

Christian Laue

Flavonoide im Rooibos
(Aspalathus linearis)

—
**Bestimmung, Nutrikinetik, Veränderungen bei
Extraktion und Lagerung**



Cuvillier Verlag Göttingen
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

**Flavonoide im Rooibos (*Aspalathus linearis*) –
Bestimmung, Nutrikinetik, Veränderungen bei
Extraktion und Lagerung**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Christian Laue
aus Nordhorn

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2011
Zugl.: Braunschweig, Univ., Diss., 2011

978-3-86955-872-1

1. Referent: apl. Professor Dr. Ulrich Engelhardt
2. Referent: Professor Dr. Peter Winterhalter
eingereicht am: 15.06.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am: 24.08.2011

Druckjahr 2011

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig,
Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2011
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2011
Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86955-872-1

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

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 Chem.*, **2011**, 128 (2), 338-347

Tagungsbeiträge

Laue, C.; Gröll, S.; Breiter, T.; Engelhardt, U. H.: Human study with flavonoids from green rooibos. EuroFoodChem XV, Kopenhagen/Dänemark. Abstract veröffentlicht in: *Proceedings of the Euro Food Chem XV*. Food for the future – the contribution of chemistry to improvement of food quality. Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Vol. II, 14-17, **2009**

Gröll, S.; Laue, C.; Breiter, T.; Engelhardt, U. H.: Bioavailability of flavonoids from flowers of black elder. EuroFoodChem XV, Kopenhagen/Dänemark. Abstract veröffentlicht in: *Proceedings of the Euro Food Chem XV*. Food for the future - the contribution of chemistry to improvement of food quality. Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Vol. II, 18-21, **2009**

Laue, C.; Gröll, S.; Breiter, T.; Engelhardt, U. H.: Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus grünem Rooibos. 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin. Abstract veröffentlicht in: *Lebensmittelchemie*, **2010**, 64, 121-122

Laue, C.; Breiter, T.; Gröll, S.; Engelhardt, U. H.; Hahn, A.: Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Rooibosflavonoiden *in vivo*. 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart-Hohenheim. Abstract veröffentlicht in: *Lebensmittelchemie*, **2011**, 65, 96

Danksagung

Danken möchte ich allen, die mir bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn apl. Prof. Dr. U. H. Engelhardt für die Bereitstellung des interessanten Themas und das in mich gesetzte Vertrauen. Ich bedanke mich für die gewährten Freiräume bei der Umsetzung meiner Ideen sowie die Möglichkeit, meine Ergebnisse auf nationalen und internationalen Tagungen präsentieren zu können.

Bei Herrn Prof. Dr. P. Winterhalter möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie das Mitwirken in der Prüfungskommission bedanken. Herrn Prof. Dr. I. Rustenbeck danke ich für das Mitwirken in der Prüfungskommission.

Der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AIF) und dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie (FEI) danke ich für die Finanzierung der Arbeit (AIF: 15303N). Der Wirtschaftsvereinigung Kräuter- und Fruchttetee e. V. (WKF), insbesondere Herrn Dr. Adolf Kler, danke ich für die Bereitstellung des Probenmaterials und das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. A. Hahn und Herrn Till Breiter vom Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung der Leibniz Universität Hannover möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken. Insbesondere Herrn Breiter danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen.

Für das unermüdliche Korrekturlesen dieser Arbeit sowie weiterer Manuskripte und die zahlreichen Literaturrecherchen möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Carola Balcke bedanken. Weiterhin gilt mein Dank Frau Britta Gries und Herrn Kai Oliver Mattutat für die im Rahmen ihrer Diplomarbeiten geleisteten Beiträge.

Ein herzliches Dankeschön geht an Frau Beate Maiwald, Frau Stephanie Gröll, Frau Dr. Yumen Hilal und Herrn Nils Kaiser für die überaus angenehme, humorvolle und konstruktive Zusammenarbeit im Teelabor. Daneben danke ich Herrn Fabian Weber, Frau Dr. Andrea Wilkens und Frau Annika Burmeister für ihre Freundschaft und Unterstützung sowie für die vielen außeruniversitären Aktivitäten.

Meiner Familie möchte ich ganz herzlich für die große Unterstützung während der gesamten Arbeit danken. Der letzte Dank geht an Christine für ihr Verständnis und den Rückhalt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	V
1 Grundlagen und Kenntnisstand.....	1
1.1 Sekundäre Pflanzenstoffe: Polyphenole	1
1.1.1 Biosynthese der Polyphenole	6
1.2 Rooibos (<i>Aspalathus linearis</i>).....	8
1.2.1 Anbau, Kultivierung und Technologie.....	9
1.2.2 Inhaltsstoffe und Zusammensetzung.....	10
1.2.2.1 Polyphenolische Bestandteile	11
1.2.3 Fermentation.....	12
1.2.4 Physiologische Effekte	13
1.3 Metabolismus und Nutrikinetik	15
1.3.1 Metabolismus von Flavonoiden	18
1.3.1.1 Metabolismus von Flavonolen	18
1.3.1.2 Metabolismus von Flavonen	25
1.4 Countercurrent Chromatography (CCC).....	26
1.4.1 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC).....	28
1.5 Zielsetzung und Problemstellung.....	29
2 Ergebnisse und Diskussion	31
2.1 Analyse von Rooibos (<i>Aspalathus linearis</i>)	31
2.1.1 Methanolische Extraktion	31
2.1.1.1 Quantifizierung der Hauptflavonoide	35
2.1.1.2 Gesamtpolyphenolgehalt und antioxidatives Potential.....	37
2.1.1.3 Anreicherung von Polyphenolen durch Polyamid-Säulenchromatographie.....	40
2.1.1.4 Bestimmung von Flavan-3-olen (Catechinen)	43
2.1.1.5 Bestimmung von Hydroxyzimtsäurederivaten (Chlorogensäuren)	44
2.1.2 Bestimmung von Proanthocyanidinen	45
2.1.3 Bestimmung von Spaltprodukten nach Phloroglucinolyse	48
2.1.4 Bestimmung der Lagerstabilität von Rooibosflavonoiden.....	51

2.1.4.1	Fertiggetränke	51
2.1.4.2	Inkubation von Aspalathin und Nothofagin.....	53
2.2	1. Humanstudie: Rooibostee & aktive Fraktion.....	57
2.2.1	Bioverfügbarkeitsstudien mit Rooibos.....	57
2.2.2	Studiendesign	57
2.2.3	Isolierung der aktiven Fraktion	59
2.2.4	Quantifizierung der Prüfprodukte	64
2.2.4.1	Rooibostee.....	64
2.2.4.2	Aktive Fraktion	65
2.2.5	Grundlagen zur Plasma- und Urinaufarbeitung	66
2.2.5.1	Entwicklung einer Methode zur Plasmaaufarbeitung.....	68
2.2.5.2	Entwicklung einer Methode zur Urinaufarbeitung	74
2.2.6	Synthese wichtiger Metabolite des Aspalathins.....	78
2.2.6.1	Methylierung von Aspalathin	78
2.2.6.2	Glucuronidierung von Aspalathin.....	79
2.2.6.3	Sulfatierung von Aspalathin	79
2.2.7	Qualitative Analyse der Urin- und Plasmaproben.....	82
2.2.7.1	Urin	82
2.2.7.2	Plasma	95
2.2.8	Quantitative Analyse der Urin- und Plasmaproben.....	100
2.2.8.1	Urin	100
2.2.8.2	Plasma	110
2.2.9	Antioxidatives Potential der Plasmaproben (ORAC).....	116
2.3	2. Humanstudie: frisches & gelagertes Fertiggetränk.....	119
2.3.1	Quantifizierung der Prüfprodukte	119
2.3.2	Qualitative Analyse der Urin- und Plasmaproben.....	120
2.3.2.1	Urin	120
2.3.2.2	Plasma	122
2.3.3	Quantitative Analyse der Urin- und Plasmaproben.....	123
2.3.3.1	Urin	123
2.3.3.2	Plasma	129
3	Zusammenfassung.....	135
4	Material und Methoden	139
4.1	Pflanzenmaterial	139
4.2	Chemikalien und Lösungsmittel	139
4.3	Geräte und Parameter.....	141
4.3.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	141
4.3.1.1	Fließmittel, Gradienten und Säulen für die HPLC und LC-MS/MS	142

4.3.2	Massenspektrometrie (LC-MS).....	145
4.3.3	High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC).....	146
4.3.3.1	Fließmittelsysteme und Parameter für die HSCCC	146
4.3.4	NMR-Spektroskopie.....	146
4.4	Standardmethoden.....	147
4.4.1	Extrahierbare Feststoffe (TSS).....	147
4.4.2	Antioxidatives Potential (TEAC).....	147
4.4.3	Gesamtpolyphenolgehalt (nach Folin-Ciocalteu).....	148
4.4.4	Verteilungsversuche für die HSCCC	149
4.4.5	Arbeitsschritte am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung (Universität Hannover).....	150
4.4.5.1	Herstellung der Prüfprodukte.....	150
4.4.5.2	Gewinnung der Plasmaproben	150
4.4.5.3	Stabilisierung der Urinproben.....	150
4.5	Analytische und präparative Methoden	150
4.5.1	Flavonoidbestimmung nach methanolischer Extraktion	150
4.5.2	Flavonoidbestimmung nach wässriger Extraktion	152
4.5.3	Polyphenolanreicherung durch Polyamid-Säulenchromatographie	152
4.5.4	Bestimmung der Flavan-3-ole (Catechine)	154
4.5.5	Bestimmung der Hydroxyzimtsäurederivate.....	154
4.5.6	Bestimmung der Proanthocyanidine	156
4.5.7	Bestimmung der Spaltprodukte nach Phloroglucinolyse	157
4.5.8	Analyse der Lagerproben	158
4.5.9	Inkubation von Aspalathin und Nothofagin	159
4.5.10	Isolierung der aktiven Fraktion	160
4.5.11	Quantifizierung der Prüfprodukte	161
4.5.11.1	Aktive Fraktion.....	161
4.5.11.2	Rooibostee	162
4.5.11.3	Fertigetränke.....	162
4.5.12	Entwicklung einer Methode zur Plasma- und Urinaufarbeitung.....	162
4.5.12.1	Plasmaaufarbeitung	163
4.5.12.2	Urinaufarbeitung	164
4.5.12.3	Berechnung der Fläche unterhalb der Konzentrations-Zeit-Kurve	166
4.5.13	Synthese von Aspalathinderivaten	167
4.5.13.1	Methylierung von Aspalathin.....	167
4.5.13.2	Sulfatierung von Aspalathin.....	167
4.5.13.3	Glucuronidierung von Aspalathin	167
5	Literatur.....	169
6	Anhang	183

6.1	Ein- und Ausschlusskriterien zur Teilnahme an den Humanstudien	183
6.2	Während des Studienzeitraums zu meidende flavonoidreiche Lebens- und Genussmittel	184
6.3	Standardisierte und energieadjustierte Kost während der Untersuchungstage	185
6.4	Flavonoidgehalte der Rooibosformulierungen	186
6.4.1	Rooibostee	186
6.4.2	Aktive Fraktion	186
6.4.3	Frisches und gelagertes Fertiggetränk	187

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

ABC	ATP-Binding Cassette
ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
ACN	Acetonitril
amu	Atomic Mass Unit
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (Area under the Curve)
BPC	Base Peak Chromatogram
C	(+)-Catechin
c_{IVmin}/c_{IVmax}	Minimal- bzw. Maximalkonzentration am jeweiligen Zeitpunkt bzw. -intervall
c_{max}	quantifizierte Höchstmenge
CCC	Countercurrent Chromatography
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COSY	Correlated Spectroscopy
C-PG	(+)-Catechin-(4 α →2)-phloroglucinol
CQA	Caffeoylchinasäureester
d	Tag(e)
DAD	Diodenarray-Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
dd	Dublett vom Dublett
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DIN	Deutsche Industrienorm
DMF	Dimethylformamid
DMSO-D ₆	deutერიertes Dimethylsulfoxid
E	Extinktion
EC	(-)-Epicatechin
EC-PG	(-)-Epicatechin-(4 β →2)-phloroglucinol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	Extracted Ion Chromatogram
ESI	Electrospray Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
F	Fraktion
FQA	Feruloylchinasäureester
Gal/-gal	Galactose bzw. -galactosid
GC	Gaschromatographie
GlcS/-glcS	Glucuronsäure bzw. -glucuronid
Glu/-glu	Glucose bzw. -glucosid
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSCCC	High-Speed Countercurrent Chromatography

HSCQ	Heteronuclear Single Quantum Coherence
i. D.	im Durchmesser
ID	Innendurchmesser
ISO	International Organization for Standardization
ISTD	Interner Standard
<i>J</i>	Kopplungskonstante in Hertz
K	Verteilungskoeffizient
KS	Kühlschrank
LC	Liquid Chromatography
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LP	Lower Phase
LOQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
LS	Lichtschutz
m	Multipllett
<i>m/z</i>	Verhältnis Masse-zu-Ladung
[M-H] ⁻	Pseudomolekülion im negativen Modus
MA	Methylaspalathin
Me	Methyl
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MRP	Multidrug Resistance Protein
MS	Massenspektroskopie
Na ₂ H ₂ EDTA	Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat
NAT	N-acetyl Transferase
ND	nicht detektiert
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PA	Polyamid
p.a.	pro analysi
<i>p</i> CouQA	<i>p</i> -Cumaroylchinasäureester
PG	Phloroglucinol
R ²	Bestimmtheitsmaß
RF	Rooibos fermentiert
RG	Rooibos grün (unfermentiert)
RP	Reversed Phase
RRF	Relativer Responsefaktor
R _t	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
Rut/-rut	Rutinose (= α -L-Rhamnosyl- β -D-glucose) bzw. -rutosid
s	Singulett
SAM	S-Adenosylmethionin
sec	Sekunde(n)
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
STABW	Standardabweichung
STD	Standard
SULT	Sulfotransferase
t	Triplett
t _{max}	Zeitpunkt bzw. -intervall der gemessenen Höchstkonzentration c _{max}
<i>t</i> BME	<i>tert.</i> -Butylmethylether
TE	Trolox-Äquivalente

TEAC	Trolox Equivalent Antioxidative Capacity
TK	Tiefkühlraum
Tr	Trockensubstanz
Trolox [®]	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
TS	Trockenschrank
U/min	Umdrehungen/min
UDP	Uridindiphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyl-Transferase
UP	Upper Phase
UV	ultraviolett
VO	Verordnung
WFR	Wiederfindungsrate
δ	chemische Verschiebung in ppm (parts per million)
λ	Wellenlänge in nm
ω	Geschwindigkeit

1 Grundlagen und Kenntnisstand

1.1 Sekundäre Pflanzenstoffe: Polyphenole

Polyphenole werden den sekundären Pflanzenstoffen zugerechnet. Innerhalb der Pflanze besitzen sie die Funktion, z.B. als Giftstoffe „Schädlinge“ zu vertreiben oder als Geruchs- oder Geschmacksstoffe Insekten zur Fortpflanzung anzulocken (MANACH et al., 2004; BELITZ et al., 2008). Daneben schützen sie die Pflanze nicht nur vor den schädlichen Effekten der UV-Strahlung, sondern spielen auch eine entscheidende Rolle in der geschlechtlichen Fortpflanzung (KOES et al., 1994).

Der Begriff „Polyphenole“ wird in der Literatur uneinheitlich verwendet. So kennzeichnet er etwa Verbindungen, die mindestens zwei aromatische Ringe besitzen, von denen jeder mindestens eine Hydroxylgruppe trägt (CLIFFORD, 1999). Diesem Einteilungsschema folgend, gehören Hydroxyzimtsäuren wie z.B. Caffeoylchinasäuren zu den nichtflavonoiden Polyphenolen bzw. „einfachen Phenolen“ (Abbildung 1.1).

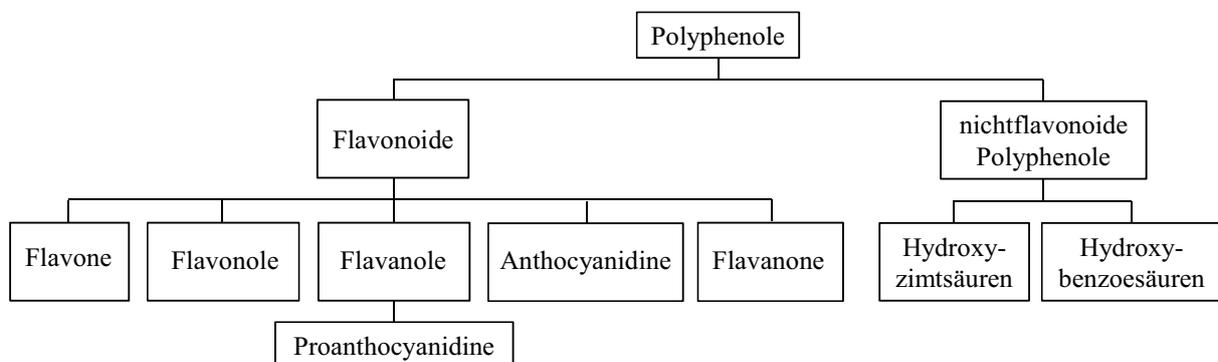


Abbildung 1.1: Klassifizierung der Polyphenole (nach MANACH et al., 2004; IRITI & FAORO, 2009)

Die größte Bedeutung unter den Polyphenolen haben die Flavonoide, deren Name sich von der gelben Farbe (lat. *flavus* = gelb) einiger Vertreter dieser Stoffklasse ableitet. Gegenwärtig sind einige Tausend verschiedene Verbindungen dieser Gruppe in höheren Pflanzen charakterisiert worden, einige Hundert sind in essbaren Pflanzen anzutreffen (WATZL & RECHKEMMER, 2001b; MANACH et al., 2004).

In Abbildung 1.2 ist das Flavonoidgrundgerüst ($C_6-C_3-C_6$ -Körper) dargestellt. Dieses besteht aus zwei aromatischen Ringsystemen (A- und B-Ring), die über den heterozyklischen C-Ring

verbunden sind. Die einzelnen Flavonoidklassen ergeben sich aus dem Oxidationszustand des C-Rings (Pyran-Ring). Hauptunterklassen der Flavonoide sind die Flavonole, Flavan-3-ole, Flavanone, Flavone und Anthocyanidine. Chalkone, Dihydrochalkone, Flavan-3,4-diole und Cumarine stellen Nebengruppen dar.

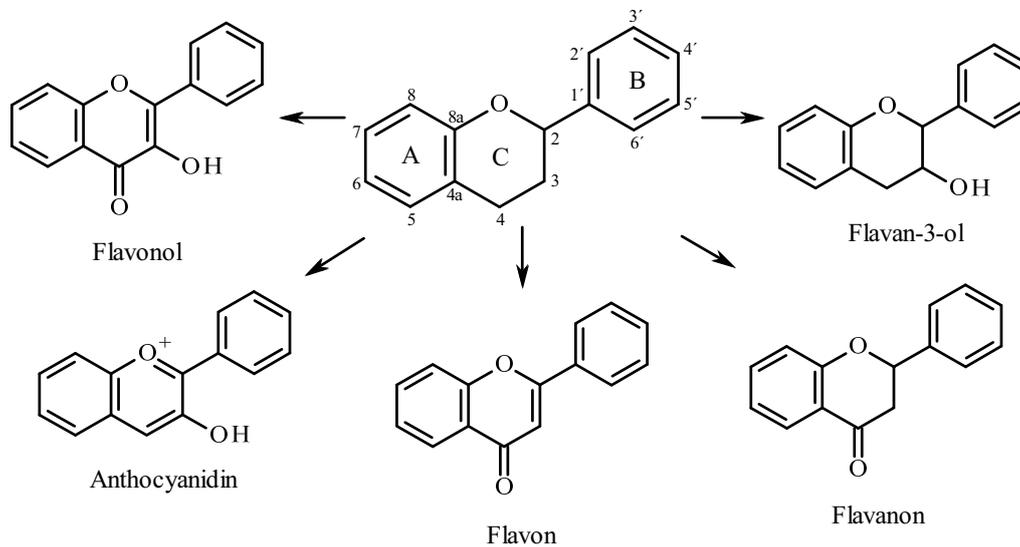


Abbildung 1.2: Grundgerüst der Flavonoide (2-Phenyl-benzopyran) und chemische Struktur der Hauptunterklassen (nach CROZIER et al., 2009)

Die enorme Vielfalt und -zahl der Flavonoide innerhalb der Klassen ergibt sich durch Substitution mit funktionellen Gruppen. Hydroxylgruppen liegen beispielsweise bevorzugt am C-4', C-5 und C-7 vor. Die Mehrheit der Flavonoide kommt natürlicherweise als Glykoside vor. Die glykosidische Bindung befindet sich zumeist an den Hydroxylgruppen der C-Atome C-3 (bei Flavanolen) und C-7. Oft sind auch C-Glykoside vorzufinden. Hier sind die Zucker am C-6 und C-8 gebunden. Während polare Substituenten wie Zucker und Hydroxylgruppen die Wasserlöslichkeit der Flavonoide erhöhen, bewirken unpolare Substituenten wie Methylgruppen den umgekehrten Effekt und verstärken die Lipophilie (MANACH et al., 2004; CROZIER et al., 2009).

Flavonole, Flavone und Flavanone

Flavonole sind die verbreitetsten Flavonoide in Lebensmitteln und kommen in großen Mengen in Zwiebeln, Grünkohl und grünen Bohnen vor (WATZL & RECHKEMMER, 2001b; CROZIER et al., 2009). Oft treten in der Natur Konjugate der Aglyka Quercetin und Kämpferol auf (MANACH et al., 2004 – Abbildung 1.3). Allein von Kämpferol sind rund 200 Glykoside bekannt (CROZIER et al., 2009).

Flavone sind ungeachtet ihrer strukturellen Verwandtschaft in Obst und Gemüse weniger verbreitet als Flavonole. Die überwiegende Zahl der Verbindungen sind Glykoside (zumeist 7-O-Glykoside) der Aglyka Apigenin und Luteolin (Abbildung 1.3). Weiterhin sind methylierte, hydroxylierte sowie O- und C-alkylierte Flavone bekannt. Reich an Flavonen

sind einige Kräuter (z.B. Petersilie und Sellerie). Bestimmte Getreidearten (Weizen und Hirse) enthalten ebenso Flavon-C-glykoside (MANACH et al., 2004; CROZIER et al., 2009).

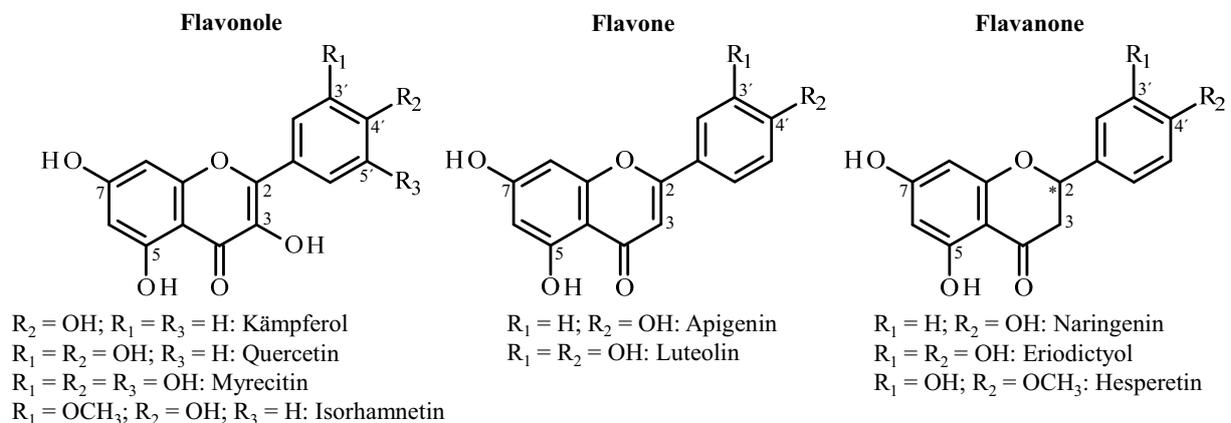


Abbildung 1.3: Chemische Strukturen einiger Flavonoide

Flavanone wie Naringenin, Hesperetin und Eriodictyol (Abbildung 1.3) treten in höheren Konzentrationen in Zitrusfrüchten (z.B. Grapefruit, Zitrone und Orange) auf. Sie sind im Allgemeinen durch ein Disaccharid an Position 7 glykosyliert. Eine Neohesperidose verleiht ihnen einen bitteren Geschmack (z.B. Naringin in Grapefruit), während eine Rutinose geschmacklos ist. Strukturell zeichnen sie sich durch das Fehlen der Doppelbindung am C-2 und C-3 des C-Rings aus, wodurch am C-2 ein Chiralitätszentrum entsteht (MANACH et al., 2004; CROZIER et al., 2009).

Flavan-3-ole (Catechine) und Proanthocyanidine

Die Flavan-3-ole sind die komplexeste Untergruppe der Flavonoide, da sie sowohl in monomerer (\rightarrow Catechine) als auch polymerer Form (\rightarrow Proanthocyanidine) auftreten. Die Struktur der Catechine ist gekennzeichnet durch die Einfachbindung am C-2 und C-3 des heterocyclischen C-Rings, wodurch zwei Chiralitätszentren entstehen. Dadurch führt eine Hydroxylierung am B-Ring zur Bildung von insgesamt vier Isomeren. Zu den wichtigsten zählen die Diastereomerenpaare (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, (+)-Gallocatechin und (-)-Epigallocatechin, (+)-Afzelechin und (-)-Epiafzelechin sowie die korrespondierenden Gallate (CROZIER et al., 2009 – Abbildung 1.4).

Im Gegensatz zu den anderen Flavonoidklassen kommen die Flavan-3-ole nur selten glykosyliert vor (RAAB et al., 2010). Catechine sind in vielen Früchten (z.B. Aprikose, Kirsche und Pfirsich), Rotwein sowie insbesondere in grünem Tee und Schokolade enthalten. Schwarzer Tee weist normalerweise nur geringe Gehalte monomerer Catechine auf, da diese während der „Fermentation“ der grünen Teeblätter enzymatisch zu Oxidationsprodukten wie den orange-roten Theflavinen (Dimere mit einem charakteristischen 1,2-Dihydroxy-3,4-benzotropolonringsystem) und den strukturell kaum charakterisierten, bräunlichen, Thearubiginen (heterogene Polymere) reagieren (MANACH et al., 2004; MENET et al.,

2004; GU et al., 2004; CROZIER et al., 2009; TANAKA et al., 2009), die u.a. für den bitteren Geschmack und die dunkle Farbe verantwortlich sind (TANAKA et al., 2001).

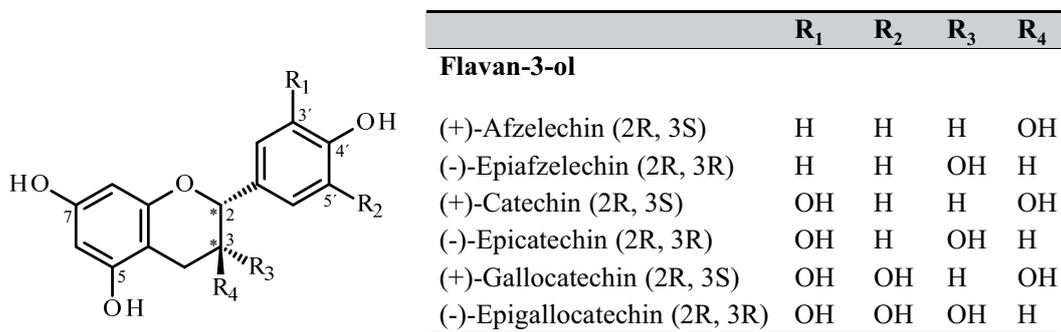


Abbildung 1.4: Chemische Struktur einiger Flavan-3-ole

Proanthocyanidine, auch als kondensierte Tannine bezeichnet, sind Mischungen von dimeren, oligomeren und polymeren Flavan-3-olen, die hauptsächlich über Position C-4→C-8, aber auch über C-4→C-6 (beides B-Typ) verknüpft sind (ARON et al., 2008). Die Flavan-3-ol-einheit kann ebenfalls über eine zusätzliche Etherbrücke zwischen C-2→O-7 konjugiert sein (A-Typ) (Abbildung 1.5).

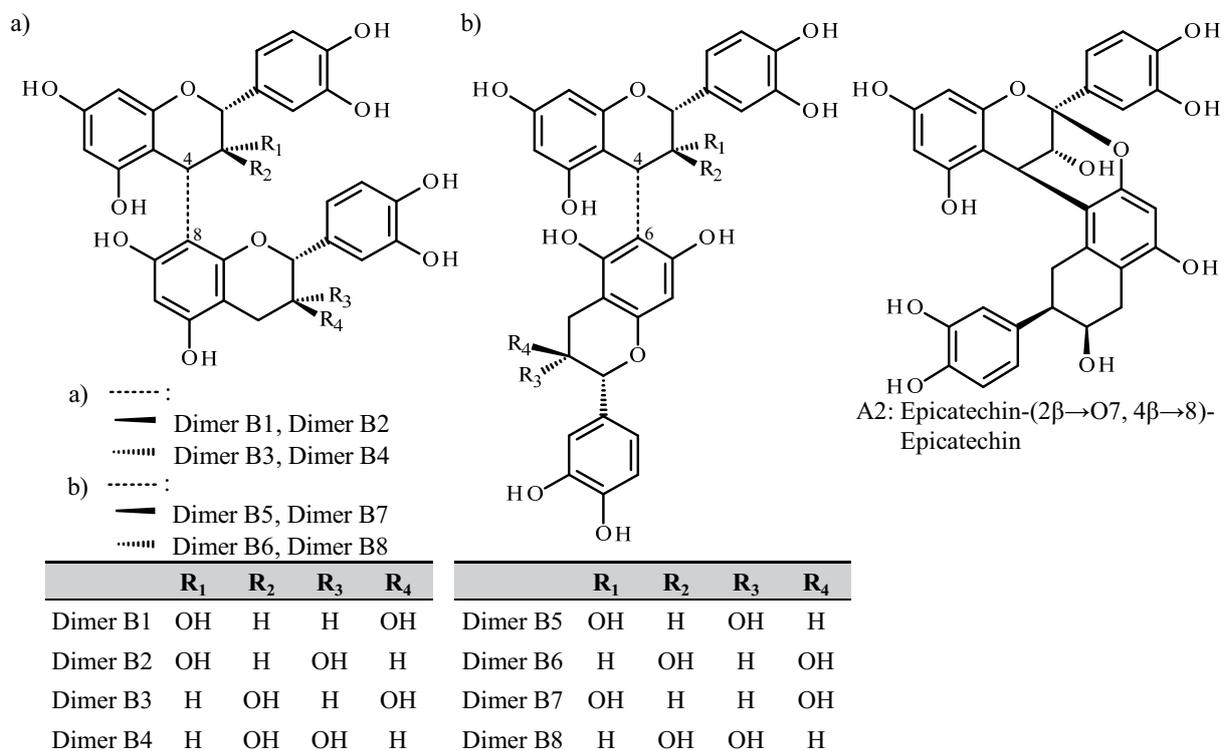


Abbildung 1.5: Chemische Struktur der dimeren Procyanidine des B-Typs (links & Mitte) und des A-Typs am Beispiel des Procyanidins A2 (rechts)

Die Größe des Proanthocyanidinmoleküls wird durch den Polymerisationsgrad beschrieben (2-7 Flavan-3-ol-Einheiten: oligomere bzw. niedermolekulare Proanthocyanidine; > 7 Ein-

heiten: polymere bzw. höhermolekulare Proanthocyanidine – GUYOT et al., 2001; GU et al., 2004). Proanthocyanidine, die ausschließlich aus (Epi)catechineinheiten bestehen, werden auch als „Procyanidine“ bezeichnet. Hauptquellen von Proanthocyanidinen sind verschiedene Früchte, Getreidekörner, Nüsse, Schokolade oder auch Getränke wie Tee, Wein, Kakao und Bier (GU et al., 2004; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2010).

Phenolische Säuren

Neben den Flavonoiden spielen auch die phenolischen Säuren, die sich in die Hydroxybenzoesäuren (C₆-C₁-Körper) und Hydroxyzimtsäuren (C₆-C₃-Körper) unterteilen lassen, eine wichtige Rolle in der Natur. Einige Vertreter dieser Stoffklassen werden in Abbildung 1.6 vorgestellt.

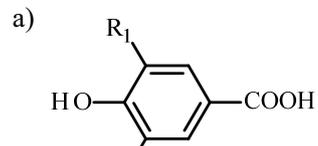
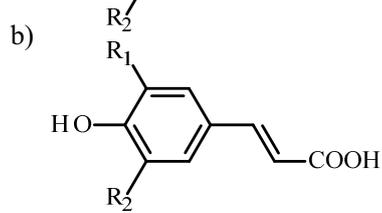
	R ₁	R ₂
a) Hydroxybenzoesäure		
		
<i>p</i> -Hydroxybenzoesäure	H	H
Protocatechusäure	OH	H
Vanillinsäure	OCH ₃	H
b) Hydroxyzimtsäure		
		
<i>p</i> -Cumarsäure	H	H
Kaffeesäure	OH	H
Ferulasäure	OCH ₃	H
Sinapinsäure	OCH ₃	OCH ₃

Abbildung 1.6: Chemische Struktur einiger phenolischer Säuren

Die Hydroxybenzoesäuregehalte essbarer Pflanzen sind mit Ausnahme derjenigen in Zwiebeln insgesamt niedrig. Tee ist daneben eine wichtige Quelle für Gallussäure. Hydroxybenzoesäuren sind auch Bestandteil komplexer Strukturen wie hydrolysierbarer Tannine (z.B. Gallotannine in Mangos) (MANACH et al., 2004; CROZIER et al., 2009).

Hydroxyzimtsäuren sind verbreiteter als Hydroxybenzoesäuren. Bedeutende Vertreter sind *p*-Cumar-, Kaffee-, Ferula- und Sinapinsäure, die abgesehen von verarbeiteten Erzeugnissen (z.B. fermentierte oder sterilisierte Produkte) nur selten in freier Form auftreten. Überwiegend kommen glykosylierte Derivate oder Ester mit China-, Shikimi- und Weinsäure vor. Zu den Hauptquellen von Hydroxyzimtsäuren zählen Heidelbeeren, Kiwis, Pflaumen, Kirschen und Äpfel, wobei Kaffeesäure (in freier und veresterter Form) üblicherweise 75-100 % des Hydroxyzimtsäuregesamtgehalts der meisten Früchte ausmacht (WATZL & RECHKEMMER, 2001a; MANACH et al., 2004; CROZIER et al., 2009, PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2010).

Sehr oft ist Chlorogensäure anzutreffen, die aus Kaffee- und Chinasäure aufgebaut ist. Diese Verbindung kommt in vielen Früchten und in hohen Konzentrationen im Kaffee (70-350 mg/Tasse) vor (MANACH et al., 2004). Die Hauptuntergruppen der Chlorogen-

säureisomere im Kaffee sind die Caffeoyl-, Feruloyl- und Dicaffeoylchinasäureester, die 98 % der Chlorogensäurezusammensetzung ausmachen (CLIFFORD, 1999; PERRONE et al., 2008). Das Chlorogensäureprofil stellt einen wichtigen Parameter zur Evaluierung der Qualität eines Kaffees dar (MOREIRA et al., 2001).

1.1.1 Biosynthese der Polyphenole

Die Biosynthese der Flavonoide und phenolischen Säuren ist ein komplexer Prozess, der vornehmlich unter Beteiligung des Shikimisäure- (C_6-C_1 -Körper), Phenylpropanoid- (C_6-C_3 -Körper) und Flavonoid-Wegs abläuft. Die nichtflavonoiden Polyphenole werden auf dem Shikimisäure- und Phenylpropanoid-Weg synthetisiert, während die Flavonoidstruktur ($C_6-C_3-C_6$ -Grundgerüst) durch Kombination dieser beiden unabhängigen Biosynthesewege entsteht (CROZIER et al., 2009).

Der erste Schritt des Shikimisäure-Wegs umfasst die aldolartige Kondensation von Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-Phosphat (DEWICK, 1994). Über mehrere Zwischenstufen entsteht Shikimisäure, die über Phenylalanin nach Desaminierung zu Zimtsäure und schließlich *p*-Cumaroyl-CoA umgesetzt wird. Die beiden zuletzt genannten Verbindungen stellen die Ausgangsstoffe für die Substanzklassen der Hydroxyzimtsäuren und -benzoesäuren sowie der Depside (Ester einer aliphatischen mit einer aromatischen Hydroxycarbonsäure) dar (CROZIER et al., 2009).

Die Synthese der Flavonoide erfolgt durch die Kondensation von drei Malonyl-CoA-Einheiten mit der aktivierten *p*-Cumarsäure zu einem Naringeninchalkon, von dem sich letztendlich alle Flavonoidklassen ableiten (Abbildung 1.7). Der aromatische B-Ring sowie die Verbindung von A- und B-Ring des Chalkons gehen auf die aktivierte *p*-Cumarsäure zurück, der A-Ring auf die Malonyl-CoA-Einheiten (HELLER & FORKMANN, 1988; CROZIER et al., 2009).

Die an den Umsetzungen beteiligten Enzyme sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Tabelle 1.1: An der Biosynthese der Flavonoide, Stilbene und phenolischen Säuren beteiligte Enzyme

Abkürzung	Enzym	Abkürzung	Enzym
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase	IFS	Isoflavon-Synthase
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase	FNS	Flavon-Synthase
COMT-1	Kaffeesäure O-Methyltransferase	F3H	Flavanon-3-Hydroxylase
ACoAC	Acetyl-CoA-Carboxylase	FLS	Flavonol-Synthase
4CL	4-Cumarat:CoA-Ligase	F3'H	Flavonoid-3'-Hydroxylase
SS	Stilben-Synthase	DFR	Dihydroflavanol-4-Reduktase
CHS	Chalkon-Synthase	LAR	Leucoanthocyanidin-4-Reduktase
CHI	Chalkon-Isomerase	ANS	Anthocyanidin-Synthase

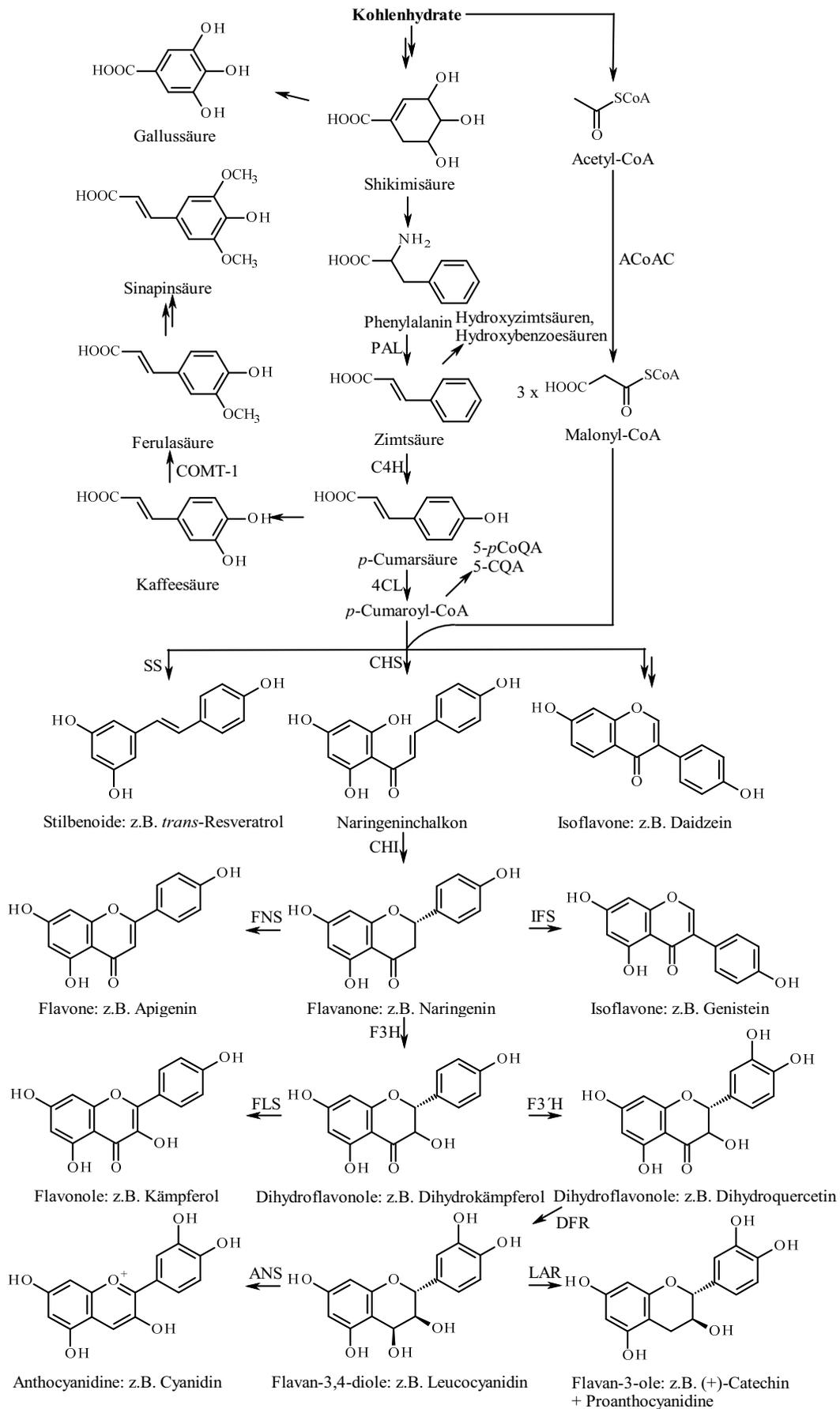


Abbildung 1.7: Biosynthese der Polyphenole (nach HELLER & FORKMANN, 1988; CROZIER et al., 2009). 5-pCouQA, 5-p-Cumaroylchinasäureester; 5-CQA, 5-Caffeoylchinasäureester

Während die Biosynthese der Chalkone und die daran beteiligten Enzyme schon länger bekannt sind, wurde der Biosyntheseweg der verwandten Dihydrochalkone erst vor kurzem aufgeklärt (GOSCH et al., 2010). Der entscheidende Schritt besteht in der Bildung von *p*-Dihydrocumaroyl-CoA aus *p*-Cumaroyl-CoA durch eine NADPH-abhängige Dehydrogenase (Abbildung 1.8 – GOSCH et al., 2010).

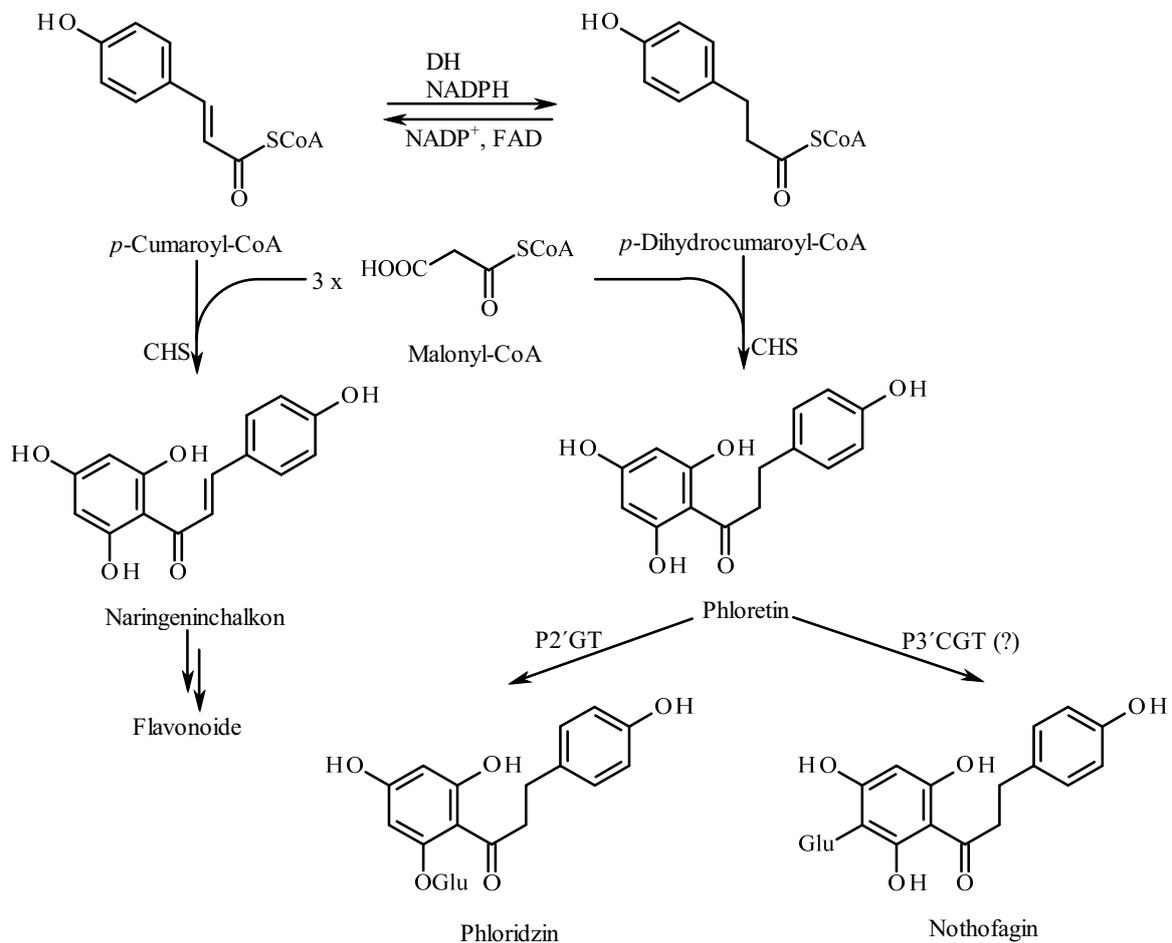


Abbildung 1.8: Biosynthese von Phloridzin, Nothofagin und Flavonoiden (modifiziert nach GOSCH et al., 2010). CHS, Chalkon-Synthase; DH, Dehydrogenase; P2'GT, Phloretin-2'-O-glycosyltransferase; P3'CGT, Phloretin-3'-C-glycosyltransferase; Glu, glucosid

Studien an Chalkon-Synthasen konnten belegen, dass die Bildung der Dihydrochalkone aus *p*-Dihydrocumaroyl-CoA und drei Malonyl-CoA-Einheiten aufgrund struktureller Ähnlichkeit mit den Chalkonen ebenfalls durch Chalkon-Synthasen (CHS) katalysiert wird (GOSCH et al., 2009).

1.2 Rooibos (*Aspalathus linearis*)

Rooibos (*Aspalathus linearis*) ist ein zu den Leguminosen (Fabaceae) gehörender Busch mit nadelartigen Blättern, der an den Berghängen der Zederberge im Südwesten der Republik

Südafrika beheimatet ist. 70 % der Pflanze werden in der Region um die Stadt Clanwilliam angebaut (CHENEY & SCHOLTZ, 1963).

Rooibos gehört zu den wenigen Pflanzen mit wirtschaftlicher Bedeutung, die den Wandel von einem lokalen wildwachsenden Rohstoff zu einer kultivierten Nutzpflanze vollzogen haben (MORTON, 1983). Sein Anbau richtete sich anfangs größtenteils auf die nationale Vermarktung, weshalb CHENEY (1947) die Pflanze aus ökonomischer Sicht als zu unbedeutend erachtete, um in seine Bestandsaufnahme zur Biologie und Ökonomie der Getränkeindustrie aufgenommen zu werden. Sechzehn Jahre später untersuchten CHENEY & SCHOLTZ (1963) seine Botanik, Kultivierung, Ernte und Vermarktung.

Erstmalige Erwähnung fand die Pflanze 1772 durch den Botaniker Carl Thunberg. Die Vermarktung des Rooibostees in Südafrika und Europa begann 1902 und wurde insbesondere durch den russischen Teehändler Barend Ginsberg intensiviert. Der feldmäßige Anbau wurde ab den 1930er Jahren vorangetrieben und ist dem Arzt Dr. P. le Fraiss Nortier zu verdanken (South African Rooibos Council – <http://rooibosforlife.com/rooibos-geschichte/9-rooibos-eintee-mit-geschichte>).

Andere Bezeichnungen für Rooibos sind *Rotbusch*, *Redbush*-, *Redbos*- und *Koopmans-Tea*. Ursprünglich kommt der Name aus dem Afrikaans, einer der elf Amtssprachen in Südafrika (rooi: "rot"; bos: "Busch"). Auf dem deutschen Markt wurde der Tee früher auch als *Roter Busch-Tee* oder *Massai-Tee* vertrieben (BENK, 1961).

Vom Aussehen her handelt es sich um einen niedrigen, aufrecht wachsenden und kaum gestielten Halbstrauch mit Wuchshöhen von etwa 1,4-2 m und rutenartigen, leicht zerbrechlichen Zweigen. Die Pflanze besitzt eine feste Pfahlwurzel; die Zweige sind rot-braun gefärbt und ca. 60 cm lang. Die Blätter sind linear, nadelartig und haben eine Größe von 2-6 cm. Die gelben, ca. 6,5 mm langen Blüten besitzen eine erbsenartige Form und sind in kleinen Gruppen angeordnet. Die etwa 1,5 cm große und flaumige Samenschale beinhaltet einen einzigen kleinen, harten, gelben und nierenförmigen Samen (MORTON, 1983).

Rooibos erfreut sich auf dem deutschen Markt wachsender Beliebtheit. Der Absatz betrug 2009 2588 Tonnen und lag damit auf Platz fünf der Monosorten-Kräuter- und Früchtetees. Spitzenreiter in dieser Gruppe ist nach wie vor die Pfefferminze mit 5950 Tonnen (WKF, 2010).

1.2.1 Anbau, Kultivierung und Technologie

Für sein Wachstum benötigt der frostempfindliche Rooibos mediterranes Klima. Er gedeiht ausschließlich in Höhenlagen von 450 bis 900 m. Weitere essentielle Voraussetzungen für einen ertragreichen Anbau sind adäquate Niederschlagsmengen (380-635 mm) und tiefe, gut durchlässige, sandige und saure Böden (pH: 4,5-5,5). Typisch für Leguminosen bildet die Pflanze Knöllchen auf ihren etwa 2 m tief reichenden Wurzeln. Diese dienen als Stickstoffquelle zur Proteinsynthese (CHENEY & SCHOLTZ, 1963).

Setzlinge werden im Abstand von 0,9 m in 2,7 m entfernten Reihen im Hochsommer gepflanzt, wenn diese 3-4 Monate alt sind und Wuchshöhen von 13-18 cm besitzen. Nach 8-12 Monaten werden die Pflanzen auf eine Höhe von ungefähr 30 cm zurückgeschnitten, um eine Verästelung voranzutreiben. Die Ernte kann nach zwei Jahren erfolgen. Der ausgewachsene Strauch liefert 113-226 g trockenen Tee pro Ernte (MORTON, 1983), wobei zur Teeproduktion ausschließlich dessen Blätter und Pflanzenstängel eingesetzt werden.

Die Ernte erfolgt in der Wachstumsruhephase des Strauches vom Sommer bis Frühherbst. Bei einer Höhe von ungefähr 45 cm werden die Stiele abgeschnitten, in Bündeln zusammengeschnürt und zu Sammelstellen transportiert. Nach einer Welkphase wird das Pflanzenmaterial in 2-5 mm große Stücke geschnitten, auf Betonflächen ausgelegt, mit Wasser befeuchtet (10 L pro 35 kg Pflanzenmaterial), zum Austreten des Zellsaftes maschinell gequetscht sowie gewendet und zur Anregung der Enzymaktivität dreimal gewässert. Das Pflanzenmaterial wird aufgehäuft und mit Säcken bedeckt. Im Anschluss erfolgt die „Fermentation“ für 8-24 h. Der grüne (unfermentierte) Rooibos wird diesem Prozess nicht unterzogen. Abschließend wird das Pflanzenmaterial auf Trocknungsfeldern auf einen Wassergehalt von ungefähr 11 % eingestellt, mehrfach gesiebt, mit Wasserdampf bei 100 °C sterilisiert, erneut auf eine Restfeuchte von rund 10 % gebracht, verpackt und zum *Rooibos Tea Control Board* nach Clanwilliam verfrachtet. Diese Institution dokumentiert und kontrolliert Produktionsmengen, Hygiene und Qualität der Ware. Der Rooibos lagert dort mindestens drei Monate, bevor er zur Auslieferung freigegeben wird (CHENEY & SCHOLTZ, 1963; MORTON, 1983; BRAMATI et al., 2002). Für eine weltweite Versendung wird der Tee via LKW und Zug in den rund 250 km entfernten Containerhafen Kapstadts transportiert.

1.2.2 Inhaltsstoffe und Zusammensetzung

Eine Tasse Tee enthält je nach Zubereitung ungefähr 0,07 mg Eisen, 0,22 mg Fluor, 7,12 mg Kalium, 1,09 mg Calcium, 0,07 mg Kupfer, 1,67 mg Magnesium, 0,04 mg Mangan, 6,16 mg Natrium und 0,04 mg Zink (HEGNAUER & HEGNAUER, 2001).

Unklarheit besteht beim Vitamin C. HESSELING et al. (1979) und MORTON (1983) publizierten Gehalte von 121,8-154,9 $\mu\text{mol/L}$ im Teeaufguss bzw. $\leq 15,7$ mg/100 mg in der Trockensubstanz. Bei einer neueren Studie gelang der Nachweis des Vitamins jedoch weder im grünen noch im fermentierten Rooibos (ERICKSON, 2003).

Im ätherischen Öl des Rooibostees konnten insgesamt 99 Verbindungen charakterisiert werden (HABU et al., 1985). Zu den Hauptbestandteilen gehören Guaiacol (24,0 %), ein Isomer von 6-Methyl-3,5-heptadien-2-on (5,2 %) und Damascenon (5,0 %).

1.2.2.1 Polyphenolische Bestandteile

Die erste Charakterisierung phenolischer Rooibosbestandteile wurde von KOEPPEN et al. (1962, 1965, 1966) mittels Papierchromatographie vorgenommen. Dabei gelang der Nachweis des Dihydrochalkon-C-glucosids Aspalathin, der Flavon-C-glucoside Isoorientin (Luteolin-6-C-glucosid) und Orientin (Luteolin-8-C-glucosid) sowie der Flavonol-O-glykoside Isoquercitrin (Quercetin-3-O-glucosid) und Rutin (Quercetin-3-O-rutinosid). SNYCKERS & SALEMI (1974) identifizierten Luteolin und Quercetin im fermentierten Rooibos. Ebenfalls in diesem Pflanzenmaterial wurden von RABE et al. (1994) die Flavon-C-glucoside Isovitexin (Apigenin-6-C-glucosid), Vitexin (Apigenin-8-C-glucosid) sowie Chrysoeriol (3'-O-Methyl-luteolin) und einige phenolische Säuren (Vanillin-, Protocatechu-, Kaffee-, Ferula- und *p*-Cumarsäure) erstmalig charakterisiert. FERREIRA et al. (1995) und MARAIS et al. (2000) bestätigten das Vorkommen des Dihydrochalkon-C-glucosids Nothofagin, der Flavanon-C-glucoside (*S*)- und (*R*)-Eriodictyol-6-C-glucosid sowie Syringasäure und (+)-Catechin. Die chemische Struktur dieser Verbindungen ist in Abbildung 1.9 zusammengefasst.

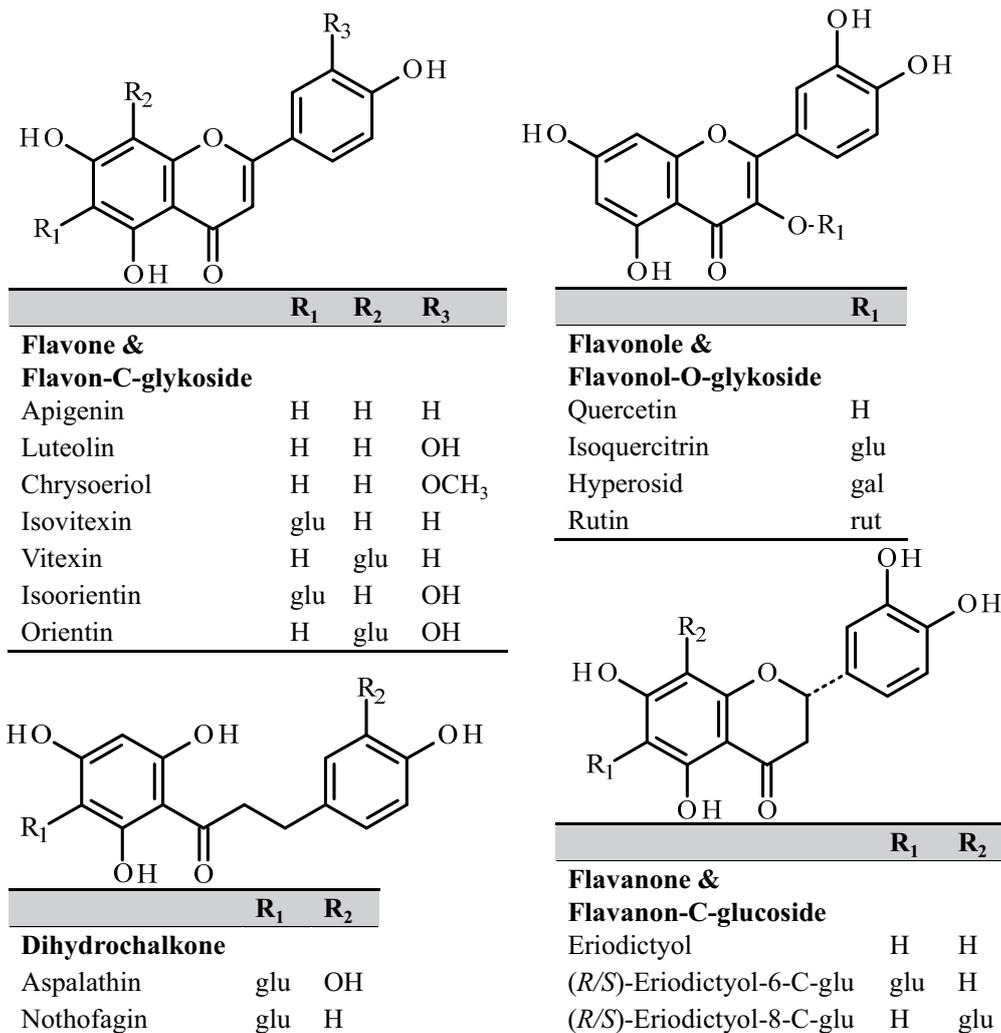


Abbildung 1.9: Chemische Struktur einiger Flavonoide des Rooibos. glu, glucosid; gal, galactosid; rut, rutinosid

Die quantitative Zusammensetzung des Rooibos stellt insofern eine Besonderheit dar, als dass die Dihydrochalkone die dominierende Flavonoidklasse insbesondere des unfermentierten Erzeugnisses sind. Aspalathin (2',3,4',4,6'-Pentahydroxy-dihydrochalkon-3'-C-glucosid) ist hier mit 4,5-12 % das Hauptflavonoid, gefolgt von dem strukturell verwandten Nothofagin mit 0,3-1,3 % (BRAMATI et al., 2003; SCHULZ et al., 2003).

β -Hydroxy-dihydrochalkone kommen selten im Pflanzenreich vor. Neben Aspalathin und Nothofagin ist lediglich Pterosupin bekannt (YOSHIDA et al., 1993; JOUBERT, 1996). Gegenwärtig ist Rooibos die einzige bekannte natürliche Quelle für Aspalathin und neben der Scheinbuche (*Nothofagus fusca*) die einzige für Nothofagin (HILLIS & INOUE, 1967; JOUBERT, 1996). Während der „Fermentation“ werden beide Dihydrochalkone abgebaut (siehe 1.2.3), was sich negativ auf den antioxidativen Status des fermentierten Rooibos auswirkt (siehe 1.2.4).

1.2.3 Fermentation

Der Gesamtpolyphenolgehalt des unfermentierten Rooibos ist signifikant größer als der des fermentierten Erzeugnisses (MARNEWICK et al., 2000; STANDLEY et al., 2001). Diese Diskrepanz wird durch die enzymatischen und chemischen Vorgänge verursacht, die sich während der „Fermentation“ und Verarbeitungsschritte abspielen (JOUBERT, 1996; STANDLEY et al., 2001). Aspalathin wird während dieser Prozesse stark abgebaut (Abbildung 1.10). BRAMATI et al. (2003) beobachteten einen beträchtlichen Abfall der Aspalathingehalte von 49,9 mg/g im Teeaufguss des grünen Rooibos auf 1,2 mg/g in dem des fermentierten Produkts. Auch die C-glykoside Isoorientin, Orientin, Isovitexin, Vitexin und Nothofagin unterliegen einem Abbau, der allerdings deutlich geringer ausfällt.

Aspalathin wird bei der „Fermentation“ durch oxidative Cyclisierung zu den Flavanonen (*R*)- und (*S*)-Eriodictyol-6-C-glucosid sowie (*R*)- und (*S*)-Eriodictyol-8-C-glucosid umgesetzt (KOEPPEN & ROUX, 1966; JOUBERT, 1996; MARAIS et al., 2000). Die beiden 6-C-glucoside können über Isoorientin zu Orientin weiterreagieren (KRAFZCYK & GLOMB, 2008). Der erste Schritt dieser Umsetzungen beginnt mit der Bildung eines intermediären *o*-Chinons, das sich zu einem Chinonmethid umlagern kann. Dieses kann in Gleichgewichtsreaktionen in die (*R/S*)-Eriodictyol-6-C- und -8-C-glucoside überführt werden, wobei die Bildung der beiden 6-C-glucoside begünstigt ist. Die Umsetzung von Isoorientin zu Orientin erfolgt über die Öffnung des heterocyclischen C-Rings, Bindungsrotation und Recyclisierung (KRAFZCYK & GLOMB, 2008).

Nothofagin reagiert vermutlich entsprechend zu den korrespondierenden Flavanonen (*R/S*)-Naringenin-6/8-C-glucosid (KRAFZCYK & GLOMB, 2008; STALMACH et al., 2009).

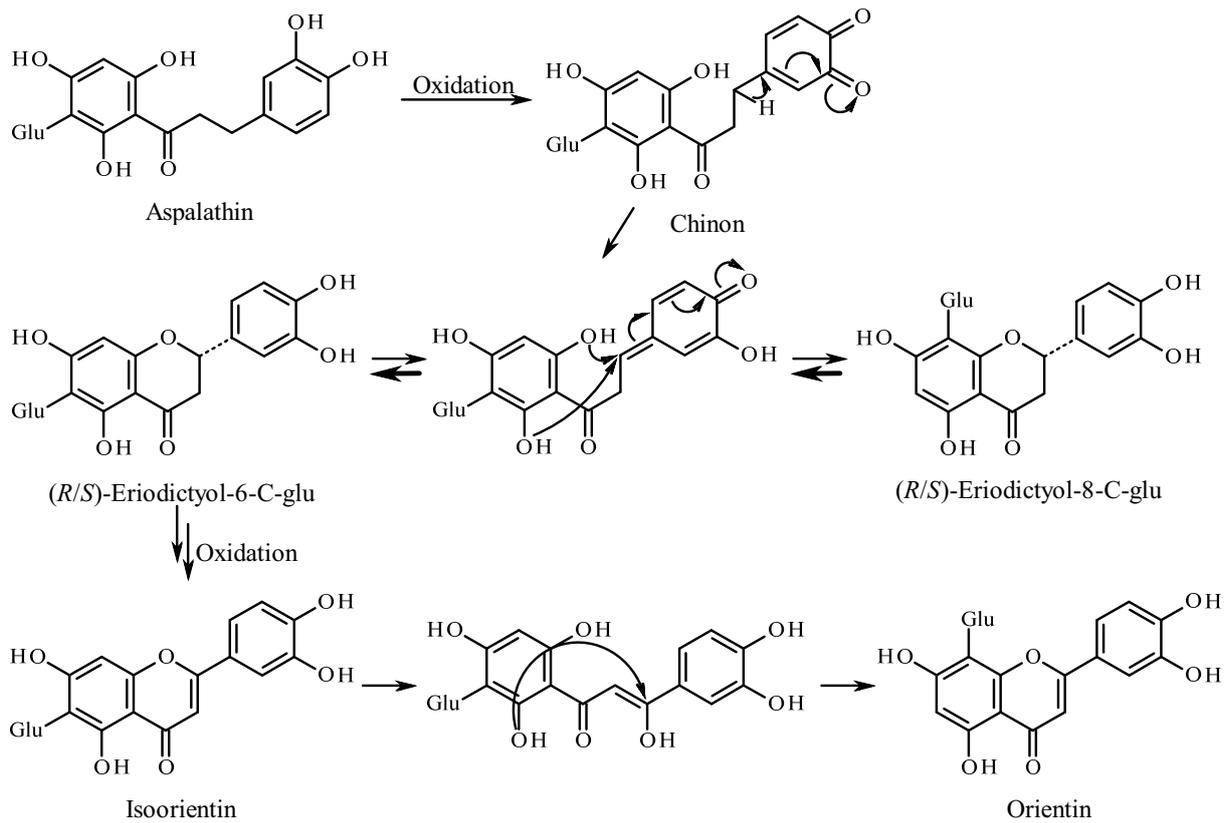


Abbildung 1.10: Oxidative Cyclisierung von Aspalathin zu den (*R/S*)-Eriodictyol-6- und -8-C-glucosiden sowie Weiterreaktion der 6-C-glucoside zu Orientin (nach KRAFZCYK & GLOMB, 2008). Glu, glucosid

1.2.4 Physiologische Effekte

Rooibos weist eine Vielzahl physiologischer Effekte auf. Dazu gehören u.a. antikanzerogene, -mutagene, -oxidative, -HIV und -proliferative Wirkung(en), die durch wissenschaftliche Untersuchungen belegt werden konnten.

Etwaige antikanzerogene Eigenschaften ethanol- bzw. acetonlöslicher Fraktionen des verarbeiteten und unverarbeiteten Rooibos wurden mit einem speziellen Karzinogenese-Testsystem im Tierversuch an Mäusen überprüft (MARNEWICK et al., 2005): Der Tumor (Hautkrebs) bildete sich nach einmaliger und lokaler Applikation von 7,12-Dimethylbenz[*a*]anthracen (DMBA) auf die Haut der Mäuse aus (Initiation). Das Wachstum der infizierten Zellen wurde durch wiederholte lokale Auftragung des Tumorpromotors 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) stimuliert (Promotion). Im Gegensatz zum irreversiblen Initiationschritt ist dieser Prozess reversibel. Die örtliche Auftragung der Rooibosextrakte inhibierte die Promotion deutlich, wobei der fermentierte Rooibos eine 75 %ige und das unfermentierte Produkt eine 60 %ige Hemmung zeigte.

STANDLEY et al. (2001) untersuchten das antimutagene und antioxidative Potential von Rooibostee im Verlauf seiner Herstellung. Die Ergebnisse zeigten, dass das fermentierte Produkt ein signifikant niedrigeres Potential als das unfermentierte Erzeugnis besitzt. Die

größten Verluste ergaben sich durch die „Fermentation“. Als Ursache wurde der wesentlich geringere Gesamtpolyphenolgehalt des fermentierten Produkts angeführt (siehe 1.2.3).

In einer weiteren Studie von SASAKI et al. (1993) wurden die supprimierenden Effekte von Extrakten dreier Teesorten, darunter auch Rooibostee, auf die Induzierung von strukturellen Chromosomenaberrationen in gezüchteten und immortalisierten Zelllinien des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen = Chinese Hamster Ovary) und an Mäusen nach Gabe des zytotoxischen Antibiotikums Mitomycin C sowie des Karzinogens Benzo[*a*]pyren analysiert. In beiden Fällen führte die Applikation des Rooibosextrakts zu einer Verringerung dieser Effekte.

Ferner wurde der Ames-Test unter Verwendung eines histidinauxotrophen *Salmonella typhimurium*-Stamms zur Einstufung der antimutagenen Eigenschaften von wässrigen Extrakten des unfermentierten und fermentierten Rooibos herangezogen (MARNEWICK et al., 2000). Beide Produkte besitzen eine antimutagene Aktivität gegenüber der durch das synthetische Karzinogen 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) und das Schimmelpilztoxin (*Aspergillus flavus* & *A. parasiticus*) Aflatoxin B₁ induzierten Mutagenese. Gegen direkt wirkende Mutagene (z.B. Methylmethansulfonat) war die Wirkung allerdings wesentlich geringer. Der grüne Rooibos zeichnete sich in allen Versuchen durch eine höhere Aktivität im Vergleich zum fermentierten Produkt aus.

Das antioxidative Potential des Rooibos wurde bereits vielfach untersucht. Aspalathin trägt zu ungefähr 43 % zum antioxidativen Gesamtpotential wässriger Extrakte des unfermentierten Ausgangsmaterials bei (SCHULZ et al., 2003) und ist ähnlich potent wie das Flavonol Quercetin (VON GADOW et al., 1997b). Zur Beurteilung der Radikalfängereigenschaften *in vitro* setzten JOUBERT et al. (2005) ein Modell zur Simulation der Lipidperoxidation ein. Unter Lipidperoxidation versteht man den durch Radikale initiierten Abbau von Lipiden. In diesem Fall wurde die dreifach ungesättigte Fettsäure Linolensäure verwendet und die Radikale (Hydroxylradikale) auf Basis der Fenton-Reaktion mit FeCl₃-EDTA und H₂O₂ erzeugt. Die Zugabe des fermentierten und grünen Rooibos führte sowohl zu anti- als auch prooxidativen Effekten. Reines Aspalathin zeigte eine prooxidative Wirkung. Im Einklang mit diesem Ergebnis wurde für den fermentierten Rooibos eine Abnahme dieses Effekts festgestellt.

Alkalische Extrakte des Rooibos zeigten eine starke anti-HIV-Aktivität bei gleichzeitig sehr geringer Cytotoxizität (NAKANO et al., 1997). Das Potential der Testsubstanzen wurde durch den Grad des Schutzes vor HIV-induzierten Zellschäden abgeschätzt. Dazu wurden Zellen (MT-4-Zellen) mit HIV-1-Erregern *in vitro* infiziert und mit den Extrakten behandelt.

LAMOSOVÁ et al. (1997) untersuchten den Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen (2, 10 und 100 %) von Rooibosextrakten auf das Wachstum embryonaler Skelettmuskelzellen von Hühnern. Dabei war eine signifikante Hemmung des Wachstums der Zellen sowie der Fibro- und Myoblasten (Vorläuferzellen der Skelettmuskelfasern) zu beobachten, die auf die Radikalfängereigenschaften des Rooibos zurückgeführt wurden.

Bei weiteren Studien zeigte Rooibos auch neurologische (Schutz vor Schädigung des zentralen Nervensystems) und immunmodulierende Effekte (Unterstützung der Antigen-spezifischen Antikörperproduktion) (INANAMI et al., 1995; SIMON et al., 2000).

1.3 Metabolismus und Nutrikinetik

Der Begriff „Nutrikinetik“ ist der Oberbegriff für die Gesamtheit aller Prozesse, denen Nahrungsmittelbestandteile im Organismus unterliegen, und ähnelt der Definition der „Pharmakokinetik“ in Bezug auf Arzneistoffe. Im Unterschied zu pharmakokinetischen Studien ist der Einfluss diätetischer Interventionen auf die endogenen und exogenen Metabolitlevel in Blut, Urin oder Stuhl der Probanden üblicherweise klein und unterliegt aufgrund genotypischer Vielfältigkeit sowie unterschiedlicher Lebensgewohnheiten und Zusammensetzung der Darmflora starken, individuellen Schwankungen (NICHOLSON et al., 2002; REZZI et al., 2007; VAN VELZEN et al., 2009). Wichtige Voraussetzung zur Ableitung potentiell gesundheitsfördernder Effekte des untersuchten Lebensmittels ist daher, Kenntnis über dessen Zusammensetzung und (bio)aktive Bestandteile sowie deren Metabolismus und Wirkmechanismus zu haben (VAN VELZEN et al., 2009). Die Prozesse, die für diese Einschätzung eine Rolle spielen, sind die Resorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion dieser Wirkstoffe (Abbildung 1.11).

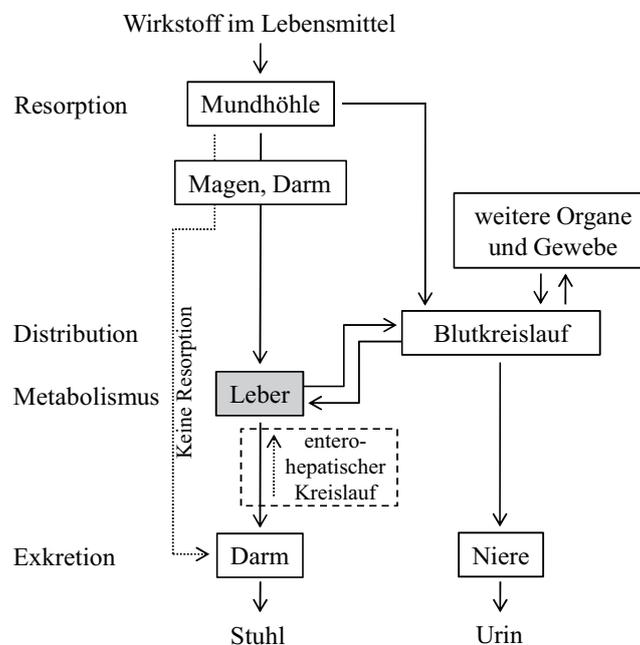


Abbildung 1.11: Nutrikinetik von Nahrungsmittelbestandteilen im Organismus (modifiziert nach GREIM & DEML, 1996; NAU et al., 2002)

Ungeladene und ausreichend lipophile Wirkstoffe können bereits in der Mundhöhle in den zentralen Blutkreislauf gelangen. Das Blut kann sowohl wasserlösliche (im Plasma gelöste),

als auch lipophile (reversibel an Plasmaproteine - z.B. Plasmaalbumin - gebundene) Stoffe transportieren. Der Hauptresorptionsort sind jedoch die Epithelien des Magen-Darm-Trakts mit ihrer sehr großen Oberfläche (0,05-100 m²).

Der Transfer der Wirkstoffe durch biologische Zellmembranen kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Lipophile Substanzen können durch die Doppellipidschicht der Zellmembranen diffundieren (passive Diffusion). Unter konvektivem Transport (Filtration) versteht man die Membranpermeation durch Membranporen (Gap Junctions), die von Transmembranproteinen (Connexine) gebildet werden. Dieser Resorptionsweg stellt ebenfalls einen passiven Transportmechanismus dar und ist für ionisierte sowie kleine hydrophile Moleküle (z.B. Harnstoff) zugänglich. Daneben kann der Transport aktiv unter Energieverbrauch gegen einen Konzentrationsgradienten mittels Carrier-Proteinen erfolgen. Bei dem Trägermolekül handelt es sich um ein membranfixiertes Enzym, zumeist eine Adenosin-triphosphatase. Neben dem aktiven Transport ist auch die erleichterte Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten Carrier-vermittelt, verbraucht aber keine Energie (Sättigungskinetik) (GREIM & DEML, 1996; NAU et al., 2002; LÖFFLER, 2008).

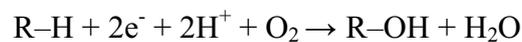
Ein bekannter aktiver Transporter ist der Natrium/Glucose-Cotransporter 1 (SGLT1 – siehe 1.3.1.1), der dafür verantwortlich ist, in einem sekundär aktiven Transport bevorzugt Galactose und Glucose aus dem Darm zu resorbieren. Unter dieser Transportform versteht man die passive Beförderung eines Ions (Na⁺) entlang eines elektrischen Gradienten unter Ausnutzung der potentiellen Energie dieses Gradienten zum Transport eines zweiten Substrats gegen dessen Konzentrationsgradienten in gleicher (Symport) oder entgegengesetzter (Antiport) Richtung (GREIM & DEML, 1996; NAU et al., 2002; LÖFFLER, 2008).

Über die Pfortader werden die resorbierten Wirkstoffe zur Leber, dem Hauptmetabolisierungsorgan, transportiert. Die ersten Biotransformationen finden bereits während der Darmwandpassage (First-Pass-Effekt – siehe 1.3.1.1) und anschließend vor allem in der Leber statt. Erst danach erreichen die metabolisierten Verbindungen (und der unmetabolisierte Teil) die systemische Blutzirkulation. Der First-Pass-Effekt führt somit zu einer verringerten Bioverfügbarkeit der intakten Wirkstoffe. Diese ist definiert als Anteil der Wirkstoffe, der unverändert in den großen Blutkreislauf gelangt, und ist proportional der Fläche unterhalb der Blut/Plasma-Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC, Area under the Curve) (GREIM & DEML, 1996; NAU et al., 2002). Die Bioverfügbarkeit polyphenolischer Nahrungsbestandteile wird durch verschiedene Faktoren beeinträchtigt, die diese direkt oder durch Verringerung des Polyphenolgehalts beeinflussen können. Beispiele sind externe (Umwelteinflüsse wie Sonneneinstrahlung und Reifegrad), herstellungs- (z.B. Wärmebehandlung und Homogenisierung), lebensmittel- (Matrix) und stoffspezifische (z.B. chemische Struktur, Gehalt im Lebensmittel und verabreichte Dosis) sowie wirtbezogene (z.B. Alter, Geschlecht, Erkrankungen, Zusammensetzung der Mikroflora und Enzymaktivität) Faktoren (D'ARCHIVIO et al., 2010).

Die Biotransformationen in Leber, Darm und Niere werden durch metabolisierende Enzyme, die im endoplasmatischen Retikulum und Zytosol lokalisiert sind, katalysiert und führen zu

einer Zu- oder Abnahme der biologischen Aktivität des jeweiligen Wirkstoffs. Ziel dieser Umsetzungen ist, dessen Exkretion aus dem Körper durch Erhöhung der Hydrophilie zu verbessern. Die Biotransformationen lassen sich in zwei Phasen einteilen. In der Phase-I werden funktionelle, polare Gruppen (OH-, SH-, NH₂- oder COOH-Gruppen) in die Moleküle eingefügt (Funktionalisierung). Für eine Exkretion nicht ausreichend wasserlöslicher Phase-I-Metabolite dienen diese als Substrate für Phase-II-Reaktionen, die durch Transferasen katalysiert werden. Hier findet eine Konjugation mit endogenen, meist polaren Stoffen statt (Hydrophilisierung) (GREIM & DEML, 1996; NAU et al., 2002).

Zu den Reaktionen der Phase-I gehören beispielsweise mikrosomale Monooxygenierungen, zytosolische und mitochondriale Oxidations- und Reduktionsreaktionen, Epoxidierungen, sowie Hydrolysen. Die bedeutendsten Enzyme der Phase-I-Biotransformationen gehören zu den Cytochrom P450-Monooxygenasen, die ein Sauerstoffatom in das Substrat einfügen. Die Reaktion läuft nach folgender allgemeinen Formel ab:



Die Cytochrom P450-Monooxygenasen sind Häm-Proteine, die aus ca. 500 Aminosäuren bestehen. Das aktive Zentrum ist ein Eisen-(III)-Ion, das äquatorial durch vier Stickstoffatome des planaren Protoporphyrin IX-Ringsystems als prosthetische Gruppe koordiniert ist. Über den hydrophoben N-terminalen Teil ist das Enzym in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert (GREIM & DEML, 1996; NAU et al., 2002). Die Variationsbreite der Cytochrom P450-Enzymfamilie ist der Grund für die große Vielfalt der katalysierten Reaktionen. Die Zahl der Cytochrom P450-Familien liegt inzwischen bei über 500, die ihrerseits noch zahlreiche Unterfamilien besitzen (SOUCEK & GUT, 1992). Die Einteilung der Cytochrom-Enzyme erfolgt nach dem Verwandtschaftsgrad der korrespondierenden Gensequenzen (NAU et al., 2002). Beim Menschen sind 18 Familien (Sequenzhomologie > 40 %) bekannt (CYP1-18). Innerhalb dieser Familien werden CYPs mit Homologien > 55 % in Unterfamilien (beim Menschen 43) eingeteilt (z.B. CYP1A) und deren Isoenzyme (beim Menschen 57) durch eine weitere Zahl definiert (z.B. CYP1A1) (WÄTJEN & FRITSCHKE, 2009).

Die Phase-II-Reaktionen umfassen beispielsweise Glucuronidierungen, Methylierungen, Sulfatierungen und Acetylierungen sowie Glutathion-Konjugationen (GREIM & DEML, 1996; NAU et al., 2002 – siehe Tabelle 1.2).

Durch den Blutstrom werden die metabolisierten Verbindungen (und der unmetabolisierte Teil) im Organismus verteilt, wobei sie zuerst in die gut durchbluteten Gewebe, wie Gehirn, Herz, Leber, Niere und Lunge, gelangen und mit fortschreitender Eliminierung aus diesen auch zuerst entfernt werden. Daneben kann es zu einer Umverteilung in weniger gut durchblutete Kompartimente (Muskel- und Fettgewebe) kommen. Insbesondere lipophile Substanzen können bei längerer Exposition im Fettgewebe akkumulieren (GREIM & DEML, 1996; NAU et al., 2002).

Die Ausschleusung der gebildeten Metabolite aus dem Körper wird unter dem Begriff der Phase-III-Reaktionen zusammengefasst. Dieser umfasst den Transport aus der Zelle durch Transportproteine und Effluxpumpen sowie die Exkretion aus dem Organismus. Letztere erfolgt zumeist renal und biliär. Beim Menschen werden Stoffe mit Molmassen unterhalb von 300 hauptsächlich über die Niere eliminiert (Molekulargewicht < 300-500 D). Größere Substanzen mit polaren Gruppen werden vorwiegend über die Galle durch aktive Transportmechanismen entfernt. Im Dünndarm kann eine Rückresorption erfolgen, gegebenenfalls nach bakterieller Dekonjugation der Metaboliten durch Glucuronidasen oder Sulfatasen (enterohepatischer Kreislauf – siehe 1.3.1.1). Der enterohepatische Kreislauf vermindert etwaige gesundheitsfördernde Effekte der Wirkstoffe, da ein erheblicher Teil der Dosis im Kreislauf gefangen sein kann (GREIM & DEML, 1996; NAU et al., 2002).

Die Eliminierung aus der Zelle wird von membrangebundenen Proteinen oder Proteinkomplexen (ABC-Transporter, ABC = ATP-binding cassette) übernommen, die sowohl spezifisch gegenüber großen, ungeladenen oder kationischen und hydrophoben Verbindungen (MDR1/P-Glycoprotein, MDR = Multi-drug resistance) als auch negativ geladenen Arzneistoff- oder ungeladenen Flavonoidkonjugaten (z.B. MRP1 und -2, MRP = Multi-drug resistance protein & BCRP = Breast cancer resistance protein) sind (KATRAGADDA et al., 2005; SESINK et al., 2005). Während MRP1 in dem meisten Geweben des menschlichen Körpers exprimiert ist (z.B. in Lunge, Leber und Skelettmuskulatur) und an basolateralen Zelloberflächen auftritt, haben P-Glycoprotein, MRP2 und BCRP eine begrenzte Verteilung und sind an der apikalen und teils basolateralen (z.B. MRPs – BORST et al., 2000) Seite von Epithelzellen lokalisiert. Hohe Gehalte dieser Transporter werden an sensiblen Bereichen gefunden, deren Schutz vor Fremdstoffen hohe Priorität hat (z.B. Blut-Hirn-Schranke, Placenta und Darm) (LESLIE et al., 2005).

1.3.1 Metabolismus von Flavonoiden

Aufgrund der physiologischen Wirkungen von Flavonoiden (siehe 1.2.4) in zahlreichen *in vitro*-Testsystemen begann Anfang der 50er Jahre die systematische Erforschung des Flavonoid-Metabolismus. Das Interesse bestand anfangs darin herauszufinden, ob Flavonoide intakt im Urin oder Faeces ausgeschieden werden (CLARK et al., 1950). Danach war die Identifizierung potentieller Flavonoidmetabolite im Fokus (MURRAY et al., 1954; BOOTH et al., 1956). Erst deutlich später wurde die Bedeutung der Mikroflora des Gastrointestinaltraktes bei der Verstoffwechslung der Flavonoide erkannt (BABA et al., 1983; BOKKENHEUSER et al., 1987; WINTER et al., 1989; HEILMANN & MERFORT, 1998a).

1.3.1.1 Metabolismus von Flavonolen

Die Flavonole, die zumeist als O-Glykoside vorkommen, wurden bereits intensiv studiert. Grob skizziert beinhaltet die Aufnahme dieser Verbindungen die Deglykosylierung im

Dünndarm und die anschließende Resorption und Metabolisierung der freigesetzten Aglyka (DE VRIES et al., 1998; HOLLMAN & KATAN, 1998; ERLUND et al., 2000). Daneben gibt es Berichte über eine Resorption der Glykoside in intakter Form (PAGANGA & RICE-EVANS, 1997; HOLLMAN & KATAN, 1998). Über die Konjugation der Flavonole zu Sulfaten und Glucuroniden sowie die O-Methylierung der Catecholgruppe zu Isorhamnetin und Tamaraxetin beim Quercetin wurde im Rahmen von Tier- und Humanstudien berichtet (ZHU et al., 1994; SPENCER et al., 1999; SCALBERT & WILLIAMSON, 2000). Eine Vielzahl phenolischer Säuren wie Hydroxyhippur- und Hydroxyphenylelessigsäuren wurden im Urin als Abbauprodukte der Flavonole identifiziert (GROSS et al., 1996; PIETTA et al., 1997; RECHNER et al., 2002). Einen Überblick über die Verstoffwechslung von Flavonol-O-glykosiden gibt Abbildung 1.12. Auf einige Schritte wird im Folgenden näher eingegangen.

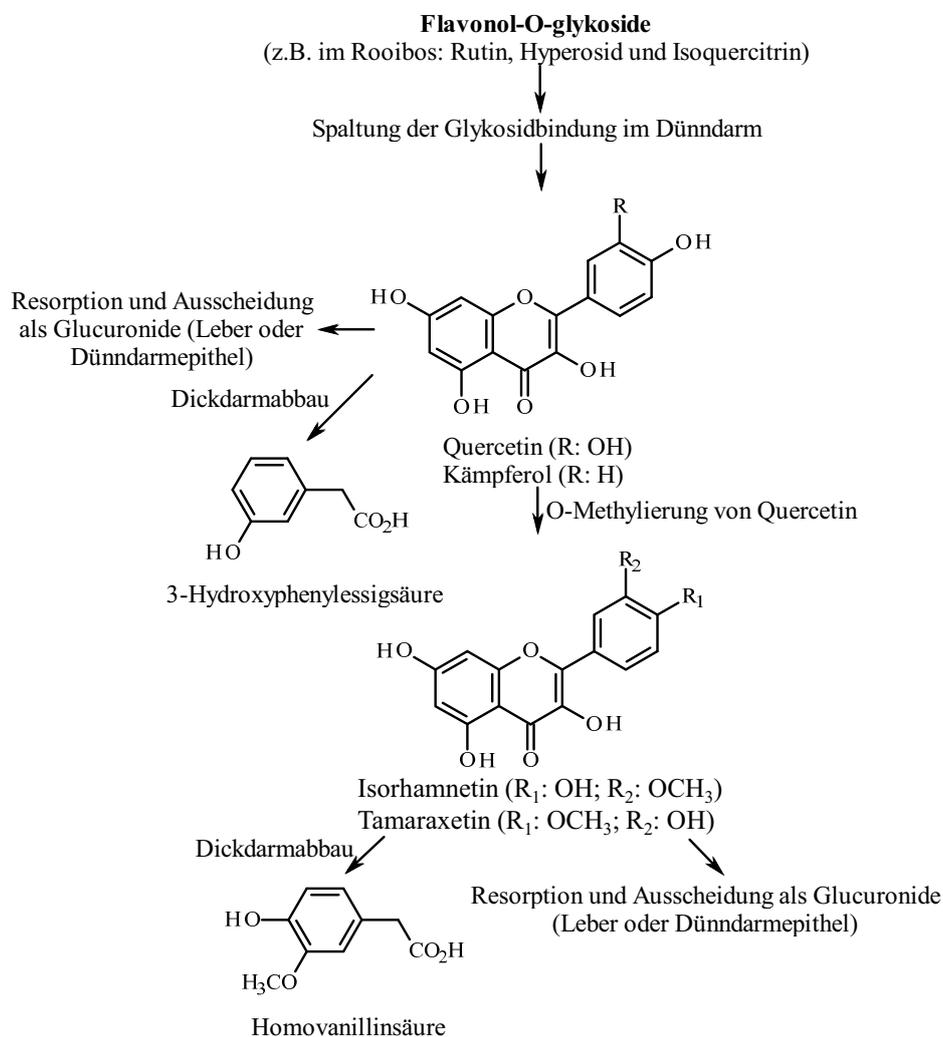


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung der Verstoffwechslung von Flavonolen (modifiziert nach RECHNER et al., 2002)

Deglykosylierung im Dünndarm

Die preabsorptive Deglykosylierung zu den korrespondierenden Aglyka führt zu einer Erhöhung der Lipophilie, so dass eine Resorption durch die Doppellipidschicht der

Zellmembranen über passive Transportmechanismen ermöglicht bzw. erleichtert wird. Verantwortlich für die Abspaltung der/des Zucker(s) sind β -Glykosidasen (z.B. Lactase-Phlorizin Hydrolase (LPH) und zytosolische β -Glucosidase (CBG)), die in der Bürstensaummembran des Dünndarmlumens bzw. im Zytosol der Enterozyten lokalisiert sind (DAY et al., 2000a; DAY et al., 2003; NÉMETH et al., 2003).

Hinsichtlich der O-glykoside von Quercetin beeinflusst die Art des Zuckerrests die Resorption und ist somit ein wichtiger Faktor für deren Bioverfügbarkeit. Während Quercetin-3-O-glucosid und Quercetin-4'-O-glucosid sofort resorbiert wurden, geschah dieses bei Quercetin-3-O-rutinosid nicht. Dessen Bioverfügbarkeit lag trotz höherer Zufuhr nur bei 20 % von der des Quercetin-4'-O-glucosids (HOLLMANN et al., 1997; OLTHOF et al., 2000). In einer weiteren Studie wurde die Fähigkeit zellfreier Extrakte aus menschlichem Dünndarm untersucht, verschiedene (Iso)flavonoid-O-glykoside zu deglykosylieren (DAY et al., 1998). Quercetin-4'-O-glucosid sowie Naringenin- und Apigenin-7-O-glucosid wurden sofort gespalten, während Quercetin-3,4'-di-O-glucosid, Quercetin- und Kämpferol-3-O-glucosid sowie Quercetin-3- und Naringenin-7-O-rhamnoglucosid unverändert blieben. In einer ähnlichen Studie an Ratten unter Testung von fünf Quercetin-O-glykosiden mit einem *in situ* Darmperfusionsmodell ging die Abnahme des Gehalts intakter Quercetin-O-glykoside mit dem verstärkten Auftreten von freiem Aglykon im Perfusat und konjugierten Metaboliten des Quercetins im Plasma einher. Bei Quercetin-3-O-glucosid und -4'-O-glucosid wurde eine Abnahme der Gehalte im Perfusat beobachtet, nicht jedoch für Quercetin-3-O-galactosid, -3-O-arabinosid und -3-O-rhamnosid (ARTS et al., 2004).

Die unterschiedliche Bioverfügbarkeit von verschiedenen Quercetin-O-glykosiden lässt sich daher mit der Substratspezifität der Enzyme erklären (BERRIN et al., 2003). Entscheidend für eine Resorption ist der Zuckertyp, nicht seine Verknüpfungsstelle im Molekül.

Transzellulärer Transport

Die Resorption der freigesetzten Aglyka kann durch passive Diffusion erfolgen (WALGREN et al., 1998; MUROTA et al., 2003). Bei intakten Flavonoiden mit höherer Polarität stehen aktive Transportvorgänge durch Transportsysteme wie dem Natrium/Glucose-Cotransporter 1 (SGLT1) im Vordergrund (HOLLMANN et al., 1995). Die Ergebnisse einer neueren Studie deuten allerdings an, dass SGLT1 Flavonoide nicht transportiert und glykosylierte Flavonoide und einige Aglyka sogar die Fähigkeit besitzen, diesen Carrier zu hemmen (KOTTRA & DANIEL, 2007).

Bereits während des transzellulären Transports ist eine Metabolisierung (vorwiegend First-Pass-Glucuronidierung durch die UDP-Glucuronosyl-Transferasen UGT 1A1, 1A3 und 1A7-9) der Aglyka und intakten Flavonoide in den Dünndarmepithelzellen zu beobachten (CRESPY et al., 1999; SPENCER et al., 1999; ZHANG et al., 2007).

Die Untersuchung der Resorption verschiedener Quercetin-O-glucoside mittels eines *in vitro*-Resorptionsmodells (CaCo-2-Zellschichtmodell) ergab, dass Quercetin-4'-O-glucosid nicht und Quercetin-3,4'-O-diglucosid nur zu einem geringen Anteil resorbiert wird (WALGREN

et al., 1998). Stattdessen wurde ein signifikanter Ausstrom beider Glucoside aus dem Zytosol der Enterozyten in das Darmlumen beobachtet. Dieses Phänomen wurde mit der Beteiligung von Transmembranproteinen (ABC-Transporter → z.B. MRP2) begründet, die in einem primär aktiven Transport Fremdstoffe unter Energieverbrauch (ATP) direkt aus den Zellen herausschleusen und somit die Bioverfügbarkeit einer Verbindung zum Teil drastisch verringern können (WALGREN et al., 2000 – siehe 1.3). Substrate der ABC-Transporter sind nicht nur Glykoside, sondern auch Flavonoidaglyka (WANG et al., 2005) und deren Metabolite (→ v.a. Glucuronide – WALLE et al., 1999; SESINK et al., 2005). Letztere werden auch zur serosalen Seite der intestinalen Epithelzellen durch Transporter (MRPs) befördert (HU et al., 2003; ZHANG et al., 2007). Nach dem Efflux in das Darmlumen kann es zur Rückresorption der Aglyka kommen. Entsprechendes gilt für die glucuronidierten Aglyka nach Hydrolyse durch β -Glucuronidasen (CHEN et al., 2003; ZHANG et al., 2007). Eine schematische Übersicht über die wesentlichen Prozesse des Flavonoidmetabolismus im Dünndarm gibt Abbildung 1.13.

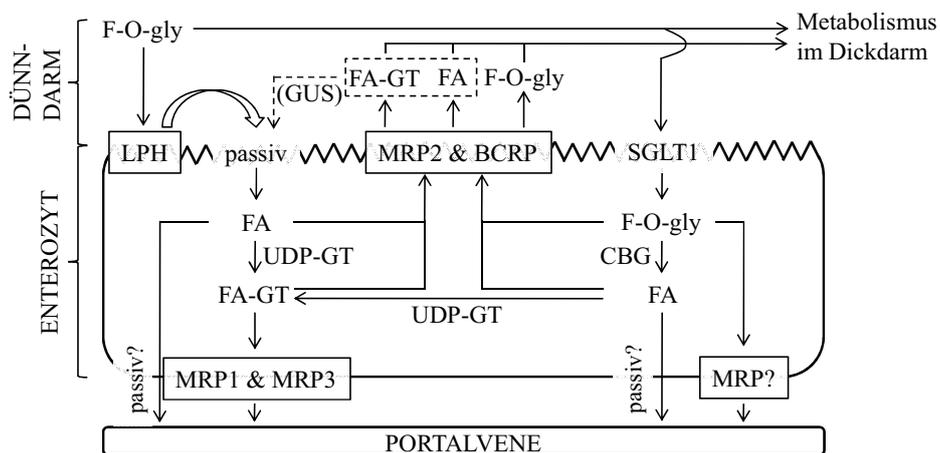


Abbildung 1.13: Schematische Darstellung wesentlicher Schritte des Flavonoidmetabolismus im Dünndarm. F-O-gly, Flavonoidglykosid; FA, Flavonoidaglykon; FA-GT, glucuronidiertes Flavonoidaglykon; LPH, Lactase-Phloridzin-Hydrolase; GUS, β -Glucuronidase; UDP-GT, UDP-Glucuronosyl-Transferase; MRP1-3, Multi-drug resistance protein 1-3; BCRP, Breast cancer resistance protein; SGLT1, Natriumabhängiger Glucosetransporter, CBG, zytosolische β -Glucosidase

Postabsorptive Stoffwechselung

Die resorbierten Verbindungen werden an Plasmaalbumin kovalent gebunden, wobei die Affinität zum Albumin von der chemischen Struktur abhängig ist (MANACH et al., 1996; BOULTON et al., 1998; KALDAS et al., 2005 – siehe 2.2.5.1). Infolge der Adduktbildung ist die Gewebegängigkeit, Integration in Zielstrukturen und damit die biologische Aktivität vermutlich eingeschränkt (DANGLES et al., 2001).

Metabolismus in der Leber

Im Anschluss erfolgt der Transport der Verbindungen über die Portalvene zur Leber, wo eine ausgedehnte Metabolisierung stattfindet (GALIJATOVIC et al., 1999; DAY et al., 2001;

O'LEARY et al., 2003 – siehe 1.3). Eine genaue Übersicht über die dort ablaufenden Phase-II-Reaktionen bietet Tabelle 1.2.

Tabelle 1.2: Detaillierter Überblick über die Phase-II-Reaktionen. UDP, Uridindiphosphat

Reaktion	Enzym	Übertragung von	auf (z.B.)
Glucuronidierung	UDP-Glucuronosyl-Transferase (UDP-GT/UGT)	Glucuronsäure aus Uridindiphosphatglucuronsäure	R-OH R-NH ₂ R-COOH
Sulfatierung	Sulfotransferase (SULT)	Sulfat-Gruppe aus 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat	R-OH R-NH ₂
Methylierung	Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT)	Methyl-Gruppe aus S-Adenosyl-methionin	R-OH R-NH ₂
Acetylierung	N-Acetyl-Transferase (NAT)	Acetyl-Rest aus Acetyl-CoA	R-OH R-NH ₂
Glykosylierung	UDP-Glycosyl-Transferase (UDP-GT)	Glucose aus Uridindiphosphatglucose	R-OH

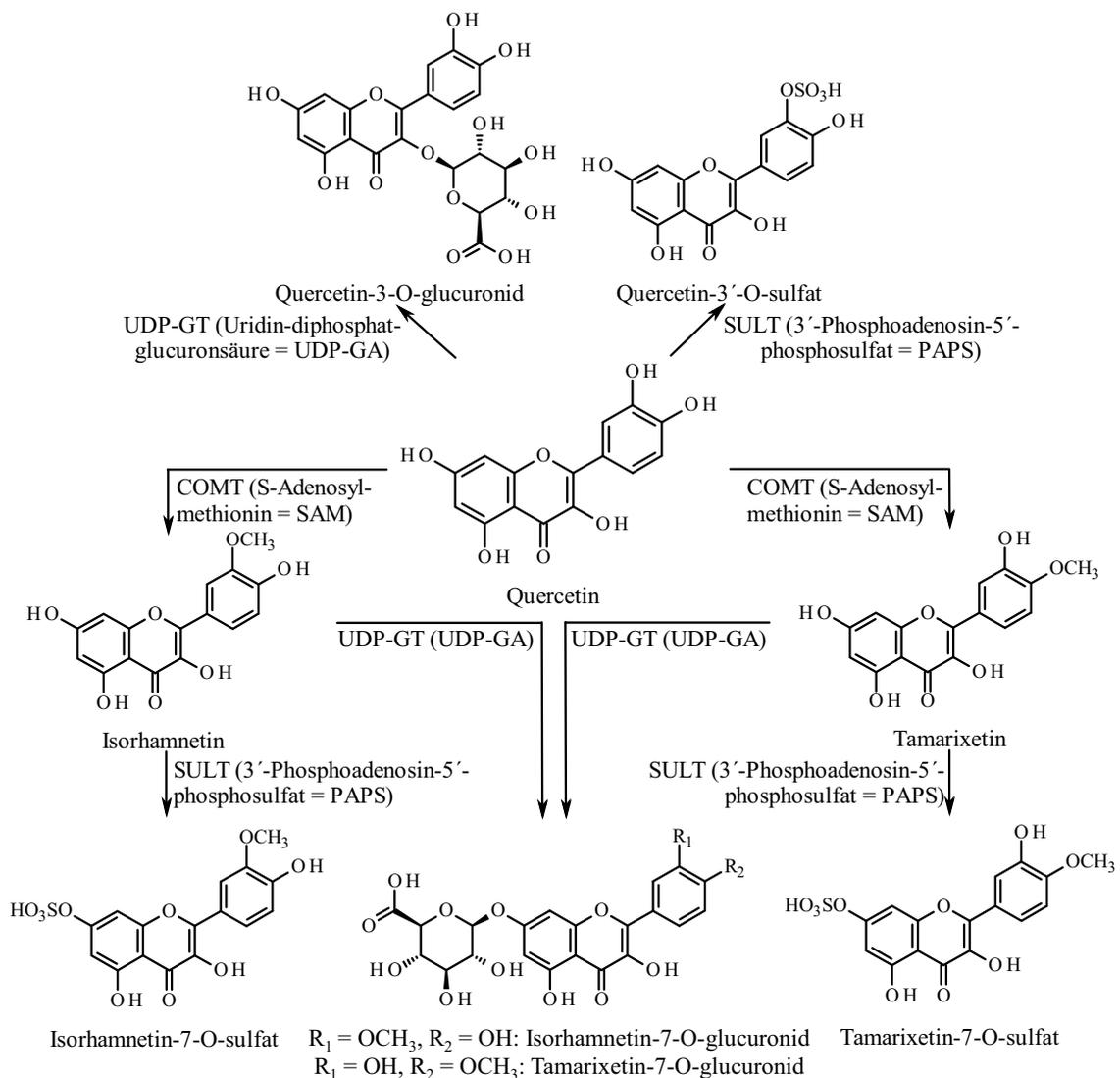


Abbildung 1.14: Schematische Darstellung der Bildung einiger Phase-II-Metabolite von Quercetin unter Angabe der beteiligten Enzyme und Coenzyme bzw. -substrate (siehe **Tabelle 1.2** – modifiziert nach HEILMANN & MERFORT, 1998a)

Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 1.14 einige Phase-II-Metabolite von Quercetin unter Angabe der an den Umsetzungen beteiligten Enzyme sowie Coenzyme bzw. -substrate dargestellt.

Die Leber ist auch an der Ausscheidung konjugierter Flavonoide beteiligt. Verschiedene Tierversuche konnten zeigen, dass die metabolisierten Flavonoide über die Gallenflüssigkeit in Dünn- und Dickdarm ausgeschieden werden und somit einer enterohepatischen Zirkulation unterliegen (WALLE et al., 2001; CHEN et al., 2003; CRESPIY et al., 2003; LIU et al., 2003). Nach intravenöser Verabreichung von Quercetin wurden etwa 35 % der Metabolite des Flavonols über die Galle ausgeschieden (CHEN et al., 2005). An den Transportvorgängen sind auch in der Leber u.a. MRPs beteiligt (ZHANG et al., 2007).

Metabolismus im Dickdarm

Nicht im Dünndarm resorbierte Flavonoide unterliegen im Dickdarm mikrobiellen Abbaureaktionen. Diese führen letztendlich zu niedermolekularen phenolischen Säuren, die ihrerseits rückresorbiert werden können. Die Bildung dieser Katabolite verläuft nach Öffnung des heterocyclischen C-Rings über die Abtrennung des A-Rings vom restlichen Flavonoidmolekül (AHERNE & O'BRIEN, 2002).

Beim Rutin und Quercetin wurden sowohl im menschlichen als auch im tierischen Urin 3,4-Dihydroxyphenyl-, 3-Hydroxyphenyl- und 4-Hydroxy-3-methoxyphenylelessigsäure (= Homovanillinsäure) sowie 3,4-Dihydroxytoluol als potentielle Abbauprodukte charakterisiert (MURRAY et al., 1954; BOOTH et al., 1956; BABA et al., 1983). Die Bildung von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure resultiert vermutlich aus der Spaltung des B-Rings nach der des C-Rings zwischen den Positionen C-1 und C-2 sowie C-3 und C-4 (DEEDS, 1968 – siehe 2.2.7.1). Die anschließende Dehydroxylierung bzw. Methylierung dieser Verbindung führt zu 3-Hydroxyphenylelessigsäure und Homovanillinsäure.

Bei Flavonolen erfolgt auch die Bildung von C₆-C₃-Körpern wie der 3-(3-Hydroxyphenyl)- bzw. 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure, die auch bekannte Metabolite des Dickdarmabbaus der Flavan-3-ole, Flavanone und Hydroxyzimtsäuren (PETRAKIS et al., 1959; JUSTESEN et al., 2000; RECHNER et al., 2002; RECHNER et al., 2004) sind und als mögliche Vorläufer der 3-Hydroxyhippursäure diskutiert werden (BOOTH et al., 1957).

3- und 4-Hydroxyhippursäure wurden neben Hippursäure bei diversen Interventionsstudien als bedeutende renale Ausscheidungsprodukte einer hohen Polyphenolaufnahme identifiziert (PHIPPS et al., 1998; CLIFFORD et al., 2000; RECHNER et al. 2001). Der hypothetische Bildungsweg dieser Verbindungen ist in Abbildung 1.15 exemplarisch für die Rooibosflavonoide Aspalathin und Isoorientin dargestellt. Hauptschritte sind die Biotransformation beider Ausgangsverbindungen zu 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure, gefolgt von β -Oxidation und Glycintransferierung in der Leber. Die Glycinkonjugation ist ein zweistufiger, enzymatischer Prozess, der aus der Aktivierung der Ausgangsverbindung zum Acyl-CoA-Thioester und dem Transfer des Acylrestes auf die Aminofunktion der Aminosäure besteht (HUTT & CALDWELL, 1990).

3-(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)-propionsäure (Dihydroferulasäure) wurde als weiteres renales Ausscheidungsprodukt von Flavonolen (z.B. Quercetin) und Hydroxyzimtsäuren (z.B. Derivate der Kaffee- und Ferulasäure) identifiziert (GROSS et al., 1996; RECHNER et al., 2001) und als mögliche Vorstufe der Vanillinsäure vorgeschlagen, die ebenfalls ein Abbauprodukt von Flavan-3-olen und Flavonolen ist (RECHNER et al., 2001).

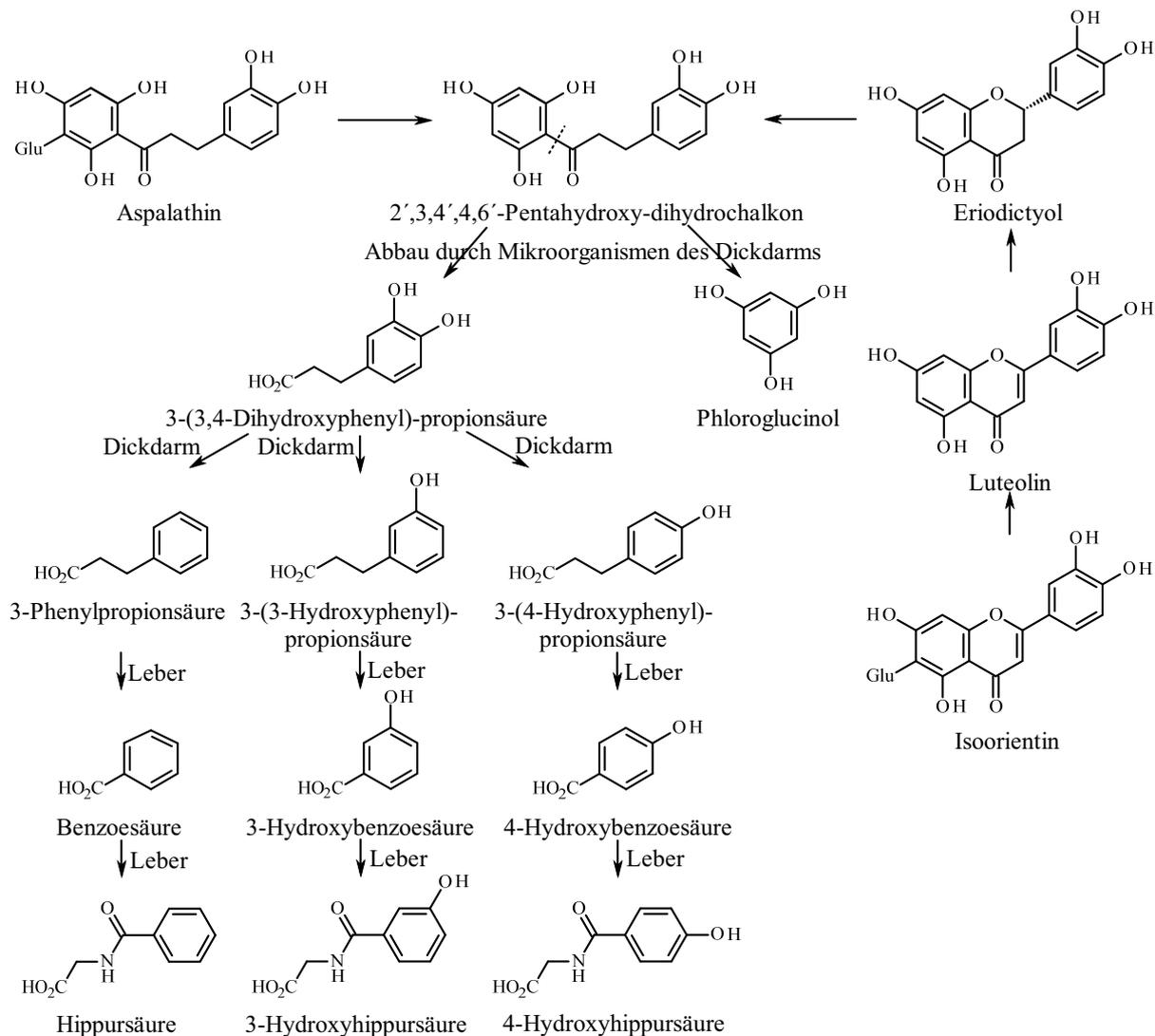


Abbildung 1.15: Hypothetischer Bildungsweg der Hippursäuren aus Polyphenolen am Beispiel von Aspalathin und Isoorientin (nach BRAUNE et al., 2001; RECHNER et al., 2002; BLAUT et al., 2003). Glu, glucosid

Bei den aus dem A-Ring hervorgehenden Verbindungen handelt es sich um Derivate des Phloroglucinols (PG), die vorwiegend in *in vitro*-Kulturen von Darmbakterien detektiert wurden (KALLIANOS et al., 1959).

Aus der Darmflora des Menschen wurden einige Bakterienstämme der Gattungen *Eubacterium* und *Clostridium* isoliert, die Quercetin, Quercitrin (Quercetin-3-O-rhamnosid), Rutin und Kämpferol zu Phloroglucinol und 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure abbauen können (WINTER et al., 1989; WINTER et al., 1991). Weiterhin wurden Bakterienarten der Gattung

Bacteroides identifiziert, die Flavonoid-O-glykoside zu den korrespondierenden Aglyka und Zucker umsetzen können (BOKKENHEUSER et al., 1987). SCHNEIDER et al. (1999) berichteten, dass nach der Deglykosylierung von Quercetin-3-O-glucosid die Freisetzung des Zuckerrestes den Abbau von Quercetin durch den Bakterienstamm *Eubacterium ramulus* auslöste. Dieselbe Arbeitsgruppe identifizierte einen Bakterienstamm (*Enterococcus cassiflavus*), der zur alleinigen Verwertung des Zuckerrests befähigt ist. Als Abbauprodukt von Quercetin-3-O-glucosid charakterisierten BLAUT et al. (2003) 3,4-Dihydroxyphenyl-essigsäure.

Die phenolischen Säuren werden nicht nur von den Darmbakterien, sondern auch in der Leber und im Blutkreislauf verstoffwechselt. Dieses lässt sich durch den Nachweis von methylierten C₆-C₃-, C₆-C₂- und C₆-C₁-Phenolcarbonsäuren im Urin belegen, von denen 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl-essigsäure (Homovanillinsäure) der Hauptvertreter ist (HEILMANN & MERFORT, 1998a; RECHNER et al., 2002). Die Methylierung kann insbesondere bei vorhandener *o*-Dihydroxystruktur durch die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) erfolgen (ZHU et al., 1994). Alternativ werden die phenolischen Abbauprodukte auch in glucuronidierter Form renal eliminiert (RECHNER et al., 2002).

1.3.1.2 Metabolismus von Flavonen

Mit den im Rooibos zahlreich vertretenen Flavon-C-glykosiden (siehe 1.2.2.1) wurde ein Tierversuch mit Ratten durchgeführt (ZHANG et al., 2007b). Die vier analysierten C-glucoside (Isoorientin, Orientin, Isovitexin, Vitexin) wurden nur schwach resorbiert und erreichten größtenteils den Dickdarm, wo sie bakteriellen Abbaureaktionen unterlagen. Bei Flavonen läuft trotz struktureller Ähnlichkeit mit Flavonolen die Spaltung vorwiegend zwischen dem C-4 und C-5 unter Bildung von Phenylpropionsäuren ab (HEILMANN & MERFORT, 1998b). ZHANG et al. (2007b) konnten in diesem Zusammenhang neben dem A-Ring-Metaboliten Phloroglucinol 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure (Dihydrokaffeesäure) als Abbauprodukt von Isoorientin und Orientin sowie 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (Phloretinsäure) als das von Isovitexin und Vitexin bestätigen (Abbildung 1.16). Die Eliminierungsraten der vier Flavon-C-glucoside aus dem Gastrointestinaltrakt waren gering und damit vermutlich die effektive Verweilzeit zur Entfaltung ihres antioxidativen Potentials ausreichend genug (ZHANG et al., 2007b).

Bei einem weiteren Tierversuch mit Ratten führte die Verfütterung von Apigenin zur Bildung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure, 4-Hydroxyzimtsäure sowie 4-Hydroxybenzoesäure (GRIFFITHS & SMITH, 1972). BRAUNE et al. (2001) untersuchten die Umwandlung von Luteolin durch *E. ramulus*. Dabei erfolgt zunächst die Reduktion zum Eriodictyol, das nach Spaltung des C-Rings über ein Chalkon zum korrespondierenden Dihydrochalkon abgebaut wird (siehe Abbildung 1.15). Als einziges Abbauprodukt wurde 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure identifiziert.

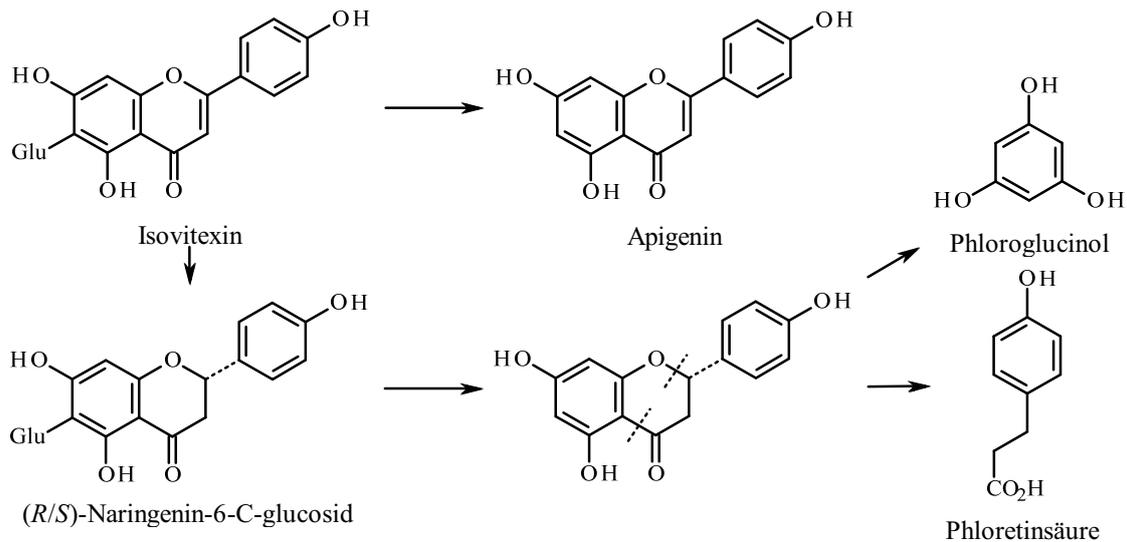


Abbildung 1.16: Hypothetischer Metabolisierungsweg von Flavon-C-glycosiden am Beispiel des Isovitexins, initiiert durch die Mikroflora des Darmtrakts (nach ZHANG et al., 2007b). Glu, glucosid

Als A-Ring-Metabolit konnte nach anaerober Inkubation von Bakterien aus der menschlichen Darmflora mit dem C-glycosid Isoorientin Phloroglucinol nachgewiesen werden (HATTORI et al., 1988).

1.4 Countercurrent Chromatography (CCC)

Die Entwicklung der Gegenstromverteilungschromatographie begann Anfang der 60er Jahre mit dem Bau der Coil Planet Centrifuge zur Isolierung von Lymphozyten (ITO et al., 1966). Auf die hydrostatischen Systeme (z.B. Droplet Countercurrent Chromatography (CONWAY, 1990)) folgten ab Mitte der 80er Jahre die heute weit verbreiteten hydrodynamischen Systeme wie die High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC). Allen Verfahren gemein ist das Fehlen einer stationären Phase. Dadurch bieten sich Vorteile gegenüber der konventionellen Säulenchromatographie, da irreversible Adsorptionen des Analyten vermieden werden (ITO, 2005). Als stationäre wie auch mobile Phase fungieren zwei miteinander nicht mischbare Lösungsmittelsysteme, zwischen denen der Stoffaustausch gemäß dem Nernst'schen Verteilungsgesetz (Gleichung 1-1) stattfindet (CONWAY, 1991).

$$K = \frac{c_s}{c_m} \quad 1-1$$

K = Verteilungskoeffizient, c_s = Konzentration des gelösten Analyten in der stationären Phase, c_m = Konzentration des gelösten Analyten in der mobilen Phase

Die Trennung beruht somit auf der unterschiedlichen Löslichkeit der Substanzen in den beiden Phasen: für Substanzen, die sich besser in der stationären Phase lösen, folgt gemäß Gleichung 1-1 ein $K > 1$, für den umgekehrten Fall ist $K < 1$. Optimale Trennungen ergeben sich bei Verteilungskoeffizienten im Bereich von 0,5 bis 1,5.

Der Aufbau einer CCC-Anlage ist in Abbildung 1.17 dargestellt. Aus einem Vorratsgefäß werden mittels einer HPLC-Pumpe die für die Trennung eingesetzten Lösungsmittel durch eine Injektionsschleife in das Trennsystem gefördert. Während der Trennung befindet sich der Coil in Rotation mit der Geschwindigkeit ω . Durch die entstehenden Kräfte verbleibt die stationäre Phase im Trennsystem und die mobile Phase wird im Gegenstromprinzip durch den Coil gepumpt. Das in Rotationsrichtung zeigende Coilende wird als „Tail“ definiert, während das der Rotationsrichtung entgegengesetzte Ende als „Head“ bezeichnet wird. Die Trennung wird mit einem Detektor verfolgt und die eluierenden Verbindungen mit einem Fraktionensammler aufgefangen.

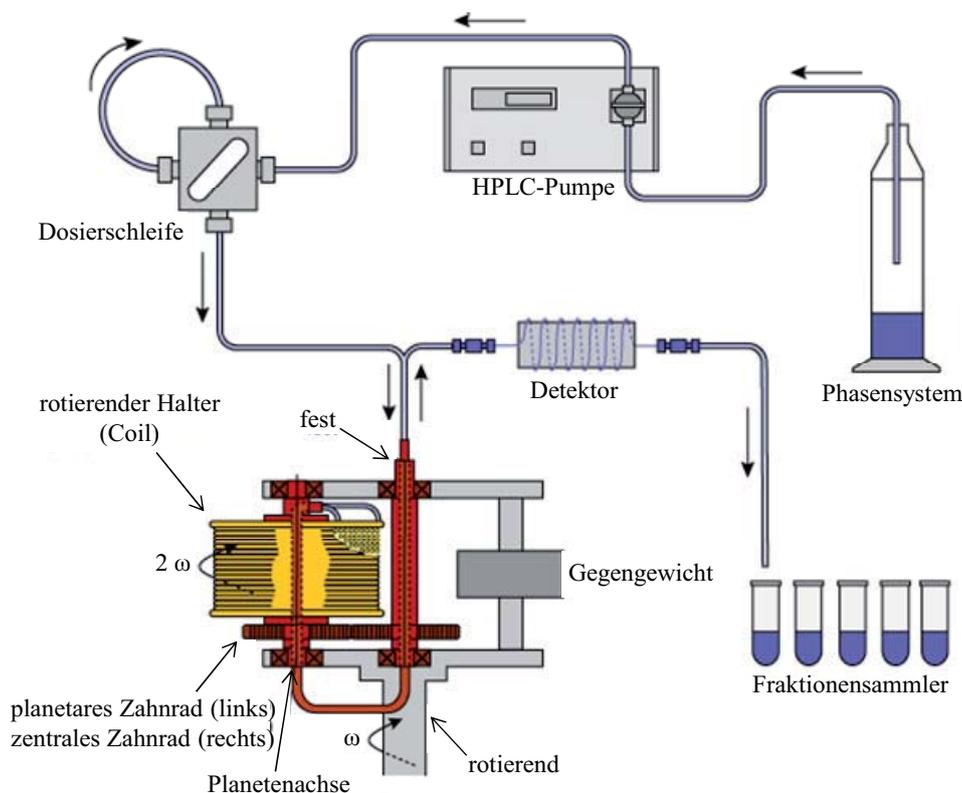


Abbildung 1.17: Schematische Übersicht über den Aufbau einer CCC-Anlage mit Single-Coil (nach SUTHERLAND, 1987)

Neben der (theoretisch) 100%igen Probenwiedergewinnung liegt ein weiterer Vorteil der Trenntechnik in ihrer universellen Einsetzbarkeit, da durch Modifizierung der Fließmittelsysteme (siehe 4.4.4) sowohl polare als auch lipophile Substanzen getrennt werden können (ITO, 2005). Voraussetzungen für ein geeignetes hydrodynamisches Fließverhalten sind eine niedrige Viskosität, hohe Grenzflächenspannung und ein großer Dichteunterschied der beiden Phasen.

Ferner eignet sich die Technik durch hohe Probeaufgabemengen bis in den Gramm-Bereich für präparative Trennungen und somit zur Isolierung bioaktiver Fraktionen aus komplexen Matrices (siehe 2.2.3).

1.4.1 High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

Bei der für diese Arbeit eingesetzten HSCCC-Anlage handelt es sich um eine Triple-Coil-CCC. Eine Auftrennung der Probe erfolgt nach dem Prinzip der Archimedischen Schraube und auf der Basis von Phasenmischungs- und Entmischungsvorgängen. Während der Trennung befinden sich die drei Coils in Rotation sowohl um sich selbst (planetare Achse) als auch um die Zentralachse (solare Achse). Anlagen dieser Art werden auch als J-Typ-HSCCC bezeichnet (Abbildung 1.18).

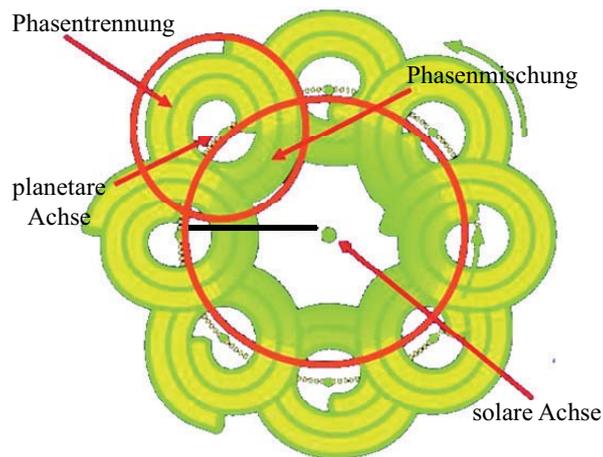


Abbildung 1.18: Phasenmischverhalten im Zuge der planetaren Bewegung des Coils (nach ITO & CONWAY, 1996)

Infolge der planetaren Bewegung kommt es zu einem alternierenden Mischen und Entmischen der beiden Lösungsmittelsysteme. In der Nähe der Zentralachse (Revolutionsachse) wirken schwache Kräfte, so dass eine Durchmischung der Phasen möglich ist („mixing zones“). Umgekehrt bewirken die starken Zentrifugalkräfte im Außenbereich des Coils eine Phasentrennung („settling zone“) (ITO, 2005). Die Trennleistung der HSCCC liegt begründet in der hohen Anzahl dieser Verteilungsvorgänge. Bei einer Rotation von 800 U/min finden in der Sekunde 13 Mischungs- und Entmischungsprozesse statt (ITO & CONWAY, 1986). In einer Stunde laufen somit 50000 Verteilungsvorgänge ab.

Im Elutionsmodus „Head to Tail“ wird als stationäre Phase die leichte, bei „Tail to Head“ die schwere Phase eingesetzt. Bei ersterem Modus wird die schwere, mobile Phase kontinuierlich in das Trennsystem befördert.

1.5 Zielsetzung und Problemstellung

Kräuter- und Früchtetees besitzen ein positives Image als gesundheitsfördernde Getränke. Diese Effekte werden zumeist der Stoffklasse der Flavonoide zugeschrieben (siehe 1.2.4), die in vielen Kräuter- und Früchtetees zu den qualitativ und quantitativ dominierenden Bestandteilen gehören.

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, zur Verbesserung der unvollständigen Datenlage Informationen über diese Inhaltsstoffe zu gewinnen. Dabei kommen zur Quantifizierung der individuellen Polyphenole (z.B. Flavanole, Catechine, Proanthocyanidine und Hydroxyzimtsäuren) spezifische Methoden zum Einsatz.

Auf Basis der gewonnenen Daten erfolgt die Bestimmung der Bioverfügbarkeit, Nutrikinetik und Metabolisierung der wesentlichen Rooibosflavonoide bei einer in Kooperation mit der Leibniz Universität Hannover (Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung) durchgeführten Humanstudie im Cross-over-Design, um ihre biologische Aktivität in den Zielorganen evaluieren zu können. Verglichen werden dazu der komplexe Teeaufguss und eine durch ein *in vitro*-Bioaktivitätsscreening (TEAC) identifizierte aktive Fraktion mit Placebo (Wasser). Die aktive Fraktion wird u.a. durch gegenstromverteilungschromatographische Trenntechniken (HSCCC) isoliert.

Die Urin- und Plasmaproben der Studienteilnehmer werden per LC-MS/MS gegebenenfalls nach vorheriger Aufarbeitung auf intakte Flavonoide und ihre korrespondierenden Metabolite analysiert. Als Zielparameter dienen u.a. die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) sowie die maximal gemessene Plasma- bzw. Urinkonzentration (c_{\max}). Grundlage für die Auswertung ist die Bestimmung der Flavonoidgehalte in den einzelnen Rooibosformulierungen, um genaue Aussagen über die applizierten Dosen treffen zu können. Im Rahmen der Untersuchung der Nutrikinetik wird vom Kooperationspartner zusätzlich das antioxidative Potential der Plasmaproben mittels des ORAC-Assays (Oxygen Radical Absorbance Capacity) bestimmt. Die *in vivo* nachgewiesenen Hauptmetabolite werden synthetisiert, isoliert und auf ihr antioxidatives Potential untersucht, um deren Beitrag zum Gesamtpotential zu ermitteln und gegebenenfalls die Gehalte ihrer Edukte durch gezielte Steuerung und Modifikation der Technologie zu steigern.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit besteht in der Betrachtung der Stabilität von Rooibosflavonoiden in Fertiggetränken („Ready-to-drink Beverages“) bei verschiedenen Lagerbedingungen, da aufgrund der positiven Beurteilung von Kräuter- und Früchtetees durch den Verbraucher zunehmend Teeextrakte zur Herstellung solcher Produkte Verwendung finden. Mit einem frisch hergestellten und einem gelagerten Fertiggetränk gleicher Rezeptur findet eine zweite Humanstudie statt. Beide Erzeugnisse werden im Cross-over mit einem Fertig-

getränk ohne Zusatz von Rooibosextrakt verglichen. Mit Ausnahme des antioxidativen Potentials werden auch hier dieselben Parameter wie bei der 1. Humanstudie bestimmt.

Die Ergebnisse der Humanstudien sind von besonderem Interesse für die Entwicklung innovativer Produkte und die Substanziierung gesundheitsbezogener Angaben gemäß der Health Claims Verordnung (VO (EG) Nr. 1924/2006). Wesentliche Neuerung dieses Gesetzestextes ist, dass solche Angaben in der Werbung und Kennzeichnung von Lebensmitteln nur noch gestattet sind (Wissenschaftsvorbehalt), wenn sie ausdrücklich zugelassen sind (Verbotsprinzip mit Erlaubnisvorbehalt) und den von der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) noch zu entwickelnden Nährwertprofilen entsprechen (Sachverständigenbüro und Unternehmensberatung für Lebensmittel und Kosmetik – <http://www.health-claims-verordnung.de>). Darüber hinaus können Aussagen getroffen werden über die für eine potentielle Wirkung notwendigen Dosierungen der wertgebenden Rooibosbestandteile (KROON et al., 2004).

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Analyse von Rooibos (*Aspalathus linearis*)

Zur Identifizierung und Quantifizierung der Inhaltsstoffe des grünen und fermentierten Rooibos wurden diese zunächst aus dem Pflanzenmaterial extrahiert. Je nach Ziel der Untersuchung fanden dabei unterschiedliche Verfahren Anwendung.

Die über den praxisüblichen Teeaufguss freigesetzten Verbindungen wurden durch eine rein wässrige, dem haushaltsüblichen Aufguss nachempfundene Extraktion bestimmt. Um eine vollständige Erfassung der enthaltenen Verbindungen zu ermöglichen, ist der Zusatz von Lösungsmitteln unerlässlich. Für die quantitative Bestimmung der Catechine, Flavon- und Flavonolglykoside sowie der Hydroxyzimtsäurederivate hat sich die Extraktion mit 70 °C heißem, 70%igem Methanol in Wasser bewährt (CLIFFORD, 1985; FINGER, 1991; KUHR, 1993). Dieses Lösungsmittelgemisch findet auch Verwendung in der ISO 14502-1 zur Extraktion von grünem und schwarzem Tee und wurde auf den Rooibos übertragen.

Die Isolierung einzelner Verbindungen und der aktiven Fraktion erforderte eine Aufarbeitung in größerem Maßstab. Die Extraktion wurde ebenfalls mit 70 %igem Methanol durchgeführt, die Temperatur jedoch zur schonenden Extraktion auf 60 °C verringert (siehe 2.2.3).

2.1.1 Methanolische Extraktion

Die nach 4.5.1 bereiteten, methanolischen Extrakte von grünem und fermentiertem Rooibos wurden zunächst mittels HPLC-DAD (Abbildung 2.1) und LC-MS/MS untersucht. Tabelle 2.1 liefert einen Überblick über die identifizierten Verbindungen.

Die beiden Chromatogramme lassen sich grob in vier Abschnitte einteilen: Im Retentionszeitenfenster von 15-25 min eluieren insbesondere Di-C-glykoside der Flavone, Flavanone und Flavonole (z.B. Luteolin- (3) und Apigenin-6,8-di-C-hexosid (7)); im Bereich von 18-28 min sind in erster Linie Mono-C-glucoside der Flavone und Dihydrochalkone (z.B. Isoorientin (11), Aspalathin (16) und Isovitexin (20)) und von 25-38 min Flavonol- und Flavon-O-glykoside (z.B. Rutin (18) und Isoquercitrin (23)) anzutreffen. Ab 50 min eluieren unpolare Flavonoidaglyka wie Luteolin (28) und Quercetin (29). Aufgrund ihrer geringeren Polarität eluieren die Dihydrochalkone jeweils nach ihren korrespondierenden Flavonen (Aspalathin (16) → Isoorientin (11); Nothofagin (25) → Isovitexin (20)) und diese wiederum

nach ihren korrespondierenden Flavanonen (Isoorientin (**11**) → (*R/S*)-Eriodictyol-6-C-glucosid (**9**, **10**); Isovitexin (**20**) → (*R/S*)-Naringenin-6-C-glucosid (JOUBERT et al., 1996).

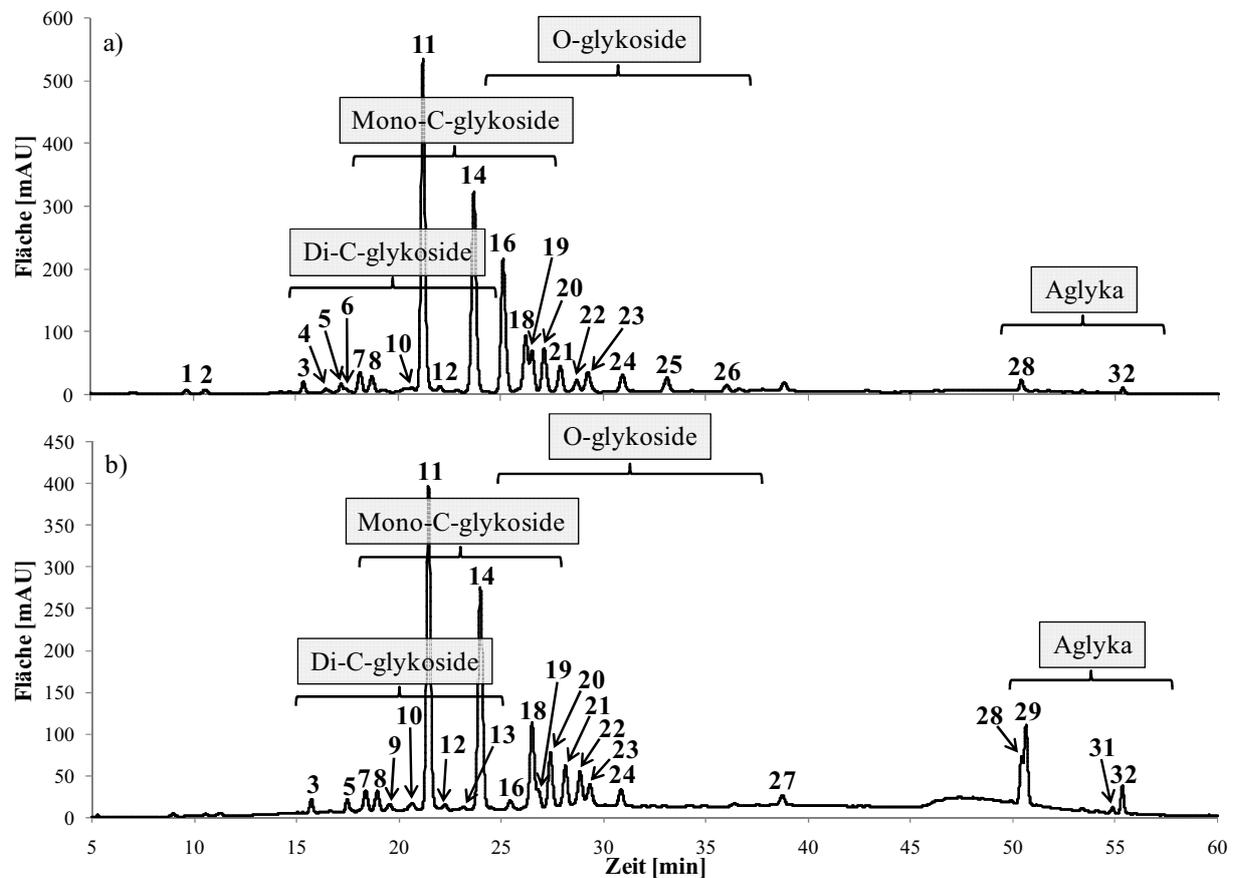


Abbildung 2.1: HPLC-DAD-Chromatogramme der methanolischen Extrakte von unfermentiertem (a) und fermentiertem (b) Rooibos (354 nm) - Peakzuordnung: siehe **Tabelle 2.1**.

Tabelle 2.1: Zusammenstellung der nach methanolischer Extraktion des unfermentierten und fermentierten Rooibos identifizierten (Poly)phenole (Hauptfragmente unterstrichen)^a

Peak	Rt [min]	[M-H] ⁻ m/z	MS ² m/z	Verbindung
1	9,7	355	193	Ferulasäure-O-hexosid
2	10,6	353	<u>191</u> , 179, 135	3-CQA
3	15,4	609	519, <u>489</u> , 429, 399, 369	Luteolin-6,8-di-C-hexosid (Lucenin-2?)
4	16,5	465	375, <u>345</u>	Dihydroquercetin-C-hexosid
5	17,2	579	519, 489, <u>459</u> , 429, 399, 369	Luteolin-6-C-pentosid-8-C-hexosid
6	17,4	581	521, 491, <u>461</u> , 431, 401, 371	Eriodictyol-6-C-hexosid-8-C-pentosid
7	18,1	593	503, <u>473</u> , 383, 353	Apigenin-6,8-di-C-hexosid (Vicenin-2?)
8	18,7	579	519, <u>489</u> , 459, 429, 399, 369	Luteolin-6-C-hexosid-8-C-pentosid
9	19,6	449	359, <u>329</u>	(<i>S</i>)-Eriodictyol-6-C-glu
10	20,7	449	359, <u>329</u>	(<i>R</i>)-Eriodictyol-6-C-glu
11	21,2	447	429, 357, <u>327</u>	Isoorientin
12	22,0	563	503, 473, 443, 383, <u>353</u>	Isoschaftosid
13	23,2	563	503, 473, 443, 383, <u>353</u>	Schaftosid
14	23,7	447	357, <u>327</u>	Orientin
15*	24,5	449	359, <u>329</u>	(<i>S</i>)-Eriodictyol-8-C-glu
16	25,1	451	361, <u>331</u>	Aspalathin
17*	25,9	449	359, <u>329</u>	(<i>R</i>)-Eriodictyol-8-C-glu

Peak	Rt [min]	[M-H] ⁻ m/z	MS ² m/z	Verbindung
18	26,2	609	301	Rutin
19	26,5	609	301	Quercetin-O-rutinosid (Isomer)
20	27,1	431	413, 341, <u>311</u>	Isovitexin
21	27,9	431	341, <u>311</u>	Vitexin
22	28,7	463	301	Hyperosid
23	29,2	463	301	Isoquercitrin
24	30,9	447	285	Luteolin-O-hexosid
25	33,1	435	345, <u>315</u>	Nothofagin
26	36,0	739	619, 613, 523, 493, 361, <u>331</u>	C-glykosyliertes Derivat von Aspalathin
27	38,7	461	299	Methyl-O-luteolin-O-hexosid
28	50,4	285	257, 241, <u>217</u>	Luteolin
29	50,6	301	271, 179, <u>151</u>	Quercetin
30	51,2	287	<u>151</u> , 135	Eriodictyol
31	54,9	269	<u>225</u> , 201, 183, 149	Apigenin
32	55,3	299	284	Chrysoeriol

^amit * markierte Substanzen nur im fermentierten Rooibos nachweisbar (bei 287 nm). glu, glucosid; gal, galactosid; CQA, Caffeoylchinasäureester; Rt, Retentionszeit

Die überwiegende Zahl der Verbindungen gehört strukturell zu den C-glykosiden; O-glykoside sind im Rooibos deutlich seltener anzutreffen. Das zahlenmäßige Verhältnis detektierter Mono- und Di-C-glykoside ist ungefähr gleich; quantitativ dominieren jedoch die einfach C-glykosylierten Verbindungen (siehe 2.1.1.1).

Über einen Peakflächenvergleich lassen sich als Hauptverbindungen sowohl im grünen als auch im fermentierten Rooibos die Flavon-C-glucoside Isoorientin (**11**), Orientin (**14**), Isovitexin (**20**) und Vitexin (**21**) sowie die Dihydrochalkon-C-glucoside Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) zuordnen. Quantitativ wichtige Inhaltsstoffe sind weiterhin die Flavonol-O-glykoside Rutin (**18**), Hyperosid (**22**) und Isoquercitrin (**23**).

Der wichtigste Unterschied zwischen beiden Pflanzenmaterialien ist der signifikant geringere Gehalt von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) im fermentierten Produkt (siehe 1.2.3). Die Ursache liegt in dem sofortigen oxidativen Abbau der Dihydrochalkone nach Zerkleinerung des Pflanzenmaterials in Gegenwart von Sonnenlicht und Sauerstoff. Dabei wird Aspalathin (**16**) durch oxidative Cyclisierung über ein *o*-Chinon zu den Flavanonen (*R/S*)-Eriodictyol-6/8-C-glucosid (**9**, **10**, **15**, **17**) abgebaut (siehe Abbildung 1.10), wobei die Bildung der beiden 6-C-glucoside **9** und **10** begünstigt ist (MARAIS et al., 2000; KRAFZCYK & GLOMB, 2008). Die Bestimmung der Elutionsreihenfolge der beiden Diastereomerenpaare erfolgte auf Basis der Arbeit von KRAFCZYK & GLOMB (2008). Danach eluiert unter vergleichbaren Messbedingungen zuerst (*S*)-Eriodictyol-6- (**9**), gefolgt von (*R*)-Eriodictyol-6- (**10**), (*S*)-Eriodictyol-8- (**15**) und (*R*)-Eriodictyol-8-C-glucosid (**17**). Nothofagin (**25**) reagiert in deutlich geringerem Ausmaß zu den vier Flavanon-C-glucosiden (*R/S*)-Naringenin-6/8-C-glucosid (siehe 2.1.4.2), die ebenfalls im fermentierten Rooibos detektiert werden konnten (m/z 433 [M-H]⁻ → 343, 313).

Unter längerer Sonneneinstrahlung entstehen braune, polymere Verbindungen unbekannter Struktur, die für die charakteristische Farbe des verarbeiteten Erzeugnisses verant-

wortlich sind. Deutlich wird dieses am sogenannten „Polymerhump“ ab einer Retentionszeit von ca. 45 min. Hier eluieren eine Vielzahl von Verbindungen unterschiedlichen Polymerisationsgrads zu ähnlichen Retentionszeiten, wodurch es zu einer Peaküberlagerung kommt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der Polymerhump beider Pflanzenmaterialien u.a. aus Procyanidinen zusammensetzt (siehe 2.1.3).

Der fermentierte Rooibos enthält mit Quercetin (**29**), Eriodictyol (**30**) und Apigenin (**31**) Flavonoidaglyka, die im grünen Rooibos nicht bzw. nur in Spuren auftreten (siehe 2.1.1.1). Auch sind die Konzentrationen von Luteolin (**28**) und Chrysoeriol (**32**) wesentlich höher als im unfermentierten Material.

Die Substanzidentifizierung erfolgte durch eine kombinierte Auswertung der UV-Spektren und LC-MS/MS-Daten. Abbildung 2.2 zeigt die charakteristischen Fragmentierungsmuster der im Rooibos zahlreich vertretenen Flavon-di-C-glykoside.

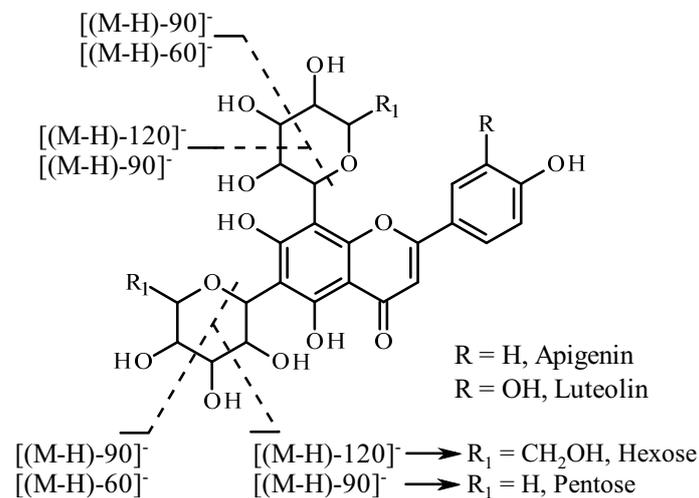


Abbildung 2.2: Fragmentierungsmuster der Zuckereinheiten von Flavon-di-C-glykosiden (nach FIGUEIRINHA et al., 2008)

Die im MS²-Modus gebildeten Hauptfragmente sind auf Spaltungen innerhalb der am Aglykon gebundenen Zuckereinheiten zurückzuführen. Bei symmetrischen Di-C-glykosiden mit zwei Hexosen sind beispielsweise die Abspaltungen [(M-H)-90]⁻, [(M-H)-120]⁻, [(M-H)-180]⁻, [(M-H)-210]⁻ und [(M-H)-240]⁻ zu beobachten. Einen Hinweis auf einen Pentoserest gibt das Fragment [(M-H)-60]⁻. Grundsätzlich zeigen 6-C-Zuckerreste eine ausgeprägtere und intensivere Fragmentierung. Bei asymmetrischen Di-C-glykosiden kann daher ermittelt werden, ob eine Pentosyl- oder Hexosyleinheit am C-6 des Aglykons gebunden ist. Bei Mono-C-glykosiden treten in Abhängigkeit vom konjugierten Zucker die Fragmente [(M-H)-60]⁻, [(M-H)-90]⁻ und [(M-H)-120]⁻ auf. Die Bestimmung des Zuckertyps gestatten die Fragmentierungsmuster nicht; eine Aufklärung war jedoch in den meisten Fällen mit Hilfe von Referenzsubstanzen und Literaturdaten möglich. Die UV-Spektren geben Aufschluss über die Natur des Aglykons, von dem sich die C-glykoside ableiten.

Die Massenspektren von O-glykosiden zeichnen sich im Vergleich zu denen von C-glykosiden durch deutlich weniger Fragmente aus. Der Fragmentierungsweg beginnt mit der Spaltung der glykosidischen Bindung und Eliminierung des/der Zuckerreste(s) unter Retention der Ladung am Aglykon oder des/der Zuckerfragment(s/e) (Hexose: [(M-H)-162]⁻; Pentose: [(M-H)-132]⁻; Rhamnose: [(M-H)-146]⁻; Rutinose: [(M-H)-308]⁻) (STOBIECKI, 2000). C-glykosylierte Flavonoide sind stabiler gegenüber Säuren und Enzymen als die O-glykosylierten Analoga (RAWAT et al., 2009).

Die Substanzidentifizierung wird im Folgenden am Beispiel von Luteolin-6-C-hexosid-8-C-pentosid (**8**) demonstriert: Die MS-Analyse ergab ein Pseudomolekülion von m/z 579 [(M-H)]⁻ und ein mit asymmetrischen Di-C-glykosiden übereinstimmendes Fragmentierungsmuster. Die MS²-Daten zeigen die Fragmente m/z 489 [(M-H)-90]⁻ und 459 [(M-H)-120]⁻, die auf die Anwesenheit einer C-gebundenen Hexosyleinheit hinweisen. Im gleichen Spektrum treten auch die Fragmente m/z 519 [(M-H)-60]⁻ und 429 [(M-H)-60-90]⁻ auf, die auf eine Pentosyleinheit hindeuten. Das Hauptfragment m/z 489 [(M-H)-90]⁻ und die hohe Intensität der Fragmente der Hexosyl- im Vergleich zu der der Pentosyleinheit lassen den Schluss zu, dass die Hexose an Position C-6 gebunden ist. Die geringe Intensität des Fragments m/z 519 [(M-H)-60]⁻ unterstützt diese Vermutung. Die für Flavon-di-C-glykoside charakteristischen Bruchstücke m/z 369 (Aglykon + 83) und 399 (Aglykon + 113), die auf am Aglykon gebunden verbliebene Zuckerreste zurückzuführen sind, legen in Verbindung mit den UV-Daten den Schluss nahe, dass als Aglykon Luteolin vorliegt (FERRERES et al., 2003). Bei Peak **8** handelt es sich demzufolge um Luteolin-6-C-hexosid-8-C-pentosid.

Neben den in Tabelle 2.1 aufgeführten Verbindungen konnten - insbesondere durch eine selektive Anreicherung polyphenolischer Rooibosbestandteile mittels Polyamidsäulenchromatographie (siehe 2.1.1.3) - weitere, bislang nicht in diesem Pflanzenmaterial beschriebene C-glykoside identifiziert werden.

2.1.1.1 Quantifizierung der Hauptflavonoide

Die im grünen und fermentierten Rooibos vertretenen Hauptflavonoide wurden durch externe Kalibriergeraden unter Berücksichtigung der Trockenmassen quantifiziert (siehe 4.5.1). Da nicht von allen Verbindungen Referenzsubstanzen zur Verfügung standen, wurden die Gehalte dieser Flavonoide über die korrespondierenden Aglyka bestimmt und anschließend über die molaren Verhältnisse auf das jeweilige Glykosid umgerechnet (Tabelle 2.2).

Die Mono-C-glykoside stellen mit einer Gesamtmenge von 10,2 % im grünen bzw. 2,0 % im fermentierten Rooibos bei einem Gesamtflavonoidgehalt von 11,0 bzw. 2,8 % den größten Anteil der quantifizierten Verbindungen, gefolgt von den O-glykosidisch verknüpften Flavonoiden mit ca. 0,6 % bzw. 0,5 %, den Di-C-glykosiden mit je ca. 0,2 % sowie den

Aglyka mit 0,02 % bzw. 0,2 %. Aspalathin (**16**) macht bei den Mono-C-glykosiden des unfermentierten Pflanzenmaterials mit 78 % den größten Anteil aus und trägt zu ca. 62 % zum Gesamtpolyphenolgehalt bei (siehe 2.1.1.2). Der Vergleich von grünem und fermentiertem Rooibos zeigt, dass sich die Gehalte der beiden Dihydrochalkon-C-glycoside (Aspalathin: 8,1 bzw. 0,4 %, Nothofagin: 0,9 bzw. 0,2 %) am stärksten voneinander unterscheiden. Infolgedessen leistet Aspalathin (**16**) beim verarbeiteten Erzeugnis lediglich einen Beitrag von ca. 4 % zum Gesamtpolyphenolgehalt (siehe 2.1.1.2).

Tabelle 2.2: Übersicht über die Flavonoidgehalte des Rooibos (siehe 4.1) nach methanolischer Extraktion^a

Nr.	Verbindung	Gehalt [g/100 g]	
		RG (n = 5)	RF (n = 5)
3	Luteolin-6,8-di-C-hexosid	0,037 ± 0,001	0,041 ± 0,002
5	Luteolin-6-C-pentosid-8-C-hexosid	0,036 ± 0,001	0,036 ± 0,001
7	Apigenin-6,8-di-C-hexosid	0,034 ± 0,001	0,029 ± 0,002
8	Luteolin-6-C-hexosid-8-C-pentosid	0,066 ± 0,001	0,069 ± 0,002
9	(S)-Eriodictyol-6-C-glu	ND	0,134 ± 0,011
10	(R)-Eriodictyol-6-C-glu	ND	0,135 ± 0,015
11	Isorientin	0,579 ± 0,079	0,404 ± 0,041
12	Isoschaftosid	0,016 ± 0,001	0,038 ± 0,002
13	Schaftosid	0,025 ± 0,000	0,021 ± 0,002
14	Orientin	0,411 ± 0,097	0,277 ± 0,069
15	(S)-Eriodictyol-8-C-glu	ND	0,039 ± 0,007
16	Aspalathin	8,069 ± 0,188	0,415 ± 0,066
17	(R)-Eriodictyol-8-C-glu	ND	0,037 ± 0,005
18	Rutin	0,240 ± 0,004	0,232 ± 0,008
19	Quercetin-O-rutinosid (Isomer)	0,145 ± 0,003	0,044 ± 0,008
20	Isovitexin	0,146 ± 0,001	0,106 ± 0,017
21	Vitexin	0,096 ± 0,001	0,088 ± 0,011
22	Hyperosid	0,046 ± 0,001	0,084 ± 0,004
23	Isoquercitrin	0,088 ± 0,001	0,062 ± 0,005
24	Luteolin-O-hexosid	0,042 ± 0,001	0,044 ± 0,004
25	Nothofagin	0,923 ± 0,028	0,187 ± 0,019
28	Luteolin	0,015 ± 0,001	0,042 ± 0,002
29	Quercetin	ND	0,104 ± 0,005
30	Eriodictyol	ND	0,008 ± 0,001
31	Apigenin	ND	0,005 ± 0,001
32	Chrysoeriol	0,003 ± 0,000	0,007 ± 0,001
Σ		11,014 ± 0,409	2,836 ± 0,0311

^aWerte angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung (als Glykoside berechnet). RG, Rooibos grün; RF, Rooibos fermentiert; ND, nicht detektiert; glu, glucosid; gal, galactosid

Vergleichsdaten zu den Flavonoidgehalten nach Extraktion mit 70 %igem Methanol sind bislang nicht veröffentlicht worden. BRAMATI et al. (2002) führten eine Extraktion von fermentiertem Rooibos mit reinem Methanol durch. Die Ergebnisse zeigen, dass die Extraktion nach 4.5.1 der mit reinem Methanol in der Flavonoidextraktion überlegen ist. Die von SCHULZ et al. (2003) in Rooibosproben aus verschiedenen Regionen Südafrikas bestimmten Gehalte an Aspalathin (4,5-12,0 %) und Nothofagin (0,3-1,0 %) entsprechen den

ermittelten Werten. Über die Konzentrationen von Minorbestandteilen (z.B. Di-C-glykoside) gibt es bisher keine Literaturwerte.

Der Vergleich von methanolischer und wässriger Extraktion am Beispiel des grünen Rooibos zeigt, dass die Flavonoidausbeuten erwartungsgemäß bei letzterem Verfahren deutlich geringer sind. Die prozentualen Abnahmen liegen im Bereich von 53 % (Isoorientin (**11**)) und 83 % (Hyperosid (**22**)). Auch Aspalathin (**16**) wird unter den Bedingungen einer hausüblichen Extraktion weit weniger (Abnahme um 62 %) extrahiert (Abbildung 2.3).

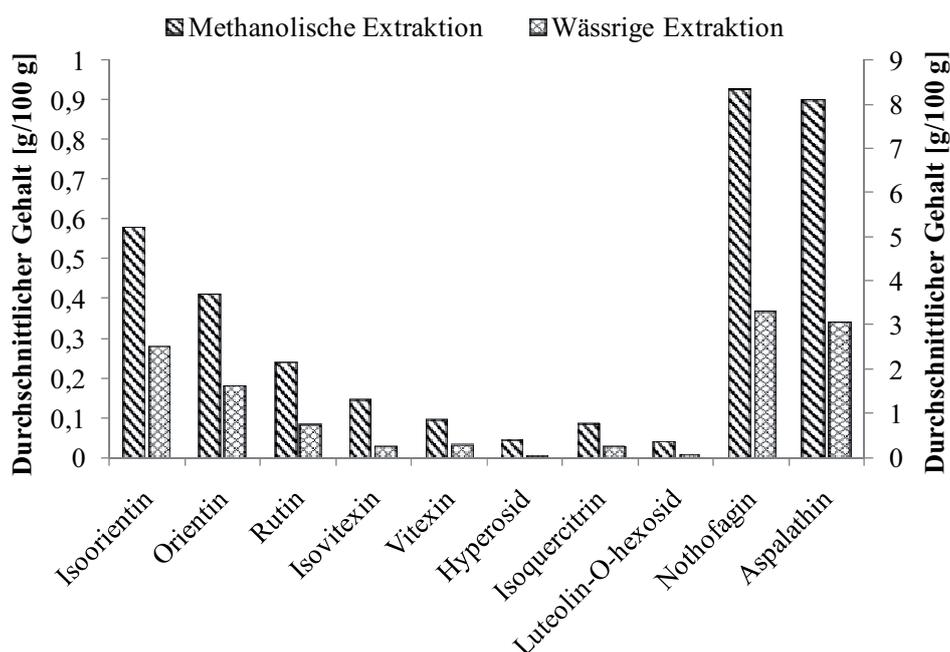


Abbildung 2.3: Vergleich von methanolischer und wässriger Extraktion (n = 12) am Beispiel der Hauptflavonoide des grünen Rooibos (Aspalathingehalte auf Sekundärachse aufgetragen)

Die in der Literatur nach wässriger Extraktion unter vergleichbaren Bedingungen publizierten Gehalte (Quantifizierung bei 255 und 287 nm) der Hauptflavonoide sind im Vergleich zu den eigenen Werten etwas höher (BRAMATI et al., 2003) - die Verhältnisse der Gehalte untereinander sowie zwischen beiden Pflanzenmaterialien stimmen jedoch überein.

2.1.1.2 Gesamtpolyphenolgehalt und antioxidatives Potential

Die Extrakte nach 4.5.1 und 4.5.2 wurden auf ihren Gesamtpolyphenolgehalt (nach Folin-Ciocalteu – siehe 4.4.3) und ihr antioxidatives Potential (TEAC-Assay: Trolox equivalent antioxidative capacity – siehe 4.4.2) untersucht (Abbildung 2.4). Die Durchführung des TEAC-Tests erfolgte nach einer modifizierten Methode (RE et al., 1999). Hierbei wird das gefärbte ABTS-Radikalkation durch Kaliumpersulfat erzeugt und anschließend die Entfärbung des Radikals (Reduktion durch das Antioxidans) zur ungefärbten Ausgangsverbindung photometrisch bei 734 nm erfasst.

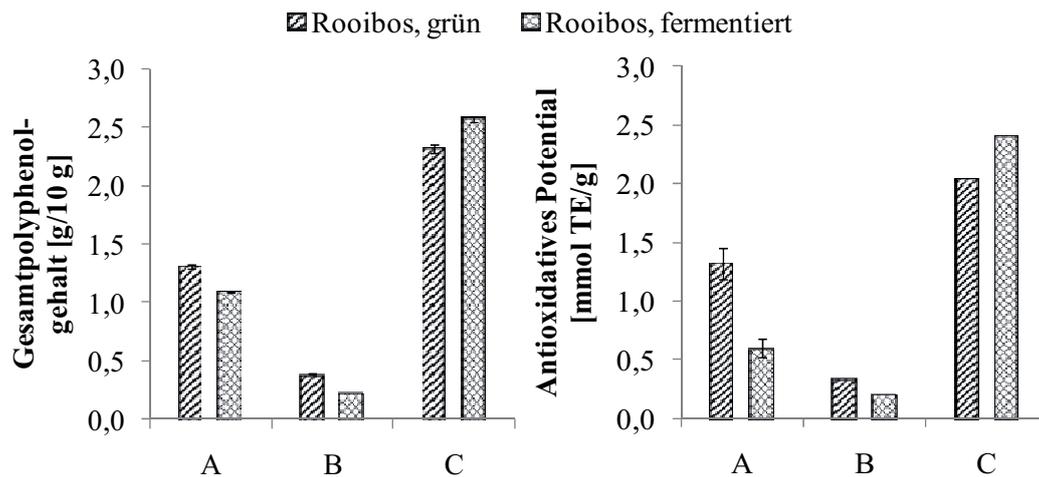


Abbildung 2.4: Gesamtpolyphenolgehalte (als Gallussäure-Äquivalente; $n = je\ 4$) und antioxidatives Potential (als Trolox-Äquivalente; $n = je\ 3$) der methanolischen (A) und der wässrigen Extrakte (B → bezogen auf die Einwaage; C → bezogen auf die extrahierbaren Feststoffe). TE, Trolox-Äquivalente

Anhand der Gesamtpolyphenolgehalte ist zu erkennen, dass die methanolische Extraktion (A) der wässrigen (B) unabhängig vom Pflanzenmaterial in der Erfassung (poly)phenolischer Rooibosbestandteile überlegen ist. Im Einklang mit diesem Ergebnis ergeben sich für das zuerst genannte Verfahren höhere antioxidative Potentiale.

Sowohl nach wässriger als auch methanolischer Extraktion übersteigen in Übereinstimmung mit den Gesamtflavonoidgehalten (siehe 2.1.1.1) die Gesamtpolyphenolgehalte des grünen Rooibos (3,9 bzw. 13 %) die des fermentierten Produkts (2,3 bzw. 11 %). Die Unterschiede in den Werten zwischen beiden Pflanzenmaterialien sind auf die Änderung der stofflichen Zusammensetzung während der „Fermentation“ zurückzuführen (→ Polymerisierung – siehe 2.1.4.1). Entsprechend sinkt das Verhältnis von antioxidativem Potential zum Gesamtpolyphenolgehalt von ca. 1 vor „Fermentation“ auf ca. 0,6 nach „Fermentation“ (A), da Aspalathin (16) aufgrund des geringen Gehalts (0,4 %) beim fermentierten Produkt nur einen sehr kleinen Beitrag zur Aktivität leistet. Anhand dessen lässt sich der große Anteil des Dihydrochalkons am antioxidativen Potential des unfermentierten Pflanzenmaterials abschätzen (25-55 %). Dieses ist ca. 2,2-fach höher als das des fermentierten Rooibos (1,3 zu 0,6 mmol TE/g; (A)). Ähnliche Werte sind von BRAMATI et al. (2003) und SCHULZ et al. (2003) ermittelt worden. Grüner und schwarzer Tee sind im Vergleich zu Rooibos potenter (1,8 bzw. 1,7 mmol TE/g).

STANDLEY et al. (2001) prüften Rooibosproben im Verlauf des Herstellungsprozesses auf die Fähigkeit, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl-radikale (DPPH) abzufangen, und stellten eine Abnahme des antioxidativen Potentials mit fortschreitender Verarbeitung fest. Die „Fermentation“ verursachte den stärksten Abfall. VON GADOW et al. (1997a) verglichen die antioxidativen Potentiale von unfermentierten, halbfermentierten und fermentierten Rooibos-tees mit denen von grünem (unfermentiert), Oolong (halbfermentiert) und schwarzem Tee (fermentiert). Mit zunehmendem Fermentationsgrad wurde eine Abnahme des Potentials

beobachtet, die bei den Rooibostees weniger stark ausfiel (86,6 % → 83,4 %). Dieselbe Arbeitsgruppe (1997c) verzeichnete eine Zunahme der Aktivität von Rooibostee nach Steigerung der Brühzeit auf 25-30 min und führte dieses auf die Veränderungen der stofflichen Beschaffenheit mit zunehmender Extraktionszeit zurück (z.B. aufgrund des steigenden Gehalts wenig wasserlöslicher Substanzen und großer Moleküle wie Proanthocyanidine).

Bezieht man zur Einschätzung der Wirksamkeit der wässrigen Teeaufgüsse die Werte nicht auf die Einwaage, sondern auf die extrahierbaren Feststoffe ((C) – siehe 4.4.1), ergibt sich eine Umkehrung der Verhältnisse. Im Vergleich zum unfermentierten Erzeugnis (1,7 g/L) liefert der fermentierte Rooibos (0,9 g/L) nur etwa halb so viel Extrakt, wodurch ein höherer Gesamtpolyphenolgehalt für dieses Pflanzenmaterial folgt.

Um einen genauen Aufschluss über den Anteil einzelner Flavonoide am gemessenen Gesamtpotential zu erhalten und Struktur-Wirkungsbeziehungen aufstellen zu können, wurden die Hauptflavonoide des Rooibos und einige phenolische Säuren auf ihr antioxidatives Potential mittels des TEAC-Tests untersucht (Abbildung 2.5).

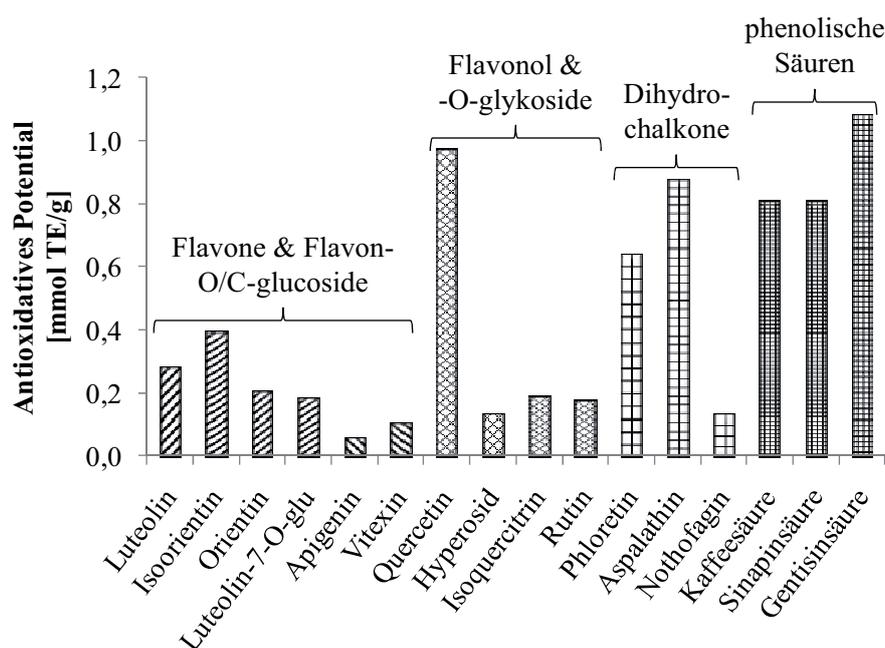


Abbildung 2.5: Antioxidatives Potential (als Trolox-Äquivalente) von einigen Flavonoiden und phenolischen Säuren. TE, Trolox-Äquivalente; glu, glucosid

Mit Ausnahme von Quercetin und Gentisinsäure (2,5-Dihydroxybenzoesäure) besitzt Aspalathin (**16**) mit 0,87 mmol TE/g die höchste Wirksamkeit, gefolgt von Sinapin- und Kaffeesäure (je 0,81 mmol TE/g). Im Fall der O-glykoside Rutin (**18**), Hyperosid (**22**), Isoquercitrin (**23**) und Luteolin-7-O-glucosid ist zu erkennen, dass die korrespondierenden Aglyka Luteolin (**28**) bzw. Quercetin (**29**) mit 0,28 bzw. 0,97 mmol TE/g höhere Potentiale

aufweisen. Diese Ergebnisse zeigen für Quercetin die Bedeutung einer freien Hydroxylgruppe an Position 3 des C-Rings (KRAFZCYK et al., 2009a).

Bei den C-glucosiden liegen heterogene Verhältnisse vor. Während Orientin (**14**) weniger potent als Luteolin (**28**) ist, liegen bei Isoorientin (**11**) und Vitexin (**21**) die umgekehrten Bedingungen vor. Demnach hat offenbar die Verknüpfungsposition des Zuckers einen Einfluss auf das antioxidative Potential (siehe 2.2.3). Im Vergleich zu Isoorientin/Orientin (**11/14**) enthält Isovitexin/Vitexin (**20/21**) nur eine Hydroxylgruppe im B-Ring. Das Fehlen der *o*-Dihydroxy-, „catechol“-Struktur reduziert somit das Potential weiter, wie auch das Beispiel von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) verdeutlicht.

Auch VON GADOW et al. (1997c) und JOUBERT et al. (2005) konnten mittels des DPPH Radikaltests zeigen, dass Quercetin und Aspalathin im Vergleich zu anderen Rooibos-flavonoiden die höchste Wirksamkeit besitzen.

2.1.1.3 Anreicherung von Polyphenolen durch Polyamid-Säulenchromatographie

Eine gezielte Anreicherung von Polyphenolen ist mit der Polyamidsäulenchromatographie möglich. Die Adsorption beruht auf der Wechselwirkung der phenolischen Hydroxyl- aber auch Carboxylfunktionen mit den Carbonyl- und Amidgruppen des Polyamids über Wasserstoffbrückenbindungen (HÖRHAMMER & WAGNER, 1959). Während des Waschschritts werden zunächst alle wasserlöslichen Stoffe wie Zucker, Säuren und Alkaloide selektiv abgetrennt und anschließend die Polyphenole mit Methanol eluiert. Flavonol-glucuronide und Hydroxyzimtsäurederivate werden aufgrund ihrer Säurefunktion stärker am Polyamid retardiert. Sie lassen sich durch ammoniakalisches Methanol eluieren (DEGENHARDT et al., 2004).

Zum Zweck eines Flavonoidscreenings wurden die Aufarbeitung gemäß 4.5.3 mit einer zehnfachen Einwaage an fermentiertem und unfermentiertem Rooibos durchgeführt und die Eluate per LC-MS/MS analysiert. Abbildung 2.6 zeigt die resultierenden Base Peak Chromatogramme (BPC). Einen Überblick über die durch Anreicherung mittels Polyamidsäulenchromatographie im Vergleich zur methanolischen Extraktion (siehe 2.1.1) zusätzlich identifizierten Verbindungen vermittelt Tabelle 2.3.

Im MeOH-Eluat des grünen Rooibos (a) gelang der Nachweis neuer Derivate der Aglyka der Dihydrochalkon-C-glucoside Aspalathin (2',3,4',4,6'-Pentahydroxy-dihydrochalkon) und Nothofagin (2',4,4',6'-Tetrahydroxy-dihydrochalkon \equiv Phloretin). Von beiden liegen vermutlich die 3',5'-Di-C-glykoside (**36** $\rightarrow m/z$ 613 [M-H]⁻ & **37** $\rightarrow m/z$ 597 [M-H]⁻) vor, wie anhand der für symmetrische Di-C-glykoside charakteristischen Abspaltungen [(M-H)-90]⁻, [(M-H)-120]⁻, [(M-H)-180]⁻, [(M-H)-210]⁻ und [(M-H)-240]⁻ ersichtlich ist (siehe 2.1.1). Daneben scheinen sowohl von Aspalathin (**16**) als auch Nothofagin (**25**) Konstitutionsisomere zu existieren, wie die Fragmentierungsmuster der Peaks **38-40** nahe legen (**38** $\rightarrow m/z$ 451

[M-H]⁻; **39** & **40** → m/z 435 [M-H]⁻). Hierbei handelt es sich vermutlich u.a. um die jeweiligen 5'-C-glucoside der angeführten Aglyka.

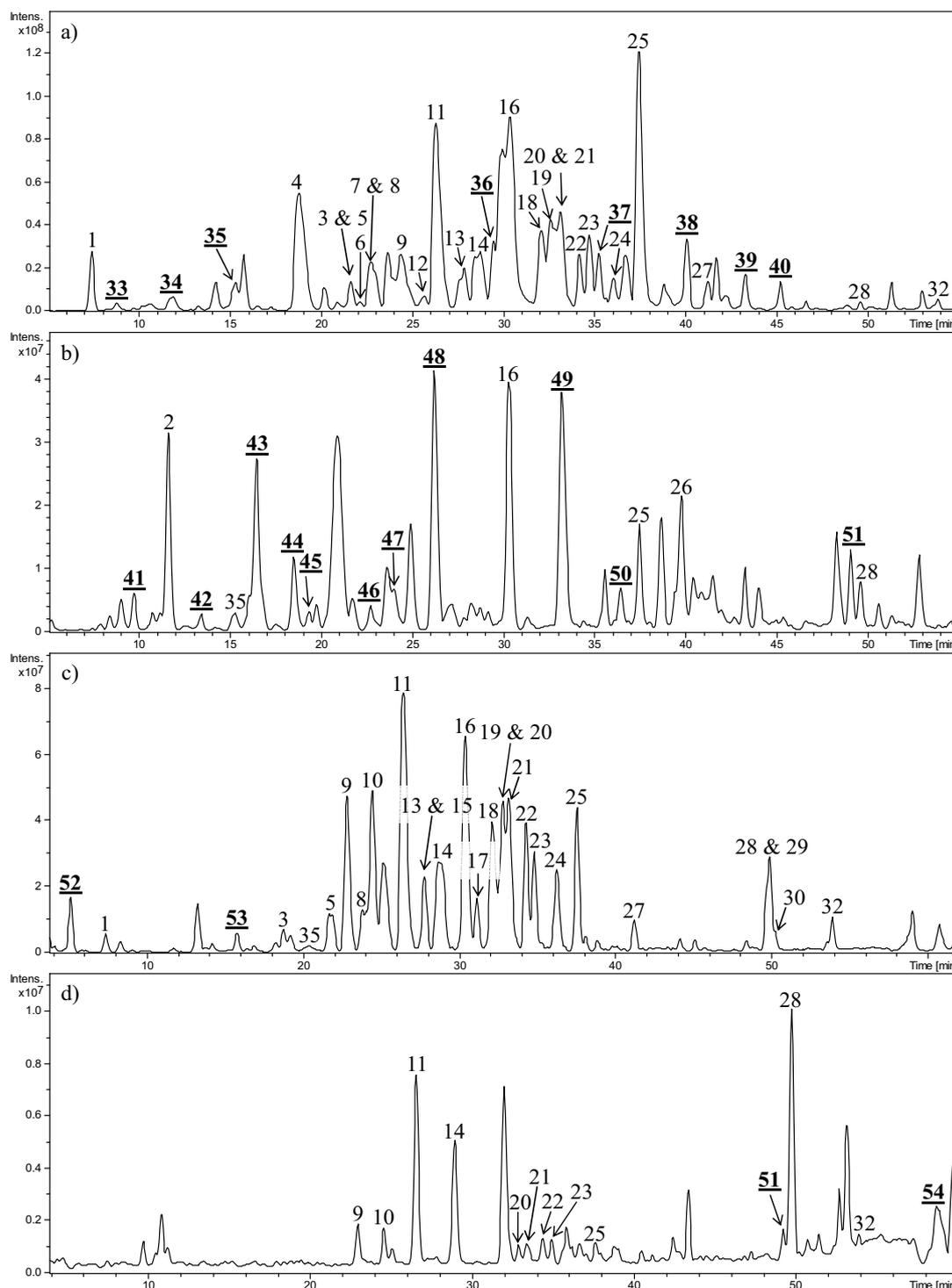


Abbildung 2.6: BPC von unfermentiertem (a & b) und fermentiertem (c & d) Rooibos nach Elution mit reinem (a & c) und ammoniakalischem (b & d) Methanol (neu identifizierte Verbindungen unterstrichen) - Peakzuordnung: siehe **Tabelle 2.1** und **Tabelle 2.3**.

Ferner konnten neben frei vorliegenden phenolischen Säuren (z.B. Kaffeesäure → m/z 179 [M-H]⁻, Cumarsäure → m/z 163 [M-H]⁻, Protocatechusäure → m/z 153 [M-H]⁻ und Syringa-

säure \rightarrow m/z 197 [M-H]⁻) auch einige korrespondierende O-Glykoside (Daten nicht alle aufgeführt) detektiert werden. Die freien Säuren wurden bereits von RABE et al. (1993) und KRAFZCYK et al. (2008) jeweils im Diethyletherextrakt des grünen bzw. fermentierten Rooibos nachgewiesen. Das ammoniakalische MeOH-Eluat des unverarbeiteten Rooibos (b) enthielt im Gegensatz zu dem des fermentierten Pflanzenmaterials (d) vorrangig Hydroxyzimtsäurederivate (**43-47** – siehe 2.1.1.5).

Tabelle 2.3: Übersicht über die nach Aufreinigung durch Polyamidsäulenchromatographie zusätzlich identifizierten Verbindungen (Hauptfragmente unterstrichen); die Daten zu den übrigen Verbindungen befinden sich in **Tabelle 2.1**^a

Peak	Rt [min]	[M-H] ⁻ m/z	MS ² m/z	Verbindung
33	8,7	315	153 (MS ³ 109)	Dihydroxybenzoesäure-O-hexosid
34	11,8	451	289 (MS ³ 245, 205, 179)	(-)-Epicatechin-/-(+)-Catechin-O-hexosid
35	15,2	577	451, <u>425</u> , 407, 289, 287, 245	Proanthocyanidin (Dimer)
36	29,4	613	523, 493, 433, 403, <u>373</u>	2',3,4',4,6'-Pentahydroxy-dihydrochalkon-3',5'-di-C-hexosid
37	35,2	597	507, 477, 417, 387, <u>357</u>	2',4,4',6'-Tetrahydroxy-dihydrochalkon-3',5'-di-C-hexosid
38	40,1	451	361, <u>331</u>	Konstitutionsisomer von Aspalathin (16)
39 & 40	42,1; 43,2	435	345, <u>315</u>	Konstitutionsisomere von Nothofagin (25)
41	9,7	357	<u>195</u> , 151, 123	Dihydroferulasäure-O-hexosid
42	13,3	341	179, <u>135</u>	Kaffeesäure-O-hexosid
43	16,0	337	191, <u>163</u> , 119	3- <i>p</i> CouQA
44	18,5	353	179, <u>173</u> , 135	4-CQA
45	19,2	367	<u>193</u> , 191	3-FQA
46	22,8	337	<u>173</u> , 163	4- <i>p</i> CouQA
47	24,1	337	<u>191</u> , 179, 173, 163	5- <i>p</i> CouQA
48 & 49	26,2; 33,2	599	509, <u>479</u> , 419, 389, 359	6,8-di-C-hexosid von m/z 275 [M-H] ⁻
50	36,5	569	509, 479, <u>449</u> , 419, 389, 359	6-C-pentosid-8-C-hexosid von m/z 275 [M-H] ⁻
51	49,0	491	315 (MS ³ 301)	Isorhamnetin-O-glucuronid
52	5,1	343	<u>191</u> , 169	galloylierte Chinasäure (Theogallin?)
53	15,7	289	<u>245</u> , 205, 179	(-)-Epicatechin
54	58,6	447	301	Quercetin-O-rhamnosid

^aRt, Retentionszeit; *p*CouQA, *p*-Cumaroylchinasäureester; CQA, Caffeoylchinasäureester; FQA, Feruloylchinasäureester

Tabelle 2.4 fasst die Gehalte der mengenmäßig wichtigsten Flavonoide beider Probenmaterialien nach Aufreinigung durch Polyamidsäulenchromatographie zusammen.

Der Vergleich mit den Gehalten nach methanolischer Extraktion (siehe 2.1.1.1) zeigt für einige Flavonoide eine starke Anreicherung. Die stärksten Zuwächse sind sowohl beim unfermentierten als auch fermentierten Rooibos für Isoorientin (**11**: +58 bzw. 42 %), Orientin (**14**: +57 bzw. 49 %), Rutin (**18**: +65 bzw. 38 %) und Aspalathin (**16**: +41 bzw. 64 %) zu verzeichnen.

Tabelle 2.4: Quantifizierung der Hauptflavonoide des Rooibos nach Anreicherung durch Polyamid-säulenchromatographie^a

Nr.	Verbindung	Gehalt [g/100 g]	
		RG (n = 3)	RF (n = 3)
11	Isoorientin	1,385 ± 0,040	0,699 ± 0,023
14	Orientin	0,948 ± 0,016	0,544 ± 0,025
16	Aspalathin	13,789 ± 0,431	0,348 ± 0,029
18	Rutin	0,687 ± 0,022	0,375 ± 0,013
20	Isovitexin	0,178 ± 0,005	0,109 ± 0,003
21	Vitexin	0,115 ± 0,003	0,088 ± 0,004
22	Hyperosid	0,034 ± 0,002	0,050 ± 0,004
23	Isoquercitrin	0,141 ± 0,002	0,073 ± 0,005
24	Luteolin-O-hexosid	0,039 ± 0,004	0,041 ± 0,004
25	Nothofagin	1,653 ± 0,076	0,070 ± 0,004

^aWerte angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung (als Glykoside berechnet). RG, Rooibos grün; RF, Rooibos fermentiert

2.1.1.4 Bestimmung von Flavan-3-olen (Catechinen)

Die Proben wurden nach dem in 4.5.1 beschriebenen Verfahren extrahiert und unter Anwendung der ISO 14502-2 mittels HPLC-DAD analysiert (siehe 4.5.4). Zur Quantifizierung wurde eine Kalibriergerade eines Coffein-Standards benutzt und die relativen Responsefaktoren (RRF) der identifizierten Catechine berücksichtigt (Tabelle 2.5). Der Vergleich der Retentionszeiten, individuellen UV-Spektren und MS/MS-Daten gewährleistete die sichere Peakidentifizierung.

Tabelle 2.5: Übersicht über Flavan-3-ole und deren Gehalte im Rooibos (als Mittelwert ± Standardabweichung)^a

Nr.	Rt [min]	[M-H] ⁻ m/z	MS ² m/z	Verbindung	Gehalt [mg/kg]	
					RG (n = 4)	RF (n = 4)
53	14,0	289	245, 205, 179 → 203 (MS ³)	(-)-Epicatechin	121,0 ± 8,4	ND

^aRt, Retentionszeit; RG, Rooibos grün; RF, Rooibos fermentiert; ND, nicht detektiert

Über mögliche im Rooibos enthaltene Flavan-3-ole findet man in der Literatur uneinheitliche Angaben. Während ALMAJANO et al. (2008) im Rahmen einer Studie zur antioxidativen und -mikrobiellen Aktivität von 13 Teesorten - darunter auch Rooibos - keine Catechine detektieren konnten, wiesen KRAFCZYK et al. (2008) bei der Charakterisierung phenolischer Inhaltsstoffe des Rooibos (+)-Catechin nach. Eine Quantifizierung erfolgte bislang nicht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in grünem Rooibos das Flavan-3-ol (-)-Epicatechin (**53**) in einer Konzentration von 121 mg/kg bestimmt werden. Nach Anreicherung der Polyphenole im größeren Maßstab (siehe 2.1.1.3) wurden in grünem und auch fermentiertem Rooibos darüber hinaus in Spuren (+)-Catechin (*m/z* 289 [M-H]⁻) via LC-MS/MS detektiert.

KUHR & ENGELHARDT (1991) konnten in grünem (1,03 g/100 g) und schwarzem Tee (0,64 g/100 g) einen deutlich höheren (-)-Epicatechin-Gehalt nach methanolischer Extraktion

(2 g Tr/200 mL) quantifizieren. Nach wässriger Extraktion (1 g Tr/100 mL) ermittelten KHOKHAR & MAGNUSDOTTIR (2002) im Rahmen der Bestimmung der Catechin- und Coffeingehalte von in Großbritannien konsumierten Tees durchschnittliche (-)-Epicatechin-Konzentrationen von 0,11-0,56 g/100 g in schwarzem und 0,44-0,95 g/100 g in grünem Tee. Die (+)-Catechin-Konzentrationen lagen mit 0,05-0,17 bzw. 0,07-0,13 g/100 g deutlich niedriger.

Die Ursache für den geringen Gehalt von Flavan-3-olen im fermentierten Rooibos sind vermutlich die stofflichen Veränderungen während der „Fermentation“. Beim schwarzen Tee werden die Catechine beispielsweise enzymatisch oxidiert und kondensieren zu höhermolekularen Polyphenolen bzw. Pigmenten (z.B. Theaflavine und Thearubigine – siehe 1.1 & 2.1.3). Ähnliche Umsetzungen sind auch für den Rooibos wahrscheinlich (siehe 2.1.4.2).

2.1.1.5 Bestimmung von Hydroxyzimtsäurederivaten (Chlorogensäuren)

Über im Rooibos vorliegende Hydroxyzimtsäurederivate gibt es bislang kaum Untersuchungen. KRAFCZYK et al. (2008) konnten Chlorogensäure (5-CQA) in fermentiertem Rooibos nachweisen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Zielverbindungen durch Festphasenextraktion (SPE) an Polyamid angereichert und mittels LC-MS/MS zunächst qualitativ analysiert.

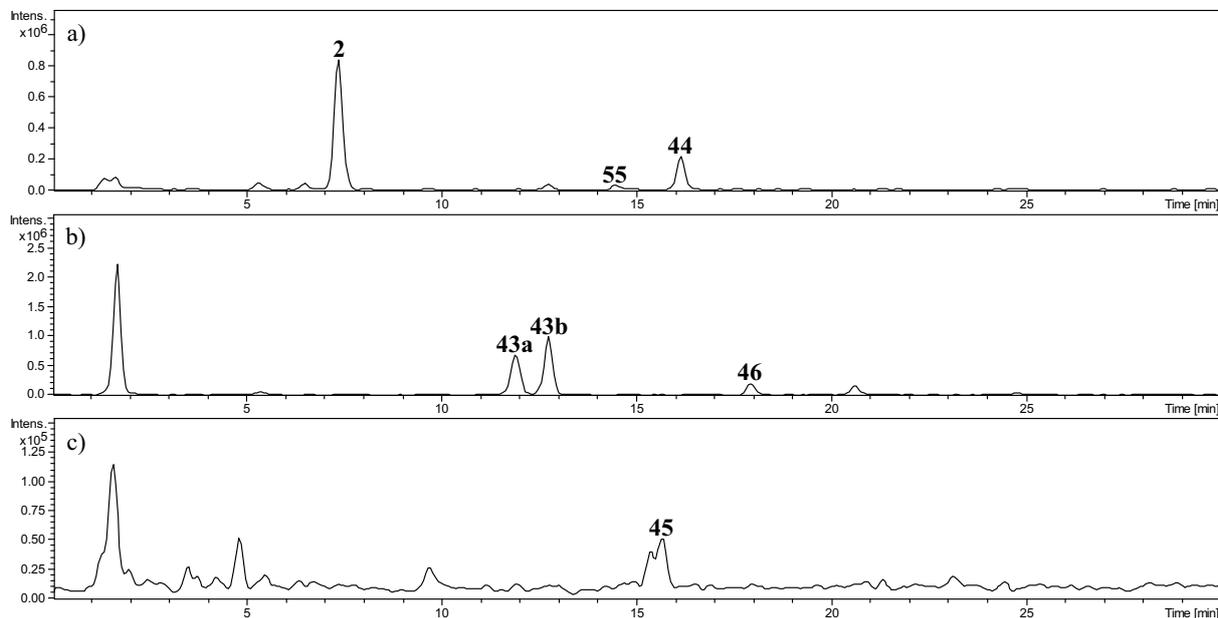


Abbildung 2.7: EIC charakteristischer Ionenspuren (a) m/z 353 $[M-H]^-$, b) m/z 337 $[M-H]^-$ und c) m/z 367 $[M-H]^-$) von Chlorogensäuren nach Aufarbeitung von unfermentiertem Rooibos - Peakzuordnung: siehe **Tabelle 2.6**.

Abbildung 2.7 zeigt Extracted Ion Chromatogramme charakteristischer Ionenspuren der Chlorogensäuren. Die Ionenspur mit m/z 353 $[M-H]^-$ stellt die mono-Caffeoylchinasäureester (2, 44, 55) dar. Das Fragment m/z 191 $[M-H]^-$ zeigt China- und m/z 179 $[M-H]^-$ Kaffeesäure

an (Tabelle 2.6). Die Ionenspur mit m/z 337 $[M-H]^-$ ist charakteristisch für *p*-Cumaroylchinasäureester (**43a**, **43b**, **46**). Von 3-*p*CouQA (**43a** & **43b**) existiert vermutlich ein Stellungsisomer, wie das identische Fragmentierungsmuster andeutet. Dieses zeigt in erster Linie die Fragmente m/z 163 [Cumarsäure-H] $^-$ und m/z 173 [Chinasäure-H₂O-H] $^-$. Für Feruloylchinasäureester (**45**) ist die Ionenspur m/z 367 $[M-H]^-$ spezifisch. Das Hauptfragment m/z 193 $[M-H]^-$ repräsentiert Ferulasäure. Ein Schema für die Identifikation von Chlorogensäuren mittels LC-MSⁿ ist bei CLIFFORD et al. (2003) dargestellt.

Die im grünen und fermentierten Rooibos vertretenen Hydroxyzimtsäurederivate wurden durch externe Kalibriergeraden der Referenzsubstanzen Chlorogen-, Ferula- und Cumarsäure über die jeweiligen relativen Responsefaktoren (RRF) per HPLC-DAD quantifiziert (Tabelle 2.6 – siehe 4.5.5).

Tabelle 2.6: Übersicht über Hydroxyzimtsäurederivate und deren Gehalte im Rooibos (Hauptfragmente unterstrichen)^a

Nr.	Rt [min]	$[M-H]^-$ m/z	MS ² m/z	Verbindung	Gehalt [mg/kg]	
					RG (n = 4)	RF (n = 4)
2	7,3	353	<u>191</u> , 179, 135 → 127 (MS ³)	3-CQA	53,4 ± 3,2	15,6 ± 0,6
55	14,4	353	<u>191</u> , 179, 161 → 127 (MS ³)	5-CQA	12,2 ± 1,1	1,8 ± 0,2
44	16,1	353	179, <u>173</u> , 135 → 111 (MS ³)	4-CQA	8,5 ± 0,9	5,0 ± 0,2
				\sum_{CQA}	74,1 ± 5,2	22,4 ± 1,0
43a	11,9	337	<u>163</u> , 191, 173 → 119 (MS ³)	3- <i>p</i> CouQA	15,2 ± 1,0	3,1 ± 0,2
43b	12,7	337	<u>163</u> , 191, 173 → 119 (MS ³)	3- <i>p</i> CouQA	80,9 ± 4,5	7,5 ± 0,2
46	20,6	337	<u>173</u> , 163 → <u>155</u> , 115 (MS ³)	4- <i>p</i> CouQA	5,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1
				\sum_{pCouQA}	101,5 ± 5,6	11,8 ± 0,5
45	15,7	367	<u>193</u> , 191 → 149, <u>134</u> (MS ³)	3-FQA	3,9 ± 0,6	1,1 ± 0,1
				$\sum_{CQA+pCouQA+FQA}$	179,5 ± 11,4	35,3 ± 1,6

^aWerte angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung. Rt, Retentionszeit; RG, Rooibos grün; RF, Rooibos fermentiert; CQA, Caffeoylchinasäureester; FQA, Feruloylchinasäureester; *p*CouQA, *p*-Cumaroylchinasäureester

Der Gesamtgehalt an Hydroxyzimtsäurederivaten ist im grünen Rooibos (ca. 180 mg/kg) ungefähr fünfmal so hoch wie im fermentierten Pflanzenmaterial (ca. 35 mg/kg). Dominierend im unverarbeiteten Erzeugnis ist 3-*p*CouQA (**43b**) mit ca. 81 mg/kg, gefolgt von 3-CQA (**2**) mit 53 mg/kg. Im fermentierten Produkt überwiegt 3-CQA (**2**) mit ca. 16 mg/kg und 3-*p*CouQA (**43b**) mit 8 mg/kg. 3-FQA (**45**) stellt in beiden Ausgangsmaterialien den geringsten Anteil. Für schwarzen Tee werden Gesamtgehalte an Chlorogensäuren von 3,1-4,5 g/kg angegeben (LAKENBRINK et al., 2000), für Röstkaffee-Mischungen durchschnittliche 3- bzw. 5-CQA-Gehalte von 5,01 bzw. 11,04 g/kg (KIEHNE, 1997).

2.1.2 Bestimmung von Proanthocyanidinen

Die Proanthocyanidinzusammensetzung des Rooibos war bislang kaum Gegenstand der Forschung. Lediglich JOUBERT (1990) untersuchte den Gesamtproanthocyanidingehalt von

sprüh- und gefriergetrockneten Rooibosextrakten. Identifiziert wurde bisher das Procyanidin B3 (BRAMATI et al. 2002).

Zur Bestimmung der Proanthocyanidine wurden diese aus dem Probenmaterial selektiv extrahiert, mittels Polyamidsäulenchromatographie angereichert und via LC-MS/MS analysiert (siehe 4.5.6). Abbildung 2.8 zeigt EIC charakteristischer Ionenspuren oligomerer Proanthocyanidine. Die identifizierten Verbindungen sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

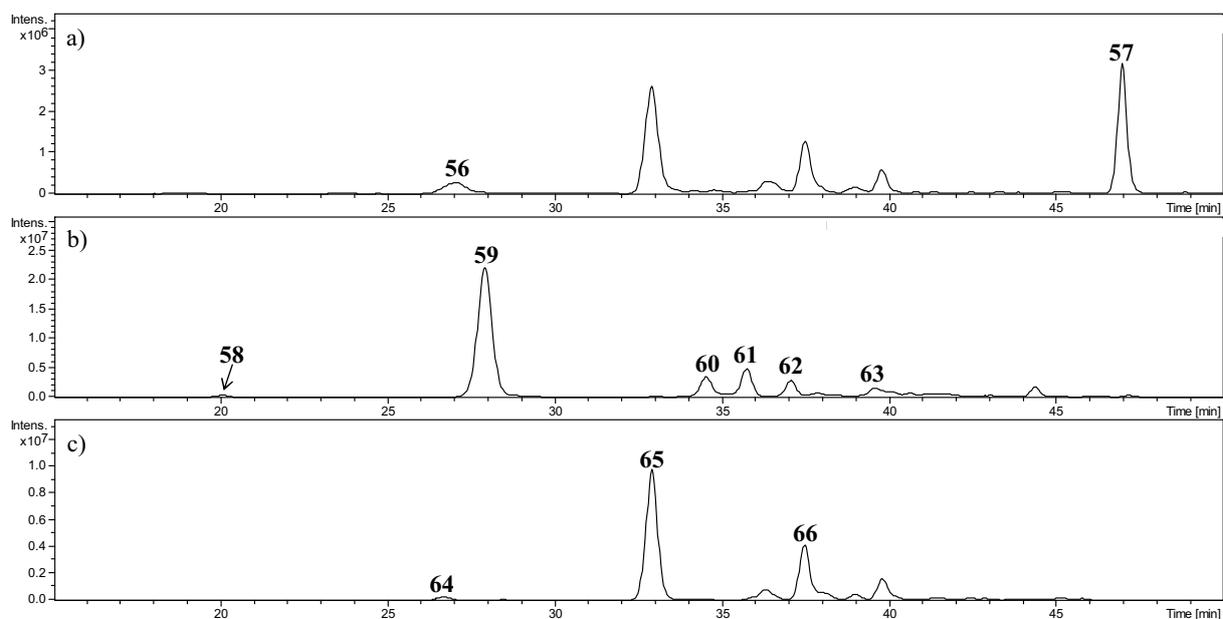


Abbildung 2.8: EIC charakteristischer Ionenspuren (a) m/z 577 $[M-H]^-$ \rightarrow Dimere, b) m/z 865 \rightarrow Trimere und c) m/z 1153 \rightarrow Tetramere) der Procyanidine nach Aufarbeitung von unfermentiertem Rooibos - Peakzuordnung: siehe **Tabelle 2.7**.

Tabelle 2.7: Überblick über Proanthocyanidine im fermentierten und unfermentierten Rooibos (Hauptfragmente unterstrichen)^a

Nr.	Rt [min]	$[M-H]^-$ m/z	MS^2 m/z	Verbindung
56	27,0	577	559, 451, 425, <u>407</u> , 289, 287, 245	C/EC-Dimer
57	46,9	577	559, 451, 425, <u>407</u> , 289, 287, 245	C/EC-Dimer
58	20,1	865	847, 739, 713, 695, 577, 525, 451, 425, <u>407</u> , 289, 287	C/EC-Trimer
59	27,9	865	847, 739, 713, 695, 577, 525, 451, 425, <u>407</u> , 289, 287	C/EC-Trimer
60	34,5	865	847, 739, 713, 695, 577, 525, 451, 425, <u>407</u> , 289, 287	C/EC-Trimer
61	35,8	865	847, 739, 713, 695, 577, 525, 451, 425, <u>407</u> , 289, 287	C/EC-Trimer
62	37,8	865	847, 739, 713, 695, 577, 525, 451, 425, <u>407</u> , 289, 287	C/EC-Trimer
63	39,5	865	847, 739, 713, 695, 577, 525, 451, 425, <u>407</u> , 289, 287	C/EC-Trimer
64	26,7	1153	1027, <u>865</u> , 739, 701, 577, 557, 451, 425, 407, 289, 287	C/EC-Tetramer
65	32,9	1153	1027, <u>865</u> , 739, 701, 577, 557, 451, 425, 407, 289, 287	C/EC-Tetramer
66	37,5	1153	1027, <u>865</u> , 739, 701, 577, 557, 451, 425, 407, 289, 287	C/EC-Tetramer

^aRt, Retentionszeit; C, (+)-Catechin; EC, (-)-Epicatechin

Elf Proanthocyanidine mit unterschiedlichem Polymerisationsgrad konnten bestätigt werden. Dabei handelt es sich ausschließlich um aus (+)-Catechin- bzw. (-)-Epicatechineinheiten

aufgebaute Dimere (**56**, **57**), Trimere (**58-63**) und Tetramere (**64-66**) mit den Pseudomolekülonen m/z 577, 865 und 1153 $[M-H]^-$. Die im negativen Modus beobachteten Fragmente werden am Beispiel eines C-4→C-8 verknüpften dimeren Procyanidins erläutert (Abbildung 2.9).

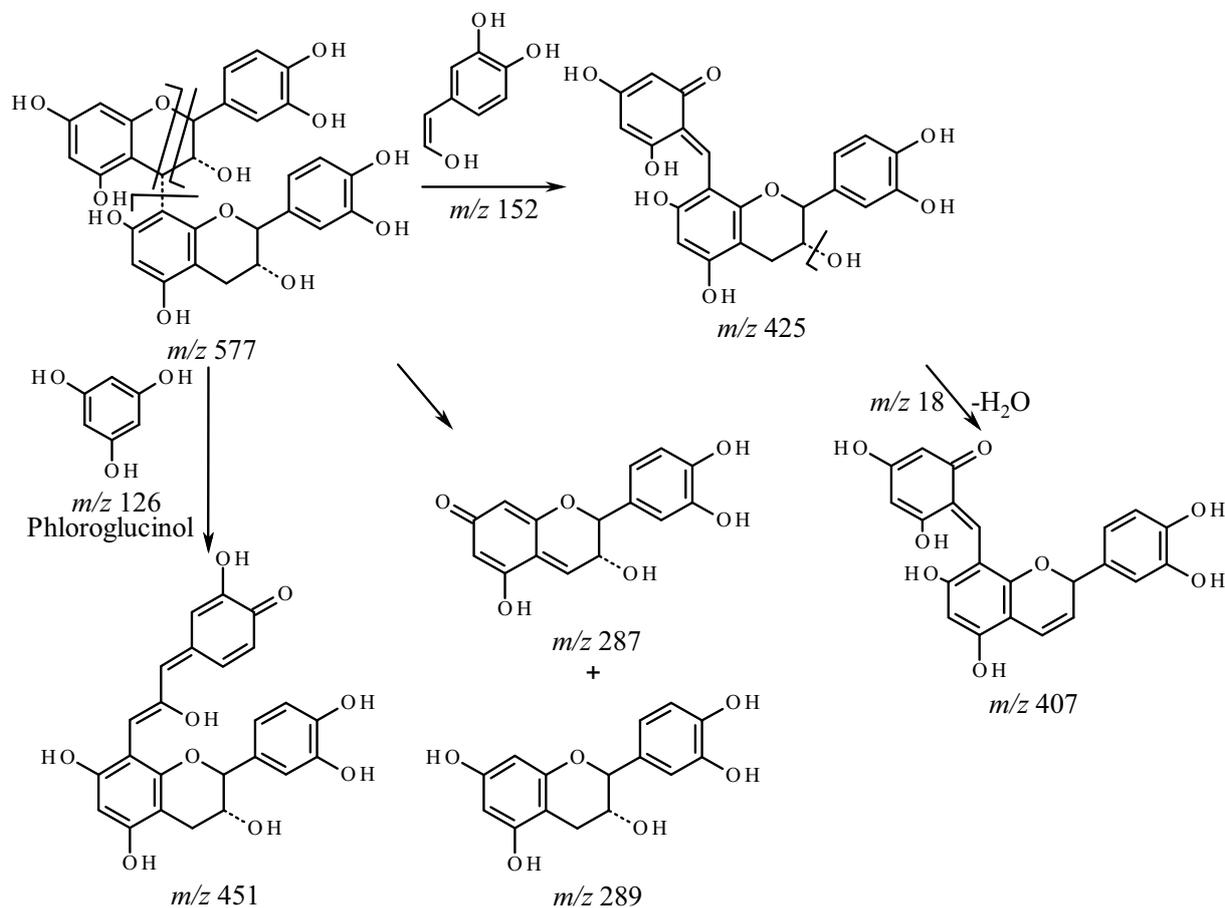


Abbildung 2.9: Fragmentierungsmuster eines dimeren Procyanidins (nach GU et al., 2003)

Das Fragment m/z 451 $[M-H]^-$ entsteht durch die Abspaltung eines Phloroglucinolrings (heterozyklische Spaltung), während das Fragment m/z 425 $[M-H]^-$ aus einer Retro-Diels-Alder-Spaltung hervorgeht. Durch die Spaltung der interflavonoiden Bindung (Chinonmethid) ist die Bildung der Fragmentationen m/z 289 und 287 $[M-H]^-$ möglich (GU et al., 2003; KARONEN et al., 2004). Da als Hauptcatechin des grünen Rooibos (-)-Epicatechin (**53**) identifiziert werden konnte (siehe 2.1.1.4), bestehen die Procyanidine vermutlich hauptsächlich aus (-)-Epicatechineinheiten.

Die Quantifizierung der dimeren und oligomeren Proanthocyanidine erfolgte aufgrund des Fehlens kommerziell verfügbarer Standards als Catechin-Äquivalente unter Berücksichtigung der relativen Responsefaktoren (HILAL, 2010 – siehe 4.5.6). Für das Epicatechin/Catechin-Dimer und -Tetramer lagen keine Werte vor. Die molare Absorption eines dimeren Procyanidins ist jedoch ungefähr zweimal so hoch wie die von Catechin; die eines Trimers dreimal so hoch usw.. Der Einfluss der interflavonoiden Bindung auf die Absorption ist bei

Procyanidinen aufgrund einheitlicher Bindungsform vernachlässigbar (ZIMMERMANN & GALENSA, 2007).

Tabelle 2.8: Überblick über Proanthocyanidingehalte im Rooibos^a

Nr.	Verbindung	Gehalt [mg/kg]	
		RG (n = 5)	RF (n = 5)
56	C/EC-Dimer	18,88*	ND
57	C/EC-Dimer	32,39 ± 8,81	**
	Σ_{Dimere}	51,27 ± 8,81	-
58	C/EC-Trimer	**	**
59	C/EC-Trimer	634,58 ± 36,78	**
60	C/EC-Trimer	58,75 ± 4,98	**
61	C/EC-Trimer	117,59 ± 5,70	**
62	C/EC-Trimer	**	**
63	C/EC-Trimer	25,50*	**
	Σ_{Trimere}	836,42 ± 47,46	-
64	C/EC-Tetramer	35,66*	ND
65	C/EC-Tetramer	899,42 ± 38,83	**
66	C/EC-Tetramer	325,73 ± 20,78	**
	$\Sigma_{\text{Tetramere}}$	1260,81 ± 59,61	-

^aWerte angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung (als Catechin-Äquivalente). RG, Rooibos grün; RF, Rooibos fermentiert; C, (+)-Catechin; EC, (-)-Epicatechin; ND, nicht detektiert; *, nur bei einer Probe unter Verdopplung der Einwaage quantifizierbar; **, in Spuren

Im Gegensatz zu den dimeren und oligomeren Procyanidinen im grünen Rooibos sind im fermentierten Produkt nur Spuren zu detektieren. Die Ursache liegt vermutlich in der verstärkten Bildung von höhermolekularen Bräunungsprodukten aus den Dimeren und Oligomeren während des Fermentationsprozesses. Im unfermentierten Pflanzenmaterial dominieren mit ca. 1261 ± 60 mg/kg die Tetramere (**64-66**), gefolgt von den Trimeren (**58-63**) und Dimeren (**56-57**).

Um zu zeigen, dass die polymeren Strukturen in beiden Pflanzenmaterialien u.a. aus Proanthocyanidinen bestehen, wurde die Phloroglucinolyse eingesetzt (siehe 2.1.3).

2.1.3 Bestimmung von Spaltprodukten nach Phloroglucinolyse

Während die Analyse intakter Proanthocyanidine Aufschluss über ihre durchschnittliche mittlere Molmasse und deren Verteilung gestattet, erhält man durch säurekatalytische Spaltung der Proanthocyanidine Informationen über deren Zusammensetzung (Bausteinanalyse) und die Natur der interflavonoiden Bindung (milde Phloroglucinolyse). Diese ist leicht spaltbar und führt zu einer Depolymerisierung der Proanthocyanidine, wobei terminale Untereinheiten (Flavan-3-ole) und positiv geladene Carbokationen (Erweiterungseinheiten) freigesetzt werden (Abbildung 2.10). Diese elektrophilen Intermediate können mittels

nukleophiler Reagenzien unter Adduktbildung abgefangen und analysiert werden. Als nukleophile Reagenzien werden z.B. Benzylmercaptan (RIGAUD et al., 1991; GU et al., 2003) oder Phloroglucinol (PG) eingesetzt (KENNEDY & JONES, 2001).

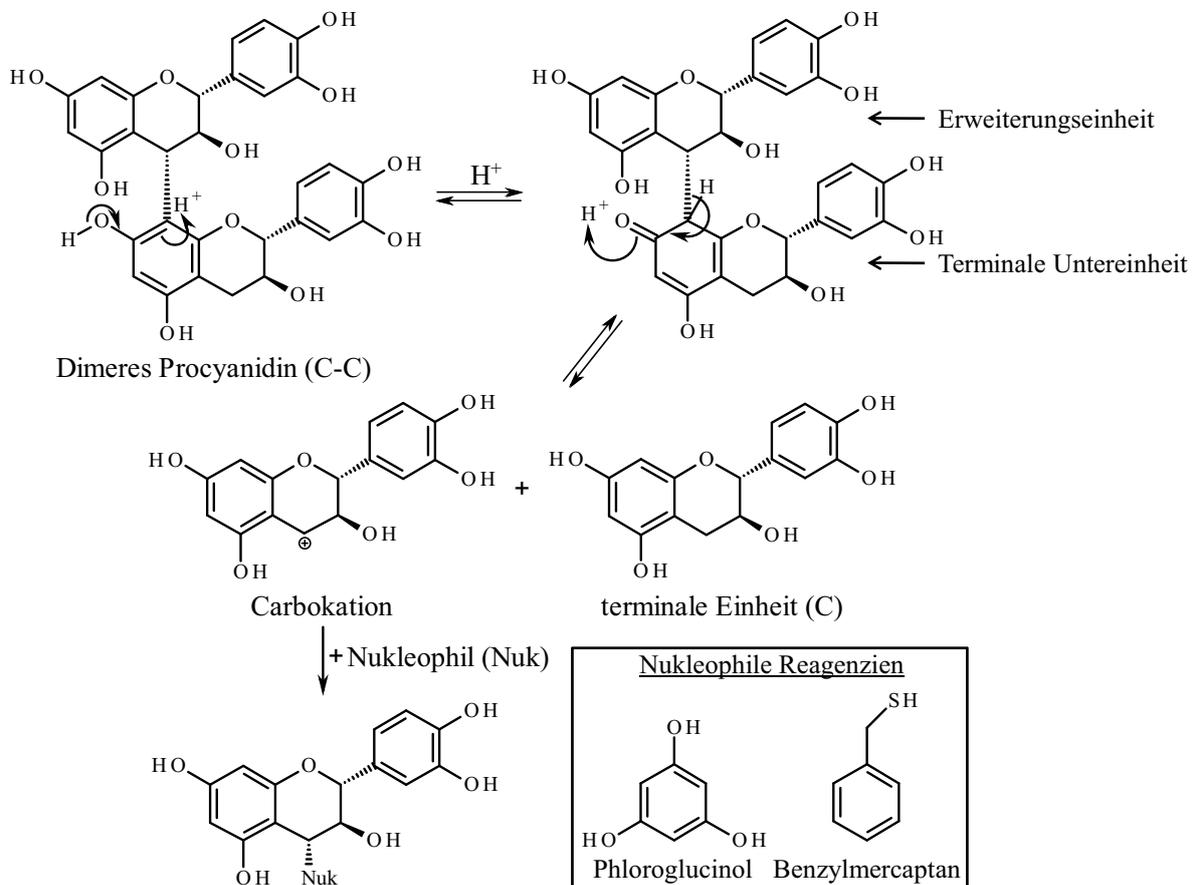


Abbildung 2.10: Mechanismus der säurekatalysierten Proanthocyanidinspaltung am Beispiel des dimeren Procyanidins B3 (C-C) (nach KENNEDY & JONES, 2001). C, (+)-Catechin

Die durchgeführten Experimente belegen, dass die Polymere des Rooibos überwiegend aus Proanthocyanidinen bestehen (prozentualer Anteil: 83 % (RG), 67 % (RF)), da sich der „Polymerhump“ im Bereich von 30-50 min durch Phloroglucinolyse nahezu vollständig zerlegen lässt (Abbildung 2.11). Die polymeren Proanthocyanidine wurden anhand einer modifizierten Methode nach HAMMERSTONE et al. (1999) als (+)-Catechin-Äquivalente bei 280 nm quantifiziert. Der Gehalt liegt bei ungefähr 4,2 g/100 g im unverarbeiteten und 0,8 g/100 g (als Catechin-Äquivalente) im verarbeiteten Rooibos. Damit machen die Proanthocyanidine neben den Dihydrochalkonen den größten Teil der phenolischen Verbindungen im Rooibos aus.

Die Diskrepanz in den Gehalten hat möglicherweise ihre Ursache in den bei der „Fermentation“ ablaufenden Prozessen. Denkbar wäre die Umsetzung der Proanthocyanidine oder - nach etwaigem partiellem Abbau - deren Bausteine zu höhermolekularen Bräunungsprodukten, die durch die Phloroglucinolyse nicht erfasst werden. Hinweise für diese Annahmen gibt es in Bezug auf den Rooibos nicht. Für den schwarzen Tee konnten allerdings

neuere Untersuchungen zeigen, dass eine beträchtliche Menge der kaum charakterisierten Thearubigine aus polyhydroxylierten Catechindimeren besteht, die sich im Redoxgleichgewicht mit ihren korrespondierenden Chinonen befinden (KUHNER et al., 2010 – siehe 1.1).

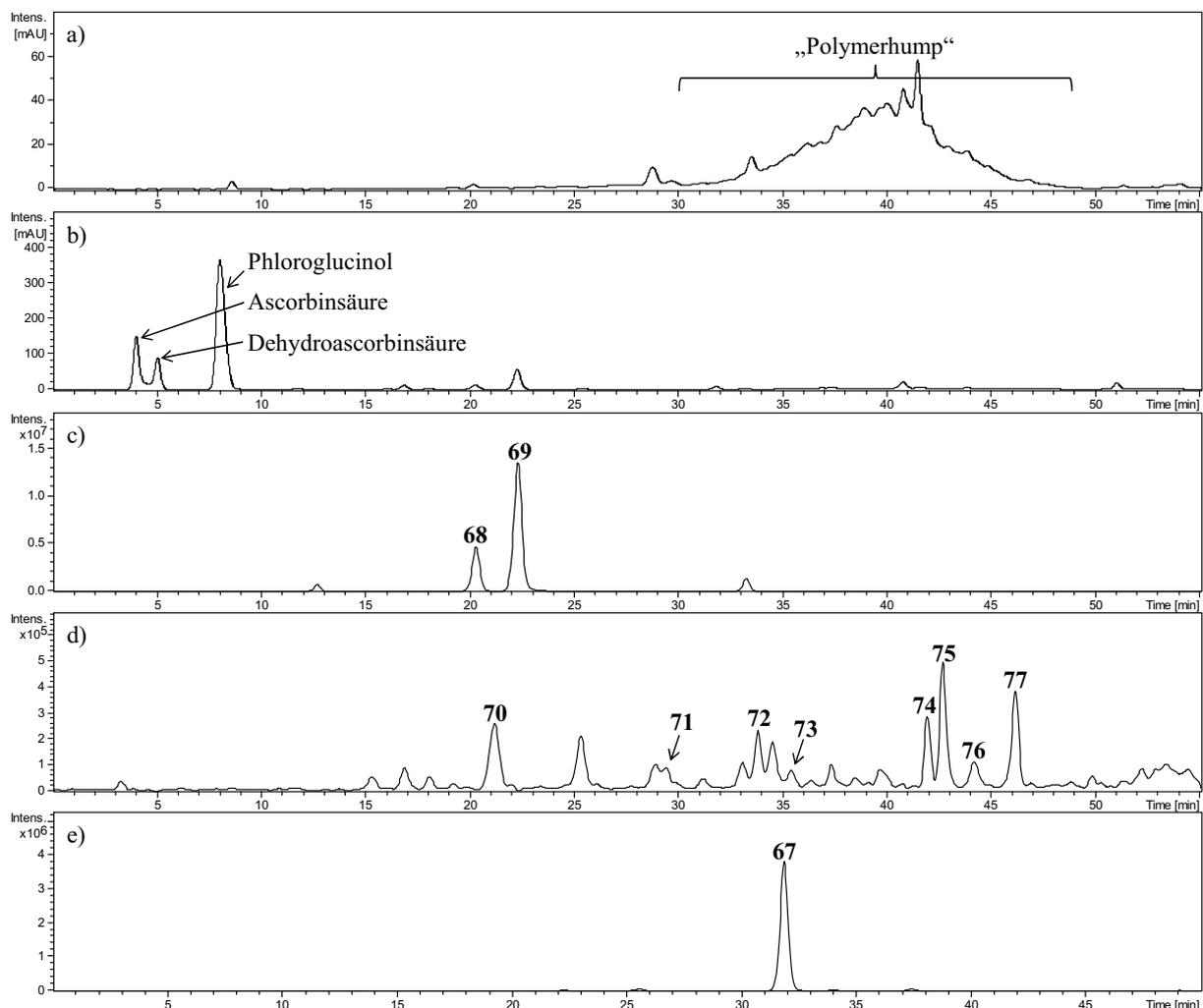


Abbildung 2.11: Base Peak Chromatogramm von unfermentiertem Rooibos nach Direktmessung (a) und Phloroglucinolyse (b) sowie EIC charakteristischer Ionenspuren von Phloroglucinoladdukten (c) m/z 413 [M-H]⁻ und d) m/z 701 [M-H]⁻ sowie (+)-Catechin (67) (e) m/z 289 [M-H]⁻ - Peakzuordnung: siehe **Tabelle 2.9**.

Nach Phloroglucinolyse konnten insgesamt 10 Phloroglucinol-Addukte (68-77) anhand ihrer Fragmentierungsmuster bestätigt werden (Tabelle 2.9). Die Hauptfragmente gehen auf die Abspaltung von Phloroglucinol [(M-H)-126]⁻ zurück. Als terminale Einheit wurde lediglich (+)-Catechin (67) freigesetzt. Als Erweiterungseinheiten konnten durch Vergleich der Retentionszeiten und Fragmentierungsmuster mit den jeweiligen Referenzsubstanzen sowohl ein C- als auch ein EC-PG-Addukt (68, 69: m/z 413 [M-H]⁻ → m/z 289 + m/z 126) identifiziert werden. Somit liegen in beiden Pflanzenmaterialien polymere Procyanidine vor, die aus etwa

19 % (RG) bzw. 23 % (RF) (+)-Catechin- und 81 % bzw. 77 % (-)-Epicatechineinheiten zusammengesetzt sind (Tabelle 2.9).

Die Hydrolyse der polymeren Procyanidine läuft nicht vollständig zu den monomeren Bausteinen ab. So ließen sich zu einem geringen Anteil auch C/EC-C/EC-PG-Addukte (70-77: m/z 701 [M-H]⁻ → 2 x m/z 289 + m/z 126) charakterisieren (Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9: Überblick über Phloroglucinol-Addukte und deren Gehalte im Rooibos (Hauptfragmente unterstrichen)^a

Nr.	Rt [min]	[M-H] ⁻ m/z	MS ² m/z	Verbindung	Gehalt [mg/kg]	
					RG (n = 4)	RF (n = 4)
67	30,6	289	<u>245</u> , 205, 179	C	464,54 ± 18,35	71,73 ± 4,36
68	20,2	413	<u>287</u> , 261	C-PG	1493,11 ± 64,46	290,94 ± 16,23
69	22,2	413	<u>287</u> , 261	EC-PG	6468,58 ± 256,58	982,41 ± 30,69
				∑ _{C/EC-PG}	7961,69 ± 321,04	1273,35 ± 46,92
70	21,1	701	<u>575</u> , 549, 449, 413, 287	C/EC-C/EC-PG	*	ND
71	29,3	701	<u>575</u> , 549, 449, 413, 287	C/EC-C/EC-PG	31,77 ± 4,63	ND
72	33,8	701	<u>575</u> , 549, 449, 413, 287	C/EC-C/EC-PG	*	ND
73	34,5	701	<u>575</u> , 549, 449, 413, 287	C/EC-C/EC-PG	*	ND
74	41,9	701	<u>575</u> , 549, 449, 413, 287	C/EC-C/EC-PG	*	ND
75	42,6	701	<u>575</u> , 549, 449, 413, 287	C/EC-C/EC-PG	154,53 ± 4,96	ND
76	44,1	701	<u>575</u> , 549, 449, 413, 287	C/EC-C/EC-PG	*	ND
77	46,1	701	<u>575</u> , 549, 449, 413, 287	C/EC-C/EC-PG	*	ND
				∑ _{C/EC-C/EC-PG}	186,30 ± 9,59	-

^aWerte angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung (als Catechin-Äquivalente). Rt, Retentionszeit; RG, Rooibos grün; RF, Rooibos fermentiert; C, (+)-Catechin; EC, (-)-Epicatechin; PG, Phloroglucinol; ND, nicht detektiert; *, in Spuren

Der Vergleich zeigt, dass in Korrelation mit den Ausgangsgehalten der polymeren Procyanidine (siehe oben) die Gehalte der Phloroglucinoladdukte im grünen Rooibos die des fermentierten Erzeugnisses deutlich übertreffen.

2.1.4 Bestimmung der Lagerstabilität von Rooibosflavonoiden

2.1.4.1 Fertiggetränke

Aufgrund der positiven Beurteilung von Kräuter- und Früchtetees durch den Verbraucher werden verstärkt Extrakte zur Herstellung von Fertiggetränken („RTD-Beverages“) eingesetzt. Zur Untersuchung der Stabilität von Flavonoiden in solchen Produkten wurden mit handelsüblichen Fertiggetränken Lagerversuche durchgeführt. Diese setzten sich aus einem von der Firma Plantextrakt GmbH & Co. KG aus grünem Rooibos gewonnenen Extrakt („Rooibos nativ“ – Extraktanteil im Fertiggetränk: 1,96 g/500 mL) sowie Zucker, Wasser, Säure und Aroma zusammen. Mit Fertiggetränken identischer Rezeptur (frisch und nach neunmonatiger Lagerung) wurden Nutrikinetikexperimente mit einem frischen und einem gelagerten Produkt durchgeführt (siehe 2.3).

Die Flavonoidgehalte des eingesetzten Extrakts sind im Vergleich zu denen in einem hausüblichen Teeaufguss (2 g Tr/200 mL Wasser – siehe 4.5.2) in Tabelle 2.10 angegeben. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur mit und ohne Lichtschutz („RT m. LS“, „RT o. LS“) sowie im Kühlschrank (+4 °C, „KS“), Tiefkühlraum (-18 °C, „TK“) und Trockenschrank (+40 °C, „TS“). Jeweils zu Beginn sowie nach 1, 3, 6, 12, 16, 22 und 29 Monaten wurden die Flavonoidgehalte erfasst (siehe 4.5.8) und der Gesamtpolyphenolgehalt nach Folin-Ciocalteu photometrisch ermittelt (siehe 4.4.3).

Tabelle 2.10: Flavonoidgehalte (in g/100 g) des zur Herstellung der Fertiggetränke verwendeten Extrakts („Rooibos nativ“)

Verbindung	Rooibosextrakt „Rooibos nativ“	Haushaltsüblicher Teeaufguss
Isoorientin (11)	1,41	0,27
Orientin (14)	1,13	0,18
Aspalathin (16)	6,75	2,99
Rutin (18)	0,69	0,08
Isovitexin (20)	0,14	0,03
Vitexin (21)	0,16	0,02
Nothofagin (25)	0,95	0,36

Die Quantifizierung der Flavonoide in den Fertiggetränken erfolgte durch Doppelbestimmung mittels HPLC-DAD. Zur sicheren Peakzuordnung wurden für jeden Messzeitpunkt LC-MS/MS-Messungen durchgeführt. Exemplarisch ist in den Abbildung 2.12 die Entwicklung des Orientin- (**14**) und Aspalathingehalts (**16**) über den gesamten Messzeitraum dargestellt.

Erwartungsgemäß sind bei Trockenschranklagerung die stärksten Abnahmen (nach einem Jahr → **16**: -60 %; **14**: -8 %), bei Lagerung im Tiefkühlraum die geringsten (nach einem Jahr → **16**: -7 %; **14**: -3 %) zu verzeichnen. Die Stärke der Abnahme fällt in Abhängigkeit von der chemischen Struktur des betrachteten Flavonoids unterschiedlich aus. So ist - unabhängig von der Lagerart - das 8-C-glucosid Orientin (**14**) stabiler als sein Stellungsisomer Isoorientin (**11**: 6-C-glucosid). Ähnliches gilt für das Isomerenpaar Isovitexin (**20**: 6-C-glucosid) und Vitexin (**21**: 8-C-glucosid). Bei den O-glykosiden wird Luteolin-O-hexosid (**24**) weit weniger stark abgebaut als die 3-O-glykoside Rutin (**18**), Hyperosid (**22**) und Isoquercitrin (**23**). Die Lagerung im Tiefkühlraum bietet gegenüber der im Kühlschrank nur geringfügige Vorteile.

Insgesamt betrachtet liegen bei den Dihydrochalkon-C-glucosiden Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) im Vergleich zu den Flavon-C/O- und Flavonol-O-glykosiden die stärksten Rückgänge in den Gehalten (insbesondere bei RT- und TS-Lagerung) vor. Die Ursache ist in der verstärkten Bildung von polymeren Strukturen aus beiden Dihydrochalkonen mit zunehmender Temperatur (TS bei 40 °C ≡ fermentative Bedingungen) zu sehen (siehe 1.2.3 und 2.1.4.2). Diese höhermolekularen Substanzen weisen vermutlich eine geringere Anzeigeempfindlichkeit (Responsefaktor) im Folin-Ciocalteu-Test auf als die intakten Dihydro-

chalkone. Dieses ist neben der geringeren Löslichkeit der Bräunungsprodukte als wesentlicher Grund für die beobachtete stetige Abnahme des Gesamtphenolgehalts anzuführen. In Übereinstimmung mit dieser Annahme ergaben sich für diesen Parameter die größten Verluste bei der Trockenschranklagerung.

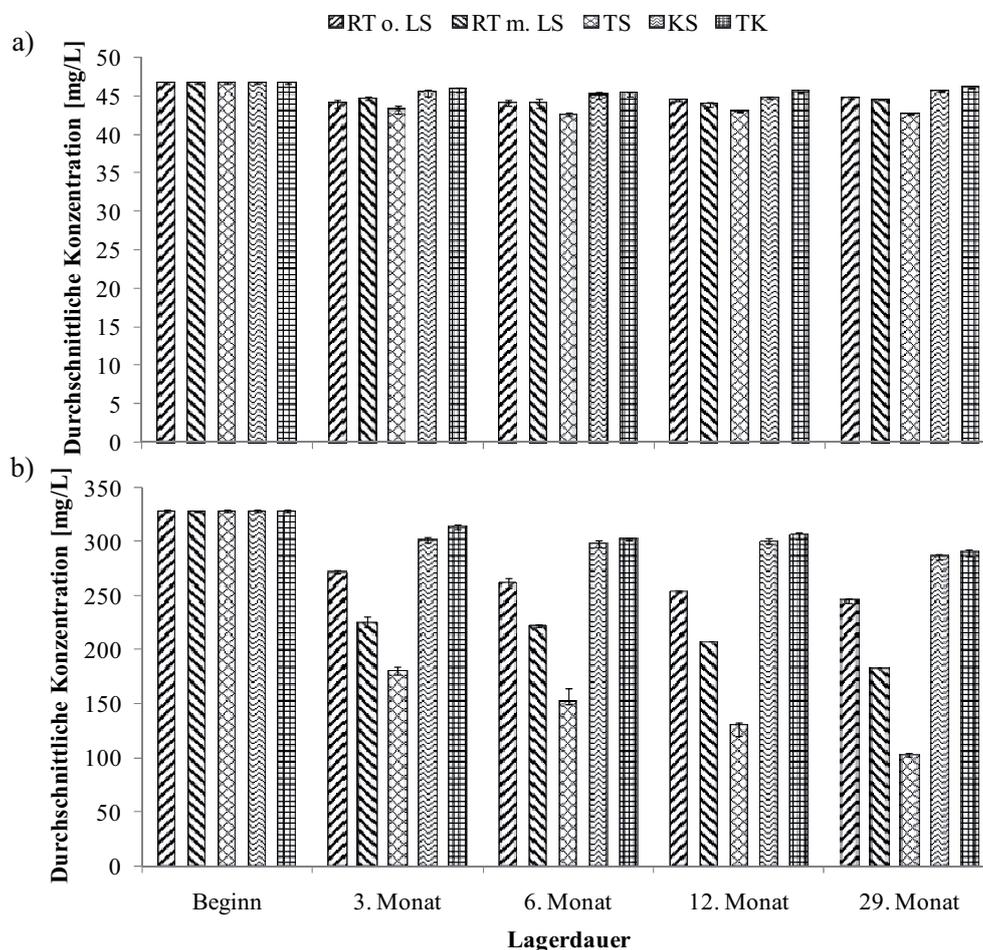


Abbildung 2.12: Entwicklung des Gehalts an Orientin (a) und Aspalathin (b) in Abhängigkeit von der Lagerdauer und -art

2.1.4.2 Inkubation von Aspalathin und Nothofagin

Um genauere Aussagen über die bei der „Fermentation“ ablaufenden Prozesse treffen zu können, wurden zur Simulation fermentativer Bedingungen Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) in Wasser gelöst und bei 40 °C unter Lichteinfluss inkubiert. Abbildung 2.13 stellt die resultierenden HPLC-DAD-Chromatogramme exemplarisch für Aspalathin (**16**) an drei verschiedenen Messpunkten vor. Über LC-MS/MS-Messungen erfolgte die Substanzidentifizierung.

Die qualitative Betrachtung der Chromatogramme zeigt zum einen den bereits beschriebenen Abbau von Aspalathin (**16**) unter bevorzugter Bildung der (*R/S*)-Eriodictyol-6-C-glucoside **9** und **10** (Tabelle 2.11), die im Gegensatz zu den 8-C-glucosiden **15** und **17** zu Isoorientin (**11**) und Orientin (**14**) weiterreagieren können (KRAFZCYK & GLOMB, 2008 – siehe 1.2.3).

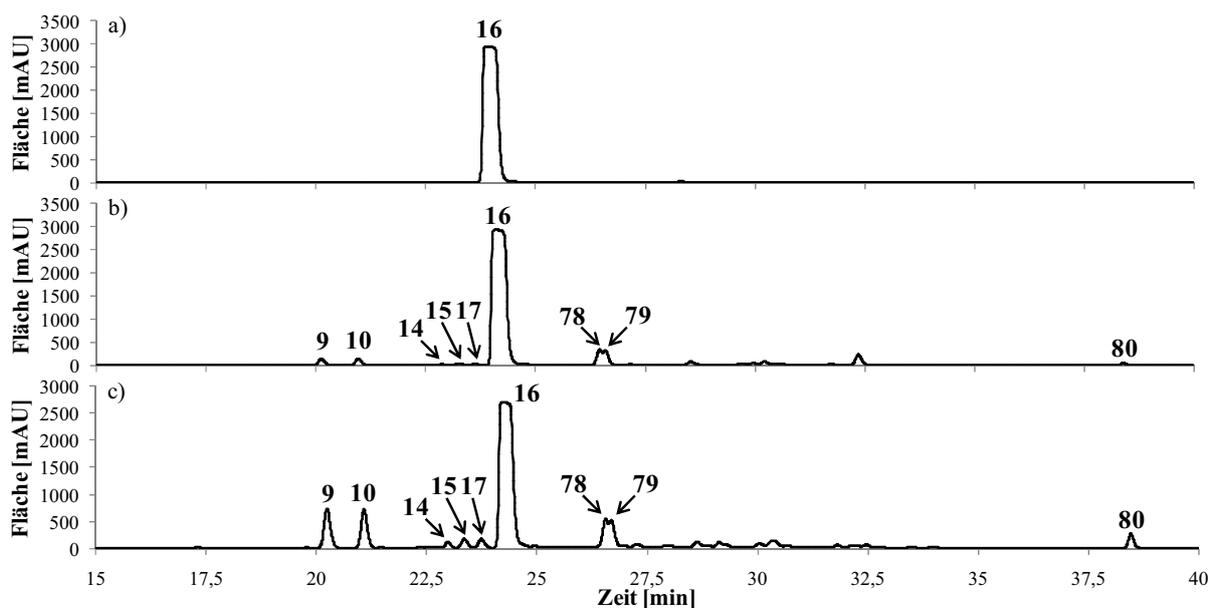


Abbildung 2.13: Inkubation von Aspalathin (**16** → 5 mg/mL – 287 nm) (a) Lagerungsbeginn; b) nach 60 h bei 40 °C; c) wie b) +24 h bei 60 °C) - Peakzuordnung: siehe **Tabelle 2.11**

Tabelle 2.11: Überblick über die bei der Inkubation von Aspalathin (**16**) identifizierten Verbindungen (Hauptfragmente unterstrichen)^a

Nr.	Rt [min]	[M-H] ⁻ m/z	MS ² m/z	Verbindung
9	21,4	449	359, <u>329</u>	(S)-Eriodictyol-6-C-glu
10	22,2	449	359, <u>329</u>	(R)-Eriodictyol-6-C-glu
14	23,8	447	357, <u>327</u>	Orientin
15	24,1	449	359, <u>329</u>	(S)-Eriodictyol-8-C-glu
16	24,6	451	361, <u>331</u>	Aspalathin
17	25,5	449	359, <u>329</u>	(R)-Eriodictyol-8-C-glu
78	27,2	901	811, <u>781</u> , 721, 691, 661, 523, 493, 449	Aspalathin-Dimer 1
79	27,5	901	811, <u>781</u> , 721, 691, 661, 523, 493, 449	Aspalathin-Dimer 2
80	38,7	289	271, 245, <u>167</u> , 125	2',3,4',4,6'-Pentahydroxydihydrochalkon

^aRt, Retentionszeit; glu, glucosid

Zum anderen ist ein zweiter Prozess zu beobachten: Aspalathin (**16**) scheint bei Luftkontakt auf nichtenzymatischem Weg zu höhermolekularen Bräunungsprodukten oxidiert zu werden (Abbildung 2.14). In diesem Kontext konnten zwei aus jeweils zwei Aspalathineinheiten aufgebaute Dimere (**78**, **79**) mit dem Pseudomolekülion m/z 901 [M-H]⁻ identifiziert werden. Das Fragment m/z 449 [(M-H)-452]⁻ bestätigt die für dimere Strukturen zu erwartende Abspaltung eines Aspalathinmoleküls. Die Fragmente m/z 811 [(M-H)-90]⁻, 781 [(M-H)-120]⁻, 721 [(M-H)-180]⁻, 691 [(M-H)-210]⁻ und 661 [(M-H)-240]⁻ sind charakteristische Bruchstücke von Di-C-glykosiden und geben einen Hinweis auf die Dimerisierung des Mono-C-glucosids Aspalathin (**16**). KRAFCZYK et al. (2009b) klärten beide Dimere mittels NMR-Spektroskopie und CD-Messungen (Circulardichroismus) auf und charakterisierten diese als Atropisomere.

Nothofagin (**25**) reagiert über die vier (*R/S*)-Naringenin-6/8-C-glucoside zu den Flavonen Isovitexin (**20**) und Vitexin (**21**), die sich allerdings nur in Spuren im Inkubationsansatz nachweisen ließen. Die Oxidationsprozesse laufen aufgrund des Fehlens der *o*-Dihydroxystruktur am B-Ring deutlich langsamer als beim Aspalathin (**16**) ab. Eine verringerte Bräunung ist die Folge. In Analogie zu Aspalathin (**16**) deutet das detektierte Pseudomolekülion m/z 871 $[M-H]^+$ zusammen mit dem Fragment m/z 435 $[(M-H)-436]^+$ auf ein bislang nicht beschriebenes Dimer von Nothofagin (**25**) hin.

Der in Abbildung 2.14 dargestellte Mechanismus der Dimerisierung spielt ebenfalls eine Rolle bei der Bildung von Bisflavanolen, die ihrerseits bedeutende Zwischenprodukte auf dem Weg zu farbigen Strukturen wie Theaflavinen und Thearubiginen sind (TANAKA et al., 2002; KRAFZCYK et al., 2009b).

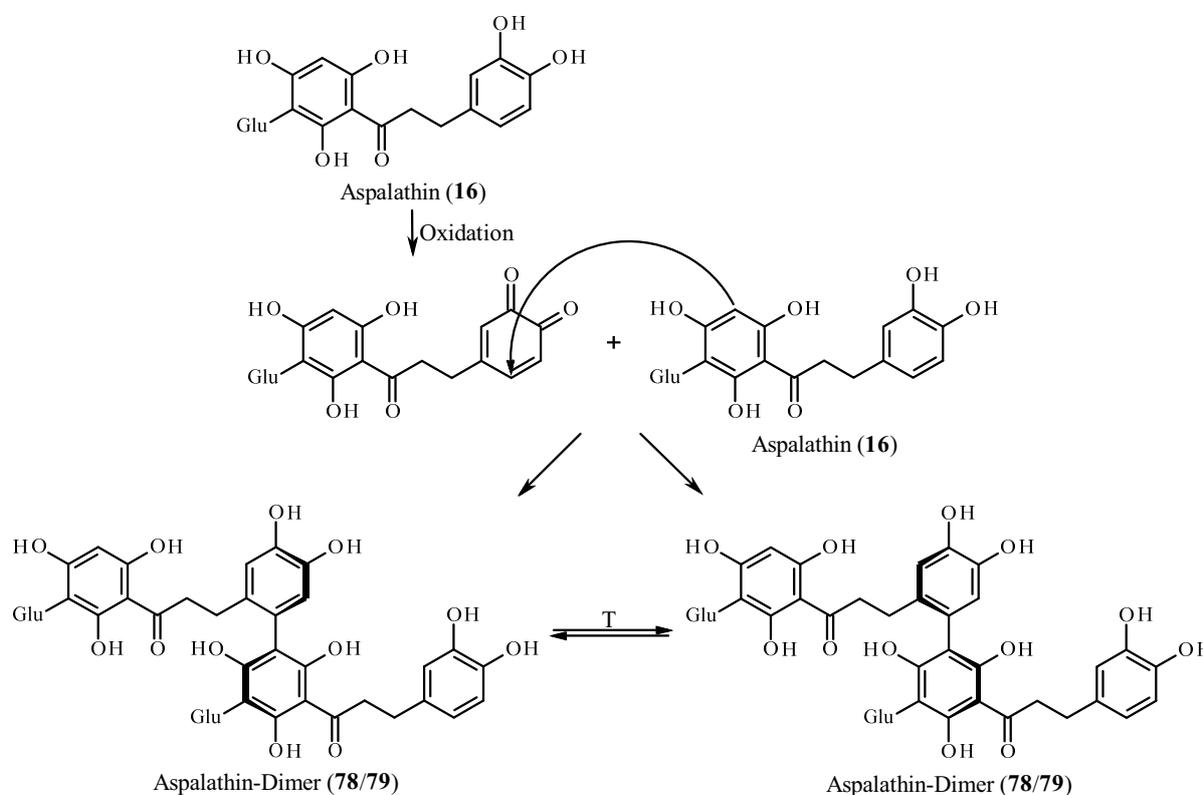


Abbildung 2.14: Oxidative Kopplung von Aspalathin (**16**) unter Bildung der Atropisomere **78** und **79** (nach KRAFZCYK et al., 2009b). Glu, glucosid

Die Gehalte der Abbau-/Umsetzungsprodukte von Aspalathin (**16**) sind in Abbildung 2.15 graphisch gegen die Messzeitpunkte aufgetragen. Bis zu einer Inkubationsdauer von ca. 24 h ist eine exponentielle Zunahme der Gehalte von (*R*)- und (*S*)-Eriodictyol-6-C-glucosid (**9**, **10**) zu beobachten, die dann in annähernd lineare Anstiege übergehen. Eine ähnliche Entwicklung liegt für das Aglykon von Aspalathin (**80**) vor. Der Kurvenverlauf der beiden Dimere **78** und **79** ist zu Beginn der Bräunungsreaktionen mit denen der (*R/S*)-Eriodictyol-6-C-glucoside **9** und **10** vergleichbar. Führt man die Inkubation unter drastischeren Bedingungen (24 h Lagerung bei 80 °C) fort, so ist nach Erreichen der Maximalkonzentration eine Verringerung

der Dimer-Gehalte unter zunehmender Polymerisierung und Bräunung (bei 450 nm erfasst) zu beobachten. Ferner steigen die Gehalte der (*R/S*)-Eriodictyol-6-C-glucoside **9** und **10** beträchtlich, womit sich höhere Konzentrationen von Isoorientin (**11**) und Orientin (**14**) ergeben.

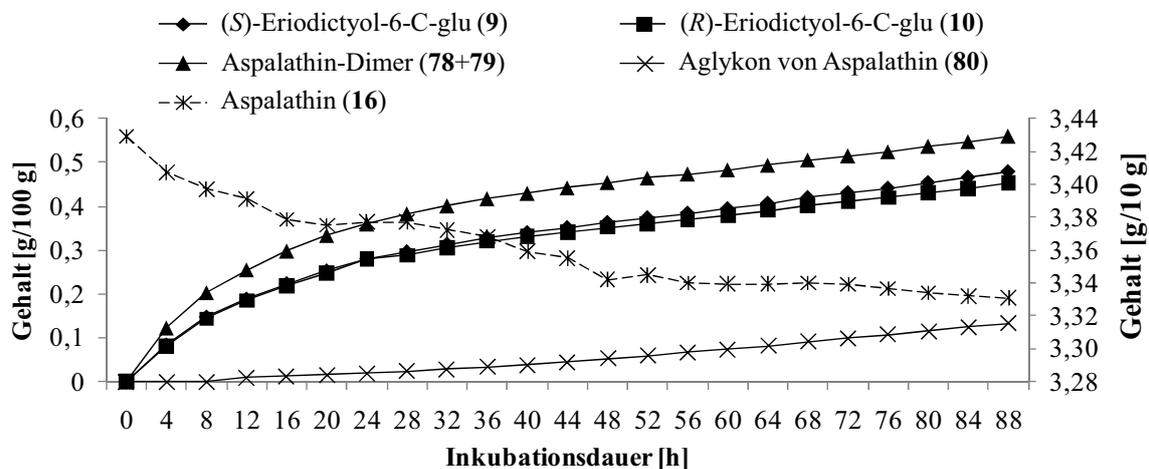


Abbildung 2.15: Gehalte der aus Aspalathin (**16**) entstehenden Abbau- bzw. Umsetzungsprodukte in Relation zu der Inkubationsdauer (Aspalathingehalt auf Sekundärachse aufgetragen)

Die beschriebenen Umsetzungsprodukte von Aspalathin (**16**) treten auch in den Fertiggetränken auf. So ist eine stetige Zunahme der Gehalte von (*S*)- und (*R*)-Eriodictyol-6-C-glucosid (**9**, **10**) bei gleichzeitigem Aspalathinabbau mit steigender Lagerdauer zu beobachten. In Abhängigkeit von der Lagerart sind die Bildungsraten der Produkte erwartungsgemäß unterschiedlich schnell. So werden die Höchstgehalte der Dimere **78** und **79** bei Trockenschranklagerung früher erreicht als bei der Tiefkühlagerung. Dementsprechend setzt bei erst genannter Lagerart eine frühere Bräunung und Trübung der Fertiggetränke ein.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass mit Blick auf Aspalathin (**16**) als einem wertgebenden Rooibosbestandteil eine Lagerung der Fertiggetränke bei 8 °C empfehlenswert ist, da bei Raumtemperlagerung unter Lichtschutz nach nur einem Monat bereits 10 % der ursprünglich enthaltenen Menge abgebaut werden.

2.2 1. Humanstudie: Rooibostee & aktive Fraktion

2.2.1 Bioverfügbarkeitsstudien mit Rooibos

Mit Rooibos wurden bereits zwei Humanstudien durchgeführt. STALMACH et al. (2009) verabreichten zehn Probanden Rooibosgetränke aus dem unfermentierten und fermentierten Pflanzenmaterial. Acht Metabolite (O-methylierte, -sulfatierte und -glucuronidierte Metabolite von Aspalathin und zusätzlich Eriodictyol-O-sulfat) konnten im Urin identifiziert werden. Hauptausscheidungsprodukt nach Verabreichung des unfermentierten Produkts war methyliertes und glucuronidiertes Aspalathin, dasjenige nach Gabe des fermentierten Teegetränks Eriodictyol-O-sulfat. Der Hauptteil der Metabolite von Aspalathin wurde innerhalb von 5 h nach Teegabe ausgeschieden. Im Plasma konnten keine intakten Flavonoide sowie deren Metabolite detektiert werden.

Bei einer weiteren Studie mit sechs Probanden wurde ein Teeaufguss aus grünem Rooibos verabreicht (COURTS & WILLIAMSON, 2009). Methyliertes sowie methyliertes und glucuronidiertes Aspalathin konnten im Urin der Studienteilnehmer nachgewiesen werden. Plasmaproben wurden nicht entnommen.

Neben den beiden Humanstudien führten KREUZ et al. (2008) einen Tierversuch mit Schweinen unter Verfütterung eines aus unfermentiertem Rooibos hergestellten Extrakts über einen Zeitraum von elf Tagen durch. Per LC-MS/MS wurden sechs Verbindungen (intaktes, methyliertes, glucuronidiertes sowie glucuronidiertes und methyliertes Aspalathin, das glucuronidierte Aglykon von Aspalathin und ein Metabolit des Eriodictyols) im Urin identifiziert. Im Plasma konnten keine Zielverbindungen nachgewiesen werden.

2.2.2 Studiendesign

Die Humanstudie wurde in Kooperation mit der Leibniz Universität Hannover (Institut für Lebenswissenschaft und Humanernährung) als placebokontrollierte, monozentrische, offene und vergleichende Cross-over-Studie durchgeführt. Sie umfasste drei separate Untersuchungsreihen, in denen die einzelnen Prüfprodukte verabreicht wurden. Die Planung und Durchführung erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (in der Version von Tokio, 2004) und in Anlehnung an die Prinzipien guter klinischer Praxis. Der Ethikantrag wurde durch die Freiburger Ethikkommission am 29.02.2008 genehmigt.

Bei der ersten, von Juni bis Juli 2008 durchgeführten Humanstudie erfolgte die Verabreichung der Rooibosprodukte in Form eines herkömmlichen Teeaufgusses und einer aus grünem Rooibos isolierten aktiven Fraktion (siehe 2.2.3). Im Rahmen der zweiten Humanstudie im Februar 2009 wurde ein frisches und ein gelagertes Rooibosfertiggetränk (Lagerung über einen Zeitraum von neun Monaten bei Raumtemperatur und Dunkelheit) zur Testung ein-

gesetzt (siehe 2.3). Als Placebo kam bei der ersten Humanstudie Wasser und bei der zweiten ein den Prüfprodukten ähnliches Präparat gleicher Rezeptur ohne den Zusatz von Rooibos-extrakt zum Einsatz.

An beiden Humanstudien nahmen zwölf gesunde, männliche Probanden teil, die alle Nicht-raucher waren und weder an kardiovaskulären, gastrointestinalen sowie hepatischen, noch renalen und endokrinen Beschwerden litten (siehe 6.1). Das Alter der Teilnehmer variierte zwischen 21 und 35 Jahren (im Mittel 25,3 Jahre) und der Body Mass Index (BMI) zwischen 20,0 und 27,4 kg/m² (im Mittel 23,4 kg/m²).

Während einer Zeitspanne von zwei Wochen vor dem ersten Untersuchungstag (Depletionsphase) und im Laufe der zweiwöchigen Humanstudie mussten die Probanden auf den Konsum flavonoidhaltiger Lebens- und Genussmittel (z.B. Früchte, Gemüse, Tee, Kaffee, Wein und Fruchtsäfte) sowie die Einnahme flavonoidhaltiger Supplemente verzichten (siehe 6.2). Am ersten Untersuchungstag wurden die Probanden randomisiert in drei Cross-over-Gruppen eingeteilt und erhielten jeweils 500 mL des Placebos, Teegetränks oder der aktiven Fraktion. Standardisierte Mahlzeiten mit geringen Flavonoidgehalten und arm an Antioxidantien wurden 0,5, 2 und 6 h nach Einnahme der Prüfprodukte verabreicht (siehe 6.3). Blutproben wurden vor sowie 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5 und 8 h nach der Gabe genommen und Urinproben innerhalb sechs verschiedener Zeitintervalle (vor sowie 0-2, 2-4, 4-6, 6-8 und 8-24 h nach dem Konsum) gesammelt. Die Gewinnung des Blutplasmas aus dem Vollblut erfolgte nach dem in 4.4.5.2 beschriebenen Verfahren.

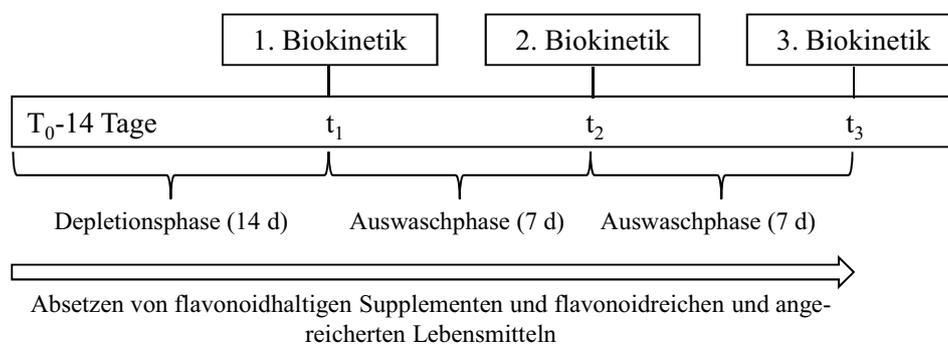


Abbildung 2.16: Exemplarische Darstellung des Ablaufs der beiden Humanstudien (d, Tage)

Zur Vermeidung einer gegenseitigen Beeinflussung der Prüfprodukte waren die drei Untersuchungstage (t_1 , t_2 , t_3) durch zwei einwöchige Auswaschphasen voneinander getrennt (Abbildung 2.16). An den Untersuchungstagen wurden die Prüfprodukte getauscht, so dass jeder Proband alle drei Getränke erhielt. Zwei der zwölf Probanden brachen die 1. Humanstudie aus persönlichen Gründen ab.

2.2.3 Isolierung der aktiven Fraktion

Eine aus grünem Rooibos isolierte aktive Fraktion wurde neben einem praxisüblichen Teeaufguss und Placebo als Prüfprodukt bei der 1. Humanstudie eingesetzt. Diese wurde im präparativen Maßstab mit Hilfe der Gegenstromverteilungschromatographie (HSCCC) isoliert. Sie ist diejenige CCC-Fraktion, die sich durch das stärkste antioxidative Potential im TEAC-Assay (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity) auszeichnete. Die Isolierung erfolgte nach dem in Abbildung 2.17 dargestellten Arbeitsschema.

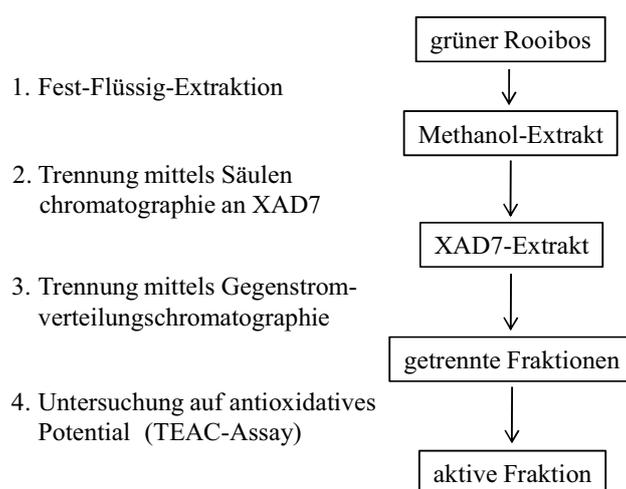


Abbildung 2.17: Arbeitsschema zur Isolierung der aktiven Fraktion aus grünem Rooibos

Grüner Rooibos wurde zunächst einer Fest-Flüssig-Extraktion mit 70%igem Methanol unter standardisierten Bedingungen unterzogen. Zur Gewährleistung einer möglichst vollständigen und schonenden Extraktion der Flavonoide wurde eine Extraktionstemperatur von 60 °C und -dauer von 60 min unter ständigem Rühren gewählt. Nach Aufreinigung des methanolischen Extrakts mittels einer Amberlite® XAD7-Säule zur Entfernung von Störsubstanzen (organische Säuren, Proteine oder Kohlenhydrate) wurde der XAD7-Extrakt durch HSCCC-Trennung weiter fraktioniert.

Zur Optimierung der Trennbedingungen wurden vorab geeignete Fließmittelsysteme durch Verteilungsversuche ermittelt (siehe 4.4.4). Insbesondere das System Ethylacetat/*n*-Butanol/Wasser erwies sich mit Verteilungskoeffizienten von 0,5-1 bei Mischungsverhältnissen im Bereich von 5/0/5 und 4/1/5 (v/v/v) als geeignet (Tabelle 2.12). Die CCC-Läufe machten deutlich, dass das Verhältnis von Ethylacetat und *n*-Butanol das Elutionsverhalten der Probe und damit die Güte der Fraktionierung beeinflusst. Im Vergleich zu einer Absenkung des Butanolanteils und der damit verbundenen Polaritätsverringerng führt dessen Erhöhung zu einer unzureichenden Trennung. Eine zusätzliche Reduzierung der Polarität unter Substitution des Butanols begünstigte die Qualität der Fraktionierung nicht weiter. Die Systeme 1 und 2 führten trotz geeigneter Verteilungskoeffizienten zu einer nicht zufriedenstellenden Separierung in nur zwei Hauptpeaks.

Tabelle 2.12: Getestete Fließmittelsysteme für die Fraktionierung des XAD7-Extrakts von grünem Rooibos mittels HSCCC (*t*BME, *tert.*-Butylmethylether)

Nr.	<i>t</i> BME	2-Propanol	Ethylacetat	<i>n</i> -Butanol	Wasser	Verteilungskoeffizient
1	5	6	0	0	10	1,40
2	4	6	1	0	10	1,06
3	0	0	5	0	5	0,38
4	0	0	4,8	0,2	5	0,52
5	0	0	4,6	0,4	5	0,80
6	0	0	4,4	0,6	5	1,00
7	0	0	4,2	0,8	5	1,11
8	0	0	4	1	5	1,20

Zur Fraktionierung des XAD7-Extrakts wurde daher System 5 ausgewählt und dieses zur Erzielung einer schnellen Trennung mit großen Ausbeuten an aktiver Fraktion hinsichtlich der Flussrate und Rotationsgeschwindigkeit optimiert. Bis zu einer Extrakteinwaage von ca. 3-4 g bei 800 U/min und einem Fluss von 4-4,5 mL/min konnten gute Trennungen innerhalb relativ kurzer Zeit (ca. 6 h) erzielt werden, was eine Isolierung der erforderlichen Mengen innerhalb der begrenzten Zeit ermöglichte. Abbildung 2.18 zeigt das HSCCC-Chromatogramm einer Trennung von 500 mg des XAD7-Extrakts. Es ergaben sich insgesamt neun Fraktionen (inklusive der Coilfraktion), von denen **F 5** mit rund 120 mg neben der Durchbruchfraktion **F 1** (240 mg) den größten Anteil stellte.

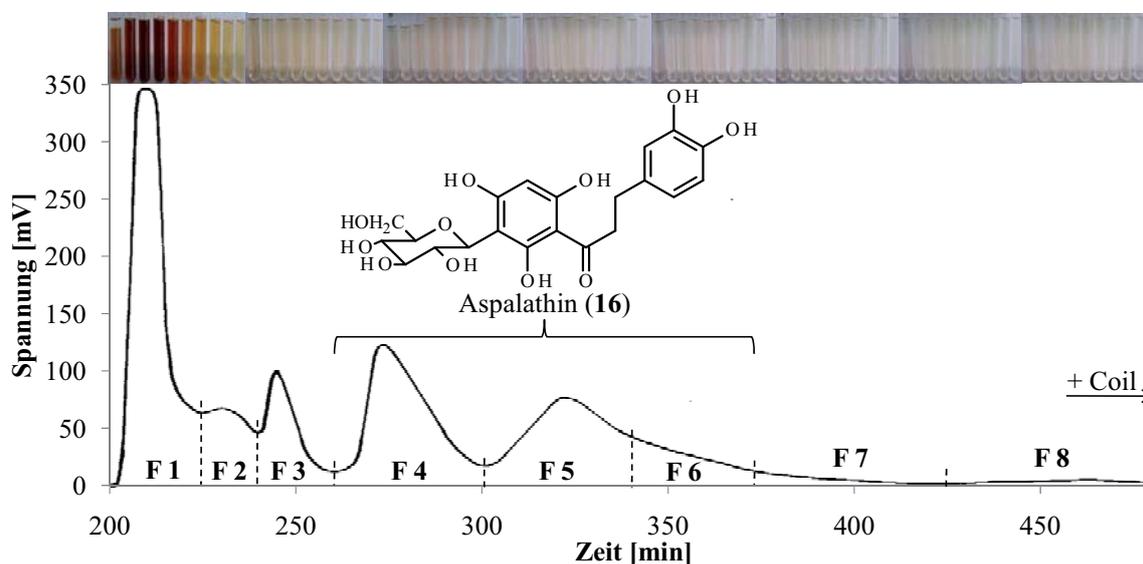


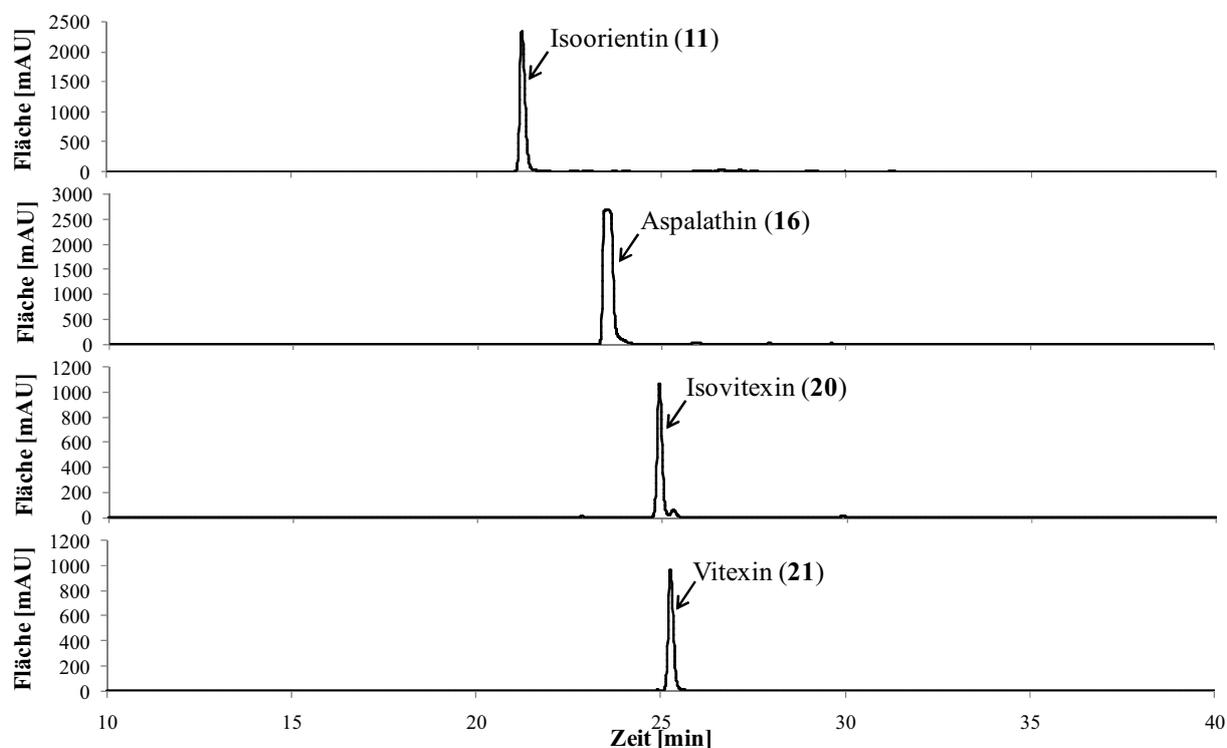
Abbildung 2.18: HSCCC-Chromatogramm (354 nm) des XAD7-Extrakts (Fließmittel: Ethylacetat/*n*-Butanol/Wasser (4,6/0,4/5, v/v/v))

Die Fraktionen wurden mittels HPLC-DAD und LC-MS/MS untersucht (Tabelle 2.13). Durch den Einsatz der HSCCC konnte eine Fraktionierung des XAD7-Extrakts vorgenommen werden. Die Rooibosflavonoide wurden dabei in Reihenfolge ihrer Polaritäten aufgetrennt. Hervorzuheben ist, dass sich die einzelnen Fraktionen bereits nach der CCC-Trennung durch eine hohe Reinheit auszeichneten und eine Anreicherung der Hauptflavonoide erfolgte.

Tabelle 2.13: Übersicht über die in den CCC-Fractionen mengenmäßig wichtigsten Verbindungen nach Trennung von 500 mg des XAD7-Extrakts (Hauptverbindungen und -fragmente unterstrichen)

Fraktion	Auswaage [mg]	[M-H] ⁻ m/z	MS ² m/z	Verbindung	Reinheit bei 354 nm [%]
F 1	238,6	609	519, <u>489</u> , 399, 369	<u>Luteolin-6,8-di-C-hexosid</u>	k.A.
		593	503, <u>473</u> , 383, <u>353</u>	Apigenin-6,8-di-C-hexosid	
F 2	16,6	465	375, <u>345</u>	<u>Dihydroquercetin-C-hexosid</u>	k.A.
		609	301	Rutin	
F 3	25,6	447	429, 357, <u>327</u>	Isorientin	10
		609	301	<u>Rutin</u>	82
F 4	26,0	447	429, 357, <u>327</u>	<u>Isorientin</u>	93
		451	361, <u>331</u>	Aspalathin	2
F 5	118,5	447	357, <u>327</u>	Orientin	48
		451	361, <u>331</u>	<u>Aspalathin</u>	52
F 6	6,1	447	357, <u>327</u>	<u>Orientin</u>	76
		451	361, <u>331</u>	Aspalathin	2
		431	413, 341, <u>311</u>	Isovitexin	20
F 7	3,1	431	413, 341, <u>311</u>	<u>Isovitexin</u>	75
		431	341, <u>311</u>	Vitexin	9
F 8	2,4	431	413, 341, <u>311</u>	Isovitexin	2
		431	341, <u>311</u>	<u>Vitexin</u>	94
		435	345, <u>315</u>	Nothofagin	ND
Coil	27,2	463	301	Isoquercitrin	13
		463	301	<u>Hyperosid</u>	29
		447	285	Luteolin-O-hexosid	11
		435	345, <u>315</u>	Nothofagin	28

^ak.A., keine Angabe (aufgrund komplexer Zusammensetzung); ND, nicht detektiert

**Abbildung 2.19:** HPLC-DAD-Chromatogramme einiger Fraktionen nach HSCCC-Trennung von grünem Rooibos (354 nm bzw. 287 nm für Aspalathin)

Zum Zweck der Isolierung von Reinsubstanzen aus dem Probenmaterial können die Fraktionen exakter entsprechend des DC- anstatt des CCC-Chromatogramms vereint werden. HPLC-DAD-Chromatogramme von HSCCC-Fractionen, die nach diesem Verfahren gewonnen wurden, sind in Abbildung 2.19 dargestellt. Die Reinheit der Flavonoide beträgt in allen Fällen über 90 % (bei 354 bzw. 287 nm für Aspalathin (**16**)).

Neben den in Tabelle 2.13 aufgeführten Hauptverbindungen konnten eine Vielzahl von Minorkomponenten nachgewiesen werden, die insbesondere in den komplexer zusammengesetzten Fraktionen **F 1-3** auftraten. Zu diesen Verbindungen gehören u.a. die sehr polaren Flavon-di-C-glykoside Luteolin- (**3**) und Apigenin-6,8-di-C-hexosid (**7**) sowie einige Hydroxyzimtsäurederivate (z.B. 3-CQA (**2**)). In Abbildung 2.20 sind beispielhaft MS/MS-Spektren von Flavon-di-C-glykosiden in **F 1** aufgeführt, die anhand ihrer Fragmentierungsmuster charakterisiert werden konnten (siehe 2.1.1).

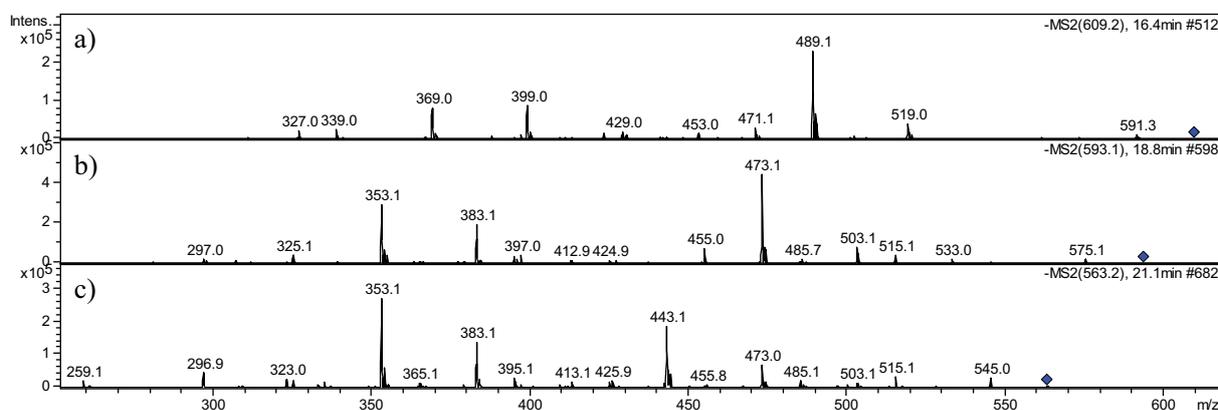


Abbildung 2.20: MS/MS-Massenspektren verschiedener Flavon-di-C-glykoside (m/z 609 [M-H]⁺: Luteolin-6,8-di-C-hexosid (a), m/z 593 [M-H]⁺: Apigenin-6,8-di-C-hexosid (b), m/z 563 [M-H]⁺: Isochaftosid (c)) aus **F 1**

Der TEAC-Test wurde zur Ermittlung des antioxidativen Potentials der CCC-Fractionen herangezogen (Abbildung 2.21).

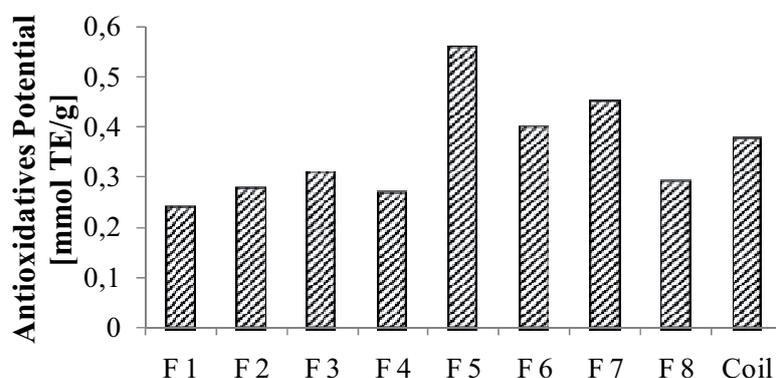


Abbildung 2.21: Übersicht über das antioxidative Potential (TEAC-Assay – Werte als Trolox-Äquivalente angegeben) der CCC-Fractionen. TE, Trolox-Äquivalente

Die Fraktionen **F 5** (119 mg) und **F 6** (6 mg), in denen Aspalathin (**16**) in hohen Konzentrationen vorlag, zeichneten sich durch ein hohes antioxidatives Potential aus. Dieses ist mit der *o*-Dihydroxy-Struktur am B-Ring des Dihydrochalkons zu erklären, die eine Keto-Enol-Tautomerie ermöglicht (siehe 2.1.1.2). Als weiterer Grund ist die 2',6'-Dihydroxyacetophenon-Anordnung innerhalb des Dihydrochalkongrundgerüsts zu nennen (NAKAMURA et al., 2003). **F 7** (3 mg) und der **Coil** (27 mg) besitzen ebenfalls hohe TEAC-Werte, die vermutlich bei **F 7** auf Isovitexin (**20**) und Vitexin (**21**) sowie im **Coil** auf Hyperosid (**22**), Isoquercitrin (**23**) und Luteolin-O-hexosid (**24**) sowie Nothofagin (**25**) zurückzuführen sind (siehe 2.1.1.2). Der Vergleich der TEAC-Werte der Fraktionen mit denen der Reinsubstanzen (siehe Abbildung 2.5) zeigt, dass die Referenzsubstanz Aspalathin (**16**) mit 0,87 mmol TE/g potenter ist als die CCC-Fraktionen, aus denen die Verbindung isoliert wurde (**F 5** und **F 6**). Somit liegt kein synergistischer Effekt vor. Die Ursache für die hohe Aktivität von **F 7** ist vermutlich auf die hohe Wirksamkeit von Isovitexin (**20**) zurückzuführen. Demnach scheint das 6-C-glucosid stärker wirksam zu sein als das 8-C-glucosid (siehe 2.1.1.2).

Aufgrund der hohen Ausbeuten wurde als aktive Fraktion für den Einsatz in der Humanstudie **F 5** ausgewählt. Die zu isolierenden Mengen richteten sich nach dem Gehalt ihrer Hauptverbindung (\rightarrow Aspalathin (**16**)) im Teeaufguss. Dieser liegt im Bereich von 4,5-12,0 % (SCHULZ et al., 2003). Ausgehend von einem vollständigen Stoffübergang aus dem Pflanzenmaterial in den Aufguss mussten daher mindestens 1,8 g der aktiven Fraktion für jeden der drei Untersuchungstage (\equiv 450 mg/Proband) isoliert werden, um vergleichbare Mengen zu applizieren. Dieses gestattet die Beurteilung der Bioverfügbarkeit des Dihydrochalkons in Abhängigkeit von der Matrix (komplexes Teegetränk im Vergleich zur definiert zusammengesetzten aktiven Fraktion). Abbildung 2.22 zeigt exemplarisch das HPLC-DAD-Chromatogramm der für den 1. Untersuchungstag bereitgestellten, aktiven Fraktion (2,0 g). Hauptbestandteil ist Aspalathin (**16**, Absorptionsmaximum (λ_{\max}): 287 nm), gefolgt von Isoorientin (**11**), Orientin (**14**), Isovitexin (**20**) sowie Rutin (**18**).

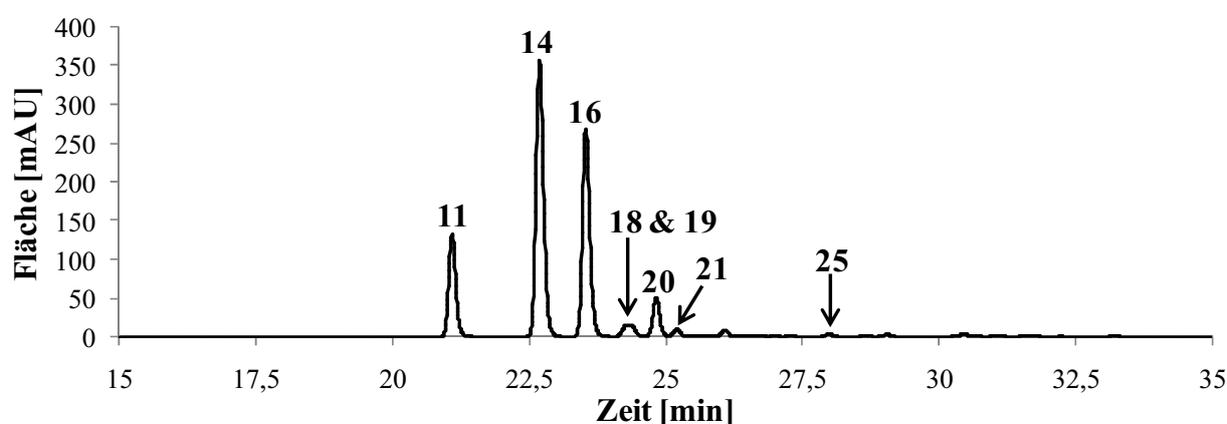


Abbildung 2.22: HPLC-DAD-Chromatogramm der aktiven Fraktion für den 1. Untersuchungstag (354 nm): Isoorientin (**11**), Orientin (**14**), Aspalathin (**16**), Rutin & Quercetin-O-rutinosid (Isomer) (**18, 19**), Isovitexin (**20**), Vitexin (**21**) und Nothofagin (**25**)

2.2.4 Quantifizierung der Prüfprodukte

2.2.4.1 Rooibostee

Die Flavonoidzusammensetzung des Rooibostees wurde durch HPLC-DAD-Messung (Doppelbestimmung) von zwölf wässrigen Extrakten, die analog des Herstellungsverfahrens für die Humanstudie (siehe 4.4.5.1) bereitet wurden, bestimmt. Der Teeaufguss ist zur Erfassung auch intakter Verbindungen im Plasma und Urin etwas stärker konzentriert als praxisüblich (\rightarrow 10 g Tr statt 5 g Tr auf 500 mL Wasser). Abbildung 2.23 zeigt das resultierende HPLC-DAD-Chromatogramm. Die Substanzidentifizierung erfolgte mittels LC-MS/MS (Tabelle 2.14).

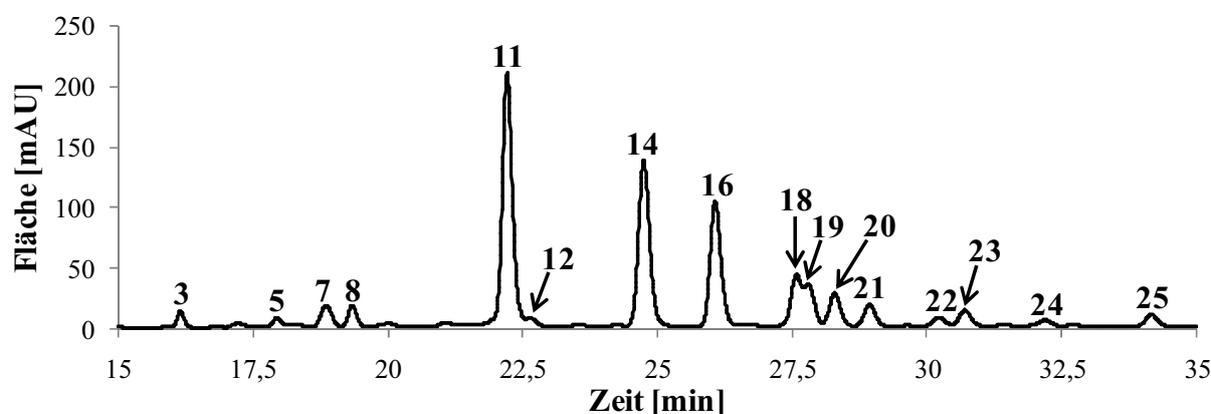


Abbildung 2.23: HPLC-DAD-Chromatogramm eines wässrigen Extrakts von grünem Rooibos bei 354 nm (Bereitung analog Herstellungsverfahren für Humanstudie) - Peakzuordnung: siehe Tabelle 2.14

Tabelle 2.14: Flavonoide im wässrigen Extrakt von grünem Rooibos (Hauptfragmente unterstrichen)^a

Nr.	Rt [min]	λ_{\max} [nm]	$[M-H]^-$ m/z	MS ² m/z	Verbindung
3	16,2	339	609	591, 519, <u>489</u> , 399, 369	Luteolin-6,8-di-C-hexosid
5	17,9	346	579	519, 489, <u>459</u> , 429, 399, 369	Luteolin-6-C-pentosid-8-C-hexosid
7	18,9	339	593	575, 503, 473, 383, <u>353</u>	Apigenin-6,8-di-C-hexosid
8	19,3	346	579	519, 489, <u>459</u> , 429, 399, 369	Luteolin-6-C-hexosid-8-C-pentosid
11	22,2	348	447	429, 357, <u>327</u>	Isoorientin
12	22,7	335	563	503, 473, 443, 383, <u>353</u>	Isoschaftosid
14	24,7	348	447	357, <u>327</u>	Orientin
16	26,1	287	451	361, <u>331</u>	Aspalathin
18	27,6	354	609	301	Rutin
19	27,8	354	609	301	Quercetin-O-rutinosid (Isomer)
20	28,3	337	431	413, 341, <u>311</u>	Isovitexin
21	28,9	337	431	341, <u>311</u>	Vitexin
22	30,2	352	463	301	Hyperosid
23	30,7	352	463	301	Isoquercitrin
24	32,2	338	447	285	Luteolin-O-hexosid
25	34,1	287	435	345, <u>315</u>	Nothofagin

^aRt, Retentionszeit; λ , Wellenlänge

Die mengenmäßig relevanten Verbindungen wurden mit Hilfe externer Kalibriergeraden der jeweiligen Referenzsubstanzen quantifiziert. Die Gehalte sind in Abschnitt 6.4 tabellarisch aufgeführt.

Die Gesamtmenge an C-glykosylierten Dihydrochalkonen sowie C- und O-glykosylierten Flavonoiden belief sich auf $893 \pm 21 \mu\text{mol}$. Hauptbestandteil des wässrigen Extrakts ist Aspalathin (**16**) mit $663 \pm 11 \mu\text{mol}$ (Absorptionsmaximum (λ_{max}): 287 nm), gefolgt von Nothofagin (**25**: $83 \pm 3 \mu\text{mol}$) und Isoorientin (**11**: $61 \pm 3 \mu\text{mol}$).

2.2.4.2 Aktive Fraktion

Die Quantifizierung der Hauptflavonoide der aktiven Fraktionen wurde mit Hilfe externer Kalibriergeraden der jeweiligen Referenzsubstanzen vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 6.4 dargestellt.

Im Gegensatz zum Rooibostee konnten in der aktiven Fraktion die O-glykoside Hyperosid (**22**), Isoquercitrin (**23**) und Luteolin-O-hexosid (**24**) nicht detektiert werden. Hauptbestandteil ist mit ca. $623 \pm 9 \mu\text{mol}$ Aspalathin (**16**), gefolgt von Orientin (**14**: $47 \pm 1 \mu\text{mol}$) und Nothofagin (**25**: $19 \pm 1 \mu\text{mol}$). Damit beträgt der Anteil an Aspalathin (**16**) in der aktiven Fraktion ca. 87 %. Dessen Gehalt entspricht mit ca. $281 \pm 4 \text{ mg}/500 \text{ mL}$ etwa dem im Teeaufguss ($300 \pm 5 \text{ mg}/500 \text{ mL}$) (siehe 2.2.4.1). Die Gesamtflavonoidmenge war mit $717 \pm 12 \mu\text{mol}$ im Vergleich zum Teeaufguss ($893 \pm 21 \mu\text{mol}$) um ca. 20 % geringer. Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 2.24 die Flavonoidgehalte beider Rooibosformulierungen gegenübergestellt.

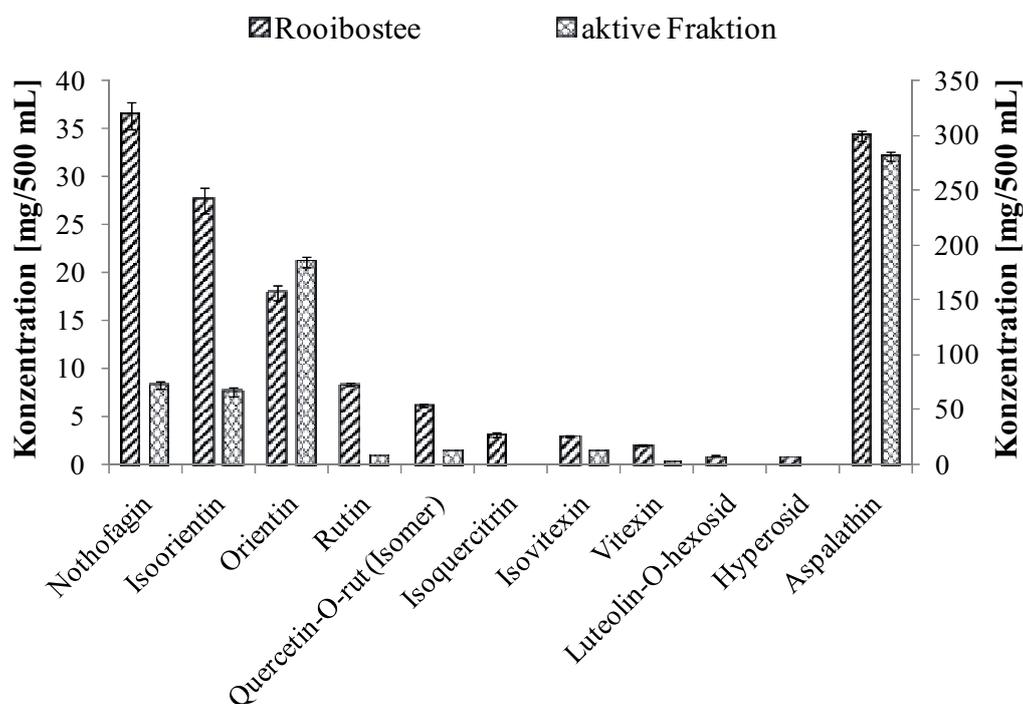


Abbildung 2.24: Gegenüberstellung der Flavonoidgehalte in je 500 mL Teeaufguss und aktiver Fraktion (Aspalathingehalte auf Sekundärachse aufgetragen). rut, rutinosid

2.2.5 Grundlagen zur Plasma- und Urinaufarbeitung

Plasmaaufarbeitung

In der Literatur sind drei verschiedene Aufarbeitungsstrategien zur Untersuchung von Blutplasma beschrieben. Sie zielen darauf ab, koeluiierende Matrixbestandteile (z.B. Proteine und Phospholipide) als Ursache von Matrixeffekten, hoher Ionensuppression und Verlust an Nachweisempfindlichkeit abzutrennen (TAYLOR, 2005) und gleichzeitig die Zielverbindungen selektiv zu extrahieren. Matrixeffekte können z.B. durch die Flüssig-Flüssig- und Festphasenextraktion minimiert werden. Beide Verfahren sind Methoden auf Basis einer alleinigen Proteinfällung überlegen (BONFIGLIO et al., 1999).

1) Direktextraktion (Flüssig-Flüssig-Extraktion)

Durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln wie z.B. Ethylacetat ist es möglich, die Zielverbindungen je nach Löslichkeit im Extraktionsmittel selektiv in die organische Phase zu extrahieren (z.B. WARDEN et al., 2001). Nach Trocknung der organischen Phase im Stickstoffstrom wird der Rückstand in mobiler Phase aufgenommen und analysiert (Abbildung 2.25).

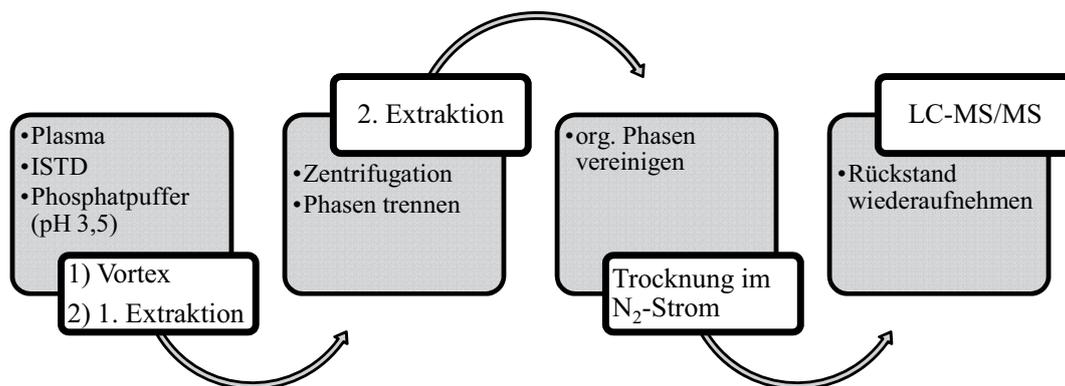


Abbildung 2.25: Schema der Plasmaaufarbeitung durch Direktextraktion. ISTD, Interner Standard

Aufgrund der Vielzahl phenolischer OH-Gruppen besitzen Polyphenole eine hohe Affinität zu Plasmaproteinen, insbesondere zu Plasmaalbumin. Diese nicht glykosylierte, kettenförmig aufgebaute Verbindung stellt den löslichen Hauptproteinbestandteil des Kreislaufsystems dar und besitzt u.a. eine Speicher- und Transportfunktion für eine Vielzahl von Substanzen. Addukte mit Flavonoiden wurden in einigen *in vitro*-Studien beobachtet (MANACH et al., 1995; MANACH et al., 1996 – siehe 2.2.7.2). Treibende Kraft für Protein-Flavonoid-Assoziationen sind Wasserstoffbrückenbindungen sowie ionische und hydrophobe Wechselwirkungen (PAPADOPOULOU et al., 2004). Da die Flavonoide im Verbund mit Albumin der LC-MS/MS-Analytik nicht zugänglich sind, müssen diese Addukte gespalten werden. Dazu werden saure Puffersysteme oder Säuren wie *o*-Phosphorsäure, Salzsäure oder Trichloressigsäure verwendet (ROURA et al., 2005; ZIMMERMANN et al., 2009). Die

Zugabe von Säure führt zur Denaturierung der Plasmaproteine (siehe Direktextraktion mit vorgeschalteter Fällung), so dass deren Abtrennung erleichtert wird. Zur Erzielung zufriedenstellender Extraktionsausbeuten ist eine mehrfache Extraktion des Plasmas erforderlich.

2) Direktextraktion mit vorgeschalteter Fällung

Bei diesem Aufarbeitsverfahren wird die Direktextraktion mit einer vorgeschalteten Proteinfällung kombiniert (z.B. LI et al., 2000), um Plasmaproteine selektiv abzutrennen. Hierzu eignen sich Alkohole (Methanol, Ethanol, etc.), Acetonitril oder Dimethylformamid (ZIMMERMANN et al., 2009). Zur Vermeidung zu hoher lokaler Konzentrationen und zu großer Wärmeentwicklung ist von entscheidender Bedeutung, dass das Fällungsreagenz eiskalt und langsam zugegeben wird. Nach Fällung und Zentrifugation wird der Überstand abgenommen und einer Flüssig-Flüssig-Extraktion unterzogen oder direkt analysiert.

3) Festphasenextraktion (SPE)

Die dritte Methode beruht auf einer Festphasenextraktion des Plasmas an RP-Material (Abbildung 2.26).

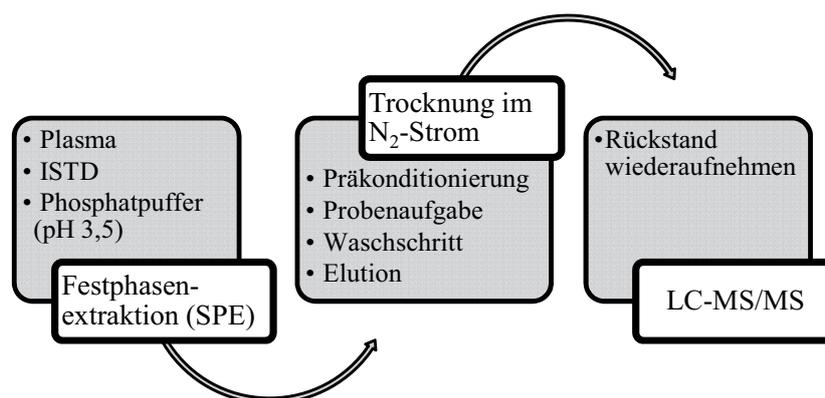


Abbildung 2.26: Schema der Plasmaaufarbeitung durch Festphasenextraktion. ISTD, Interner Standard

Der Waschschrift dient der Abtrennung von Störsubstanzen und Plasmaproteinen, während die Zielverbindungen an der stationären Phase retardiert und im nachfolgenden Schritt sukzessive von der Kartusche eluiert werden (ERLUND et al., 2000; UNNO et al., 2005). Der Trocknung des Eluats im Stickstoffstrom und Wiederaufnahme des Rückstands in mobiler Phase schließt sich die LC-MS/MS-Messung an.

Die SPE eignet sich insbesondere zur Bestimmung von Analyten in komplexen Matrices (z.B. in biologischem Probenmaterial wie Vollblut, Plasma und Urin).

Urinaufarbeitung

Für die Urinaufarbeitung spielen nur die Verfahren 1 und 3 eine Rolle. Eine vorgeschaltete Fällung nach Methode 2 ist nicht erforderlich. Neben Methoden auf Basis einer Direkt- und

Festphasenextraktion findet man in der Literatur auch solche auf Basis einer Direktmessung des Urins (z.B. MULLEN et al., 2004). Es besteht hier allerdings die Gefahr der Diskriminierung von Spurenkomponenten, da die LC-MS/MS-Messung ohne vorherige Analytanreicherung aus einer verdünnten Lösung vorgenommen wird (siehe 2.2.8.1).

Enzymatische Behandlung von Plasma- und Urinproben vor der Aufarbeitung

Oftmals beschrieben ist in zumeist älteren Publikationen der Einsatz von Enzymen (z.B. Sulfatasen und Glucuronidasen) zur Freisetzung konjugiert vorliegender Flavonoide. Dieses hatte den Hintergrund, dass vielfach eine sichere Zuordnung dieser Metabolite aufgrund von Störpeaks mittels HPLC-DAD misslang (z.B. LEE et al., 1995) und massenspektrometrische Techniken auf Basis der Thermospray (TSP)- oder Elektrospray (ESI)-Ionisation zur sicheren Metabolitidentifizierung zu damaliger Zeit noch nicht weit verbreitet waren. Daneben standen Metabolite der Polyphenole als Referenzsubstanzen kaum zur Verfügung.

Der selektive Einsatz von Enzymen gestattet die Bestimmung der individuellen Mengen der freien sowie der sulfatiert und/oder glucuronidiert vorliegenden Flavonoide (LEE et al., 1995). Das Aufarbeitungsverfahren umfasst üblicherweise die Messung des Probenmaterials mit und ohne enzymatische Umsetzung. Die ermittelten Metabolitgehalte sind nicht notwendigerweise akkurat, da bislang nur wenig Informationen zur Effizienz der Enzyme, Polyphenole zu hydrolysieren, verfügbar sind (MULLEN et al., 2008). Bei einem Tierversuch mit Ratten führte die enzymatische Behandlung sogar zu einer Unterbewertung von Isoflavonmetaboliten (GU et al., 2005; D'ARCHIVIO et al., 2010).

Einige Vorversuche wurden zu diesem Themenkomplex durchgeführt. Aufgrund der Probenzahl und kostspieligen Enzyme wurde auf weiterführende Untersuchungen verzichtet.

2.2.5.1 Entwicklung einer Methode zur Plasmaaufarbeitung

Sieben in der Literatur beschriebene Methoden wurden auf ihre Eignung zur Plasmaaufarbeitung getestet, wobei drei Vorschriften auf der Direktextraktion, drei auf der kombinierten Fällung und Direktextraktion und eine auf der Festphasenextraktion (SPE) des Plasmas basierten (Tabelle 2.15).

Tabelle 2.15: Übersicht über die getesteten Methoden^a

Nr.	Typ	Extraktions-/Fällungs-/Elutionsmittel	Literaturstelle
1	Direktextraktion	1 x CH ₂ Cl ₂ , 2 x EtOAc	LEE et al., 1995
2	Direktextraktion	2 x EtOAc	HENNING et al., 2004
3	Direktextraktion	3 x EtOAc	MOON et al., 2001
4	Fällung & Extraktion	1 x MeOH	ZHANG et al., 2007b
5	Fällung & Extraktion	1 x ACN, 1 x MeOH	MULLEN et al., 2006
6	Fällung & Extraktion	1 x DMF/TCA	ZIMMERMANN et al., 2009
7	Festphasenextraktion	4 x MeOH	MIYAKE et al., 2000

^aCH₂Cl₂, Dichlormethan; EtOAc, Ethylacetat; MeOH, Methanol; ACN, Acetonitril; DMF, Dimethylformamid; TCA, Trichloressigsäure

Zur Überprüfung der Methoden wurde zu Leerplasma ein Mischstandard aus verschiedenen Rooibosflavonoiden und Metaboliten zugesetzt (siehe 4.5.12), die Aufarbeitung als Doppelbestimmung durchgeführt und die Wiederfindungsraten der einzelnen Referenzsubstanzen ermittelt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die in den jeweiligen Methoden eingesetzten Mengen an Leerplasma, Mischstandard, Elutions- bzw. Extraktionsmittel angepasst. Die erfolgversprechendste Methode wurde anschließend optimiert.

Die mittels LC-MS/MS erfassten Verbindungen sind abhängig von der Wahl des Extraktionsmittels bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion bzw. des Elutionsmittels bei der Festphasenextraktion sowie der Lösungsmittel, die zur Wiederaufnahme des im Stickstoffstrom eingegangenen Rückstands nach Extraktion bzw. Elution Verwendung finden.

Methodenscreening

In Abbildung 2.27 sind die Peakflächen in Abhängigkeit von der jeweiligen Aufarbeitungsmethode am Beispiel von Orientin (14), Aspalathin (16) und Quercetin-O-glucuronid (81) graphisch aufgetragen.

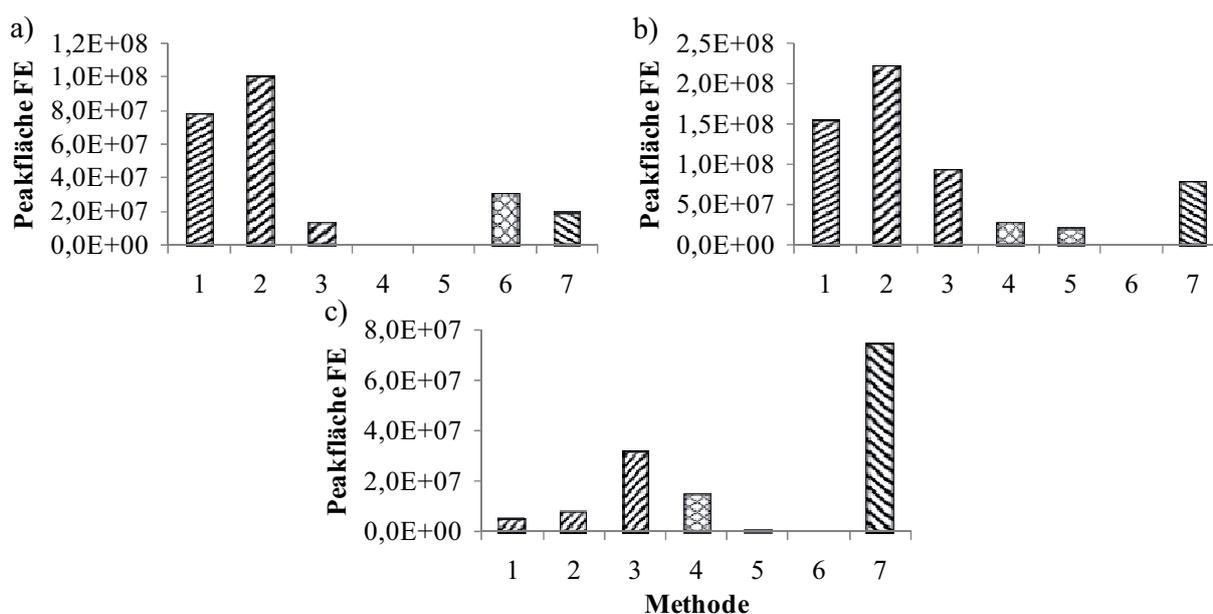


Abbildung 2.27: Vergleich der Methoden 1-7 aus **Tabelle 2.15** am Beispiel von Aspalathin (a), Orientin (b) und Quercetin-O-glucuronid (c) (1-3 = Direktextraktionen, 4-6 = Fällung & Extraktion, 7 = SPE)

Die chemische Struktur bestimmt die Löslichkeit im Extraktions- bzw. Elutionsmittel und somit die Wiederfindungsraten. Verhältnismäßig hohe Ausbeuten aller im Mischstandard enthaltenen Flavonoide sind mit den Direktextraktionen (Methoden 1-3) zu erzielen, während die SPE (Methode 7) und die drei Aufarbeitungen mit Fällung (Methode 4-6) deutlich weniger geeignet sind.

Drei Extraktionsschritte mit Ethylacetat führen zu keinen Vorteilen gegenüber von zweien. Die besten Ergebnisse für die Erfassung von Glucuroniden liefert die SPE (siehe 2.2.5.2).

Allerdings sind die Wiederfindungsraten für die restlichen Bestandteile des Mischstandards deutlich geringer als bei den übrigen Aufarbeitungsmethoden.

Insgesamt stellt die zweifache Direktextraktion des Plasmas mit Ethylacetat (Methode 2) den vielversprechendsten Aufarbeitungsansatz dar.

Variation der Extraktionsschritte und -zeit sowie des Extraktionsmittels

Für die Optimierung der Methode 2 wurden die Parameter Extraktionszeit, -schritte und -mittel variiert (Tabelle 2.16).

Tabelle 2.16: Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen. ISTD, Interner Standard

Nr.	Extraktions...		
	...schritte	...zeit [min]	...mittel
2.1	2	15	Ethylacetat
2.2	2	30	Ethylacetat
2.3	2	60	Ethylacetat
2.4	3	15	Ethylacetat
2.5	3	30	2 x Ethylacetat 1 x Methanol
ISTD	2	30	Ethylacetat

Die Ergebnisse (Tabelle 2.17) wurden mit denen des internen Standards (ISTD) verglichen, der unter Substitution von Plasma durch Wasser analog Methode 2 einer zweifachen Direktextraktion mit Ethylacetat als Referenzmethode unterworfen wurde (Leerwert).

Tabelle 2.17: Prozentuale Wiederfindungsraten in Bezug auf den internen Standard. glcS, glucuronid

Nr.	Wiederfindungsrate [%]						
	Orientin	Aspalathin	Rutin	Isovitexin	Isoquercitrin	Quercetin-O-glcS	Chrysoeriol
2.1	77	39	28	56	68	2	91
2.2	75	7	29	80	81	2	94
2.3	79	4	31	82	86	2	94
2.4	37	6	34	54	64	2	59
2.5	32	8	48	47	54	65	56

Eine Verlängerung der Extraktionszeit von 2x15 min (Methode 2.1) auf 2x30 min (Methode 2.2) führt zu einer deutlichen Steigerung der Wiederfindungsraten von Isovitexin (**20**: +24 %) und Isoquercitrin (**23**: +13 %), während für Aspalathin (**16**) eine deutliche Abnahme um 32 % zu registrieren ist. Eine weitere Verlängerung der Extraktionsdauer auf 2x60 min wirkt sich nicht vorteilhaft aus und führt daneben zu einer unverhältnismäßigen Steigerung der Aufarbeitungszeit. Eine dreifache 15-minütige Extraktion ruft eine deutliche Abnahme der Ausbeuten von Orientin (**14**: -40 %), Aspalathin (**16**: -33 %) und Chrysoeriol (**32**: -32 %) im Vergleich zu der Methode 2.1 hervor.

Der kombinierte Einsatz von Ethylacetat und Methanol (Methode 2.5) ermöglicht im Vergleich zu Methode 2.1 eine bessere Erfassung von Quercetin-O-glucuronid (**81**: +63 %)

und Rutin (**18**: +20 %). Für die restlichen Bestandteile des Mischstandards ergeben sich Abnahmen in den Ausbeuten.

Probleme bereitet die Erfassung von Aspalathin (**16**). Aufgrund dessen thermischer Instabilität führt eine Verlängerung der Extraktionszeit im Ultraschallbad möglicherweise zu einem sukzessiven Abbau. Aus diesem Grund wurde zur Aufarbeitung des authentischen Probenmaterials Methode 2.1 herangezogen. Ein weiterer Faktor für die limitierten Wiederfindungsraten ist die geringe Löslichkeit des Dihydrochalkons im Extraktionsmittel. Für dessen Substitution gibt es allerdings kaum geeignete Alternativen.

Variation der Rückstandsaufnahme

Der Einfluss verschiedener Lösungsmittelsysteme auf die Güte der Wiederaufnahme des Rückstands nach Einengen im Stickstoffstrom wurde überprüft (Tabelle 2.18).

Tabelle 2.18: Versuchsparameter für die Variation der Rückstandsaufnahme^a

Nr.	Extraktionsmittel	Lösungsmittelsystem	Matrix
2.6	2x15 min EtOAc	ACN/H ₂ O (1/1; v/v)	Wasser
2.7	2x15 min EtOAc	ACN/H ₂ O (1/1; v/v)	Leerplasma
2.8	2x15 min EtOAc	ACN/H ₂ O/DMF (3/4/3; v/v/v)	Wasser
2.9	2x15 min EtOAc	ACN/H ₂ O/DMF (3/4/3; v/v/v)	Leerplasma
2.10	2x15 min EtOAc/DMF (2/1; v/v)	ACN/H ₂ O (1/1; v/v)	Wasser
2.11	2x15 min EtOAc/DMF (2/1; v/v)	ACN/H ₂ O (1/1; v/v)	Leerplasma

^aEtOAc, Ethylacetat; DMF, Dimethylformamid; ACN, Acetonitril

Das Leerplasma wurde für jeden untersuchten Parameter zusätzlich durch Wasser substituiert und die Aufarbeitung analog durchgeführt (Leerwert). Die Ermittlung der Wiederfindungsraten erfolgte aus den resultierenden Peakflächen unter Vergleich mit dem direkt injizierten Mischstandard 2 (siehe Tabelle 4.10 b)). Die graphische Auftragung unter Normierung des Mischstandards nach Direktmessung auf 100 % ist in Abbildung 2.28 dargestellt.

Die Probenmatrix übt einen starken Einfluss auf die Wiederfindungsraten der Zielverbindungen aus. Dieses gilt insbesondere für das Plasma. Obwohl der Mischstandard diesem Medium nur zugesetzt wurde, sind die Wiederfindungsraten im Vergleich zur Aufarbeitung mit Wasser insbesondere für Aspalathin (**16**: -90 %) und die beiden Glucuronide **81** und **82** deutlich geringer (Abbildung 2.28). Teilweise scheiterte die Detektion einiger Bestandteile (Versuch 2.11: Aspalathin (**16**), Versuch 2.7 & 2.11: Luteolin-O-glucuronid (**82**)). Als mögliche Ursache ist die unvollständige Spaltung der Flavonoid-Plasmaprotein-Addukte anzuführen (siehe 2.2.5).

Der Einsatz von Dimethylformamid als universelles, polar aprotisches Lösungsmittel bei der zweiten Extraktion im Gemisch mit Ethylacetat (Versuch 2.10 & 2.11) brachte keine Verbesserung. Die Wiederfindungsraten fallen im Vergleich zu den Versuchen 2.6 & 2.7 deutlich geringer aus. Der Nachweis von Aspalathin (**16**) und Luteolin-O-glucuronid (**82**) war nach Zusatz des Mischstandards zum Leerplasma nicht mehr möglich.

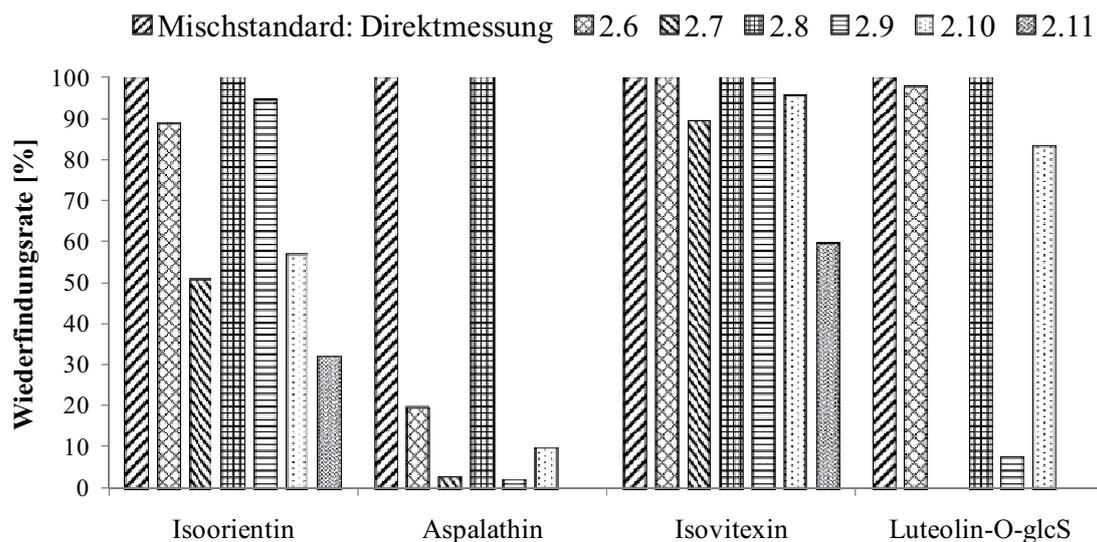


Abbildung 2.28: Graphische Darstellung der prozentualen Wiederfindungsraten von Isoorientin (**11**), Aspalathin (**16**), Isovitexin (**20**) und Luteolin-O-glucuronid (**82**) in Abhängigkeit von den Versuchsparametern (siehe **Tabelle 2.18**). glcS, glucuronid

Wird das Lösungsmittelgemisch aus ACN/DMF/H₂O (Versuch 2.8 & 2.9) anstelle des Systems ACN/H₂O (2.6 & 2.7) verwendet, ist eine signifikante Steigerung der Wiederfindungsraten sowohl beim Zusatz des Mischstandards zum Wasser als auch - in abgeschwächter Form - zum Leerplasma zu verzeichnen. Für den Leerwert erhält man unter diesen Bedingungen für fast alle Zielverbindungen Ausbeuten von ca. 100 %. Beim Leerplasma ist eine ähnliche Tendenz zu beobachten; für Aspalathin (**16**: 2 %) und die beiden Glucuronide (9 % für **81** und 7 % für **82**) gilt dies jedoch nicht. Luteolin-O-glucuronid (**82**) konnte zumindest wieder nachgewiesen werden.

Variation der Plasmamenge

Aufgrund des hohen Einflusses des Plasmas auf die Wiederfindungsraten wurde untersucht, inwieweit das verwendete Plasmavolumen die Extraktion beeinträchtigt. Dazu wurden Aufarbeitungen unter Dotierung von 500 und 1000 μ L Leerplasma mit dem Mischstandard 1 (siehe **Tabelle 4.10 a**) durchgeführt und die erhaltenen Peakflächen für jeden Mischstandardbestandteil verglichen.

Bei Orientin (**14**), Aspalathin (**16**), Rutin (**18**), Hyperosid (**22**) und Quercetin-O-glucuronid (**81**) übt die Plasmamenge einen vernachlässigbar kleinen Einfluss auf die Extraktionsausbeuten (< 10 %) aus. Lediglich für Isovitexin (**20**) und Chrysoeriol (**32**) ergeben sich mit 20 % bzw. 38 % Abweichung starke Abnahmen bei Dotierung von 1000 μ L Plasma im Vergleich bei der von 500 μ L Plasma. Zur Erfassung von Spurenkomponenten wurden für die Aufarbeitung des authentischen Probenmaterials 1 mL Plasma verwendet.

Zusammenfassung

Es bleibt festzuhalten, dass sowohl die Detektion von Aspalathin (**16**) als auch von Quercetin- (**81**) und Luteolin-O-glucuronid (**82**) bei Verwendung der Direktextraktion im Vergleich zur Festphasenextraktion Schwierigkeiten bereitet. Allerdings wurde das Hauptaugenmerk bei der Plasmaanalytik auf die Erfassung intakter Flavonoide gerichtet. Für diesen Zweck lieferte die Direktextraktion insgesamt bessere Ergebnisse. Unter Berücksichtigung aller Modifizierungen wurden die authentischen Plasmaproben der Probanden nach dem in Abbildung 2.29 dargestellten Arbeitsschema aufgearbeitet.

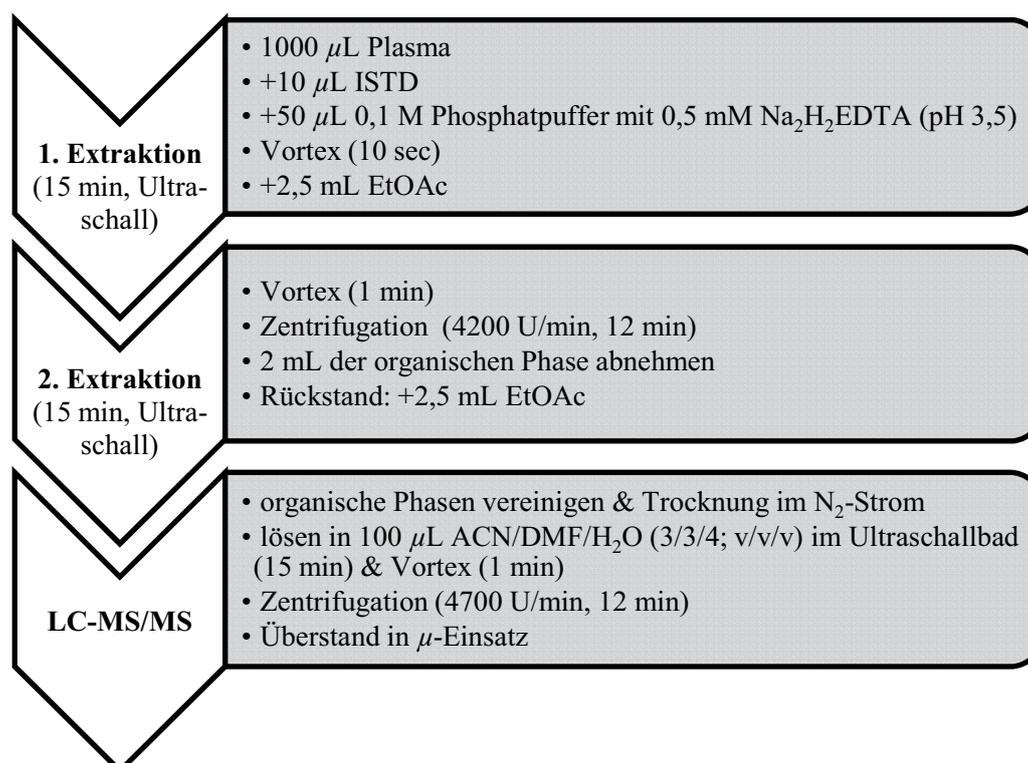


Abbildung 2.29: Arbeitsschema zur optimierten Plasmaaufarbeitung. ISTD, Interner Standard; $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$, Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat; EtOAc, Ethylacetat; ACN, Acetonitril; DMF, Dimethylformamid

Tabelle 2.19: Prozentuale Abweichung der Peakflächen vom Mittelwert und resultierende Standardabweichungen STABW. glcS, glucuronid

Nr.	Orientin	Aspalathin	Rutin	Isovitexin	Isoquercitrin	Quercetin-O-glcS	Chrysoeriol
1	8,8	19,6	8,6	8,2	9,5	3,6	-6,4
2	3,8	-9,1	7,6	3,2	1,7	-8,4	-8,6
3	1,1	13,6	-0,6	-0,3	0,1	2,1	-1,3
4	-4,4	-3,3	1,2	-6,8	-5,1	-0,3	1,0
5	-1,9	-7,9	-8,0	0,9	0,5	2,9	8,2
6	-7,4	-12,9	-8,7	-5,2	-6,7	0,1	7,1
STABW	$\pm 5,8$	$\pm 13,3$	$\pm 7,4$	$\pm 5,5$	$\pm 5,7$	$\pm 4,4$	$\pm 6,9$

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methodik wurden sechs Leerplasmaproben unter Zusatz des Mischstandards 1 (siehe Tabelle 4.10 a)) nach dem Arbeitsschema in

Abbildung 2.29 aufgearbeitet und die prozentualen Abweichungen der Peakflächen vom jeweiligen Mittelwert für sämtliche Zielverbindungen bestimmt (Tabelle 2.19).

Mit Ausnahme von Aspalathin (**16**) mit einer Standardabweichung von $\pm 20\% > x > \pm 10\%$ liegen die prozentualen Abweichungen der restlichen Flavonoide in einem guten Bereich deutlich unter $\pm 10\%$.

2.2.5.2 Entwicklung einer Methode zur Urinaufarbeitung

Bei der Entwicklung einer Methode zur Urinanalytik wurde ähnlich verfahren wie bei der zur Plasmaanalytik (siehe 2.2.5.1). Getestet wurden die in Tabelle 2.20 aufgeführten Methoden unter Verwendung des in Tabelle 4.10 dargestellten Mischstandards 2.

Tabelle 2.20: Übersicht über die getesteten Methoden

Nr.	Typ	Extraktions- bzw. Elutionsmittel	Literaturstelle
1	Direktextraktion	2 x Ethylacetat	WARDEN et al., 2001
2	Direktmessung	entfällt	MULLEN et al., 2004
3	Festphasenextraktion	Methanol (+ <i>o</i> -Phosphorsäure)	ROURA et al., 2005
4	Festphasenextraktion	Methanol (+Oxalsäure)	MIYAKE et al., 2000

Die Direktmessung des Urins war aufgrund fehlender Probenkonzentrierung ungeeignet. Die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat (Methode 1) und Festphasenextraktion mit Methanol (Methode 3) erwiesen sich durch hohe Wiederfindungsraten der Zielverbindungen als günstige Verfahren, wobei letztere Methodik ebenso wie bei der Plasmaaufarbeitung (siehe 2.2.5.1) Vorteile in der Erfassung von Aspalathin (**16**) und den Glucuroniden **81** und **82** bietet. Aus diesem Grund wurde zur Sicherstellung einer Detektion sowohl intakter Flavonoide als auch der erwarteten Flavonoidmetabolite eine Kombination beider Techniken angestrebt, indem der aus der Direktextraktion resultierende Rückstand für eine nachgeschaltete Festphasenextraktion Verwendung fand.

Tabelle 2.21: Übersicht zur Optimierung der SPE^a

Nr.	Typ	Modifizierung der	Parameter
3.1	Festphasenextraktion	Elutionsmittel	1) 1 x MeOH, 1 x DMF 2) 1 x MeOH/DMF (1/1; v/v) 3) 1 x MeOH, 1 x EtOAc 4) 1 x MeOH/EtOAc (1/1; v/v)

^aMeOH, Methanol; DMF, Dimethylformamid; EtOAc, Ethylacetat

Zunächst wurde die Basismethode 3 hinsichtlich der verwendeten Elutionsmittel optimiert (Tabelle 2.21). Dazu wurden Urinproben vor Verabreichung von Prüfprodukt ($t = 0$) mit dem Mischstandard 2 (siehe Tabelle 4.10 b)) versetzt und die Flavonoide bestimmt.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Festphasenextraktion die Bestimmung sowohl von Aspalathin (**16**) als auch von Quercetin- (**81**) und Luteolin-O-glucuronid (**82**) begünstigt. Die 1/1-Mischungen beider Elutionsmittel (Nr. 2 und 4) lieferten höhere Extraktionsausbeuten als ihre aufeinanderfolgende Elution (Nr. 1 und 3). Eine Ausnahme bildete Eriodictyol (**30**), das sich durch Elution mit dem System 1 deutlich besser als durch die anderen Verfahren extrahieren ließ. Im Durchschnitt lagen für das Gemisch aus MeOH/DMF (1/1; v/v) die höchsten Wiederfindungsraten für alle Bestandteile des Mischstandards vor. Das System gestattet insbesondere die Erfassung von Orientin (**14**), Aspalathin (**16**), Rutin (**18**) sowie Quercetin- und Luteolin-O-glucuronid (**81**, **82**). Beim Gemisch aus MeOH/EtOAc (1/1; v/v) zeigten sich gute Werte für Orientin (**14**), Aspalathin (**16**) und Quercetin-O-glucuronid (**81**), die aber etwas niedriger als beim System 1 waren. Die Ausbeuten für Rutin (**18**) und Luteolin-O-glucuronid (**82**) waren auf ungefähr gleichem Niveau.

Mit der Basismethode 4 konnten Eriodictyol (**30**) sowie die beiden Glucuronide **81** und **82** nicht nachgewiesen werden; bei den restlichen Bestandteilen des Mischstandards ergaben sich Ausbeuten im Bereich von 38-72 %. Bei den Festphasenextraktionen weist diese Methode die höchsten Extraktionsraten für Isovitexin (**20**), Hyperosid (**22**) und Chrysoeriol (**32**) auf.

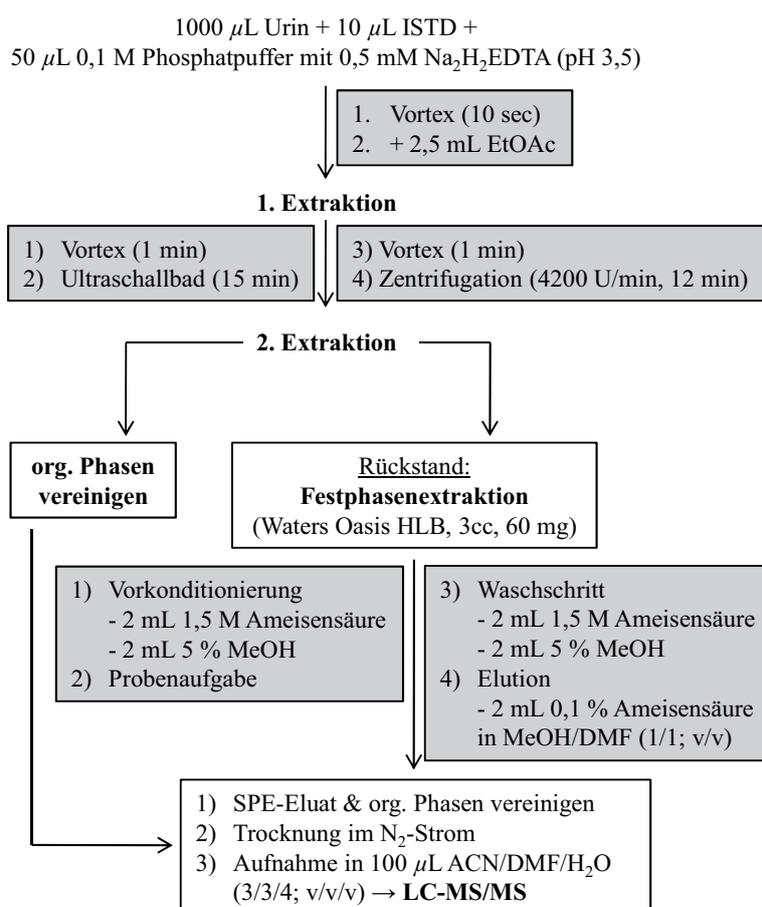


Abbildung 2.30: Fließschema zur Urinaufarbeitung mittels kombinierter Flüssig-Flüssig- und Festphasenextraktion. ISTD, Interner Standard; Na₂H₂EDTA, Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat; EtOAc, Ethylacetat; MeOH, Methanol; DMF, Dimethylformamid; ACN, Acetonitril (modifiziert nach MATTUTAT, 2010)

Als Elutionsmittel für die Festphasenextraktion wurde das Gemisch aus MeOH/DMF (1/1; v/v) ausgewählt. Die Zugabe erfolgte zur Erhöhung der Wiederfindungsraten und Verbesserung der Reproduzierbarkeit in mehreren Teilschritten ($4 \times 500 \mu\text{L}$) bei einer Einwirkzeit von je 4 min und einheitlicher Tropfgeschwindigkeit. Der Waschschrift wurde zur möglichst vollständigen Entfernung unerwünschter Störsubstanzen durch eine Wasche-lutionsstudie optimiert. Die Ermittlung der optimalen Konzentration geschah durch systematische Variation des prozentualen Anteils an Methanol, um ein Maximum an Störsubstanzen bei gleichzeitiger Vermeidung einer vorzeitigen Analytelution zu entfernen.

Als Kartuschenmaterial kamen Waters Oasis HLB-Kartuschen zum Einsatz. Die stationäre Phase besteht aus zwei Monomeren, dem hydrophilen N-Vinylpyrrolidon und dem lipophilen Divinylbenzen. Auf diese Weise wird neben RP-Wechselwirkungen auch eine verbesserte Retention für polare Verbindungen (wie z.B. Flavonoide und deren polare Metabolite) erzielt.

Für die Direktextraktion wurde die optimierte Methodik zur Plasmaaufarbeitung übernommen (siehe 2.2.5.1). Das vollständige Aufarbeitungsschema ist in Abbildung 2.30 dargestellt.

Die neu entwickelte Methodik wurde mit beiden einzelnen Aufarbeitungstechniken verglichen. Dazu wurde der Mischstandard 2 (siehe Tabelle 4.10 b)) den Urinproben zum Zeitpunkt $t = 0$ zugesetzt und diese als Dreifachbestimmung aufgearbeitet. In Abbildung 2.31 sind die Mediane der Peakflächen dargestellt.

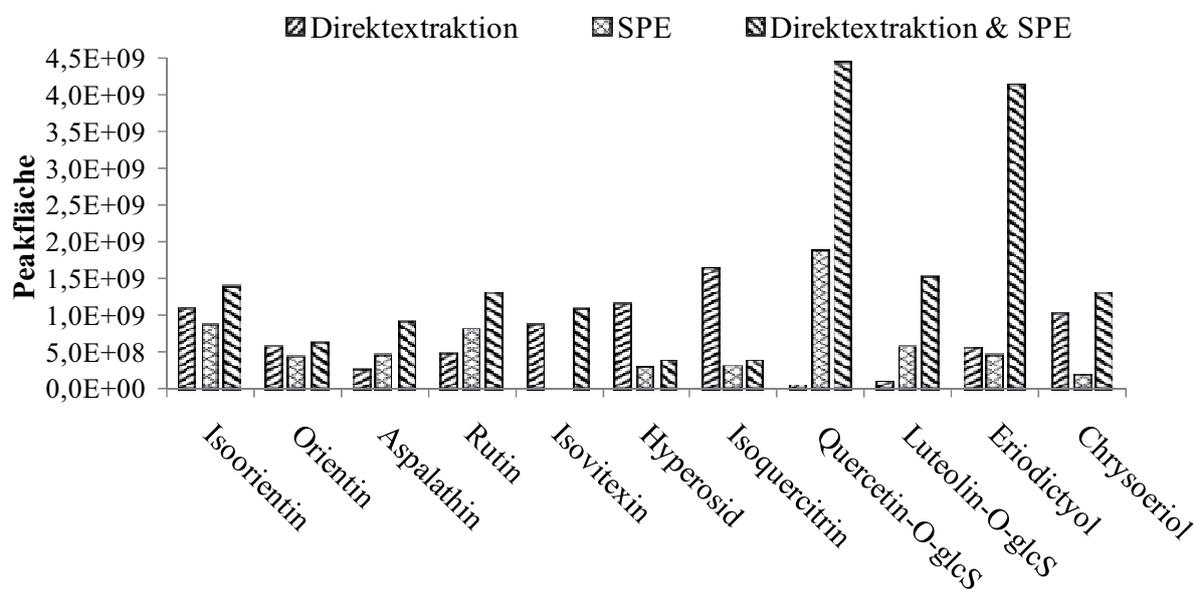


Abbildung 2.31: Gegenüberstellung der Peakflächen der Bestandteile des Mischstandards nach Aufarbeitung mittels Direkt- und Festphasenextraktion (SPE) sowie der Kombination beider Verfahren. glcS, glucuronid (nach MATTUTAT, 2010)

Deutlich zu erkennen ist die im Vergleich zur Direkt- und Festphasenextraktion verbesserte Erfassung von Eriodictyol (**30**) sowie Quercetin- (**81**) und Luteolin-O-glucuronid (**82**).

Insgesamt konnten mit Ausnahme von Hyperosid (**22**) und Isoquercitrin (**23**) gesteigerte Ausbeuten für alle Mischstandardbestandteile erzielt werden. Das gilt auch für Aspalathin (**16**), dessen Ausbeute um ca. 50 % im Vergleich zur Aufarbeitung mittels Festphasenextraktion anstieg. Da der Fokus auf der Bestimmung dieser Verbindung und ihrer Metabolite lag, wurde die kombinierte Methode zur Urinaufarbeitung herangezogen.

2.2.6 Synthese wichtiger Metabolite des Aspalathins

Aufgrund kommerziell nicht verfügbarer Standards wurde zur sicheren qualitativen Identifizierung der in den Urin- und Plasmaproben der Probanden erwarteten Metabolite die Synthese der Hauptmetabolite von Aspalathin (**16**) angestrebt. Aspalathin (**16**) wurde methyliert (siehe 2.2.6.1), glucuronidiert (siehe 2.2.6.2) und sulfatiert (siehe 2.2.6.3). Die Durchführung der Synthesen erfolgte zum Teil im größeren Maßstab, um die Metabolite nach ihrer Isolierung als Referenzsubstanzen für eine Quantifizierung einsetzen zu können.

2.2.6.1 Methylierung von Aspalathin

Auf dem Weg einer enzymatischen Umsetzung von Aspalathin mit Catechol-O-methyltransferase (COMT) und S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor konnten COURTS & WILLIAMSON (2009) 3-O- (3-O-MA) und 4-O-Methylaspalathin (4-O-MA) darstellen (Abbildung 2.32).

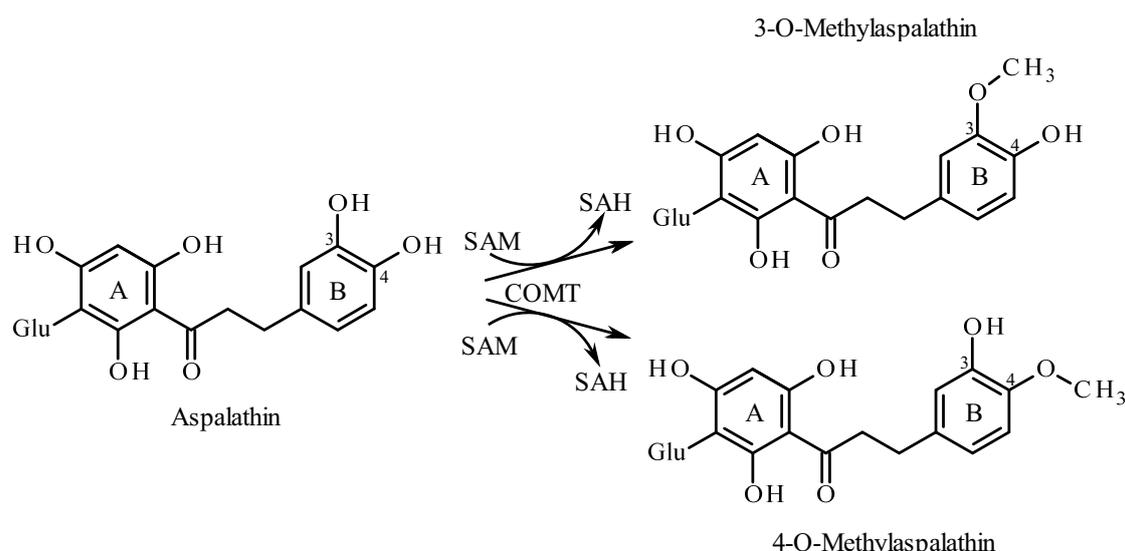


Abbildung 2.32: COMT-katalysierte Bildung von den zwei isomeren O-methylierten Aspalathin-metaboliten 3-O- und 4-O-Methylaspalathin (nach COURTS & WILLIAMSON, 2009). COMT, Catechol-O-methyltransferase; SAM, S-Adenosylmethionin; SAH, S-Adenosylhomocystein; Glu, glucosid

Ein typisches Base-Peak-Chromatogramm nach Methylierung von 4 mg Aspalathin (**16**) zeigt Abbildung 2.33.

Die Ausbeuten der zwei entstehenden Produkte **84** und **85** liegen bei 3,3 % bzw. 0,8 %. Bei den Produkten handelt es sich um zwei methylierte Metabolite des Dihydrochalkons. Beide weisen mit m/z 465 $[M-H]^-$ ein identisches Pseudomolekülion und Fragmentierungsmuster (m/z 375 $[(M-H)-90]^-$ und 345 $[(M-H)-120]^-$) auf. Letzteres stimmt - abgesehen von einer Massendifferenz von 14 amu durch Einführung der Methyl-Gruppe - mit dem von Aspalathin (**16**) überein (siehe 2.2.7.1).

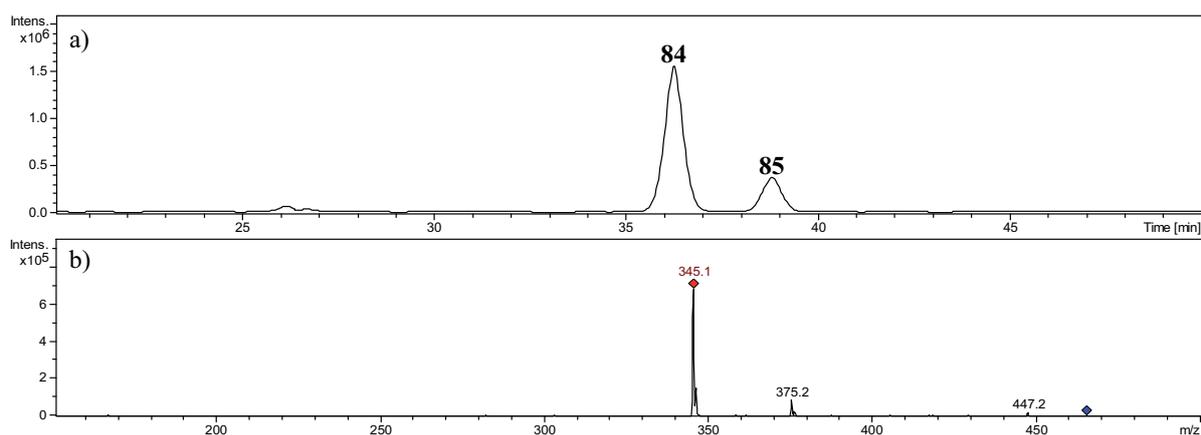


Abbildung 2.33: BPC der nach Methylierung von Aspalathin (**16**) erhaltenen Fraktion (a) (**84**: 3-O-MA, **85**: 4-O-MA) und MS²-Spektrum von 3-O-MA (b) (modifiziert nach MATTUTAT, 2010)

Die Position der Methylierung wurde anhand der Arbeiten von CREVELING et al. (1972) und COURTS & WILLIAMSON (2009) ermittelt. Danach ist die Methylierung am C-3 (meta) deutlich gegenüber der am C-4 (para) bevorzugt. Aufgrund des Reaktionsproduktverhältnisses von ca. 4:1 wurden Peak **84** als 3-O- und Peak **85** als 4-O-MA identifiziert.

Wegen der relativ hohen Enzymkosten und der geringen Produktausbeuten wurde auf die präparative Umsetzung verzichtet. Stattdessen wurden die Reaktionsansätze zur Aufnahme einer Kalibriergeraden in Anlehnung an COURTS & WILLIAMSON (2009) mit verschiedenen Aspalathinkonzentrationen dotiert. Diese korrelierten allerdings nicht mit den resultierenden Peakflächen der beiden Reaktionsprodukte.

2.2.6.2 Glucuronidierung von Aspalathin

Die Darstellung von Aspalathin-O-glucuronid sollte über eine modifizierte Koenig-Knorr-Reaktion aus dem freien Dihydrochalkon und Acetobromoglucuronsäuremethylester in Anlehnung an FLOWERS (1971) und MOON et al. (2001) erfolgen. Letzterer Arbeitsgruppe gelang auf diesem Weg die Synthese von Quercetin-3-O- β -D-glucuronid und -4'-O- β -D-glucuronid aus Quercetin.

Aspalathin (**16**: 5 mg) wurde dazu mit Acetobromoglucuronsäuremethylester in Anwesenheit von Kaliumcarbonat in Dimethylformamid über zwei Stunden unter Lichtausschluss inkubiert. Die Methylester wurden anschließend durch 30 %iges Natriummethylat von den Glucuroniden abgespalten (siehe 4.5.13.3). Im Rückstand konnten weder Aspalathin-O-glucuronid noch unverändertes Aspalathin (**16**) identifiziert werden.

2.2.6.3 Sulfatierung von Aspalathin

Die Sulfatierung von Aspalathin (**16**) wurde analog der von JONES et al. (2005) beschriebenen Vorschrift ausgeführt. Dieser Arbeitsgruppe gelang durch unspezifische Reaktion von Quercetin mit Schwefeltrioxid-N-triethylaminkomplex als Sulfatdonor die

Synthese von insgesamt vier Mono- und drei Disulfaten des Flavonols. Hauptprodukt der Umsetzung war Quercetin-3-O-sulfat.

Zur Gewährleistung einer vollständigen Wasserfreiheit wurde Aspalathin (**16**: 100 mg) in Pyridin gelöst und die Mischung anschließend evaporiert. Der Rückstand wurde in Dioxan aufgenommen und mit dem Komplex (580,25 μmol) unter Heliumatmosphäre bei 40 °C im Wasserbad inkubiert (siehe 4.5.13.2). In der resultierenden Fraktion (ca. 570 mg) konnten insgesamt vier Monosulfate des Dihydrochalkons (**86-89**) anhand ihres Pseudomolekülions m/z 531 $[\text{M-H}]^-$ und Fragmentierungsmusters identifiziert werden (Abbildung 2.34 – siehe 2.2.7.1). Die Ausbeuten betragen 63 (**86**), 3 (**87**), 4 (**88**) und 27 % (**89**). Es gelang, das Hauptisomer **86** (12 mg) mittels präparativer HPLC zu isolieren (siehe 4.5.13.2).

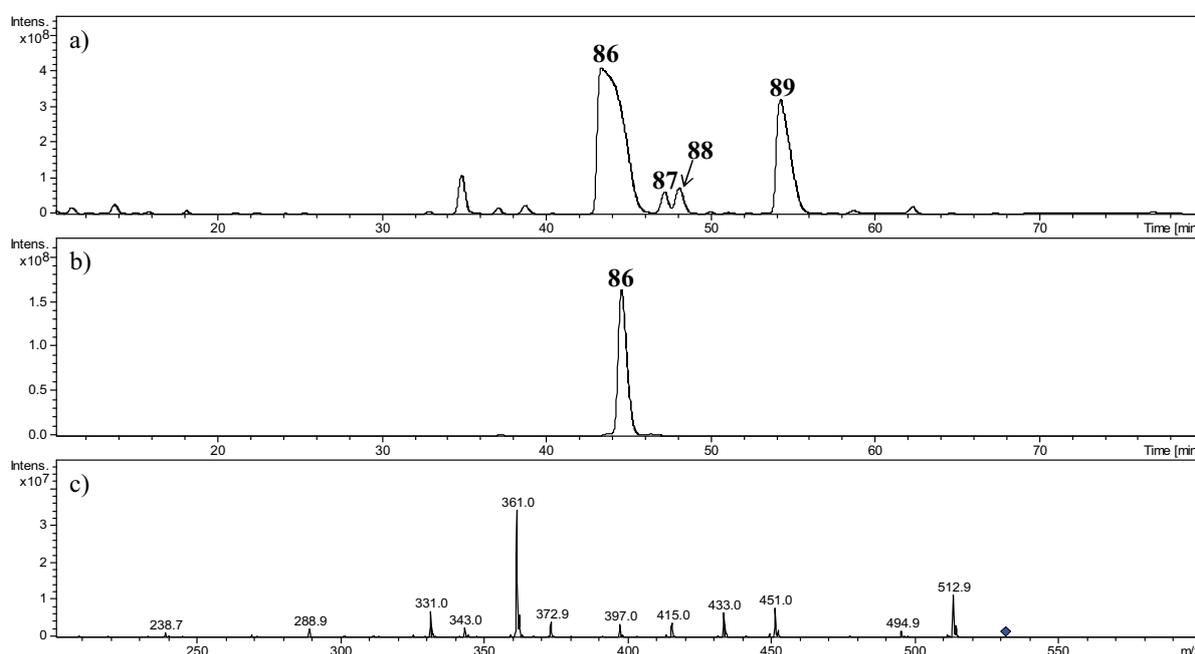


Abbildung 2.34: BPC der nach Sulfatierung von Aspalathin (**16**) erhaltenen Fraktion (a) (**86-89**; m/z 531 \rightarrow 513, 451, 411, 361, 331), EIC-Chromatogramm nach präparativer Aufreinigung (b) und MS^2 -Spektrum von **86** (c) (modifiziert nach MATTUTAT, 2010)

Strukturaufklärung von Aspalathin-4-O-sulfat mittels NMR-Spektroskopie

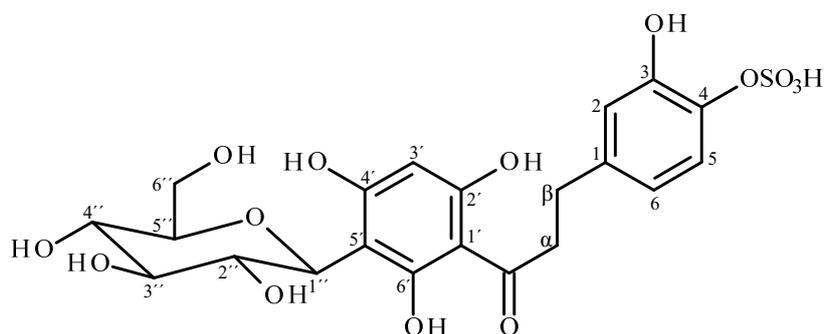
Durch die kombinierte Auswertung der 1D- und 2D-NMR-Experimente (^1H , ^{13}C , DEPT-135 sowie HMBC, HSQC, NOESY und COSY) konnte Peak **86** als Aspalathin-4-O-sulfat charakterisiert werden (Tabelle 2.22).

Das Dihydrochalkongrundgerüst ist anhand der ^{13}C -Daten δ 45,42 ppm (C- α), 29,81 ppm (C- β) sowie der HMBC-Korrelationen von H- β zu C-1 (δ 132,46 ppm) und von H- α zu C-1' (δ 103,92 ppm) zu erkennen. Übereinstimmende Daten wurden von KRAFZCYK et al. (2008) veröffentlicht.

Die Position der Hydroxylgruppe, an der der Sulfatrest gebunden ist, wurde durch die Kombination mehrerer NMR-Experimente ermittelt. Der starke Elektronenzug des Schwefelatoms innerhalb der Sulfatgruppe wirkt entschirmend auf das C-Atom, das die funktionelle

Gruppe trägt. Die Intensität dieser Entschirmung fällt im Vergleich zu den unkonjugiert vorliegenden Hydroxylgruppen jedoch geringer aus. Im ^{13}C -Experiment wurden zwei Signale mit einer Verschiebung von δ 143,30 und 145,06 ppm detektiert, die mit dem *o*-Disubstitutionsmuster des B-Rings korrelieren. Die intensiven HMBC-Korrelationen von C-4 (δ 143,30 ppm) zu H-6 (3J) und H-2 (3J) im Vergleich zu der schwachen Korrelation von C-3 (δ 145,06 ppm) zu H-6 (4J) (und H-5 (3J)) ließen den Schluss zu, dass der Sulfatrest am C-4 des B-Rings gebunden ist.

Tabelle 2.22: ^1H - (600 MHz) und ^{13}C -NMR- (125 MHz) Daten von Aspalathin-4-O-sulfat (**86**) (in DMSO- D_6) (modifiziert nach MATTUTAT, 2010)^a



C/H	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]
1		132,46
2	6,62 (s, 1 H)	115,75
3		145,06
4		143,30
5	6,62 (d, 1H, $J = 10,8$ Hz)	115,26
6	6,47 (d, 1H, $J = 6,0$ Hz)	118,80
CO		204,41
α	3,23 (t, 2H, $J = 8,2$ Hz)	45,42
β	2,70 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz)	29,81
1'		103,92
2'		163,85
3'		103,65
4'		165,18
5'	5,75 (s, 1 H)	94,50
6'		161,75
1''	4,75 (d, 1H, $J = 9,7$ Hz)	73,50
2''	4,05 (t, 1H, $J = 8,6$ Hz)	70,40
3''	3,18 (t, 1H, $J = 8,3$ Hz)	78,80
4''	3,28 (t, 1H, $J = 9,1$ Hz)	70,60
5''	3,18 (m, 1H)	79,01
6''	3,67 (dd, 1H, $J = 11,4$ Hz, 6,2 Hz) 3,93 (dd, 1H, $J = 11,3$ Hz, 1,5 Hz)	66,41

^a δ , chemische Verschiebung; J , Kopplungskonstante. Die H- und C-Zuordnung wurde durch ^{13}C -DEPT, HMBC, HSQC und COSY-Experimente bestätigt

2.2.7 Qualitative Analyse der Urin- und Plasmaproben

Aspalathin (**16**) stellt qualitativ und quantitativ den wertgebenden Bestandteil des grünen Rooibos dar. Aufgrund des steigenden Konsums von Rooibostee steht die Verstoffwechslung dieser Verbindung im Interesse der Forschung. Ihre Resorption bildet die Grundvoraussetzung, um einen kausalen Zusammenhang zwischen der Substanz Aspalathin (**16**) und ihren physiologischen Wirkungen herzustellen (VON GADOW et al., 1997b; SNIJMAN et al., 2007; KREUZ et al., 2008 – siehe 1.2.4). Bei der Analyse der Plasma- und Urinproben wurde daher das Hauptaugenmerk auf das Dihydrochalkon und seine korrespondierenden Metabolite gelegt.

2.2.7.1 Urin

Die Aufarbeitung erfolgte nach dem in 4.5.12.2 beschriebenen Verfahren. Untersucht wurden die Urinproben von insgesamt fünf Zeitintervallen (vor und 0-2, 2-4, 4-6 und 8-24 h nach Prüfproduktgabe).

Metabolite von Aspalathin und Nothofagin

Abbildung 2.35 zeigt Extracted Ion Chromatogramme charakteristischer Ionenspuren einiger Metabolite von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**), die im 0-24 h-Urin der Studienteilnehmer nach oraler Applikation von 500 mL des Rooibostees identifiziert wurden. Tabelle 2.23 gibt einen Überblick über die insgesamt bestätigten Verbindungen.

Tabelle 2.23: Übersicht über die im 0-24 h-Urin der Probanden nach Gabe von 500 mL des Rooibostees identifizierten Metabolite von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) (Hauptfragmente unterstrichen) (modifiziert nach BREITER et al., 2011)^a

Nr.	Rt [min]	[M-H] ⁻ m/z	MS ² m/z	Verbindung
90	31,4	627	537, <u>507</u> , 451, 361, 331	Aspalathin-O-glcS
91	31,7	641	<u>551</u> , 521, 465, 375, 345	Me-O-aspalathin-O-glcS
16	34,4	451	361, <u>331</u>	Aspalathin
92	38,3	641	<u>551</u> , 521, 465, 375, 345	Me-O-aspalathin-O-glcS
93	44,2	545	465 (MS ³ 375, <u>345</u>)	Me-O-aspalathin-O-sulfat
94	44,4	611	<u>521</u> , 491, 435, 345, 315	Nothofagin-O-glcS
25	45,1	435	345, <u>315</u>	Nothofagin
86	45,2	531	513, 451, 411, <u>361</u> , 331	Aspalathin-4-O-sulfat
95	46,4	641	<u>551</u> , 521, 465, 375, 345	Me-O-aspalathin-O-glcS
84	47,9	465	375, <u>345</u>	3-O-Methylaspalathin
89	55,8	531	513, 451, 411, <u>361</u> , 331	Aspalathin-3-O-sulfat (?)
96	50,6	465	289 (MS ³ 271, <u>167</u> , 125)	2',3,4',4,6'-Pentahydroxy-dihydrochalkon-O-glcS
97	59,6	449	273 (MS ³ <u>167</u> , 123)	2',4,4',6'-Tetrahydroxy-dihydrochalkon-O-glcS
98	60,1	465	289 (MS ³ 271, <u>167</u> , 125)	2',3,4',4,6'-Pentahydroxy-dihydrochalkon-O-glcS

^aRt, Retentionszeit; glcS, glucuronid; Me, Methyl

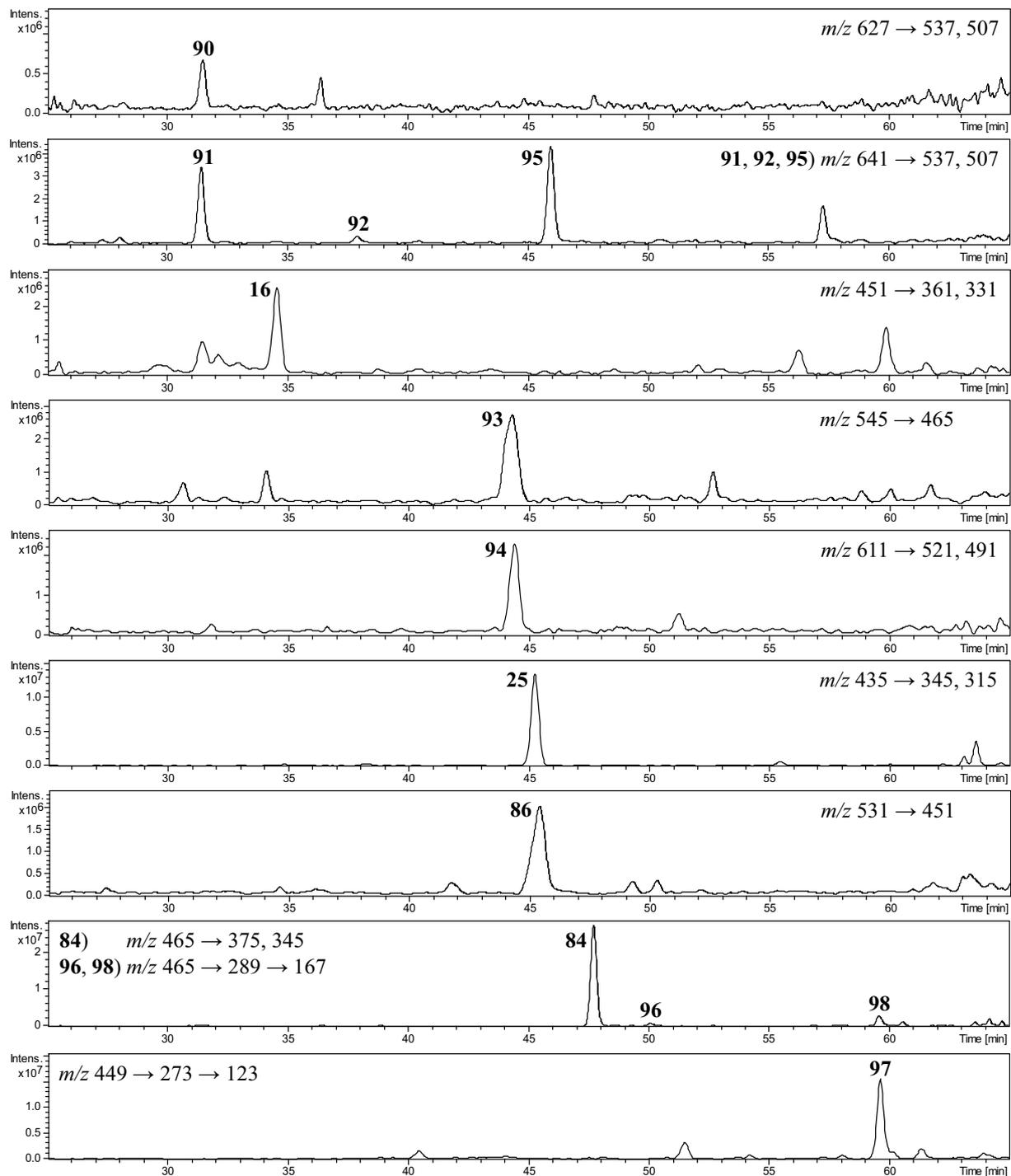


Abbildung 2.35: Einige im 0-24 h-Urin der Probanden nach Gabe von 500 mL des Rooibostees identifizierte Metabolite von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) (**90**: m/z 627 \rightarrow Aspalathin-O-glucuronid; **91**, **92**, **95**: m/z 641 \rightarrow Methyl-O-aspalathin-O-glucuronid; **16**: m/z 451 \rightarrow Aspalathin; **93**: m/z 545 \rightarrow Methyl-O-aspalathin-O-sulfat; **94**: m/z 611 \rightarrow Nothofagin-O-glucuronid; **25**: m/z 435 \rightarrow Nothofagin; **86**: m/z 531 \rightarrow Aspalathin-4-O-sulfat; **84**: m/z 465 \rightarrow 3-O-Methylaspalathin; **96**, **98**: m/z 465 \rightarrow 2',3,4',4,6'-Pentahydroxy-dihydrochalkon-O-glucuronid; **97**: m/z 449 \rightarrow 2',3,3',6'-Tetrahydroxy-dihydrochalkon-O-glucuronid) (modifiziert nach BREITER et al., 2011)

Insgesamt wurden neben den beiden intakten Dihydrochalkonen fünf verschiedene Metabolite von Aspalathin (**86**, **89**: sulfatiert; **90**: glucuronidiert; **84**: methyliert; **93**: methyliert und sulfatiert; **91**, **92**, **95**: glucuronidiert und methyliert), ein Metabolit des Aglykons von

Aspalathin (**96**, **98**: glucuronidiert), ein Metabolit von Nothofagin (**94**: glucuronidiert) und ein Metabolit von dessen Aglykon (**97**: glucuronidiert) nachgewiesen. Die glucuronidierten und methylierten sowie sulfatierten Derivate von Aspalathin (**91**, **92**, **95** bzw. **86**, **89**) sowie die der Aglyka (**96**, **98**) deuten auf das Vorliegen von Stellungsisomeren hin.

Peak **90** wurde aufgrund des Pseudomoleküliions m/z 627 $[M-H]^-$ und des für Mono-C-glykoside charakteristischen Fragmentierungsmusters als Aspalathin-O-glucuronid verifiziert. Die im MS^3 -Modus beobachtete Massendifferenz von m/z 176 ist auf die Abspaltung des Glucuronidrestes zurückzuführen. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von KREUZ et al. (2008). VAN DER MERWE et al. (2010) führten eine Studie mit subzellularen Rattenleberfraktionen als Quelle von Glucuronosyl- und Sulfotransferasen zur Untersuchung des *in vitro*-Metabolismus von Aspalathin und Nothofagin durch. Das Hauptglucuronidierungsprodukt von Aspalathin resultiert demnach aus der Konjugation am 4-OH. Ein weiterer Hinweis für diese Verknüpfungsposition ist, dass die Glucuronidierung von Quercetin mit Hilfe menschlicher Lebermikrosomen vier Glucuronide ergab, von denen ebenfalls das 4'-O-glucuronid den Hauptmetaboliten darstellte (DAY et al., 2000b).

Peak **84** besitzt ein Pseudomoleküliion von m/z 465 $[M-H]^-$ und im MS^2 -Modus - abgesehen von einer Massenabweichung von m/z 14 (\rightarrow Methylgruppe) - ein mit Aspalathin (**16**) vergleichbares Fragmentierungsmuster (m/z 345 und 375). Daher wurde Peak **84** in Übereinstimmung mit den Daten von KREUZ et al. (2008) als methyliertes Aspalathin charakterisiert. Aufgrund der Cochromatographie mit dem synthetisierten, 3-O-methylierten Aspalathin (3-O-MA) konnte die Verknüpfungsposition der Methylgruppe bestimmt werden (siehe 2.2.6.1).

Die Peaks **91**, **92** und **95** zeigen alle ein $[M-H]^-$ bei m/z 641 und die Fragmente m/z 551, 521, 465, 375 und 345. Die Tochterionen m/z 551 $[(M-H)-90]^-$ und m/z 521 $[(M-H)-120]^-$ weisen beide auf die mono-C-glykosidische Natur dieser Metabolite hin. Das Fragment m/z 465 $[(M-H)-176]^-$ geht aus der neutralen Abspaltung des Glucuronidrestes hervor. Die im Vergleich zum glucuronidierten Aspalathin (**90**) beobachtete Massenverschiebung um 14 amu und die mit methyliertem Aspalathin (**84**) übereinstimmenden Fragmente ließen den Schluss zu, dass methylierte Derivate von Aspalathin (**16**) vorliegen. In Kombination mit den Ergebnissen von KREUZ et al. (2008) wurden die drei Peaks als methyliertes und glucuronidiertes Aspalathin verifiziert.

Bei den Peaks **96** und **98** handelt es sich vermutlich um 2',3,4',4,6'-Pentahydroxy-dihydrochalkon-O-glucuronide, da beide ein Pseudomoleküliion bei m/z 465 $[M-H]^-$ besitzen, aus dem nach Fragmentierung unter Abspaltung eines Glucuronidrestes das Tochterion m/z 289 hervorgeht. Dieses bildet im MS^3 -Modus die Fragmente m/z 271, 167 und 125. Übereinstimmende Ergebnisse wurden von KREUZ et al. (2008) publiziert.

Peak **97** besitzt ein $[M-H]^-$ bei m/z 449 und zeigt ebenso wie das glucuronidierte Aglykon von Aspalathin (**96**, **98**) einen neutralen Massenverlust von 176 amu. Das Fragment m/z 273 kann ebenso wie die im MS^3 -Modus gebildeten Fragmente m/z 167 und 123 dem Aglykon von Nothofagin (**25**) zugeordnet werden. Daher handelt es sich bei Peak **97** wahrscheinlich um das

bislang noch nicht beschriebene glucuronidierte Aglykon (2',4,4',6'-Tetrahydroxy-dihydrochalkon-O-glcS).

Peak **93** wurde aufgrund des $[M-H]^-$ bei m/z 545, das im MS^2 -Modus als Folge der Abspaltung eines Sulfatrestes ($[(M-H)-80]^-$) das Hauptfragment m/z 465 lieferte, als sulfatiertes und methyliertes Aspalathin charakterisiert (STALMACH et al., 2009). Die Methylierung wird durch das mit 3-O-MA (**84**) übereinstimmende MS^3 -Profil bestätigt (m/z 375 und 345).

Peak **86** zeigt ein Pseudomolekülion von m/z 531 $[M-H]^-$, aus dem im MS^2 -Modus u.a. das Fragment m/z 451 bei einem Massenverlust von 80 amu (\rightarrow Sulfatrest) hervorgeht. Die übrigen Fragmente weisen auf ein C-verknüpftes Glykosid hin. STALMACH et al. (2009) veröffentlichten entsprechende Daten, so dass Peak **86** als sulfatiertes Aspalathin charakterisiert wurde. Durch Cochromatographie mit dem synthetisierten Aspalathin-4-O-sulfat (siehe 2.2.6.3) konnte dieser Metabolit als 4-O-sulfat bestätigt werden. Ein Konstitutionsisomer von Peak **86** eluiert bei einer Retentionszeit von 55,8 min und weist Cochromatographie mit dem Syntheseprodukt **89** auf. Da eine Verknüpfung von Aspalathin (**16**) vornehmlich am 4-OH und 3-OH erfolgt (VAN DER MERWE et al., 2010), handelt es sich bei dieser Verbindung vermutlich um Aspalathin-3-O-sulfat. Dafür spricht auch, dass Verbindung **89** neben **86** das Hauptprodukt der Sulfatierung von Aspalathin (**16**) ist (siehe 2.2.6.3).

Peak **94** hat ein ähnliches Fragmentierungsmuster wie Peak **90**. Die Fragmentierung des $[M-H]^-$ bei m/z 611 führte zu der Bildung von Fragmenten, die charakteristisch für ein Mono-C-glykosid ($[(M-H)-90]^-$ und $[(M-H)-120]^-$) sind. Ein Massenverlust von 176 amu deutet auf die Abspaltung eines Glucuronidrestes hin. Bei Peak **94** handelt es sich demnach voraussichtlich um die bislang noch nicht beschriebene glucuronidierte Form von Nothofagin (**25**).

Neben den konjugiert vorliegenden Dihydrochalkonen konnten Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) auch in freier Form nach Konsum des Teegetränks und der aktiven Fraktion nachgewiesen werden. Auch die nach Deglykosylierung entstehenden Aglyka 2',3,4',4,6'-Pentahydroxy- und 2',4,4',6'-Tetrahydroxy-dihydrochalkon (**80, 99**) wurden vereinzelt detektiert.

Die Ergebnisse der Humanstudie zeigen, dass nach oraler Applikation der Rooibosformulierungen die Hauptkonjugationswege von Aspalathin (**16**) die Glucuronidierung, Sulfatierung und Methylierung sind. Nothofagin (**25**) konnte lediglich in glucuronidierter Form nachgewiesen werden. Weiterhin ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von COURTS & WILLIAMSON (2009) ersichtlich, dass die Deglykosylierung keine Voraussetzung für die Resorption C-glykosylierter Flavonoide ist, wie die nachgewiesenen Metabolite von Aspalathin und Nothofagin (**84, 86, 89, 90-95**) belegen. Demnach können beide Dihydrochalkon-C-glucoside sowohl in unveränderter Form als auch nach Deglykosylierung zu den korrespondierenden Aglyka **80** und **99** im Gastrointestinaltrakt resorbiert werden.

Die Resorption der beiden hydrophilen Dihydrochalkone ist in intakter Form durch passive transzellulare Diffusion nicht zu erklären. Denkbar ist ein aktiver Transport durch Wechselwirkung des intakten Glucoserestes mit dem Natrium/Glucose-Cotransporter 1 (SGLT1) auf der apikalen Zellseite der Enterozyten (Lumen) (siehe 1.3). Das bedeutet gleichzeitig, dass basolateral aktive Transporterspezifität gegenüber intakten glykosylierten Flavonoiden vorliegen muss (COURTS & WILLIAMSON, 2009). Ein alternativer Aufnahmeweg wäre die Resorption durch die sogenannten „Tight Junctions“. Dabei handelt es sich um interzelluläre Adhäsionskomplexe von Epithel- und Endothelzellen, die eine parazelluläre Diffusionsbarriere bilden und den Fluss von Molekülen über das Epithel regulieren. Es ist bekannt, dass an deren Aufbau Multiproteinkomplexe beteiligt sind, die zytosolische und Transmembranproteine (z.B. Occludin (FURUSE et al., 1993) und Claudine (FURUSE et al., 1998)) enthalten (STEED et al., 2009).

Aufgrund der gegen Säuren und Enzyme resistenten C-C-Bindung zwischen Zucker und Aglykon werden Deglykosylierungen bei C-Glykosiden selten beobachtet. Dass die Abspaltung des Zuckerbausteins dennoch möglich ist, beweist die Detektion des glucuronidierten Aglykons sowohl von Aspalathin als auch von Nothofagin (**96-98**). In der Literatur wurde bereits die Spaltung des C-verknüpften Glykosids Mangiferin zu dessen Aglykon Norathyriol durch Darmbakterien beschrieben (SANUGUL et al., 2005). Daher sind entsprechende Umsetzungen auch für beide Dihydrochalkone denkbar. Anhand der geringen Peakintensitäten und nur vereinzelter Erfassung dieser Metabolite lässt sich abschätzen, dass die Ausscheidung in dieser Form eine unwesentliche Rolle spielt. Auch die alleinige Glucuronidierung und Sulfatierung von Aspalathin (**16**) stellt ebenso wie die kombinierte Methylierung und Sulfatierung einen Sekundärprozess dar. Wichtige Konjugationswege sind dagegen die Methylierung sowie die kombinierte Methylierung und Glucuronidierung. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von KREUZ et al. (2008).

Für die Methylierung von Aspalathin (**16**) kann anhand von Cochromatographie und der Daten von COURTS & WILLIAMSON (2009) gezeigt werden, dass trotz der *in vitro*-Bildung von 3-O- und 4-O-MA (**84, 85**) *in vivo* nur das 3-O-Methylisomer relevant ist. Dieses besitzt im Vergleich zum freien Aspalathin (**16**) eine höhere Lipophilie, wodurch nach Durchlaufen des enterohepatischen Kreislaufs die Möglichkeit zur Rückresorption durch passive Diffusion deutlich erhöht wird. Dieses ist möglicherweise ein Grund für die hohen Peakintensitäten des methylierten und glucuronidierten Aspalathins (**91, 92, 95**). Vermutlich ist in diesen Metaboliten die Methylgruppe am 3-OH des B-Rings konjugiert. Zusätzlich zur Glucuronidierung in der Leber und im Darm könnte dieser Prozess auch in der Niere ablaufen und damit zur ausgeprägten Anwesenheit dieser Metabolite beitragen. Es ist bekannt, dass z.B. die in der Niere lokalisierte UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A8/9 über ein breites Spektrum an Substratspezifität verfügt (MCGURK et al., 1998) und daher möglicherweise an der Metabolisierung von Aspalathin (**16**) beteiligt ist.

Tabelle 2.24 gibt einen Überblick über das Vorkommen einiger nach oraler Gabe der Rooibosformulierungen identifizierten Metabolite von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) unabhängig vom Zeitpunkt der Exkretion. Aufgrund der vergleichbaren Aspalathingehalte im Rooibostee und der aktiven Fraktion ergeben sich für ersteres Dihydrochalkon keine signifikanten Unterschiede im Metabolitprofil und den Detektionsraten. Ein Einfluss der Prüfproduktmatrix (komplexer Teeaufguss – definiert zusammengesetzte aktive Fraktion) auf beide Parameter ist somit nicht gegeben.

Tabelle 2.24: Übersicht über das Vorkommen einiger Metabolite von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) im 0-24 h-Urin der Probanden 1-9 nach Gabe von jeweils 500 mL des Rooibostees bzw. der aktiven Fraktion^a

Rooibostee	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Σ
Aspalathin (16)		X				X		X	X	4
3-O-Me-aspalathin (84)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
Aspalathin-O-glcS (90)		X	X							2
Me-O-aspalathin-O-glcS (91)	X	X	X	X			X	X	X	7
Me-O-aspalathin-O-sulfat (93)									X	1
Me-O-aspalathin-O-glcS (95)	X	X	X	X			X	X	X	7
Aspalathin-4-O-sulfat (86)	X						X		X	3
Nothofagin (25)	X	X	X		X	X	X	X	X	8
Nothofagin-O-glcS (94)		X	X				X		X	4
2',4,4',6'-Tetrahydroxy-dihydrochalkon-O-glcS (97)		X		X	X		X	X	X	6
Σ	5	8	6	4	3	3	7	6	9	
aktive Fraktion										
Aspalathin (16)		X	X		X	X		X	X	6
3-O-Me-aspalathin (84)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
Aspalathin-O-glcS (90)								X		1
Me-O-aspalathin-O-glcS (91)	X	X	X	X	X	X		X	X	8
Me-O-aspalathin-O-sulfat (93)										0
Me-O-aspalathin-O-glcS (95)	X	X	X	X		X	X	X	X	8
Aspalathin-4-O-sulfat (86)	X								X	2
Nothofagin (25)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
Nothofagin-O-glcS (94)										0
2',4,4',6'-Tetrahydroxy-dihydrochalkon-O-glcS (97)				X			X			2
Σ	5	5	5	5	4	5	4	6	6	

^aglcS, glucuronid; Me, Methyl

3-O-MA (**84**) stellt den Hauptmetaboliten dar und konnte sowohl nach Verabreichung von Rooibostee als auch nach aktiver Fraktion in den Urinproben aller Probanden identifiziert werden. Die überwiegende Zahl der Probanden scheidet auch die beiden dominierenden Methyl-O-aspalathin-O-glucuronide **91** und **95** aus. Interessanterweise konnte intaktes Aspalathin (**16**) trotz seines höheren Gehalts unabhängig vom verabreichten Prüfprodukt bei deutlich weniger Probanden als das strukturell verwandte Nothofagin (**25**) bestätigt werden. Die Ursache kann der ausgeprägtere Metabolismus von Aspalathin (**16**) sein. Nothofagin-O-glucuronid (**94**) konnte als einziger Metabolit von Nothofagin (**25**) ausschließlich nach Zufuhr des Rooibostees gefunden werden. Diese Beobachtung ist vermutlich auf die deutlich

geringeren Nothofagingehalte in der aktiven Fraktion zurückzuführen (siehe 6.4). Ähnliches gilt für 2',4,4',6'-Tetrahydroxy-dihydrochalcon-O-glucuronid (**97**).

Der relative Beitrag der einzelnen Konjugationsreaktionen zur Metabolisierung ist von der Verteilung der jeweiligen Verbindung zwischen der wässrigen Phase und der Lipidphase innerhalb der Zelle abhängig. Beim physiologischen pH-Wert von 7,4 sind die meisten Polyphenole an den polaren Kopfgruppen der Membranphospholipide assoziiert. Dadurch sind die Hydroxylgruppen für eine Glucuronidierung besser zugänglich (VERSTRAETEN et al., 2003; VAN DER MERWE et al., 2010). Polarere Metabolite bevorzugen den wässrigen Interzellularraum, so dass diese in Umkehrung für zytosolische Konjugationsreaktionen wie die Methylierung und Sulfatierung empfänglicher sind. Im Falle des methylierten und glucuronidierten Aspalathins (**91**, **92**, **95**) erfolgt demnach die Methylierung vorzugsweise im Zytosol und die nachfolgende Glucuronidierung im endoplasmatischen Retikulum (VAN DER MERWE et al., 2010).

Metabolite der Flavon-C/O-, Flavanon-C- und Flavonol-O-glykoside

Neben den Metaboliten von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) wurden im Retentionszeitenbereich von 40-60 min zahlreiche Glucuronide der Flavonoidaglyka Luteolin (**28**), Quercetin (**29**), Eriodictyol (**30**), Apigenin (**31**), Naringenin bzw. der methylierten Aglyka (z.B. 3-Methylquercetin (Isorhamnetin); 3'-Methyluteolin (Chrysoeriol, **32**)) anhand der neutralen Abspaltung des Glucuronidrestes von 176 amu im MS²-Modus identifiziert. Durch Vergleich mit den Messungen vor Verabreichung beider Rooibosformulierungen konnte ermittelt werden, welche der Metabolite als Folge der Prüfproduktgabe entstanden sind. Die Charakterisierung des korrespondierenden Aglykons erfolgte auf Basis der MS³-Messungen einiger Urinproben und der verfügbaren Referenzsubstanzen (Tabelle 2.25). Die Fragmente gehen aus der Spaltung des heterocyclischen C-Rings hervor. Weiterhin sind identifizierte intakte Vertreter der genannten Stoffklassen sowie deren Metabolite aufgeführt.

Insgesamt konnten jeweils zwei Eriodictyol- (z.B. **100**), Quercetin- (z.B. **81**), Naringenin- (z.B. **103**), Methylquercetin- (z.B. **101**), Apigenin (z.B. **102**)- und Methylluteolin- (z.B. **104**) sowie drei Luteolin-O-glucuronide (z.B. **82**) nachgewiesen werden, wobei nach Gabe der aktiven Fraktion die Apigenin-O-glucuronide (z.B. **102**) bei keinem und die Methylluteolin-O-glucuronide (z.B. **104**) lediglich bei einem Studienteilnehmer identifiziert werden konnten. Als einziges Diglucuronid konnte Luteolin-di-O-glucuronid (**106**) bei einem Probanden nach Gabe der aktiven Fraktion bestätigt werden. Mit Quercetin-O-sulfat (**105**) lag lediglich ein sulfatiertes Konjugat bei insgesamt zwei Probanden vor.

Der Nachweis von Methylquercetin- und Methylluteolin-O-glucuronid (**101**, **104**) zeigt, dass die Ausscheidung der korrespondierenden Aglyka auch über eine kombinierte Glucuronidierung und Methylierung ablaufen kann. Dieser Stoffwechselweg spielt allerdings

ebenso wie die Sulfatierung eine untergeordnete Rolle. Hauptsächlich erfolgt die renale Eliminierung im Unterschied zu den Dihydrochalkonen über die Monoglucuronide.

Tabelle 2.25: Überblick über die im 0-24 h-Urin der neun untersuchten Probanden nach oraler Applikation von je 500 mL Rooibostee bzw. aktiver Fraktion identifizierten Flavone, Flavanone und Flavonole und deren Metabolite sowie der jeweilige Nachweisort (Hauptfragmente unterstrichen)^a

Nr.	Rt [min]	[M-H] ⁻ m/z	MS ² m/z	Prüfprodukt		Verbindung
				Tee	Fraktion	
81	41,2; 54,8	477	301 (MS ³ 179, 151)	X	X	Quercetin-O-glcS
105	67,5	381	301 (MS ³ 179, 151)	X	X	Quercetin-O-sulfat
82	45,8; 55,6; 59,7	461	285 (MS ³ 241, 217)	X	X	Luteolin-O-glcS
106	45,9	637	<u>461</u> , 285		X	Luteolin-di-O-glcS
100	56,8; 58,0	463	287 (MS ³ 151)	X	X	Eriodictyol-O-glcS
101	50,8; 55,1	491	315 (MS ³ 301)	X	X	Me-O-quercetin-O-glcS
102	55,5; 58,2	445	269 (MS ³ 201, 181)	X		Apigenin-O-glcS
103	58,0; 60,6	447	271 (MS ³ 151)	X	X	Naringenin-O-glcS
104	55,6; 58,8	475	299 (MS ³ 284)	X	X	Me-O-luteolin-O-glcS
11	30,3	447	429, 357, <u>327</u>	X		Isoorientin
14	33,5	447	357, <u>327</u>	X	X	Orientin
107	39,1	461	443, 371, <u>341</u>	X	X	Me-O-isoorientin
108	28,0	623	533, 503, 447, 429, <u>357</u> , 327		X	Isoorientin-O-glcS
109	28,5	637	547, 517, 461, 443, <u>371</u> , 341		X	Me-O-isoorientin-O-glcS
110	30,1	637	547, 517, 461, <u>371</u> , 341		X	Me-O-orientin-O-glcS
111	37,7	527	<u>447</u> , 429, 357, 327	X	X	Isoorientin-O-sulfat
18	35,5	609	301	X		Rutin
20	37,6	431	413, 341, <u>311</u>	X	X	Isovitexin
21	39,6	431	341, <u>311</u>	X		Vitexin
22/23	39,8	463	301	X	X	Hyperosid/Isoquercitrin
24	44,2	447	285	X		Luteolin-O-hexosid
112	30,6	623	<u>447</u> , 285		X	Luteolin-O-hexosid-O-glcS
30	66,8	287	<u>151</u> , 135	X	X	Eriodictyol
113	37,5; 38,7	463	373, <u>343</u>	X	X	(R/S)-Me-O-eriodictyol-6/8-C-glu

^aRt, Retentionszeit; glcS, glucuronid; Me, Methyl; glu, glucosid

Derivate von Naringenin sind in der aktiven Fraktion nicht enthalten. Die Bildung von Naringenin-O-glucuroniden (z.B. **103**) ist allerdings aus Nothofagin (**25**) über Naringenin auf zwei Wegen denkbar: Zum einen nach Deglykosylierung zum Aglykon des Nothofagins (**99**) und anschließendem Ringschluss, zum anderen nach Ringschluss zum (R/S)-Naringenin-6-C-glucosid und nachfolgender Deglykosylierung. Entsprechende Umsetzungen lassen sich auch für Aspalathin (**16**) formulieren. Über beide Reaktionswege entsteht dann Eriodictyol (**30**), das im Körper zu Eriodictyol-O-glucuroniden (z.B. **100**) umgewandelt werden kann (KREUZ et al., 2008 – Abbildung 2.36).

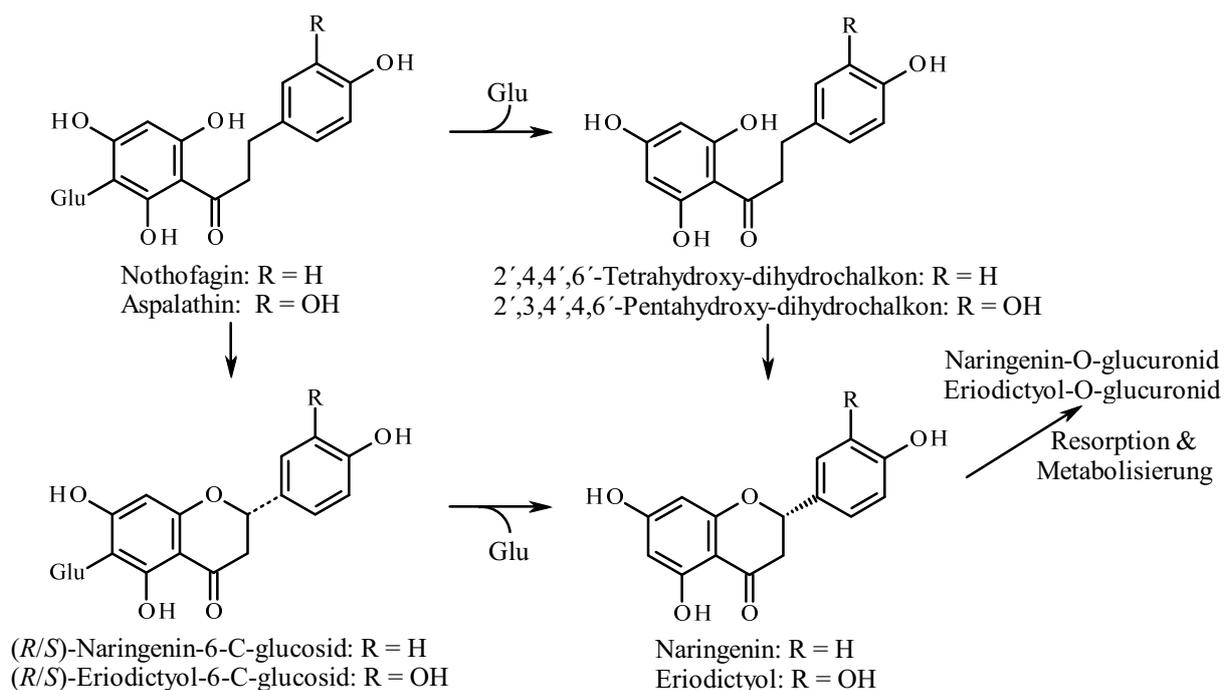


Abbildung 2.36: Hypothetischer Bildungsweg von Eriodictyol- und Naringenin-O-glucuronid (z.B. **100** und **103**) aus Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**). Glu, glucosid

Die Vielzahl der erfassten Glucuronide deutet auf eine ausgedehnte Deglykosylierung der Flavone, Flavanone und Flavonole im Darmtrakt sowie die anschließende Verstoffwechslung der freigesetzten Aglyka hin (siehe 2.2.7.2). Das Auftreten von Luteolin- und Apigenin-O-glucuroniden (z.B. **82** und **102**) nach oraler Applikation der aktiven Fraktion geht vermutlich auf die Deglykosylierung der C-glucoside Isoorientin (**11**), Orientin (**14**) sowie Isovitexin (**20**) und Vitexin (**21**) durch die Mikroflora des Dickdarms und die nachfolgende Rückresorption der freigesetzten Aglyka zurück, da die Spaltung der C-glykosidischen Bindung aufgrund ihrer Stabilität auf enzymatischem Weg kaum erfolgt.

Die resorbierten Flavonoide werden aus dem Organismus nicht nur als Metabolite der Aglyka ausgeschleust, wie der Nachweis intakter Flavonoide (z.B. Rutin (**18**)) nach Gabe von aktiver Fraktion und Rooibostee belegt. Bei letzterem Prüfprodukt war die Zahl detektierter unveränderter Flavonoide insgesamt größer (siehe 2.2.8.1). Als Phase-II-Umsetzungsprodukte der intakten Ausgangsverbindungen konnten vier bislang unbekannte Metabolite von Isoorientin (**11**) und Orientin (**14**) identifiziert werden. Im Einzelnen handelte es sich um methyliertes (**107**), glucuronidiertes (**108**), sulfatiertes (**111**) sowie methyliertes und glucuronidiertes Isoorientin (**109**) bzw. Orientin (**110**). Von welchem der beiden Flavon-C-glucoside sich die Metabolite ableiten, wurde anhand der Fragmente m/z 429 (intaktes Flavonoid-18 amu) und 443 (methyliertes Flavonoid-18 amu) ermittelt. Beide traten ausschließlich beim 6-C-glucosid Isoorientin (**11**) auf, nicht jedoch beim 8-C-glucosid Orientin (**14**) (ebenso wie das Fragment m/z 429 zur Differenzierung der unveränderten Flavone – siehe Tabelle 2.1). In Übereinstimmung mit der Verstoffwechslung von Aspalathin (**16**) stellt

die Biotransformation zum methylierten Konjugat **107** (Methylisoorientin) den Hauptkonjugationsweg dar. Entsprechende Metabolite wurden für Isovitexin (**20**) und Vitexin (**21**) aufgrund geringerer Gehalte in den Rooibosformulierungen nicht gefunden.

(*R/S*)-Eriodictyol-6/8-C-glucoside (**9**, **10**, **15**, **17**) entstehen bei der „Fermentation“ aus Aspalathin (**16**) (siehe 1.2.3). Der Nachweis einiger sich davon ableitender Metabolite (z.B. Eriodictyol (**30**), Eriodictyol-O-glucuronide (z.B. **100**) und methylierte (*R/S*)-Eriodictyol-6/8-C-glucoside (z.B. **113**)) nach Gabe von aktiver Fraktion und Rooibostee liefert erstmals den Beweis dafür, dass die Oxidation des Dihydrochalkons nicht nur während fermentativer Prozesse, sondern auch *in vivo* abläuft (KREUZ et al., 2008), da weder Eriodictyol (**30**) noch die korrespondierenden C-glucoside **9**, **10**, **15** und **17** Bestandteile der aktiven Fraktion waren (siehe Abbildung 2.22). Demnach wird Aspalathin (**16**) auch zu einem gewissen Teil über die vier Flavanon-C-glucoside verstoffwechselt. An Bedeutung gewinnt dieser Prozess bei der 2. Humanstudie (siehe 2.3). Hier wurde deutlich, dass mit zunehmender Lagerdauer (→ gelagertes Fertiggetränk) die renale Ausscheidung verstärkt über diesen Weg abläuft. Die Detektion von Eriodictyol (**30**) ist mit der bakteriellen Spaltung der Flavanon-C-glucoside **9**, **10**, **15** und **17** in Aglykon und Zuckerrest zu erklären, die einerseits nach fortschreitendem Abbau zur Bildung phenolischer Säuren führt (siehe unten). Andererseits kann nach Rückresorption die Biotransformation zu Eriodictyol-O-glucuroniden (z.B. **100** – siehe Abbildung 2.36) erfolgen.

Phenolische Abbauprodukte

In Tabelle 2.26 sind einige phenolische Säuren aufgeführt, die in den Urinproben der neun untersuchten Probanden nach oraler Gabe der beiden Rooibosformulierungen auf Basis der massenspektrometrischen Daten und potentieller C-Ring-Metabolite der Rooibosflavonoide charakterisiert werden konnten.

Die Fragmentierungsmuster zeigten in erster Linie einen Massenverlust von 44 amu infolge der Abspaltung der Carboxylfunktion (CO₂). Die mit * markierten Zielverbindungen lagen als Referenzsubstanzen vor, so dass in diesen Fällen die Identität der Abbauprodukte und angesichts möglicher Stellungsisomere insbesondere die Verknüpfungsstelle(n) der funktionellen Gruppe(n) im Molekül durch Cochromatographie und den Vergleich mit Literaturdaten (z.B. JUSTESEN et al., 2000) ermittelt werden konnte. Teilweise war der Nachweis durch Coelutionen erschwert bzw. nicht möglich. So gelang die sichere Bestätigung von 3-Hydroxyphenylelessigsäure (**122**) aufgrund fehlender MS²-Daten nicht. Abhilfe könnte die GC-MS/MS-Analytik verschaffen, die vielfach zur Analyse niedermolekularer Verbindungen herangezogen wird (z.B. RECHNER et al., 2002).

Als unspezifische Abbauprodukte verschiedener Flavonoiduntergruppen lagen insbesondere Hippursäure (**127**) und die hydroxylierten Derivate **128** und **129** bereits vor Prüfproduktgabe im Probenmaterial vor. Deren Ausgangskonzentrationen wurden bei der quantitativen

Auswertung als Basiswert betrachtet und analysiert, inwieweit die Zufuhr der Rooibosformulierungen zu einer signifikanten Zunahme der Gehalte führt (siehe 2.2.7.1 und 2.2.8.1).

Tabelle 2.26: Übersicht über die im 0-24 h-Urin der neun untersuchten Studienteilnehmer nach oraler Applikation von je 500 mL Rooibostee bzw. aktiver Fraktion identifizierten phenolischen Säuren sowie deren Detektionsraten.^a

Nr.	Rt [min]	[M-H] ⁻ m/z	MS ² m/z	Prüfprodukt		Verbindung
				Tee	Fraktion	
115	15,5	153	109	3	3	Dihydroxybenzoesäure
116	16,8	153	109	2	ND	3,4-Dihydroxybenzoesäure (*)
117	25,1	153	109	4	3	2,5-Dihydroxybenzoesäure (*)
118	20,4	137	108	3	2	Dihydroxybenzaldehyd
119	23,0	137	93	3	2	4-Hydroxybenzoesäure (*)
120	27,9	137	93	ND	ND	3-Hydroxybenzoesäure (*)
121	23,6	151	107	8	8	4-Hydroxyphenylelessigsäure (*)
122	27,2	151	107	ND	ND	3-Hydroxyphenylelessigsäure (*)
123	23,3	181	137	2	3	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure (*)
124	26,8	181	137	3	2	Dihydroxyphenylpropionsäure
125	31,9	165	121	ND	ND	3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (*)
126	38,2	165	121	3	3	3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure (?)
127	25,9	178	134	9	9	Hippursäure (*)
128	15,7	194	150	9	9	3/4-Hydroxyhippursäure
129	36,1	194	150	9	9	3/4-Hydroxyhippursäure

^aDie mit * markierten Substanzen standen als Referenzen zur Verfügung. Rt, Retentionszeit; ND, nicht detektiert

Insgesamt konnte unabhängig von der zugeführten Rooibosformulierung die Bildung zahlreicher C₆-C₃- (z.B. **123-126**), C₆-C₂- (z.B. **121-122**) sowie C₆-C₁-Körper (z.B. **115-120**) beobachtet werden, wobei die zuerst genannten Metabolite vermutlich hauptsächlich aus dem bakteriellen Abbau der mengenmäßig wichtigsten Flavone (**11, 14, 20, 21, 24**) und die an zweiter Stelle aufgeführten aus dem der Flavonole (z.B. **18, 19, 22, 23**) hervorgehen (siehe 2.1.1.1).

Die Katabolite können auch dem Abbau der Hydroxyzimtsäurederivate des grünen Rooibos entstammen (siehe 2.1.1.5). Bei zwei Probanden wurden mit Ferula- (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure), Isoferula- (3-Hydroxy-4-methoxyzimtsäure) und Dihydroferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxydihydrozimtsäure) weitere Metabolite des Hydroxyzimtsäurestoffwechsels anhand ihres Fragmentierungsmusters und durch Cochromatographie charakterisiert. Die Bildung dieser Verbindungen ist aus Caffeoylchinasäureestern nach Spaltung der Esterbindung sowie der Methylierung der freigesetzten Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) denkbar. Bei diesem Prozess entstehen Isoferula- und Ferulasäure. Letztere kann unter Reduktion der aliphatischen Doppelbindung zur Dihydroferulasäure weiterreagieren (BOOTH et al., 1957; PLUMB et al., 1999; RECHNER et al., 2001). Kaffee-, Ferula-, Isoferula- und Dihydroferulasäure können einerseits im Dickdarm mikrobiell zu phenolischen Säuren (z.B. 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure und 3-Hydroxyhippursäure) zersetzt (CHESSON et al., 1999; PLUMB et al., 1999), andererseits auch unverändert resorbiert und in der Leber zu den

korrespondierenden Glucuroniden umgesetzt werden (BOOTH et al., 1957; PLUMB et al., 1999; RECHNER et al., 2001). Ferner wurden in den Urinproben einiger Probanden Fragmentierungsmuster gefunden, die möglicherweise auf die typischen Flavonol-Abbauprodukte 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure (**130**; m/z 167 $[M-H]^- \rightarrow 123$) und 3,4-Dihydroxytoluol (**131**; m/z 193 $[M-H]^- \rightarrow 123$) zurückgehen.

Mögliche Angriffsstellen des C-Rings, die zur Bildung einiger in Tabelle 2.26 genannten Metabolite führen, sind am Beispiel des Flavonols Rutin (**18**) in Abbildung 2.37 dargestellt.

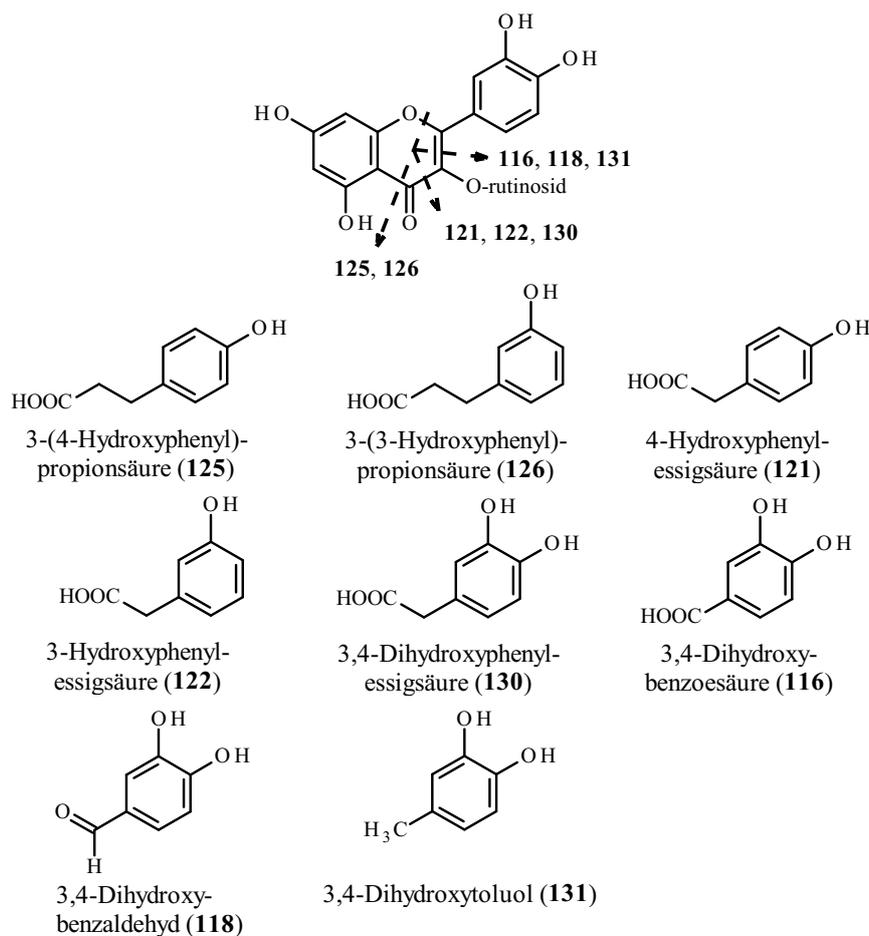


Abbildung 2.37: Potentielle C-Ring-Spaltungsstellen für einen mikrobiellen Abbau durch die Dickdarmflora am Beispiel des Rutins (**18**) (modifiziert nach JUSTESEN et al., 2000)

Als potentielle Abbauprodukte der Flavon-C-glucoside Isoorientin (**11**) und Orientin (**14**) konnte 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure (**123**) bei zwei (Rooibostee) bzw. drei (aktive Fraktion) Probanden bestätigt werden. 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (**125**), die aus Isovitexin (**20**) und Vitexin (**21**) entstehen kann (ZHANG et al., 2007b), wurde wahrscheinlich aufgrund deren geringer Gehalte in den Rooibosformulierungen nicht identifiziert. Ebenfalls nicht nachgewiesen wurden A-Ring-Metabolite wie Phloroglucinol (PG) und dessen Derivate. Dieses hängt möglicherweise mit dem weiteren bzw. vollständigen Abbau zu CO_2 und Acetyl-CoA zusammen (HEIDER & FUCHS, 1997; HEILMANN & MERFORT, 1998b).

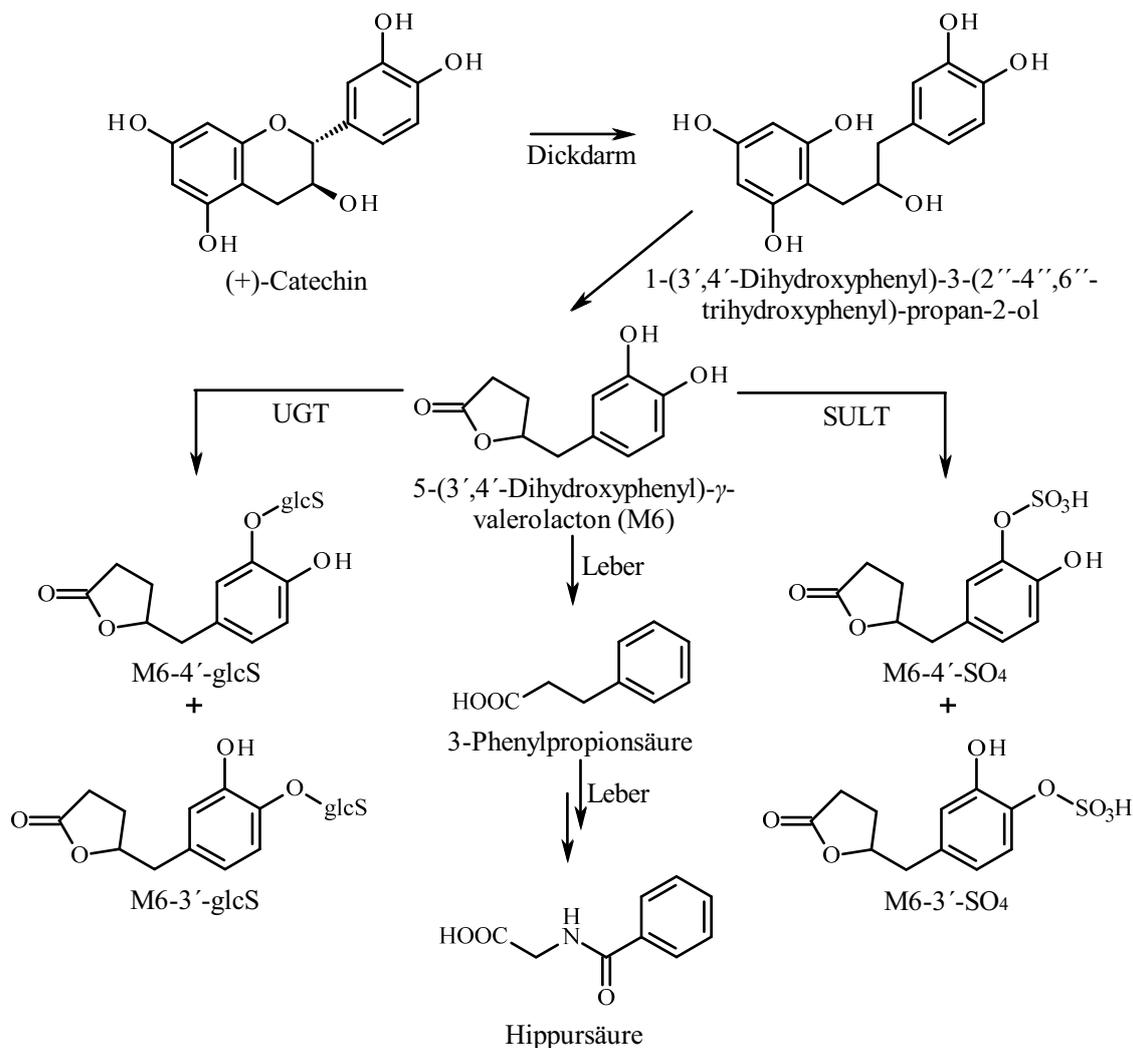


Abbildung 2.38: Schematische Darstellung der Metabolisierung von (+)-Catechin (modifiziert nach MESELHY et al., 1997; HOLLMAN & KATAN, 1997; MULDER et al., 2005; SANG et al., 2008). UGT, UDP-Glucuronosyl-Transferase; SULT, Sulfotransferase; glcS, glucuronid

In den Urinproben zweier Probanden konnten zwei Metabolite identifiziert werden, die sich vermutlich vom 5-(3',4',5'-Trihydroxyphenyl)- (M4; 224 g/mol) und 5-(3',4'- bzw. 3',5'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton (M6 bzw. M6'; 208 g/mol) ableiten. Bei diesen Verbindungen handelt es sich um bakterielle Ringspaltungsprodukte der Flavan-3-ole (z.B. Epicatechin und Epigallocatechin). Der erste Metabolit (**132**) besitzt ein Pseudomolekülion bei m/z 303 [M-H]⁻, das im MS²-Modus neben m/z 179 insbesondere m/z 223 [(M-H)-80]⁻ als Hauptfragment liefert und mit der Abspaltung eines Sulfatrests korreliert. Verbindung **132** stellt daher in Übereinstimmung mit SANG et al. (2008) und DEL RIO et al. (2010) vermutlich ein sulfatiertes Derivat von M4 dar. Der zweite Metabolit (**133**) zeigt ein [M-H]⁻ bei m/z 383, das im MS²-Modus die Fragmente m/z 207, 175 und 113 bildet. Das Hauptfragment m/z 207 [(M-H)-176]⁻ weist auf die neutrale Abspaltung eines Glucuronidrests hin. Damit handelt es sich möglicherweise um die glucuronidierte Form von M6 bzw. M6', die ebenfalls von beiden Arbeitsgruppen beschrieben wurde. Eine Unterscheidung zwischen M6 und M6' war aufgrund fehlender Referenzsubstanzen nicht möglich. Eine schematische

Darstellung der Metabolisierung von (+)-Catechin unter Bildung von M6-glcS (**133**) zeigt Abbildung 2.38.

2.2.7.2 Plasma

Plasmaproben von insgesamt drei Messpunkten (0, 1,5 und 3 h) wurden gemäß 4.5.12.1 aufgearbeitet und per LC-MS/MS analysiert. Abbildung 2.39 zeigt EIC intakter Rooibosflavonoide nach oraler Applikation von 500 mL des Rooibostees.

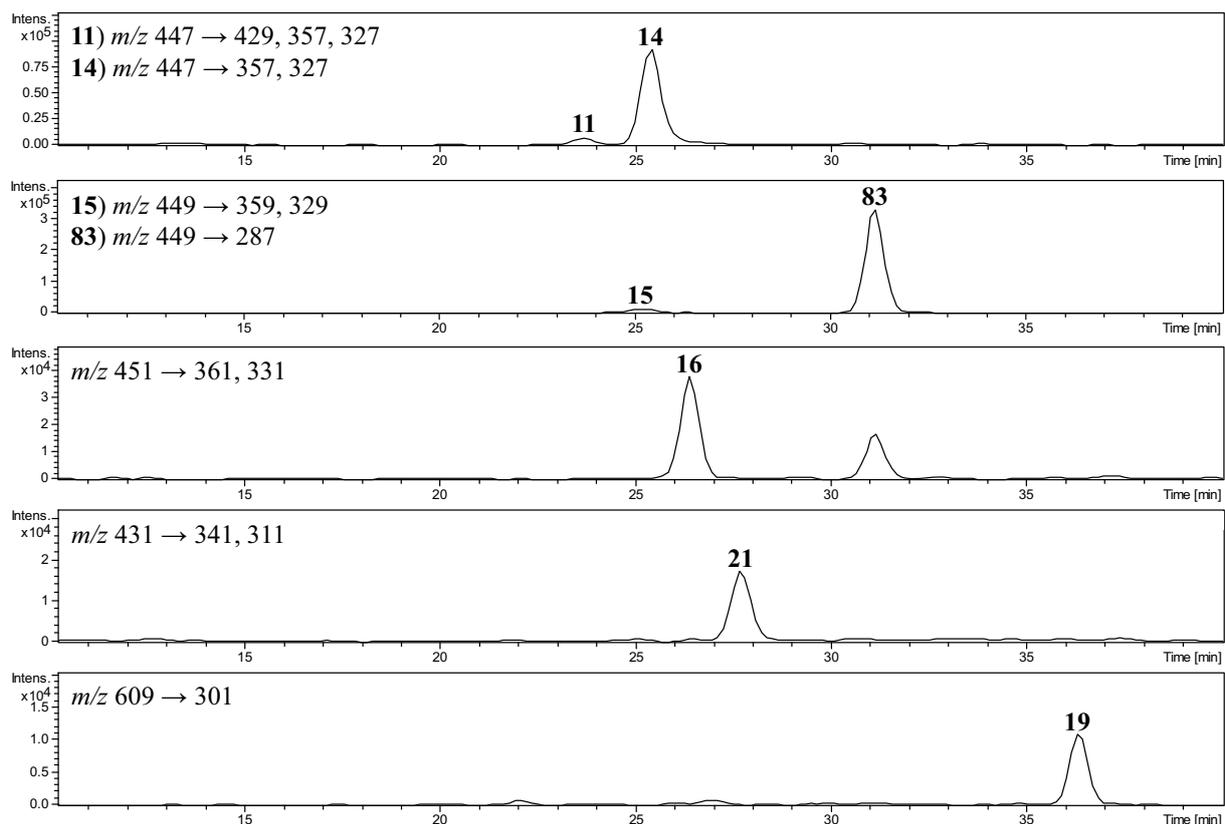


Abbildung 2.39: LC-MS/MS-Analyse (EIC) des 3 h-Plasmas eines Probanden nach Gabe von 500 mL Rooibostee (**11**: m/z 447 → Isoorientin; **14**: m/z 447 → Orientin; **15**: m/z 449 → (*S*)-Eriodictyol-8-C-glucosid; **83**: m/z 449 → Eriodictyol-7-O-glucosid (ISTD); **16**: m/z 451 → Aspalathin; **21**: m/z 431 → Vitexin; **19**: m/z 609 → Quercetin-O-rutinosid) (nach BREITER et al., 2011)

In den Plasmaproben konnten erstmalig unveränderte Rooibosflavonoide anhand ihrer Fragmentierungsmuster und Cochromatographie mit den jeweiligen Referenzsubstanzen identifiziert werden. Die quantitativ wichtigsten Rooibosflavonoide - u.a. Aspalathin (**16**) - ließen sich bei dem Großteil der Probanden detektieren. Neben den in Abbildung 2.39 aufgeführten Verbindungen waren das Rutin (**18**), Isovitexin (**20**) und Luteolin-O-hexosid (**24**).

Weder KREUZ et al. (2008) noch STALMACH et al. (2009) konnten intakte Flavonoide oder deren Metabolite in den Plasmaproben der Studienteilnehmer bzw. Versuchstiere nach Gabe von Rooibosprodukten bestätigen. Diese abweichenden Ergebnisse sind vermutlich auf die

unterschiedlichen Aufarbeitsverfahren zurückzuführen. Zur Spaltung der Plasmaalbumin-Flavonoid-Komplexe, in denen die Flavonoide nach Resorption vorliegen (siehe 1.3.1.1 und 2.2.5), wurde den Plasmaproben im Unterschied zu STALMACH et al. (2009) bei der Aufarbeitung ein saures Puffersystem (pH 3,5) zugesetzt. KREUZ et al. (2008) verwendeten zwar einen Natriumacetatpuffer (pH 4,8), setzten allerdings die Festphasenextraktion, die sich als eher ungünstiges Verfahren zur Erfassung intakter Flavonoide erwies (siehe 2.2.5.1), zur Aufarbeitung der Plasmaproben ein.

Unveränderte Flavonoide, insbesondere einige Vertreter der Quercetin-O-glykoside, konnten bereits bei anderen Studien intakt detektiert werden. So gelang der Nachweis von unverändertem Rutin im Plasma eines Probanden (c_{\max} : 63 ng/mL; t_{\max} : 5 h) nach oraler Gabe von 500 mg Rutin (ISHII et al., 2001). Die Arbeitsgruppe um MULLEN (2006) untersuchte bei einer Humanstudie die Bioverfügbarkeit von Quercetin-O-glykosiden (Quercetin-4'-O-glucosid und Quercetin-3,4'-O-glucosid) aus gerösteten Zwiebeln. Dabei konnten in erster Linie Metabolite des Quercetins (sulfatiertes, glucuronidiertes, zweifach glucuronidiertes, glucuronidiertes und sulfatiertes sowie glucuronidiertes und methyliertes Quercetin) in den Plasmaproben nachgewiesen werden (c_{\max} zumeist nach 0,6-0,8 h). Vergleichbare Ergebnisse wurden von DAY et al. (2001) im Rahmen einer Humanstudie mit vier Probanden erzielt. Bei einer weiteren Studie mit demselben Probenmaterial (270 g) konnten MULLEN et al. (2004) bei einem Probanden auch intaktes Isoquercitrin in Spuren bestimmen. Nach direkter Gabe von reinem Isoquercitrin (325 μ mol) und Quercetin-4'-O-glucosid (331 μ mol) ermittelten OLTHOF et al. (2000) durchschnittliche Plasmahöchstgehalte der intakten Glucoside ($n = 5$) von 5 bzw. 4,5 μ mol/L (t_{\max} : 37 bzw. 27 min).

Die Flavon-C-glucoside Isoorientin und Orientin konnten bei einer Humanstudie mit insgesamt neun Teilnehmern nach intravenöser Verabreichung von Extrakten aus *Polygonum orientale* und *Erigeron breviscapus* neben verschiedenen Metaboliten auch intakt nachgewiesen werden (ZHANG et al., 2007a). Bei einem Tierversuch mit Ratten zur Metabolisierung derselben Verbindungen sowie von Vitexin und Isovitexin konnten ZHANG et al. (2007b) zeigen, dass die vier Flavone im Gastrointestinaltrakt kaum resorbiert und hauptsächlich mit dem Faeces in unveränderter Form oder nach mikrobiellem Dickdarmabbau ausgeschieden werden (siehe 1.3.1.2).

Der Nachweis der Dihydrochalkon-C-glucoside Aspalathin und Nothofagin im Plasma ist bislang nicht beschrieben worden. Das Aglykon von Nothofagin (Phloretin) und sein korrespondierendes 2'-O-glucosid (Phloridzin) wurden in einem Tierversuch mit Ratten als Prüfprodukte eingesetzt (CRESPY et al., 2001). Phloretin wurde hauptsächlich in konjugierter Form (glucuronidiert und/oder sulfatiert) und zu einem geringeren Anteil intakt in den Plasmaproben wiedergefunden, während unverändertes Phloridzin nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Bestätigung intakter Flavonoide ist für ihre physiologischen Eigenschaften, z.B. ihr antioxidatives Potential, von Bedeutung. So korreliert im Idealfall die detektierte Flavonoid-

menge mit dem antioxidativen Potential zu einem definierten Messpunkt. Die im Organismus ablaufenden Biotransformationen können sowohl zu einer Ab- als auch Zunahme der biologischen Aktivität führen (CANIVENC-LAVIER et al., 1996; MUTO et al., 2001; JUSTINO et al., 2004), wobei der Beitrag einzelner Verbindungen und korrespondierenden Metabolite zu diesen Effekten von ihrer bioverfügbaren Menge und chemischen Struktur abhängig ist (FRANCIS et al., 1989; SNIJMAN et al., 2007). Dieses führt oft zu einer Diskrepanz der Ergebnisse von *in vitro*- und *in vivo*-Studien (LOTITO et al., 2006).

In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass die Position der Glucuronidierung Einfluss auf die biologische Aktivität der Flavonoide hat. Das Redoxpotential des B-Rings ist niedriger als das des A-Rings, so dass eine Glucuronidierung am 3'- oder 4'-OH des B-Rings das antioxidative Potential des korrespondierenden Aglykons mindert (JOVANOVIC et al., 1998). Deshalb untersuchten DAY et al. (2000b) die Bildungsraten von Quercetin-O-glucuroniden anhand zellfreier Extrakte der menschlichen Leber. Diese folgten der Reihenfolge 4'-OH > 3'-OH > 7-OH > 3-OH, während die Position 5-OH keine Reaktion zeigte. Bei *in vitro*-Versuchen mit subzellulären Leberfraktionen von Ratten konnte gezeigt werden, dass die Glucuronidierung von Aspalathin zu einer vollständigen Abnahme des antioxidativen Potentials führt (VAN DER MERWE et al., 2010). Auch dessen Sulfatierung führt zu ähnlichen Ergebnissen (Abbildung 2.40).

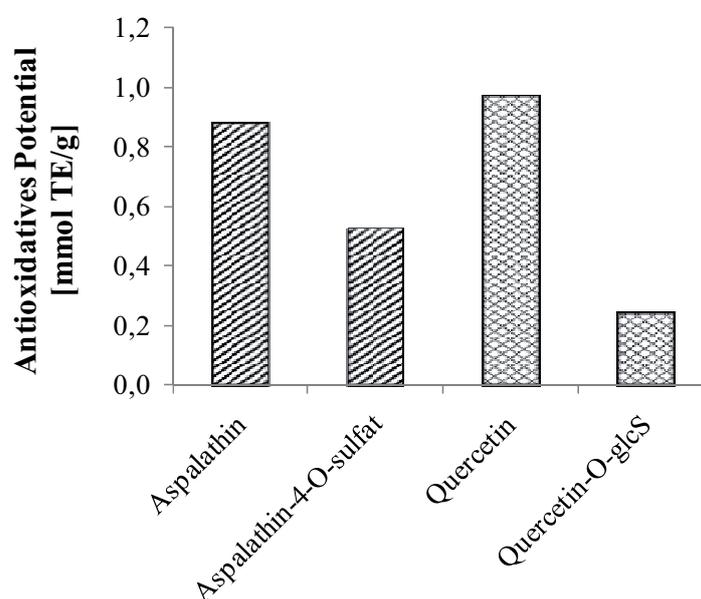


Abbildung 2.40: Abnahme des antioxidativen Potentials (TEAC-Assay – Werte als Trolox-Äquivalente angegeben) infolge zunehmender Konjugation. TE, Trolox-Äquivalente; glcS, glucuronid

Nichtsdestotrotz können die konjugierten Produkte immer noch andere biologische Aktivitäten aufweisen. Einige Metabolite des Quercetins (z.B. Quercetin-4'-O-glucuronid) behalten beispielsweise ihre Fähigkeit zur Hemmung der Xanthinoxidase und Lipooxygenase, die eine Schlüsselrolle bei Entzündungsprozessen und der Ausbildung von Artherosklerose und Krebs spielen, bei (DAY et al., 2000b). Glucuronide des Flavonols zeigen daneben eine

hemmende Wirkung auf das Wachstum von menschlichen Lungenkrebszellen (ZHANG et al., 2007c).

Phase-II-Metabolite der intakten Flavonoide bzw. ihrer korrespondierenden Aglyka konnten mittels Direktextraktion nicht verifiziert werden (siehe 2.2.5.1). Dass diese dennoch vorkommen, ließ sich durch Analyse einiger Plasmaproben mittels Festphasenextraktion belegen. So gelang unabhängig von der Rooibosformulierung der Nachweis zahlreicher Glucuronide von Luteolin (**28**), Quercetin (**29**), Eriodictyol (**30**) und Apigenin (**31**) anhand der im MS²-Modus durch Abspaltung des Glucuronidrests auftretenden Massendifferenz von 176 amu. Die Glucuronide von Luteolin (**28**) entstehen vermutlich primär aus Isoorientin (**11**), Orientin (**14**) und Luteolin-O-hexosid (**24**), die von Apigenin (**31**) aus Isovitexin (**20**) und Vitexin (**21**) sowie die von Quercetin (**29**) aus Rutin (**18**), Hyperosid (**22**) und Isoquercitrin (**23**). Die glucuronidierten Metabolite von Eriodictyol (**30**) sind offenbar eine Folge der oxidativen Cyclisierung von Aspalathin (**16**), da weder das Flavanon noch potentielle Vorläufer in signifikanter Menge in den Rooibosformulierungen enthalten waren (siehe 2.2.7.1). Metabolite der beiden intakten Dihydrochalkone **16** und **25** konnten in den untersuchten Plasmaproben nicht identifiziert werden.

Zusammenfassend werden die Rooibosflavonoide zum einen unverändert über aktive Transportmechanismen und zum anderen nach Deglykosylierung zu den korrespondierenden Aglyka vorwiegend über passive Diffusion aufgenommen. Während der transzellularen Resorption sowie in der Leber unterliegen insbesondere die freien Aglyka einer ausgedehnten Metabolisierung (siehe 1.3 und 2.2.7.1), die hauptsächlich zu einfachen Glucuroniden (sulfatierte, methylierte, mehrfach glucuronidierte und gemischte Metabolite nicht nachweisbar) führt. Diese sogenannte First-Pass-Glucuronidierung findet vielfach in der Literatur Erwähnung. So wurde beobachtet, dass trotz der angenommenen raschen Resorption oral verabreichter Flavonoidaglyka ihre Plasmakonzentration im Vergleich zu der der entsprechenden Phase-II-Metabolite sehr gering ist. Die durch verschiedene UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs) vermittelte Glucuronidierung wurde hierbei als wichtigster Stoffwechselweg vorgeschlagen (ZHANG et al., 2007c – siehe 1.3.1.1). Bei einer Humanstudie wurde beispielsweise nach Gabe von Kämpferol die 3-O-glucuronidierte Form dieses Flavonols als dominierender Metabolit im Plasma identifiziert (CHEN et al., 2005). Bei einer weiteren Humanstudie war Epicatechin-O-glucuronid Hauptmetabolit nach Gabe eines mit Procyanidinen und Flavon-3-olen angereicherten Kakaos (NATSUME et al., 2003). Auch die im Rooibos freigesetzten Aglyka scheinen der First-Pass-Glucuronidierung zu unterliegen. Die Glucuronid-Konjugation läuft unspezifisch ab - allein für Eriodictyol-O-glucuronid wurden drei Konstitutionsisomere (z.B. **100**) identifiziert.

Tabelle 2.27 gibt abschließend eine Übersicht über das Vorkommen einiger intakter Flavonoide nach Gabe der Rooibosformulierungen unabhängig vom Messzeitpunkt. Aufgrund interindividueller Stoffwechselunterschiede war eine Detektion aller Verbindungen nicht bei sämtlichen Probanden möglich. So konnten nach Gabe von aktiver Fraktion beim Probanden

„5“ insgesamt acht der neun Flavonoide nachgewiesen werden, während dieses beim Probanden „8“ bei keinem einzigen Flavonoid gelang. Mögliche Ursachen für diese abweichenden Stoffwechselantworten auf die diätetische Intervention sind Unterschiede im Genotyp, in den Lebensgewohnheiten sowie in der Darmflora (siehe 1.3).

Die Gegenüberstellung beider Prüfprodukte zeigt aufgrund des vergleichbaren Flavonoidprofils (siehe 2.2.4.2) keine signifikanten Diskrepanzen. Unterschiede in den Detektionsraten ergeben sich lediglich für die Quercetin-3-O-glykoside Hyperosid (**22**) und Isoquercitrin (**23**).

Tabelle 2.27: Übersicht über das Vorkommen intakter Flavonoide in den Plasmaproben der Probanden 1-9 nach Gabe von je 500 mL Rooibostee bzw. aktiver Fraktion

Rooibostee	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Σ
Isoorientin (11)	X	X	X	X	X	X			X	7
Orientin (14)	X	X	X	X	X	X		X	X	8
Aspalathin (16)	X	X		X	X	X			X	6
Rutin (18)	X		X	X		X	X		X	6
Isovitexin (20)	X	X		X	X	X				5
Vitexin (21)	X				X	X				3
Hyperosid (22)	X	X	X	X	X		X			6
Isoquercitrin (23)		X	X				X			3
Nothofagin (25)						X				1
Σ	7	6	5	6	6	7	3	1	4	
aktive Fraktion										
Isoorientin (11)	X			X	X	X			X	5
Orientin (14)	X	X	X	X	X	X	X		X	8
Aspalathin (16)	X	X			X	X	X			5
Rutin (18)	X		X	X	X	X	X			6
Isovitexin (20)	X		X	X	X	X				5
Vitexin (21)	X				X	X				3
Hyperosid (22)			X		X		X			3
Isoquercitrin (23)		X	X		X	X	X		X	6
Nothofagin (25)						X			X	2
Σ	6	3	5	4	8	8	5	0	4	

2.2.8 Quantitative Analyse der Urin- und Plasmaproben

Die Quantifizierung der bei beiden Humanstudien identifizierten Flavonoide und Metabolite wurde mittels HPLC-ESI-MS/MS durch externe, lineare Kalibrierung mit den jeweiligen Referenzsubstanzen (gelöst in DMF) vorgenommen (siehe 4.5.12). Da Standards der Metaboliten kommerziell nicht verfügbar waren und zum Teil ihre Synthese scheiterte (siehe 2.2.6), erfolgte deren Quantifizierung über die korrespondierenden Flavonoide (siehe 2.2.8.1 und 2.3.3.1). Im Rahmen der Methodenentwicklung konnte durch Dotierung von Leerplasma und -urin mit dem in Tabelle 4.10 aufgeführten Mischstandard 2 gezeigt werden, dass beide Matrices keinen Einfluss auf die Ionisierung seiner Bestandteile haben. Die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) der einzelnen Referenzsubstanzen sind in Abschnitt 4.5.12 angegeben. Details zu den MS-Parametern finden sich in Abschnitt 4.3.2.

Angesichts des begrenzten Probenmaterials pro Messzeitpunkt und Proband (\rightarrow Plasma: < 2 mL), der hohen Probengesamtzahl und der zur Verfügung stehenden Messzeit wurden bei der 1. Humanstudie drei Plasma- (0, 1,5 und 3 h) und fünf Urinproben je Prüfprodukt und Proband (0, 0-2, 2-4, 4-6 und 8-24 h) untersucht. Die Messungen erfolgten unter regelmäßiger Zugabe eines Kontrollstandards (Eriodictyol-7-O-glucosid (**83**)) als Einfachbestimmung, so dass keine Schwankungsbreiten für die Gehalte der Zielverbindungen angegeben werden konnten. Zur Erfassung von Analytverschleppungen wurden bei jeder Sequenz ein Reagenzienleerwert (Substitution von Plasma/Urin durch Wasser und Aufarbeitung nach Vorschrift) mitgeführt und Blankmessungen vorgenommen.

Zur Auswertung der Messungen wurden die Bioverfügbarkeitsparameter t_{\max} (Zeitpunkt bzw. -intervall der gemessenen Höchstkonzentration c_{\max}), c_{\max} (quantifizierte Höchstmenge), AUC (Fläche unterhalb der Konzentrations-Zeit-Kurve), $c_{IV\min}$ und $c_{IV\max}$ (Minimal- bzw. Maximalkonzentration am betrachteten Zeitpunkt bzw. -intervall) sowie $\sum c_{IV}$ (Summe der an den untersuchten Zeitpunkten bzw. -intervallen quantifizierte Metabolitgehalte) herangezogen.

2.2.8.1 Urin

Metabolite von Aspalathin und Nothofagin

In Tabelle 2.28 sind unabhängig vom Messintervall die Höchstmengen c_{\max} von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) sowie ihrer Metabolite im 0-24 h-Urin nach Verabreichung von aktiver Fraktion und Rooibostee aufgeführt. Da mit Ausnahme des sulfatierten Aspalathins (**86**) die übrigen Metabolite als Referenzen nicht zur Verfügung standen, wurden die Gehalte als Aspalathin-Äquivalente quantifiziert und diese über das Verhältnis der molaren Massen auf die jeweiligen Metabolite umgerechnet. Das glucuronidierte Aglykon von Nothofagin (**96**) wurde als Phloretin bestimmt (siehe 4.5.12.2). Über die protokollierten Urinmengen konnten für sämtliche Probanden die Absolutmengen der Zielverbindungen je Messintervall berechnet werden.

Tabelle 2.28: Übersicht über die nach Verabreichung von je 500 mL Rooibostee bzw. aktiver Fraktion in den Urinproben der Probanden 1-9 ermittelten Höchstmengen c_{\max} (in μmol) von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) sowie ihrer Metabolite (Maximalgehalte unterstrichen)^a

Rooibostee	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aspalathin (16)	ND	1,2	ND	ND	ND	1,5	ND	0,6	<u>73,4</u>
3-O-Me-aspalathin (84)	5,5	<u>31,6</u>	18,6	6,7	18,1	14,4	5,0	13,6	10,4
Aspalathin-O-glcS (90)	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Me-O-aspalathin-O-glcS (91)	0,4	5,1	1,9	0,2	ND	ND	0,1	<u>6,9</u>	3,5
Me-O-aspalathin-O-glcS (95)	0,4	1,8	<u>13,5</u>	0,4	ND	ND	0,2	1,1	0,9
Aspalathin-4-O-sulfat (86)	0,1	ND	ND	ND	ND	ND	<u>5,7</u>	ND	1,7
Nothofagin (25)	0,9	<u>4,1</u>	3,0	ND	2,1	1,7	0,8	2,0	2,0
Nothofagin-O-glcS (94)	ND	<u>1,1</u>	0,8	ND	ND	ND	0,2	ND	1,0
Phloretin-O-glcS (97)	ND	2,7	ND	3,6	<u>46,1</u>	ND	31,8	42,4	3,3
aktive Fraktion									
Aspalathin (16)	ND	1,0	1,8	ND	<u>4,5</u>	2,0	ND	0,2	1,7
3-O-Me-aspalathin (84)	13,1	29,4	55,6	13,4	<u>74,9</u>	38,6	2,5	12,7	20,9
Aspalathin-O-glcS (90)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<u>0,2</u>	ND
Me-O-aspalathin-O-glcS (91)	2,1	<u>5,8</u>	0,7	5,1	0,2	3,4	ND	1,7	4,7
Me-O-aspalathin-O-glcS (95)	1,1	2,2	1,3	1,1	ND	4,3	1,0	0,9	<u>3,1</u>
Aspalathin-4-O-sulfat (86)	0,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<u>3,3</u>
Nothofagin (25)	ND	ND	ND	ND	<u>1,4</u>	ND	ND	ND	ND
Nothofagin-O-glcS (94)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Phloretin-O-glcS (97)	ND	ND	ND	<u>11,1</u>	ND	ND	7,0	ND	ND

^aND, nicht detektiert; glcS, glucuronid; Me, Methyl; LOQ, Bestimmungsgrenze

Trotz hoher interindividueller Schwankungen ist 3-O-MA (**84**) mit Maximalgehalten c_{\max} von 5,0-31,6 (Rooibostee) bzw. 2,5-74,9 μmol (aktive Fraktion) zum Zeitpunkt t_{\max} unabhängig vom Prüfprodukt das Hauptausscheidungsprodukt und wurde bei jedem der neun Probanden nachgewiesen. Die methylierten und glucuronidierten Metabolite von Aspalathin (**91**, **95**) konnten ebenfalls bei nahezu allen Studienteilnehmern mit Gehalten zwischen 0,1-13,5 (Rooibostee) bzw. 0,2-5,8 μmol (aktive Fraktion) quantifiziert werden. Die einfache Sulfatierung stellt wie die Glucuronidierung keinen relevanten Stoffwechselweg dar. Ein Vergleich beider Prüfprodukte zeigt, dass trotz standardisierter Aufnahmemengen die Maximalgehalte (z.B. für 3-O-MA) nach Gabe der aktiven Fraktion teils deutlich größer als beim Teeaufguss sind.

Beim Nothofagin (**25**) scheint im Gegensatz zum Aspalathin (**16**) die Deglykosylierung zum korrespondierenden Aglykon Phloretin ($\equiv 2',4,4',6'$ -Tetrahydroxy-dihydrochalkon (**99**)) und dessen nachfolgende Metabolisierung zum Phloretin-O-glcS (**97**) (c_{\max} : 2,7-46,1 μmol) insbesondere nach Gabe des Rooibostees ein wesentlicher Eliminierungsprozess zu sein. Auch die Exkretion in unveränderter Form (Rooibostee: 0,9-4,1 μmol) hat eine große Relevanz. Die nach Gabe der aktiven Fraktion niedrigen Detektionsraten des intakten Nothofagins (**25**) und dessen Metabolite **94** und **97** sind auf die deutlich geringeren Gehalte des Dihydrochalkons in diesem Prüfprodukt zurückzuführen (siehe 6.4).

Zur Erhöhung der Aussagekraft wurde der Median der pro Messintervall detektierten Metabolitkonzentrationen (c_{med}) berechnet (Tabelle 2.29). Dieser ist definiert als der Wert, der

eine Verteilung in zwei gleich große Hälften unterteilt. Demnach ist $c_{\text{med}} > 0$, wenn die jeweilige Zielverbindung bei wenigstens fünf der neun untersuchten Probanden detektiert wurde. Als zusätzliche Parameter sind die je Messintervall ermittelte Gesamtmetabolitkonzentration ($\sum c_{\text{IV}}$) sowie die Maximal- und Minimalgehalte der Metaboliten ($c_{\text{IVmax}}/c_{\text{IVmin}}$) aufgeführt.

Tabelle 2.29: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der renalen Exkretion von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) sowie ihrer Metabolite nach Gabe von je 500 mL Rooibostee bzw. aktiver Fraktion (keine Detektion der Zielverbindungen vor Prüfproduktgabe). Die applizierte Flavoniddosis betrug ca. 893 bzw. 713 μmol .^a

Zeitintervall [h]	Rooibostee (n = 9)					aktive Fraktion (n = 9)					
	0-2	2-4	4-6	8-24	0-24	0-2	2-4	4-6	8-24	0-24	
Aspalathin (16)	c_{med}	0	0	0	0	0	0,04	<u>0,2</u>	0	0	0,2
	c_{IVmin}	0,6	0,2	0	0	0,8	0,04	0,2	0,3	0	0,5
	c_{IVmax}	1,6	1,3	2,2	73,4	78,5	2,0	1,8	0,6	4,5	8,9
3-O-Me-aspalathin (84)		6,4	<u>6,7</u>	2,2	0	15,3	<u>16,2</u>	14,9	5,7	2,5	39,3
		3,0	4,7	2,0	0,5	10,2	3,0	0,3	0,6	1,5	5,4
		31,6	18,1	9,2	3,3	62,2	74,9	60,8	37,5	33,9	207,1
Aspalathin-O-glcS (90)		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	0,2	0	0	0,2
Me-O-aspalathin-O-glcS (91)		0,1	<u>0,2</u>	0	0	0,3	<u>0,7</u>	0,2	0	0	0,9
		0,1	0,1	0,1	0	0,3	0,7	0,06	0,1	0	0,8
		6,9	1,8	0,3	0	9,0	5,1	5,8	2,5	0	13,4
Me-O-aspalathin-O-glcS (95)		0	<u>0,4</u>	0,2	0	0,6	<u>0,6</u>	0,5	0,5	0	1,6
		0,1	0,1	0,2	0	0,4	0,3	0,3	0,1	1,0	1,7
		1,8	0,7	13,5	0,5	16,5	2,0	3,1	2,4	4,3	11,8
Aspalathin-4-O-sulfat (86)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0,1	0,2	0	0	0,3	0,9	0,3	0,1	0	1,3
		1,7	0,3	0	5,7	7,7	1,2	3,3	1,3	0	5,8
Gesamt ($\sum c_{\text{IV}}$)	6,5	7,3	2,4	0	<u>16,2</u> 1,8 %	17,5	15,8	6,2	2,5	<u>42,0</u> 5,9 %	
Nothofagin (25)		0,8	<u>0,9</u>	0,3	0	2,0	0	0	0	0	0
		0,5	0,7	0,3	0	1,5	0	0	0	0	0
		4,1	2,1	1,1	0	7,3	0	1,4	0,7	0	2,1
Nothofagin-O-glcS (94)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0,8	0,1	0,2	0	1,1	0	0	0	0	0
		1,0	0,7	0,7	1,1	3,5	0	0	0	0	0
Phloretin-O-glcS (97)		0	<u>0,7</u>	0	0	0,7	0	0	0	0	0
		1,9	0,7	3,3	0	5,9	0	0	0	0	0
		7,0	3,6	46,1	31,8	88,5	0	3,5	11,1	7,0	21,6
Gesamt ($\sum c_{\text{IV}}$)	0,8	1,6	0,3	0	<u>2,7</u> 0,3 %	0	0	0	0	<u>0</u> -	

^a c_{med} , Median der Metabolitkonzentrationen am jeweiligen Messintervall; $c_{\text{IVmin}}/c_{\text{IVmax}}$, Minimal- und Maximalkonzentration am Messintervall – c_{med} , $\sum c_{\text{IV}}$ und $c_{\text{IVmin}}/c_{\text{IVmax}}$ in μmol . c_{IVmin} gibt den kleinsten gemessenen Wert an und lässt Probanden, bei denen die Metabolite nicht nachgewiesen wurden, unberücksichtigt. Die kursiv geschriebenen Daten geben die 0-24 h-Ausscheidung als prozentualen Anteil von der applizierten Flavoniddosis an. glcS, glucuronid; Me, Methyl; LOQ, Bestimmungsgrenze

Anhand der Daten ist zu erkennen, dass die Zufuhr der definiert zusammengesetzten aktiven Fraktion eine deutlich stärkere renale Exkretion der Aspalathinmetabolite auslöst als dieses

für den Rooibostee der Fall ist. Ferner lässt die Betrachtung des zeitlichen Verlaufs eine länger andauernde Eliminierung für die aktive Fraktion erkennen. So wird das 3-O-methylierte Aspalathin (**84**) auch 8-24 h nach Prüfproduktgabe bei mehr als der Hälfte der Probanden ausgeschieden. Zudem werden die Höchstmengen c_{\max} früher als beim Teeaufguss erreicht. Während beispielsweise die Maxima für 3-O-MA (**84**) ($16,2 \mu\text{mol}$) und Methyl-O-aspalathin-O-glucuronid (**91**) ($0,7 \mu\text{mol}$) bei der aktiven Fraktion nach 0-2 h durchlaufen werden, werden diese beim Rooibostee mit Konzentrationen von $6,7$ bzw. $0,2 \mu\text{mol}$ erst nach 2-4 h erreicht. Ähnliches gilt für das Stellungsisomer **95**. Intaktes Aspalathin (**16**) lässt sich mit einem Gesamtgehalt von ca. $0,2 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$ lediglich nach Gabe der aktiven Fraktion bei einer signifikanten Probandenzahl nachweisen.

Aufgrund unterschiedlicher Nothofagingehalte in den Rooibosformulierungen (siehe 6.4) liegen für dieses Dihydrochalkon und dessen Metabolite **94** und **97** die umgekehrten Verhältnisse vor. Infolgedessen treten nennenswerte Gehalte lediglich nach Gabe des Rooibostees auf. Auffällig ist die relativ hohe eliminierte Gesamtmenge von unverändertem Nothofagin (**25**) ($2,0 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass im Gegensatz zu Nothofagin (**25**) der Großteil der zugeführten Aspalathinmenge unabhängig vom Prüfprodukt in metabolisierter Form als 3-O-MA (**84**) ausgeschieden wird. Die Verabreichung von aktiver Fraktion führt zu einer ausgeprägteren und länger andauernden Exkretion von Aspalathinmetaboliten. Ferner wird das Ausscheidungsmaximum früher erreicht (Abbildung 2.41).

Mit dem 0-24 h-Urin wurden insgesamt $16,2 \mu\text{mol}$ der über den Rooibostee (ca. $893 \mu\text{mol}$) und $42,0 \mu\text{mol}$ der über die aktive Fraktion (ca. $717 \mu\text{mol}$) aufgenommenen Flavonoiddosis als Metabolite des Aspalathins (**16**) ausgeschieden. Das entspricht einem prozentualen Anteil von $1,8$ (Rooibostee) bzw. $5,9 \%$ (aktive Fraktion) (Tabelle 2.29). Bezogen auf die applizierten Aspalathinmengen ergeben sich $2,4 \%$ für den Rooibostee bzw. $6,7 \%$ für die aktive Fraktion. STALMACH et al. (2009) bestimmten im 0-24 h-Urin der zehn Studienteilnehmer für die identifizierten Metabolite des Dihydrochalkons (Aspalathin-O-glucuronid, Aspalathin-O-sulfat sowie Methylaspalathin-O-glucuronid und Methylaspalathin-O-sulfat) eine Gesamtkonzentration von ca. $316 \pm 30 \text{ nmol}$ nach Gabe von Ready-to-Drink Rooibostees aus dem unfermentierten Pflanzenmaterial, was $0,2 \%$ der Flavonoid- ($159 \mu\text{mol}$) und $0,4 \%$ der Aspalathindosis ($90 \mu\text{mol}$) entsprach. Unter Berücksichtigung der geringeren Aspalathin- (Faktor 7) und Flavonoidaufnahmemengen (Faktor 6) liegt somit eine gute Übereinstimmung mit den Werten für den Rooibostee vor.

KREUZ et al. (2008) verabreichten bei einem Tierversuch drei Schweinen über einen Zeitraum von 11 Tagen täglich 96 g eines Rooibosextrakts (Aspalathinanteil: $16,3 \%$ \equiv $15,6 \text{ g}$). Damit entsprach die Aspalathindosis etwa der 50-fachen Menge, die bei dieser Humanstudie verabreicht wurde. Zwischen $0,1$ und $0,9 \%$ der applizierten Dosis wurden im Urin der Versuchstiere in metabolisierter und intakter Form wiedergefunden.

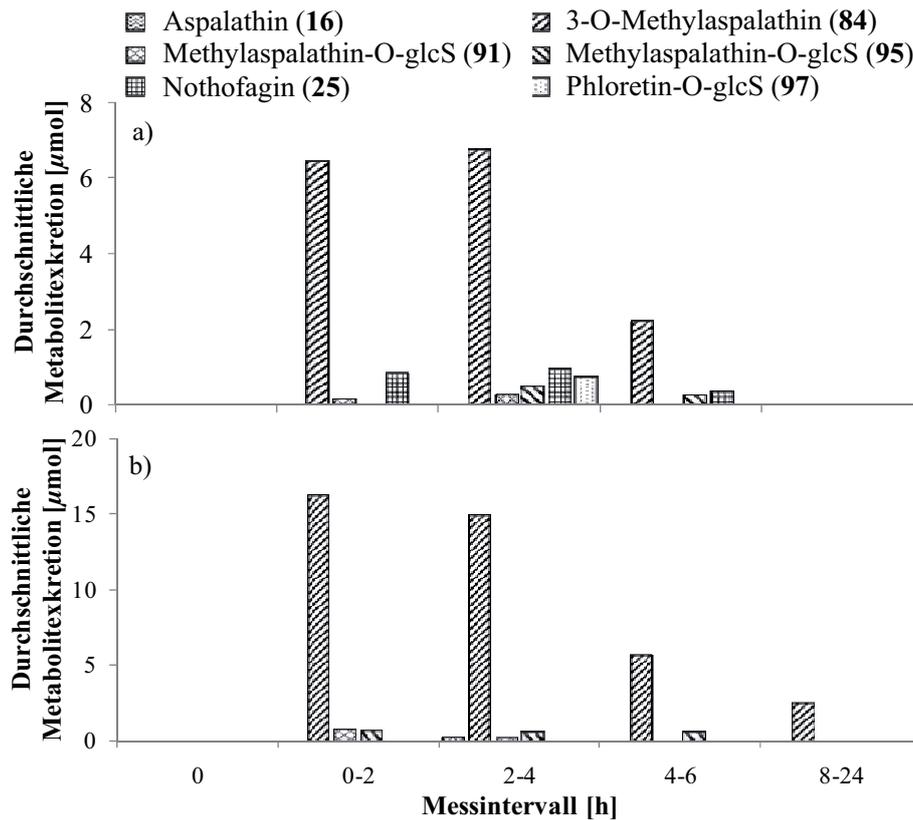


Abbildung 2.41: Zeitverlauf der renalen Ausscheidung von Aspalathin (16) und Nothofagin (25) sowie ihrer relevanten Metabolite ($\sum c_{\text{med}} > 0$) nach Gabe von Rooibostee (a) bzw. aktiver Fraktion (b)

Zur Beschreibung der zeitlichen Eliminierung der relevanten Metabolite und intakten Dihydrochalkone (d.h. $\sum c_{\text{med}} > 0$) wurde die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (Area under the Curve, AUC) ermittelt (Tabelle 2.30 – siehe 4.5.12.3). Darüber hinaus ist der Zeitpunkt $t_{50\%}$, an dem mehr als die Hälfte des jeweiligen Metaboliten ($c_{50\%}$) ausgeschieden wurde, angegeben.

Tabelle 2.30: Daten zur renalen Ausscheidung von Aspalathin (16) und Nothofagin (25) sowie ihrer relevanten Metabolite^a

	Rooibostee			aktive Fraktion		
	AUC _{0-24h}	c _{50%}	t _{50%}	AUC _{0-24h}	c _{50%}	t _{50%}
Aspalathin (16)	0	0	–	0,5	0,1	2-4
3-O-Me-aspalathin (84)	48,3	7,7	2-4	144,2	19,7	2-4
Me-O-aspalathin-O-glcS (91)	0,6	0,2	2-4	1,7	0,5	0-2
Me-O-aspalathin-O-glcS (95)	2,4	0,3	2-4	7,6	0,8	2-4
Nothofagin (25)	6,7	1,0	2-4	0	0	–
Phloretin-O-glcS (97)	1,3	0,4	2-4	0	0	–

^aAUC, Fläche unterhalb der Konzentrations-Zeit-Kurve; c_{50%}, Ausscheidungshalbwertskonzentration; t_{50%}, Ausscheidungshalbwertszeit – AUC_{0-24h} in µmol*h, c_{50%} in µmol, t_{50%} in h. glcS, glucuronid; Me, Methyl

Die Ausscheidungshalbwertszeit $t_{50\%}$ wird nach Gabe der aktiven Fraktion ebenso wie beim Rooibostee zumeist nach 2-4 h erreicht. 94,4 % der eliminierten Gesamtmetabolitmenge

entfallen beim zuletzt genannten Prüfprodukt auf 3-O-MA (**84**) und 5,6 % auf die beiden Methylaspalathin-O-glucuronide **91** und **95**. Für die aktive Fraktion resultieren 93,6 % für das methylierte Aspalathin (**84**) und 6,0 % für die gemischt konjugierten Metabolite **91** und **95**; 0,4 % entfallen auf das intakte Dihydrochalkon (**16**). Entsprechend zeigt die AUC_{0-24h} für 3-O-MA (**84**) mit ca. 48 (Rooibostee) bzw. 144 $\mu\text{mol}\cdot\text{h}$ (aktive Fraktion) die höchsten Werte, gefolgt von den methylierten und glucuronidierten Metaboliten **91** und **95**.

Metabolite der Flavon-C/O-, Flavanon-C- und Flavonol-O-glykoside

Tabelle 2.31 gibt einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der renalen Ausscheidung der in den Urinproben der neun untersuchten Probanden identifizierten Flavone, Flavanone und Flavonole sowie ihrer Metabolite nach Gabe von je 500 mL Rooibostee bzw. aktiver Fraktion (siehe 2.3.2.1). Zur Beurteilung der Daten wurden die Parameter c_{med} , c_{IVmin} , c_{IVmax} , AUC sowie $t_{50\%}$ herangezogen. Für den Fall $\sum c_{\text{med}} = 0$ (für beide Prüfprodukte) wurde auf die Angabe von c_{med} , AUC sowie $t_{50\%}$ verzichtet und neben c_{IVmin} und c_{IVmax} lediglich die Detektionsraten aufgeführt. Die für die Glucuronide **81**, **82**, **100**, **101**, **102** und **104** sowie die beiden methylierten Derivate des (*R/S*)-Eriodictyol-6/8-C-glucosids (z.B. **113**) angegebenen Werte stellen jeweils die Summe aller pro Zeitintervall erfassten Stellungsisomere dar (siehe 2.2.7.1). Weitere Details zur Auswertung sind in Abschnitt 4.5.12.2 aufgeführt.

Aufgrund der im Vergleich zu den Dihydrochalkonen deutlich geringeren Gehalte der Flavone, Flavanone und Flavonole im Rooibostee und der aktiven Fraktion (siehe 6.4) ist das Ausmaß der Verstoffwechslung dieser Verbindungen unabhängig vom Prüfprodukt wesentlich geringer (d.h. $\sum c_{\text{med}}$ zumeist null). Anhand der Detektionsraten, der Minimal- und Maximalkonzentrationen ($c_{\text{IVmin}}/c_{\text{IVmax}}$) sowie des zeitlichen Verlaufs der Eliminierung lässt sich jedoch ablesen, dass die orale Applikation des Teeaufgusses insgesamt zu einer stärkeren Metabolisierung führt. Dieses hat seine Ursache in der unterschiedlichen stofflichen Beschaffenheit der Prüfprodukte (siehe 6.4). Bei der definiert zusammengesetzten aktiven Fraktion kommen beispielsweise als Luteolinquellen lediglich die Flavon-C-glucoside Isoorientin (**11**) und Orientin (**14**) in Frage. Dagegen enthält der komplexere Teeaufguss weitere Luteolinderivate (siehe 2.1.1). Ähnliches gilt für Quercetin (**29**) und Apigenin (**31**). Im Vordergrund steht für die drei genannten Aglyka die Ausscheidung in einfach glucuronidierter Form (z.B. als Luteolin- (**82**) und Apigenin-O-glucuronid (**102**)). Für Luteolin ist daneben die Exkretion als methyliertes und glucuronidiertes Konjugat (z.B. **104**) (0,2 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$) ein wichtiger Stoffwechselweg.

Für die Metabolite des intakten Isoorientins (**11**) bzw. Orientins (**14**) ist anhand der Detektionsraten ebenso wie beim Aspalathin (**16**) eine vorrangige Exkretion in methylierter Form (\rightarrow z.B. als Methylisoorientin (**107**)), daneben auch in unveränderter Form festzustellen. Quantitativ spielt die Verstoffwechslung über die intakten Flavone und Flavonole gegenüber der als Metabolite der korrespondierenden Aglyka eine untergeordnete Rolle.

Tabelle 2.31: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der renalen Exkretion identifizierter Flavone, Flavanone und Flavonole sowie deren Metaboliten nach oraler Applikation von je 500 mL Rooibostee bzw. aktiver Fraktion (keine Detektion der Zielverbindungen vor Prüfproduktgabe)^a

Zeitintervall [h]	Rooibostee (n = 9)				aktive Fraktion (n = 9)				
	0-2	2-4	4-6	8-24	0-2	2-4	4-6	8-24	
Quercetin-O-glcS (z.B. 81)	c_{IVmin}	0,3	0,04	0,1	0,5	0,03	0	0	0
	c_{IVmax}	1,3	0,8	0,8	1,5	0,1	0,03	0	0
	Detektionsrate	2	4	4	3	2	1	–	–
Quercetin-O-sulfat (105)		0	0	0	0	0	0	0	0
		1,6	0	0	0	1,8	0,5	0,4	0
		1	–	–	–	1	1	1	–
Me-O-quercetin-O-glcS (z.B. 101)		0	0	0	0	0,2	0,4	0	0
		0,1	0,1	0,02	0	0,9	1,0	0,2	0
		1	1	1	–	2	2	1	–
Apigenin-O-glcS (z.B. 102)		0,8	0,7	2,1	0	0	0	0	0
		24,2	2,1	3,7	4,5	0	0	0	0
		3	4	2	1	–	–	–	–
Luteolin-O-glcS (z.B. 82)		0	0,1	0,1	0	0	0	0	0
		0,4	1,4	0,4	3,5	0	1,7	2,6	0
		1	3	3	1	–	1	1	–
Luteolin-di-O-glcS (106)		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0,5	0
		–	–	–	–	–	–	1	–
Me-O-luteolin-O-glcS (z.B. 104)	c_{med}	0,2	0	0	0	0	0	0	0
	c_{IVmin}	0,2	0,3	0	0	0	0	0	0
	c_{IVmax}	1,1	1,1	0,3	0,3	0,5	0	0	0
	AUC_{0-24h}	0,3	$t_{50\%}$	0-2	AUC_{0-24h}	0	$t_{50\%}$	–	–
Eriodictyol-O-glcS (z.B. 100)		0	0,6	0,1	0	0	0	0,4	0
		0,4	3,2	4,2	0	0	1,7	2,9	1,7
		1	2	2	–	–	1	2	1
Isoorientin (11)		0	0,01	0,04	0	0	0	0	0
		0,1	0,4	0,2	6,7	0	0	0	0
		1	2	2	1	–	–	–	–
Orientin (14)		0	0,1	0,1	0	0,2	0,1	0	0
		0,2	0,1	0,2	3,1	0,3	0,4	0	0
		1	2	2	1	2	3	–	–
Me-O-isoorientin (107)		0,2	0,1	0,1	0	0	0	0	0
		0,3	0,1	0,2	0	0,1	0,03	0	0
		2	2	2	–	1	1	–	–
Isoorientin-O-glcS (108)		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0,1	0	0
		–	–	–	–	–	1	–	–
Me-O-isoorientin-O-glcS (109)		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0,2	0	0
		–	–	–	–	–	1	–	–
Me-O-orientin-O-glcS (110)		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0,1	0	0
		–	–	–	–	–	1	–	–
Isoorientin-O-sulfat (111)		0	0	0	0	0	0	0	0
		0,2	0	0	0	0,1	0,1	0	0
		1	–	–	–	1	1	–	–
Rutin (18)		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0,01	0,03	1,1	0	0	0	0
		–	1	1	1	–	–	–	–
Isovitexin (20)		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0,1	0	0	0	0,04	0	0
		–	1	–	–	–	1	–	–
Vitexin (21)		0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0,03	0	0	0	0	0	0

Zeitintervall [h]	Rooibostee (n = 9)				aktive Fraktion (n = 9)			
	0-2	2-4	4-6	8-24	0-2	2-4	4-6	8-24
Hyperosid/Isoquercitrin (22/23)	–	1	–	–	–	–	–	–
	0	0	0,4	0,9	0	0	0	0
	0,3	0,4	0,7	25,1	0	0	0,02	0
	1	1	2	2	–	–	1	–
Luteolin-O-hexosid (24)	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0,1	3,9	0	0	0	0
	–	–	1	1	–	–	–	–
Luteolin-O-hexosid-O- glcS (112)	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0,04	0
	–	–	–	–	–	–	1	–
Eriodictyol (30)	0	0	0	0	0	0	0,3	0
	0,4	0,2	0	0	2,3	1,6	0,3	4,5
	2,4	3,0	0	23,9	5,0	4,6	2,7	15,0
	AUC _{0-24h}	0	t _{50%}	–	AUC _{0-24h}	3,4	t _{50%}	4-6
(R/S)-Me-O-eriodictyol- 6/8-C-glu (z.B. 113)	0	0	0	0	0	0,1	0	0
	0	0,1	0	0	0,3	0,1	0,1	0
	0	0,1	0,1	0	0,3	0,7	0,4	0
	AUC _{0-24h}	0	t _{50%}	–	AUC _{0-24h}	0,3	t _{50%}	2-4

^ac_{med}, Median der Metabolitkonzentrationen am jeweiligen Messintervall; c_{IVmin}/c_{IVmax}, Minimal- und Maximalkonzentration am Messintervall; AUC, Fläche unterhalb der Konzentrations-Zeit-Kurve; t_{50%}, Ausscheidungshalbwertszeit – c_{med} und c_{IVmin}/c_{IVmax} in μmol , AUC_{0-24h} in $\mu\text{mol}\cdot\text{h}$, t_{50%} in h. c_{IVmin} gibt den kleinsten gemessenen Wert an und lässt Probanden, bei denen die Metabolite nicht nachgewiesen wurden, unberücksichtigt. glcS, glucuronid; Me, Methyl; glu, glucosid

Eriodictyol (**30**) (0,3 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$), die Eriodictyol-O-glucuronide (z.B. **100**) sowie die (R/S)-Methyl-O-eriodictyol-6/8-C-glucoside (z.B. **113**) (0,1 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$) treten verstärkt nach Gabe der aktiven Fraktion im Urin der Studienteilnehmer auf. Die Bildung dieser Verbindungen *in vivo* ist eine Folge der oxidativen Cyclisierung von Aspalathin (**16**) (siehe 2.3.2.1). Allerdings stellt die auf diesem Weg ablaufende Exkretion im Vergleich zu der als Metabolite der unveränderten Ausgangsverbindung einen Sekundärprozess dar. Der prozentuale Anteil der 0-24 h-Ausscheidung der Metabolite **30** und **113** an der applizierten Flavonoiddosis liegt entsprechend nur bei ca. 0,06 %. Trotz normierter Aspalathingehalte ist offenbar die Biotransformation zu den Umsetzungsprodukten **30**, **100** und **113** nach Applikation der aktiven Fraktion begünstigt.

Abschließend bleibt im Vergleich zur Verstoffwechslung von Aspalathin (**16**) festzuhalten, dass in Korrelation zu den Gehalten der Flavon-C/O-, Flavanon-C- und Flavonol-O-glykoside in den Rooibosformulierungen die Metabolisierung dieser Verbindungen sowohl hinsichtlich des Metabolitprofils als auch der Metabolitgehalte weit weniger ausgeprägt ist. Dominierend sind anders als beim Aspalathin (**16**) die Deglykosylierung der intakten Flavonoide zu den korrespondierenden Flavonoidaglyka auf enzymatischem Weg im Dünndarm und während des transzellulären Transports (O-glykoside) bzw. durch die Mikroflora des Dickdarms (C-glykoside), die partielle Resorption der freigesetzten Aglyka sowie deren Exkretion in überwiegend glucuronidierter Form.

Phenolische Abbauprodukte

Abbildung 2.42 zeigt den zeitlichen Verlauf der renalen Ausscheidung der wichtigsten phenolischen Abbauprodukte Hippursäure (**127**) sowie 3/4-Hydroxyhippursäure (**128**, **129**) nach oraler Applikation von jeweils 500 mL des Rooibostees und der aktiven Fraktion. Aufgetragen wurden für jedes Zeitintervall die Mediane aus den Metabolitgehalten (c_{med}).

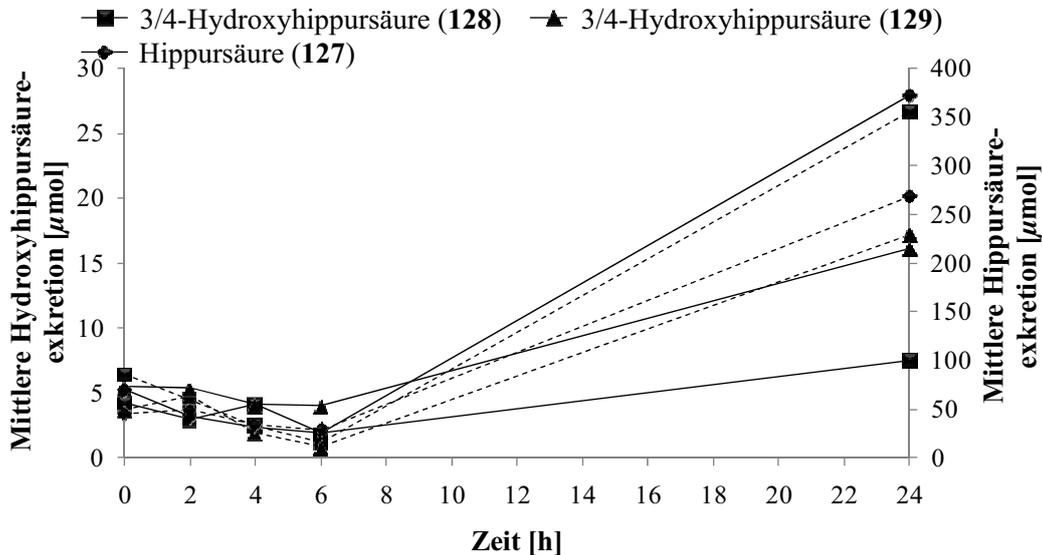


Abbildung 2.42: Zeitprofile der renalen Ausscheidung (in μmol , $n = 9$) von Hippursäure (**127**) sowie der beiden Hydroxyhippursäuren **128** und **129** nach oraler Gabe von je 500 mL Rooibostee (durchgezogene Linien) bzw. aktiver Fraktion (gestrichelte Linien – Hippursäuregehalte auf Sekundärachse aufgetragen)

Deutlich zu erkennen ist, dass die orale Applikation beider Prüfprodukte nach einem Abfall der Metabolitgehalte im 0-6 h-Intervall einen drastischen Anstieg der Exkretion insbesondere von Hippursäure (**127**) im 8-24 h-Intervall auslöst. Das Ausmaß der Eliminierung ist für diesen Metaboliten in Korrelation mit der verabreichten Flavonoiddosis nach Gabe des komplex zusammengesetzten Rooibostees höher. Die Höchstmenge liegt für den Rooibostee bei $372 \mu\text{mol}$ und für die aktive Fraktion bei $269 \mu\text{mol}$, was in Relation zur Ausgangskonzentration am Zeitpunkt t_0 einem Anstieg von ca. $302 \mu\text{mol}$ (Rooibostee) bzw. $224 \mu\text{mol}$ (aktive Fraktion) entspricht. Für die Hydroxyhippursäuren **128** und **129** ergeben sich stärkere Zuwächse nach Gabe der aktiven Fraktion (20 bzw. $13 \mu\text{mol}$ im Vergleich zu 3 bzw. $11 \mu\text{mol}$). Die Verabreichung des Placebos führt in Bezug auf die Metabolite **127-129** zu einem vergleichbaren Kurvenverlauf. Allerdings fallen die relativen Konzentrationsanstiege im 8-24 h-Urin insbesondere für Hippursäure (**127**) ($\rightarrow 171 \mu\text{mol}$) weitaus geringer aus. Daher ist zu vermuten, dass die resultierende Differenz von $131 \mu\text{mol}$ (Rooibostee) bzw. $53 \mu\text{mol}$ (aktive Fraktion) eine unmittelbare Folge des mikrobiellen Dickdarmabbaus der über die Rooibosformulierungen zugeführten Polyphenole zum Stoffwechselendprodukt Hippursäure (**127**) ist.

Die Unterschiede zwischen beiden Rooibosformulierungen sind möglicherweise eine Folge der komplexeren Zusammensetzung des Rooibostees. Denkbar ist, dass einige Inhaltsstoffe den Natrium/Glucose-Cotransporter 1 (SGLT1) hemmen oder eine Konkurrenzsituation um die Bindungskapazitäten dieses Transporters eintritt. Dagegen besteht die aktive Fraktion größtenteils aus Aspalathin (**16**) (siehe 2.2.3), wodurch vermutlich eine gesteigerte Resorption im Dünndarm resultiert. Dieses würde gleichzeitig auch die hohen Eliminierungsraten von Aspalathinmetaboliten nach Gabe dieses Prüfprodukts erklären (siehe Tabelle 2.29). Der prozentuale Anteil der Hippursäureexkretion, der auf die applizierte Flavonoiddosis zurückzuführen ist, liegt bei 15 % für den Rooibostee und 7 % für die aktive Fraktion.

Auch CLIFFORD et al. (2000) beobachteten bei einer Humanstudie mit neun Probanden nach dreitägiger Verabreichung von jeweils 6-10 Tassen Schwarztee ((Poly)phenoldosis: ca. 415 mg/Tasse \equiv 7,5-13,5 g/3 d) einen signifikanten Anstieg der Hippursäureexkretion um 1,5 mmol/24 h. OLTHOF et al. (2003) berichteten von ähnlichen Effekten (Anstieg um 1,9 mmol/24 h) als Folge der täglichen Gabe von 4 g eines Schwarzteeextrakts über einen Zeitraum von 7 Tagen (\equiv 2 L eines starken Schwarztees; (Poly)phenoldosis: ca. 4,3 mmol/d \equiv 30,1 mmol/7 d). Unter Berücksichtigung der deutlich höheren applizierten Polyphenolmengen bei beiden Studien (Faktor 18-34) ergibt sich eine recht gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen für die Rooibosformulierungen. Die Berechnung der mit den Prüfprodukten applizierten Gesamtmengen an Catechinen, Theaflavinen, Gallussäure und Flavonolen zeigte für die angeführten Studien, dass der gravierende Anstieg der Hippursäureexkretion nicht allein auf die Zufuhr dieser Polyphenole, sondern zusätzlich auf den Abbau der komplexen Thearubigine zurückzuführen ist.

Gegenüber der Hippursäure (**127**) fielen die absoluten Zunahmen der Gehalte anderer phenolischer Säuren (ca. 0,3-2,6 μ mol für 3/4-Hydroxyhippursäure (**128**, **129**), 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure (**123**) und 3-(3-Hydroxyphenyl)-propionsäure (**126**)) ebenso wie bei dieser Humanstudie auch bei anderen Studien deutlich geringer aus (CLIFFORD et al., 2000; OLTHOF et al., 2003; MULDER et al., 2005).

Die Korrelation zwischen der Polyphenolaufnahme durch den Rooibostee und der verstärkten renalen Eliminierung der Metabolite **127-129** unterstreicht die Bedeutung des Dickdarms als wichtigen Stoffwechselort. Andere Forscher konnten ähnliche Beziehungen nach Verabreichung von Tee (CLIFFORD et al., 2000), Kaffee (RECHNER et al., 2001), Rotweineextrakt (GONTHIER et al., 2003) und Pflanzenpolyphenolen (PHIPPS et al., 1998; GRAEFE & VEIT, 1999) herstellen (siehe 2.2.7.1). Die Abbauprodukte besitzen gegenüber ihren intakten Ausgangsverbindungen zwar ein niedrigeres antioxidatives Potential (RICE-EVANS et al., 1996), können aber andere biologische Aktivitäten aufweisen. So gibt es Anzeichen für entzündungshemmende Wirkungen (LAROSSA et al., 2009).

2.2.8.2 Plasma

In Tabelle 2.32 sind die bei den neun Probanden zum Zeitpunkt t_{\max} bestimmten Höchstmengen c_{\max} für Isoorientin (11), Orientin (14), Aspalathin (16), Rutin (18), Isovitexin (20) und Vitexin (21) nach Verabreichung von je 500 mL Rooibostee und aktiver Fraktion aufgeführt. Zusätzlich sind die prozentualen Wiederfindungsraten WFR (\equiv Bioverfügbarkeit) zum Zeitpunkt t_{\max} im Vergleich zu den Aufnahmemengen angegeben (siehe 6.4). Dazu wurden die theoretisch möglichen Maximalgehalte des jeweiligen Flavonoids in 1 mL Plasma unter der Annahme einer vollständigen Extraktion aus dem Pflanzenmaterial und der vollständigen Resorption in unveränderter Form im Darmtrakt ermittelt. Grundlage für die Berechnungen war, dass ein durchschnittlich schwerer (70 kg), gesunder Mann 5 L Vollblut und damit rund 2,8 L Plasma besitzt. Auf die Bestimmung der AUC wurde angesichts der geringen Zahl der Messpunkte verzichtet (siehe 4.5.12.3).

Anhand der Daten sind interindividuelle Stoffwechselunterschiede offensichtlich. So waren nicht alle Flavonoide bei sämtlichen Probanden nachzuweisen (z.B. Aspalathin (16), Isovitexin (20) und Vitexin (21)) und die Gehalte weichen teilweise stark voneinander ab, was sich in den Schwankungsbreiten SD niederschlägt. Die Höchstgehalte c_{\max} werden im Allgemeinen zu unterschiedlichen Zeitpunkten t_{\max} erreicht. Für einige Flavonoide lassen sich dennoch Tendenzen ableiten (z.B. Isoorientin (11)).

Tabelle 2.32: Zusammenstellung der Höchstmengen (c_{\max}) intakter Flavonoide (in $\mu\text{mol/mL}$), die in den Plasmaproben der Probanden 1-9 zum Zeitpunkt t_{\max} (in h) nach Verabreichung von je 500 mL Rooibostee bzw. aktiver Fraktion bestimmt wurden (modifiziert nach BREITER et al., 2011).^a

Proband	Isoorientin (11)				Orientin (14)				Aspalathin (16)			
	Rooibos-tee		aktive Fraktion		Rooibos-tee		aktive Fraktion		Rooibos-tee		aktive Fraktion	
	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}
1	0,03	1,5	0,08	3	0,03	1,5	0,09	3	0,05	3	0,43	1,5
2	0,03	1,5	ND	–	0,03	3	0,06	1,5	0,19	3	0,18	1,5
3	0,05	1,5	ND	–	0,07	1,5	0,13	1,5	ND	–	ND	–
4	0,05	1,5	0,08	3	0,72	3	0,14	3	1,20	3	ND	–
5	0,03	3	0,02	1,5	0,06	1,5	0,11	1,5	0,21	3	0,22	3
6	0,12	3	0,07	1,5	0,11	1,5	0,06	3	1,97	1,5	1,01	1,5
7	ND	–	ND	–	ND	–	0,07	3	ND	–	0,25	3
8	ND	–	ND	–	0,15	3	ND	–	ND	–	ND	–
9	0,06	1,5	0,04	1,5	0,12	1,5	0,04	1,5	0,16	1,5	ND	–
Mittelwert	0,04		0,03		0,15		0,08		0,42		0,23	
\pm	\pm		\pm		\pm		\pm		\pm		\pm	
SD	0,03		0,04		0,22		0,05		0,69		0,33	
WFR [%]	0,18		0,51		1,00		0,45		0,17		0,10	

Proband	Rutin (18)				Isovitexin (20)				Vitexin (21)			
	Rooibos- tee		aktive Fraktion		Rooibos- tee		aktive Fraktion		Rooibos- tee		aktive Fraktion	
	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}
1	0,47	3	0,08	3	0,01	3	0,04	1,5	0,29	1,5	0,03	1,5
2	ND	–	ND	–	0,03	1,5	ND	–	ND	–	ND	–
3	0,33	3	0,12	3	0,03	1,5	ND	–	ND	–	ND	–
4	0,01	1,5	ND	–	0,06	3	ND	–	ND	–	ND	–
5	ND	–	0,05	3	0,02	3	0,02	3	ND	–	0,03	1,5
6	0,02	1,5	0,07	1,5	0,03	3	0,04	1,5	0,05	1,5	0,04	3
7	0,06	3	0,07	3	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–
8	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–
9	0,02	1,5	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–
Mittelwert	0,10		0,04		0,02		0,01		0,04		0,01	
\pm	\pm		\pm		\pm		\pm		\pm		\pm	
SD	0,18		0,04		0,02		0,03		0,10		0,02	
WFR [%]	1,49		7,07		0,69		0,70		2,25		3,45	

^a t_{\max} , Zeitpunkt der gemessenen Höchstkonzentration; c_{\max} , quantifizierte Höchstmenge; SD, Standardabweichung; ND, nicht detektiert. Die Wiederfindungsrate WFR stellt den Anteil der tatsächlich quantifizierten Flavonoidmenge im Vergleich zu der aufgenommenen Menge des jeweiligen Flavonoids dar (siehe **Abbildung 2.24**).

In **Abbildung 2.43** sind die prozentuale Bioverfügbarkeit der sechs Flavonoide in Relation zur zugeführten Flavonoidmenge (b) sowie ihre durchschnittlichen Höchstmengen c_{\max} am Zeitpunkt t_{\max} (a) graphisch dargestellt. Diese spiegeln unabhängig vom Prüfprodukt ungefähr die Abfolge der Gehalte in einem wässrigen Extrakt von grünem Rooibos wider. Aspalathin (**16**) ist mit 0,42 (Rooibostee) bzw. 0,23 nmol/mL (aktive Fraktion) das Hauptflavonoid, gefolgt von Orientin (**14**) und Rutin (**18**). Die Gehalte von Isoorientin (**11**), Isovitexin (**20**) und Vitexin (**21**) bewegen sich in einem engen Konzentrationsbereich von 0,02 (**20**) bis 0,04 (**11**) nmol/mL nach Verabreichung des Rooibosteekes sowie von 0,01 (**21**) bis 0,03 (**21**) nmol/mL für die aktive Fraktion. Die durchschnittlichen Maximalgehalte der Flavonoide sind nach Zufuhr des Teegetränks im Vergleich zur aktiven Fraktion größer. Als mögliche Ursachen sind Matrixeffekte und synergistische Effekte mit anderen Probenbestandteilen anzuführen, die in der definiert zusammengesetzten aktiven Fraktion nicht vertreten sind.

Zur modulierenden Wirkung von Flavonoiden auf die Resorption bestimmter Verbindungen gibt es bereits einige Untersuchungen. So fanden HUANG et al. (2008) bei *in vitro*-Untersuchungen zum Transport von Aspalathin durch Dünndarmepithelzellen (CaCo-2 Zellschichtmodell) heraus, dass die Aspalathinkonzentration einen bestimmten Schwellenwert erreichen muss, um relativ hohe Transportraten und damit eine hohe Bioverfügbarkeit zu erzielen. Dabei wurde das Dihydrochalkon aus Rooibosextrakten aufgrund vermuteter synergistischer Effekte besser resorbiert als in reiner Form. SILBERBERG et al. (2005) beobachteten im Tierversuch nach gleichzeitiger Verfütterung von Quercetin und (+)-Catechin eine signifikante Abnahme der Plasmakonzentrationen beider Flavonoide (-35 % bzw. -28 %) im Vergleich zu ihrer unabhängigen Gabe. Keinen Einfluss hatte die kombinierte Verabreichung auf das Metabolitprofil. BRAND et al. (2010) untersuchten den Effekt

gleichzeitig applizierter Flavonoide auf den Metabolismus des Flavanons Hesperetin im CaCo-2 Zellschichtmodell und stellten trotz beobachteter Hemmung des Hesperetin-metabolismus parallel eine signifikante Steigerung des basolateralen Transports von Metaboliten dieser Verbindung nach Gabe bestimmter Flavonoide (Quercetin, Isorhamnetin, Chrysin) fest.

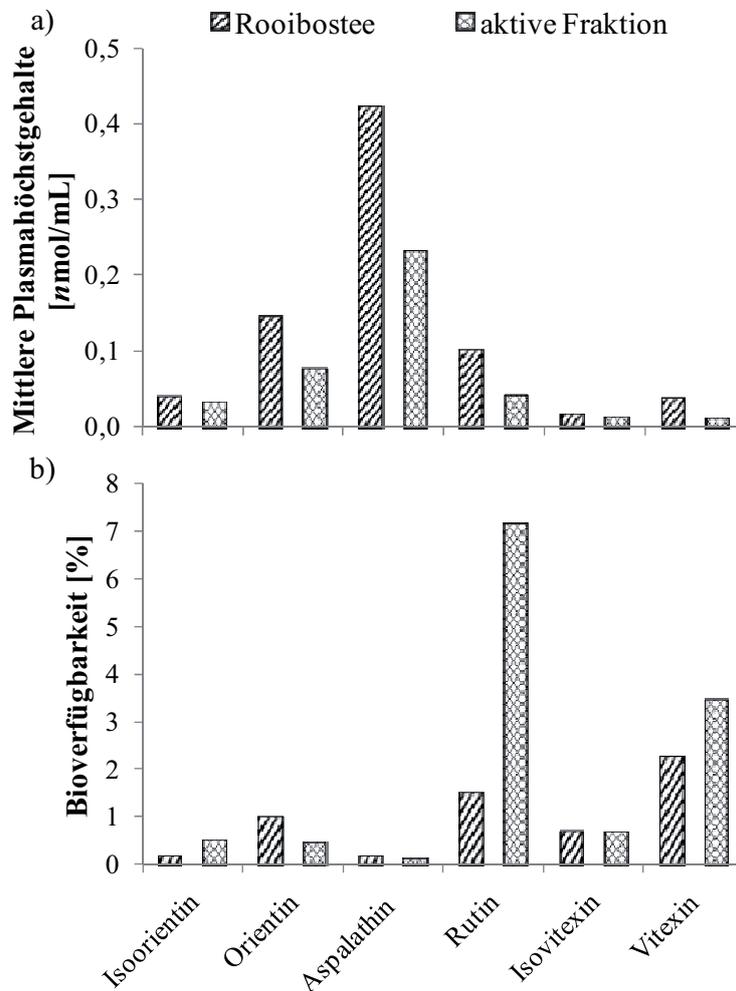


Abbildung 2.43: Vergleich der durchschnittlichen Flavonoidhöchstmengen c_{max} (a) nach oraler Gabe von je 500 mL Rooibostee bzw. aktiver Fraktion sowie der prozentualen Bioverfügbarkeit (WFR) in Abhängigkeit von der zugeführten Dosis (b) der jeweiligen Verbindung

Die auf Basis der theoretischen Maximalwerte berechnete prozentuale Bioverfügbarkeit der Flavonoide liegt für den Rooibostee im Bereich von 0,2 (Aspalathin **(16)**) und 2,3 % (Vitexin **(21)**), für die aktive Fraktion zwischen 0,1 **(16)** und 3,5 % **(21)** (Abbildung 2.43 - b). Lediglich Rutin **(18)** zeichnet sich im Fall der aktiven Fraktion durch hohe Wiederfindungsraten aus. Die Gesamtmenge der sechs Flavonoide, die zum Zeitpunkt t_{max} nach Applikation des Rooibostees bioverfügbar war, belief sich auf durchschnittlich 0,76 $\mu\text{mol/mL}$. Verglichen mit den theoretischen Maximalgehalten entspricht dieses einer Bioverfügbarkeit von 0,3 %. Für die aktive Fraktion folgt bei einem mittleren Flavonoidgesamtgehalt von 0,41 $\mu\text{mol/mL}$ eine Bioverfügbarkeit von 0,2 %.

Zu berücksichtigen ist, dass die Werte in Tabelle 2.32 auf Basis der durchschnittlichen Maximalgehalte unabhängig vom Messzeitpunkt angegeben sind. Die Mediane der Flavonoidgehalte (c_{med}) sind mit den zugehörigen Minimal- und Maximalwerten ($c_{\text{IVmin}}/c_{\text{IVmax}}$) in Tabelle 2.33 zusammengefasst.

Tabelle 2.33: Überblick über den zeitlichen Verlauf der Zirkulation intakter Flavonoide im Plasma der neun untersuchten Probanden nach oraler Applikation von je 500 mL Rooibostee bzw. aktiver Fraktion (keine Detektion der Zielverbindungen vor Prüfproduktgabe)^a

Messzeitpunkt [h]	Rooibostee (n = 9)		aktive Fraktion (n = 9)	
	1,5	3	1,5	3
Isoorientin (11)	c_{med}	0,03	0	0
	c_{IVmin}	0,02	0,03	0,02
	c_{IVmax}	0,10	0,12	0,07
Orientin (14)		0,06	0,03	0
		0,03	0,03	0,04
		0,27	0,72	0,13
Aspalathin (16)		0	0,05	0
		0,16	0,05	0,13
		1,97	1,90	1,01
Rutin (18)		0,01	0	0
		0,01	0,01	0,04
		0,03	0,47	0,07
Isovitexin (20)		0	0	0
		0,02	0,01	0,02
		0,03	0,06	0,04
Vitexin (21)		0	0	0
		0,05	0	0,03
		0,29	0,04	0,03
Hyperosid (22)		0	0	0
		0,05	0,09	0,06
		0,09	0,09	0,09
Isoquercitrin (23)		0	0	0
		0,04	0,02	0
		0,20	0,12	0,09
Nothofagin (25)		0	0	0
		0	0	0,12
		0,25	0,22	0,14

^a c_{med} , Median der Flavonoidkonzentrationen am jeweiligen Messpunkt; $c_{\text{IVmin}}/c_{\text{IVmax}}$, Minimal- und Maximalkonzentration am Messpunkt – c_{med} und $c_{\text{IVmin}}/c_{\text{IVmax}}$ in nmol/mL . c_{IVmin} gibt den kleinsten gemessenen Wert an und lässt Probanden, bei denen die Metabolite nicht nachgewiesen wurden, unberücksichtigt.

Aus dieser geht hervor, dass lediglich Isoorientin (11), Orientin (14), Aspalathin (16) und Rutin (18) bei einer signifikanten Probandenzahl bestimmt werden konnten. Für die übrigen Rooibosflavonoide war dieses zumeist nicht der Fall. Die Gehalte bewegen sich für den Rooibostee zwischen 0,01 (18) und 0,06 nmol/mL (14), wobei die Höchstmengen vorwiegend nach 1,5 h durchlaufen werden. Für die aktive Fraktion erfolgt erst nach 3 h ein Anstieg (c_{med} : 0,02 (22) - 0,06 nmol/mL (14)). Der kumulative Anteil der pro Zeitintervall bioverfügbaren

Flavonoidmenge in Relation zur verabreichten Dosis ist beim Rooibostee mit rund 0,07 % etwas höher als bei der aktiven Fraktion (ca. 0,04 %). Zur abschließenden Beurteilung fehlen allerdings die Daten für das 5 und 8 h-Plasma. Trotz der hohen Aufnahmemenge liegt Aspalathin (**16**) lediglich im 3 h-Plasma nach Gabe des Rooibostees mit einem Gehalt von 0,05 nmol/mL (\equiv 0,05 μ mol/L) bei einer signifikanten Probandenzahl vor, was einer Bioverfügbarkeit von 0,02 % entspricht.

Im Vergleich dazu konnten für die Flavonol-O-glykoside Quercetin, Rutin, Quercetin-3-O-glucosid und -4'-O-glucosid bei applizierten Flavonolmengen von 1,6 bis 4000 mg (in reiner Form oder durch flavonolhaltige Kost) teilweise deutlich höhere Plasmakonzentrationen (0,13-7,6 μ mol/L) ermittelt werden, wie die Auswertung von insgesamt 24 Bioverfügbarkeitsstudien durch MANACH et al. (2005) ergab. Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte zusätzlich die pharmakokinetischen Daten von insgesamt 73 weiteren Studien zur Bioverfügbarkeit anderer Polyphenole (Anthocyane, Flavanone, Catechine, Proanthocyanidine, Isoflavone, Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren). Zur besseren Vergleichbarkeit wurden dazu die Daten auf eine einmalige 50 mg-Dosis des jeweiligen Aglykons standardisiert. Wie sich zeigte, wird die Hydroxybenzoesäure Gallussäure wesentlich besser resorbiert als die Vertreter der anderen Substanzklassen. Die durchschnittlichen Höchstmengen c_{\max} ihrer Metabolite lagen bei 4,00 μ mol/L, und der mit dem Urin ausgeschiedene Anteil an der zugeführten Dosis betrug 38 %. Danach folgen die Isoflavone mit Höchstmengen von rund 2,00 μ mol/L und einer durchschnittlichen renalen Exkretion von 42 % für Daidzin und 15,6 % für Genistin. Schlechte Bioverfügbarkeiten weisen die Proanthocyanidine (c_{\max} : 0,02 μ mol/L) und Anthocyane (c_{\max} : 0,03 μ mol/L) auf.

Gemessen an diesen Zahlen ist die Bioverfügbarkeit von intaktem Aspalathin (**16**) als wertgebendem Bestandteil des grünen Rooibos unter Berücksichtigung der hohen Dosen als gering einzustufen und liegt im Bereich der Werte für Proanthocyanidine und Anthocyane. Als Ursachen sind ein effizienter intestinaler Metabolismus und/oder Effluxpumpen wie MRP2 und BCRP in der apikalen Membran der Enterozyten anzuführen, die Flavonoide und deren Metabolite zurück in das Darmlumen transportieren können (WALGREN et al., 2000; DAY et al., 2003; O'LEARY et al., 2003; SESINK et al., 2005, TIAN et al., 2006 – siehe 1.3). In diesem Kontext konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß des apikalen Ausstroms abhängig ist von der chemischen Struktur des applizierten Flavonoids (CRESPY et al., 2003). Umgekehrt konnten Studien belegen, dass bestimmte Flavonoide (z.B. Chrysin) in Abhängigkeit von ihrer Konzentration den durch BCRP-vermittelten Efflux hemmen können (ZHANG et al., 2004), was besondere Relevanz in der Krebstherapie hat.

Für eine abschließende Bewertung der Bioverfügbarkeit von Aspalathin (**16**) gilt allerdings zu beachten, dass lediglich die Plasmaspiegel des intakten Dihydrochalkons, nicht jedoch seiner Metabolite bestimmt werden konnten. In der Literatur finden sich hierzu keine Angaben. Weder Aspalathin (**16**) noch dessen Stoffwechselprodukte konnten bei anderen Studien im Plasma nachgewiesen werden (KREUZ et al., 2008; STALMACH et al., 2009 – siehe 2.2.1). Die Daten für O-glykosylierte Vertreter dieser Stoffklasse (z.B. Phloridzin) deuten an, dass

das nach Deglykosylierung freigesetzte Aglykon hauptsächlich in konjugierter Form im Plasma vorliegt (CRESPY et al., 2001). Die renal eliminierte Gesamtmenge von Metaboliten des Aspalathins (**16**) im Vergleich zu der unveränderten Ausgangsverbindung lässt vergleichbares für C-glykosylierte Dihydrochalkone erwarten. Dieses steht vor dem Hintergrund, dass das dekonjugierende Enzym β -Glucuronidase in Leber, Niere und Blut vorhanden ist (O'LEARY et al., 2003), wodurch es zu einer anhaltenden Zirkulation resorbierter Polyphenole und/oder ihrer Metabolite in Blut und Leber kommen kann (VAN DER MERWE et al., 2010). Es ist somit denkbar, dass unkonjugierte Polyphenole und einige ihrer Konjugate im Körper akkumulieren und so verzögert ihr pharmakologisches Potential entfalten können (ZHANG et al., 2007c).

Eine genaue Einschätzung zur Anreicherung der Rooibosflavonoide ist aufgrund des gewählten Studiendesigns schwierig. Die einmalige Prüfproduktgabe löst einen vorübergehenden Konzentrationsanstieg einiger Flavonoide im Plasma aus, der hauptsächlich die Fähigkeit des menschlichen Organismus zur Aufnahme dieser Verbindungen aus der Lebensmittelmatrix widerspiegelt. Wesentlich relevanter ist die Bestimmung der Bioverfügbarkeit in den Zielgeweben. Hierfür können die Plasmaspiegel nur als ein Indikator angesehen werden (PORRINI & RISO, 2008; D'ARCHIVIO et al., 2010). Mit Blick auf die Eliminierungshalbwertszeiten $t_{50\%}$ der wichtigsten Metabolite von Aspalathin (**16**) (0-4 h für Rooibostee und aktive Fraktion – siehe Tabelle 2.30) ist es allerdings fragwürdig, ob das Dihydrochalon bzw. dessen Metabolite bei wiederholter Prüfproduktgabe im Körper akkumulieren können. Im Vergleich dazu wurden beispielsweise für Quercetin-O-glucoside durchschnittliche Halbwertszeiten von rund 18 h ermittelt (MANACH et al., 2005).

2.2.9 Antioxidatives Potential der Plasmaproben (ORAC)

Die Bestimmung des antioxidativen Potentials der Plasmaproben der 1. Humanstudie wurde unter Verwendung des ORAC-Testsystems (Oxygen Radical Absorbance Capacity) nach der von DÁVALOS et al. (2003) beschriebenen Methodik am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung (Abt. Ernährungsphysiologie und Humanernährung) der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Auszüge der Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

Der ORAC-Test beruht auf dem oxidativen Abbau einer Fluoreszenzquelle wie Fluorescein oder β -Phycoerythrin nach Zugabe eines Radikalstarters wie 2,2'-Azobis-(2-amidinopropan)-dihydrochlorid (AAPH). Aus diesem entstehen durch Erhitzen zwei Peroxylradikale, die die Fluoreszenzquelle unter Abnahme der Fluoreszenzintensität schädigen können. Antioxidantien wirken als Radikalfänger und können diesen Prozess verlangsamen. Die Intensität der Fluoreszenz wird mit und ohne Antioxidans in Abhängigkeit der Zeit (üblicherweise 35 min) aufgezeichnet und die Fläche zwischen beiden Abklingkurven berechnet. Das antioxidative Potential wird in Bezug auf die Referenzsubstanz Trolox (ein Vitamin E-Derivat) als Trolox-Äquivalente (TE) angegeben. Fluorescein wird im Vergleich zu β -Phycoerythrin aufgrund seiner guten Photostabilität vorwiegend als Fluoreszenzquelle eingesetzt (OU et al., 2001).

Tabelle 2.34 zeigt das durchschnittliche antioxidative Potential des Blutserums, das vor und bis acht Stunden nach Verabreichung der drei Prüfprodukte gemessen wurde.

Tabelle 2.34: Durchschnittliche Gehalte des Serum ORAC ($\mu\text{mol TE/L}$) vor und nach Konsum der Prüfprodukte (Mittelwerte \pm SD) (nach BREITER et al., 2011)^a

Prüfprodukt	0 h	0,5 h	1 h	1,5 h	2 h	3 h	5 h	8 h
Rooibostee (n = 10)	2668 \pm 305	2554 \pm 276	2516 \pm 292 ‡	2289 \pm 324 †	2381 \pm 327 *	2277 \pm 225 ‡	2274 \pm 226 †	2300 \pm 176 †
	Aktive Fraktion (n = 10)	2633 \pm 360	2480 \pm 308	2479 \pm 389	2368 \pm 293 ‡	2400 \pm 306	2386 \pm 293	2315 \pm 284 *
Placebo (n = 10)		2637 \pm 320	2515 \pm 291	2416 \pm 206 ‡	2362 \pm 273 ‡	2438 \pm 184 ‡	2430 \pm 224 ‡	2325 \pm 259 ‡

^a † = $p \leq 0,001$; * = $p \leq 0,01$; ‡ = $p \leq 0,05$; paired T-Test; SD, Standardabweichung

Eine signifikante Abnahme des antioxidativen Potentials konnte in jeder Gruppe nach Gabe der Prüfprodukte bestimmt werden, wobei die durchschnittlichen Serumlevel an den Messzeitpunkten nicht signifikant zwischen den verschiedenen Gruppen abwichen. Abbildung 2.44 veranschaulicht die Effekte der einzelnen Prüfprodukte auf den antioxidativen Status, der als absolute Änderung von der Basislinie angegeben wurde.

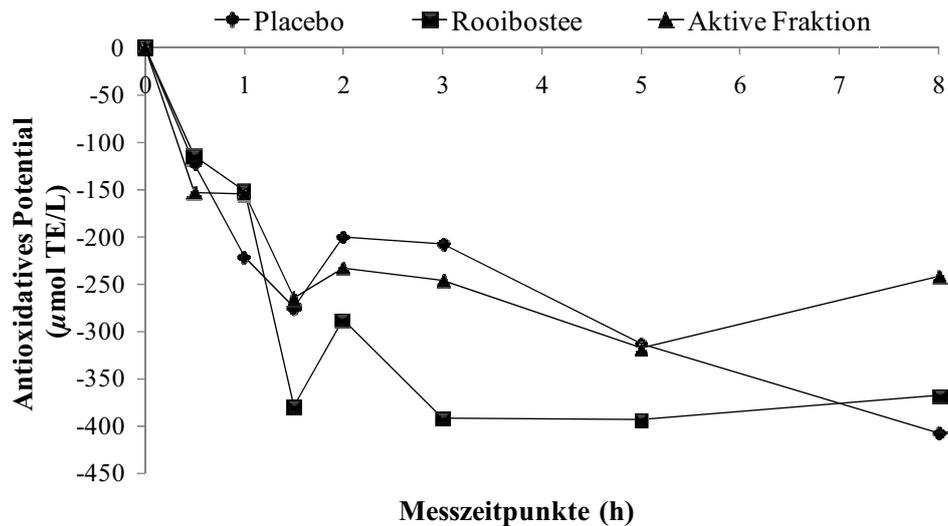


Abbildung 2.44: Verlauf des antioxidativen Potentials im ORAC-Test nach Gabe von Placebo, Rooibostee und aktiver Fraktion (nach BREITER et al., 2011). TE, Trolox-Äquivalente

Zur Abschätzung der Reaktion des Serums auf die Zufuhr der drei Prüfprodukte wurde die Fläche unter den Kurven (AUC) über den gesamten Untersuchungszeitraum gebildet. Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede in den Werten nach Konsum des Rooibostees ($-2659 \pm 1314 \mu\text{mol TE}\cdot\text{h/L}$), der aktiven Fraktion ($-1987 \pm 2185 \mu\text{mol TE}\cdot\text{h/L}$) sowie des Placebos ($-2163 \pm 1878 \mu\text{mol TE}\cdot\text{h/L}$) beobachtet.

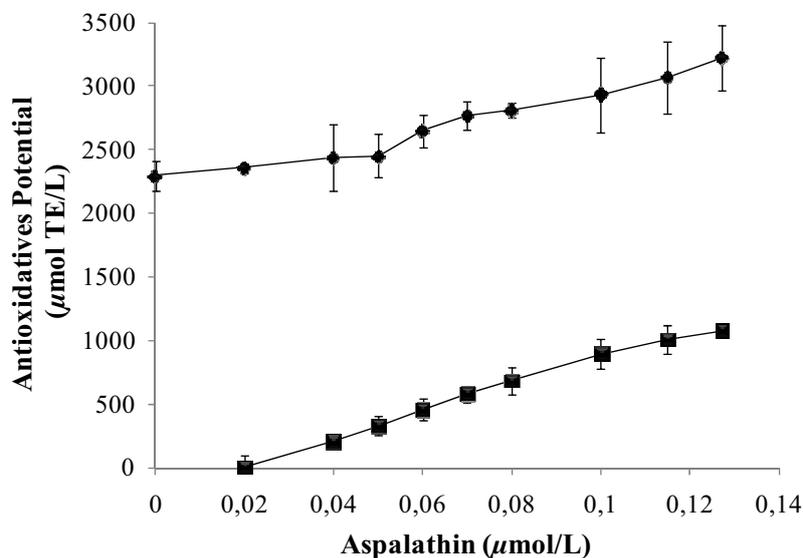


Abbildung 2.45: *In vitro* antioxidatives Potential eines wässrigen Extrakts von unfermentiertem Rooibos (···■···) und Blutserum, dem unterschiedliche Mengen des wässrigen Extrakts (—◆—) zugesetzt wurden (die Quantifizierung erfolgte über die Aspalathinkonzentrationen) (nach BREITER et al., 2011). TE, Trolox-Äquivalente

Zur Bewertung und Einordnung der Ergebnisse wurden *in vitro*-Messungen des antioxidativen Potentials einer standardisierten Menge eines wässrigen Extrakts von grünem Rooibos mit und ohne Zugabe von Blutserum vorgenommen (Abbildung 2.45).

Der wässrige Extrakt besitzt erwartungsgemäß ein hohes antioxidatives Potential. Steigende Konzentrationen resultieren entsprechend in einem Anstieg der gemessenen ORAC-Werte. Die Zumischung verschiedener Konzentrationen des wässrigen Extrakts zum Blutserum führt ab einem Schwellenwert von $0,06 \mu\text{mol/L}$ Aspalathin (**16**) zu einer Zunahme der ORAC-Werte.

Zur Messung der authentischen Plasmaproben mittels des ORAC-Testsystems war aufgrund der hohen (endogenen) Antioxidantienmenge ein Verdünnungsschritt (Faktor 1000) zwingend erforderlich, womit die Aspalathinkonzentration im Well noch deutlich unterhalb des ermittelten Medians von $0,05 \mu\text{mol/L}$ (siehe Tabelle 2.33) lag. Aus diesem Grund war vermutlich kein Anstieg des antioxidativen Potentials nach Prüfproduktgabe zu beobachten (Abbildung 2.44). Als weitere Ursachen sind Maskierungseffekte durch Flavonoid-Plasma-albumin-Adduktbildung zu nennen (SAUTER, 2004 – siehe 2.2.5.1).

Die sukzessive Abnahme des antioxidativen Potentials ist möglicherweise mit der Zusammensetzung der Mahlzeiten an den Untersuchungstagen zu begründen. PRIOR et al. (2007) beobachteten im Rahmen mehrerer klinischer Studien mit 6-10 Probanden eine ähnliche Entwicklung bei oraler Applikation von kohlenhydratreicher sowie flavonoid- und antioxidantienarmer Kost. Möglicherweise war daher die resorbierte Flavonoidmenge nicht ausreichend, um diesem Verlauf entgegenzuwirken.

2.3 2. Humanstudie: frisches & gelagertes Fertiggetränk

Zur besseren Vergleichbarkeit mit der 1. Humanstudie wurden die Plasma- und Urinproben analog der unter 4.5.12.1 und 4.5.12.2 beschriebenen Vorschriften aufgearbeitet. Im Unterschied zu dieser Studie wurden die Plasmaproben von insgesamt neun Probanden an vier statt drei Messpunkten (0, 0,5, 1,5 und 3 h) und Urinproben von vier statt neun Probanden analysiert, so dass sich für den Urin statistisch weniger abgesicherte Daten ergeben.

2.3.1 Quantifizierung der Prüfprodukte

Bei der 2. Humanstudie wurden als Prüfprodukte ein frisches Fertiggetränk, dem ein Extrakt aus grünem Rooibos zugesetzt wurde, ein neun Monate bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss gelagertes Fertiggetränk gleicher Rezeptur sowie ein Getränk ohne Rooibosextrakt (Placebo) eingesetzt (siehe 2.1.4.1). Die Fertiggetränke enthielten in 500 mL die gleiche Menge an nativem Extrakt ($\equiv 1,96$ g), die bei einem herkömmlichen Teeaufguss (\rightarrow 1. Humanstudie) aus 10 g Pflanzenmaterial in 500 mL Wasser extrahiert wird (siehe 2.2.4.1). Die Proben wurden in Doppelbestimmung gemäß 4.5.8 aufgearbeitet und die Hauptflavonoide durch externe Kalibriergeraden der jeweiligen Referenzsubstanzen quantifiziert. Eine tabellarische Auflistung der Ergebnisse befindet sich in Abschnitt 6.4.

Die Gesamtflavonoidmenge belief sich bei dem Frischgetränk auf $576 \pm 3 \mu\text{mol}$ und ist damit um etwa 35 % niedriger als die des Rooibostees ($893 \pm 21 \mu\text{mol}$) bei der 1. Humanstudie (siehe Tabelle 6.2). Zurückzuführen ist diese Diskrepanz auf den Aspalathingehalt, der in den Fertiggetränken deutlich niedriger als im Teeaufguss ist (363 ± 1 im frischen bzw. $237 \pm 3 \mu\text{mol}$ im gelagerten Fertiggetränk im Vergleich zu $663 \pm 11 \mu\text{mol}$ im Rooibostee). Verglichen mit dem Frischgetränk besitzt das gelagerte Produkt erwartungsgemäß geringere Flavonoidgehalte (durchschnittliche Abnahme: 23 %). Besonders starke Einbrüche (> 30 %) sind neben Aspalathin (**16**) für Rutin (**18**), Hyperosid (**22**) und Isoquercitrin (**23**) zu verzeichnen (siehe 2.1.4.1).

2.3.2 Qualitative Analyse der Urin- und Plasmaproben

2.3.2.1 Urin

Metabolite von Aspalathin und Nothofagin

In den Urinproben der vier untersuchten Probanden konnten einige Metabolite des Aspalathins (**16**) und Nothofagins (**25**) anhand der Fragmentierung und Retentionszeit zugeordnet werden (Tabelle 2.35).

Tabelle 2.35: Übersicht über das Vorkommen von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) sowie deren Metabolite im 0-24 h-Urin der Probanden 1-4 nach Gabe von je 500 mL des frischen bzw. gelagerten Fertiggetränks^a

	Fertiggetränk, frisch					Fertiggetränk, gelagert				
	1	2	3	4	Σ	1	2	3	4	Σ
Aspalathin (16)	X	X			2	X				1
3-O-Me-aspalathin (84)	X	X	X	X	4	X	X	X	X	4
Aspalathin-O-glcS (90)					0					0
Me-O-aspalathin-O-glcS (91)		X			1					0
Me-O-aspalathin-O-glcS (95)		X		X	2					0
Aspalathin-4-O-sulfat (86)					0					0
Nothofagin (25)		X	X	X	3		X			1
Nothofagin-O-glcS (94)					0					0
Phloretin-O-glcS (97)					0					0
	Σ	2	5	2	3	2	2	1	1	

^aglcS, glucuronid; Me, Methyl

3-O-MA (**84**) ist auch bei der 2. Humanstudie Hauptmetabolit von Aspalathin (**16**) und trat in den Urinproben der vier untersuchten Probanden über den gesamten Interventionszeitraum auf. Auch die gemischt konjugierten Aspalathinmetabolite **91** und **95** ließen sich im Frischgetränk nachweisen. Insgesamt ist das Ausmaß der Metabolisierung im Vergleich zur 1. Humanstudie (siehe Tabelle 2.24) weniger ausgeprägt. Weder die Glucuronide beider Dihydrochalkone noch die Metabolite der korrespondierenden Aglyka (**96-98**) konnten bestätigt werden. Auch die Sulfatierung von Aspalathin zum 4- bzw. 3-O-sulfat (**86, 89**) war nicht zu beobachten. In intakter Form konnten Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) jedoch identifiziert werden.

Eine Korrelation zwischen der Flavoniddosis und der Detektionshäufigkeit lässt sich angesichts der geringen Zahl untersuchter Probanden schwer beurteilen. Auffällig ist jedoch, dass die beiden methylierten und glucuronidierten Metabolite (**91, 95**) nicht mehr und die unveränderten Dihydrochalkone (**16, 25**) nur noch bei jeweils einem Studienteilnehmer nach Gabe des gelagerten Erzeugnisses vorlagen. Angesichts dieser Ergebnisse ist zu diskutieren, ob das Spektrum der gebildeten Metabolite bzw. der bevorzugte Konjugationsweg von der zugeführten Flavoniddosis abhängig ist (siehe 2.2.7.1).

Metabolite der Flavon-C/O-, Flavanon-C- und Flavonol-O-glykoside

Die Ergebnisse für die Flavon-C/O-, Flavanon-C- und Flavonol-O-glykoside decken sich mit denen der 1. Humanstudie. So traten zahlreiche Glucuronide (z.B. Quercetin- (z.B. **81**), Luteolin- (z.B. **82**), Eriodictyol- (z.B. **100**) und Apigenin-O-glucuronid (z.B. **102**)) im 0-24 h-Urin auf. Als einziges Diglucuronid konnte auch bei dieser Studie das zweifach glucuronidierte Luteolin (**106**) charakterisiert werden.

Die schon bei der 1. Humanstudie beobachtete Flavonoidresorption in unveränderter Form fand Bestätigung durch die Identifizierung von Isoorientin (**11**), Orientin (**14**) und Vitexin (**22**). Mit Methyl-O-isoorientin (**107**), Isoorientin-O-sulfat (**111**) und (*R/S*)-Methyl-O-eriodictyol-6/8-C-glucosid (z.B. **113**) konnten in Übereinstimmung mit dem Metabolitprofil der 1. Humanstudie drei Stoffwechselprodukte intakter Flavon-C-glucoside auf Basis der massenspektrometrischen Daten identifiziert werden (siehe 2.2.7.1). Als Metabolite intakter O-glykoside wurden Luteolin-O-hexosid-O-glucuronid (**112**) und das entsprechende Konjugat mit Quercetin (**114**) bei einem Probanden nach Gabe des gelagerten Prüfprodukts gefunden.

Ein neuer Metabolit mit einem Pseudomolekülion von m/z 625 $[M-H]^-$, welches im MS^2 -Modus die Fragmente m/z 449 ($[(M-H)-176]^-$), 359 und 329 bildete, trat ausschließlich beim gelagerten Fertiggetränk auf. Hierbei handelt es sich vermutlich um glucuronidiertes (*R/S*)-Eriodictyol-6/8-C-glucosid (**134**). Das Vorkommen dieser Verbindung im gelagerten Prüfprodukt steht in Zusammenhang mit dem fortschreitendem Aspalathinabbau zu den (*R/S*)-Eriodictyol-6/8-C-glucosiden **9**, **10**, **15** und **17** mit zunehmender Lagerdauer (siehe 1.2.3). Da bei diesem Prozess bevorzugt die 6-C-glucoside gebildet werden, liegt vermutlich (*R/S*)-Eriodictyol-6-C-glucosid-O-glucuronid vor. Parallel läuft auch die Biotransformation zu den korrespondierenden (*R/S*)-Methyl-O-eriodictyol-6/8-C-glucosiden (z.B. **113**), die anhand ihres Fragmentierungsmusters (m/z 463 $[M-H]^- \rightarrow 373, 343$) identifiziert werden konnten, ab.

Die Metabolisierung erfolgt nicht nur über die intakten Flavanon-C-glucoside, sondern auch über das korrespondierende Aglykon Eriodictyol (**30**), das seinerseits in glucuronidierter Form als Eriodictyol-O-glucuronid (z.B. **100**), daneben auch unverändert und/oder nach Abbau zu phenolischen Säuren (z.B. 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure (**123**)) ausgeschieden wird. Die ebenfalls beschriebene 3'-O-methylierte Form von Eriodictyol (\rightarrow Homoeriodictyol – BOOTH et al., 1958) wurde im Probenmaterial nicht gefunden.

Phenolische Abbauprodukte

Als phenolische Abbauprodukte konnten wie bei der 1. Humanstudie (siehe 2.3.2.1) neben den Stoffwechselendprodukten Hippursäure (**127**) und 3/4-Hydroxyhippursäure (**128**, **129**) sowohl C_6-C_3 - (z.B. 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)- (**123**) und 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (**125**)) als auch C_6-C_2 - (z.B. 4-Hydroxyphenylelessigsäure (**121**)) und C_6-C_1 -Körper (z.B. 2,5-Dihydroxybenzoesäure (**117**)) detektiert werden. Darüber hinaus gelang bei einem Probanden die Identifizierung von 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure (**125**) als neu auftretendem Metabolit.

2.3.2.2 Plasma

Auch bei der 2. Humanstudie konnten nach Verabreichung beider Rooibosprodukte unveränderte Flavonoide in den Plasmaproben identifiziert werden. Dazu gehören die Dihydrochalkone Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**), die Flavon-C-glucoside Isoorientin (**11**), Orientin (**14**), Isovitexin (**20**) und Vitexin (**21**) sowie die Flavonol-O-glykoside Rutin (**18**), Hyperosid (**22**) und Isoquercitrin (**23**). Die Bestätigung von Metaboliten dieser Flavonoide sowie der korrespondierenden Aglyka scheiterte vermutlich aufgrund des Aufarbeitungsverfahrens (Flüssig-Flüssig-Extraktion) (siehe 2.2.7.2). Einen zusammenfassenden Überblick über das Flavonoidvorkommen liefert Tabelle 2.36.

Tabelle 2.36: Übersicht über das Vorkommen intakter Flavonoide im 0-3 h-Plasma der Probanden 1-9 nach Gabe von je 500 mL des frischen bzw. gelagerten Fertiggetränks

Fertiggetränk, frisch	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Σ
Isoorientin (11)		X	X	X			X	X	X	6
Orientin (14)		X	X	X					X	4
Aspalathin (16)	X	X	X	X			X		X	6
Rutin (18)		X	X	X						3
Isovitexin (20)			X							1
Vitexin (21)			X							1
Hyperosid (22)	X	X	X							3
Isoquercitrin (23)										0
Nothofagin (25)		X	X	X			X		X	5
Σ	2	6	8	5	0	0	3	1	4	

Fertiggetränk, gelagert	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Σ
Isoorientin (11)			X	X			X	X	X	5
Orientin (14)				X			X	X	X	4
Aspalathin (16)	X	X	X	X			X		X	6
Rutin (18)				X			X			2
Isovitexin (20)				X			X			2
Vitexin (21)				X			X			2
Hyperosid (22)				X			X			2
Isoquercitrin (23)				X						1
Nothofagin (25)	X		X	X			X	X		5
Σ	2	1	3	9	0	0	8	3	3	

Unterschiede im Stoffwechsel der Studienteilnehmer wirken sich auch bei dieser Studie deutlich aus. Unabhängig von der verabreichten Rooibosformulierung schlug beispielsweise der Nachweis jeglicher Flavonoide bei den Probanden „5“ und „6“ fehl, während bei dem Proband „4“ fast alle Zielverbindungen detektiert werden konnten. Der Vergleich mit dem Rooibostee und der aktiven Fraktion zeigt (siehe Tabelle 2.27), dass die Detektionshäufigkeit bei der 2. Humanstudie insgesamt niedriger ist. Während beispielsweise Orientin (**14**) bei der 1. Humanstudie in den Plasmaproben von acht der neun untersuchten Probanden nach Gabe beider Rooibosformulierungen bestimmt werden konnte, gelang dieses bei der 2. Humanstudie trotz vergleichbarer Aufnahmemenge (Rooibostee: 18 mg/500 mL; Fertiggetränk, frisch: 23 mg/ 500 mL) nur bei vier Studienteilnehmern. Ähnliche Verhältnisse liegen bei

Rutin (**18**), Isovitexin (**20**), Vitexin (**21**), Hyperosid (**22**) und Isoquercitrin (**23**) vor. Der Vergleich der RTD-Getränke macht deutlich, dass sich die Lagerung des Produkts nicht negativ auf die Detektionsraten auswirkt.

2.3.3 Quantitative Analyse der Urin- und Plasmaproben

2.3.3.1 Urin

Metabolite von Aspalathin und Nothofagin

Tabelle 2.37 liefert einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der Eliminierung von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) sowie der drei Hauptmetabolite von Aspalathin (**84**, **91**, **95**).

Tabelle 2.37: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der renalen Ausscheidung von Nothofagin (**25**) und Aspalathin (**16**) sowie dessen Hauptmetabolite **84**, **91** und **95** nach Gabe von je 500 mL der beiden Fertiggetränke (keine Detektion der Zielverbindungen vor Prüfproduktgabe). Die applizierte Flavonoiddosis betrug ca. 576 (frisch) bzw. 410 μmol (gelagert).^a

Zeitintervall [h]	Fertiggetränk, frisch (n = 4)					Fertiggetränk, gelagert (n = 4)					
	0-2	2-4	4-6	8-24	0-24	0-2	2-4	4-6	8-24	0-24	
Aspalathin (16)	c_{med}	0	0	0	<u>2,7</u>	2,7	0	0	0	0	0
	c_{IVmin}	0	0	0	5,5	5,5	0	0	0	0	0
	c_{IVmax}	<u>0,03</u>	0,4	0,4	15,0	15,8	0	0	2,6	19,7	22,3
	AUC _{0-24h}		24,6	$t_{50\%}$	8-24		AUC _{0-24h}	0	$t_{50\%}$	-	
3-O-Me-aspalathin (84)		3,1	<u>3,2</u>	1,8	0,6	8,7	<u>2,1</u>	1,5	0	0	3,6
		0,5	0,9	1,2	1,2	3,8	0,8	1,1	0	0	1,9
		10,8	6,3	3,7	3,9	24,7	7,0	2,0	0,7	0	9,7
	AUC _{0-24h}		35,8	$t_{50\%}$	2-4		AUC _{0-24h}	7,3	$t_{50\%}$	0-2	
Me-O-aspalathin- O-glcS (91)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		0,1	0,3	0,2	0	0,6	0	0	0	0	0
	AUC _{0-24h}		0	$t_{50\%}$	-		AUC _{0-24h}	0	$t_{50\%}$	-	
Me-O-aspalathin- O-glcS (95)		0	<u>0,1</u>	0	0	0,1	0	0	0	0	0
		0	0,1	0	0	0,1	0	0	0	0	0
		0	0,8	0,5	0	1,3	0	0	0	0	0
	AUC _{0-24h}		0,3	$t_{50\%}$	2-4		AUC _{0-24h}	0	$t_{50\%}$	-	
Gesamt ($\sum c_{\text{IV}}$)	3,1	3,3	1,8	3,3	<u>11,5</u> <i>1,9 %</i>	2,1	1,5	0	0	<u>3,6</u> <i>0,9 %</i>	
Nothofagin (25)		<u>0,1</u>	0,1	0	0	0,2	0	0	0	0	0
		0,3	0,1	0	0	0,4	0	0	0	0	0
		0,9	0,2	0	0	1,1	6,2	0	0	0	6,2
	AUC _{0-24h}		0,4	$t_{50\%}$	0-2		AUC _{0-24h}	0	$t_{50\%}$	0	

^a c_{med} , Median der Metabolitkonzentrationen am jeweiligen Messintervall; $c_{\text{IVmin}}/c_{\text{IVmax}}$, Minimal- und Maximalkonzentration am Messintervall; AUC, Fläche unterhalb der Konzentrations-Zeit-Kurve; $t_{50\%}$, Ausscheidungshalbwertszeit – c_{med} , $\sum c_{\text{IV}}$ und $c_{\text{IVmin}}/c_{\text{IVmax}}$ in μmol , AUC_{0-24h} in $\mu\text{mol}\cdot\text{h}$, $t_{50\%}$ in h. c_{IVmin} gibt den kleinsten gemessenen Wert an und lässt Probanden, bei denen die Metabolite nicht nachgewiesen wurden, unberücksichtigt. Die kursiv dargestellten Daten geben die 0-24 h-Ausscheidung als prozentualen Anteil der Flavonoiddosis an. glcS, glucuronid; Me, Methyl

Dargestellt ist die Entwicklung der Mediane (c_{med}) an den untersuchten Messintervallen (0-2, 2-4, 4-6 und 8-24 h) unter Angabe der Maximal- und Minimalgehalte ($c_{\text{IVmax}}/c_{\text{IVmin}}$), der Fläche unterhalb der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) sowie der Ausscheidungshalbwertszeit ($t_{50\%}$).

3-O-MA (**84**) ist mit einer Gesamtkonzentration $8,7 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$ im frischen und $3,6 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$ im gelagerten Fertiggetränk Hauptmetabolit, wobei für das Frischgetränk die Höchstmenge c_{max} erst nach 2-4 h ($3,2 \mu\text{mol}$) erreicht wird. Für das gelagerte Produkt ist dieses bereits nach 0-2 h der Fall. Der Vergleich beider Prüfprodukte zeigt eine Korrelation mit den verabreichten Aspalathinmengen (siehe 6.4). Infolgedessen ist die 0-24 h-Ausscheidung von Metaboliten des Dihydrochalkons beim Frischgetränk deutlich größer ($11,5 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$ im Vergleich zu $3,6 \mu\text{mol}/24 \text{ h}$). Ebenso wie bei der aktiven Fraktion ist bei diesem Prüfprodukt für 3-O-MA (**84**) eine länger anhaltende Exkretion über den gesamten Interventionszeitraum feststellbar. Für das gelagerte Produkt erfolgt diese nur im 0-4 h-Intervall. Auch konnten die beiden glucuronidierten und methylierten Metabolite **91** und **95** sowie die intakten Dihydrochalkone nicht mehr identifiziert werden ($\rightarrow c_{\text{med}} = 0$).

Der Vergleich beider Humanstudien hinsichtlich des Metabolitvorkommens deutete bereits auf eine ausgeprägtere Verstoffwechslung von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) nach dem Konsum von Rooibostee und aktiver Fraktion hin (siehe 2.3.2.1). Dieses schlägt sich auch in den Gehalten nieder: Für den Hauptmetaboliten 3-O-MA (**84**) wurde beispielsweise eine $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ von 48 (Rooibostee) bzw. $144 \mu\text{mol}\cdot\text{h}$ (aktive Fraktion) ermittelt. Damit werden die Werte der 2. Humanstudie (36 (frisches Fertiggetränk) bzw. $7 \mu\text{mol}\cdot\text{h}$ (gelagertes Fertiggetränk)) deutlich übertroffen.

Allerdings sind die geringe Zahl untersuchter Probanden und die unterschiedlichen Aspalathinausgangsgelalte zu beachten (siehe 6.4). Wird dazu der prozentuale Anteil der 0-24 h-Ausscheidung der Metabolite des Dihydrochalkons an der Flavonoiddosis betrachtet, ergibt sich ein anderes Bild. Aufgrund der geringeren Gesamtflavonoidmenge des Frischgetränks im Vergleich zum Rooibostee liegt dieser bei beiden Prüfprodukten auf ungefähr gleichem Niveau ($1,9 \%$ bzw. $1,8 \%$). Der höchste Wert wurde mit $5,9 \%$ nach Gabe der aktiven Fraktion gefunden. In Relation zur Aspalathindosis folgen prozentuale Anteile von $6,7$ (aktive Fraktion), $3,1$ (frisches Fertiggetränk), $2,4$ (Rooibostee) und $1,7 \%$ (gelagertes Fertiggetränk). Vergleicht man diese Zahlen mit den Wiederfindungsraten anderer Polyphenole, so liegen diese im Bereich der Werte für Anthocyane ($0,004$ - $5,1 \%$) sowie Quercetin-O-glucoside ($0,3$ - $6,4 \%$) und sind damit in Bezug auf das Isoflavon Daidzin ($21,4$ - $62,0 \%$) und die Hydroxybenzoesäure Gallussäure ($36,4$ - $39,6 \%$) als gering einzustufen (MANACH et al., 2005).

Für sämtliche relevanten Aspalathinmetabolite wird das Ausscheidungsmaximum c_{max} bei den vier Prüfprodukten bereits nach 0-4 h durchlaufen, was auf eine sehr schnelle Ausschleusung ($t_{50\%}$: 0-4 h) der verabreichten Dosis aus dem Organismus hindeutet. Abbildung 2.46 fasst abschließend den kumulativen Anteil aller pro Zeitintervall detektierten Metabolite des Dihydrochalkons in Relation zur Aufnahmemenge für den Rooibostee, die aktive Fraktion

und die Fertiggetränke zusammen. Zusätzlich ist der zeitliche Verlauf der Exkretion von 3-O-MA (**84**), das bei allen Prüfprodukten einen Beitrag von über 90 % zur eliminierten Gesamtmetabolitmenge von Aspalathin (**16**) leistet, dargestellt.

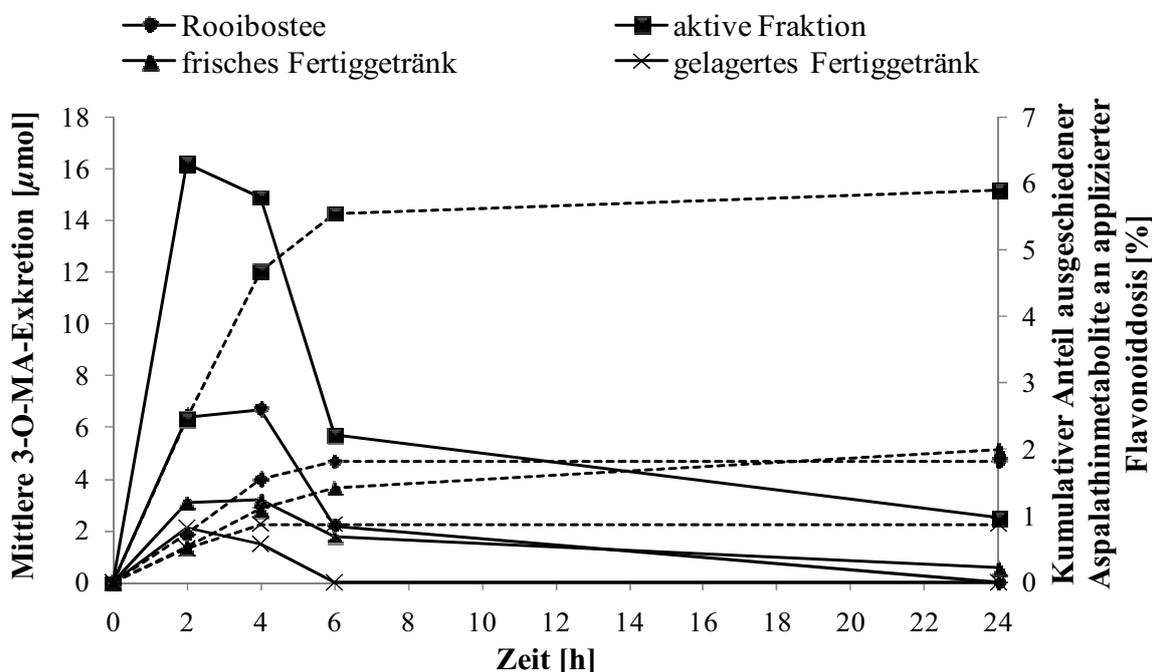


Abbildung 2.46: Median aus den 3-O-MA-Konzentrationen (durchgezogene Linien) nach oraler Applikation von je 500 mL der vier Rooibosformulierungen unter Angabe des kumulativen Anteils aller relevanten Aspalathinmetabolite in Relation zur applizierten Aspalathindosis (gestrichelte Linien – Sekundärachse)

Die Höchstmenge c_{\max} von 3-O-MA (**84**) wurde nach Applikation der aktiven Fraktion im 0-2 h-Urin ($16,2 \mu\text{mol}$) gemessen und entspricht ungefähr der doppelten Menge, die für den Rooibostee ($6,7 \mu\text{mol}$) ermittelt wurde. Das frische und gelagerte Fertiggetränk folgen mit $3,2$ bzw. $2,1 \mu\text{mol}$.

Metabolite der Flavon-C/O-, Flavanon-C- und Flavonol-O-glykoside

Tabelle 2.38 liefert eine Übersicht über den zeitlichen Verlauf der renalen Ausscheidung der intakten Flavone, Flavanone und Flavonole, der korrespondierenden Aglyka sowie jeweils ihrer Metabolite unter Angabe von c_{med} , c_{IVmin} , c_{IVmax} , $t_{50\%}$ sowie der AUC und Detektionsrate (falls $\sum c_{\text{med}} = 0$ für beide Prüfprodukte). Die für die Glucuronide **81**, **82**, **100**, **101**, **102** und **104** sowie die methylierten Derivate des (*R/S*)-Eriodictyol-6/8-C-glucosids (z.B. **113**) angegebenen Werte stellen jeweils die Summe aller pro Zeitintervall erfassten Stellungs-isomere dar. Weitere Details zur Auswertung sind in Abschnitt 4.5.12.2 aufgeführt.

Im Vergleich zur 1. Humanstudie konnten deutlich mehr Zielverbindungen bei einer signifikanten Probandenzahl, insbesondere nach Gabe des Frischgetränks detektiert werden ($\rightarrow c_{\text{med}} > 0$). Deren Gehalte im 0-24 h Urin ($\sum c_{\text{med}}$) korrelieren im Allgemeinen mit der

applizierten Flavoniddosis. Im Vordergrund steht wie bei der 1. Humanstudie die Verstoffwechslung der aus den intakten C- und O-Glykosiden hervorgehenden Aglyka Luteolin (**28**), Quercetin (**29**), Eriodictyol (**30**) und Apigenin (**31**). Die Gesamtgehalte ihrer Glucuronide liegen nach Verabreichung des Frischgetränks im Bereich von 0,1 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ (Luteolin-O-glucuronid (z.B. **82**)) und 1,3 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ (Apigenin-O-glucuronid (z.B. **102**)). Besondere Relevanz hat für Luteolin (**28**) die renale Ausscheidung als methyliertes und glucuronidiertes Konjugat (0,6 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ – siehe 2.2.8.1).

Tabelle 2.38: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der renalen Exkretion identifizierter Flavone, Flavanone und Flavonole sowie deren Metaboliten nach oraler Applikation von je 500 mL des frischen und gelagerten Fertiggetränks (keine Detektion der Zielverbindungen vor Prüfproduktgabe)^a

Zeitintervall [h]	Fertiggetränk, frisch (n = 4)				Fertiggetränk, gelagert (n = 4)			
	0-2	2-4	4-6	8-24	0-2	2-4	4-6	8-24
Quercetin-O-glcS (z.B. 81)	c_{med}	0	0,01	0,03	<u>0,1</u>	0	0	0
	c_{IVmin}	0	0,01	0,1	0,3	0,1	0	0
	c_{IVmax}	0,1	0,03	0,3	0,5	0,1	0,04	0
	AUC _{0-24h}	1,7	$t_{50\%}$	8-24	AUC _{0-24h}	0,1	$t_{50\%}$	0-2
Me-O-quercetin-O-glcS (z.B. 101)	c_{IVmin}	0	0	0	0	0	0	0
	c_{IVmax}	0,1	0	0,1	0,1	0	0	0
	Detektionsrate	1	–	1	1	–	–	–
Apigenin-O-glcS (z.B. 102)		0	0	0,5	<u>0,8</u>	0	0	0
		0	0	1,0	0,4	0	0	0
		0	0,2	5,3	9,2	0	0	0,8
	AUC _{0-24h}	11,6	$t_{50\%}$	8-24	AUC _{0-24h}	0	$t_{50\%}$	–
Luteolin-O-glcS (z.B. 82)	<u>0,1</u>	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0
	0,4	0	1,5	0	0,3	0,1	0,1	0
	AUC _{0-24h}	0,1	$t_{50\%}$	0-2	AUC _{0-24h}	0	$t_{50\%}$	–
Luteolin-di-O-glcS (106)	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0,2	0	0	0
	–	–	–	–	1	–	–	–
Me-O-luteolin-O-glcS (z.B. 104)	<u>0,4</u>	0,1	0,1	0	0,1	<u>0,1</u>	0,03	0
	0,3	0,1	0,1	0	0,1	0,2	0,1	0
	0,7	0,2	0,6	0	0,3	0,2	0,1	0
	AUC _{0-24h}	1,5	$t_{50\%}$	0-2	AUC _{0-24h}	0,6	$t_{50\%}$	2-4
Eriodictyol-O-glcS (z.B. 100)	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,3	1,3	5,1	0	0	0	0	3,5
	1	1	1	–	–	–	–	1
Isoorientin (11)	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0,01	0	0	0	0	0	1,0
	–	1	–	–	–	–	–	1
Orientin (14)	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0,1	0	0	0,1	0	0	0,4
	–	1	–	–	1	–	–	1
Me-O-isoorientin (107)	0	<u>0,03</u>	0,01	0	0,01	<u>0,02</u>	0	0
	0	0,04	0,03	0	0,02	0,02	0	0
	0,1	0,1	0,04	0	0,05	0,03	0	0
	AUC _{0-24h}	0,2	$t_{50\%}$	2-4	AUC _{0-24h}	0,1	$t_{50\%}$	2-4
Isoorientin-O-sulfat (111)	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,03	0	0	0	0	0	0	0
	1	–	–	–	–	–	–	–
Vitexin (21)	0	0	0	0	0,01	<u>0,03</u>	0	0
	0	0	0	0	0,03	0,02	0	0
	0,1	0,1	0,03	0	0,04	0,05	0	0

Zeitintervall [h]	Fertiggetränk, frisch (n = 4)				Fertiggetränk, gelagert (n = 4)			
	0-2	2-4	4-6	8-24	0-2	2-4	4-6	8-24
	AUC _{0-24h}	0	t _{50%}	–	AUC _{0-24h}	0,1	t _{50%}	2-4
Luteolin-O-hexosid-O-glcS(112)	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0,1	0	0,03	0	0	0
	–	–	1	–	1	–	–	–
Quercetin-O-hexosid-O-glcS (114)	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0,1	0	0	0
	–	–	–	–	1	–	–	–
Eriodictyol (30)	0,6	0,4	0	0	0	0,8	0,8	0
	0,5	0,8	0	0	0	0,3	0,6	0
	1,6	0,9	3,0	9,7	1,7	2,7	1,3	12,8
	AUC _{0-24h}	1,9	t _{50%}	0-2	AUC _{0-24h}	9,7	t _{50%}	2-4
(R/S)-Me-O-eriodictyol-6/8-C-glu (z.B. 113)	0,05	0,1	0,05	0	0,3	0,3	0,2	0
	0,1	0,2	0,1	0	0,2	0,3	0,2	0
	0,1	0,3	0,2	0	0,5	0,3	0,2	0
	AUC _{0-24h}	0,8	t _{50%}	2-4	AUC _{0-24h}	2,9	t _{50%}	2-4
(R/S)-Eriodictyol-6/8-C-glu-O-glcS (134)	0	0	0	0	0,1	0,03	0	0
	0	0	0	0	0,1	0,1	0	0
	0	0	0	0	0,1	0,3	0,3	0
	AUC _{0-24h}	0	t _{50%}	–	AUC _{0-24h}	0,3	t _{50%}	0-2

^ac_{med}, Median der Metabolitkonzentrationen am jeweiligen Messintervall; c_{IVmin}/c_{IVmax}, Minimal- und Maximalkonzentration am Messintervall; AUC, Fläche unterhalb der Konzentrations-Zeit-Kurve; t_{50%}, Ausscheidungshalbwertszeit – c_{med}, $\sum c_{IV}$ und c_{IVmin}/c_{IVmax} in μmol , AUC_{0-24h} in $\mu\text{mol}\cdot\text{h}$, t_{50%} in h. c_{IVmin} gibt den kleinsten gemessenen Wert an und lässt Probanden, bei denen die Metabolite nicht nachgewiesen wurden, unberücksichtigt. glcS, glucuronid; Me, Methyl; glu, glucosid

Die Exkretion über die intakten Flavonoide bzw. deren Metabolite ist angesichts der geringen Detektionsraten ($\rightarrow \sum c_{\text{med}}$ zumeist 0) in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der 1. Humanstudie ein unerheblicher Prozess.

Aufgrund höherer Ausgangsgehalte der vier (R/S)-Eriodictyol-6/8-C-glucoside **9**, **10**, **15** und **17** konnten die sich von den vier Flavanonen ableitenden Metabolite **113** und **134** im Vergleich zum Frischgetränk in erster Linie nach Gabe des gelagerten Produkts mit einer eliminierten Gesamtmenge von ca. 0,9 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ (Frischgetränk: 0,2 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$) in größeren Mengen bestimmt werden (siehe 2.1.4.1). Die Eliminierungshalbwertszeit t_{50%} wird für beide Verbindungen bereits nach 0-2 h erreicht. Auch Eriodictyol (**30**) folgt mit 1,6 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ für das gelagerte und 1,0 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ für das frische Produkt diesem Trend.

Abbildung 2.47 fasst den zeitlichen Verlauf der renalen Exkretion von Aspalathin (**16**) über die (R/S)-Eriodictyol-6/8-C-glucoside **9**, **10**, **15** und **17** für das frische und gelagerte Fertiggetränk sowie die aktive Fraktion (keine Detektion der Zielverbindungen nach Zufuhr des Rooibostees) zusammen. Die eliminierte Gesamtsumme ist beim gelagerten Fertiggetränk mit 2,5 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$ am größten und übersteigt die des Frischgetränks (1,2 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$) und der aktiven Fraktion (0,4 $\mu\text{mol}/24\text{ h}$) um das 2- bzw. 6-fache. Die für das gelagerte Produkt besondere Bedeutung dieses Stoffwechselwegs wird bei Betrachtung des Verhältnisses der Metabolite der (R/S)-Eriodictyol-6/8-C-glucoside **9**, **10**, **15** und **17** zu denen des Dihydrochalkons deutlich. Dieses steigt von 0 (Rooibostee) über 0,01 (aktive Fraktion) bis auf 0,1 (Frischgetränk) und schließlich 0,7 für das gelagerte Fertiggetränk. Der prozentuale Anteil der 0-24 h-Ausscheidung an der Flavonoiddosis beträgt für das zuletzt genannte Prüfprodukt

0,6 %. In Bezug auf die applizierte Aspalathinmenge ergeben sich 1,1 %. Nach oraler Applikation des gelagerten Fertiggetränks wird das Ausscheidungsmaximum (c_{\max} : 1,2 μmol) nach 0-4 h, für das Frischgetränk bereits nach 0-2 h und für die aktive Fraktion erst nach 4-6 h erreicht.

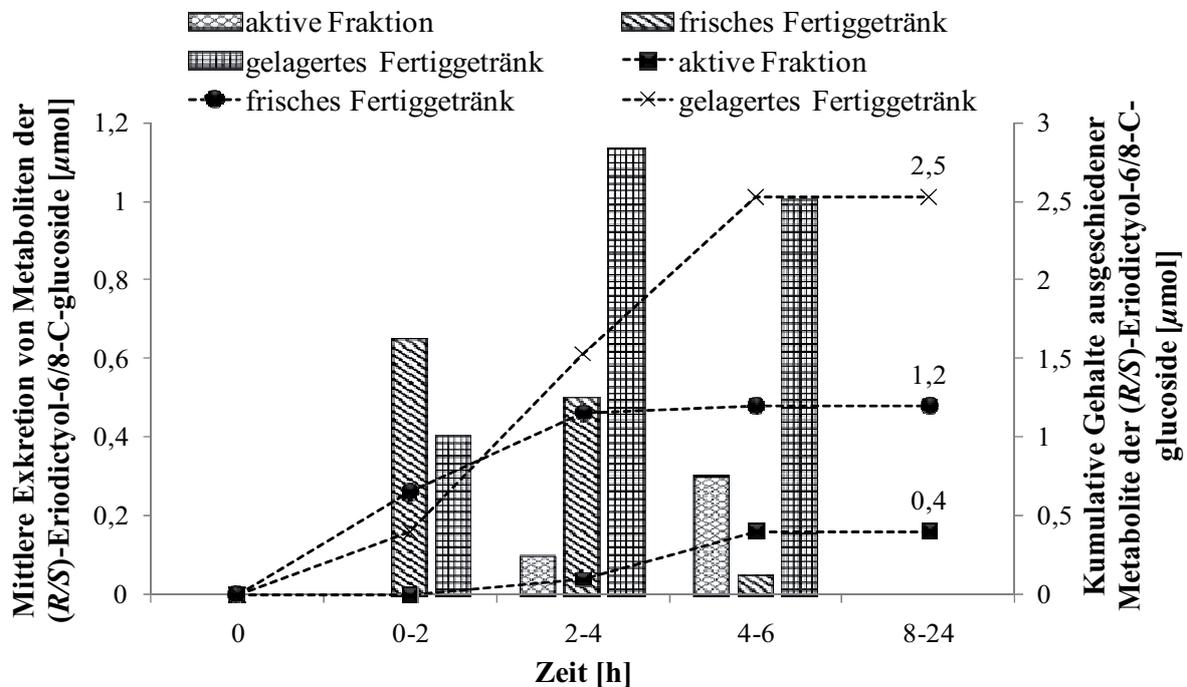


Abbildung 2.47: Gesamtgehalt ausgeschiedener Metabolite der (R/S)-Eriodictyol-6/8-C-glucoside **9**, **10**, **15** und **17** in Abhängigkeit vom Zeitintervall (Säulendiagramm) unter Angabe der kumulativen Gesamtkonzentrationen (Liniendiagramm – Gehalte auf Sekundärachse aufgetragen)

Insgesamt belegen diese Zahlen, dass bei dem gelagerten Erzeugnis die Metabolisierung der Eriodictyol-C-glucoside an Bedeutung gewinnt. STALMACH et al. (2009) konnten mit Eriodictyol-O-sulfat und KREUZ et al. (2008) mit methyliertem sowie zweifach glucuronidiertem Eriodictyol zwei weitere, potentielle Metabolite dieser Verbindungen charakterisieren.

Phenolische Abbauprodukte

Abbildung 2.48 zeigt die Zeitprofile zur renalen Ausscheidung der aus dem mikrobiellen Dickdarmabbau der Polyphenole entstehenden Hippur- (**127**) und 3/4-Hydroxyhippursäure (**128**, **129**).

Die Kurvenverläufe entsprechen denen bei der 1. Humanstudie. So ist mit Ausnahme eines Anstiegs der Gehalte für die Hydroxyhippursäure **129** im 0-2 h-Intervall unabhängig vom Prüfprodukt für alle Metabolite eine Abnahme in Relation zur Ausgangskonzentration am Zeitpunkt t_0 im 0-6 h-Urin festzustellen. Im letzten Untersuchungszeitraum ist sowohl für das gelagerte als auch das frische Fertiggetränk eine signifikante Zunahme der renalen Ausscheidung insbesondere von Hippursäure (**127**) zu beobachten. Die eliminierten Mengen sind

vergleichbar (Anstieg um $134 \mu\text{mol}$ (Frischgetränk) bzw. $146 \mu\text{mol}$ (gelagertes Getränk)), liegen damit aber im Einklang mit den applizierten Flavoniddosen deutlich unterhalb der Werte für den Rooibostee ($302 \mu\text{mol}$) und die aktive Fraktion ($224 \mu\text{mol}$). Bei der 2. Humanstudie wurden die 8-24 h-Urinproben nach Gabe des Placebos nicht aufgearbeitet, so dass im Gegensatz zur 1. Humanstudie der durch die Flavonoide verursachte tatsächliche Anteil an der Hippursäureexkretion nicht ermittelt werden konnte (siehe 2.2.8.1). Allerdings ist von einem sehr viel geringeren Beitrag auszugehen.

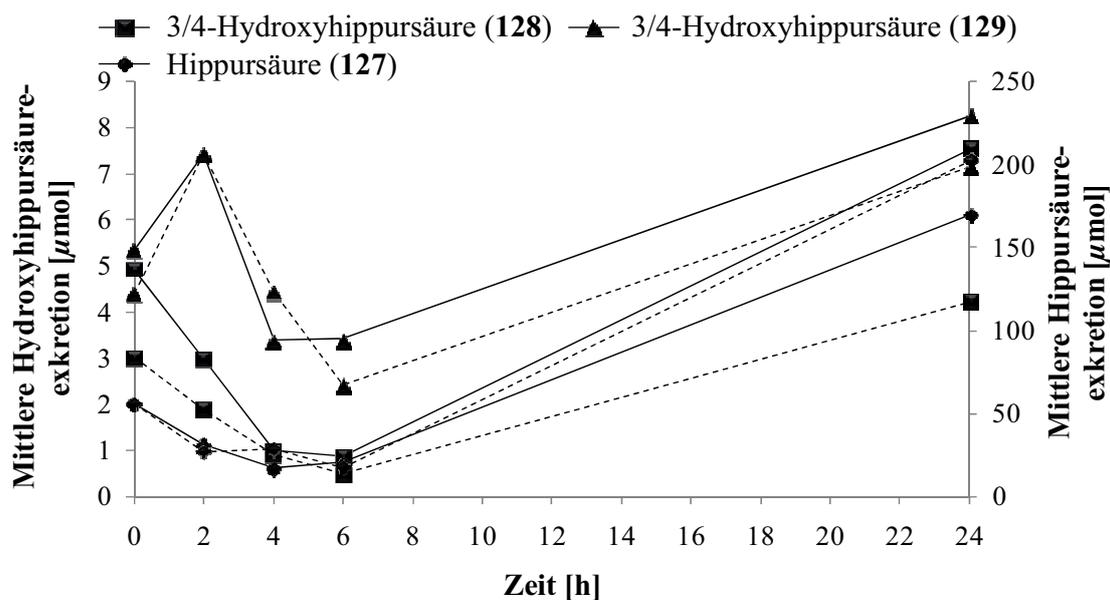


Abbildung 2.48: Zeitprofile zur renalen Ausscheidung (in μmol , $n = 4$) von Hippursäure (127) und der beiden Hydroxyhippursäuren 128 und 129 nach oraler Gabe von je 500 mL des frischen (durchgezogene Linien) bzw. gelagerten Fertiggetränks (gestrichelte Linien – Hippursäuregehalte auf Sekundärachse aufgetragen)

Für die Hydroxyhippursäuren 128 und 129 ergeben sich nach Verabreichung beider Fertiggetränke mit Konzentrationszunahmen im Bereich von $1\text{-}3 \mu\text{mol}$ ebenfalls geringere Werte als nach Zufuhr von Rooibostee und aktiver Fraktion ($3\text{-}20 \mu\text{mol}$). Gleiches trifft auf Minorabbauprodukte wie die 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure (123) zu.

2.3.3.2 Plasma

In Tabelle 2.39 sind die zum Zeitpunkt t_{max} ermittelten Höchstmengen c_{max} von Isoorientin (11), Orientin (14), Aspalathin (16), Rutin (18), Isovitexin (20) und Vitexin (21) nach Gabe von je 500 mL des frischen und gelagerten Fertiggetränks aufgeführt. Die prozentualen Wiederfindungsraten WFR sind in Relation zu den berechneten, theoretischen Höchstmengen in 1 mL Plasma auf Basis der mit dem Prüfprodukt aufgenommenen Menge des jeweiligen Flavonoids angegeben (siehe 2.2.8.2).

Tabelle 2.39: Zusammenstellung der Höchstmengen (c_{\max}) intakter Flavonoide (in $\mu\text{mol/mL}$), die in den Plasmaproben der Probanden 1-9 zum Zeitpunkt t_{\max} (in h) nach Verabreichung von je 500 mL des frischen bzw. gelagerten Fertiggetränks bestimmt wurden.^a

Proband	Isoorientin (11)				Orientin (14)				Aspalathin (16)			
	frisch		gelagert		frisch		gelagert		frisch		gelagert	
	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}
1	0,09	0,5	ND	–	0,06	0,5	ND	–	1,28	0,5	ND	–
2	0,43	3	0,07	1,5	0,14	3	ND	–	4,56	3	2,44	1,5
3	0,04	1,5	0,14	0,5	0,02	1,5	0,06	0,5	0,56	1,5	1,52	0,5
4	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–
5	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–
6	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	0,68	1,5
7	0,02	3	0,06	1,5	ND	–	0,04	1,5	ND	–	0,54	1,5
8	0,02	3	0,04	1,5	ND	–	0,01	3	ND	–	ND	–
9	0,08	0,5	0,05	0,5	0,07	0,5	0,06	3	0,96	0,5	0,77	0,5
Mittelwert	0,08		0,04		0,03		0,02		0,82		0,66	
\pm	\pm		\pm		\pm		\pm		\pm		\pm	
SD	0,14		0,05		0,05		0,03		1,49		0,84	
WFR [%]	0,33		0,22		0,17		0,11		0,62		0,77	

Proband	Rutin (18)				Isovitexin (20)				Vitexin (21)			
	frisch		gelagert		frisch		gelagert		frisch		gelagert	
	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}	c_{\max}	t_{\max}
1	0,02	0,5	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–
2	0,19	0,5	ND	–	0,13	0,5	ND	–	0,16	0,5	ND	–
3	0,003	1,5	0,04	0,5	ND	–	0,05	0,5	ND	–	0,03	0,5
4	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–
5	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–
6	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–
7	ND	–	0,01	1,5	ND	–	0,03	0,5	ND	–	0,03	0,5
8	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–
9	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–	ND	–
Mittelwert	0,02		0,01		0,02		0,01		0,02		0,01	
\pm	\pm		\pm		\pm		\pm		\pm		\pm	
SD	0,06		0,06		0,04		0,02		0,05		0,01	
WFR [%]	0,31		0,11		0,65		0,45		0,56		0,25	

^a t_{\max} , Zeitpunkt der gemessenen Höchstkonzentration; c_{\max} , quantifizierte Höchstmengung; SD, Standardabweichung; ND, nicht detektiert. Die Wiederfindungsrate WFR stellt den Anteil der tatsächlich quantifizierten Flavonoidmenge im Vergleich zu der aufgenommenen Menge des jeweiligen Flavonoids dar.

Die Betrachtung der Zeitpunkte t_{\max} , an denen die Höchstmengen c_{\max} der jeweiligen Flavonoide erreicht wurden, ergibt ein uneinheitliches Bild. Tendenzen lassen sich nicht ablesen. Bei der Analyse aller Messwerte ist jedoch ersichtlich, dass die untersuchten Flavonoide - unabhängig vom verabreichten Prüfprodukt - größtenteils bereits nach 0,5 h in den Plasmaproben der Probanden nachweisbar sind, was für eine schnelle Resorption im Dünndarm spricht. Die Verweilzeit im Plasma scheint in intakter Form von kurzer Dauer zu sein, da die Detektion der Zielverbindungen ebenso wie bei der 1. Humanstudie zumeist an nur einem der drei Messpunkte gelang. Die Analyse der durchschnittlichen Gehalte zum

Zeitpunkt t_{\max} zeigt eine Korrelation mit den zugeführten Flavonoidmengen. Dementsprechend folgen für das Frischgetränk höhere Werte als für das gelagerte Produkt.

Aspalathin (**16**) ist mit 0,8 im frischen und 0,7 $\mu\text{mol/mL}$ im gelagerten Fertiggetränk wie bei der 1. Humanstudie das Hauptflavonoid, gefolgt von Isoorientin (**11**) und Orientin (**14**). Insgesamt lag die Gesamtmenge der Zielverbindungen zum Zeitpunkt t_{\max} nach Gabe des Frischgetränks bei ca. 1,0 $\mu\text{mol/mL}$, was einer Bioverfügbarkeit von 0,5 % entspricht; für das gelagerte Erzeugnis folgen 0,7 $\mu\text{mol/mL}$ (Bioverfügbarkeit: 0,6 %). Trotz höherer Flavonoiddosis waren bei der 1. Humanstudie nur 0,8 (Rooibostee) bzw. 0,4 $\mu\text{mol/mL}$ (aktive Fraktion) bioverfügbar. Diese Diskrepanz hat ihre Ursache vor allem in den Aspalathingehalten, die nach Gabe beider Fertiggetränke - insbesondere beim Probanden „2“ - wesentlich höher als bei der 1. Humanstudie sind. Infolgedessen ergibt sich für das Dihydrochalkon mit 0,6 % nach Gabe des frischen und 0,8 % für das gelagerte Fertiggetränk eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit. Bei Isoorientin (**11**), Orientin (**14**), Rutin (**18**), Isovitexin (**20**) und Vitexin (**21**) liegt dagegen eine Korrelation mit den applizierten Mengen vor.

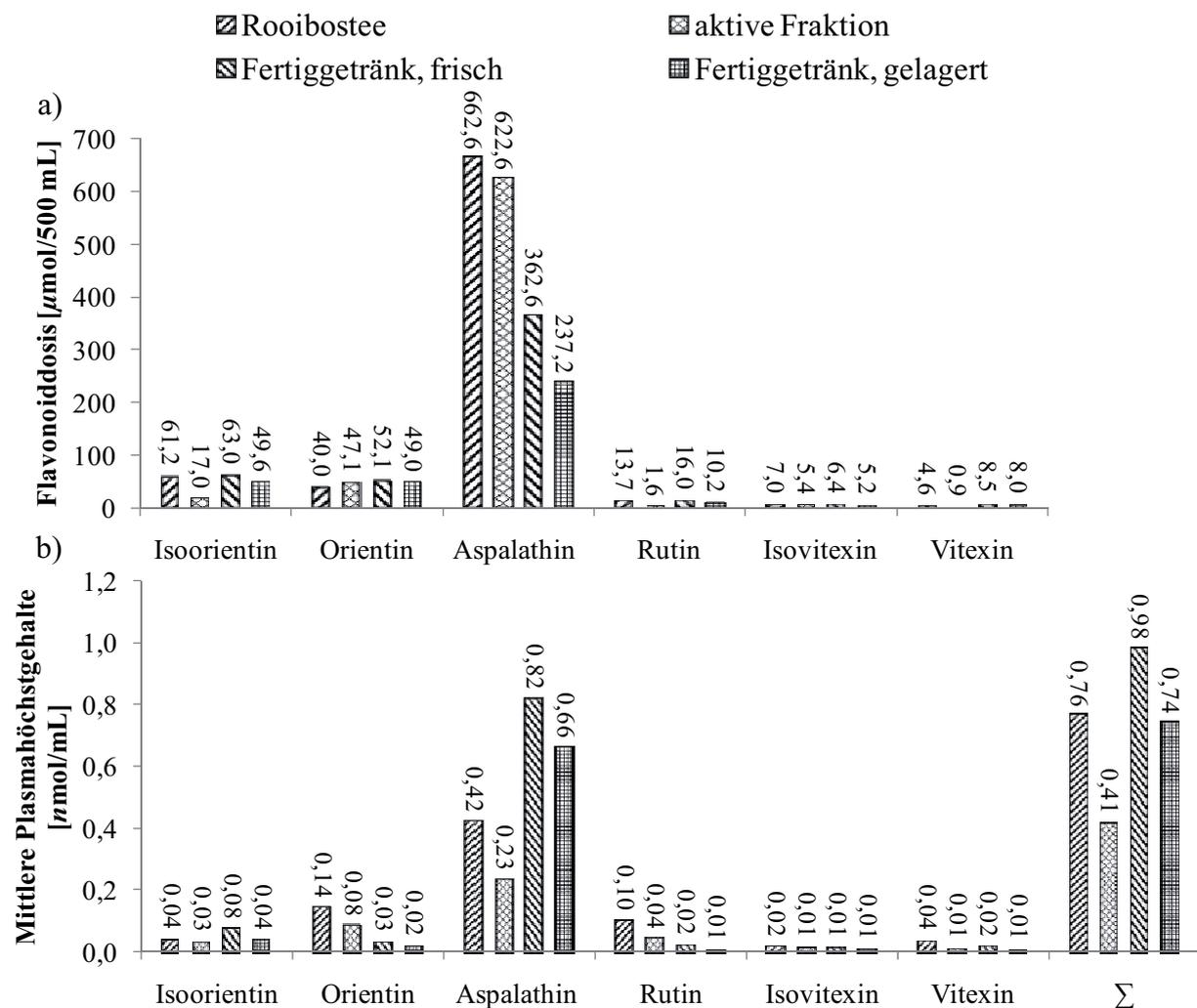


Abbildung 2.49: Gegenüberstellung der applizierten Mengen von sechs Rooibosflavonoiden (a) und ihrer durchschnittlichen Plasmahöchstgehalte c_{\max} (b)

Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 2.49 die mit den vier Rooibosformulierungen aufgenommenen Mengen der sechs Flavonoide (a) sowie deren durchschnittliche Plasmahöchstgehalte c_{\max} zum Zeitpunkt t_{\max} (b) dargestellt. Diese spiegeln für Isoorientin (**11**), Isovitexin (**20**) und Vitexin (**21**) in etwa die Relationen in den jeweiligen Prüfprodukten wider. Orientin (**14**) weicht von diesem Trend ab. Während der Gehalt des Flavons in den vier Prüfprodukten ungefähr gleich ist, ist dessen Bioverfügbarkeit nach Gabe des Rooibostees und der aktiven Fraktion deutlich größer als nach Konsum der Fertiggetränke.

In Tabelle 2.40 sind die Mediane aus den Konzentrationen (c_{med}) für die einzelnen Flavonoide mit den jeweiligen Maximal- und Minimalgehalten ($c_{\text{IVmax}}/c_{\text{IVmin}}$) aufgeführt.

Tabelle 2.40: Überblick über den zeitlichen Verlauf der Zirkulation intakter Flavonoide im Plasma der neun untersuchten Probanden nach oraler Applikation von je 500 mL des frischen bzw. gelagerten Fertiggetränks (keine Detektion der Zielverbindungen vor Prüfproduktgabe)^a

Messzeitpunkt [h]	Fertiggetränk, frisch (n = 9)			Fertiggetränk, gelagert (n = 9)			
	0,5	1,5	3	0,5	1,5	3	
Isoorientin (11)	c_{med}	0	0	0	0	0	
	c_{IVmin}	0,08	0,04	0,02	0,01	0,03	0,01
	c_{IVmax}	0,40	0,31	0,43	0,14	0,07	0,03
Orientin (14)		0	0	0	0	0	
		0,06	0,02	0	0,04	0,02	0,01
		0,13	0,11	0,14	0,06	0,04	0,01
Aspalathin (16)		0	0	0	0	0	
		0,57	0,01	0	0,50	0,22	0,02
		3,16	1,88	4,56	1,52	0,98	0,03
Rutin (18)		0	0	0	0	0	
		0,02	0	0	0	0	0
		0,19	0	0	0,04	0,01	0
Isovitexin (20)		0	0	0	0	0	
		0	0	0	0,03	0	0
		0,13	0	0	0,05	0	0
Vitexin (21)		0	0	0	0	0	
		0	0	0	0,03	0	0
		0,16	0	0	0,03	0	0
Hyperosid (22)		0	0	0	0	0	
		0,09	0	0	0	0	0
		0,13	0,08	0,95	0,11	0,07	0
Isoquercitrin (23)		0	0	0	0	0	
		0	0	0	0	0	0
		0	0	0	0,031	0	0
Nothofagin (25)		0	0	0	0	0	
		0,36	0	0	0,06	0,26	0
		1,09	0,09	0	0,97	1,57	0

^a c_{med} , Median der Flavonoidkonzentration am jeweiligen Messpunkt; $c_{\text{IVmin}}/c_{\text{IVmax}}$, Minimal- und Maximalkonzentration am jeweiligen Messpunkt – c_{med} und $c_{\text{IVmin}}/c_{\text{IVmax}}$ in nmol/mL. c_{IVmin} gibt den kleinsten gemessenen Wert an und lässt Probanden, bei denen die Metabolite nicht nachgewiesen wurden, unberücksichtigt.

Aufgrund der geringen Detektionsrate liegen die Mediane für alle Zielverbindungen im 0-3 h-Plasma bei null. Die Ursache ist vermutlich in den Gesamtflavonoidgehalten der beiden

Fertiggetränke zu sehen, die im Vergleich zu der aktiven Fraktion und dem Rooibostee deutlich niedriger sind (siehe 6.4). Infolgedessen ist das Ausmaß der Verstoffwechslung bei der 1. Humanstudie größer ($\rightarrow c_{\text{med}} > 0$ – siehe Tabelle 2.33).

Somit werden die Ergebnisse der Analyse der Urinproben bestätigt (siehe 2.3.3.1). Die Rooibosflavonoide werden in intakter bzw. deglykosylierter Form infolge der größeren Flavoniddosis offenbar verstärkt nach oraler Applikation des Teeaufgusses und der aktiven Fraktion resorbiert. Daraus resultieren auf Basis der Mediane c_{med} für beide Prüfprodukte höhere Bioverfügbarkeitsraten für die intakten Flavonoide im Plasma, ein insgesamt breitgefächerteres Metabolitspektrum im Urin sowie deutlich größere Gesamtmengen renal eliminiertes Metabolite.

Abbildung 2.50 fasst abschließend die Metabolisierung von Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**) zusammen. Durch die vorliegende Arbeit konnte für beide Verbindungen gezeigt werden, dass diese zwar im Dünndarm in intakter Form oder nach Deglykosylierung zu den korrespondierenden Aglyka resorbiert werden, ein Großteil der applizierten Dosis allerdings unverändert in den Dickdarm gelangt. Dort finden mikrobielle Abbaureaktionen statt, die zu niedermolekularen phenolischen Säuren führen. Diese werden teilweise rückresorbiert und weiter verstoffwechselt oder direkt ausgeschieden.

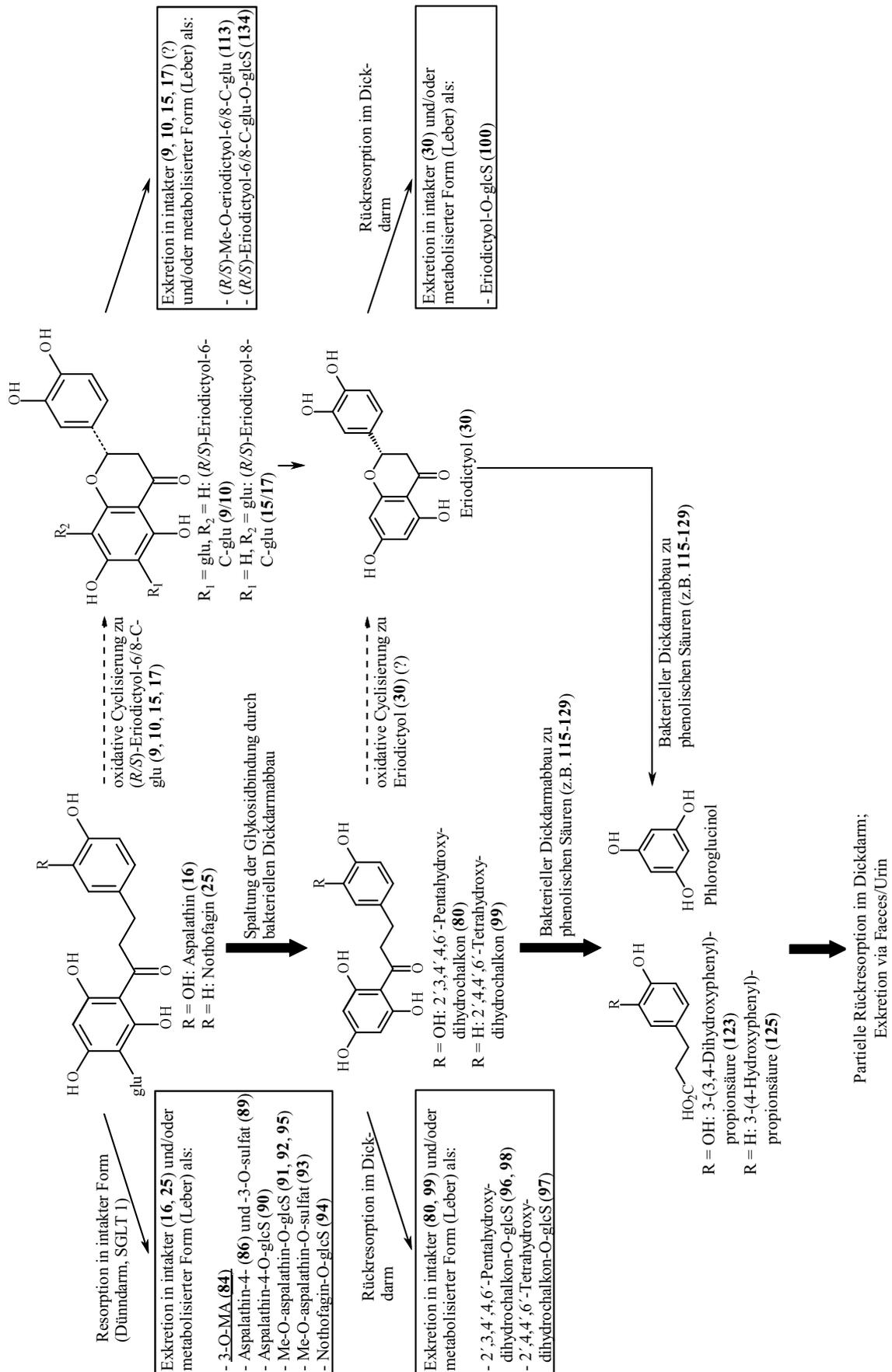


Abbildung 2.50: Schematische Darstellung der Metabolisierung der Dihydrochalkon-C-glucoside Aspalathin (**16**) und Nothofagin (**25**). glu, glucosid; glcS, glucuronid; Me, Methyl; MA, Methyl-aspalathin

3 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden qualitative und quantitative Bestimmungen polyphenolischer Bestandteile des Rooibos (*Aspalathus linearis*) durchgeführt sowie deren Veränderungen bei Extraktion und Lagerung untersucht.

Hierbei gelang via LC-ESI-MS/MS der Nachweis bislang unbekannter Derivate der Dihydrochalkon-C-glycoside Aspalathin und Nothofagin (z.B. 2',3,4',4,6'-Pentahydroxy- und 2',4,4',6'-Tetrahydroxy-dihydrochalkon-3',5'-di-C-hexosid). Des Weiteren konnten einige für den Rooibos neue Verbindungen der Flavonoidglyka Luteolin, Apigenin, Quercetin und Eriodictyol (z.B. Luteolin- und Apigenin-6,8-di-C-hexosid) ebenfalls per LC-ESI-MS/MS identifiziert werden. Ferner wurden erstmals Daten zu Vorkommen und Gehalten von Flavan-3-olen, Hydroxycimtsäurederivaten und Proanthocyanidinen im fermentierten und unfermentierten Rooibos publiziert. Beide Pflanzenmaterialien enthalten weiterhin eine Vielzahl C-verknüpfter Glykoside, insbesondere Flavon-C-glykoside. Quantitativ dominieren Mono-C-glykoside (z.B. Isoorientin) gegenüber Di-C- (z.B. Isoschaftosid) und O-glykosiden (z.B. Flavonol-O-glykoside wie Hyperosid und Rutin). Aspalathin ist mit ca. 8,0 % im unverarbeiteten und 0,4 % im verarbeiteten Rooibos Hauptverbindung. Die unterschiedlichen Gehalte beruhen auf der "Fermentation" und sind Ursache für das geringere antioxidative Potential des fermentierten Produkts.

Bei Lagerversuchen mit Fertiggetränken, die unter Zugabe eines Extrakts des unverarbeiteten Rooibos bereitet wurden, zeigte sich, dass die Kühlung der Produkte (+4 °C) essentielle Voraussetzung zur Vermeidung eines vorzeitigen Abbaus von Aspalathin ist. Dabei entstehen vorwiegend (*R*)- und (*S*)-Eriodictyol-6-C-glucosid, die ihrerseits zu Isoorientin und Orientin weiterreagieren können. Parallel werden höhermolekulare Verbindungen gebildet (z.B. Aspalathin-Dimere). Ähnliche Umsetzungen wurden erstmals auch für Nothofagin beschrieben.

Zur Evaluierung der Verstoffwechslung der Rooibosflavonoide wurden in Kooperation mit der Leibniz Universität Hannover zwei placebo-kontrollierte Humanstudien im Cross-over-Design durchgeführt. Als Prüfprodukte kamen bei der 1. Humanstudie ein haushaltsüblicher Teeaufguss aus grünem Rooibos, eine aus demselben Material isolierte aktive Fraktion und ein Placebo (Wasser), bei der 2. Humanstudie ein frisches (siehe oben) und ein gelagertes Fertiggetränk gleicher Rezeptur sowie ein Placebo (Fertiggetränk ohne Rooibosextrakt) zum Einsatz. Die aktive Fraktion stellt diejenige mittels High-Speed Countercurrent Chromato-

graphy (HSCCC) isolierte Fraktion dar, die bei einem *in vitro*-Bioaktivitätsscreening (TEAC) das höchste antioxidative Potential zeigte. Sie enthielt Aspalathin als Hauptbestandteil und wurde standardisiert verabreicht. An den drei Untersuchungstagen wurden Blut- und Urinproben vor und nach Prüfproduktgabe gewonnen. Die Analyse des Probenmaterials erfolgte per LC-ESI-MS/MS. Zur sicheren Peakzuordnung wurden Phase-II-Metabolite des Aspalathins zum Teil erstmalig synthetisiert und strukturell aufgeklärt (z.B. Aspalathin-4-O-sulfat).

In den Plasmaproben der Probanden konnten nach Gabe der Rooibosformulierungen erstmals intakte Flavonoide detektiert werden. Die durchschnittlichen Maximalgehalte korrelierten im Allgemeinen mit den Aufnahmemengen und lagen für Aspalathin zwischen 0,2 (aktive Fraktion) und 0,8 $\mu\text{mol/L}$ (Frischgetränk). Die bioverfügbare Gesamtmenge der sechs Rooibosflavonoide Isoorientin, Orientin, Aspalathin, Rutin, Isovitexin und Vitexin lag im Bereich von 0,2 % (aktive Fraktion) bis 0,6 % (gelagertes Fertiggetränk).

Im 0-24 h-Urin konnten neben intaktem Aspalathin insgesamt sechs Phase-II-Umsetzungsprodukte des Dihydrochalkons identifiziert werden (glucuronidiertes, sulfatiertes, methyliertes, methyliertes und glucuronidiertes sowie methyliertes und sulfatiertes Aspalathin und das glucuronidierte Aglykon von Aspalathin). Bei dem methylierten Konjugat handelt es sich um 3-O-Methylaspalathin, bei den sulfatierten Produkten um Aspalathin-3-O-sulfat und -4-O-sulfat. Das Metabolitspektrum von Nothofagin fiel deutlich kleiner aus. Als einziger Metabolit der unveränderten Verbindung trat die noch nicht beschriebene glucuronidierte Form auf. Ferner gelang mit 2',4,4',6'-Tetrahydroxy-dihydrochalkon-O-glucuronid die Bestätigung eines neuen Metaboliten des Aglykons von Nothofagin.

Unabhängig von der Rooibosformulierung erfolgte die Exkretion von Aspalathin primär nach Methylierung bzw. Methylierung und Glucuronidierung. 3-O-Methylaspalathin war mit Gehalten von 3,6 (gelagertes Fertiggetränk) bis 39,3 $\mu\text{mol/24 h}$ (aktive Fraktion) Hauptmetabolit. Der Gesamtanteil im 0-24 h-Urin eliminiertes Aspalathinmetabolite lag in Relation zur Flavoniddosis im Bereich von 0,9 (gelagertes Fertiggetränk) bis 5,9 % (aktive Fraktion). Die Eliminierungshalbwertszeiten wurden für alle Prüfprodukte bereits nach 0-4 h erreicht. Das Ausmaß der Verstoffwechslung von Nothofagin war wesentlich geringer. Quantitativ bedeutend ist dessen Exkretion in unveränderter Form (Rooibostee: 2,0 $\mu\text{mol/24 h}$).

Erstmals konnte gezeigt werden, dass Aspalathin *in vivo* zu (*R/S*)-Eriodictyol-6/8-C-glucosiden biotransformiert und als Metabolite dieser Verbindungen (z.B. als (*R/S*)-Methyl-O-eriodictyol-6/8-C-glucosid und (*R/S*)-Eriodictyol-6/8-C-glucosid-O-glucuronid) ausgeschieden wird. An Relevanz gewinnt dieser Stoffwechselweg beim gelagerten Fertiggetränk (eliminierte Gesamtsumme: 2,5 $\mu\text{mol/24 h}$).

Für die Flavon-C- und Flavonol-O-glykoside ist eine vorwiegende renale Exkretion als Monoglucuronide der korrespondierenden Aglyka festzustellen. Daneben konnten erstmals einige Metabolite intakter C-glykoside (z.B. Methyl-O-isoorientin) bestätigt werden. Die mit dem 0-24 h-Urin ausgeschiedenen Metabolitmengen waren unabhängig vom Prüfprodukt äußerst gering.

Die Applikation der Rooibosformulierungen löste einen beträchtlichen mikrobiellen Dickdarmabbau der Polyphenole zu niedermolekularen phenolischen Säuren aus. Ein drastischer dosisabhängiger Anstieg der Exkretion insbesondere des Stoffwechsellendprodukts Hippursäure (Rooibostee: +131 μmol) war die Folge.

Für Aspalathin als qualitativ und quantitativ wichtigsten Rooibosbestandteil bleibt festzuhalten, dass dessen Bioverfügbarkeit unabhängig von der Matrix äußerst gering ist. Entsprechend löste die Gabe der Rooibosformulierungen keinen Anstieg des antioxidativen Potentials der Plasmaproben aus. Mit Blick auf die Bewertung möglicher gesundheitlicher Wirkungen des Rooibos ist es somit fragwürdig, ob nach einmaliger oder wiederholter Applikation unmittelbare biologische Effekte *in vivo* auftreten können.

Für eine solche Einschätzung ist auch das Essverhalten von Bedeutung. In der täglichen Ernährung spielt Rooibostee beispielsweise im Vergleich zu Orangensaft, mit dem eine hohe Dosis des besser resorbierten Flavanons Hesperidin zugeführt werden kann, eine untergeordnete Rolle. Dihydrochalkon-C-glucoside gehören daher - auch aufgrund ihrer geringen Verbreitung - nicht zu den dominierenden zirkulierenden Polyphenolen im menschlichen Organismus. Ihre Akkumulation ist aufgrund der geringen Verweilzeit im Plasma und der kurzen Eliminierungshalbwertszeit der korrespondierenden Metabolite unwahrscheinlich.

Ungeachtet der Resorption im Dünndarm gelangt der Großteil der Aspalathindosis in den Dickdarm, wo ein mikrobieller Abbau zu niedermolekularen phenolischen Säuren stattfindet. Diese werden teilweise rückresorbiert und erreichen so vor der Exkretion das Kreislaufsystem. Der nicht aufgenommene Teil wird direkt mit dem Faeces eliminiert.

Für die Entwicklung neuartiger Lebensmittel ist angesichts der ernährungsphysiologischen Eigenschaften von Aspalathin eine gezielte Verbesserung der Bioverfügbarkeit wünschenswert. Dieser Effekt konnte bei *in vitro*-Versuchen für das Flavanon Hesperitin durch gleichzeitige Applikation spezifischer Flavonoide (z.B. Chrysin) erzielt werden. Möglicherweise kann diese Strategie auch auf Aspalathin übertragen werden. Eine weitere Perspektive ist die Nano-Verkapselung. Bei dieser Technik werden z.B. bioaktive Wirkstoffe zum Schutz vor nachteiligen äußeren Einflüssen in eine nanogroße Kapsel verpackt, um die Bioverfügbarkeit zu verbessern.

4 Material und Methoden

4.1 Pflanzenmaterial

1) **Rooibos fermentiert** (ca. 20 kg)

Art. 167508, Ch. 17103899, Plantextrakt GmbH & Co. KG (Vestenbergsreuth)

2) **Rooibos grün** (ca. 16,5 kg)

Art. 167485, Ch. 17101961, Plantextrakt GmbH & Co. KG (Vestenbergsreuth)

4.2 Chemikalien und Lösungsmittel

- Acetobromoglucuronsäuremethylester, Apollo Scientific LTD (Bredbury, UK)
- Aceton, p.a., Carl Roth (Karlsruhe)
- Acetonitril, HPLC- und LC-MS-Qualität, Honeywell GmbH (Seelze)
- Amberlite[®] XAD7, Merck (Darmstadt)
- Ameisensäure, p.a., > 98 %, Carl Roth (Karlsruhe)
- Apigenin, Carl Roth (Karlsruhe)
- Ascorbinsäure, reinst, Merck (Darmstadt)
- Aspalathin (isolierter Standard)
- 2,2'-Azino-bis-(-3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS), Diammoniumsalz, mind. 98 %, Sigma-Aldrich (Steinheim)
- *n*-Butanol, p.a., Fisher Scientific (Loughborough, UK)
- (+)-Catechin-Hydrat, ≥ 98 %, Sigma-Aldrich (Steinheim)
- (+)-Catechin-(4 α →2)-phloroglucinol (isolierter Standard)
- Catechol-O-Methyltransferase (COMT), MP Biomedicals (Illkirch, F)
- Citronensäure, p.a., wasserfrei, Sigma-Aldrich (Steinheim)
- Citronensäure-Phosphat-Puffer nach McIlvaine (pH 3,5): bestehend aus 69,7 mL 0,1 mol Citronensäure- (wasserfrei) und 30,3 mL 0,1 mol Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat-Lösung
- Chloroform, HPLC, Sigma-Aldrich (Steinheim)
- *n*-Chlorogensäure, ≥ 97 %, Carl Roth (Karlsruhe)

- Chrysoeriol, Carl Roth (Karlsruhe)
- Coffein, wasserfrei, purum, Fluka (Buchs, CH)
- *p*-Cumarsäure, Sigma-Aldrich (Steinheim)
- Dichlormethan, p.a., Fisher Scientific (Loughborough, UK)
- 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure, 98 %, Fluka (Buchs, CH)
- Dimethylsulfoxid-d₆, 99,8 %, Deutero GmbH (Kastellaun)
- Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, puriss. p.a., Merck (Darmstadt)
- Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat (Na₂H₂EDTA), puriss. p.a., ≥ 98 %, Sigma-Aldrich (Steinheim)
- Dioxan, HPLC, Sigma-Aldrich (Steinheim)
- (-)-Epicatechin, p.a., Sigma-Aldrich (Steinheim)
- (-)-Epicatechin-(4β→2)-phloroglucinol (isolierter Standard)
- Eriodictyol, Carl Roth (Karlsruhe)
- Essigsäure, HPLC- und LC-MS-Qualität, Fisher Scientific (Loughborough, UK) bzw. Sigma (Steinheim)
- Ethanol, p.a., mind. 99,8 %, Honeywell Riedel-de Haën (Seelze)
- Ethylacetat, p.a., Fisher Scientific (Loughborough, UK)
- Ferulasäure, purum, > 98 %, Fluka (Buchs, CH)
- Folin-Ciocalteu Phenolreagenz, Merck (Darmstadt)
- Gallussäure-Monohydrat, Fluka (Buchs, CH)
- *n*-Hexan, technisch (destilliert)
- Hippursäure, 99 %, Honeywell Riedel-de Haën (Seelze)
- 3- und 4-Hydroxyphenylelessigsäure, 99 %, Sigma-Aldrich (Gillingham, UK)
- 3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure, ≥ 98 %, Sigma-Aldrich (Steinheim)
- Hyperosid (isolierter Standard)
- Isoquercitrin (isolierter Standard)
- Isoorientin, Carl Roth (Karlsruhe)
- Isovitexin, Carl Roth (Karlsruhe)
- Kaliumcarbonat, puriss. p.a., Honeywell Riedel-de Haën (Seelze)
- Kaliumperoxodisulfat (K₂S₂O₈), p.a., Honeywell Riedel-de Haën (Seelze)
- Luteolin, PhytoLab (Vestenbergsgreuth)
- Luteolin-7-O-glucosid (isolierter Standard)
- Luteolin-O-glucuronid (isolierter Standard)
- Methanol, HPLC, Fisher Scientific (Loughborough, UK)
- *N,N*-Dimethylformamid, HPLC, Carl Roth (Karlsruhe)
- Natriumacetat, wasserfrei, p.a., Honeywell Riedel-de Haën (Seelze)
- Natriumcarbonat, wasserfrei, p.a., ≥ 99 %, Fluka (Darmstadt)
- Nothofagin (isolierter Standard)

- Orientin, Carl Roth (Karlsruhe)
- Phloretin (isolierter Standard)
- Phloroglucinol, p.a., Merck (Darmstadt)
- Quercetin, Carl Roth (Karlsruhe)
- Quercetin-O-glucuronid (isolierter Standard)
- Rutin, Sigma-Aldrich Co. Ltd. (St. Louis, USA)
- S-Adenosyl-Methionin (SAM), 32 mM Lösungen, New England BioLabs (Frankfurt am Main)
- Salzsäure, mind. 37 %, Honeywell Riedel-de Haën (Seelze)
- Schwefeltrioxid-Triethylamin-Komplex, > 95 %, TCI Europe (Antwerpen, B)
- *tert*-Butylmethylether (TBME), technisch (destilliert)
- Trolox[®] (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure), purum, > 98 %, Fluka (Buchs, CH)
- Vitexin, Carl Roth (Karlsruhe)
- Wasser, doppelt deionisiert (Nanopure[®], Barnstead, W. Werne (Gimbtel))

4.3 Geräte und Parameter

Photometer

Gerät :	Shimadzu UV-2101PC UV-VIS Scanning Spectralphotometer
Software :	UV-2101PC
Küvetten :	Sarstedt Einwegküvetten, 2,5 mL (Semimikro), d = 10 mm Hellma [®] Präzisionsküvetten aus Quarzglas Suprasil [®] , Typ Nr.: 101-QS, d = 10 mm

4.3.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

a) Analytische HPLC

Pumpe:	Series 1200 – Bin Pump G1312A (Agilent, Waldbronn)
Probenaufgabe:	Series 1200 – Autosampler ALS G1329A, ALS Therm G1330B (Agilent, Waldbronn)
Säulenofen:	Series 1200 – Colcom G1316A (Agilent, Waldbronn)
Detektor:	Series 1200 – DAD G1315D (Agilent, Waldbronn)
Datenverarbeitung:	ChemStation Software Version B.03.01 (Agilent, Waldbronn)

b) Präparative HPLC

Pumpe:	System Gold - Programmable Solvent Module 126 (Beckman, Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
Probenaufgabe:	Handeinspritzung (100 μ L Injektionsschleife)
Detektor:	System Gold - Diode Array Detector Module 168 (Beckman, Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
Datenverarbeitung:	System Gold - The Personal Chromatograph Version GoldV711

4.3.1.1 Fließmittel, Gradienten und Säulen für die HPLC und LC-MS/MSHPLC analytisch:**Methode I: Quantifizierung der Rooibosflavonoide nach methanolischer und wässriger Extraktion (siehe 4.5.1 und 4.5.2)**

Fließmittel A:	2 % Essigsäure, aq
Fließmittel B:	100 % Acetonitril
Flussrate:	0,8 mL/min
Messwellenlängen:	287, 324, 354 nm
Säulenofen:	20 °C
Injektionsvolumen:	10-20 μ L
Trennsäule:	Luna Phenyl-Hexyl (5 μ m, 250 x 4.6 mm i. D. – Phenomenex [®] , Aschaffenburg) mit Phenyl-Vorsäulenkartusche (4 x 3 mm i. D. – Phenomenex [®] , Aschaffenburg)
Gradient:	6 % B in 10 min auf 14 % \rightarrow in 40 min auf 25 % B \rightarrow in 18 min auf 55 % B \rightarrow 10 min isokratisch bei 55 % B \rightarrow in 1 min auf 60 % B – Ende der Datenerfassung \rightarrow 10 min isokratisch bei 60 % B \rightarrow in 1 min auf 6 % B \rightarrow 10 min konditionieren – Methodenende: 100 min

Methode II: Quantifizierung der Flavan-3-ole (Catechine) (siehe 4.5.4)

Fließmittel A:	9 % Acetonitril, aq; 2 % Essigsäure mit 20 μ g/mL Na ₂ H ₂ EDTA, aq
Fließmittel B:	80 % Acetonitril, aq; 2 % Essigsäure mit 20 μ g/mL Na ₂ H ₂ EDTA, aq
Flussrate:	1 mL/min
Messwellenlänge:	278 nm
Säulenofen:	35 °C
Injektionsvolumen:	10-20 μ L
Trennsäule:	Luna Phenyl-Hexyl (5 μ m, 250 x 4.6 mm i. D. – Phenomenex [®] , Aschaffenburg) mit Phenyl-Vorsäulenkartusche (4 x 3 mm i. D. – Phenomenex [®] , Aschaffenburg)
Gradient:	mit 0 % B 15 min isokratisch \rightarrow in 15 min auf 32 % B \rightarrow 5 min isokratisch – Ende der Datenerfassung: 35 min \rightarrow in 1 min auf 100 % B

→ 9 min mit 100 % B spülen → in 1 min auf 0 % B → 20 min mit 0 % B konditionieren – Methodenende: 66 min

Methode III: Quantifizierung der Polyphenole nach Anreicherung (siehe 4.5.3)

Fließmittel A: 2 %ige Essigsäure, aq
Fließmittel B: 100 % Acetonitril
Flussrate: 0,5 mL/min
Messwellenlängen: 287, 324, 354 nm
Temperatur: 20 °C
Injektionsvolumen: 10-20 µL
Trennsäule: Luna Phenyl-Hexyl (5 µm, 250 x 4,6 mm i. D. – Phenomenex®, Aschaffenburg) mit Vorsäule Nucleosil 100, C-18 (5 µm, 10 x 4,6 mm i. D. – Techlab, Erkerode)
Gradient: 6 % B in 10 min auf 14 % → in 30 min auf 25 % B → in 20 min auf 55 % B → in 5 min auf 95 % B – Ende der Datenerfassung → 10 min isokratisch mit 95 % B → in 1 min auf 6 % B → 9 min konditionieren – Methodenende: 85 min

Methode IV: Quantifizierung der Hydroxyzimtsäurederivate (siehe 4.5.5)

Fließmittel A: 2 %ige Essigsäure, aq
Fließmittel B: 100 % Acetonitril
Flussrate: 1 mL/min
Messwellenlänge: 324 nm
Säulenofen: 20 °C
Injektionsvolumen: 10-20 µL
Trennsäule: ODS-Hypersil (5 µm, 250 x 4,6 mm i. D. – Thermo Scientific, Karlsruhe) mit Vorsäule Nucleosil 100, C-18 (5 µm, 10 x 4,6 mm i. D. – (Techlab, Erkerode)
Gradient: mit 6 % B 15 min isokratisch → in 5 min auf 12 % B → 25 min isokratisch mit 12 % B → in 1 min auf 100 % B → 10 min mit 100 % B spülen → in 1 min auf 6 % B – Ende der Datenerfassung: 60 min → 20 min konditionieren – Methodenende: 77 min

Methode V: Quantifizierung der Proanthocyanidine und Abbauprodukte nach Phloroglucinolyse (siehe 4.5.6 und 4.5.7)

Fließmittel A: 2 %ige Essigsäure, aq
Fließmittel B: 100 % Acetonitril
Flussrate: 0,8 mL/min
Messwellenlänge: 280 nm
Temperatur: RT

Injektionsvolumen: 10-20 μL
Trennsäule: Aqua (5 μm , 250 x 4,6 mm i. D. – Phenomenex[®], Aschaffenburg) mit Vorsäule Nucleosil 100, C-18 (5 μm , 10 x 4,6 mm i. D. – Techlab, Erkerode)
Gradient: 3 % B in 25 min auf 10 % → in 20 min auf 35 % B → in 5 min auf 75 % B – Ende der Datenerfassung → 5 min isokratisch mit 75 % B → in 5 min auf 3 % B → 10 min konditionieren – Methodenende: 70 min

Methode VI: Inkubation von Aspalathin und Nothofagin (siehe 4.5.9)

Fließmittel A: 2 %ige Essigsäure, aq
Fließmittel B: 100 % Acetonitril
Flussrate: 0,8 mL/min
Messwellenlängen: 287, 354, 450 nm
Temperatur: 20 °C
Injektionsvolumen: 20 μL
Trennsäule: Luna Phenyl-Hexyl (5 μm , 250 x 4,6 mm i. D. – Phenomenex[®], Aschaffenburg) mit Vorsäule Nucleosil 100, C-18 (5 μm , 10 x 4,6 mm i. D. – Techlab, Erkerode)
Gradient: 6 % B in 15 min auf 17 % → in 15 min auf 30 % B → in 10 min auf 50 % B → in 2 min auf 95 % B – Ende der Datenerfassung → 8 min isokratisch bei 95 % B → in 1 min auf 6 % B → 9 min konditionieren – Methodenende: 60 min

Methode VII: Analyse der Plasma- und Urinproben (siehe 4.5.12.1 & 4.5.12.2)

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

HPLC präparativ:

Methode VIII: Isolierung von Aspalathin-4-O-sulfat (siehe 4.5.13.2)

Fließmittel A: 2 %ige Essigsäure, aq
Fließmittel B: 100 % Acetonitril
Flussrate: 3,5 mL/min
Messwellenlänge: 287 nm
Injektionsvolumen: 100 µL
Trennsäule: Hypersil 120 ODS (5 µm, 250 x 16 mm i. D. – Thermo Scientific, Karlsruhe)
Gradient: 6 % B in 1 min auf 14 % → in 5 min auf 18 % B → in 20 min auf 95 % B – Ende der Datenerfassung → 10 min isokratisch bei 95 % B → in 1 min auf 6 % B → 10 min konditionieren – Methodenende: 47 min

4.3.2 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)

Tabelle 4.1: Überblick über die verwendeten LC-MS/MS-Parameter

LC-MS/MS-Parameter	HPLC-Methoden gemäß Abschnitt 4.3.1.1							
	I	II	III	IV	V	VI	VII a)	VII b)
LC-MS-Anlage	II	II	II	II	II	I	I	II
Injektionsvolumen [μL]	10-20	10-20	10-20	10-20	10-20	20	50	20-50
Messmodus	negativ							
Dry Gas Temperature [$^{\circ}\text{C}$]	365	365	365	365	365	310	310	365
Dry Gas Flow [L/min]	10	12	10	12	11	10	10	10
Nebulizer Gas (N_2) [psi]	50	70	50	70	60	65	65	50
Capillary [V]	4000	3500	3500	4000	3500	3000	3000	4000
End Plate Offset [V]	-500	-500	-500	-500	-500	-500	-500	-500
Skimmer [V]	-40	-40	-40	-40	-40			-40
Skimmer 1 [V]						-25,5	-25,5	
Skimmer 2 [V]						-6,0	-6,0	
Cap Exit Offset [V]	-118	-109,9	-121,0	-113,7	-136,9	-69,7	-69,7	-118
Trap Drive	44,4	45,4	-48,1	50,5	81,7	46,0	46,0	44,4
Scan Range [m/z]	100- 800	100- 800	100- 900	100- 800	100- 1600	100- 800	100- 800	100- 800
Accu Time [ms]	200	200	200	200	200	200	200	200

4.3.3 High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)

Pumpe:	Beckman System Gold Programmable Detector Module 116
Coilvolumen:	800 mL (Schlauch ID 2,5 mm)
System:	HSCCC model CCC-100 (Pharma Tech Research)
Injektor:	Rheodyne 5041 4-Wegeventil, 30 mL Teflonschleife
Detektor:	Beckman System Gold Programmable Detector Module 166
Fraktionssammler:	LKB Bromma 2111 MULTIRAC

4.3.3.1 Fließmittelsysteme und Parameter für die HSCCC

a) Isolierung der aktiven Fraktion

Fließmittel:	Ethylacetat/n-Butanol/Wasser, 4,8/0,2/5 (v/v/v)
Fluss:	4 mL/min
Rotation:	800 U/min
Messwellenlänge:	354 nm
Modus:	Leichte Phase ist Stationäre Phase („Head to Tail“-Modus)

4.3.4 NMR-Spektroskopie

Gerät 1:	Bruker Avance II-600
Messfrequenz:	^1H : 600,1 MHz; ^{13}C : 150,9 MHz
Temperatur:	301,2 K

4.4 Standardmethoden

4.4.1 Extrahierbare Feststoffe (TSS)

In ein 100 mL-Becherglas werden 50 mL des wässrigen Extrakts nach 4.5.2 pipettiert und im Trockenschrank bei 103 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet.

4.4.2 Antioxidatives Potential (TEAC)

Die Durchführung des TEAC-Assays erfolgt nach dem von RE et al. (1999) beschriebenen Verfahren.

Arbeitslösungen und Standards

- *ABTS⁺-Stammlösung:*

38,41 mg ABTS (7 mmol) werden mit 6,63 mg (2,45 mmol) Kaliumperoxodisulfat (Kaliumpersulfat, K₂S₂O₈) in 10 mL Nanopure[®] gelöst und zur Bildung des Radikals für 12-16 h bei RT im Dunkeln stehen gelassen. Danach kann die Lösung für ca. sechs Wochen im Kühlschrank dunkel aufbewahrt werden.

- *ABTS⁺-Arbeitslösung:*

0,5 mL der Stammlösung werden mit ca. 50 mL Ethanol (p.a., ≥ 99,8 %) versetzt und auf eine Extinktion von 0,70 ± 0,02 eingestellt. 1 mL dieser Lösung werden in eine Semimikroküvette pipettiert und die Extinktion bei 734 nm gemessen (Leerwert E1).

- *Trolox[®]-Stammlösung:*

12,5 mg Trolox[®] werden in einen 10 mL-Messkolben eingewogen und mit Ethanol (p.a., ≥ 99,8 %) bis zur Marke aufgefüllt (5 mmol/L).

- *Trolox[®]-Standardlösungen:*

Von der Trolox[®]-Stammlösung werden 250, 500, 750 und 1000 µL (≡ 0,25-1,00 mmol Trolox[®]/L) in je einen 5 mL-Messkolben überführt und mit Ethanol (p.a., ≥ 98 %) bis zur Marke aufgefüllt.

Messung

Das Probenmaterial (→ HSCCC-Fractionen nach Abschnitt 4.5.10 sowie die lyophilisierten methanolischen und wässrigen Extrakte nach Abschnitt 4.5.1 und 4.5.2) wird in Ethanol gelöst und je nach zu erwartendem antioxidativen Potential verdünnt. Jeweils 20 µL Standard bzw. Probe werden in Semimikroküvetten vorgelegt, mit 1,5 mL ABTS⁺-Arbeitslösung versetzt und gründlich durchmischt. Nach genau 10 min Reaktionszeit wird die Extinktion der Lösungen bei 734 nm gegen Luft gemessen (E2). Von der Kalibrierreihe werden jeweils zwei

Messungen pro Standard durchgeführt und die Proben einer Drei- oder Vierfachbestimmung unterzogen.

Auswertung

Die Extinktionen der Kalibrier- bzw. Probelösungen (E2) werden von der Extinktion des Leerwertes (E1) subtrahiert und die resultierenden Extinktionsdifferenzen der Standardlösungen gegen die jeweiligen Trolox[®]-Konzentrationen aufgetragen. Mittels der Geradengleichung wird das antioxidative Potential der Proben unter Beachtung des Verdünnungsfaktors und der bestimmten Trockenmasse (RG: ca. 95 %; RF: ca. 92 %) als Troloxäquivalente (TE) berechnet.

4.4.3 Gesamtpolyphenolgehalt (nach Folin-Ciocalteu)

Die Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes erfolgt als Summenparameter nach einer Modifikation der Methode von SINGLETON & ROSSI (1965) und SINGLETON et al. (1999). Die Methode wird nach der für Tee in der ISO 14502-1 genormten Variante durchgeführt. Das Prinzip der Methode beruht auf der leichten Oxidierbarkeit phenolischer Verbindungen. Diese können im alkalischen Milieu aus Wolframat- und Molybdat-Ionen mit Phosphorsäure gebildete Komplexe zu blauen Farbpigmenten reduzieren. Die Intensität der entstehenden Färbung ist proportional zum Gehalt an oxidierbaren Stoffen und wird photometrisch bestimmt.

Arbeitslösungen und Standards

Die im Handel erhältliche 2N Folin-Ciocalteu-Lösung wird vor der Bestimmung 1:10 mit Nanopure[®] verdünnt.

- *7,5 %ige wässrige Natriumcarbonatlösung:*

37,5 g wasserfreies Na₂CO₃ werden in einen 500 mL Messkolben eingewogen und zunächst in ca. 250 mL Nanopure[®] gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wird bis zur Marke mit Nanopure[®] aufgefüllt.

- *Gallussäure-Standardlösungen:*

110 mg Gallussäure-Monohydrat werden in einen 100 mL-Messkolben möglichst genau eingewogen und bis zur Marke mit Nanopure[®] aufgefüllt. Von dieser Stammlösung werden 1, 2, 3, 4 und 5 mL in je einen 100 mL-Messkolben pipettiert und bis zur Marke mit Nanopure[®] aufgefüllt (≡ 10-50 mg/mL).

Messung

Gemessen werden die Lagerproben (siehe 4.5.8) und methanolischen Extrakte (siehe 4.5.1) nach 1:50-Verdünnung sowie die wässrigen Extrakte (siehe 4.5.2) nach 1:10- und 1:20-

Verdünnung. Der Reaktionsansatz erfolgt jeweils als Doppelbestimmung in einem 10 mL-Messkolben. Von sämtlichen Kalibrier- und Probelösungen werden jeweils 1 mL vorgelegt und zusätzlich ein Blindwert mit 1 mL Nanopure® angesetzt. Anschließend wird jeder Kolben über einen Dispenser mit 5 mL der Folin-Ciocalteu-Arbeitslösung und innerhalb von 3-8 min mit 4 mL der 7,5 %igen Natriumcarbonatlösung versetzt. Nach gründlichem Durchmischen werden die Kolben für mind. 60 min bei RT stehen gelassen und dann in 10 mm Küvetten bei 765 nm photometrisch vermessen.

Auswertung

Von der Extinktion der Proben- bzw. Standardlösungen wird die Extinktion des Blindwertes subtrahiert. Die Extinktionsdifferenzen der Standardlösungen werden gegen die jeweiligen Konzentrationen aufgetragen und die Regressionsgerade ermittelt. Die quantitative Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes der Proben erfolgte über die Geradengleichung unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und der Trockenmasse.

4.4.4 Verteilungsversuche für die HSCCC

Zur Ermittlung eines geeigneten Fließmittelsystems für das entsprechende Trennproblem werden zunächst Verteilungsversuche durchgeführt (ITO, 2005).

Durchführung

Einige mg der Probe werden in ein Schnappdeckelglas eingewogen und in 2 mL der wässrigen, schweren Phase (LP) des zu testenden Fließmittelsystems gelöst. Anschließend werden 2 mL der leichten Phase (UP) zugegeben und geschüttelt. Die Zeit bis zur vollständigen Phasentrennung wird bestimmt und sollte nicht mehr als 20 sec betragen. Danach wird ein Aliquot (500 µL) der oberen und unteren Phase in ein Vial überführt, im Stickstoffstrom getrocknet und schließlich der Rückstand in HPLC-Fließmittel aufgenommen.

Messung

Die obere und untere Phase werden jeweils getrennt mittels HPLC-DAD (Methode I – Abschnitt 4.3.1.1) analysiert.

Auswertung

Der Verteilungskoeffizient K einer Substanz lässt sich für den L-Modus (LP = mobile Phase) aus dem Peakflächenverhältnis von UP und LP nach Gleichung 4-1 ermitteln.

$$K = \text{Peakfläche } A_{UP} [\text{mAU} \cdot \text{sec}] / \text{Peakfläche } A_{LP} [\text{mAU} \cdot \text{sec}] \quad 4-1$$

Der optimale Bereich des Verteilungskoeffizienten liegt bei $0,5 \leq K \leq 1,0$.

4.4.5 Arbeitsschritte am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Humanernährung (Universität Hannover)

4.4.5.1 Herstellung der Prüfprodukte

a) Rooibostee

10 g des unfermentierten Rooibos werden mit 500 mL kochendem Wasser übergossen, genau 10 min extrahiert und anschließend filtriert.

b) aktive Fraktion

0,5 g der isolierten aktiven Fraktion werden analog der Vorgehensweise beim Rooibostee aufgearbeitet.

4.4.5.2 Gewinnung der Plasmaproben

Das Blutplasma wird durch Zentrifugation bei 2000 U/min für 10 min aus dem Vollblut gewonnen. Jeweils 1 mL des Überstandes wird in ein Reaktionsgefäß (Serum-Monovette) überführt. Zur Hemmung der Blutgerinnung wird eine Konservierungslösung, die aus 20 µL Ascorbat-EDTA-Lösung (0,4 M NaH₂PO₄ mit 20 % Ascorbinsäure und 0,1 % EDTA, pH 3,5) besteht, zugesetzt. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C bis zur weiteren Analyse (siehe 4.5.12.1).

4.4.5.3 Stabilisierung der Urinproben

Jeweils 20 mL der Urinsammelproben werden in ein spezielles Aufbewahrungsbehältnis überführt, in welchem 20 mg Ascorbinsäure und 0,5 mg EDTA vorgelegt sind. Die Proben werden bei -80 °C bis zur weiteren Untersuchung gelagert (siehe 4.5.12.2).

4.5 Analytische und präparative Methoden

4.5.1 Flavonoidbestimmung nach methanolischer Extraktion

Die methanolische Extraktion erfolgt analog der ISO-Norm ISO 14502-1. Es wird angenommen, dass unter den dort angegebenen Bedingungen alle relevanten Verbindungen vollständig extrahiert werden.

Durchführung

0,2 g fein gemahlener fermentierter bzw. unfermentierter Rooibos (Partikelgröße < 0,5 mm) werden mit 5 mL auf 70 °C temperiertem, 70 %igem MeOH versetzt und exakt 10 min im

Wasserbad bei 70 °C erhitzt. Zu Beginn der Extraktion sowie nach 5 und 10 min wird die Probe durch Vortexbehandlung gut durchmischt. Nach der Extraktion und dem Abkühlen auf RT wird der Extrakt mit 3500 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird in einen 10 mL Messkolben pipettiert; mit dem Rückstand wird eine zweite Extraktion analog des oben beschriebenen Verfahrens durchgeführt. Der Überstand wird ebenfalls in den 10 mL Messkolben dekantiert und anschließend mit 70 %igem MeOH bis zur Marke aufgefüllt.

Messung

Die methanolischen Extrakte (unverdünnt sowie 1:5- und 1:20-verdünnt) und Standardlösungen (siehe unten) werden per HPLC-DAD (Methode I – Abschnitt 4.3.1.1) gemessen (Doppel- oder Dreifachbestimmung). Aspalathin, Nothofagin, Eriodictyol und die (*R/S*)-Eriodictyol-6/8-C-glucoside werden bei einer Wellenlänge von 287 nm, die restlichen Flavonoide bei 354 nm detektiert. Zusätzlich werden Extrakte beider Pflanzenmaterialien per LC-MS/MS (siehe 4.3.2) analysiert.

- Standardlösungen:

Die Standards werden definiert in einen Messkolben eingewogen und mit DMF zur Marke aufgefüllt (→ Stammlösung). Aus dieser Stammlösung werden die Standardlösungen durch Verdünnen hergestellt. Nähere Angaben zu den Konzentrationsbereichen der verwendeten Referenzsubstanzen finden sich in Tabelle 4.2. Des Weiteren ist das jeweilige Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach der DIN-Norm 32645 angegeben. Der Mischstandard wird bei -20 °C verwahrt.

Tabelle 4.2: Überblick über das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645

Referenzsubstanz	Konzentrationsbereich [mg/L]	Bestimmtheitsmaß (R^2)	Nachweisgrenze (LOD) [mg/L]	Bestimmungsgrenze (LOQ) [mg/L]
Isoorientin	2,10-21,00	0,9999	1,413	5,410
Orientin	2,12-21,20	0,9999	0,164	0,688
Aspalathin	1,96-39,20	0,9995	2,708	9,644
Rutin	2,00-20,00	0,9999	0,603	2,423
Isovitexin	1,22-12,20	0,9998	1,041	3,913
Hyperosid	1,96-19,60	0,9999	0,360	1,479
Isoquercitrin	2,48-19,80	0,9998	1,615	6,051
Luteolin-7-O-glucosid	0,77-19,20	0,9998	0,906	3,299
Nothofagin	0,80-80,00	0,9992	13,868	52,283
Luteolin	0,56-14,00	0,9999	0,363	1,350
Quercetin	1,55-15,50	0,9999	0,319	1,307
Eriodictyol	2,50-20,00	0,9998	1,723	6,432
Apigenin	0,69-17,20	0,9999	0,504	1,867
Chrysoeriol	2,43-19,40	0,9998	2,270	8,349

Auswertung

Aus den erhaltenen Peakflächen der Standardlösungen wird in Kombination mit den jeweiligen Konzentrationen für jede Referenzsubstanz eine Regressionsgerade erstellt. Deren Geradengleichung dient als Kalibrierfunktion und die Konzentration der Zielverbindungen wird durch Einsetzen der Peakflächen unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungs- und Umrechnungsfaktors (siehe unten) sowie der Trockenmasse berechnet. Vitexin wird als Isovitexin, Quercetin-O-rutinosid (Isomer) als Rutin und Luteolin-O-hexosid als Luteolin-7-O-glucosid quantifiziert.

- *Umrechnungsfaktoren:*

- Luteolin zu Luteolin-6,8-di-C-hexosid: 2,13
- Luteolin zu Luteolin-6-C-pentosid-8-C-hexosid: 2,03
- Apigenin zu Apigenin-6,8-di-C-hexosid: 2,20
- Eriodictyol zu (*R/S*)-Eriodictyol-6/8-C-glucosid: 1,56
- Apigenin zu Isoschaftosid/Schaftosid: 2,09

Die methanolischen Extrakte werden darüber hinaus zur Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu (siehe 4.4.3) sowie der antioxidativen Aktivität (siehe 4.4.2) eingesetzt.

4.5.2 Flavonoidbestimmung nach wässriger Extraktion

Durchführung

Ca. 2 g Probe werden mit 200 mL siedendem Wasser (Nanopure[®]) aufgebrüht. Nach 10 min Ziehzeit wird der Aufguss filtriert. Der so gewonnene Extrakt wird als wässriger Extrakt bezeichnet.

Messung und Auswertung

Die Proben werden per HPLC-DAD (Methode I – Abschnitt 4.3.1.1) gemessen (Doppelbestimmung). Die restliche Auswertung erfolgt wie in Abschnitt 4.5.1 dargelegt.

Zusätzlich werden die Teeaufgüsse für die Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes nach Folin-Ciocalteu (siehe 4.4.3) sowie der antioxidativen Aktivität (siehe 4.4.2) herangezogen.

4.5.3 Polyphenolanreicherung durch Polyamid-Säulenchromatographie

Neben der direkten Bestimmung der Polyphenole (siehe 4.5.1) ist es möglich, der methanolischen Extraktion eine Polyamid-Säulenchromatographie zur Anreicherung dieser Verbindungen nachzuschalten. Im Waschschrift werden alle wasserlöslichen Stoffe wie Zucker und Säuren von den Zielverbindungen abgetrennt.

Herstellen der Lösungen

- *Standardlösungen*: Die Standards werden definiert in einen Messkolben eingewogen und mit DMF zur Marke aufgefüllt (→ Stammlösung). Aus dieser Stammlösung werden die Standardlösungen hergestellt. Genauere Informationen zu den Konzentrationsbereichen der verwendeten Referenzsubstanzen sind Tabelle 4.3 aufgeführt, die daneben das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN-Norm 32645 zusammenfasst.

- *Probenlösungen*: methanolische Extrakte gemäß Abschnitt 4.5.1 (unverdünnt)

Tabelle 4.3: Überblick über das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645. Die Daten zu Aspalathin befinden sich in **Tabelle 4.2**.

Referenzsubstanz	Konzentrationsbereich [mg/L]	Bestimmtheitsmaß (R^2)	Nachweisgrenze (LOD) [mg/L]	Bestimmungsgrenze (LOQ) [mg/L]
Isoorientin	2,63-42,00	0,9993	3,666	12,938
Orientin	2,65-42,40	0,9994	3,527	12,468
Rutin	2,00-40,00	0,9997	1,556	5,509
Isovitexin	1,53-24,40	0,9991	1,775	6,168
Hyperosid	2,45-19,60	0,9997	1,924	7,125
Isoquercitrin	1,98-19,80	0,9997	0,968	3,495
Luteolin-7-O-glucosid	1,30-32,40	0,9996	1,556	5,461
Nothofagin	0,80-80,00	0,9993	7,317	26,001

Durchführung

Die Vorkonditionierung des Polyamids (PA) erfolgt nach der Methode von FINGER (1991). 1,2 kg Polyamid SC 6 werden mit ca. 8 L Nanopure[®] und 1,5 L MeOH versetzt, gut durchmischt und der Ansatz über Nacht stehen gelassen. Der Überstand wird anschließend entfernt, der Vorgang ab Methanolzugabe zweimal wiederholt und das PA unter MeOH gelagert.

Eine Glassäule (15 x 2 cm i. D.) wird mit Glaswolle, Seesand, vorgequollenem PA (Füllhöhe: rund 10 cm) und erneut Glaswolle vorbereitet. Nach Konditionieren mit 250 mL Nanopure[®] kann die Probenaufgabe beginnen.

5 mL der methanolischen Extrakte werden in einen 50 mL-Spitzkolben pipettiert und am Rotationsverdampfer bis fast zur Trockene eingengt. Der methanolfreie Rückstand wird mit Nanopure[®] quantitativ auf die vorbereiteten PA-Säulen überführt. Die Säulen werden daraufhin mit 100 mL Nanopure[®] gewaschen und die Waschflüssigkeiten verworfen. Die Zielverbindungen werden mit 250 mL MeOH und anschließend mit weiteren 250 mL 0,5 %igem ammoniakalischen MeOH eluiert. Die Eluate werden jeweils fast zur Trockne eingengt, mit 4 mL DMF in einen 10 mL Messkolben überführt und schließlich mit Nanopure[®] bis zur Marke aufgefüllt.

Messung

Die Proben- (Dreifachbestimmung) und Standardlösungen werden per HPLC-DAD (Methode III – Abschnitt 4.3.1.1) untersucht. Aspalathin und Nothofagin werden bei 287 nm, die

übrigen Verbindungen bei 354 nm detektiert. Zusätzlich finden zur qualitativen Analyse der Eluate LC-MS/MS-Messungen (siehe 4.3.2) statt.

Auswertung

Die Auswertung erfolgt, wie in Abschnitt 4.5.1 erläutert.

4.5.4 Bestimmung der Flavan-3-ole (Catechine)

Herstellen der Lösungen

- *Stammlösung*: Coffein (2,0000 mg/mL)
- *Standardlösungen*: 1, 5, 50, 100, 150 mg/L (LOD: 1,032 mg/L; LOQ: 3,942 mg/L; R^2 : 0,9999 – nach DIN 32645)
- *Probenlösungen*: methanolische Extrakte gemäß Abschnitt 4.5.1 (unverdünnt und 1:5- bzw. 1:20-verdünnt)

Messung

Die Proben- (Vierfachbestimmung) und Standardlösungen werden per HPLC-DAD (Methode II – Abschnitt 4.3.1.1) bei 278 nm gemessen. Je eine Probe beider Pflanzenmaterialien wird auch per LC-MS/MS (siehe 4.3.2) untersucht.

Auswertung

Mittels der für die Standardlösungen resultierenden Peakflächen wird in Kombination mit den jeweiligen Konzentrationen eine Coffein-Kalibriergerade erstellt. Mit deren Kalibrierfunktion werden unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, der Trockenmasse und der relativen Responsefaktoren (RRF) die Gehalte der identifizierten Flavan-3-ole bestimmt. Die RRF wurden bei einem internationalen Ringversuch ermittelt und sind in der ISO 14502-2 enthalten.

- *Responsefaktoren (RRF)*: (+)-Catechin (C): $RRF = 3,58$; Coffein: $RRF = 1$; (-)-Epicatechin (EC): $RRF = 3,67$

4.5.5 Bestimmung der Hydroxyzimtsäurederivate

Herstellen der Lösungen

- *Stammlösungen*: *p*-Cumarsäure (20,52 mg/L), *n*-Chlorogensäure-Hemihydrat (5-Caffeoylchinasäureester – wasserfrei: 39,91 mg/L), Ferulasäure (20,52 mg/L)

Die Standardlösungen werden durch Verdünnung der Stammlösungen erhalten und liegen in den in Tabelle 4.4 angegebenen Konzentrationsbereichen. Das Bestimmtheitsmaß sowie die

Nachweis- und Bestimmungsgrenze der Kalibrierfunktionen nach DIN-Norm 32645 sind dort ebenfalls aufgeführt.

Tabelle 4.4: Überblick über das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645

Referenzsubstanz	Konzentrationsbereich [mg/L]	Bestimmtheitsmaß (R^2)	Nachweisgrenze (LOD) [mg/L]	Bestimmungsgrenze (LOQ) [mg/L]
<i>p</i> -Cumarsäure	0,08-2,04	0,9999	0,048	0,181
<i>n</i> -Chlorogensäure	0,16-3,99	0,9995	0,283	1,014
Ferulasäure	0,08-2,05	0,9999	0,060	0,222

- *Probenlösungen:* methanolische Extrakte gemäß Abschnitt 4.5.1 (unverdünnt)

Durchführung

Von den methanolischen Extrakten werden jeweils 5 mL in einen 50 mL-Spitzkolben pipettiert und am Rotationsverdampfer soweit eingengt, bis die Lösung methanolfrei ist. Der methanolfreie Rückstand wird mit Nanopure[®] quantitativ in einen 10 mL-Messkolben überführt und mit Nanopure[®] zur Marke aufgefüllt. Diese Lösung wird direkt zur SPE eingesetzt.

Nach Konditionierung der RP-18-Kartuschen mit 9 mL MeOH und 6 mL Nanopure[®] wird pro Kartusche 1 mL des methanolischen Extrakts aufgegeben und mit 9 mL Nanopure[®] quantitativ in einen 50 mL-Spitzkolben eluiert (Supelco-Vakuumkammer). Die Konditionierung der Kartusche, die Probenaufgabe und die Elution erfolgen pro Probe insgesamt viermal. Das Eluat (ca. 40 mL) wird danach am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 1 mL Nanopure[®] unter Ultraschallbadbehandlung aufgenommen. Nach Überführen der Lösung in einen 2 mL-Messkolben wird der Spitzkolben mit 1 mL Nanopure[®] gespült. Die Lösung wird ebenfalls in den Messkolben überführt und abschließend mit Nanopure[®] zur Marke aufgefüllt.

Messung

Proben- (Vierfachbestimmung) und Standardlösungen werden direkt zur HPLC-DAD-Messung (Methode IV – Abschnitt 4.3.1.1) bei 320 nm eingesetzt. Zur sicheren Substanzidentifizierung wird jeweils ein Eluat beider Pflanzenmaterialien per LC-MS/MS (siehe 4.3.2) analysiert.

Auswertung

Für jeden der drei Standards wird mittels der erhaltenen Peakflächen und der dazugehörigen Konzentrationen eine Regressionsgerade erstellt, die zur quantitativen Bestimmung unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, der Trockenmassen und der unten angegebenen Umrechnungsfaktoren herangezogen wird.

- *Umrechnungsfaktoren:* *p*-Cumarsäure zu 3-/4-/5-*p*CouQA: 2,06
 Ferulasäure zu 3-/4-/5-FQA: 1,90
 n-Chlorogensäure zu 3-/4-/5-CQA: 1,00

4.5.6 Bestimmung der Proanthocyanidine

Die Aufarbeitung erfolgt in Anlehnung an das von HILAL (2010) beschriebene Verfahren. Aufgrund der geringen zu erwartenden Gehalte an Proanthocyanidinen in fermentiertem und unfermentiertem Rooibos wird deren Auswertung und Quantifizierung ausschließlich per HPLC-DAD-MS/MS vorgenommen, um eine sichere Peakzuordnung zu gewährleisten.

Durchführung

a) Extraktion:

5 g der gemahlene Teeprobe werden mit 100 mL 70 %igem Aceton für 1 h bei RT extrahiert. Der Extrakt wird in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 4200 U/min für 12 min zentrifugiert. Nach Filtration des Überstands in einen Rundkolben wird der Rückstand für eine zweite Extraktion mit 150 mL 70 %igem Aceton unter den gleichen Bedingungen in das Extraktionsgefäß überführt. Die beiden Überstände werden vereinigt, am Rotationsverdampfer eingengt und anschließend lyophilisiert.

b) Polyamid-Säulenchromatographie:

0,2 g des gefriergetrockneten Aceton-Extrakts werden in einen 10 mL-Messkolben eingewogen, mittels Ultraschall gelöst und mit Nanopure[®] zur Marke aufgefüllt. 5 mL der Lösung werden auf die mit 10 mL Nanopure[®], 5 mL MeOH und 20 mL Nanopure[®] konditionierte PA-Kartusche (Macherey-Nagel, Chromabond[®], 1 g) aufgegeben. Die Kartusche wird mit 20 mL 2 %igem essigsäurem MeOH sowie 40 mL reinem MeOH gewaschen. Die anschließende Elution der Zielverbindungen erfolgt mit 20 mL 65 %igem wässrigem Aceton. Das Eluat wird am Rotationsverdampfer eingengt, in einen 5 mL-Messkolben überführt und mit Nanopure[®] bis zur Marke aufgefüllt.

Messung

Die Proben- (Vierfachbestimmung) und Standardlösungen (siehe unten) werden via HPLC-DAD-MS/MS (Methode V – Abschnitt 4.3.1.1 und 4.3.2) analysiert.

- *Stammlösungen:* (+)-Catechin (643 mg/L), (-)-Epicatechin (536 mg/L)

Die Standardlösungen werden durch Verdünnung der beiden Stammlösungen erhalten. In Tabelle 4.5 sind das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die erhaltenen Kalibrierfunktionen nach der DIN-Norm 32645 angegeben.

Tabelle 4.5: Überblick über das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645

Referenzsubstanz	Konzentrationsbereich [mg/L]	Bestimmtheitsmaß (R^2)	Nachweisgrenze (LOD) [mg/L]	Bestimmungsgrenze (LOQ) [mg/L]
(+)-Catechin	0,54-53,60	0,9998	3,730	14,972
(-)-Epicatechin	0,64-64,30	0,9997	5,104	20,455

Auswertung

Grundsätzlich erfolgt die Quantifizierung durch Auswertung der UV-Spuren; die MS/MS-Daten dienen lediglich der qualitativen Zuordnung. Die Peakflächen der Standardlösungen werden gegen die entsprechenden Konzentrationen aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt. Mit Hilfe der Kalibrierfunktion sowie der Verdünnungs- und Responsefaktoren (RRF) zur Umrechnung von monomerem Catechin auf die jeweiligen Proanthocyanidine (siehe unten) wird der Gehalt der Zielverbindungen berechnet. Für das EC- bzw. C-Dimer wird als RRF ein Wert von 2,00 verwendet (siehe 2.1.2).

Tabelle 4.6: Überblick über die relativen Responsefaktoren (RRF) für Proanthocyanidine gegenüber dem (+)-Catechin-Standard (nach HILAL, 2010)^a

Proanthocyanidine	RRF ((+)-Catechin)
EC-EC-EC	3,04
EC-ECG	1,40
EGC-EGCG/EGCG-EGC	3,58
EC-EGCG	1,49
EGC-ECG	3,49
EGCG-EGCG	0,95
ECG-ECG	0,78
ECG-EGCG/EGCG-ECG	0,87
EGC-EGC	6,20

^aEC, (-)-Epicatechin; ECG, (-)-Epicatechingallat; EGC, (-)-Epigallocatechin; EGCG, (-)-Epigallocatechingallat

4.5.7 Bestimmung der Spaltprodukte nach Phloroglucinolyse

Die Phloroglucinolyse wird in Anlehnung an das von KENNEDY & JONES (2001) beschriebene Verfahren durchgeführt. Die Abbauprodukte nach Phloroglucinolyse werden ausschließlich per HPLC-DAD-MS/MS analysiert (siehe 4.5.6).

Herstellen der Lösungen

- *Reaktionslösung:* 50 mg Ascorbinsäure + 250 mg Phloroglucinol in 5 mL 0,1 N methanolischer Salzsäurelösung
- *Probelösungen:* PA-Eluat gemäß Abschnitt 4.5.3

Durchführung

Von den PA-Eluaten wird ein Aliquot (500 μL) abgenommen und mittels des LC-MS/MS-Systems (siehe 4.3.2) gemessen, um den in den PA-Eluaten vor Phloroglucinolyse enthaltenen Anteil der monomeren Bausteine (+)-Catechin und (-)-Epicatechin zu bestimmen.

Weitere 200 μL des PA-Eluats werden in ein Vial überführt, im Stickstoffstrom zur Trockene eingengt und anschließend zur Phloroglucinolyse eingesetzt. Dazu wird der Rückstand mit 200 μL der Reaktionslösung versetzt und bei 50 °C für 20 min im Wasserbad inkubiert. Zum Stopp der Reaktion werden 500 μL 40 mM wässrige Natriumacetatlösung zugegeben.

Messung

Die Probenlösungen (Vierfachbestimmung) vor und nach der Phloroglucinolyse sowie die Standards (siehe unten) werden per HPLC-DAD-MS/MS (Methode V – Abschnitt 4.3.1.1 und 4.3.2) gemessen.

- Stammlösungen: C-PG (102 mg/L), EC-PG (91 mg/L)

Die Standardlösungen werden durch Verdünnung der beiden Stammlösungen erhalten. Im Folgenden sind das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze [mg/L] für die erhaltenen Kalibrierfunktionen nach der DIN-Norm 32645 angegeben.

Tabelle 4.7: Überblick über das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645. Die Daten zu (+)-Catechin und (-)-Epicatechin befinden sich in **Tabelle 4.5**.^a

Referenzsubstanz	Konzentrationsbereich [mg/L]	Bestimmtheitsmaß (R^2)	Nachweisgrenze (LOD) [mg/L]	Bestimmungsgrenze (LOQ) [mg/L]
C-PG	2,04-102,00	0,9999	1,515	5,754
EC-PG	1,82-91,00	0,9999	1,205	4,586

^aC, (+)-Catechin; EC, (-)-Epicatechin; PG, Phloroglucinol

Auswertung

Die Peakflächen für die Standardlösungen werden gegen die korrespondierenden Konzentrationen aufgetragen, die Geradengleichungen durch lineare Regression ermittelt und zur quantitativen Auswertung herangezogen. Die Gehalte der EC/C-EC/C-PG-Addukte werden als Catechin-Äquivalente berechnet.

4.5.8 Analyse der Lagerproben

1) Untersuchung des Flavonoidprofils per HPLC-DAD

Durchführung

Die Fertiggetränke (jeweils zwei pro Lagerart) werden auf RT gebracht, gut geschüttelt und im Ultraschallbad für 10 min behandelt. In einen 10 mL-Messkolben werden 0,6 mL ACN vorgelegt und mit den Fertiggetränken zur Marke aufgefüllt.

Messung

Zur Analyse der Proben- (Doppelbestimmung) und Standardlösungen (siehe unten) per HPLC-DAD wird Methode I (siehe 4.3.1.1) eingesetzt. Aspalathin und Nothofagin werden bei 287 nm und die übrigen Flavonoide bei 354 nm detektiert. Zur sicheren Substanzidentifizierung werden einige Proben zusätzlich einer LC-MS-Messung (siehe 4.3.2) unterzogen.

- *Standardlösungen*: Nähere Angaben zur Herstellung, dem Bestimmtheitsmaß sowie der Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach der DIN-Norm 32645 sind in Abschnitt 4.5.3 aufgeführt.

Auswertung

Mit Hilfe der Peakflächen und Konzentrationen der jeweiligen Standardsubstanzen werden Kalibriergeraden erstellt und zur quantitativen Auswertung herangezogen.

2) Untersuchung des Gesamtpolyphenolgehalts

Durchführung

Zur Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehalts nach Folin-Ciocalteu wird ein Aliquot der Proben membranfiltriert (Phenex, PTFE, 0,45 μm , Phenomenex, Aschaffenburg). Von dem Filtrat werden 1 mL in einen 50 mL-Messkolben überführt und mit Nanopure[®] zur Marke aufgefüllt. Die resultierenden Lösungen werden nach der in Abschnitt 4.4.3 beschriebenen Methodik aufgearbeitet (Doppelbestimmung), analysiert und ausgewertet.

4.5.9 Inkubation von Aspalathin und Nothofagin

Durchführung

5 mg Aspalathin und 2 mg Nothofagin werden in je ein Vial für die HPLC eingewogen und in jeweils 1 mL Nanopure[®] gelöst. Die Inkubation erfolgt anschließend unter Lichteinfluss (Beleuchtung des Autosamplers eingeschaltet) in dem auf 40 °C temperierten Autosampler einer HPLC-DAD-Anlage (siehe 4.3.1 a)). Dabei werden die drei Proben (Aspalathin, Nothofagin und Nanopure[®]) wiederholt zyklisch über einen Gesamtzeitraum von rund 88 h gemessen. Die nachfolgenden Inkubationen bei 60 und 80 °C werden im Trockenschrank durchgeführt und die Proben ebenfalls in regelmäßigen Abständen per HPLC-DAD analysiert.

Messung

Die Analyse der Proben- (Einfachbestimmung) und Standardlösungen (siehe unten) erfolgt per HPLC-DAD (Methode VI – Abschnitt 4.3.1.1). Dabei werden Aspalathin, Phloretin, die Aspalathin-Dimere sowie die (*R/S*)-Eriodictyol-6/8-C-glucoside bei 287 nm, Isoorientin und Orientin bei 354 nm erfasst. In regelmäßigen Abständen werden einige Proben zusätzlich per LC-MS/MS (siehe 4.3.2) untersucht.

- *Standardlösungen:* Die Standardlösungen werden durch Verdünnung der definiert eingewogenen Stammlösung erhalten und bewegen sich in dem in Tabelle 4.8 aufgeführten Konzentrationsbereich. Darüber hinaus sind dort das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Kalibrierfunktionen nach der DIN-Norm 32645 zu finden.

Tabelle 4.8: Überblick über das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645. Die Daten zu Aspalathin befinden sich in **Tabelle 4.2**.

Referenzsubstanz	Konzentrationsbereich [mg/L]	Bestimmtheitsmaß (R^2)	Nachweisgrenze (LOD) [mg/L]	Bestimmungsgrenze (LOQ) [mg/L]
Eriodictyol	2,00-40,00	0,9995	2,030	7,126
Isoorientin	2,10-21,00	0,9996	1,278	4,566
Orientin	2,12-21,20	0,9995	1,597	5,649
Phloretin	1,73-17,30	0,9995	2,408	8,958

Auswertung

Die Peakflächen der Standardsubstanzen werden gegen die jeweiligen Konzentrationen aufgetragen und mit Hilfe linearer Regression die Gehalte der Zielverbindungen unter Berücksichtigung der Umrechnungsfaktoren (siehe unten) ermittelt.

- *Umrechnungsfaktoren:* Eriodictyol zu (*R/S*)-Eriodictyol-6/8-C-glucosid: 1,56
Aspalathin zu Aspalathin-Dimer: 2,00

4.5.10 Isolierung der aktiven Fraktion

Durchführung

a) Methanolische Extraktion:

50 g gemahlener, unfermentierter Rooibos werden unter Rühren mit 750 mL 70%igem MeOH bei 60 °C für 1 h extrahiert. Nach Filtration (MN 615 ¼, Ø 270 mm, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) wird das Filtrat mit 100 mL Hexan dreimal ausgeschüttelt, daraus anschließend das MeOH am Rotationsverdampfer vollständig entfernt und der wässrige Rückstand lyophilisiert.

b) Adsorptionschromatographie an Amberlite® XAD7:

Zur Polyphenolanreicherung und zur Entfernung von Kohlenhydraten und Proteinen wird eine Chromatographiesäule (Durchmesser: 5,5 cm, Füllhöhe: 50 cm) mit Amberlite® XAD7 befüllt. Das Adsorptionsmaterial wird mit Nanopure® konditioniert. Ca. 5 g des in Nanopure® gelösten Rohextrakts werden auf die Säule aufgegeben. Anschließend wird mit ca. 2 L Nanopure® gewaschen und mit 2 L MeOH eluiert. Das Eluat wird am Rotationsverdampfer vom MeOH befreit, der wässrige Rückstand erneut lyophilisiert und dieser anschließend mittels HSCCC getrennt.

c) HSCCC-Trennung:

Zunächst wird der Coil der HSCCC-Anlage (siehe 4.3.3) mit der entgasten leichten Phase („Head to Tail“-Modus) befüllt. 0,5-4 g des XAD7-Extrakts werden im Ultraschallbad in insgesamt 15 mL schwerer Phase gelöst. Dann werden 15 mL der leichten Phase zugegeben, die Lösung membranfiltriert (Chromafil® XTRA PET-120/25, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) und gleichmäßig ohne Luftblasen in die Injektionsschleife überführt. Die Trennung wird anschließend unter Verwendung der in Abschnitt 4.3.3.1 aufgeführten Parameter durchgeführt. Im Anschluss der Trennung werden die Fraktionen entsprechend des/der CCC-, DC- und/oder HPLC-Chromatogramm(s/e) vereinigt, am Rotationsverdampfer von den Lösungsmitteln befreit und lyophilisiert.

d) TEAC-Assay:

Die Fraktionen werden auf ihr antioxidatives Potential mittels des TEAC-Assays gemäß 4.4.2 untersucht. Insgesamt werden für die Humanstudie ca. 5,4 g der aktiven Fraktion isoliert. Die Quantifizierung des Prüfprodukts ist in Abschnitt 4.5.11.1 beschrieben.

4.5.11 Quantifizierung der Prüfprodukte

4.5.11.1 Aktive Fraktion

Durchführung und Messung

Eine definierte Menge der aktiven Fraktion wird in ein HPLC-Vial eingewogen, in 500 μ L Nanopure® gelöst und neben den Standardlösungen (siehe unten) direkt per HPLC-DAD (Methode VI – Abschnitt 4.3.1.1) bei 287 (Aspalathin und Nothofagin) und 354 nm gemessen (Doppelbestimmung).

- *Standardlösungen:* Die Standardlösungen werden durch Verdünnung der definiert eingewogenen Stammlösung erhalten. Die Konzentrationsbereiche sind neben den Bestimmtheitsmaßen sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach der DIN-Norm 32645 in Tabelle 4.9 aufgelistet.

Tabelle 4.9: Überblick über das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645. Die Daten der übrigen Flavonoide befinden sich in **Tabelle 4.3** und **Tabelle 4.8**.

Referenzsubstanz	Konzentrationsbereich [mg/L]	Bestimmtheitsmaß (R^2)	Nachweisgrenze (LOD) [mg/L]	Bestimmungsgrenze (LOQ) [mg/L]
Hyperosid	2,45-19,60	0,9997	1,924	7,125
Isoquercitrin	2,48-39,60	0,9993	3,362	11,877

Auswertung

Die Auswertung erfolgt, wie in Abschnitt 4.5.1 vorgestellt.

4.5.11.2 Rooibostee

Durchführung und Messung

Die wässrigen Extrakte werden analog Abschnitt 4.4.5.1 a) vorbereitet. 500 μL des Teeaufgusses werden in ein HPLC-Vial überführt und mit der HPLC-Methode I (Abschnitt 4.3.1.1) bei 287 und 354 nm gemessen (Zwölfachbestimmung).

- *Standardlösungen:* siehe 4.5.11.1

Auswertung

Die Auswertung erfolgt, wie in Abschnitt 4.5.1 dargestellt.

4.5.11.3 Fertiggetränke

Die Durchführung, Messung und Auswertung erfolgt, wie in Abschnitt 4.5.8 beschrieben.

4.5.12 Entwicklung einer Methode zur Plasma- und Urinaufarbeitung

Durchführung und Auswertung

Insgesamt sieben Methoden zur Aufarbeitung der Plasmaproben (siehe Tabelle 2.15) und vier für die Urinproben (siehe Tabelle 2.20) werden getestet. Dazu werden Leerplasma und -urin mit einer definierten Menge eines der beiden in Tabelle 4.10 dargestellten Mischstandards versetzt, die Aufarbeitung nach Vorschrift (siehe Literaturquellen in Abschnitt 2.2.5) durchgeführt und die resultierenden prozentualen Wiederfindungsraten bzw. Peakflächen der Bestandteile des Mischstandards ermittelt. Zur besseren Vergleichbarkeit werden für jeden Ansatz dieselben Mischstandard-, Urin- und Plasamengen verwendet. Auch die Aufarbeitungsmethoden werden entsprechend standardisiert.

Tabelle 4.10: Für die Methodenentwicklung zur Urin- und Plasmaanalytik verwendete Mischstandards. STD, Standard

Verbindung	a) STD 1	b) STD 2
	c [mg/L]	
Isoorientin	-	21,0
Orientin	84,0	21,2
Aspalathin	57,0	19,6
Rutin	87,0	20,0
Isovitexin	84,0	12,2
Isoquercitrin	60,0	19,8
Hyperosid	-	19,6
Luteolin-O-glucuronid	-	21,6
Quercetin-O-glucuronid	117,0	20,6
Chrysoeriol	61,0	19,4
Eriodictyol	-	20,0

Die vielversprechendsten Methoden werden hinsichtlich verschiedener Parameter optimiert (siehe 2.2.5.1 und 2.2.5.2).

Messung

Die Proben- (Doppelbestimmung) und Standardlösungen werden per LC-MS/MS untersucht. Zur Auswertung wird dabei die MS-Spur (d.h. die jeweiligen Extracted Ion Chromatogramme) herangezogen. Die Plasmaproben wurden unter Verwendung der Methode VII a) (siehe 4.3.1.1 und 4.3.2) mit dem LC-MS-System 1 analysiert. Die Entwicklung der Methode zur Urinaufarbeitung wurde mit der Methode VII b) am LC-MS-System 2 durchgeführt (siehe 4.3.1.1 und 4.3.2).

4.5.12.1 Plasmaaufarbeitung

Durchführung

1000 μL Plasma werden mit 10 μL ISTD (Eriodictyol-7-O-glucosid, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 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. Nach Zugabe von 2,5 mL Ethylacetat und ausgiebigem Schütteln (Vortex, 1 min) werden die Proben 15 min im Ultraschallbad extrahiert, erneut durchmischt und 12 min bei 4200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein Schnappdeckelglas überführt und der Rückstand unter den oben angegebenen Bedingungen einer zweiten Extraktion unterworfen.

4 mL der vereinigten, organischen Phasen werden mit 10 μL Ascorbinsäure (1 %, aq) versetzt und 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) im Ultraschallbad (15 min) gelöst und anschließend 12 min bei 4700 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird in einen μ -Einsatz für die HPLC überführt und die Probe bis zur Messung bei -20°C gelagert.

Messung

Die Proben- (Einfachbestimmung) und Standardlösungen (siehe unten) werden per LC-MS/MS untersucht. Die Plasmaproben der 1. Humanstudie wurden unter Verwendung der Methode VII a) (siehe 4.3.1.1 und 4.3.2) mit dem LC-MS-System 1 analysiert. Für die 2. Humanstudie wurde die Methode VII b) mit dem LC-MS-System 2 verwendet.

- Standardlösungen:

Die Standards werden definiert in einen Messkolben eingewogen und mit DMF zur Marke aufgefüllt (\rightarrow Stammlösung). Aus dieser Stammlösung werden die Standardlösungen durch Verdünnen hergestellt. Nähere Angaben zu den Konzentrationsbereichen der jeweiligen Referenzsubstanzen finden sich in Tabelle 4.11 und Tabelle 4.12. Des Weiteren sind die Bestimmtheitsmaße sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach der DIN-Norm 32645 angegeben.

Auswertung

Die Quantifizierung der Zielverbindungen erfolgt über die MS-Spur (d.h. über die jeweiligen Extracted Ion Chromatogramme). Aus den Peakflächen der Standards wird in Kombination mit den jeweiligen Konzentrationen für jede Referenzsubstanz eine Regressionsgerade erstellt, deren Geradengleichung als Kalibrierfunktion dient. Daraus wird die Konzentration der Zielverbindungen durch Einsetzen der ermittelten Peakflächen unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors berechnet. Die Bestimmung von Vitexin erfolgt mit Hilfe der Kalibriergerade für Isovitexin. Nothofagin wird bei der 2. Humanstudie als Phloretin bestimmt (Tabelle 4.12).

Tabelle 4.11: Überblick über das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 (Methode VII a); LC-MS-System 1)

Referenzsubstanz	Konzentrationsbereich [mg/L]	Bestimmtheitsmaß (R^2)	Nachweisgrenze (LOD) [mg/L]	Bestimmungsgrenze (LOQ) [mg/L]
Isoorientin	0,01-2,10	0,9999	0,005	0,018
Orientin	0,002-2,12	0,9999	0,003	0,013
Aspalathin	0,20-19,60	0,9999	0,250	1,052
Rutin	0,02-2,00	0,9999	0,006	0,025
Isovitexin	0,01-1,22	0,9998	0,094	0,385
Hyperosid	0,002-0,20	0,9999	0,006	0,023
Isoquercitrin	0,002-1,98	0,9999	0,017	0,066
Nothofagin	0,80-40,00	0,9999	0,856	3,217

Tabelle 4.12: Überblick über das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 (Methode VII b); LC-MS-System 2)

Referenzsubstanz	Konzentrationsbereich [mg/L]	Bestimmtheitsmaß (R^2)	Nachweisgrenze (LOD) [mg/L]	Bestimmungsgrenze (LOQ) [mg/L]
Isoorientin	1,05-4,20	0,9999	0,112	0,411
Orientin	1,06-4,24	0,9995	0,333	1,149
Aspalathin	12,5-125	0,9996	7,656	27,389
Rutin	1,00-4,00	0,9996	0,258	0,902
Isovitexin	0,61-4,88	0,9999	0,104	0,391
Hyperosid	0,98-3,92	0,9998	0,143	0,517
Isoquercitrin	0,99-3,96	0,9998	0,186	0,663
Luteolin-7-O-glucosid	0,38-3,84	0,9999	0,147	0,584
Phloretin	1,73-17,30	0,9998	0,669	2,462

4.5.12.2 Urinaufarbeitung

Durchführung

1000 μ L Urin werden mit 10 μ L ISTD (Eriodictyol-7-O-glucosid, 10 μ g/mL, in DMF) und 50 μ L 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 4.5.12.1 aufgearbeitet. Nach Vereinigung der 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 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Messung

Die Proben- (Einfachbestimmung) und Standardlösungen (siehe unten) werden per LC-MS/MS untersucht. Die Urinproben beider Humanstudien wurden unter Verwendung der Methode VII b) (siehe 4.3.1.1 und 4.3.2) mit dem LC-MS-System 2 analysiert und ausgewertet.

Tabelle 4.13: Überblick über das Bestimmtheitsmaß sowie die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 (Methode VII b); LC-MS-System 2). Daten zu den intakten Flavonoiden befinden sich in **Tabelle 4.12**.^a

Referenzsubstanz	Konzentrationsbereich [mg/L]	Bestimmtheitsmaß (R^2)	Nachweisgrenze (LOD) [mg/L]	Bestimmungsgrenze (LOQ) [mg/L]
Phloretin	1,73-17,30	0,9998	0,669	2,462
Quercetin	3,10-15,50	0,9999	0,537	2,164
Eriodictyol	1,00-4,00	0,9999	0,136	0,494
Apigenin	0,34-3,44	0,9998	0,131	0,481
Chrysoeriol	0,97-2,59	0,9998	0,193	0,729
Quercetin-O-glcS	1,03-4,12	0,9998	0,196	0,700
Luteolin-O-glcS	1,08-4,32	0,9998	0,219	0,780
Aspalathin-4-O-sulfat	20,60-103,00	0,9999	0,248	1,056
Hippursäure	0,19-0,74	0,9996	0,051	0,178
3-Hydroxyphenyl-essigsäure	0,90-44,80	0,9998	0,314	1,235
3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure	0,19-1,52	0,9994	0,084	0,291
3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure	0,19-0,76	0,9996	0,054	0,187

^aglcS, glucuronid

- Standardlösungen:

Die Standards werden definiert in einen Messkolben eingewogen und mit DMF zur Marke aufgefüllt (\rightarrow Stammlösung). Aus dieser Stammlösung werden die Standardlösungen durch Verdünnen hergestellt. Nähere Details zu den Konzentrationsbereichen der jeweiligen Referenzsubstanzen, den Bestimmtheitsmaßen sowie den Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nach DIN-Norm 32645 sind in Tabelle 4.13 angegeben.

Auswertung

Die Quantifizierung der Zielverbindungen erfolgt über die MS-Spur (d.h. über die jeweiligen Extracted Ion Chromatogramme). Mit Hilfe der Kalibriergeraden der Referenzsubstanzen wird die Konzentration der Zielverbindungen durch Einsetzen von deren Peakflächen unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors berechnet. Gegebenenfalls muss zur Berechnung auch ein Umrechnungsfaktor (siehe Tabelle 4.14) einbezogen werden. Der Gehalt an Vitexin wird mit Hilfe der Kalibriergerade für Isovitexin bestimmt. Luteolin-O-hexosid wird als Luteolin-7-O-glucosid quantifiziert. Über die protokollierten Urinsammelungen je Proband und Zeitintervall werden für sämtliche Zielverbindungen die Absolutmengen ermittelt.

Tabelle 4.14: Zusammenstellung der für die Auswertung verwendeten Umrechnungsfaktoren^a

Aspalathin zu Aspalathin-O-glcS	1,39	Eriodictyol zu Eriodictyol-O-glcS	1,61
Aspalathin zu Me-O-aspalathin-O-glcS	1,42	Eriodictyol zu (R/S)-Me-O-eriodictyol-6/8-C-glu	1,61
Aspalathin zu Me-O-aspalathin	1,03	Eriodictyol zu (R/S)-Eriodictyol-6/8-C-glu-O-glcS	2,17
Aspalathin zu Nothofagin:	0,96	Quercetin zu Quercetin-O-sulfat	1,26
Aspalathin zu Nothofagin-O-glcS	1,35	Quercetin-O-glcS zu Me-O-quercetin-O-glcS	1,03
Isoorientin zu Me-O-isoorientin	1,03	Luteolin-O-glcS zu Luteolin-di-O-glcS	1,38
Isoorientin zu Isoorientin-O-glcS	1,39	Luteolin-7-O-glu zu -O-hexosid-O-glcS	1,39
Isoorientin zu Me-O-isoorientin-O-glcS	1,42	Apigenin zu Apigenin-O-glcS	1,65
Isoorientin zu Isoorientin-O-sulfat	1,18	Chrysoeriol zu Me-O-luteolin-O-glcS	1,59
Phloretin zu Phloretin-O-glcS	1,64	Hippursäure zu 3/4-Hydroxyhippursäure	1,09

^aglcS, glucuronid; Me, Methyl; glu, glucosid

4.5.12.3 Berechnung der Fläche unterhalb der Konzentrations-Zeit-Kurve

Zur Auswertung der Urin- und Plasmaproben wird u.a. die Fläche unterhalb der Konzentrations-Zeit-Kurven (AUC: Area under the Curve) berechnet. Diese ergibt sich aus dem Verlauf der Konzentrationen der Zielverbindungen im Interventionszeitraum (Urin: 0-24 h) am jeweiligen Untersuchungstag. Die AUC wird nur für die Urinproben bestimmt, da hier der gesamte Untersuchungszeitraum untersucht wurde. Bei den Plasmaproben wurden dagegen für einige Zielverbindungen erst nach 3 h Peaks detektiert, wodurch sich die Bestimmung des Parameters nicht anbot.

Die Berechnung der AUC erfolgt nach der Sehnentrapezmethode gemäß Gleichung 4-2. Dabei wird die Fläche unter der Kurve nach den verschiedenen Entnahmepunkten in Trapeze unterteilt, deren Flächeninhalte berechnet und zur AUC summiert (CHOW & LIU, 1992; NIAZI, 2007).

$$AUC_{0-24h} = \sum_{i-1} \left(\frac{c_{i-1} + c_i}{2} \right) (t_i - t_{i-1}) \quad 4-2$$

AUC_{0-24h} = AUC über einen Zeitraum von 24 h [$\mu\text{mol} \cdot \text{h}$], i = Urinprobe, c_i = Konzentration der Zielverbindung in Urinprobe i [μmol], t_i = Entnahmezeitpunkt der Urinprobe nach Einnahme des Prüfproduktes [h]

4.5.13 Synthese von Aspalathinderivaten

4.5.13.1 Methylierung von Aspalathin

Durchführung und Messung

4,01 mg Aspalathin werden in 10 mL Tris-HCl-Puffer (10 mmol/L, pH 7,4) gelöst. 0,11 mg Catechol-O-Methyltransferase (COMT), 5,2 μL S-Adenosylmethionin (SAM) und 200 μL Magnesiumchlorid-Lösung (0,75 mol/L) werden mit 200 μL der Aspalathin-Lösung (887,17 $\mu\text{mol/L}$) versetzt und das Reaktionsgefäß auf 1,5 mL mit dem Tris-HCl-Puffer aufgefüllt. Der Ansatz wird 30 min bei 38 °C im Wasserbad inkubiert und die Reaktion anschließend mit 300 μL eiskaltem Methanol gestoppt. Die Lösung wird bei 4500 U/min für 10 min zentrifugiert. 100 μL des Überstandes kommen für die LC-MS/MS-Analyse mit der Anlage 2 (siehe 4.3.2) unter Verwendung der Methode VII b) (siehe 4.3.1.1 – Flussrate: 0,8 mL/min) zum Einsatz.

4.5.13.2 Sulfatierung von Aspalathin

Durchführung und Messung

100,2 mg Aspalathin werden zur Entfernung letzter Wasserreste in 10 mL Pyridin gelöst und das Pyridin anschließend mit einem Rotationsverdampfer entfernt. Der Vorgang wird zweimal wiederholt und der Rückstand schließlich in 10 mL Dioxan aufgenommen. In zwei Rollrandgläsern werden 0,2657 g und 0,2623 g Triethylamin-Schwefeltrioxid-Komplex (580,25 μmol) unter Heliumatmosphäre eingewogen, das in Dioxan gelöste Aspalathin auf beide Reaktionsgefäße aufgeteilt und diese für 90 min bei 40 °C im Wasserbad inkubiert. Das Dioxan wird in Zentrifugengläser dekantiert und nach Zentrifugation bei 4000 U/min für 5 min verworfen. Der Rückstand wird in je 2 mL Methanol aufgenommen und im Stickstoffstrom getrocknet. Nach Aufnahme des Rückstands beider Ansätze in je 5 mL Nanopure[®] werden diese vereinigt und lyophilisiert.

Das Lyophilisat (570 mg) wird in 3 mL ACN/H₂O (6/94; v/v) aufgenommen und mittels präparativer HPLC mit der Methode VIII (siehe 4.3.1.1) aufgereinigt. Die gewonnenen Fraktionen werden erneut lyophilisiert und anschließend per LC-MS/MS mit Methode VII b) (siehe 4.3.1.1) auf ihre Reinheit überprüft. Die erhaltene reine Fraktion (ca. 10 mg) wird in DMSO-D₆ gelöst und zur NMR-Messung (siehe 4.3.4) eingesetzt.

4.5.13.3 Glucuronidierung von Aspalathin

Durchführung und Messung

4,96 mg Aspalathin werden zusammen mit 24,98 mg Acetobromoglucuronsäuremethylester in 5 mL DMF gelöst. Nach Zugabe von 4,83 mg Kaliumcarbonat wird der Ansatz 2 h bei RT gerührt und die Reaktion anschließend mit kaltem Nanopure[®] (30 mL) gestoppt. Nach

Ansäuerung mit konz. Ameisensäure wird die Lösung bei 5000 U/min für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand mit 5 mL wässriger Ameisensäure (0,2 %) gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Rückstand wird in einem Gemisch aus 4 mL Methanol und Chloroform (1/1; v/v) aufgenommen und im Stickstoffstrom getrocknet. Nach Aufnahme in 3 mL eines Gemisches aus Methanol/Chloroform (1/1; v/v) und Zugabe von 90 μ L wasserfreiem Natriummethylat (28 %) erfolgt eine erneute Inkubation für 30 min bei 4 °C. Anschließend werden 3 mL Nanopure[®] hinzugefügt und die Mischung für 30 min bei RT stehen gelassen. Die Lösung wird anschließend mit 222 μ L Salzsäure (2 mol/L) neutralisiert und mit einigen Tropfen konz. Ameisensäure angesäuert. Abschließend wird bei 5000 U/min für 13 min zentrifugiert, das Zentrifugat im Stickstoffstrom getrocknet, der resultierende Rückstand in einem Gemisch aus ACN/H₂O (1/1; v/v) aufgenommen und zur LC-MS-Bestimmung unter Verwendung der Methode VII b) (siehe 4.3.1.1 – Flussrate: 0,8 mL/min) eingesetzt.

5 Literatur

- Aherne, S. A.; O'Brien, N. M.: Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, **2002**, 18 (1), 75-81
- Almajano, M. P.; Carbó, R.; Jiménez, J. A. L.; Gordon, M. H.: Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. *Food Chem.*, **2008**, 108 (1), 55-63
- Aron, P. M.; Kennedy, J. A.: Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2008**, 52 (1), 79-104
- 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. *Br. J. Nutr.*, **2004**, 91 (6), 841-847
- Baba, S.; Furuta, T.; Fujioka, M.; Goromaru, T.: Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVII: Urinary metabolites of rutin in rats and the role of intestinal microflora in the metabolism of rutin. *J. Pharm. Sci.*, **1983**, 72 (10), 1155-1158
- Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P.: *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6. Auflage, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, **2008**
- Benk, E.: Roter Busch-Tee (rooibosh-tea). *Kaffee- u. Tee-Markt*, **1961**, 11, 17-18.
- Berrin, J.-G.; Czjzek, M.; Kroon, P. A.; McLauchlan, W. R.; Puigserver, A.; Williamson, G.; Juge, N.: Substrate (aglycone) specificity of human cytosolic beta-glucosidase. *Biochem. J.*, **2003**, 373 (1), 41-48
- Blaut, M.; Schoefer, L.; Braune, A.: Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **2003**, 73 (2), 79-87
- Bokkenheuser, V. D.; Shackleton, C. H. L.; Winter, J.: Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochem. J.*, **1987**, 248 (3), 953-956
- Bonfiglio, R.; King, R. C.; Olah, T. V.; Merkle, K.: The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1999**, 13 (12), 1175-1185
- Booth, A. N.; Murray, C. W.; Jones, F. T.; DeEds, F.: The metabolic fate of rutin and quercetin in the animal body. *J. Biol. Chem.*, **1956**, 223 (1), 251-257
- Booth, A. N.; Emerson, O. H.; Jones, F. T.; DeEds, F.: Urinary metabolites of caffeic and chlorogenic acids. *J. Biol. Chem.*, **1957**, 229, 51-59
- Booth, A. N.; Jones, F. T.; deEds, F.: Metabolic fate of hesperidin, eriodictyol, homoeriodictyol, and diosmin. *J. Biol. Chem.*, **1958**, 230 (2), 661-668
- Borst, P.; Evers, R.; Kool, M.; Wijnholds, J.: A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.*, **2000**, 92 (16), 1295-1302
- Boulton, D. W.; Walle, U. K.; Walle, T.: Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J. Pharm. Pharmacol.*, **1998**, 50 (2), 243-249
- 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. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50 (20), 5513-5519
- Bramati, L.; Aquilano, F.; Pietta, P.: Unfermented rooibos tea: quantitative characterization of flavonoids by HPLC-UV and determination of the total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51 (25), 7472-7474

- Brand, W.; Padilla, B.; van Bladeren, P. J.; Williamson, G.; Rietjens, I. M. C. M.: The effect of co-administered flavonoids on the metabolism of hesperetin and the disposition of its metabolites in Caco-2 cell monolayers. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2010**, 54 (6), 851-860
- Braune, A.; Gutschow, M.; Engst, W.; Blaut, M.: Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, 67 (12), 5558-5567
- 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 Chem.*, **2011**, 128 (2), 338-347
- Canivenc-Lavier, M.-C.; Vernevaux, M.-F.; Totis, M.; Siess, M.-H.; Magdalou, J.; Suschetet, M.: Comparative effects of flavonoids and model inducers on drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Toxicology*, **1996**, 114 (1), 19-27
- Chen, J.; Lin, H.; Hu, M.: Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2003**, 304 (3), 1228-1235
- Chen, X.; Yin, O. Q. P.; Zuo, Z.; Chow, M. S. S.: Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharm. Res.*, **2005**, 22 (6), 892-901
- Cheney, R.H.: The biology and economics of the beverage industry. *Econ. Bot.*, **1947**, 1, 243-275
- Cheney, R.H.; Scholtz, E.: Rooibos tea, a South African contribution to world beverages. *Econ. Bot.*, **1963**, 17 (3), 186-194
- Chesson, A.; Provan, G. J.; Russell, W. R.; Scobbie, L.; Richardson, A. J.; Stewart, C.: Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *J. Sci. Food Agric.*, **1999**, 79 (3), 373-378
- Chow, S. C.; Liu, J. P.: *Design and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies*. New York: Marcel Dekker, **1992**
- Clark, W. G.; MacKay, E. M.; Mary, J.: The absorption and excretion of rutin and related flavonoid substances. *J. Am. Med. Assoc.*, **1950**, 143 (16), 1411-1415
- Clifford, M. N.: Chlorogenic acids. In: Clarke, R. J.; Macrae, R. (Hrsg.): *Coffee. Volume 1: Chemistry*. Elsevier Applied Science Publishers LTD, London, **1985**, 153-202
- Clifford, M. N.: Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, **1999**, 79 (3), 362-372
- Clifford, M. N.; Copeland, E. L.; Bloxside, J. P.; Mitchell, L. A.: Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. *Xenobiotica*, **2000**, 30 (3), 317-326
- Clifford, M. N.; Johnston, K. L.; Knight, S.; Kuhnert, N.: Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51 (10), 2900-2911
- Conway, W. D., Ed. Countercurrent chromatography: apparatus, theory, and applications; New York: VCH Publishers, **1990**
- Conway, W. D.: Counter-current chromatography. *J. Chromatogr., A*, **1991**, 538 (1), 27-35
- Courts, F. L.; Williamson, G.: The C-glycosyl flavonoid, aspalathin, is absorbed, methylated and glucuronidated intact in humans. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, 53 (9), 1104-1111
- 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. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **1999**, 277 (1), G120-G126
- Crespy, V.; Aprikian, O.; Morand, C.; Besson, C.; Manach, C.; Demigne, C.; Remesy, C.: Bioavailability of phloretin and phloridzin in rats. *J. Nutr.*, **2001**, 131 (12), 3227-3230
- Crespy, V.; Morand, C.; Besson, C.; Cotellet, N.; Vézina, H.; Demigné, C.; Rémésy, C.: The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **2003**, 284 (6), G980-G988
- Creveling, C. R.; Morris, N.; Shimizu, H.; Ong, H. H.; Daly, J.: Catechol O-Methyltransferase. IV. Factors affecting *m*- and *p*-methylation of substituted catechols. *Mol. Pharmacol.*, **1972**, 8 (4), 398-409

- Crozier, A.; Jaganath, I. B.; Clifford, M. N.: Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.*, **2009**, 26 (8), 1001-1043
- Dangles, O.; Dufour, C.; Manach, C.; Morand, C.; Rémésy, C.: Binding of flavonoids to plasma proteins. *Methods Enzymol.*, **2001**, 335, 319-333
- D'Archivio, M.; Filesi, C.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Masella, R.: Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int. J. Mol. Sci.*, **2010**, 11 (4), 1321-1342
- Dávalos, A.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.: Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–fluorescein) assay. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 52 (1), 48-54
- 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 Lett.*, **1998**, 436 (1), 71-75
- Day, A. J.; Cañada, F. J.; Díaz, 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 Lett.*, **2000a**, 468 (2-3), 166-170
- Day, A. J.; Bao, Y.; Morgan, M. R. A.; Williamson, G.: Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radic. Biol. Med.*, **2000b**, 29 (12), 1234-1243
- 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 Res.*, **2001**, 35 (6), 941-952
- 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. *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, 65 (7), 1199-1206
- DeEds, F.: Flavonoid metabolism. In: Bentley, R.; Florkin, M.; Neuberger, A.; Semenza, G. (Eds.): *Metabolism of Cyclic Compounds. Comprehensive Biochemistry*, Vol. 20. Elsevier, Amsterdam, **1968**, 127-171
- de Vries, J. H.; Hollman, P. C.; Meyboom, S.; Buysman, M. N.; Zock, P. L.; van Staveren, W. A.; Katan, M. B.: Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1998**, 68 (1), 60-65
- Degenhardt, A.; Habben, S.; Winterhalter P.: Isolation of physiologically active compounds from nutritional beverages and vegetables by countercurrent chromatography. In: Shahidi, F.; Weerasinghe, D. K. (Hrsg.): *Nutraceutical beverages – chemistry, nutrition, and health effects*. ACS Symposium Series 871, American Chemical Society, Washington DC, USA, **2004**, 443-456
- Del Rio, D.; Calani, L.; Cordero, C.; Salvatore, S.; Pellegrini, N.; Brighenti, F.: Bioavailability and catabolism of green tea flavan-3-ols in humans. *Nutrition*, **2010**, 26 (11-12), 1110-1116
- Dewick, P. M.: The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, **1994**, 11, 173-203
- DIN 32645 (2008): Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze. Beuth Verlag: Berlin
- Erickson, L.: Rooibos tea: research into antioxidant and anticancer properties, *HerbalGram*, **2003**, 59, 34-45
- Erlund, I.; Kosonen, T.; Alfthan, G.; Mäenpää, J.; Perttunen, K.; Kenraali, J.; Parantainen, J.; Aro, A.: Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **2000**, 56 (8), 545-553
- Ferreres, F.; Silva, B. M.; Andrade, P. B.; Seabra, R. M.; Ferreira, M. A.: Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochem. Anal.*, **2003**, 14 (6), 352-359

- Ferreira, D.; Marais, C.; Steenkamp, J. A.; Joubert, E.: Rooibos tea as a likely health food supplement. *Proceedings of Recent Developments of Technologies on Fundamental Foods for Health*; Korean Society of Food Science and Technology: Seoul, Korea, **1995**, 73–88.
- Figueirinha, A.; Paranhos, A.; Pérez-Alonso, J. J.; Santos-Buelga, C.; Batista, M. T.: *Cymbopogon citratus* leaves: characterization of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chem.*, **2008**, 110 (3), 718-728
- Finger, A.: *Flavonol- und Flavonglykoside des Tees*. Technische Universität Braunschweig, Dissertation, **1991**
- Flowers, H. M.: Studies on the Koenigs-Knorr reaction: Part I. Synthesis of 6-O- α -glucopyranosyl-galactose and 3-O- α -glucopyranosyl-galactose. *Carbohydr. Res.*, **1971**, 18 (2), 211-218
- Francis, A. R.; Shetty, T. K.; Bhattacharya, R. K.: Modifying role of dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B₁: in vitro effect of plant flavonoids. *Mutat. Res. - Genet. Tox.*, **1989**, 222 (4), 393-401
- Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S.: Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell. Biol.*, **1993**, 123, 1777-1788
- Furuse, M.; Fujita, K.; Hiiragi, T.; Fujimoto, K.; Tsukita, S.: Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell. Biol.*, **1998**, 141 1539-1550
- 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**, 29 (12), 1241-1256
- Gonthier, M.-P.; Cheynier, V.; Donovan, J. L.; Manach, C.; Morand, C.; Mila, I.; Lapiere, C.; Remesy, C.; Scalbert, A.: Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J. Nutr.*, **2003**, 133 (2), 461-467
- Gosch, C.; Halbwirth, H.; Kuhn, J.; Miosic, S.; Stich, K.: Biosynthesis of phloridzin in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Sci.*, **2009**, 176 (2), 223-231
- Gosch, C.; Halbwirth, H.; Stich, K.: Phloridzin: biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry*, **2010**, 71 (8-9), 838-843
- Graefe, E. U.; Veit, M.: Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomedicine*, **1999**, 6 (4), 239-246
- Greim, H.; Deml, E.: *Toxikologie: Eine Einführung für Naturwissenschaftler und Mediziner*, Weinheim, Wiley-VCH Verlag, **1996**
- Griffiths, L. A.; Smith, G. E.: Metabolism of apigenin and related compounds in the rat. Metabolite formation *in vivo* and by the intestinal microflora *in vitro*. *Biochem. J.*, **1972**, 128 (4), 901-911.
- Gross, M.; Pfeiffer, M.; Martini, M.; Campbell, D.; Slavin, J.; Potter, J.: The quantitation of metabolites of quercetin flavonols in human urine. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **1996**, 5 (9), 711-720
- Gu, L.; Kelm, M. A.; Hammerstone, J. F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Prior, R. L.: Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51 (25), 7513-7521
- Gu, L.; Kelm, M. A.; Hammerstone, J. F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Gebhardt, S.; Prior, R. L.: Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J. Nutr.*, **2004**, 134 (3), 613-617

- Gu, L.; Laly, M.; Chang, H. C.; Prior, R. L.; Fang, N.; Ronis, M. J. J.; Badger, T. M.: Isoflavone conjugates are underestimated in tissues using enzymatic hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53 (17), 6858-6863
- Guyot, S.; Marnet, N.; Drilleau, J.-F.: Thiolysis-HPLC Characterization of apple procyanidins covering a large range of polymerization states. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49 (1), 14-20
- Habu, T.; Flath, R. A.; Mon, T. R.; Morton, J. F.: Volatile components of rooibos tea (*Aspalathus linearis*). *J. Agric. Food Chem.*, **1985**, 33 (2), 249-254
- Hammerstone, J. F.; Lazarus, S. A.; Mitchell, A. E.; Rucker, R.; Schmitz, H. H.: Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47 (2), 490-496
- Hattori, M.; Shu, Y.-Z.; El-Sedawy, A. I.; Namba, T.; Kobashi, K.; Tomimori, T.: Metabolism of homoorientin by human intestinal bacteria. *J. Nat. Prod.*, **1988**, 51 (5), 874-878
- Hegnauer, R.; Hegnauer, M.: *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Band XIb-2 Teil 3, S. 977, Basel: Birkhäuser Verlag, **2001**.
- Heider, J.; Fuchs, G.: Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.*, **1997**, 243 (3), 577-596
- Heilmann, J.; Merfort, I.: Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden I. Resorption und Metabolismus von Flavonolen. *Pharm. Unserer Zeit*, **1998a**, 27 (2), 58-65
- Heilmann, J.; Merfort, I.: Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. *Pharm. Unserer Zeit*, **1998b**, 27 (4), 173-183
- Heller, W.; Forkmann, G.: Biosynthesis. In: Harborne, J. B. (Hrsg.): *The Flavonoids – Advances in Research since 1980*. Chapman and Hall, London, New York, **1988**, 399-425
- 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. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2004**, 80 (6), 1558-1564
- Hesseling, P. B.; Klopper, J. F.; Van Heerden, P. D. R.: Die effek von rooibostee op ysterabsorpsie. *S. Afr. Med. J.*, **1979**, 55, 631-632.
- Hilal, Y.: *Untersuchungen über Polyphenole in weißen und grünen Tees*. Technische Universität Braunschweig, Dissertation, **2010**
- Hillis, W. E.; Inoue, T.: The polyphenols of *Nothofagus* species-II.: The heartwood of *Nothofagus fusca*. *Phytochemistry*, **1967**, 6 (1), 59-67
- Hollman, P. C.; de Vries, J. H.; van Leeuwen, S. D.; Mengelers, M. J.; Katan, M. B.: Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1995**, 62 (6), 1276-1282
- Hollman, P. C. H.; van Trijp, J. M. P.; Buysman, M. N. C. P.; v. d. Gaag, M. S.; Mengelers, M. J. B.; de Vries, J. H. M.; Katan, M. B.: Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett.*, **1997**, 418 (1,2), 152-156
- Hollman, P. C. H.; Katan, M. B.: Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch. Toxicol., Suppl.*, **1998**, 20, 237-248
- Hörhammer, L.; Wagner, H.: Polyamidchromatographie. *Pharm. Zeitg.*, **1959**, 104, 783-786
- Hu, M.; Chen, J.; Lin, H.: Metabolism of flavonoids via enteric recycling: mechanistic studies of disposition of apigenin in the Caco-2 cell culture model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2003**, 307 (1), 314-321

- 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. *Phytother. Res.*, **2008**, 22 (5), 699-704
- Hutt, A.J.; Caldwell, J.: Amino acid conjugation. In: *Conjugation Reactions in Drug Metabolism* (Mulder GJ ed), Taylor and Francis Ltd., New York, **1990**, 274-307
- Inanami, O.; Asanuma, T.; Inukai, N.; Jin, T.; Shimokawa, S.; Kasai, N.; Nakano, M.; Sato, F.; Kuwabara, M.: The suppression of age-related accumulation of lipid peroxides in rat brain by administration of rooibos tea (*Aspalathus linearis*). *Neurosci. Lett.*, **1995**, 196 (1-2), 85-88
- Iriti, M.; Faoro, F.: Bioactivity of grape chemicals for human health. *Nat. Prod. Commun.*, **2009**, 4, 611-634
- Ishii, K.; Furuta, T.; Kasuya, Y.: Determination of rutin in human plasma by high-performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2001**, 759 (1), 161-168
- ISO 14502-1 (**2005**): Determination of total polyphenols in tea – Part 1: Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.
- ISO 14502-2 (**2005**): Tea – Methods for the determination of substances characteristic of green and black tea – Part 2: Determination of catechins in green tea - Method using high performance liquid chromatography
- Ito, Y.; Weinstein, M.; Aoki, I.; Harada, R.; Kimura, E.; Nunogaki, K.: The coil planet centrifuge. *Nature*, **1966**, 212 (5066), 985-987
- Ito, Y.: High-speed countercurrent chromatography. *CRC Crit. Rev Anal. Chem.*, **1986**, 17 (1), 65-143
- Ito, Y.; Conway W.D. (Eds.): *High-speed Countercurrent Chromatography*. New York: Wiley-Interscience, **1996**
- Ito, Y.: Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr., A*, **2005**, 1065 (2), 145-168
- Jones, D. J. L.; Jukes-Jones, R.; Verschoyle, R. D.; Farmer, P. B.; Gescher, A.: A synthetic approach to the generation of quercetin sulfates and the detection of quercetin 3'-O-sulfate as a urinary metabolite in the rat. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13 (24), 6727-6731
- Jovanovic, S. V.; Steenken, S.; Simic, M. G.; Hara, Y.: Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. In: Rice-Evans, C. A.; Packer, L. (Eds.): *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel-Dekker Inc.: New York, **1998**, 137-161.
- Joubert, E.: Chemical and sensory analyses of spray- and freeze-dried extracts of rooibos tea (*Aspalathus linearis*). *Int. J. Food Sci. Tech.*, **1990**, 25 (3), 344-349
- Joubert, E.: HPLC quantification of the dihydrochalcones, aspalathin and nothofagin in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by processing. *Food Chem.*, **1996**, 55 (4), 403-411
- 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*). *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53 (26), 10260-10267
- Justesen, U.; Arrigoni, E.; Larsen, B. R.; Amado, R.: Degradation of flavonoid glycosides and aglycones during *in vitro* fermentation with human faecal flora. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, **2000**, 33 (6), 424-430
- Justino, G. C.; Santos, M. R.; Canário, S.; Borges, C.; Florêncio, M. H.; Mira, L.: Plasma quercetin metabolites: structure-antioxidant activity relationships. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2004**, 432 (1), 109-121

- Kaldas, M. I.; Walle, U. K.; van der Woude, H.; McMillan, J. M.; Walle, T.: Covalent binding of the flavonoid quercetin to human serum albumin. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53 (10), 4194-4197
- Kallianos, A. G.; Petrakis, P. L.; Shetlar, M. R.; Wender, S. H.: Preliminary studies on degradation products of quercetin in the rat's gastrointestinal tract. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1959**, 81 (2), 430-433
- Karonen, M.; Loponen, J.; Ossipov, V.; Pihlaja, K.: Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 522 (1), 105-112
- Katragadda, S.; Budda, B.; Anand, B. S.; Mitra, A. K.: Role of efflux pumps and metabolising enzymes in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2005**, 2 (4), 683-705
- Kennedy, J. A.; Jones, G. P.: Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49 (4), 1740-1746
- Khokhar, S.; Magnusdottir, S. G. M.: Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50 (3), 565-570
- Kiehne, A.: *Untersuchungen über Polyphenole in Tee und Kaffee mittels HPLC und Thermospray HPLC-MS*. Technische Universität Braunschweig, Dissertation, **1997**
- Koeppen, B. H.; Smit, C. J. B.; Roux, D. G.: The flavone C-glycosides and flavonol O-glycosides of *Aspalathus acuminatus* (Rooibos tea). *Biochem. J.*, **1962**, 83, 507-511
- Koeppen, B. H.; Roux, D. G.: C-Glycosylflavonoids. The chemistry of orientin and isoorientin. *Biochem. J.*, **1965**, 97, 444-448
- Koeppen, B. H.; Roux, D. G.: C-glycosylflavonoids-the chemistry of aspalathin. *Biochem. J.*, **1966**, 99, 604-609
- Koes, R. E.; Quattrocchio, F.; Mol, J. N. M.: The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *BioEssays*, **1994**, 16 (2), 123-132
- Kottra, 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. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2007**, 322 (2), 829-835
- Krafczyk, N.; Glomb, M. A.: Characterization of phenolic compounds in rooibos tea. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56 (9), 3368-3376
- Krafczyk, N.; Woyand, F.; Glomb, M. A.: Structure-antioxidant relationship of flavonoids from fermented rooibos. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009a**, 53 (5), 635-642
- Krafczyk, N.; Heinrich, T.; Porzel, A.; Glomb, M. A.: Oxidation of the dihydrochalcone aspalathin leads to dimerization. *J. Agric. Food Chem.*, **2009b**, 57 (15), 6838-6843
- 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. *Nutr. Res.*, **2008**, 28 (10), 690-701
- Kroon, P. A.; Clifford, M. N.; Crozier, A.; Day, A. J.; Donovan, J. L.; Manach, C.; Williamson, G.: How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*? *Am. J. Clin. Nutr.*, **2004**, 80 (1), 15-21
- Kuhnert, N.; Clifford, M. N.; Muller, A.: Oxidative cascade reactions yielding polyhydroxytheaflavins and theacitrins in the formation of black tea thearubigins: Evidence by tandem LC-MS. *Food Funct.*, **2010**, 1 (2), 180-199
- Kuhr, S.; Engelhardt, U. H.: Determination of flavanols, theogallin, gallic acid and caffeine in tea using HPLC. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1991**, 192 (6), 526-529
- Kuhr, S.: *Flavanole, Flavon-C-glykoside und höhermolekulare Polyphenole im Tee*. Technische Universität Braunschweig, Dissertation, **1993**

- Lakenbrink, C.; Lapczynski, S.; Maiwald, B.; Engelhardt, U. H.: Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48 (7), 2848-2852
- Lamosová, D.; Juráni, M.; Greksák, M.; Nakano, M.; Vaneková, M.: Effect of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on chick skeletal muscle cell growth in culture. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.*, **1997**, 116 (1), 39-45
- Larrosa, M.; Luceri, C.; Vivoli, E.; Pagliuca, C.; Lodovici, M.; Moneti, G.; Dolaro, P.: Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2009**, 53 (8), 1044-1054
- Lee, M. J.; Wang, Z. Y.; Li, H.; Chen, L.; Sun, Y.; Gobbo, S.; Balentine, D. A.; Yang, C. S.: Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **1995**, 4 (4), 393-399
- Leslie, E. M.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C.: Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2005**, 204 (3), 216-237
- Li, C.; Lee, M. J.; Sheng, S.; Meng, X.; Prabhu, S.; Winnik, B.; Huang, B.; Chung, J. Y.; Yan, S.; Ho, C. T.; Yang, C. S.: Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. *Chem. Res. Toxicol.*, **2000**, 13 (3), 177-184
- Liu, Y.; Liu, Y.; Dai, Y.; Xun, L.; Hu, M.: Enteric disposition and recycling of flavonoids and ginkgo flavonoids. *J. Altern. Complement Med.*, **2003**, 9 (5), 631-640
- Lotito, S. B.; Frei, B.: Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic. Biol. Med.*, **2006**, 41 (12), 1727-1746
- Löffler, G.: *Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie*, 7. Auflage, Regensburg, Heidelberg: Springer Verlag, **2008**
- Manach, C.; Morand, C.; Texier, O.; Favier, M.-L.; Agullo, G.; Demigne, C.; Regeat, F.; Remesy, C.: Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J. Nutr.*, **1995**, 125 (7), 1911-1922
- Manach, C.; Texier, O.; Régéat, F.; Agullo, G.; Demigné, C.; Rémésy, C.: Dietary quercetin is recovered in rat plasma as conjugated derivatives of isorhamnetin and quercetin. *J. Nutr. Biochem.*, **1996**, 7 (7), 375-380
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L.: Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2004**, 79 (5), 727-747
- Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C.: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, 81 (1), 230S-242S
- Marais, C.; van Rensburg, W. J.; Ferreira, D.; Steenkamp, J. A.: (S)- and (R)-Eriodictyol-6-C- β -glucopyranoside, novel keys to the fermentation of rooibos (*Aspalathus linearis*). *Phytochemistry*, **2000**, 55 (1), 43-49
- Marnewick, J. L.; Gelderblom, W. C. A.; Joubert, E.: An investigation on the antimutagenic properties of South African herbal teas. *Mutat. Res. - Gen. Tox. En.*, **2000**, 471 (1-2), 157-166
- Marnewick, J.; Joubert, E.; Joseph, S.; Swanevelder, S.; Swart, P.; Gelderblom, W.: Inhibition of tumour promotion in mouse skin by extracts of rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*), unique South African herbal teas. *Cancer Lett.*, **2005**, 224 (2), 193-202
- Mattutat, K. O.: *Untersuchung zur Bioverfügbarkeit von Flavonoiden aus grünen Rooibos*. Technische Universität Braunschweig, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, **2010**
- McGurk, K. A.; Brierley, C. H.; Burchell, B.: Drug glucuronidation by human renal UDP-glucuronosyltransferases. *Biochem. Pharmacol.*, **1998**, 55 (7), 1005-1012

- Menet, M.-C.; Sang, S.; Yang, C. S.; Ho, C.-T.; Rosen, R. T.: Analysis of theaflavins and thearubigins from black tea extract by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52 (9), 2455-2461
- Meselhy, M. R.; Nakamura, N.; Hattori, M.: Biotransformation of (-)-epicatechin 3-O-gallate by human intestinal bacteria. *Chem. Pharm. Bull.*, **1997**, 45 (5), 888-893
- Miyake, Y.; Shimoi, K.; Kumazawa, S.; Yamamoto, K.; Kinae, N.; Osawa, T.: Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of eriocitrin-treated rats. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48 (8), 3217-3224
- Moon, J.-H.; Tsushida, T.; Nakahara, K.; Terao, J.: Identification of quercetin 3-O- β -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic. Biol. Med.*, **2001**, 30 (11), 1274-1285
- Moreira, R. F. A.; Trugo, L. C.; De Maria, C. A. B.; Matos, A. G. B.; Santos, S. M.; Leite, J. M. C.: Discrimination of Brazilian arabica green coffee samples by chlorogenic acid composition. *Arch. Latinoam. Nutr.*, **2001**, 51 (1), 95-99
- Morton, J.: Rooibos tea, *Aspalathus linearis*, a caffeineless, low-tannin beverage. *Econ. Bot.*, **1983**, 37 (2), 164-173
- Mulder, T. P.; Rietveld, A. G.; van Amelsvoort, J. M.: Consumption of both black tea and green tea results in an increase in the excretion of hippuric acid into urine. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2005**, 81 (1), 256S-260S
- Mullen, W.; Boitier, A.; Stewart, A. J.; Crozier, A.: Flavonoid metabolites in human plasma and urine after the consumption of red onions: analysis by liquid chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr., A*, **2004**, 1058 (1-2), 163-168
- 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. *Br. J. Nutr.*, **2006**, 96 (1), 107-116
- Mullen, W.; Edwards, C. A.; Serafini, M.; Crozier, A.: Bioavailability of pelargonidin-3-O-glucoside and its metabolites in humans following the ingestion of strawberries with and without cream. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, 56 (3), 713-719
- Murota, K.; Terao, J.: Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2003**, 417 (1), 12-17
- Murray, C. W.; Booth, A. N.; DeEds, F.; Jones, F. T.: Absorption and metabolism of rutin and quercetin in the rabbit. *J. Am. Pharm. Assoc.*, **1954**, 43 (6), 361-364
- Muto, S.; Fujita, K.-I.; Yamazaki, Y.; Kamataki, T.: Inhibition by green tea catechins of metabolic activation of procarcinogens by human cytochrome P450. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.*, **2001**, 479 (1-2), 197-206
- Nakamura, Y.; Watanabe, S.; Miyake, N.; Kohno, H.; Osawa, T.: Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51 (11), 3309-3312
- Nakano M.; Itoh Y.; Mizuno T.; Nakashima H.: Polysaccharide from *Aspalathus linearis* with strong anti-HIV activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1997**, 61(2), 267-271
- Natsume, M.; Osakabe, N.; Oyama, M.; Sasaki, M.; Baba, S.; Nakamura, Y.; Osawa, T.; Terao, J.: Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. *Free Radic. Biol. Med.*, **2003**, 34 (7), 840-849
- Nau, H.; Steinberg, P.; Kietzmann, M.: *Lebensmitteltoxikologie, Rückstände und Kontaminanten: Risiken und Verbraucherschutz*, Berlin, Parey Buchverlag, **2002**
- Németh, 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. *Eur. J. Nutr.*, **2003**, 42 (1), 29-42

- Niazi, S. K.: *Handbook of Bioequivalence Testing*. New York: Informa Healthcare USA, **2007**
- Nicholson, J. K.; Connelly, J.; Lindon, J. C.; Holmes, E.: Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2002**, 1 (2), 153-161
- 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. *Biochem. Pharmacol.*, **2003**, 65 (3), 479-491
- 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. *J. Nutr.*, **2000**, 130 (5), 1200-1203
- 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. *J. Nutr.*, **2003**, 133 (6), 1806-1814
- 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. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49 (10), 4619-4626
- Paganga, G.; Rice-Evans, C. A.: The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett.*, **1997**, 401 (1), 78-82
- Papadopoulou, A.; Green, R. J.; Frazier, R. A.: Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 53 (1), 158-163
- Pérez-Jiménez, J.; Neveu, V.; Vos, F.; Scalbert, A.: Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58 (8), 4959-4969
- Perrone, D.; Farah, A.; Donangelo, C. M.; de Paulis, T.; Martin, P. R.: Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. *Food Chem.*, **2008**, 106 (2), 859-867
- Petrakis, P. L.; Kallianos, A. G.; Wender, S. H.; Shetlar, M. R.: Metabolic studies of quercetin labeled with C¹⁴. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1959**, 85 (1), 264-271
- Phipps, A. N.; Stewart, J.; Wright, B.; Wilson*, I. D.: Effect of diet on the urinary excretion of hippuric acid and other dietary-derived aromatics in rat. A complex interaction between diet, gut microflora and substrate specificity. *Xenobiotica*, **1998**, 28 (5), 527-537
- Pietta, P. G.; Gardana, C.; Mauri, P. L.: Identification of *Ginkgo biloba* flavonol metabolites after oral administration to humans. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1997**, 693 (1), 249-255
- Plumb, G. W.; Garcia-Conesa, M. T.; Kroon, P. A.; Rhodes, M.; Ridley, S.; Williamson, G.: Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. *J. Sci. Food Agric.*, **1999**, 79 (3), 390-392
- Porrini, M.; Riso, P.: Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: A critical appraisal. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **2008**, 18 (10), 647-650
- 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. *J. Am. Coll. Nutr.*, **2007**, 26 (2), 170-181
- Raab, T.; Barron, D.; Vera, F. A.; Crespy, V.; Oliveira, M.; Williamson, G.: Catechin glucosides: occurrence, synthesis, and stability. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58 (4), 2138-2149
- Rabe, C.; Steenkamp, J. A.; Joubert, E.; Burger, J. F. W.; Ferreira, D.: Phenolic metabolites from rooibos tea (*Aspalathus linearis*). *Phytochemistry*, **1994**, 35 (6), 1559-1565

- Rawat, P.; Kumar, M.; Sharan, K.; Chattopadhyay, N.; Maurya, R.: Ulmosides A and B: flavonoid 6-C-glycosides from *Ulmus wallichiana*, stimulating osteoblast differentiation assessed by alkaline phosphatase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, 19 (16), 4684-4687
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, 26 (9-10), 1231-1237
- Rechner, A. R.; Spencer, J. P. E.; Kuhnle, G.; Hahn, U.; Rice-Evans, C. A.: Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.*, **2001**, 30 (11), 1213-1222
- 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 Radic. Biol. Med.*, **2002**, 33 (2), 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 Radic. Biol. Med.*, **2004**, 36 (2), 212-225
- Rezzi, S.; Ramadan, Z.; Martin, F.-P. J.; Fay, L. B.; van Bladeren, P.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Kochhar, S.: Human metabolic phenotypes link directly to specific dietary preferences in healthy individuals. *J. Proteome Res.*, **2007**, 6 (11), 4469-4477
- Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, **1996**, 20 (7), 933-956
- Rigaud, J.; Perez-Illzarbe, J.; Da Silva, J. M. R.; Cheynier, V.: Micro method for the identification of proanthocyanidin using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1991**, 540, 401-405
- Roura, E.; Andres-Lacueva, C.; Jauregui, O.; Badia, E.; Estruch, R.; Izquierdo-Pulido, M.; Lamuela-Raventos, R. M.: Rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to quantify plasma (-)-epicatechin metabolites after ingestion of a standard portion of cocoa beverage in humans. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53 (16), 6190-6194
- Sachverständigenbüro und Unternehmensberatung für Lebensmittel und Kosmetik, <http://www.health-claims-verordnung.de> – zuletzt besucht am 28.05.2011
- Sang, S.; Lee, M.-J.; Yang, I.; Buckley, B.; Yang, C. S.: Human urinary metabolite profile of tea polyphenols analyzed by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry with data-dependent acquisition. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2008**, 22 (10), 1567-1578
- 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. *Biol. Pharm. Bull.*, **2005**, 28 (9), 1672-1678
- Sasaki, Y.; Yamada, H.; Shimoi, K.; Kator, K.; Kinae, N.: The clastogen-suppressing effects of green tea, po-lei tea and rooibos tea in CHO cells and mice. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.*, **1993**, 286 (2), 221-232
- Sauter, W.: *Vergleich antioxidativer Eigenschaften von Extrakten aus Camellia sinensis, Rosmarinus officinalis, Cyclopia genistoides, Cyclopia sessiliflora und Aspalathus linearis*. Technische Universität München, Dissertation, **2004**
- Scalbert, A.; Williamson, G.: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, **2000**, 130 (8), 2073S-2085S
- Schneider, H.; Schwiertz, A.; Collins, M. D.; Blaut, M.: Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Arch. Microbiol.*, **1999**, 171 (2), 81-91

- Schulz, H.; Joubert, E.; Schütze, W.: Quantification of quality parameters for reliable evaluation of green rooibos (*Aspalathus linearis*). *Eur. Food Res. Technol.*, **2003**, 216 (6), 539-543
- Sesink, A. L. A.; Arts, I. C. W.; de Boer, V. C. J.; Breedveld, P.; Schellens, J. H. M.; Hollman, P. C. H.; Russel, F. G. M.: Breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits net intestinal uptake of quercetin in rats by facilitating apical efflux of glucuronides. *Mol. Pharmacol.*, **2005**, 67 (6), 1999-2006
- Silberberg, M.; Morand, C.; Manach, C.; Scalbert, A.; Remesy, C.: Co-administration of quercetin and catechin in rats alters their absorption but not their metabolism. *Life Sci.*, **2005**, 77 (25), 3156-3167
- Simon M.; Horovská L.; Greksák M.; Dusinský R.; Nakano M.: Antihemolytic effect of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) on red blood cells of Japanese quails. *Gen. Physiol. Biophys.*, **2000**, 19 (4), 365-371
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A.: Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*, **1965**, 16 (3), 144-158
- Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M.: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Lester Packer (Hrsg.): *Methods in Enzymology. Oxidants and Antioxidants*, Part A. Academic Press, San Diego, **1999** (299), 152-178
- Snijman, P. W.; Swanevelder, S.; Joubert, E.; Green, I. R.; Gelderblom, W. C. A.: The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. *Mutat. Res. - Gen. Tox. En.*, **2007**, 631 (2), 111-123
- Snyckers, F. O.; Salemi, G.: Studies of the South African medicinal plants (isolation and identification of quercetin and luteolin). *J. S. Afr. Chem. Inst.*, **1974**, 27, 5-7
- Soucek, P.; Gut, I.: Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica*, **1992**, 22 (1), 83-103
- South African Rooibos Council, Rooibosbüro Deutschland, <http://rooibosforlife.com/rooibos-geschichte/9-rooibos-ein-tee-mit-geschichte> – zuletzt besucht am 28.05.2011
- 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 Lett.*, **1999**, 458 (2), 224-230
- 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. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57 (15), 7104-7111
- 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. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49 (1), 114-117
- Steed, E.; Rodrigues, N.; Balda, M.; Matter, K.: Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol.*, **2009**, 10 (1), 95
- Stobiecki, M.: Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochem.*, **2000**, 54 (3), 237-256
- Sutherland, I. A.: Countercurrent chromatography. *Lab. Practice*, **1987**, 36, 37-38, 41-42
- Tanaka, T.; Inoue, K.; Betsumiya, Y.; Mine, C.; Kouno, I.: Two types of oxidative dimerization of the black tea polyphenol theaflavin. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49 (12), 5785-5789
- Tanaka, T.; Mine, C.; Inoue, K.; Matsuda, M.; Kouno, I.: Synthesis of theaflavin from epicatechin and epigallocatechin by plant homogenates and role of epicatechin

- quinone in the synthesis and degradation of theaflavin. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50 (7), 2142-2148
- Tanaka, T.; Matsuo, Y.; Kouno, I.: Chemistry of secondary polyphenols produced during processing of tea and selected foods. *Int. J. Mol. Sci.*, **2009**, 11 (1), 14-40
- Taylor, P. J.: Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.*, **2005**, 38 (4), 328-334
- Tian, X.; Yang, X.; Wang, K.; Yang, X.: The efflux of flavonoids morin, isorhamnetin-3-O-rutinoside and diosmetin-7-O- β -D-xylopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranoside in the human intestinal cell line Caco-2. *Pharm. Res.*, **2006**, 23 (8), 1721-1728
- Unno, T.; Sagesaka, Y. M.; Kakuda, T.: Analysis of tea catechins in human plasma by high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53 (26), 9885-9889
- van der Merwe, J. D.; Joubert, E.; Manley, M.; de Beer, D.; 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. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, 58 (4), 2214-2220
- van Velzen, E. J. J.; Westerhuis, J. A.; van Duynhoven, J. P. M.; van Dorsten, F. A.; Grün, C. H.; Jacobs, D. M.; Duchateau, G. S. M. J. E.; Vis, D. I. J.; Smilde, A. K.: Phenotyping tea consumers by nutrikinetic analysis of polyphenolic end-metabolites. *J. Proteome Res.*, **2009**, 8 (7), 3317-3330
- Verstraeten, S. V.; Keen, C. L.; Schmitz, H. H.; Fraga, C. G.; Oteiza, P. I.: Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic. Biol. Med.*, **2003**, 34 (1), 84-92
- Von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C. F.: Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chem.*, **1997a**, 60 (1), 73-77
- Von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C. F.: Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.*, **1997b**, 45 (3), 632-638
- Von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C. F.: Effect of extraction time and additional heating on the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) extracts. *J. Agric. Food Chem.*, **1997c**, 45 (4), 1370-1374
- Walgren, R. A.; Walle, U. K.; Walle, T.: Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem. Pharmacol.*, **1998**, 55 (10), 1721-1727
- Walgren, R. A.; Karnaky, K. J.; Lindenmayer, G. E.; Walle, T.: Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'- β -glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2000**, 294 (3), 830-836
- Walle, U. K.; Galijatovic, A.; Walle, T.: Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem. Pharmacol.*, **1999**, 58 (3), 431-438
- Walle, T.; Otake, Y.; Brubaker, J. A.; Walle, U. K.; Halushka, P. V.: Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **2001**, 51 (2), 143-146
- Wang, Z.; Mandell, K. J.; Parkos, C. A.; Mrsny, R. J.; Nusrat, A.: The second loop of occludin is required for suppression of Raf1-induced tumor growth. *Oncogene*, **2005**, 24, 4412-4420

- Warden, B. A.; Smith, L. S.; Beecher, G. R.; Balentine, D. A.; Clevidence, B. A.: Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. *J. Nutr.*, **2001**, 131 (6), 1731-1737
- Watzl, B.; Rechkemmer, G.: Phenolsäuren, *Ernähr.-Umsch.*, **2001a**, 48 (10), 413-416
- Watzl, B.; Rechkemmer, G.: Flavonoide, *Ernähr.-Umsch.*, **2001b**, 48 (12), 499-503
- Winter, J.; Moore, L. H.; Dowell, V. R., Jr.; Bokkenheuser, V. D.: C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1989**, 55 (5), 1203-1208
- Winter, J.; Popoff, M. R.; Grimont, P.; Bokkenheuser, V. D.: *Clostridium orbiscindens* sp. nov., a human intestinal bacterium capable of cleaving the flavonoid C-ring. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1991**, 41 (3), 355-357
- Wirtschaftsvereinigung Kräuter- und Fruchtee e. V. (WKF): Marktreport: Bunt und gesund im Trend – Kräuter- und Fruchteees stabil in 2009, **2010**
(<http://www.wkf.de/article/articleview/375/1/95/>) – zuletzt besucht am 28.05.2011
- Wätjen, W.; Fritsche, E.: Rolle des Fremdstoffmetabolismus in Pharmakologie und Toxikologie: Teil 1: Phase-I-Reaktionen, *ApothekenMagazin*, **2009**, 27, 8-14
- Yoshida, T.; Wei-Sheng, F.; Okuda, T.: Two polyphenol glycosides and tannins from *Rosa cymosa*. *Phytochemistry*, **1993**, 32 (4), 1033-1036
- Zhang, L.; Zuo, Z.; Lin, G.: Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. *Mol. Pharmaceutics*, **2007**, 4 (6), 833-845
- Zhang, S.; Yang, X.; Morris, M. E.: Flavonoids are inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated transport. *Mol. Pharmacol.*, **2004**, 65 (5), 1208-1216
- Zhang, Y.; Gao, R.; Liu, J.; Wang, S.: Simultaneous determination the concentration of isoorientin, orientin and scutellarin in healthy human plasma by solid phase extraction-HPLC. *Zhongguo Linchuang Yaolixue Zazhi*, **2007a**, 23 (4), 299-303
- 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. *Br. J. Nutr.*, **2007b**, 97 (03), 484-494
- Zhu, B. T.; Ezell, E. L.; Liehr, J. G.: Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269 (1), 292-299
- Zimmermann, B. F.; Galensa, R.: One for all—all for one: proof of authenticity and tracing of foods with flavonoids. *Eur. Food Res. Technol.*, **2007**, 224 (3), 385-393
- Zimmermann, B. F.; Papagiannopoulos, M.; Brachmann, S.; Lorenz, M.; Stangl, V.; Galensa, R.: A shortcut from plasma to chromatographic analysis: Straightforward and fast sample preparation for analysis of green tea catechins in human plasma. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, **2009**, 877 (8-9), 823-826

6 Anhang

6.1 Ein- und Ausschlusskriterien zur Teilnahme an den Humanstudien

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

6.2 Während des Studienzeitraums zu meidende flavonoidreiche Lebens- und Genussmittel

Gemüse:

- Grünkohl
- Brokkoli
- Grüne Bohnen
- Sellerie
- Aubergine
- Zwiebel
- Tomaten

Obst:

- Äpfel
- 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

- Johannisbeersaft
- Holunderbeersaft
- Apfelsinensaft
- Roter Traubensaft
- Grapefruitsaft

6.3 Standardisierte und energieadjustierte Kost während der Untersuchungstage

Tabelle 6.1: Übersicht über die an den Untersuchungstagen der beiden Humanstudien verabreichte Kost

	Lebensmittel	Getränk	Kalorien (Kcal)
7.45 Uhr		500 mL Tee, aktive Fraktion oder Wasser bzw. 500 mL frisches Fertiggetränk, gelagertes Fertiggetränk oder Fertiggetränk ohne Rooibos-extrakt	
Frühstück	1 Brötchen (70 g)	250 mL Wasser	177,8
8.30 Uhr	2 Frischkäse (16,67 g)		86,6
Zwischenmahlzeit	1 Brötchen (70 g)	250 mL Wasser	177,8
10.30 Uhr	1 Butter (20 g)		149,6
	1 Schb. Schinkenwurst (18 g)		37,5
	1 Schb. Kochschinken (30 g)		54,0
Mittag	175 g (rohe) Nudeln	500 mL Wasser	524,3
14.00 Uhr	(ca. 438 g gekochte Nudeln)		
	1 Butter (20 g)		149,6
	Salz		0
	20 g Parmesan		75,0
	1 Joghurt (natur, 3,5 %) (150 g)		91,5
	2 TL Zucker		50,0
Zwischenmahlzeit	1 Brötchen (70 g)	250 mL Wasser	177,8
16.00 Uhr	2 Frischkäse (16,67 g)		86,6
Abends	1 Nudelgericht	1500 mL Wasser	716,0
Spätmahlzeit	Bifi XXL		202,0
		3250 mL	2756,1

6.4 Flavonoidgehalte der Rooibosformulierungen

6.4.1 Rooibostee

Tabelle 6.2: Quantifizierung der Hauptflavonoide im wässrigen Extrakt (10 g Tr auf 500 mL Wasser; n = 12) (modifiziert nach BREITER et al., 2011)^a

Verbindung	mg/500 mL	μmol
Isoorientin (11)	27,5 ± 1,3	61,2 ± 2,8
Orientin (14)	17,9 ± 0,8	40,0 ± 1,9
Aspalathin (16)	299,5 ± 4,8	662,6 ± 10,7
Rutin (18)	8,4 ± 0,2	13,7 ± 0,3
Quercetin-O-rutinosid (19)	6,2 ± 0,2	10,1 ± 0,3
Isovitexin (20)	3,0 ± 0,1	7,0 ± 0,3
Vitexin (21)	2,0 ± 0,1	4,6 ± 0,2
Hyperosid (22)	0,8 ± 0,0	1,6 ± 0,1
Isoquercitrin (23)	3,1 ± 0,2	6,6 ± 0,4
Luteolin-O-hexosid (24)	0,9 ± 0,1	2,0 ± 0,2
Nothofagin (25)	36,3 ± 1,4	83,3 ± 3,3
Σ	405,6 ± 9,2	892,7 ± 20,5

^aWerte angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung (als Glykoside berechnet)

6.4.2 Aktive Fraktion

Tabelle 6.3: Quantifizierung der Hauptflavonoide in der aktiven Fraktion für den ersten Untersuchungstag (0,5 g Tr auf 500 mL Wasser; n = 2). Die am zweiten und dritten Untersuchungstag verabreichte aktive Fraktion zeigte ein vergleichbares Flavonoidprofil.^a

Verbindung	mg/500 mL	μmol
Isoorientin (11)	7,6 ± 0,5	17,0 ± 1,1
Orientin (14)	21,1 ± 0,5	47,2 ± 1,2
Aspalathin (16)	281,4 ± 4,2	622,6 ± 9,2
Rutin (18)	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,1
Quercetin-O-rutinosid (19)	1,4 ± 0,0	2,2 ± 0,0
Isovitexin (20)	1,4 ± 0,0	5,4 ± 0,0
Vitexin (21)*	0,4	0,9
Hyperosid (22)	ND	-
Isoquercitrin (23)	ND	-
Luteolin-O-hexosid (24)	ND	-
Nothofagin (25)	8,3 ± 0,4	19,2 ± 1,1
Σ	323,9 ± 5,6	716,8 ± 11,5

^aWerte angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung (als Glykoside berechnet); *, nur in unverdünnter Probe nachweisbar; ND, nicht detektiert

6.4.3 Frisches und gelagertes Fertiggetränk

Tabelle 6.4: Übersicht über die Gehalte der Hauptflavonoide in 500 mL des frischen und gelagerten Fertiggetränks (n = 2) sowie über die prozentualen Abnahmen der Flavonoidgehalte bei Vergleich von gelagertem Fertiggetränk mit dem Frischgetränk^a

Verbindung	Fertiggetränk, frisch		Fertiggetränk, gelagert*		prozentuale Abnahme [%]
	mg/500 mL	μmol	mg/500 mL	μmol	
Isoorientin (11)	28,2 ± 0,3	63,0 ± 0,7	22,2 ± 0,3	49,6 ± 0,7	21
Orientin (14)	23,3 ± 0,1	52,1 ± 0,2	22,0 ± 0,2	49,0 ± 0,5	6
Aspalathin (16)	163,9 ± 0,6	362,6 ± 1,3	107,2 ± 1,3	237,2 ± 2,8	35
Rutin (18)	9,8 ± 0,1	16,0 ± 0,2	6,2 ± 0,2	10,2 ± 0,3	36
Isovitexin (20)	2,8 ± 0,0	6,4 ± 0,0	2,2 ± 0,0	5,2 ± 0,1	19
Vitexin (21)	3,7 ± 0,0	8,5 ± 0,0	3,4 ± 0,1	8,0 ± 0,1	7
Hyperosid (22)	0,8 ± 0,0	1,8 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,3 ± 0,1	31
Isoquercitrin (23)	3,3 ± 0,0	7,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1	4,5 ± 0,1	36
Luteolin-O-hexosid (24)	2,2 ± 0,0	4,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0	4,3 ± 0,0	12
Nothofagin (25)	23,4 ± 0,2	53,6 ± 0,5	17,6 ± 0,2	40,4 ± 0,5	25
Σ	261,3 ± 1,3	575,9 ± 3,0	185,5 ± 2,4	409,6 ± 5,2	

^aWerte angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung (als Glykoside berechnet)

*Da das Flavonoidprofil nach neunmonatiger Lagerung der Fertiggetränke nicht bestimmt wurde (siehe 2.1.4 und 4.5.8), wurden die Mittelwerte aus den Gehalten nach sechs- und zwölfmonatiger Lagerung gebildet.

