle zu komplexieren und damit zu inaktivieren
- der Anwesenheit von Hydroxygruppen, die die Fähigkeit haben, als Elektronendonatoren/Wasserstoffdonatoren zu wirken
- und der Möglichkeit, das daraus resultierende, ungepaarte Elektron über die Bildung eines stabilen Phenoxylradikals zu delokalisieren.

[MUSIALIK ET AL. 2009]

Der Begriff des Antioxidans ist bisher nicht einheitlich definiert. Einer bis heute gängigen Definition zur Folge ist ein Antioxidans eine Substanz, die bei Anwesenheit in einer, im Vergleich zu einer oxidierbaren Substanz, geringeren Konzentration, die Oxidation dieser signifikant hemmen oder verzögern kann [HALLIWELL ET AL. 1995]. Im Jahre 2007 simplifizierte HALLIWELL [2007] diese Definition und berücksichtigte damit, dass antioxidativ wirksame Stoffe wie z. B. Albumin in höherer Konzentration vorliegen können als die Zielmoleküle. Demzufolge ist jede Substanz eine Antioxidans, die die oxidative Schädigungen eines Zielmoleküls verzögern und/oder verhindern kann.

Im Folgenden soll genauer auf die radikalneutralisierende Aktivität der Flavonoide eingegangen werden. Dabei wird, in Anlehnung an MACDONALD-WICKS ET AL. [2006], zwischen den Begrifflichkeiten der antioxidativen Aktivität und der antioxidativen Kapazität differenziert. Während ersteres auf die Reaktion zwischen einem spezifischen Antioxidans (z. B. Vitamin C) und einem spezifischen Oxidans (z. B. Peroxylradikalen) abzielt, bezieht sich letzteres auf die Reaktion zwischen einem Radikal und einem heterogenen Gemisch von Antioxidantien. Eine nähere Charakterisierung der antioxidativen Aktivität einer spezifischen Komponente ist diesem Fall nicht möglich.

Zumeist verläuft die Reaktion zwischen phenolischen Antioxidantien und Radikalen gemäß der in Abbildung 15 gezeigten Reaktionsformel:



Abbildung 15: Hydrogen Atom Transfer (HAT)

Es muss jedoch beachtet werden, dass die radikalneutralisierende Reaktion nicht ausschließlich über den Hydrogen-Atom-Transfer verlaufen kann, sondern auch über die Abgabe eines Elektrons (Abbildung 16).



Abbildung 16: Single Electron Transfer followed by Proton Transfer (SET-PT)

Beide Reaktionen treten vermutlich parallel auf, wobei der Hydrogen-Atom-Transfer dominant ist und die Elektronenübertragung primär nach vorheriger Deprotonierung an Relevanz zunimmt, wie Versuche mit Flavonen zeigen. Unabhängig von der jeweiligen Reaktion entsteht dasselbe Reaktionsprodukt [KLEIN UND LUKES 2007, LEMAŃSKA ET AL. 2001, WRIGHT ET AL. 2001]. Neben den beschriebenen Mechanismen wird zudem ein als SPLET (Sequential Proton Loss Electron Transfer) titulierter antioxidativer Reaktionsmechanismus diskutiert, bei dem es zu einer sequentiellen Deprotonierung mit anschließender Elektronenabgabe kommt. Reaktionsmedien, die eine Ionisation unterstützen, begünstigen Reaktionen gemäß dieses Mechanismus [KLEIN UND LUKES 2007, LITWINIENKO UND INGOLD 2005].

2.5.1 Antioxidative Testsysteme

Mit voranschreitender Erkenntnis von der Bedeutung freier Radikale und oxidativer Prozesse in der Pathogenese chronischer Erkrankungen nahm auch die ernährungsphysiologische Relevanz zu, die Antioxidantien bzw. antioxidantienreichen Lebensmitteln beigemessen wird. Im Zuge dessen wurden zahlreiche Methoden entwickelt, mit denen die antioxidative Aktivität von Flavonoiden und die antioxidative Kapazität komplexer polyphenolhaltiger Gemische erfasst werden kann. Zunehmend finden solche Testsysteme auch bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität biologischer Proben Anwendung.

Die Einteilung dieser Methoden kann entsprechend der zu Grunde liegenden Mechanismen, in Hydrogen Atom Transfer (HAT)- und Single Electron Transfer (SET)-basierte Methoden erfolgen [MAGALHÃES ET AL. 2008, MACDONALD-WICKS ET AL. 2006, HUANG ET AL. 2005, PRIOR ET AL. 2005].

HAT-Tests

Die HAT-Tests messen die Befähigung eines Antioxidans, eine reaktive Spezies über einen Wasserstoffatomtransfer zu neutralisieren. Zumeist basieren diese Assays auf einem kompetitiven Reaktionsmechanismus. Bei der Reaktionslösung handelt es sich um ein Drei-Komponenten-System, das die zu testende Probe/Antioxidans, ein Indikatormolekül (häufig ein Fluorophor) sowie eine reaktive Spezies (häufig freie Radikale) umfasst. Die

Antioxidantien konkurrieren mit dem Indikatormolekül um eine Reaktion mit der reaktiven Spezies und können das Indikatormolekül somit vor einer Oxidation schützen (Abbildung 17). Die Quantifizierung des Indikatormoleküls nach einer definierten Zeitspanne, z. B. anhand einer Fluoreszenzmessung, ermöglicht es, die Menge der enthaltenen Antioxidantien zu bestimmen.

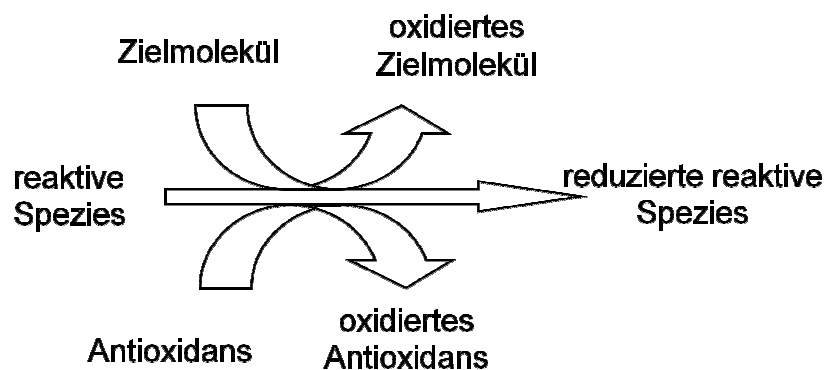


Abbildung 17: Reaktionsprinzip kompetitiver Messmethoden [MAGALHÃES ET AL. 2008]

SET-Tests

Im Vergleich zu den HAT-Tests messen SET-basierte Methoden die Fähigkeit von Antioxidantien, reaktive Spezies durch die Übertragung von Elektronen zu neutralisieren. In diesen Testsystemen kommt eine Zwei-Komponenten-Lösung zum Einsatz. Neben der Probe bzw. dem Antioxidans ist lediglich eine reaktive Spezies enthalten, die gleichzeitig das Indikatormolekül darstellt. In einer nichtkompetitiven Reaktion abstrahiert die reaktive Spezies ein Elektron aus den Antioxidantien, verändert dadurch ihre Farbe und gibt somit Aufschluss über den Gehalt an Antioxidantien (Abbildung 18).

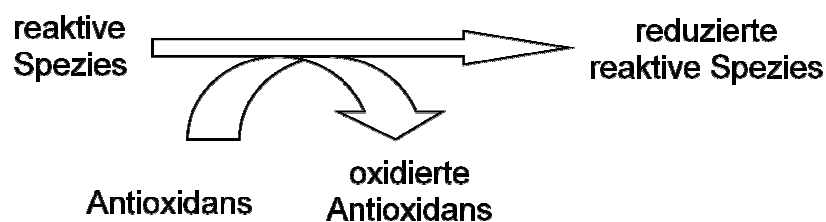


Abbildung 18: Reaktionsprinzip nicht-kompetitiver Messmethoden [MAGALHÃES ET AL. 2008]

Im Folgenden sollen die gängigsten Methoden, zu denen

- der **Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay (ORAC)**
- der **Ferric Reducing Ability of Plasma Assay (FRAP)**
- der **Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay (TEAC) / 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonsäure) Assay (ABTS)**
- der **2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Assay (DPPH)**

zählen, kurz beschrieben und erläutert werden. In Tabelle 4 sind diese Methoden unter Nennung des Testprinzips sowie einer Beschreibung des Testablaufes dargestellt.

Tabelle 4: Antioxidative Testsysteme

Test-system	Test-prinzip	Reaktive Spezies	Testablauf	Detektions-prinzip
ORAC	HAT	Peroxyradikal (ROO·)	Antioxidantien reagieren mit ROO· und verzögern die radikalinduzierte Schädigung von Fluoreszein (FI)	Abnahme der Fluoreszenz
FRAP	SET	2,4,6-tripyridyl-s-triazin ([Fe(III)-(TPTZ) ₂] ³⁺)	Antioxidantien reagieren mit [Fe(III)-(TPTZ) ₂] ³⁺ wodurch eine tiefblaue Färbung entsteht	Bildung von ([Fe(III)-(TPTZ) ₂] ²⁺)
TEAC/ABTS	SET/ HAT	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure (ABTS ⁺)	Antioxidantien reagieren mit ABTS ⁺ und induzieren damit eine Entfärbung des ABTS ⁺	Abbau von ABTS ⁺
DPPH	SET	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Antioxidantien reagieren mit ABTS und induzieren damit eine Entfärbung des DPPH	Abbau von DPPH

2.5.1.1 TEAC/ABTS

Der TEAC-Assay ist ein photometrisches Messsystem, das zur Erfassung der antioxidativen Kapazität von Lebensmitteln und biologischen Proben verwendet wird. Obwohl der TEAC häufig zu den SET-basierten Testsystemen gezählt wird, können enthaltene Antioxidantien das ABTS⁺ auch über einen Wasserstoffatomtransfer neutralisieren [WOOD ET AL. 2006, PRIOR ET AL. 2005, ANTOLOVICH ET AL. 2002]. Durch die Reduktion des ABTS-Kation entfärbt sich die Reaktionslösung. Mittels einer Trolox-Eichgerade wird das Ergebnis in Troloxequivalente überführt.

Die Erzeugung des ABTS-Radikals kann enzymatisch oder chemisch erfolgen [MAGALHÃES ET AL. 2008, MACDONALD-WICKS ET AL. 2006]. In der ursprünglichen Variante des Tests wurde zur Generierung des ABTS⁺ Metmyoglobin eingesetzt [MILLER ET AL. 1993]. Dieses wurde durch H₂O₂ zu Ferrylmyoglobin aktiviert, welches das ABTS anschließend zu dem blaugrün gefärbten Kation oxidiert. Die Zugabe der Antioxidantien erfolgte vor Bildung des ABTS⁺. Somit wurde neben der radikalangängenden Aktivität der Antioxidantien auch die

Hemmung der Radikalbildung, z. B. durch Reaktion mit dem Wasserstoffperoxid, gemessen. Dadurch kam es leicht zu einer Überschätzung der antioxidativen Kapazität. In einer inzwischen geläufigeren Variante, die auch als ABTS-Assay bekannt ist, wird das ABTS-Radikal hingegen vor Zugabe der Antioxidantien durch Kaliumpersulfat generiert. Somit wird ausschließlich die radikalfangende Wirkung der Probe gemessen [RE ET AL. 1999].

Vorteile/Nachteile

Der TEAC-Assay stellt eine einfache Methode zur Messung der antioxidativen Kapazität dar. Das ABTS-Radikal kann über einen weiten pH-Bereich eingesetzt werden und somit Aufschluss über den Einfluss des pH-Wertes auf die antioxidativen Kapazität geben. Da es sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln löslich ist, kann die antioxidative Kapazität von hydrophilen sowie von lipophilen Proben bestimmt werden.

Kritik an diesem Testsystem bezieht sich in erster Linie auf das verwendete ABTS-Radikal, das in vivo keinerlei Relevanz besitzt. Damit bleiben die physiologische Bedeutung des Tests und die In-vivo-Relevanz gemessener Ergebnisse unklar. Aus thermodynamischer Sicht kann zudem jede Komponente, die ein geringeres Redoxpotential als ABTS^+ (0.68 Volt) aufweist, mit dem Radikal reagieren. Außerdem ist keine deutliche Korrelation zwischen den TEAC-Werten und der Reduktionskapazität eines Antioxidans erkennbar. So wiesen verschiedene Substanzen trotz nahezu identischer struktureller Merkmale häufig stark divergierende antioxidative Aktivitäten auf. Andere Verbindungen, die zur Abgabe mehrerer Elektronen befähigt sind, zeigten hingegen häufig dieselben TEAC-Werte wie Stoffe, die nur ein Elektron donieren können [MAGALHÃES ET AL. 2008, MACDONALD-WICKS ET AL. 2006, HUANG ET AL. 2005, PRIOR ET AL. 2005].

2.5.1.2 DPPH-Assay

Bei DPPH^{\cdot} handelt es sich um eines der wenigen stabilen und kommerziell verfügbaren organischen Stickstoffradikale. Der DPPH-Assay misst die Fähigkeit von Antioxidantien, das DPPH^{\cdot} -Radikal über einen Elektronentransfer zu neutralisieren.

Ursprünglich wurde das DPPH^{\cdot} , das nicht reduziert werden konnte, durch Elektronenspinresonanzspektroskopie (ESR) quantifiziert. Die Signalintensität war invers zu der Konzentration an Antioxidantien. Inzwischen ist die Durchführung als Dekolorationsassay geläufiger. Hierbei wird eine durch die Antioxidantien ausgelöste Entfärbung des DPPH^{\cdot} -Radikals photometrisch gemessen. Der prozentuale Anteil des nach der Reaktion zurückbleibenden DPPH^{\cdot} ist proportional zu dem Gehalt an Antioxidantien. Die Menge an Antioxidantien, die ein Absinken des ursprünglichen DPPH^{\cdot} -Gehalts um 50 % bewirkt, ist als die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) definiert [MAGALHÃES ET AL. 2008, MACDONALD-WICKS ET AL. 2006, HUANG ET AL. 2005, PRIOR ET AL. 2005].

Vorteile/Nachteile

Ebenso wie der TEAC ist der DPPH-Test einfach und schnell durchführbar.

Die Interpretation der photometrischen Testergebnisse wird jedoch erschwert, wenn Substanzen die zur photometrischen Messung verwendete Wellenlänge absorbieren [MAGALHÃES ET AL. 2008]. Zudem handelt es sich bei dem DPPH um ein unphysiologisches Radikal, das nur eine geringe Ähnlichkeit mit Radikalen aufweist, die eine In-vivo-Relevanz besitzen. Demnach zeigten verschiedene Antioxidantien, die schnell mit Peroxylradikalen reagieren, im DPPH-Test zum Teil nur eine sehr langsame oder aufgrund einer sterischen Hinderung gar keine Reaktion. Die physiologische Relevanz des Testsystems ist daher fraglich [MAGALHÃES ET AL. 2008, PRIOR ET AL 2005].

2.5.1.3 FRAP

Der FRAP-Assay wurde von BENZIE UND STRAIN [1998, 1996] entwickelt, um die antioxidative Kapazität von Plasma zu messen. Inzwischen findet er jedoch auch in der Analytik von Lebensmitteln, wie z. B. Tee und Wein, Einsatz.

Es handelt sich um eine SET-basierte, kolorimetrische Methode, die die Fe^{3+} -reduzierende Aktivität von Antioxidantien misst. Der in der sauren Reaktionslösung (pH 3.6) enthaltene farblose, dreiwertige Eisenkomplex (Eisen(III)-Tripyridyltriazin-Komplex $[\text{Fe(III)-(TPTZ)}_2]^{3+}$) wird durch Antioxidantien in einen tiefblauen, zweiwertigen Komplex $([\text{Fe(III)-(TPTZ)}_2]^{2+})$ überführt. Üblicherweise ist hierfür eine Reaktionsdauer von vier Minuten vorgesehen. Das Ausmaß der Färbung kann photometrisch erfasst werden und gibt Aufschluss über die enthaltenen Antioxidantien. Die Quantifizierung erfolgt über eine Eichgerade mit bekannten Mengen an zweiwertigem Eisen [BENZIE UND STRAIN 1996, 1998].

Vorteile/Nachteile

Der FRAP-Test stellt eine schnelle und kostengünstige Methode zur Messung der antioxidativen Kapazität dar. Wie die zuvor beschriebenen Testsysteme ist auch dieser Assay als SET-Test zu klassifizieren [WOOD ET AL. 2006]. Substanzen, die über einen Wasserstoffatomtransfer neutralisierend wirken, wie z. B. Proteine und Thiole, werden nicht oder nur unzureichend erfasst. Die physiologische Relevanz bleibt somit fraglich [Rice-Evans 2000, CAO UND PRIOR 1998]. Jedoch bietet sich der FRAP-Test in Kombination mit einem HAT-Test an, um den dominanten Reaktionsmechanismus einer Substanz zu ermitteln [PRIOR ET AL. 2005]. Die durchschnittliche Reaktionszeit beträgt lediglich vier Minuten, wobei anzumerken ist, dass die Reaktion von manchen Antioxidantien mit dem dreiwertigen Eisen auch nach dieser vorgesehenen Reaktionszeit weiterläuft [PRIOR ET AL. 2005].

Die Messergebnisse korrelieren ähnlich wie beim TEAC-Test nicht mit der Elektronenabgabefähigkeit der Proben. Obwohl sowohl Bilirubin als auch Vitamin C in der Lage sind, zwei Elektronen zu transferieren, zeigt eine äquimolare Menge Bilirubin einen doppelt so hohen FRAP-Wert wie Vitamin C. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass die Reduktionskapazität antioxidativer Substanzen zum Teil durch den niedrigen pH-Wert beeinflusst wird. So ist diese z. B. im Falle der Flavonoide gesenkt, da sie größtenteils protoniert vorliegen, wodurch die Fähigkeit zur Elektronenabgabe reduziert ist [HUANG ET AL. 2005]. Da in dieser Methode weder ein oxidierbares Substrat als Zielmolekül noch ein Radikal verwendet wird, liefert der FRAP-Test keine direkten Informationen über die protektive und radikalneutralisierende Wirkung der Flavonoide [FRANKEL UND MEYER 2000].

2.5.1.4 ORAC

Der ORAC-Assay wurde ursprünglich von CAO ET AL. [1993] entwickelt. Es handelt sich um eine fluorimetrische Methode, mittels derer die Reaktivität von Antioxidantien gegenüber Peroxylradikalen gemessen wird.

Die verwendete Reaktionslösung besteht aus einem Drei-Komponenten-System, das ein Fluorophor (Zielmolekül), ein Radikal (Peroxylradikal) sowie die Probe/Antioxidantien umfasst. Die Antioxidantien können durch einen Wasserstoffatomtransfer die Peroxylradikale neutralisieren und damit die radikalinduzierte Abnahme der Fluoreszenz verzögern. In der ursprünglichen Variante des Tests wurde β -Phycoerythrin (β -PE) zur Erzeugung der Fluoreszenz verwendet [CAO ET AL. 1993]. Es zeigte sich jedoch, dass dieser Fluorophor photolabil ist, chargenabhängig differierende Fluoreszenzeigenschaften aufweist und zudem mit in der Probe enthaltenen Polyphenolen wechselwirkt und somit bereits ohne radikalische Einwirkung Fluoreszenz verliert. Inzwischen wird deshalb überwiegend Fluorescein verwendet [HUANG ET AL. 2005, OU ET AL. 2001]. Das Peroxylradikal entsteht durch die thermische Dekomposition von 2,2'-diazobis(2-amidinopropane)-dihydrochlorid (AAPH) bei 37 °C. Diese Temperatur muss während des gesamten Reaktionsverlaufes konstant gehalten werden.

In Abbildung 19 ist das kompetitive Reaktionsschema des ORAC-Assays schematisch dargestellt

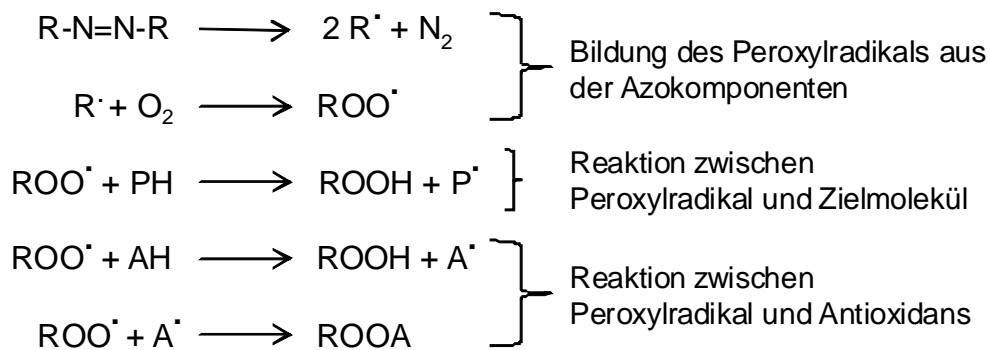


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Reaktionsprinzips des ORAC-Assays [nach MAGALHÃES ET AL. 2008]

ROO[·] = Peroxylradikal, PH = Zielmolekül, AH = Antioxidans

Die Fluoreszenzabnahme wird minütlich gemessen. Zur Quantifizierung der antioxidativen Kapazität wird die Fläche unter der gemessenen Fluoreszenzkurve (Area under the Curve, AUC) ermittelt und um eine Blindwertfläche (Substrat ohne Antioxidantien) bereinigt. Über eine Eichgerade, die mit den AUC-Werten einer Trolox-Kalibrierlösung hergestellt wird, werden die Ergebnisse in Troloxequivalente umgerechnet [HUANG ET AL. 2005, DÁVALOS ET AL. 2004]. Trolox ist ein Vitamin E-Derivat, das als Referenzsubstanz zur Messung der antioxidativen Kapazität dient. Der Zeitraum, über den die Reaktion verfolgt wird, variiert dabei zwischen 30 [OU ET AL. 2001] und 80 min [DÁVALOS ET AL. 2004].

Inzwischen gibt es zudem verschiedene Modifikationen des ORAC-Assays, die es ermöglichen, auch lipophile Proben/Antioxidantien zu messen [HUANG ET AL. 2005, HUANG ET AL. 2002]. Dabei werden entweder lipophile Reagenzien wie BODIPY 665/676 als Fluoreszenz und AMVN (2,2'-Azobis[2,4-dimethylvaleronitril]) als Peroxylgenerator eingesetzt [NAGUIB 2000] oder aber Lösungsvermittler wie methyliertes beta-Zyklohextrin (RMCD) verwendet [PRIOR ET AL. 2003, HUANG ET AL. 2002]. Besonders erstere Methode ist jedoch deutlich weniger sensitiv als der hydrophile ORAC-Assay [HUANG ET AL. 2005].

Vorteile/Nachteile

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen antioxidativen Assays ist das im ORAC-Assay verwendete Radikal (Peroxylradikal) als Initiator pathophysiologischer Reaktionen (Lipidperoxidation) von physiologischer Relevanz. Zudem sollten Tests, die auf dem Wasserstoffatomtransfer beruhen bzw. diesen messen, SET-basierten Methoden vorgezogen werden, da der HAT-Mechanismus, auf dem auch der ORAC-Assay basiert, als der für phenolische Antioxidantien und Flavonoide typische und dominierende Reaktionsmechanismus betrachtet wird [FRANKEL UND FINLEY 2008, AMIC ET AL. 2007, MACDONALD-WICKS ET AL. 2006, WOOD ET AL. 2006, HUANG ET AL. 2005, PRIOR ET AL. 2005, WRIGHT ET AL. 2001]. Die AUC vereint als Zielparame-ter die Hemmungszeit und den

Hemmungsgrad in einer Messgröße. Es wird der Gesamtumfang der antioxidativen Inhibierung erfasst und damit auch der Einfluss von langsam reagierenden und/oder sekundär gebildeten antioxidativen Produkten [MAGALHÃES ET AL. 2008].

Als nachteilig erweist sich, dass die ORAC-Reaktion sehr temperatursensitiv ist und bereits geringe Temperaturschwankungen die Reproduzierbarkeit deutlich mindern [PRIOR ET AL. 2005]. Beim Befüllen der Mikrotiterplatten sollte darauf geachtet werden, dass der äußere Rand ausgespart wird, da Temperaturdifferenzen in den äußeren Wells ebenfalls die Reproduzierbarkeit beeinflussen [LUSSIGNOLI ET AL. 1999]. Im Vergleich zu den bisher vorgestellten antioxidativen Testsystemen ist der Arbeits- und Zeitaufwand vergleichsweise hoch. Eine zeitsparende Vollautomatisierung erfordert jedoch ein kostenintensives Mehrkanal-Liquid-Handling-System und ist aufgrund der hohen Anschaffungskosten nur für größere Auftragslabore eine Alternative.

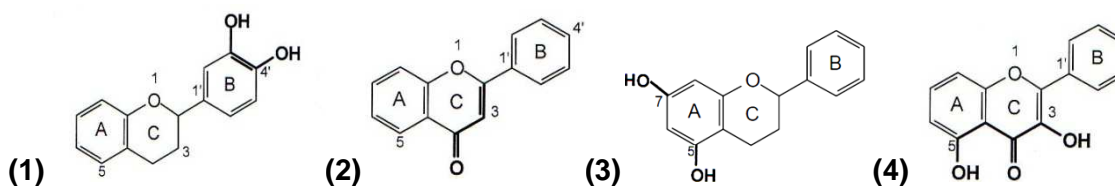
2.5.2 Struktur-Aktivitätsbeziehungen

Die Untersuchung von Struktur-Aktivitätsbeziehungen (SAR) ermöglicht es, die chemischen, biologischen, physikalischen und pharmakologischen Wirkungen eines Stoffes mit der chemischen Struktur in Verbindung zu setzen. BORS ET AL. [1990] konnten bereits früh verschiedene strukturelle Merkmale im Flavonoidmolekül identifizieren, die die hohe radikalneutralisierende Kapazität der Stoffklasse bedingen.

Neben der Anzahl und der Positionierung der OH-Gruppen im Ringsystem [AMIĆ ET AL. 2007] sind besonders die von BORS ET AL. [1990] identifizierten Strukturmerkmale zu nennen. Die Bedeutung dieser Merkmale wurde in weiteren Untersuchungen bestätigt und zum Teil um weitere ergänzt. Somit sind die folgenden Strukturelemente aufzuführen:

- die Catecholgruppe (3', 4'-OH-Gruppe) im B-Ring oder A-Ring (6, 7-OH-Gruppe) **(1)**
- die Doppelbindung zwischen C2-C3 im heterocyclischen C-Ring in Verbindung mit der Ketofunktion an C4 **(2)**
- Hydroxygruppen in den Positionen 5 und 7 im A-Ring **(3)**
- Hydroxygruppen in C3 und C5 in Verbindung mit der Ketofunktion in C4 **(4)**

[AMIĆ ET AL. 2007; TROUILLAS ET AL. 2006, CHOI ET AL. 2002, SILVA ET AL. 2002, CROFT 1998, RICE-EVANS UND MILLER 1998, RICE-EVANS ET AL. 1996, BORS ET AL. 1990].



B-Ring

Der B-Ring bzw. die dort lokalisierte Catecholstruktur (Hydroxygruppen an 3' und 4' (**1**)), ist das zentrale Strukturmerkmal, das für die antioxidative Kapazität eines Flavonoids verantwortlich ist. Durch Abgabe eines Wasserstoffatoms können diese Hydroxygruppen freie Radikale neutralisieren. Das entstehende Phenoxyradikal wird über die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung stabilisiert (Abbildung 20), wodurch auch die Dissoziationsenthalpie der OH-Bindung herabgesetzt ist und die radikalische Spaltung der OH-Gruppe erleichtert wird [SILVA ET AL. 2002, WRIGHT ET AL. 2001].

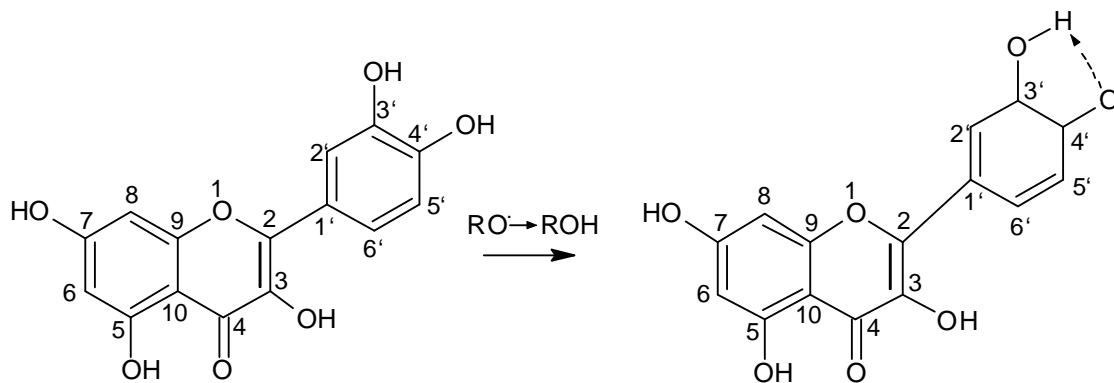


Abbildung 20: Phenoxyradikalstabilisierung über intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung [AMIĆ ET AL. 2007]

Durch den Angriff eines weiteren Radikals an das Phenoxyradikal kommt es zur Bildung eines stabilen Quinons (Abbildung 21).

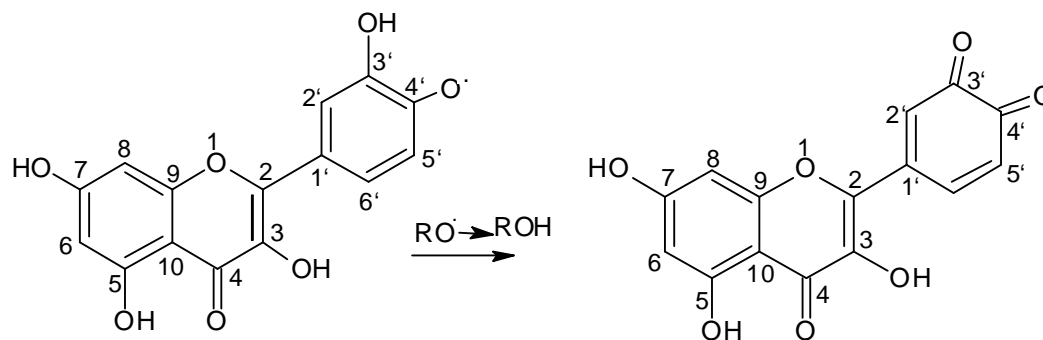


Abbildung 21: Bildung eines stabilen Quinons nach weiterem Radikalangriff [AMIĆ ET AL. 2007]

Wie ein Vergleich zwischen Quercetin und Kaempferol verdeutlicht, ist die antioxidative Aktivität deutlich niedriger, wenn im B-Ring nur eine Hydroxygruppe substituiert ist [RICE-EVANS UND MILLER 1998]. Das alleinige Vorliegen der Catecholstruktur ist, trotz ihrer prominenten Bedeutung für die antioxidative Aktivität, nicht mit der höchst möglichen antioxidativen Wirkung assoziiert. Diese wird erst durch das Zusammenspiel mit weiteren

strukturellen Merkmalen, die vorwiegend im heterocyclischen C-Ring lokalisiert sind, erreicht [RICE-EVANS UND MILLER 1998].

In Flavonoiden, in denen der B-Ring nur eine Hydroxygruppe aufweist und demnach nur partiell zur antioxidativen Wirkung beiträgt, nimmt die Relevanz der restlichen Struktur zu [SILVA ET AL. 2002]. Als Beispiel sei die hohe antioxidative Aktivität des Kaempferols, das über keine Catecholstruktur im B-Ring verfügt, aufgeführt [AMIĆ ET AL. 2003, SILVA ET AL. 2002, VAN ACKER ET AL. 1998]. Laut RICE-EVANS UND MILLER [1998] sind im Falle eines Verlustes der Catecholstruktur außerdem die im A-Ring substituierten OH-Gruppen von Bedeutung.

C-Ring

Der C-Ring kann über verschiedene strukturelle Merkmale zur Antioxidativität des Flavonoidmoleküls beitragen. Hierzu zählen die Doppelbindung zwischen C2-C3, die Ketofunktion an C4 und die Hydroxygruppe an C3 (**2,4**).

Über die Doppelbindung zwischen C2-C3 ist der B-Ring mit der Ketofunktion konjugiert, wodurch eine Elektronendelokalisation vom B-Ring in das Ringsystem ermöglicht wird. Gleichzeitig gewährleistet die Doppelbindung die Planarität des Moleküls, wodurch die Delokalisation erleichtert ist.

Die Hydroxygruppen an C3 und C5 (A-Ring) tragen in Verbindung mit der Ketofunktion in Position C4 des C-Rings ebenfalls zur antioxidativen Aktivität bei, da es somit zu einer Elektronendelokalisation von der Ketofunktion auf diese beiden Substituenten kommen kann. Zudem gewährleistet die Hydroxygruppe an C3 über Wechselwirkungen mit den Wasserstoffatomen in den Positionen 2' und 6' (B-Ring), ebenso wie die Doppelbindung zwischen C2-C3, die Planarität des Moleküls, wodurch die Elektronendelokalisation begünstigt ist [BORS UND MICHEL 2002, SILVA ET AL. 2002, VAN ACKER ET AL. 1998, RICE-EVANS UND MILLER 1998]. Verschiedene Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass die Delokalisation des freien Elektrons im Ringsystem vergleichsweise gering ausfällt. Einer Oxidation des B-Rings folgend verblieb nahezu der gesamte Spin auf dem B-Ring bzw. auf der OH-Gruppe, aus der das Wasserstoffatom (4') abstrahiert wurde [VAN ACKER ET AL. 1996]. Im Gegensatz dazu bestätigten andere Untersuchungen, dass höher konjugierte Flavonoide, wie z. B. das Quercetin, gegenüber weniger konjugierten Flavonoiden, wie z. B. dem Taxifolin (fehlende Doppelbindung in C2-C3), aufgrund der vergleichsweise besseren Befähigung zur Delokalisation eine höhere antioxidative Aktivität besitzen [RICE-EVANS UND MILLER 1998].

A-Ring

Der A-Ring kann die antioxidative Aktivität durch Hydroxygruppen in den Positionen 5 und 7 beeinflussen (3). Dies wird besonders deutlich, wenn im B-Ring keine Catecholstruktur vorliegt. So zeigte ein Vergleich von Naringenin (Hydroxygruppen in 5 und 7) mit Narirutin (keine freie Hydroxygruppe im A-Ring), dass es durch den Verlust einer Hydroxygruppe im A-Ring bereits zu einer deutlichen Abnahme der antioxidativen Aktivität kommt [RICE-EVANS UND MILLER 1998]. Hydroxygruppen, die in einer Catecholstruktur im A-Ring angeordnet sind, entfalten eine vergleichbare antioxidative Wirkung wie eine Catecholstruktur im B-Ring [LEMAŃSKA ET AL. 2001].

Zudem können die Hydroxygruppen in den Positionen 5 und 7 das antioxidative Potential der Hydroxygruppe in C3 des heterocyclischen C-Rings beeinflussen. Durch ihre elektronenschiebende Wirkung schwächen sie die Bindung zwischen dem Sauerstoff und dem Wasserstoff in C3 und erleichtern somit die Abgabe des Wasserstoffatoms [HEIJNEN ET AL. 2001A, HEIJNEN ET AL. 2001B].

2.5.3 Antioxidative Wirkung von Rooibosflavonoiden

Bezug nehmend auf die im vorigen Kapitel dargestellten SAR besitzen die Flavonoide des Rooibos zumeist mehrere strukturelle Merkmale, die mit einer hohen antioxidativen Aktivität in Verbindung stehen (vgl. 2.4.1).

So weisen das Isoquercitrin, das Hyperosid und das Rutin neben der Catecholstruktur im B-Ring eine Doppelbindung in C2-C3 sowie eine Ketofunktion in Position 4 des C-Rings auf. Des Weiteren liegen Hydroxygruppen in den Positionen 5 und 7 des A-Ringes vor. Lediglich die Hydroxygruppe am dritten Kohlenstoffatom des O-heterocyclischen C-Ringes ist nicht verfügbar, da in dieser Position über eine Etherbindung ein Zuckerrest gebunden ist. Orientin und Isoorientin verfügen über identische strukturelle Merkmale, in Position 3 des C-Ringes ist jedoch weder ein Zucker gebunden noch eine freie Hydroxygruppe verfügbar.

Die Antioxidativität des Aspalathins resultiert in erster Linie aus der Catecholstruktur im B-Ring. Im Falle des Nothofagins ist im B-Ring lediglich eine Hydroxygruppe gebunden. Studien mit Phloretin haben jedoch belegt, dass unter Abwesenheit der Catecholstruktur im B-Ring, die Hydroxygruppen in den Positionen C2' und C6' des A-Ringes eine kompensatorische antioxidative Wirkung entfalten [KOZŁOWSKI ET AL. 2007]. In Abbildung 22 sind die Hydroxygruppen, die die antioxidative Wirkung des Aspalathin und des Nothofagin determinieren, zusammenfassend dargestellt.

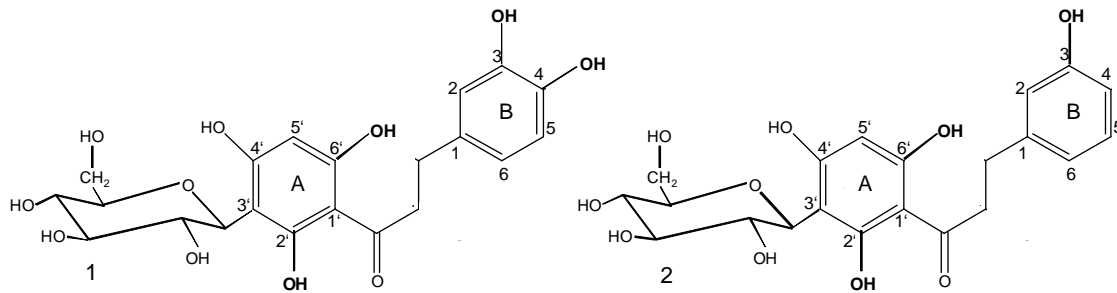


Abbildung 22: Antioxidativ wirksame Hydroxygruppen des Aspalathins (1) und des Nothofagins (2)

Des Weiteren verfügen beide Stoffe über eine 2,4,6-Trihydroxyacetophenonstruktur (Abbildung 23). In-vitro-Versuche haben gezeigt, dass diese Struktur eine hohe antioxidative Aktivität generiert [REZK ET AL. 2002].

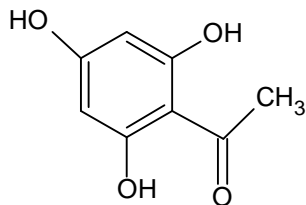


Abbildung 23: 2,4,6-Trihydroxyacetophenon

Als vorherrschender antioxidativer Wirkmechanismus wird im Falle der Chalkone und Dihydrochalkone der HAT angenommen. In Abhängigkeit des vorliegenden Radikals und Reaktionsmediums ist eine Beteiligung des SET jedoch nicht auszuschließen [KOZLOWSKI ET AL. 2007].

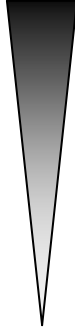
2.5.3.1 Antioxidative Kapazität von Rooibosflavonoiden in vitro

Gemäß ihrer strukturellen Merkmale besitzen die Flavonoide des Rooibos eine voneinander abweichende antioxidative Wirksamkeit. In Tabelle 5 sind Studien dargestellt, die diese vergleichend bestimmt haben. In dem Großteil der Untersuchungen besaß das Aspalathin die höchste antioxidative Aktivität. Die korrespondierenden Flavone, das Orientin und das Isoorientin, zeigten zumeist eine geringere Aktivität [KRAFczyk ET AL. 2009, SINJMAN ET AL. 2009]. Lediglich in den Untersuchungen von JOUBERT ET AL. [2004] war die antioxidative Aktivität des Orientins der des Aspalathins überlegen.

Das Vitexin und das Isovitexin stellen zusammen mit dem Nothofagin die einzigen Inhaltsstoffe des Rooibos dar, die über keine Catecholstruktur verfügen. Die beiden Flavone wiesen somit erwartungsgemäß in allen Untersuchungen die geringste antioxidative Aktivität der untersuchten Flavonoide auf. Ihr Dihydrochalkonanalogen Nothofagin besaß, trotz der ebenfalls fehlenden Catecholstruktur, eine deutlich höhere antioxidative Aktivität. Dies stimmt

mit Erkenntnissen von DZIEDZIC UND HUDSON [1983] überein, nach denen Dihydrochalkone eine höhere antioxidative Aktivität innehaben als die korrespondierenden Flavone.

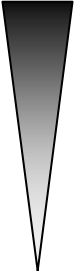
Tabelle 5: Antioxidative Aktivität von Rooibosflavonoiden [KRAFczyk ET AL. 2009, SINJMAN ET AL. 2009, JOUBERT ET AL. 2004]

ABTS	ABTS	DPPH	Antioxidative Aktivität
Aspalathin	Aspalathin	Orientin	
Nothofagin	Nothofagin	Aspalathin	
Isoorientin	Hyperoside	Isoquercitrin	
Orientin	Rutin	Isoorientin	
Hyperoside	Isoorientin	Rutin	
Isoquercitrin	Orientin	Vitexin	
Rutin	Isoquercitrin		
Vitexin	Isovitexin		
Isovitexin	Vitexin		

ABTS = 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure, DPPH = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

In weiteren Untersuchungen wurde auch die antioxidative Kapazität von Rooibostee erfasst und mit der von grünem und schwarzem Tee (*Camellia Sinensis*) verglichen (Tabelle 6). Die Studien zeigten übereinstimmend, dass unfermentierter Rooibostee eine deutlich höhere antioxidative Kapazität besitzt als sein fermentierter Konterpart. Ursache sind die während der Fermentation auftretenden oxidativen Prozesse, die zu einem Verlust der enthaltenen Polyphenole führen. Dies äußert sich im besonderen Maße in einer Abnahme des Aspalathingehaltes, der maßgeblich mit der antioxidativen Kapazität des unfermentierten Rooibos korreliert [SCHULZ ET AL. 2003, STANDLEY ET AL. 2001]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die antioxidative Kapazität von Rooibostee unabhängig vom Fermentationszustand geringer war als die von grünem Tee. Im Vergleich zum schwarzen Tee hingegen wiesen wässrige Extrakte des unfermentierten Rooibos, mit Ausnahme von Messungen im ABTS-System, eine höhere antioxidative Kapazität auf. Fermentierter Rooibostee verfügte dagegen zumeist über die geringste antioxidative Kapazität. Eine Ausnahme bilden Ergebnisse des DPPH-Tests in denen fermentierter *Camellia Sinensis* über die geringste Aktivität verfügte [JOUBERT ET AL. 2008, VON GADOW ET AL. 1997A].

Tabelle 6: Untersuchungen zur antioxidativen Kapazität von wässrigen Extrakten von *Aspalathus Linearis* und *Camellia Sinensis* [JOUBERT ET AL. 2008, VON GADOW ET AL. 1997A]

ABTS	FRAP	DPPH	Antioxidative Kapazität
Grüner Tee	Grüner Tee	Grüner Tee	
Schwarzer Tee	Unfermentierter Rooibostee	Unfermentierter Rooibostee	
Unfermentierter Rooibost	Schwarzer Tee	Fermentierter Rooibost	
Fermentierter Rooibostee	Fermentierter Rooibostee	Schwarzer Tee	

ABTS = 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure, FRAP = Ferric Reducing Ability of Plasma, DPPH = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

Die unterschiedliche antioxidative Aktivität bzw. Kapazität gleicher Substanzen und Proben in den verschiedenen Testsystemen resultiert aus den jeweilig verwendeten Oxidantien und Reaktionsmedien sowie den dadurch abweichenden Reaktionsraten [MACDONALD-WICKS ET AL. 2006].

2.5.3.2 Antioxidative Wirkung von Rooibosflavonoiden in vivo

Während die antioxidative Kapazität von wässrigen Extrakten des Rooibos bzw. seinen Einzelkomponenten in vitro gut untersucht ist, sind bisher nur wenige Studien bekannt, die ihre antioxidative Wirkung in vivo erfasst haben. Da absorbierte Flavonoide im Organismus zahlreichen Metabolisierungen und Strukturveränderungen unterliegen, sind die Ergebnisse aus In-vitro-Studien, in denen unmetabolisierte Stoffe verwendet wurden, nicht auf die physiologische Situation übertragbar. So konnten VAN DER MERWE ET AL. [2010] zeigen, dass eine Glukuronidierung von Aspalathin einen Verlust der antioxidativen Kapazität bewirkte.

Erste Aufschlüsse über das antioxidative Potential von Rooibosflavonoiden in vivo gab eine tierexperimentelle Studie mit Ratten. Im Rahmen dieser Untersuchungen erhielten die Versuchstiere über einen Zeitraum von zehn Wochen als einzige Flüssigkeitszufuhr wässrige Extrakte von unfermentierten und fermentierten Rooibos. Einer Kontrollgruppe wurde über denselben Zeitraum lediglich Wasser verabreicht. Nach Beendigung des zehnwöchigen Studienzeitraums wurde der antioxidative Status mittels des ORAC-Assays in Leberhomogenisaten gemessen. Dabei konnten keine Unterschiede in der antioxidativen Kapazität der Proben ermittelt werden. Die Applikation des Rooibos bewirkte im Vergleich zur Gabe des Wassers keine Veränderung der antioxidativen Kapazität [MARNEWICK ET AL. 2003].

In einer Langzeitkinetik von SAUTER [2004] wurde erstmalig die antioxidative Wirkung des Rooibosflavonoids Aspalathin am Menschen untersucht. Einer einwöchigen Depletionsphase

folgend nahmen 20 Probanden (zehn Raucher, zehn Nichtraucher) über einen Zeitraum von zwei Wochen ein in Tablettenform gepressten Extrakt aus unfermentiertem Rooibos, auf der 75 mg/d Aspalathin enthielt. Blutproben wurden zu Studienbeginn und nach Beendigung der Interventionsphase entnommen. Die antioxidative Kapazität der entnommenen Proben wurde mittels des ABTS- und des Xanthin/Xanthinoxidase-Tests erfasst. Unabhängig von der Gruppenzuordnung (Raucher, Nichtraucher) konnte mittels des ABTS-Tests keine signifikante Veränderung der antioxidativen Kapazität ermittelt werden. Bei Verwendung des Xanthin/Xanthinoxidase-Assays wurde hingegen in beiden Gruppen eine signifikante Abnahme der antioxidativen Kapazität des Plasmas gemessen.

In einer neueren Studie untersuchten VILLAÑO ET AL. [2010] ebenfalls das Potential von Rooibostee den antioxidativen Status *in vivo* zu modifizieren. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von SAUTER ET AL. [2004] handelte es sich bei dieser Untersuchung um eine Kurzzeitkinetik, in der die verschiedenen Prüfprodukte (unfermentierter und fermentierter Rooibostee, Wasser) lediglich einmalig appliziert wurden. Die applizierte Flavonoidmenge betrug 73 (unfermentierter Rooibostee) bzw. 40 mg (fermentierter Rooibostee). Die Gabe der Prüfprodukte erfolgte im Cross-over-Design und die einzelnen Untersuchungszeitpunkte wurden durch zweiwöchige Auswaschphasen unterbrochen. Blutentnahmen erfolgten vor sowie 0,5, 1, 2 und 5 h nach der Applikation des jeweiligen Getränkes. Während die Aufnahme des Wassers zu keiner Veränderung der antioxidativen Kapazität des Plasmas führte, war die Applikation des fermentierten Rooibos mit einem signifikanten Anstieg der antioxidativen Kapazität assoziiert. Der Konsum des unfermentierten Rooibostee bewirkte lediglich einen leichten Anstieg der antioxidativen Kapazität des Plasmas (TRAP-Assay = Total Radical Absorbance Capacity). Dieser war nur im Vergleich zur Placebogruppe signifikant, nicht jedoch im Vergleich zu den vor Applikation des unfermentierten Rooibostees gemessenen Nüchternwerten.

In einer Cross-over-Studie mit 40 Probanden führte der sechswöchige Konsum von 1,2 l/d (164 mg/d Polyphenole) fermentierten Rooibostees im Vergleich zu einer vierwöchigen Kontrollphase, in der lediglich Wasser verabreicht wurde, zu keiner messbaren Veränderung der antioxidativen Kapazität (ORAC-, FRAP-, ABTS-Assay). Die Erfassung verschiedener physiologischer Parameter, die als Indikatoren für den antioxidativen Status fungieren, zeigte jedoch positive Effekte der Rooibosapplikation. So konnten am Ende der sechswöchigen Interventionsphase signifikant höhere Konzentrationen von reduziertem Glutathion (GSH) gemessen werden als nach der vierwöchigen Kontrollphase. Gleichzeitig war die Konzentration von oxidiertem Glutathion (GSSG) signifikant geringer. Das GSH:GSSG-Verhältnis war in Folge des Rooiboskonsums ebenfalls signifikant erhöht [MARNEWICK ET AL. 2011].

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch in einer Interventionsstudie, in der die Auswirkungen eines achtwöchigen Konsums von Rooibostee auf den oxidativen Status von Arbeitern, die beruflich Schwermetallen ausgesetzt sind, untersucht wurde. Im Vergleich zu einer Plazebobehandlung bewirkte die Applikation von Rooibostee einen signifikanten Anstieg der Konzentration von GSH. Zudem war die Konzentration an Malondialdehyden signifikant reduziert, was als Beleg einer Abnahme der Lipidperoxidation zu verstehen ist [NIKOLOVA ET AL. 2007].

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeines

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu ermitteln, in welchem Maße die in verschiedenen Rooiboszubereitungen enthaltenen Flavonoide bioverfügbar sind und ob die einmalige Aufnahme der Prüfprodukte mit einer Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Blutes assoziiert ist.

Dieser Fragestellung Rechnung tragend wurden zwei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt (Tabelle 7). In der Versuchsreihe I wurden im Rahmen einer Humanstudie verschiedene Rooibosprodukte plazebokontrolliert verabreicht. Blut- und Urinproben wurden vor und nach Aufnahme des jeweiligen Prüfproduktes gesammelt und auf ihren Flavonoidgehalt (Blut- und Urinproben) und ihre antioxidative Kapazität (Blutproben) untersucht. Parallel zu der Versuchsreihe I durchgeführte In-vitro-Studien ermöglichten es, unter reproduzierbaren Bedingungen, mögliche Störeinflüsse zu ermitteln, die die antioxidative Kapazität der Flavonoide in vivo beeinflusst haben könnten (Versuchsreihe II).

Tabelle 7: Durchgeführte Versuchsreihen zur Erfassung der Bioverfügbarkeit und antioxidativen Kapazität von Rooibosflavonoiden

Versuchsreihe Untersuchungsreihe	Testverfahren	Fragestellung/Zielsetzung	Proben
I			
I.I	ex vivo	Sind Rooibosflavonoide nach einmaliger Ingestion von	• Urinproben der Untersuchungsreihen I.I/I.II
I.II	ex vivo	Rooibosprodukten bioverfügbar? Wird die antioxidative Kapazität des Plasmas beeinflusst?	• Blutproben der Untersuchungsreihen I.I/I.II
II			
II.I	in vitro	Welche antioxidative Kapazität besitzt Rooibostee?	• Rooibostee
II.II	in vitro	In welcher Konzentration muss Rooibostee vorliegen, um einen messbaren Anstieg der antioxidativen Kapazität des Plasmas zu induzieren?	• Serumproben • Serumproben gespiket mit Rooibostee
II.III	in vitro	Kommt es durch die Mischung von Blut und Rooibostee zu Wechselwirkungen, die die antioxidative Kapazität von diesem einschränken?	• Serum • Rooibostee • Serumproben gespiket mit Rooibostee

Die Studien wurden im Rahmen des FEI/AIF geförderten Projektes „Flavonoide in ausgewählten Kräutertees – Bestimmung, Nutrikinetik, Veränderungen bei Extraktion und Lagerung“ (AiF 15303 N) durchgeführt.

3.2 Versuchsreihe I – Humanstudie

Das Ziel der in Versuchsreihe I durchgeführten Humanstudie war es zu ermitteln, in welchem Ausmaß Rooibosflavonoide nach einmaliger Aufnahme verschiedenartiger Rooiboszubereitungen bioverfügbar sind und ob der Konsum mit einer Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Blutes assoziiert ist. Zudem sollte der Frage nachgegangen werden, ob produktspezifische Charakteristika (Applikationsform, Produktmatrix) die antioxidative Wirkung unterschiedlich beeinflussen.

Nachfolgend sollen das Studiendesign, der Studienablauf, die Kollektivbildung und die in der Humanstudie verwendeten Analyseverfahren sowie die erfassten Parameter beschrieben werden.

3.2.1 Studiendesign

Die Humanstudie wurde als plazebokontrollierte, monozentrische, offene und vergleichende Cross-over-Studie geplant und durchgeführt.

Wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt, setzte sie sich aus zwei unabhängigen Untersuchungsserien zusammen. Diese waren hinsichtlich des Studiendesigns sowie der Anzahl der eingeschlossenen Probanden identisch, differierten jedoch bezüglich der verabreichten Prüfprodukte. In der Untersuchungsserie I.I handelte es sich um Rooibostee und eine isolierte aktive Fraktion des Rooibos, in Untersuchungsserie I.II um ein frisches und ein gelagertes Rooibosfertiggetränk.

Tabelle 8: Übersicht der Studienphasen, des Studiendesigns und der verabreichten Prüfprodukte

	Untersuchungsserie I.I	Untersuchungsserie I.II
Studiendesign	Kurzzeitkinetik, Cross-over-Design	Kurzzeitkinetik, Cross-over-Design
Probanden	12 (4 pro Cross-Over-Gruppe)	12 (4 pro Cross-Over-Gruppe)
Prüfprodukte	Rooibostee, isolierte aktive Fraktion d. Rooibos, Plazebo	Frisches/gelagertes Fertiggetränk, Plazebo

Die Applikation der Prüfprodukte erfolgte im Cross-over-Design (Tabelle 9). Auf diese Weise sollte der Einfluss interindividueller Absorptionsunterschiede minimiert werden.

Tabelle 9: Verteilung der Prüfprodukte im Cross-over-Design

Probanden	Untersuchungsserie I.I / I.II		
	t ₁	t ₂	t ₃
1/2/3/4	1	2	3
5/6/7/8	2	3	1
9/10/11/12	3	1	2

1 = Rooibostee bzw. Frisches Fertiggetränk, 2 = Isolierte aktive Fraktion bzw. Gelagertes Fertiggetränk, 3 = Plazebo

Die ethische Begutachtung des geplanten Studienvorhabens erfolgte durch die Freiburger Ethikkommission International (FEKI). Mit einem positiven Votum in den Ethikantrag am 29.02.2008 konnte die Rekrutierung von Probanden für die erste Untersuchungsserie starten.

3.2.2 Studienkollektiv

Für jede der beiden Untersuchungsserien waren 12 männliche, gesunde Probanden im Alter von 18-40 Jahren gesucht. Um mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede und hormonell bedingte Schwankungen in der Biokinetik der Flavonoide auszuschließen, wurden keine weiblichen Studienteilnehmer in das Kollektiv aufgenommen. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte über Aushänge an der Leibniz Universität Hannover sowie eine institutsinterne Datenbank in der Teilnehmer früherer Studien geführt werden.

Neben Personen mit chronischen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes wurden auch Raucher von der Studienteilnahme ausgeschlossen. Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass Rauchen einen prooxidativen Einfluss darstellt und die antioxidative Kapazität des Plasmas senkt [GORACA UND SKIBSKA 2005, YOKUS ET AL. 2005]. Eine genaue Auflistung aller Ein- und Ausschlusskriterien ist im Anhang zu finden (Anhang 1.2).

An der Studienteilnahme interessierte Personen wurden zunächst mündlich über den Studienablauf aufgeklärt. Sämtliche studienrelevanten Informationen wurden zudem auch in schriftlicher Form ausgehändigt (Probandeninformation, Einverständnis- und Datenschutzerklärung, Screeningfragebogen (Anhang 1.1.1 u. Anhang 1.1.2)). Der Einschluss in das Studienkollektiv erfolgte, wenn der Studieninteressent weiterhin Interesse hatte, nach Sichtung des ausgefüllten Screeningfragebogens alle Ein- und Ausschlusskriterien erfüllte und sich zudem durch Abgabe der unterschriebenen Datenschutz- und Einwilligungserklärung mit den Studienbedingungen einverstanden erklärte.

3.2.3 Studienablauf

Die beiden Untersuchungsserien wurden gemäß des in Abbildung 24 dargestellten Schemas durchgeführt.

Einer einwöchigen Depletionsphase schlossen sich drei Untersuchungstage an, die von jeweils einwöchigen Wash-out-Phasen separiert wurde. Hierdurch sollte eine gegenseitige Beeinflussung der Prüfprodukte verhindert werden. Um möglichst niedrige Flavonoidblutspiegel zu Studienbeginn zu gewährleisten, waren die Studienteilnehmer angehalten, während der Depletionsphase (zwei Wochen) bzw. des gesamten Interventionszeitraums (vier Wochen), auf die Einnahme flavonoidhaltiger Supplemente und flavonoidreicher und -angereicherter Lebensmittel zu verzichten und ansonsten ihre üblichen Ernährungsgewohnheiten beizubehalten.

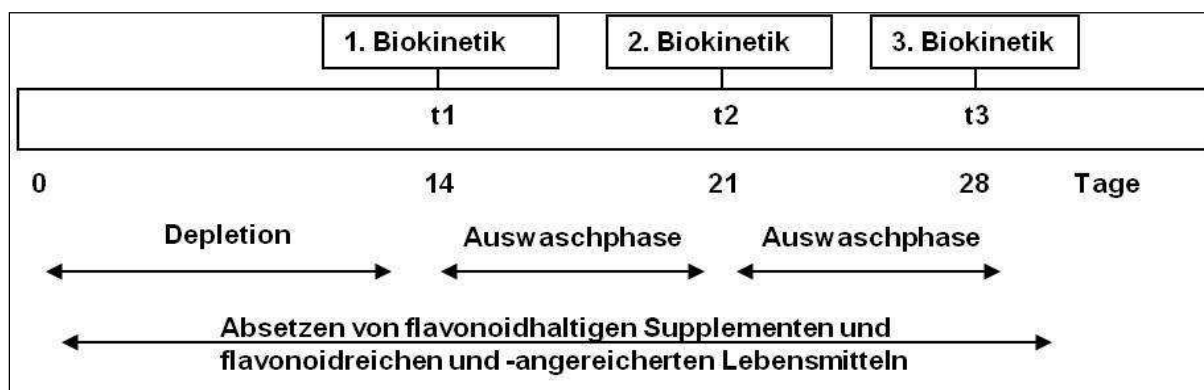


Abbildung 24: Studienablauf

Im Anhang ist eine den Probanden ausgehändigte Liste zu finden, die besonders flavonoidhaltige und somit zu meidende Lebensmittel aufführt (Anhang 1.1.1). Die Compliance bezüglich der Flavonoiddepletion wurde an den Untersuchungstagen mittels Probandendokumentationsbögen erfasst. Mit diesen Fragebögen wurden außerdem das Auftreten unerwünschter Ereignisse und Erkrankungen sowie Medikationsänderungen (Anhang 1.1.3 u. Anhang 1.1.4) erfasst.

An den Untersuchungstagen mussten die Studienteilnehmer um 6.30 Uhr nüchtern (mindestens achtstündige Phase der Nahrungskarenz) im Institut erscheinen. Vor einer Nüchternblutentnahme wurden am jeweils ersten Untersuchungstag jeder Untersuchungsserie die anthropometrischen Kenngrößen (Körpergröße und -gewicht) der Studienteilnehmer erfasst. Die Messung der Körpergröße erfolgte ohne Schuhe an einer genormten Messlatte, die Bestimmung des Körpergewichts mit einer geeichten, elektronischen Personenwaage (Seca, Hamburg/Deutschland). Mittels der erhobenen Daten

konnte der Körpermassenindex (Body Mass Index, BMI) eines jeden Probanden berechnet werden.

Unmittelbar nach der Nüchternblutentnahme erhielten die Probanden jeweils eines der zu untersuchenden Prüfprodukte. Weitere Blutentnahmen erfolgten 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 und 8 Stunden nach Aufnahme des Testgetränkes. Zudem wurde in definierten Zeitspannen der Urin der Probanden gesammelt. Während des gesamten Untersuchungstages wurde eine standardisierte, flavonoidarme Kost verabreicht, die größtenteils kohlenhydratreiche Lebensmittel, Milchprodukte und geringe Mengen Wurstwaren umfasste (Tabelle 10).

Tabelle 10: Exemplarische Darstellung eines Untersuchungstages

	Untersuchungsserie I.I			Untersuchungsserie I.II		
	t ₁	t ₂	t ₃	t ₁	t ₂	t ₃
Blutentnahmen	vor, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 u. 8 h nach Konsum des Prüfproduktes					
Urinsammelproben	Nüchternurinprobe, 0-2, 2-4, 4-6, 6-8, 8-24 h					
Kost	standardisierte, flavonoidarme Kost					

Im Anhang ist eine genaue Aufführung der an den Untersuchungstagen applizierten Studienmahlzeiten enthalten (Anhang 1.3). Die jeweils verabreichten Mengen waren energieadjustiert und richteten sich nach dem individuellen Gesamtenergiebedarf des Probanden. Dieser berechnete sich aus dem Grundumsatz multipliziert um einen Faktor für die körperliche Aktivität (physical activity level, PAL) und die nahrungsinduzierte Thermogenese. Die Berechnung des Grundumsatzes erfolgte mittels der Formel von HARRIS UND BENEDICT [1918]:

$$66.5 + (13.8 \times \text{Körpergewicht [kg]}) + (5 \times \text{Größe [cm]}) - (6.8 \times \text{Alter [Jahren]})$$

Das PAL orientiert sich an der Arbeitsschwere bzw. dem Freizeitverhalten der Probanden, das über den Aufnahmefragebogen (Anhang 1.1.2) erfasst wurde. Um die nahrungsinduzierte Thermogenese zu berücksichtigen, wurden zusätzlich 6 % des Gesamtenergieumsatzes zu diesem addiert [PELLET 1990].

Die Teilnehmer wurden gebeten, die gereichten Mahlzeiten zeitnah und möglichst vollständig zu verzehren. Außerdem waren sie angehalten, während des Untersuchungstages nur Wasser zu trinken. Zwischen den Mahlzeiten und den Blutentnahmen konnten sie sich frei bewegen.

3.2.4 Prüfprodukte

Im Rahmen der Humanstudie wurden pro Untersuchungsserie je zwei verschiedenartige Rooibosprodukte plazebokontrolliert eingesetzt.

Die Analyse des Flavonoidprofils der jeweiligen Prüfprodukte erfolgte im Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Braunschweig. Eine genaue Beschreibung der Methodik ist einer gemeinsamen Veröffentlichung [BREITER ET AL. 2011] zu entnehmen und zudem Gegenstand einer weiteren Dissertation, die im Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Braunschweig verfasst wurde [LAUE 2011].

3.2.4.1 Untersuchungsserie I.I

In der ersten Untersuchungsserie wurden Rooibostee, eine isolierte aktive Fraktion sowie Wasser gereicht.

Rooibostee

Zur Herstellung des Tees wurden 10 g des getrockneten Pflanzenmaterials (Plantextrakt GmbH & Co. KG. Vestenbergsgreuth/Deutschland) mit 500 ml kochendem Wasser übergossen und für zehn Minuten extrahiert. Anschließend wurde filtriert.

Anhand einer quantitativen Analyse mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit Photodiodenarray-Detektor (HPLC-DAD) und anschließender Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) konnte die in Tabelle 11 dargestellte polyphenolische Zusammensetzung der Rooibostees ermittelt werden [BREITER ET AL. 2011].

Tabelle 11: Flavonoidprofil des Rooibostees (10 g Droge auf 500 ml Wasser, n = 12)

Flavonoide	Struktur	Glykosidische Bindung	Menge (mg / μ mol)
Aspalathin	Dihydrochalkon	C-Glykosid	287 \pm 0.1 / 636 \pm 20
Nothofagin	Dihydrochalkon	C-Glykosid	34.4 \pm 0.0 / 79 \pm 3.1
Isoorientin	Flavon	C-Glykosid	26 \pm 0.0 / 58 \pm 2.6
Orientin	Flavon	C-Glykosid	17 \pm 0.0 / 38 \pm 1.8
Vitexin	Flavon	C-Glykosid	3.1 \pm 0.0 / 7.1 \pm 0.2
Isovitexin	Flavon	C-Glykosid	2.8 \pm 0.0 / 6.6 \pm 0.3
Luteolin-O-galaktoside	Flavon	O-Glykosid	0.9 \pm 0.0 / 1,9 \pm 0,2
Rutin	Flavonol	O-Glykosid	7.9 \pm 0.0 / 13 \pm 0.3
Hyperosid	Flavonol	O-Glykosid	0.8 \pm 0.0 / 1.7 \pm 0.1
Isoquercitrin	Flavonol	O-Glykosid	2.9 \pm 0.0 / 6.3 \pm 0.4
Σ			383 \pm 0.1 / 848 \pm 29

Isolierte aktive Fraktion

Neben dem Rooibostee wurde eine isolierte aktive Fraktion des Rooibos verabreicht. Die Herstellung der isolierten aktiven Fraktion erfolgte im Institut für Lebensmittelchemie der

Technischen Universität Braunschweig mittels Hochgeschwindigkeits-Gegenstromverteilungschromatographie (HSCCC). Die Fraktion mit der höchsten antioxidativen Aktivität wurde für die Humanstudie ausgewählt. Aspalathin stellte in dieser, analog zum Rooibostee, die quantitativ dominierende Verbindung dar [BREITER ET AL. 2011].

An den Untersuchungstagen wurden 500 mg der isolierten aktiven Fraktion mit 500 ml kochendem Wasser übergossen. Die Menge an enthaltenem Aspalathin entsprach in etwa der, die über den Rooibostees zugeführt wurde. In Tabelle 12 ist die Flavonoidzusammensetzung der isolierten aktiven Fraktion, die am ersten Untersuchungstag verabreicht wurde, exemplarisch dargestellt. Die an den weiteren Untersuchungstagen applizierte isolierte aktive Fraktion zeigte ein vergleichbares Flavonoidprofil.

Tabelle 12: Flavonoidprofil der isolierten aktiven Rooibosfraktion (500 mg auf 500 ml Wasser, n = 2)

Flavonoide	Struktur	Glykosidische Bindung	Menge (mg / μ mol)
Aspalathin	Dihydrochalkon	C-Glykosid	281 \pm 4.2 / 623 \pm 9.2
Nothofagin	Dihydrochalkon	C-Glycosid	8,3 \pm 0.4 / 19.2 \pm 1.1
Isoorientin	Flavon	C-Glykosid	7.6 \pm 0.5 / 17.0 \pm 1.1
Orientin	Flavon	C-Glykosid	21.1 \pm 0.5 / 47.2 \pm 1.2
Vitexin	Flavon	C-Glykosid	0.4 / 0.9
Isovitexin	Flavon	C-Glykosid	1.4 \pm 0.0 / 5,4 \pm 0.0
Quercetin-O-rutinosid	Flavon	O-Glykosid	1.4 \pm 0.0 / 2.2 \pm 0.0
Rutin	Flavonol	O-Glykosid	1.0 \pm 0.0 / 1.6 \pm 0.1
Hyperosid	Flavonol	O-Glykosid	ND
Isoquercitrin	Flavonol	O-Glykosid	ND
Σ			324 \pm 5.6 / 717 \pm 11.5

Plazebo

Als Plazebo wurden 500 ml Wasser gereicht.

3.2.4.2 Untersuchungsserie I.II

In der zweiten Untersuchungsserie wurden als Verumpräparate ein frisches sowie ein gelagertes Rooibosfertiggetränk eingesetzt. Ein Fertiggetränk ohne Rooibosextrakt fungierte als Plazebo. Die Produkte wurden von der Plantextrakt GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth/Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Rooibosfertiggertränke (frisch/gelagert)

Das Fertiggertränk wurde als frisch hergestelltes sowie als gelagertes Getränk (Lagerungsbedingungen: Raumtemperatur, Lichtschutz; Lagerdauer: 9 Monate) appliziert. Es bestand aus Rooibosextrakt, Zucker, Wasser, Säure und Aroma. Der Energiegehalt lag bei 92 kJ/100 ml. Der Flavonidgehalt der Fertiggertränke war deutlich geringer als der des Rooibostees und der isolierten aktiven Fraktion. Durch die Lagerung nahm der Flavonidgehalt weiter ab, wobei das Ausmaß des Abbaus bei den verschiedenen Komponenten unterschiedlich stark ausfiel (Tabelle 13). Genauere Angaben zu der lagerungsbedingten Veränderung des Flavonidgehaltes und -profils sind einer am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Braunschweig verfassten Dissertation zu entnehmen [LAUE 2011].

Tabelle 13: Flavonoidprofil des frischen und gelagerten Fertiggertränks, n = 2)

Flavonoide	Struktur	frisches Fertiggertränk (mg / μ mol)	gelagertes Fertiggertränk (mg / μ mol)
Aspalathin	C-Glykosid	164 \pm 0.57 / 363 \pm 1.26	107 \pm 1.25 / 237 \pm 2.77
Nothofagin	C-Glycosid	23.4 \pm 0.23 / 53.6 \pm 0.51	17.6 \pm 0.22 / 40.4 \pm 0.49
Isoorientin	C-Glykosid	28.2 \pm 0.31/ 63.0 \pm 0.69	22.2 \pm 0.32/ 49.6 \pm 0.72
Orientin	C-Glykosid	23,3 \pm 0.10/ 52.1 \pm 0.22	22.0 \pm 0.23 / 49.0 \pm 0.50
Vitexin	C-Glykosid	3.7 \pm 0.01 / 8.5 \pm 0.02	3.4 \pm 0.05 / 8,0 \pm 0.11
Isovitexin	C-Glykosid	2.8 \pm 0.01 / 6.4 \pm 0.01	2.2 \pm 0.02/ 5.2 \pm 0.05
Luteolin-O-hexosid	O-Glykosid	2.2 \pm 0.02 / 4.9 \pm 0.04	1.9 \pm 0.02 / 4.3 \pm 0.04
Rutin	O-Glykosid	9.8 \pm 0.10 / 16.0 \pm 0.16	6,2 \pm 0.16 / 10.2 \pm 0.26
Hyperosid	O-Glykosid	0.8 \pm 0.01 / 1,8 \pm 0.01	0.6 \pm 0.03 / 1.3 \pm 0.08
Isoquercitrin	O-Glykosid	3.3 \pm 0.01 / 7.0 \pm 0.11	2,1 \pm 0.06 / 4.5 \pm 0.12
Σ		259,1 / 571,2	186,3 / 411,3

Plazebo

Als Plazebo fungierten 500 ml eines isokalorischen Fertiggertränks, das mit Ausnahme des fehlenden Rooibosextraktes eine den Rooibosfertiggertränken analoge Rezeptur aufwies.

3.2.5 Analyse des Flavonoidprofils

Die Analyse absorbierter Rooibosflavonoide erfolgte sowohl in Plasmaproben als auch in den in der Humanstudie gewonnenen Sammelurinproben.

3.2.5.1 Plasmaproben

Die für die Analysen erforderlichen Plasmaproben wurden im Rahmen der Untersuchungsserien I.I und I.II im Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung gewonnen.

Die Entnahme der Blutproben erfolgte vor sowie zu definierten Zeitpunkten nach Einnahme der Prüfprodukte in Lithium-Heparin-Monovetten (Sarstedt, Nürnberg/Deutschland). Zur Plasmagewinnung wurden die Monovetten für 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Jeweils 1 ml des entstehenden Überstandes wurde in zwei Eppendorfgefäße überführt, die zusätzlich mit 20 µl einer Ascorbat-EDTA-Stabilisierungslösung (20 % Ascorbinsäure, 0.1 % EDTA, pH 3.6 Natriumdihydrogenphosphat) versehen waren.

Die quantitative und qualitative Analyse des Flavonoidgehaltes im Plasma erfolgte im Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Braunschweig. Plasmaproben von je drei Messzeitpunkten (0, 1.5 und 3 h) in Untersuchungsserie I.I bzw. vier Messzeitpunkten (0, 0.5, 1.5 und 3 h) in Untersuchungsserie I.II wurden nach vorheriger Aufarbeitung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion per Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) analysiert. Während der Methodenentwicklung zeigte sich, dass die Direktextraktion die Methode der Wahl ist um unveränderte Flavonoide zu erfassen [LAUE 2011]. Im Anhang ist eine ausführliche Beschreibung der Bioverfügbarkeitsanalysen aufgeführt (Anhang 2.1).

Abbildung 25 zeigt beispielhaft ein extrahiertes Ionenchromatogramm (EIC) intakter und unveränderter Rooibosflavonoide nach oraler Applikation von 500 ml Rooibostee.

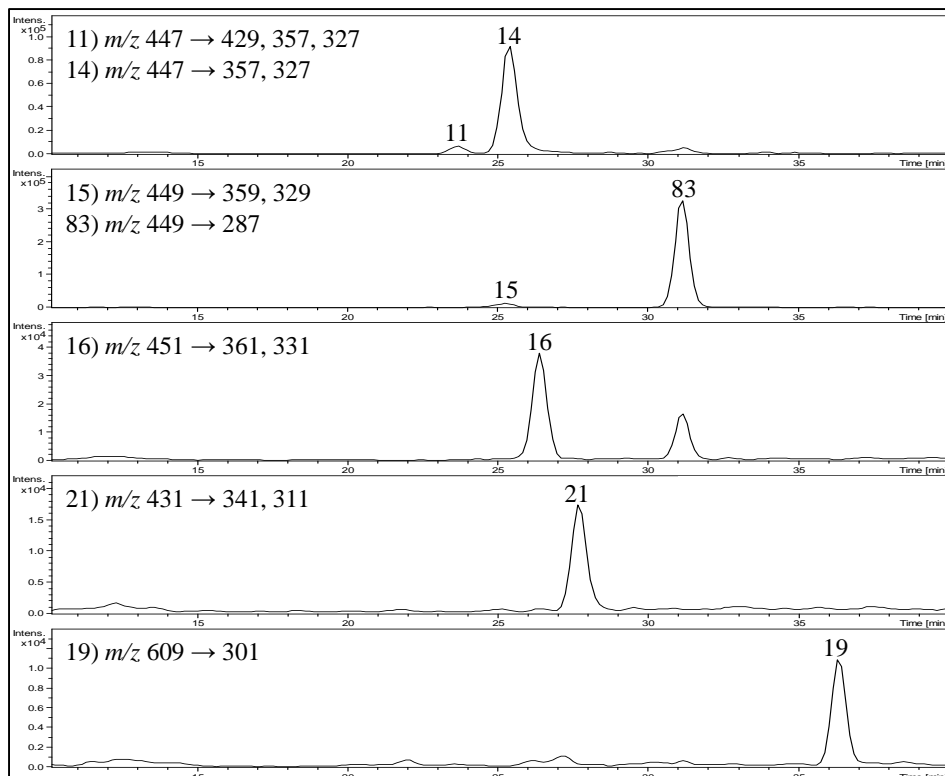


Abbildung 25: HPLC-MS/MS-Analyse (EIC) des 3 h-Plasmas eines Probanden nach Gabe von 500 ml Rooibostee [BREITER ET AL. 2011]

(11: m/z 447 → Isoorientin; 14: m/z 447 → Orientin; 15: m/z 449 → (S)-Eriodictyol-8-C-glucosid; 83: m/z 449 → Eriodictyol-7-O-glucosid (ISTD); 16: m/z 451 → Aspalathin; 21: m/z 431 → Vitexin; 19: m/z 609 → Quercetin-O-rutinosid)

In den analysierten Plasmaproben (Untersuchungsserie I.I: 1.5 h, 3 h; Untersuchungsserie II.I: 0.5 h, 1.5 h, 3 h) wurde jeweils der Median der detektierten Flavonoide berechnet.

In weiteren Analysen wurde für die vier in den Prüfprodukten dominierenden Flavonoide (Aspalathin, Orientin, Isoorientin, Nothofagin) außerdem die mittlere Konzentration berechnet. Hierbei fanden ausschließlich Plasmaproben von Probanden Berücksichtigung, in denen diese Flavonoide mit den oben aufgeführten analytischen Methoden nachgewiesen werden konnten.

Die auf diesem Weg berechnete mittlere Aspalathinkonzentration sowie die für diese Berechnung verwendete individuelle Aspalathinkonzentration der einzelnen Proben wurden zudem in weiteren Berechnungen in Bezug zur jeweilig über das Prüfprodukt zugeführten Aspalathinmenge gesetzt. Hierdurch konnte der prozentuale Anteil der aus den Prüfprodukten in die Plasmaproben übergegangenen Aspalathinmenge näherungsweise bestimmt werden. Grundlage dieser Berechnung war die Annahme, dass ein erwachsener Mann durchschnittlich über 5 l Blut verfügt, welches 2750 ml (55 %) Plasma enthält. Weiterhin wurde angenommen, dass die jeweilige über das Prüfprodukt applizierte Aspalathinmenge in Gänze in das Plasma übergeht. Die somit theoretisch erreichbare

Aspalathinkonzentration wurde zur jeweilig detektierten Aspalathinmenge bzw. der daraus berechneten mittleren Aspalathinmenge in Beziehung gesetzt.

3.2.5.2 Urinproben

Neben Plasmaproben wurden auch ausgewählte, in der Humanstudie gewonnene, Sammelurinproben auf Flavonoide untersucht.

Die Sammlung der Urinproben erfolgte in speziellen, sterilen Sammelbehältern. Für die Urinanalytik wurden 20 ml der jeweiligen Urinprobe in ein spezielles Gefäß, welches mit 20 mg Ascorbinsäure und 0.5 mg EDTA versehen war, überführt.

Die quantitative und qualitative Analyse des Flavonoidgehaltes im Urin erfolgte im Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Braunschweig. Sammelproben der Zeiträume 0-2, 2-4, 4-6, 8-24 h wurden nach vorheriger Aufarbeitung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion per Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) analysiert. Im Anhang ist eine ausführliche Beschreibung dieser Analysen aufgeführt (Anhang 2.1).

Die in den einzelnen Sammelurinproben detektierte Konzentration (nmol/ml) der verschiedenen Aspalathinmetabolite wurde in Beziehung zur absoluten Urinmenge der jeweiligen Urinsammelprobe gesetzt, um die gesamte ausgeschiedene Menge des jeweiligen Metaboliten (μmol) zu bestimmen. In jeder einzelnen Sammelurinprobe (0-2, 2-4, 4-6, 8-24 h) wurde anschließend jeweils der Median der verschiedenen detektierten Aspalathinmetabolite berechnet. Durch Addition dieser Werte konnte die Gesamtausscheidungsmenge (0-24 h) für jeden einzelnen der Metabolite näherungsweise berechnet werden. Eine Addition dieser Einzelwerte ermöglichte letztlich die überschlägige Berechnung der prozentualen Menge an Aspalathin, die über den Urin über 24 h ausgeschieden wurde.

3.2.6 Analyse biochemischer Parameter und der antioxidativen Kapazität

Als weiterer Parameter wurde in der Humanstudie neben der Bioverfügbarkeit der Flavonoide auch die antioxidative Kapazität aller Blutproben, die vor und nach Einnahme der jeweiligen Produkte entnommen wurden, erfasst. Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität erfolgte im institutseigenen Labor mittels des ORAC- und FRAP-Assays. Beide Testsysteme zählen zu den gängigsten Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität von biologischen Proben und Lebensmitteln (vgl. 2.5.1).

Neben der antioxidativen Kapazität wurde auch die Harnsäure erfasst, die als endogenes Antioxidans maßgeblich zur antioxidativen Kapazität beiträgt [SO UND THORENS 2010,

BECKER 1993, BECKER ET AL. 1991]. Die Quantifizierung der Harnsäure erfolgte in allen entnommenen Blutproben durch die Laborärztliche Arbeitsgemeinschaft für Diagnostik und Rationalisierung e.V. (LADR) GmbH, Medizinisches Versorgungszentrum Hannover. Zur näheren Charakterisierung des Kollektivs und um schwerwiegende Erkrankungen ausschließen zu können, erfolgte im LADR auch die Analyse der Leber- und Lipidwerte in den Nüchternblutproben des ersten Untersuchungsstages einer jeden Untersuchungsserie.

3.2.6.1 Biochemische Parameter

Vor der ersten Blutentnahme wurde das Einhalten der Nüchternheit der Studienteilnehmer erfragt. Anschließend wurden 7.5 ml Vollblut in eine Serummonovette (Sarstedt, Nürnberg/Deutschland) entnommen und bis zum Transport zum LADR dunkel und kühl (+4 °C) gelagert.

In Tabelle 14 sind die im LADR analysierten biochemischen Parameter unter Nennung der jeweiligen Bestimmungsmethoden aufgeführt. Im Anhang ist eine genaue Beschreibung der angewendeten Methoden enthalten (Anhang 2.2-2.4).

Tabelle 14: Analyseverfahren der LADR zur Bestimmung der Leber- und Lipidwerte sowie der Harnsäure

Parameter	Probe	Bestimmungsmethode	Messbereich	
Leberwerte:	Serum			
GGT		Kinetischer Farbtest	5-1200 U/l	
AST		Kinetischer UV-Test	3-1000 U/l	
ALT		Kinetischer UV-Test	3-500 U/l	
ALP		Kinetischer Farbtest	5-1500 U/l	
Bilirubin		Photometrischer Farbtest	0-30 mg/dl	0-513 µmol/l
Lipidwerte:	Serum			
TG			10-1000 mg/dl	0.1-11.3 mmol/l
TC		Enzymatischer Farbtest	20-700 mg/dl	0.5-18.0 mmol/l
HDL-C			2-180 mg/dl	0.05-4.65 mmol/l
LDL-C			10- 400 mg/dl	0.26-10.3 mmol/l
Antioxidativer Status:	Serum			
Harnsäure		Enzymatischer Farbtest	1,5-30 mg/dl	89-1785 µmol/l

3.2.6.2 Antioxidative Kapazität

Die Messung der antioxidativen Kapazität erfolgte in Abhängigkeit des Testsystems im Plasma (FRAP) oder im Serum (ORAC). Das in Serum- und EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nürnberg/Deutschland) entnommene Vollblut musste dazu im ersten Schritt einer präanalytischen Aufarbeitung unterzogen werden.

Zur Plasmagewinnung wurden die EDTA-Monovetten für 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Jeweils 300 µl des entstehenden Überstandes wurden in drei Eppendorfgefäße überführt.

Die Gewinnung des Serums erfordert eine 20-30-minütige Gerinnungszeit bei +4 °C, der sich eine zehnmünütige Zentrifugation der Serum-Monovetten bei 2000 g und +4 °C anschloss. Jeweils 200 µl des Überstandes wurden in drei Eppendorfgefäße überführt.

Alle Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

3.2.6.2.1 ORAC

Der ORAC-Assay ist eine fluorimetrische Methode mit der die Reaktivität von Antioxidantien gegenüber Peroxylradikalen gemessen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Test, mit geringfügigen Abweichungen, nach der Methode von DÁVALOS ET AL. [2004] in 96-Well-Platten durchgeführt. Fluoreszein wurde als Indikatormolekül eingesetzt, AAPH als Peroxylradikalquelle und Trolox zur Erstellung einer Kalibriergeraden genutzt, mittels der die antioxidative Kapazität der Prüfsubstanzen in Trolox-Äquivalente umgerechnet werden konnte. Als Reaktionsmedium wurde Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7.4) verwendet. Das Reaktionsvolumen umfasste 200 µl pro Well. Es setzte sich aus 20 µl der zu testenden Probe, 120 µl Fluoreszeinlösung (7 nmol/l) und 60 µl AAPH-Lösung (12 mmol/l) zusammen.

Im ersten Arbeitsschritt wurden die äußeren Wells der Mikrotiterplatte mit jeweils 200 µl Wasser belegt. Anschließend wurden die Prüfsubstanzen bzw. der Phosphatpuffer und die Troloxlösungen gemäß des Pipettierschemas (Anhang 2.5) in die dafür vorgesehenen Wells überführt. Im nächsten Schritt wurde die Fluoreszeinlösung in die Wells pipettiert. Die Zugabe der AAPH-Lösung erfolgte nachdem die Platte für 15 Minuten bei 37 °C im Trockenschrank inkubiert wurde. Unverzüglich nach Zugabe des Radikalstarters wurde die Platte in das auf 37 °C vorgeheizte Fluorimeter ein gesetzt.

Die Messungen der Proben und des Blanks (Leerprobe) erfolgten in Doppelbestimmung, die der Troloxlösungen in Dreifachbestimmung. Die Abnahme der Fluoreszenz wurde über einen 80-minütigen Zeitraum in einminütigen Intervallen erfasst.

Die Auswertung wurde mittels der gerätespezifischen Software des Elisa-Readers (Magellan, Version 6) durchgeführt. Dazu wurden die gemittelten Messdaten der Proben in einem ersten Schritt zur Normalisierung mit dem Faktor $F_{\text{Blank},t} = 0 / F_{\text{Probe},t = 0}$ multipliziert. Von diesen normalisierten Messdaten ausgehend konnte das Programm die Fläche unter der Kurve berechnen. Aus den AUC-Werten der Proben und der Blindprobe wurde der Netto-AUC der Proben durch Subtraktion gebildet. Mittels der Messergebnisse der verschiedenen

Troloxproben wurde eine Eichgerade erstellt, über deren Geradengleichung die Messergebnisse der Proben in einem letzten Schritt in Troloxäquivalente umgerechnet wurden.

Eine genaue Auflistung der verwendeten Gerätschaften, Chemikalien und Reaktionslösungen ist dem Anhang zu entnehmen (Anhang 2.5).

3.2.6.2.2 FRAP

Der FRAP-Assay ist eine von BENZIE UND STRAIN [1998, 1996] entwickelte photometrische Methode, die die reduzierende Aktivität einer Probe gegenüber dreiwertigem Eisen misst. Im Gegensatz zum ORAC erfolgt die Messung der antioxidativen Kapazität im Plasma.

Die Reaktionslösung, die in Einwegküvetten pipettiert wurde, bestand aus 75 µl der zu untersuchenden Probe, 225 µl dest. Wasser und 2250 µl FRAP-Reagenz. Das FRAP-Reagenz setzte sich aus 300 mmol/l Natriumacetatpuffer, 10 mmol/l 2,4,6-tripyridyl-s-triazin-Lösung (TPTZ) und 20 mmol/l Eisen-III-chlorid-Hexahydrat-Lösung zusammen und wurde in einem Schüttelbad auf einer konstanten Temperatur von +37 °C gehalten.

Die Messung der Extinktion erfolgte 4 Minuten nach Zugabe des FRAP-Reagenz zur Reaktionslösung, in einem auf +37 °C beheizten Spektralphotometer, bei einer Wellenlänge von 593 nm. Über die Geradengleichung einer Kalibriergerade, die mittels definierter wässriger Fe-II-Lösungen erstellt wurde, konnten die Messergebnisse in Eisen-II-Äquivalente umgerechnet werden. Die Proben sowie die FeSO₄-Eichwerte wurden jeweils in einer Doppelbestimmung erfasst.

Eine genaue Auflistung der verwendeten Gerätschaften, Chemikalien und Reaktionslösungen ist dem Anhang zu entnehmen (Anhang 2.6).

3.2.6.2.3 Berechnung der antioxidativen Gesamtkapazität

Zur Abschätzung der gesamtantioxidativen Kapazität wurde die AUC (Fläche unter der Kapazität-Zeit-Kurve) der ORAC- und FRAP-Messungen, die nach Konsum des jeweiligen Prüfproduktes erfolgten, berechnet. Sie ergab sich aus dem Verlauf der antioxidativen Kapazität, die in insgesamt acht Blutproben über acht Stunden gemessen wurde. Da das Blut grundsätzlich eine individuell ausfallende antioxidative Kapazität aufweist, in diesen Versuchen jedoch nur der tatsächliche Einfluss des Prüfproduktes auf die gesamtantioxidative Kapazität erfasst werden sollte, wurden zur Berechnung die um die Nüchternwerte bereinigten Messwerte herangezogen..

Die Berechnung des biokinetischen Parameters erfolgte mittels der Sehnenrapezmethode. Dabei wird die Fläche unter der Kurve entsprechend den verschiedenen

Entnahmezeitpunkten in mehrere Trapeze unterteilt, der Flächeninhalt dieser berechnet und zum AUC aufaddiert [NIAZI 2007, CHOW UND LIU 1992].

$$AUC_{0-8h} = \sum_{i=1} \left(\frac{c_{i-1} + c_i}{2} \right) (t_i - t_{i-1})$$

AUC_{0-8h} : AUC über einen Zeitraum von 8 h [$\mu\text{mol TE/l}$ bzw. $\mu\text{mol Fe II/l}$]

i : Blutprobe, c_i : antioxidative Kapazität der Blutprobe [$\mu\text{mol TE/l}$ bzw. $\mu\text{mol Fe II/l}$], t_i : Entnahmezeitpunkt der Blutprobe nach Einnahme des Prüfproduktes [h]

3.2.7 Statistische Verfahren

Die im Rahmen der Studie generierten Daten wurden in pseudonymisierter Form in eine SPSS-Datei aufgenommen und auf einem passwortgeschützten Computer gespeichert. Die Richtigkeit der Dateneintragungen wurde durch eine doppelte Kontrolle gewährleistet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Datenanalyseprogramms SPSS für Windows, Version 18.0 (SPSS INC., Chicago/USA).

Bei sämtlichen Berechnungen wurden ausschließlich vollständige Datensätze berücksichtigt. Die statistische Auswertung der ersten Untersuchungsserien erfolgte demnach anhand der Datensätze von zehn Probanden, da zwei Studienteilnehmer die Untersuchung vor Beendigung abbrachen. In der zweiten Untersuchungsserie konnten die Datensätze von 12 Probanden zur Berechnung herangezogen werden.

Ab einer errechneten Irrtumswahrscheinlichkeit von $\leq 5\%$ ($p \leq 0,05$) wurde die Nullhypothese abgelehnt und die Alternativhypothese angenommen. Zur Überprüfung der Daten auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test genutzt. Da die in dieser Arbeit zur Berechnung verwendeten Daten normalverteilt waren, wurden als Lage- und Streuungsmaße das arithmetische Mittel \pm Standardabweichung (Mittelwert \pm SD) sowie das Minimum (Min.) und Maximum (Max.) angegeben. Lediglich bei der Auswertung der Bioverfügbarkeitsdaten wurde der Median der zu dem jeweiligen Entnahmezeitpunkt detektierten Metabolite ($\mu\text{mol/l}$) bestimmt. Dieser ist definiert als der Wert, der eine Verteilung halbiert. Zudem fanden hierbei auch die ebenfalls bestimmten minimalen und maximalen Konzentrationen ($c_{\text{min}}-c_{\text{max}}$, $\mu\text{mol/l}$) Berücksichtigung.

Zum statistischen Vergleich innerhalb einer Cross-Over-Gruppe wurde ein t-Test für abhängige Stichproben gewählt. Vergleiche zwischen den Cross-over-Gruppen erfolgten mittels einer univariaten Varianzanalyse (Analysis of Variance, ANOVA).

Zur Überprüfung der Korrelation zweier Variablen wurde bei normalverteilten Daten der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet, bei schiefverteilten Daten der Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten. Der Korrelationskoeffizient gibt die Stärke und Richtung des

Zusammenhangs zwischen den Ausprägungen zweier Variablen an und kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Ein negativer Wert steht für einen negativen linearen und ein positiver Wert für einen positiven linearen Zusammenhang.

3.3 Versuchsreihe II - In-vitro-Studien

Parallel zur Humanstudie (Versuchsreihe I, Untersuchungsserien I/I.II) wurde in Versuchsreihe II durch verschiedene In-vitro-Untersuchungsserien (II.I, II.II, II.III) mit dem ORAC-Assay die antioxidative Kapazität von reinem Rooibostee und mit Rooibostee gespiketen Serum analysiert. Das Ziel war es, mögliche Störeinflüsse, die die Messung der antioxidativen Kapazität in Versuchsreihe I beeinflusst haben können, unter reproduzierbaren Bedingungen zu ermitteln.

Im Folgenden sollen die Untersuchungsserien, die im Rahmen der Versuchsreihe II durchgeführt wurden, genauer beschrieben werden.

3.3.1.1 Untersuchungsserie II.I

Für die Untersuchungsserie II.I wurde Rooibostee in der Konzentration verwendet, in der dieser auch in der Humanstudie eingesetzt wurde (500 ml Wasser auf 10 g Droge \triangleq 1270 $\mu\text{mol/l}$ Aspalathin, vgl. 3.2.4.1). Ausgehend von dieser Stammlösung wurde eine Messreihe mit ansteigendem Verdünnungsgrad des Rooibosteess erstellt (1150, 1000, 800, 700, 600, 500, 200 $\mu\text{mol/l}$ Aspalathin). Die finale Konzentration in den Wells war nach der Probenaufarbeitung, wie sie auch im Rahmen der Humanstudie erfolgte, deutlich geringer (1.27, 1.15, 1.0, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.2 $\mu\text{mol/l}$ Aspalathin, Anhang 2.5.2.1). Die Quantifizierung der in den jeweiligen Proben vorliegenden Menge an Rooibostee erfolgte über die Berechnung der Aspalathinkonzentration, da dieses Flavonoid quantitativ dominierend ist. Das Ziel der Untersuchungsserie war es, die Antioxidativität des Rooibosteess, stellvertretend für die weiteren in der Humanstudie eingesetzten Prüfprodukte mit ähnlichem Flavonoidprofil, zu bestätigen.

3.3.1.2 Untersuchungsserie II.II

In der Untersuchungsserie II.II wurde Rooibostee in verschiedenen Konzentrationsstufen Serumproben zugesetzt. Im Folgenden wird in diesem Zusammenhang der Begriff spiken verwendet.

Ausgehend von einer Stammlösung in der Aspalathin in einer Konzentration von 1270 $\mu\text{mol/l}$ vorlag, wurde eine Verdünnungsreihe mit abnehmenden Mengen Rooibostee und parallel ansteigenden Mengen Serum erstellt (115, 100, 80, 70, 60, 50, 40 $\mu\text{mol/l}$ Aspalathin). Die finale Konzentration in den Wells war in Folge der weiteren Probenaufarbeitung noch

deutlich geringer (0.127, 0.115, 0.1, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04 $\mu\text{mol/l}$ Aspalathin, Anhang 2.5.2.1). Die Quantifizierung der jeweilig in den Proben enthaltenen Mengen Rooibostee erfolgte, wie auch in Untersuchungsserie II.I, anhand des Aspalathingehaltes. Eine ungespikete Serumprobe wurde gemessen um einen Vergleichswert zu bilden.

3.3.1.3 Untersuchungsserie II.III

In dieser Untersuchungsserie sollte ermittelt werden, ob die antioxidative Kapazität der Einzelkomponenten Serum und Rooibostee im Falle einer Mischung additiv ist oder, ob in Folge einer Reaktion der Flavonoide mit endogenen Substanzen des Serums Maskierungseffekte auftreten, die ihre antioxidative Kapazität überlagern.

Dieser Fragestellung folgeleistend wurde die antioxidative Kapazität von Serum, Rooibostee (1.0 $\mu\text{mol/l}$ Aspalathin) sowie einem Gemisch aus Rooibostee und Serum (1.0 $\mu\text{mol/l}$ Aspalathin) gemessen. Die in den jeweiligen Proben enthaltene Menge an Rooibostee wurde, wie in den vorigen Untersuchungsserien, anhand des Aspalathingehaltes quantifiziert.

4 Ergebnisse

Insgesamt wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei Versuchsreihen durchgeführt (Versuchsreihe I - Ex-vivo-Messungen, Versuchsreihe II - In-vitro-Messungen), deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden.

4.1 Versuchsreihe I – Humanstudie

In der Versuchsreihe I wurden die Blutproben aus der Humanstudie untersucht. Als Hauptzielparameter wurde neben der antioxidativen Kapazität der entnommenen Blutproben zu definierten Zeitpunkten die Bioverfügbarkeit der applizierten Rooibosflavonoide bestimmt.

Die Versuchsreihe I war in zwei Untersuchungsserien (I.I, I.II) untergliedert, in denen plazebokontrolliert Rooibostee und eine isolierte Fraktion (Untersuchungsserie I.I) bzw. ein frisches sowie ein gelagertes Fertiggetränk (Untersuchungsserie I.II) gereicht wurden.

4.1.1 Studienkollektiv

Die Studienkollektive beider Untersuchungsserien umfassten jeweils 12 männliche Probanden.

Im Rahmen der Untersuchungsserie I.I beendeten zwei Probanden die Studie auf eigenen Wunsch ohne Angabe von Gründen vorzeitig. Im Gegensatz wurde in der Untersuchungsserie I.II kein Dropout verzeichnet. Das durchschnittliche Alter der Probanden lag bei 26.1 ± 4.1 Jahren (Spanne 12-35 Jahre) in der ersten bzw. 29.6 ± 4.4 Jahren (Spanne 21-35) in der zweiten Untersuchungsserie.

Die anthropometrischen Daten der beiden Kollektive können der Tabelle 15 entnommen werden. Anhand des BMI war der Großteil der Probanden als normalgewichtig zu klassifizieren ($< 25 \text{ kg/m}^2$).

Tabelle 15: Anthropometrische Daten des Kollektive beider Untersuchungsserien, Mittelwerte \pm SD (Min.-Max.)

Parameter	US I.I (n = 10)	US I.II (n = 12)
Körpergröße [m]	1.83 ± 0.07 (1.72-1.98)	$1.83 \pm 0,07$ (1.71-1.91)
Körpergewicht [kg]	78.5 ± 8.20 (66.0-98.0)	83.5 ± 13.20 (60.6-99.9)
Body Mass Index [kg/m²]	23.5 ± 2.10 (20.0-27.4)	$25,0 \pm 2,90$ (19.6-29.5)

Neben den anthropometrischen Daten wurden in der Humanstudie zu Studienbeginn verschiedene Basis- und Sicherheitsparameter (Lipid- und Leberwerte) erfasst.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die mittlere Nüchternserumkonzentration der Triacylglyceride sowie des LDL- und HDL-Cholesterols. Die berechneten Mittelwerte lagen im jeweiligen Referenzbereich, ebenso die meisten individuellen Werte.

Tabelle 16: Nüchternserumkonzentration von Triacylglyceriden, LDL- und HDL-Cholesterols der Studienkollektive der Versuchsreihe I, Mittelwerte \pm SD (Min.-Max.)

Parameter	US I.I (n = 10)	US I.II (n = 12)	Referenzbereich
Triacylglyceride [mg/dl]	121 \pm 100 (58-300)	130 \pm 91.3 (52-393)	< 150
LDL-Cholesterol [mg/dl]	108 \pm 29.8 (63-155)	126 \pm 33.1 (64-169)	< 130
HDL-Cholesterol [mg/dl]	51.3 \pm 9.80 (32-67)	50.4 \pm 11.5 (36-79)	> 35

Neben den Lipidwerten wurden zu Beginn jeder Untersuchungsserie auch die Leberwerte bestimmt (Tabelle 17). Diese lagen im Mittel in beiden Untersuchungsserien innerhalb des Normbereichs, ebenso wie die meisten individuellen Werte. Die in beiden Untersuchungsserien gemessenen Abweichungen von den Referenzwerten waren nur gering und gesundheitlich unbedenklich.

Tabelle 17: Leberwerte der Studienkollektive der Versuchsreihe I, Mittelwerte \pm SD (Min.-Max.)

Parameter	US I.I (n = 10)	US I.II (n = 12)	Referenzbereich
GGT [U/l]	22.6 \pm 6.17 (14-32)	27.3 \pm 12.27 (14-53)	< 60
AST [U/l]	27.5 \pm 4.88 (21-35)	29.5 \pm 9.94 (18-53)	< 50
ALT [U/l]	32.5 \pm 12.33 (19-56)	27.8 \pm 10.95 (15-46)	< 50
ALP [U/l]	73.6 \pm 15.8 (57-111)	72.4 \pm 13.26 (59-98)	40-130
Bilirubin [mg/dl]	1.04 \pm 0.53 (0.50-1.91)	1.00 \pm 0.48 (0.55-1.90)	< 1.10

4.1.2 Bioverfügbarkeit

Da sowohl in der Nüchterblut- als auch der Nüchternurinprobe sowie nach Einnahme des Placebos weder in den Urin- noch in den Plasmaproben der beiden Untersuchungsserien Rooibosflavonoide detektiert wurden, wird im Folgenden auf eine tabellarische Darstellung und eine Beschreibung dieser Werte verzichtet. Eine Bereinigung der zu den Entnahmezeitpunkten 1.5 und 3h (Untersuchungsserie I.I) bzw. 0.5, 1.5 und 3 h (Untersuchungsserie I.II) ermittelten Flavonoidplasmaspiegel und der Flavonoidurinspiegel (0-2, 2-4, 4-6, 8-24 h) war demnach ebenfalls nicht erforderlich.

4.1.3 Bioverfügbarkeit Untersuchungsserie I.I

Plasmaproben

Wie in Tabelle 18 dargestellt, war die Menge der absorbierten Rooibosflavonoide im Plasma sowohl nach Konsum des Rooibostees als auch nach Aufnahme der isolierten aktiven Fraktion gering. Zudem wird aus den jeweiligen Medianen ersichtlich, dass der Großteil der applizierten Flavonoide in weniger als der Hälfte der Blutproben detektierbar war.

Nach Applikation des Rooibostees war nur für die Flavonoid-C-Glykoside Isoorientin, Orientin und Aspalathin eine mediane Konzentration von 0.02-0.05 $\mu\text{mol/l}$ berechenbar. Weitere polyphenolische Komponenten des Rooibostees akkumulierten in weniger als der Hälfte der Blutproben in quantifizierbaren Mengen, weshalb der Median dieser Flavonoide bei 0 $\mu\text{mol/l}$ lag. Für das Aspalathin konnten die vergleichsweise höchsten c_{max} -Werte von bis zu 1.20 $\mu\text{mol/l}$ nach 3 h detektiert werden. Im Falle der übrigen Verbindungen lag die jeweilige maximale Konzentration deutlich niedriger.

Nach Konsum der isolierten aktiven Fraktion fiel die Bioverfügbarkeit, wie auch nach Aufnahme des Tees, sehr gering aus. Für die Komponenten Orientin, Rutin und Hyperosid waren mediane Konzentrationen zwischen 0.03-0.06 $\mu\text{mol/l}$ berechenbar. Die weiteren Flavonoide wiesen einen Median von 0 $\mu\text{mol/l}$ auf, gleichbedeutend damit, dass die nach Konsum der aktiven Fraktion detektierten polyphenolischen Komponenten in weniger als der Hälfte der Blutproben in quantifizierbaren Mengen akkumulierten. Das Aspalathin erreichte auch nach Einnahme dieses Prüfproduktes, im Vergleich zu den übrigen Komponenten, nach 1.5 h die höchsten c_{max} -Werte (0.42 $\mu\text{mol/l}$).

Tabelle 18: Konzentration der Rooibosflavonoide im Plasma nach Gabe des Rooibostees und der isolierten aktiven Fraktion zu den Entnahmezzeitpunkten 1.5 und 3 h, Median (Min.-Max.), n = 8

Substanz	Rooibostee		isolierte aktive Fraktion	
	Flavonoid-C-Glykoside ($\mu\text{mol/l}$)			
	1.5 h	3 h	1.5 h	3 h
Isoorientin	0.03 (0-0.06)	0 (0-0.04)	0 (0-0.04)	0 (0-0.08)
Orientin	0.05 (0-0.27)	0.02 (0-0.72)	0.02 (0-0.13)	0.06 (0-0.13)
Aspalathin	0 (0-0.21)	0.03 (0-1.20)	0 (0-0.42)	0 (0-0.25)
Isovitexin	0 (0-0.03)	0 (0-0.06)	0 (0-0.04)	0 (0-0.02)
Vitexin	0 (0-0.29)	0 (0-0)	0 (0-0.03)	0 (0-0.01)
Nothofagin	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0.12)	0 (0-0.12)
Substanz	Flavonoid-O-Glykoside ($\mu\text{mol/l}$)			
	1.5 h	3 h	1.5 h	3 h
Rutin	0 (0-0.03)	0 (0-0.47)	0 (0-0.04)	0.03 (0-0.12)
Hyperosid	0 (0-0.09)	0 (0-0.09)	0 (0-0.06)	0.03 (0-0.22)
Isoquercitrin	0 (0-0.20)	0.01 (0-0.12)	0 (0-0.09)	0 (0-0.04)

In Tabelle 19 ist die individuelle und die mittlere Konzentration der vier, in den Prüfprodukten der Untersuchungsserie I.I, dominierenden Flavonoide (Isoorientin, Orientin, Aspalathin, Nothofagin, vgl. 3.2.4.1) unter ausschließlicher Berücksichtigung von Probanden, in deren Blutproben diese Substanzen detektiert werden konnten, aufgeführt. Die Verteilung der vier Flavonoide in den Blutproben war heterogen. In Plasmaproben nahezu aller Probanden der Untersuchungsserie I.I konnten Isoorientin, Orientin, Aspalathin oder Nothofagin, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß und zu verschiedenen Zeitpunkten, detektiert werden.

Tabelle 19: Individuelle und mittlere Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) der Substanzen Isoorientin, Orientin, Aspalathin und Nothofagin im Plasma zu den Entnahmezeitpunkten 1.5 und 3 h

Substanz	Rooibostee				isolierte aktive Fraktion			
	1.5 h*		3 h*		1.5 h*		3 h*	
Isoorientin	Pb [†] 1	0.05	Pb 1	0.03	Pb 4	0.04	Pb 1	0.08
	Pb 2	0.03	Pb 5	0.03	Pb 5	0.02	Pb 2	0.08
	Pb 3	0.03						
	Pb 4	0.06						
	Pb 5	0.02						
	Pb 6	0.05						
Mittelwert	0.04		0.03		0.02		0.08	
Orientin	Pb 1	0.27	Pb 1	0.72	Pb 3	0.06	Pb 1	0.13
	Pb 2	0.03	Pb 3	0.03	Pb 4	0.04	Pb 2	0.09
	Pb 4	0.12	Pb 7	0.15	Pb 5	0.10	Pb 3	0.05
	Pb 5	0.06	Pb 5	0.04	Pb 6	0.13	Pb 4	0.03
	Pb 6	0.07					Pb 5	0.03
							Pb 8	0.07
						Pb 6	0.10	
Mittelwert	0.11		0.24		0.08		0.07	
Aspalathin	Pb 1	0.21	Pb 1	1.20	Pb 2	0.42	Pb 5	0.22
	Pb 4	0.16	Pb 2	0.05	Pb 3	0.18	Pb 8	0.25
	Pb 5	0.20	Pb 3	0.20	Pb 5	0.13		
			Pb 5	0.21				
Mittelwert	0.19		0.42		0.24		0.24	
Nothofagin	-	-	-	-	Pb 4	0.12	Pb 4	0.12
Mittelwert	-	-	-	-	0.12		0.12	

* berücksichtigt wurden ausschließlich Plasmaproben in denen Isoorientin, Orientin, Aspalathin oder Nothofagin detektiert wurde

[†] Pb = Proband

Wie in Tabelle 20 dargestellt, entsprach die aus den Messwerten von drei (1.5 h) bzw. vier (3 h) Probanden berechnete, mittlere Aspalathinplasmakonzentration nach Aufnahme des Rooibostees (1.5 h: 0.19 $\mu\text{mol/l}$, 3 h: 0.42 $\mu\text{mol/l}$, siehe Tabelle 19) in etwa 0.08 bzw. 0.18 % der über den Rooibostee applizierten Aspalathinmenge. Die mittlere Aspalathinplasmakonzentration nach Ingestion der isolierten aktiven Fraktion berechnete sich aus den Messwerten von drei (1.5 h) bzw. zwei Probanden (3 h) (1.5 und 3 h: 0.24 $\mu\text{mol/l}$, siehe Tabelle 19) und machte etwa 0.11 % des zugeführten Aspalathins aus.

Tabelle 20: Prozentualer Anteil der aus den Prüfprodukten in die Plasmaproben übergegangen Aspalathinmenge für ausgewählte Probanden und im Mittel

Substanz	Rooibostee				isolierte aktive Fraktion			
	1.5 h* %		3 h* %		1.5 h* %		3 h* %	
Aspalathin	Pb 1	0.09	Pb 1	0.52	Pb 2	0.19	Pb 5	0.10
	Pb 4	0.07	Pb 2	0.02	Pb 3	0.08	Pb 8	0.11
	Pb 5	0.09	Pb 3	0.08	Pb 5	0.06		
			Pb 5	0.09				
Mittelwert	0.08		0.18		0.11		0.11	

* berücksichtigt wurden ausschließlich Plasmaproben in denen Isoorientin, Orientin, Aspalathin oder Nothofagin detektiert wurde

Urinproben

Neben den Plasmaproben wurden auch die in der Humanstudie gewonnenen Urinproben auf ihren Aspalathingehalt untersucht. In der Tabelle 21 ist die mediane Konzentration des Aspalathins und seiner Metabolite in den verschiedenen Sammelurinproben dargestellt. Rechnerisch ließ sich abschätzen, dass die Gesamtmenge aller über den 0-24 h Urin ausgeschiedenen Aspalathinmetabolite im Falle des Rooibostees bei 16.2 µmol bzw. bei 42 µmol nach Aufnahme der isolierten, aktiven Fraktion lag. Prozentual entsprach dies 2.6 bzw. 6.7 % der über das jeweilige Prüfprodukt verabreichten Aspalathinmenge. Der quantitativ dominierende Metabolit im Urin war nach Aufnahme beider Prüfprodukte das einfach methylierte Aspalathin.

Tabelle 21: Menge (μmol) des Aspalathins und seiner Metabolite im Urin nach Gabe des Rooibostees und der isolierten aktiven Fraktion, $n = 9$

Zeitintervall (h)	Rooibostee					isolierte aktive Fraktion					
	0-2	2-4	4-6	8-24	0-24	0-2	2-4	4-6	8-24	0-24	
Aspalathin	Median	0	0	0	0	0	0.04	0.21	0	0	0.25
	Minimum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maximum	1.58	1.31	2.23	73.4	78.5	2	1.84	0.58	4.55	8.97
3-O-Me-Aspalathin		6.35	6.67	2.22	0	15.2	16.2	14.9	5.67	2.47	39.3
		0	4.72	0	0	4.72	0	0.28	0.60	0	0.90
		31.6	18.1	9.16	3.29	62.2	74.9	60.8	37.5	33.9	207
Aspalathin-O-GlcA		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<LOQ	<LOQ	0	0	0	0	0.24	0	0	0.24
Me-O-Aspalathin-GlcA		0.09	0.21	0	0	0.30	0.66	0.18	0	0	0.84
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		6.87	1.83	0.26	0	8.96	5.08	5.78	2.52	0	13.4
Me-O-Aspalathin-GlcA		0	0.36	0.17	0	0.53	0.60	0.49	0.54	0	1.63
		0.12	0	0	0	0.12	0	0	0	0	0
		1.83	0.67	13.5	0.54	16.5	1.96	3.08	2.38	4.29	11.8
Aspalathin-4-O-Sulfat		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0.3	0	0	0	0	0
		1.72	0.26	0	5.68	7.66	1.19	3.26	1.34	0	5.79
Gesamt		6.44	7.24	2.39	0	16.0	17.5	15.8	6.21	2.47	42.0
	Median %[†]					2.6					6.7

[†] prozentualer Anteil des aus den Prüfprodukten in den Urin übergegangenen Aspalathins

4.1.4 Bioverfügbarkeit Untersuchungserie I.II

Plasmaproben

Nach Aufnahme des frischen Fertiggetränks lag die mediane Konzentration im Plasma bei allen detektierten Komponenten und zu allen untersuchten Zeitpunkten bei 0 nmol/ml. Das Aspalathin erreichte die vergleichsweise höchste Maximalkonzentration (4.56 $\mu\text{mol/l}$) nach 3 h. Die weiteren polyphenolischen Bestandteile akkumulierten in deutlich geringeren Mengen (Tabelle 22).

Der Ingestion des gelagerten Fertiggetränks folgend konnte ebenfalls für keine der ermittelten Verbindungen, zu keinem der Zeitpunkte eine mediane Konzentration $> 0 \mu\text{mol/l}$ ermittelt werden. Aspalathin und Nothofagin erreichten die höchsten c_{max} -Werte von 1.52 $\mu\text{mol/l}$ nach 0.5 h bzw. von 1.57 $\mu\text{mol/l}$ nach 1.5 h. Die übrigen Komponenten zeigten deutlich geringere maximale Konzentrationen.

Tabelle 22: Konzentration der Rooibosflavonoide im Plasma nach Gabe des frischen und gelagerten Fertiggetränks zu den Entnahmezeitpunkten 0.5, 1.5 und 3 h, Median (Min.-Max.), n = 9

Substanz	frisches Fertiggetränk (n = 9)			gelagertes Fertiggetränk (n = 9)		
	Flavonoid-C-Glykoside (µmol/l)					
	0.5 h	1.5 h	3 h	0.5 h	1.5 h	3 h
Isoorientin	0 (0-0.40)	0 (0-0.31)	0 (0-0.43)	0 (0-0.14)	0 (0-0.07)	0 (0-0.03)
Orientin	0 (0-0.13)	0 (0-0.10)	0 (0-0.14)	0 (0-0.06)	0 (0-0.04)	0 (0-0.01)
Aspalathin	0 (0-3.16)	0 (0-1.88)	0 (0-4.56)	0 (0-1.52)	0 (0-0.98)	0 (0-0.05)
Isovitexin	0 (0-0.13)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0.05)	0 (0-0)	0 (0-0)
Vitexin	0 (0-0.16)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0.03)	0 (0-0)	0 (0-0)
Nothofagin	0 (0-1.09)	0 (0-0.09)	0 (0-0)	0 (0-0.97)	0 (0-1.57)	0 (0-0)
Substanz	Flavonoid-O-Glykoside (µmol/l)					
	0.5 h	1.5 h	3 h	0.5 h	1.5 h	3 h
	Rutin	0 (0-0.19)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0.04)	0 (0-0.01)
Hyperosid	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0.03)	0 (0-0)	0 (0-0)
Isoquercitrin	0 (0-0.13)	0 (0-0.08)	0 (0-0.95)	0 (0-0.11)	0 (0-0.07)	0 (0-0)

In Tabelle 23 ist die individuelle und die mittlere Konzentration der vier in den Prüfprodukten dominierenden Flavonoide (Isoorientin, Orientin, Aspalathin, Nothofagin, vgl. 3.2.4.2), unter ausschließlicher Berücksichtigung von Probanden, in deren Blutproben diese Substanzen detektiert werden konnten, dargestellt. Die Verteilung der Substanzen in den Blutproben der an der Untersuchungsserie I.II teilnehmenden Probanden war, wie in Untersuchungsserie I.I, weitestgehend heterogen. Mit Ausnahme von zwei Probanden konnten Isoorientin, Orientin, Aspalathin oder Nothofagin, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß und zu verschiedenen Zeitpunkten, in Blutproben aller Studienteilnehmer detektiert werden.

Tabelle 23: Individuelle und mittlere Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) der Substanzen Isoorientin, Orientin, Aspalathin und Nothofagin im Plasma zu den Entnahmezeitpunkten 1.5 und 3 h

Substanz	frisches Fertiggetränk			gelagertes Fertiggetränk		
	0.5 h*	1.5 h*	3 h*	0.5 h*	1.5 h*	3 h*
Isoorientin	Pb [†] 1 0.09	Pb 2 0.31	Pb 2 0.43	Pb 3 0.14	Pb 2 0.07	Pb 2 0.03
	Pb 2 0.40	Pb 3 0.04	Pb 5 0.02	Pb 5 0.05	Pb 3 0.03	Pb 3 0.01
	Pb 4 0.08		Pb 6 0.02	Pb 6 0.02	Pb 5 0.06	
				Pb 4 0.05	Pb 6 0.04	
Mittelwert	0.57	0.18	0.16	0.02	0.05	0.02
Orientin	Pb 1 0.06	Pb 2 0.10	Pb 2 0.14	Pb 3 0.06	Pb 3 0.02	Pb 6 0.01
	Pb 2 0.13	Pb 3 0.02		Pb 5 0.04	Pb 5 0.04	
	Pb 4 0.07			Pb 4 0.06	Pb 6 0.01	
Mittelwert	0.09	0.06	0.14	0.05	0.02	0.01
Aspalathin	Pb 1 1.28	Pb 2 1.88	Pb 2 4.55	Pb 3 1.52	Pb 2 2.44	Pb 2 0.05
	Pb 2 3.16	Pb 3 0.56		Pb 5 0.50	Pb 3 0.22	Pb 7 0.03
	Pb 4 0.96	Pb 4 0.01		Pb 4 0.77	Pb 7 0.68	
					Pb 5 0.54	
Mittelwert	1.80	0.82	4.55	0.93	0.97	0.04
Nothofagin	Pb 1 0.51	Pb 3 0.09	-	Pb 3 0.97	Pb 2 1.57	-
	Pb 2 1.09			Pb 5 0.06	Pb 5 0.26	
	Pb 4 0.36					
Mittelwert	0.65	0.09		0.52	0.92	

* berücksichtigt wurden ausschließlich Plasmaproben in denen Isoorientin, Orientin, Aspalathin oder Nothofagin detektiert wurde

† Pb = Proband

Wie in Tabelle 24 dargestellt, entsprach die aus den Messwerten von drei (0.5, 1.5 h) bzw. einem (3 h) Probanden berechnete mittlere Aspalathinplasmakonzentration nach Aufnahme des frischen Fertiggetränks (0.5 h: 1.8 $\mu\text{mol/l}$, 1.5 h: 0.82 $\mu\text{mol/l}$, 3 h: 4.55 $\mu\text{mol/l}$, siehe Tabelle 23) in etwa 2.09, 0.95 und 5.28 % der mittels des Prüfprodukts zugeführten Aspalathinmenge. Die nach Ingestion des gelagerten Fertiggetränks aus den Messwerten von drei (0.5 h), vier (1.5 h) und zwei (3 h) Probanden berechnete mittlere Aspalathinplasmakonzentration (0.5 h: 0.93 $\mu\text{mol/l}$, 1.5 h: 0.97 $\mu\text{mol/l}$, 3 h: 0.04 $\mu\text{mol/l}$, siehe Tabelle 23) machte 6.31, 6.60 und 0.29 % des zugeführten Aspalathins aus.

Tabelle 24: Prozentualer Anteil der aus den Prüfprodukten in die Plasmaproben übergegangenen Aspalathinmenge für ausgewählte Probanden und im Mittel

Substanz	frisches Fertiggetränk			gelagertes Fertiggetränk		
	0.5 h* %	1.5 h* %	3 h* %	0.5 h* %	1.5 h* %	3 h* %
Aspalathin	Pb 1 1.49	Pb 2 2.18	Pb 2 5.29	Pb 3 10.4	Pb 2 16.6	Pb 2 0.36
	Pb 2 3.67	Pb 3 0.65		Pb 5 3.37	Pb 3 1.51	Pb 7 0.22
	Pb 4 1.11	Pb 4 0.01		Pb 4 5.22	Pb 7 4.60	
					Pb 5 3.65	
Mittelwert	2.09	0.95	5.28	6.31	6.60	0.29

* berücksichtigt wurden ausschließlich Plasmaproben in denen Isoorientin, Orientin, Aspalathin oder Nothofagin detektiert wurde

Neben den Plasmaproben wurden auch die in der Humanstudie gewonnenen Urinproben auf ihren Aspalathingehalt untersucht. In der Tabelle 25 ist die mediane Konzentration des Aspalathins und seiner Metabolite in den verschiedenen Sammelurinproben dargestellt. Rechnerisch konnte abgeschätzt werden, dass die Gesamtmenge der über den 0-24 h Urin ausgeschiedenen Aspalathinmetabolite nach Aufnahme des frischen und des gelagerten Fertiggetränks bei 11.5 bzw. 3.6 µmol lag. Dies entsprach 3.2 bzw. 1.5 % der über das jeweilige Prüfprodukt verabreichten Aspalathindosis. Übereinstimmend mit den Untersuchungsergebnissen der Untersuchungsserie I.I war das einfach methylierte Aspalathin auch hier der dominierende Metabolit.

Tabelle 25: Menge (μmol) des Aspalathins und seiner Metabolite im Urin nach Gabe des frischen und gelagerten Fertiggetränks, n = 4

Zeitintervall (h)	frisches Fertiggetränk					gelagertes Fertiggetränk					
	0-2	2-4	4-6	8-24	0-24	0-2	2-4	4-6	8-24	0-24	
Aspalathin	Median	0	0	0	2.73	2.73	0	0	0	0	0
	Minimum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maximum	0.03	0.37	0.40	15	15.8	0	0	2.57	19.7	22.3
3-O-Me-Aspalathin		3.05	3.18	1.80	0.60	8.63	2.14	1.51	0	0	3.65
		0	0	0	0	0	0.82	1.15	0	0	1.97
		10.8	6.32	3.70	3.86	24.7	7.04	1.98	0.70	0	9.72
Me-O-Aspalathin-glcS		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0.32	0.23	0	0.55	0	0	0	0	0
Me-O-Aspalathin-glcS		0	0.13	0	0	0.13	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0.85	0.54	0	1.39	0	0	0	0	0
Gesamt	Median %[†]	3.05	3.31	1.80	3.33	11.5 3.2	2.1	1.5	0	0	3.65 1.5

[†] prozentualer Anteil des aus den Prüfprodukten in den Urin übergegangen Aspalathins

4.1.5 Antioxidatives Potenzial

Als weiterer Parameter wurde neben der Bioverfügbarkeit auch die antioxidative Kapazität der entnommenen Blutproben bestimmt. Die Messungen erfolgten mittels des ORAC- und FRAP-Assays. Weiterhin wurde in allen Blutproben die Harnsäure quantifiziert, da diese als endogenes, körpereigenes Antioxidans die Messung der antioxidativen Kapazität möglicherweise maßgeblich beeinflussen kann.

4.1.5.1 ORAC

4.1.5.1.1 Untersuchungsserie I.I

In der Untersuchungsserie I.I wurden plazebokontrolliert Rooibostee und eine isolierte aktive Fraktion appliziert.

Wie die nachfolgende Tabelle zeigt, konnte nach Verabreichung des Plazebos zu allen Messezeitpunkten eine im Vergleich zur Nüchternprobe niedrigere antioxidative Kapazität gemessen werden. Ab dem Entnahmezeitpunkt 1 h war diese Abnahme, die zwischen 5-15 % schwankte, signifikant.

Tabelle 26: Antioxidative Kapazität (ORAC) vor und nach Aufnahme des Placebos, n = 10

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	Placebo		
		Mean ± SD	% [†]	p [‡]
ORAC [μmol TE/l]	0	2637 ± 320	100	
	0.5	2515 ± 291	95	0.220
	1	2416 ± 206	92	0.044
	1.5	2362 ± 273	90	0.016
	2	2438 ± 184	92	0.012
	3	2430 ± 224	92	0.016
	5	2325 ± 259	88	0.015
	8	2230 ± 252	85	0.001

[‡] t-Test für abhängige Stichproben (Nüchternkonzentration vs. jeweiliger Entnahmezeitpunkt)

[†] prozentuale Veränderung der antioxidativen Kapazität bezogen auf den Ausgangswert

Nach Aufnahme des Rooibostees konnte ebenfalls durchgehend eine Abnahme der antioxidativen Kapazität gemessen werden, die ab dem Entnahmezeitpunkt 1 h signifikant war und eine Höhe von 6-15 % erreichte (Tabelle 27).

Tabelle 27: Antioxidative Kapazität (ORAC) vor und nach Aufnahme des Rooibostees, n = 10

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	Rooibostee		
		Mean ± SD	% [†]	p [‡]
ORAC [μmol TE/l]	0	2668 ± 305	100	
	0.5	2554 ± 276	96	0.089
	1	2516 ± 292	94	0.005
	1.5	2289 ± 324	85	0.001
	2	2381 ± 327	89	0.010
	3	2277 ± 225	85	0.003
	5	2274 ± 226	85	< 0.001
	8	2300 ± 176	86	0.001

[‡] t-Test für abhängige Stichproben (Nüchternkonzentration vs. jeweiliger Entnahmezeitpunkt)

[†] prozentuale Veränderung der antioxidativen Kapazität bezogen auf den Ausgangswert

Analog zu den Messwerten, die nach Konsum des Placebos und des Rooibostees ermittelt wurden, war auch nach der Ingestion des zweiten Verumpräparates, der isolierten aktiven Rooibosfraktion, zu allen Messzeitpunkten eine Abnahme der antioxidativen Kapazität messbar. Diese war im Vergleich zur Nüchternprobe zu den Zeitpunkten 1.5, 5 und 8 h signifikant und lag dabei zwischen 10-15 % (Anhang 3.1, Tabelle A 6).

Wie eine Analyse der ORAC-Messwerte mittels ANOVA zeigte, wiesen die nach Konsum des Placebos und der beiden Verumpräparate in der Untersuchungsserie I.I erfassten Messwerte

im Gruppenvergleich zu keinem der Entnahmezeitpunkte einen signifikanten Unterschied auf (Tabelle 28).

Tabelle 28: Antioxidative Kapazität (ORAC) vor und nach Aufnahme der verschiedenen Prüfprodukte im Gruppenvergleich, n = 10

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	Plazebo	Rooibostee	Fraktion	p *
		Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
ORAC [µmol TE/l]	0	2637 ± 320	2668 ± 305	2633 ± 360	0.967
	0.5	2515 ± 291	2554 ± 276	2480 ± 308	0.853
	1	2416 ± 206	2516 ± 292	2479 ± 389	0.762
	1.5	2362 ± 273	2289 ± 324	2368 ± 293	0.802
	2	2438 ± 184	2381 ± 327	2400 ± 306	0.898
	3	2430 ± 224	2277 ± 225	2386 ± 293	0.380
	5	2325 ± 259	2274 ± 226	2315 ± 284	0.897
	8	2230 ± 252	2300 ± 176	2391 ± 249	0.304

* ANOVA (Rooibostee vs. isolierte aktive Fraktion vs. Plazebo)

Anhand der um die Nüchternwerte bereinigten ORAC-Werte lässt sich die Entwicklung der antioxidativen Kapazität nach Aufnahme des jeweiligen Prüfproduktes auch grafisch darstellen. Wie aus der Abbildung 26 ersichtlich wird, wies der Verlauf prüfproduktunabhängig vergleichbare Charakteristika auf.

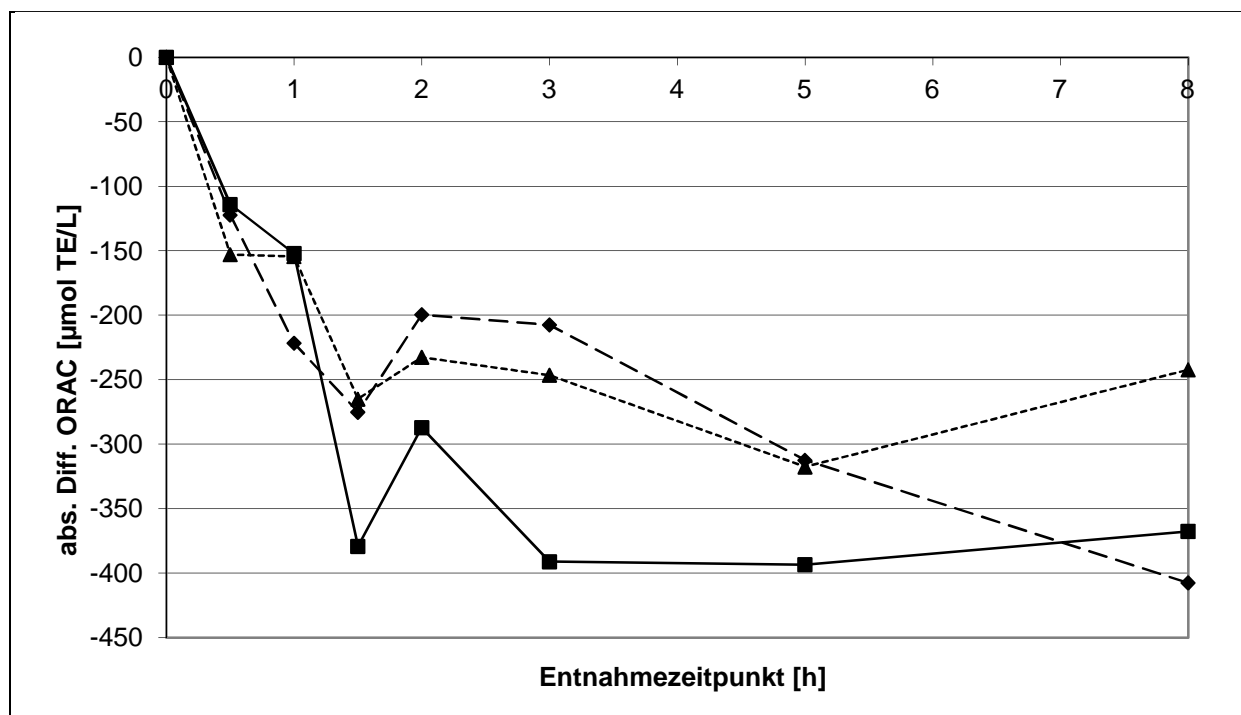


Abbildung 26: Veränderung der antioxidativen Kapazität (ORAC) nach Aufnahme der Prüfprodukte der Untersuchungsserie I.I, n = 10

(■ = Rooibostee, ▲ = Fraktion, ◆ = Plazebo)

Mittels der bereinigten Messwerte wurde zudem die AUC_{0-8h} , als Maß für die Veränderung der gesamtantioxidativen Kapazität nach Aufnahme der jeweiligen Prüfprodukte berechnet. Im Mittel lag diese im Falle des Rooibostees bei $-2660 \pm 1314 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$, nach Aufnahme der isolierten aktiven Fraktion bei $-1988 \pm 2185 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ und bei $-2163 \pm 1878 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ nach Applikation des Placebos. Mittels einer ANOVA konnte ermittelt werden, dass diese Werte, ebenso wie die Einzelmesswerte, die nach Aufnahme der verschiedenen Prüfprodukte gemessen wurden, keinen signifikanten Unterschied aufwiesen ($p = 0.699$).

Die über den ORAC-Test in der Untersuchungsserie I.I bestimmte antioxidative Kapazität korrelierte zu allen Messzeitpunkten, mit Ausnahme der Entnahmezeitpunkte 1.5 und 5 h, signifikant mit dem jeweiligen Harnsäuregehalt der Proben (Tabelle 29).

Tabelle 29: Korrelation zwischen der antioxidativen Kapazität (ORAC) und dem Harnsäuregehalt der Blutproben, $n = 30$

ORAC-HS	Untersuchungsserie I.I	
	r^*	p
t_0	0.408	0.025
$t_{0.5}$	0.499	0.005
t_1	0.544	0.002
$t_{1.5}$	0.260	0.166
t_2	0.425	0.019
t_3	0.454	0.012
t_5	0.318	0.087
t_8	0.585	0.001

* Pearson-Korrelationskoeffizient

Wurden zur Berechnung der Korrelation von Harnsäurekonzentration und antioxidativer Kapazität die jeweiligen um die Nüchternwerte bereinigten Messwerten verwendet, konnte größtenteils keine signifikante Korrelation zwischen den beiden Parametern detektiert werden (Tabelle 30).

Tabelle 30: Korrelation zwischen der um die Nüchternwerte bereinigten antioxidativen Kapazität (ORAC) und dem um die Nüchternwerte bereinigten Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 30

ORAC-HS	Untersuchungsserie I.I	
	r*	p
t _{0.5}	-0.030	0.876
t ₁	-0.209	0.267
t _{1.5}	-0.068	0.721
t ₂	-0.002	0.990
t ₃	-0.174	0.359
t ₅	-0.399	0.029
t ₈	-0.040	0.835

* Spearman-Rangkorrelationskoeffizient

In Tabelle 31 ist die um die Nüchternwerte bereinigte mittlere antioxidative Kapazität von Blutproben der Entnahmezeitpunkte 1.5 und 3 h im Vergleich zu der in diesen Blutproben detektierten mittleren Aspalathinkonzentration dargestellt. Entgegen vorheriger Analysen fanden in diesen Berechnungen ausschließlich Proben Berücksichtigung, in denen Aspalathin detektiert wurde (vgl. Tabelle 19). Übereinstimmend mit den bereits dargestellten Messergebnissen zur antioxidativen Kapazität war auch hierbei ein Abfall der antioxidativen Kapazität zu verzeichnen.

Tabelle 31: Mittlere nüchternwertbereinigte antioxidative Kapazität (ORAC) und mittlere Aspalathinkonzentration von Blutproben der Entnahmezeitpunkte 1.5 und 3 h

	Rooibostee			isolierte aktive Fraktion	
	Aspalathin-konzentration $\mu\text{mol/l}^*$	ORAC $\mu\text{mol TE/l}^*$		Aspalathin-konzentration $\mu\text{mol/l}^*$	ORAC $\mu\text{mol TE/l}^*$
1.5 h n = 3 [†]	0.19	-159	1.5 h n = 3 [†]	0.24	-209
3 h n = 4 [†]	0.42	-382	3 h n = 2 [†]	0.24	-316

* Mittelwertbildung erfolgte ausschließlich anhand von Plasmaproben in denen Aspalathin detektiert werden konnte

[†] Anzahl der Probanden/Plasmaproben, in denen Aspalathin detektiert wurde

4.1.5.1.2 Untersuchungsserie I.II

In der Untersuchungsserie I.II erfolgte die plazebokontrollierte Gabe eines frischen und eines gelagerten Rooibosfertiggetränkes.

Nach der Ingestion des Plazebos konnte in allen Serumproben eine geringere antioxidative Kapazität als in der Nüchternprobe ermittelt werden. Diese Differenz war zu den Zeitpunkten 1.5, 2, 3, 5 und 8 h signifikant und bewegte sich dabei zwischen 12-23 % (Tabelle 32).

Tabelle 32: Antioxidative Kapazität (ORAC) der Serumproben vor und nach Aufnahme des Placebos, n = 12

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	Placebo		
		Mean ± SD	% [†]	p [‡]
ORAC [μmol TE/l]	0	1977 ± 504	100	
	0.5	1950 ± 592	99	0.779
	1	1840 ± 539	93	0.074
	1.5	1741 ± 606	88	0.021
	2	1578 ± 518	80	< 0.001
	3	1667 ± 555	84	0.006
	5	1708 ± 526	86	0.037
	8	1539 ± 488	77	< 0.001

[‡] t-Test für abhängige Stichproben (Nüchternkonzentration vs. jeweiliger Entnahmezeitpunkt)

[†] prozentuale Veränderung der antioxidativen Kapazität bezogen auf den Ausgangswert

Nach dem Konsum des frischen Fertiggetränks konnte größtenteils eine Abnahme der antioxidativen Kapazität gemessen werden. Diese war zum Zeitpunkt 1.5 h signifikant und betrug ausgehend vom Nüchternwert 8 %. Lediglich nach 0.5 und 3 h wurde ein leichter Anstieg der antioxidativen Kapazität von maximal 7 % detektiert, der jedoch zu keinem der beiden Zeitpunkte ein signifikantes Niveau erreichte (Tabelle 33).

Tabelle 33: Antioxidative Kapazität (ORAC) der Serumproben vor und nach Aufnahme des frischen Fertiggetränks, n = 12

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	frisches Fertiggetränk		
		Mean ± SD	% [†]	p [‡]
ORAC [μmol TE/l]	0	1951 ± 334		
	0.5	2094 ± 445	107	0.167
	1	1909 ± 347	98	0.501
	1.5	1790 ± 387	92	0.002
	2	1828 ± 417	94	0.086
	3	1972 ± 518	101	0.832
	5	1901 ± 572	97	0.659
	8	1930 ± 497	99	0.819

[‡] t-Test für abhängige Stichproben (Nüchternkonzentration vs. jeweiliger Entnahmezeitpunkt)

[†] prozentuale Veränderung der antioxidativen Kapazität bezogen auf den Ausgangswert

In Übereinstimmung mit den zuvor dargestellten Messergebnissen war auch nach Konsum des gelagerten Fertiggetränks eine durchgehend niedrigere antioxidative Kapazität messbar als in der Nüchternprobe. Zu den Zeitpunkten 1.5 und 5 h erreichte diese Differenz eine Wertigkeit von 11 % und war signifikant (Anhang 3.1, Tabelle A 7).

Wie der nachfolgenden Tabelle entnommen werden kann, bestand zwischen den ORAC-Werten, die nach Aufnahme des Placebos und der beiden Verumpräparate (frisches und gelagertes Fertiggetränk) bestimmt wurden, kein signifikanter Unterschied.

Tabelle 34: Antioxidative Kapazität (ORAC) der Serumproben vor und nach Aufnahme der Prüfprodukte im Gruppenvergleich, n = 12

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	Plazebo	frisches Fertiggetränk	gelagertes Fertiggetränk	p*
		Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
ORAC [µmol TE/l]	0	1977 ± 504	1951 ± 334	2000 ± 558	0.968
	0.5	1950 ± 592	2094 ± 445	1999 ± 591	0.808
	1	1840 ± 539	1909 ± 347	1934 ± 562	0.888
	1.5	1741 ± 606	1790 ± 387	1786 ± 434	0.963
	2	1578 ± 518	1828 ± 417	1768 ± 559	0.453
	3	1667 ± 555	1972 ± 518	1880 ± 562	0.384
	5	1708 ± 526	1901 ± 572	1776 ± 449	0.655
	8	1539 ± 488	1930 ± 497	1821 ± 469	0.141

* ANOVA (Rooibostee vs. isolierte aktive Fraktion vs. Placebo)

Anhand der um die Nüchternwerte bereinigten ORAC-Messwerte lässt sich die Veränderung der antioxidativen Kapazität auch grafisch darstellen (Abbildung 27). Dabei wird deutlich, dass diese über den Untersuchungszeitraum hinweg prüfproduktunabhängig einen vergleichbaren Verlauf aufwies.

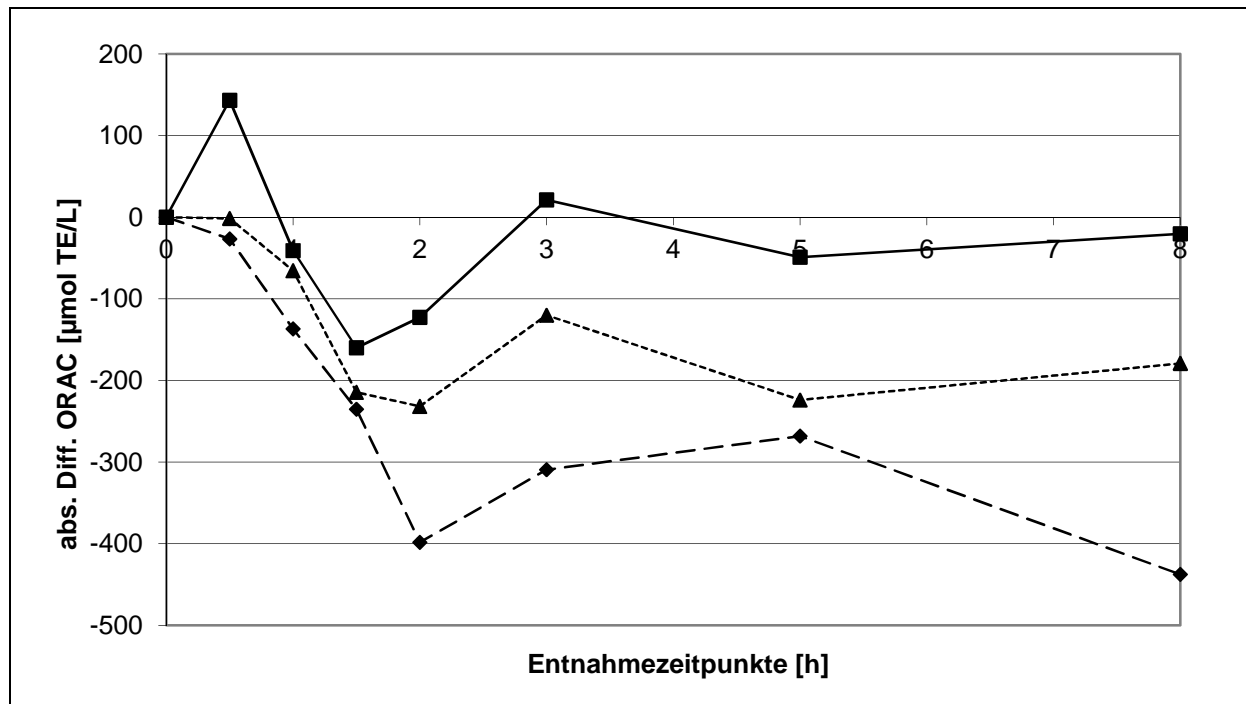


Abbildung 27: Veränderung der antioxidativen Kapazität nach Aufnahme des frischen und gelagerten Fertiggetränks sowie des Plazebos, n = 12

(■ = frisches Fertiggetränk, ▲ = gelagertes Fertiggetränk, ◆ = Plazebo)

Die gesamtantioxidative Kapazität (AUC_{0-8h}) lag nach Konsum der verschiedenen Testprodukte im Mittel bei $-243 \pm 2078 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ (frisches Fertiggetränk), $-1325 \pm 1874 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ (gelagertes Fertiggetränk) und $-2290 \pm 2241 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ (Plazebo). Wie eine ANOVA ergab, wiesen diesen Werte keinen signifikanten Unterschied auf ($p = 0.067$).

Die ORAC-Werte, die im Rahmen der Untersuchungsserie I.II erfasst wurden, korrelierten zu keinem der Messzeitpunkte mit der Harnsäurekonzentration, die parallel in den jeweiligen Proben bestimmt wurde (Tabelle 35).

Tabelle 35: Korrelation zwischen der antioxidativen Kapazität (ORAC) und dem Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 36

ORAC-HS	Untersuchungsserie I.II	
	r^*	p
t_0	0.092	0.595
$t_{0.5}$	0.012	0.946
t_1	0.006	0.971
$t_{1.5}$	0.017	0.919
t_2	0.084	0.624
t_3	0.031	0.858
t_5	0.016	0.928
t_8	0.038	0.826

* Pearson-Korrelationskoeffizient

Wie in Tabelle 36 dargestellt, bestand auch zwischen der um die jeweiligen Nüchternwerte bereinigten antioxidativen Kapazität und der ebenfalls nüchternwertbereinigten Harnsäurekonzentration mit einer Ausnahme keine signifikante Korrelation.

Tabelle 36: Korrelation zwischen der um die Nüchternwerte bereinigten antioxidativen Kapazität (ORAC) und dem um die Nüchternwerte bereinigten Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 36

ORAC-HS	Untersuchungsserie I.II	
	r*	p
t _{0,5}	0.043	0.804
t ₁	0.001	0.995
t _{1,5}	-0.132	0.444
t ₂	-0.054	0.757
t ₃	-0.339	0.043
t ₅	-0.127	0.461
t ₈	-0.071	0.682

* Spearman-Rangkorrelationskoeffizient

In Tabelle 37 ist die um die Nüchternwerte bereinigte mittlere antioxidative Kapazität der zu den Zeitpunkten 0.5, 1.5 und 3 h entnommenen Blutproben im Vergleich zu der in diesen Blutproben ermittelten mittleren Aspalathinkonzentration dargestellt. In diesen Berechnungen fanden ausschließlich Proben Berücksichtigung, in denen Aspalathin detektierbar war (vgl. Tabelle 23). Während dem Konsum der beiden Prüfprodukte folgend zu dem Zeitpunkt 0.5 h eine im Vergleich zur jeweiligen Nüchternprobe höhere antioxidative Kapazität messbar war, lag sie zu den späteren Zeitpunkten (1.5, 3 h), analog zu den Messergebnissen der Untersuchungsserie I.I, niedriger.

Tabelle 37: Mittlere nüchternwertbereinigte antioxidative Kapazität (ORAC) und mittlere Aspalathinkonzentration von Blutproben der Entnahmezeitpunkte 0.5, 1.5 und 3 h

	frisches Fertiggetränk			Gelagertes Fertiggetränk	
	Konzentration µmol/l*	ORAC µmol TE/l*		Konzentration µmol/l*	ORAC µmol TE/l*
0.5 h n = 3 [†]	1.80	441	0.5 h n = 3 [†]	0.93	253
1.5 h n = 3 [†]	0.82	-19,2	1.5 h n = 4 [†]	0.97	-117
3 h n = 1 [†]	4.55	-362	3 h n = 2 [†]	0.04	-277

* Mittelwertbildung erfolgte ausschließlich anhand von Plasmaproben in denen Aspalathin detektiert werden konnte

† Anzahl der Probanden/Plasmaproben, in denen Aspalathin detektiert wurde

4.1.5.2 FRAP

4.1.5.2.1 Untersuchungsserie I.I

In der Untersuchungsserie I.I wurden plazebokontrolliert Rooibostee und eine isolierte aktive Fraktion gereicht.

Nach der Ingestion des Plazebos kam es, mit Ausnahme des nicht signifikanten Anstiegs zum Entnahmezeitpunkt 0.5 h, durchgehend zu einem Abfall der antioxidativen Kapazität. Dieser war zu den Zeitpunkten 2, 3, 5 und 8 h signifikant und betrug maximal 7 % (Tabelle 38).

Tabelle 38: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme des Plazebos, n = 10

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	Plazebo		
		Mean ± SD	% [†]	p [‡]
FRAP [μmol Fe II/I]	0	1094 ± 207	100	
	0.5	1105 ± 189	101	0.603
	1	1075 ± 206	98	0.096
	1.5	1064 ± 204	97	0.100
	2	1061 ± 195	97	0.045
	3	1035 ± 205	95	0.018
	5	1022 ± 197	93	0.022
	8	1035 ± 200	95	0.017

[‡] t-Test für abhängige Stichproben (Nüchternkonzentration vs. jeweiliger Entnahmezeitpunkt)

[†] prozentuale Veränderung der antioxidativen Kapazität bezogen auf den Ausgangswert

Dem Konsum des Rooibostees folgend wurde, ebenso wie nach der Aufnahme des Plazebos, in dem Großteil der Proben eine geringere antioxidative Kapazität gemessen als in der Nüchternprobe. Eine Ausnahme bildeten die zu den Zeitpunkten 1.5 und 3 h entnommenen Proben, die eine höhere antioxidative Kapazität aufwiesen als die Nüchternprobe. Die maximale Abnahme betrug 2 %, der maximale Anstieg < 1 %. In keinem der beiden Fälle erreichte die Veränderung der antioxidativen Kapazität ein signifikantes Niveau (Tabelle 39).

Tabelle 39: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme des Rooibostees, n = 10

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	Rooibostee		
		Mean ± SD	% [†]	p [‡]
FRAP [µmol Fe II/I]	0	1099 ± 212	100	
	0.5	1097 ± 223	100	0.943
	1	1095 ± 236	100	0.886
	1.5	1103 ± 228	100	0.879
	2	1094 ± 228	100	0.849
	3	1108 ± 245	100	0.770
	5	1072 ± 220	98	0.259
	8	1098 ± 220	100	0.976

[‡] t-Test für abhängige Stichproben (Nüchternkonzentration vs. jeweiliger Entnahmezeitpunkt)

[†] prozentuale Veränderung der antioxidativen Kapazität bezogen auf den Ausgangswert

Wie im Anhang in Tabelle A 8 (Anhang 3.2) dargestellt, konnte nach Einnahme der isolierten aktiven Fraktion, mit Ausnahme der Entnahmezeitpunkten 0.5 und 1.5 h, durchgehend eine Abnahme der antioxidativen Kapazität detektiert werden. Im Vergleich zu der Nüchternprobe war weder der Anstieg (< 1 %) noch der Abfall, der maximal 4 % betrug, signifikant.

Mittels einer ANOVA konnte gezeigt werden, dass die in den jeweiligen Cross-over-Gruppen bestimmte antioxidative Kapazität im Gruppenvergleich zu keinem der Entnahmezeitpunkt signifikant differierte (Tabelle 40).

Tabelle 40: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme der isolierten der verschiedenen Prüfprodukte im Gruppenvergleich, n = 10

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	Plazebo	Rooibostee	Fraktion	p*
		Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
FRAP [µmol Fe II/I]	0	1094 ± 207	1099 ± 212	1083 ± 265	0.993
	0.5	1105 ± 189	1097 ± 223	1087 ± 266	0.991
	1	1075 ± 206	1095 ± 236	1069 ± 256	0.987
	1.5	1064 ± 204	1103 ± 228	1085 ± 261	0.972
	2	1061 ± 195	1094 ± 228	1078 ± 262	0.983
	3	1035 ± 205	1108 ± 245	1079 ± 265	0.954
	5	1022 ± 197	1072 ± 220	1050 ± 244	0.931
	8	1035 ± 200	1098 ± 220	1044 ± 233	0.948

* ANOVA (Plazebo vs. isolierte aktive Fraktion vs. Rooibostee)

Anhand der um die Nüchternwerte bereinigten FRAP-Werte lässt sich der Verlauf der antioxidativen Kapazität über den Untersuchungszeitraum grafisch darstellen (Abbildung 28). Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, entwickelte sich die antioxidative Kapazität nach

Aufnahme der beiden Verumpräparate ähnlich. Nach Ingestion des Placebos war hingegen nahezu durchgehend eine Abnahme der antioxidativen Kapazität messbar.

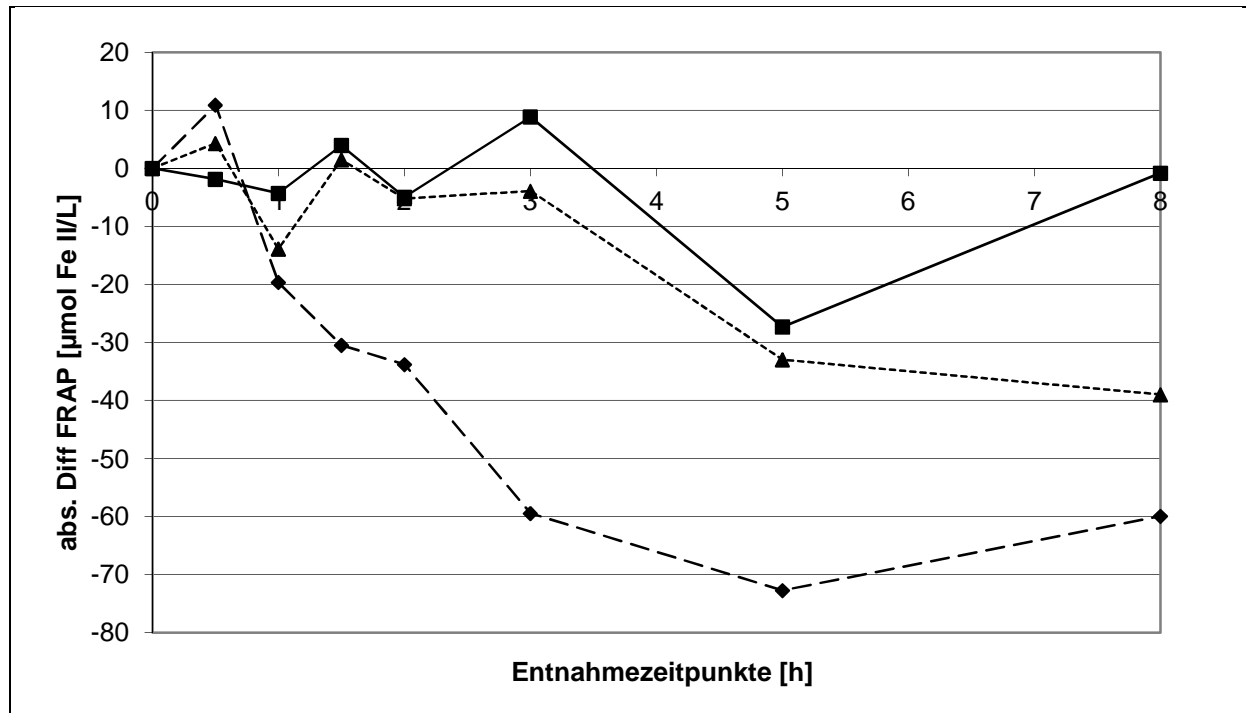


Abbildung 28: Veränderung der antioxidativen Kapazität nach Aufnahme des Rooibostees, der isolierten aktiven Fraktion und des Placebos, n = 10

(■ = Rooibostee, ▲ = Fraktion, ◆ = Placebo)

Die gesamtantioxidative Kapazität (AUC_{0-8h}) lag nach Konsum der verschiedenen Testprodukte im Mittel bei $-61 \pm 592 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ (Rooibostee), $-155 \pm 533 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ (isolierte aktive Fraktion) und $-406 \pm 449 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ (Placebo). Wie eine Analyse mittels ANOVA ergab, waren die Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen nicht signifikant ($p = 0.334$).

Die über den FRAP-Test bestimmte antioxidative Kapazität korrelierte zu allen Entnahmezeitpunkten signifikant mit dem jeweiligen Harnsäuregehalt der Proben (Tabelle 41).

Tabelle 41: Korrelation zwischen der antioxidativen Kapazität (FRAP) und dem Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 30

FRAP-HS	Untersuchungsserie I.I	
	r*	p
t ₀	0.541	0.002
t _{0.5}	0.614	< 0.001
t ₁	0.561	0.001
t _{1.5}	0.571	0.001
t ₂	0.616	< 0.001
t ₃	0.647	< 0.001
t ₅	0.664	< 0.001
t ₈	0.596	0.001

* Pearson-Korrelationskoeffizient

Wurden zur Berechnung der Korrelation von Harnsäurekonzentration und antioxidativer Kapazität die jeweilig um die Nüchternwerte bereinigten Messwerten verwendet, war mit Ausnahme eines Zeitpunkts keine signifikante Korrelation zwischen den beiden Parametern detektierbar (Tabelle 42).

Tabelle 42: Korrelation zwischen der um die Nüchternwerte bereinigten antioxidativen Kapazität (FRAP) und dem um die Nüchternwerte bereinigten Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 30

FRAP-HS	Untersuchungsserie I.I	
	r*	p
t _{0.5}	0.126	0.507
t ₁	0.317	0.088
t _{1.5}	0.429	0.018
t ₂	0.132	0.486
t ₃	0.104	0.586
t ₅	0.231	0.220
t ₈	0.450	0.013

* Spearman-Rangkorrelationskoeffizient

In Tabelle 43 ist die um die Nüchternwerte bereinigte mittlere antioxidative Kapazität der zu den Zeitpunkten 1.5 und 3 h entnommenen Blutproben im Vergleich zu der zu diesen Zeitpunkten detektierten mittleren Aspalathinkonzentration aufgeführt. Im Gegensatz zu den vorherigen Analysen fanden in diesen Berechnungen nur Proben Berücksichtigung, in denen Aspalathin detektiert wurde (vgl. Tabelle 19). Ein Anstieg der antioxidativen Kapazität war zu keinem der beiden Zeitpunkte, weder nach Konsum des Rooibostees noch der isolierten aktiven Fraktion, messbar.

Tabelle 43: Mittlere nüchternwertbereinigte antioxidative Kapazität (FRAP) und mittlere Aspalathinkonzentration von Blutproben der Entnahmezeitpunkte 1.5 und 3 h

	Rooibostee			Isolierte aktive Fraktion	
	Konzentration $\mu\text{mol/l}^*$	FRAP $\mu\text{mol Fe II/l}^*$		Konzentration $\mu\text{mol/l}^*$	FRAP $\mu\text{mol Fe II/l}^*$
1.5 h n = 3 [†]	0.19	-45.7	1.5 h n = 3 [†]	0.24	-15.6
3 h n = 4 [†]	0.42	-46.7	3 h n = 2 [†]	0.24	-23.8

* Mittelwertbildung erfolgte ausschließlich anhand von Plasmaproben in denen Aspalathin detektiert werden konnte

[†] Anzahl der Probanden/Plasmaproben, in denen Aspalathin detektiert wurde

4.1.5.2 Untersuchungsserie I.II

In der Untersuchungsserie I.II wurden plazebokontrolliert ein frisches sowie ein gelagertes Rooibosfertiggetränk gereicht.

Wie in Tabelle 44 dargestellt war nach Konsum des Placebos zumeist ein Abfall der antioxidativen Kapazität messbar. Zu den Zeitpunkten 5 und 8 h betrug dieser maximal 3 % und erreichte ein signifikantes Niveau. Lediglich nach 0.5, 1 und 3 h konnte ein im Vergleich zur Nüchternprobe, minimaler (1 %), nicht signifikanter Anstieg der antioxidativen Kapazität verzeichnet werden.

Tabelle 44: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme des Placebos, n = 12

Parameter	Entnahme- zeitpunkte (h)	Placebo		
		Mean \pm SD	% [†]	p [‡]
FRAP [$\mu\text{mol Fe II/l}$]	0	1064 \pm 84		
	0.5	1076 \pm 106	101	0.468
	1	1066 \pm 88	100	0.857
	1.5	1057 \pm 106	99	0.751
	2	1035 \pm 89	97	0.100
	3	1066 \pm 99	100	0.889
	5	1036 \pm 90	97	0.044
	8	1027 \pm 87	97	0.028

[‡] t-Test für abhängige Stichproben (Nüchternkonzentration vs. jeweiliger Entnahmezeitpunkt)

[†] prozentuale Veränderung der antioxidativen Kapazität bezogen auf den Ausgangswert

Nach der Einnahme des frischen Fertiggetränks nahm die antioxidative Kapazität durchgehend ab. Mit Ausnahme der Entnahmezeitpunkte 0.5 und 1.5 h war diese Abnahme signifikant. Sie bewegte sich dabei in einer Größenordnung von 3-5 % (Tabelle 45).

Tabelle 45: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme des frischen Fertiggetränks, n = 12

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	Frisches Fertiggetränk		
		Mean ± SD	% [†]	p [‡]
FRAP [μmol Fe II/I]	0	1050 ± 111		
	0.5	1045 ± 111	100	0.680
	1	1020 ± 108	97	0.041
	1.5	1027 ± 120	98	0.112
	2	998 ± 97	95	0.002
	3	1016 ± 102	97	0.020
	5	998 ± 108	95	0.003
	8	995 ± 103	95	0.005

[‡] t-Test für abhängige Stichproben (Nüchternkonzentration vs. jeweiliger Entnahmezeitpunkt)

[†] prozentuale Veränderung der antioxidativen Kapazität bezogen auf den Ausgangswert

In Übereinstimmung mit den Messergebnissen, die nach Aufnahme des Placebos und des frischen Fertiggetränks erfasst wurden, war auch nach Konsum des zweiten Verumpräparats zumeist eine niedrigere antioxidative Kapazität messbar als in der Nüchternprobe. Zum Zeitpunkte 1.5 h betrug die prozentuale Abnahme einen 2 % und erreichte damit ein signifikantes Niveau (Anhang 3.2, Tabelle A 9).

Wie der Tabelle 46 zu entnehmen ist, lag zwischen der antioxidativen Kapazität die nach Konsum der jeweiligen Prüfprodukte gemessen wurde, kein signifikanter Unterschied vor.

Tabelle 46: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme der verschiedenen Prüfprodukte, n = 12

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	Placebo	Frisches Fertiggetränk	Gelagertes Fertiggetränk	p*
		Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
FRAP [μmol Fe II/I]	0	1064 ± 84	1050 ± 111	1079 ± 124	0,556
	0,5	1076 ± 106	1045 ± 111	1095 ± 138	0,346
	1	1066 ± 88	1020 ± 108	1073 ± 117	0,262
	1,5	1057 ± 106	1027 ± 120	1061 ± 115	0,486
	2	1035 ± 89	998 ± 97	1041 ± 120	0,354
	3	1066 ± 99	1016 ± 102	1051 ± 110	0,435
	5	1036 ± 90	998 ± 108	1039 ± 100	0,345
	8	1027 ± 87	995 ± 103	1021 ± 96	0,517

* ANOVA (Placebo vs. gelagertes Fertiggetränk vs. frisches Fertiggetränk)

Anhand der um die Nüchternwerte korrigierten Messwerte kann der Verlauf der antioxidativen Kapazität nach Einnahme der Prüfprodukte grafisch dargestellt werden. Der

Abbildung 29 ist zu entnehmen, dass die antioxidative Kapazität prüfproduktunabhängig einen nahezu identischen Verlauf nahm.

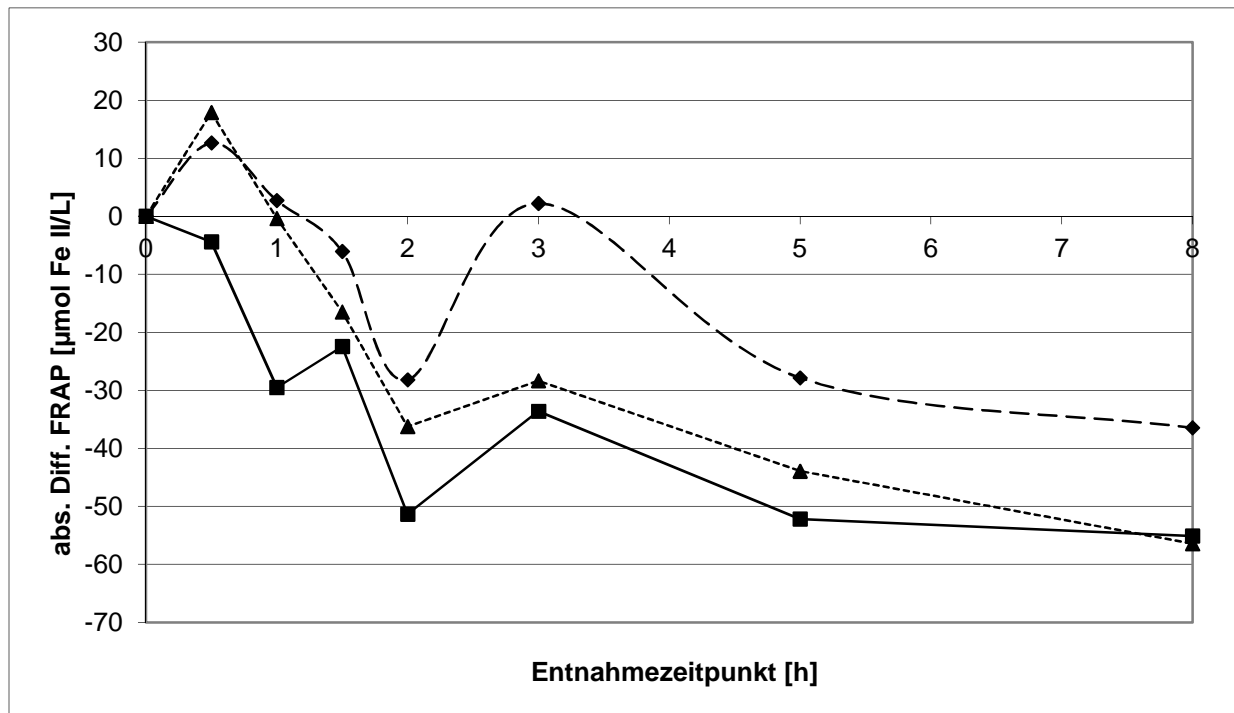


Abbildung 29: Veränderung der antioxidativen Kapazität nach Aufnahme des frischen und gelagerten Fertiggetränks sowie des Plazebos, n=12

(■=frisches Fertiggetränk, ▲=gelagertes Fertiggetränk, ◆=Plazebo)

Im Mittel lag die gesamtantioxidative Kapazität (AUC_{0-8h}) nach Konsum der verschiedenen Testprodukte bei $-330 \pm 328 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ (frisches Fertiggetränk), $-264 \pm 310 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ (gelagertes Fertiggetränk) und $-137 \pm 357 \mu\text{mol}\cdot\text{h/l}$ (Plazebo). Wie mittels einer ANOVA gezeigt werden konnte, waren weder die Unterschiede zwischen den beiden Verumpräparaten, noch den Verumpräparaten und dem Plazebo signifikant ($p = 0.364$).

Die im Rahmen der Untersuchungsserie I.II gemessenen FRAP-Werte korrelierten signifikant mit den Harnsäurekonzentrationen, die parallel in den Proben erfasst wurden (Tabelle 47).

Tabelle 47: Korrelation zwischen der antioxidativen Kapazität (FRAP) und dem Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 36

FRAP-HS	Untersuchungsserie I.II	
	r*	p
t ₀	0.613	< 0.001
t _{0.5}	0.743	< 0.001
t ₁	0.781	< 0.001
t _{1.5}	0.753	< 0.001
t ₂	0.763	< 0.001
t ₃	0.770	< 0.001
t ₅	0.705	< 0.001
t ₈	0.685	< 0.001

* Pearson-Korrelationskoeffizient

Wie in Tabelle 48 dargestellt bestand auch zwischen der um die jeweiligen Nüchternwerte bereinigten antioxidativen Kapazität und der ebenfalls nüchternwertbereinigten Harnsäurekonzentration mit zwei Ausnahmen keine signifikante Korrelation.

Tabelle 48: Korrelation zwischen der um die Nüchternwerte bereinigten antioxidativen Kapazität (FRAP) und dem um die Nüchternwerte bereinigten Harnsäuregehalt der Blutproben, n = 36

FRAP-HS	Untersuchungsserie I.II	
	r*	p
t _{0.5}	0.479	0.003
t ₁₋₀	0.148	0.390
t _{1.5}	0.310	0.066
t ₂	0.138	0.423
t ₃	0.248	0.144
t ₅	0.303	0.073
t ₈	0.370	0.026

* Spearman-Rangkorrelationskoeffizient

In Tabelle 49 wird die um die jeweiligen Nüchternwerte bereinigte antioxidative Kapazität der zu den Messzeitpunkten 0.5, 1.5 und 3 h entnommenen Plasmaproben, im Vergleich zu der zu diesen Zeitpunkten detektierten mittleren Aspalathinkonzentration, aufgeführt. Entgegen vorheriger Analysen fanden in diesen Berechnungen nur Proben Berücksichtigung, in denen Aspalathin detektiert wurde (vgl. Tabelle 23). Dem Konsum der beiden Prüfprodukte folgend war zu dem Zeitpunkt 0.5 h eine im Vergleich zur jeweiligen Nüchternprobe höhere antioxidative Kapazität messbar. Zu den späteren Zeitpunkten (1.5, 3 h), kam es hingegen zu einem Abfall der antioxidativen Kapazität.

Tabelle 49: Mittlere nüchternwertbereinigte antioxidative Kapazität (FRAP) und mittlere Aspalathinkonzentration von Blutproben der Entnahmezeitpunkte 0,5, 1,5 und 3 h

	frisches Fertiggetränk			Gelagertes Fertiggetränk	
	Konzentration µmol/l*	FRAP µmol Fe II/l*		Konzentration µmol/l*	FRAP µmol Fe II/l*
0.5 h n = 3 [†]	1.8	14.5	0.5 h n = 3 [†]	0.93	36.5
1.5 h n = 3 [†]	0.82	-14,2	1.5 h n = 3 [†]	0.97	-21.6
3 h n = 1 [†]	4.55	-53	3 h n = 1 [†]	0.04	-10

* Mittelwertbildung erfolgte ausschließlich anhand von Plasmaproben in denen Aspalathin detektiert werden konnte

† Anzahl der Probanden/Plasmaproben, in denen Aspalathin detektiert wurde

4.1.6 Zusammenfassung der Messergebnisse zur antioxidativen Kapazität

Im Folgenden sollen die mit dem ORAC- und FRAP-Assays ermittelten Messergebnisse der Untersuchungsserien I.I und I.II zusammenfassend dargestellt werden.

4.1.6.1 ORAC

Die Messungen der antioxidativen Kapazität mittels des ORAC-Assays ergaben, dass es unabhängig vom jeweilig aufgenommenen Prüfprodukt, sowohl in US I.I als auch in US I.II zu einer Abnahme der antioxidativen Kapazität kam. Diese war dabei in beiden Untersuchungsserien, sowohl nach Aufnahme der Verumpräparate als auch nach Konsum des Placebos zu verschiedenen Messzeitpunkten signifikant. Die prozentuale Abnahme der antioxidativen Kapazität betrug dabei bis zu 23 %, überwiegend war jedoch eine maximale Abnahme in einem Größenbereich von 10-15 % zu verzeichnen.

Wie ein Vergleich der jeweiligen Cross-over-Gruppen mittels ANOVA zeigte, wies die antioxidative Kapazität zu keinem der Entnahmezeitpunkte einen signifikanten Unterschied auf. Die Abnahme der antioxidativen Kapazität nach Aufnahme der Verumpräparate und des Placebos wies sowohl in der Untersuchungsserie I.I als auch in der Untersuchungsserie I.II vergleichbare Charakteristika auf.

Während die ORAC-Messwerte in US I.I nahezu zu allen Messzeitpunkten signifikant mit der jeweilig bestimmten Harnsäurekonzentration korrelierten, war dies in US I.II nicht der Fall. In beiden Untersuchungsserien konnte keine signifikante Korrelation zwischen den um die Nüchternwerte bereinigten ORAC- und Harnsäurewerten ermittelt werden.

Eine Subgruppenanalyse in der, unter Bezugnahme auf die Bioverfügbarkeitsanalysen (vgl. 4.1.3/4.1.4), ausschließlich die antioxidative Kapazität von Blutproben Berücksichtigung fand, in denen Aspalathin detektiert wurde ergab ebenfalls, dass mittels des ORAC-Assays nach Aufnahme der Verumpräparate der US I und der US I.II kein Anstieg der antioxidativen Kapazität messbar war.

4.1.6.2 FRAP

Analog zu den Messungen die mittels des ORAC-Tests durchgeführt wurden, konnte auch mit dem FRAP in beiden Untersuchungsserien, unabhängig vom aufgenommenen Produkt, zumeist eine Abnahme der antioxidativen Kapazität gemessen werden. In Untersuchungsserie I.I erreichte die Abnahme der antioxidativen Kapazität lediglich nach Aufnahme des Plazebos ein signifikantes Niveau, in der Untersuchungsserie I.II hingegen sowohl nach Aufnahme des Plazebos als auch nach Ingestion der Verumpräparate. Die maximale Abnahme der antioxidativen Kapazität fiel mit 7 % deutlich geringer aus als im ORAC-Assay.

Im Gruppenvergleich wies die antioxidative Kapazität in keiner der beiden Untersuchungsserien signifikante Unterschiede auf. Der Verlauf der antioxidativen Kapazität nach Aufnahme der jeweiligen Verumpräparate und des Plazebos wies, ebenso wie in den ORAC-Messungen, sowohl in der ersten als auch in der zweiten Untersuchungsserie ähnliche Charakteristika auf.

In beiden Untersuchungsserien korrelierten die detektierten FRAP-Messwerte signifikant mit der jeweilig bestimmten Harnsäurekonzentration. Wurden zur Korrelationsberechnungen die jeweils um die Nüchternwerte bereinigten Messwerte verwendet konnte hingegen zu den meisten Entnahmezeitpunkten keine signifikante Korrelation etabliert werden.

Eine Subgruppenanalyse in der, Bezug nehmend auf die Bioverfügbarkeitsanalysen (vgl. 4.1.3/4.1.4), ausschließlich die antioxidative Kapazität von Blutproben Berücksichtigung fand, in denen Aspalathin detektiert wurde zeigte, dass mittels des FRAP-Assays in beiden Untersuchungsserien zum Zeitpunkt 0.5 h ein leichter Anstieg der antioxidativen Kapazität messbar war. Dies bestätigte sich zu den beiden späteren Entnahmezeitpunkten (1.5, 3 h) jedoch nicht.

4.2 Versuchsreihe II - In vitro-Studien

Parallel zu den Ex-vivo-Messungen der Versuchsreihe I wurden im Rahmen der Versuchsreihe II verschiedene In-vitro-Versuche durchgeführt. Diese waren auf drei separate

Untersuchungsserien (II.I, II.II, II.III) aufgeteilt, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden.

4.2.1 Untersuchungsserien II.I / II.II

In den In-vitro-Versuchen der Untersuchungsserie II.I wurde die antioxidative Kapazität von unterschiedlich stark konzentriertem Rooibostee untersucht (vgl. 3.3.1.1). In Untersuchungsserie II.II wurde Serum mit Rooibostee verschiedener Konzentrationen gespiket (vgl. 3.3.1.2).

Das antioxidative Potenzial des Rooibostees bestätigte sich in beiden In-vitro-Untersuchungsserien. In US II.I schwankte es in Abhängigkeit der verwendeten Teemenge bzw. Aspalathinkonzentration zwischen 9-1075 $\mu\text{mol TE/l}$. Im Rahmen der US II.II zeigte sich, dass Rooibostee in der Lage ist die antioxidative Kapazität von Serum zu erhöhen. In Abhängigkeit der Aspalathinkonzentration war ein Anstieg der antioxidativen Kapazität von 2297 $\mu\text{mol TE/l}$ (ungespikete Probe) auf bis zu 3221 $\mu\text{mol TE/l}$ messbar.

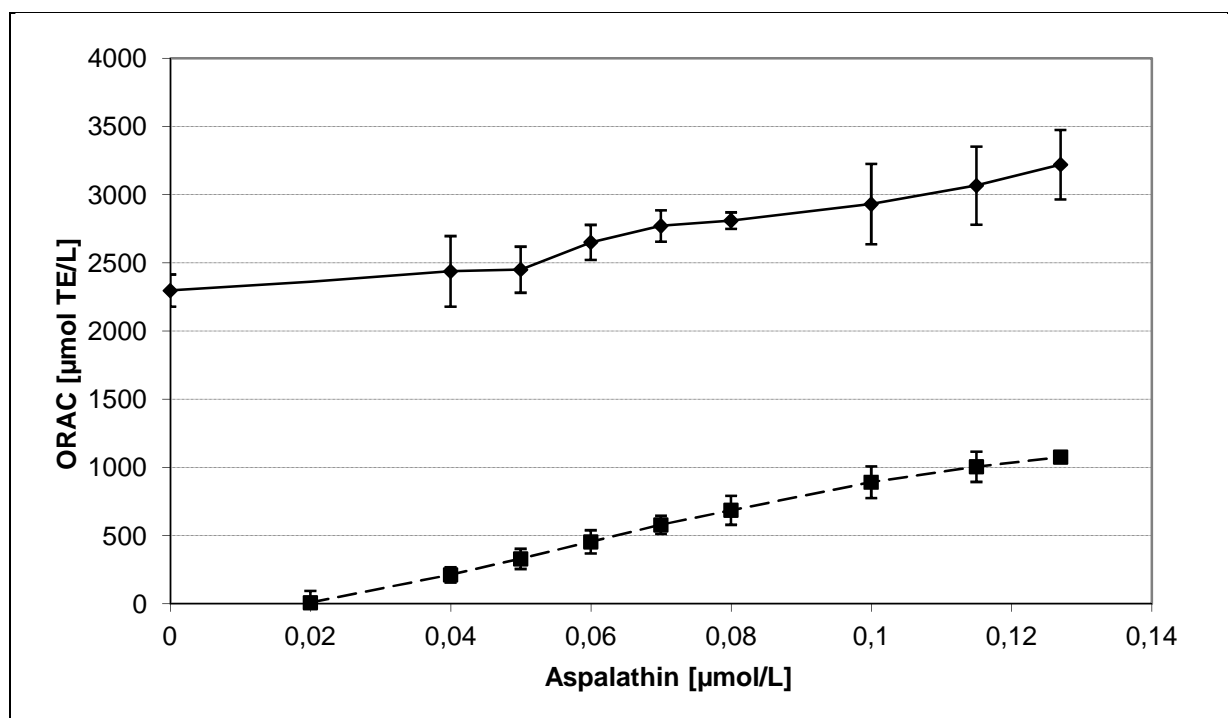


Abbildung 30: Konzentrationsabhängige antioxidative Kapazität (ORAC) von reinem Rooibostee und von mit Rooibostee versetztem Serum, n = 6

(■ = Rooibostee, ♦ = Serum + Rooibostee)

4.2.2 Versuchsreihe II.III

In der Versuchsreihe II.III wurde zum einen die antioxidative Kapazität von Serum und Rooibostee und zum anderen von mit Rooibostee gespiketen Serum untersucht.

Wie der nachfolgenden Abbildung zu entnehmen ist, wies das Serum (2) eine antioxidative Kapazität von 2615 $\mu\text{mol TE/l}$ auf, während der Rooibostee in der verwendeten Konzentration von 0.1 $\mu\text{mol/l}$ Aspalathin (1) eine Kapazität von 1211 $\mu\text{mol TE/l}$ zeigte. Die antioxidative Kapazität des mit Rooibostee gespiketen Serums (0.1 $\mu\text{mol/l}$ Aspalathin (3)) lag mit 2819 TE/l etwa 8 % über der antioxidativen Kapazität des ungespiketen Serums. Dies entsprach 74 % der antioxidativen Kapazität, die durch Addition der Kapazität der beiden Einzelsubstanzen rechnerisch möglich gewesen wäre (3826 $\mu\text{mol TE/l}$ (4)). Der Annahme folgend, dass bei einer Mischung der Flavonoide mit einer biologischen Probenflüssigkeit ausschließlich die antioxidative Kapazität der Flavonoide limitiert wird, lässt sich berechnen, dass sie im Serum lediglich 17 % ihrer ursprünglichen antioxidativen Kapazität entfalten können.

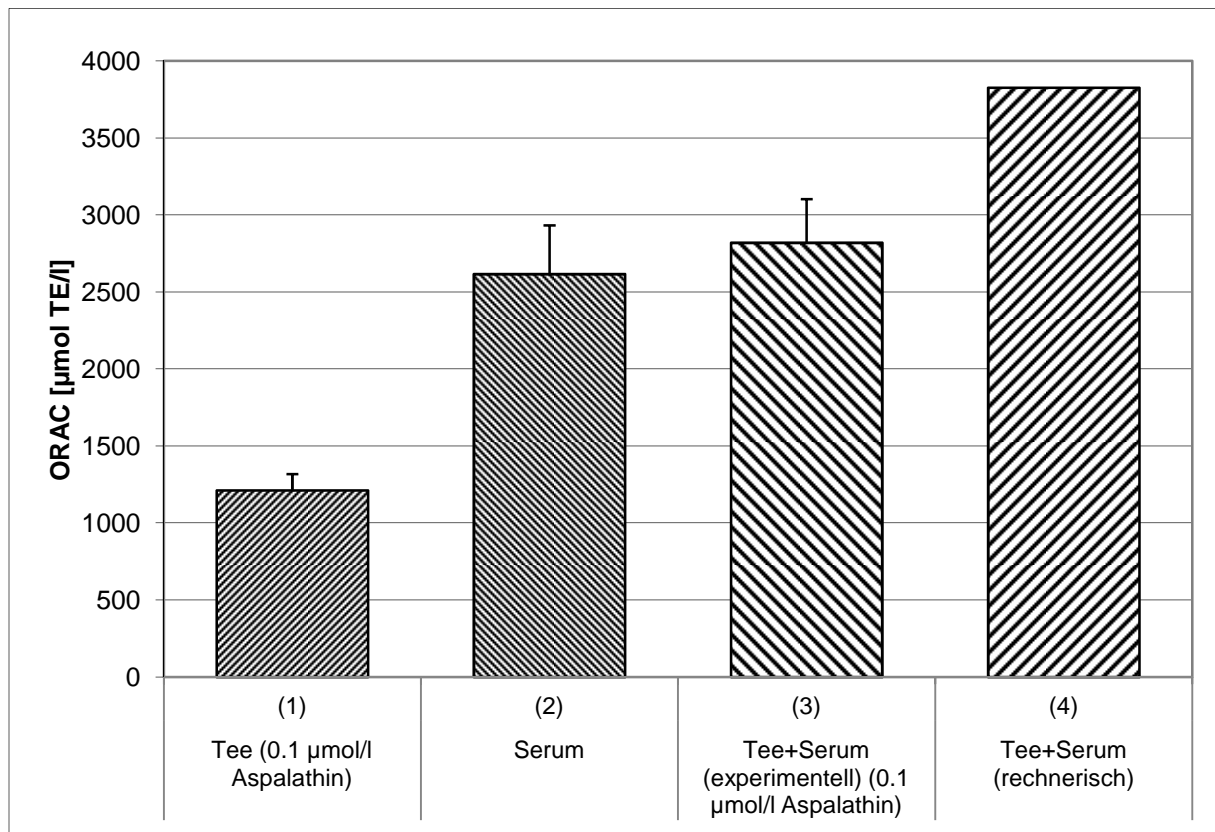


Abbildung 31: Antioxidative Kapazität von Rooibostee, Serum sowie einem Gemisch aus Serum und Rooibostee, n = 5

5 Diskussion

Rooibos ist eine in Südafrika heimische Pflanze, die vorwiegend zur Teeproduktion eingesetzt wird. Im Zuge des in den letzten Jahren stetig ansteigenden Absatzes von Kräuter- und Früchtetees in Deutschland konnte sich auch der Rooibostee als feste Verbrauchsgröße am Markt etablieren [VEREINIGUNG KRÄUTER- UND FRÜCHTETEEES 2003-2011].

Die Flavonoide stellen die quantitativ dominierenden Inhaltsstoffe des Rooibos und seiner wässrigen Extrakte dar. Sie zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen und bilden eine Untergruppe der Polyphenole. In der Natur und der menschlichen Ernährung stellen sie die quantitativ bedeutendste Klasse der Polyphenole dar [CROZIER 2009, WATZL UND RECHKEMMER 2001, BRAVO 1998]. Lange Zeit galten sie als antinutritive Pflanzenstoffe, bei deren gesundheitlicher Bewertung die potentielle Toxizität sowie die Befähigung zur Einschränkung der Bioverfügbarkeit anderer Nährstoffe im Vordergrund standen. Inzwischen wird davon ausgegangen, dass die Flavonoide, ähnlich den meisten Stoffen pflanzlicher Herkunft, normale Verzehrsgewohnheiten vorausgesetzt, gesundheitserhaltende und -fördernde Eigenschaften besitzen.

Dabei steht zumeist die antioxidative Wirkung dieser Stoffklasse im Vordergrund. Diese wurde sowohl *in vitro* als auch in Blutproben, die nach Applikation flavonoidreicher Lebensmittel gewonnen wurden, untersucht. In solchen Untersuchungen fanden verschiedene Teesorten Verwendung, vor allem jedoch grüner und schwarzer Tee (Gattung *Camellia Sinensis*).

Rooibostee, insbesondere unfermentierter, enthält eine dem grünen und schwarzen Tee vergleichbare Menge an Flavonoiden, ist jedoch bisher vergleichsweise schlecht untersucht [JOUBERT ET AL. 2008]. Während die *In-vitro*-Aktivität des Rooibosteess bereits in einzelnen Studien dokumentiert werden konnte, ist seine antioxidative Wirkung *in vivo* mit bisher vier Humanstudien, von denen die meisten parallel zu den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen veröffentlicht wurden, nur unzureichend dokumentiert [MARNEWICK ET AL. 2011, VILLAÑO ET AL. 2010, NIKOLOVA ET AL. 2007, SAUTER 2004]. Auch über die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus Rooiboszubereitungen ist bis jetzt nur wenig bekannt. Insgesamt existieren nur drei Humanstudien, in denen Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit oral applizierter Rooibosflavonoide erfolgten [MARNEWICK ET AL. 2011, COURTS UND WILLIAMSON 2009, STALMACH ET AL. 2009A].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher sowohl die Bioverfügbarkeit der applizierten Rooibosflavonoide als auch ihre antioxidative Wirkung *in vivo* im Rahmen einer

Humanstudie untersucht werden. Dazu wurden Blutproben vor und nach einmaliger Applikation verschiedener Rooibosprüfprodukte entnommen und mittels antioxidativer Testsysteme auf ihre antioxidative Kapazität überprüft. Zu ausgewählten Entnahmezeitpunkten wurde zudem der Flavonoidgehalt in den Blut- und Sammelurinproben bestimmt, um Informationen über die Biokinetik der Flavonoide zu erhalten. Diese Analysen erfolgten im Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Braunschweig.

Parallel zu den Humanuntersuchungen (Versuchsreihe I) wurden In-vitro-Versuche (Versuchsreihe II) durchgeführt, um die Antioxidativität des Produktes praktisch zu bestätigen. Außerdem sollten methodische und physiologische Limitierungen, die eine Messung der antioxidativen Kapazität erschweren bzw. die mögliche antioxidative Wirkung der Flavonoide nach Absorption einschränken, ermittelt werden.

In der nachfolgenden Diskussion sollen zu Beginn wichtige methodische Aspekte der Humanstudie dargestellt und im Vergleich zu anderen mit Tee und Teeprodukten durchgeführten Kurzzeitkinetiken diskutiert werden. Anschließend werden die in der Studie generierten Ergebnisse dargestellt und denen vergleichbarer Untersuchungen gegenübergestellt. Abschließend wird Bezug nehmend auf die Erkenntnisse aus den In-vitro-Versuchen die zur Erfassung der antioxidativen Kapazität genutzte Methodik auf ihre Eignung zum Einsatz in Humanstudien diskutiert.

5.1 Versuchsreihe I – Humanstudie

5.1.1 Studiendesign

Die Humanstudie wurde als plazebokontrollierte, monozentrische, offene und vergleichende Cross-over-Studie geplant und durchgeführt. Sie war in zwei Untersuchungsserien untergliedert. In jeder dieser beiden Untersuchungsserien wurden zwei verschiedenartige Rooibosprodukte (Untersuchungsreihe I.I: Rooibostee, isolierte aktive Fraktion, Untersuchungsreihe I.II: frisches Fertiggetränk, gelagertes Fertiggetränk) plazebokontrolliert verabreicht. Da beide Untersuchungsserien im Cross-over-Design durchgeführt wurden erhielt jeder Teilnehmer einer Untersuchungsreihe jedes der beiden entsprechenden Verumpräparate sowie das Plazebo einmalig gereicht und fungierte damit als seine eigene Kontrolle. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass in der Studie beobachtete Effekte nicht durch individuelle Unterschiede ausgelöst wurden.

Ein Vergleich mit anderen Humanstudien, in denen ebenfalls die antioxidative Kapazität sowie die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus Tee und Teeprodukten untersucht wurde, zeigte, dass das Cross-over-Design zumeist die bewährte Methode zur Untersuchung dieser

beiden Parameter in Kurzzeitkinetiken ist [VILLAÑO ET AL. 2010, STALMACH ET AL. 2009A, COURTS UND WILLIAMSON 2009, HENNING ET AL. 2005, HENNING ET AL. 2004, KIMURA ET AL. 2002, LANGLEY-EVANS 2000, LEENEN ET AL. 2000, SERAFINI ET AL. 2000, SUNG ET AL. 2000, BENZIE 1999]. Die Kollektivgröße lag in den oben aufgeführten Studien im Mittel bei 14 Studienteilnehmern (Spanne 5-30).

Im Großteil der Studien mussten die Probanden verschiedene, antioxidantienreiche Lebensmittel meiden. Dabei handelte es sich vorwiegend um frisches Gemüse und Obst sowie Fruchtsäfte, Tee und Wein. Hinsichtlich des Beginns und der Dauer der Depletionsphase variierten die oben aufgeführten Humanstudien. Zumeist sollten die aufgeführten Lebensmittel in einem definierten Zeitraum zwischen zwölf Stunden und zwei Tagen vor dem jeweiligen Untersuchungstag gemieden werden [VILLAÑO ET AL. 2010, LEENEN ET AL. 2000, LANGLEY-EVANS ET AL. 2000]. In anderen Untersuchungen begann die Depletionsphase hingegen bereits eine Woche vor Studienbeginn und antioxidantienreiche Lebensmittel mussten zudem über den gesamten Interventionszeitraum gemieden werden [HENNING ET AL. 2005, HENNING ET AL. 2004].

Die Dauer der Wash-out-Phase, die die jeweiligen Untersuchungstage voneinander separierte, schwankte zwischen zwei [LEENEN ET AL. 2000] und 14 Tagen [VILLAÑO ET AL. 2010] und umfasste in der Mehrzahl der Studien sieben Tage. In Untersuchungen von COURTS UND WILLIAMSON [2009] und STALMACH ET AL. [2009A] wurde die Bioverfügbarkeit von Flavonoiden ausschließlich anhand eines einzelnen Prüfproduktes untersucht, weshalb kein Cross-over-Design zur Anwendung kam. Ansonsten wiesen jedoch auch diese beiden Studien mit den bereits vorgestellten Untersuchungen übereinstimmende Parameter auf. Die Kollektivgröße war mit sechs [COURTS UND WILLIAMSON 2009] bzw. zehn Studienteilnehmern [STALMACH ET AL. 2009A] von vergleichbarer Größe und in beiden Untersuchungen waren die Probanden angehalten, vor Studienbeginn sowie während des Untersuchungstages flavonoidreiche Lebensmittel zu meiden.

In der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Humanstudie wurde mit zwölf Probanden ein vergleichbar großes Kollektiv untersucht wie in den aufgeführten Studien. Im Vergleich zu diesen Untersuchungen waren die Probanden jedoch angehalten, neben den aufgeführten Lebensmitteln auch auf flavonoidreiche Süßigkeiten, wie Schokolade, zu verzichten. Diese flavonoidarme Ernährung musste zwei Wochen vor Studienbeginn und während des gesamten Interventionszeitraums aufrechterhalten werden. Damit fiel die Depletionsphase im Vergleich zu den aufgeführten Studien länger aus. Die gewählte Wash-out-Phase von sieben Tagen war hingegen ähnlich lang wie in den meisten der genannten Kurzzeitkinetiken.

5.1.2 Ergebnisse Humanuntersuchungen / biokinetische Parameter

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Humanstudie kurz rekapituliert und denen vergleichbarer Untersuchungen gegenübergestellt.

In der Humanstudie konnte gezeigt werden, dass die Bioverfügbarkeit der Rooibosflavonoide nach Aufnahme der verschiedenen Prüfprodukte gering ausfiel. Die mediane Konzentration der meisten in den Plasmaproben detektierten Flavonoide lag unter 0 µmol/l. Für die vier in den Prüfprodukten dominierenden Flavonoide wurde außerdem die mittlere Plasmakonzentration berechnet. Hierbei fanden ausschließlich Plasmaproben Berücksichtigung, in denen diese Stoffe detektiert werden konnten. Das Aspalathin erreichte in diesen Berechnungen die höchsten Plasmaspiegel. Nach Aufnahme des Rooibostees und der isolierten aktiven Fraktion schwankte die mittlere Aspalathinkonzentration zwischen 0.19-0.42 µmol/l, nach Aufnahme der Fertiggetränke zwischen 0.04-4.55 µmol/l. Dies entsprach 0.08-0.18 % (Rooibostee, isolierte aktive Fraktion) und 0.29-6.60 % (frisches, gelagertes Fertiggetränk) der jeweilig über das Prüfprodukt applizierten Aspalathingesamtmenge. Die in den Sammelurinproben (0-24 h) detektierte Aspalathinmenge lag nach Aufnahme des Rooibostees bei 16.2 bzw. bei 42 µmol nach Konsum der isolierten aktiven Fraktion. Dies entsprach 2.6 bzw. 6.7 % der über die Prüfprodukte zugeführten Aspalathinmenge. Dem Konsum des frischen und gelagerten Fertiggetränks folgend wurden 11.5 µmol (3.2 %) bzw. 3.6 µmol (1.5 %) Aspalathin im 0-24 h Sammelurin detektiert.

Die ORAC- und FRAP-Messungen zeigten, dass es sowohl nach Aufnahme der verschiedenen Verumpräparate als auch nach Einnahme der Plazebos zu einem Abfall der antioxidativen Kapazität kam. Dabei bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der antioxidativen Kapazität, die nach Aufnahme der Rooibosprüfprodukte und der Plazebos gemessen wurde. Auch die in Subanalysen ermittelte mittlere Aspalathinkonzentration war größtenteils nicht mit einem Anstieg der antioxidativen Kapazität assoziiert.

Diese Ergebnisse sind konträr zu den Ergebnissen der In-vitro-Versuche, in denen die antioxidative Kapazität der Flavonoide sowohl in Reinform als auch in Mischung mit Blut bestätigt wurde.

5.1.3 Diskussion der Studienergebnisse unter Berücksichtigung vergleichbarer Humanuntersuchungen

Die Humanuntersuchungen der Versuchsreihe I ergaben, dass die Bioverfügbarkeit von Rooibosflavonoiden prüfproduktunabhängig sehr gering ist. Sowohl nach Aufnahme der Verumpräparate als auch der Plazebos war zudem zum Großteil der Entnahmezeitpunkte ein Abfall der antioxidativen Kapazität messbar. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen

konnte auch in anderen Humanuntersuchungen nach der Applikation verschiedener Rooiboszubereitungen zumeist weder eine signifikante Bioverfügbarkeit der Rooibosflavonoide noch ein Anstieg der antioxidativen Kapazität ermittelt werden [MARNEWICK ET AL. 2011, VILLAÑO ET AL. 2010, COURTS UND WILLIAMSON 2009, STALMACH ET AL. 2009A, SAUTER 2004].

5.1.3.1 Studienergebnisse zur Bioverfügbarkeit

Neben den eigenen Untersuchungen existieren bis zum jetzigen Zeitpunkt lediglich drei weitere Humanuntersuchungen, in denen die Bioverfügbarkeit von oral applizierten Rooibosflavonoiden untersucht wurde [MARNEWICK ET AL. 2011, STALMACH ET AL. 2009A, COURTS UND WILLIAMSON 2009].

In Untersuchungen von STALMACH ET AL. [2009A] konsumierten zehn Probanden 500 ml eines unfermentierten (159 $\mu\text{mol}/73$ mg Flavonoide) bzw. fermentierten Rooibostees (84 $\mu\text{mol}/40$ mg Flavonoide). Blutentnahmen erfolgten vor sowie 0,5, 1, 2 und 5 h nach Aufnahme der Prüfprodukte. Zudem wurde in definierten Intervallen (0-5, 5-12 und 12-24 h nach Aufnahme der Prüfprodukte) der Urin gesammelt. Während in den Blutproben keine Metabolite detektiert werden konnten, betrug die Gesamtmenge der renal ausgeschiedenen Flavonoidmetabolite im Falle des unfermentierten Rooibostees etwa 352 nmol (0,35 mg) bzw. 82 nmol (0,08 mg) nach Konsum des fermentierten Rooibostees. Prozentual entsprach dies 0,22 bzw. 0,90 % der applizierten Flavonoide. Es handelte sich größtenteils um methylierte, glukuronidierte und sulfatierte Metabolite des Aspalathins. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten in einer weiteren Humanstudie mit sechs Studienteilnehmern nach oraler Applikation von 300 ml unfermentierten Rooibostee (91,2 mg Aspalathin) im 24-Stunden-Sammelurin in erster Linie methylierte und glukuronidierte Metabolite des Aspalathins detektiert werden. Die prozentuale Verfügbarkeit des Aspalathins lag bei 0,74 % (0,67 mg). Blutproben wurden in diesen Untersuchungen nicht entnommen [COURTS UND WILLIAMSON 2009].

In Übereinstimmung mit diesen beiden Humanstudien konnte die grundsätzliche **Bioverfügbarkeit der Rooibosflavonoide** auch in den eigenen Humanuntersuchungen **bestätigt werden**. Die Menge der über die Prüfprodukte applizierten Flavonoid war jedoch mit 848 $\mu\text{mol}/383$ mg (Rooibostee), 717 $\mu\text{mol}/324$ mg (isolierte aktive Fraktion), 259 $\mu\text{mol}/571$ mg (frisches Fertiggetränk) und 186 $\mu\text{mol}/411$ mg (gelagertes Fertiggetränk), deutlich höher. Zudem konnten Metabolite der oral applizierten Rooibosflavonoide sowohl in Plasmaproben, als auch im Urin detektiert werden, während dies in den Untersuchungen von STALMACH ET AL. [2009A] nicht möglich war.

Die im Urin erfasste prozentuale Menge des applizierten Aspalathins lag darüber hinaus mit 2.6 % (16.2 μmol /7.3 mg) und 6.7 % (42 μmol /19 mg) (Rooibostee, isolierte aktive Fraktion) bzw. 3.2 % (11.5 μmol /5.2 mg) und 1.5 % (3.6 μmol /1.6 mg) (frisches und gelagertes Fertiggetränk) in den eigenen Untersuchungen höher, als in den Studien von STALMACH ET AL. [2009A] und COURTS UND WILLIAMSON [2009]. Mögliche Ursache hierfür ist die höhere Applikationsmenge der Rooibosflavonoide bzw. des Aspalathins in der eigenen Humanuntersuchung. So konnten HUANG ET AL. [2008] in vitro belegen, dass Aspalathin eine Caco-2-Zell-Monolayer einem konzentrationsabhängigen Transportprozess folgend überquert, wobei die Flavonoidmenge die entscheidende Determinante für die Effektivität des Absorptionsprozess ist.

In Übereinstimmung mit den Studien von STALMACH ET AL. [2009A] und COURTS UND WILLIAMSON [2009] wiesen die in den eigenen Untersuchungen im Plasma sowie im Urin detektierten Aspalathinmetabolite eine **intakte C-glykosidische Bindung** auf. Dies belegt, dass Rooibosflavonoide im Dünndarm ohne vorherige Spaltung absorbiert werden können und widerspricht damit, der im Zusammenhang mit Flavonoid-O-Glykosiden gängigen Annahme, dass eine hydrolytische Spaltung der Flavonoidglykoside die Voraussetzung für eine intestinale Absorption ist. COURTS UND WILLIAMSON [2009] mutmaßen, dass der SGLT-1 als mögliches Transportsystem in Frage kommt, wobei offen bleibt, wie der basolaterale Efflux vermittelt wird. Weiterhin verdeutlichen die im Urin detektierten Metabolite die Relevanz von Phase-2-Metabolisierungen im Stoffwechsel der Rooibosflavonoide. Diese Metabolisierungsreaktionen haben das Ziel, die Hydrophilie absorbierter Substanzen zu erhöhen und dienen dem Organismus damit der Detoxifikation [HALLIWELL ET AL. 2005]. Gleichzeitig haben diese Reaktionen jedoch auch direkte Folgen für das antioxidative Potenzial von Rooibosflavonoiden in vivo, wie im nächsten Kapitel dargestellt wird.

Die in der eigenen Humanuntersuchung gezeigte Diskrepanz zwischen der in Untersuchungsserie I.I und der in Untersuchungsserie I.II berechneten prozentualen Menge der aus den Prüfprodukten ins Blut übergangenen Flavonoide (0.08-0.18 % und 0.10-0.11 % nach Konsum des Rooibosteetes und der isolierten aktiven Fraktion, 0.95-5.28 % und 0.29-6.60 % nach Applikation des frischen und gelagerten Fertiggetränks) deutet möglicherweise auf eine bessere Bioverfügbarkeit der Flavonoide aus den Fertiggetränken hin. Da die prozentuale Verfügbarkeit jedoch lediglich aus den Messwerten von einem bis maximal vier Probanden berechnet wurde, sind diese Annahmen nur spekulativ. Weiterhin existiert keine biologische plausible Erklärung, die diese Diskrepanz erklären könnte. Unter Berücksichtigung der In-vitro-Versuche von HUANG ET AL. [2008] wäre vielmehr aufgrund des geringeren Aspalathingehaltes der Fertiggetränke eine geringere Absorption im Dünndarm zu erwarten gewesen. Die im Urin detektierten Flavonoidmengen bestätigen die Vermutung,

dass die Flavonoide aus den Fertiggetränken besser verfügbar waren ebenfalls nicht. Generell muss erwähnt werden, dass mit der gewählten Methodik der Plasmaaufarbeitung primär die intakten, unveränderten Flavonoide detektiert wurden. Aufgrund der quantitativen Relevanz von Phase-2-Reaktionen im Stoffwechsel der Flavonoide und Bezug nehmend auf die im Urin detektierten Phase-2-Metabolite des Aspalathins kann vermutet werden, dass die tatsächlichen Plasmaspiegel möglicherweise höher lagen. Wie im Folgenden Kapitel 5.1.3.2 dargestellt, sind die metabolisierten Rooibosflavonoide für die Etablierung antioxidativer Effekte jedoch im Gegensatz zu den unmetabolisierten Flavonoide nur von untergeordneter Bedeutung.

In Übereinstimmung mit den eigenen Humanuntersuchungen konnten MARNEWICK ET AL. [2011] nach Applikation von Rooibosflavonoiden ebenfalls ein Übergang dieser in die Blutlaufbahn bestätigen. Der sechswöchige Konsum von 1.2 l/d wässrigen Extrakt (164 mg Polyphenole) aus fermentierten Rooibos führte zu einem Anstieg der Polyphenolspiegel im Plasma (72.3 mg/l auf 89.8 mg/l). Im Vergleich dazu waren die Polyphenolspiegel nach Beendigung einer vierwöchigen Kontrollphase, in der statt des Rooibostees Wasser konsumiert wurde, signifikant geringer (79.8 mg/l). Da die Applikation der Rooibosflavonoide in diesen Untersuchungen über einen deutlich längeren Zeitraum erfolgte als in der eigenen Humanstudie sind die Ergebnisse nur bedingt miteinander vergleichbar. Sie verdeutlichen jedoch in Übereinstimmung mit unseren Versuchen und den Studien von STALMACH ET AL. [2009A] und COURTS UND WILLIAMSON [2009] die grundsätzliche Bioverfügbarkeit der Rooibosflavonoide.

5.1.3.2 Studienergebnisse zur antioxidativen Kapazität

Neben der Bioverfügbarkeit der Rooibosflavonoide wurde in der Humanstudie auch der Einfluss der Rooibosflavonoide auf die antioxidative Kapazität des Blutes untersucht. Parallel zu den Humanuntersuchungen wurde das antioxidative Potenzial der Rooibosflavonoide außerdem im Rahmen verschiedener In-vitro-Versuche, sowohl in Reinform als auch in Mischung mit Serum, erfasst.

In den In-vitro-Versuchen der Versuchsreihe II wurde der ORAC-Assay eingesetzt, da er als bevorzugte Methode zur Messung der antioxidativen Kapazität gilt. Er misst die Fähigkeit der in der Probe enthaltenen Antioxidantien, Peroxylradikale über einen Wasserstoffatomtransfer zu neutralisieren und zählt damit zu den HAT-Assays. Sowohl der kompetitive Reaktionsmechanismus dieses Assays als auch das in diesem Testsystem verwendete Peroxylradikal spielen in biologischen Systemen, z. B. im Rahmen der Lipidperoxidation, eine relevante Rolle. Die Messbedingungen des ORAC-Tests simulieren physiologische Verhältnisse und Reaktionsmechanismen damit realitätsgetreuer als andere Testsysteme

wie z. B. der FRAP-Assay. In diesem kommen weder Radikale zum Einsatz, noch wird ein kompetitiver Reaktionsmechanismus modelliert [FRANKEL UND FINLEY 2008, MACDONALD-WICKS ET AL. 2006, PRIOR ET AL. 2005]. Der HAT-Mechanismus, auf dem der ORAC-Assay basiert, wird zudem als der für phenolische Antioxidantien und Flavonoide typische und dominierende Reaktionsmechanismus betrachtet [AMIĆ ET AL. 2007, WRIGHT ET AL. 2001]. Generell sollten Testsysteme, die auf dem HAT-Mechanismus beruhen und kompetitive Reaktionsmechanismen modellieren, SET-basierten Assays vorgezogen werden. [MACDONALD-WICKS ET AL. 2006, WOOD ET AL. 2006, HUANG ET AL. 2005].

Die In-vitro-Messungen der **Untersuchungsserie II.I** konnten die antioxidative Kapazität des Rooibostees bzw. der enthaltenen Flavonoide in Übereinstimmung mit Studien von JOUBERT ET AL. [2008] und VON GADOW ET AL. [1997A] belegen. Sie schwankte in Abhängigkeit von der Aspalathinkonzentration (0.01-0.127 $\mu\text{mol/l}$) zwischen 9-1075 $\mu\text{mol TE/l}$. Anhand der Geradengleichung ($y = 10290x-174.26$) ließ sich ermitteln, dass ein Anstieg der Aspalathinkonzentration um 0.01 $\mu\text{mol/l}$ mit einer Steigerung der antioxidativen Kapazität um 103 $\mu\text{mol TE/l}$ assoziiert war. Die in dieser Untersuchungsserie generierten Erkenntnisse können aufgrund der Übereinstimmungen im Flavonoidprofil auch auf die übrigen in Versuchsreihe I verwendeten Prüfprodukte übertragen werden. In weiteren In-vitro-Versuchen der Untersuchungsserie II.II konnte zudem bestätigt werden, dass Rooibosflavonoide befähigt sind, die antioxidative Kapazität von Serum bzw. Blut zu erhöhen.

Im Widerspruch zu den In-vitro-Versuchen und entgegen den Erwartungen, konnte in der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Humanstudie **kein Anstieg der antioxidativen Kapazität** nach Aufnahme der Prüfprodukte ermittelt werden. Dies stimmt mit Humanuntersuchungen von MARNEWICK ET AL. [2011] und SAUTER [2004] überein. In den Untersuchungen von SAUTER [2004] konsumierten 20 Probanden über einen Zeitraum von zwei Wochen 75 mg/d Aspalathin. Weder im ABTS- noch im Xanthin/Xanthinoxidase-Test ließ sich ein Anstieg der antioxidativen Kapazität messen. Übereinstimmend hiermit war auch in einer sechswöchigen Interventionsstudie, in der 40 Studienteilnehmer täglich 1.2 l fermentierten Rooibos konsumierten (164 mg Polyphenole), weder im ORAC-, FRAP- oder ABTS-Test eine Zunahme der antioxidativen Kapazität zu verzeichnen [MARNEWICK ET AL. 2011].

Die Diskrepanz zwischen der antioxidativen Kapazität der Rooibosflavonoide in vitro und in vivo kann verschiedenen Gründe haben, wobei die **niedrige Bioverfügbarkeit** der Flavonoide als eine der Hauptursachen in Betracht zu ziehen ist. So konnten die In-vitro-Versuche der Untersuchungsserie II.II zwar bestätigen, dass die Rooibosflavonoide in der Lage sind, die antioxidative Kapazität von Serum zu erhöhen, die hierfür erforderliche Aspalathinkonzentration lag jedoch mit 0.05-0.06 $\mu\text{mol/l}$ über der in der Humanuntersuchung

detektierten medianen Plasmakonzentration von maximal 0.03 $\mu\text{mol/l}$. Auch unter der Annahme, dass die Plasmaaspalathinkonzentration möglicherweise höher lag, da Phase-2-Metabolisiertes Aspalathin nicht detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass die Bioverfügbarkeit zu gering war, da die Plasmaproben vor Einsatz im ORAC-Assay verdünnt werden mussten (Anhang 2.5.2.1). Erschwerend kommt hinzu, dass Serum aufgrund des hohen Gehaltes potenter Antioxidantien [RICE-EVANS 2000, RICE-EVANS UND MILLER 1998] bereits eine hohe antioxidative Eigenaktivität aufweist, wie die Ergebnisse der In-vitro-Versuche und die Messungen der jeweiligen Nüchternproben in der Versuchsreihe I zeigen. Die **geringen Plasmaspiegel** absorbiertes Rooibosflavonoide nach Aufnahme der Prüfprodukte waren vermutlich, analog zu den ORAC-Messungen, auch im FRAP-Assay Ursache dafür, dass kein Anstieg der antioxidativen Kapazität messbar war. So konnte in Untersuchungen von KIMURA ET AL. [2002] nach Applikation von Grünteeflavonoiden mittels des FRAP-Assays ebenfalls kein Anstieg der antioxidativen Kapazität gemessen werden, da die hierfür erforderliche Mindestkonzentration von 2 $\mu\text{mol/l}$ nicht erreicht wurde. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde auch in einer weiteren Humanstudie in der Grünteeprodukte appliziert wurden, kein Anstieg der antioxidativen Kapazität detektiert [HENNING ET AL. 2005]. In diesen Untersuchungen konsumierten 20 Probanden ein aufgereinigtes Epigallocatechingallatkonzentrat (580 mg EGCG) und ein Grünteextrakt (618 mg EGCG, 168 mg EGC, 166 mg EC, 77 mg ECG). Das EGCG erreichte mittlere maximale Plasmaspiegel von 0.7 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 0.5 $\mu\text{mol/l}$. Das EC und das EGC wiesen mit 1.7 bzw. 0.9 $\mu\text{mol/l}$ im Mittel nochmals höhere Plasmakonzentrationen auf. Im Vergleich zu den medianen Konzentrationen, die in den eigenen Untersuchungen bestimmt wurden, lag die Konzentration der einzelnen Catechine deutlich höher. Besonders auffällig ist dies im Falle des EC und des EGC. Ihre Plasmakonzentration lag höher als die mediane Konzentration aller Rooibosflavonoide, obwohl die Applikationsmenge im Vergleich zum Aspalathin deutlich geringer (Rooibostee 636 $\mu\text{mol}/287$ mg, aktive Fraktion 623 $\mu\text{mol}/281$ mg) bzw. vergleichbar (frisches Fertiggetränk 363 $\mu\text{mol}/164$, gelagertes Fertiggetränk 237 $\mu\text{mol}/107$ mg) war. Generell können, nach der Applikation einer mit unseren Prüfprodukten vergleichbaren Catechinmenge, zumeist Plasmaspiegel von 1 $\mu\text{mol/l}$ und teilweise auch von bis zu 6 $\mu\text{mol/l}$ gemessen werden [MANACH ET AL. 2005]. Trotz des vergleichsweise hohen Plasmagesamtcatechingehalt von 3.2 $\mu\text{mol/l}$ wurde auch in den Untersuchungen von Henning et al. [2005] mittels des TEAC-Assays kein Anstieg der antioxidativen Kapazität erfasst. Den Autoren zu Folge hätte hierfür eine Mindestkonzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ erreicht werden müssen.

Die Ergebnisse aus den In-vitro-Versuchen der **Untersuchungsserie II.III** lassen vermuten, dass das Potenzial von Rooibosflavonoiden zur Beeinflussung der antioxidativen Kapazität von Blut neben der geringen Bioverfügbarkeit auch durch Wechselwirkungen mit

Serumbestandteilen beeinflusst werden kann. Mit Rooibostee versetztes Serum (2819 $\mu\text{mol TE/l}$) wies lediglich 74 % der antioxidativen Kapazität auf, die durch Addition der Kapazität der beiden Einzelsubstanzen (Rooibostee 1211 $\mu\text{mol TE/l}$, Serum 2615 $\mu\text{mol TE/l}$) rechnerisch möglich gewesen wäre (3826 $\mu\text{mol TE/l}$). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten auch andere Arbeitsgruppen belegen, dass die antioxidative Kapazität verschiedener Flavonoide (Quercetin, Rutin, Catechine) sowie von grünem und schwarzem Tee und Plasma in gängigen antioxidativen Testsystemen nicht additiv war. Vielmehr kam es durch die Mischung der Flavonoide mit Plasma zu einer **partiellen Maskierung** ihrer antioxidativen Aktivität bzw. Kapazität. Die Bindung an das Plasmaprotein Albumin wurde in diesen Versuchen als Ursache der auftretenden Maskierungseffekte ausgemacht [ARTS ET AL. 2001, ARTS ET AL. 2002B]. Dies deckt sich auch mit weiteren Angaben aus der Literatur, denen zufolge das Serumprotein Albumin Auslöser der maskierenden Wechselwirkungen ist [BOLLI ET AL. 2010, DONOVAN ET AL. 2006, DANGLES ET AL. 2001]. Mögliche Ursache hierfür ist, dass antioxidativ wirksame Gruppen des Flavonoids durch Aminosäureketten blockiert werden [DEGRAFT-JOHNSON ET AL. 2007]. Unter Berücksichtigung dieser Datenlage ist somit zu schlussfolgern, dass die in Untersuchungsserie II.III aufgetretenen Effekte ebenfalls auf Wechselwirkungen der Rooibosflavonoide mit dem Albumin beruhen. Wird davon ausgegangen, dass in Folge der Bindung der Flavonoide an das Protein lediglich die antioxidative Kapazität der Flavonoide limitiert wird, lässt sich berechnen, dass sie bei Mischung mit einer biologischen Probenflüssigkeit lediglich 17 % ihrer ursprünglichen antioxidativen Kapazität entfalten können. Diese Maskierungseffekte begrenzen die Befähigung der Flavonoide das antioxidative Potenzial von Blut messbar zu beeinflussen, zusätzlich zur geringen Bioverfügbarkeit, deutlich.

Neben den Maskierungseffekten und der geringen Bioverfügbarkeit unterliegen die Flavonoide in vivo zudem **strukturverändernden Metabolisierungsreaktionen**, die ihre antioxidative Kapazität in gängigen Testsystemen ebenfalls negativ beeinflussen. Dabei handelt es sich vorwiegend um Phase-2-Reaktionen (Glukuronidierungen, Sulfatierungen, Methylierungen), die das Ziel haben, die Hydrophilie absorbierter Substanzen zu erhöhen und dem Organismus damit der Detoxifikation dienen [HALLIWELL ET AL. 2005]. In-vitro-Messungen mit dem DPPH- und ABTS-Assay belegen jedoch, dass Aspalathin durch eine Glukuronidierung auch seine antioxidative Aktivität einbüßt [VAN DER MERWE ET AL. 2010]. Die physiologische Relevanz der Phase-2-Reaktionen wird durch die in der eigenen Humanstudie in Sammelurinproben detektierten Metabolite des Aspalathin bestätigt. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde auch in weiteren Humanstudien im Urin vorwiegend metabolisiertes Aspalathin erfasst [STALMACH ET AL. 2009A, COURTS UND WILLIAMSON 2009].

Zusammengefasst können die:

- geringe Bioverfügbarkeit
- in vivo auftretende Maskierungseffekte

und

- Phase-2-Metabolisierungen

erklären, warum die in vitro bestätigte antioxidative Kapazität der Rooibosflavonoide nicht nach Applikation der Prüfprodukte nachweisbar war.

Die aufgeführten Punkte liefern jedoch keine hinreichende Erklärung warum in den eigenen Humanuntersuchungen ein Abfall der antioxidativen Kapazität messbar war, während es in einer Humanuntersuchung von VILLAÑO ET AL. [2010], bei vergleichbarem Studiendesign, nach einmaliger Applikation eines Rooibosprüfproduktes zu einem Anstieg der antioxidativen Kapazität kam. In diesen Untersuchungen konsumierten 15 Probanden 500 ml eines unfermentierten (159 $\mu\text{mol}/73$ mg Flavonoide) bzw. fermentierten „Ready-to-drink“ Teegetränks (84 $\mu\text{mol}/40$ mg Flavonoide). Als Plazebo wurde Wasser gereicht. Die Gabe der Produkte erfolgte ebenso wie in der eigenen Humanuntersuchung im Cross-over-Design. Blutproben wurden vor sowie 0,5, 1, 1,5, 2 und 5 h nach Einnahme des jeweiligen Prüfproduktes entnommen. Dabei konnte sowohl nach Aufnahme des fermentierten Rooibostees als auch nach Konsum des unfermentierten Rooibostees ein Anstieg der antioxidativen Kapazität gemessen werden. Im Vergleich zur antioxidativen Kapazität der jeweiligen Nüchternprobe erreichte dieser nach Konsum des fermentierten Tees ein signifikantes Niveau ($p < 0.05$). Prozentual gesehen fiel der Anstieg mit 3 % (unfermentierter Rooibostee) bzw. 6 % (fermentierter Rooibostee) nur gering aus.

Als mögliche Ursache der differierenden Messergebnisse kommen Unterschiede in den verwendeten Messmethoden und/oder den applizierten Prüfprodukten in Frage.

Sowohl in den eigenen Untersuchungen als auch in der Studie von VILLAÑO ET AL. [2010] wurden mit dem ORAC- und dem TRAP-Assay auf dem HAT-Mechanismus basierende Messsysteme eingesetzt. In beiden Testsystemen wird zudem mit dem Peroxylradikal dieselbe reaktive Spezies verwendet. Demnach kann nicht angenommen werden, dass die abweichenden Ergebnisse den verwendeten Testsystemen geschuldet sind. Diese Annahme gilt auch für die Messergebnisse des FRAP-Assays, da dieser trotz eines vom TRAP- und ORAC-Assay abweichenden Reaktionsprinzips mit dem ORAC-Test übereinstimmende Ergebnisse liefert.

Die in den Untersuchungen von VILLAÑO ET AL. [2010] verabreichten „Ready-to-drink“-Rooibosteegetränke wiesen einen geringeren Flavonoidgesamtgehalt auf als die Verumpräparate der eigenen Untersuchungen, weshalb diese als Grund der differierenden Studienergebnisse ebenfalls auszuschließen sind. Obwohl Harnsäure neben Vitamin C und E sowie Albumin und Glutathion als potentes endogenes Antioxidans, in gängigen Testsystemen mit bis zu 62 % maßgeblich zur antioxidativen Kapazität des Blutes beiträgt [RICE-EVANS 2000, CAO UND PRIOR 1998, RICE-EVANS UND MILLER 1998], kann in den Untersuchungen von VILLAÑO ET AL. [2010] ausgeschlossen werden, dass Schwankungen der Harnsäurekonzentration, Ursache für die Messergebnisse waren. Übereinstimmend damit ergaben Korrelationsberechnungen mit den nüchternwertbereinigten ORAC- und FRAP-Werte und der nüchternwertbereinigten Harnsäurekonzentration, dass die Veränderung der antioxidativen Kapazität in den eigenen Untersuchungen ebenfalls nicht mit der Veränderung der Harnsäurekonzentration korrelierte.

Da demnach weder die verwendeten Testsysteme noch die verabreichten Prüfprodukte oder Schwankungen des Harnsäuregehaltes eine hinreichende Erklärung für die abweichenden Messergebnisse liefern, müssen andere Einflussfaktoren ermittelt werden. Hierzu zählt möglicherweise die während des **Untersuchungstages applizierte Studiernahrung**, die als potentielle Quelle antioxidativ und **prooxidativ wirksamer Verbindungen**, die antioxidative Kapazität des Blutes beeinflussen kann.

Der Veröffentlichung von VILLAÑO ET AL. [2010] ist nicht zu entnehmen, ob den Probanden während der Untersuchungstage Mahlzeiten verabreicht wurden. In den eigenen Untersuchungen wurden hingegen standardisierte, kohlenhydratreiche und antioxidantien- und flavonoidarme Mahlzeiten gereicht. Auf diese Weise sollte ausgeschlossen werden, dass nutritive Antioxidantien zu einer unerwünschten Beeinflussung der Messung führen. PRIOR ET AL. [2007] haben jedoch andererseits mittels des ORAC-Assays nachgewiesen, dass die Aufnahme einer Energiequelle, die sich in erster Linie aus Kohlenhydraten zusammensetzt und gleichzeitig nur wenige bis keine Antioxidantien enthält, eine Abnahme der antioxidativen Kapazität des Blutes induzieren kann. Die Autoren mutmaßen, dass freie Radikale, die während der Metabolisierung der Kohlenhydrate in der Atmungskette (Superoxide im Mitochondrium) entstehen, die Ursache hierfür sind.

Basierend auf Ernährungserhebungen, die eine positive Korrelation zwischen dem Konsum von Tee, Gemüse, Obst und Wein und der Aufnahmemenge von Vitamin C, Vitamin E und Flavonoiden ermittelt haben [CHUN ET AL. 2010, CHUN ET AL. 2007], kann zudem angenommen werden, dass es in Folge der strikten, vierwöchigen Ernährungsvorgaben (u. a. waren Tee, Gemüse, Obst und Wein zu meiden), in der eigenen Humanuntersuchungen zu einer deutlich reduzierten Aufnahme exogener Antioxidantien

kam. Hierdurch haben die Ernährungsvorgaben möglicherweise die Etablierung prooxidativer Effekte begünstigt und indirekt zu dem gemessenen Abfall beigetragen. Die nahrung induzierte oxidative Belastung kann wiederum die bereits verringerte Konzentration exogener Antioxidantien weiter abgesenkt haben. Die Bedeutung bzw. der Beitrag exogener und endogener Antioxidantien (u. a. Vitamin C, Albumin und Harnsäure) zur antioxidativen Kapazität des Serums wurde in verschiedenen Messungen mittels des ORAC-, FRAP- und TEAC-Assays belegt [RICE-EVANS 2000, RICE-EVANS UND MILLER 1998].

Unter Berücksichtigung der möglichen prooxidativen Effekte der Studienernährung wird zudem erklärbar, warum die in Untersuchungsserie II.I zum Messzeitpunkt 0.5 h bestimmte mittlere Aspalathinkonzentration sowohl im ORAC als auch im FRAP-Assay mit einem Anstieg der antioxidativen Kapazität assoziiert war, während dies zu den Zeitpunkten 1.5 h weder in der ersten noch der zweiten Untersuchungsserie der Fall war. Neben der Nüchternprobe war die zum Zeitpunkt 0.5 h gewonnene Blutprobe die einzige, die vor Gabe einer der Studienmahlzeiten entnommen wurde. Prooxidative Effekte konnten sich demnach noch nicht etablieren und die antioxidative Kapazität der Flavonoide nicht beeinträchtigen. Diese Annahme ist jedoch aufgrund der Datenlage (die zum Zeitpunkt 0.5 h bestimmte mittlere Aspalathinkonzentration berechnete sich ebenso wie die korrespondierende mittlere antioxidative Kapazität lediglich aus den Werten von drei Probanden) nur spekulativ und bedarf einer Bestätigung mit höherer Fallzahl.

Unter Berücksichtigung aller genannten Argumente scheint es am wahrscheinlichsten, dass:

- die Studienernährung und die strikten Ernährungsvorgaben synergistisch für den Abfall der antioxidativen Kapazität verantwortlich waren

und

- die an den Untersuchungstagen zugeführten Rooibosflavonoide die prooxidativen Einflüsse, aufgrund
 - ihrer geringen Bioverfügbarkeit

und

- der in vivo auftretenden Metabolisierungsreaktionen (Bindung an Albumin, Phase-2-Reaktionen), in deren Folge ihre antioxidative Kapazität abnahm, nicht ausgleichen konnten.

5.1.3.3 Methodische Limitationen

Die physiologische Relevanz des in dieser Studie im ORAC- und FRAP-Assay gemessenen Abfalls der antioxidativen Kapazität ist unklar. Da bisher keine Grenzwerte existieren, die eine wünschenswerte antioxidative Kapazität des Blutes charakterisieren, ist eine Veränderung dieser bis jetzt nicht direkt mit einem Krankheitsgeschehen zu assoziieren. Generell muss in Frage gestellt werden, ob einer mittels gängiger Testsysteme gemessenen Veränderung der antioxidativen Kapazität des Blutes, unabhängig von ihrer Ausrichtung und ihrem Ausmaß, eine klinische Relevanz beigemessen werden kann.

Die biologische Effizienz von Antioxidantien in vivo sollte neben der Messung mit antioxidativen Testsystem auch anhand der Analyse von Biomarkern bewertet werden. Parameter die Rückschlüsse auf den endogenen antioxidativen Status zulassen, sind z. B. Peroxidationsprodukte, wie F2-Isoprostane als Marker für eine Lipidperoxidation oder modifizierte Tyrosine, als Indikatoren von oxidativem Stress und damit assoziierten Lipid-, Protein- und DNA-Schädigung. Die Messung von F2-Isoprostanen (z. B. 8-Isoprostaglandin F_{2α}) mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS) gilt als Goldstandard zur Erfassung von Veränderungen des oxidativen Status in vivo [WOOD ET AL. 2006].

In Humanstudien konnte belegt werden, dass die Messung von solchen endogenen Parametern erfolgsversprechend sein kann. So war in einer Humanuntersuchung von MARNEWICK ET AL. [2011] nach einer sechswöchigen Applikation von 1.2 l/d Rooibostee, trotz fehlendem Anstiegs der antioxidativen Kapazität des Blutes, im FRAP-, ORAC- oder ABTS-Assay, eine signifikante Zunahme von reduziertem Glutathion und eine signifikante Abnahme von oxidiertem Glutathion messbar. In Übereinstimmung mit diesen Untersuchungen wurde in einer Interventionsstudie von NIKOLOVA ET AL. [2007] nach achtwöchiger Applikation von Rooibostee ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Konzentration von reduziertem Glutathion erfasst. Zudem war die Konzentration an Malondialdehyden signifikant reduziert, was als Beleg einer Abnahme der Lipidperoxidation verstanden werden kann. Da in diesen Untersuchungen jedoch im Vergleich zu der eigenen Humanstudie eine deutlich längerfristige Applikation der Rooibosprüfprodukte erfolgte, kann nicht mit Sicherheit geschlussfolgert werden, ob die angewendeten Parameter auch für den Einsatz in Kurzzeitkinetiken geeignet sind. In den Untersuchungen von NIKOLOVA ET AL. [2007] kam mit schwermetallexponierten Arbeitern zudem ein Risikokollektiv (schwermetallexponierte Arbeiter) zum Einsatz, weshalb die Ergebnisse nicht direkt auf ein gängiges Untersuchungskollektiv unbelasteter Probanden übertragbar sind.

Unter Berücksichtigung der Studie von MARNEWICK ET AL. [2011] in der trotz der positiven Beeinflussung endogener Parameter, mittels FRAP-, ORAC- und TRAP-Assay kein Anstieg der antioxidativen Kapazität messbar war, muss übereinstimmend mit RICE-EVANS [2000] die Frage gestellt werden, ob gängige antioxidative Testsysteme sensitiv genug sind, eine flavonoidinduzierte Veränderung der antioxidativen Kapazität zu messen. So weist Blut aufgrund des hohen Gehaltes antioxidativ wirksamer Komponenten in den meisten Testsystemen bereits ohne die Einwirkung von Flavonoiden ein hohes antioxidatives Potenzial auf. Stoffe wie Albumin, Harnsäure, Vitamin C und E sowie Bilirubin machen dabei in Abhängigkeit des Testsystems bis zu 90 % der antioxidativen Kapazität des Blutes aus [RICE-EVANS 2000, CAO UND PRIOR 1998, RICE-EVANS UND MILLER 1998]. Die Bedeutung der Harnsäure wurde auch in der eigenen Humanstudie belegt. So korrelierten sowohl die FRAP- und ORAC-Werte der ersten, als auch die FRAP-Werte der zweiten Untersuchungsserie überwiegend signifikant mit dem jeweilig bestimmten Harnsäuregehalt. Die Flavonoide, die aufgrund ihrer geringen Bioverfügbarkeit zumeist nur niedrige μ -molare Plasmakonzentrationen erreichen und damit in geringerer Konzentration vorliegen als die genannten Substanzen, können vermutlich nur einen verhältnismäßig geringfügigen Beitrag zur antioxidativen Kapazität des Plasmas leisten. DEGRAFT-JOHNSON ET AL. [2007] haben in diesem Zusammenhang in In-vitro-Versuchen gezeigt, dass Plasma im FRAP-Assay eine bis zu 30 mal höhere antioxidative Kapazität besitzt, als verschiedene Flavonoide (u. a. Catechin und Quercetin), die in einer μ -molaren Konzentration (0.5 $\mu\text{mol/l}$) vorliegen. In diesen Versuchen ist zudem noch nicht berücksichtigt, dass das antioxidative Potenzial von absorbierten Flavonoiden in Folge albumininduzierter Maskierungseffekte und Phase-2-Metabolisierungen weiter eingeschränkt ist. In Übereinstimmung mit den dargestellten Zusammenhängen war die in den eigenen Untersuchungen detektierte maximale mediane Plasmaaspalathinkonzentration von 0.03 $\mu\text{mol/l}$ zu gering, um im ORAC-Assay einen Anstieg der antioxidativen Kapazität des Blutes zu induzieren. Die hierfür benötigte Konzentration hätte bei 0.05-0.06 $\mu\text{mol/l}$ gelegen. Ebenso war auch in Humanuntersuchungen von KIMURA ET AL [2002] und HENNING ET AL. [2005], trotz deutlich höherer Flavonoidplasmaspiegel, mittels des FRAP- bzw. des TEAC-Assays ebenfalls kein Anstieg messbar, da die jeweilig erforderliche Mindestkonzentration von 2 bzw. 5 $\mu\text{mol/l}$ nicht erreicht wurde.

6 Zusammenfassung und Fazit

Kräuter- und Früchtetees wurden bereits vor Jahrtausenden zu Genuss- und Heilzwecken konsumiert. Ansteigende Verbrauchsmengen in den letzten Jahren verdeutlichen, dass sich diese Produktklasse in Deutschland einer zunehmenden Beliebtheit erfreut [VEREINIGUNG KRÄUTER- UND FRÜCHTETEEES 2003-2011].

Hauptbestandteil und gleichzeitig auch wertgebende Komponente des Rooibos und seiner wässrigen Extrakte sind die Flavonoide. Sie zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen und ihnen werden ähnlich den meisten Stoffen pflanzlicher Herkunft, normale Verzehrsgewohnheiten vorausgesetzt, gesundheitserhaltende und -fördernde Eigenschaften beigemessen. Hierbei steht zumeist die antioxidative Wirkung dieser Stoffklasse im Vordergrund, die sie in die Lage versetzt, pathophysiologisch relevante Radikale und reaktive Sauerstoffspezies, wie z. B. das Superoxid-, Peroxyl-, Alkoxy- und Hydroxyradikal zu neutralisieren [DEGRAFT-JOHNSON ET AL. 2007, RICE-EVANS ET AL. 2000, PRIOR UND CAO 1999, RICE-EVANS 2001, COTELLE 2001, PIETTA 2000, SHACKELFORD ET AL. 2000]. Im menschlichen Organismus können Radikale verschiedene Biomoleküle schädigen und sind somit an der Pathogenese von Erkrankungen wie Atherosklerose und Krebs beteiligt. Flavonoiden wird deshalb vor allem eine protektive Wirkung bei Erkrankungen zugesprochen in denen „oxidativer Stress“ ein zentraler Faktor in der Pathogenese ist.

Zum Zeitpunkt der Studienplanung und -durchführung waren die Bioverfügbarkeit und die antioxidative Kapazität von Rooibosflavonoiden nur unzureichend untersucht. Es existierte lediglich eine Humanuntersuchung [SAUTER 2004], in der zudem ausschließlich die antioxidative Kapazität von Rooibosextrakten nach oraler Applikation bestimmt wurde. Eine Quantifizierung oder Bestimmung in das Blut übergegangener Flavonoide erfolgte nicht. Auch zum jetzigen Zeitpunkt ist der Rooibos mit sechs Humanuntersuchungen [MARNEWICK ET AL. 2011, VILLAÑO ET AL. 2010, COURTS UND WILLIAMSON 2009, STALMACH ET AL. 2009A, NIKOLOVA ET AL. 2007, SAUTER ET AL. 2004] im Vergleich zu anderen Teesorten (grüner, schwarzer Tee) nur wenig erforscht. Ergebnisse aus Untersuchungen mit grünem und schwarzem Tee besitzen aufgrund der variierenden Flavonoidzusammensetzung der Tees keine allgemeingültige Bedeutung. So dominieren in diesen Teesorten mit den Catechinen (Flavanole) Flavonoide, die als Aglykone vorliegen, während in dem Rooibostee Flavonoid-C-Glykoside dominieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher Daten über die Biokinetik und das antioxidative Potenzial oral applizierter Rooibosflavonoide zu gewinnen.

Zu diesem Zweck wurden im Rahmen einer Humanstudie verschiedenartige Rooibosprüfprodukte verabreicht. Blut und Urinproben wurden in definierten Intervallen nach Gabe der Prüfprodukte gesammelt und auf ihr Flavonoidprofil und ihr antioxidative Kapazität untersucht. In parallel durchgeführten In-vitro-Versuchen wurde außerdem die antioxidative Kapazität von Rooibosflavonoiden in Reinform und in Mischung mit Blut erfasst.

In der Humanstudie konnte bestätigt werden, dass die Flavonoide des Rooibos trotz ihrer C-glykosidischen Bindung bioverfügbar sind. Nach Aufnahme der verschiedenen Prüfprodukte waren sowohl in den Plasma- als auch den Urinproben Rooibosflavonoide detektierbar. Obwohl das antioxidative Potenzial von Rooibosflavonoiden in vitro bestätigt wurde, war in den Humanuntersuchungen kein Anstieg, sondern sogar ein Abfall der antioxidativen Kapazität messbar.

Mögliche Ursache für die Abnahme der antioxidativen Kapazität waren vermutlich prooxidative Effekte, die von der an den Studientagen verabreichten kohlenhydratreichen, antioxidantienarmen Studienernährung ausgingen. Die strikten Ernährungsvorgaben, in deren Folge die Aufnahme exogener Antioxidantien wahrscheinlich reduziert war, können die Etablierung der prooxidativen Effekte begünstigt haben. Die über die Prüfprodukte applizierten Rooibosflavonoide konnten diese prooxidativen Effekte, trotz ihrer in vitro bestätigten antioxidativen Kapazität, nicht ausgleichen. Neben ihrer geringen Bioverfügbarkeit lag dies vermutlich daran, dass albuminvermittelte Maskierungseffekte und Phase-2-Metabolisierungen auch die antioxidative Kapazität absorbiertes Rooibosflavonoide einschränkten.

In zukünftigen Studien zur Untersuchung der Bioverfügbarkeit und antioxidativen Kapazität von Rooibosflavonoiden in vivo sollten, unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse, verschiedene Modifikationen des hier zum Einsatz gekommenen Studiendesigns erfolgen. Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit der Flavonoide ist es möglicherweise ratsam, eine längere Interventionsphase oder eine Mehrfachgabe der entsprechenden Prüfprodukte vorzusehen. Zudem sollten, neben den in dieser Humanstudie verwendeten antioxidativen Testsystemen auch physiologische Parameter, die den endogenen antioxidativen Status reflektieren, berücksichtigt werden. Weiterhin verdeutlichen die Ergebnisse der eigenen Humanstudie, dass es von Vorteil sein kann, einen weniger restriktiven Einfluss auf das Ernährungsverhalten der Probanden zu nehmen. Solche Einschränkungen haben möglicherweise eine unnatürlich geringe Zufuhr exogener Antioxidantien und damit einer unerwünschte Beeinflussung der antioxidativen Kapazität zu Folge. Hier bietet sich an die Probanden anzuhalten, ihre üblichen Ernährungsgewohnheiten beizubehalten und nur den Konsum von besonders flavonoidhaltigen Lebensmitteln, wie Tee und Wein zu meiden sowie den Verzehr von Obst und Gemüse moderat einzuschränken.

7 Literaturverzeichnis

Aherne, S. A.; O'Brien, N. M. Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 2002. 1. 18. 75–81.

Amić, D.; Davidović-Amić, D.; Bešlo, D.; Rastija, V.; Lučić, B.; Trinajstić, N. SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*. 2007. 7. 14. 827–845.

Amić, D.; Davidović-Amić, D.; Bešlo, D.; Trinajstić, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*. 2003. 1. 76. 55–61.

Antolovich, M.; Prenzler, P. D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 2002. 1. 127. 183–198.

Arora, A.; Nair, M. G.; Strasburg, G. M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine*. 1998. 9. 24. 1355–1363.

Arts, I. C.; Hollman, P. C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*. 2005. 1 Suppl. 81.

Arts, I. C. W.; Sesink, A. L. A.; Faassen-Peters, M.; Hollman, P. C. H. The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *British Journal of Nutrition*. 2004. 6. 91. 841–847.

Arts, I. C. W.; Sesink, A. L. A.; Hollman, P. C. H. Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *Journal of Nutrition*. 2002a. 9. 132. 2823–2824.

Arts, M. J. T. J.; Haenen, G. R. M. M.; Voss, H. -P; Bast, A. Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food and Chemical Toxicology*. 2001. 8. 39. 787–791.

Arts, M. J. T. J.; Haenen, G. R. M. M.; Wilms, L. C.; Beetstra, S. A. J. N.; Heijnen, C. G. M.; Voss, H. -P; Bast, A. Interactions between flavonoids and proteins: Effect on the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002b. 5. 50. 1184–1187.

Azzi, A.; Davies, K. J. A.; Kelly, F. Free radical biology - Terminology and critical thinking. *FEBS Letters*. 2004. 1-3. 558. 3–6.

Bechthold, A. Kräuter- und fruchtetees - Trendgetränk mit Heilwirkung? *Ernährungs Umschau*. 2005. 11. 52. B46-B48.

Becker, B. F. Towards the physiological function of uric acid. *Free Radical Biology and Medicine*. 1993. 6. 14. 615–631.

Becker, B. F.; Reinholz, N.; Leipert, B.; Raschke, P.; Permanetter, B.; Gerlach, E. Role of uric acid as an endogenous radical scavenger and antioxidant. *Chest*. 1991. 3 SUPPL. 100. 176S-181S.

Beecher, G. R. Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutrition*. 2003. 10. 133.

- Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 1996. 1. 239. 70–76.
- Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*. 1998. 299. 15–27.
- Benzie, I. F. F.; Szeto, Y. T.; Strain, J. J.; Tomlinson, B. Consumption of green tea causes rapid increase in plasma antioxidant power in humans. *Nutrition and Cancer*. 1999. 1. 34. 83–87.
- Blaut, M.; Schoefer, L.; Braune, A. Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2003. 2. 73. 79–87.
- Boersma, M. G.; van der Woude, H.; Bogaards, J.; Boeren, S.; Vervoort, J.; Cnubben, N. H. P.; van Iersel, M. L. P. S.; van Bladeren, P. J.; Rietjens, I. M. C. M. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chemical Research in Toxicology*. 2002. 5. 15. 662–670.
- Bohm, B. A. Introduction to Flavonoids. *Chemistry and biochemistry of organic natural products*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1998. 5-50.
- Bokkenheuser, V. D.; Shackleton, C. H. L.; Winter, J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochemical Journal*. 1987. 3. 248. 953–956.
- Bolli, A.; Marino, M.; Rimbach, G.; Fanali, G.; Fasano, M.; Ascenzi, P. Flavonoid binding to human serum albumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010. 3. 398. 444–449.
- Borges, Gina; Mullen, William; Mullan, Adam; Lean, Michael E. J.; Roberts, Susan A.; Crozier, Alan. Bioavailability of multiple components following acute ingestion of a polyphenol-rich juice drink. *Molecular nutrition & food research*. 2010. 54 Suppl 2. S268-77.
- Bors, W.; Heller, W.; Michel, C.; Saran, M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*. 1990. 186. 343–355.
- Bors, W.; Michel, C. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002. 957. 57–69.
- Boyle, S. P.; Dobson, V. L.; Duthie, S. J.; Hinselwood, D. C.; Kyle, J. A. M.; Collins, A. R. Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: A human supplementation study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2000. 10. 54. 774–782.
- Bramati, L.; Aquilano, F.; Pietta, P. Unfermented Rooibos Tea: Quantitative Characterization of Flavonoids by HPLC-UV and Determination of the Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. 25. 51. 7472–7474.
- Bramati, L.; Minoggio, M.; Gardana, C.; Simonetti, P.; Mauri, P.; Pietta, P. Quantitative characterization of flavonoid compounds in Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) by LC-UV/DAD. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. 20. 50. 5513–5519.
- Brand, W.; Boersma, M. G.; Bik, H.; Hoek-van Den Hil, E. F.; Vervoort, J.; Barron, D.; Meinel, W.; Glatt, H.; Williamson, G.; van Bladeren, P. J.; Rietjens, I. M. C. M. Phase II metabolism of

- hesperetin by individual UDP- glucuronosyltransferases and sulfotransferases and rat and human tissue samples. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010. 4. 38. 617–625.
- Braune, A.; Gütschow, M.; Engst, W.; Blaut, M. Degradation of Quercetin and Luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001. 12. 67. 5558–5567.
- Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 1998. 11. 56. 317–333.
- Breiter, T.; Laue, C.; Kressel, G.; Gröll, S.; Engelhardt, U. H.; Hahn, A. Bioavailability and antioxidant potential of rooibos flavonoids in humans following the consumption of different rooibos formulations. *Food Chemistry*. 2011. 2. 128. 338–347.
- Bugianesi, R.; Catasta, G.; Spigno, P.; D'Uva, A.; Maiani, G. Naringenin from cooked tomato paste is bioavailable in men. *Journal of Nutrition*. 2002. 11. 132. 3349–3352.
- Cao, G.; Alessio, H. M.; Cutler, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 1993. 3. 14. 303–311.
- Cao, G.; Prior, R. L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*. 1998. 6. 44. 1309–1315.
- Carle, R.: Sekundäre Pflanzenstoffe. In: Biesalski, H. K.; Bischoff, S. C.; Puchstein, C. *Ernährungsmedizin*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2010. 235–244.
- Chen, L.; Lee, M. -J; Li, H.; Yang, C. S. Absorption, distribution, and elimination of tea polyphenols in rats. *Drug Metabolism and Disposition*. 1997. 9. 25. 1045–1050.
- Chen, J.; Lin, H.; Hu, M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling: Role of intestinal disposition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003. 3. 304. 1228–1235.
- Choi, J. S.; Chung, H. Y.; Kang, S. S.; Jung, M. J.; Kim, J. W.; No, J. K.; Jung, H. A. The structure-activity relationship of flavonoids as scavengers of peroxynitrite. *Phytotherapy Research*. 2002. 3. 16. 232–235.
- Chow, S. C.; Liu, J. P. *Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies*. New York: Marcel Decker, Inc., 1992
- Chun, O. K.; Chung, J. S.; Song, W. O. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. *Journal of Nutrition*. 2007. 5. 137. 1244–1252.
- Chun, O. K.; Floegel, A.; Chung, S. -J; Chung, C. E.; Song, W. O.; Koo, S. I. Estimation of antioxidant intakes from diet and supplements in U.S. adults. *Journal of Nutrition*. 2010. 2. 140. 317–324.
- Clifford, M. N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Medica*. 2004. 12. 70. 1103–1114.
- Conquer, J. A.; Maiani, G.; Azzini, E.; Raguzzini, A.; Holub, B. J. Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *Journal of Nutrition*. 1998. 3. 128. 593–597.
- Cotelle, N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*. 2001. 6. 1. 569–590.

Courts, F. L.; Williamson, G. The C-glycosyl flavonoid, aspalathin, is absorbed, methylated and glucuronidated intact in humans. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2009. 9. 53. 1104–1111.

Crespy, V.; Morand, C.; Besson, C.; Cotelle, N.; Vezin, H.; Demigne, C.; Remesy, C. The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2003. 6 47-6. 284.

Crespy, V.; Morand, C.; Besson, C.; Manach, C.; Demigne, C.; Remesy, C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. 3. 50. 618–621.

Crespy, V.; Morand, C.; Manach, C.; Besson, C.; Demigne, C.; Remesy, C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1999. 1 40-1. 277.

Croft, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998. 854. 435–442.

Crozier, A.; Jaganath, I. B.; Clifford, M. N. Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. In: Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Oxford: Blackwell Publishing LTD, 2006. 1–24.

Crozier, A.; Jaganath, I. B.; Clifford, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*. 2009. 8. 26. 1001–1043.

Cuyckens, F.; Claeys, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*. 2004. 1. 39. 1–15.

Dangles, O.; Dufour, C.; Manach, C.; Morand, C.; Remesy, C. Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods in Enzymology*. 2001. 335. 319–333.

D'Archivio, M.; Filesi, C.; Di Benedetto, R.; Gargiulo, R.; Giovannini, C.; Masella, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*. 2007. 4. 43. 348–361.

D'Archivio, M.; Filesi, C.; Varì, R.; Scaccocchio, B.; Masella, R. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010. 4. 11. 1321–1342.

Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004. 1. 52. 48–54.

Day, A. J.; Canada, F. J.; Di-az, J. C.; Kroon, P. A.; McLauchlan, R.; Faulds, C. B.; Plumb, G. W.; Morgan, M. R. A.; Williamson, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters*. 2000. 2-3. 468. 166–170.

Day, A. J.; Dupont, M. S.; Ridley, S.; Rhodes, M.; Rhodes, M. J. C.; Morgan, M. R. A.; Williamson, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Letters*. 1998. 1. 436. 71–75.

Day, A. J.; Gee, J. M.; Dupont, M. S.; Johnson, I. T.; Williamson, G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4-glucoside in the rat small intestine: The role of lactase

phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology*. 2003. 7. 65. 1199–1206.

Day, A. J.; Mellon, F.; Barron, D.; Sarrazin, G.; Morgan, M. R. A.; Williamson, G. Human metabolism of dietary flavonoids: Identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radical Research*. 2001. 6. 35. 941–952.

Day, A. J.; Rothwell, J. A.; Morgan, M. R. A. Characterization of Polyphenol Metabolites. In: Bao, Y.; Fenwick, R. *Phytochemicals in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2004. 57–77.

DeGraft-Johnson, J.; Kolodziejczyk, K.; Krol, M.; Nowak, P.; Krol, B.; Nowak, D. Ferric-reducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: Implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 2007. 5. 100. 345–352.

Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE). *Ernährungsbericht 2004*. Bonn: Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., 2004

Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (DGE). *Ernährungsbericht 2008*. Bonn: Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V., 2008

Donovan, J. L.; Crespy, V.; Manach, C.; Morand, C.; Besson, C.; Scalbert, A.; Ramasy, C. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *Journal of Nutrition*. 2001. 6. 131. 1753–1757.

Donovan, J. L.; Manach, C.; Faulks, R. M.; Kroon P. A. Absorption and Metabolism of Dietary Plant Secondary Metabolites. In: Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Oxford: Blackwell Publishing LTD, 2006. 303–351.

Dost, F. H. (1968): *Grundlagen der Pharmakokinetik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Dupont, M. S.; Day, A. J.; Bennett, R. N.; Mellon, F. A.; Kroon, P. A. Absorption of kaempferol from endive, a source of kaempferol-3-glucuronide, in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2004. 6. 58. 947–954.

Dziedzic, S. Z.; Hudson, B. J. F. Polyhydroxy chalcones and flavanones as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry*. 1983. 3. 12. 205–212.

Erlund, I.; Meririnne, E.; Alfthan, G.; Aro, A. Human nutrition and metabolism: Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *Journal of Nutrition*. 2001. 2. 131. 235–241.

Frankel, E. N.; Finley, J. W. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008. 13. 56. 4901–4908.

Frankel, E. N.; Meyer, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000. 13. 80. 1925–1941.

Gadow, A. von; Joubert, E.; Hansmann, C. F. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry*. 1997a. 1. 60. 73–77.

- Galijatovic, A.; Otake, Y.; Walle, U. K.; Walle, T. Extensive metabolism of the flavonoid chrysin by human Caco-2 and Hep G2 cells. *Xenobiotica*. 1999. 12. 29. 1241–1256.
- Goraca, A.; Skibska, B. Plasma antioxidant status in healthy smoking and non-smoking men. *Bratislavské lekárske listy*. 2005. 10. 106. 301–306.
- Graefe, E. U.; Wittig, J.; Mueller, S.; Riethling, A. -K.; Uehleke, B.; Drewelow, B.; Pforte, H.; Jacobasch, G.; Derendorf, H.; Veit, M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2001. 5. 41. 492–499.
- Griffiths, L. A.; Barrow, A. The fate of orally and parenterally administered flavonoids in the mammal. The significance of biliary excretion. *ANGIOLOGICA*. 1972. 3-6. 9. 162–174.
- Hahn, A.; Ströhle, A.; Wolters, M. Ernährung. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2006
- Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Löliger, J.; Aruoma, O. I. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 1995. 7. 33. 601–617.
- Halliwell, B.; Rafter, J.; Jenner, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *The American journal of clinical nutrition*. 2005. 1 Suppl. 81. 268S-276S.
- Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*. 2007. 35. 1147-1150.
- Harris, J. A.; Benedict F.G. A Biometric Study of Human Basal Metabolism. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 1918. 12. 4. 370–373.
- Hays, W. S.; Jenison, S. A.; Yamada, T.; Pastuszyn, A.; Glew, R. H. Primary structure of the cytosolic β -glucosidase of guinea pig liver. *Biochemical Journal*. 1996. 3. 319. 829–837.
- Heijnen, C. G. M.; Haenen, G. R. M. M.; van Acker, F. A. A.; van der Vijgh, W. J. F.; Bast, A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: The role of the hydroxyl groups. *Toxicology in Vitro*. 2001a. 1. 15. 3–6.
- Heijnen, C. G. M.; Haenen, G. R. M. M.; Vekemans, J. A. J. M.; Bast, A. Peroxynitrite scavenging of flavonoids: Structure activity relationship. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2001b. 4. 10. 199–206.
- Heller, W.; Forkmann, G. Biosynthesis of Flavonoids. In: Harborne, J. B. *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. London: Chapman & Hall, 1994. 499–537.
- Henning, S. M.; Niu, Y.; Lee, N. H.; Thames, G. D.; Minutti, R. R.; Wang, H.; Go, V. L. W.; Heber, D. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004. 6. 80. 1558–1564.
- Henning, S. M.; Niu, Y.; Liu, Y.; Lee, N. H.; Hara, Y.; Thames, G. D.; Minutti, R. R.; Carpenter, C. L.; Wang, H.; Heber, D. Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2005. 10. 16. 610–616.
- Higdon, J. V.; Frei, B. Tea Catechins and Polyphenols: Health Effects, Metabolism, and Antioxidant Functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2003. 43. 1. 89–143.

- Hollman, P. C. H.; Arts, I. C. W. Flavonols, flavones and flavanols - Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000. 7. 80. 1081–1093.
- Hollman, P. C. H.; Katan, M. B. Absorption, Metabolism, and Bioavailability of Flavonoids. In: Rice-Evans, C. A.; Packer, L. *Flavonoids in Health and Disease*. New York: Marcel Decker, Inc., 1998. 483–522.
- Hollman, P. C. H.; van Trijp, J. M. P.; Buysman, M. N. C. P.; V. d.Gaag, M. S.; Mengelers, M. J. B.; Vries, J. H. M. de; Katan, M. B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*. 1997. 1-2. 418. 152–156.
- Hollman, P. C. H.; Vries, J. H. M. de; van Leeuwen, S. D.; Mengelers, M. J. B.; Katan, M. B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1995. 6. 62. 1276–1282.
- Huang, C.; Chen, Y.; Zhou, T.; Chen, G. Sulfation of dietary flavonoids by human sulfotransferases. *Xenobiotica*. 2009. 4. 39. 312–322.
- Huang, D.; Boxin, O. U.; Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005. 6. 53. 1841–1856.
- Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J. A.; Deemer, E. K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. 7. 50. 1815–1821.
- Huang, M.; Du Plessis, J.; Du Preez, J.; Hamman, J.; Viljoen, A. Transport of aspalathin, a rooibos tea flavonoid, across the skin and intestinal epithelium. *Phytotherapy Research*. 2008. 5. 22. 699–704.
- Iswaldi, I.; ArrÃ©ez-RomÃ©n, D.; RodrÃ©guez-Medina, I.; BeltrÃ©n-DeBÃ©n, R.; Joven, J.; Segura-Carretero, A.; FernÃ©ndez-GutiÃ©rrez, A. Identification of phenolic compounds in aqueous and ethanolic rooibos extracts (*Aspalathus linearis*) by HPLC-ESI-MS (TOF/IT). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011. 10. 400. 3643–3654.
- Iwashina, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*. 2000. 111. 113. 287–299.
- Izumi, T.; Piskula, M. K.; Osawa, S.; Obata, A.; Tobe, K.; Saito, M.; Kataoka, S.; Kubota, Y.; Kikuchi, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *Journal of Nutrition*. 2000. 7. 130. 1695–1699.
- Jaganath, I. B.; Mullen, W.; Edwards, C. A.; Crozier, A. The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Radical Research*. 2006. 10. 40. 1035–1046.
- Joubert, E. HPLC quantification of the dihydrochalcones, aspalathin and nothofagin in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by processing. *Food Chemistry*. 1996. 4. 55. 403–411.
- Joubert, E.; Gelderblom, W. C. A.; Beer, D. de. Phenolic Contribution of South African Herbal Teas to a Healthy Diet. *Natural Product Communications*. 2009. 5. 4. 701–718.

- Joubert, E.; Gelderblom, W. C. A.; Louw, A.; Beer, D. de. South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia* spp. and *Athrixia phylicoides*-A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008 a. 3. 119. 376–412.
- Joubert, E.; Richards, E. S.; van der Merwe, J. D.; Beer, D. de; Manley, M.; Gelderblom, W. C. A. Effect of species variation and processing on phenolic composition and in vitro antioxidant activity of aqueous extracts of *Cyclopia* spp. (honeybush tea). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008b. 3. 56. 954–963.
- Joubert, E.; Schulz, H. Production and quality aspects of rooibos tea and related products. A review. *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 2006. 2. 80. 138–144.
- Joubert, E.; Winterton, P.; Britz, T. J.; Ferreira, D. Superoxide anion and α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl radical scavenging capacity of rooibos (*Aspalathus linearis*) aqueous extracts, crude phenolic fractions, tannin and flavonoids. *Food Research International*. 2004. 2. 37. 133–138.
- Joubert, E.; Winterton, P.; Britz, T. J.; Gelderblom, W. C. A. Antioxidant and pro-oxidant activities of aqueous extracts and crude polyphenolic fractions of rooibos (*Aspalathus linearis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005. 26. 53. 10260–10267.
- Kano, M.; Takayanagi, T.; Harada, K.; Sawada, S.; Ishikawa, F. Bioavailability of isoflavones after ingestion of soy beverages in healthy adults. *Journal of Nutrition*. 2006. 9. 136. 2291–2296.
- Kimura, M.; Umegaki, K.; Kasuya, Y.; Sugisawa, A.; Higuchi, M. The relation between single/double or repeated tea catechin ingestions and plasma antioxidant activity in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2002. 12. 56. 1186–1193.
- Klein, E.; Lukes, V. DFT/B3LYP study of the substituent effect on the reaction enthalpies of the individual steps of sequential proton loss electron transfer mechanism of phenols antioxidant action: Correlation with phenolic C-O bond length. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. 2007. 1-3. 805. 153–160.
- Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Järvinen, R.; Rissanen, H.; Heliövaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T.; Aromaa, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2002. 3. 76. 560–568.
- Koster, H.; Halsema, I.; Scholtens, E. Dose-dependent shifts in the sulfation and glucuronidation of phenolic compounds in the rat in vivo and in isolated hepatocytes. The role of saturation of phenolsulfotransferase. *Biochemical Pharmacology*. 1981. 18. 30. 2569–2575.
- Kotra, G.; Daniel, H. Flavonoid glycosides are not transported by the human Na⁺/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007. 2. 322. 829–835.
- Kozłowski, D.; Trouillas, P.; Calliste, C.; Marsal, P.; Lazzaroni, R.; Duroux, J. -L. Density functional theory study of the conformational, electronic, and antioxidant properties of natural chalcones. *Journal of Physical Chemistry A*. 2007. 6. 111. 1138–1145.
- Krafczyk, N.; Woyand, F.; Glomb, M. A. Structure-antioxidant relationship of flavonoids from fermented rooibos. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2009. 5. 53. 635–642.

- Kreuz, S.; Joubert, E.; Waldmann, K. -H; Ternes, W. Aspalathin, a flavonoid in *Aspalathus linearis* (rooibos), is absorbed by pig intestine as a C-glycoside. *Nutrition Research*. 2008. 10. 28. 690–701.
- Kuhnle, G.; Spencer, J. P. E.; Schroeter, H.; Shenoy, B.; Debnam, E. S.; Srail, S. K. S.; Rice-Evans, C.; Hahn, U. Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000. 2. 277. 507–512.
- Lambert, J. D.; Sang, S.; Lu, A. Y. H.; Yang, C. S. Metabolism of dietary polyphenols and possible interactions with drugs. *Current Drug Metabolism*. 2007A. 5. 8. 499–507.
- Lambert, J. D.; Sang, S.; Yang, C. S. Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. 2007B. *Molecular Pharmaceutics*. 4. 6. 819–825.
- Lambert, N.; Kroon, P. A.; Faulds, C. B.; Plumb, G. W.; McLauchlan, W. R.; Day, A. J.; Williamson, G. Purification of cytosolic β -glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glycosides. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1999. 1-2. 1435. 110–116.
- Langley-Evans, S. C. Consumption of black tea elicits an increase in plasma antioxidant potential in humans. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2000. 5. 51. 309–315.
- Laue, C. Flavonoide im Rooibos (*Aspalathus linearis*) - Bestimmung, Nutrikinetik, Veränderung bei Extraktion und Lagerung. Cuvillier Verlag. 2011
- Lee, M. -J; Maliakal, P.; Chen, L.; Meng, X.; Bondoc, F. Y.; Prabhu, S.; Lambert, G.; Mohr, S.; Yang, C. S. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: Formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2002. 10 I. 11. 1025–1032.
- Leenen, R.; Roodenburg, A. J. C.; Tijburg, L. B. M.; Wiseman, S. A. A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2000. 1. 54. 87–92.
- Lehtonen, H. -M; Lehtinen, O.; Suomela, J. -P; Viitanen, M.; Kallio, H. Flavonol glycosides of sea buckthorn (*hippophæ rhamnoides* ssp. *sinensis*) and lingonberry (*vaccinium vitis-idaea*) are bioavailable in humans and monoglucuronidated for excretion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. 1. 58. 620–627.
- Lemańska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zieliński, R.; Soffers, A. E. M. F.; Rietjens, I. M. C. M. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001. 7. 31. 869–881.
- Litwinienko, G.; Ingold, K. U. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 3. Novel kinetics in sequential proton loss electron transfer chemistry. *Journal of Organic Chemistry*. 2005. 22. 70. 8982–8990.
- Liu, Y.; Liu, Y.; Dai, Y.; Xun, L.; Hu, M. Enteric Disposition and Recycling of Flavonoids and Ginkgo Flavonoids. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 2003. 5. 9. 631–640.
- Liu, Z.; Hu, M. Natural polyphenol disposition via coupled metabolic pathways. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 2007. 3. 3. 389–406.

Lussignoli, S.; Fraccaroli, M.; Andrioli, G.; Brocco, G.; Bellavite, P. A microplate-based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma. *Analytical Biochemistry*. 1999. 1. 269. 38–44.

Ma, G.; Jiang, X. -H; Chen, Z.; Ren, J.; Li, C. -R; Liu, T. -M. Simultaneous determination of vitexin-4''-O-glucoside and vitexin-2''-O-rhamnoside from hawthorn leaves flavonoids in rat plasma by HPLC method and its application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007. 1. 44. 243–249.

MacDonald-Wicks, L. K.; Wood, L. G.; Garg, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006. 13. 86. 2046–2056.

Magalhães, L. M.; Segundo, M. A.; Reis, S.; Lima, J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*. 2008. 1. 613. 1–19.

Manach, C.; Donovan, J. L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Research*. 2004. 8. 38. 771–785.

Manach, C.; Morand, C.; Crespy, V.; Demigne, C.; Texier, O.; Regeat, F.; Ramasy, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Letters*. 1998. 3. 426. 331–336.

Manach, C.; Morand, C.; Gil-Izquierdo, A.; Bouteloup-Demange, C.; Ramasy, C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two dose of orange juice. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2003. 2. 57. 235–242.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Remesy, C.; Jimenez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004. 5. 79. 727–747.

Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Ramasy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*. 2005. 1 Suppl. 81.

Marais, J. P. J.; Deavours, B.; Dixon, R. A. The Stereochemistry of Flavonoids. In: Grotewald, E. *The Science of Flavonoids*. New York: Springer Science & Business Media, Inc., 2006. 1–46.

Marks, S. C.; Mullen, W.; Borges, G.; Crozier, A. Absorption, metabolism, and excretion of cider dihydrochalcones in healthy humans and subjects with an ileostomy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. 5. 57. 2009–2015.

Marnewick, J. L.; Joubert, E.; Swart, P.; Der Westhuizen, F. V.; Gelderblom, W. C. Modulation of Hepatic Drug Metabolizing Enzymes and Oxidative Status by Rooibos (*Aspalathus linearis*) and Honeybush (*Cyclopia intermedia*), Green and Black (*Camellia sinensis*) Teas in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. 27. 51. 8113–8119.

Marnewick, J. L.; Rautenbach, F.; Venter, I.; Neethling, H.; Blackhurst, D. M.; Wolmarans, P.; MacHaria, M. Effects of rooibos (*Aspalathus linearis*) on oxidative stress and biochemical parameters in adults at risk for cardiovascular disease. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011. 1. 133. 46–52.

Maron, D. J. Flavonoids for reduction of atherosclerotic risk. *Current Atherosclerosis Reports*. 2004. 1. 6. 73–78.

- McKay, D. L.; Blumberg, J. B. A review of the bioactivity of South African herbal teas: Rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*). *Phytotherapy Research*. 2007. 1. 21. 1–16.
- Meng, X.; Maliakal, P.; Lu, H.; Lee, M. -J; Yang, C. S. Urinary and Plasma Levels of Resveratrol and Quercetin in Humans, Mice, and Rats after Ingestion of Pure Compounds and Grape Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004. 4. 52. 935–942.
- Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. 1993. 4. 84. 407–412.
- Mullen, W.; Edwards, C. A.; Crozier, A. Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *British Journal of Nutrition*. 2006. 1. 96. 107–116.
- Musialik, M.; Kuzmicz, R.; Pawlowski, T. S.; Litwinienko, G. Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *Journal of Organic Chemistry*. 2009. 7. 74. 2699–2709.
- Naguib, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000. 4. 48. 1150–1154.
- Nemeth, K.; Piskula, M. K. Food content, processing, absorption and metabolism of onion flavonoids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2007. 4. 47. 397–409.
- Nemeth, K.; Plumb, G. W.; Berrin, J. -G; Juge, N.; Jacob, R.; Naim, H. Y.; Williamson, G.; Swallow, D. M.; Kroon, P. A. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition*. 2003. 1. 42. 29–42.
- Niazi, S. K. *Handbook of Bioequivalence Testing*. New York: Informa Healthcare USA, 2007
- Nikolova, V.; Petrova, S.; Petkova, V.; Pavlova, A.; Georgieva, T. Antioxidant effects of rooibos tea on workers occupationally exposed to lead. *Toxicology Letters*. 172(S). 120–121.
- O'Leary, K. A.; Day, A. J.; Needs, P. W.; Mellon, F. A.; O'Brien, N. M.; Williamson, G. Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: The role of human β -glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochemical Pharmacology*. 2003. 3. 65. 479–491.
- Olthof, M. R.; Hollman, P. C. H.; Buijsman, M. N. C. P.; van Amelsvoort, J. M. M.; Katan, M. B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *Journal of Nutrition*. 2003. 6. 133. 1806–1814.
- Olthof, M. R.; Hollman, P. C. H.; Vree, T. B.; Katan, M. B. Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *Journal of Nutrition*. 2000. 5. 130. 1200–1203.
- Olympus Life and Material Science Europa GmbH. GGT. Olympus Life and Material Science Europa GmbH, Hamburg. 2007 a.
- Olympus Life and Material Science Europa GmbH. AST. Olympus Life and Material Science Europa GmbH, Hamburg. 2007 b.

Olympus Life and Material Science Europa GmbH. ALT. Olympus Life and Material Science Europa GmbH, Hamburg. 2007 c.

Olympus Life and Material Science Europa GmbH. ALP. Olympus Life and Material Science Europa GmbH, Hamburg. 2007 d.

Olympus Life and Material Science Europa GmbH. Billirubin. Olympus Life and Material Science Europa GmbH, Hamburg. 2007 e.

Olympus Life and Material Science Europa GmbH. Triglyceride. Olympus Life and Material Science Europa GmbH, Hamburg. 2007 f.

Olympus Life and Material Science Europa GmbH. LDL-Cholesterol. Olympus Life and Material Science Europa GmbH, Hamburg. 2007 g.

Olympus Life and Material Science Europa GmbH. HDL-Cholesterol. Olympus Life and Material Science Europa GmbH, Hamburg. 2007 h.

Olympus Life and Material Science Europa GmbH. Harnsäure. Olympus Life and Material Science Europa GmbH, Hamburg. 2007 i.

Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. 10. 49. 4619–4626.

Pellet, P.L. Food Energy Requirements in Humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1990. 5. 51. 711–722.

Petri, N.; Tannergren, C.; Holst, B.; Mellon, F. A.; Bao, Y.; Plumb, G. W.; Bacon, J.; O'Leary, K. A.; Kroon, P. A.; Knutson, L.; Forsell, P.; Eriksson, T.; Lennernas, H.; Williamson, G. Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *Drug Metabolism and Disposition*. 2003. 6. 31. 805–813.

Pietta, P.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Brusamolino, A.; Morazzoni, P.; Bombardelli, E. Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant status. *Biochemistry and Molecular Biology International*. 1998. 5. 46. 895–903.

Pietta, P. -G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000. 7. 63. 1035–1042.

Piskula, M. K.; Terao, J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *Journal of Nutrition*. 1998. 7. 128. 1172–1178.

Piskula, M. K.; Yamakoshi, J.; Iwai, Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Letters*. 1999. 2-3. 447. 287–291.

Possemiers, S.; Bolca, S.; Verstraete, W.; Heyerick, A. The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia*. 2011. 1. 82. 53–66.

Prasain, J. K.; Jones, K.; Brissie, N.; Moore, R.; Wyss, J. M.; Barnes, S. Identification of puerarin and its metabolites in rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004. 12. 52. 3708–3712.

- Prior, R. L.; Cao, G. Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: Implications for altering in vivo antioxidant status. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1999. 4. 220. 255–261.
- Prior, R. L.; Gu, L.; Wu, X.; Jacob, R. A.; Sotoudeh, G.; Kader, A. A.; Cook, R. A. Plasma antioxidant capacity changes following a meal as a measure of the ability of a food to alter in vivo antioxidant status. *Journal of the American College of Nutrition*. 2007. 2. 26. 170–181.
- Prior, R. L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003. 11. 51. 3273–3279.
- Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005. 10. 53. 4290–4302.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. 9-10. 26. 1231–1237.
- Rechner, A. R.; Kuhnle, G.; Bremner, P.; Hubbard, G. P.; Moore, K. P.; Rice-Evans, C. A. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002. 2. 33. 220–235.
- Rechner, A. R.; Smith, M. A.; Kuhnle, G.; Gibson, G. R.; Debnam, E. S.; Srail, S. K. S.; Moore, K. P.; Rice-Evans, C. A. Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004. 2. 36. 212–225.
- Rezk, B. M.; Haenen, G. R. M. M.; van der Vijgh, W. J. F.; Bast, A. The antioxidant activity of phloretin: The disclosure of a new antioxidant pharmacophore in flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002. 1. 295. 9–13.
- Rice-Evans, C. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*. 2001. 7. 8. 797–807.
- Rice-Evans, C.; Spencer, J. P. E.; Schroeter, H.; Rechner, A. R. Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms in vivo. *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 2000. 1-4. 17. 291–310.
- Rice-Evans, C. A. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: Procedures and limitations. *Free Radical Research*. 2000. SUPPL. 33. S59-S66.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Isoflavonoids. In: Rice-Evans, C. A.; Packer, L. *Flavonoids in Health and Disease*. New York: Marcel Decker, Inc., 1998. 199–219.
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996. 7. 20. 933–956.
- Ross, J. A.; Kasum, C. M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*. 2002. 22. 19–34.
- Sanugul, K.; Akao, T.; Li, Y.; Kakiuchi, N.; Nakamura, N.; Hattori, M. Isolation of a human intestinal bacterium that transforms mangiferin to norathyriol and inducibility of the enzyme

that cleaves a C-glucosyl bond. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005. 9. 28. 1672–1678.

Sauter, W. Vergleich antioxidativer Eigenschaften von Extrakten aus *Camellia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Cyclopia genistoides*, *Cyclopia sessiliflora* und *Aspalathus linearis* (Dissertation). München: Technische Universität München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. 2004.

Sawai, Y.; Kohsaka, K.; Nishiyama, Y.; Ando, K. Serum concentrations of rutoside metabolites after oral administration of a rutoside formulation to humans. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*. 1987. 6. 37. 729–732.

Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*. 2000. 8 SUPPL. 130.

Schneider, H.; Blaut, M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. *Archives of Microbiology*. 2000. 1. 173. 71–75.

Schulz, H.; Joubert, E.; Schütze, W. Quantification of quality parameters for reliable evaluation of green rooibos (*Aspalathus linearis*). *European Food Research and Technology*. 2003. 6. 216. 539–543.

Serafini, M.; Laranjinha, J. A. N.; Almeida, L. M.; Maiani, G. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2000. 11-12. 11. 585–590.

Setchell, K. D. R.; Brown, N. M.; Desai, P.; Zimmer-Nechemias, L.; Wolfe, B. E.; Brashear, W. T.; Kirschner, A. S.; Cassidy, A.; Heubi, J. E. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *Journal of Nutrition*. 2001. 4 SUPPL. 131.

Sfakianos, J.; Coward, L.; Kirk, M.; Barnes, S. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *Journal of Nutrition*. 1997. 7. 127. 1260–1268.

Shackelford, R. E.; Kaufmann, W. K.; Paules, R. S. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000. 9. 28. 1387–1404.

Shelnutt, S. R.; Cimino, C. O.; Wiggins, P. A.; Ronis, M. J. J.; Badger, T. M.

Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2002. 3. 76. 588–594.

Silva, M. M.; Santos, M. R.; Carço, G.; Rocha, R.; Justino, G.; Mira, L. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: A re-examination. *Free Radical Research*. 2002. 11. 36. 1219–1227.

Sinjman, P. W.; Joubert, E.; Ferreira, D.; Li, X. -C; Ding, Y.; Green, I. R.; Gelderblom, W. C. A. Antioxidant activity of the dihydrochalcones aspalathin and nothofagin and their corresponding flavones in relation to other rooibos (*Aspalathus linearis*) flavonoids, epigallocatechin gallate, and Trolox. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009. 15. 57. 6678–6684.

So, A.; Thorens, B. Uric acid transport and disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2010. 6. 120. 1791–1799.

- Spencer, J. P. E. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *Journal of Nutrition*. 2003. 10. 133. 3255S-3261S.
- Spencer, J. P. E.; Chowrimootoo, G.; Choudhury, R.; Debnam, E. S.; Srari, S. K.; Rice-Evans, C. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Letters*. 1999. 2. 458. 224–230.
- Spencer, J. P. E.; Rice-Evans, C. A. Metabolism in the Small Intestine and Gastrointestinal Tract. In: Rice-Evans, C. A.; Packer, L. *Flavonoids in Health and Disease*. New York: Marcel Decker, Inc., 2003. 363–389.
- Stalmach, A.; Mullen, W.; Pecorari, M.; Serafini, M.; Crozier, A. Bioavailability of C-linked dihydrochalcone and flavanone glucosides in humans following ingestion of unfermented and fermented rooibos teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009A. 15. 57. 7104–7111.
- Stalmach, A.; Mullen, W.; Steiling, H.; Williamson, G.; Lean, M. E. J.; Crozier, A. Absorption, metabolism, and excretion of green tea flavan-3-ols in humans with an ileostomy. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2010. 3. 54. 323–334.
- Stalmach, A.; Troufflard, S.; Serafini, M.; Crozier, A. Absorption, metabolism and excretion of Choldi green tea flavan-3-ols by humans. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2009B. SUPPL. 1. 53. S44-S53.
- Standley, L.; Winterton, P.; Marnewick, J. L.; Gelderblom, W. C. A.; Joubert, E.; Britz, T. J. Influence of processing stages on antimutagenic and antioxidant potentials of rooibos tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. 1. 49. 114–117.
- Sung, H.; Nah, J.; Chun, S.; Park, H.; Yang, S. E.; Min, W. K. In vivo antioxidant effect of green tea. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2000. 7. 54. 527–529.
- Tomás-Barberán, F. A.; Clifford, M. N. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2000. 7. 80. 1073–1080.
- Trouillas, P.; Marsal, P.; Siri, D.; Lazzaroni, R.; Duroux, J. -L. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chemistry*. 2006. 4. 97. 679–688.
- Vaidyanathan, J. B.; Walle, T. Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid (-)-Epicatechin by the human and rat enzymes. *Drug Metabolism and Disposition*. 2002. 8. 30. 897–903.
- Vaidyanathan, J. B.; Walle, T. Cellular Uptake and Efflux of the Tea Flavonoid (-)-Epicatechin-3-gallate in the Human Intestinal Cell Line Caco-2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003. 2. 307. 745–752.
- van Acker, S. A. B. E.; Bast, A.; van der Vijgh, W. J. F. Structural Aspects of Antioxidant Activity of Flavonoids. In: Rice-Evans, C. A.; Packer, L. *Flavonoids in Health and Disease*. New York: Marcel Decker, Inc., 1998. 221–251.
- van Acker, S. A. B. E.; Groot, M. J. de; van Berg, D. -J D.; Tromp, M. N. J. L.; Kelder, G. D. -O D.; van der Vijgh, W. J. F.; Bast, A. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chemical Research in Toxicology*. 1996. 8. 9. 1305–1312.

van der Merwe, J. D.; Joubert, E.; Manley, M.; Beer, D. de; Malherbe, C. J.; Gelderblom, W. C. A. In vitro hepatic biotransformation of aspalathin and nothofagin, dihydrochalcones of rooibos (*Aspalathus linearis*), and assessment of metabolite antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. 4. 58. 2214–2220.

Veitch, N. C.; Grayer, R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Natural Product Reports*. 2008. 3. 25. 555–611.

Villaño, D.; Pecorari, M.; Testa, M. F.; Raguzzini, A.; Stalmach, A.; Crozier, A.; Tubili, C.; Serafini, M. Unfermented and fermented rooibos teas (*Aspalathus linearis*) increase plasma total antioxidant capacity in healthy humans. *Food Chemistry*. 2010. 3. 123. 679–683.

Walgren, R. A.; Lin, J. -T; Kinne, R. K. -H; Walle, T. Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'- β -glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1^{sup1/sup}. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2000. 3. 294. 837–843.

Walle, T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004. 7. 36. 829–837.

Walle, T.; Browning, A. M.; Steed, L. L.; Reed, S. G.; Walle, U. K. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *Journal of Nutrition*. 2005. 1. 135. 48–52.

Walle, T.; Otake, Y.; Brubaker, J. A.; Walle, U. K.; Halushka, P. V. Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2001. 2. 51. 143–146.

Walle, U. K.; French, K. L.; Walgren, R. A.; Walle, T. Transport of genistein-7-glucoside by human intestinal Caco-2 cells: Potential role for MRP2. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*. 1999b. 1. 103. 45–56.

Walle, U. K.; Galijatovic, A.; Walle, T. Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochemical Pharmacology*. 1999a. 3. 58. 431–438.

Watzl, B.; Leitzmann, C. (2005): *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Stuttgart: Hippokrates Verlag.

Watzl, B.; Rechkemmer, G. Flavonoide. *Ernährungs-Umschau*. 2001. 12. 48. 498–502.

Welling, P. G. *Pharmacokinetics. Processes and Mathematics*. Washington, DC: American Chemical Society. 1986

Williamson, G.; Clifford, M. N. Colonic metabolites of berry polyphenols: The missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*. 2010. SUPPL.3. 104. S48-S66.

Winter, J.; Moore, L. H.; Dowell, V. R., JR.; Bokkenheuser, V. D. C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989. 5. 55. 1203–1208.

Wirtschaftsvereinigung Kräuter- und Fruchttetee e.V. Marktberichte 2003-2011. <http://www.wkf.de/article/archive/6>.

Wolffram, S.; Blöck, M.; Ader, P. Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *Journal of Nutrition*. 2002. 4. 132. 630–635.

Wood, L. G.; Gibson, P. G.; Garg, M. L. A review of the methodology for assessing in vivo antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2006. 13. 86. 2057–2066.

Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*. 2001. 6. 123. 1173–1183.

Yokus, B.; Mete, N.; Cakir, U. D.; Toprak, G. Effects of active and passive smoking on antioxidant enzymes and antioxidant micronutrients. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 2005. 3. 19. 117–123.

Zhang, L.; Zuo, Z.; Lin, G. Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. *Molecular Pharmaceutics*. 2007b. 6. 4. 833–845.

Zhang, Y.; Tie, X.; Bao, B.; Wu, X.; Zhang, Y. Metabolism of flavone C-glucosides and p-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats. *British Journal of Nutrition*. 2007a. 3. 97. 484–494.

8 Anhang

Inhaltsverzeichnis

A 1 Studienunterlagen	129
A 1.1 Informed Consent	129
A 1.1.1. Informed Consent, Datenschutz und Einwilligungserklärung	129
A 1.1.2 CRF-Screening	136
A 1.1.3 CRF-Intervention (t1)	143
A 1.1.4 CRF-Intervention (t2, t3)	147
A 1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	151
A 1.3 Zusammensetzung der Kost	152
A 2 Versuchsbeschreibungen	153
A 2.1 Bioverfügbarkeitsanalysen	153
A 2.1.1 Plasmaaufarbeitung	153
A 2.1.2 Urinaufarbeitung	153
A 2.1.2 Messungen	154
A 2.2 Leberwerte	155
A 2.3 Lipidwerte	156
A 2.4 Harnsäure	157
A 2.5 Durchführung ORAC-Assay	157
A 2.5.1 Geräte und Chemikalien	158
A 2.5.2 Herstellung der Reaktionslösungen	159
A 2.5.2.1 Herstellung Probelösungen	160
A 2.6 Durchführung FRAP Assay	161
A 2.6.1 Geräte und Chemikalien	161
A 2.6.2 Herstellung der Reaktionslösungen	162
A 2.6.2.1 Herstellung Probelösungen	163
A 3 Ergebnisse	164
A 3.1 Ergebnisse ORAC	164
A.3.2 Ergebnisse FRAP	165

A 1 Studienunterlagen

A 1.1 Informed Consent

A 1.1.1. Informed Consent, Datenschutz und Einwilligungserklärung

Information für Studienteilnehmer

Sehr geehrter Studienteilnehmer,
wir freuen uns, dass Sie sich für eine Teilnahme an unserer Ernährungsstudie interessieren. Dies ist wichtig, da ohne die Bereitschaft von Freiwilligen keine neuen Erkenntnisse über die Wirkung von Nahrungsinhaltsstoffen auf die Gesunderhaltung gewonnen werden können. In der geplanten Studie mit dem Titel

„Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus xxx in Plasma und Urin nach einmaliger Verabreichung“

soll bei freiwilligen Probanden untersucht werden, in welchem Umfang die Aufnahme von Rooibos-Fertiggetränken Einfluss auf die antioxidative Kapazität des Plasmas hat. Kräuter- und Früchtetees haben z. T. hohe Gehalte an Flavonoiden. Für die Gruppe der Flavonoide wurden eine Reihe von gesundheitsfördernden Wirkungen beschrieben: u. a. antioxidative, entzündungshemmende, gerinnungshemmende, das Immunsystem modulierende und antimikrobielle Eigenschaften. Deshalb werden Flavonoide, bzw. flavonoidhaltige Lebensmittel, als protektiv im Hinblick auf degenerative Erkrankungen beim Menschen betrachtet.

Ziel dieser Untersuchung ist es, den Einfluss der Lagerdauer eines Rooibos-Fertigproduktes auf die Bioverfügbarkeit und die Lagerstabilität der enthaltenen Flavonoide zu untersuchen. Zusätzlich soll die antioxidative Kapazität der verschiedenen flavonoidhaltigen Prüfprodukte im Plasma und im Urin erfasst werden.

Diese Untersuchung wird unter Berücksichtigung aller ethischen, rechtlichen und wissenschaftlichen Anforderungen durchgeführt, die in der Europäischen Gemeinschaft für Studien gelten. Der Leiter der Studie, Prof. Dr. A. Hahn, übernimmt die Verantwortung für die ordnungsgemäße Durchführung der Untersuchung.

Die vorliegende Information für Studienteilnehmer unterrichtet Sie über das Ziel und den Ablauf dieser Untersuchung. Ihr Studienbetreuer beantwortet Ihnen gerne alle Fragen, die Sie zu den nachfolgenden Informationen möglicherweise haben.

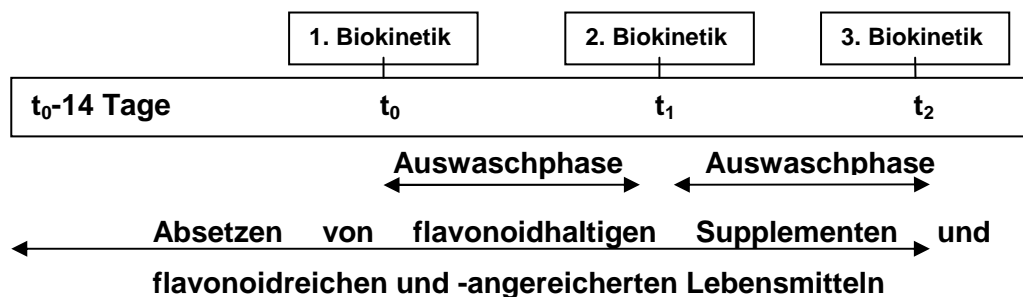
Studiendurchführung

Aus diesen Untersuchungen soll eine Aussage über die Höhe der Resorption von Flavonoiden aus Rooibos-Fertiggetränken abgeleitet werden können.

Die Studie wird an der Leibniz Universität Hannover im Institut für Lebensmittelwissenschaft und Ökotrophologie durchgeführt und umfasst insgesamt einen Zeitraum von vier Wochen. Die Studie beginnt mit einer 14-tägigen Vorlaufphase (Depletionsphase), an die sich drei Untersuchungstage anschließen. Die eigentlichen Untersuchungen finden jeweils im Abstand von einer Woche statt. An jedem der Untersuchungstage erhalten Sie eines der Prüfprodukte, d.h. entweder eines der beiden Rooibos-Fertiggetränke oder ein Plazebo (Trinkwasser). Damit nehmen Sie jedes zu prüfende Produkt einmal ein.

Die Teilnahme an der Untersuchung erfordert zudem, dass Sie jeweils **zwei Wochen vor Studienbeginn** und auch **während des gesamten Untersuchungszeitraums** (also insgesamt über einen Zeitraum von vier Wochen) auf flavonoidhaltige Nahrungsergänzungsmittel und flavonoidreiche bzw. -angereicherte Lebensmittel verzichten. In der beiliegenden Liste finden Sie eine Übersicht über Lebensmittel mit einem hohen Gehalt an Flavonoiden, die Sie bitte meiden sollen. Auf den Verzehr antioxidanzienhaltiger Supplemente (Vitamin E, Vitamin C, Vitamin A, β -Karotin, Lycopin, Selen, Zink, etc.) sollten Sie in diesem Zeitraum ebenfalls verzichten.

Nachfolgend finden Sie eine Übersichtsskizze zum **Untersuchungsablauf**:



Studienablauf

An den jeweiligen **Blutentnahmetagen** (die Termine werden Ihnen schriftlich mitgeteilt) bitten wir Sie, **nüchtern** im Institut zu erscheinen. Nüchtern bedeutet, dass Sie morgens lediglich 1 kleines Glas Wasser trinken dürfen und abends zuvor nach 20 Uhr nichts mehr essen und ebenfalls nur noch wenig Wasser trinken sollten. Zunächst erfolgt die Sammlung einer Urinprobe und anschließend wird Ihnen nüchtern Blut abgenommen. Im Anschluss daran erhalten Sie ein standardisiertes Frühstück (ca. 150- 250 g Weißbrot) und 500 ml des entsprechenden Getränkes, d.h. des Prüfproduktes oder des Plazebogetränks. Die weiteren Blutabnahmen erfolgen 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5 und 8 Stunden nach dem Konsum der

Prüfprodukte. Die weiteren Urinproben werden von Ihnen in folgenden Intervallen gesammelt: 0-2 h, 2-4 h, 4-6 h, 6-8 h und 8-24 h. Die dafür vorgesehen Behältnisse werden Ihnen von uns zur Verfügung gestellt.

Im Laufe des Untersuchungstages dürfen Sie nur die von uns zur Verfügung gestellten Lebensmittel bzw. Mahlzeiten (Wasser, Weißbrot, Nudeln) verzehren.

Bei jeder Blutabnahme werden nur **ca. 20 ml Blut**, insgesamt also 160 ml Blut, abgenommen. Im Vergleich zu etwa 500 ml, die üblicherweise bei einer Blutspende entnommen werden, handelt es sich also um eine vergleichsweise geringe Menge.

Ausschlusskriterien und Vorsichtsmaßnahmen

In die Studie können nur gesunde Männer im Alter zwischen 18-40 Jahren eingeschlossen werden, die einen BMI zwischen 20 – 27 kg/m² aufweisen. Frauen sind von der Studie ausgeschlossen, da der Stoffwechsel von Flavonoiden durch die Hormonspiegel beeinflusst werden kann. Personen mit Erkrankungen des Verdauungstraktes, mit Zuständen nach operativen Eingriffen am Verdauungstrakt, mit ernsthaften Verdauungsproblemen sowie mit schwerwiegenden chronischen Erkrankungen können an der Studie nicht teilnehmen. Weitere Ausschlusskriterien sind bekannte Allergien oder Unverträglichkeit gegen einen der Inhaltsstoffe der Prüfprodukte, Zigarettenrauchen, Alkohol- und Drogenabhängigkeit. Auch bei Verwendung von Abführmitteln ist eine Teilnahme nicht möglich. Ausgeschlossen von der Studie sind außerdem Personen mit Blutgerinnungsstörungen sowie solche, die gerinnungshemmende Medikamente (z. B. Marcumar[®]) einnehmen.

Mit Ausnahme der Einschränkungen hinsichtlich des Verzehrs der flavonoid- bzw. antioxidanzienreichen Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel sollten Sie keine gravierenden Änderungen in Ihren Ernährungs- und Lebensgewohnheiten während des gesamten vierwöchigen Studienzeitraums (zwei Wochen vor dem ersten Untersuchungstag und während der zweiwöchigen Interventionsphase) vornehmen, z. B. keine Diäten beginnen.

Studienbeendigung

Die Teilnahme an dieser Untersuchung ist **freiwillig**. Sie können Ihre Teilnahme zu jedem Zeitpunkt der klinischen Prüfung ohne Angabe von Gründen widerrufen. Die Studie kann auch vom Leiter der Untersuchung jederzeit unter Abwägung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses unterbrochen und beendet werden.

Risiken und Nebenwirkungen

Von den verabreichten Prüfprodukten sind **keine Risiken und Nebenwirkungen** zu erwarten, da es sich um Zubereitungen aus natürlichem, handelsüblichen Rooibos- bzw. Holunderblütentee handelt. Die Blutentnahme erfolgt durch einen approbierten Arzt. Hierbei können die üblichen, mit dem Einstich verbundenen Risiken (z.B. blaue Flecken) auftreten.

Sollten während des Studienzeitraumes gesundheitliche Probleme auftreten – unabhängig davon, ob sie im Zusammenhang mit der Studiendurchführung stehen – bitten wir Sie, uns darüber in Kenntnis zu setzen.

Notfalladresse bei unerwünschten Ereignissen während der Studie sowie Name und Adresse der Prüfperson:

Dipl.-Berufspäd. Till Breiter
Leibniz Universität Hannover
Institut für Lebensmittelwissenschaft und Ökotrophologie
Am Kleinen Felde 30
30167 Hannover
Tel.: 0511-762 5430
Mobil.:0176-62571653
Breiter@nutrition.uni-hannover.de

Probandenhonorar

Jeder Studienteilnehmer erhält einmalig xxx bei erfolgreicher Teilnahme an allen drei Terminen.

Bestimmungen zum Datenschutz

Der ordnungsgemäße Ablauf einer Studie schließt den Schutz persönlicher Daten ein. Dementsprechend werden Unterlagen mit persönlichen Daten verschlossen aufbewahrt und die Untersuchungsdaten werden durch die Vergabe von Probandennummern pseudonymisiert. Der abschließende Studienbericht enthält nur die pseudonymisierten Studiendaten.

Falls Sie noch Fragen haben, können Sie uns jederzeit gern anrufen oder diese während der Untersuchungstermine persönlich mit uns abklären!

Bitte meiden Sie während des vierwöchigen Studienzeitraumes folgende Lebensmittel

Gemüse

Grünkohl

Brokkoli

Grüne Bohnen

Sellerie

Aubergine

Zwiebel

Tomaten

Obst

Apfel

Zitrusfrüchte (Apfelsinen, Grapefruit, Zitronen, etc.)

Beerenfrüchte

Aronia

Holunderbeeren

Schwarze Johannisbeeren

Rote Trauben

Aprikosen

Süßigkeiten

Schokolade

Getränke

Rotwein

Grüner Tee

Schwarzer Tee

Rooibostee

Früchtetee

Kaffee

Kakao

Fruchtsäfte

Johannisbeersaft

Holunderbeersaft

Apfelsinensaft

Roter Traubensaft

Grapefruitsaft

Datenschutzerklärung

zur Teilnahme an der ernährungsphysiologischen Studie:

„Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus xxx in Plasma und Urin nach einmaliger Verabreichung“

Name, Vorname:

Geburtsdatum:

Adresse:

Im Rahmen der ernährungsphysiologischen Studie werden Ihre Daten einschließlich der Daten über Geschlecht, Alter, Gewicht und Körpergröße pseudonymisiert (d. h. ohne Nennung Ihres Namens) aufgezeichnet. Die pseudonymisierten Daten werden dem Auftraggeber der Studie zu wissenschaftlichen Zwecken zur Verfügung gestellt.

Die ordnungsgemäße Durchführung der Studie, insbesondere die ordnungsgemäße Erhebung der Daten sowie deren Zuordnung zu bestimmten Studienteilnehmern, wird von autorisierten Mitarbeitern u. a. durch direkte Einsicht in Ihre personenbezogenen (d. h. in Verbindung mit Ihrem Namen genannten) Daten überprüft. Die Autorisierung der Mitarbeiter erfolgt durch den Leiter der Studie. Diese Mitarbeiter werden für diese Aufgabe speziell ausgebildet und haben sich in einer schriftlichen Erklärung zum Stillschweigen verpflichtet. Sie unterliegen auch der Verschwiegenheitsverpflichtung gemäß § 40 Bundesdatenschutzgesetz. Die Mitarbeiter dürfen Ihre Daten nur in pseudonymisierter Form weitergeben und keine Kopien oder Abschriften von Ihren persönlichen Unterlagen erstellen. Einsicht in Ihre beim Leiter der Studie vorliegenden persönlichen Daten nehmen unter Umständen auch die zuständige Überwachungsbehörde oder die Freiburger Ethikkommission. Ihre persönlichen Daten werden dabei in Übereinstimmung mit dem geltenden Datenschutzgesetz vertraulich behandelt.

Eine Weitergabe Ihrer Daten erfolgt ausschließlich pseudonymisiert. Der abschließende Studienbericht enthält nur die pseudonymisierten Studiendaten. Im Falle der Veröffentlichung von Studienergebnissen bleibt die Vertraulichkeit Ihrer persönlichen Daten ebenfalls gewährleistet. Alle personenbezogenen Daten werden nach Abschluss der Studie gelöscht. Die Beachtung des Bundesdatenschutzgesetzes ist in vollem Umfang sichergestellt.

Ich stimme der oben beschriebenen Erfassung und Behandlung meiner personenbezogenen Daten und Einsichtnahme in diese Daten zu.

.....
Ort, Datum und Unterschrift
des Teilnehmers

.....
Ort, Datum, Stempel und Unterschrift
des Leiters der Prüfung

Sie erhalten eine Kopie dieser auch vom Leiter der Prüfung unterzeichneten
Datenschutzerklärung.

Einwilligungserklärung

zur Teilnahme an der ernährungsphysiologischen Studie:

„Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus xxx in Plasma und Urin nach einmaliger Verabreichung“

Name, Vorname:

Geburtsdatum:

Adresse:

.....

- 1 Ich habe die Probandeninformation erhalten und bin eingehend über die Art, Durchführung und die Risiken der Untersuchung aufgeklärt worden. Alle meine Fragen zu der vorgesehenen Untersuchung wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet. Mit den Teilnahmebedingungen, insbesondere mit den Ernährungsbedingungen zwei Wochen vor und während der Untersuchung (das sind insgesamt vier Wochen) bin ich einverstanden.
- 2 Ich versichere hiermit, dass ich sämtliche Fragen nach bestem Wissen beantworten werde und dass ich mich an die Anweisungen im Rahmen dieser Studie halten werde.
- 3 Die Teilnahme an dieser ernährungsphysiologischen Untersuchung ist freiwillig. Ich kann jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile meine Teilnahme widerrufen.
- 4 Ich erkläre mich bereit, an jedem der drei Untersuchungstage acht Blutabnahme durchführen zu lassen und sechs Urinproben zu sammeln sowie das Blut und den Urin für die in dieser Studie vorgesehenen ernährungswissenschaftlichen Untersuchungen zur Verfügung zu stellen.
- 5 Mir ist bewusst, dass mit dem Ausfüllen des Probandendokumentationsbogens und der Einwilligungserklärung kein verbindliches Recht auf Teilnahme an der Studie verbunden ist. Die Prüfer werden die einzelnen Studienteilnehmer ausschließlich anhand der für die Studie maßgebenden Ein- und Ausschlusskriterien auswählen.

.....
Ort, Datum und Unterschrift
des Teilnehmers

.....
Ort, Datum, Stempel und Unterschrift
des Leiters der Prüfung

Sie erhalten eine Kopie dieser auch vom Leiter der Prüfung
unterzeichneten Einwilligungserklärung.

A 1.1.2 CRF-Screening

Aufnahmefragebogen (CRF Screening)

Scr.-Nr.: |_|_|_|

„Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus xxx in Plasma und Urin nach einmaliger Verabreichung“

Sehr geehrter Studieninteressent,

um zu beurteilen, ob Sie an unserer Studie teilnehmen können, benötigen wir einige Angaben zu Ihrer Person. Die Auswertung des Fragebogens erfolgt nur zu wissenschaftlichen Zwecken. Persönliche Daten werden vertraulich behandelt und nicht an Dritte weitergegeben.

Versuchen Sie bitte, alle Fragen so genau wie möglich zu beantworten. Für evtl. Fragen, stehe ich – **Till Breiter** – Ihnen gerne telefonisch unter **0511-7625430** zur Verfügung.

Bitte reichen Sie den ausgefüllten Fragebogen bis **spätestens xxx** an uns zurück!

Vielen Dank für Ihre Mitarbeit!

Name/Vorname:

Anschrift: Strasse

PLZ, Ort

Tel.-Nr.

Email

Noch ein Hinweis:

Diese Seite mit Ihren persönlichen Angaben wird vertraulich behandelt, vom Fragebogen abgetrennt und in einem verschlossenen Schrank aufbewahrt.

Persönliche Daten

1. Geschlecht

- männlich
- weiblich

2. Wann sind sie geboren?.....

3. Um die Mahlzeiten entsprechend Ihrem Körpergewicht und -größe standardisieren zu können, benötigen wir Ihre aktuellen Daten:

Körpergröße(cm)

Körpergewicht, unbekleidet(kg)

Gesundheitszustand

4. Leiden Sie an ärztlich diagnostizierten chronischen Erkrankung?

- nein
- ja, und zwar

5. Leiden Sie an einer Erkrankung, die den Verdauungstrakt betrifft (Colitis Ulcerosa, Morbus Crohn, Zöliakie, etc.)?

- nein
- ja, und zwar

6. Leiden Sie an Verdauungsproblemen (Motilitätsstörungen, Obstipation, etc.)?

- nein
- ja, und zwar

7. Sind bei Ihnen Operationen vorgenommen worden, bei denen Teile des Verdauungstraktes entfernt wurden?

- nein
 ja, und zwar

8. Leiden Sie unter einer Blutgerinnungsstörungen (z. B. Bluterkrankheit)?

- nein
 ja, und zwar

Medikamenteneinnahme

9. Haben Sie in den letzten 2 Wochen Antibiotika eingenommen oder nehmen Sie derzeit Antibiotika ein?

- nein
 ja, und zwar

(bitte Name des Arzneimittels, Dosierung und Häufigkeit angeben)

10. Nehmen Sie derzeit blutverdünnende Medikamente mit dem Wirkstoff Phenprocoumon oder Warfarin ein (z.B. Marcumar[®], Falithrom[®], Coumadin[®])?

- nein
 ja, und zwar

(bitte Name des Arzneimittels, Dosierung und Häufigkeit angeben)

11. Nehmen Sie regelmäßig Acetylsalicylsäure-haltige Arzneimittel ein (z.B. Aspirin[®] protect, ASS ratiopharm[®]100 TAH)?

- nein ⇒ weiter mit Frage 12
 ja und zwar

(bitte Name des Arzneimittels, Dosierung und Häufigkeit angeben)

12. Verwenden Sie regelmäßig Abführmittel (z.B. Dulcolax[®], Agiolax[®])?

- nein
- ja, und zwar.....
 - täglich
 - 2 bis 3 mal wöchentlich
 - 1 mal wöchentlich
 - 1 mal pro Monat oder seltener

13. Nehmen Sie derzeit andere als die von uns angegebenen Medikamente?

- nein
- ja, und zwar (bitte in die Tabelle eintragen)

Wir bitten Sie, auch solche Medikamente anzugeben, die Ihnen nicht von einem Arzt verschrieben werden.

Name des Arzneimittels und Darreichungsform	Dosierung	Behandlungsbeginn
<i>z.B. Ambroxol AL Tropfen, Tropfen</i>	<i>3 x 60 Tropfen täglich</i>	<i>10.01.2005</i>

Lebensstilfaktoren

14. Wie oft treiben Sie Sport?

- 5 oder mehr Std. pro Woche
- 3 bis < 5 Std. pro Woche
- 1 bis < 3 Std. pro Woche
- weniger als 1 Std. pro Woche
- gar nicht

15. Rauchen Sie (Zigaretten, Zigarren, Zigarillos, Pfeife)?

- nein, ich habe noch nie geraucht
- nein, ich habe mit dem Rauchen aufgehört und zwar seit.....Jahren
- ja, und zwar
 - 1 bis weniger als 10 Stück täglich
 - 10 bis weniger als 20 Stück täglich
 - 20 und mehr Stück pro Tag

Ernährungsverhalten

16. Wie ernähren Sie sich?

- Mischkost (inkl. Fleisch)
- lakto-ovo-vegetarisch + Fisch (inkl. Milch, Eier; ohne Fleisch, Wurst, Geflügel)
- lakto-ovo-vegetarisch (inkl. Milch, Eier; ohne Fleisch, Wurst, Geflügel, Fisch)
- vegan (rein pflanzliche Kost)
- Sonstiges:

.....
.....

16.1 Seit wann ernähren Sie sich so?

- schon immer
- seit Jahren

17. Nehmen Sie derzeit Polyphenol-Supplemente (z.B. Traubenkernextrakt, Sambucol, Rotweineextrakt, Resveratrol, oligomere Procyanidine) ?

- nein ⇒ *weiter mit Frage 18*
- ja und zwar

17.1 Wie oft und in welcher Dosierung?

.....

18. Nehmen Sie regelmäßig Vitamin- oder Mineralstoffpräparate sowie sonstige Nahrungsergänzungsmittel ein (z.B. Brausetabletten, Kautabletten, Dragees)?

- nein ⇒ *weiter mit Frage 19*
- ja, gelegentlich
- ja, wöchentlich
- ja, täglich

18.1 Bitte nennen Sie den genauen Namen der Präparate, den Hersteller wie auch die jeweilige Dosierung!

Name des Präparates	Hersteller	Dosierung	
<i>z.B. EUNOVA® Langzeit</i>	<i>Firma X,Y</i>	<i>3 x 1 Tablette</i>	<input type="radio"/> täglich
<i>z.B. Omega-3-Fischölkapseln</i>			<input type="radio"/> wöchentlich
			<input type="radio"/> gelegentlich
			<input type="radio"/> täglich
			<input type="radio"/> wöchentlich
			<input type="radio"/> gelegentlich
			<input type="radio"/> täglich
			<input type="radio"/> wöchentlich
			<input type="radio"/> gelegentlich

19. Trinken Sie regelmäßig Rotwein?

- nein
- gelegentlich
- täglich

20. Trinken Sie regelmäßig Tee (Grüner-, Schwarzer-, Früchte-, oder Kräutertee)?

- nein
- gelegentlich
- täglich

21. Trinken Sie regelmäßig Johannisbeer-, Trauben-, Holunderbeer-, Grapefruit-, oder Orangensaft?

- nein
- gelegentlich
- täglich

22. Wie häufig verzehren Sie Obst und Gemüse?

- 1- 2 mal wöchentlich
- täglich
- mehrmals täglich

23. Sind Sie bei Einschluss in die Studie bereit

- an den insgesamt drei Blutentnahmetagen jeweils insgesamt 8 Blutentnahmen durchführen zu lassen sowie den sechs Urinabgabtagen 6 Urinproben abzugeben und die von uns an diesen Tagen angebotenen Mahlzeiten und Trinkvorgaben einzuhalten?

- nein
- ja

- spätestens 2 Wochen vor Studienbeginn und bis Ende der Studie auf flavonoidhaltige Nahrungsergänzungsmittel und flavonoidreiche Lebensmittel sowie auf antioxidanzienhaltige Supplemente zu verzichten?

- nein
- ja

Vielen Dank für Ihre Teilnahme!
Sie hören umgehend wieder von uns.

A 1.1.3 CRF-Intervention (t1)

Probandendokumentation Basisuntersuchung (t1)

zur Studie

*„Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus xxx in Plasma und Urin
nach einmaliger Verabreichung*

1. Untersuchung (xxx)

Datum: xxx

Scr.-Nr. |_|_|_|_|

Studienbedingungen

Sind Sie nüchtern (mindestens acht Stunden Nahrungskarenz)?

- ja
 nein, weil _____

Zu welcher Uhrzeit haben Sie gestern zuletzt etwas gegessen und getrunken?

_____ Uhr

Was haben Sie gegessen und getrunken?

Haben Sie seit Beginn der Depletionsphase regelmäßig Supplemente mit Polyphenolen (z.B. Traubenkernextrakt, Rotweineextrakt, Resveratrol, etc.) oder Vitamin- und Mineralstoffpräparate), Säfte (Johannisbeer-, Trauben-, Holunderbeer-, Grapefruit- oder Orangensaft), mit Vitaminen angereicherte Getränke, Rotwein oder Tee (Grüner-, Schwarzer-, Früchte- oder Kräutertee) eingenommen bzw. getrunken?

- nein
- ja

- Welche Präparate / Getränke haben Sie zu sich genommen und wie oft?

Präparat(e) / Getränk(e): _____

- Häufigkeit (Bitte geben Sie auch die jeweils verzehrte Menge an, z.B. 3 x 1 Tablette):

- täglich _____
- 2- bis 3-mal wöchentlich _____
- 1-mal wöchentlich _____
- weniger als 1-mal in 14 Tagen oder seltener _____
- Sonstiges _____

Umsetzung der flavonoid- und antioxidanzienarmen Ernährung

Haben Sie sich während der Depletionsphase an die Empfehlungen zu einer flavonoid- und antioxidanzienarmen Ernährung gehalten?

- ja
- nein, weil _____

Aktueller Gesundheitszustand

Fühlen Sie sich heute gesund?

- ja
- nein, weil _____

Erkrankungen

Leiden Sie derzeit an Durchfallerkrankungen?

- nein
- ja, _____ und
zwar _____

Leiden Sie derzeit an akuten Erkrankungen?

- nein
- ja, folgende _____

Medikation (Selbstmedikation)

Haben sich seit Beginn der Depletionsphase Änderungen bezüglich der Einnahme von Medikamenten (inklusive Selbstmedikation) ergeben?

- nein
- ja, und
zwar _____

Studienablauf

Nach der Nüchternblutentnahme, der Erhebung der anthropometrischen Daten und der Abgabe Ihres Morgenurins erhalten Sie zunächst das flavonoidhaltige Fertiggetränk. Die Termine der weiteren Blutentnahmen sowie der Mahlzeiten entnehmen Sie bitte unten stehender Übersicht.

Bitte essen Sie in an den Untersuchungstagen (**bis zur Abgabe des letzten Urinpools am nächsten Morgen**) nur die von uns ausgegebenen Mahlzeiten und trinken Sie bitte nur das Ihnen ausgehändigte Wasser.

Die mit Ihrem Code beschrifteten Behälter für die Urinpools finden Sie in der Herrentoilette. Bitte sammeln Sie Ihren Urin in der Zeit von **8.00 – 8.00 Uhr des Folgetages** in den entsprechenden Behältern (s.u.).

Tee:		7:20 – 7:30 Uhr
	2. Blutentnahme	8:00 Uhr
Frühstück:		8:10 Uhr
	3. Blutentnahme	8:30 Uhr
	4. Blutentnahme	9:00 Uhr
	5. Blutentnahme	9:30 Uhr
Zwischenmahlzeit		9:40 Uhr
	6. Blutentnahme	10:30 Uhr
	7. Blutentnahme	12:30 Uhr
Mittagessen		13:30 Uhr
	8. Blutentnahme	15:30 Uhr
Zwischenmahlzeit		15:40 Uhr
Urinpools:	Urin zwischen	8.00 und 10.00 Uhr
		10.00 und 12.00 Uhr
		12.00 und 14.00 Uhr
		14.00 und 16.00 Uhr
		16.00 und 8.00 Uhr (nächster Morgen)

Wir danken Ihnen herzlich für Ihre Teilnahme!

A 1.1.4 CRF-Intervention (t2, t3)**Probandendokumentation
Basisuntersuchung (xxx)**

zur Studie

**„Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus xxx in Plasma und Urin
nach einmaliger Verabreichung**

1. Untersuchung (xxx)

Datum: xxx

Scr.-Nr. |__|__|S|

Studienbedingungen

Sind Sie nüchtern (mindestens acht Stunden Nahrungskarenz)?

- ja
 nein, weil _____

Zu welcher Uhrzeit haben Sie gestern zuletzt etwas gegessen und getrunken?

_____ Uhr

Was haben Sie gegessen und getrunken?

Haben Sie seit dem letzten Untersuchungstag regelmäßig Supplemente mit Polyphenolen (z.B. Traubenkernextrakt, Rotweineextrakt, Resveratrol, etc.) oder Vitamin- und Mineralstoffpräparate), Säfte (Johannisbeer-, Trauben-, Holunderbeer-, Grapefruit- oder Orangensaft), mit Vitaminen angereicherte Getränke, Rotwein oder Tee (Grüner-, Schwarzer-, Früchte- oder Kräutertee) eingenommen bzw. getrunken?

- nein
- ja

- Welche Präparate / Getränke haben Sie zu sich genommen und wie oft?

Präparat(e) / Getränk(e): _____

- Häufigkeit (Bitte geben Sie auch die jeweils verzehrte Menge an, z.B. 3 x 1 Tablette):

- täglich _____
- 2- bis 3-mal wöchentlich _____
- 1-mal wöchentlich _____
- weniger als 1-mal in 14 Tagen oder seltener _____
- Sonstiges _____

Umsetzung der flavonoid- und antioxidanzienarmen Ernährung

Haben Sie sich seit dem letzten Untersuchungszeitraum an die Empfehlungen zu einer flavonoid- und antioxidanzienarmen Ernährung gehalten?

- ja
- nein, weil _____

Aktueller Gesundheitszustand

Fühlen Sie sich heute gesund?

- ja
 nein, weil _____

Erkrankungen

Leiden Sie derzeit an Durchfallerkrankungen?

- nein
 ja, und
zwar _____

Leiden Sie derzeit an akuten Erkrankungen?

- nein
 ja, folgende _____

Unerwünschte Ereignisse

Traten seit dem letzten Besuch unerwünschte Ereignisse auf?

- nein
 ja

Wenn „ja“, bitte dokumentieren Sie diese im Dokumentationsbogen „unerwünschte Ereignisse“?

Medikation (Selbstmedikation)

Haben sich seit dem letzten Untersuchungszeitraum Änderungen bezüglich der Einnahme von Medikamenten (inklusive Selbstmedikation) ergeben?

- nein
 ja, und
zwar _____

Studienablauf

Nach der Nüchternblutentnahme, der Erhebung der anthropometrischen Daten und der Abgabe Ihres Morgenurins erhalten Sie zunächst das flavonoidhaltige Fertiggetränk. Die Termine der weiteren Blutentnahmen sowie der Mahlzeiten entnehmen Sie bitte unten stehender Übersicht.

Bitte essen Sie in an den Untersuchungstagen (**bis zur Abgabe des letzten Urinpools am nächsten Morgen**) nur die von uns ausgegebenen Mahlzeiten und trinken Sie bitte nur das Ihnen ausgehändigte Wasser.

Die mit Ihrem Code beschrifteten Behälter für die Urinpools finden Sie in der Herrentoilette. Bitte sammeln Sie Ihren Urin in der Zeit von **8.00 – 8.00 Uhr des Folgetages** in den entsprechenden Behältern (s.u.).

Tee:		7:20 – 7:30 Uhr
	2. Blutentnahme	8:00 Uhr
Frühstück:		8:10 Uhr
	3. Blutentnahme	8:30 Uhr
	4. Blutentnahme	9:00 Uhr
	5. Blutentnahme	9:30 Uhr
Zwischenmahlzeit		9:40 Uhr
	6. Blutentnahme	10:30 Uhr
	7. Blutentnahme	12:30 Uhr
Mittagessen		13:30 Uhr
	8. Blutentnahme	15:30 Uhr
Zwischenmahlzeit		15:40 Uhr
Urinpools:	Urin zwischen	8.00 und 10.00 Uhr
		10.00 und 12.00 Uhr
		12.00 und 14.00 Uhr
		14.00 und 16.00 Uhr
		16.00 und 8.00 Uhr (nächster Morgen)

Wir danken Ihnen herzlich für Ihre Teilnahme!

A 1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien

- Einwilligungsfähige gesunde männliche Kaukasier im Alter zwischen 18-40 Jahren
- Schriftliche Einwilligung der Probanden nach ausführlicher mündlicher und schriftlicher Aufklärung über die Studieninhalte, -anforderungen und -risiken
- Fähigkeit und Bereitschaft der Studienteilnehmer, den Anweisungen des Prüfers und des Arztes zu folgen (Einhalten der Studien- sowie Ernährungsbedingungen vor und während der Intervention, etc.)

Ausschlusskriterien

- Einnahme von flavonoidhaltigen Supplementen während der Depletionsphase und des Untersuchungszeitraumes
- schwerwiegende chronische Erkrankungen (Nieren- und Leberinsuffizienz, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, etc.) sowie andere schwerwiegende internistische Erkrankungen, insbesondere Malignome
- Unmittelbare Notwendigkeit eines chirurgischen Eingriffs
- chronische Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts (speziell Dünndarm, Leber, Pankreas, z. B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, Pankreasinsuffizienz, Sprue, Enterokolitis, Cholestase, Kurzdarmsyndrom) sowie Zustand nach operativen Eingriffen am Gastrointestinaltrakt (z. B. Gastrektomie)
- bei bestehenden ernsthaften Verdauungsproblemen (Motilitätsstörungen, Obstipation)
- diagnostizierte Gerinnungsstörung und/oder Einnahme gerinnungshemmender Medikamente (z. B. Marcumar)
- regelmäßige Einnahme von Laxanzien
- bekannte Allergie oder Unverträglichkeit gegen einen Bestandteil der Prüfprodukte
- Alkohol-, Drogen- und/oder Medikamentenabhängigkeit
- Raucher
- Nicht einwilligungsfähige Probanden
- Verweigerung bzw. Rücknahme der Einwilligung durch den Probanden
- gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Studie bzw. Teilnahme innerhalb der vergangenen 30 Tage

A 1.3 Zusammensetzung der Kost

Tabelle A 1: Exemplarische Darstellung eines standardisierten Kostplans

	Lebensmittel	Getränk	Kalorien (Kcal)
7.20-7.30 Uhr		500 ml Tee/Wasser oder Extrakt	
Frühstück 8.10 Uhr	1 Brötchen (70 g) 2 Frischkäse (16.7 g)	250 ml Wasser	178 86,6
Zwischenmahlzeit 09.40 Uhr	1 Brötchen (70 g) 1 Butter (20g) 1 Schb. Schinkenwurst (18 g) 1 Schb. Kochschinken (30 g)	250 ml Wasser	178 150 37,5 54
Mittag 13.30 Uhr	175 g (rohe) Nudeln (ca. 438 g gekochte Nudeln) 1 Butter (20 g) Salz 20 g Parmesan 1 Joghurt (natur, 3.5 %) (150g) 2 TL Zucker	500 ml Wasser	524 150 0 75 91.5 50
Zwischenmahlzeit 15.40 Uhr	1 Brötchen (70 g) 2 Frischkäse (16.7 g)	250 ml Wasser	178 86.6
Abends	1 Nudelgericht	1500 ml Wasser	716
Spätmahlzeit	Bifi XXL		202
	Σ	3250 ml	2756

A 2 Versuchsbeschreibungen

A 2.1 Bioverfügbarkeitsanalysen

A 2.1.1 Plasmaaufarbeitung

1000 µl Plasma wurden mit 10 µl internem Standard (ISTD, Eriodictyol-7-O-glucosid, 10 µg/ml, in DMF) und 50 µl 0.1 M Phosphatpuffer (Na_2HPO_4 ; pH 3,5), der 0,5 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ enthielt, versetzt. Nach Zugabe von 2.5 ml Ethylacetat und ausgiebigem Schütteln (Vortex, 1 min) erfolgte eine Extraktion der Proben im Ultraschallbad (15 min), eine erneute Durchmischung und anschließend eine zwölfminütige Zentrifugation bei 4200 U/min. Der Überstand wurde in ein Schnappdeckelglas überführt und der Rückstand unter den oben angegebenen Bedingungen einer weiteren Extraktion unterworfen. 4 ml der vereinigten, organischen Phasen wurden mit 10 µl Ascorbinsäure (1 %, aq) versetzt und im N_2 -Strom zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 100 µl eines Gemisches aus ACN/DMF/ H_2O (3/3/4; v/v/v) im Ultraschallbad (15 min) gelöst und anschließend 12 min bei 4700 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen µ-Einsatz für die HPLC überführt und die Probe bis zur Messung bei -20 °C gelagert [L AUE 2011].

A 2.1.2 Urinaufarbeitung

1000 µl Urin werden mit 10 µl internem Standard (ISTD (Eriodictyol-7-O-glucosid, 10 µg/ml, in DMF) und 50 µl 0,1 M Phosphatpuffer (Na_2HPO_4 ; pH 3,5), der 0,5 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ enthält, versetzt und bis nach der zweiten Direktextraktion gemäß den Plasmaproben (A 2.1.1) aufgearbeitet. Nach der Vereinigung der beiden organischen Phasen wird der resultierende Rückstand auf die mit je 2 ml 1,5 M Ameisensäure in Nanopure® und 5 % wässrigem MeOH vorkonditionierte SPE-Kartusche (Waters Oasis HLB 3cc, 60 mg, Eschborn) aufgegeben. Diese wird mit je 2 ml derselben Lösungen gewaschen und anschließend sukzessive mit 4 x 500 µl 0,1 %iger Ameisensäure in MeOH/DMF (1/1; v/v) eluiert. 10 µl Ascorbinsäure (1 %, aq) und 4 ml der organischen Phase aus der Direktextraktion werden zum SPE-Eluat zugegeben und die Lösung im N_2 -Strom zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird in 100 µl eines Gemisches aus ACN/DMF/ H_2O (3/3/4; v/v/v) gelöst und zentrifugiert (4700 U/min für 12 min). Der Überstand wird in einen µ-Einsatz für die HPLC überführt und bis zur LC-MS-Messung bei -20 °C gelagert [L AUE 2011].

A 2.1.2 Messungen

Die Proben- und Standardlösungen werden per HPLC-MS/MS untersucht. Die Plasmaproben der Untersuchungsserie I.I wurden unter Verwendung der Methode a) mit dem LC-MS-System 1 analysiert, die Plasmaproben der Untersuchungsserie I.II sowie die Urinproben beider Untersuchungsserien mit der Methode b) unter Verwendung des LC-MS-Systems 2 [LAUE 2011].

Hochleistungsflüssigkeitschromatografie

Fließmittel A: 2 %ige Essigsäure, aq

Fließmittel B: 100 % Acetonitril

Flussrate: 0,5 mL/min

Messwellenlängen: 287, 324, 354 nm

Temperatur: RT

Injektionsvolumen: 20-50 µL

Trennsäule: a) Luna Phenyl-Hexyl (5 µm, 250 x 4,6 mm i. D. – Phenomenex®, Aschaffenburg) mit Phenyl-Vorsäulenkartusche (4 x 3 mm i. D. – Phenomenex®, Aschaffenburg)

b) Luna Phenyl-Hexyl (3 µm, 250 x 4,6 mm i. D. – Phenomenex®, Aschaffenburg) mit Phenyl-Vorsäulenkartusche (4 x 3 mm i. D. – Phenomenex®, Aschaffenburg)

Gradient: a) 6 % B in 10 min auf 17 % → in 45 min auf 19 % B → in 15 min auf 50 % B → in 2 min auf 100 % B – Ende der Datenerfassung → 10 min isokratisch bei 100 % B → in 1 min auf 6 % B → 10 min konditionieren – Methodenende: 93 min

b) 6 % B in 10 min auf 14 % → in 40 min auf 25 % B → in 18 min auf 55 % B → 10 min isokratisch bei 55 % B → in 1 min auf 60 % B – Ende der Datenerfassung → 10 min isokratisch bei 60 % B → in 1 min auf 6 % B → 10 min konditionieren – Methodenende: 100 min

Massenspektrometrie (LC-MS)

Anlage I:

Pumpe: Series 1100 – Bin Pump G1312A (Agilent, Waldbronn)

Probenaufgabe: Series 1200 – Autosampler ALS G1329B, ALS Therm G1330B (Agilent, Waldbronn)

MS-Gerät: Bruker Esquire LC-MS/MS Electrospray Ionisation Ion Trap Multiple Mass Spectrometry (Bruker Daltonics, Bremen)

Datenverarbeitung: Bruker ESI-Compass 1.3 for HCT/esquire, Data Analysis V. 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen)

Anlage II:

Pumpe: Series 1100 – Bin Pump G1312A (Agilent, Waldbronn)

Probenaufgabe: Series 1200 – Autosampler ALS G1329B, ALS Therm G1330B (Agilent, Waldbronn)

Detektor: Series 1100 – DAD G1315B (Agilent, Waldbronn)

MS-Gerät: HCT Ultra PTM Discovery System (Bruker Daltonics, Bremen)

Datenverarbeitung: Esquire Control Software V. 4.5, Data Analysis V. 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen)

A 2.2 Leberwerte

Gammaglutamyltransferase (GGT)

Die quantitative Bestimmung der GGT erfolgte im Serum über einen kinetischen Farbttest. Die GGT katalysiert die Übertragung der Gammaglutamylgruppe von Gammaglutamyl-3-Carboxy-4-Nitroanilidsubstrat auf Glycylglycin und die Bildung von 5-Amino-2-Nitrobenzoat. Die Absorptionsänderung kann bei 410 oder 480 nm gemessen werden und verhält sich zur GGT-Aktivität der Probe proportional [OLYMPUS LIFE AND MATERIAL SCIENCE EUROPA GMBH 2007 A].

Aspartataminotransferase (AST/GOT)

Die quantitative Bestimmung der AST erfolgte im Serum über einen kinetischen UV-Test. Die in der Probe enthaltene AST katalysiert die Transamination von Aspartat und 2-Oxoglutarat und die Bildung von L-Glutamat und Oxalacetat. Das Oxalacetat wird durch Malatdehydrogenase zu L-Malat reduziert, während NADH gleichzeitig in NAD⁺ umgewandelt wird. Die Extinktionsabnahme aufgrund des NADH-Verbrauchs wird bei 340 nm gemessen und ist zur AST-Aktivität proportional [OLYMPUS LIFE AND MATERIAL SCIENCE EUROPA GMBH 2007 B].

Alaninaminotransferase (ALT/GPT)

Die quantitative Bestimmung der ALT erfolgte ebenfalls über einen kinetischen UV-Test. Die in der Probe enthaltene ALT wandelt die Aminogruppe von Alanin in 2-Oxoglutarat um und bildet Pyruvat und Glutamat. Das Pyruvat geht mit NADH eine durch Laktatdehydrogenase katalysierte Reaktion ein und wird zu Laktat und NAD⁺ reduziert. Die Extinktionsabnahme aufgrund des NADH-Verbrauchs wird bei 340 nm gemessen und ist zur ALT-Aktivität der Probe proportional [OLYMPUS LIFE AND MATERIAL SCIENCE GMBH 2007 C].

Alkalische Phosphatase (ALP)

Die quantitative Bestimmung der ALP erfolgte im Serum über einen kinetischen Farbttest. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wird durch Messung der Umwandlungsrate von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol in Anwesenheit von Magnesiumionen und

Diethanolamin als Phosphatakzeptor mit pH 9,8 bestimmt. Die Rate des Anstiegs der Absorptionsfähigkeit aufgrund der Bildung von p-Nitrophenol (pNP) wird bei 410 nm oder 480 nm gemessen und ist zur ALP-Aktivität der Probe direkt proportional [OLYMPUS LIFE AND MATERIAL SCIENCE GMBH 2007 D].

Billirubin

Die quantitative Bestimmung des Bilirubins erfolgte im Serum über einen photometrischen Farbttest. Das stabilisierte Diazoniumsalz 3,5-Dichlorphenylazonium-Tetrafluorborat bildet mit konjugiertem Bilirubin in direkter Reaktion und mit unkonjugiertem Bilirubin in Gegenwart eines Beschleunigers Azobilirubin. Bei 540 nm ist die Absorption proportional zur Gesamtbilirubinkonzentration [OLYMPUS LIFE AND MATERIAL SCIENCE GMBH 2007 E].

A 2.3 Lipidwerte

Gesamttriacylglyceride

Die quantitative Bestimmung der Gesamttriacylglyceride erfolgte im Serum über einen enzymatischen Farbttest. Dabei werden die Triacylglyceride in der Probe zunächst durch eine Verbindung bakterieller Lipasen zu Glycerol und Fettsäuren hydrolysiert. Das Glycerol wird in Gegenwart von Glycerolkinasen mit Adenosintriphosphat zu Glycerol-3-Phosphat und Fettsäuren hydrolysiert. Anschließend wird das gebildete Glycerol-3-Phosphat mit Sauerstoffmolekülen in Gegenwart von Glycerolphosphatoxidasen zu Wasserstoffperoxyd und Dihydroxyacetonphosphat oxidiert. Das hierbei gebildete Wasserstoffperoxyd reagiert mit 4-Aminophenazon und N,N-bis(4-Sulfobutyl)-3,5-Dimethylanilin, Dinatriumsalz in Gegenwart von Peroxidasen und produziert einen blauen Farbstoff (Chromophor), der bei 660 oder 800 nm abgelesen wird. Der Extinktionsanstieg ist proportional zur Triacylglycerid-Konzentration der Probe [OLYMPUS LIFE AND MATERIAL SCIENCE EUROPA GMBH 2007 F].

LDL-Cholesterol

Zur quantitativen Bestimmung des LDL-Cholesterols wurde ebenfalls ein enzymatischer Farbttest angewendet. Dabei wird der Probe ein Reagenz zugegeben, welches die LDL-Partikel vor enzymatischen Reaktionen schützt. Alle weiteren Lipoproteine (Chylomikronen, VLDL, HDL) werden durch Cholesterolesterase und Cholesteroxidase zerlegt. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxyd wird durch eine Katalase zersetzt. Mit Zugabe eines zweiten Reagenz wird das Maskierungsreagenz von LDL entfernt und die Katalase durch Natriumazid inaktiviert. Das durch Enzymreaktion aus dem LDL freigesetzte Wasserstoffperoxyd reagiert in Gegenwart von Peroxidase in einer oxidativen Kopplungsreaktion mit 4-Aminoantipyrin und N-(2-Hydroxy-3-Sulfopropyl)-3,5-Dimethoxyanilin. Der entstehende blaue Farbstoff kann bei 600 nm gemessen werden [OLYMPUS LIFE AND MATERIAL SCIENCE EUROPA GMBH 2007 G].

HDL-Cholesterol

Auch die quantitative Bestimmung des HDL-C wurde über einen enzymatischen Farbttest durchgeführt. Bei diesem Test werden zu der Probe Anti-Human- β -Lipoprotein-Antikörper gegeben, die andere Lipoproteine als HDL (Chylomikronen, VLDL, LDL) binden. Die dadurch gebildeten Antigen-Antikörperkomplexe blockieren bei Zugabe des zweiten Reagenz die Enzymreaktionen, so dass nur das HDL reagiert. Das dabei über Cholesterinesterase (CHE) und Cholesterinoxidase (CHO) freigesetzte Wasserstoffperoxid bildet in Gegenwart von Peroxidase mit N-Ethyl-N-(2-Hydroxy-3-Sulfopropyl)-3,5-Dimethoxy-4-Fluoranilin und 4-Aminoantipyrin in einer oxidativen Kupplungsreaktion einen blauen Komplex der bei 600 nm gemessen werden kann [OLYMPUS LIFE AND MATERIAL SCIENCE EUROPA GMBH 2007 H].

A 2.4 Harnsäure

Die quantitative Bestimmung der Harnsäure erfolgte durch einen enzymatischen Farbttest. Die Harnsäure wird im Blut von Uricase zu Allantoin und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das entstandene H_2O_2 reagiert mit N,N-bis-(4-Sulfobutyl)-3,5-Dimethylanilin, Natriumsalz und 4-Aminophenazon in Gegenwart von Peroxidase und bildet ein Chromophor, das bei 660 und 880 nm biochromatisch gemessen wird. Die Menge des gebildeten Farbstoffs ist proportional zur Harnsäurekonzentration in der verwendeten Probe [OLYMPUS LIFE AND MATERIAL SCIENCE GMBH 2007 I].

A 2.5 Durchführung ORAC-Assay

Der ORAC-Assay ist eine fluorimetrische Methode. In der vorliegenden Arbeit wurde der Assay nach der Methode von DÁVALOS ET AL. [2004] durchgeführt.

In Abweichung zu DÁVALOS ET AL. [2004] wurde das Fluoreszein in einer geringeren Konzentration, 7 nmol/l statt 70 nmol/l, eingesetzt. Um probenspezifische Eigenschaften zu berücksichtigen wurden zudem geringere Troloxkonzentrationen verwendet. Damit wurde sichergestellt, dass die Messwerte der Proben innerhalb der Eichgerade liegen. Sämtliche Reaktionen wurden in 75 mmol/l Phosphatpuffer ausgetragen. Das Pipettierschema ist in Abbildung A 1 dargestellt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H ₂ O											
B		Trolox									Bl- ank	
C												
D		Prüfsubstanz										
E												
F												
G												
H												

Abbildung A 1: Pipettierschema

A 2.5.1 Geräte und Chemikalien

- 96-Loch-Mikrotiterplatten (NUN 96fb-Luminunc FluoroNunc – Nunclon 96 Flat Black, Nunc, Langensfeld/Deutschland)
- Mikroplatten-Reader (Infinite®F200, 544/584 nm Exzitations-/Emissionsfilter, Tecan, Crailsheim/Deutschland)
- Mehrkanalpipette (EDP®3-Plus E8-300, Mettler & Toledo GmbH, Giessen/Deutschland)
- Multidispenserpipette (AutoRep™ AR-E1 EU, Mettler & Toledo GmbH, Giessen/Deutschland)
- Transferpipetten (Eppendorf, Hamburg/Deutschland).

Die zur Durchführung des ORAC-Assay benötigten Chemikalien sind in Tabelle A 2 aufgelistet.

Tabelle A 2: Im ORAC verwendete Chemikalien

Stoff	Hersteller
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen/Deutschland)
Fluoreszein (C ₂₀ H ₁₀ Na ₂ O ₅)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen/Deutschland)
AAPH (2,2'-azobis[2-methylpropionamidin]dihydrochloride)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen/Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth (Karlsruhe/Deutschland)
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Roth (Karlsruhe/Deutschland)

A 2.5.2 Herstellung der Reaktionslösungen

Im Folgenden soll die Herstellung der in Tabelle A 3 aufgeführten Reaktionslösungen, sowie des verwendeten Puffers beschrieben werden.

Tabelle A 3: Konzentrationen der verwendeten Reaktionslösungen

Stoff	Stamm- lösung [mmol/l]	Lösung II [µmol/l]	Lösung III [µmol/l]	Arbeitslösungen [µmol/l]	Well [µmol/l]	Unter- suchungs- serien
Trolox	10	100	-	5/10/20/30/40/50	0.5/1/2/3/4/5	I./I.II II.II
			20	1,0/2,5/5,0/10/15/20	0.1/0.25/0.5/1.0/1.5/2	II.I/II.III
Fluoreszein	1.17	11.7	0.117	0.0117	0.007	I./I.II II.I/II.II/II.III
AAPH	40	-	-	-	12000	I./I.II II.I/II.II/II.III

Phosphatpuffer

- Reaktionen wurden in Phosphatpuffer ausgetragen
- Puffer wurde nach Sørensen (pH 7.4) angesetzt
- Herstellung aus 808 ml der Lösung B und 192 ml der Lösung A
Lösung A: 9.078 g KH_2PO_4 in 1 l dest. Wasser
Lösung B: 11.670 g K_2HPO_4 in 1 l dest. Wasser
- Lagerung im Kühlschrank bei 4°C bis zum vollständigen Verbrauch

Kalibrationslösungen – Trolox

Molgewicht = 250.29 g/mol

- 25.092 mg Trolox in 10 ml Puffer → Stammlösung
- 0.1 ml Stammlösung + 9.9 ml Puffer → Lösung II
- 2 ml Lösung II + 8 ml Puffer → Lösung III
- 10/20/40/60/80/100 µl Lösung II +
190/180/160/140/120/100 µl Puffer → Arbeitslösung
Untersuchungsserie I./I.I/II.II
- 10/25/50/100/150/200 µl Lösung III +
190/175/150/100/50/0 µl Puffer → Arbeitslösung
Untersuchungsserie II./II.III
- 20 µl Arbeitslösung pro Well
- Arbeitslösung für jeweils 3 Platten bzw. einen Arbeitstag genutzt, Stammlösung alle zwei Wochen neu angesetzt

Fluoreszein

Molgewicht = 376.28 g/mol

- 44 mg in 100 ml Puffer → Stammlösung
- 100 µl Stammlösung + 9900 µl Puffer → Lösung II

- 100 µl Lösung II + 9900 µl Puffer → **Lösung III**
- 10 ml Lösung III + 90 ml Puffer → **Arbeitslösung**
- 120 µl Arbeitslösung pro Well
- Arbeitslösung maximal eine Woche genutzt, dann neuerstellt aus Stammlösung
- Lagerung aller Lösungen im Kühlschrank bei 4°C

AAPH

Molgewicht = 271.20 g/mol

- 108.48 mg AAPH in 10 ml Puffer → **Arbeitslösung**
- 60 µl Arbeitslösung pro Well
- Arbeitslösung für jede Platte neu angesetzt

Reaktionslösung

- Gesamtvolumen 200 µl
- Zusammensetzung: 120 µl Fluoreszeinlösung + 20 µl Probe + 60 µl AAPH-Lösung

A 2.5.2.1 Herstellung Probelösungen

Im Folgenden soll die Herstellung der in Tabelle A 4 aufgeführten Probelösungen werden.

Versuchsreihe I

- Lagerung bei -80°C bis zum Tag der Analyse
- Proben mussten vor Verwendung im Testsystem verdünnt werden, 20 µl Serum + 1980 µl Puffer (1:100)

Versuchsreihe II

Untersuchungsserie II.I

- 10 g Rooibos in 500 ml Wasser, 10 min. Extraktion → **Stammlösung**
- 158/394/472/551/630/787/909/1000 µl Stammlösung mit Puffer
- auf Endvolumen von 1000 µl aufgefüllt → **Lösung II**
- 100 µl der Lösungen II + 900 µl Puffer → **Lösung III**
- 20 µl der Lösungen III + 1980 µl Puffer → **Arbeitslösungen**
- Arbeitslösungen täglich frisch aus Lösung III
- Lösung III maximal eine Woche genutzt
- Lagerung aller Lösungen bei 4°C im Kühlschrank

Untersuchungsserie II.II

- 10 g Rooibos in 500 ml Wasser, 10 min. Extraktion → **Stammlösung**
- 315/394/472/551/630/787/909/1000 µl Stammlösung mit Puffer
auf Endvolumen von 1000 µl aufgefüllt → **Lösung II**
- 50 µl der Lösungen II + 450 µl Serum → **Lösung III**
- 20 µl der Lösungen III + 1980 µl Puffer → **Arbeitslösungen**

- Arbeitslösungen täglich frisch aus Lösung III
- Lösung III maximal eine Woche genutzt
- Lagerung aller Lösungen bei 4°C im Kühlschrank

Untersuchungsserie II.III

- 10 g Rooibos in 500 ml Wasser, 10 min. Extraktion → **Stammlösung**
- 787 µl Stammlösung + 113 µl Puffer → **Lösung II**
- 50 µl der Lösung II + 450 µl Serum bzw. Puffer → **Lösung III**
- 20 µl der Lösungen III + 1980 µl Puffer → **Arbeitslösungen**
- Arbeitslösungen täglich frisch aus Lösung III
- Lösung III maximal eine Woche genutzt
- Lagerung aller Lösungen bei 4°C im Kühlschrank

Tabelle A 4: Konzentration (µmol/l) des Aspalathins in Versuchsreihe II

Stoff	Stamm- lösung [µmol/l]	Lösung II [mmol/l]	Lösung III [µmol/l]	Arbeitslösungen [µmol/l]	Well [µmol/l]	Unter- suchungs- serie
Tee	1270	0.2/0.5/0.6/0.7/ 0.8/1.0/1.15/ 1.27	20/50/60/70/80/ 100/115/127	0.2/0.5/0.6/0.7/0.8/ 1.0/1.15/1.27	0.02/0.05/0.06 /0.07/0.08/0.1/ 0.115/0.127	II.I
		0.4/0.5/0.6/0.7/ 0.8/1.0/1.15/ 1.27	40/50/60/70/80/ 100/115/127	0.4/0.5/0.6/0.7/0.8/ 1.0/1.15/1.27	0.04/0.05/0.06 /0.07/0.08/0.1/ 0.115/0.127	II.II
	1270	1.0	100 [†]	1.0	0.1	II.III

[†] Verdünnung erfolgte mit Serum und Puffer

A 2.6 Durchführung FRAP Assay

Der FRAP-Assay ist eine photometrische Methode, die die reduzierenden Eigenschaften von Antioxidantien gegenüber dreiwertigem Eisen misst. In der vorliegenden Studie wurde der Assay nach der Methode von BENZIE UND STRAIN [1999] durchgeführt.

A 2.6.1 Geräte und Chemikalien

- Spektralphotometer (DU®640, Beckman Instruments, München/Deutschland)
- Einwegküvetten aus Polystyrol, Fassungsvermögen 4,5 ml (Roth, Karlsruhe/Deutschland)
- Ultraschallbad (Julabo 20 B, Julabo, Seelbach/Deutschland)

Die zur Durchführung des FRAP-Assay benötigten Chemikalien sind in Tabelle A 5 aufgelistet.

Tabelle A 5: Im FRAP verwendete Chemikalien

Stoff	Hersteller
Eisen-II-sulfat (FeSO₄) (FeII)	Merck, Darmstadt/Deutschland
Eisessig (C₂H₄O₂)	Merck, Darmstadt/Deutschland
Salzsäure (HCL)	Merck, Darmstadt/Deutschland
2,4,6-tripyridyl-s-triazin (TPTZ)	Fluka, Taufkirchen/Deutschland
Eisen-III-chlorid-Hexahydrat (FeCl₃ 6 H₂O)	Roth, Karlsruhe/Deutschland
Natriumacetat (C₂H₃NaO₂)	Sigma, Taufkirchen/Deutschland

A 2.6.2 Herstellung der Reaktionslösungen

Im Folgenden wird die Herstellung der verwendeten Reaktionslösungen beschrieben.

Natriumacetatpuffer

Molgewicht: 82.03

- Pufferlösung gewährleistet einen konstanten pH-Wert von 3.6.
- 0.935 g Natriumacetat und 8 ml Eisessig mit dest. Wasser auf Endvolumen von 500 ml aufgefüllt
- pH-Wert von 3.6 überprüft, ggf. eingestellt
- Pufferlösung wöchentlich neu angesetzt
- Dunkel und kühl gelagert

Kalibrationslösungen - FeSO₄

Molgewicht: 278.02

- 27.8 mg Fe II in 100 ml dest. Wasser → **Stammlösung**
- 0/100/250/500/750/1000 µl + 1000/900/750/500/250/0 dest. Wasser → **Arbeitslösung**

TPTZ-Lösung

Molgewicht: 312.34 g/mol (TPTZ)

- 156.5 mg TPTZ + 2 ml Salzsäure (1 mol/l) mit dest. Wasser auf Endvolumen von 500 ml auffüllen
- TPTZ-Lösung wird täglich neu angesetzt
- Dunkel und kühl gelagert

Eisentrichloridlösung

Molgewicht: 270.3 g/mol

- 270 mg Fe III in 50 ml dest. Wasser
- Lösung alle zwei Tage neu angesetzt

FRAP-Reagenz

- 100 ml Pufferlösung + 10 ml TPTZ-Lösung + 10 ml Eisentrichloridlösung

Reaktionslösung

- Gesamtvolumen 2550 μ l
- 2250 μ l FRAP-Reagenz + 75 μ l Probe + 225 μ l H₂O

A 2.6.2.1 Herstellung Probelösungen**Proben**

- Lagerung bei -80°C bis zum Tag der Analyse
- Plasmaproben konnten unverdünnt im Testsystem verwendet werden

A 3 Ergebnisse

A 3.1 Ergebnisse ORAC

US I.I

Tabelle A 6: Antioxidative Kapazität (ORAC) vor und nach Aufnahme der isolierten aktiven Fraktion, n=10

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	isolierte aktive Fraktion		
		Mean ± SD	%	p [‡]
ORAC [μmol TE/l]	0	2633 ± 360	100	
	0.5	2480 ± 308	95	0.174
	1	2479 ± 389	92	0.126
	1.5	2368 ± 293	90	0.020
	2	2400 ± 306	92	0.082
	3	2386 ± 293	92	0.062
	5	2315 ± 284	88	0.008
	8	2391 ± 249	85	0.021

[‡] t-Test für abhängige Stichproben (Nüchternkonzentration vs. jeweiligen Entnahmezeitpunkt)

[†] prozentuale Veränderung der antioxidativen Kapazität bezogen auf den Ausgangswert

US I.II

Tabelle A 7: Antioxidative Kapazität (ORAC) der Serumproben vor und nach Aufnahme des gelagerten Fertiggetränks, n=12

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	gelagertes Fertiggetränk		
		Mean ± SD	% [†]	p [‡]
ORAC [μmol TE/l]	0	2000 ± 558	100	
	0.5	1999 ± 591	100	0.981
	1	1934 ± 562	98	0.266
	1.5	1786 ± 434	89	0.006
	2	1768 ± 559	88	0.069
	3	1880 ± 562	94	0.327
	5	1776 ± 449	89	0.017
	8	1821 ± 469	91	0.051

[‡] t-Test für abhängige Stichproben (Nüchternkonzentration vs. jeweiligen Entnahmezeitpunkt)

[†] prozentuale Veränderung der antioxidativen Kapazität bezogen auf den Ausgangswert

A.3.2 Ergebnisse FRAP

US I.I

Tabelle A 8: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme des isolierten aktiven Fraktion, n=10

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	isolierte aktive Fraktion		
		Mean \pm SD	% [†]	p [‡]
FRAP [μ mol Fe II/l]	0	1083 \pm 265	100	
	0.5	1087 \pm 266	100	0.572
	1	1069 \pm 256	99	0.429
	1.5	1085 \pm 261	100	0.898
	2	1078 \pm 262	100	0.766
	3	1079 \pm 265	100	0.870
	5	1050 \pm 244	97	0.295
	8	1044 \pm 233	96	0.212

[‡] t-Test für abhängige Stichproben (Nüchternkonzentration vs. jeweiligen Entnahmezeitpunkt)

[†] prozentuale Veränderung der antioxidativen Kapazität bezogen auf den Ausgangswert

US I.II

Tabelle A 9: Antioxidative Kapazität (FRAP) der Plasmaproben vor und nach Aufnahme des gelagerten Fertiggetränks und des Placebos n=12

Parameter	Entnahmezeitpunkte (h)	gelagertes Fertiggetränk		
		Mean \pm SD	% [†]	p [‡]
FRAP [μ mol Fe II/l]	0	1079 \pm 124		
	0.5	1095 \pm 138	101	0.167
	1	1073 \pm 117	99	0.501
	1.5	1061 \pm 115	98	0.002
	2	1041 \pm 120	96	0.086
	3	1051 \pm 110	97	0.832
	5	1039 \pm 100	96	0.659
	8	1021 \pm 96	95	0.819

[‡] t-Test für abhängige Stichproben (Nüchternkonzentration vs. jeweiligen Entnahmezeitpunkt)

[†] prozentuale Veränderung der antioxidativen Kapazität bezogen auf den Ausgangswert

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name Till Breiter

Geburtsdatum/-ort 17.04.1984 in Hannover

Familienstand ledig

Schule/Ausbildung:

Schulen 1996 - 03 Gymnasium in Hannover-List

Hochschulbildung:

Studium WS 2003 - SS 08 Lehramt an berufsbildenden Schulen mit der Fachrichtung Lebensmittelwissenschaft
20.06.2008 Abschluss als Dipl.-Berufspäd.

Promotion:

seit 08/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Promotionsstudent an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Leibniz Universität Hannover

Publikationsverzeichnis

Breiter, T.; Laue, C.; Kressel, G.; Gröll, S.; Engelhardt, U. H.; Hahn, A. Bioavailability and antioxidant potential of rooibos flavonoids in humans following the consumption of different rooibos formulations. *Food Chemistry*. 2011. 2. 128. 338–347.

Gröll, S.; Laue, C.; Breiter, T.; Engelhardt, U. H. Bioavailability of flavonoids from flowers of black elder. *Proceedings of the 15th European Conference on Food Chemistry*. 2009. Vol. II. 18-21.

Laue, C.; Breiter, T.; Gröll, S.; Hahn, A.; Engelhardt, U. H. Bioverfügbarkeit und antioxidatives Potential von Rooibosflavonoiden. 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag. *Lebensmittelchemie*. 2010. 64. 121-122.

Laue, C.; Gröll, S.; Breiter, T.; Engelhardt, U. H. Human study with flavonoids from green Rooibos. *Proceedings of the 15th European Conference on Food Chemistry*. 2009. Vol. II. 14-17.

Laue, C.; Breiter, T.; Gröll, S.; Engelhardt, U. H.; Hahn, A. Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Rooibosflavonoiden in vivo. 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag. *Lebensmittelchemie*. 2011. 65. 96.

Weißhaupt, A.; Birkefeld, A.; Breiter, T.; Nettekoven, S.; Kressel, G.; Lichtinghagen, R.; Hahn, A. Vergleich des Einflusses zweier isokalorischer Formulaprodukte mit unterschiedlicher Hauptnährstoffrelation auf Parameter des Lipidstoffwechsels Übergewichtiger. *Proceedings of the German Nutrition Society*. 2008. 12. 52

Erklärung zur Dissertation

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover für die Promotion zum Dr. rer. nat

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und antioxidativen Kapazität von Flavonoiden aus Rooiboszubereitungen nach einmaliger Applikation“

selbstständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Till Breiter