

Lehrstuhl für Phytopathologie der Technischen Universität München

Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Freising

**Vergleich antioxidativer Eigenschaften von Extrakten aus
Camellia sinensis, *Rosmarinus officinalis*,
Cyclopia genistoides, *Cyclopia sessiliflora* und
*Aspalathus linearis***

Wiebke Sauter

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. G. Forkmann

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. E.F. Elstner, i. R.

2. Univ.-Prof. Dr. D. Treutter

Die Dissertation wurde am 26.10.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 16.12.2004 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	5
1.1	Generierung und Folgereaktionen von ROS und RNS	5
1.2	Pflanzliche Extrakte als Antioxidanzien	7
1.3	Gegenstand der Untersuchungen	8
1.3.1	Charakterisierung der extrahierten Pflanzen	10
1.3.2	Pflanzenextrakte in biochemischen Testsystemen	12
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	17
2.1	Material	17
2.1.1	Pflanzenextrakte und Trolox	17
2.1.2	Chemikalien	17
2.1.3	Puffer und Lösungen	18
2.1.4	Geräte und Laborartikel	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Aufbereitung des Probenmaterials	21
2.2.2	Gehalt an löslichen Polyphenolen	22
2.2.3	Chemische und photodynamische Systeme	22
2.2.4	Humanes Blutplasma als biochemisches Testsystem	26
2.2.5	Bestimmung von IC - Konzentrationen	30
2.3	Studie zur Bioverfügbarkeit	30
2.3.1	Ermittlung der Hämoglobingehalte im Plasma	31
2.3.2	Biochemische Systeme	31
3	<u>ERGEBNISSE (PHASE I)</u>	32
3.1	Ziel und Vorgehensweise	32
3.2	Ergebnisse im Fenton - System	33
3.3	Ergebnisse im Peroxynitrit - System	38
3.4	Ergebnisse im ABTS - System	42
3.5	Ergebnisse im Xanthin / Xanthinoxidase (X / XOD) - System	46
3.6	Ergebnisse im Rose - Bengal (Cu ²⁺) - System	50
3.7	3.8 Bewertung der Ergebnisse aus PHASE I	56

4	<u>ERGEBNISSE (PHASE II)</u>	60
4.1	Ziel und Vorgehensweise	60
4.2	Ergebnisse im ABTS - System (PHASE II)	62
4.3	Ergebnisse im Xanthin / Xanthinoxidase - System (X / XOD)	67
4.4	Ergebnisse im Rose - Bengal - System	72
4.5	Ergebnisse im Rose - Bengal (Cu ²⁺) - System	78
4.6	Gehalt an löslichen Polyphenolen	83
4.7	Bewertung der Ergebnisse aus PHASE II	85
5	<u>ERGEBNISSE (PHASE III)</u>	90
5.1	Ziel und Vorgehensweise	90
5.2	Blutparameter aus Vollblut	92
5.3	Kupferinduzierte LDL - Oxidation	96
5.4	Plasma im ABTS - System	97
5.5	Plasma im Xanthin / Xanthinoxidase - System	98
5.6	Hämoglobin - und Proteingehalte im Blutplasma	100
6	<u>DISKUSSION</u>	104
6.1	Struktur - Aktivitäts - Beziehungen	105
6.1.1	Radikalfangende Eigenschaften der Extraktinhaltsstoffe	105
6.1.2	Fenton - System; Strukturen und Aktivität	111
6.1.3	Peroxyinitrit - System; Strukturen und Aktivität	113
6.1.4	ABTS - System; Strukturen und Aktivität	114
6.1.5	Xanthin / Xanthinoxidase - System; Strukturen und Aktivität	116
6.1.6	Hemmung der Lipidperoxidation im Rose - Bengal - System	120
6.1.7	Hemmung der Lipidperoxidation in der kupferinduzierten LDL - Oxidation	122
6.2	Bioverfügbarkeit von Rotbusch - Extrakt	124
6.2.1	Blutparameter	124
6.2.2	LDL - Oxidation	125
6.2.3	Antioxidative Kapazität des Plasmas	126
7	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	128

8	<u>LITERATUR</u>	<u>130</u>
----------	-------------------------------	-------------------

9	<u>CURRICULUM VITAE.....</u>	<u>142</u>
----------	-------------------------------------	-------------------

10	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>143</u>
-----------	--------------------------------	-------------------

Abkürzungen

ABTS	2,2` - Azino - bis (3-Ethyl) benzthiazolin - 6 - sulfonsäure
BMI	Body mass index
BSA	Bovine Serum Albumine
(e)	entfärbt
EC	Epicatechin
ECG	Epicatechingallat
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure - Dinatriumsalz - Dihydrat
(f)	fermentiert
gen	<i>genistoides</i>
GT	Grüntee - Extrakt
HDL	High Density Lipoprotein
HO	Honigbusch - Extrakt
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC	Inhibition Concentration
KMB	α -Keto- γ -methiolbuttersäure
LDL	Low Density Lipoprotein
n.e.	nicht erreicht
PBS	Phosphate buffered Saline
RM	Rosmarin - Extrakt
RNS	Reactive Nitrogen Species
RO	Rotbusch - Extrakt
ROS	Reaktive Oxygen Species
RS	Rosmarinsäure - Extrakt
sess	<i>sessiliflora</i>
SY	Sternnyolk
TW	Tween
VDL	Very low Density Lipoprotein
WT	Weißtee - Extrakt
X	Xanthin
XOD	Xanthinoxidase

1 Einleitung

Pflanzliche Antioxidanzien sind von zunehmender kommerzieller Bedeutung in der Herstellung von Medikamenten, Lebensmittel- und Kosmetikprodukten. Die vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der antioxidativen Kapazität verschiedener Auszüge aus einer Reihe von Tee- und Gewürzpflanzen, mit dem Ziel, Pflanzenextrakte zu etablieren, die ein möglichst breites antioxidatives Wirkungsspektrum haben. Dafür werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) und reaktive Stickstoffspezies (RNS, reactive nitrogen species), die beim Verderb von Lebensmitteln und bei der Ausbildung verschiedener Krankheiten eine wichtige Rolle spielen, gezielt *in vitro* gebildet, um die entgiftenden Eigenschaften der Extrakte auf diese zu ermitteln und zu vergleichen.

1.1 Generierung und Folgereaktionen von ROS und RNS

Als wichtigste Vertreter der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gelten das Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$), das Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) und der Singulett-Sauerstoff (1O_2). Ein Vertreter der reaktiven Stickstoffspezies (RNS) ist das nichtradikalische Peroxynitrit ($ONOOH$).

Der Transfer eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff generiert das Superoxidradikalanion. Superoxidradikale dismutieren bei neutralem bis leicht saurem pH - Wert spontan zu Wasserstoffperoxid und Wasser, während sie in alkalischem Medium relativ stabil bleiben. H_2O_2 kann aber auch (enzymkatalysiert) durch einen Zwei - Elektronenübergang auf molekularen Sauerstoff gebildet werden. In Anwesenheit von H_2O_2 und Übergangsmetallen wie zum Beispiel Eisen oder Kupfer werden über die Haber - Weiss - Reaktion Hydroxylradikale generiert. Der Singulett-Sauerstoff (1O_2) wird physikalisch durch die Übertragung von Lichtenergie auf photodynamisch aktive Moleküle gebildet und reagiert schnell mit organischen Molekülen. Peroxynitrit entsteht *in vivo* durch die extrem schnelle Reaktion ($k = 6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$) von Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxid ($O_2^{\cdot-}$).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS) stehen in Zusammenhang mit vielen der sogenannten Volkskrankheiten. Die bedeutendste in Europa und den Vereinigten Staaten ist die Artherosklerose und die damit verbundenen Herz - Kreislauf - Erkrankungen. ROS und RNS verursachen die Oxidation

von DNA, Proteinen, Lipiden und anderen essentiellen Zellkomponenten, wodurch die Funktionsfähigkeit der Zelle beeinträchtigt wird. Das Hydroxylradikal wird als eine der wichtigsten Spezies für die Pathologie freier Radikale angesehen. Es reagiert schnell mit nahezu allen organischen Molekülen, die dabei zerstört oder stark geschädigt werden. Hydroxylradikale sind bei vielen Erkrankungen wie Krebsentwicklung durch Rauchen und Asbestexposition, Arthritis und Arthrose, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson beteiligt. Die Haut, das Lungenepithel und das Intestinalepithel sind sowohl endogenen als auch exogenen Quellen von oxidativem Stress ausgesetzt. Abgesehen von der Hautkrebsentstehung durch UV - Strahlung führt die Akkumulation von Oxidationsprodukten zu Alterungsprozessen der Haut (Kohen 1999). Der Abwehrmechanismus gegen oxidativen Stress besteht aus mehreren Komponenten, den Reparatursystemen (z.B. DNA - reparierende Enzyme), den Präventionsmechanismen (z.B. Chelatbindung redoxaktiver Metalle), der physikalischen Abwehr (z.B. Stabilisierung von Membranen) und der antioxidativen Verteidigung (z.B. durch Enzyme oder niedermolekulare Radikalfänger (Scavenger)). Die antioxidative Abwehr spielt die bedeutendste Rolle bei oxidativem Stress. Stehen dem Körper zu wenig ROS / RNS - abfangende Antioxidanzien zur Verfügung, kommt es zur Ausbildung entzündlicher Reaktionen und zu Gewebeschädigungen, die an der Entstehung oben genannten pathologischen Situationen beteiligt sind (Elstner 1993; Hippeli und Elstner 1997). Eine Möglichkeit, den Körper bei der Abwehr reaktiver Verbindungen zu unterstützen, ist eine ausgewogene Ernährung, die reich an pflanzlichen Antioxidanzien ist. Die Haut lässt sich durch Applikation antioxidativer Substanzen effektiv schützen (Aquino et al. 2002).

Reaktive Sauerstoffspezies und reaktive Stickstoffspezies gelten aber nicht nur als entscheidender Faktor bei der Ausbildung pathophysiologischer Situationen. Vor allem durch Wärme und Licht entstehen ROS in Lebensmitteln und Kosmetika, welche zu Qualitätsverlust und Verderb führen (Aruoma et al. 1996; Hrás et al. 2000). Um dies zu vermeiden, müssen Produkte der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie durch Konservierungsstoffe geschützt werden. Hierbei bekommen pflanzliche Antioxidanzien immer größere Bedeutung (Schwarz et al. 1992; Chen et al. 1998; Yanishlieva und Marinova 2001), da sie vom Verbraucher eher akzeptiert werden und zudem einen nahrungsmittelergänzenden bzw. hautprotektiven Effekt haben. Extrakte aus Tee sind beispielsweise in den unterschiedlichsten Produkten der

Nahrungsmittel - und Kosmetikindustrie zu finden. Zum einen dienen sie dem Schutz des Produktes selbst, zum anderen können sie auch gleichzeitig den Gesundheitszustand des Nutzers verbessern.

1.2 Pflanzliche Extrakte als Antioxidanzien

Die antioxidativen Eigenschaften pflanzlicher Extrakte basieren auf deren Inhaltsstoffen. Oft werden sie über ihre Leitsubstanzen definiert. Die Leitsubstanzen aller in dieser Arbeit untersuchten Extrakte gehören zur Stoffklasse der Phenole, welche die größte Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe darstellen. Sie dienen der Pflanze als Schutz gegen Pilz- und Bakterieninfektionen, regeln den pflanzlichen Hormonhaushalt und dienen als Signalsubstanzen (Heß 1991). Ihre genaue Funktion ist aber noch Gegenstand der Forschung. Phenole zeichnen sich durch ein aromatisches Ringsystem mit mindestens einer Hydroxylgruppe oder funktionellen Derivaten derselben aus. Die Flavonoide haben die größte Bedeutung unter den Polyphenolen in Pflanzen und sind bekannt für ihr hohes antioxidatives Potenzial (Bermond et al 1990; Shahidi et al. 1992; Halliwell and Gutteridge 1999; Heim et al. 2002). Sie leiten sich strukturell vom Flavan (Abbildung 1) ab und lassen sich, je nach Oxidationszustand des mittleren Heterozyklus, in eine Reihe von Untergruppen einteilen. Zu jeder Untergruppe gehört eine Anzahl von Substanzen, die sich nur in bestimmten Substituenten des Grundskelettes, vor allen in Substituenten ihres Ringes B voneinander unterscheiden. Die meisten Flavanderivate kommen in Pflanzen als O - Glycoside vor.

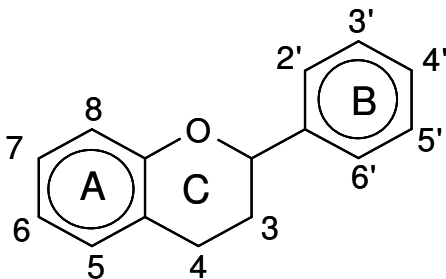


Abbildung 1: Flavanskelett bestehend aus zwei aromatischen Ringen (Ring A und Ring B) die über einen heterozyklischen Ring C miteinander in Verbindung stehen.

Einer Reihe von Polyphenolen werden positive physiologische und pharmakologische Auswirkungen auf den menschlichen und tierischen Organismus zugeschrieben, die oft auf radikalfangende Mechanismen (= Scavengereigenschaften) zurückzuführen sind. Über die Absorption, den Metabolismus und die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen im Menschen weiß man trotz zahlreicher Untersuchungen noch relativ wenig. In der Nahrung liegen, bis auf die Flavan - 3 - ole, alle Flavonoide glycosidisch gebunden vor. Nach neueren Untersuchungen können sie im Dünndarm sowohl als Aglykone (mikrobielle Spaltung) oder auch als Glycoside aufgenommen werden, wobei die Aufnahme von Art und Position der Glycoside abhängt (Hollman et al. 1999; Olthof et al. 2000) Der Metabolismus der Polyphenole findet hauptsächlich im Dickdarm durch Bakterien und nach der Absorption in der Leber statt (Hollman und Katan 1998). Um den Einfluss von Polyphenolen auf die menschliche Gesundheit genauer beurteilen zu können, werden mehr Informationen über Absorption, Bioverfügbarkeit und Metabolismus, sowie Einflüsse der Matrix auf einzelne Polyphenole benötigt.

1.3 Gegenstand der Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt elf Extrakte aus fünf verschiedenen Tee- und Gewürzpflanzen (Tabelle 1) sowie die, bei ähnlichen Fragestellungen üblicherweise verwendete, Bezugssubstanz Trolox untersucht. Das wasserlösliche α - Tocopherolanalogon Trolox besitzt sehr gute antioxidative Eigenschaften und wird in der internationalen Literatur als Standard für die Ermittlung des sogenannten Troloxäquivalents herangezogen, was einen Vergleich unterschiedlichster Proben ermöglicht. Das Troloxäquivalent ist ein errechneter Wert, der angibt, welche Menge Trolox (mM oder μ g) nötig wäre, um die gleiche Wirkung wie die getestete Substanz zu erzielen.

In Tabelle 1 sind die untersuchten Extrakte, deren Kürzel, ihre Herkunftspflanzen (*kursiv*), ihr Fermentationsstatus, ihre Leitsubstanzgehalte und das verwendete Extraktionsmittel aufgelistet. Im Anschluss an die Tabelle werden die Pflanzen, aus denen die Extrakte hergestellt wurden, näher beschrieben.

Tabelle 1: Charakterisierung der verwendeten Extrakte

Herkunfts- pflanze	Extrakte	Leitsubstanzen und weitere Inhaltstoffe	Anteil am Extrakt
<i>Camellia sinensis</i>	Grüntee - Extrakt (GT)	Coffein	5,69 %
	unfermentiert	Epicatechin	2,09 %
	Ethanol (100 %)	Epigallocatechingallat	23,28 %
		Epicatechingallat	6,7 %
	Weißtee - Extrakt (WT)	Polyphenole, davon	95 %
	unfermentiert	Epigallocatechingallat	50 %
	Ethanol (100 %)		
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Rosmarin - Extrakt (RM)	Carnosolsäure	60 %
	Ethanol (100 %)		
	Rosmarinsäure - Extrakt (RS)	Rosmarinsäure	4,5 %
	Ethanol (100 %)	Äpfelsäure	3,6 %
		Zitronensäure	4,7 %
<i>Aspalathus linearis</i>	Rotbusch - Extrakt (RO)	Aspalathin	19,2 %
	unfermentiert		
	Ethanol (100 %)		
	Rotbusch - Extrakt (RO (f))	Aspalathin	2,15 %
	fermentiert		
	Ethanol / Wasser (80 % : 20 %)		
	Rotbusch - Extrakt (RO (e))	Aspalathin	16,6 %
	unfermentiert, entfärbt		
	Ethanol / Wasser (80 % : 20 %)		
<i>Cyclopia genistoides</i>	Honigbusch - Extrakt (HO gen1)	Mangiferin	14,9 %
	unfermentiert	Isomangiferin	5,4 %
	Ethanol 100 %	Hesperidin	3,0 %
	Honigbusch - Extrakt (HO gen2)	Mangiferin	12,31 %
	unfermentiert	Isomangiferin	4,1 %
	Ethanol / Wasser (80 % : 20 %)	Hesperidin	0,14 %
<i>Cyclopia sessiliflora</i>	Honigbusch - Extrakt (HO sess)	Mangiferin	1,56 %
	unfermentiert	Isomangiferin	0,49 %
	Ethanol / Wasser (80 % : 20 %)	Hesperidin	0,57 %
	Honigbusch - Extrakt (HO sess(e))	Mangiferin	3,28 %
	unfermentiert, entfärbt	Isomangiferin	1,01 %
	Ethanol / Wasser (80 % : 20 %)	Hesperidin	1,08 %

1.3.1 Charakterisierung der extrahierten Pflanzen

Camellia sinensis

Eine der wichtigsten Quellen für Polyphenole und insbesondere Flavonoide, auch in der westlichen Welt, ist Tee. Die in Tee überwiegend vorkommenden Flavonoide sind Flavanole (OH an C3 und/oder an C4) und Flavonole (OH an C3 und Oxo an C4). Grüner Tee und Schwarzer Tee stellen dabei die am häufigsten konsumierten Teesorten dar. Die zugrundeliegende Teepflanze *Camellia sinensis* wird in der südöstlichen Region von China angebaut und verarbeitet. Bei der Produktion des Grünen Tees verhindern spezielle Zerkleinerungs- und Trocknungsprozesse die enzymatische Oxidation der Polyphenole in den Blättern, die dort eine Konzentration bis zu 30 % des Trockengewichtes erreichen (Paquay et al. 2000; Wang et al. 2000). Bei der Produktion von schwarzem Tee durchlaufen die Blätter einen, durch Polyphenoloxidasen katalysierten, aeroben Oxidationsprozess. Im Gegensatz zum Grünen Tee werden zur Herstellung des Weißen Tees ausschließlich die Knospen der Pflanze verwendet. Durch die feinen silbrigen Haare bekommt der Tee in getrockneter Form ein weißgraues Aussehen. Der Weiße Tee wird nicht vorgetrocknet. Damit bleiben seine Polyphenol- und auch Koffeingehalte im Vergleich zu Grünem Tee höher (Santana-Rios et al. 2001). Den Hauptanteil der Polyphenole des Grünen Tees machen die Catechine (Flavanole) aus, wobei als wichtigste Epicatechin (EC), Epigallocatechin (EGC), Epicatechingallat (ECG) und Epigallocatechingallat (ECGC) zu nennen sind. Catechine gehören zu den am besten untersuchten Flavonoiden, wobei ihnen ein sehr hohes antioxidatives Potenzial gegenüber ROS und RNS zugeschrieben wird (Prior und Cao 1999; Ueda et al. 1996; Guo et al. 1999). Zudem wird die antikarzinogene, antivirale, antibakterielle und antiallergene Wirkung von Produkten aus *Camellia sinensis* auf die hohen Catechingehalte zurückgeführt (Bushman 1998; Dufresne und Farnworth 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Extrakte aus *Camellia sinensis* untersucht. Der Anteil an Catechinen lag beim Grüntee - Extrakt (GT) bei 38,09 % und beim Weißtee - Extrakt (WT) bei 95 %.

Rosmarinus officinalis

Rosmarinus officinalis ist eine mediterrane, krautige Gewürzpflanze. Die industrielle Nutzung von Rosmarin beschränkte sich bis vor kurzem noch auf die Destillation flüchtiger Öle aus dieser Pflanze, bis seine konservierenden Eigenschaften für die

Nahrungsmittelindustrie entdeckt wurden. Seither werden Extrakte aus Rosmarin im Lebensmittelbereich vielfach verwendet (Aruoma et al. 1996; Pearson et al. 1997).

Rosmarin und seine Extrakte schützen Fette und fetthaltige Nahrungsmittel vor oxidativen Veränderungen (Schwarz und Ternes 1992). Die guten antioxidativen Eigenschaften von *Rosmarinus officinalis* beruhen dabei auf phenolischen Diterpenen, wie Carnosolsäure, Carnosol, Rosmanol und anderen phenolischen Säuren, wie zum Beispiel Rosmarinsäure. Untersucht wurden ein Rosmarin - Extrakt (RM), dessen Carnosolsäuregehalt bei 60 % lag und ein carnosolsäurefreier Extrakt (Rosmarinsäure - Extrakt, RS) mit einem Rosmarinsäuregehalt von 4,5 %.

Aspalathus linearis

Aspalathus linearis (Rotbusch oder Rooibos) ist eine in Südafrika im Cedarberg - Gebiet endemisch wachsende Fabaceae, der gesundheitsfördernde Eigenschaften z.B. bei Allergien, Schlaflosigkeit und photosensitiver Dermatitis zugeschrieben werden (Snyckers und Salemi 1974; Morton 1983; Ferreira et al. 1998 (2); Schulz et al. 2000). Aber auch antimutagene, antikanzerogene und antiinflammatorische Eigenschaften werden für den Rotbusch beschrieben (Joubert 1994; Joubert und Ferreira, 1996). *Aspalathus linearis* enthält als Hauptkomponente Aspalathin. Dabei handelt es sich um ein Dihydrochalkon (Koeppen und Roux 1966) mit einer kovalenten Bindung zu Glucose. Chalkone sind keine Flavanderivate sondern deren Vorläufer. Ihnen fehlt der charakteristische mittlere Heterozyklus. Sie gehen aber spontan, besonders in leicht sauerem Medium, in echte Flavanderivate, die Flavanone über. Zur Gewinnung des süßlichen, fermentierten Tees werden die geernteten Triebe, Blätter und Blüten, analog der Prozessierung des schwarzen Tees, einem Fermentationsprozess unterzogen. Das Aspalathin wird dabei zu seinen korrespondierenden Flavonen, Orientin und Isoorientin, oxidiert (Joubert 1994). Aber nicht nur das Aspalathin wird durch die Fermentation verändert. Der Gesamtpolyphenolgehalt ist in unfermentiertem Material insgesamt höher als in fermentiertem (Marnewick und Snijman 1999). Insgesamt wurden drei Extrakte aus *Aspalathus linearis* untersucht. Zwei davon wurden aus unfermentiertem Material hergestellt: der ethanolische Extrakt (RO) mit einem Aspalathingehalt von 19,2 % und der, zusätzlich entfärbte, Ethanol / Wasser - Mischextrakt (RO(e) mit einem Aspalathingehalt von 16,6 %. Der ethanolische Extrakt aus fermentiertem Material (RO(f)) hatte einen Aspalathinanteil von 2,15 %.

Cyclopia spec.

Cyclopia spec. (Honigbusch) wächst endemisch, mit vielen verschiedenen Arten, ebenfalls in Südafrika am Kap der guten Hoffnung (Ferreira et al. 1998 (1)). Wie auch *Aspalathus linearis* werden dem koffeinlosen, tanninfreien Tee verschiedenste gesundheitsfördernde Effekte zugeschrieben (Kamara et al. 2003). Besondere Inhaltsstoffe und daher Leitsubstanzen dieser Pflanze sind die C-glycosidischen Xanthone Mangiferin und Isomangiferin und das Flavanon Hesperidin, ein O-Rutinosyl. Für Hesperitin (Aglycon zu Hesperidin) ermittelten van Acker et al. (1996 (1)) eine inhibierende Wirkung auf die Lipidperoxidation. Für Mangiferin sind radikalfangende Eigenschaften bei Sato et al. (1992) beschrieben. Untersuchungsgegenstand waren zwei Extrakte der Spezies *Cyclopia genistoides* und zum Vergleich zwei Extrakte der Spezies *Cyclopia sessiliflora*. Durch die Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmittel unterschieden sich die beiden Extrakte aus *Cyclopia genistoides* (Ethanol: HO gen1; Ethanol / Wasser: HO gen2) nur in ihren Leitsubstanzgehalten (23,3 % und 16,55 %). Die beiden Auszüge aus *Cyclopia sessiliflora* wurden mittels Ethanol / Wasser - Mischextraktion hergestellt. Sie unterschieden sich durch Entfärbung (HO sess(e)) und veränderte Leitsubstanzgehalte (HO sess: 2,62 %; HO sess (e): 5,37 %).

1.3.2 Pflanzenextrakte in biochemischen Testsystemen

Um die verschiedenen Wirkmöglichkeiten antioxidativer Substanzen ausreichend darstellen zu können, müssen verschiedene biochemische *in vitro* Testsysteme herangezogen werden. In diesen Modellsystemen, die im Folgenden einzeln vorgestellt werden, werden pathophysiologische Situationen sowie oxidative Prozesse in Lebensmitteln und Kosmetika simuliert. Dabei hat das Milieu, in dem die Reaktionen stattfinden, einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkung antioxidativer Substanzen. Die Aktivität von Antioxidanzien kann, abhängig vom umgebenden Medium und den verwendeten Emulgatoren, stark variieren (Ruben und Larson 1985, Frankel et al. 1994; Frankel et al. 1996, Roginsky 1990). Dem Einsatz von Emulgatoren muss demnach bei der Betrachtung antioxidativer Eigenschaften von pflanzlichen Extrakten eine besondere Rolle zukommen. Die teilweise schlechte Wasserlöslichkeit der untersuchten Extrakte und ihrer Inhaltsstoffe erforderte den Einsatz von Lösungsvermittlern. Inhalt der Untersuchungen war unter anderem der Vergleich zweier Lösungsvermittler und ihre Auswirkungen auf das antioxidative

Verhalten von Pflanzenextrakten. Dabei handelte es sich einmal um den herkömmlichen, synthetischen Lösungsvermittler Tween80 und zum anderen um den Lecithinemulgator Sternylk.

Die biochemischen *in vitro* Testsysteme (Schempp et al. 2000)

1. Im ABTS - System wird der initiale Schritt der Lipidperoxidation, die Wasserstoffabstraktion, nachempfunden. Durch die Reaktion von Myoglobin und Wasserstoffperoxid werden Ferrylradikalkationen generiert. Durch Wasserstoffabstraktion oxidieren ABTS - Moleküle zu ABTS - Kationradikalen.
2. Einer der wichtigsten Mechanismen zur Generierung von Hydroxylradikalen *in vivo* ist die reduktive Spaltung von Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Eisen(II) - Salzen: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^\bullet + OH + Fe^{3+}$. Im hydrophilen Fenton - System wird diese Reaktion *in vitro* nachvollzogen.
3. Das hydrophile Xanthin / Xanthinoxidase - System ist ein Modell für die destruktiven Vorgänge in Geweben während ischämischer Vorgänge. Während der Ischämie wird das Enzym Xanthindehydrogenase (XDH) in Xanthinoxidase (XOD) umgewandelt. Die Xanthindehydrogenase katalysiert in der oxygenierten Zelle die Oxidation von Hypoxanthin über Xanthin zur Harnsäure unter gleichzeitiger Reduktion von NAD^+ zu $NADH$. Die Xanthinoxidase jedoch reduziert Sauerstoff auf Kosten von Xanthin zum Superoxidradikalanion (20 %) und zu Wasserstoffperoxid (80 %). Im Modellsystem wird diese Reaktion *in vitro* nachempfunden: $Xanthin + O_2 + H_2O \xrightarrow{XOD} Harnsäure + O_2^{\bullet-} + H_2O_2$. Durch Fe^{2+} , das in Spuren im verwendeten Puffer bzw. der Enzympräparation vorliegt, wird H_2O_2 zum OH - Radikal reduziert: $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^\bullet + OH + Fe^{3+}$. Fe^{2+} selbst geht dabei in Fe^{3+} über, welches durch Superoxid wiederum zu Fe^{2+} regeneriert wird: $Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \rightarrow O_2 + Fe^{2+}$.
4. Peroxynitrit ist ein hochdestruktives nichtradikalisches Oxidans, das *in vivo* und *in vitro* durch die extrem schnelle Reaktion von Stickstoffmonoxid (NO) und dem Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet-}$) gebildet wird. Peroxynitrit entsteht *in vivo* hauptsächlich unter pathophysiologischen Bedingungen, und zwar, wenn zur gleichen Zeit eine hohe Superoxidkonzentration (über die X / XOD - Reaktion bzw. über aktivierte Leukozyten) und in größeren Mengen NO (Leukozyten, Gefäßendothelzellen) erzeugt wird. Dies ist z.B. bei

Artherosklerose, Schocksituationen, Herzinfarkt und Raucherkrankheiten der Fall. Im Modell wird mit synthetisch hergestelltem Peroxynitrit der Angriff auf organische Moleküle nachempfunden.

5. Die Lipidperoxidation ist eine der häufigsten und eine der ersten Reaktionen, die unter pathophysiologischen Bedingungen beobachtet wird. Sie ist auch die Reaktion, die zur Ranzigkeit fetthaltiger Nahrungsmittel und Kosmetika führt. Dabei handelt es sich um einen Radikalkettenprozess, bei dem im ersten Schritt der Reaktion Fettsäurehydroperoxide unter Sauerstoffverbrauch gebildet werden. Formal liegt eine Substitutionsreaktion vor, die in zwei Stufen abläuft, d.h. auf eine Wasserstoffabstraktion folgt eine Sauerstoffaddition. Die Wasserstoffabstraktion ist der initiale Schritt und wird durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung der Doppelbindung im Fettsäuremolekül, der sogenannten Dienkonjugation, um die radikalische Stelle zu stabilisieren. An diese lagert sich dann Sauerstoff unter Bildung eines Fettsäurehydroperoxyradikals (ROO^\bullet) an, das seinerseits durch erneute Wasserstoffabstraktion zum Fettsäureperoxid (ROOH) abreagiert (Kettenreaktion). Im Rose - Bengal - System bildet der über die photodynamisch aktive Substanz Rose - Bengal generierte Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) direkt das Peroxid der verwendeten α - Linolensäure. Fettsäureperoxide zerfallen zu instabilen Alkoxy - Radikalen (RO^\bullet), die ihrerseits zu Ethan oder Pentan (je nach Fettsäure) und aldehydischen Abbauprodukten (z.B. Malondialdehyd) fragmentieren. Während dieses Prozesses entsteht auch das Hydroxylradikal (OH^\bullet). Eine Abwandlung des Modellsystems ist durch den Zusatz von Kupferionen möglich. Cu^{2+} oxidiert das Ethylradikal zu Ethen, wobei es selbst reduziert wird. Durch die entstehenden Cu^+ - Ionen wird der Fettsäureperoxid - Zerfall beschleunigt, wobei Cu^+ zu Cu^{2+} regeneriert wird (Abbildung 2).

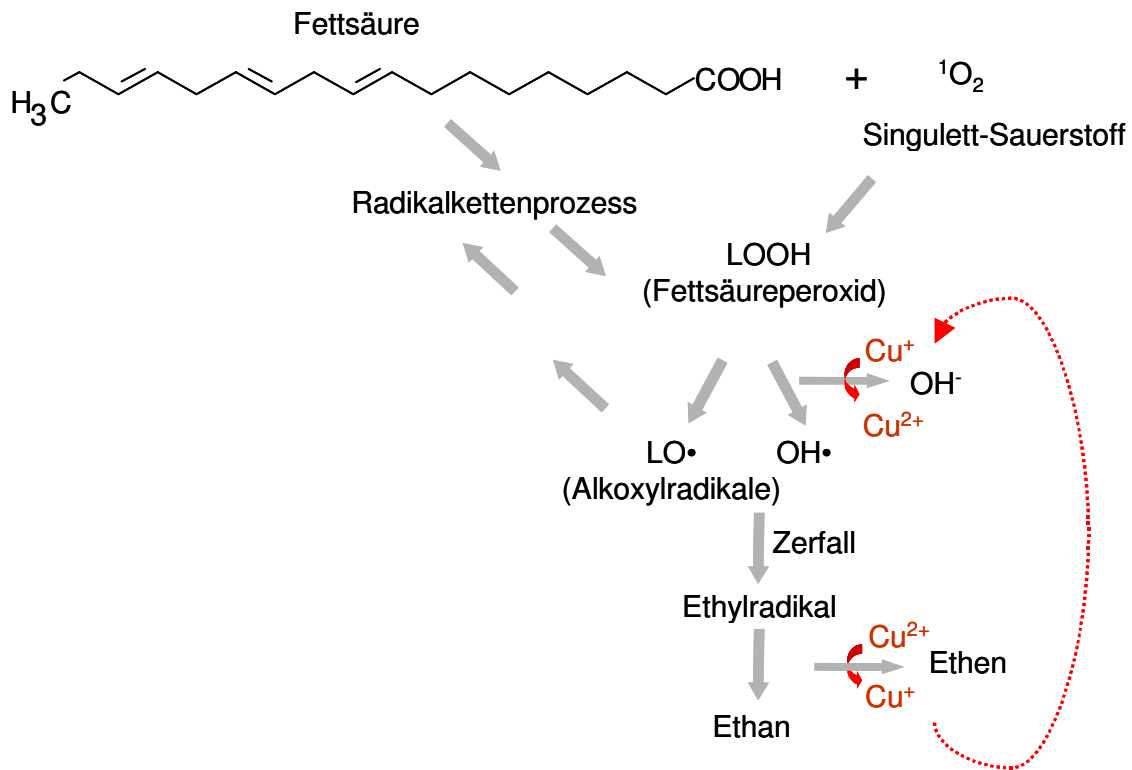


Abbildung 2: Schema der Lipidperoxidation

6. Als Schlüsselreaktion für die Entstehung von Artherosklerose gilt die Oxidation von LDL (Low - Density - Lipoprotein), einem Lipoproteinpartikel im Blutserum, das unter anderem die Aufgabe hat, Cholesterin zur Leber zu transportieren, wo es dann abgebaut wird. Der LDL - Partikel besitzt an der Oberfläche eine Schicht aus Phospholipiden und unverestertem Cholesterin. In diese Hülle ist das Apolipoprotein B - 100 eingebettet. Der stark hydrophobe Kern enthält Cholesterinester (häufig mit Linolsäure). Zusätzlich sind im LDL endogene Antioxidanzien enthalten, die sich je nach ihrer Polarität im Inneren des LDL - Partikels (z.B. Carotinoide) oder weiter an der Außenseite (z.B. α - Tocopherol) befinden. Den Weg zur Leber legt LDL gebunden an Blutmakrophagen zurück. Unter oxidativem Stress und bei einem erhöhtem LDL - Gehalt im Plasma wandern Monozyten und Lipoproteine in die Arterienwände ein, wo es zur LDL - Oxidation kommen kann. Oxidiertes LDL kann von den Blutmakrophagen nicht mehr über den LDL - Rezeptor erkannt werden. Über einen anderen, den Scavenger - Rezeptor, wird das modifizierte LDL unkontrolliert aufgenommen, was die sogenannte Schaumzellenbildung zur Folge hat. Die aus den Makrophagen entstandenen Schaumzellen können

sich als Fettstreifen an den Arterienwänden anlagern. Aus diesen Fettstreifen können sich im weiteren Verlauf der Artherogenese durch Nekrosen, Thrombosen und Einlagerung von Kalzium komplexe Plaques entwickeln, die dann letztendlich zum Verschluss von Blutgefäßen und zu Infarkten führen können. Die Hypothese, dass Cu^{2+} bei der Oxidation eine entscheidende Rolle spielt, wird dadurch unterstützt, dass das Apolipoprotein B - 100 definierte Kupferbindungsstellen besitzt. Die kupferinduzierte LDL - Oxidation wird weltweit als „*ex vivo*“ - Modellreaktion herangezogen, um den Einfluss von Antioxidanzien auf die Oxidation des LDL unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* zu untersuchen.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte (Projektphasen). Die erste Projektphase (PHASE I) diente vor allem der Sondierung von Material. Dafür wurden fünf Extrakte aus vier verschiedenen Pflanzen in mehreren biochemischen *in vitro* Testsystemen untersucht. Zusätzlich wurden zwei Emulgatoren miteinander verglichen. Aufbauend auf den Ergebnissen aus PHASE I war das Ziel der zweiten Projektphase (PHASE II), die ausgewählten Extrakte zu optimieren, indem verschiedene Extraktvarianten einer Pflanze in ausgewählten biochemischen Testsystemen untersucht wurden. Anhand der PHASE II konnte ein Extrakt etabliert werden, der in einer Interventionsstudie zur Bioverfügbarkeit eingesetzt wurde (PHASE III). Der Ergebnisteil ist chronologisch zu den durchgeführten Untersuchungsphasen aufgebaut und gliedert sich in drei Kapitel. Im Anschluss an die Ergebnisse von PHASE I und PHASE II erfolgt jeweils eine Bewertung der Ergebnisse, die bereits einen Teil der Diskussion darstellt. Anschließend werden die möglichen Struktur - Aktivitäts - Beziehungen der Extraktinhaltsstoffe kapitelübergreifend diskutiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenextrakte und Trolox

Die Pflanzenextrakte (siehe Tabelle 1) und Emulgatoren (Tween80 und Sternylolk) wurden vom Adalbert - Raps - Zentrum für Arznei- und Gewürzpflanzenforschung; Am Forum 2; 85350 Freising - Weihenstephan zur Verfügung gestellt. Das wasserlösliche α - Tocopherolanalogon Trolox wurde von Sigma (T-4389) bezogen.

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien

Name	Formel / Abkürzung	M [g / mol]	Hersteller	Bestell- nummer
2,2` - Azino - bis (3-Ethyl) benzthiazolin - 6 - sulfonsäure	ABTS	548,7	Sigma	A-1888
Borsäure	H ₃ BO ₄	61,83	Merck	165
Eisen(II)sulfat - Heptahydrat	FeSO ₄ *7H ₂ O	278	Sigma	F-7002
Ethan - Prüfgas			Messer - Griesheim	
Ethen - Prüfgas			Messer - Griesheim	
Ethylendinitrotetraessigsäure - Dinatriumsalz - Dihydrat	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ * H ₂ O (EDTA)	372,24	Merck	8418
Folin - Ciocalteu's Phenol Reagent		2 Normal	Sigma	F 9252
Kaliumbromid	KBr	119	Merck	1.04905. 0500
α -Keto- γ -methiolbuttersäure	KMB	170.2	Sigma	K-6000
Kupfer(II)Sulfat - Pentahydrat	CuSO ₄ *5H ₂ O	249,68	Merck	2790
α - Linolensäure	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278,4	Sigma	L-2376
Myoglobin		18800	Sigma	M-1882
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	105,99	Merck	6398
Natriumchlorid	NaCl	58,44	Merck	6404
Natrium – dihydrogenphos- phat - Monohydrat	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	137,99	Merck	1.06346

Name	Formel	M [g/mol]	Hersteller	Bestellnummer
Di - Natriumphosphat - Dihydrat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	177,9	Merck	1.06580
Natriumhydroxid	NaOH	40,00	Merck	6498
Natriumhypochlorid	NaOCl	74,4	Merck	1.05614
Natriumnitrit	NaNO_2			
Natriumtetraborat	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	201,22	Merck	6310
Proteinassay - Farbstoffkonzentrat			BioRad	500- 0006
Rinderserumalbumin (BSA)			Sigma	A-2153
Rose - Bengal	$\text{C}_{20}\text{H}_2\text{O}_5\text{Cl}_4\text{I}_4\text{Na}_2$	1017,6	Sigma	R-3877
Salzsäure	HCl	36,46	Merck	1.00319
Schwefelsäure	H_2SO_4	98,08	Merck	731
Stickstoff Typ 5.0	N_2		Messer - Griesheim	
Synthetische Luft			Messer - Griesheim	
Trichloressigsäure	$\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$	163,4	Sigma	T-4885
Tween20			Merck	822184
Wasserstoff Typ 5.0	H_2		Messer-Griesheim	
Wasserstoffperoxid	H_2O_2	34,01	Merck	1.08597
Xanthin	$\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$	152,1	Sigma	X-4002
Xanthinoxidase	XOD	20 U / 13,5 mg Protein	Sigma	X-4875

2.1.3 Puffer und Lösungen

Phosphatpuffer 0,2 M pH 7,4 und pH 9

Lösung A: 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (35,6 g / l)

Lösung B: 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (27,6 g / l)

Einstellen des pH - Wertes mit Lösung B

PBS - Puffer pH 7,4

9,0 g NaCl in 100 ml Phosphatpuffer (0,2 M, pH 7,4) lösen und mit Aqua bidest auf ein Volumen von 1 l auffüllen

Boratpuffer 0,2 M pH 9

Lösung A: 0,2 M H_3BO_4 (12,4 g / l)

Lösung B: 0,2 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (10,061 g / l)

Einstellen des PH - Wertes mit Lösung A

Peroxyinitrit - Lösung

0,7 M H_2O_2 durch Verdünnung mit 0,6 M HCl herstellen (auf Eis)

0,6 M NaNO_2 - Lösung mit Aqua bidest herstellen (auf Eis)

Die H_2O_2 - und NaNO_2 - Lösung zu gleichen Teilen (jeweils 5 ml) zusammengeben und sofort dieselbe Menge NaOH (1,2 M) zugeben und über Nacht bei -20°C einfrieren. Vor dem Einsatz in den Versuchen wird die durch das Zusammengeben der beiden Lösungen entstandene gelbe Schicht abgenommen und 1:100 mit NaOH (10 mM) verdünnt. Über $A_{302} = \epsilon \cdot c \cdot d$ (Quarzküvette, $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) wird anschließend die Peroxyinitritkonzentration berechnet und mit NaOH (10 mM) auf 200 μM eingestellt (= Stammlösung).

 α - Linolensäure - Lösung, 71 mM

0,5 ml Tween20 werden in 10 ml Boratpuffer (0,2 M, pH 9,0) gelöst. Tropfenweise werden 0,5 ml α - Linolensäure unter leichtem Rühren emulgiert. Anschließend werden tropfenweise 1,3 ml 1N NaOH zugegeben und so lange gerührt, bis eine klare Lösung entsteht. Mit Boratpuffer wird die so verseifte Fettsäure auf ein Endvolumen von 25 ml aufgefüllt.

Dichtelösungen

Lösung A (1,08 g / ml): 40,0 g KBr und 0,5 g EDTA ad 0,5 l Aqua bidest lösen

Lösung B (1,05 g / ml): 25,0 g KBr und 0,5 g EDTA ad 0,5 l Aqua bidest lösen

Lösung C: 0,5 g EDTA ad 0,5 l Aqua bidest lösen

2.1.4 Geräte und Laborartikel

Gaschromatograph:

Varian Star 3300 CX mit Shimadzu Integrator C-R6A Chromatopac

Detektor: Flammenionisationsdetektor (FID)

Säulen: 1/8 Zoll x 80 cm Aluminiumoxid, 1/8 Zoll x 100 cm Aluminiumoxid

Säulentemperatur: 80°C

Injektortemperatur: 80°C

Detektortemperatur: 225°C

Trärgas: Stickstoff (25 ml / min)

Brenngase: Wasserstoff (25 ml / min), synthetische Luft (250 ml / min)

Prüfgase: Ethan (236,45 pmol / ml), Ethen (259,3 pmol / ml)

Photometer

Spektralphotometer: Uvicon Modell 930, Modell 922 und Pharmacia LKB

Ultrospec III

Thermostat

2209 Multitemp, Pharmacia LKB Bromma und Julabo F 18

pH - Meter

Orion Research 701 A, Bachhofer

Zentrifugen

Ultrazentrifuge Optima LE-70, Beckman mit Swinging Bucket Rotor SW 40 Ti

Biofuge A, Heraeus Sepatech

Minifuge BF, Heraeus

Centrifuge 5810 R, Eppendorf

Waagen

MC1 Analytic AC 210 S

Feinwaage Modell 2474, Sartorius

Whirly Mix

Vortex - Genie 2, Scientific industries

Wasserschüttelbad

Köttermann Labortechnik

Wasserbad belichtet

Eigenbau, Mitarbeiter des Lehrstuhls für Phytopathologie

Inkubationsrad

Eigenbau, Mitarbeiter des Lehrstuhls für Phytopathologie

Gelfiltrationssäule

EconoPac DG - 10, BioRad

Bidest-Anlage

Seralpur PRO 90 CN, Seral

Sonstiges Material

Insulinspritzen: Mikrofine III, Fa. Plastipac

Filter: Nalgene 0,2 µm, Katalog - Nr. 1912020

2.2 Methoden**2.2.1 Aufbereitung des Probenmaterials**

Bei den eingesetzten Emulgatoren handelte es sich um Tween80, einen herkömmlichen, synthetischen Lösungsvermittler und um Sternylolk, einen Lecithinemulgator. Für die Untersuchungen wurde das Probenmaterial in einer 0,2 %igen wässrigen Lösung des jeweiligen Emulgators suspendiert und für 5 Minuten im Ultraschallbad bei 30°C homogenisiert. Voruntersuchungen (Daten nicht gezeigt) ergaben für die Emulgatoren eine maximal verwendbare Konzentration von 0,01 % in den Testsystemen. Bei höheren Emulgatorkonzentrationen stieg zwar die Löslichkeit der Extrakte, jedoch war in einigen der Testsysteme die antioxidative bzw. prooxidative Eigenkapazität der Emulgatorlösungen zu hoch. Mit der Ausgangskonzentration von 0,2 % (= 0,01 % im Versuchsansatz), wurde eine 15 %ige Inhibierung bzw. Aktivierung der Reaktionen nicht überschritten.

Die Suspensionen aus den Pflanzenextrakten und den Emulgatorlösungen wurden täglich frisch hergestellt und in Form von Konzentrationsreihen in den Versuchen eingesetzt.

2.2.2 Gehalt an löslichen Polyphenolen

Der Polyphenolgehalt der Extrakte (Stammlösung 200 µg / ml) wurde mit dem Folin - Ciocalteu - Assay bestimmt. Er wird in Catechinäquivalenten, über eine Kalibrationsgerade von 10 bis 200 µM angegeben (Geradengleichung für die Referenzsubstanz Catechin: $A_{720} = 0,0873 \text{ AU} + 0,00327 \text{ AU} / \mu\text{M} * c$; $c =$ Konzentration µM, $r = 0,9887$). Der Assay setzt sich wie folgt zusammen: 0,2 ml Probe werden mit 1 ml einer 10 %igen Lösung des Folin - Ciocalteu - Reagenz (2 N) vermischt. Nach zwei Minuten werden 1 ml einer Na₂CO₃ - Lösung (7 %) hinzugefügt. Nach gründlicher Durchmischung und einer Inkubationszeit von 60 min erfolgt die photometrische Messung bei $\lambda = 720 \text{ nm}$.

2.2.3 Chemische und photodynamische Systeme

2.2.3.1 Gaschromatographische Bestimmung von Ethen und Ethan

Die meisten der nachfolgend beschriebenen Modellsysteme beruhen auf der gaschromatographischen Bestimmung von Ethen und Ethan. Ethen entsteht zum Beispiel nach einem Angriff verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies auf ein Indikatormolekül wie die α - Keto - γ - methiolbuttersäure (KMB). Ethen und Ethan entstehen beim oxidativen Angriff auf α - Linolensäure in Anwesenheit von Cu²⁺. Da die Reaktionen in volumengeeichten, gasdicht verschlossenen Gefäßen durchgeführt wurden, konnte 1 ml des entstandenen Gases nach Beendigung der Inkubationszeit mittels Insulinspritzen aus dem Kopfraum (Headspace) abgezogen und gaschromatographisch analysiert werden. Die Menge an Ethen bzw. Ethan pro ml Gasvolumen errechnet sich über:

$$\frac{\text{Area} \times \text{Gesamtvolumen [ml]} - \text{Probenvolumen [ml]}}{\text{Eichfaktor [ml / pmol]}} = \text{Ethen oder Ethan [pmol]}$$

Die Kalibrierung erfolgt über jeweils 1 ml Prüfgas, das in den Gaschromatographen injiziert wird. Der „Eichfaktor“ errechnet sich durch Division der errechneten Areas durch 236,45 (Ethan) bzw. 259,3 (Ethen).

2.2.3.2 Das Fenton - System

Im Fenton - System werden reaktive Sauerstoffspezies durch die Reaktion von H_2O_2 mit Fe(II) erzeugt. Dabei entstehen Hydroxylradikale, die KMB unter Freisetzung von Ethen spalten. Die Reaktionsansätze (Tabelle 3) wurden in volumengeeichten, gasdicht verschlossenen Reaktionsgefäßen 30 Minuten bei $37^\circ C$ inkubiert. Anschließend erfolgte mittels Headspace - Technik die gaschromatographische Quantifizierung des während der Reaktion freigesetzten Ethens. Die Extrakte und die Bidestkontrolle wurden in den Reaktionsansätzen in vier Parallelen getestet.

Tabelle 3: Versuchsansatz im Fenton - System

Reagenzien	Konzentration im Ansatz	Volumen
Phosphatpuffer pH 7,4	0,1 M	1000 μ l
Extrakt	Konzentrationsreihe	100 μ l
KMB	1 mM	100 μ l
H_2O_2	25 μ M	100 μ l
Fe^{2+} (aus $FeSO_4$)	10 μ M	100 μ l
H_2O_{bidest} ad 2 ml		600 μ l

2.2.3.3 Das Peroxynitrit - System

Im Peroxynitrit - System wird KMB unter Freisetzung von gaschromatographisch quantifizierbarem Ethen gespalten (Hippeli et al. 1997; Hippeli und Elstner 1997). Eine im Vergleich zur Kontrollreaktion verringerte Ethenbildungsrate in Anwesenheit pflanzlicher Extrakte dient als Maß für deren antioxidatives Potenzial.

In der Untersuchung wurden jeweils vier Parallelen der Reaktionsansätze (Tabelle 4) in volumengeeichten, gasdicht verschlossenen Reaktionsgefäßen 30 Minuten bei $37^\circ C$ inkubiert. Die Headspace - Technik erlaubte wiederum die Quantifizierung der während der Reaktion freigesetzten Ethenmenge.

Tabelle 4: Versuchsansatz im Peroxynitrit - System

Reagenzien	Konzentration im Ansatz	Volumen
Phosphatpuffer pH 9	0,1 M	1000 μ l
Extrakt	Konzentrationsreihe	100 μ l
KMB	1 mM	100 μ l
ONOOH	10 μ M	100 μ l
H ₂ O _{bidest} ad 2 ml		700 μ l

2.2.3.4 Das Xanthin / Xanthinoxidase (X / XOD) - System

Im X / XOD - System reduziert das Enzym Xanthinoxidase (XOD) molekularen Sauerstoff auf Kosten von Xanthin (X) zum Superoxidradikalanion und zu Wasserstoffperoxid. Durch Fe²⁺, das in Spuren im verwendeten Puffer bzw. in der Enzympräparation vorliegt, wird H₂O₂ zum OH[•] - Radikal reduziert. Fe²⁺ selbst geht dabei in Fe³⁺ über, welches durch Superoxid wiederum zu Fe²⁺ regeneriert wird. Sowohl O₂^{•-} als auch OH[•] sind in der Lage, KMB anzugreifen und dieses oxidativ zu spalten, wobei Ethen freigesetzt wird.

In der Untersuchung wurden die Reaktionsansätze (Tabelle 5) in volumengeeichten, gasdicht verschlossenen Reaktionsgefäßen 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die gaschromatographische Quantifizierung der freigesetzten Ethenmengen erfolgte mittels Headspace - Technik. Es wurden vier Parallelen der jeweiligen Reaktionsansätze getestet.

Tabelle 5: Versuchsansatz im Xanthin / Xanthinoxidase - System

Reagenzien	Konzentrationen im Ansatz	Volumen
Phosphatpuffer pH 7,4	0,1 M	1000 μ l
Extrakte	Konzentrationsreihe	100 μ l
KMB	1 mM	100 μ l
Xanthin	0,5 mM	100 μ l
XOD	0,016 U	100 μ l
H ₂ O _{bidest} ad 2 ml		600 μ l

Xanthin wurde in 0,1 N NaOH (15 % des Lösungsmittelvolumens) gelöst und anschließend mit Aqua bidest auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt.

2.2.3.5 Das ABTS - System

Im ABTS - System (ABTS = 2,2` - Azino - bis (3-Ethyl) benzthiazolin - 6 - sulfonsäure) werden durch die Reaktion von Myoglobin und Wasserstoffperoxid Ferrylradikalkationen generiert. Durch Wasserstoffabstraktion oxidieren ABTS - Moleküle (hellgrün) zu ABTS - Kationradikalen (dunkelgrün). Diese Reaktion kann spektralphotometrisch bei 734 nm verfolgt werden. Eine im Vergleich zur Kontrollreaktion verminderte Anzahl an ABTS⁺ - Radikalen in Anwesenheit pflanzlicher Extrakte ist ein Maß für deren antioxidatives Potenzial.

Der Versuchsansatz (Tabelle 6) wurde direkt in Einmalküvetten pipettiert. Anschließend wurde die Reaktion im Photometer mit Wasserstoffperoxid gestartet. Es wurden vier Parallelen pro Versuchsansatz alle 60 sec über einen Zeitraum von insgesamt 15 min gemessen. Die Konzentration der ABTS - Radikale nach 15 min diente als Vergleichspunkt.

Tabelle 6: Versuchsansatz im ABTS - System

Reagenzien	Konzentration im Ansatz	Volumen
Phosphatpuffer pH 7,4	0,1 M	1000 µl
Extrakte	Konzentrationsreihe	100 µl
ABTS	150 µM	100 µl
Myoglobin	2,5 µM	100 µl
H ₂ O ₂	100 µM	100 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 2 ml	600 µl

2.2.3.6 Das Rose - Bengal - System

Im Rose - Bengal - System erfolgt die Peroxidation der α - Linolensäure photodynamisch. Singulettauerstoff wird durch den Photoaktivator Rose - Bengal relativ spezifisch aus molekularem Sauerstoff erzeugt (Elstner 1990) und reagiert mit der eingesetzten α - Linolensäure, wodurch es zu einem Radikalkettenprozess kommt, in dem durch Peroxidzerfall letztendlich Ethan entsteht.

Eine Variation des Rose - Bengal - Systems erhält man durch den Zusatz von Cu^{2+} , wodurch das Ethylradikal zu Ethen oxidiert wird. Durch die dabei entstehenden Cu^+ - Ionen wird wiederum der Fettsäureperoxidzerfall beschleunigt, wobei Cu^+ zu Cu^{2+} regeneriert wird. Dabei ist die eingesetzte Kupfermenge in diesem System so gewählt, dass zu gleichen Teilen Ethan und Ethen entstehen (Heiser et al. 1998). In der Untersuchung wurden die Reaktionsansätze (Tabelle 7) in volumengeeichten und gasdicht verschlossenen Reaktionsgefäßen 30 Minuten bei 37°C unter Belichtung (Lichtbad: Nitrophotlampen 4 x 500 Watt, 30000 Lux) inkubiert. Die freigesetzten Ethan- und Ethenmengen wurden mittels Headspace - Technik gaschromatographisch quantifiziert.

Tabelle 7: Versuchsansatz im Rose - Bengal - System

Reagenzien	Konzentrationen im Ansatz	Volumen
Phosphatpuffer pH 7,4	0,1 M	1000 μl
Extrakte	Konzentrationsreihe	100 μl
α -Linolensäure	3,55 mM	100 μl
Rose-Bengal	20 μM	100 μl
[CuSO_4]	[5 μM]	[100 μl]
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ad 2 ml		600 μl [700 μl]

2.2.4 Humanes Blutplasma als biochemisches Testsystem

Gewinnung von humanem Blutplasma

Das mit EDTA (Endkonzentration 1 mg / ml) stabilisierte Vollblut wurde in der Schwenkkopfzentrifuge in Aliquoten zu jeweils 20 ml in Spitzbodenreagenzgläsern mit 3000 U und 10°C über eine Dauer von 20 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma (Überstand) abgezogen und auf Eis gestellt. Pro 100 ml Plasma wurden 1 ml einer 60 %igen Saccharoselösung zur Konservierung zugegeben. Das Plasma wurde anschließend in Kryoröhrchen überführt und mit Stickstoff überschichtet. Das so vor Oxidation geschützte Probenmaterial konnte bei -70°C über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden.

Proteinquantifizierung

Proteingehalte lassen sich mittels eines Standard - Schnellverfahrens der Firma Bio - Rad bestimmen. Dabei handelt es sich um eine Absorptionsverschiebung von

465 nm nach 595 nm einer sauren Comassie Brilliant Blue G - 250 - Lösung durch Komplexbildung mit Proteinen. Zunächst wurde das Plasma 1:100 mit einer isotonischen Kochsalzlösung (0,9 %) verdünnt. Nach Zugabe des Bio - Rad - Reagenz und zehnmütiger Inkubation wurde der Proteingehalt bei 595 nm gemessen (Reaktionsansatz siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Pipettierschema zur Bestimmung des Proteingehaltes in Blutplasma

Reagenzien	Volumen
H ₂ O _{bidest}	790 µl
Bio - Rad - Reagenz	200 µl
Probe	10 µl

Die Bestimmung der Proteinmenge pro ml Probe erfolgte mittels einer Kalibrationsgeraden (Abbildung 3). Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin (BSA).

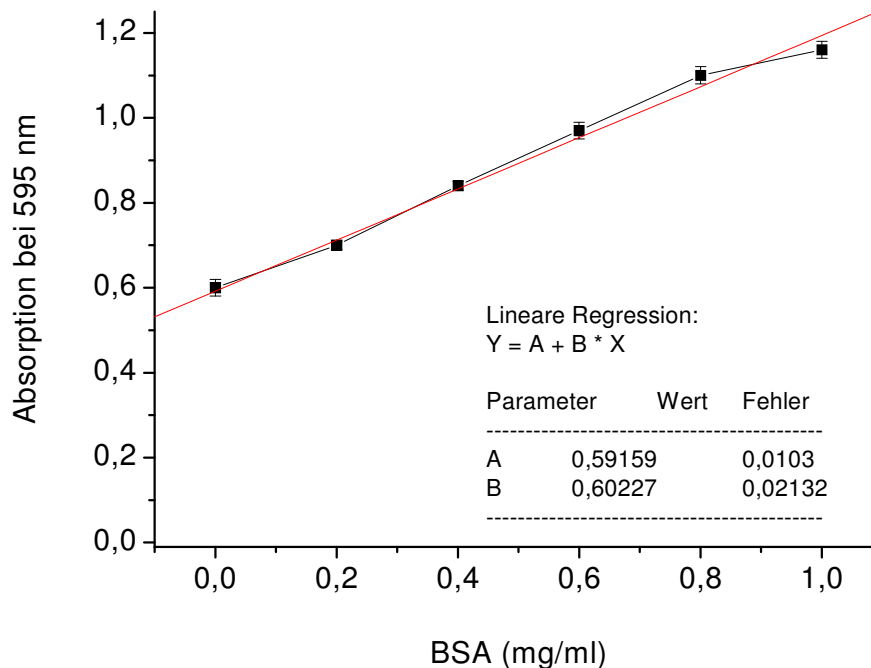


Abbildung 3: Kalibrationsgerade mit BSA (Rinderserumalbumin) zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen.

Anreicherung von Extraktinhaltsstoffen im LDL (Low Density Lipoprotein)

Zur Überprüfung der LDL - Gängigkeit der Extraktinhaltsstoffe wurde das Plasma mit den Extrakten vorinkubiert. Der Schutz des LDL nach der Isolierung aus dem Plasma in der anschließenden Oxidationsreaktion geht so nur von Substanzen aus, die auch wirklich fähig sind, in den LDL - Partikel einzudringen. Dazu wurden die Extrakte in verschiedenen Konzentrationen in Sternnyolk emulgiert. 500 µl der so vorbereiteten Probe wurde mit 2,5 ml des Plasmas (Verhältnis 1 : 6) in verschraubbaren Kryoröhrchen im Inkubationsrad bei 37° C konstant leicht durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 90 min wurde das LDL aus dem Plasma isoliert.

Isolierung, Reinigung und Quantifizierung von LDL

Die LDL - Isolierung aus Humanplasma erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Das Plasma (3 ml) wurde mit Kaliumbromid (KBr, 1,23 g) auf eine Dichte von 1,41 g / ml eingestellt und in einem Beckmann - Zentrifugen - Röhrchen mit jeweils 2,5 ml Dichtelösung A und Dichtelösung B überschichtet. Der Rest des Röhrchens wurde mit Dichtelösung C aufgefüllt und für 22 h bei 285000*g (40000 U / min) zentrifugiert. Die im aufgebauten Dichtegradienten erkennbaren Banden waren die HDL - Bande (High Density Lipoprotein) am Boden des Röhrchens, die gelbliche LDL - Bande (Low Density Lipoprotein) etwa in der Röhrchen - Mitte und darüber die Bande des VDLs (Very Low Density Lipoprotein) und der Chylomikronen. Die LDL - Bande wurde mit einer gebogenen Kanüle abgezogen und filtriert (Nalge Nunc Filter, Porengröße 0,2 µm). Das isolierte LDL wurde maximal 7 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Das zur Stabilisierung des Vollblutes zugesetzte EDTA wurde vor dem Einsatz des LDLs in den Versuchen mit einer EconoPac DG - 10 Gelfiltrationssäule (Bio - Rad) unter Verwendung eines PBS - Puffers entsalzt. Anschließend wurde die LDL - Konzentration der Probe über ihren Proteingehalt mit dem Bio - Rad - Assay bestimmt.

2.2.4.1 Kupferinduzierte LDL - Oxidation (Dienkonjugation)

Die Oxidationsreaktion beginnt vermutlich im Proteinteil des LDL - Partikels. Durch Tryptophanperoxyradikale wird im folgenden eine Radikalkettenreaktion im Lipidanteil des LDL - Partikels ausgelöst, die zur Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren führt. In Folge der Fettsäureperoxidation kommt es zur sogenannten Dienkonjugation, also zu einer Verschiebung von Doppelbindungen, die

photometrisch bei 234 nm verfolgt werden kann (Esterbauer et al. 1989). Die zeitliche Verzögerung der Dienbildung und die damit verbundene Extinktionszunahme im Vergleich zur Kontrollreaktion zeigt den Schutz des mit Antioxidanzien angereicherten LDL's vor Oxidation.

Der typische Verlauf einer kupferinduzierten LDL - Oxidation (Abbildung 4) beginnt mit der Lagphase, in der endogene Antioxidanzien im LDL - Partikel verbraucht werden. Die Dauer der Lagphase, die Lagzeit, dient als Maß für den Schutz des LDLs durch Antioxidanzien. Sie ist der Schnittpunkt der Tangenten an den ersten beiden Schenkeln der Kurve und wird graphisch ermittelt. Auf die Lagphase folgt die Propagationsphase, in der durch Lipidperoxidation die maximale Dienbildungsrate erreicht wird. Anschließend findet ein Zerfall der oxidierten Produkte in der Dekompositionsphase statt. Die Verlängerung der Lagphase und die dadurch entstehende größere Lagzeit (min) im Vergleich zur Kontrollreaktion (mit Aqua bidest) ist ein Maß für die antioxidative Kapazität der zu testenden Substanz. Der Versuchsansatz erfolgte nach Tabelle 9. Die Dienkonjugation wurde bei 234 nm und 37° C mit Messabständen von 10 min über Nacht (1000 min) verfolgt.

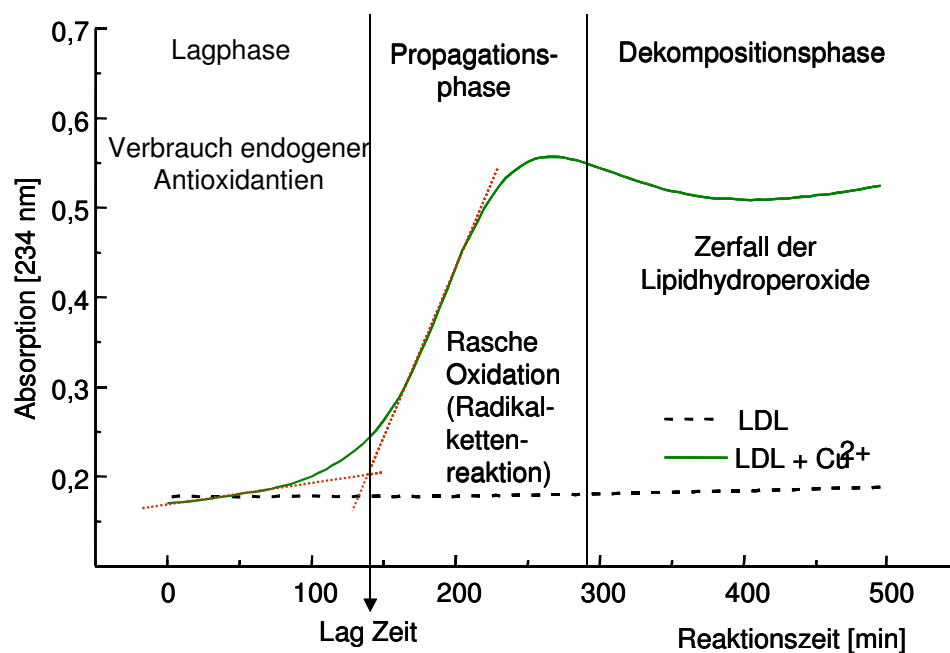


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Cu²⁺ - induzierten LDL - Oxidation

Tabelle 9: Pipettierschema zur Dienkonjugation

Reagenzien	Menge
PBS - Puffer	ad 1 ml
Isoliertes LDL	25 µg, quantifiziert über Proteingehalt
Cu ²⁺ (als CuSO ₄ , 33,4 µM)	1,67 µM i.A. (50 µl der Stammlösung)

2.2.5 Bestimmung von IC - Konzentrationen

Um die antioxidativen Eigenschaften der untersuchten Extrakte besser untereinander vergleichen zu können, wurden sogenannte IC - Konzentrationen ermittelt. Diese Inhibition Concentrations dienen als Maß für die antioxidative Kapazität einer Substanz. Für den Literaturvergleich besonders wichtig ist die IC₅₀ - Konzentration, also die Konzentration einer Substanz in mmol oder µg / ml, die für die 50 %ige Hemmung der Grundreaktion des jeweiligen Testsystems erforderlich ist. Für eine deutlichere Charakterisierung von Extrakten, wie sie in PHASE I vorgenommen wurde, sind die IC₂₅ - und die IC₇₅ - Konzentrationen ebenfalls von Interesse. So kann der Vergleich von Extrakten auch in den hochkonzentrierten und niedrigkonzentrierten Bereichen stattfinden. Die IC - Werte der untersuchten Substanzen wurden anhand einer Ausgleichskurve durch die Messpunkte mit der Software MicrocalTMOriginTM, Version 6.1 bestimmt.

2.3 Studie zur Bioverfügbarkeit

Die Pilotstudie war ein Selbstversuch mit 20 Probanden, die sich in zwei Gruppen aus 10 Rauchern (5 Männer, 5 Frauen) und 10 Nichtrauchern (4 Männer, 6 Frauen) gliederten. Nach einer Woche antioxidantienarmer „Diät“ wurde mit der Supplementierung begonnen. Zusätzlich zur Bestimmung verschiedener Blutparameter des Vollblutes (großes Blutbild, Harnsäurespiegel, Blutfettwerte) wurde das Plasma isoliert (Kapitel 2.2.4, Plasmagewinnung) und im ABTS - System auf radikalfangende Eigenschaften untersucht. Weiter wurde, aus dem Plasma isoliertes LDL einer kontrollierten, kupferinduzierten LDL - Oxidation unterzogen, um eine eventuelle Anreicherung von Antioxidanzien aus dem Rotbusch - Extrakt im LDL - Partikel nachzuvollziehen. Im Xanthin / Xanthinoxidase - System wurde das Probandenplasma auf komplexere antioxidative Wirkungsweisen hin untersucht.

Zusätzlich wurden die „Verunreinigung durch Hämoglobin“ und der Proteingehalt in den Plasmaproben bestimmt.

2.3.1 Ermittlung der Hämoglobingehalte im Plasma

Zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration wurden 300 µl Plasma in einem Gesamtvolumen von 2 ml Puffer gegen Phosphatpuffer bei 403 nm gemessen. Über den Extinktionskoeffizienten von Hämoglobin ($\epsilon_{\text{Häm}} = 100000 \text{ l/M cm}$ (x 4), da 4 Hämgruppen pro Hämoglobin) ließ sich die Hämoglobinkonzentration über die Extinktion ($E = \epsilon \times c \times d$) berechnen (Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$; $A = \text{Meßwert}$; $c = \text{Hämoglobinkonzentration (M)}$).

2.3.2 Biochemische Systeme

Das Plasma wurde im ABTS - System, im Xanthin / Xanthinoxidase - System und in der kupferinduzierten LDL - Oxidation auf seine antioxidativen Eigenschaften vor und nach der Rotbusch - Einnahme untersucht. Aufgrund der sowieso hohen antioxidativen Kapazität von Plasma wurden die Testsysteme nach Janisch (2003) angepasst. Im ABTS - System wurden statt der Pflanzenextrakte 10 µl der 1 : 10 verdünnten Plasmaproben eingesetzt. Im Xanthin / Xanthinoxidase - System konnten 300 µl des Probandenplasmas eingesetzt werden, wobei sich die zugesetzte Menge an Aqua bidest dementsprechend um 300 µl verringerte. Die kupferinduzierte LDL - Oxidation bedurfte keiner Anpassung an das Plasma der Interventionsstudie. Das LDL wurde, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, isoliert und mittels Dienkonjugation auf mögliche Anreicherungen von Antioxidanzien untersucht.

3 Ergebnisse (PHASE I)

3.1 Ziel und Vorgehensweise

Ziel der ersten Projektphase war die Sondierung von neuartigen Pflanzenextrakten, die für die Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie als Antioxidanzien von Interesse sein könnten. Dafür wurden mehrere ethanolische Extrakte (100 %) in insgesamt sechs verschiedenen biochemischen Testsystemen untersucht. Im einzelnen handelte es sich um das hydrophile Fenton -, Peroxynitrit -, Xanthin / Xanthinoxidase - und ABTS - System, um das lipophile Rose - Bengal - System und um das Modell der kupferinduzierten LDL - Oxidation. Von Interesse war zusätzlich die Auswirkung der Emulgatoren Tween80 (TW) und Sternylolk (SY) auf die antioxidativen Eigenschaften der Pflanzenextrakte in diesen Testsystemen. Bei den miteinander zu vergleichenden Extrakten handelte es sich im Einzelnen um die ethanolischen Extrakte aus unfermentiertem *Aspalathus linearis* (Rotbusch - Extrakt (RO)), unfermentiertem *Cyclopia genistoides* (Honigbusch - Extrakt, (HO gen1)), *Rosmarinus officinalis* (Rosmarin - Extrakt (RM) und Rosmarinsäure - Extrakt, (RS)) und unfermentierter *Camellia sinensis* (Grüntee - Extrakt (GT)). Bei *Rosmarinus officinalis* und *Camellia sinensis* handelt es sich um gut untersuchte und vielfach verwendete Tee- und Gewürzpflanzen, während über *Aspalathus linearis* und *Cyclopia genistoides* verhältnismäßig wenig bekannt und beschrieben ist. Als Vergleichssubstanz mit bekannt gutem antioxidativen Potenzial wurde Trolox (hydrophiles α - Tocopherolanalogon) eingesetzt.

3.2 Ergebnisse im Fenton - System

Im Fenton - System werden eisenkatalysiert Hydroxylradikale aus Wasserstoffperoxid generiert, die durch KMB - Spaltung gaschromatographisch nachweisbares Ethen bilden. Eine gegenüber der Kontrollreaktion (Aqua bidest = 100 %) verminderte Ethenbildung dient als Maß für die antioxidative Wirksamkeit der eingesetzten Substanzen.

Dosis - Wirkungsdiagramme im Fenton - System

Mit Ausnahme des Rosmarin - Extraktes hemmten alle untersuchten Extrakte und Trolox die Ethenfreisetzung konzentrationsabhängig (Abbildung 5). Der Verlauf des Graphen von *Cyclopia genistoides* (HO gen1) war nahezu linear, während alle anderen Graphen, außer der des Rosmarin - Extraktes, Sättigungskurven darstellten. Der Extrakt aus *Aspalathus linearis* (RO) hatte, ebenso wie der Extrakt aus *Camellia sinensis* (GT), eine höhere antioxidative Leistung in Verbindung mit dem Lecithinemulgator Sternvolk (SY). Dagegen war das antioxidative Verhalten des Honigbusch - Extraktes und des Rosmarinsäure - Extraktes (RS) unabhängig vom verwendeten Emulgator. Trolox hatte in Verbindung mit Tween80 (TW) die besseren antioxidativen Eigenschaften. Auffallend war die Dosis - Wirkungskurve des Rosmarin - Extraktes (RM). In Verbindung mit TW hemmte er zunächst die Ethenbildung. Bei höheren Extraktkonzentrationen (> 5 µg / ml) erfolgte eine Stimulation der Reaktion bis zum Wiedererreichen der Kontrollreaktion (Ethenbildungsrate: 100 %). In Verbindung mit SY trat dieses Phänomen verzögert auf: Das System konnte mit 25 µg / ml eingesetztem Extrakt noch gehemmt werden, bevor es bei höheren Konzentrationen zu einer Aufhebung und Umkehrung der Hemmwirkung kam.

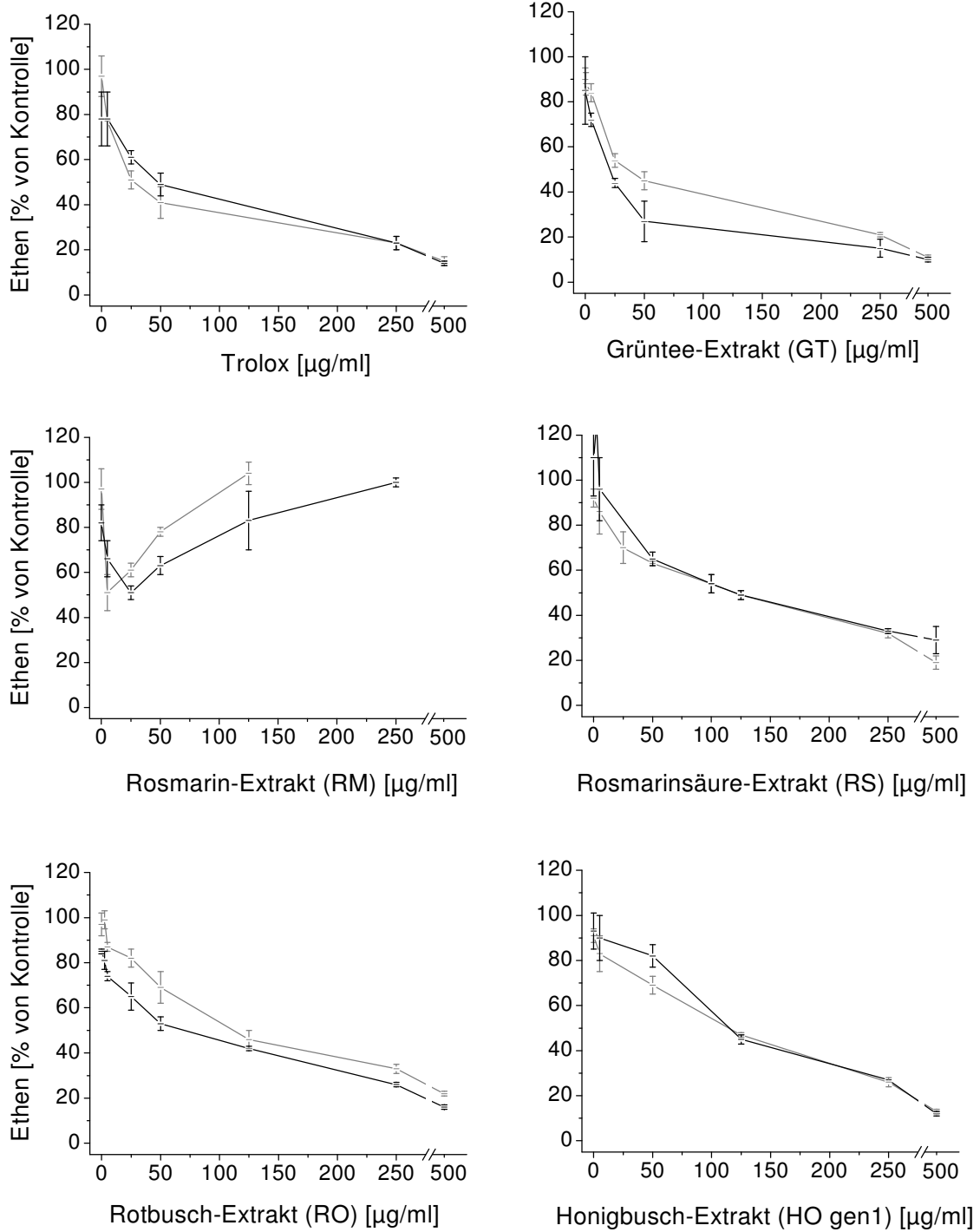


Abbildung 5: Einfluss der Pflanzenextrakte und Trolox auf das Fenton - System;

— Emulgator Sternylolk; - - - Emulgator Tween80

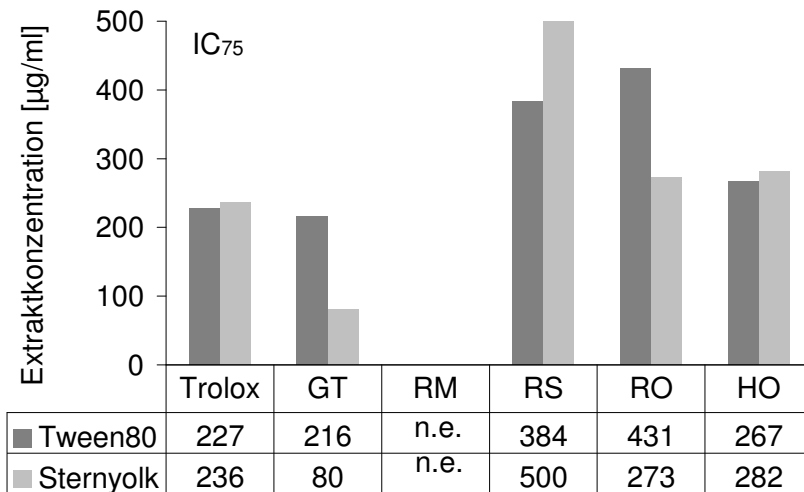
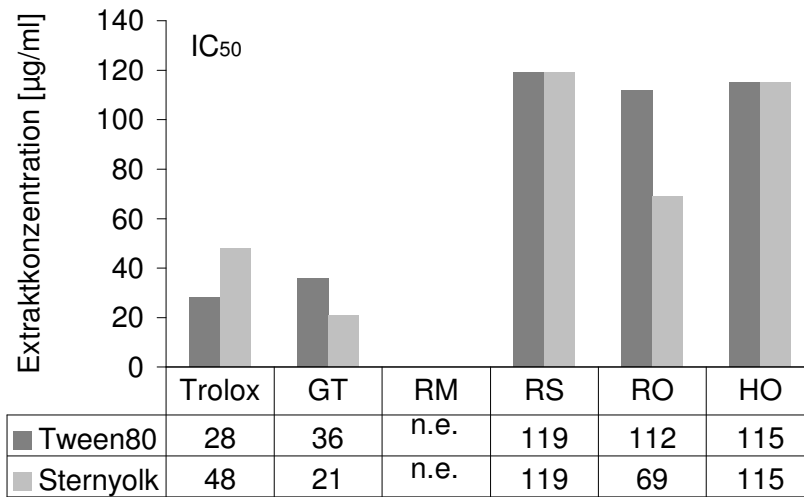
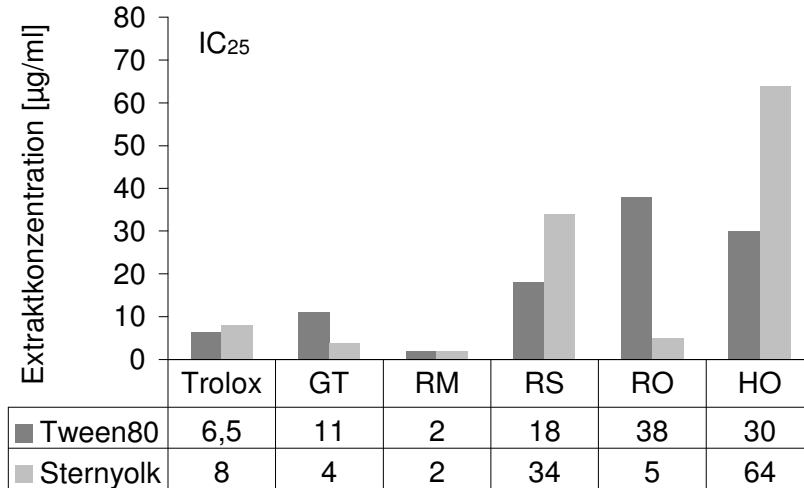


Abbildung 6: IC - Konzentrationen im Fenton - System; GT = Grüntee - Extrakt, RM = Rosmarin - Extrakt, RS = Rosmarinsäure - Extrakt; RO = Rotbusch - Extrakt, HO = Honigbusch - Extrakt; n.e. = nicht erreicht

IC - Konzentrationen im Fenton - System

Die in Abbildung 6 dargestellten IC₂₅ -, IC₅₀ - und IC₇₅ - Konzentrationen erlaubten den detaillierten Vergleich der antioxidativen Kapazität der verschiedenen Extrakte. Der Grüntee - Extrakt (GT) hatte mit IC₂₅ - Konzentrationen von 11 µg / ml (TW) bzw. 4 µg / ml (SY), mit IC₅₀ - Konzentrationen von 36 µg / ml (TW) bzw. 21 µg / ml (SY) und mit IC₇₅ - Konzentrationen von 216 µg / ml (TW) bzw. 80 µg / ml (SY) ähnliche bzw. bessere antioxidative Eigenschaften als Trolox (IC₂₅ = 6,5 µg / ml (TW) bzw. 8 µg / ml (SY); IC₅₀ = 28 µg / ml (TW) bzw. 48 µg / ml (SY); IC₇₅ = 227 µg / ml (TW) bzw. 236 µg / ml (SY)). Der Emulgator Sternylolk bewirkte eine zusätzliche Steigerung der antioxidativen Kapazität des Extraktes aus *Camellia sinensis* (Erniedrigung aller IC - Konzentrationen).

Mit Sternylolk als Emulgator war die Hemmung durch den Rotbusch - Extrakt (RO) im IC₂₅ - Konzentrationsbereich (5 µg / ml (SY)) besser als die von Trolox (8 µg / ml (SY)). Der Emulgator Tween80 setzte die antioxidative Leistung von RO herab (IC₂₅ = 38 µg / ml). Die IC₅₀ - Konzentrationen (112 µg / ml (TW) bzw. 69 µg / ml (SY)) zeigten den Rotbusch - Extrakt im Fenton - System mit noch guter antioxidativen Kapazität, im Bereich der IC₇₅ - Konzentrationen dagegen hemmte RO, vor allem in Verbindung mit Tween80, das System vergleichsweise schlecht (IC₇₅ = 431 µg / ml (TW) bzw. 273 µg / ml (SY)).

Die antioxidative Kapazität des Rosmarinsäure - Extraktes (RS) war nur im Niedrigkonzentrationsbereich und mit Tween80 (IC₂₅ = 18 µg / ml) vergleichbar mit der des Grüntee - Extraktes. In Verbindung mit Sternylolk hatte RS einen ähnlichen IC₂₅ - Wert (34 µg / ml) wie RO in Verbindung mit Tween80 (38 µg / ml). Auch im Hochdosisbereich hatte der Emulgator Tween80 einen unterstützenden Effekt auf RS (IC₇₅ = 384 µg / ml (TW) und 500 µg / ml (SY)). Die Konzentrationen für die halbmaximale Hemmleistung (IC₅₀ - Wert) waren mit jeweils 119 µg / ml (TW und SY) sehr hoch. Damit war die antioxidative Kapazität des Rosmarinsäure - Extraktes in diesem Bereich, verglichen mit den anderen Extrakten und Trolox, gering.

Der Honigbusch - Extrakt (HO gen1) hatte im niedrigen und mittleren Konzentrationsbereich eine vergleichsweise geringe hemmende Wirkung auf das Fenton - System (IC₂₅ = 30 µg / ml (TW) bzw. 64 µg / ml (SY); IC₅₀ = 115 µg / ml (TW und SY)). Die IC₇₅ - Konzentrationen waren mit 267 µg / ml (TW) und 282 µg / ml (SY) ähnlich niedrig wie die von Trolox (227 µg / ml (TW) und 236 µg / ml (SY)). Der Extrakt aus

Cyclopia genistoides war damit, verglichen mit RO und RS, das bessere Antioxidans in diesem Konzentrationsbereich.

Für den Rosmarin - Extrakt (RM) konnte aufgrund seiner indifferenten Dosis - Wirkungskurve (Abbildung 5) nur der IC₂₅ - Wert ermittelt werden. Sowohl in Verbindung mit Tween80 als auch mit Sternvolk war die IC₂₅ - Konzentration des Rosmarin - Extraktes mit 2 µg / ml extrem niedrig, das heißt, seine antioxidative Kapazität war bei Verwendung einer geringen Dosis wesentlich höher als die der Vergleichssubstanz Trolox (6,5 µg / ml (TW) und 8 µg / ml (SY)) und des Grüntee - Extraktes (11 µg / ml (TW) und 4 µg / ml (SY)).

Fazit:

Der Grüntee - Extrakt hatte die besten antioxidativen Eigenschaften im Fenton - System. Die Extrakte aus Rotbusch, Honigbusch und Rosmarinsäure hatten ebenfalls gute Eigenschaften in allen Konzentrationsbereichen. Der Emulgator Sternvolk wirkte positiv auf die Extrakte aus *Camellia sinensis* und *Aspalathus linearis* in allen Konzentrationsbereichen. Alle anderen Extrakte hatten in Verbindung mit Tween80 bessere bzw. gleiche antioxidative Eigenschaften verglichen mit Sternvolk als Emulgator. Der Rosmarin - Extrakt hemmte das Fenton - System bei niedrigen Konzentrationen sehr effektiv. Bei höheren Konzentrationen allerdings kam es zu einer Aufhebung der Hemmwirkung bzw. zur Stimulation des Systems.

3.3 Ergebnisse im Peroxynitrit - System

Die KMB - Spaltung erfolgt durch das nichtradikalische Oxidans Peroxynitrit, wobei wiederum gaschromatographisch detektierbares Ethen entsteht. Auch hier deutet eine Abnahme der Ethenbildung gegenüber der Kontrollreaktion auf die antioxidative Wirksamkeit der eingesetzten Substanzen hin.

Dosis - Wirkungsdiagramme im Peroxynitrit - System

Im Gegensatz zum Fenton - System hemmten alle untersuchten Pflanzenextrakte ohne Ausnahme die Reaktion konzentrationsabhängig (Abbildung 7). Trolox hatte einen enormen Einfluss auf die Freisetzung von Ethen aus KMB. Trolox hemmte die Reaktion „sehr schnell“ zu über 90 %. Die Graphen der Extrakte aus *Aspalathus linearis* und *Camellia sinensis* zeigten ebenfalls die hohe Empfindlichkeit des Systems gegenüber diesen Extrakten, während die Graphen der anderen untersuchten Pflanzenextrakte vergleichsweise flach verliefen. Die Emulgatoren zeigten nur geringen Einfluss auf die antioxidative Wirksamkeit der Extrakte in diesem System. Eindeutige Unterschiede gab es lediglich bei Trolox und *Cyclopia genistoides*, wobei Sternvolk auf beide einen leichten aktivitätssteigernden Effekt hatte.

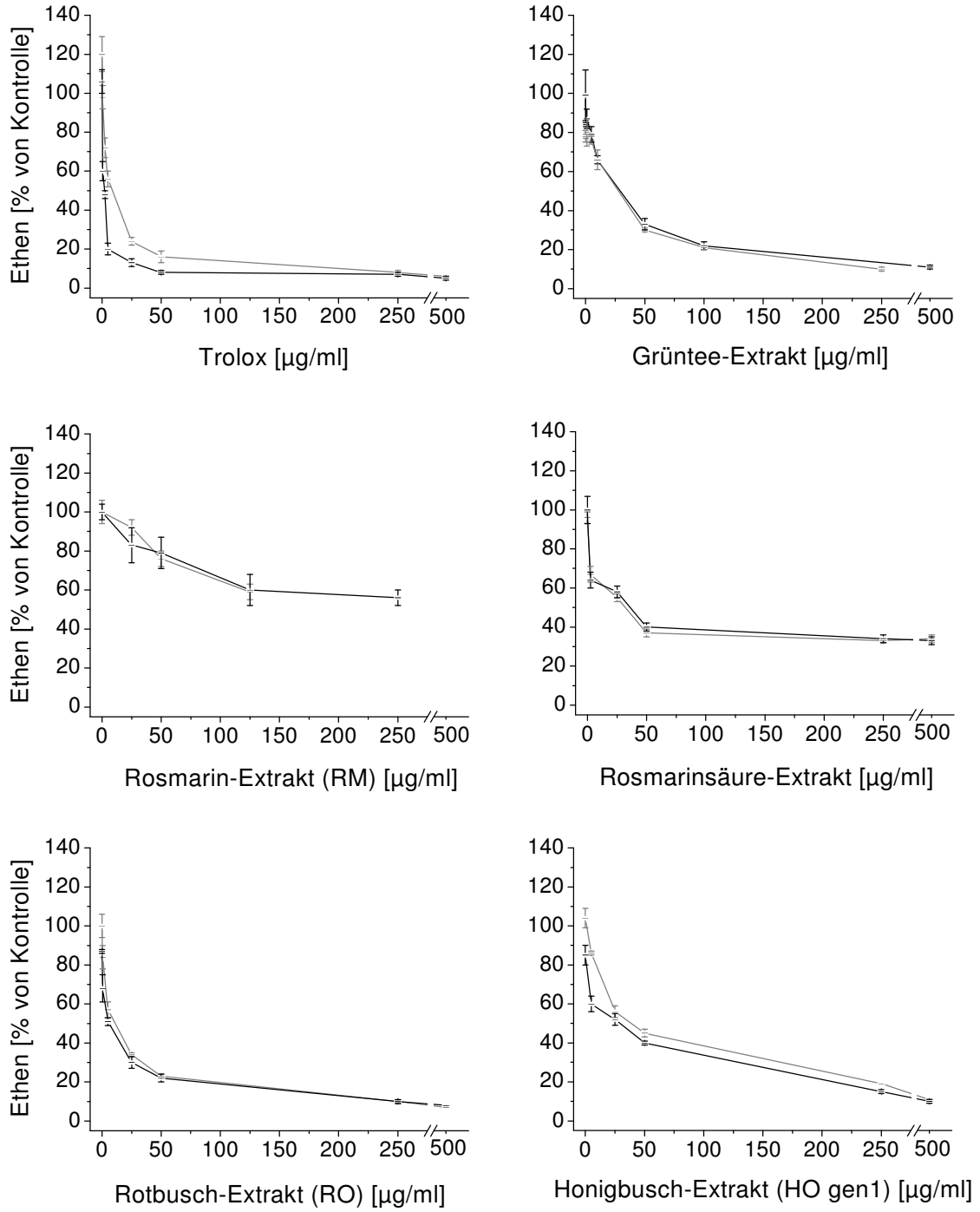


Abbildung 7: Einfluss der Pflanzenextrakte und Trolox auf das Peroxynitrit - System;
 — Emulgator Sternvolk; — Emulgator Tween80

IC - Konzentrationen im Peroxynitrit - System

Die IC_{25} -, IC_{50} - und IC_{75} - Konzentrationen der untersuchten Extrakte und der Vergleichssubstanz Trolox sind in Abbildung 8 dargestellt. Trolox hatte in allen drei Konzentrationsbereichen außerordentlich gute antioxidative Eigenschaften (IC_{25} = 2,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. 0,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (SY); IC_{50} = 8,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (SY); IC_{75} = 24 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. 4,4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)). Trolox hatte in Verbindung mit Sternvolk vier- bis fünffach erniedrigte IC_{25} - Konzentrationen gegenüber Tween80 als Emulgator. Der Rotbusch - Extrakt hatte etwas niedrigere IC_{25} - Werte verglichen mit Trolox (IC_{25} = 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) und 0,13 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)). Damit war die antioxidative Kapazität von RO im Niedrigdosisbereich besser als die der Vergleichssubstanz. Im mittleren Bereich hatte der Rotbusch - Extrakt ähnlich niedrige IC_{50} - Werte wie Trolox (11 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. 5,8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)). Hochdosiert im System eingesetzt hatte der Rotbusch - Extrakt eine immer noch ausgezeichnete, aber deutlich geringere Wirksamkeit als Trolox (IC_{75} = 46 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. 40 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)). Der Rosmarinsäure - Extrakt (RS) hatte mit IC_{25} - Werten von jeweils 1,8 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (TW und SY) eine ähnliche antioxidative Kapazität wie RO und Trolox im Niedrigdosisbereich. Im mittleren Konzentrationsbereich hatte RS mit 32 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. 36 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (SY) bereits deutlich höhere IC_{50} - Werte. Eine IC_{75} - Konzentration wurde schließlich weder mit TW noch mit SY erreicht. Für den Rosmarin - Extrakt konnten, aufgrund seiner geringen antioxidativen Kapazität in diesem System, weder die IC_{50} - , noch die IC_{75} - Konzentrationen bestimmt werden. Dementsprechend waren auch die IC_{25} - Konzentrationen dieses Extraktes mit 54 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) und 66 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (SY) sehr hoch. Der Grüntee - Extrakt hatte, sowohl mit Tween80 (IC_{25} = 6,6 $\mu\text{g} / \text{ml}$; IC_{50} = 29 $\mu\text{g} / \text{ml}$; IC_{75} = 85 $\mu\text{g} / \text{ml}$) als auch mit Sternvolk (IC_{25} = 5,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$; IC_{50} = 28 $\mu\text{g} / \text{ml}$; IC_{75} = 77 $\mu\text{g} / \text{ml}$) deutlich bessere antioxidative Eigenschaften als der Rosmarin - Extrakt. Das antioxidative Potenzial von GT war jedoch, verglichen mit Trolox und dem Rotbusch - Extrakt, gering. Die IC_{50} - Konzentrationen des Honigbusch - Extraktes lagen, ähnlich wie die des Grüntee - Extraktes, bei $\pm 30 \mu\text{g} / \text{ml}$ (Tween80 und Sternvolk). Sowohl die IC_{25} - Konzentrationen (12 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)) als auch die IC_{75} - Konzentrationen (204 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. 171 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)) waren verhältnismäßig hoch. Damit war die antioxidative Wirksamkeit des Honigbusch - Extraktes im Peroxynitrit - System vergleichsweise gering.

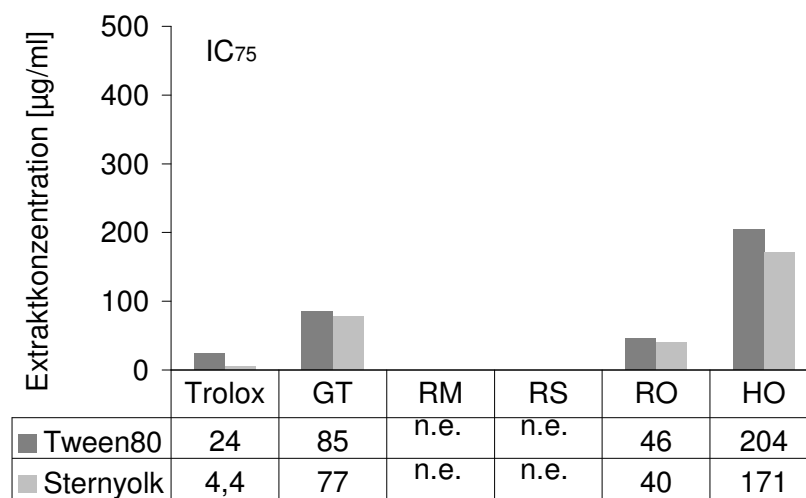
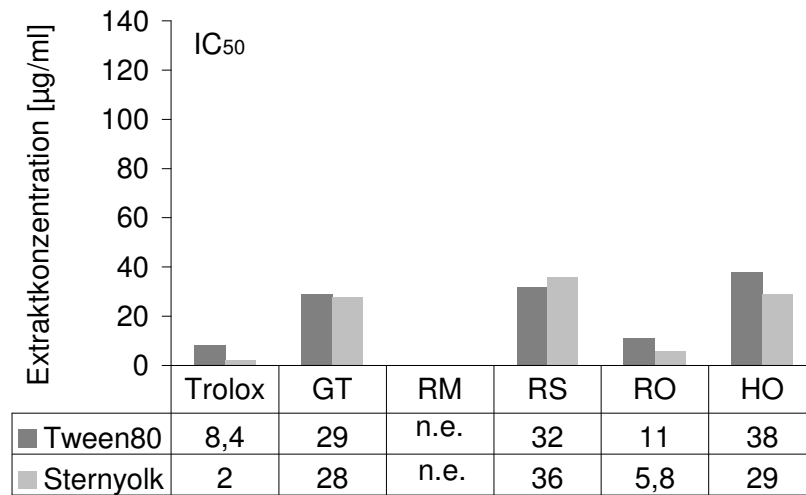
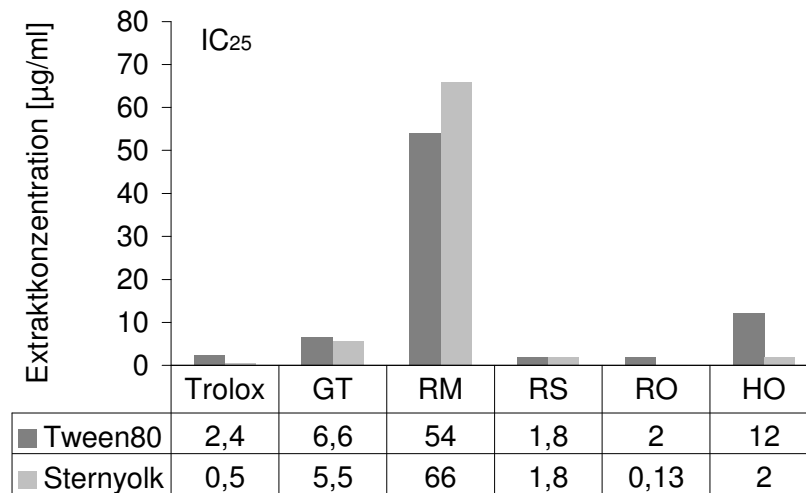


Abbildung 8: IC - Konzentrationen im Peroxynitrit - System; GT = Grüntee - Extrakt, RM = Rosmarin - Extrakt, RS = Rosmarinsäure - Extrakt; RO = Rotbusch - Extrakt, HO = Honigbusch - Extrakt

Fazit:

Die Vergleichssubstanz Trolox besitzt ausgezeichnete antioxidativen Eigenschaften im Peroxynitrit - System. Der aus *Aspalathus linearis* gewonnene Extrakt hatte im niedrigen und im mittleren Konzentrationsbereich ähnliche IC - Konzentrationen wie Trolox und war damit der beste Pflanzenextrakt in diesem System. Tween80 und Sternvolk hatten keinen Einfluss auf die antioxidativen Eigenschaften der Extrakte. Bei Trolox hingegen förderte Sternvolk die hemmenden Eigenschaften.

3.4 Ergebnisse im ABTS - System

Im ABTS - System kann die Bildung von ABTS - Radikalen spektralphotometrisch verfolgt werden. Die Menge an ABTS - Radikalen nach einer Inkubationszeit von 15 min dient als Maß für die antioxidativen Eigenschaften der pflanzlichen Extrakte und Trolox.

Dosis - Wirkungsdiagramme im ABTS - System

Alle untersuchten Extrakte und Trolox hemmten das ABTS – System konzentrationsabhängig (Abbildung 9). Der Lösungsvermittler Sternvolk hatte, mit Ausnahme des Rosmarin - Extraktes, bei allen Extrakten und Trolox eine Steigerung der antioxidativen Kapazität zur Folge. Mit sehr geringen Konzentrationen (5 µg) und in Verbindung mit Sternvolk hemmten der Grüntee - und der Rotbusch - Extrakt das ABTS - System zu 100 %. Im Gegensatz zu den bisher dargestellten Ergebnissen in den anderen Systemen fiel die komplette Systemhemmung, die früher oder später durch jeden der Extrakte erreicht wurde, auf.

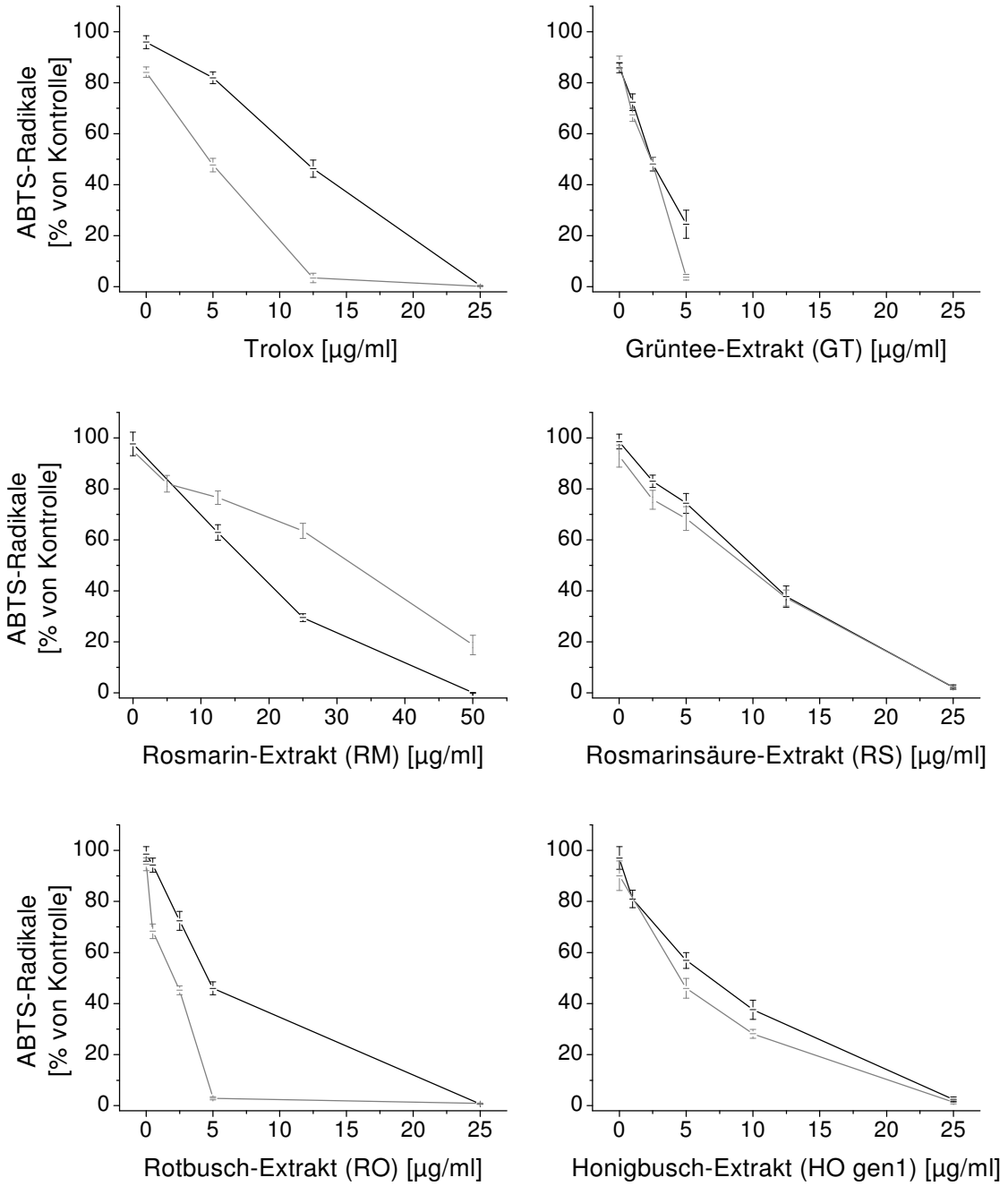


Abbildung 9: Einfluss der Pflanzenextrakte und Trolox auf das ABTS - System;
 — Emulgator Sternvolk; — Emulgator Tween80

IC - Konzentrationen im ABTS - System

Die Extrakte aus *Aspalathus linearis* (RO) und *Camellia sinensis* (GT) hatten die besten antioxidativen Eigenschaften im ABTS - System (Abbildung 10). Der Grüntee - Extrakt (GT) hatte mit IC_{25} - Konzentrationen von $0,8 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $0,6 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY), IC_{50} - Konzentrationen von $2,3 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW und SY) und IC_{75} - Konzentrationen von $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $3,8 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY) eine deutlich bessere antioxidative Kapazität im ABTS - System als Trolox ($IC_{25} = 6,4 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $1,3 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY); $IC_{50} = 11,7 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $4,7 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY) und $IC_{75} = 18,3 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $8,8 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)). Gleiches galt auch für den Rotbusch - Extrakt. Seine antioxidative Kapazität glich vor allem in Verbindung mit Sternylolk ($IC_{25} = 0,4 \mu\text{g} / \text{ml}$; $IC_{50} = 2 \mu\text{g} / \text{ml}$; $IC_{75} = 3,7 \mu\text{g} / \text{ml}$), der des Grüntee - Extraktes. Die IC - Werte des Rotbusch - Extraktes waren mit Tween80 zwar um das Doppelte erhöht ($IC_{25} = 2,2 \mu\text{g} / \text{ml}$; $IC_{50} = 4,6 \mu\text{g} / \text{ml}$; $IC_{75} = 14 \mu\text{g} / \text{ml}$) aber immer noch niedriger als die von Trolox. Die antioxidativen Eigenschaften des Honigbusch - Extraktes waren in diesem Testsystem ebenfalls sehr gut. Seine IC_{50} - und IC_{75} - Werte waren vor allem in Verbindung mit Sternylolk nur geringfügig höher ($IC_{50} = 6,8 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $4,3 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY), $IC_{75} = 15 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $12 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)) als die IC - Werte von GT und RO. Die antioxidative Kapazität des Extraktes aus *Cyclopia genistoides* (HO) war somit besser im ABTS - System als die der Vergleichssubstanz Trolox. Der Rosmarinsäure - Extrakt (RS) dagegen hatte, suspendiert in Tween80, eine ähnliche Wirkung auf das ABTS - System ($IC_{25} = 4,8 \mu\text{g} / \text{ml}$; $IC_{50} = 10 \mu\text{g} / \text{ml}$, $IC_{75} = 17 \mu\text{g} / \text{ml}$) wie Trolox. Lediglich im Niedrigdosisbereich gab es Unterschiede zwischen den Emulgatoren $IC_{25} = 2,2 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $0,4 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY). Die antioxidativen Eigenschaften von RS waren im mittleren und im höheren Konzentrationsbereich unabhängig vom eingesetzten Emulgator. Tween80 wirkte nur auf den Rosmarin - Extrakt positiv, dessen antioxidative Eigenschaften aber im ABTS - System sowohl in Verbindung mit Tween80 ($IC_{25} = 8,1 \mu\text{g} / \text{ml}$; $IC_{50} = 17 \mu\text{g} / \text{ml}$; $IC_{75} = 29 \mu\text{g} / \text{ml}$) als auch in Verbindung mit Sternylolk ($IC_{25} = 14 \mu\text{g} / \text{ml}$; $IC_{50} = 39 \mu\text{g} / \text{ml}$; $IC_{75} = 48 \mu\text{g} / \text{ml}$) vergleichsweise gering waren.

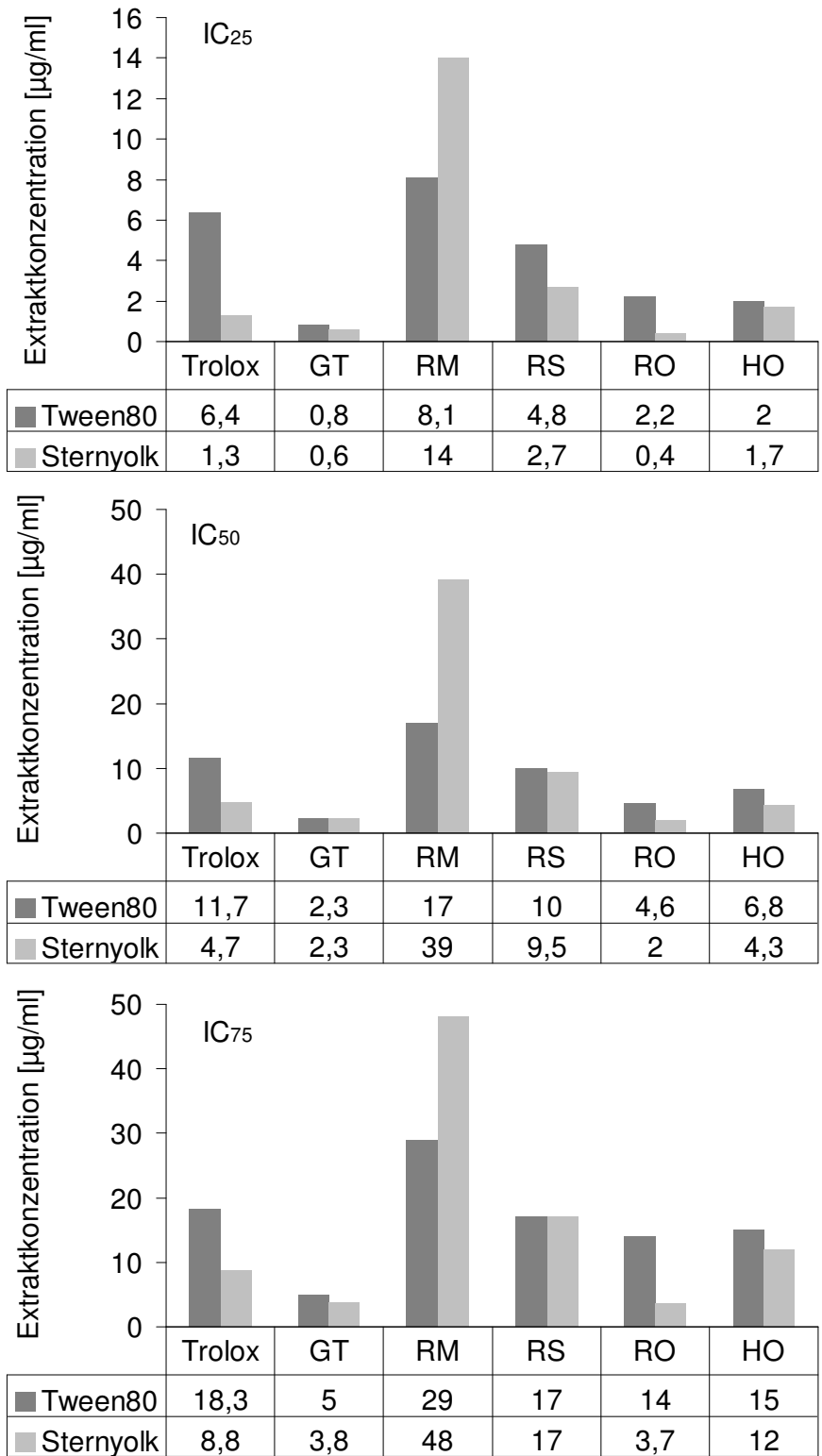


Abbildung 10: IC - Konzentrationen im ABTS - System; GT = Grüntee - Extrakt, RM = Rosmarin - Extrakt, RS = Rosmarinsäure - Extrakt; RO = Rotbusch - Extrakt, HO = Honigbusch - Extrakt

Fazit:

Die besten antioxidativen Eigenschaften im ABTS - System hatten die Extrakte aus *Camellia sinensis* und *Aspalathus linearis*. Auffallend war jedoch, dass alle Extrakte das ABTS - System mit verhältnismäßig geringen Konzentrationen zu 100 % hemmen konnten. Mit Ausnahme vom Rosmarin - Extrakt, auf den Tween80 fördernde Eigenschaften hatte, unterstützte der Emulgator Sternylolk das antioxidative Verhalten der untersuchten Pflanzenextrakte und Trolox im ABTS - System.

3.5 Ergebnisse im Xanthin / Xanthinoxidase (X / XOD) - System

In der zugrundeliegenden Reaktion werden enzymkatalysiert $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 generiert. Zusätzlich reagiert H_2O_2 eisenkatalysiert zum aggressiven OH^{\cdot} . Die entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies bilden durch KMB - Spaltung gaschromatographisch detektierbares Ethen.

Dosis - Wirkungsdiagramme im Xanthin / Xanthinoxidase - System

Abbildung 11 zeigt die konzentrationsabhängige Hemmung des Testsystems durch alle untersuchten Pflanzenextrakte. Auffällig war die schnelle 100 %ige Hemmung des Systems durch den Grüntee - Extrakt. Der Rosmarinsäure - Extrakt und der Rotbusch - Extrakt hatten ebenfalls einen deutlich stärkeren Einfluss auf das Xanthin / Xanthinoxidase - System als Trolox. Der Emulgator Sternylolk förderte die antioxidativen Eigenschaften von Trolox, Rosmarin - und Rotbusch - Extrakt deutlich und die der anderen Extrakte leicht.

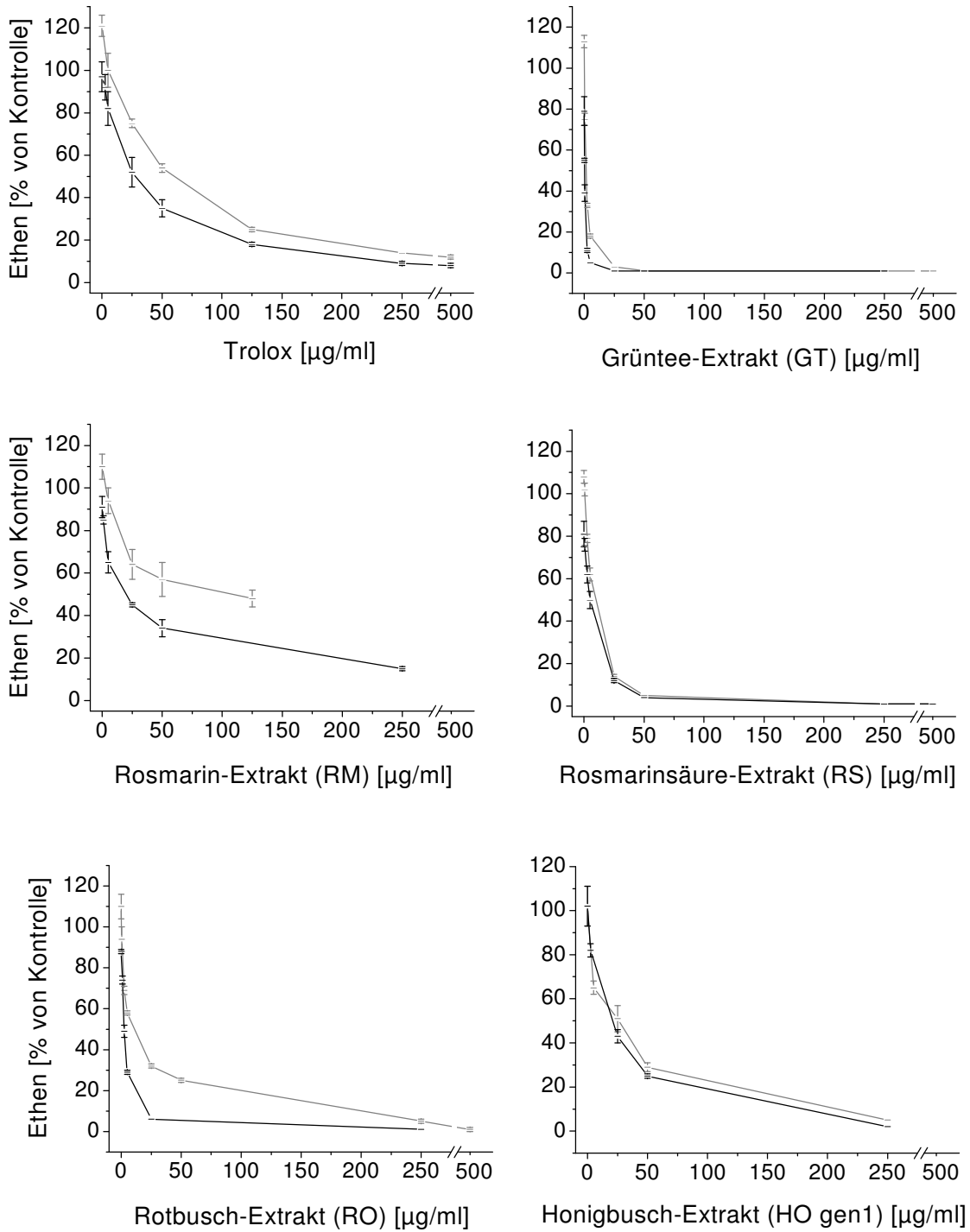


Abbildung 11: Einfluss der Pflanzenextrakte und Trolox auf das Xanthin / Xanthinoxidase - System; — Emulgator Sternvolk, — Emulgator Tween80

IC - Konzentrationen im Xanthin / Xanthinoxidase - System

Trolox und der Rosmarin - Extrakt (RM) waren in allen Konzentrationsbereichen die schlechteren Antioxidanzien. Die Sternylolksuspension des Rosmarin - Extraktes hatte dennoch die besseren antioxidativen Eigenschaften im niedrigen und mittleren Konzentrationsbereich ($IC_{25} = 3 \mu\text{g} / \text{ml}$ und $IC_{50} = 20 \mu\text{g} / \text{ml}$) verglichen mit Trolox ($IC_{25} = 8,7 \mu\text{g} / \text{ml}$ und $IC_{50} = 28 \mu\text{g} / \text{ml}$). Tween80 hatte eine deutliche Erhöhung der IC - Konzentrationen von RM ($IC_{25} = 18 \mu\text{g} / \text{ml}$ und $IC_{50} = 107 \mu\text{g} / \text{ml}$) und damit eine Verschlechterung seiner antioxidativen Leistung zur Folge. Eine 75 %ige Hemmung konnte durch RM nicht erreicht werden. Der Extrakt aus *Camellia sinensis* (GT) war mit vergleichsweise niedrigen IC - Konzentrationen herausragend, wobei der Emulgator Sternylolk die antioxidative Kapazität von GT noch heraufsetzte ($IC_{25} = 0,5 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $0,01 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY); $IC_{50} = 1,8 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $0,35 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY) und $IC_{75} = 3,7 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $1,4 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)). Einen weitaus größeren Effekt hatte Sternylolk auf den Rotbusch - Extrakt. Im Vergleich zu den IC - Werten mit Tween80 ($IC_{25} = 2,1 \mu\text{g} / \text{ml}$, $IC_{50} = 11,2 \mu\text{g} / \text{ml}$ und $IC_{75} = 50 \mu\text{g} / \text{ml}$) waren die IC - Werte in Verbindung mit Sternylolk um das Sechsfache kleiner ($IC_{25} = 1 \mu\text{g} / \text{ml}$; $IC_{50} = 2,4 \mu\text{g} / \text{ml}$ und $IC_{75} = 8,6 \mu\text{g} / \text{ml}$). Dagegen hatten die Emulgatoren nur einen kleinen Effekt auf die antioxidative Wirksamkeit des Rosmarinsäure - Extraktes. Zum Erreichen des IC_{25} - Wertes waren nur $2,8 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $0,5 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY) und für die IC_{50} - Konzentration waren nur $9,8 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $4,8 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY) nötig. Die IC_{75} - Werte lagen bei $21 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $18 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY). Auch beim Honigbusch - Extrakt (HO gen1) gab es kaum Unterschiede zwischen den Emulgatoren ($IC_{25} = 3,7 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) und $6,3 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY); $IC_{50} = 26 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) und $21 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY); $IC_{75} = 82 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW); $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)). Die IC - Werte des Honigbusch - Extraktes waren insgesamt höher als die des Rotbusch - Extraktes, aber immer noch wesentlich kleiner als die IC - Konzentrationen von Trolox ($IC_{25} = 26 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $8,7 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY); $IC_{50} = 60 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $28 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY) und $IC_{75} = 125 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $94 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)).

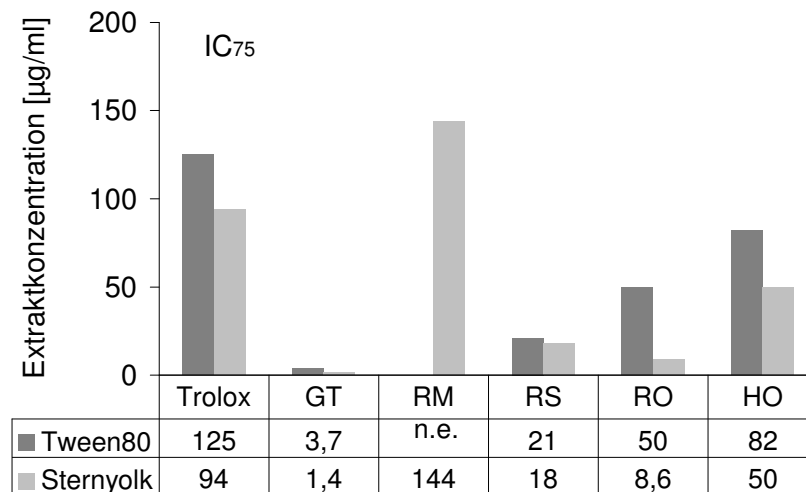
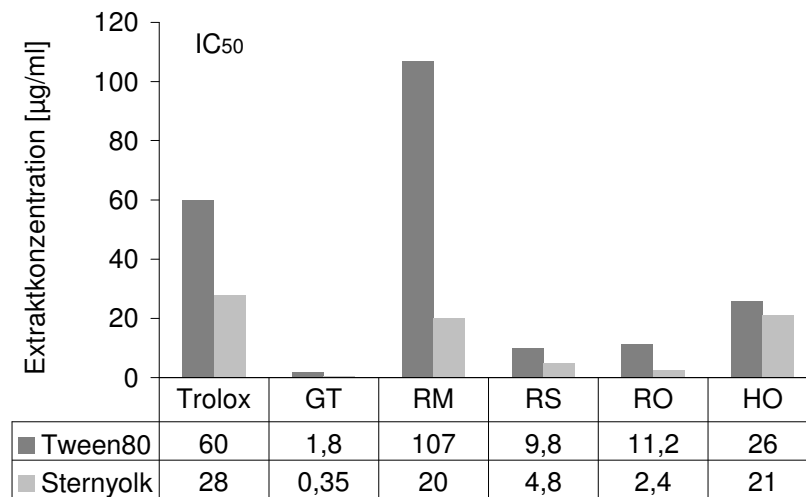
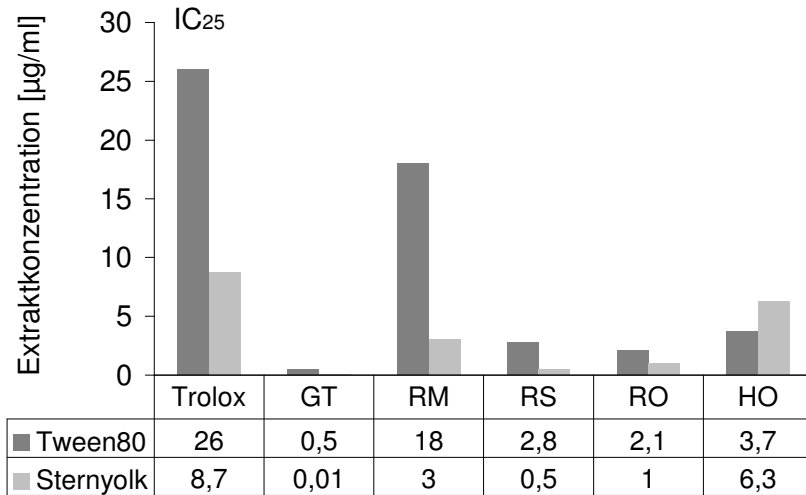


Abbildung 12: IC - Konzentrationen im Xanthin / Xanthinoxidase - System; GT = Grüntee - Extrakt, RM = Rosmarin - Extrakt, RS = Rosmarinsäure - Extrakt; RO = Rotbusch - Extrakt, HO = Honigbusch - Extrakt

Fazit:

Im Gegensatz zum Fenton - und Peroxynitrit - System hatte Trolox im Xanthin / Xanthinoxidase - System nur geringe antioxidative Eigenschaften. Der Grüntee - Extrakt bewirkte eine schnelle 100 %ige Hemmung des Systems und auch der Rotbusch - und der Rosmarinsäure - Extrakt hemmten die Ethenfreisetzung in diesem System überdurchschnittlich gut. Die antioxidative Kapazität aller Extrakte erhöhte sich unter dem Einfluss von Sternylolk als Lösungsvermittler. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei den Extrakten aus *Rosmarinus officinalis* (RM) und *Aspalathus linearis* (RO) und bei der Vergleichssubstanz Trolox.

3.6 Ergebnisse im Rose - Bengal (Cu^{2+}) - System

In Anwesenheit des Farbstoffes Rose - Bengal entsteht lichtaktiviert Singulett-sauerstoff, welcher die Peroxidation von α - Linolensäure initiiert und dadurch einen Radikalkettenmechanismus auslöst. Dabei wird unter anderem gaschromatographisch quantifizierbares Ethan gebildet. Durch den Zusatz von Kupfer zum Rose - Bengal - System wird zum einen die photochemisch ausgelöste Lipidperoxidation beschleunigt, zum anderen entsteht neben Ethan auch Ethen. Eine verminderte Ethan / Ethen - Bildung dient als Maß für die antioxidativen Eigenschaften der eingesetzten Extrakte. Keiner der Extrakte bewirkte eine Verschiebung von Ethen zu Ethan, so dass die Komplexierung von Cu^{2+} durch die Extrakte in den untersuchten Konzentrationsbereichen ausgeschlossen werden konnte.

Dosis - Wirkungsdiagramme im Rose - Bengal (Cu^{2+}) - System

Für alle Extrakte und Trolox war eine Korrelation zwischen steigender Extraktmenge und steigender Hemmung gegeben (Abbildung 13). Auffällig war die schnelle 100 %ige Hemmung des Systems durch den Rosmarin - Extrakt, während sich die Graphen der anderen Pflanzenextrakte und Trolox asymptotisch an eine maximale Hemmung annäherten. Der Emulgator Tween80 förderte die antioxidativen Eigenschaften der Extrakte aus Rosmarinsäure, Rotbusch und Honigbusch deutlich. Die Dosis - Wirkungsdiagramme der anderen Pflanzenextrakte und Trolox waren mit beiden Emulgatoren als Lösungsvermittler ähnlich.

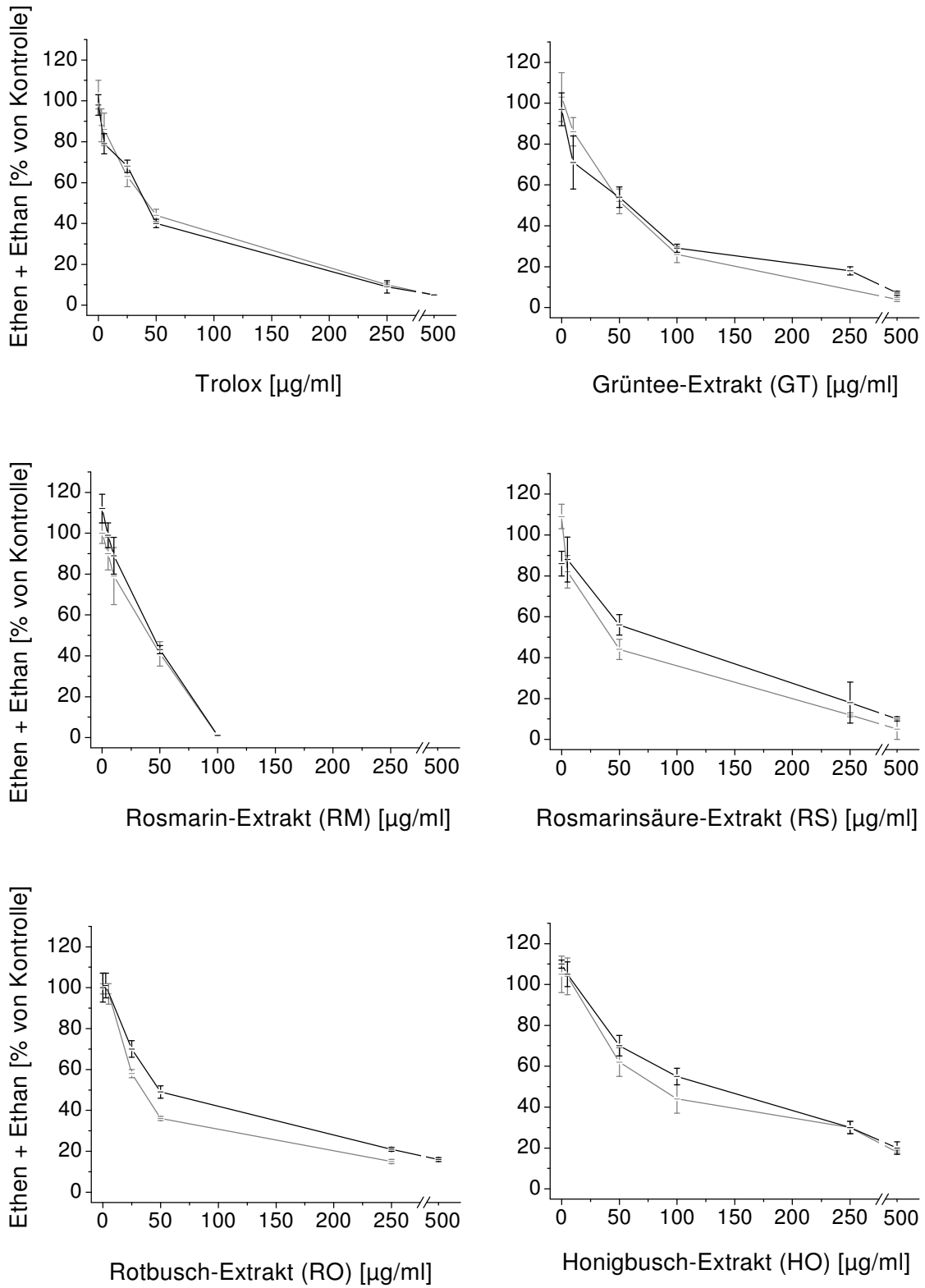


Abbildung 13: Einfluss der Pflanzenextrakte und Trolox auf das Rose - Bengal (Cu^{2+}) - System, — Emulgator Sternvolk, — Emulgator Tween80

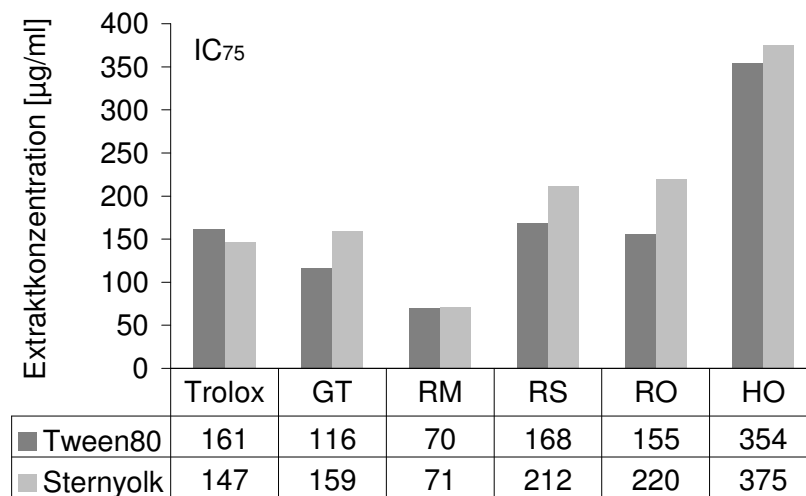
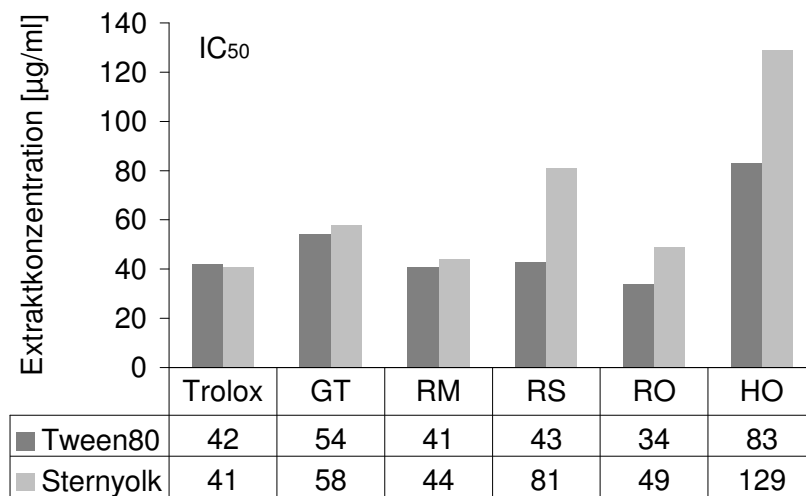
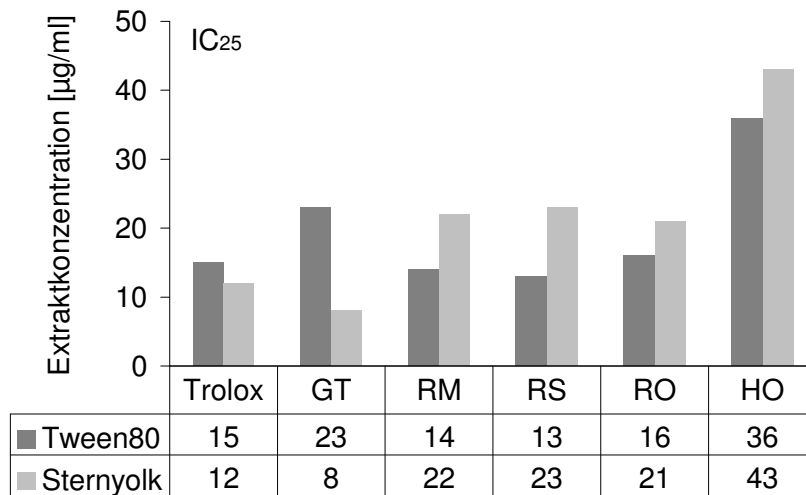


Abbildung 14: IC - Konzentrationen im Rose - Bengal (Cu^{2+}) - System; GT = Grüntee - Extrakt, RM = Rosmarin - Extrakt, RS = Rosmarinsäure - Extrakt; RO = Rotbusch - Extrakt, HO = Honigbusch - Extrakt

IC - Konzentrationen im Rose - Bengal (Cu^{2+}) - System

Sowohl Trolox als auch beide Extrakte aus *Rosmarinus officinalis* (RM und RS) und der Rotbusch - Extrakt (RO) hatten IC_{25} - Werte zwischen $13 \mu\text{g} / \text{ml}$ (RS) und $16 \mu\text{g} / \text{ml}$ (RO) mit Tween80 als Lösungsvermittler. Mit Sternvolk als Lösungsvermittler lagen die IC_{25} - Werte oben genannter Extrakte zwischen $21 \mu\text{g} / \text{ml}$ (RO) und $23 \mu\text{g} / \text{ml}$ (RS). Im Gegensatz dazu hatte Sternvolk einen positiven Effekt auf die Vergleichssubstanz, die einen IC_{25} - Wert von $12 \mu\text{g} / \text{ml}$ erreichte. Einen niedrigeren IC_{25} - Wert als Trolox in Sternvolk hatte nur der Grüntee - Extrakt mit $8 \mu\text{g} / \text{ml}$. Der Honigbusch - Extrakt hatte mit IC_{25} - Konzentrationen von $36 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $43 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY), mit IC_{50} - Konzentrationen von $83 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $129 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY) und mit IC_{75} - Konzentrationen von $354 \mu\text{g} / \text{ml}$ bzw. $375 \mu\text{g} / \text{ml}$ eine vergleichsweise geringe antioxidative Kapazität im Rose - Bengal (Cu^{2+}) - System. Die anderen Pflanzenextrakte und Trolox hatten mit IC_{50} - Werten zwischen $34 \mu\text{g} / \text{ml}$ (RO, TW) und $81 \mu\text{g} / \text{ml}$ (RS, SY) ähnliche antioxidative Eigenschaften im mittleren Konzentrationsbereich, während sich der Rosmarin - Extrakt im höheren Konzentrationsbereich mit IC_{75} - Konzentrationen von $70 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $71 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY) deutlich von den anderen Pflanzenextrakten und Trolox unterschied: Ausgenommen von GT (TW) mit $116 \mu\text{g} / \text{ml}$ waren die IC_{75} - Konzentrationen von Trolox ($161 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $147 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)), Rosmarinsäure - Extrakt ($168 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $212 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)), Rotbusch - Extrakt ($155 \mu\text{g} / \text{ml}$ (TW) bzw. $220 \mu\text{g} / \text{ml}$ (SY)) und Grüntee - Extrakt (SY, $159 \mu\text{g} / \text{ml}$) doppelt bis dreimal so hoch wie die des Rosmarin - Extraktes. Tween80 hatte bis auf wenige Ausnahmen (Trolox und GT (IC_{25})) eine Steigerung der antioxidativen Kapazität im Rose - Bengal (Cu^{2+}) - System zur Folge.

Fazit:

Im untersuchten Konzentrationsbereich fand keine Kupferkomplexierung statt. Der Einsatz von Rosmarin - Extrakt führte zu einer schnellen 100 %igen Hemmung des Systems. Unterschiede zwischen dem Rosmarin - Extrakt und den übrigen untersuchten Extrakten bzw. Trolox machten sich dennoch erst bei den IC_{75} - Konzentrationen bemerkbar. Der Honigbusch - Extrakt hatte vergleichsweise geringe antioxidative Eigenschaften. Tween80 förderte bis auf GT und Trolox die antioxidative Kapazität der untersuchten Extrakte.

Ergebnisse in der kupferinduzierten LDL - Oxidation

Die kupferinduzierte Oxidationsreaktion des LDLs erfolgte nach der Vorinkubation des Humanplasmas mit den im Emulgator angelösten Extrakten. Das LDL lässt sich durch die Ultrazentrifugation sehr genau vom restlichen Plasma trennen, so dass nur die tatsächlich in den LDL - Partikel eingewanderten Extraktbestandteile einen zusätzlichen Schutz vor Oxidation darstellen. Die Vorinkubation des gesamten Plasmas mit den Extrakten machte das Testsystem aber nicht nur zu einem „physiologienahen“ System, sondern auch zu einem System, in dem mit größeren Schwankungen gerechnet werden musste. Da mit dem Lecithinemulgator Sterniyolk feinere Suspensionen aus den Pflanzenextrakten hergestellt werden konnten und die Oberflächenaktivität von Extraktkomponenten in diesem System nicht abgefragt werden, wurde ausschließlich mit Sterniyolk gearbeitet. Maß für die antioxidative Kapazität eines Extraktes war die Lagphasenverschiebung gegenüber der Kontrollreaktion (Abbildung 15). Der Rosmarin - Extrakt schützte das LDL während der Oxidationsreaktion deutlich besser als alle anderen Extrakte und Trolox. Schon eine Vorinkubation mit nur 0,5 mg des Extraktes hatte eine Verschiebung der Lagphase über 100 min zur Folge. Bei dieser Konzentration konnten die anderen Extrakte und Trolox nur eine geringfügige Verzögerung der Lagzeit bewirken. Erst die Inkubation des Plasmas mit größeren Extraktmengen zeigte die LDL - Gängigkeit und Konzentrationsabhängigkeit der Extrakte aus *Aspalathus linearis* (RO) und *Camellia sinensis* (GT). Bei der Vorinkubation mit 1,25 mg war der Rotbusch - Extrakt mit einer Lagphasenverschiebung von mehr als 80 min wirksamer als der Grüntee - Extrakt mit einer Lagphasenverschiebung von 50 min. Der Rosmarin - Extrakt bewirkte hier bereits eine Verschiebung der Lagphase von über 200 min, während die Extrakte aus Rosmarinsäure und Honigbusch sowie Trolox keine Schutzfunktion auf das LDL hatten. Durch die Vorinkubation mit der doppelten Menge an Rosmarin - Extrakt (2,5 mg / ml) dauerte der Oxidationsschutz des LDLs mehr als 400 min. Der Schutz des LDLs durch den Grüntee - Extrakt verdoppelte sich ebenfalls (Lag > 80 min). Damit war die Verschiebung der Lagphase durch den Extrakt aus *Camellia sinensis* (GT) allerdings gerade mal so groß wie die von *Aspalathus linearis* (RO) bei halber eingesetzter Extraktmenge. Bei der Vorinkubation mit 2,5 mg Rotbusch - Extrakt kam es bei der anschließenden Ultrazentrifugation zur Denaturierung von Plasmaproteinen, womit eine LDL - Isolierung nicht mehr möglich war.

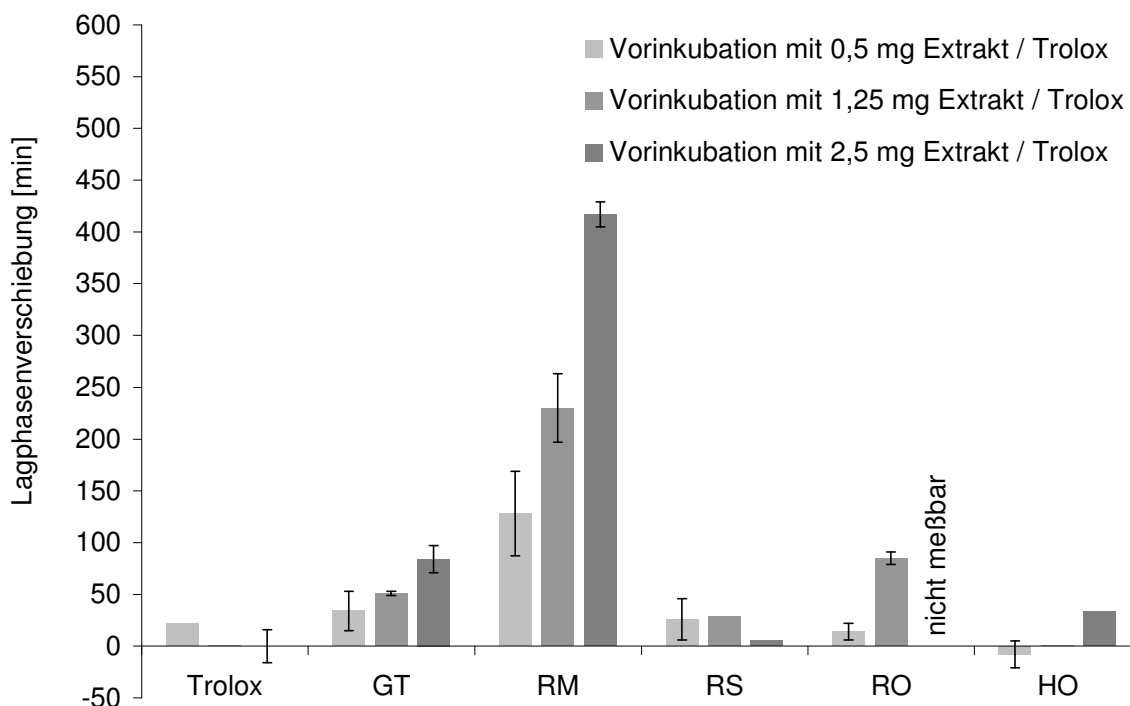


Abbildung 15: Kupferinduzierte LDL - Oxidation mit Vorinkubation. Lagphasenverschiebung der Pflanzenextrakte und Trolox. GT = Grüntee - Extrakt, RM = Rosmarin - Extrakt, RS = Rosmarinsäure - Extrakt; RO = Rotbusch - Extrakt; HO = Honigbusch - Extrakt.

Fazit:

Die Extrakte aus Rosmarin, Rotbusch und Grünem Tee hatten im System messbare Schutzfunktion auf den LDL - Partikel. Eine Konzentrationsabhängigkeit zeigten einmal der Grüntee - Extrakt und zum anderen der Rosmarin - Extrakt, der zusätzlich eine enorme zeitliche Verschiebung der Dienkonjugation bewirkte. Bei der Vorinkubation mit 1,25 mg war die Schutzfunktion des Rotbusch - Extraktes auf das LDL wesentlich größer als die des Grüntee - Extraktes. Trolox und der Rosmarinsäure - Extrakt waren ohne nennenswerte Wirkung, was auf ihre Hydrophilie hinweist.

3.7 3.8 Bewertung der Ergebnisse aus PHASE I

PHASE I der Untersuchungen diente der Sondierung und Bewertung von Pflanzenextrakten, die für einen Einsatz in der Nahrungsmittel- bzw. der Kosmetikindustrie interessant sein könnten. Das Kriterium war die antioxidative Kapazität der untersuchten Extrakte innerhalb verschiedener biochemischer Testsysteme. Diese Testsysteme basieren auf der Bildung von reaktiven Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies (ROS und RNS), die beim Verderb von Lebensmitteln und bei der Entstehung einiger Krankheiten von Bedeutung sein können. In den hydrophilen Systemen „Fenton“, „ABTS“ und „Xanthin / Xanthinoxidase“ ist vor allem die Bildung von Hydroxylradikalen (OH^\bullet) und Superoxidradikalanionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$) von Bedeutung. Das ebenfalls hydrophile Peroxynitrit - System basiert auf einem nichtradikalischen Oxidans, im Rose - Bengal - System sind der Singulett-Sauerstoff und lipophile Reaktionssequenzen von Bedeutung und die kupferinduzierte LDL - Oxidation testet die Pflanzenextrakte bezüglich ihrer Schutzwirkung auf das cholesterintransportierende LDL, wobei ebenfalls die Wirkung lipophiler Bestandteile der Extrakte im Vordergrund steht.

In den Untersuchungen wurde das Verhalten der Pflanzenextrakte gegenüber reaktiven Verbindungen, der Reaktionsmatrix und verschiedener Lösungsvermittler abgefragt. Bei den Extrakten handelte es sich im Einzelnen um die ethanolischen Auszüge aus unfermentiertem Grünen Tee (*Camellia sinensis*), unfermentiertem Rotbusch (*Aspalathus linearis*), Rosmarin (*Rosmarinus officinalis*, 2 Extrakte) und Honigbusch (*Cyclopia genistoides*). Die zu vergleichenden Lösungsvermittler waren Tween80 und Sternylk. Als Vergleichssubstanz diente das wasserlösliche α - Tocopherolanalogon Trolox.

Vergleich der Emulgatoren

Emulgatoren kommt eine große Bedeutung bei der Suspension von Trockenextrakten zu. Im Verlauf der Untersuchungen in PHASE I wurde die Auswirkung der beiden Emulgatoren Tween80 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat) und Sternylk (Lecithin) auf die antioxidative Kapazität der Pflanzenextrakte und Trolox untersucht. Ob einer der beiden Emulgatoren einen fördernden Effekt auf die Pflanzenextrakte hatte oder nicht, hing sehr von den Testsystemen, den Pflanzenextrakten selbst und sogar von den untersuchten Konzentrationsbereichen

ab. Ein einfaches Punktesystem, in dem es für einen besseren IC - Wert einen Punkt gab, führte zu in Abbildung 16 dargestellter Bewertung.

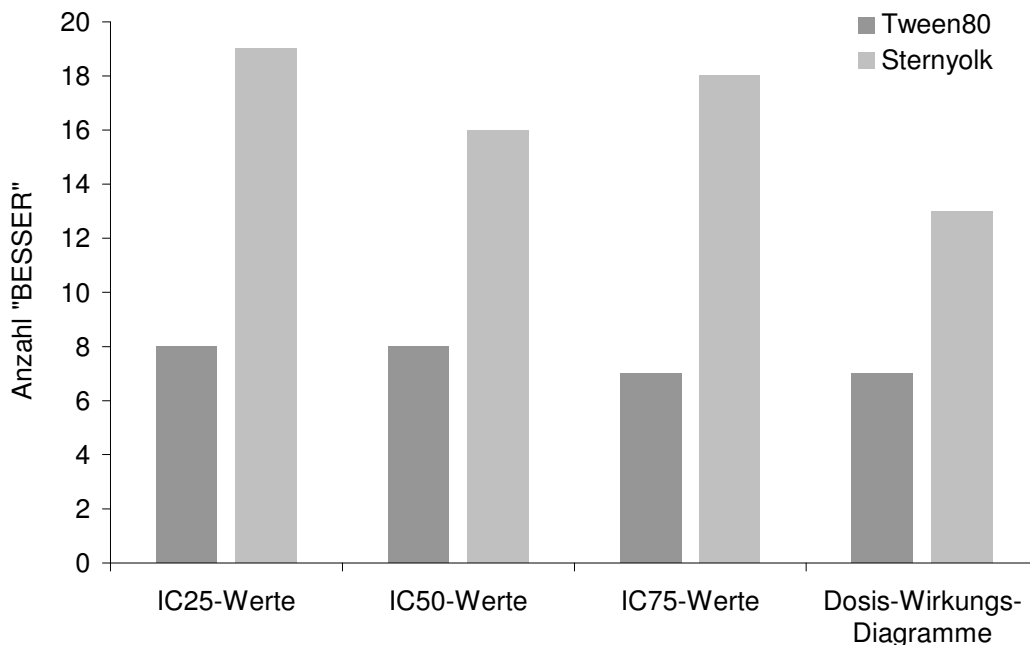


Abbildung 16: Vergleich der Emulgatoren in PHASE I mittels eines einfachen Punktesystems

Der Emulgator Sternlyolk ist in allen vier abgefragten Bereichen dem Emulgator Tween80 überlegen. Ausschlaggebend war hier die Mehrzahl an hydrophilen Testsystemen, in denen die Sternlyolksuspensionen deutlich bessere antioxidative Eigenschaften als die Suspensionen mit Tween80 hatten. Im Rose - Bengal (Cu^{2+}) - System waren die Verhältnisse umgekehrt. Die besseren antioxidativen Eigenschaften des Lecithinemulgators in den hydrophilen Systemen könnten auf sein besseres Lösungsvermögen zurückzuführen sein. Sternlyolk könnte im lipophilen System aber auch in Konkurrenz mit den lipophilen Reaktionskompartimenten (Micellen) treten, wodurch in Tween80, trotz größerer Inhomogenität, die antioxidativen Eigenschaften der Extrakte besser sind.

Profile der Pflanzenextrakte

Tabelle 10 bietet einen Vergleich der in PHASE I untersuchten Extrakte. Die Bewertung des antioxidativen Potenzials anhand eines einfachen Punktesystems erleichterte die Profilerstellung der einzelnen Extrakte. Für die Bewertung wurden die IC_{50} - Konzentrationen herangezogen. Geringe Aktivität wurde mit einem, gute mit

zwei und sehr gute mit drei Punkten bewertet. Schwarze Punkte stehen für Sternylolk, graue für Tween80.

Tabelle 10: Vergleich der antioxidativen Eigenschaften der verschiedenen Extrakte in den unterschiedlichen Testsystemen; Hemmung des Systems: --- keine Aktivität; * gering; ** gut; *** sehr gut. * Tween80; * Sternylolk

	Fenton	X / XOD	Peroxyinitrit	ABTS	Rose – Bengal (Cu ²⁺)	LDL - Oxidation	Gesamt
Trolox	*** **	* **	*** **	** **	*** **	*	26
Grüner Tee	*** **	*** **	** **	*** **	** **	**	28
Rosmarin	--- ---	* **	--- ---	** *	*** **	***	15
Rosmarin- säure	* *	*** **	** **	** **	*** **	*	22
Rotbusch	* **	*** **	*** **	*** **	*** **	**	29
Honigbusch	* *	** **	** **	** **	* *	---	16

Der Grüntee - Extrakt hatte im Fenton - System, im Xanthin / Xanthinoxidase - System und im ABTS - System sehr gute antioxidative Eigenschaften. Seine entgiftende Wirkung gegenüber dem nichtradikalischen Peroxyinitrit war vergleichsweise schlechter. Seine antioxidative Kapazität im Rose - Bengal - System und die Ergebnisse der kupferinduzierten LDL - Oxidation waren vergleichsweise gut. Aufgrund der konstant guten antioxidativen Eigenschaften des Extraktes aus *Camellia sinensis*, seiner guten Handhabbarkeit und seiner Funktion als „Positivkontrolle“ war diese Pflanze auch in der zweiten Untersuchungsphase weiter von Interesse.

Der Rosmarin - Extrakt war zum einen schwer löslich, zum anderen war sein antioxidatives Potenzial auf die lipophilen Systeme beschränkt. Damit wurde auf beide Extrakte aus *Rosmarinus officinalis* bei den nachfolgenden Untersuchungen verzichtet.

Der Rotbusch - Extrakt erzielte in der Bewertung einen Punkt mehr als der Grüntee - Extrakt und war damit für weitere Untersuchungen in PHASE II von großem Interesse. Um weiterhin einen, dem Rotbusch ähnlichen, Konkurrenten gleicher taxonomischer Familie und gleichen Herkunftsortes zu haben, wurde der Honigbusch, der immerhin genauso gute antioxidative Eigenschaften entwickelte wie der Rosmarin - Extrakt, in

die zweite Untersuchungsphase mit hineingenommen. Es wurde demnach in PHASE II mit Extrakten aus *Camellia sinensis*, *Aspalathus linearis* und aus *Cyclopia spec.* weitere Untersuchungen durchgeführt.

Auswahl der Testsysteme für PHASE II

Die erste Untersuchungsphase machte die Notwendigkeit der Anwendung verschiedener *in vitro* Testsysteme deutlich. Die untersuchten Extrakte verhielten sich zum Teil sehr unterschiedlich in den einzelnen Systemen. Für die Bewertung ihrer antioxidativen Eigenschaften ist der Vergleich mehrerer Testsysteme unabdingbar. Ein nicht zu vergessender und sehr wichtiger Punkt ist das Reaktionsmilieu, das unbedingt beachtet werden muss. Die Auswahl der Testsysteme sollte sich an den zu untersuchende Substanzen und der Fragestellung orientieren. Benötigt werden für die Evaluierungsphase Systeme, die sehr sensibel gegenüber den Extraktinhaltsstoffen reagieren und die sowohl ein lipophiles als auch ein hydrophiles Reaktionsmilieu bieten.

Aus den drei einfachen hydrophilen Testsystemen Fenton, ABTS und Peroxynitrit wurde das ABTS - System für weitere Untersuchungen ausgewählt. Zum einen wird hier der Hauptmechanismus (H - Donorfunktion) der antioxidativen Eigenschaften von Polyphenolen abgefragt, zum anderen ist die Anwendung des ABTS - Systems international weit verbreitet.

Im Xanthin / Xanthinoxidase - System beruht die Generierung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf komplexeren enzymatischen Reaktionen (Schempp et al. 2000). Die Xanthinoxidase selbst, das Superoxidradikalanion und die Eisenionen bieten zusätzliche Wirkorte für Pflanzeninhaltsstoffe. Dies und die hohe Empfindlichkeit des Systems gegenüber den verwendeten Extrakten war der Grund für einen Einsatz in der zweiten Untersuchungsphase.

Im Unterschied zum ABTS - und Peroxynitrit - System handelt es sich beim Rose - Bengal - System um ein Testsystem mit lipophilen Reaktionssequenzen und anderen antioxidativen Wirkmöglichkeiten, wie die Eliminierung von Singulett-Sauerstoff, Interaktion mit Zwischenprodukten der Lipidperoxidation und Kupferkomplexierung. Im Vergleich der lipophilen Systeme war das Rose - Bengal - System aufgrund seiner leichten Handhabbarkeit und dem direkten Bezug zum Nahrungsmittelverderb das System der Wahl für die zweite Untersuchungsphase. Eine Variation des Systems ohne den Zusatz von Kupfer sollte eine detailliertere Diskussion ermöglichen.

4 Ergebnisse (PHASE II)

4.1 Ziel und Vorgehensweise

In der zweiten Projektphase wurde mit Extrakten aus *Camellia sinensis*, *Aspalathus linearis* und *Cyclopia spec.* weitergearbeitet. Ziel war der Vergleich und die Bewertung verschiedener Extrakte aus einer Pflanze, um einen Extrakt mit optimalen Eigenschaften für den Einsatz in Lebensmitteln und Kosmetika zu erhalten. Die neuen Extrakte unterschieden sich durch ihr Extraktionsmedium, weiterhin wurden eine neue Spezies des Honigbusches (*Cyclopia sessiliflora*), ein Weißtee - Extrakt (*Camellia sinensis*, Knospen) und ein Extrakt aus fermentiertem Rotbusch (*Aspalathus linearis*) in die Untersuchungen miteinbezogen. Insgesamt standen neun Extrakte zur Verfügung, als Vergleichssubstanz diente weiterhin das wasserlösliche α - Tocopherol analogon Trolox. Der Emulgator Sternnyolk wurde, aufgrund der Ergebnisse der ersten Untersuchungsphase, als Lösungsvermittler eingesetzt. Die Charakterisierung der antioxidativen Eigenschaften der pflanzlichen Extrakte erfolgte, wie auch in PHASE I, mit Hilfe von biochemischen *in vitro* Testsystemen. Gegenüber der ersten Untersuchungsphase wurde die Anzahl der verwendeten Systeme auf vier reduziert. Es handelte sich dabei um das ABTS - System, das Xanthin / Xanthinoxidase - System und das Rose - Bengal - System mit und ohne Zusatz von Kupfer. Die Variation der Extrakte durch Verwendung

- unterschiedlicher Extraktionsmedien (bei Rotbusch und Honigbusch)
- verschiedener Pflanzenteile (bei Grüntee und Weißtee)
- anderer Arten (bei Honigbusch)
- unterschiedlicher Verarbeitungen (bei Rotbusch)

ergab quantitative Veränderungen bezüglich der Inhaltsstoffe und der Leit-substanzen. Über die IC_{50} - Konzentration, also die Konzentration eines Extraktes, die das jeweilige Testsystem zu 50 % hemmt, wurde der Unterschied zwischen den verschiedenen Extrakten herausgearbeitet. Um eine Diskussionsgrundlage zu schaffen, wurden anhand der IC_{50} - Konzentrationen der Gesamtextrakte ($IC_{50}(G)$) die IC_{50} - Konzentrationen der Leitsubstanzen ($IC_{50}(L)$) berechnet und im Hinblick auf Struktur - Aktivitäts - Beziehungen miteinander verglichen. Die in PHASE II untersuchten Extrakte, ihre Extraktionsmethoden und Inhaltsstoffe sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Charakterisierung der verwendeten Extrakte *) neue Extrakte in PHASE II

Herkunfts- pflanze	Extrakte	Leitsubstanzen und weitere Inhaltstoffe	Anteil am Extrakt		
<i>Camellia sinensis</i>	• Grüntee - Extrakt (GT) unfermentiert Ethanol (100 %)	Coffein	5,69 %		
		Epicatechin	2,09 %		
		Epigallocatechingallat	23,28 %		
		Epicatechingallat	6,7 %		
		Gesamt	38,09 %		
	• Weißtee - Extrakt (WT) * unfermentiert Ethanol (100 %)	Polyphenole, davon	95 %		
		Epigallocatechingallat	50 %		
		Gesamt	95 %		
		<i>Aspalathus linearis</i>	• Rotbusch - Extrakt (RO) unfermentiert Ethanol (100 %)	Aspalathin	19,2 %
				• Rotbusch - Extrakt (RO (f)) * fermentiert Ethanol / Wasser (80 % : 20 %)	Aspalathin
• Rotbusch - Extrakt (RO (e)) * unfermentiert, entfärbt Ethanol / Wasser (80 % : 20 %)	Aspalathin				16,6 %
	<i>Cyclopia genistoides</i>		• Honigbusch - Extrakt (HO gen1) unfermentiert Ethanol 100 %		Mangiferin
				Isomangiferin	5,4 %
Hesperidin				3,0 %	
• Honigbusch - Extrakt (HO gen2) * unfermentiert Ethanol / Wasser (80 % : 20 %)		Mangiferin	12,31 %		
		Isomangiferin	4,1 %		
		Hesperidin	0,14 %		
<i>*Cyclopia sessiliflora</i>	• Honigbusch - Extrakt (HO sess) * unfermentiert Ethanol / Wasser (80 % : 20 %)	Mangiferin	1,56 %		
		Isomangiferin	0,49 %		
		Hesperidin	0,57 %		
	• Honigbusch - Extrakt (HO sess(e)) * unfermentiert, entfärbt Ethanol / Wasser (80 % : 20 %)	Mangiferin	3,28 %		
		Isomangiferin	1,01 %		
		Hesperidin	1,08 %		
Gesamt	5,37 %				

Aus der Pflanze *Camellia sinensis* wurde ein Weißtee - Extrakt (aus Knospen) und ein Grüntee - Extrakt (aus Blättern) gewonnen. Aus der Pflanze *Aspalathus linearis* wurden 3 Extrakte gewonnen. Zwei davon aus unfermentiertem Material. RO war ein reiner Ethanolextrakt und RO(e) ein Mischextrakt aus Ethanol und Wasser, der zusätzlich entfärbt wurde. RO(f) wurde mittels Mischextraktion aus fermentiertem Rotbuschmaterial gewonnen. Die Extrakte aus *Cyclopia genistoides* unterschieden sich nur in ihrer Extraktionsmethode. HO gen1 war der Ethanolextrakt, HO gen2 war der Ethanol / Wasser - Extrakt. Die Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* hingegen unterschieden sich nur hinsichtlich der Entfärbung des Extraktes HO sess(e). Die Extraktionsmethode war bei HO sess und HO sess(e) jeweils die Ethanol / Wasser - Mischextraktion.

4.2 Ergebnisse im ABTS - System (PHASE II)

Dosis - Wirkungsdiagramme im ABTS - System

Die Hemmung des ABTS - Systems durch die Extrakte war stark konzentrationsabhängig (Abbildung 17). Bereits mit niedrigen Extraktkonzentrationen im Ansatz konnte das Testsystem zu 100 % gehemmt werden. Dabei war unter den „neuen“ Extrakten nur der Weißtee - Extrakt deutlich wirksamer als sein „alter“ Vergleichsextrakt aus Grünem Tee. Mit einer Konzentration von nur 2,5 µg WT pro ml konnte das Testsystem zu 100 % gehemmt werden. Dabei waren beide Extrakte aus *Camellia sinensis* deutlich wirksamer als Trolox. Die Graphen der Extrakte aus unfermentiertem *Aspalathus linearis* (RO und RO(e)) lagen, unabhängig von Extraktionsmethode und Entfärbung, eng beieinander. Beide Extrakte hemmten damit die ABTS - Radikalbildung effizienter als Trolox. Der Kurvenverlauf des Rotbusch - Extraktes aus fermentiertem Material (RO(f)) hingegen war deutlich flacher. Seine Wirksamkeit in diesem Testsystem war demnach geringer als die von RO, RO(e) und auch Trolox. Mit Ausnahme des entfärbten Extraktes aus *Cyclopia sessiliflora* hatten die Dosis - Wirkungs - Diagramme der Honigbusch - Extrakte unabhängig von Art und Extraktionsmethode einen ähnlichen Verlauf. Trolox war gegenüber allen Extrakten aus *Cyclopia spec.* das bessere Antioxidans im ABTS - System.

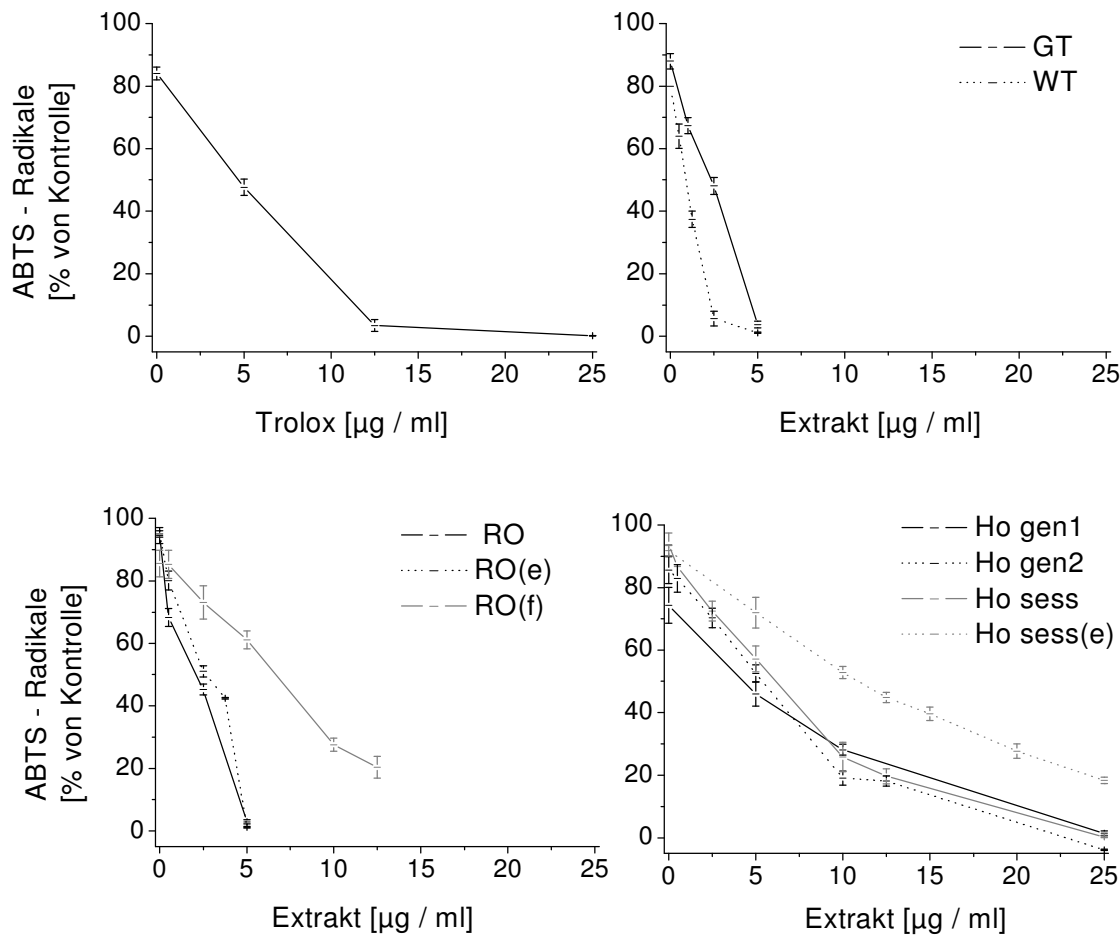


Abbildung 17: Einfluss der verschiedenen Pflanzenextrakte und Trolox gelöst in Sternnyolk auf das ABTS - System. Trolox = α - Tocopherolanalogen; GT = Grüner Tee; RO = Rotbusch; HO = Honigbusch; WT = Weißer Tee; f = fermentiert; e = entfärbt; gen = *genistoides*; sess = *sessiliflora*

IC₅₀ - Konzentrationen im ABTS - System

Die IC₅₀(G) - Konzentrationen der Gesamtexttrakte zeigten deutliche Unterschiede bezüglich der radikalfangenden Eigenschaften der Extrakte (Abbildung 18). Den niedrigsten IC₅₀(G) - Wert und damit die höchste Aktivität hatte der Extrakt aus Weißem Tee mit 0,9 µg / ml. Der Extrakt aus Grünem Tee (GT) und beide Extrakte aus unfermentiertem Rotbusch (RO und RO(e)) hatten ebenfalls sehr niedrige IC₅₀(G) - Werte mit 2,3, 2,1 und 2,7 µg / ml. Alle anderen Extrakte, außer der entfärbte Honigbusch (HO sess(e), 10,9 µg / ml), hatten IC₅₀(G) - Konzentrationen von ± 5 µg / ml und waren damit genauso gut im ABTS - System wie die Vergleichssubstanz Trolox.

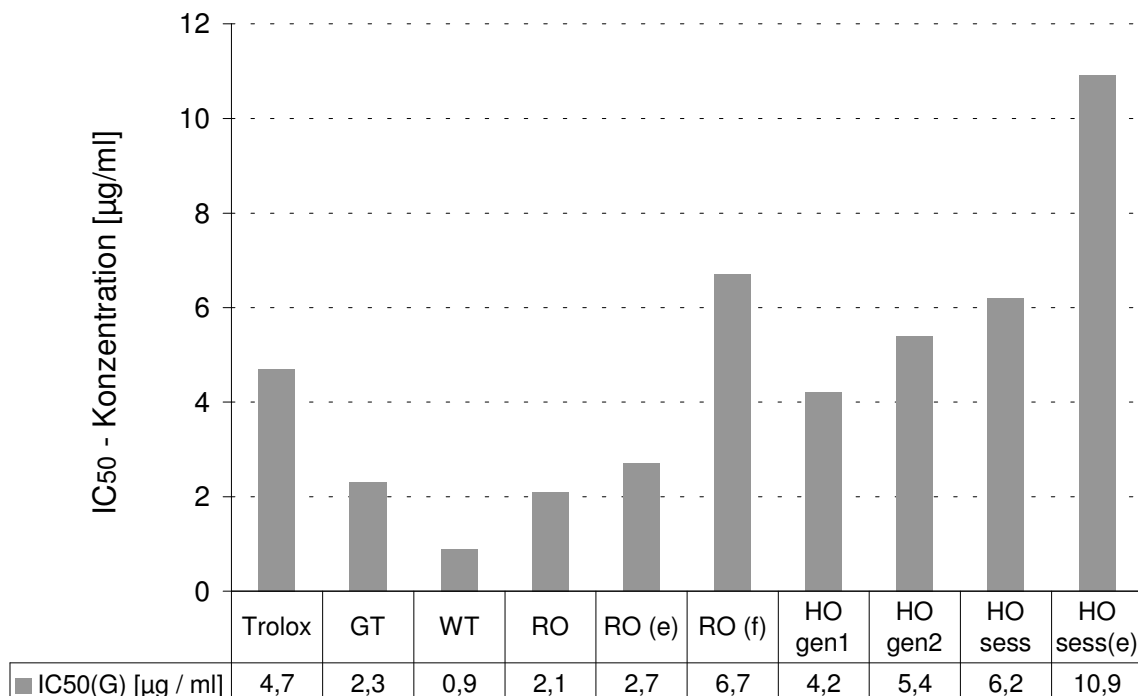


Abbildung 18: ABTS - System: IC₅₀ - Konzentrationen der verschiedenen Pflanzenextrakte und Trolox; GT = Grüner Tee; RO = Rotbusch; HO = Honigbusch; WT = Weißer Tee; f = fermentiert; e = entfärbt; gen = genistoides; sess = sessiliflora; IC₅₀(G) = IC₅₀ - Konzentration des Gesamtextraktes

Um den Vergleich verschiedener Extrakte gleicher pflanzlicher Herkunft zu ermöglichen, wurden die IC₅₀ - Konzentrationen der Gesamtextrakte (IC₅₀(G)) und die errechneten IC₅₀ - Konzentrationen der Leitsubstanzen (IC₅₀(L)) miteinander verglichen (Abbildung 19 bis Abbildung 21).

Die Extrakte der Pflanze *Camellia sinensis*, WT und GT, zeigten einen direkt proportionalen Zusammenhang zwischen ihrer Aktivität im ABTS - System und ihrem Anteil an Leitsubstanzen im Extrakt (Abbildung 19). Die antioxidative Wirkung des Gesamtextraktes von Weißem Tee (WT) war 2,5 mal höher (0,9 µg / ml) als die des Gesamtextraktes von Grünem Tee (GT) (2,3 µg / ml). Die Leitsubstanzen der beiden Extrakte standen in exakt demselben Verhältnis zueinander (95% in WT; 38,09 % in GT). Der errechnete Anteil, der die Wirksamkeit der Leitsubstanzen im ABTS - System ausmacht (IC₅₀(L)) ergab daraus folgend für beide Extrakte denselben IC₅₀(L) - Wert von 0,85 µg / ml.

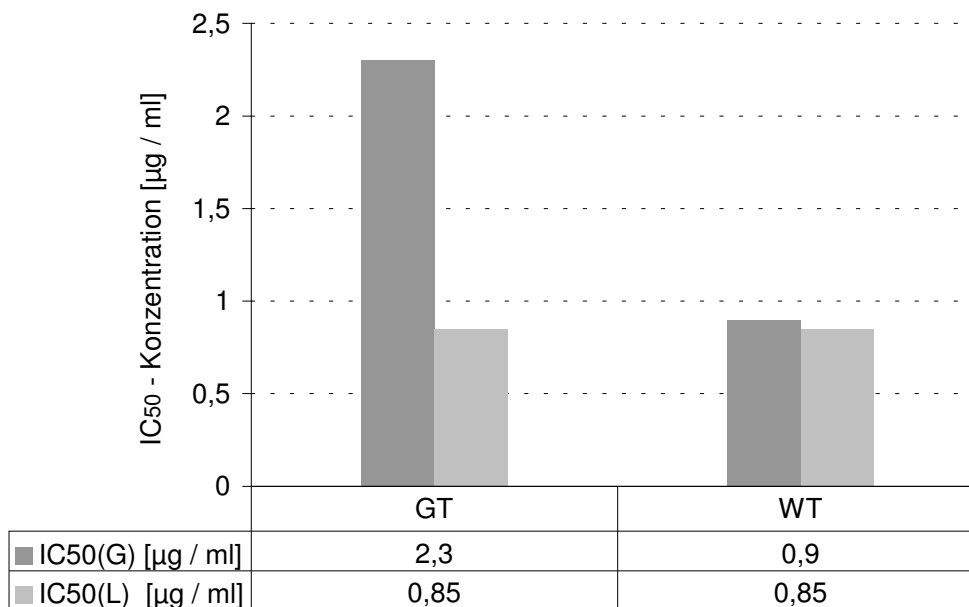


Abbildung 19: ABTS - System: $IC_{50}(G)$ - Konzentrationen der Gesamtextrakte und der prozentuale Anteil an Leitsubstanzen ($IC_{50}(L)$ - Konzentrationen); Vergleich der Extrakte aus *Camellia sinensis*

Im Gegensatz zu den Extrakten aus *Camellia sinensis* waren die Extrakte aus *Aspalathus linearis* unterschiedlich vorbehandelt. Die beiden unfermentierten Extrakte RO und RO(e) unterschieden sich zum einen durch das Extraktionsmittel und zum anderen durch die anschließende Entfärbung des durch Mischextraktion gewonnenen Extraktes (RO(e)). Wie bei den Extrakten aus *Camellia sinensis* gab es auch bei den Extrakten aus unfermentiertem *Aspalathus linearis* einen proportionalen Zusammenhang zwischen der Aktivität im ABTS - System und dem Anteil an der Leitsubstanz Aspalathin im Gesamtextrakt (RO: 19,2 % Aspalathin, $IC_{50}(G) = 2,1 \mu\text{g} / \text{ml}$, $IC_{50}(L) = 0,4 \mu\text{g} / \text{ml}$; RO(e): 16,6 % Aspalathin, $IC_{50}(G) = 2,7 \mu\text{g} / \text{ml}$, $IC_{50}(L) = 0,45 \mu\text{g} / \text{ml}$; Abbildung 19). Die Extrakte aus unfermentiertem Material (RO und RO(e)) waren damit wesentlich effektiver verglichen mit RO(f) ($IC_{50} = 6,7 \mu\text{g} / \text{ml}$). Der Anteil an der Leitsubstanz Aspalathin in RO und RO(e) war jedoch um ein Vielfaches höher als der Anteil von Aspalathin im Extrakt aus fermentiertem Rotbusch (nur 2,15 %). Das Verhältnis zwischen Aktivität und Leitsubstanzanteil war in diesem Fall nicht proportional, wodurch die $IC_{50}(L)$ - Konzentrationen von RO und RO(e) dreimal so hoch waren wie die $IC_{50}(L)$ - Konzentration von RO(f) mit $0,15 \mu\text{g} / \text{ml}$.

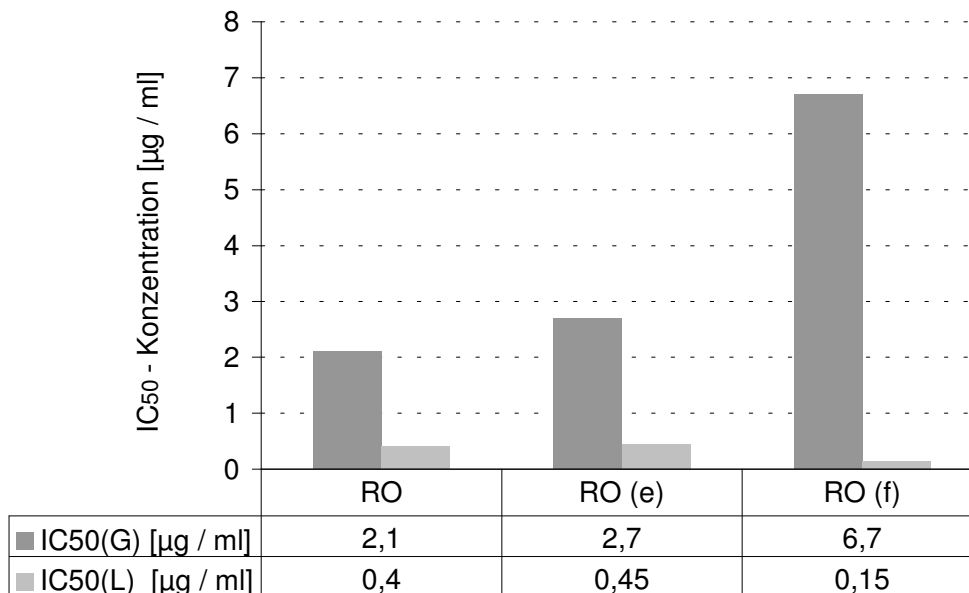


Abbildung 20: ABTS - System: IC₅₀(G) - Konzentrationen der Gesamtextrakte und der prozentuale Anteil an Leitsubstanzen (IC₅₀(L) - Konzentrationen); Vergleich der Extrakte aus *Aspalathus linearis* (Rotbusch)

Die Extrakte der Pflanze *Cyclopia genistoides*, HO gen1 und HO gen2, zeigten ebenfalls einen proportionalen Zusammenhang zwischen Aktivität und Anteil an Leitsubstanzen im Extrakt (Abbildung 21). Die antioxidative Wirkung des „alten“ Gesamtextraktes HO gen1 war 20% höher als die des „neuen“ Gesamtextraktes HO gen2. Der Anteil an Leitsubstanz war in HO gen1 um 30 % höher als der Anteil an Leitsubstanz in HO gen2 (Tabelle 11). Der errechnete Anteil, der die Wirksamkeit der Leitsubstanzen im ABTS - System ausmacht (IC₅₀(L)), ergab für die Extrakte ähnliche IC₅₀(L) - Werte von 1 µg / ml (HO gen1) bzw. 0,9 µg / ml (HO gen2), also einen Unterschied von lediglich 10 %. Die unterschiedliche Aktivität der Gesamtextrakte HO gen1 und HO gen2 beruht demnach auf den unterschiedlichen Gehalten an Leitsubstanzen. Die Entfärbung des Extraktes aus *Cyclopia sessiliflora* hatte eine deutliche Aktivitätsminderung in diesem Testsystem zur Folge. Trotz eines höheren Leitsubstanzanteils von HO sess(e) (5,37 %) war dessen antioxidative Kapazität mit einer IC₅₀ - Konzentration von 10,9 µg / ml geringer als die des gefärbten Extraktes (Leitsubstanzanteil: 2,62 %, IC₅₀ = 6,2 %). Gemessen an ihren geringen Anteilen an Leitsubstanzen hatten dennoch beide Extrakte dieser Honigbuschspezies ein hohes antioxidatives Potenzial im ABTS - System.

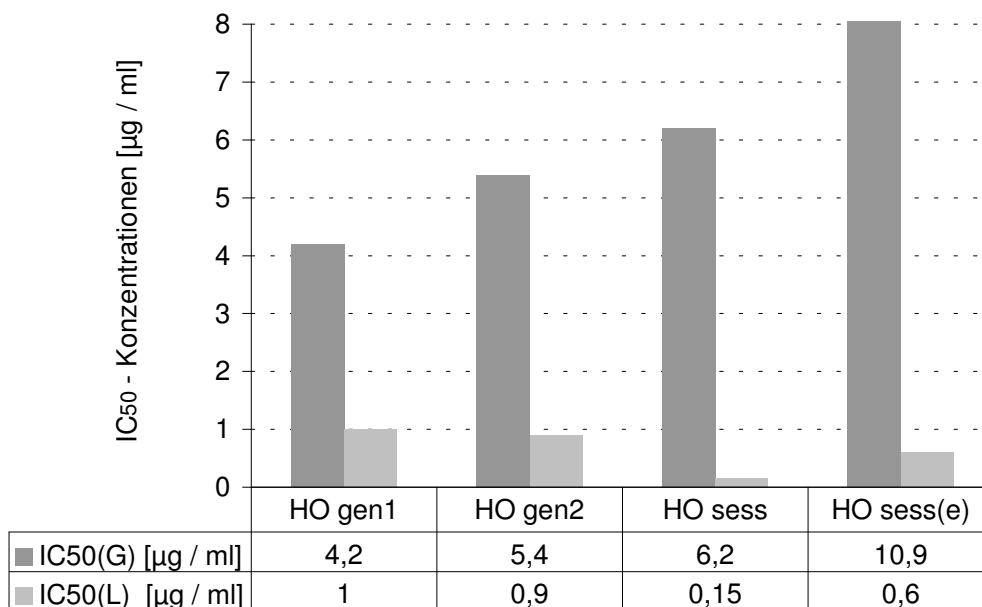


Abbildung 21: ABTS - System: $IC_{50}(G)$ - Konzentration der Gesamtextrakte und der prozentuale Anteil an Leitsubstanzen $IC_{50}(L)$ - Konzentration; Vergleich der Extrakte aus *Cyclopaia spec.* (Honigbusch)

Fazit:

Die antioxidative Kapazität der Extrakte aus *Camellia sinensis*, unfermentiertem *Aspalathus linearis* und *Cyclopaia genistoides* korrelierte mit deren Anteilen an Inhaltsstoffen.

Die ethanolischen Extrakte von *Aspalathus linearis* und *Cyclopaia genistoides* hatten höhere Leitsubstanzkonzentrationen und damit bessere antioxidative Eigenschaften im ABTS - Testsystem als die Ethanol / Wasser - Extrakte. Es gab keine Korrelationen zwischen den $IC_{50}(G)$ - Konzentrationen und den quantifizierten Inhaltsstoffen der Extrakte aus fermentiertem *Aspalathus linearis* und *Cyclopaia sessiliflora*. Trotz der geringen Leitsubstanzkonzentrationen hatten diese Extrakte jedoch ein verhältnismäßig gutes antioxidatives Potenzial im ABTS - System. Die Entfärbung von HO sess(e) hatte eine Aktivitätsminderung zur Folge.

4.3 Ergebnisse im Xanthin / Xanthinoxidase - System (X / XOD)

Dosis - Wirkungs - Diagramme im Xanthin / Xanthinoxidase - System

Die untersuchten Extrakte erwiesen sich im Xanthin / Xanthinoxidase - System als ausgezeichnete Antioxidanzien (Abbildung 22). Eine noch schnellere Hemmung des Systems als durch den Grüntee - Extrakt erfolgte durch den Weißtee - Extrakt. Wie

auch im ABTS - System lagen die Graphen der beiden Extrakte aus unfermentiertem *Aspalathus linearis* (RO und RO(e)) unabhängig von Extraktionsmethode und Färbung, sehr eng zusammen. Die Fermentation des Pflanzenmaterials hatte auch in diesem Testsystem eine Aktivitätsminderung zur Folge. Im Gegensatz zum vorhergegangenen ABTS - System hatte Trolox einen deutlich geringeren antioxidativen Effekt als alle Rotbusch - Extrakte. Einen ähnlich flachen Kurvenverlauf wie Trolox hatte nur der ethanolische Extrakt aus *Cyclopi genistoides* (HO gen1). Der in Mischextraktion gewonnenen Extrakte aus *Cyclopi genistoides* (HO gen2) war deutlich wirksamer als sein ethanolischer Auszug HO gen1. Die Entfärbung des Extraktes aus *Cyclopi sessiliflora* (HO sess(e)) führte zu einer Aktivitätssteigerung.

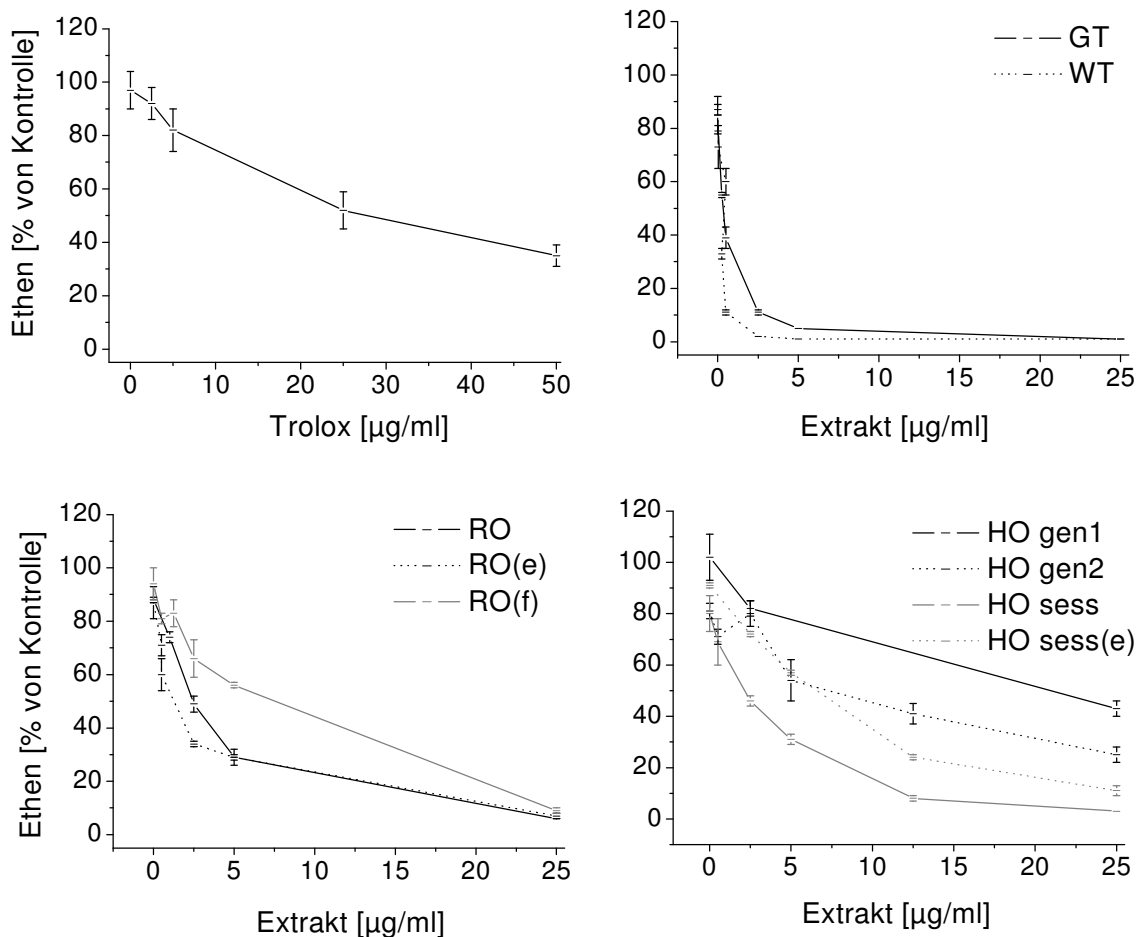


Abbildung 22: Einfluss der verschiedenen Pflanzenextrakte und Trolox gelöst in Sternnyolk auf das Xanthin / Xanthinoxidase - System. GT = Grüner Tee; RO = Rotbusch; HO = Honigbusch; WT = Weißer Tee; f = fermentiert; e = entfärbt; gen = *genistoides*; sess = *sessiliflora*

IC₅₀ - Konzentrationen im Xanthin / Xanthinoxidase - System

Die ermittelten IC₅₀(G) - Konzentrationen bestätigten, dass alle untersuchten Pflanzenextrakte im Xanthin / Xanthinoxidase (X / XOD) - System eine bessere antioxidative Wirkung hatten als die Reinsubstanz Trolox (IC₅₀ = 28 µg / ml, Abbildung 23). Die Extrakte der Pflanze *Camellia sinensis* (GT und WT), waren mit IC₅₀(G) - Konzentrationen kleiner 0,5 µg / ml die wirksamsten Extrakte in diesem Testsystem. Die Extrakte aus unfermentiertem *Aspalathus linearis* (RO und RO(e)) hatten mit IC₅₀(G) - Konzentrationen unter 3 µg / ml ebenfalls ausgezeichnete antioxidative Eigenschaften. RO(f)), HO gen2 und beide Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* (HO sess und HO sess (e)) hemmten mit IC₅₀(G) - Konzentrationen unter 7,5 µg / ml das X / XOD - System um ein Vielfaches besser als Trolox. Auch der ethanolische Extrakt aus *Cyclopia genistoides* (HO gen1) hatte mit einer IC₅₀(G) - Konzentrationen von 21 µg / ml immer noch bessere antioxidative Eigenschaften als die Vergleichssubstanz.

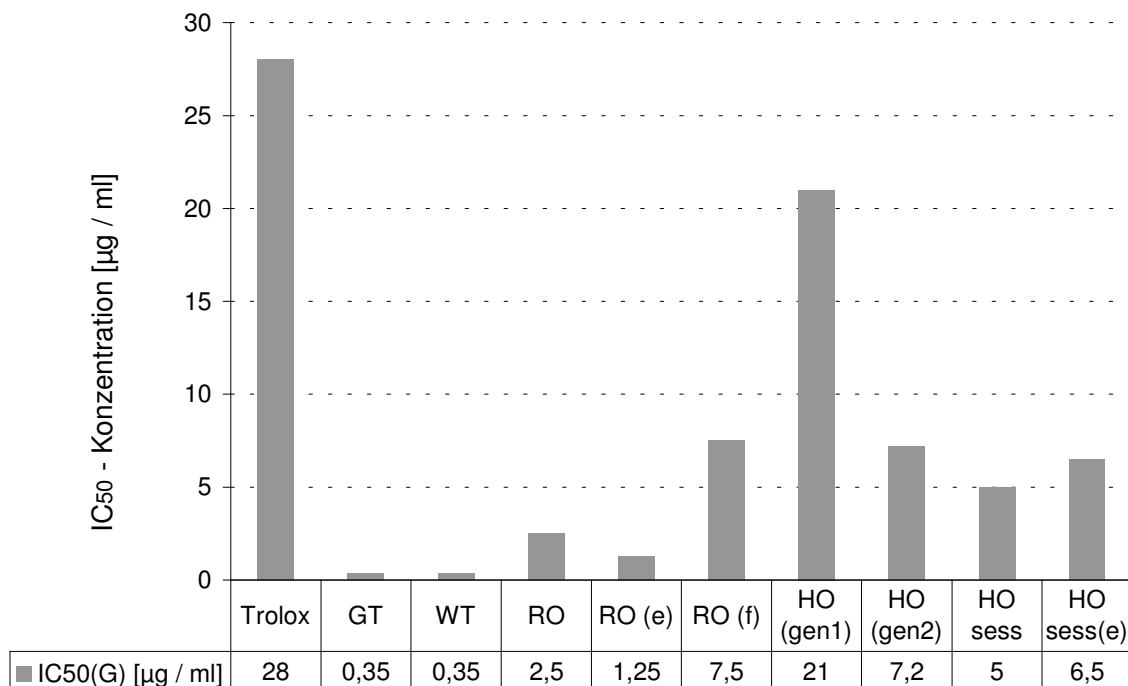


Abbildung 23: Xanthin / Xanthinoxidase - System: IC₅₀(G) - Konzentrationen der verschiedenen Pflanzenextrakte und Trolox. GT: Grüner Tee; RO: Rotbusch; HO: Honigbusch; WT: Weißer Tee; f = fermentiert; e = entfärbt; gen = genistoides; sess = sessiliflora

Im Gegensatz zum ABTS - System zeigten die Extrakte aus der Pflanze *Camellia sinensis* keinen proportionalen Zusammenhang zwischen Aktivität und Leitsubstanzgehalt im Xanthin / Xanthinoxidase - System (Abbildung 24). Die IC_{50} - Konzentrationen beider Extrakte lagen bei $0,35 \mu\text{g} / \text{ml}$. Durch seinen vergleichsweise geringeren Catechingehalt war die errechnete $IC_{50(L)}$ - Konzentration des Grüntee - Extraktes um das Dreifache kleiner ($0,13 \mu\text{g} / \text{ml}$) als die $IC_{50(L)}$ - Konzentration des Weißtee -Extraktes ($0,33 \mu\text{g} / \text{ml}$).

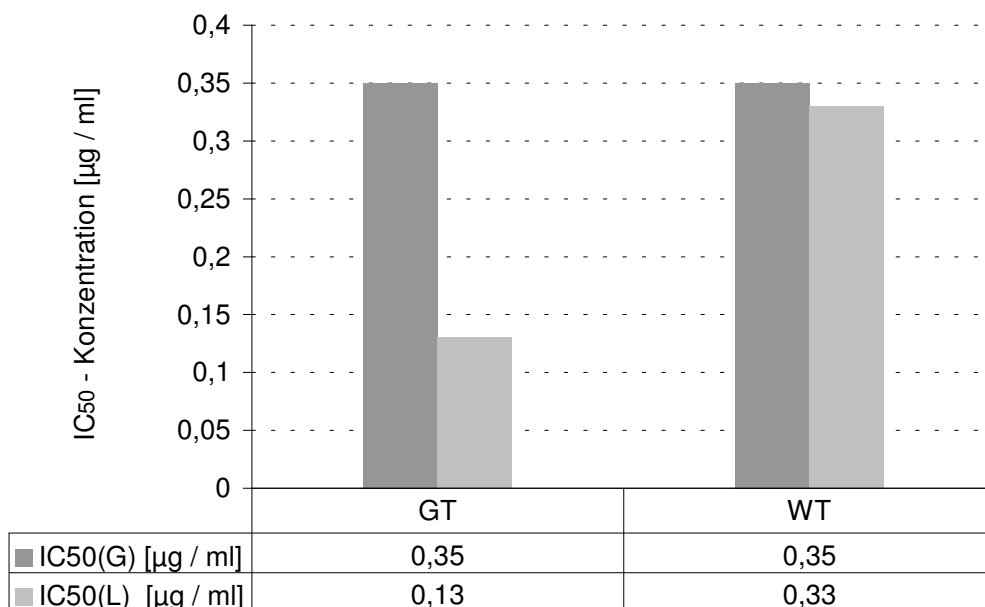


Abbildung 24: Xanthin / Xanthinoxidase - System: $IC_{50(G)}$ - Konzentrationen der Gesamtextrakte und der prozentuale Anteil an Leitsubstanzen ($IC_{50(L)}$ - Konzentrationen); Vergleich der Extrakte von *Camellia sinensis*

Die in Mischextraktion hergestellten Extrakte aus *Aspalathus linearis* RO(f) und RO(e) hatten, trotz sehr verschiedener $IC_{50(G)}$ - Konzentrationen ($1,25 \mu\text{g} / \text{ml}$ bzw. $7,5 \mu\text{g} / \text{ml}$), ähnliche $IC_{50(L)}$ - Konzentrationen ($0,15$ bzw. $0,2 \mu\text{g} / \text{ml}$) und zeigten damit eine Proportionalität zwischen Leitsubstanzanteil und Aktivität im Xanthin / Xanthinoxidase - System (Abbildung 25). Obwohl der Anteil an Leitsubstanz im Ethanol / Wasser - Extrakt geringer war (RO(e); 16,6 %) als im ethanolischen Extrakt (RO; 19,2 %), war die antioxidative Kapazität von RO(e) ($IC_{50} = 1,25 \mu\text{g} / \text{ml}$) deutlich höher als die von RO ($IC_{50} = 2,5 \mu\text{g} / \text{ml}$). Hier gab es demnach keinen Zusammenhang zwischen Leitsubstanzanteilen und antioxidativen Eigenschaften.

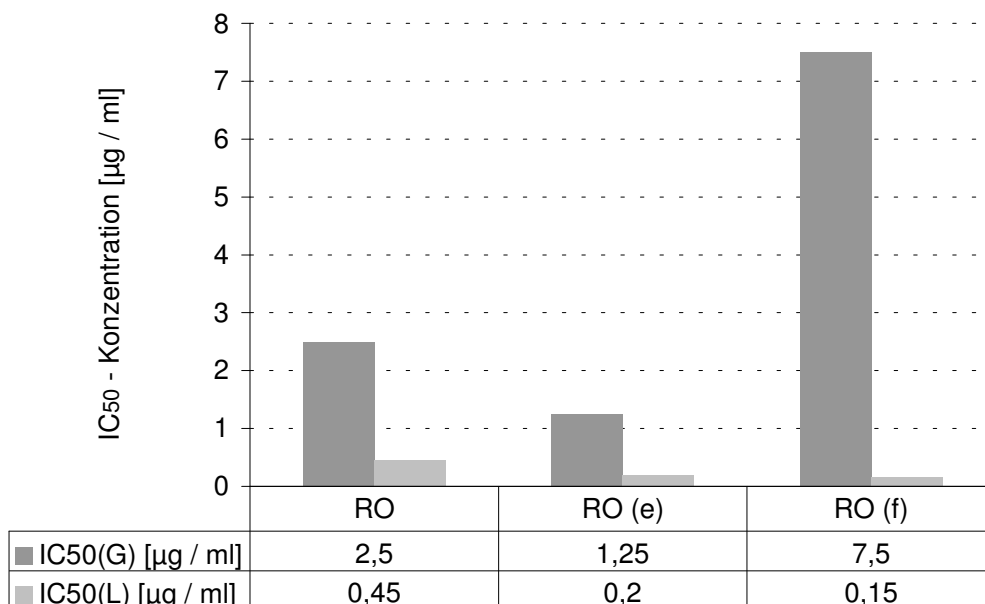


Abbildung 25: Xanthin / Xanthinoxidase - System: $IC_{50}(G)$ - Konzentrationen der Gesamt-extrakte und der prozentuale Anteil an Leitsubstanzen ($IC_{50}(L)$ - Konzentrationen); Vergleich der Extrakte von *Aspalathus linearis*

Die Extrakte der Pflanze *Cyclopia genistoides* (HO gen1 und HO gen2) und *Cyclopia sessiliflora* (HO sess und HO sess(e)) ließen im Xanthin / Xanthinoxidase - System keine Zusammenhänge zwischen Aktivität und Anteil an Leitsubstanzen erkennen (Abbildung 26). Der Ethanol / Wasser - Extrakt aus *Cyclopia genistoides* (HO gen2) hatte einen geringeren Anteil an Leitsubstanzen (16,55 %) als HO gen1 (23,3 %). HO gen2 hatte aber dennoch eine um ein Vielfaches höhere Aktivität ($IC_{50} = 7,2 \mu\text{g} / \text{ml}$) im Xanthin / Xanthinoxidase - System als der ethanolische Extrakt ($IC_{50} = 21 \text{ mg} / \text{ml}$). Ähnlich verhielt es sich auch bei *Cyclopia sessiliflora*. Trotz des vergleichsweise sehr geringen Anteils an Leitsubstanzen (2,62 %) hatte HO sess die beste antioxidative Kapazität ($IC_{50} = 5 \mu\text{g} / \text{ml}$) verglichen mit allen anderen Honigbusch - Extrakten. Die Entfärbung des Materials (HO sess(e)) hatte eine Aktivitätsminderung zur Folge ($IC_{50} = 6,5 \mu\text{g} / \text{ml}$).

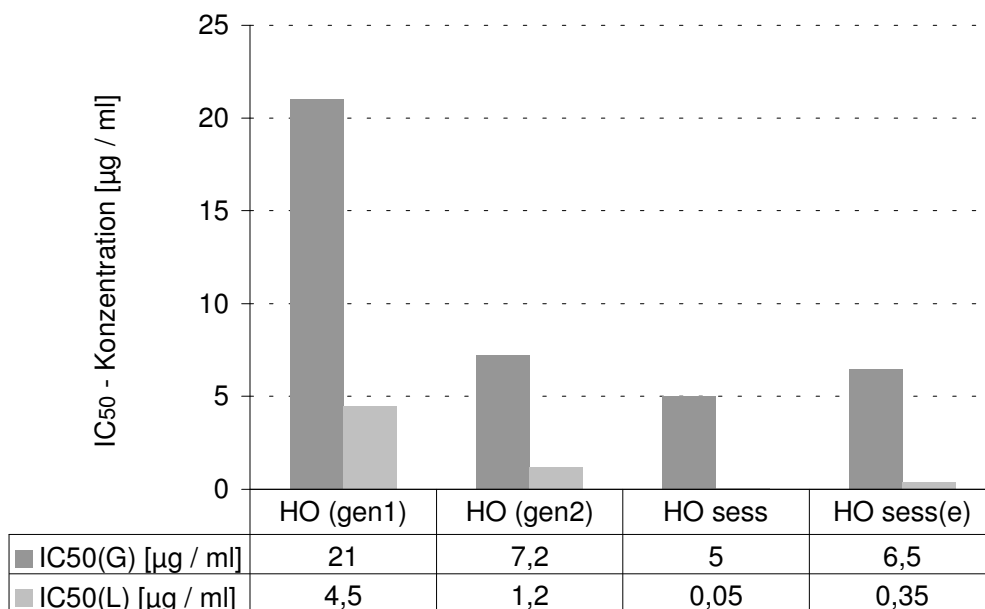


Abbildung 26: Xanthin / Xanthinoxidase - System: $IC_{50}(G)$ - Konzentrationen der Gesamt-extrakte und der prozentuale Anteil an Leitsubstanzen ($IC_{50}(L)$ - Konzentrationen); Vergleich der Extrakte von *Cyclopia spec.*

Fazit:

Die beiden Extrakte aus *Camellia sinensis* hatten mit Abstand die besten antioxidativen Eigenschaften im Xanthin / Xanthinoxidase - System. Ein Zusammenhang zwischen Leitsubstanzanteilen und Aktivität im Testsystem ergab sich ausschließlich für die Ethanol / Wasser - Extrakte aus *Aspalathus linearis*, RO(e) und RO(f). Im Vergleich der Extraktionsmittel scheint die Mischextraktion die antioxidativen Eigenschaften der Extrakte zu verstärken. So haben die Extrakte HO gen2 und RO(e) trotz geringeren Leitsubstanzanteilen niedrigere IC_{50} - Konzentrationen und damit eine höhere Aktivität verglichen mit den ethanolischen Extrakten gleicher pflanzlicher Herkunft.

4.4 Ergebnisse im Rose - Bengal - System

Durch Variation des Rose - Bengal - Systems sind genauere Interpretationen der Testergebnisse möglich. Die Untersuchungen in PHASE II wurden daher im Rose - Bengal - System einmal mit dem Zusatz von Kupfer und einmal ohne den Zusatz von Kupfer durchgeführt. Im System ohne Kupfer stellt der Fettsäureperoxidzerfall den

limitierenden Schritt dar. Durch den Zusatz von Kupfer wird zum einen der Fettsäureperoxidzerfall beschleunigt, zum anderen lassen sich Aussagen über eine eventuelle Kupferkomplexierung durch die Extrakte machen.

Dosis - Wirkungsdiagramme im Rose - Bengal - System

Die eingesetzten Pflanzenextrakte bewirkten mit zunehmenden Konzentrationen eine stetige Abnahme der aus α - Linolensäure freigesetzten Menge an Ethan (Abbildung 27). Die Vergleichssubstanz Trolox war in jedem Konzentrationsbereich das beste Antioxidans. Der Extrakt aus Weißem Tee hatte nur im mittleren Konzentrationsbereich bessere antioxidative Eigenschaften als der Grüntee - Extrakt. Die Graphen der Extrakte aus *Aspalathus linearis* waren einander sehr ähnlich und auch die Extrakte aus *Cyclopia spec.* zeigten nur tendenzielle Unterschiede.

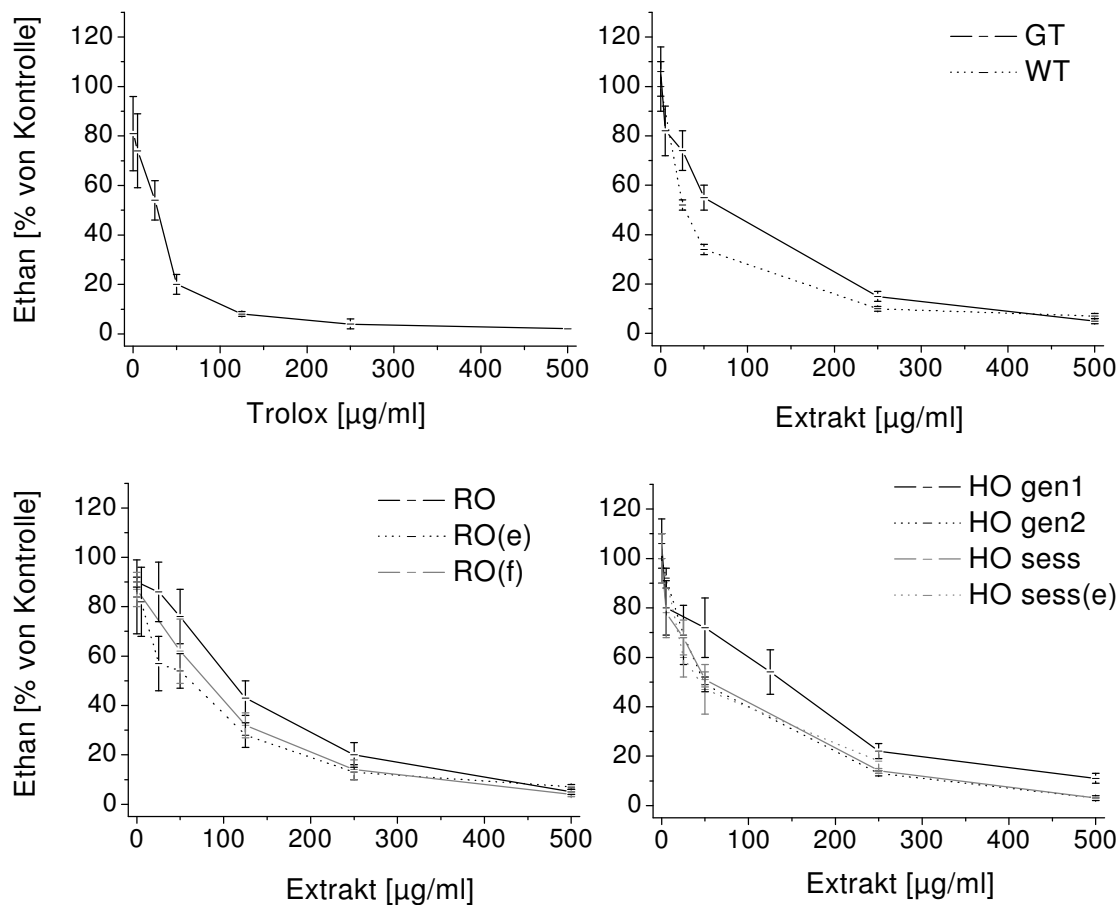


Abbildung 27: Einfluss der verschiedenen Pflanzenextrakte und Trolox gelöst in Sternnyolk auf das Rose - Bengal - System; GT = Grüner Tee; RO = Rotbusch; HO = Honigbusch; WT = Weißer Tee; f = fermentiert; e = entfärbt; gen = *genistoides*; sess = *sessiliflora*

IC₅₀ - Konzentrationen im Rose - Bengal - System

Der Extrakt aus Weißem Tee hatte exakt dasselbe hohe antioxidative Potenzial wie die Reinsubstanz Trolox (IC₅₀ = 27,5 µg/ml) und damit die niedrigste IC₅₀ - Konzentration verglichen mit den anderen Extrakten (Abbildung 28). Die Ethanol / Wasser - Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* (HO sess und HO sess(e)), aus *Cyclopia genistoides* (HO gen2) und aus *Aspalathus linearis* (RO(e)) hatten mit IC₅₀(G) - Konzentrationen ± 50 µg / ml ausgezeichnete antioxidative Eigenschaften in diesem lipophilen System. Der ebenfalls durch Ethanol / Wasser - Extraktion hergestellte fermentierte Rotbusch - Extrakt (RO(f)) hatte mit einer IC₅₀(G) - Konzentration von 80 µg / ml eine ähnliche Wirksamkeit wie der Grüntee - Extrakt (IC₅₀(G) = 75 µg / ml). Die ethanolischen Extrakte aus *Aspalathus linearis* und *Cyclopia genistoides* (RO und HO gen1) waren mit IC₅₀(G) - Konzentrationen über 100 µg / ml die schlechteren Antioxidanzien in diesem Testsystem.

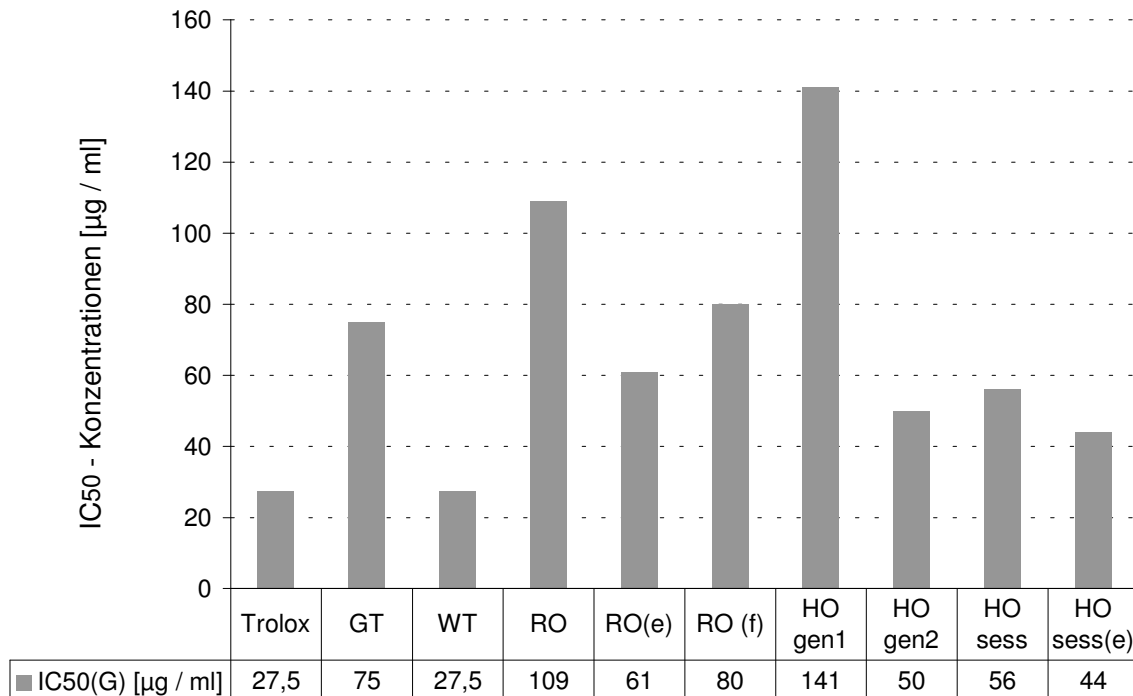


Abbildung 28: Rose - Bengal - System (ohne Kupfer): IC₅₀(G) - Konzentrationen der verschiedenen Pflanzenextrakte und Trolox; GT = Grüner Tee; RO = Rotbusch; HO = Honigbusch; WT = Weißer Tee; f = fermentiert; e = entfärbt; gen = *genistoides*; sess = *sessiliflora*.

Für die Extrakte der Pflanze *Camellia sinensis* war im Rose - Bengal - System der proportionale Zusammenhang zwischen Aktivität und Leitsubstanzgehalt gegeben (Abbildung 29). Die $IC_{50}(G)$ - Konzentration des Weißtee - Extraktes war um den Faktor 2,5 kleiner ($27,5 \mu\text{g} / \text{ml}$) als die des Grüntee - Extraktes ($IC_{50}(G) = 75 \mu\text{g} / \text{ml}$). Die Leitsubstanzen der beiden Extrakte standen in gleichem Verhältnis zueinander, so dass die Extrakte annähernd gleiche $IC_{50}(L)$ - Konzentrationen aufwiesen.

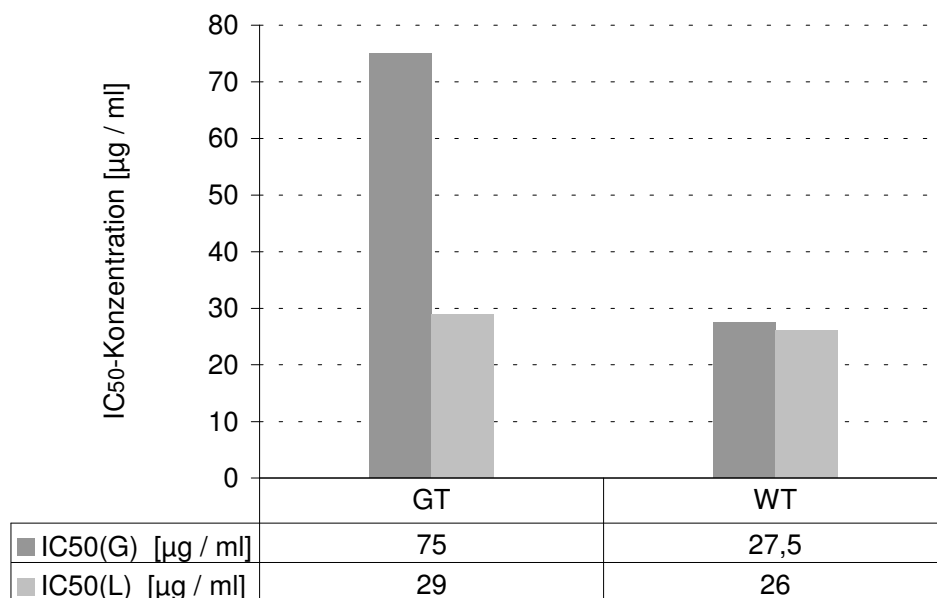


Abbildung 29: Rose - Bengal - System: $IC_{50}(G)$ - Konzentrationen der Gesamtextrakte und der prozentuale Anteil an Leitsubstanzen ($IC_{50}(L)$ - Konzentrationen); Vergleich der Extrakte aus *Camellia sinensis* (Grüner Tee).

Der Ethanol / Wasser - Extrakt RO(e) war mit einer $IC_{50}(G)$ - Konzentration von $61 \mu\text{g} / \text{ml}$ der beste Extrakt aus *Aspalathus linearis* im Rose - Bengal - System. Bei keinem der Rotbusch - Extrakte war eine Korrelation zwischen Wirksamkeit und Leitsubstanzanteil gegeben. Innerhalb der durchgeführten Untersuchungen war das Rose - Bengal - System das einzige, in dem der „alte“ ethanologische Rotbusch - Extrakt (RO) eindeutig ein schlechteres antioxidatives Potenzial hatte als der fermentierte Rotbusch - Extrakt RO(f). Seine $IC_{50}(G)$ - Konzentration war mit $109 \mu\text{g} / \text{ml}$ im Vergleich zum fermentierten Rotbusch - Extrakt ($80 \mu\text{g} / \text{ml}$) verhältnismäßig hoch. Auch die $IC_{50}(L)$ - Konzentration von RO war um mehr als das 10fache größer als die $IC_{50}(L)$ - Konzentration von RO(f), der mit Abstand den niedrigsten Leitsubstanzanteil unter den Rotbusch - Extrakten aufwies (Abbildung 30).

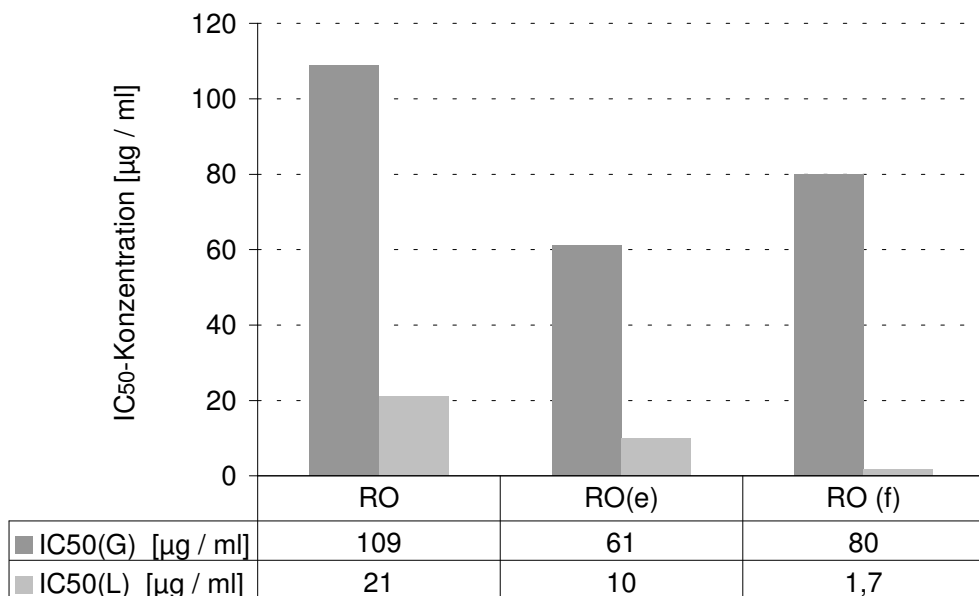


Abbildung 30: Rose - Bengal - System: $IC_{50}(G)$ - Konzentrationen der Gesamtextrakte und der prozentuale Anteil an Leitsubstanzen ($IC_{50}(L)$ - Konzentrationen); Vergleich der Extrakte aus *Aspalathus linearis* (Rotbusch).

Die Extrakte der Pflanze *Cyclopia genistoides* (HO gen1 und HO gen2) zeigten keinen Zusammenhang zwischen Aktivität und Anteil an Leitsubstanzen (Abbildung 31). Obwohl HO gen1, verglichen mit HO gen2, einen verhältnismäßig höheren Prozentsatz an Leitsubstanzen aufwies (HO gen1: 23,3 %; HO gen2: 16,55 %), war HO gen1 das schlechtere Antioxidans ($IC_{50}(G) = 141 \mu\text{g} / \text{ml}$). Damit war auch hier, wie bei den Rotbusch - Extrakten, der Ethanol / Wasser - Extrakt dem rein ethanolanischen Extrakt deutlich überlegen ($IC_{50}(G)$ von HO gen2 = $50 \mu\text{g} / \text{ml}$).

Die Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* hatten mit $IC_{50}(G)$ - Konzentrationen von $56 \mu\text{g} / \text{ml}$ bzw. $44 \mu\text{g} / \text{ml}$ eine sehr hohe antioxidative Kapazität gemessen an ihren niedrigen Leitsubstanzanteilen (2,72 % bzw. 5,37 %). Die Entfärbung des Extraktes bewirkte eine Aktivitätssteigerung, die aber nicht proportional zum Leitsubstanzgehalt verlief.

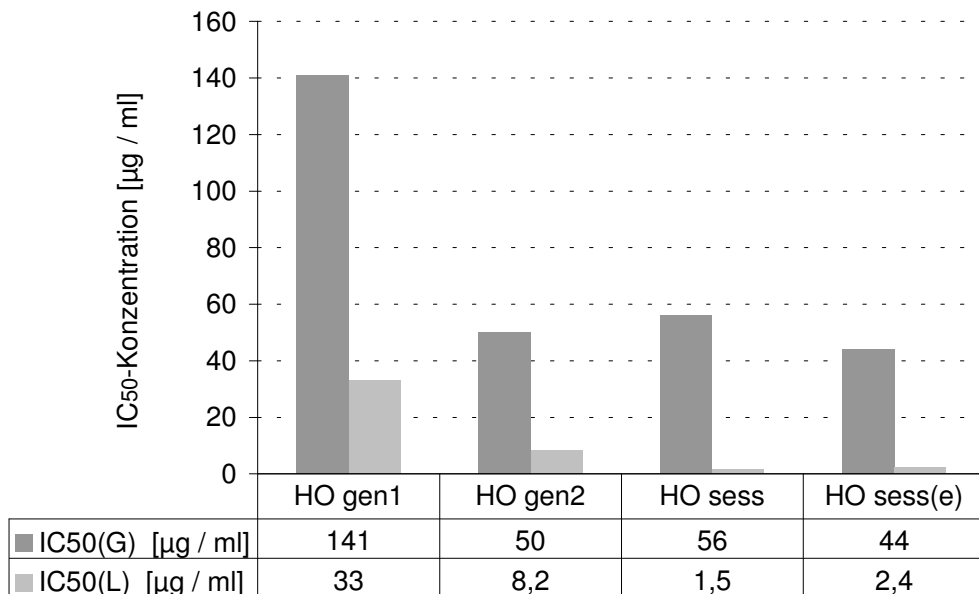


Abbildung 31: Rose - Bengal - System: $IC_{50}(G)$ - Konzentrationen der Gesamtextrakte und der prozentuale Anteil an Leitsubstanzen ($IC_{50}(L)$ - Konzentrationen); Vergleich der Extrakte von *Cyclopia spec.* (Honigbusch)

Fazit:

Ein proportionaler Zusammenhang zwischen Leitsubstanzanteil und Aktivität im Rose - Bengal - System bestand lediglich bei den Extrakte aus *Camellia sinensis*. Die wasserlöslichen Komponenten der Extrakte schienen eine große Rollen zu spielen, denn alle Mischextrakte hatten bessere $IC_{50}(G)$ - Konzentrationen als die ethanologischen Extrakte derselben Pflanze. Dadurch war RO(e) unter den Rotbusch - Extrakten der Favorit. Noch besser wirksam als die Rotbusch - Extrakte waren die durch Mischextraktion hergestellten Honigbusch - Extrakte. Der entfärbte Extrakt aus *Cyclopia sessiliflora* hatte die höchste Aktivität und folgte in der Gesamtbewertung direkt auf den Weißtee - Extrakt.

4.5 Ergebnisse im Rose - Bengal (Cu^{2+}) - System

Dosis - Wirkungsdiagramme im Rose - Bengal (Cu^{2+}) - System

Abbildung 32 zeigt die Summen der aus α - Linolensäure freigesetzten Mengen an Ethen und Ethan. Auffällig war die, im Gegensatz zum Grünen Tee, zunächst schnell abfallende Kurve des Extraktes aus Weißem Tee (WT), die aber dann bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ in einer Sättigungskurve endete. Diese Art von Sättigungskurve ließ auf eine Limitierung des Systems schließen (s.u.). Unterschiede gab es auch bei den Rotbusch - Extrakten: Der Ethanol / Wasser - Extrakt, RO(e), hemmte die Freisetzung von Ethen und Ethan am stärksten. Die Graphen der Honigbusch - Extrakte ließen, wie schon im System ohne Kupfer, keine deutlichen Unterschiede erkennen.

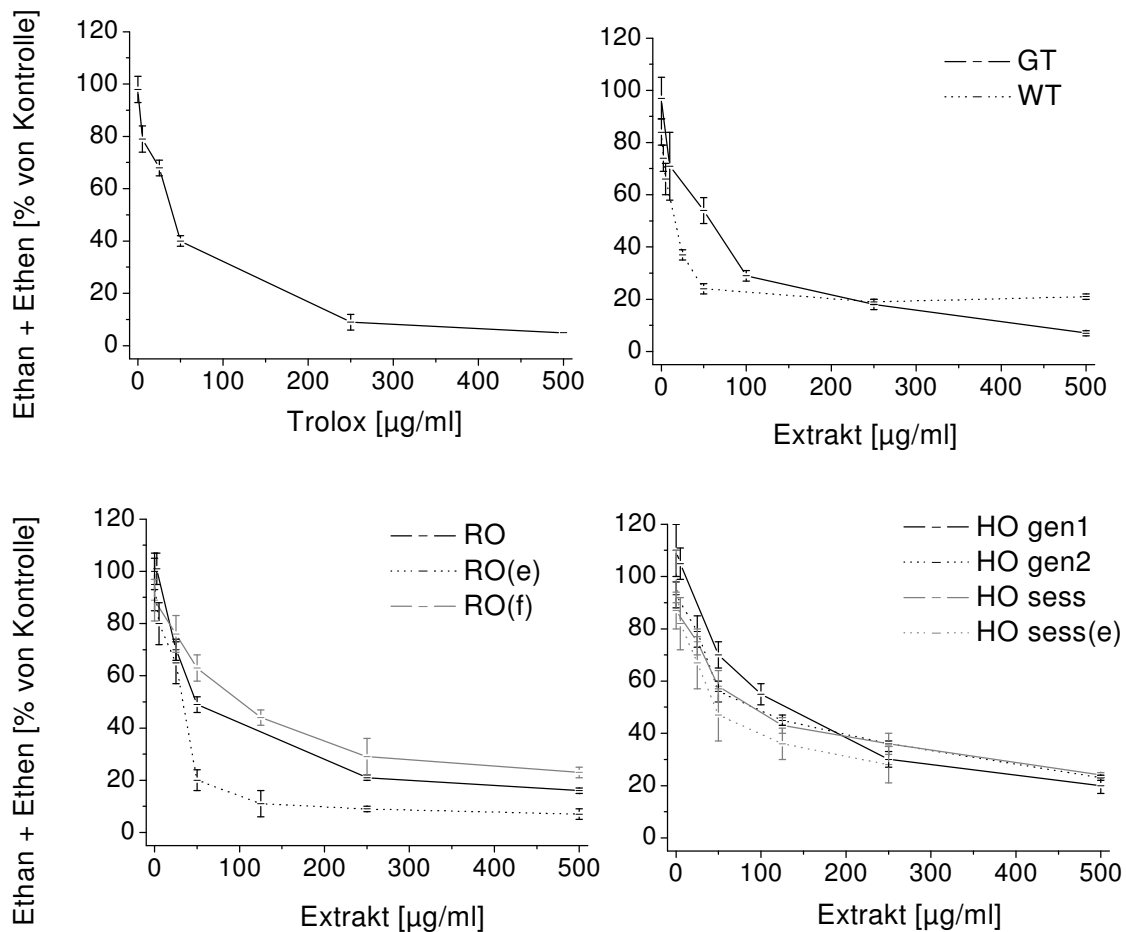


Abbildung 32: Einfluss der verschiedenen Pflanzenextrakte gelöst in Sternnyolk auf das Rose - Bengal(Cu^{2+}) - System. GT = Grüner Tee; RO = Rotbusch; HO = Honigbusch; WT = Weißer Tee; f = fermentiert; e = entfärbt; gen = *genistoides*; sess = *sessiliflora*

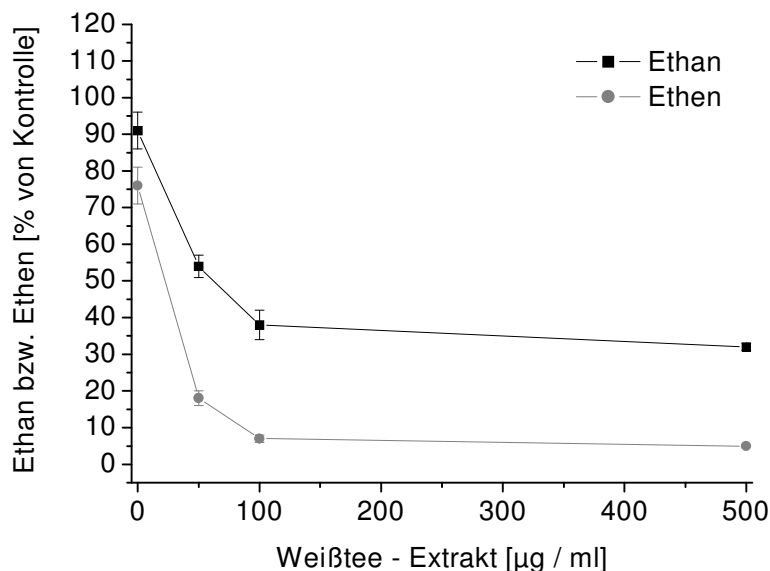


Abbildung 33: Weißtee - Extrakt im Rose - Bengal(Cu^{2+}) - System: Getrennte Darstellung von Ethan und Ethen.

Die aufgrund der Sättigungskurve des Weißtee - Extraktes vermutete Kupferkomplexierung konnte durch die getrennte Darstellung von Ethan und Ethen bestätigt werden. Abbildung 33 zeigt, dass die Freisetzung von Ethen bei einer Menge von 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ eingesetzten Weißtee - Extraktes fast Null beträgt, während die Ethanfreisetzung bei 40 % liegt. Durch die Eliminierung von Kupfer findet ab einer bestimmten Menge des Weißtee - Extraktes im Ansatz nur noch die Grundreaktion ohne Kupfer statt, deren geschwindigkeitslimitierender Faktor der Lipidperoxidzerfall ist.

IC_{50} - Konzentrationen im Rose - Bengal (Cu^{2+}) - System

Der Extrakt aus Weißem Tee (WT) hatte mit 15,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ die niedrigste $\text{IC}_{50}(\text{G})$ - Konzentration im Rose - Bengal(Cu^{2+}) - System (Abbildung 34). Die beiden entfärbten Extrakte RO(e) und HO sess(e) waren mit $\text{IC}_{50}(\text{G})$ - Konzentrationen von 33 $\mu\text{g} / \text{ml}$ und 46,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ähnlich wirkungsvoll wie Trolox ($\text{IC}_{50} = 41,5 \mu\text{g} / \text{ml}$) und deutlich effektiver als der „alte“ Rotbusch - ($\text{IC}_{50} = 50 \mu\text{g} / \text{ml}$) und der Grüntee - Extrakt ($\text{IC}_{50} = 58 \mu\text{g} / \text{ml}$). Die Extrakte aus *Cyclopia genistoides* (HO gen1 und HO gen2), *Cyclopia sessiliflora* (HO sess) und fermentiertem Rotbusch zeigten sich mit

IC₅₀(G) - Konzentrationen um 100 µg / ml als mäßige Antioxidanzien im Rose - Bengal - System mit Kupfer.

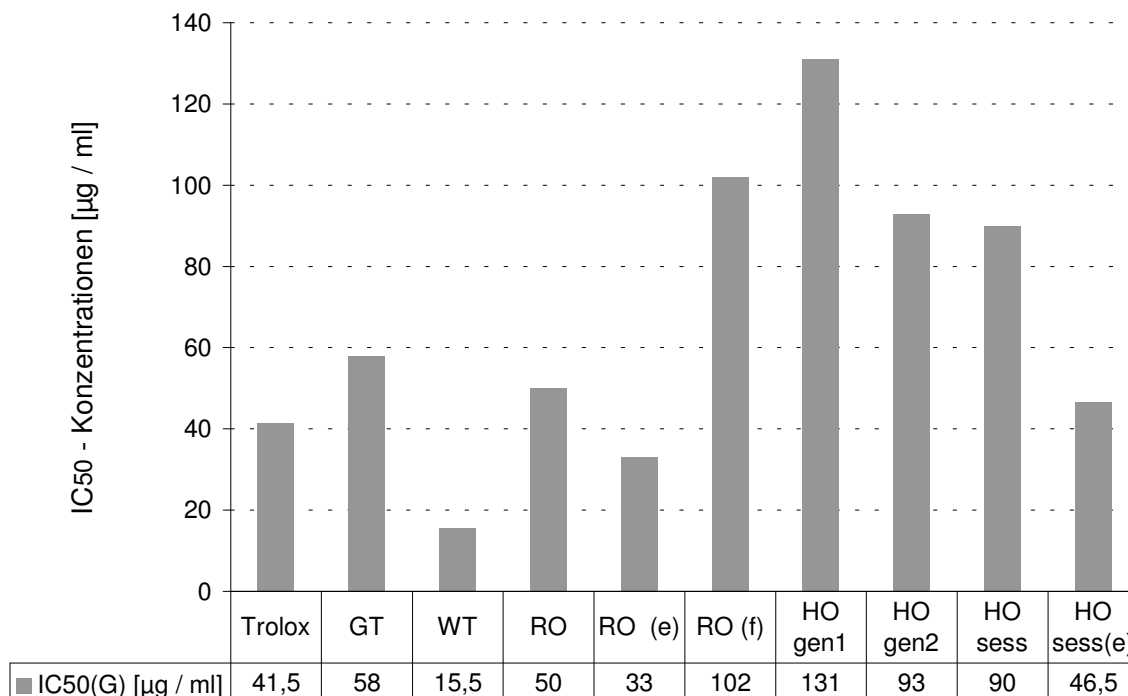


Abbildung 34: Rose - Bengal(Cu²⁺) - Testsystem: IC₅₀(G) - Konzentrationen der verschiedenen Pflanzenextrakte und Trolox; GT = Grüner Tee; RO = Rotbusch; HO = Honigbusch; WT = Weißer Tee; f = fermentiert; e = entfärbt; gen = *genistoides*; sess = *sessiliflora*.

Die Extrakte der Pflanze *Camellia sinensis* zeigten, im Gegensatz zum System ohne Kupfer, nur einen tendenziellen Zusammenhang zwischen Aktivität und Leitsubstanzgehalt (Abbildung 35). Die Wirksamkeit des Gesamtextraktes von Weißem Tee war um den Faktor 3,5 höher (IC₅₀(G) = 15,5 µg / ml) als die des Gesamtextraktes aus Grünem Tee (IC₅₀(G) = 58 µg / ml), wobei der Weißtee - Extrakt nur einen 2,5fach höheren Leitsubstanzanteil (95 %) als der Grüntee-Extrakt (38,09 %) hatte. Aufgrund dieser unterschiedlichen Leitsubstanzanteile im Extrakt unterschieden sich die errechneten IC₅₀(L) - Konzentrationen um 7 µg / ml.

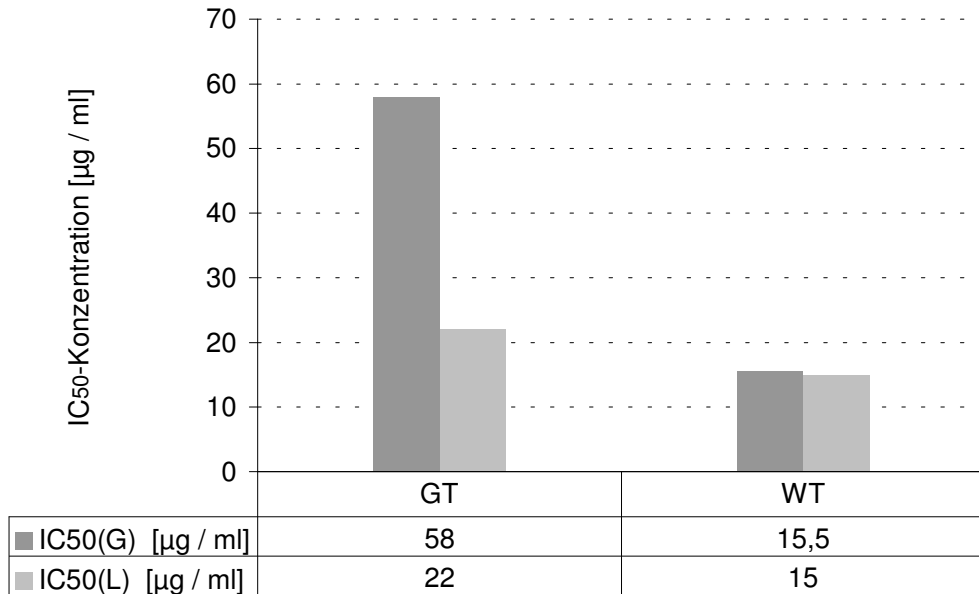


Abbildung 35: Rose - Bengal(Cu^{2+}) - Testsystem: $\text{IC}_{50}(\text{G})$ - Konzentrationen der Gesamt-extrakte und der prozentuale Anteil an Leitsubstanzen ($\text{IC}_{50}(\text{L})$ - Konzentrationen); Vergleich der Extrakte aus *Camellia sinensis*

Die $\text{IC}_{50}(\text{G})$ - und $\text{IC}_{50}(\text{L})$ - Konzentrationen der Extrakte aus der Pflanze *Aspalathus linearis* zeigten keine Korrelationen mit den Aspalathingehalten. RO, RO(e) und RO(f) hatten damit ein ähnliches Verhältnis zueinander wie im Xanthin / Xanthinoxidase - System (Abbildung 36). Der entfärbte Ethanol / Wasser - Extrakt (RO(e)) hatte mit einer $\text{IC}_{50}(\text{G})$ - Konzentration von $33 \mu\text{g} / \text{ml}$ die beste antioxidative Kapazität der Rotbusch - Extrakte im Rose - Bengal(Cu^{2+}) - System. Der ethanolische Extrakt RO war mit einem $\text{IC}_{50}(\text{G})$ - Wert von $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ immer noch doppelt so effektiv wie der Extrakt aus fermentiertem Material ($\text{IC}_{50}(\text{G}) = 102 \mu\text{g} / \text{ml}$). Gemessen an seinem niedrigen Leitsubstanzgehalt (2,15 %) hatte RO(f) dennoch sehr gute antioxidative Eigenschaften.

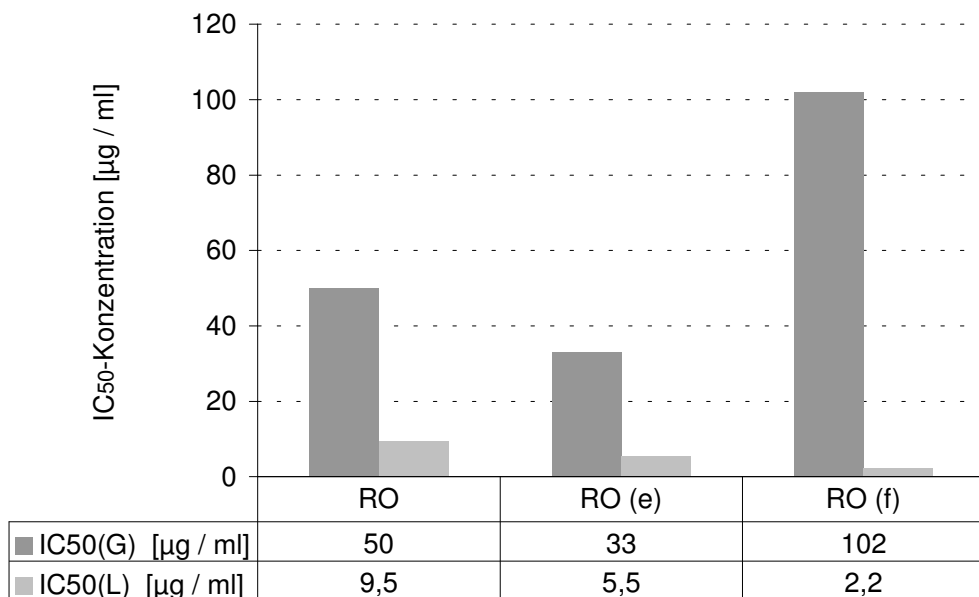


Abbildung 36: Rose - Bengal(Cu^{2+}) - Testsystem: $\text{IC}_{50}(\text{G})$ - Konzentrationen der Gesamtextrakte und der prozentuale Anteil an Leitsubstanzen ($\text{IC}_{50}(\text{L})$ - Konzentrationen); Vergleich der Extrakte aus *Aspalathus linearis*

Die Extrakte der Pflanze *Cyclopia genistoides* (HO gen1 und HO gen2) zeigten keinen Zusammenhang zwischen Aktivität und Anteil an Leitsubstanzen im Rose - Bengal - System mit Kupfer (Abbildung 37). Obwohl HO gen1 verhältnismäßig mehr Leitsubstanzen besaß (23,3 %), hatte er eine geringere antioxidative Aktivität ($\text{IC}_{50}(\text{G}) = 131 \mu\text{g} / \text{ml}$) als der Gesamtextrakt von HO gen2 mit nur 16,55 % Leitsubstanzanteil ($\text{IC}_{50}(\text{G}) = 93 \mu\text{g} / \text{ml}$). Also hatte auch hier die Mischextraktion eine Steigerung der antioxidativen Kapazität zur Folge. Die errechnete $\text{IC}_{50}(\text{L})$ - Konzentration von HO gen2 lag deutlich niedriger ($15,3 \mu\text{g} / \text{ml}$) als die von HO gen1 ($30,5 \mu\text{g} / \text{ml}$).

Im Vergleich von HO sess und HO sess(e) war ein Zusammenhang zwischen Leitsubstanzanteil und Aktivität erkennbar. Trotz ihrer viel geringeren Leitsubstanzanteile (2,16 % und 5,37 %) waren die Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* effektiver als die Extrakte aus *Cyclopia genistoides*.

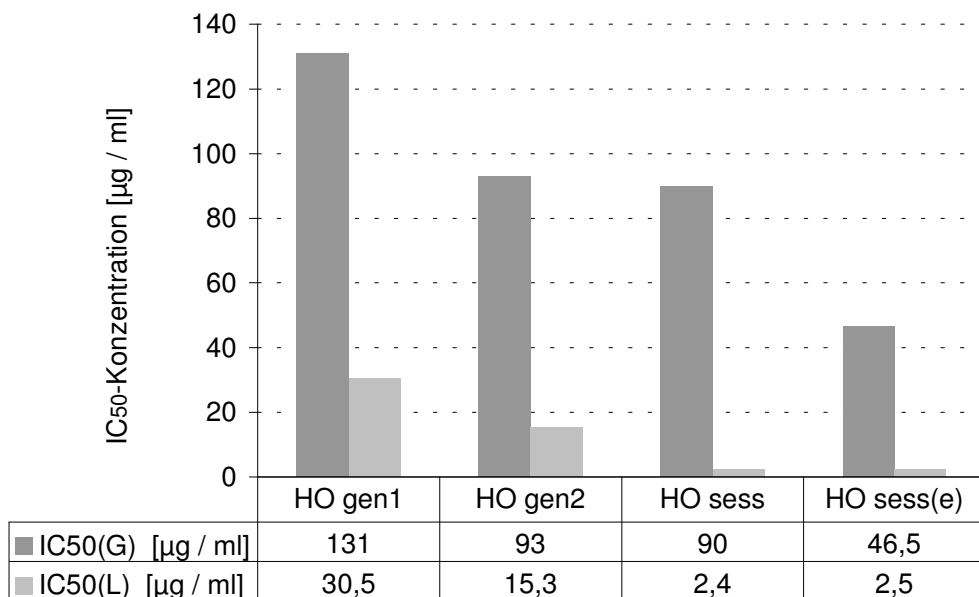


Abbildung 37: Rose - Bengal(Cu^{2+}) - Testsystem: $\text{IC}_{50}(\text{G})$ - Konzentrationen der Gesamt-extrakte und der prozentuale Anteil an Leitsubstanzen ($\text{IC}_{50}(\text{L})$ - Konzentrationen); Vergleich der Extrakte von *Cyclopia spec.*

Fazit:

Bester Extrakt im Rose - Bengal(Cu^{2+}) - System war der Weißtee - Extrakt, für den auch eine Kupferkomplexierung festgestellt wurde. Wie auch im System ohne Kupfer hatten die Wasser / Ethanol - Extrakte bessere antioxidative Eigenschaften als die ethanolischen Auszüge derselben Pflanze. Die entfärbten Extrakte aus unfermentiertem *Aspalathus linearis* und *Cyclopia sessiliflora* hatten ausgezeichnete antioxidative Eigenschaften in ihrer Gruppe und im Vergleich aller Extrakte. Eine Korrelation zwischen Leitsubstanzgehalt und Hemmung des Systems zeigten nur die Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora*.

4.6 Gehalt an löslichen Polyphenolen

Die Ergebnisse der biochemischen Testsysteme zeigen, dass die Leitsubstanzgehalte nicht automatisch mit der Aktivität der Extrakte in den Systemen korreliert werden können. Sind die Leitsubstanzen der Extrakte aber die einzigen analytisch nachgewiesenen Substanzen, so wie es bei den vorliegenden Extrakten der Fall ist, macht es Sinn, einen relativ unspezifischen Polyphenolnachweis wie den Folin - Ciocault - Test hinzuzuziehen, um eine bessere Einschätzung der Ergebnisse hinsichtlich der wirksamen Substanzen zu ermöglichen. Mit dem Folin -

Cioceault - Test lassen sich allerdings nicht die prozentualen Polyphenolanteile im Extrakt bestimmen. Im Prinzip werden nur reaktive bzw. reduzierende Gruppen in Äquivalenten (Abbildung 38) dargestellt. Mit nahezu 600 μM Catechinäquivalenten (CE) hatte der Weißtee - Extrakt (WT) den höchsten Anteil an reduzierenden Gruppen. Der Grüntee - Extrakt (GT) hatte einen nur noch halb so großen Anteil an Catechinäquivalenten (264,1 μM). Die beiden Rotbusch - Extrakte zeigten ähnliche (RO(e) = 259,1 μM) bis höhere (RO = 311,7 μM) Aktivität verglichen mit dem Grüntee - Extrakt. Die Catechinäquivalente der Extrakte aus fermentiertem Rotbusch (RO(f)) und der verschiedenen Honigbuscharten lagen im Bereich zwischen 120 μM und 190 μM .

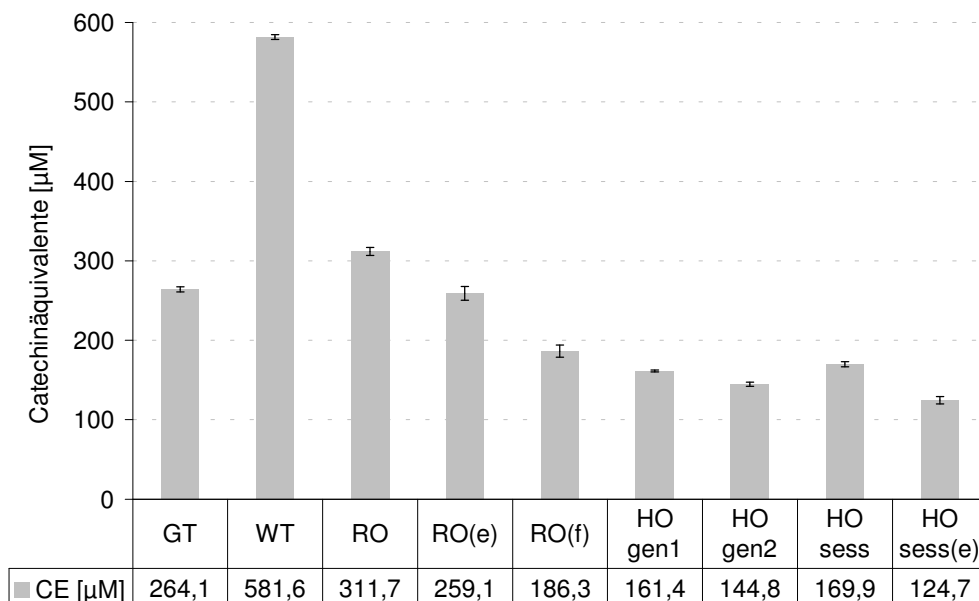


Abbildung 38: Catechinäquivalente (CE) der Pflanzenextrakte mit Sternylolk als Emulgator: Eingesetzte Extraktmenge aus einer Stammlösung von 200 μg / ml; GT = Grüner Tee; RO = Rotbusch; HO = Honigbusch; WT = Weißer Tee; f = fermentiert; e = entfärbt; gen = *genistoides*; sess = *sessiliflora*

4.7 Bewertung der Ergebnisse aus PHASE II

In Phase II wurde die Evaluierung bzw. Optimierung der in Phase I sondierten Extrakte vorgenommen. Das heißt, es wurden mehrere Extrakte aus den Pflanzen hergestellt, deren Ergebnisse in Phase I interessant waren. Verschiedene Pflanzenextrakte wurden zum einen durch die Variation der Extraktionsmethode (statt 100 % Ethanol jetzt Ethanol / Wasser - Extraktion 80 % : 20 %) und zum anderen durch die Verwendung verschiedener Arten oder Teile einer Pflanze gewonnen. Dadurch ergaben sich Extrakte gleicher pflanzlicher Herkunft mit unterschiedlichen Inhaltsstoffmengen und unterschiedlichem Lösungsverhalten. Als Lösungsvermittler für die Trockenextrakte diente der in PHASE I etablierte Lecithinemulgator Sternnyolk. Wieder stellten die antioxidativen Eigenschaften der Extrakte in ausgewählten biochemischen Testsystemen die Basis für den wertenden Vergleich. Das α - Tocopherolanalogen Trolox diente dabei als Vergleichssubstanz. Bei den Testsystemen handelte es sich um das hydrophile ABTS - und X / XOD - System und um das lipophile Rose - Bengal - System und seine Variante mit Kupferzusatz.

Vergleich der Extraktionsmittel

Ein Extraktionsmittelvergleich ist anhand der Extrakte von *Cyclopia genistoides* und, aufgrund der Entfärbung unter Vorbehalt, anhand der Extrakte aus unfermentiertem *Aspalathus linearis* möglich. Wichtig für den Vergleich ist zunächst die Betrachtung der Leitsubstanzgehalte, die durch die Ethanol / Wasser - Extraktion leicht erniedrigt waren. Auch der Gehalt an löslichen Polyphenolen war bei den Ethanol / Wasser - Extrakten geringer. Im ABTS - System unterschieden sich die Extrakte nur geringfügig zugunsten der Ethanolextrakte. Für dieses System scheint die Polarität des Extraktionsmittels nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, denn die Unterschiede im antioxidativen Verhalten korrelierten mit den Unterschieden in den Leitsubstanzgehalten. Andere Verhältnisse bot das Xanthin / Xanthinoxidase - System. Trotz niedrigerer Leitsubstanzgehalte waren die Mischextrakte doppelt bis dreimal so gut verglichen mit den reinen Ethanolextrakten. Auch im lipophilen Rose - Bengal - System ohne und mit Zusatz von Kupfer waren die Mischextrakte deutlich wirkungsvoller. Im Falle der vorliegenden Extrakte ist also eine Mischextraktion aus Ethanol und Wasser sinnvoll. Es werden zwar weder die Anteile an Leitsubstanzen

noch die Catechinäquivalente erhöht, dennoch ergibt sich eine deutliche Verbesserung der antioxidativen Kapazität. Anzunehmen ist, dass durch die Mischung von Ethanol (80 %) und Wasser (20 %) wirksame Substanzen mitextrahiert werden, die bei den ethanolischen Auszügen nicht zu finden sind.

Der Einfluss der Entfärbung auf die Extrakte

Sinn der Entfärbung war, die Extrakte vor allem für die Kosmetikindustrie zu konditionieren, da die grünliche Eigenfarbe eines Pflanzenextraktes für Produkte wie Hautcremes ungünstig ist. Die Auswirkungen der Entfärbung auf die antioxidativen Eigenschaften kann in vorliegender Untersuchung anhand der Extrakte aus unfermentiertem Rotbuschmaterial und anhand des Materials aus *Cyclopia sessiliflora* betrachtet werden. Zwischen den gefärbten und den entfärbten Extrakten gab es in den hydrophilen Systemen keine Unterschiede bezüglich ihrer antioxidativen Leistung. Im Gegensatz dazu bewirkte ein Entfärben der Extrakte in den lipophilen Systemen eine Aktivitätssteigerung.

Vergleich der Polyphenolgehalte mit den Leitsubstanzkonzentrationen

Auch wenn der Folin - Ciocalteu - Test keine zuverlässige Bestimmung eines Gesamtpolyphenolgehaltes darstellt, sondern vielmehr die Menge an reduzierenden Substraten bestimmt, so gibt er doch Aufschluss über zusätzlich vorhandene antioxidative Komponenten (Vernon et al. 1998). Da die Kalibrierung (Daten nicht gezeigt) mit Catechin erfolgte, konnte der Weißtee - Extrakt mit einem Gehalt von 95 % Catechinen bzw. Catechinderivaten, als Berechnungsgrundlage verwendet werden. Die mittels des Folin - Ciocalteu - Reagenz bestimmten Catechinäquivalente (CE) des Weißtee - Extraktes (581,6 μM) wurden gleich 95 % gesetzt. Die darüber für die anderen Extrakte berechneten prozentualen Anteile an Catechinäquivalenten konnten dann mit den prozentualen Anteilen an Leitsubstanzen graphisch verglichen werden (Abbildung 39).

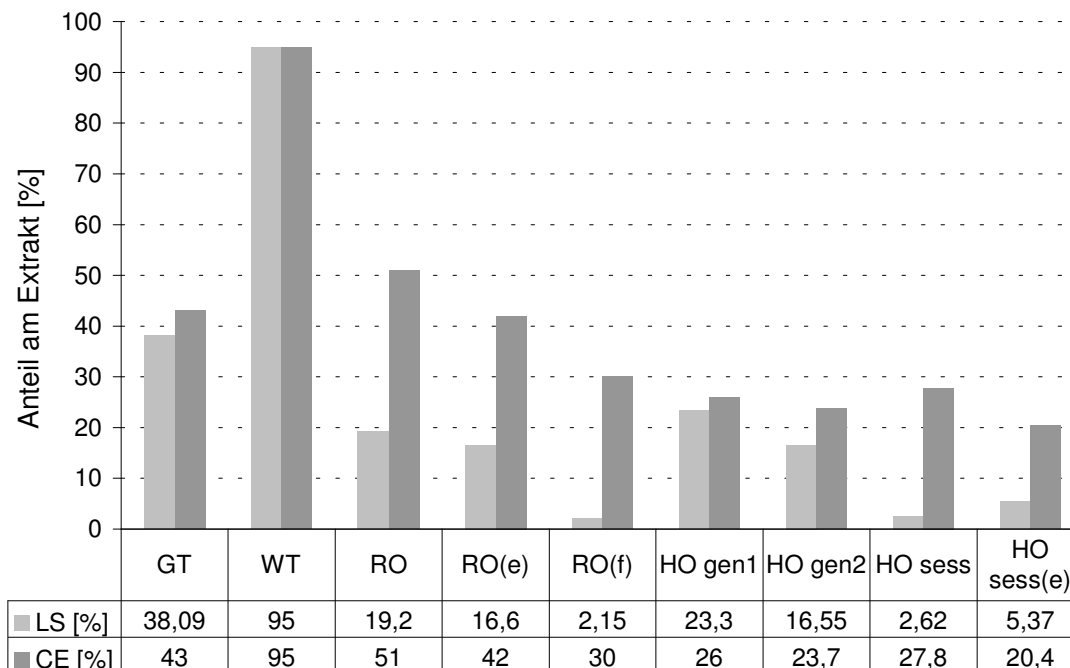


Abbildung 39: Vergleich der Leitsubstanzgehalte (LS) mit den Polyphenolgehalten dargestellt in Catechinäquivalenten (CE) aus dem Folin - Ciocalteu - Test. Berechnungsgrundlage war der Leitsubstanzgehalt des Weißtee - Extraktes (WT). GT = Grüner Tee; RO = Rotbusch; HO = Honigbusch; WT = Weißer Tee; f = fermentiert; e = entfärbt; gen = genistoides; sess = sessiliflora

Das Verhältnis der Polyphenol- und der Leitsubstanzgehalte (Abbildung 39) stimmt in soweit mit den in den Testsystemen erzielten Ergebnissen überein, dass die Extrakte mit den hohen Catechinäquivalentanteilen, also der Weißtee - Extrakt, der Grüntee - Extrakt und die Extrakte aus unfermentiertem Rotbusch auch die besten Ergebnisse in den Testsystemen erzielten. Die Catechinäquivalente (%) der Extrakte aus *Camellia sinensis* und *Cyclopia genistoides* stimmen in etwa mit den angegebenen Leitsubstanzanteilen (%) überein. Anders verhält es sich bei den Extrakten aus *Aspalathus linearis* und *Cyclopia sessiliflora*, deren Anteile an Catechinäquivalenten erheblich von den Leitsubstanzangaben abweichen. Wie bereits vermutet, lassen sich die guten antioxidativen Eigenschaften der Rotbusch - Extrakte und auch der Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* nicht allein auf deren Gehalten an Leitsubstanzen zurückführen. Der Grüntee - Extrakt und die Extrakte aus *Cyclopia genistoides* scheinen dagegen keine weiteren aktiven Inhaltsstoffe außer der angegebenen Leitsubstanzen, zu enthalten.

Profile der Pflanzenextrakte

Tabelle 12 zeigt eine Übersicht und den Vergleich der in PHASE II untersuchten Extrakte anhand der verwendeten Testsysteme. Wie schon in PHASE I erleichtert ein einfaches, mit Hilfe der IC₅₀ - Konzentrationen gefertigtes Punktesystem die Profilerstellung der einzelnen Extrakte. Wie in PHASE I wurde geringe Aktivität mit einem, gute mit zwei und sehr gute mit drei Punkten bewertet. Zusätzlich und im Gegensatz zu PHASE I gab es die Bewertung „ausgezeichnet“ mit vier Punkten.

Tabelle 12: Vergleich der antioxidativen Eigenschaften der verschiedenen Extrakte in den unterschiedlichen Testsystemen; Schutz vor Oxidation: --- keine Aktivität; * gering; ** gut; *** sehr gut; **** ausgezeichnet

	ABTS	Xanthin / XOD	Rose - Bengal	Rose - Bengal (+Cu ²⁺)	Gesamt
Trolox	**	*	****	***	10
Weißer Tee (WT)	****	****	****	****	16
Grüntee (GT)	***	****	**	***	12
Rotbusch unfermentiert (RO)	***	***	*	***	10
Rotbusch unfermentiert, entfärbt (RO(e))	***	***	***	****	13
Rotbusch fermentiert (RO(f))	*	**	**	**	7
Honigbusch (HO gen1)	**	*	*	*	5
Honigbusch (HO gen2)	*	**	***	**	8
Honigbusch (HO sess)	*	**	***	**	8
Honigbusch entfärbt (HO sess(e))	*	**	***	***	9

Als Kontrollsubstanz erreichte das wasserlösliche α - Tocopherolanalogon Trolox eine Bewertung von insgesamt zehn Punkten.

Weit höhere Punktzahlen konnten durch die Extrakte aus *Camellia sinensis* (Weißtee - Extrakt = 16 Punkte; Grüntee - Extrakt = 12 Punkte) erzielt werden. Egal, ob in hydrophiler oder in lipophiler Matrix, der Weißtee - Extrakt war in allen Testsystemen der überragende Extrakt in den Untersuchungen. Dieser Extrakt könnte aufgrund seines extrem hohen Polyphenolgehaltes als weitere Vergleichssubstanz betrachtet werden. Der Grüntee - Extrakt hatte vor allem in den hydrophilen Testsystemen wesentlich bessere antioxidative Eigenschaften als Trolox. In den lipophilen Systemen war dagegen Trolox etwas besser.

Vergleichbar mit dem Grüntee - Extrakt und im Gegensatz zu Trolox lagen die Stärken der unfermentierten Rotbusch - Extrakte vor allem in den hydrophilen Testsystemen. Im besonderen der entfärbte Extrakt RO(e) (13 Punkte), aber auch der ethanolische Extrakt (RO, 10 Punkte) waren im Rose - Bengal - System mit Kupfer deutlich wirkungsvoller verglichen mit der kupferlosen Variante. Der fermentierte Rotbusch - Extrakt (RO(f), 7 Punkte) hatte ein deutlich vermindertes antioxidatives Potenzial gegenüber den unfermentierten Extrakten und Trolox.

Die Honigbusch - Extrakte hatten in lipophiler Matrix deutlich größere Einflüsse auf die generierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) als in hydrophiler Matrix. Ihr Verhalten ähnelte damit am ehesten dem von Trolox. Die Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* (8 und 9 Punkte) hatten, trotz wesentlich geringeren Anteilen an Leitsubstanzen, ähnliche bis bessere antioxidative Eigenschaften verglichen mit den Extrakten aus *Cyclopia genistoides* (5 und 8 Punkte).

Im Gesamtbild ist der unfermentierte, entfärbte Extrakt aus *Aspalathus linearis* (RO(e)) nach dem Weißtee - Extrakt aus *Camellia sinensis* der antioxidativ wirksamste, innovativste und aufgrund seines wenig bekannten Wirkstoffes Aspalathin auch der interessanteste der untersuchten Pflanzenextrakte. Dies führte zu der Entscheidung, ihn für die Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit einzusetzen.

5 Ergebnisse (Phase III)

5.1 Ziel und Vorgehensweise

Eine gesunde, abwechslungsreiche Ernährung vermindert das Risiko, an sogenannten Volkskrankheiten wie Herzinfarkt, Krebs, Arteriosklerose und Arthritis zu erkranken. Diese allgemein bekannte Tatsache sucht ihre wissenschaftliche Bestätigung in mehreren Tier- und Humanstudien (Anderson et al. 1997; van den Berg et al. 2001; Samman et al. 2003). Vor allem Pflanzeninhaltsstoffe aus der Gruppe der Flavonoide werden für den Schutz vor oben genannten Krankheiten verantwortlich gemacht. Dabei ist über ihren Metabolismus verhältnismäßig wenig bekannt. Um die Bioverfügbarkeit von bestimmten Substanzen nachweisen zu können, ist aber die Kenntnis von Ort, Zeit und Art der eventuell entstandenen Metaboliten nötig. Für wenig erforschte Substanzen, wie z.B. das Aspalathin (Leitsubstanz des Rotbusch - Extraktes) würde solch ein analytischer Nachweis der Metaboliten einen enormen Zeit- und Kostenaufwand bedeuten.

Die in PHASE II gezeigte sehr gute antioxidative Kapazität des unfermentierten, entfärbten Rotbusch - Extraktes (RO(e)) führte zu großem Interesse an der Bioverfügbarkeit dieses Pflanzenextraktes. Die Idee war, mit Hilfe der bereits etablierten und in PHASE I und PHASE II verwendeten biochemischen Testsysteme, den Weg des analytischen Nachweises zu umgehen und die Bioverfügbarkeit indirekt über die Auswirkung der Einnahme von Rotbusch - Extrakt auf die antioxidativen Eigenschaften von Blutplasma zu untersuchen.

Die Studie zur Bioverfügbarkeit von Rotbusch - Extrakt wurde als Pilotstudie konzipiert. Die freiwilligen Teilnehmer wurden ausführlich über den Ablauf der Studie aufgeklärt und hatten jederzeit die Möglichkeit, die verantwortlichen Wissenschaftler zu kontaktieren und die Studie selbstbestimmt abzubrechen. Bei den Probanden handelte es sich um gesunde Personen im Alter zwischen 20 und 40 Jahren. Sie unterteilten sich in zwei Gruppen, eine Rauchergruppe und eine Nichtrauchergruppe, die jeweils zur Hälfte aus Männern und Frauen bestanden. Durch den Vergleich von Rauchern und Nichtrauchern sollte ein möglicher Effekt der Rotbuscheinahme verdeutlicht werden, da man nach Hippeli et al. 2003 davon ausgehen muss, dass der antioxidative Status von Raucherplasma im allgemeinen niedriger ist als der von Nichtraucherplasma. Der BMI (Body Mass Index = m^2 / kg) der Probanden lag zwischen 18 und 30. Die während der Laufzeit angefertigten Ernährungsprotokolle

dienten vor allem dazu, eventuell auftretende Besonderheiten erklären zu können. Zur leichteren Einnahme wurde der unfermentierte, entfärbte Rotbusch - Extrakt (RO(e)) in Tablettenform gepresst. Der Pressling enthielt 250 mg des Extraktes mit einem Aspalathingehalt von 15 %. Um die Aufnahme von Aspalathin im Dünndarm zu gewährleisten, war der Pressling mit einer magensaftresistenten Schicht umgeben. Die Studie war über einen Zeitraum von insgesamt drei Wochen angelegt. Die erste Woche diente der „Einstellung“ und „Reinigung“ des Plasmas der Probanden. In dieser „Vorlaufzeit“ wurde von den Teilnehmern der Studie ein individueller „Diätplan“ erstellt, der während der Supplementierungsphase eingehalten wurde, um so einen annähernd gleichbleibenden Anteil an Antioxidanzien in der Nahrung für die Dauer der Studie zu gewährleisten. Generell stand nicht übermäßig viel rotes bzw. buntes Obst und Gemüse auf dem Speiseplan. Auf die Einnahme von Vitaminpräparaten, auf Rotbuschtee und Grünen Tee sowie auf Rotwein wurde vollständig verzichtet. Ein Schema des Studiendesigns zeigt Abbildung 40.

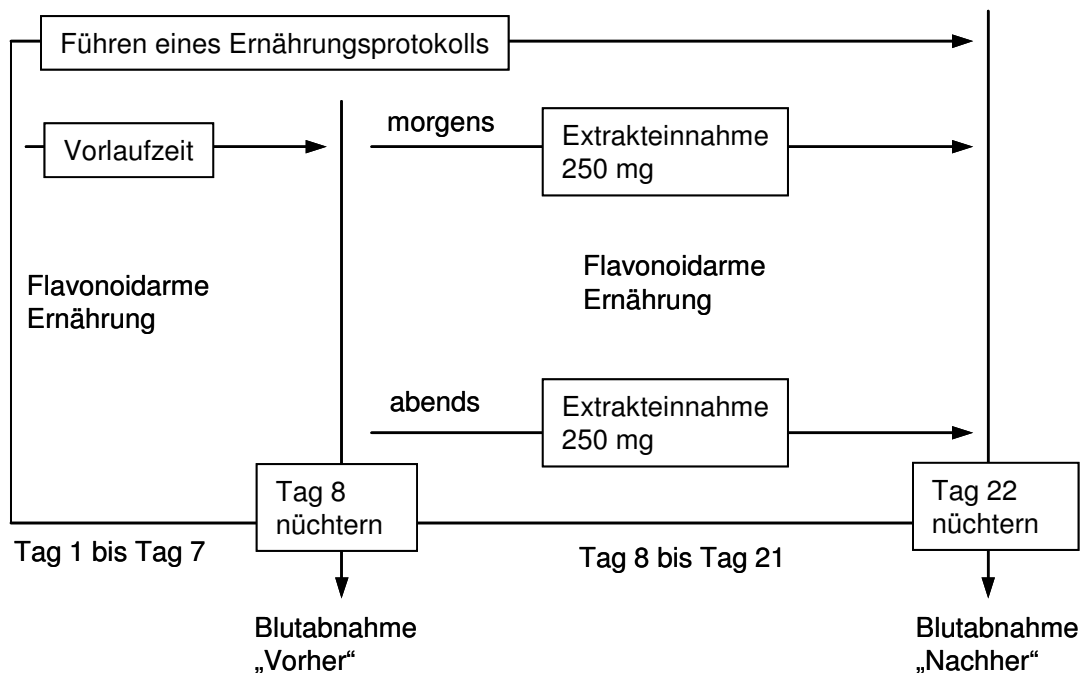


Abbildung 40: Konzeption der Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit von Rotbusch - Extrakt

Im Anschluss an die einwöchige „Vorlaufzeit“ erfolgte die erste Blutabnahme (nüchtern an Tag 8 = „Vorher“). Für die Plasmagewinnung wurden 60 ml Vollblut von jedem Probanden benötigt. Zusätzlich wurden über ein externes Labor verschiedene

Blutparameter wie großes Blutbild, Harnsäurespiegel und die Blutfettwerte bestimmt. Im Anschluss an die Blutabnahme („Vorher“) wurde mit der zweiwöchigen Supplementierung begonnen. Die Presslinge (250 mg RO(e)) wurden zweimal täglich eingenommen. Die zweite Blutabnahme (nüchtern an Tag 22 = „Nachher“) erfolgte am Tag nach der Einnahme des letzten Presslings. Für die Plasmagewinnung wurden diesmal 80 ml Vollblut abgenommen, um zusätzlich eine Analytik des Plasmas zu ermöglichen. Wieder wurden durch ein externes Labor verschiedene Blutparameter (großes Blutbild, Blutfettwerte und Harnsäuregehalte) bestimmt.

5.2 Blutparameter aus Vollblut

Als Beispiel für die durch ein medizinisches Labor gemessenen Blutwerte werden in der nachfolgenden Tabelle 13 die Messwerte eines Probanden vor und nach 14tägiger Einnahme von Rotbusch - Extrakt gezeigt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Blutwerte eines Probanden innerhalb der Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit von Rotbusch - Extrakt

	Blutparameter	Einheit	Normalwert	Vorher	Nacher
Blutbild (groß)	Erythrozyten	/ pl	4,1 - 5,9	4,17	4,24
	Hämoglobin	g / dl	14 - 18	13,2	13,4
	HABE (MHC)	pg	27 - 32	31,7	31,6
	MCV	fl	82 - 101	95,9	94,6
	Hämatokrit	%	36 - 52	40	40,1
	MCHC	g / dl	32 - 36	33	33,4
	Thrombozyten	Tsnd / µl	140 - 400	277	264
	Leukozyten	/nl	4,0 - 10,0	8,3	10,1
	• Segmentkernige	%	40 - 80	65	75
	• Lymphozyten	%	20 - 52	22	15
	• Monozyten	%	2 - 12	9	7
	• Basophile	%	bis 1	0	0
	• Eosinophile	%	bis 5	4	3

	Blutparameter	Einheit	Normalwert	Vorher	Nacher
Harnsäurespiegel	Harnsäure	mg / dl	3,5 - 7,0	4,22	4,19
Blutfettwerte	Cholesterin	mg / dl	120 - 200	203	213
	Triglyceride	mg / dl	74 - 172	90	95
	HDL - Cholesterin	mg / dl	> 55	58	63
	LDL - Cholesterin	g / dl	< 135	118	112
	LDL / HDL		< 3,5	2	1,8

Eine signifikante Beeinflussung der Parameter des großes Blutbildes war bei keinem der Probanden gegeben (Daten nicht gezeigt).

Die Harnsäure gilt als potentes endogenes Antioxidans. Daher war für die Fragestellung, ob sich das antioxidative Potenzial des Probandenplasmas nach Rotbusch - Einnahme ändert, die genauere Betrachtung der Harnsäuregehalte wichtig (Abbildung 41 und Abbildung 42).

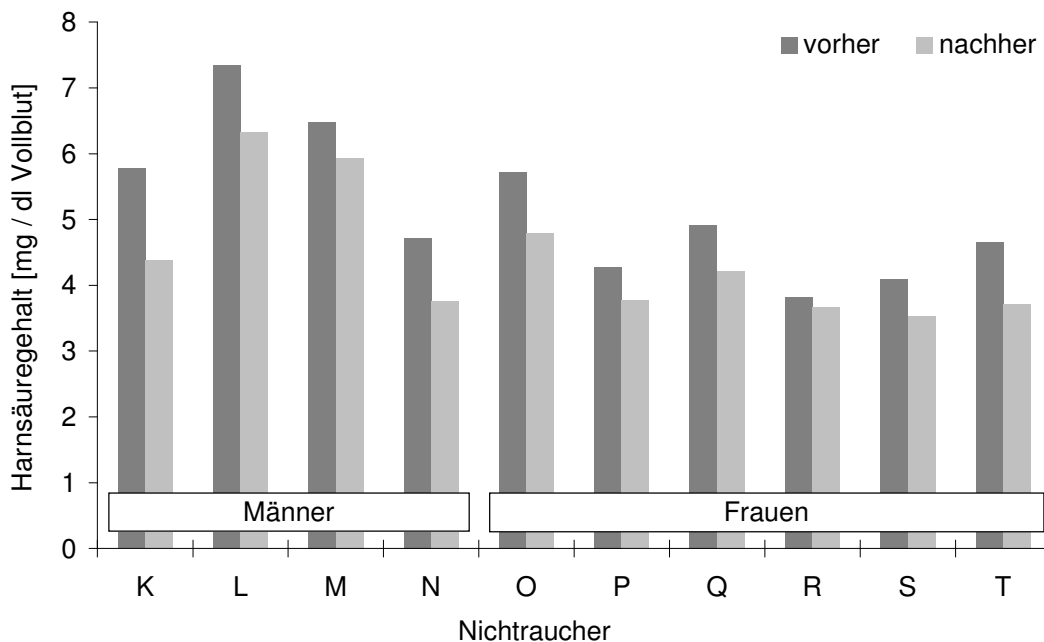


Abbildung 41: Harnsäuregehalte der Nichtraucher vor und nach 14tägiger Einnahme von Rotbusch - Extrakt

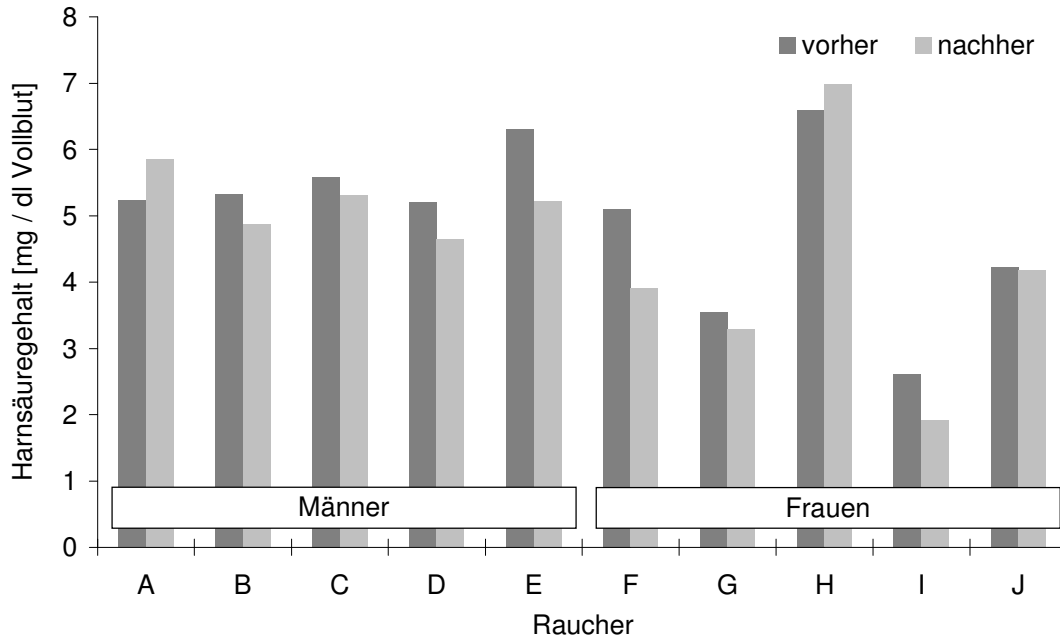


Abbildung 42: Harnsäuregehalte der Raucher vor und nach 14tägiger Einnahme von Rotbusch - Extrakt

Der Gehalt an Harnsäure im Vollblut war, unabhängig vom Geschlecht, bei allen Probanden der Nichtrauchergruppe und sieben Probanden der Rauchergruppe nach Supplementierung mit Rotbusch - Extrakt deutlich niedriger als „vorher“.

Der Einsatz des Probandenplasmas in der kupferinduzierten LDL - Oxidation machte auch die detaillierte Darstellung der Blutfettwerte sinnvoll. Tabelle 14 und Tabelle 15 zeigen den LDL / HDL - Quotienten mit gegenläufigen Effekten bei Nichtrauchern und Rauchern. Bei sieben Probanden der Nichtrauchergruppe war der Quotient nach Beendigung der Studie erniedrigt, zweimal blieb er gleich und einmal erhöhte er sich leicht. Innerhalb der nichtrauchenden Frauen gingen die HDL - Werte hoch, was die Erniedrigung des LDL / HDL - Quotienten verursachte. Innerhalb der nichtrauchenden Männer folgten die Unterschiede die zur Erniedrigung des Quotienten führten keiner Regelmäßigkeit. Bei der Gruppe der Raucher war der Quotient dagegen nachher siebenmal größer und zweimal kleiner und einmal blieb er gleich. Dabei blieb der HDL - Wert konstant, während sich der LDL - Wert erhöhte.

Tabelle 14: LDL und HDL Gehalte der Nichtraucher vor und nach 14tägiger Einnahme von Rotbusch - Extrakt

Proband	vorher			nachher		
	LDL [mg / dl]	HDL [mg / dl]	LDL / HDL	LDL [mg / dl]	HDL [mg / dl]	LDL / HDL
K	107	57	1,9	101	56	1,8
L	119	59	2	104	55	1,9
M	137	70	2	142	82	1,7
N	97	57	1,7	106	64	1,7
O	124	66	1,9	100	65	1,5
P	87	61	1,4	106	69	1,5
Q	118	68	1,7	112	77	1,5
R	106	71	1,5	123	85	1,4
S	103	61	1,7	95	60	1,6
T	70	107	0,7	87	124	0,7

Tabelle 15: LDL und HDL Gehalte der Raucher vor und nach 14tägiger Einnahme von Rotbusch - Extrakt

Raucher	LDL	HDL	LDL / HDL	LDL	HDL	LDL / HDL
	[mg / dl]	[mg / dl]		[mg / dl]	[mg / dl]	
A	98	65	1,5	137	74	1,9
B	161	67	2,4	116	49	2,4
C	78	78	1	92	77	1,2
D	81	55	1,5	84	54	1,6
E	131	43	3	139	43	3,2
F	137	52	2,6	159	56	2,8
G	68	86	0,8	80	91	0,9
H	123	46	2,7	111	57	1,9
I	111	72	1,5	130	75	1,7
J	118	58	2	112	63	1,8

5.3 Kupferinduzierte LDL - Oxidation

In diesem Testsystem konnte kein signifikanter LDL - Oxidationsschutz nach 14tägiger Supplementierung mit Rotbusch - Extrakt festgestellt werden. Abbildung 43 zeigt beispielhaft den Verlauf der kupferinduzierten LDL - Oxidation mit aus Probandenplasma isoliertem LDL ohne nennenswerte Verschiebung der Lagphase. Aufgrund der großen Schwankungen in dieser *in vivo* - Untersuchung, kann von einer Verschiebung der Lagzeiten erst ab einer Differenz von 30 min ausgegangen werden. Im Gegensatz zu den guten Ergebnissen, die der Rotbusch - Extrakt im *in vitro* System in PHASE I erzielte, konnte nach der Supplementierung von Probanden mit diesem Extrakt kein zusätzlicher Oxidationsschutz gemessen werden.

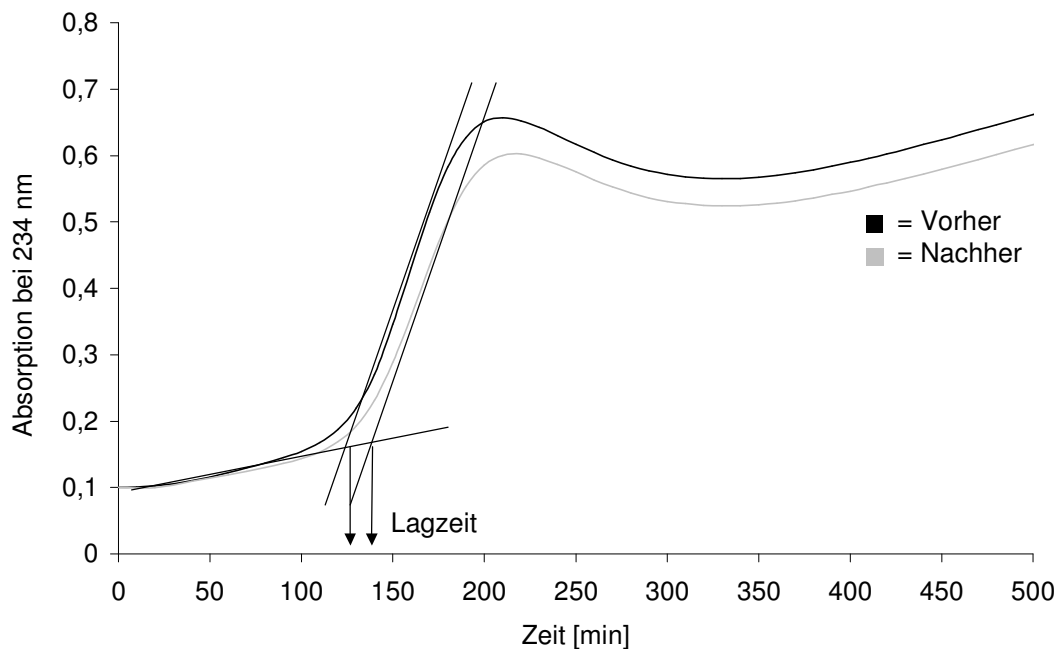


Abbildung 43: Bioverfügbarkeitsstudie; Cu - induzierte LDL - Oxidation: Lagphasenverschiebung durch Probandenplasma (exemplarisch) vor und nach Einnahme von Rotbusch - Extrakt RO(e)

5.4 Plasma im ABTS - System

Im ABTS - System sinkt die ABTS - Radikalkonzentration mit steigender antioxidativen Kapazität der untersuchten Substanz. Der Einsatz von Humanplasma im ABTS - System erforderte eine Verdünnung des Plasmas (1 : 10) mit Phosphatpuffer pH 7,4. Von dieser verdünnten Probe wurden 10 µl eingesetzt. Anhand der in Abbildung 44 und Abbildung 45 dargestellten Ergebnisse ist die generelle antioxidative Kapazität von Blutplasma deutlich zu erkennen („Vorher“ - Werte). Bereits geringste Plasmamengen, wie sie hier eingesetzt wurden, hemmten die ABTS - Bildungsrate bereits zu über 50 %. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen waren sehr gering. Signifikante Unterschiede im antioxidativen Status des Plasmas vor und nach der Einnahme von Rotbusch - Extrakt konnten im ABTS - System weder bei Nichtrauchern noch bei Rauchern festgestellt werden (Abbildung 44 und Abbildung 45).

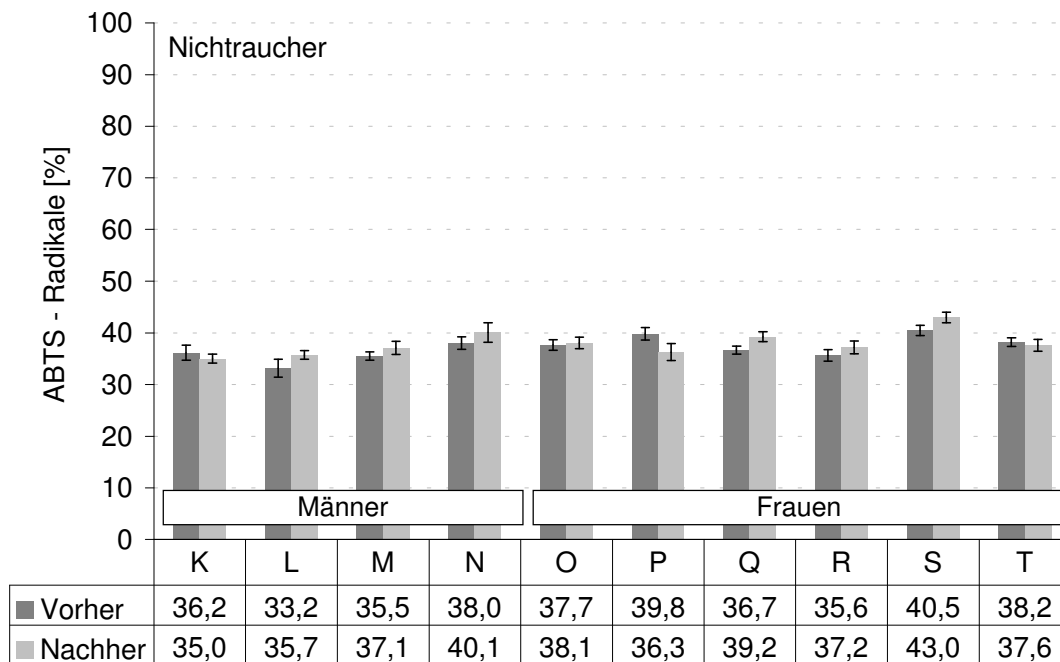


Abbildung 44: Bioverfügbarkeitsstudie; ABTS - System: Antioxidativer Status des Probandenplasmas (Nichtraucher) vor und nach Einnahme von Rotbusch - Extrakt (500 mg / d; 14 Tage lang)

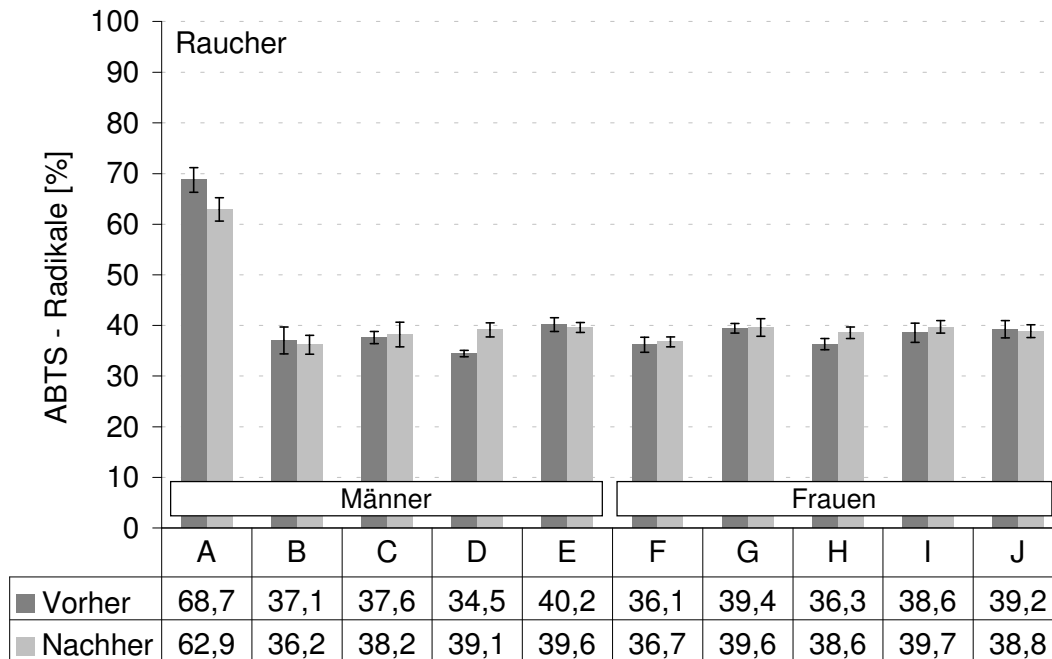


Abbildung 45: Bioverfügbarkeitsstudie; ABTS - System: Antioxidativer Status des Probandenplasmas (Raucher) vor und nach Einnahme von Rosmarin - Extrakt (500 mg / d; 14 Tage lang)

5.5 Plasma im Xanthin / Xanthinoxidase - System

Im Xanthin / Xanthinoxidase - System korreliert die Freisetzung von Ethen mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die maximale ROS - Bildung wurde in der Kontrollreaktion ohne den Zusatz von Plasma bestimmt und entspricht 100 %. Den Ansätzen wurden jeweils 300 µl des jeweiligen Probandenplasmas zugesetzt. Die antioxidative Kapazität des Probandenplasmas wurde in Form der gemessenen Ethenmengen bestimmt, wobei eine Erniedrigung der aus KMB freigesetzten Menge an Ethen eine Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Plasmas bedeutete (Abbildung 46 und Abbildung 47). Im Gegensatz zum ABTS - System wurden im Xanthin / Xanthinoxidase - System erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Individuen deutlich. Das „vorher“ - Plasma einiger Probanden hemmte das System bereits zu 70 % (Proband P, D, E), während das ebenfalls „vorher“ - Plasma anderer Probanden die Ethenfreisetzung lediglich um 40 % (Proband K, N, F, I) reduzierte. Dabei waren keine Regelmäßigkeiten innerhalb der Gruppen (Raucher, Nichtraucher, Männer, Frauen) vorhanden. Deutliche Unterschiede gab es aber zwischen den „vorher“ - und den „nachher“ - Proben. Sowohl bei den Rauchern, als auch bei den Nichtrauchern war die antioxidative Kapazität des „nachher“ - Plasmas, bis auf zwei

Ausnahmen (Probanden N und B), signifikant ($p < 0,05$) geringer als die des „vor her“ - Plasmas. Dabei variierten die Differenzen von einer Senkung der antioxidativen Kapazität um weniger als 10 % (Probanden L, D, E, H, J), wobei es sich hier, mit Ausnahme von Proband L, um Nichtraucher handelte, bis zu einer völligen Aufhebung der Systemhemmung (Proband Q und G) und damit zu einer Steigerung der Ethenproduktion um 60 %.

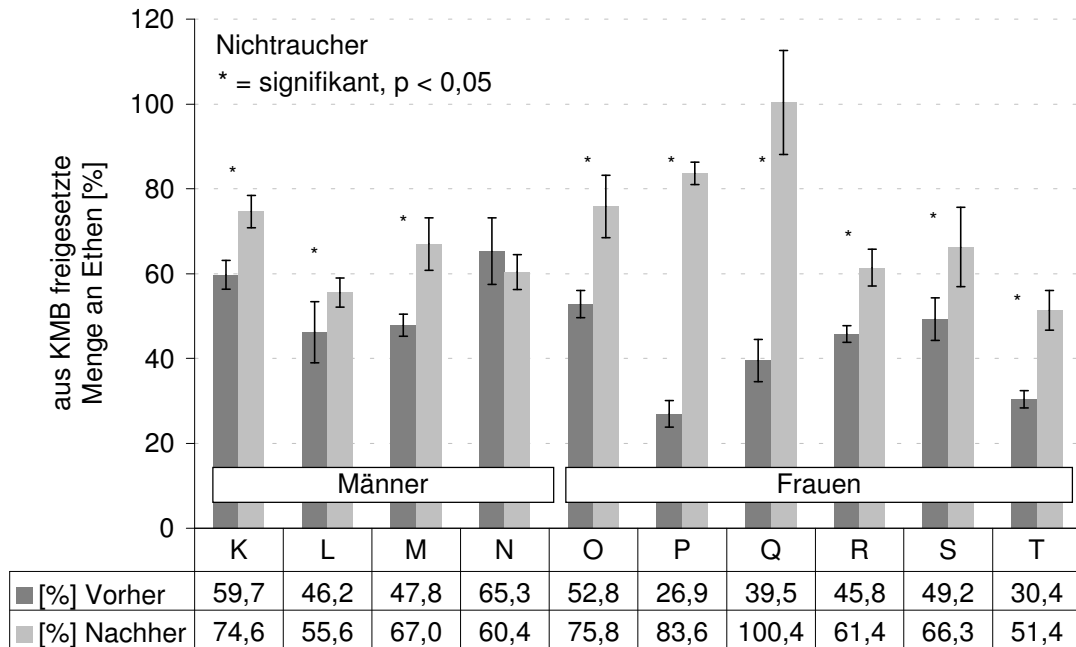


Abbildung 46: Bioverfügbarkeitsstudie; Xanthin / Xanthinoxidase - System: Antioxidativer Status des Probandenplasmas (Nichtraucher) vor und nach Einnahme von Rotbusch - Extrakt (500 mg / d; 14 Tage lang)

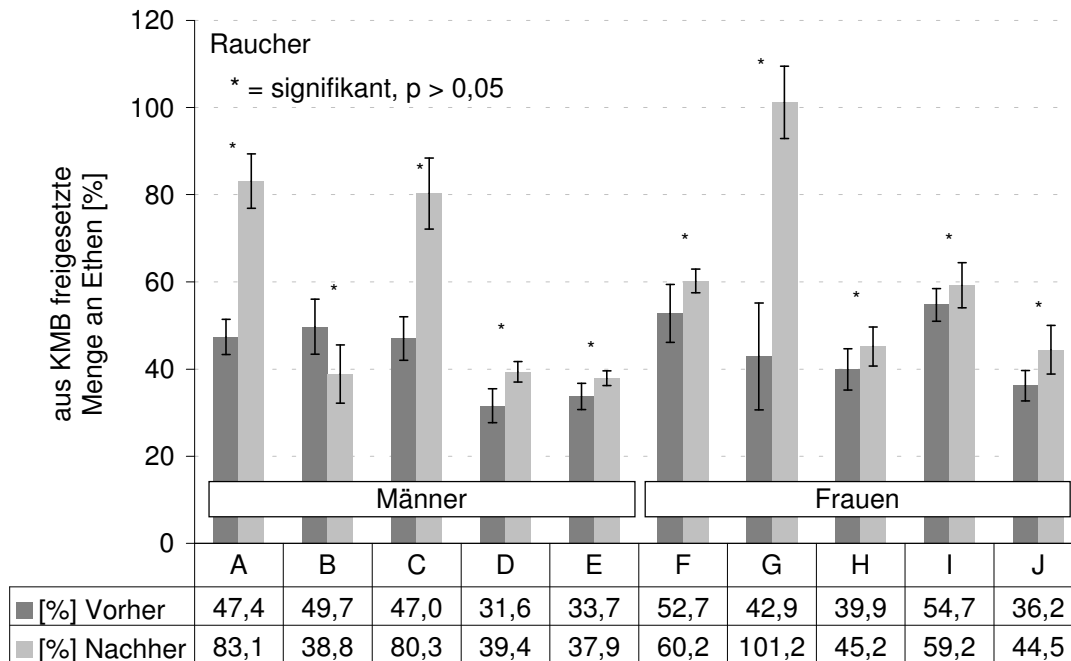


Abbildung 47: Bioverfügbarkeitsstudie; Xanthin / Xanthinoxidase - System: Antioxidativer Status des Probandenplasmas (Raucher) vor und nach Einnahme von Rosmarinus - Extrakt (500 mg / d; 14 Tage lang)

5.6 Hämoglobin - und Proteingehalte im Blutplasma

Durch die Zerstörung von Erythrozyten während der Blutabnahme wird Hämoglobin freigesetzt, das zum einen in der Lage ist, das Xanthin / Xanthinoxidase - System durch Bildung sogenannter Pseudo - Peroxidasen zu hemmen, zum anderen besteht die Gefahr, dass Eisenionen das empfindliche X / XOD - System stören. Die Hämoglobingehalte der „vorher“ - Proben unterschieden sich zum Teil deutlich von den Hämoglobingehalten der „nachher“ - Proben (Abbildung 50 und Abbildung 51). Dabei war die Hämoglobinkonzentration der „nachher“ - Plasmaproben bei 14 Probanden niedriger als die der „vorher“ - Plasmaproben. Aufschluss über einen Zusammenhang mit den Ergebnissen des Xanthin / Xanthinoxidase - Systems gaben aber die Probanden mit den gegenläufigen Effekten (Proband P, A, D, E, und J), bei denen trotz Erniedrigung des Hämoglobingehaltes, zum Teil erhebliche prooxidative Effekte im X / XOD - System vorlagen. Eine Ausnahme bildete Proband N, der sowohl eine höhere Hämoglobinkonzentrationen als auch eine bessere, aber nicht signifikante, antioxidative Kapazität im X / XOD - System hatte. Zusätzlich konnten die minimalen Unterschiede in den Hämoglobingehalten der Plasmaproben unmöglich die zum Teil sehr großen Effekte im X / XOD - System hervorrufen.

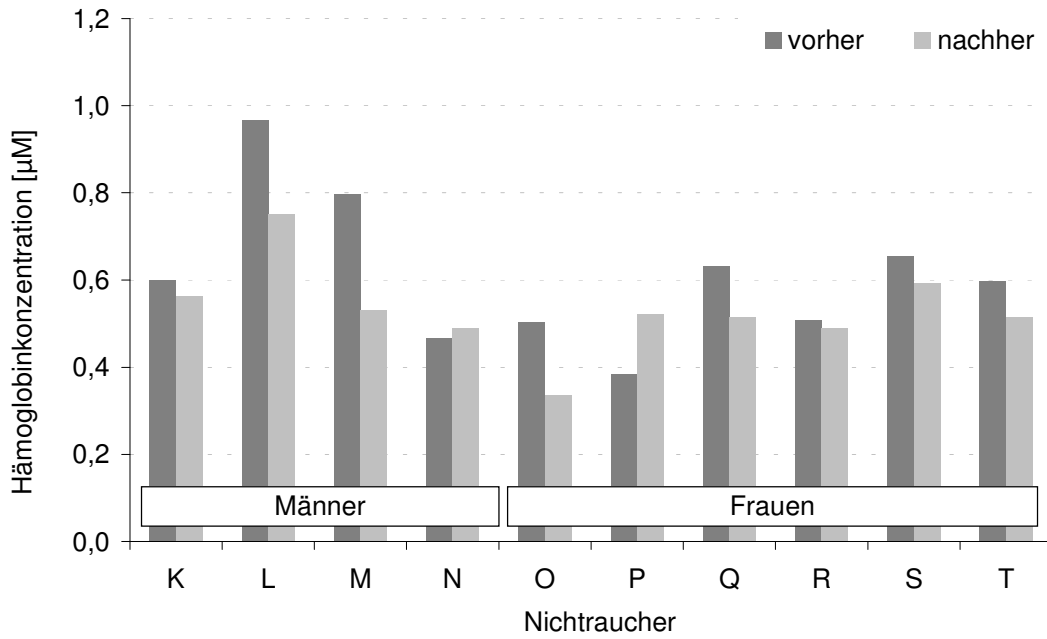


Abbildung 48: Nichtraucher, Hämoglobinkonzentration im Probandenplasma vor und nach Einnahme von Rotbusch – Extrakt

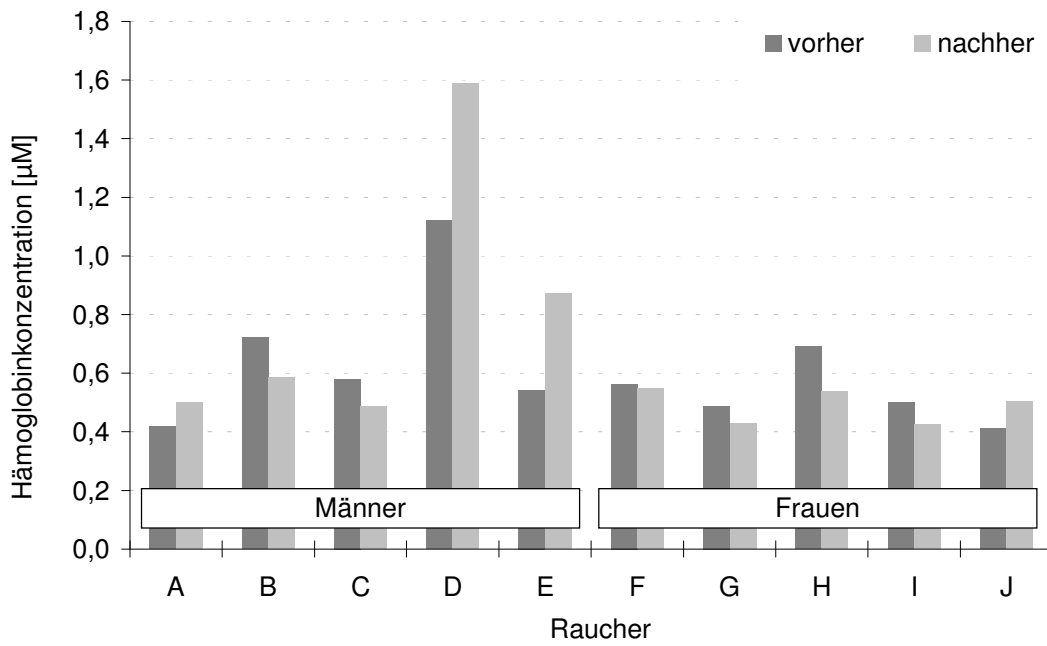


Abbildung 49: Raucher, Hämoglobinkonzentration im Probandenplasma vor und nach Einnahme von Rotbusch - Extrakt

Bekanntermaßen tragen auch Proteine, wie z.B. das Serumalbumin, zum antioxidativen Potenzial des Plasmas bei. Um mögliche Effekte bezüglich der antioxidativen Kapazität auf veränderte Proteingehalte ausschließen zu können, wurde mit Hilfe des Bradford - Assays die Proteinkonzentration in den einzelnen Plasmaproben bestimmt (Abbildung 50 und Abbildung 51). Eine höhere Proteinkonzentration „nachher“, wie sie bei den Probanden L, M, N, R, T, E, G, H und J bestimmt wurde, müsste demnach mit einer Aktivitätssteigerung desselben Plasmas im X / XOD - System einhergehen. Dies ist aber nur bei Proband N (nicht signifikant) der Fall. Dies und die Tatsache, dass große Effekte im X / XOD - System, wie z.B. bei den Probanden P, Q und G, nicht mit extremen Erniedrigungen der Proteingehalte einhergehen, sprechen gegen einen Einfluss von Veränderungen der Plasmaproteingehalte auf das Ergebnis im Xanthin / Xanthinoxidase - System.

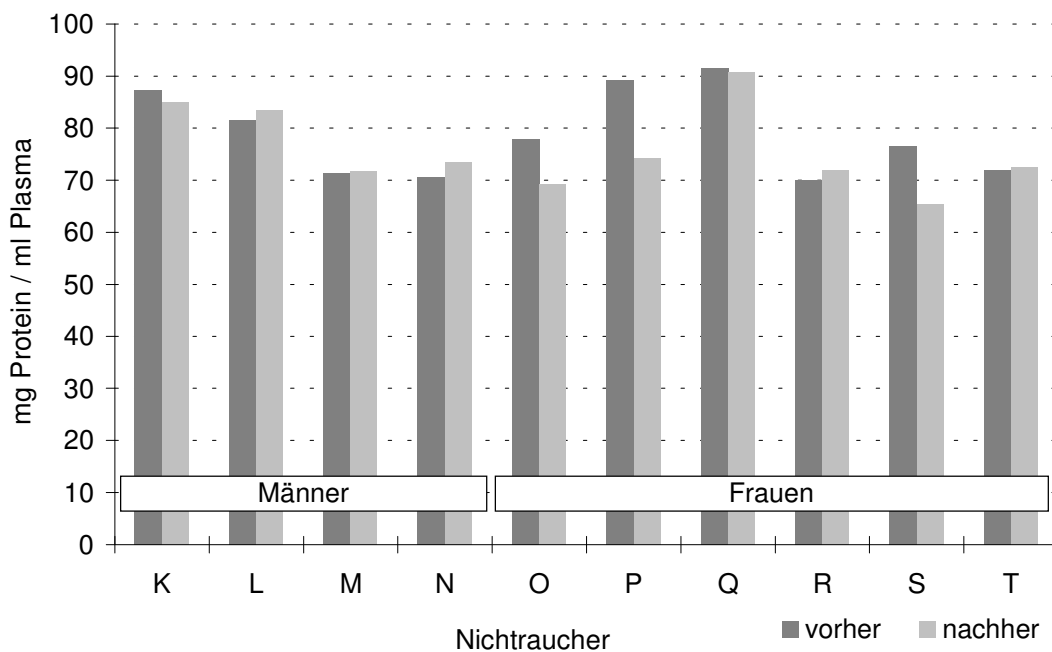


Abbildung 50: Nichtraucher, Proteinkonzentration im Probandenplasma vor und nach Einnahme von Rotbusch - Extrakt

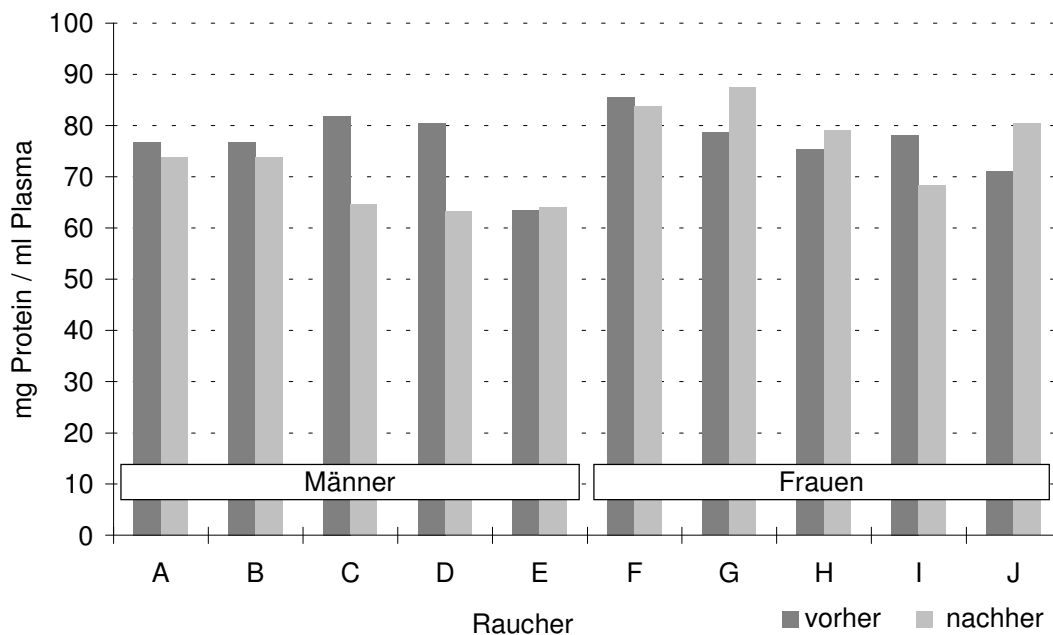


Abbildung 51: Raucher, Proteinkonzentration im Probandenplasma vor und nach Einnahme von Rotbusch - Extrakt

Fazit:

In der Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit von Rotbusch - Extrakt ergaben sich keine signifikanten Veränderungen innerhalb der Parameter des Großen Blutbildes und der Blutfettwerte. Der Harnsäurespiegel war bei allen Probanden nach der Einnahme von Rotbusch - Extrakt leicht erniedrigt. Die antioxidative Kapazität des Probandenplasmas blieb im ABTS - System und in der kupferinduzierten LDL - Oxidation unverändert, dafür war sie im Xanthin / Xanthinoxidase - System nach der Supplementierung deutlich geringer, was weder durch den erniedrigten Harnsäurespiegel noch durch veränderte Hämoglobin- bzw. Proteingehalte im Plasma erklärt werden konnte.

6 Diskussion

Die antioxidativen Eigenschaften verschiedener Substanzen hängen von den gegebenen Strukturmerkmalen, Konzentrationen, der Löslichkeit und der Verfügbarkeit von aktiven Gruppen für das Oxidans und der Stabilität der entstehenden Reaktionsprodukte ab (Salah et al. 1995; Guo et al. 1999). Antioxidanzien können reaktive Verbindungen direkt eliminieren oder aber auf Umwegen wirken, indem sie ein anderes reduzierendes Agens wie zum Beispiel das α - Tocopherol regenerieren (Patel et al. 2001), oder synergistische Effekte sind für die antioxidative Kapazität mitverantwortlich (Fuhrmann et al. 2000; Milde et al. 2004). Tabelle 16 bietet eine Übersicht der verwendeten biochemischen Testsysteme, den darin generierten reaktiven Verbindungen und den möglichen Wirkungsweisen eingesetzter Antioxidanzien.

Tabelle 16: Übersicht über die biochemischen *in vitro* Testsysteme; generierte Oxidanzien und möglich Wirkungsweisen von Antioxidanzien

Testsystem	Matrix	Oxidanzien	Wirkung Antioxidanzien
Fenton	hydrophil	Hydroxylradikal OH [*] Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ Eisenionen Fe ²⁺	ROS - abfangend Fe ²⁺ - komplexierend
Peroxyinitrit	hydrophil	Peroxyinitrit ONOO ⁻	RNS - Scavenger
ABTS	hydrophil	Ferrylradikalkation ABTS - Radikal (ABTS [*])	Radikal - löschend
Xanthin / Xanthinoxidase (X / XOD)	hydrophil	Hydroxylradikal OH [*] Superoxidradikalanion O ₂ ^{*-} Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ Eisenionen Fe ²⁺	ROS - abfangend XOD - hemmend Fe ²⁺ - komplexierend
Rose - Bengal (LPO)	lipophil	Singulett-Sauerstoff ¹ O ₂ Radikale der LPO (ROO [*] , RO [*] , OH [*])	¹ O ₂ - quenchend Licht - absorbierend ROS - Scavenger
Rose - Bengal (Cu ²⁺) (LPO)	lipophil	Singulett-Sauerstoff ¹ O ₂ Radikale der LPO (ROO [*] , RO [*] , OH [*]) Cu ²⁺ - Ionen	¹ O ₂ - Quenchend Licht - absorbierend ROS - abfangend Cu ²⁺ - komplexierend
Cu ²⁺ - induzierte LDL - Oxidation	lipophil	ROS Lipidradikale, OH [*] , Cu ²⁺	ROS - abfangend Cu ²⁺ - komplexierend

Auffallend ist die Wirkmöglichkeit von Antioxidanzien als Scavenger (= Fänger) von ROS und RNS in allen Systemen. Tatsächlich spielen „Scavenger“-Eigenschaften für Antioxidanzien eine übergeordnete Rolle. Substanzen, die aufgrund ihrer chemischen Struktur die Möglichkeit haben, ROS und RNS zu reduzieren, werden im allgemeinen als gute Antioxidanzien angesehen. In allen Testsystemen, mit Ausnahme des Peroxynitrit-Systems, spielen Radikale eine wichtige Rolle. Aufgrund der Gemeinsamkeit der generierten Radikale und ihrer Eliminierung über „Radikalfänger“ befasst sich die Diskussion zunächst mit den möglichen radikalfangenden Eigenschaften der Leitsubstanzen, bevor dann die Pflanzenextrakte in den biochemischen *in vitro* Systemen separat behandelt werden. Dabei werden die hydrophilen Testsysteme, die ausschließlich in PHASE I behandelt wurden (Fenton- und Peroxynitrit-System), zuerst diskutiert. Anschließend folgt die Diskussion aller Systeme, die Bestandteil der ersten und zweiten Untersuchungsphase waren (ABTS-, X/XOD- und Rose-Bengal-System). Auf Unterschiede zwischen den verschiedenen Emulgatoren wird dabei nicht weiter eingegangen, da diese in der Bewertung der ersten Untersuchungsphase ausführlich behandelt wurden. Alle Angaben beziehen sich auf die IC_{50} -Konzentrationen und den Emulgator Sternylolk. Die, nur in PHASE I behandelte, kupferinduzierte LDL-Oxidation dient als Überleitung und wird der anschließend diskutierten Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit von Rotbusch-Extrakt (PHASE III) vorangestellt.

6.1 Struktur - Aktivitäts - Beziehungen

6.1.1 Radikalfangende Eigenschaften der Extraktinhaltsstoffe

Um die Zusammenhänge zwischen antioxidativer Kapazität und der gegebenen Strukturmerkmale zu erleichtern, zeigt Abbildung 52 nochmals die Flavonoid-Grundstruktur, da ein Großteil der Extraktinhaltsstoffe Flavonoide sind. Zum Teil lassen sich aber auch die für Flavonoide gültigen Struktur - Aktivitäts - Beziehungen auf andere phenolische Verbindungen übertragen.

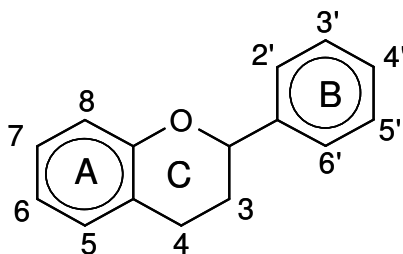


Abbildung 52: Flavanskelett

Benachbarte OH - Gruppen an C3' und C4' (ortho - Dihydroxystruktur) und idealerweise auch an C5' (ortho - Trihydroxystruktur) an Ring B sind die wichtigsten radikalfangenden Strukturen bei Flavonoiden (Cao et al. 1997; Cotelle et al. 1996). Noch bessere radikalfangende Eigenschaften haben Flavonoide mit einer zusätzlichen Doppelbindung zwischen C2 und C3, verbunden mit einer Oxogruppe an C4 (van Acker et al. 1996 (1)). Mit einer OH - Gruppe an C3 (van Acker et al. 1996 (2)), erhält man über Wasserstoffbrückenbindungen das ideale Flavonoid, ein planares Molekül mit optimalen Bindungslängen für ein konjugiertes System. Substanzen, die keine benachbarten OH - Gruppen an Ring B tragen, dafür aber an Ring A mit OH - Gruppen substituiert sind (C5 und C7), haben auch radikalfangende Eigenschaften. Dies führt zu der Regel, dass mit sinkender Anzahl der OH - Gruppen an Ring B die Anzahl der OH - Gruppen an Ring A an Bedeutung gewinnen. Der Mechanismus, mit dem Flavonoide als Scavenger wirken, beruht auf Wasserstoffatomdonation (Rice - Evans et al. 1996). Die Abgabe von H - Atomen ist vor allem deshalb möglich, weil die aromatischen Ringe der Flavonoide die Stabilisierung der entstehenden radikalischen Stellen durch ihr konjugiertes π - Elektronensystem ermöglichen. Die vereinfachte Darstellung der Reaktion: $HO^{\bullet} + \text{Flavonoid} - OH \rightarrow H_2O + \text{Flavonoid} - O^{\bullet}$ zeigt die Wichtigkeit der Hydroxylgruppen für die antioxidative Wirksamkeit von Flavonoiden gegenüber Radikalen, wobei stellvertretend das aggressive OH - Radikal in der Reaktionsformel dargestellt ist (Arora et al. 1998).

Die astringierenden, farblosen und wasserlöslichen Catechine, wie sie in *Camellia sinensis* überwiegend zu finden sind, gehören zur Stoffgruppe der Flavonoide. Sie zeichnen sich durch ortho - Dihydroxystrukturen (Epicatechin, EC) und ortho - Trihydroxystrukturen (Epigallocatechin, EGC) an Ring B aus (Abbildung 53). Sie haben keine Doppelbindung zwischen C2 und C3, womit ihnen ein wichtiger Stabilitätsfaktor fehlt, denn durch diese Bindung mit einer zusätzlichen Oxogruppe an C4 ergäbe sich das schon erwähnte planare Molekül mit idealen Voraussetzungen für die Eliminierung von Radikalen.

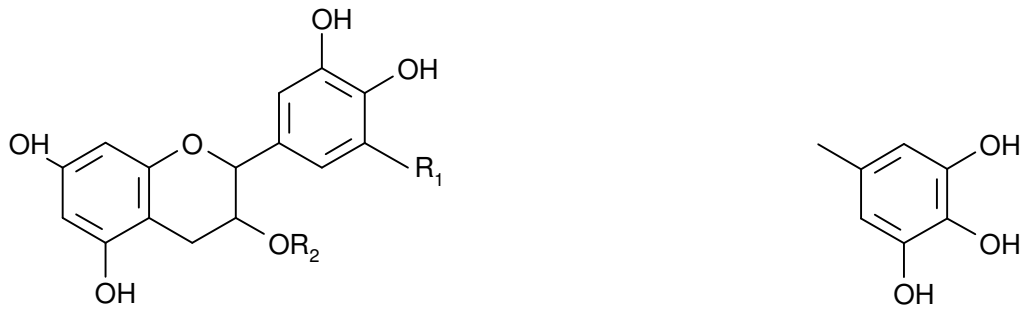


Abbildung 53: Catechin - Grundgerüst

Epicatechin: R1=R2=H;

Epicatechingallat: R1=H; R2=Gallatrest;

Epigallocatechingallat: R1=OH; R2=Gallatrest

Gallatrest

Wenn auch nicht ganz planar, sind die Catechine doch als überragend gute Radikalscavenger bekannt (Ueda et al. 1996; Plumb et al. 1998). Die Besonderheit dieser Pflanzeninhaltsstoffe ist ihre Kondensation mit Gallussäure und die daraus entstehenden Epicatechingallate (ECG) und Epigallocatechingallate (EGCG). Zusätzlich ist eine Kondensierung der Catechine untereinander möglich. Nach Salah et al. (1995) und Guo et al. (1999) hängen die Scavengereigenschaften der verschiedenen Catechinmoleküle von der Anzahl an ortho - Dihydroxy - und ortho - Hydroxyketogruppen, vom Vorhandensein der C2 - C3 - Doppelbindung, ihrer Konzentration im Ansatz, ihrer Löslichkeit, der Verfügbarkeit von aktiven Gruppen für das Oxidans und der Stabilität des Reaktionsproduktes ab. Die dominierende Substanz in den beiden Extrakten aus *Camellia sinensis* ist das Epigallocatechingallat, das im Grüntee - Extrakt (GT) zu 23,3 % und im Weißtee - Extrakt (WT) zu 45 % zu finden ist. Bors und Michel (1999) führen die auffallend guten antioxidativen Eigenschaften der Gallatcatechine auf die zusätzlichen ortho - Di - bzw. - Trihydroxystrukturen am Gallatrest des Epicatechingallats (ECG) und des Epigallocatechingallats (EGCG) zurück. Dabei hatten Mischungen der verschiedenen Catechinderivate eine höhere antioxidative Kapazität als die Einzelsubstanzen (Bors et al. 2001).

Dihydrochalkone, wie das Pentahydroxydihydrochalkon Aspalathin aus *Aspalathus linearis*, sind Flavonoidvorläufer. Ihnen fehlt der Ringschluss zum heterozyklischen Ring C, der aber sehr leicht schon bei einer Änderung des pH - Wertes, erfolgen

kann. Das Aspalathin (Abbildung 54) zeigt einige Strukturmerkmale, welche die sehr guten antioxidativen Eigenschaften des Rotbusch - Extraktes durch Scavenger - Aktivität erklären könnten. Diese Merkmale sind ortho - Dihydroxystrukturen am „Ring B“, drei weitere OH - Gruppen am „Ring A“ und eine Ketogruppe am offenen „Ring C“ an C4.

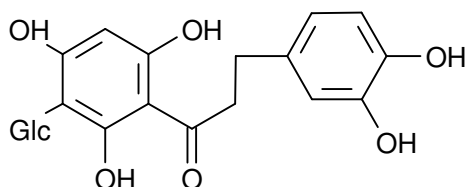


Abbildung 54: Aspalathin (Glc = Glucose)

Beim Vorhandensein freier OH - Gruppen und einer Verbindung der Ringe A und B untereinander ist ein geschlossener Ring C nicht unbedingt für die Aktivität ausschlaggebend, denn Chalkone sind als gute Antioxidanzien bekannt (Mathiesen et al. 1997). An C6 (Ring A) befindet sich eine kovalent gebundene Glucose. Im Gegensatz zu den Catechinen des Grünen Tees handelt es sich beim Aspalathin um eine monomer vorliegende Substanz (Joubert 1994), für die bisher keine Struktur - Aktivitäts - Beziehungen beschrieben sind. Die Fermentationsprodukte des Aspalathins sind Orientin und Isoorientin. Es handelt sich dabei um die korrespondierenden Flavone zu Aspalathin, die sich durch benachbarte OH - Gruppen am Ring B, zwei OH - Gruppen an Ring A und einer Doppelbindung zwischen Position 2 und 3 auszeichnen (Ferreira 1998 (2)) und damit gute radikalfangende Eigenschaften bzw. H - Donorfunktion vermuten lassen. Nach Dziedzic et al. (1985) und von Gadow et al. (1997 (1)) sind Flavone weniger aktiv als ihre korrespondierenden Chalkone und diese sind wiederum weniger aktiv als ihre korrespondierenden Dihydrochalkone. Standley et al. (2001) beschreiben ein höheres antioxidatives Potenzial für unfermentierten Rotbusch. Für Aspalathin konnten bereits bessere radikalfangende Eigenschaften verglichen mit α - Tocopherol und dem synthetischen Antioxidans BHT gezeigt werden (von Gadow et al. 1997 (2)).

Das Hesperidin aus *Cyclopia spec.* ist ein Flavonoid, bei dem im Gegensatz zum Aspalathin an Ring B die Position 4' mit einer Methoxygruppe substituiert ist. Dies bedingt einen schwächenden Effekt auf die Scavengereigenschaften durch H -

Donation (Arora et al. 1998; Cao et al. 1997). Weiterhin ist das Hesperidin mit einer Ketogruppe an C4 und einer Hydroxylgruppe an C2', C5' und C5 substituiert. Die O - Rutinose (Glucose - Rhamnose) befindet sich an C7. In Untersuchungen von van Acker et al. (1996 (1)) waren die radikalfangenden Eigenschaften von Hesperidin aber immer noch besser als die von Naringin und Naringenin, denen die Methoxygruppe fehlt und die sich nur durch eine einzelne OH - Gruppe an C4' auszeichnen. Die weiterhin quantifizierten Inhaltsstoffe des Honigbusches, Mangiferin bzw. Isomangiferin, gehören nicht zu der Gruppe der Flavonoide, sondern zu den Xanthonen. Strukturell handelt es sich dabei ebenfalls um Verbindungen aus drei Ringen, von denen zwei aromatisch sind (analog Ring A und Ring B der Flavonoide). Die aromatischen Ringe A und B stehen über einen heterozyklischen Ring miteinander in Verbindung und haben jeweils zwei OH - Substituenten. Die OH - Gruppen an Ring A stehen in ortho - Stellung und bieten damit die ideale Struktur eines polyphenolischen Antioxidans (Sato et al. 1992).

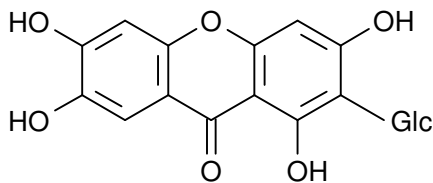
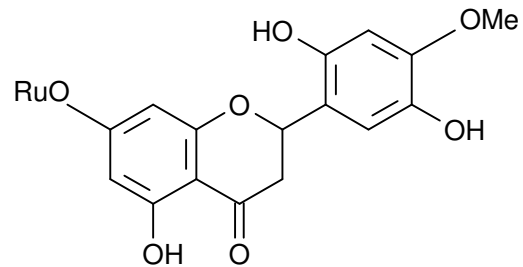


Abbildung 55: Mangiferin
(Glc = Glucose)



Hesperidin
(Ru = Rutinose; Me = CH₃)

Für Rosmarin - Extrakte im Allgemeinen sind sehr gute antioxidative Eigenschaften beschrieben (del Bano et al. 2003). Die vorliegende Untersuchung beschäftigte sich mit zwei Extrakten, einem Rosmarin (Carnosolsäure) - Extrakt und einem carnosolsäurefreien Rosmarinsäure - Extrakt. Die antioxidative Kapazität des carnosolsäurehaltigen, Rosmarin - Extraktes hängt mit seinen phenolischen Komponenten zusammen. Die Carnosolsäure ist ein tricyclisches Diterpendiphenol. Eine entgiftende Wirkung von Radikalen kann aufgrund der leichten Oxidierbarkeit zweier Hydroxylgruppen in Orthostellung angenommen werden (Schwarz et al. 1992; Masuda et al. 2001). Die Rosmarinsäure, ein Kaffeyolderivat, hat eine ortho - Dihydroxygruppe an jedem aromatischen Ring, die vor allem auf radikalfangende

Eigenschaften durch H - Donation hindeuten. Unterstützt wird diese Scavenger - Aktivität wahrscheinlich zusätzlich durch die konjugierten Doppelbindungen in der Carbonkette (Nakamura et al. 1998). Unter allen Rosmarininhaltsstoffen hat die Rosmarinsäure die besten antioxidativen Eigenschaften in wässriger Umgebung (Frankel et al. 1996).

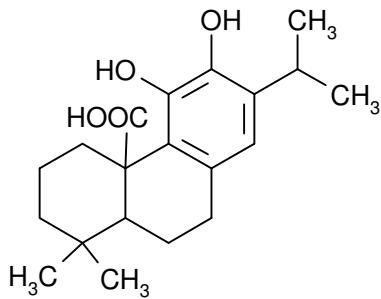
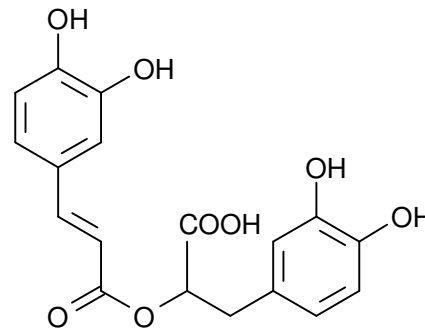
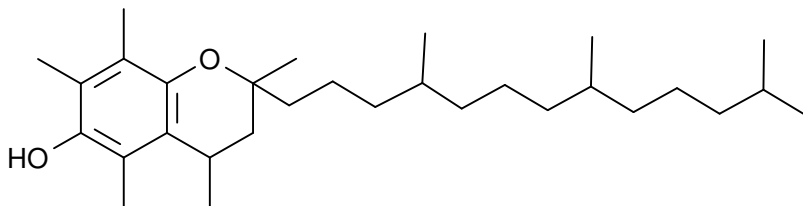


Abbildung 56: Carnosolsäure



Rosmarinsäure

Tocopherole sind Derivate des 2 - Methyl - 6 - Chromanol mit einer Phytol - Seitenkette an C2. Das α - Tocopherol kommt *in vivo* am häufigsten vor und gilt auch als das biologisch aktivste (Lit. in Janisch et al. 2004). Es ist leicht oxidierbar, wobei ein Chinon (Tocochinon) entsteht. Die Hydroxylgruppe am aromatischen Ring ermöglicht die Abgabe eines H - Atoms an radikalische Verbindungen und die konjugierten Doppelbindungen erleichtern die Stabilisierung des entstehenden Tocopherylradikals. Für den lipophilen Charakter ist die Seitenkette verantwortlich, da diese eine Einlagerung in Lipiddoppelschichten (Zellmembranen, LDL - Partikel) erlaubt. Trolox, das wasserlösliche Analogon von α - Tocopherol, unterscheidet sich von diesem durch eine Alkylgruppe an Stelle der Phytol - Seitenkette.

Abbildung 57: α - Tocopherol

6.1.2 Fenton - System; Strukturen und Aktivität

In der Fentonreaktion werden eisenkatalysiert Hydroxylradikale (OH^\bullet) über die Reduktion von H_2O_2 generiert. Diese können durch pflanzliche Inhaltsstoffe wie phenolische Säuren, Flavonoide und Tocopherole in unterschiedlichem Ausmaß abgefangen werden (Kono et al. 1997; Hippeli et al. 1998; Pietta et al. 2000). Die Hemmung des Testsystems ist einmal durch die Entgiftung von OH - Radikalen und zum anderen durch die Chelatierung von Eisenionen möglich (Tabelle 16). Die Effektivität der untersuchten Extrakte und Trolox in PHASE I war: GT > Trolox > RO > HO > RS > RM. Flavonoide sind nicht nur als gute Scavenger von Radikalen bekannt, strukturell haben einige von ihnen auch die Voraussetzungen für die Bildung inaktiver Komplexe mit Übergangsmetallen: Bei Vorhandensein einer Ketogruppe an C4 und Hydroxylgruppen an C3, C5, C3' und C4' gibt es drei Möglichkeiten der Metallkomplexierung: zwischen 3 - OH und 4 - Oxo, zwischen 5 - OH und 4 - Oxo und zwischen den ortho - Hydroxylgruppen im B - Ring (Fernandez et al. 2002).

Für die Catechine aus *Camellia sinensis* ergibt sich somit zusätzlich zu den guten Scavengereigenschaften, die Möglichkeit der Fe^{2+} - Komplexierung durch die OH - Gruppen in Ring B (Moran et al. 1997; Kashima 1999). Miller et al. (1996) zeigten, dass die Eisenchelatierung durch Gallatreste verstärkt wird. Dies ist physiologisch besonders bei der Nahrungsaufnahme wichtig, da die gastrointestinale Eisenaufnahme durch Catechine gestört werden kann (Hurrell et al. 1999; Wang et al. 2000; Samman et al. 2001). Nach Morel et al. (1994) spielt die Übergangsmetallkomplexierung für die antioxidative Kapazität von Flavonoiden nur eine untergeordnete Rolle. Auch Van Acker et al. (1996 (1)) gehen davon aus, dass eine Eisenkomplexierung für Flavonoide vor allem dann wichtig wird, wenn die radikalfangenden Eigenschaften eher gering sind.

Yoshikawa et al. (1990) beschreibt für Aspalathin aus *Aspalathus linearis* sehr gute OH^\bullet - entgiftende Eigenschaften. Vergleicht man die IC_{50} - Konzentration des Rotbusch - Extraktes (69 $\mu\text{g} / \text{ml}$) mit der des Grüntee - Extraktes (21 $\mu\text{g} / \text{ml}$), zeigt sich jedoch für den Rotbusch - Extrakt eine dreifach geringere Aktivität, und das, obwohl das Aspalathin eine Catecholstruktur an Ring B und weitere phenolische Gruppen an Ring A trägt. Der Leitsubstanzanteil im unfermentierten Rotbusch - Extrakt (19,2 %) macht etwa die Hälfte des Leitsubstanzanteils des Grüntee - Extraktes (38,09 %) aus. Dass die verhältnismäßig viel niedrigere IC_{50} -

Konzentration mit den Strukturen der Catechine am heterocyclischen Ring C zusammenhängt ist eher unwahrscheinlich. Sicher ist aber, dass Aspalathin Eisenionen nicht in unlösliche Chelatkomplexe bindet (Hesseling et al. 1979; Morton et al. 1983), so dass die mehr als dreimal so gute antioxidative Kapazität des Grüntee - Extraktes durchaus auch auf der Fähigkeit, Fe^{2+} zu komplexieren, beruhen kann. Damit müssten den chelatierenden Eigenschaften auch bei starken Scavengern mehr Bedeutung zugeschrieben werden als dies bisher der Fall war.

Dem Hesperidin von *Cyclopia spec.* fehlen die für die effektive Eliminierung von OH^\bullet geforderten Strukturmerkmale, insbesondere die ortho - Dihydroxystruktur. Dafür ist eine von Fernandez et al. (2002) beschriebene Übergangsmetallkomplexierende Struktur, die Oxogruppe an C4 und die Hydroxylgruppe an C5, vorhanden. Allerdings ist Hesperidin nur zu sehr geringen Teilen in den Extrakten enthalten. Einen weit größeren Anteil machen die Xanthone Mangiferin bzw. Isomangiferin aus, die eine benachbarte phenolische Gruppen, wie sie für die Entgiftung von OH^\bullet von Vorteil ist, besitzen. Ihr Gesamtanteil im Extrakt ist mit 20,3 % ähnlich wie der Anteil an Aspalathin im Rotbusch - Extrakt. Die IC_{50} - Konzentration war mit 115 $\mu\text{g} / \text{ml}$ aber fast doppelt so hoch. Grund dafür könnte die Überlegenheit der Flavonoidstruktur bzw. der weitaus höhere Anteil an Catechinäquivalenten des Rotbusch - Extraktes sein.

Die Optimumskurve bei Zugabe des carnosolsäurehaltigen Rosmarin - Extrakts zur Fenton - Reaktion beruht wahrscheinlich auf den von Smith et al. (1992) beschriebenen prooxidativen Eigenschaften der Carnosolsäure in Gegenwart von Eisen. So könnte zwar in niedrigen Konzentrationsbereichen die antioxidative Kapazität überwiegen, da Carnosolsäure diffusionskontrolliert mit wenig Eisen interagieren kann. In höheren Konzentrationen gewinnt aber die Reduktion von Fe^{3+} und damit die Regenerierung von Fe^{2+} durch die Carnosolsäure die Oberhand und es kommt zu einer konkurrierenden Situation zwischen antioxidativen und prooxidativen Reaktionen.

Die Rosmarinsäure hat im Unterschied zur Carnosolsäure zwei phenolische Ringe mit Hydroxylgruppen in ortho - Stellung. Für Radikale wie das OH^\bullet ergeben sich dadurch im Vergleich zur Carnosolsäure mehr Angriffspunkte. Auch eine Fe^{2+} - Komplexierung wäre denkbar. Allerdings hat der Rosmarinsäure - Extrakt vergleichsweise geringe Inhaltsstoffkonzentrationen, was die Unterlegenheit gegenüber den Extrakten aus Grünem Tee, Rotbusch und Honigbusch erklärt.

6.1.3 Peroxynitrit - System; Strukturen und Aktivität

Die Reihenfolge der Extrakte im Peroxynitrit - System, in Phase I, sortiert nach sinkender antioxidativer Kapazität (Trolox > RO > GT > HO > RS > RM), unterschied sich maßgeblich von der Reihenfolge im Fenton - System. Das höchste Potenzial, Peroxynitrit zu entgiften, hatte Trolox. Für α - Tocopherol wiesen Hogg et al. (1994) nach, dass es in Anwesenheit von Peroxynitrit zu einer $2 e^-$ - Oxidation kommt, wobei das α - Tocopherylchinon entsteht. Dieser Mechanismus ist auch für Trolox anzunehmen, da sich Trolox und α - Tocopherol nur in einer, für diese Reaktion unwichtigen, Alkylgruppe unterscheiden. Für die Entgiftung von ONOO^- sind bei Flavonoiden nach Haenen et al. 1997 die ortho - Dihydroxygruppe an Ring B und die 3 - OH - Gruppe an Ring C von allergrößter Wichtigkeit, wobei die Fähigkeit der Flavonoide, Peroxynitrit zu entgiften, allgemein mit der Anzahl an OH - Gruppen korreliert. Ein zweifacher Elektronenübergang ($2 e^-$ - Oxidation) führt dabei zur Bildung der korrespondierenden Quinone (Pannala et al. 1998; Kerry et al. 1998).

Catechine, Epicatechine und deren Gallate (Inhaltsstoffe des Grüntee - Extraktes) gelten als potente Peroxynitrit - Scavenger (Paquay et al. 2000), wobei das Epigallocatechingallat (im Grüntee - Extrakt zu 23,3 % enthalten) innerhalb der Catechine als aktivste Substanz gilt (Pannala et al. 1997; Haenen et al. 1997). Entgegen aller Vermutungen war der Rotbusch - Extrakt in den Untersuchungen zur Entgiftung von Peroxynitrit um ein Vielfaches wirksamer ($\text{IC}_{50} = 5,8 \mu\text{g} / \text{ml}$) als der Grüntee - Extrakt ($\text{IC}_{50} = 28 \mu\text{g} / \text{ml}$). Leider sind bisher keine Peroxynitrit - entgiftenden Eigenschaften von Dihydrochalkonen beschrieben. Die Leitsubstanz des Rotbusch - Extraktes, Aspalathin, besitzt, wie schon erwähnt, neben der Catecholgruppe an Ring B noch drei weitere phenolische OH - Gruppen an Ring A mit möglichen entgiftenden Eigenschaften. Wie schon im Fenton - System sprechen auch die Ergebnisse im Peroxynitrit - System, zusammen mit den ermittelten Catechinäquivalenten, für zusätzliche polyphenolische Substanzen im Rotbusch - Extrakt.

Inwieweit die mit dem Grüntee - Extrakt vergleichbare Aktivität des Rosmarinsäure - Extraktes und des Honigbusch - Extraktes auf Oxidations- und Nitrierungsreaktionen beruht, ist unklar. Allerdings sollten die benachbarten Hydroxylgruppen der Rosmarinsäure, der Carnosolsäure und des Mangiferins eine entscheidende Rolle für die antioxidative Kapazität dieser Substanzen gegenüber Peroxynitrit spielen.

6.1.4 ABTS - System; Strukturen und Aktivität

Die eingesetzten Proben können einmal als H - Donatoren zur Entgiftung der Radikale auftreten, weiterhin können sie mit dem zugegebenen H_2O_2 reagieren und so die Radikalproduktion in ihrer Entstehung verhindern. Aufgrund der hohen Bindungsaffinität von Myoglobin zu Eisen ist eine antioxidative Wirkung der Extrakte durch Bildung eines inaktiven Eisenkomplexes unmöglich.

Schon die Sondierung in PHASE I zeigte einen deutlichen Unterschied innerhalb der Reihung der Extrakte verglichen mit den vorhergegangenen Systemen. Der Extrakt aus *Aspalathus linearis* hatte mit einer IC_{50} - Konzentration von $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ die beste antioxidative Kapazität im ABTS - System, dicht gefolgt vom Extrakt aus *Camellia sinensis* ($\text{IC}_{50} = 2,3 \mu\text{g} / \text{ml}$). Auf den Grüntee - Extrakt (GT) folgten nach sinkender antioxidativer Leistung $\text{HO} > \text{Trolox} > \text{RS} > \text{RM}$. Der wichtigste Unterschied zwischen dem Fenton - und dem ABTS - System ist die Art, in der Eisenionen (Fe^{2+}) vorliegen, um die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu katalysieren. Anhand der Ergebnisse im ABTS - System, können die Theorien zur Komplexierung von Eisenionen, die bei der Besprechung des Fenton - Systems aufgestellt wurden, bestätigt oder verworfen werden. Durch die relativ schlechte Hemmung des Grüntee - Extraktes im ABTS - System im Vergleich zum Fenton - System lässt sich die vermutete Komplexierung von Fe^{2+} durch die Catechine des Grüntee - Extraktes bestätigen. Umgekehrt gilt, dass eine Eisenkomplexierung durch die Inhaltsstoffe des Rotbusch - Extraktes ausgeschlossen werden kann. Die für das Hesperidin des Honigbusch - Extraktes vermutete Fähigkeit zur Eisenkomplexierung konnte durch das ABTS - System nicht bestärkt werden. Die verglichen mit dem Fenton - System bessere Position des Honigbusch - Extraktes in der Reihung der Extrakte im ABTS - System spricht für die überwiegende Wirksamkeit dieses Extraktes durch die Eliminierung von ROS. Der Rosmarin - Extrakt reagiert im Gegensatz zum Fenton - System im ABTS - System nicht in Form einer ansteigenden Optimumkurve. Durch die Bindung des Eisens an Myoglobin wird wahrscheinlich der prooxidative Effekt der Carnosolsäure in diesem System unterbunden. Der Rosmarinsäure - Extrakt besitzt mit seinen Inhaltsstoffen Rosmarinsäure, Äpfelsäure und Zitronensäure mehrere gute Angriffspunkte für das ABTS - Radikal, vor allem durch die phenolische Rosmarinsäure mit insgesamt zwei ortho - Dihydroxygruppen. Dies macht sich in den, mit Trolox vergleichbaren, niedrigen IC - Konzentrationen bemerkbar.

Die Verhältnisse der antioxidativen Kapazität verschiedener Extrakte gleicher pflanzlicher Herkunft im ABTS - System waren stark von den bekannten Leit-substanzen abhängig (PHASE II). Dies galt im Besonderen für die beiden Extrakte aus *Camellia sinensis*. Dies unterstützt die Vermutung, dass keine weiteren antioxidativen Mechanismen außer der H - Donation, durch die phenolischen Gruppen der Catechine für die Systemhemmung verantwortlich sind.

Die antioxidative Aktivität der unfermentierten Rotbusch - Extrakte korrelierte ebenfalls mit den Leitsubstanzgehalten. Also ist auch für die beiden unfermentierten Rotbusch - Extrakte die Hemmung des Systems über nur einen Mechanismus sehr wahrscheinlich. Anzunehmen ist auch hier vor allem die H - Donation durch die Catecholstruktur von Ring B und die drei zusätzlichen OH - Gruppen an Ring A. Verglichen mit dem Grüntee - Extrakt hatten die unfermentierten Rotbusch - Extrakte einen ähnlichen bzw. höheren Gehalt an Catechinäquivalenten, also muss davon ausgegangen werden, dass noch weitere antioxidativ wirksame Inhaltsstoffe in den unfermentierten Rotbusch - Extrakten zu finden sind. Für fermentiertes Rotbusch-material sind ebenfalls gute radikalfangende bzw. antioxidative Eigenschaften beschrieben (Yoshikawa et al. 1990; Ferreira et al. 1998 (2)). Der Unterschied der antioxidativen Wirkung der unfermentierten Rotbusch - Extrakte (RO und RO(e)) im Vergleich mit dem fermentierten Rotbusch - Extrakt (RO(f)) liegt sicherlich zum Großteil an dem ca. zehnmal geringeren Aspalathingehalt von RO(f). Allerdings war die Aktivität der unfermentierten Extrakte im ABTS - System nur etwa dreimal höher ($IC_{50} = 2,1$ und $2,7 \mu\text{g} / \text{ml}$) als die des fermentierten Rotbusch - Extraktes ($IC_{50} = 6,7 \mu\text{g} / \text{ml}$). Die Fermentationsprodukte des Aspalathins, Orientin und Isoorientin, zeichnen sich ebenfalls durch radikalfangende Strukturen aus. Unklar ist jedoch, in wieweit die Flavonoide im Zuge des Fermentationsprozesses weiter oxidiert werden: Obwohl die Struktur von Orientin bzw. Isoorientin kaum eine Aktivitätsminderung gegenüber Radikalen vermuten lässt, hatte der fermentierte Rotbusch - Extrakt doch eine wesentlich geringere Aktivität. Als weiteres Indiz für fortschreitende Oxidationsprozesse ist der Gehalt an Catechinäquivalenten, der nach der Fermentation deutlich geringer ist (unfermentiert: $311,7 \mu\text{M}$, fermentiert: $186,3 \mu\text{M}$), zu sehen. Die Ergebnisse für unfermentierte und fermentierte Rotbusch - Extrakte stimmen mit den Untersuchungen von Bramati et al. (2003) überein, der im ABTS - System für einen unfermentierten Rotbusch - Extrakt eine zweimal höhere antioxidative Leistung erhielt als für einen fermentierten.

Drei der vier Honigbusch - Extrakte zeigten sinkende Aktivitäten mit sinkenden Leit-substanzanteilen. Die Entfärbung des Extraktes aus *Cyclopia sessiliflora* hatte eine Aktivitätsminderung im ABTS - System zur Folge, obwohl der Gehalt an Leit-substanzen höher war als beim gefärbten Extrakt. Dies, und die Tatsache, dass beide Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* eine im Verhältnis zum Leitsubstanzanteil sehr hohe Aktivität aufwiesen, lässt weitere aktive Substanzen mit antioxidativen Eigenschaften in diesen Extrakten vermuten. Durch die Entfärbung scheinen einige dieser, für das ABTS - System relevanten, zusätzlichen Komponenten verloren zu gehen. Diese Vermutungen decken sich mit den Gehalten an Catechinäquivalenten. Zum einen waren diese bei den Extrakten aus *Cyclopia sessiliflora* (169,9 und 124,7 μM) ähnlich wie bei den Extrakten aus *Cyclopia genistoides* (161,4 und 144,8 μM), zum anderen war der Gehalt an Catechinäquivalenten beim entfärbten Extrakt, korrelierend mit dem Leitsubstanzgehalt, niedriger.

Myoglobin bildet eine Pseudoperoxidase mit Wasserstoffperoxid (in Janisch et al. 2002). Bei der Reaktivität der untersuchten Substanzen kann zusätzlich von einer Hemmung dieses Komplexes ausgegangen werden. Über mögliche Struktur - Aktivitäts - Beziehungen von Polyphenolen ist bisher nichts bekannt. Aus diesem Grund wurde auf Vermutungen bezüglich der Extraktinhaltsstoffe verzichtet.

6.1.5 Xanthin / Xanthinoxidase - System; Strukturen und Aktivität

Im Xanthin / Xanthinoxidase - System werden enzymatisch Superoxidradikalanionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und, in Anwesenheit von Eisenionen, Hydroxylradikale (OH^{\bullet}) gebildet. Wie auch das OH^{\bullet} - Radikal kann $\text{O}_2^{\bullet-}$ durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe abgefangen werden (Pincemail et al. 1990; Kono et al. 1997). Eisenionen und das Enzym Xanthinoxidase bieten einen zusätzlichen Wirkort für sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in diesem Testsystem. Nach van Acker et al. (1996 (1)) und Cos et al. (1998) sind für das Abfangen von $\text{O}_2^{\bullet-}$ Hydroxylgruppen an C3' (Ring B), an C3 (Ring C) und an C5 (Ring A) und eine Oxogruppe an C4 (Ring C) von Bedeutung. Für die Koordination von Eisen gelten wie schon für das Fenton - System gezeigt, ortho - Dihydroxy - Strukturen an Ring B, eine OH - Gruppe an C5 zusammen mit einer Ketogruppe an C4, als mögliche Interaktionsstellen (van Acker et al. 1996 (1)). Die Struktur - Aktivitäts - Beziehungen für die Hemmung der Xanthinoxidase sind andere als die für das Abfangen von Superoxid. Eine Hydroxylgruppe an C5 und C7 (Ring A) scheint das katalysierende Enzym

Xanthinoxidase, durch Bindung an dessen aktives Zentrum, kompetitiv hemmen zu können (Hille and Sprecher 1987; Cos et al. 1998). Eine Doppelbindung zwischen C2 und C3 hat auch auf die Enzymhemmung einen fördernden Effekt (Cos et al. 1998). Für die Hemmung der Xanthinoxidase scheint also auch die schon erwähnte, planare Struktur des Flavonoids wichtig zu sein.

Die Reihung der Extrakte in PHASE I (GT > RO > RS > RM > HO > Trolox) zeigte, im Gegensatz zum Fenton - und Peroxynitrit - System, die Vergleichssubstanz Trolox mit schlechter antioxidativer Aktivität. Auffallend ist die überragende antioxidative Leistung des Grüntee - Extraktes, der immer dann maximale Wirksamkeit zu erzielen scheint, wenn mehrere Faktoren für die Hemmung des Systems relevant sein können. Im Xanthin / Xanthinoxidase - System bietet sich vor allem, wie auch im Fenton - System, die Möglichkeit für Catechine, Eisen zu komplexieren. Für *Aspalathus linearis* wie auch für die Rosmarinsäure sind Scavengeraktivitäten für Superoxid bekannt (Yoshikawa et al. 1990; Nakamura et al. 1998), die durch die guten Ergebnisse beider Extrakte in vorliegender Untersuchung bestätigt werden. Für das Mangiferin (Honigbusch - Extrakt) sind bei Leiro et al. 2003 Superoxidradikalfangende Eigenschaften beschrieben, im Testsystem hatte der Extrakt dann auch bessere antioxidative Eigenschaften als Trolox. Für die Carnosolsäure werden ebenfalls $O_2^{\bullet -}$ - Scavengereigenschaften beschrieben (Haraguchi et al. 1995). Auffallend ist, dass die IC_{50} - Konzentrationen aller Extrakte, die nicht überwiegend Flavonoide enthalten, wesentlich schlechter waren als die der flavonoidhaltigen Extrakte. Dies führt zu der Annahme, dass Flavonoide vor allem für die Entgiftung von Superoxidradikalanionen eine übergeordnete Rolle spielen.

Im Vergleich der Extrakte gleicher pflanzlicher Herkunft hatten beide Extrakte der Pflanze *Camellia sinensis* extrem niedrige IC_{50} - Konzentrationen ($0,35 \mu g / ml$) und damit die mit Abstand besten antioxidativen Eigenschaften in diesem komplexen Testsystem. Auch wenn hier das Abfangen von Radikalen eine nicht unbedeutende Rolle spielen mag, kann die hohe antioxidative Kapazität beider Extrakte nicht allein darauf beruhen. Catechine (Grüntee - Extrakt: 38,09; Weißtee - Extrakt: 95 %) haben bekanntermaßen sowohl Superoxid - entgiftende Eigenschaften (Wang et al. 2000; Dufresne et al. 2001) als auch die Fähigkeit zur Eisenkomplexierung. Beide Eigenschaften sind aufgrund der Gallatreste besonders ausgeprägt (Rice - Evans et

al. 1996; Miller et al. 1996) und kompensieren die Unfähigkeit der Catechine, die Xanthinoxidase kompetitiv zu hemmen (Cos et al. 1998). Allerdings ist auch eine nichtkompetitive Hemmung der Xanthinoxidase denkbar. Wesentlich wahrscheinlicher ist jedoch die Komplexbildung von Fe^{2+} . Als Indiz dafür kann die, trotz der sehr unterschiedlichen Inhaltsstoffkonzentrationen gleiche und extrem schnelle Hemmung des Systems gewertet werden.

Die IC_{50} - Konzentrationen der Extrakte aus *Aspalathus linearis* waren zwar höher als die der Extrakte aus *Camellia sinensis*, aber mit 2,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (RO); 1,25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (RO(e)) und 7,5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (RO(f)) immer noch extrem niedrig. Das Aspalathin des Rotbusch - Extraktes hat einige Strukturmerkmale, welche die sehr guten antioxidativen Eigenschaften dieses Extraktes erklären können. Aufgrund seiner ortho - Dihydroxystruktur am Ring B, seiner Hydroxylgruppe an C5 und der Oxo - Gruppe an C4 lassen sich vor allem entgiftende Eigenschaften gegenüber $O_2^{\bullet-}$ und OH^{\bullet} vermuten. Insbesondere für fermentiertes Rotbuschmaterial sind diese auch beschrieben (Yoshikawa et al. 1990; Ferreira et al. 1998 (2)). Rotbusch ist, wie schon erwähnt, bekannt dafür, dass er keine inaktiven Chelatkomplexe mit Eisen bildet (Hesseling et al. 1979; Morton 1983). Orientin, das korrespondierende Flavonoid des Aspalathins, hat an C5 und C7 (Ring A) eine OH - Gruppe und zusätzlich noch die Doppelbindung zwischen C2 und C3. Damit ist Orientin höchstwahrscheinlich in der Lage, die Xanthinoxidase zu hemmen. Folglich kann auch für das Aspalathin eine kompetitive Hemmung der XOD nicht ausgeschlossen werden. Nicht zu vergessen ist auch der mit dem Grüntee - Extrakt zu vergleichende Anteil an Catechinäquivalenten, also die hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Rotbusch - Extrakte zusätzlich zum Aspalathin eine beträchtliche Menge weiterer Polyphenole enthalten. Die Komplexität dieses Testsystems mit seinen vielen Eingriffsmöglichkeiten lässt die Schwierigkeit der Diskussion erahnen. Aspalathin könnte theoretisch an allen Angriffsmöglichkeiten im Xanthin / Xanthinoxidase - System hemmend wirken. Die Ergebnisse der unfermentierten Extrakte im Vergleich mit dem fermentierten Rotbusch - Extrakt zeigen auch hier wieder, dass die Oxidationsprodukte des Aspalathins, Orientin und Isoorientin, ebenfalls aktive Substanzen im Xanthin / Xanthinoxidase - System darstellen. Die geringen Anteile an Catechinäquivalenten und die wesentlich schlechtere Aktivität des fermentierten Rotbusch - Extraktes im X / XOD - System bestätigen die Vermutung einer fortschreitenden Oxidationsreaktion während des Fermentationsprozesses.

Die IC_{50} - Konzentrationen der vier Honigbusch - Extrakte waren gegenüber den Extrakten aus Grünem Tee und unfermentiertem Rotbusch deutlich erhöht. Für Hesperidin sind zwar radikalfangende Eigenschaften beschrieben (Sato et al. 1992; van Acker et al. 1996 (1)), aber die für die kompetitive Hemmung der Xanthinoxidase notwendige OH - Gruppe an Position 7 ist beim Hesperidin durch Rutinose blockiert. Hesperidin dürfte, nicht zuletzt wegen seiner geringen Konzentration im Extrakt eine eher untergeordnete Rolle im Xanthin / Xanthinoxidase - System spielen. Über die Wirkungsweise von Xanthonen (Mangiferin und Isomangiferin) auf die Xanthin / Xanthinoxidase - Reaktion ist nichts bekannt. Mangiferin und Isomangiferin lassen aufgrund ihrer ortho - Dihydroxygruppe und benachbarten OH - und Keto - Gruppen auf $O_2^{\bullet -}$ - und OH^{\bullet} - entgiftende Eigenschaften und die Fähigkeit zur Eisenkomplexierung schließen. Dies konnte im X / XOD - System allerdings nicht bestätigt werden, da es innerhalb der Arten keine korrelierenden Zusammenhänge zwischen den Leitsubstanzen und den Aktivitäten gab. Die Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* waren im Xanthin / Xanthinoxidase - System sowohl im Gesamtextrakt, als auch bezüglich der Leitsubstanz um ein Vielfaches wirksamer als die Extrakte aus *Cyclopia genistoides*. Dies wird als Hinweis darauf gewertet, dass Mangiferin / Isomangiferin und Hesperidin nicht die hauptsächlichen Verursacher der antioxidativen Eigenschaften dieser Extrakte im Xanthin / Xanthinoxidase - System sein können. Die Polyphenolgehalte der Honigbusch - Extrakte, gemessen in Catechinäquivalenten, zeigen, dass die Leitsubstanzgehalte der Extrakte aus *Cyclopia genistoides* in etwa mit den Polyphenolgehalten übereinstimmt (gemessen an Weisssem Tee = 95 %). Die Polyphenolgehalte der Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* bewegen sich ebenfalls in dieser Region ($\pm 150 \mu M$), obwohl die Leitsubstanzanteile um den Faktor 10 niedriger angegeben sind. Die Theorie über zusätzliche antioxidative Substanzen wird dadurch nur für die Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* unterstützt.

6.1.6 Hemmung der Lipidperoxidation im Rose - Bengal - System

Die Hemmung der Lipidperoxidation ist zum einen für den Schutz von Membranen, zum anderen für den Schutz von fetthaltigen Nahrungsmitteln und Kosmetika von übergeordneter Bedeutung. Die Lipidperoxidation wird im lipophilen Rose - Bengal - System durch Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) ausgelöst. Die entstehenden Fettsäureperoxide reagieren weiter zu Alkoxyradikalen, die im Verlauf weiter zerfallen und kupferkatalysiert Ethan und Ethen freisetzen. Die antioxidative Kapazität einer Testsubstanz kann auf Abfangen von Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Komplexierung von Kupferionen und der Unterbindung des Radikalkettenprozesses der Lipidperoxidation beruhen. Eine weitere Möglichkeit pflanzlicher Inhaltsstoffe, auf das Rose - Bengal - System Einfluss zu nehmen, ist die direkte Lichtabsorption. Dabei entsteht weniger Singulett-Sauerstoff und damit weniger Ethan. Für die Eliminierung von $^1\text{O}_2$ sind vor allem durchkonjugierte Strukturen von Bedeutung (Edge et al. 1997; Bohm et al. 2001). Die Eliminierung von Fettsäureradikalen (ROO^\bullet) und Hydroxylradikalen (OH^\bullet) durch Flavonoide setzt die schon erwähnten Strukturmerkmale (benachbarte Hydroxylgruppen an Ring B, C2 - C3 - Doppelbindung und OH - Gruppe an C3 in Ring C, weitere Hydroxylgruppen an Ring A) voraus. Für die Kupferkomplexierung durch Flavonoide sind die Übergangsmetallkomplexierenden Strukturen (OH an C3' und C4' (Ring B) und / oder eine Ketogruppe an C4 verbunden mit einer OH - Gruppe an C3 oder C5) wichtig (van Acker et al. 1996 (1)).

Die Reihung im Rose - Bengal - System (Trolox > RM > RO > GT > RS > HO) zeigt die Abhängigkeit der antioxidativen Leistung vom umgebenden Reaktionsmedium. Trolox und der Rosmarin - Extrakt waren in den hydrophilen Testsystemen nur mäßige Antioxidanzien im Vergleich zu den anderen untersuchten Extrakten, die Fettsäureperoxidation hemmten sie dagegen erheblich. Die Carnosolsäure und Vitamin E bevorzugen bekanntermaßen lipophile Medien (Hopia et al. 1996) und sind zudem für die Entgiftung von $^1\text{O}_2$ bekannt (Haraguchi et al. 1995; Aruoma et al. 1996). Vitamin E (Diplock et al. 1998), Rotbuschtee (von Gadow et al. 1997 (2)) bzw. Flavonoiden im allgemeinen wird eine inhibierende Wirkung auf den Radikalkettenprozess zugeschrieben, weshalb die beiden hydrophileren Extrakte aus *Aspalathus linearis* und *Camellia sinensis* einen deutlich stärkeren Schutz auf die Fettsäuren hatten als der Rosmarinsäure - Extrakt und der Honigbusch - Extrakt.

Im Vergleich verschiedener Extrakte derselben pflanzlichen Herkunft (PHASE II) korrelierten die Leitsubstanzgehalte mit der antioxidativen Aktivität der beiden Extrakte aus *Camellia sinensis* im System ohne Kupfer, während im kupfergetriggerten System der Weißtee - Extrakt eine unverhältnismäßig höhere Aktivität als der Grüntee - Extrakt hatte. Das Epigallocatechingallat, das einen Großteil der Leitsubstanzen beider Extrakte ausmacht, ist einmal bekannt für seine entgiftenden Eigenschaften gegenüber Radikalen (Rice-Evans et al. 1996; Arora et al. 1998) und gegenüber $^1\text{O}_2$ (Guo et al. 1999). Weiterhin sind auch kupferkomplexierende Eigenschaften beschrieben (Dufresne et al. 2000; Record et al. 2001). Daher rühren wahrscheinlich die „nur guten“ antioxidativen Eigenschaften des Grüntee - Extraktes im System ohne Kupfer, während im System mit Kupfer die Verhältnisse zwischen dem Grüntee - Extrakt und Trolox zu Gunsten des Grüntee - Extraktes verschoben waren. Deutlich zu sehen war die Kupferkomplexierung beim Weißtee - Extrakt. Daraus folgt, dass die Komplexierung von Kupfer durch die Inhaltsstoffe der Pflanze *Camellia sinensis* vor allem eine Frage der Konzentrationsverhältnisse ist.

In keiner der beiden Variationen des Rose - Bengal - Systems gab es eine Korrelation zwischen den Leitsubstanzen der Rotbusch - Extrakte und deren antioxidativen Eigenschaften. Der unfermentierte, entfärbte Extrakt war der beste der Rotbusch - Extrakte. Im System ohne Kupfer war sogar der fermentierte Extrakt (RO(f)) besser als der unfermentierte, ethanolische Extrakt RO.

Aspalathin ist kein durchkonjugiertes Molekül, daher ist eine Funktion als Singulettquencher nicht von vornherein anzunehmen. Aufgrund der vielen OH - Substituenten an Ring A und B ist ein Eingriff im Radikalkettenprozess wahrscheinlicher und durch von Gadow et al. (1997 (2)) bestätigt. Für Orientin und Isoorientin wurde eine Interaktion mit Kupfer gezeigt (Miura et al. 2002). Der fermentierte Extrakt hatte aber im System ohne Kupfer bessere antioxidative Eigenschaften als der unfermentierte Extrakt. Aufgrund der ähnlichen Strukturmerkmale des korrespondierenden Aspalathins kann von der Bildung aktiver Kupferkomplexe ausgegangen werden, inaktive Kupferkomplexe hätten eine Verschiebung des Ethan / Ethen - Verhältnisses zur Folge, was in vorliegender Untersuchung nicht gezeigt werden konnte. Ein weiterer Erklärungsansatz für die sehr hohe Effektivität der Rotbusch - Extrakte ist eventuell die Photoaktivität der

Leitsubstanzen und weiterer Inhaltsstoffe. Ein Indiz dafür war die ungewöhnliche Rotfärbung der Versuchsansätze nach der Belichtung.

Zwischen den Honigbusch - Extrakten gab es im System ohne Kupfer keine Korrelationen zu den Leitsubstanzkonzentrationen. Im System mit Kupfer korrelierten die Aktivitäten der Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* mit den Leitsubstanzen. Hesperidin und Mangiferin bzw. Isomangiferin haben Strukturmerkmale, die hauptsächlich H - Donor - Funktionen vermuten lassen. Für das Hesperitin, das Aglycon zu Hesperidin, konnte Ubeda et al. (1993) LPO - inhibierende Eigenschaften nachweisen, Hesperidin erwies sich dagegen als unwirksam. Eine Funktion als Singulettquencher könnte möglicherweise das Mangiferin mit seiner nahezu durchkonjugierten Struktur haben. Die Bildung von unlöslichen Chelatkomplexen mit Kupfer kann ausgeschlossen werden. Insbesondere für die Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* mit extrem niedrigen Leitsubstanzanteilen sind, wie bereits erwähnt, weitere aktive Substanzen zu vermuten. Auch hier bietet die Möglichkeit der Photoaktivität bzw. Pigmentkooxidation einen weiteren Erklärungsansatz für die vergleichsweise außerordentliche antioxidative Kapazität, die vor allem die Mischextrakte hatten. Das antioxidative Potenzial verschiedener polyphenolischer Substanzen, unter anderem auch von Hesperidin, unterscheidet sich je nach Extraktionsmittel (Finotti et al. 2003). Die Überlegenheit der Wasser / Ethanol - Extrakte war sowohl im System ohne Kupfer als auch im System mit Kupfer auffällig. Demnach spielt das Lösungsmittel für das Redoxverhalten aller Extrakte und ihrer Inhaltsstoffe eine fundamentale Rolle.

6.1.7 Hemmung der Lipidperoxidation in der kupferinduzierten LDL - Oxidation

Eine weitere Methode, um die Inhibierung der Lipidperoxidation zu testen, war die kupferinduzierte LDL - Oxidation. Die Besonderheit dieses Systems war die Vorinkubation des humanen Plasmas mit den Extrakten. Das anschließend isolierte LDL wurde einer kontrollierten Oxidationsreaktion unterzogen. Eine Anreicherung von antioxidativ wirksamen Substanzen im LDL zeigte sich durch eine zeitlich verzögerte Oxidationsreaktion (verlängerte Lagphase).

Die hohe antioxidative Kapazität des Rosmarin - Extraktes beruht sicherlich auf dem Hauptinhaltsstoff, der Carnosolsäure. Diese kann sich, wahrscheinlich aufgrund ihrer hohen Lipophilie, im LDL - Partikel anreichern und ihn so vor Oxidation schützen.

Dabei fängt die Carnosolsäure entweder selbst reaktive Verbindungen ab oder sie regeneriert endogen vorhandenes α - Tocopherol durch die Reduktion des α - Tocopherylradikals. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen Untersuchungen von Pearson et al. (1997), die ebenfalls die antioxidative Wirksamkeit von Carnosolsäure, allerdings innerhalb einer zellinduzierten LDL - Oxidation, nachweisen konnten.

Im Vergleich mit dem Grüntee - Extrakt schneidet der Rotbusch - Extrakt überraschend gut ab. Der Gesamtpolyphenolgehalt des Rotbusch - Extraktes zeigt, dass neben dem angegebenen Aspalathin noch andere aktive Komponenten vorhanden sind, die zum guten Ergebnis des Rotbusch - Extraktes beitragen könnten. So ist zum Beispiel eine hemmende Wirkung auf die LDL - Oxidation für Quercetin, das ebenfalls in *Aspalathus linearis* vorkommt, bekannt (Belinky et al. 1998). Die Quantität, in der Aspalathin im Extrakt vorkommt, spricht aber dafür, dass die Leitsubstanz maßgeblich an der schützenden Funktion auf den LDL - Partikel beteiligt ist.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass die schützende Wirkung von Grünem Tee auf LDL auf seinen Hauptinhaltsstoffen, den Catechinen beruht (Vinson et al. 1995, Craig 1999). Zhu et al. 1999 fanden für die Polyphenole aus Grünem Tee regenerierende Aktivität bezüglich des endogenen α - Tocopherols. Problematisch bei dem Vergleich mit der vorliegenden Untersuchungen ist, dass nur die wenigsten Arbeitsgruppen mit der oben erwähnten Vorinkubation arbeiten. Üblich ist die direkte Zugabe einer Substanz zum bereits isolierten LDL. Diese Methode zeigt zwar das Potenzial der Substanz, die Lipidperoxidation zu inhibieren, es können deshalb aber noch lange keine Aussagen über die LDL - Gängigkeit getroffen werden. Da der hohe Catechinanteil im Grüntee - Extrakt nicht ausreichte, um dieselbe Schutzfunktion auf das LDL zu bewirken, wie sie durch den Rotbusch - Extrakt vorlag, könnte an den höher kondensierten Strukturen der Catechine liegen. Diese Catechinpolymere sind wahrscheinlich aufgrund ihrer Größe nicht in der Lage, in die Lipidmatrix des LDL - Partikels einzudringen. Sie können dann auch nicht mit ihm zusammen isoliert werden, um ihn in der anschließenden Oxidationsreaktion zu schützen.

6.2 Bioverfügbarkeit von Rotbusch - Extrakt

Um die Biodynamik von Pflanzeninhaltsstoffen nach oraler Einnahme zu verstehen, ist die Kenntnis der existierenden Struktur - Aktivitäts - Beziehungen von fundamentaler Bedeutung. Zusätzlich zu den strukturellen und chemischen Eigenschaften der untersuchten Komponenten sind Absorption, Struktur und die relative Aktivität der Metaboliten determinierende Faktoren für biologische Effekte in Organismen. Untersuchungen *in vitro* stellen die antioxidative Kapazität vieler Pflanzeninhaltsstoffe unter verschiedenen Bedingungen effektiv und nachvollziehbar dar. Bis heute ist die Absorption und der Metabolismus im Menschen nur für wenige Pflanzeninhaltsstoffe gut untersucht. Für erst seit kurzem im Lebensmittelbereich verwendete Pflanzen, wie *Aspalathus linearis*, existieren weder ausreichende *in vitro* - noch *in vivo* - Untersuchungen.

Die durchgeführte Studie war nicht darauf ausgerichtet, Inhaltsstoffe aus dem Rotbusch - Extrakt im Probandenplasma zu identifizieren, sondern es stand primär die Erhöhung der antioxidativen Kapazität des Plasmas als gesundheitsfördernder Faktor im Vordergrund. Aufgrund der *in vitro* - Ergebnisse wurde versucht, durch Anreicherung der antioxidativ wirksamen Inhaltsstoffe des Rotbusch - Extraktes einen Effekt *in vivo* zu bewirken. Dafür nahmen 20 Probanden insgesamt zwei Wochen eine orale Dosis von täglich 500 mg Rotbusch - Extrakt ein. Zu Beginn und nach Beendigung der Rotbusch - Einnahme wurden Blutproben entnommen. Daraus wurden die Parameter des großen Blutbildes mit Leukozytendifferenzierung, der Harnsäuregehalt und die Blutfettwerte bestimmt. In Hinblick auf den Schutz vor Herz - Kreislauferkrankungen wurde eine *ex vivo* kupferinduzierte LDL - Oxidation mit dem aus Blutplasma isolierten LDL durchgeführt. Um den antioxidativen Status des Blutplasmas vor und nach der Rotbusch - Einnahme zu bestimmen, wurden das ABTS - und das Xanthin / Xanthinoxidase - System angewandt.

6.2.1 Blutparameter

Die Parameter des Großen Blutbildes mit Leukozytendifferenzierung sollten vor allem Aufschluss über mögliche Immunreaktionen bzw. Stimulationen durch die Einnahme des Rotbusch - Extraktes geben. Auf keinen der Parameter des Großen Blutbildes hatte die Einnahme von Rotbusch - Extrakt einen Einfluss.

Deutliche Veränderungen nach der Rotbusch - Einnahme gab es bei dem Harnsäuregehalt, der bei allen Probanden nach der Rotbusch - Einnahme niedriger war als vorher.

Der Harnsäuregehalt im Vollblut spielt bei der Ermittlung der antioxidativen Kapazität von Blutplasma eine bedeutende Rolle, da Harnsäure ein effektives Antioxidans ist (Elstner 1990). Natella et al. (2002) zeigen in einer vergleichenden Studie, dass vor allem der Harnsäuregehalt für einen erhöhten antioxidativen Status des Plasmas verantwortlich gemacht werden kann. Ein konstant erhöhter Harnsäurespiegel bedingt andererseits auch eine negative Erscheinung, er wird als Ursache für Gicht bzw. Gelenkserkrankungen angesehen (Voet 2002). Der Grund für den leicht erniedrigten Harnsäurespiegel nach der Rotbusch - Einnahme ist ungeklärt. Ein interessanter Versuchsansatz wäre, die Auswirkung des Extraktes auf Probanden mit chronisch hohem Harnsäurespiegel zu untersuchen.

Innerhalb der gemessenen Blutfettwerte waren zwar Veränderungen feststellbar, diese waren jedoch ohne einheitliche Richtung und sind damit schlecht zu diskutieren.

6.2.2 LDL - Oxidation

Die Verzögerung der Dienkonjugation in der kupferinduzierten LDL - Oxidation durch die schützende Wirkung von Rotbusch - Extrakt *in vitro* führte zu der Frage, ob sich dieses Ergebnis auch durch die orale Einnahme des Extraktes erzielen lässt. Mit dem aus Probandenplasma isolierten LDL war jedoch auch nach zweiwöchiger Einnahme von Rotbusch - Extrakt kein zusätzlicher Schutz messbar. Durch die *in vitro* - Untersuchung, in der die Isolierung des LDLs nach einer Inkubation des Extraktes mit dem Gesamtplasma stattfand, konnte die LDL - Gängigkeit der Extraktinhaltsstoffe bewiesen werden. Von einer Bioverfügbarkeit (Resorption) ausgehend, ist zu vermuten, dass die Inhaltsstoffe des Rotbusch - Extraktes zu gering konzentriert sind, um *in vivo* in den LDL - Partikel einzuwandern. Ein Oxidationsschutz des LDLs könnte auch in der näheren Umgebung des Partikels stattfinden. Um dies erfassen zu können, müsste eine Möglichkeit gefunden werden, die Dienkonjugation im Plasma zu messen.

6.2.3 Antioxidative Kapazität des Plasmas

Die antioxidative Kapazität des Plasmas war nach der Supplementierung mit Rotbusch - Extrakt im ABTS - System unverändert und im Xanthin / Xanthinoxidase - System erniedrigt. Auffallend im ABTS - System war, dass es kaum individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden gab. Diese immer gleichbleibende antioxidative Kapazität lässt vermuten, dass sich das ABTS - System für Untersuchungen mit Humanplasma nicht eignet. Möglicherweise ist die maximal einsetzbare Plasamenge nicht ausreichend, um Unterschiede im antioxidativen Status von Humanplasma im ABTS - System darzustellen.

Im Gegensatz dazu waren im Xanthin / Xanthinoxidase - System die individuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden deutlich zu sehen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich dieses Testsystem für die Untersuchung von Humanplasma grundsätzlich eignet. Die geringere antioxidative Kapazität des Plasmas nach Supplementierung mit Rotbusch - Extrakt ist nicht durch eine Veränderung des Hämoglobingehaltes oder des Proteingehaltes im Plasma (Kapitel 5.6) zu erklären. Auch ein Harnsäureeffekt kann ausgeschlossen werden, da die Abnahme der Harnsäurekonzentration im Vollblut unmöglich in diesem Maße (teilweise 100 %) Auswirkungen auf die antioxidative Kapazität des Plasmas haben kann. Nach den guten Ergebnissen des Rotbusch - Extraktes in allen *in vitro* - Untersuchungen bleibt das Ergebnis der *in vivo* - Untersuchung ungeklärt.

Kern (2003) konnte im gleichen Testsystem denselben Effekt nach Supplementierung mit einem mit Polyphenolen angereicherten Bier messen. Auch hier fand in den *in vitro* - Untersuchungen eine Hemmung des Systems statt, während das Plasma der Probanden nach Trinken des angereicherten Bieres eine Stimulation des X / XOD - Systems bewirkte.

Möglicherweise handelt es sich bei dem beobachteten Effekt nur um eine scheinbare Verschlechterung der antioxidativen Kapazität und die Ergebnisse zeigen eine Interaktion zwischen dem Xanthin / Xanthinoxidase - System und Serumalbumin, welches für seine antioxidative Wirksamkeit bekannt ist. Bekannt ist außerdem, dass Polyphenole assoziativ an HSA (Human Serum Albumine) gebunden werden können (Dangles et al. 2001). Wenn sich dies auf die Polyphenole des Rotbusch - Extraktes übertragen ließe, kann folgende Hypothese formuliert werden: *Offenbar wird durch die Beladung von Serumalbuminen mit Inhaltsstoffen des Rotbusch - Extraktes deren eigene antioxidative Kapazität maskiert. Dadurch ergibt sich eine scheinbare*

Verschlechterung der antioxidativen Kapazität des Blutplasmas nach der Supplementierung mit Rotbusch - Extrakt im Vergleich zu vorher.

Eine weitere Hypothese beruht auf Erkenntnissen von Princen et al. (1998) und Kimura et al. (2002), die für Polyphenole aus *Camellia sinensis* ebenfalls eine Erniedrigung des antioxidativen Status in Humanplasma fanden, wobei die Gehalte an α - Tocopherol sanken (Princen et al. 1998).

Möglicherweise werden durch die Einnahme großer Mengen an Rotbusch - Extrakt die endogenen Antioxidanzien im Plasma erniedrigt. Dies erklärt aber nicht den geringeren Gehalt an Antioxidantien im Plasma, da die Inhaltsstoffe des Rotbusch - Extraktes die entstandene Lücke auffüllen müssten. Diese Hypothese ist nur tragbar, wenn man davon ausgeht, dass die Halbwertszeiten der Inhaltsstoffe des Rotbusch - Extraktes so gering sind, dass diese nach zwölf Stunden bereits verstoffwechselt sind, denn die zweite Blutabnahme erfolgte erst am Morgen nach der letzten Extrakt - Einnahme.

Beide Hypothesen zeigen den Aufklärungsbedarf des Effektes im Xanthin / Xanthinoxidase - System, denn seine Erklärung könnte bedeuten, dass dieses Testsystem ein Werkzeug darstellt, mit dem sehr sensibel die Bioverfügbarkeit von Polyphenolen nachgewiesen werden kann.

7 Zusammenfassung

Ziel des Projektes war die Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften verschiedener pflanzlicher Extrakte, die das Adalbert - Raps - Zentrum für Arznei- und Gewürzpflanzenforschung zur Verfügung stellte. Um die verschiedenen Wirkmöglichkeiten antioxidativer Substanzen ausreichend darstellen zu können, wurden unterschiedliche biochemische *in vitro* Testsysteme herangezogen. Diese simulieren relevante Schlüsselreaktionen pathophysiologischer Situationen, aber auch oxidative Prozesse in Lebensmitteln und Kosmetika.

Die erste Projektphase diente vor allem der Sondierung. Es wurden sechs verschiedene Extrakte in mehreren biochemischen *in vitro* - Testsystemen untersucht. Weiterhin wurden zwei Emulgatoren (Lösungsvermittlern) miteinander verglichen. Der Rotbusch - Extrakt hatte im Vergleich zu den anderen Pflanzenextrakten eine unerwartet hohe Aktivität, die mit dem bekannt guten antioxidativen Potenzial des Grünen Tees vergleichbar war. Der Rosmarinsäure - und der Honigbusch - Extrakt hatten, verglichen mit dem Grüntee - und dem Rotbusch - Extrakt, zwar geringere, aber im Vergleich zu Trolox immer noch beachtliche antioxidative Eigenschaften. Der hauptsächlich Carnosolsäure enthaltende Rosmarin - Extrakt zeigte im hydrophilen Milieu nur ein geringes antioxidatives Potenzial. Im lipophilen Reaktionsmilieu dagegen besaß er, verglichen mit den anderen Pflanzenextrakten, das höchste Potenzial, reaktive Verbindungen abzufangen. Der Emulgator Sternnyolk förderte, im Vergleich zu Tween80, bis auf wenige Ausnahmen, die antioxidativen Eigenschaften der Extrakte. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf des Projektes mit Sternnyolk gearbeitet. Die interessanten Ergebnisse des Rotbusch - Extraktes und des Honigbusch - Extraktes im Vergleich mit dem Grüntee - Extrakt und Trolox in fast allen Testsystemen führten zur zweiten Projektphase. Ziel war, die Extraktionsmethode zu optimieren, wodurch eine Vielzahl von Extraktvarianten aus *Aspalathus linearis*, *Cyclopia spec.* und *Camellia sinensis* untersucht wurden, die sich in erster Linie in ihren Leitsubstanzgehalten unterschieden. Diese unterschiedlichen Gehalte an Substanzen und die Wirkung der Extrakte in den biochemischen Testsystemen bildeten die Basis für eine wissenschaftliche Diskussion über Struktur - Aktivitäts - Beziehungen. Aus der Pflanze *Camellia sinensis* wurde ein Weißtee - Extrakt und ein Grüntee - Extrakt gewonnen. Beide Extrakte zeigten sehr gute antioxidative Eigenschaften in allen

ausgesuchten biochemischen *in vitro* - Testsystemen. Hervorzuheben sind aber die ausgezeichneten Eigenschaften des Extraktes aus Weißem Tee, die in engem Zusammenhang mit seinem hohen Catechingehalt stehen. Der Extrakt aus fermentiertem Rotbuschmaterial ließ eine deutliche Aktivitätsminderung gegenüber den Extrakten aus unfermentiertem Rotbuschmaterial erkennen, welche als ausgezeichnete Allrounder bezüglich ihrer antioxidativen Kapazität bezeichnet werden können. Dies deutet darauf hin, dass die antioxidative Kapazität der Rotbusch - Extrakte von ihrer Leitsubstanz, dem Aspalathin, abhängt. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass die Fermentationsprodukte des Aspalathins ebenfalls antioxidative Kapazität besitzen müssen. Die Extrakte aus *Cyclopia genistoides* erlaubten einen direkten Vergleich der Extraktionsmethoden. Teilweise war eine Korrelation zwischen Aktivität und lösungsmittelabhängigen Inhaltsstoffanteilen zu verzeichnen. Die Extrakte aus *Cyclopia sessiliflora* hatten, trotz wesentlich geringeren Inhaltsstoffkonzentrationen, ähnliche bis bessere antioxidative Eigenschaften verglichen mit den Extrakten aus *Cyclopia genistoides*. Dies deutet auf zusätzliche antioxidativ wirksame, aber noch unbekannt Substanzen in diesen Extrakten hin.

Aus den Untersuchungen der zweiten Phase wurde ein Extrakt aus *Aspalathus linearis* etabliert, der aus kommerziellem und wissenschaftlichem Interesse heraus in einer Interventionsstudie zur Bioverfügbarkeit eingesetzt wurde. Dabei handelte es sich um einen Selbstversuch mit 20 Probanden, die sich in zwei Gruppen aus je zehn Rauchern (fünf Männer, fünf Frauen) und zehn Nichtrauchern (vier Männer, sechs Frauen) gliederten. Nach einer Woche antioxidanzienarmer „Diät“ wurde, verbunden mit einer ersten Blutabnahme, die 14 - tägige Supplementierung mit 2 x 250 mg / Tag unfermentiertem Rotbusch - Extrakt begonnen. Zusätzlich zur Bestimmung der verschiedenen Blutparameter vor und nach Einnahme von Rotbusch - Extrakt wurde Probandenplasma aufbereitet und in drei ausgewählten biochemischen *in vitro* - Testsystemen eingesetzt. Die bisher erhaltenen Ergebnisse bringen weitere interessante Fragestellungen mit sich: im antioxidativen Status des Probandenplasmas waren bei einem der drei ausgewählten biochemischen Testsysteme (Xanthin / Xanthinoxidase) hochsignifikante Unterschiede vor und nach Einnahme von Rotbusch - Extrakt vorhanden. Unklar ist zu diesem Zeitpunkt jedoch die Ursache und damit die Bedeutung dieses Befundes.

8 Literatur

- ACKER VAN, S.A.B.E., BERG VAN DEN, D.-J.; TROMP, M.N.J.L; GRIFFIOEN, D.H.; BENNEKOM VAN, W.P.; VIJGH VAN DER, W.J.F.; BAST, A. *Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids*. In *Free Radical Biology & Medicine* **20** (3) (1996 (1)): 331 - 342
- ACKER VAN, S.A.B.E.; GROOT DE M.; BERG VAN DEN, D.-J.; TROMP, M.N.J.L; DONNE-OP DEN KELDER, G.; VIJGH VAN DER, W.J.F.; BAST, A. *A quantum Chemical Explanation of the Antioxidant Activity of Flavonoids*. In *Chemical Research and Toxicology* **9** (1996 (2)): 1305 - 1312
- ANDERSON, D.; PHILLIPS, B.J.; YU, T.-W.; EDWARDS, A.J.; AYESH, R.; BUTTERWORTH, K.R. *The Effects of Vitamin C Supplementation on Biomarkers of Oxygen Radical Generated Damage in Human Volunteers With "Low" or "High" Cholesterol Levels*. In *Environmental and Molecular Mutagenesis* **30** (1997): 161 - 174
- AQUINO, R; MORELLI, S.; TOMAINO, A.; PELLEGRINO, M.; SAIJA, A.; GRUMETTO, L.; PUGLIA, C.; VENTURA, D.; BONINA, F. *Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids*. In *Journal of Ethnopharmacology* **79** (2002): 183 - 191
- ARORA, A. MURALEEDHARAN G.N.; STRASBURG, G.M. *Structure-Activity Relationships for antioxidant Activities of a series of Flavonoids in a liposomal System*. In *Free Radical Biology & Medicine* **24** (9) (1998): 1355 - 1363
- ARUOMA, O. I., SPENCER, J. P. E., ROSSI, R., AESCHBACH, R., KHAN, A., MAHMOOD, N., MUNZOZ, A., MURCIA, A., BUTLER, J., HALLIWELL, B. *An Evaluation of the Antioxidant and Antiviral Action of Extracts of Rosemary and Provençal Herbs*. In *Food and Chemical Toxicology* **34** (1996): 449 - 456.
- BELINKY, P.A.; AVIRAM, M.; FUHRMAN, B.; ROSENBLAT, M.; VAYA, J. *The antioxidative effects of the isoflavan glabridin on endogenous constituents of LDL during its oxidation*. In *Artherosclerosis* **137** (1) (1998): 49 - 61
- BERMOND, P. *Biological effects of food antioxidants*. In *Food Antioxidants* (edited by B.J.F. Hudson) London: Elsevier Applied Science (1990): 193 - 251

- BOHM, F.; EDGE, R.; BURKE, M.; TRUSCOTT, T.G. *Dietary uptake of lycopene protects human cells from singlet oxygen and nitrogen dioxide - ROS components from cigarette smoke.* In *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **64** (2001): 176 - 178
- BORS W.; MICHEL, C. *Antioxidant capacity of flavonols and gallate esters: pulse radiolysis studies.* In *Free Radical Biology & Medicine* **27** (11/12) (1999): 1413 - 1426
- BORS, W.; MICHEL, C. AND STETTMAIER, K. *Structure - Activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols.* In *Methods of Enzymology* (Packer L. ed.) **335** (2001): 166 - 180
- BRAMATI, L.; AQUILANO, F.; PIETTA, P. *Unfermented rooibos tea: quantitative characterization of flavonoids by HPLC-UV and determination of the total antioxidant activity.* In *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **51** (25), Dec 3 (2003): 7472 - 7474
- BUSHMAN, J.L. *Green tea and cancer in humans: a review of literature.* In *Nutrition and Cancer.* **31** (3) (1998): 151 - 159
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR R.L. *Antioxidant and Prooxidant behaviour of Flavonoids: Structure-Activity Relationships.* In: *Free Radical Biology & Medicine,* **22** (5) (1997): 749 - 760
- CHEN, Z-Y; WANG, L-Y; CHAN, P.T ; ZHANG, Z.; CHUNG, H.Y.; LIANG, C. *Antioxidative activity of green tea catechin extract compared with that of rosemary extract* In *Journal of the American Oil Chemists' Society* **75** (1998): 1141 - 1145
- COS, P.; YING, L.; CALOMME, M.; HU, J.P.; CIMANGA, K.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; VLIETINICK, A.J.; VAN DEN BERGH; D In: *Strukture-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxid Scavengers.* In *Journal of Natural Production* **61** (1998): 71 - 76
- COTELLE, N.; BERNIER, J-L, CATTEAU, J-P; POMMERY, J.; WALLET, J-C GAYDOU, E.M. *Antioxidant Properties of Hydroxy-Flavones.* In: *Free Radical Biology & Medicine* **20** (1) (1996): 35 - 43
- CRAIG, W.J. *Health-promoting properties of common herbs.* In *American Journal of Clinical Nutrition* **70** (Suppl 3) (1999): 41S - 49S

- CUVELIER, M.E.; BONDETY, V.; BERSET, C. *Behavior of phenolic antioxidants in a portioned medium: Structure-activity relationship*. In *Journal of the American Oil Chemists' Society* **77** (2000): 819 - 823
- DANGLES, O.; DUFOUR, C.; MANACH, C.; MORAND, C. AND REMESY, C. *Binding of flavonoids to plasma proteins*. In *Methods in Enzymology* (Packer, L. ed.) Vol. **335** (2001): 319 - 333
- DEL BANO, M.J.; LORENTE, J.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCIA, O.; DEL RIO, J.A.; ORTUNO, A.; QUIRIN, K-W; GERARD, D. *Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of Rosmarinus officinalis. Antioxidant Activity*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** (2003): 4247 - 4253
- DIPLOCK, A.T.; CHARLEUX, J.-L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F.J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VINA-RIBES, J. *Functional food science and defense against reactive oxidative species* In *British Journal of Nutrition* **80** (1998): 77 - 112
- DUFRESNE, C.J.; FARNWORTH, E.R. *A review of latest research findings on the health promotion properties of tea*. In *Journal of Nutritional Biochemistry* **12** (2001): 404 - 421
- DZIEDZIC S.Z.; HUDSON, B.J.F.; and BARBES, G. *Polyhydroxydihydrochalcones as Antioxidants for Lard* In *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **33** (1985): 244 - 246
- EDGE, R.; GARVEY MC, D.J.; TRUSCOTT, T.G. *The carotenoids as anti-oxidants - a review*. In *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **41** (1997): 189 - 200
- ELSTNER, E. F. *Der Sauerstoff. Biochemie, Biologie, Medizin*; BI Wissenschaftsverlag: Mannheim, Germany, 1990
- ELSTNER, E.F. *Sauerstoffabhängige Erkrankungen und Therapien*. (Ed. Elstner) BI Wissenschaftsverlag, Mannheim (1993)
- ESTERBAUER, H.; STRIEGL, G.; PUHL, H. AND ROTHENEDER, M. *Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low-density lipoprotein*. In *Free Radical Research Communications* **6(1)** (1989): 67 - 75

- FERNANDEZ, M.TEREZA; MIRA M. LURDES; FLORENCIO M. HELENA; JENNINGS, KEITH R. *Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study*. In *Journal of Inorganic Biochemistry* **92** (2002) 105 - 111
- FERREIRA, D.; KAMARA, B.I.; BRANDT, E.V.; JOUBERT, E. *Phenolic compounds from *Cyclopia intermedia* (Honeybush Tea)*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** (1998 (1)): 3406 - 3410
- FERREIRA, D.; MARAIS, C.; STEENKAMP J.A.; JOUBERT, E. *Rooibos tea as a likely health food supplement*. [Http://www.redbushtea.com /chemistry/researchpaper.html](http://www.redbushtea.com/chemistry/researchpaper.html) (1998 (2))
- FINOTTI, E.; DI MAJO, D. *Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids*. In *Nahrung*. **47** (3) (2003): 186 - 187
- FRANKEL, E. N.; HUANG. S.-W.; KANNER, J.; GERMAN, J.B. *Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oil vs emulsions*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42** (1994): 1054 - 1059
- FRANKEL, E. N.; HUANG. S.-W; PRIOR, E.; AESCHBACH, R. *Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions*. In *Journal of Science, Food and Agriculture* **72** (1996): 201 - 208
- FUHRMANN, B.; VOLKOVA, N.; ROSENBLAT, M.; AVIRAM, M. *Lycopene Synergistically Inhibits LDL Oxidation in Combination with Vitamin E, Glabridin, Rosmarinic Acid, Carsonic Acid, or Garlic*. In *Antioxidants & Redox Signaling* **2** (3) (2000): 491 - 506
- GUO, Q.; ZHAO, B.; SHEN, S.; HU, J.X.W. *ERS study on the structure-antioxidant-activity relationship of tea catechins and their epimers*. In *Biochemic et Biophysic Acta* **1427** (1999): 13 - 23
- HAENEN, G.R.M.M.; PAQUAY, J.B.G.; KORTHOUWER, R.E.M.; BAST, A. *Peroxy-nitrite Scavenging by Flavonoids*. In *Biochemistry and Biophysics Research Communications* **236** (1997): 591 - 593
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; *Free radicals, other reaktive species and disease*. In *Free Radical Biology & Medicine*; Oxford University Press: Oxford, UK (1999): 617 - 748.

- HARAGUCHI, H.; SAITO, T.; OKAMURA, N.; YAGI, A. *Inhibition of Lipid Peroxidation and Superoxide Generation by Diterpenoids from Rosmarinus officinalis* In *Planta Medica* **61** (1995): 333 - 336
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRI, A. R.; BOBILYA, D. J. *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships* In *Journal of Nutrition and Biochemistry* **10** (2002): 572 - 584
- HEISER I.; OSWALD. W.F.; ELSNER, E.F. *Photodynamic Ethane and Ethylene Formation from α - Linolenic Acid Catalysed by Cytokinins and Copper Ions.* In *Journal of Plant Physiology* **152** (1998): 230 - 234
- HEß, D. *Pflanzenphysiologie* Stuttgart: Ulmer, 1991, 9. Auflage
- HESSELING, P.B.; KLOPPER, J.F., VAN HEERDEN, P.D. *The effect of Rooibos tea on iron absorption.* In *South African Medical Journal* **55** (16) (1979): 631 - 632
- HILLE, R.; SPRECHER, H. *On the mechanism of action of xanthine oxidase.* In *Journal of Biological Chemistry* **262** (1987): 10914 - 10917
- HIPPELI, S.; DORNISCH, K; BRINK, M.; LORENZ, R.; JESCHKE, D.; ELSTNER, E.F. *Attenuation of Blood Parameters in Smokers and Non-Smokers after Intake of a Complex Food Additive.* In *Zeitschrift für Naturforschung* **58c** (2003) 119 - 127
- HIPPELI, S.; ELSTNER, E. F. *OH-radical-type reactive oxygen species: A short review on the mechanisms of OH-radical- and peroxy nitrite toxicity.* In *Zeitschrift für Naturforschung* **52 c** (1997): 555 - 563
- HIPPELI, S.; ROHNERT, U.; KOSKE, D. AND ELSTNER, E.F. *OH-radical-type reactive oxygen species derived from superoxide and nitric oxide: a sensitive method for their determination and differentiation.* In *Zeitschrift für Naturforschung* **52c** (1997): 564 - 570
- HIPPELI, S.; ROHNERT, U.; KOSKO, D.; ELSTNER, E. F. *Free radicals in pathogenesis: health promoting functions of plant- and milk-derived antioxidants.* In *Monatsschrift Kinderheilkunde* **146** (Suppl 1) (1998): 63 - 72
- HOGG, N.; JOSEPH, J.; KALYANARAMAN, B. *The oxidation of alpha - tocopherol and trolox by peroxy nitrite.* In *Archives of Biochemistry and Biophysics* **314** (7) (1994): 153 - 158

- HOLLMAN P.C.; BIJSMAN M.N.; VAN GAMEREN, Y.; CNOSSEN E.P.; DE VRIES J.H.; KATAN M.B. *The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man*. In *Free Radical Research* **6** (1999): 569 - 573
- HOLLMAN P.C.; KATAN, M.B. *Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man*. In *Archives of Toxicology Supplements* **20** (1998): 237 - 248
- HOLLMAN P.C.; VAN TRIJP, J.M.; MENGELERS, M.J.; DE VRIES, J.H.; KATAN, M.B. *Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man*. In *Cancer Letters* **114** (1-2) (1997): 139 - 140
- HOPIA, A.; HUANG, S.W.; FRANKEL, E.N. *Effect of alpha-tocopherol and Trolox on the decomposition of methyl linoleate hydroperoxides*. In *Lipids*. **31**(4) (1996): 357 - 365
- HRAS, A. R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMANN, D. *Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -Tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil*. In *Food Chemistry* **71** (2000): 229 - 233.
- HURRELL, R.F.; REDDY, M.; COOK, J.D. *Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic containing beverages*. In *British Journal of Nutrition* **81** (1999): 289 - 295
- JANISCH, K. *Antioxidant abilities of human plasma, buckwheat extracts and fractions, and quercetin metabolites in different biochemical assays* Dissertation an der Technischen Universität München (2003)
- JANISCH, K.; MILDE, J.; SCHEMPP, H.; ELSTNER, E.F. in A. Augustin (ed.) *Nutrition and the eye* Karger Verlag, Basel, Schweiz (2004)
- JOUBERT, E. *Processing of rooibos tea under controlled conditions (Aspalathus linearis)*. Ph.D. Dissertation, University of Stellenbosch, Stellenbosch (1994): 1 - 26
- JOUBERT, E.; FERREIRA, D. *Antioxidants of Rooibos tea - a possible explanation for its health promoting properties?* In *The South African Journal of Food Science and Nutrition* **8** (1996): 79 - 83.
- KAMARA, B.I.; BRANDT, E.V.; FERREIRA, D.; JOUBERT, E. *Polyphenols from Honeybush tea* In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(13) (2003): 3874 - 3879

- KASHIMA M. *Effects of catechins on superoxide and hydroxyl radical*. In *Chemical Pharmaceutical bulletin (Tokyo)* **47 (2)** (1999): 279 - 283
- KERN, S. *Untersuchungen zur antioxidativen Kapazität von Bier und Bierinhaltsstoffen sowie zu Absorption und Metabolismus von Hydroxymethylsäuren im Menschen*. Dissertation an der Technischen Universität München (2003)
- KERRY, N.; RICE-EVANS, C. *Peroxynitrite oxidizes catechols to o - quinones*. In *FEBS Letters* **437** (1998): 167 - 171
- KOEPPEN, B.H.; ROUX, D.G. (1966): *The chemistry of Aspalathin*. In *Biochemical Journal* **99** (1966): 604 - 609
- KOHEN, R. *Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation*. In *Biomedical & Pharmacological therapies* **53** (1999): 181 - 92
- KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; TAGAWA, S.; ADACHI, K.; UEDA, A.; SAWA, Y.; SHIBATA, H. *Antioxidant activity of polyphenolics in diets: Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen*. In *Biochemic Biophysic Acta* **1335** (1997): 335 - 342
- LEE M.-J.; MALIAKAL, P.; CHEN, L.; MENG, X.; BONDOC, F.Y.; PRABHU, S.; LAMBERT, G.; MOHR, S.; YANG, S. *Pharmacokinetics of Tea catechins after Ingestion of Green Tea and (-)-Epigallocatechin-3-gallate by Humans: Formation of Different Metabolites and Individual Variability*. In *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **11** (2002): 1025 - 1032
- LEIRO, J.M.; ALVAREZ, J.A.; SISO, I.G.; ORLLO, F. *In vitro effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta genes*. In *Biochemistry and Pharmacology* **65** (8) (2003): 1361 - 1371
- MARNEWICK, J.; SNIJMAN, P. *Anyone for tea?* Internet (1999): <http://www.mrc.ac.za/mrcnews/novem99/tea.htm>
- MASUDA, T.; INABA, Y.; TAKEDA, Y. *Antioxidant mechanism of Carnosic Acid: Structural Identification of Two Oxidation Products*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** (2001): 5560 - 5565

- MATHIESEN, L.; MALTERUD K.E.; SUND, R.B. *Hydrogen bond formation as basis for radical scavenging activity: a structure activity study of C-methylated dihydrochalcones from Myrica gale and structurally related acetophenones*. In *Free Radical Biology & Medicine* **2** (1997): 307 - 311
- MILDE, J.; ELSTNER, E.F.; GRABMANN, J. *Synergistic inhibition of low-density lipoprotein by rutin, γ -terpinen, and ascorbic acid* In *Phytomedicine* **11(2)** (2004): 105 - 113
- MILLER, N.J.; CASTELLUCCIO, C.; TIJBURG, L.; RICE-EVANS, C. *The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters - radical scavengers or metal chelators?* In *FEBS Letters* **392** (1996): 40 - 44
- MIURA, Y.; CHIBA, T.; MIURA, S.; TOMITA, I.; UMEGAKI, K.; IKEDA, M.; TOMITA, T. *Green tea polyphenols (flavan 3-ols) prevent oxidative modification of low density lipoproteins: An ex vivo study in humans*. In *Journal of Nutrition and Biochemistry*. **11** (2000): 216 - 222.
- MORAN, J.S.; KLUCAS, R.V.; GRAYER, R.J.; ABIAN, J.; BECANA, M. *complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties*. In *Free Radical Biology & Medicine* **22(5)** (1997): 861 - 870
- MOREL I.; LESCOAT, G.; CILLARD, P.; CILLARD, J. *Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action*. In *Methods of Enzymology* **234** (1994): 437 - 443
- MORTON J.F. *Rooibos tea, Aspalathus linearis, a caffeineless, low tannin beverage*. In *Economic Botany*, **37** (1983): 164 - 173
- NAKAGAWA, K.; NINOMIYA, M.; OKUBO, T.; AOI, N.; JUNEJA, L.R.; KIM, M.; YAMANAKA, K.; MIYAZAWA, T. *Tea Catechin Supplementation Increases Antioxidant Capacity and Prevents Phospholipid Hydroperoxidation in Plasma of Humans*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** (1999): 3967 - 3973
- NAKAMURA, Y.; OHTO, Y.; MURAKAMI, A.; AND OHIGASHI, H. *Superoxide Scavenging activity of Rosmarinic Acid from Perilla frutescens Britton var. acuta f. viridis*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46** (1998): 4545 - 4550
- NATELLA, F.; NARDINI, M.; GIANNETTI, C.D. AND SCACCINI, C. *Coffee Drinking Influences plasma Antioxidant Capacity in Humans*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** (2002): 6211 - 6216

- OLTHOF M.R.; HOLLMAN P.C.; VREE T.B.; KATAN M.B. *Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans*. In *Journal of Nutrition* **130(5)** (2000): 1200 - 1203
- PANNALA, S. A.; RAZAQ, R.; HALLIWELL, B.; RICE-EVANS, C. *Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation?* In *Free Res boil Med* **24** (1998): 597 - 606
- PANNALA, S. A.; RICE-EVANS, C.; HALLIWELL, B.; SINGH, S. *Inhibition of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration by catechin polyphenols*. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* **232** (1997): 164 - 168
- PAQUAY, J.B.G.; HAENEN, G.R.M.M.; STENDER, G.; WISEMAN, S. A.; TIJBURG, L.B.M. BAST, A. *Protection against Nitric Oxide Toxicity by Tea*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48** (2000): 5768 - 5772
- PATEL, R.P.; BOERSMA, B.J.; CRAWFORD, J.H.; HOGG, N.; KIRK, M.; KALYANARAMAN, B.; PARKS, D.A.; BARNES, S.; DARLEY-USMAR, V. *Antioxidant Mechanisms of Isoflavones in Lipid Systems: Paradoxical effects of Peroxyl Radical Scavenging*. In *Free Radical Biology & Medicine* **31** (12) (2001): 1570 - 1581
- PEARSON, D.A.; FRANKEL, E.N.; AESCHBACH, R.; GERMAN, J.B. *Inhibition of Endothelial Cell-Mediated Oxidation of Low-Density Lipoprotein by Rosemary and Plant Phenolics*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** (1997): 578 - 582.
- PIETTA, P.G. *Flavonoids as Antioxidants*. In *Journal of Natural Products* **63** (2000): 1035 - 1042
- PINCEMAIL, J.; DEBY, C.; DRIEU, K.; ANTON, R.; GOUTIER, R. *Flavonoids as «antioxidants»*. In *Flavonoids in Biology and Medicine III* (1990): 161 - 179
- PLUMB, G.W.; PRICE, K.R. AND WILLIAMSON, G. *Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea*. In *Redox Report* **4** (1/2) (1998): 13 - 16
- PRINCEN, H.M.G.; VAN DUYNENVOORDE, W.; BUYTENHEK, R.; BLONK, C.; TIJBURG, L.B.M.; LANGIUS, J.A.E.; MEINDERS, A.E.; PIJL, H. *No Effect of Consumption of Green and Black Tea on Plasma Lipid and antioxidant Levels and on LDL Oxidation in Smokers*. In *Arterioscler Thromb vasc boil*. **18** (1998): 833 - 841

- PRIOR, L.R.; CAO, G. *Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: Implications for altering in vivo antioxidant status*. In *P.S.E.B.M.* **220** (1999): 255 - 261
- RECORD, I. R.; LANE, J. M. *Simulated intestinal digestion of green and black teas*. In *Food Chemistry* **73** (2001): 481 - 486
- RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. *Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids*. In *Free Radicals Biology & Medicine* **20** (7) (1996): 933 - 956
- ROGINSKY, V.A. *Effectiveness of lipid- and water-soluble phenolic antioxidants in the autoxidation of polyunsaturated fatty acids esters in microheterogeneous solutions*. In *Biological Membranes* **4** (1990): 437 - 451
- RUBEN, C.; LARSSON, K. *Relation between antioxidant effect of α - Tocopherol and emulsion structure*. In *Journal of Dispersion Science and Technology* **6** (1985): 213 - 221
- SALAH, N., MILLER, N.J., PAGANGA, G., TIJBURG, L., BOLWELL, G.P., RICE-EVANS, C. ; *Polyphenolic flavonols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants*. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* **322** (1995): 339 - 346
- SAMMAN, S.; SANDSTRÖM, B.; TOFT, M.B.; BUKHAVE, K.; JENSEN, M.; SORENSEN, S.S.; HANSEN, M. *Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme iron absorption*. In *American Journal of Clinical Nutrition* **73** (2001): 607 - 612
- SAMMAN, S.; SIVARAJAH, G.; MAN, J.C.; AHMAD, Z.I.; PETOCZ, P.; CATERSON, I.D. *A mixed Fruit and Vegetable Concentrate increases Plasma Antioxidant Vitamins and Folate Plasma Homocysteine in Men*. In *Journal of Human Nutrition and Metabolism* **133** (2003): 2188 - 2193
- SANTANA-RIOS, G.; ORNER, G.A.; AMANTANA, A.; PROVOST, C.; WU, S.-Y.; DASHWOOD, R.H. *Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay*. In *Mutation Research* **495** (2001): 61 - 74
- SATO, T.; KAWAMOTO, A.; TAMURA, A.; TATSUMI, Y.; FUJII, T. *Mechanism of antioxidants action of pueraria glycoside (PG)-1 (an isoflavonoid) and mangiferin (a xanthonoid)*. In *Chemical and Pharmaceutical Bulletins Tokyo* **40**(3) (1992): 721 - 724

- SCHEMP, H.; WEISER, D.; ELSTNER, E.F. *Biochemical Model Reactions Indicative of Inflammatory Processes* In *Arzneimittelforschung / Drug Research* **50** (I), 4 (2000) 362 - 372
- SCHULZ, H.; STEUER, B.; SCHÜTZ, W. *Rotbusch-Tee*. In *Deutsche Apotheker Zeitung* **33** (2000):47 - 53
- SCHWARZ, K. TERNES, W. *Antioxidative Constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis*. (I - III) In *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* **195** (1992): 95 - 98
- SHAHIDI, F. & WANASUNDRA, P.K.J. *Phenolic antioxidants*. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition **32** (1992) 67 - 103
- SMITH, C.; HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. *Protection by albumin against the Pro-oxidant actions of phenolic dietary components*. In *Food Chemistry and Toxicology* **30(6)** (1992): 483 - 489
- SNYCKERS, F.O.; SALEMI, G. *Studies of south african medical plants. Part I: Quercetin as the major in vitro active component of Rooibos tea*. In *Journal of South African Chemistry Institution* **27** (1)(1974): 5 - 7
- 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*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** (2001): 114 - 117
- UBEDA, A.; MONTESINOS, C.; PAYA, M.; ALCARAZ, M.J. *Iron reducing and free - radical - scavenging properties of apomorphine and some related benzyloquinolines* In *Free Radical Biology & Medicine* **15 (2)** (1993):159 - 162
- UEDA, J.; SAITO, N.; SHIMAZU, Y.; OZAWA, T. *A comparison of scavenging abilities of antioxidants against hydroxyl radicals*. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* **333** (2) (1996): 337 - 384
- VAN DEN BERG R.; VAN VLIET, T; BROEKMANS, W.M.R.; CNUBBEN, N.H.P.; VAES, W.H.J.; ROZA, L.; HAENEN, G.R.M.M.; BAST, A.; VAN DEN BERG, H. *A Vegetable/Fruit Concentrate with High Antioxidant Capacity Has No Effekt on Biomarkers of Antioxidant Status in Male Smokers*. In *Journal of Human Nutrition and Metabolism* **131** (2001): 1714 – 1722

- VERNON, L.; SINGLETON, R.O.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. *Analysis of total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent*. In *Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants, Part A, Vol 299* edited by Lester Packer, University of California (1998): 152 - 178
- VINSON, J.A.; DABBAGH, Y.; SERRY, M.; JANG, J. *Plant flavonoids, especially tea flavonols are powerful antioxidants using in vitro oxidation model for heart disease*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43** (1995): 2800 - 2802
- VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. *Fundamentals of Biochemistry / Upgrade Edition (Lehrbuch der Biochemie)* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim Ausgabe 2002
- VON GADOW, A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C.F. *Comparison of the activity of rooibos tea (Aspalathus linearis) with green, oolong and black tea*. In *Food Chemistry* **60** (1)(1997 a): 73 - 77
- VON GADOW, A; JOUBERT, E. AND 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* In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45** (1997 b): 632 - 638
- WANG, H.; PROVAN, G.J.; HELLIWELL, K. *Tea flavonoids: their function, utilisation and analysis*. In *Trends in Food Science & Technology* **11** (2000): 152 - 160
- YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M.; *Stabilisation of edible oils with natural antioxidants*. In *European Journal of Lipid Science and Technology* **103** (2001): 752 – 767
- YOSHIKAWA, T.; NAITO, Y.; OYAMADA, H.; UEDA, S.; TANIGAWA, T.; TAKEMURA, T.; SUGINO, S.; KONDO, M. *Scavenging effects of Aspalathus linearis (Rooibos tea) on active oxygen species*. In *Antioxidants in Therapy and Preventive medicine* (Eds: Emerit, Packer, Anclair); Plenum Press, New York (1990): 171 - 174
- ZHU, Q.Y.; HUANG, Y; TSANG, D.; CHEN, Z.Y. *Regeneration of alpha - tocopherol in human low - density lipoproteins by green tea catechins*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47** (1999): 2020 - 2025

9 Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Wiebke Sauter, geb. Burghard

geboren am 27.02.1973 in Hamburg

Familienstand: verheiratet, zwei Kinder (20.04.1998 und 11.01.2004)

Schulbildung

1979 - 1983: Grundschule in Braunschweig, Neu - Ulm und Marburg

1983 - 1993: Gymnasium in Marburg und Memmingen

Abschluß: allgemeine Hochschulreife

Diplom / Studium

1993 - 1999: Biologiestudium an der Universität Ulm

Abschluß: Diplom mit der Gesamtnote „sehr gut“, Thema der Diplomarbeit:
„Paarungsbiologie und Verhaltensökologie cyclopoider Copepoden (Cyclopidae)“

wissenschaftlicher Werdegang

- April 1999 bis Mai 2000: wissenschaftliche Mitarbeit am Lehrstuhl für Grünlandlehre an der TU München
- Juni 2000 bis Mai 2001: wissenschaftliche Mitarbeit im SFB 607 „Wachstum oder Parasitenabwehr“ am Lehrstuhl für Phytopathologie (TU München)
- Juni 2001 bis Oktober 2003: wissenschaftliche Mitarbeit innerhalb des Projektes „Antioxidative Eigenschaften verschiedener pflanzlicher Extrakte“ in Zusammenarbeit mit dem Adalbert - Raps - Zentrum für Arznei - und Gewürzpflanzenforschung
- November 2003 bis Oktober 2004 HWP - Stipendiatin zu Fertigstellung der Promotion mit dem Thema: *Vergleich antioxidativer Eigenschaften von Extrakten aus Camellia sinensis, Rosmarinus officinalis, Cyclopia genistoides Cyclopia sessiliflora und Aspalathus linearis.*

10 Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, denen ich hier herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. E.F. Elstner, ohne dessen Ermutigung und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin möchte ich der Zentralkommission für die Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses und der Frauenbeauftragten der technischen Universität München für die finanzielle Unterstützung durch ein Promotionsstipendium danken.

Bei Herrn Dr. Weinreich, Dr. Sabine Grüner, Dr. Frank Otto und Yvonne vom Adalbert - Raps - Zentrum für Arznei- und Gewürzpflanzenforschung bedanke ich mich für die gelungene Zusammenarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank den Probanden der Bioverfügbarkeitsstudie und Frau Dr. Reinhard für den ärztlichen Beistand und die Blutabnahmen.

Ein ganz herzlicher Dank gilt den IsarLab'ern: Dr. Kerstin Dornisch und Dr. Susanne Hippeli, die mich „an Bord“ geholt haben. Besonders Dir, Susanne, danke ich für die konstruktive Kritik, die viele Arbeit, die Du Dir mit mir gemacht hast und dafür, dass deine Begeisterung für die Sache mich immer wieder inspiriert hat.

Auch bei meinen Kollegen, Kerstin, Jens, Elke, Sandra und Dr. Harald Schempp, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich mich bedanken. Dir, Kerstin, danke ich für die Korrekturarbeiten, die gefahrenen Kilometer und die vielen aufmunternden Worte während der Endphase.

Allen anderen „Freisingern“ und „Münchnern“ der Phytopathologie sei für die nette Atmosphäre und die entstandenen Freundschaften gedankt.

Ein Großer Dank gilt allen Allershausener Babysittern, Annemarie, Sabrina, Sabina, Andrea und der Dame für Punkt, Komma und Dativ - Annette.

Bleiben zu guter Letzt meine Eltern und meine Schwiegereltern, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben und meine Familie, Holle, Alina und Inga. Ihr musstet teilweise viel ertragen, danke für Eure Hilfe und Geduld während der oft auch anstrengenden Zeit. Ich liebe Euch. Danke!