

Technische Universität München
Department für Lebensmittel und Ernährung
Hochschuldozentur für Humanernährung und Krebsprävention

**Entwicklung einer HPLC-Methode zur Bestimmung
ausgewählter Polyphenole und ihr Einsatz in Humanstudien**

Adrian Bolarinwa

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.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. Hannelore Daniel
Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Jakob Linseisen
2. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Engel

Die Dissertation wurde am 13.06.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 05.10.2006 angenommen.

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. Dr. **Jakob Linseisen**, der mir die Anfertigung der vorliegenden Dissertation ermöglichte, danke ich für die überaus interessante Themenstellung, seine stete Diskussionsbereitschaft und die engagierte und großzügige Unterstützung bei wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen. Seine persönliche Unterstützung und menschliche Großzügigkeit haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. **Karl-Heinz Engel** danke ich für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur. Mein Dank gilt ebenso Herrn em. Prof. Dr. **Günther Wolfram** für die fachliche Beratung in medizinischen Fragestellungen, für sein Interesse an dieser Arbeit sowie für die Ausdauer bei der Abnahme des Probandenblutes der Absorptionsstudie. Vor allem aber möchte ich mich bei **allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Hochschuldozentur für Humanernährung und Krebsprävention** aufrichtig für das förderliche Arbeitsklima und für alle Beiträge zum Gelingen meiner Arbeit bedanken. Frau Dr. **Susanne Heiler** danke ich für ihren Rat, ihre unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, die zahlreichen Möglichkeiten zu wissenschaftlichem Austausch und ihre konstruktive Kritik bei der Durchsicht meiner Arbeit. Frau **Barbara Gelhaus** danke ich für die angenehme Zusammenarbeit im Labor und Herrn **Alexander Haag** für die zahlreichen chemischen Dialoge und die Hilfe bei der Erstellung arbeitsintensiver Grafiken sowie Frau **Henrike Seiler** und Frau **Regina Piller** für die unkomplizierte Zusammenarbeit und für ihre fachliche und menschliche Unterstützung. Frau **Hellen Meyer** danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit im Labor und ihre geschätzte Mitarbeit an der Absorptionsstudie sowie **allen Petersilienverzehrern und Blutspendern**, ohne die die Absorptionsstudie nicht durchführbar gewesen wäre. Mein Dank gilt außerdem den Herrn Dr. **Michael Wiseman** für die Unterstützung bei statistischen Fragen, Herrn **Thomas Nachtigall**, dessen kompetente Hilfe und persönlicher Einsatz bei der Wiederbelebung von HPLC-Bauteilen wesentlich dazu beigetragen haben, die damit verbundenen Probleme in den Griff zu bekommen und Frau **Kristina Linge** für das freundliche und kompetente Lektorat des Manuskriptes.

Mein aufrichtiger Dank geht an **meine Freunde**, die auch in schwierigen Zeiten bei mir blieben und die mir zeigten, daß es noch ein Leben außerhalb des „Labradors“ gibt.

An **Alexandra, Aram, Mara, Markos, Maria** und an **meinen Bruder Steven** die so viel Verständnis, Trost und Herzlichkeit, Wärme, Freundlichkeit und Einfühlungsvermögen hatten, die während der Promotion Freud und Leid mit mir teilten und die so oft Nachsicht mit mir hatten.

Danke für die schönen Abende nach dem Labor, für Momente des Verschmaufens, der Unterstützung und der Aufrichtung, für Innigkeit und Vertrautheit, für unsere gemeinsamen „WG-Zeiten“ während des Zusammenschreibens und der Methodenerstellung, für Spaziergänge, wenn mir das Wasser bis zum Hals stand, für Hilfe bei "Engpässen", bei Korrekturen und Präsentationen, für unsere wertvollen Gespräche in der Loggia, in Cafés, auf Sofas, in Küchen, in Autos, am Telefon...

Danke daß ihr mir in dieser nicht immer leichten Zeit stets liebevoll mit Rat und Tat zur Seite standet und vor allem für euer Interesse an meiner "Arbeit". Danke für eure Freundschaft, Gefährtenschaft und Liebe.

Mein ganz besonderer Dank gilt **meinen Eltern Victor und Gisela Bolarinwa**, die mir durch ihre bedingungslose Unterstützung während des gesamten Studiums diese Arbeit überhaupt ermöglicht haben.

Manche leben mit einer so erstaunlichen Routine, dass es schwerfällt zu glauben, sie lebten zum ersten Mal.

Stanislaw Jerzy Lec

Für Tommy, Giulia und Ben

Emi fé gbó, emi fé sisé, emi fé dà, jemo Olórun, jí tikálára.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
2. Polyphenole	5
2.1 Biosynthese	5
2.2 Vorkommen	6
2.3 Reaktionen von Polyphenolen in Lebensmitteln	8
2.4 Zufuhr von Polyphenolen	12
2.5 Resorption und Metabolismus von Polyphenolen	12
2.6 Wirkungen von Polyphenolen	15
3. Material, Methoden und Studien	18
3.1 Material	18
3.1.1 Reagenzien	18
3.1.2 Standardsubstanzen	19
3.1.3 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	20
3.2 Methoden	21
3.2.1 Plasmagewinnung	21
3.2.2 Polyphenolbestimmung in Plasma und Urin mittels HPLC	21
3.2.3 Polyphenolbestimmung in Erythrozyten mittels HPLC	21
3.2.4 Polyphenolbestimmung im Lebensmittel mittels HPLC	22
3.2.5 HPLC-Bedingungen	23
3.2.6 Carotinoid- und Tocopherolbestimmung im Plasma mittels HPLC	25
3.2.7 Vitamin C-Bestimmung im Serum	29
3.3 Studien	30
3.3.1 Bayerische Verzehrsstudie II	30
3.3.2 Brustkrebsstudie im Rahmen der EPIC-Studie	33
3.3.3 Studie zur Absorption von Apigenin beim Menschen	36
3.4 Statistische Auswertung	43

4. Ergebnisse	46
4.1 Entwicklung der Nachweismethode	46
4.1.1 Stabilisierung der Polyphenole	47
4.1.2 Interner Standard	50
4.1.3 Hydrolyse	51
4.1.4 Extraktion	52
4.1.5 High Performance Liquid Chromatographie	56
4.2 Validierung der Nachweismethode	61
4.2.1 Linearität	61
4.2.2 Reproduzierbarkeit	63
4.2.3 Wiederfindung	65
4.2.4 Nachweisgrenze	66
4.3 Polyphenolkonzentrationen im Plasma eines repräsentativen Kollektivs der Bayerischen Verzehrsstudie II	67
4.3.1 Polyphenolkonzentrationen im Plasma gesamt und nach Geschlecht	67
4.3.2 Korrelation der Plasmakonzentrationen von Polyphenolen mit anthropometrischen und sozioökonomischen Faktoren	73
4.3.3 Polyphenolkonzentrationen im Plasma nach Altersgruppen	75
4.3.4 Polyphenolkonzentrationen im Plasma nach Body-Mass-Index	81
4.3.5 Polyphenolkonzentrationen im Plasma nach Waist-to-Hip-Ratio	85
4.3.6 Polyphenolkonzentrationen im Plasma nach Rauchstatus	87
4.3.7 Polyphenolkonzentrationen im Plasma nach Schichtzugehörigkeit	91
4.3.8 Korrelation der Plasmakonzentrationen von Polyphenolen	96
4.3.9 Plasmakonzentrationen von Tocopherolen, Carotinoiden und Vitamin C sowie deren Korrelation mit den Plasmakonzentrationen der Polyphenole	101
4.4 Polyphenolkonzentrationen im Plasma der Teilnehmerinnen der Brustkrebsstudie im Rahmen der EPIC-Studie	105
4.5 Studie zur Absorption von Apigenin beim Menschen	112
4.5.1 Verlauf der Apigeninkonzentration im Plasma	112
4.5.2 Verlauf der Apigeninkonzentration im Urin	116
4.5.3 Verlauf der Apigeninkonzentration in den Erythrozyten	119

5. Diskussion	122
5.1 Entwicklung der Nachweismethode	122
5.1.1 Stabilität während der Probenmessung	125
5.1.2 Interner Standard	125
5.1.3 Extraktionstechniken	126
5.2 Validierung der Methode	128
5.2.1 Linearität und Nachweisgrenzen	128
5.2.2 Wiederfindung und Reproduzierbarkeit	130
5.2.3 Selektivität	131
5.3 Polyphenolkonzentrationen im Plasma der Teilnehmer/innen der Bayerischen Verzehrsstudie II	133
5.4 Polyphenolkonzentrationen im Plasma und Brustkrebsrisiko in der EPIC-Studie	154
5.5 Polyphenolbestimmung der Studie zur Absorption von Apigenin beim Menschen	174
6. Zusammenfassung	183
7. Literaturverzeichnis	187

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Das Flavan-Grundgerüst (2-Phenylchroman) der Flavonoide	1
Abb. 2: Übersicht der grundlegenden Unterklassen der Flavonoide	2
Abb. 3: Übersicht der grundlegenden Klassen der Phenolsäuren	3
Abb. 4: Grundzüge der Biosynthese von Polyphenolen	6
Abb. 5: Cyclisierung der freien cis-o-Cumarsäure	9
Abb. 6: Reaktionen von o-Chinonen mit Polyphenolen	9
Abb. 7: Reaktionen von o-Chinonen mit verschiedenen Substanzen	11
Abb. 8: HPLC-Chromatogramm einer Polyphenol-Standardmischung	24
Abb. 9: HPLC-Chromatogramm einer Humanplasma-Probe mit Standards	24
Abb. 10: HPLC-Chromatogramm der Carotinoide als Standardmischung	26
Abb. 11: HPLC-Chromatogramm der Carotinoide im Plasma	27
Abb. 12: HPLC-Chromatogramm der Tocopherole als Standardmischung	27
Abb. 13: HPLC-Chromatogramm der Tocopherole im Plasma	27
Abb. 14: Zeitlicher Ablauf des Absorptionsversuches	36
Abb. 15: Negativliste für Apigenin und Luteolin zur Vermeidung durch die Probanden	38
Abb. 16: Stabilität der Catechine bei Raumtemperatur ohne Oxidationsschutz	48
Abb. 17: Stabilität von (-)-Epigallocatechin mit verschiedenen Antioxidantien	49
Abb. 18: Stabilität der Polyphenole mit Zusatz von Ascorbinsäure nach 24 Stunden	50
Abb. 19: Chromatogramm zur Prüfung der Hydrolyseaktivität von Sulfatase	52
Abb. 20: Festphasenextraktions Sorbens Poly(divinyl-benzol-co-N-vinylpyrrolidon)	53
Abb. 21: Gehalte an Quercetin bzw. Salicylsäure im Extrakt der Festphasenextraktion	54
Abb. 22: HLB-Festphasenextraktionsverfahren zur Bestimmung von Polyphenolen	55
Abb. 23: Gradientenelutionsprogramm zur HPLC-Trennung der Polyphenole	56
Abb. 24: Bestimmung der Meßspannung von Quercetin / Kämpferol am ECD	59
Abb. 25: Chromatogramm/UV-Spektren der Polyphenole im Nüchternplasma	60

Abb. 26: Korrelation zwischen der Ferulasäurekonzentration und dem Lebensalter	73
Abb. 27: Korrelation zwischen der Ferulasäure- und der Naringeninkonzentration	97
Abb. 28: Korrelation zwischen der Quercetin- und der γ -Tocopherolkonzentration	102
Abb. 29: Apigeninkonzentrationen der männlichen Studienteilnehmer nach Bolusgabe	113
Abb. 30: Apigeninkonzentrationen der weiblichen Studienteilnehmer nach Bolusgabe	113
Abb. 31: Mittelwerte der Apigeninkonzentrationen zu den Blutabnahme-Zeitpunkten	115
Abb. 32: Apigeninkonzentrationen in Erythrozyten der männlichen Probanden nach Bolusgabe	120
Abb. 33: Apigeninkonzentrationen in Erythrozyten der weiblichen Probanden nach Bolusgabe	120
Abb. 34: Abnahme der Peakfläche von Gallocatechin innerhalb von 24 h bei Raumtemperatur	126
Abb. 35: Schematischer Ablauf der Festphasenextraktion für Plasma, Erythrozyten und Urin	127
Abb. 36: Mittlere Polyphenolkonzentrationen im Studienkollektiv der BVS II-Studie	135
Abb. 37: Die metabolische Umwandlung von Epigallocatechingallat und Rutin	147
Abb. 38: Vergleich der Polyphenolkonzentrationen der Männer und Frauen	151
Abb. 39: Strukturformel von Apiin	175
Abb. 40: Stoffwechselwege der Polyphenole im menschlichen Körper	180
Abb. 41: Absorbierte Menge an Daidzein/Genistein, Glykosiden und Konjugaten im Blut	181

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Standardsubstanzen für die Polyphenolbestimmung	19
Tab. 2: Standardsubstanzen zur Carotinoid- und Tocopherolbestimmung	20
Tab. 3: Gradientenprofil der HPLC-Fließmittel zur Polyphenolbestimmung	23
Tab. 4: HPLC-Bedingungen zur Bestimmung der Polyphenole	23
Tab. 5: HPLC-Bedingungen der Carotinoid- und Tocopherolbestimmung in Plasma	26
Tab. 6: Standardsubstanzen und Responsefaktoren der Carotinoide und der Tocopherole	28
Tab. 7: Verteilung der soziodemographischen und anthropometrischen Variablen im Studienkollektiv der BVS II	32
Tab. 8: Verteilung der soziodemographischen und anthropometrischen Variablen bei den Fällen und Kontrollen in der Brustkrebsstudie im Rahmen von EPIC	35
Tab. 9: Lebensalter und anthropometrische Daten im Studienkollektiv der Absorptionsstudie	37
Tab. 10: Geschätzter Energiebedarf und Anteil der Formularnahrung	38
Tab. 11: Nährstoffträger der Formularnahrung und Nährstoffrelation	39
Tab. 12: Apigeningehalte in Petersilie in Abhängigkeit vom Sorte und Herkunft	40
Tab. 13: Menge an Petersilie und Butter pro Bolus	40
Tab. 14: Petersilienmenge und Apigeningehalt pro Bolus	41
Tab. 15: Zeitlicher Ablauf am Versuchstag	42
Tab. 16: Standardsubstanzen und Responsefaktoren	51
Tab. 17: Physikalische Eigenschaften der HLB-SPE-Säulen	53
Tab. 18: Liste der untersuchten Polyphenole entsprechend ihrer Retentionszeiten	58
Tab. 19: Geradengleichung und Regressionskoeffizienten der Eichkurven für die untersuchten Polyphenole	62
Tab. 20: Konzentrationsbereiche der Linearitätsbestimmung bei der Eichung der Polyphenole	63
Tab. 21: Reproduzierbarkeit zugesetzter Standards	64
Tab. 22: Wiederfindung einer Polyphenol-Standard-Mischung in Wasser und einer Humanplasma-Probe mit zugesetzter Polyphenol-Standard-Mischung	65
Tab. 23: Nachweisgrenzen der untersuchten Polyphenole	66
Tab. 24: Polyphenolkonzentration im Plasma des gesamten Studienkollektives der BVS II-Studie	69
Tab. 25: Polyphenolkonzentration im Plasma der männlichen Studienteilnehmer der BVS II-Studie	70

Tab. 26: Polyphenolkonzentration im Plasma der weiblichen Studienteilnehmerinnen der BVS II-Studie	71
Tab. 27: Polyphenolkonzentration im Plasma von Männern und Frauen der BVS II-Studie	72
Tab. 28: Spearman'sche Korrelationskoeffizienten zwischen den Polyphenolkonzentrationen und dem Alter, Body-Mass-Index, Waist-to-Hip-Ratio, Schichtzugehörigkeit sowie dem Rauchstatus des gesamten Studienkollektives	74
Tab. 29: Polyphenolkonzentration im Plasma des gesamten Studienkollektives der BVS II-Studie unterteilt nach Lebensalter	78
Tab. 30: Polyphenolkonzentration im Plasma der männlichen Studienteilnehmer der BVS II-Studie unterteilt nach Lebensalter	79
Tab. 31: Polyphenolkonzentration im Plasma der weiblichen Studienteilnehmerinnen der BVS II-Studie unterteilt nach Lebensalter	80
Tab. 32: Polyphenolkonzentration im Plasma des gesamten Studienkollektives der BVS II-Studie unterteilt nach BMI-Gruppen	82
Tab. 33: Polyphenolkonzentration im Plasma der männlichen Studienteilnehmer unterteilt nach BMI-Gruppen	83
Tab. 34: Polyphenolkonzentration im Plasma der weiblichen Studienteilnehmerinnen unterteilt nach BMI-Gruppen	84
Tab. 35: Polyphenolkonzentration im Plasma der männlichen Studienteilnehmer unterteilt nach WHR-Gruppen	85
Tab. 36: Polyphenolkonzentration im Plasma der weiblichen Studienteilnehmerinnen unterteilt nach WHR-Gruppen	86
Tab. 37: Polyphenolkonzentration im Plasma des gesamten Studienkollektives der BVS II-Studie unterteilt nach Rauchstatus	88
Tab. 38: Polyphenolkonzentration im Plasma der männlichen Studienteilnehmer unterteilt nach Rauchstatus	89
Tab. 39: Polyphenolkonzentration im Plasma der weiblichen Studienteilnehmerinnen unterteilt nach Rauchstatus	90
Tab. 40: Polyphenolkonzentration im Plasma des gesamten Studienkollektives unterteilt nach Schichtzugehörigkeit	93
Tab. 41: Polyphenolkonzentration im Plasma der männlichen Studienteilnehmer unterteilt nach Schichtzugehörigkeit	94

Tab. 42: Polyphenolkonzentration im Plasma der weiblichen Studienteilnehmerinnen unterteilt nach Schichtzugehörigkeit	95
Tab. 43: Spearman'sche Korrelationskoeffizienten der Polyphenolkonzentrationen im gesamten Studienkollektiv	99
Tab. 44: Plasmakonzentration von Tocopherolen, Carotinoiden	101
Tab. 45: Spearman'sche Korrelationskoeffizienten zwischen den Polyphenolkonzentrationen und den Tocopherol-, Carotinoid- und Vitamin C-Konzentrationen im Plasma des gesamten Studienkollektives	104
Tab. 46: Plasma-Polyphenolkonzentrationen der Teilnehmerinnen der Fall-Kontroll-Studie zu Brustkrebs im Rahmen der EPIC-Studie	106
Tab. 47: Nicht-Adjustierte logistische Regression für die Effekte der Plasmakonzentrationen ausgewählter Polyphenole auf das Brustkrebsrisiko	110
Tab. 48: Adjustierte logistische Regression für die Effekte der Plasmakonzentrationen ausgewählter Polyphenole auf das Brustkrebsrisiko	111
Tab. 49: Apigeninkonzentration im Plasma des Studienkollektivs nach Verzehr einer Testmahlzeit	112
Tab. 50: Vergleich der Apigeninplasmakonzentration von Männern und Frauen mit dem Student t-Test zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Verzehr einer Petersilienmahlzeit	114
Tab. 51: Vergleich der Apigeninplasmakonzentration von Sportlern und Nichtsportlern mit dem Student t-Test zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verzehr einer Petersilienmahlzeit	114
Tab. 52: AUC-Werte aller Studienteilnehmer	116
Tab. 53: Apigeningehalte in der Testmahlzeit und im Urin, Urinvolumen und Apigeninausscheidung im 24-Stunden-Urin	117
Tab. 54: Vergleich der renalen 24 h-Apigeninexkretion von Männern und Frauen mit dem Student t-Test	117
Tab. 55: Vergleich der renalen 24 h-Apigeninexkretion von Sportlern und Nichtsportlern mit dem Student t-Test	117
Tab. 56: Apigeningehalte in Testmahlzeit, 24-h-Urin und prozentualer Anteil der zugeführten Menge	118
Tab. 57: Konzentration von Apigenin in den Erythrozyten nach Verzehr der Petersilienmahlzeit	119

Tab. 58: Vergleich der Erythrozytenkonzentration von Männern und Frauen mit dem Student t-Test zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verzehr der Testmahlzeit	121
Tab. 59: Vergleich der Erythrozytenkonzentration von Sportlern und Nichtsportlern mit dem Student t-Test zu verschiedenen Zeitpunkten nach Verzehr der Petersilienmahlzeit	121
Tab. 60: Vergleich der Plasmakonzentrationen der Probanden aus der BVS II - Studie mit denen der Probanden aus der EPIC - Studie	156
Tab. 61: Vergleich der Energiezufuhr und der Zufuhr von Makronährstoffen der untersuchten Probanden mit den Studien von Janssen et al. (1998) und Nielsen et al. (1999)	178
Tab. 62: Vergleich der HPLC- Parameter, Methodenbedingungen und Art der Proben der vorliegenden Studie mit den Studien von Janssen et al. (1998) und Nielsen et al. (1999)	179

Abkürzungsverzeichnis

\bar{x}	Mittelwert
A	Fläche
Api	Apigenin
AUC	Fläche unter der Kurve (Area Under the Curve)
BA	Blutabnahme
BHA	tert.-Butylhydroxyanisol
BHT	tert.-Butylhydroxytoluol
BMI	Body Mass Index
BVS II-Studie	Bayerische Verzehrsstudie II
C	Konzentration
C.I.	Vertrauensintervall (Konfidenzintervall)
Cantha	Canthaxanthin
Cat	Catechin
Crypto	Cryptoxanthin
Cum	p-Cumarsäure
CV	Variationskoeffizient
d	Tag
Dai	Daidzein
EC	Epicatechin
E.C.	Enzyme Commission
ECD	elektrochemischer Detektor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGC	Epigallocatechin
EGCG	Epigallocatechingallat
Ellag	Ellagsäure
Fer	Ferulasäure
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
GC	Gallocatechin
Gen	Genistein
Genti	Gentisinsäure
HAsc	Ascorbinsäure
Hesp	Hesperetin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50 %
Isorh	Isorhamnetin
ISTD	Interner Standard
k. A.	keine Angabe
Kaff	Kaffeesäure
Käm	Kämpferol
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzerkrankungen
Lut	Luteolin
Max.	Maximum
Mean	Arithmetischer Mittelwert
Min.	Minimum
n	Anzahl
n.d.	not detected
Nari	Naringenin

OR	odds ratio
p	Signifikanz-Niveau
Proto	Protocatechusäure
Que	Quercetin
r	Korrelationskoeffizient
Rf _x	Responsefaktor
RP	Reversed Phase
S.E.M	Standardfehler des Mittelwerts
Sal	Salicylsäure
SD	Standardabweichung
SPE	Solid Phase Extraktion (Festphasenextraktion)
Syr	Syringasäure
TCA	Trichloressigsäure
U	Units
U/min	Umdrehungen pro Minute
Van	Vanillinsäure
Vit C	Vitamin C
vs.	versus
WHR	Waist-to-Hip Ratio
α - Toco	α - Tocopherol
α -Caro	α -Carotin
β -Caro	β -Carotin
γ - Toco	γ - Tocopherol

1. Einleitung

Flavonoide und Phenolsäuren stellen mit Tausenden bisher identifizierten Einzelsubstanzen die größte und bedeutendste Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe dar (Herrmann, 1993). In den letzten Jahren rückten die sekundären Pflanzenstoffe und besonders die Klasse der Polyphenole verstärkt in das Interesse der Wissenschaften. Als überzeugend gelten die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen, die zeigen, dass eine obst- und gemüsereiche Ernährung und somit eine ausreichende Aufnahme dieser Polyphenole vor verschiedenen Krankheiten schützen können (Block et al., 1992; Freudenheim et al., 1996; Braga et al., 1997; Witte et al., 1997; Smith-Warner et al., 2000). Heute werden vor allem die Flavonoide intensiv untersucht, da einige ihrer Vertreter starke antioxidative Wirkungen zeigen und sich sowohl in vitro als auch in Tierversuchen als antikanzerogen erwiesen haben (Huang et al., 1992 und Rice-Evans, 2001). Polyphenole sind in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs weit verbreitet und tragen dort zur Farb- und Geschmacksbildung bei (Herrmann, 1989, Haslam et al., 1988). Man findet sie in hoher Konzentration in der Schale und den Zwischenmembranen der Pflanzen. Bei sehr ungleicher Verteilung in der Pflanze fungieren die Polyphenole als Sekundärmetaboliten in verschiedenster Weise, wie etwa als Farb- und Lockstoffe, Antioxidantien oder als Fraßschutz. Der Begriff Polyphenole benennt eine breite Gruppe von Stoffen, die auf der Grundstruktur des Phenols aufgebaut sind. In dieser Gruppe werden die Flavonoide und die Phenolsäuren zusammengefasst. Zu dieser Stoffgruppe werden auch die in geringerem Maße in pflanzlichen Lebensmitteln vorkommenden Lignane, Lignine und Cumarine gezählt. Die Flavonoide leiten sich vom Flavan-Grundgerüst (2-Phenylchroman) mit zwei Benzolringen (A und B) und einem heterozyklischen Ring (C) ab (siehe Abbildung 1). Durch Modifizierungen an diesem Grundgerüst entstehen die ca. 6000 bisher bekannten Flavonoide.

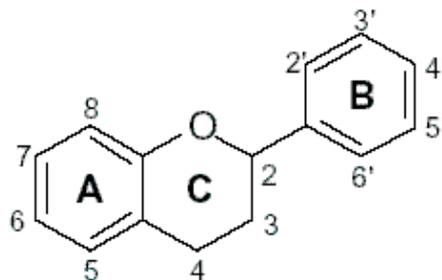


Abb. 1: Das Flavan-Grundgerüst (2-Phenylchroman) der Flavonoide

Flavonoide lassen sich in die sechs Subklassen Flavone, Flavonole, Flavanone, Flavan-3-ole (Catechine), Isoflavone und Anthocyanidine unterteilen (Bors et al., 1990) (siehe Abbildung 2). Die Vertreter der Flavonoide sowie die strukturell von ihnen abgeleiteten Anthocyanidine gehören zur großen Gruppe der Phenylpropane. Sie zählen neben den Phenolsäuren, Carotinoiden, Alkaloiden, Terpenoiden und Glucosinolaten zu den am weitesten verbreiteten Pflanzenphenolen.

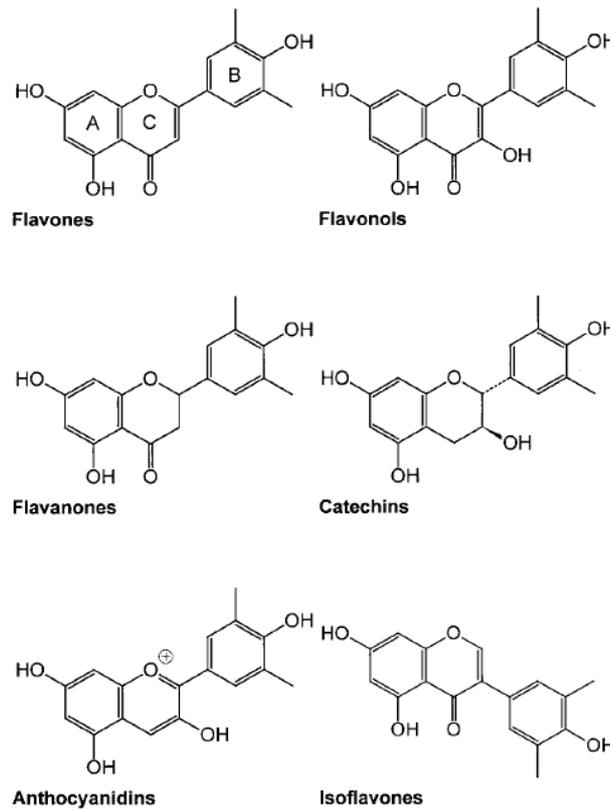


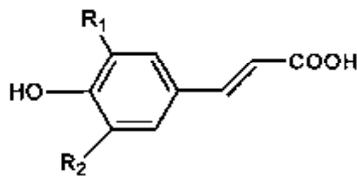
Abb. 2: Übersicht der grundlegenden Unterklassen der Flavonoide basierend auf Variationen am heterocyclischen C-Ring (Hollman und Katan, 1999)

Die Flavonoide bilden davon die größte und auch die bedeutendste Gruppe der Sekundärmetaboliten in Pflanzen. Die große Zahl an Einzelsubstanzen beruht vor allem auf den unterschiedlichen Glykosylierungsmustern (Kühnau, 1976; Herrmann, 1993; Middleton et al., 1994; Harborne et al., 2000).

Einerseits lässt sich ihre große Differenziertheit auf die Kombination mit unterschiedlichen Substituenten zurückführen. Dabei handelt es sich vornehmlich um Hydroxylierung und/oder Methylierung der drei Ringe sowie Art, Anzahl und Anordnung verschiedener möglicher Glycoside. Andererseits liegt die enge Verwandtschaft der unterschiedlichen Flavonoide im gemeinsamen Biosyntheseweg in der Pflanze begründet (Hollman et al., 1997; Bors et al., 1992; Agullo et al., 1996; Bravo, 1998; Berhow und Vaughn, 1999).

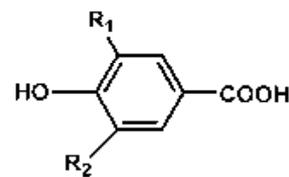
Mit dem Begriff „Phenolsäuren“ werden Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren zusammengefasst. Diese Phenolsäuren liegen oft verestert vor z.B. mit organischen Säuren (z.B. Chinasäure) oder mit Zuckern (z.B. Arabinose). Der am häufigsten vorkommende Hydroxyzimtsäureester ist Chlorogensäure, die aus Kaffeesäure und Chinasäure gebildet wird. Wichtige Hydroxybenzoesäuren sind z.B. Vanillinsäure oder Gallussäure (siehe Abbildung 3). Die Hydroxyzimtsäure, die in Getreide (vor allem in Vollkorn) dominiert, ist Ferulasäure

Hydroxyzimtsäuren



p-Cumarsäure	$R_1 = H, R_2 = H$
Ferulasäure	$R_1 = H, R_2 = OCH_3$
Sinapinsäure	$R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3$
Kaffeesäure	$R_1 = H, R_2 = OH$

Hydroxybenzoesäuren



Gallussäure	$R_1 = OH, R_2 = OH$
Protocatechusäure	$R_1 = OH, R_2 = H$
Syringasäure	$R_1 = OCH_3, R_2 = OCH_3$
Vanillinsäure	$R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Abb. 3: Übersicht der grundlegenden Klassen der Phenolsäuren (Watzl und Rechkemmer, 2001).

Die Berechnung der täglichen Aufnahme von Polyphenolen ist auf eine genaue Beschreibung der Ernährungsweise und auf die Kenntnis der genauen Polyphenolgehalte der verzehrten Lebensmittel angewiesen. Daher ist die Berechnung der täglichen Aufnahme von Polyphenolen oft schwer zu bestimmen. Durch Ungenauigkeiten bei der Ernährungserhebung und in den verwendeten Lebensmitteldaten können Zufuhrberechnungen oft mit erheblichen methodischen Fehlern behaftet sein. Biomarkermessungen werden deshalb als sinnvolle Alternative bzw. notwendige Ergänzung für die Überprüfung postulierter Effekte am Menschen angesehen.

Die Untersuchung von Polyphenolen und anderen Antioxidantien im Blutplasma stellt somit eine geeignete Methode dar, um den Versorgungszustand mit diesen Nahrungsinhaltsstoffen zu erfassen. Aufgrund fehlender Daten zu den verschiedenen Polyphenolen in einer Plasmaprobe sind Wechselwirkungen interessierender Polyphenole jedoch noch sehr wenig untersucht und bestehende Untersuchungen berücksichtigen meist nur einzelne Polyphenole oder ganz bestimmte Unterklassen der Flavonoide oder Phenolsäuren.

Der Bedarf an sensitiven Methoden zur simultanen Bestimmung wichtiger Vertreter der fünf Flavonoid-Unterklassen (Catechine, Flavonole, Flavanone, Flavone, Isoflavone) und beider Phenolsäure-Unterklassen (Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren) aus geringen Plasmavolumina sowie die Notwendigkeit zur Fortsetzung weiterführender Humanstudien wird in der Literatur jedoch wiederholt betont (Robbins, 2003; Merken und Beecher, 2000).

Daher ist das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung

- einer sensitiven, validierten Methode zur Aufarbeitung von Lebensmitteln, Blutplasma, Erythrozyten und Urinproben
- bei gleichzeitiger Bestimmung von 14 Flavonoiden aus 5 Subklassen sowie 6 Hydroxybenzoesäuren und 3 Hydroxyzimtsäuren mit Einsatz geringer Probevolumina.

Darüber hinaus soll diese Methode angewendet werden, um

- die ausgewählten Polyphenole als Aglykon bzw. als freie Säure im Humanplasma im Rahmen der BVS II – Studie qualitativ und quantitativ zu untersuchen und zu bewerten,
- die Gehalte ausgewählter Polyphenole in Plasma von Teilnehmerinnen einer Fall-Kontroll-Studie zu prämenopausalem Brustkrebs im Rahmen der EPIC-Studie zu prüfen und mögliche Effekte auf das Brustkrebsrisiko zu untersuchen,
- die Apigeninkonzentration im Plasma, in den Erythrozyten und im Urin zu ermitteln sowie die interpersonelle Variation für Apigenin bei elf gesunden Probanden im Rahmen einer Absorptionsstudie zu bestimmen und die Bioverfügbarkeit von Apigenin zu testen.

Abschließend soll untersucht werden, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen den Plasmawerten der Flavonoide, Phenolsäuren, der Carotinoiden, Tocopherole, Vitamin C und den anthropometrischen sowie sozioökonomischen Daten besteht. Die ermittelten Plasmakonzentrationen werden kritisch geprüft und im thematischen Zusammenhang diskutiert.

2. Polyphenole

2.1 Biosynthese

Die Biosynthese der Polyphenole findet im Cytoplasma der Zelle statt (siehe Abbildung 4). Im Phenylpropanstoffwechsel wird L-Phenylalanin (aus dem Shikimisäureweg) unter *trans*-Eliminierung von der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (E.C. 4.3.15) zur *trans*-Zimtsäure desaminiert (Schuster und Retey, 1995). Mit Hilfe der Zimtsäure-4-Hydroxylase (E.C. 1.14.13.11) kann die *trans*-Zimtsäure zur *trans*-4-Cumarsäure hydroxyliert werden, die dann durch die 4-Cumarat-CoA Ligase (E.C. 6.2.1.12) in einer Mg^{2+} /ATP-abhängigen Reaktion zu 4-Cumaroyl-CoA umgesetzt wird. In einigen Pflanzen können weitere Hydroxyzimtsäuren auf diesem Weg synthetisiert werden (Ehlting et al., 2001; Rechner et al., 2001; Foley et al., 1999). Durch eine der β -Oxidation der Fettsäuren analoge Reaktionsfolge können Hydroxybenzoesäuren aus den Hydroxyzimtsäuren resultieren (Croft, 1998). Die aktivierten Ester der Phenolsäuren bilden Vorstufen für Flavonoide und andere Sekundärmetabolite, wie z.B. Lignane (siehe Abbildung 4). Die Flavonoidbiosynthese beginnt mit der schrittweisen Kondensation von 4-Cumaroyl-CoA mit drei Malonyl-CoA. Dabei entsteht durch Einwirkung von Chalkonsynthase (E.C. 2.3.1.74) und unter Decarboxylierung ein lineares Tetraketid, das unter Claisen-Kondensation zum primären Reaktionsprodukt Naringeninchalkon zyklisiert (Heller und Forkmann, 1993; Forkmann und Heller, 1999). Das entstehende Chalkon zyklisiert zu (2R/S)-Naringenin und wird durch die Aktivität der Chalkonisomerase (E.C. 5.5.1.6) spezifisch zu (2S)-Naringenin umgesetzt (Pelletier et al., 1997). (2S)-Flavanon ist dann Ausgangssubstanz für weitere Flavonoide (siehe Abbildung 4). Das Hydroxylierungsmuster an den Ringen A und B wird von Flavonoidhydroxylasen reguliert. (Martens und Forkmann, 1999; Martens et al., 2001). Während eine 2-Oxoglutarat-abhängige Flavonol-6-Hydroxylase den A-Ring hydroxyliert (Anzellotti und Ibrahim, 2000), wird der B-Ring Cytochrom-P450-abhängig von Flavonoid 3',5'-Hydroxylase (E.C. 1.14.13.21) und Flavonoid-3'-Hydroxylase hydroxyliert (Forkmann und Heller, 1999). Diese Dihydroflavonole können schließlich entweder von der Flavonolsynthase (FLS) zu Flavonolen oxidiert werden oder es kann der Weg über die Leucoanthocyanidine zu den Anthocyanen eingeschlagen werden (Turnbull et al., 2004).

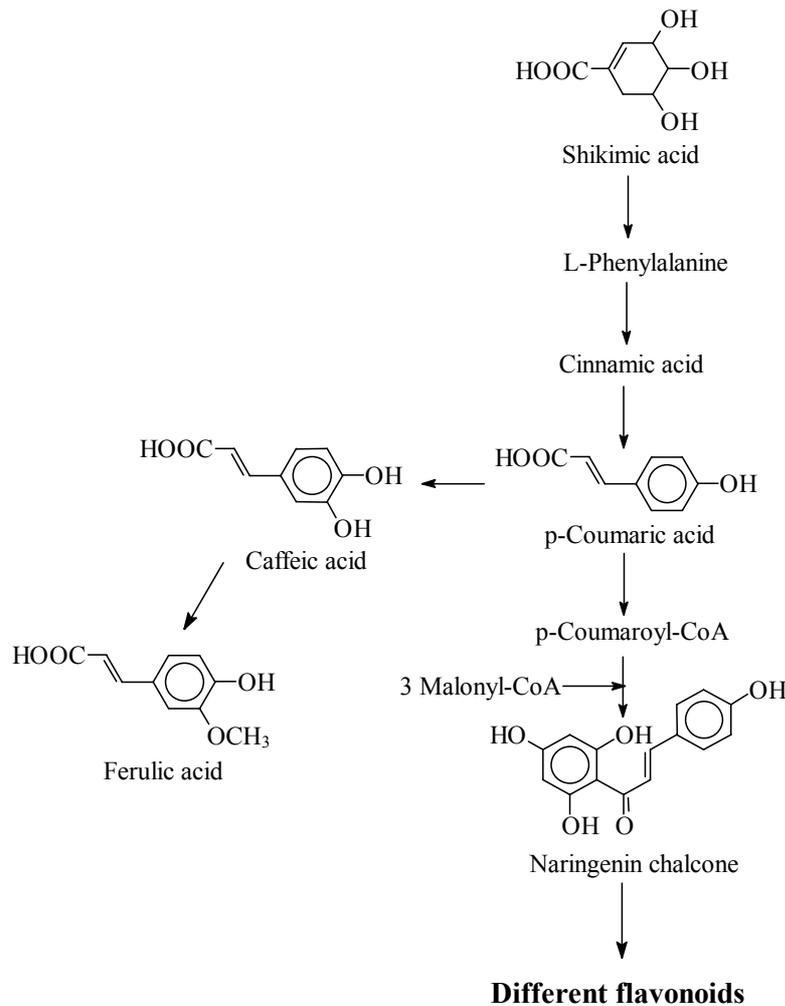


Abb. 4: Grundzüge der Biosynthese von Polyphenolen (Rechner et al., 2001)

2.2 Vorkommen

Flavonoide werden bei Mikroorganismen und Algen nur sporadisch gefunden. Im Pflanzenreich treten sie bei Moorpflanzen (Bryophyta) und Farnpflanzen (Pteridophyta) häufig auf, bei den Samenpflanzen (Spermatophyta) sind sie ubiquitär verbreitet. Der tierische und menschliche Organismus kann sie jedoch nicht bilden. Die Bildung der hellgelben Flavonolglykoside ist von der Lichtzufuhr abhängig, sodass es nicht erstaunt, dass diese Substanzgruppe hauptsächlich in der Schale von Früchten vorgefunden wird. Flavonoide liegen in pflanzlichen Lebensmitteln hauptsächlich konjugiert vor, wobei Mono- (Genistin = 7-O- β Glucopyranosylgenistein) oder Disaccharide (Rutin = Quercetin-3-Rutinosid), meist β -glykosidisch an das Aglykon geknüpft sind. Der Glykosidanteil liegt überwiegend in Form von Glucose, Galactose oder Rutinose vor. Man findet 3-glykosid, oft aber auch 7-glykosid oder 4'-glykoside. Von manchen Flavonoiden

sind auch C-glykoside bekannt, z.B. Apigenin 6-C-glucosid-7-O-(6"-caffeoyl)-glucosid (Krauze-Baranowska und Cisowski, 1995). Die Glykosidierung der Flavonoide erhöht ihre Wasserlöslichkeit und stabilisiert sie gegenüber Licht und enzymatischen Abbauvorgängen (Salunkhe et al., 1990; Aherne und O'Brien, 2002). Die einfachen Phenolsäuren sind in der Pflanzenwelt sehr weit verbreitet. Natürliche Quelle für Polyphenole in der menschlichen Ernährung sind pflanzliche Lebensmittel, Obst- und Gemüseprodukte, oder Getränke, Wein und Tee. Lebensmittel mit besonders hohen Flavonoidgehalten sind z.B. Äpfel, Zwiebeln, Brokkoli, Aprikosen, Kirschen, Johannisbeeren, grüner Kopfsalat, grüner Tee und Rotwein (Linseisen et al., 1997; Radtke et al., 1998; Herrmann, 1988; Herrmann, 1990; Hertog et al., 1992; Duthie et al., 2000; Hollman und Arts, 2000; Böhm et al., 1998; Böhm, 2000; Schieber et al., 2001).

Auffallend ist die Tatsache, dass bestimmte Flavonoidsubklassen bevorzugt in bestimmten Pflanzengruppen vorkommen. Die Flavone Apigenin und Luteolin sind hauptsächlich in Kräutern und Doldengewächsen (Apiaceae) zu finden (Herrmann, 1995). Die Flavanone Naringenin oder Hesperetin, deren Glykoside Naringin (Naringenin-7-O-rhamnoglucosid) und Hesperidin (Hesperetin-7-O-rutinosid) aufgrund ihres Bittergeschmacks bekannt sind (McIntosh und Mansell, 1997), kommen in hohen Konzentrationen fast ausschließlich in Zitrusfrüchten, Orangen oder Grapefruit, vor (Kanaze et al., 2004). Isoflavone, etwa Daidzein und Genistein, sind nur in bestimmten pflanzlichen Lebensmitteln zu finden. Es handelt sich hierbei im Wesentlichen um Sojaprodukte (Bravo, 1998; Verkasalo et al., 2001). Hohe Konzentrationen an Anthocyanidinen treten z.B. in Beerenfrüchten oder in Kirschen auf (Herrmann, 1990; Häkkinen et al., 1999). Flavan-3-ole (Catechine und dessen Derivate) kommen insbesondere in grünem Tee, Rotwein und in Obst (z.B. Äpfeln) vor (Del Rio et al., 2004; Yang et al., 2000). Die Proanthocyanidine, oligomere Catechinderivate, findet man genauso wie die monomeren Catechine in Äpfeln und Rotwein (Treutter, 1995; Wittig et al., 2002).

Flavonole sind in fast allen Pflanzen, v.a. in Obst und Gemüse, enthalten, wobei Quercetin und Kämpferol bzw. deren Glykoside die am häufigsten vorkommenden Flavonole sind (Herrmann, 1988; Hertog et al., 1993). Es existiert zwar derzeit eine große Anzahl an Veröffentlichungen zum qualitativen und quantitativen Polyphenolgehalt vieler Pflanzen und Lebensmittel, doch die wenigen verfügbaren allgemeingültigen Daten in der Literatur sind erst kürzlich erstellt worden. Einige Flavonoidgehalte pflanzlicher Lebensmittel sind in Datenbanken zusammengefasst worden (Linseisen et al., 1997; USDA Database, 2003; Manach et al., 2004).

Über die Phenolsäuregehalte ausgewählter Nahrungsmittel pflanzlichen Ursprungs liegen kaum Daten vor. Die bekannten Gehalte sind bisher lediglich für einzelne Pflanzen oder einzelne Phenolsäuren dargestellt worden. So dienen als Quelle für viele Hydroxybenzoesäuren hauptsächlich Kernobst, Beerenobst und Nüsse (v.a. für Ellagsäure). Protocatechusäure und

Gentisinsäure kommen als Metabolite der Salicylsäure vor oder werden mit Wein zugeführt. Vertreter der Hydroxyzimtsäuren kommen in nennenswerten Mengen in Gemüse, Getreide oder Kaffee vor. Trotzdem sind umfassende Datenbanken über die Gehalte an Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren in verbreiteten Lebensmitteln erst in wenigen Untersuchungen erfasst worden (Herrmann, 1989; Radtke et al. 1998).

Da die Flavonoidkonzentrationen innerhalb einer Pflanzenart von vielen Parametern wie z.B. Genotyp der Pflanze und Bodentyp des Standortes, Witterung und Jahreszeit, Reifegrad und Größe der Früchte sowie Behandlungs- und Lagerungsbedingungen beeinflusst werden, unterliegen die entsprechenden Daten teilweise großen Schwankungen (Hertog et al., 1992; Hollman und Arts, 2000; McIntosh und Mansell, 1997; Linseisen und Wolfram, 1997; Crozier et al., 1997).

2.3 Reaktionen von Polyphenolen in Lebensmitteln

Die Flavonoide und vor allem ihre Oxidationsprodukte, die Chinone, sind sehr reaktive Stoffe. Sie können mit anderen Stoffgruppen wie Proteinen und Kohlenhydraten sowie innerhalb der eigenen Stoffgruppe unterschiedliche Reaktionen eingehen. Während der gesamten Lagerungsdauer vor dem Verzehr der Lebensmittel, wie auch später während der Aufarbeitung der Plasmaproben, unterliegen die Polyphenole durch enzymatische und nicht-enzymatische oxidative Reaktionen ständigen Veränderungen (Macheix et al., 1991). Beginnend bei der Zerstörung der Zellen durch Mahlen und Entsaften der Früchte und der damit verbundenen Freisetzung der Polyphenole, stellen diese Substanzen potentielle Reaktionspartner für andere Inhaltsstoffe dar, was die Qualität des Produktes beeinflussen kann oder die Polyphenole in metabolischen Reaktionsschritten intrinsisch weiter umwandelt. Daher unterscheidet sich die Zusammensetzung der Polyphenole in den Früchten, aus denen sie hergestellt wurden, immer von der Zusammensetzung der Fruchtsäfte und von der Verteilung der Polyphenole im Plasma. Gleichwohl können sich Zusammensetzung und Gehalte an Flavonoiden und Phenolsäuren in den verschiedenen Obstprodukten untereinander in Abhängigkeit von der Art ihrer Herstellung und ihrer Lagerungsdauer stark unterscheiden. Diese Veränderungen der Polyphenole in Fruchtsäften beeinflussen nicht nur die Qualität des Produktes, sondern sicherlich auch ihre biologischen Eigenschaften wie die Bioverfügbarkeit und die antioxidative Kapazität. Durch Reduktion der Carboxylgruppe der Hydroxyphenolsäuren beispielsweise können die entsprechenden Aldehyde und Alkohole entstehen, z.B. Coniferylalkohol aus Ferulasäure sowie Vanillin und Vanillylalkohol aus 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure. Die cis-o-Cumarsäure kann nach Freisetzung aus ihren Glykosiden spontan cyclisieren und stellt somit die Vorstufe zu den aromaaktiven Cumarinen dar (siehe Abbildung 5).

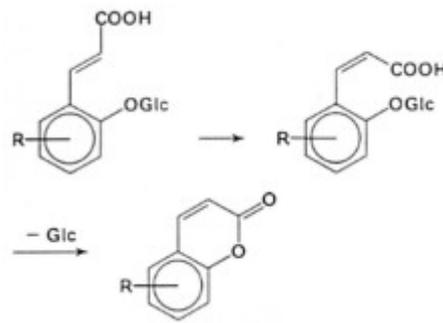


Abb. 5: Cyclisierung der freien cis-o-Cumarsäure

Die ortho-Chinone sind wichtige Reaktionszwischenstufen der Polyphenole und vermögen sowohl mit Polyphenolen als auch mit anderen organischen Saftinhaltsstoffen zu reagieren, wie in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt wird.

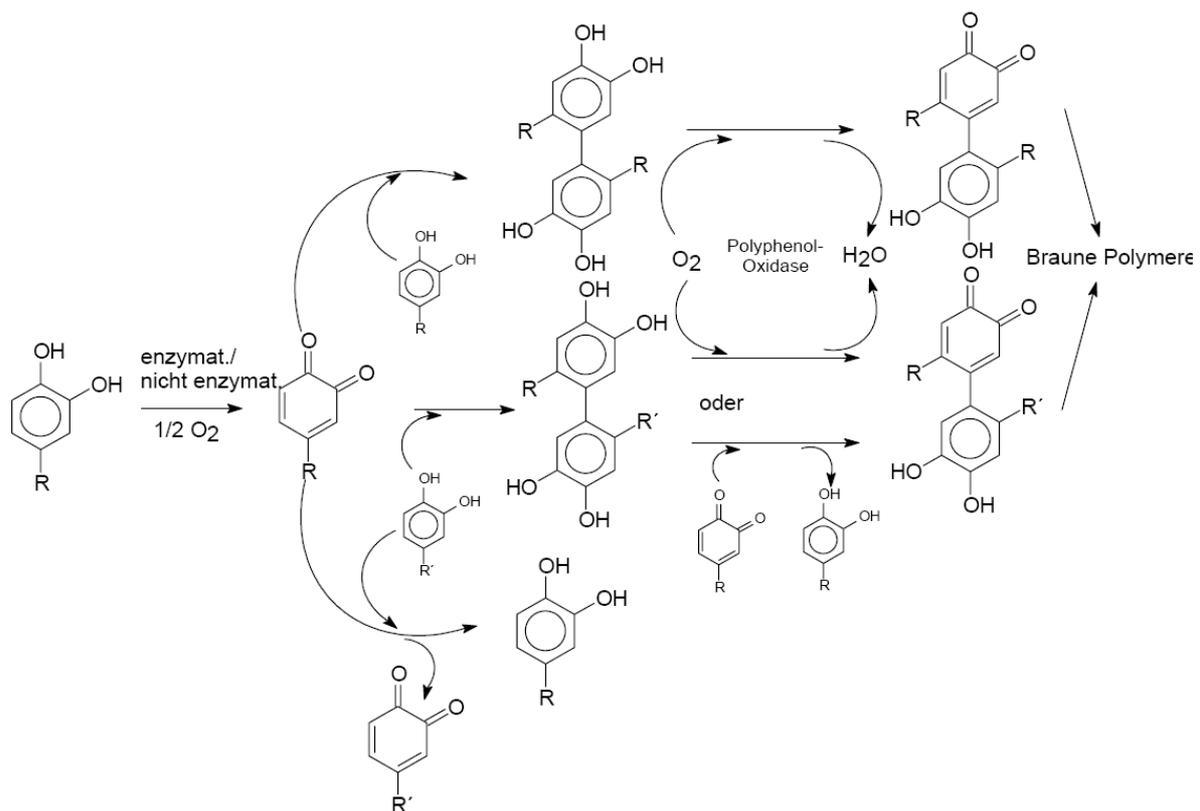


Abb. 6: Reaktionen von o-Chinonen mit Polyphenolen

Die enzymatische oder nicht enzymatische Bildung von o-Chinon ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt aller anknüpfenden Reaktionen. Enzyme, die Polyphenole oxidieren können, werden als Polyphenoloxidasen (PPO) bezeichnet. Die Reaktionen der dargestellten primären Reaktionsprodukte sind aufgrund der Vielfalt der Ausgangsstoffe sehr

komplex, führen aber in den meisten Fällen zu höheren Polymeren mit brauner Farbe (z.B. Theaflavin, Epitheaflavinsäure). Die wichtigsten Reaktionsmechanismen der Flavonoide können daher in folgende Gruppen eingeteilt werden:

- Enzymatische Oxidation (Mostoxidation)
- Nichtenzymatische Reaktionen (Kondensation, Polymerisation)
- Polyphenol-Protein Bindung
- Polyphenol-Polysaccharid Bindung

Enzymatische Oxidation

Die enzymatische Oxidation umfasst sowohl enzymatische (katalysiert durch PPO's wie Laccase oder Tyrosinase) als auch nicht enzymatische Redoxreaktionen (Abbildung 7). Die Startreaktion ist die durch Enzyme katalysierte Oxidation zum o-Chinon, während die Reaktionen, die schließlich zur Bildung von braunen Pigmenten führen, hauptsächlich nichtenzymatischer Natur sind. Die Mostoxidation ist die Hauptursache der Abnahme des Polyphenolgehaltes während der Herstellung eines Fruchtsaftes. Die tätigen Enzyme weisen dabei eine besonders hohe Affinität zu Hydroxymitsäureverbindungen, vor allem zu Kaffeesäure-Derivaten, auf, während die Flavonoide weniger schnell umgesetzt werden. Neben der Oxidation von o-Diphenolen zu o-Chinonen können Polyphenoloxidasen auch die Hydroxylierung eines Monophenols wie Cumarsäurederivate, Phloretinderivate oder Pelargonidinderivate zu einem o-Diphenol katalysieren. Bei ausreichender Enzymaktivität und ausreichendem Polyphenolgehalt ist der limitierende Faktor einer enzymatischen Oxidation hauptsächlich die Sauerstoffkonzentration in einer Lösung.

Gekoppelte Oxidation

Das Chinon ist ein starkes Oxidans und kann durch Reduktionsmittel, wie L-Ascorbinsäure oder andere Reduktone, wieder reduziert werden. Sind diese allerdings verbraucht oder nur in geringer Konzentration vorhanden, besteht die Möglichkeit, mit einem anderen o- oder p-Diphenol („Gekoppelte Oxidation“) zu reagieren (Abbildung 7). Durch diese Reaktion können auch Polyphenole, die keine oder schlechte Substrate für Polyphenoloxidasen sind, beispielsweise Procyanidine, oxidiert werden. Die gekoppelte Oxidation zwischen Chinonen und Phenolen läuft ohne die Katalyse von Enzymen und ohne Sauerstoff ab.

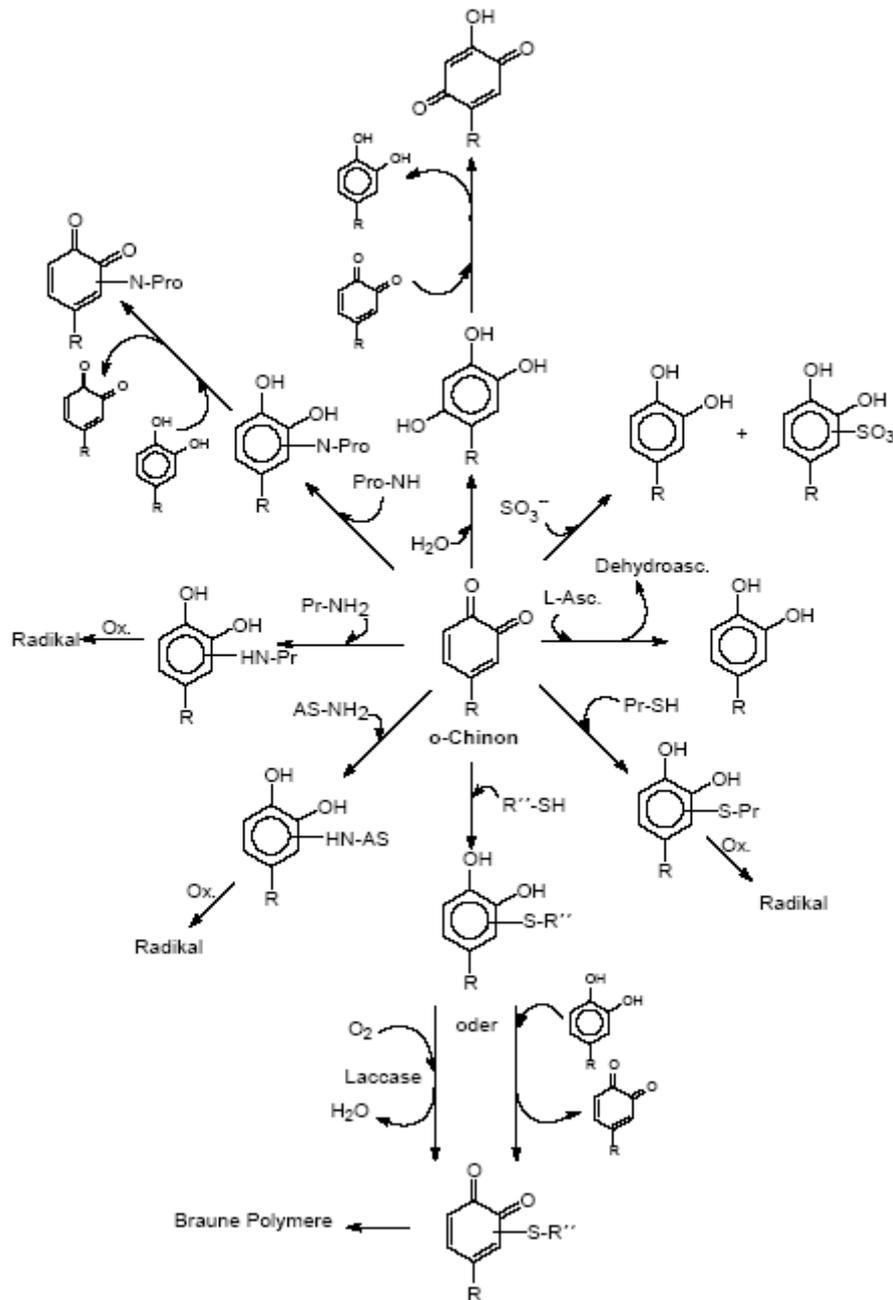


Abb. 7: Reaktionen von o-Chinonen mit verschiedenen Substanzen (L-Asc. = L-Ascorbinsäure, Dehydroasc. = Dehydroascorbinsäure, AS-NH₂ = Aminosäure, Pr-NH₂ und Pr-SH = Protein, Pro-NH = Prolin, R''-SH = z.B. Cystein, Glutathion, Ox. = weitere Oxidation)

2.4 Zufuhr von Polyphenolen

Die Aufnahme von Flavonoiden erfolgt hauptsächlich durch Getränke, etwa Tee, Kaffee, Kakao, Fruchtsäfte und Wein. Andere wichtige Flavonoidquellen sind Zwiebeln, Früchte, Zitrusfrüchte, Gemüse, Gewürze und Soja (Kühnau, 1976).

Die durchschnittliche tägliche Flavonoidzufuhr pro Person in Bayern liegt nach Linseisen et al. (1997) bei ca. 54 mg, wobei die Anteile bei 12 mg für Flavonole, 8 mg für Catechine, und 13 mg für Flavanone liegen. Die Hauptquelle für Flavonoide in Bayern sind Obst und Obstprodukte. Flavonole werden vor allem durch Gemüseprodukte zugeführt. Die durchschnittliche tägliche Phenolsäurezufuhr pro Person in Bayern beträgt 211 mg. Den größten Anteil dabei hat Kaffeesäure mit 206 mg/d. Von der Gesamtaufuhrmenge fallen 211 mg/d auf die Hydroxycinnamsäuren und auf die Hydroxybenzoesäuren 11 mg/d (Linseisen et al. 1997; Radtke et al., 1998). Andere Untersuchungen geben die durchschnittliche Flavon- und Flavonolzufuhr in den Niederlanden mit 23 mg pro Tag an, wobei der Anteil an Quercetin ca. 16 mg pro Tag beträgt (Hertog et al., 1993).

2.5 Resorption und Metabolismus von Polyphenolen

Klinische Studien zur Absorption von Quercetin beim Menschen belegen Resorptionsraten von annähernd 1 % (Griffith, 1982). Im Gegensatz dazu zeigten Ratten für oral verabreichtes, ¹⁴C markiertes Quercetin eine mit 20 % deutlich höhere Resorption, wobei die Produkte jedoch nicht weiter untersucht werden konnten. Neuere Studien deuten darauf hin, dass bestimmte Flavonolglukoside über einen aktiven Transport im Dünndarm aufgenommen werden. Bei Ileostomie-Patienten wurde nach standardisierter oraler Zufuhr von Quercetinglykosiden aus Zwiebeln eine doppelt so hohe (52 %) Resorption von Quercetin ermittelt wie nach der Aufnahme von Quercetinaglykon (24 %) (Hollman et al., 1995; Hollman und Katan, 1997). Man nimmt an, dass Flavonoidglykoside durch die Mikroflora im Dickdarm hydrolysiert werden und die Aglyka anschließend durch passive Diffusion absorbiert werden. In der Leber glukuroniert, sulfatiert oder methyliert, werden sie dann mit dem Gallensaft ausgeschieden. In mehreren Untersuchungen wurde beschrieben, dass oral zugeführte Flavonoide bereits im Darmlumen in gewissem Ausmaß einer präabsorptiven Metabolisierung unterliegen können. Neben der Laktase-Phlorizin-Hydrolase, die sich in der Bürstensaummembran befindet und die die β -glykosidische Bindung von Flavonoidglykosiden zu hydrolysieren vermag, geht bei der Metabolisierung der Polyphenole also vermutlich von der Darmflora ein durchaus bedeutender Einfluss aus (Gee et al., 2000).

In der Darmflora des Menschen wurden mehrere Bakterienstämme isoliert (unter anderem Bakterien der Gattung Clostridium und Eubacterium), die verschiedene Flavonoide und deren Glykoside bis hin zu den Phenolsäuren metabolisieren konnten. Die Bildung dieser Phenolsäurederivate entsteht durch Spaltung des C-Ringes an den Positionen 1 und 2 sowie 3 und 4 und anschließender Dehydroxylierung bzw. Methylierung. Die aus dem B-Ring hervorgegangenen Spaltprodukte von Quercetin waren vor allem 3-Hydroxybenzoesäure, 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure und 3-(3-Hydroxyphenyl)-Propionsäure (Nielson et al., 1998). Demzufolge kann man davon ausgehen, dass bei einer hinreichend langen Retention der Flavonoide im Gastrointestinaltrakt bei gleichzeitigem Vorhandensein einer intakten Darmflora ein beträchtlicher Teil der Flavonoidglykoside und der Flavonoidaglyka zu Phenolsäuren umgewandelt werden können (Heilmann und Merfort, 1998a; Heilmann und Merfort, 1998b). Die postabsorptive Metabolisierung der Polyphenole findet überwiegend in der Leber und den Dünndarm-Mukosazellen statt. Die Flavonoid-Metabolite und -Konjugate werden teilweise von der Leber aus dem Darm partiell rückresorbiert und unterliegen somit dem enterohepatischen Kreislauf. Mittels der enzymatischen Aktivität der Mukosazellen können resorbierte Stoffe in einem sogenannten „First-Pass-Effekt“ verändert werden. In einer Absorptionsstudie an Ratten, deren Dünndarm mit einer quercetinhaltigen Lösung behandelt wurde, konnte bereits gezeigt werden, dass in den Mukosazellen eine intensive Glukuronidierung, Sulfatierung und Methylierung des Flavonolaglykons stattfindet. Mehr als 95 % des Quercetins und der Quercetin-Metabolite lagen in konjugierter Form vor. Auf der apikalen und der basolateralen Seite wurden dann eben diese Konjugate detektiert. Eine Beteiligung der Leber bei der Synthese dieser Verbindungen konnte ausgeschlossen werden (Crespy et al., 1999). Boulton et al. (1999) prüften die Metabolisierung von Quercetin an humanen Hepatokarzinomazellen. Nach Akkumulation von Quercetin in den Zellen konnten sie die Entstehung eines durch O-Methylierung veränderten Metaboliten nachweisen und als Isorhamnetin identifizieren.

All diese Untersuchungen sprechen dafür, dass Polyphenole zum einen bei der Absorption an der Darmwand, zum anderen während der Leberpassage einer Metabolisierung bzw. Konjugation im Sinne des „First-Pass-Effektes“ unterliegen (Hollman und Katan, 1997; Manach et al., 1997; Graefe et al., 1999). Auch Ader et al. (2000) interpretierten ihre Versuchsergebnisse auf diese Weise.

Spencer et al. (1999) vermuten bei der Absorption von Flavonen und Flavonolen (Glykoside und Aglyka) in den Enterozyten des Dünndarmes die Aktivität einer Uridindiphosphat-Glukuronyl-Transferase. Sie konnten zeigen, dass die Glykoside auch bei fehlender Mikroflora des Darmes hydrolysiert wurden, was die Existenz endogener Glukosidasen vermuten lässt. Die Versuchsergebnisse zeigen, dass beim Vorhandensein von Flavonoiden im Darmlumen

(vorliegend als Glykoside oder Aglyka) im Pfortaderblut überwiegend Flavonoid-Glukuronide und Flavonoid-Sulfate auftauchen. Direkt nach dem Übergang ins Blut werden sie dann fast vollständig an Plasmaproteine gebunden (Manach et al., 1995; Gugler et al., 1975).

Durch Untersuchungen mit ^{14}C -markiertem Quercetin wurden diese Versuchsergebnisse weiter unterstützt. Dabei wurde Quercetin Humanplasmaproben zudotiert. Nach anschließender Ultrazentrifugation wurde festgestellt, dass sich für Quercetin eine Plasmaprotein-Bindung von $99,1 \pm 0,5 \%$ ergab.

Bindungsproteine waren hauptsächlich Albumin und in sehr geringem Maße auch Glykoprotein und Very-Low-Density-Lipoproteine. Eine Aufnahme von Quercetin in Erythrozyten wurde durch Bindung an Plasmaproteine signifikant reduziert (Boulton et al., 1998). Die Ergebnisse von Fiorani et al. (2003) beleuchten die Absorptionsverhältnisse von Quercetin in Erythrozyten noch genauer. Demnach wird Quercetin durch passive Diffusion in menschliche Erythrozyten aufgenommen. Dieser Prozess wird durch reversible Bindungen des Polyphenols an Hämoglobin angetrieben und unterstützt. In Hämoglobin-freien Erythrozyten werden Polyphenole ausschließlich in der Membran angereichert. In beiden Fällen sind gebundene Polyphenole biologisch aktiv und unterstützen die Reduktion extrazellulärer, oxidativ wirksamer Substrate durch Mithilfe einer Transplasma-Membran-Oxidoreduktase. In Anwesenheit von Albumin (z.B. im Plasma) wird die Aufnahme von Quercetin in die Zellen drastisch reduziert. Aber die Wiederaufnahme von Quercetin in die Zelle, auch in Anwesenheit von Albumin, scheint möglich zu sein. Es besteht also ein Austausch von albumingebundenem und hämoglobingebundenem Quercetin in Abhängigkeit von der Erythrozytenanzahl und der Konzentration an albumingebundenem Quercetin. Die Eliminationshalbwertszeit für die Ausscheidung von Quercetinglukosiden, aufgenommen aus Zwiebeln, beträgt etwa 24 Stunden. Im Plasma liegt Quercetin zu 99 % an Albumin gebunden vor. Diese hohe Affinität erklärt möglicherweise die sehr langsame Elimination von Quercetin (Hollman und Katan; 1997, Hollmann et al., 1996). In einer Übersichtsarbeit von Griffith wurde der Transport konjugierter Flavonoide und deren Metaboliten über die Galle als ein Hauptweg der Exkretion dargestellt.

Die Untersuchungen bei Ratten mit kanuliertem Gallengang, denen oral oder parenteral radioaktiv markierte Flavan-3-ole verabreicht wurden, zeigten, dass bis zu 44 % der zugeführten Menge als Flavonol-Konjugate über die Galle ausgeschieden wurden (Griffith, 1982). Dabei handelte es sich hauptsächlich um die Glukuronide der Polyphenole. Ueno et al. (1983) bestätigten diese Resultate anhand eines ähnlichen Versuchsansatzes. Oral verabreichtes ^{14}C -Quercetin wurde innerhalb von 48 h über Galle und Urin als Glukuronat- oder Sulfat-Konjugat ausgeschieden. Jedoch scheint die Elimination über die Niere grundsätzlich nur eine untergeordnete Rolle bei der Exkretion von Polyphenolen zu spielen.

So wurde beispielsweise in einer Untersuchung mit ileostomierten Testpersonen, denen gebratene Zwiebeln (entspricht 89 mg Quercetinaglykon) oral verabreicht wurden festgestellt, dass nur etwa 0,5 % der absorbierten Polyphenol-Menge über den Harn ausgeschieden wurde (Hollman und Katan, 1997). Auch Choudhury et al. (1999) legten schlussfolgernd dar, dass die renale Exkretion der Flavonoide bei der Ratte kein Hauptweg zur Ausscheidung von Quercetin, Isoquercitrin und Rutin nach deren oraler oder parenteraler Applikation ist. Sie konnten 2,4 % der intravenös verabreichten Menge Quercetin sowie 6,7 % Isoquercitrin und 9,2 % Rutin im Urin wiederfinden.

2.6 Wirkungen von Polyphenolen

Es ist bereits gut erforscht, dass pflanzliche Lebensmittel einen hohen Gehalt an antioxidativ wirksamen Verbindungen enthalten, die das Risiko für das Auftreten einer Reihe von Erkrankungen reduzieren können (Block et al., 1992). Als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe werden somit auch den Polyphenolen eine Reihe physiologischer Wirkungen zugeschrieben. Experimentelle Untersuchungen zeigen, dass phenolische, antioxidative Lebensmittelinhaltsstoffe protektive Wirkung gegenüber den sogenannten „free radical diseases“, z.B. Arteriosklerose und damit verbundenen Herz-Kreislaufkrankungen oder bestimmten Tumorformen, ausüben können. Unter den vielen verschiedenen positiven Wirkungen, die für Polyphenole postuliert werden, spielen die antioxidative Wirksamkeit, ihre Aktivität als Antikarzinogen und ihre antimikrobiellen Eigenschaften die wohl bedeutendste Rolle in der Diskussion um diese sekundären Pflanzenstoffe (Graf und Eaton, 1993; Huang et al., 1992; Wang et al., 1992; Rice-Evans et al., 1995). Daneben werden auch antithrombotische, antivirale, antiinflammatorische, immunmodulierende und synergistische Effekte der Polyphenole geprüft.

Die antioxidative Eigenschaft vieler Polyphenole beruht sowohl auf ihrer Wirkung als Radikalfänger, Chelatbildner für Metalle und Oxidationsschutz durch Singulett-Sauerstoff wie auch auf ihrer Fähigkeit, durch ihre antioxidativen Eigenschaften die Bildung von kanzerogenen Nitrosaminen aus der Reaktion von Nitrit mit sekundären Aminen zu inhibieren (Brandl und Herrmann, 1984; Shahidi und Wanasundara, 1992). Die Stärke der antioxidativen Eigenschaft von Phenolsäuren hängt in starkem Maße von der Anzahl der Hydroxylgruppen im Molekül ab. Kaffeesäure beispielsweise gilt als potenter Inhibitor der Hydroxylradikalbildung bei der Lipidperoxidation (Morton et al., 2000). Für Ellagsäure konnte gezeigt werden, dass sie reaktive Sauerstoffmoleküle abfangen und dadurch oxidative DNA-Schäden *in vitro* verhindern kann (Cozzi et al., 1995). Es wird in vielen Fällen vermutet, dass synergistische Wechselwirkungen für die gesteigerten Effekte verantwortlich sind, die durch die Wirkung der isolierten Phenolsäuren nicht zu erklären sind (Onyeneho und Hettiarachchy, 1992).

Flavonoide nehmen als antioxidative Lebensmittelinhaltsstoffe eine Sonderstellung ein, da sie aufgrund ihrer chemischen Struktur sowohl in hydrophilen als auch in lipophilen Systemen aktiv sein können (Kühnau, 1976). Diese Eigenschaft einerseits und ihre enge Verwandtschaft andererseits stellen die gleichzeitige Analytik verschiedener Polyphenole jedoch vor besondere Schwierigkeiten.

Die antioxidative Eigenschaft der Flavonoide beruht auf ihrer chemischen Struktur. Aufgrund der Delokalisation der Ringelektronen sind sie in der Lage, mit Radikalen unter Bildung stabiler, wenig reaktiver Phenoxyradikale zu reagieren. Die dafür verantwortlichen strukturellen Voraussetzungen sind vor allem die Anwesenheit einer C-C-Doppelbindung zwischen C₂ und C₃ sowie Hydroxylgruppen an den aromatischen Ringen (Rice-Evans et al., 1996).

Man kennt die antimutagene und antikanzerogene Wirkung natürlich vorkommender Phenolsäuren, etwa Ellagsäure, Kaffeesäure, Gallussäure und Ferulasäure, bereits gegenüber aggressiven Kanzerogenen, wie Nitrosaminen und Mykotoxinen (Mukhtar et al., 1986; Dixit und Gold, 1986). Als wesentlicher Bestandteil des Mechanismus für die antikanzerogene Wirkung der Phenolsäuren werden die Hydroxylgruppen verantwortlich gemacht (Wattenberg, 1985). Bislang wurde Ellagsäure als Vertreter der Phenolsäuren am besten untersucht. In der verfügbaren Literatur wurden bisher jedoch noch keine Studien am Menschen durchgeführt, in denen die Phenolsäureaufnahme und deren Einfluss auf die Entwicklung verschiedener Krebsarten untersucht wurden. Am Tiermodell und anhand von in vitro Versuchen wurde jedoch bereits bestätigt, dass Phenolsäuren die Kanzerogenese sowohl während der Initiation als auch während der Promotion hemmen können (Huang et al., 1988). Dabei werden folgende Mechanismen hervorgehoben (Wattenberg, 1985; Watzl und Rechkemmer, 2001):

- Hemmung von Phase-I-Enzymen
- Wechselwirkungen mit dem aktivierten Kanzerogen
- Wechselwirkungen mit der DNA
- Induktion von Phase-II-Enzymen
- Antioxidative Wirkung

Zur antikanzerogenen und antimutagenen Wirksamkeit von Flavonoiden gibt es etliche Hinweise *in vivo*, sodass eine hohe Aufnahme von Obst und Gemüse für ein verringertes Magen-, Dickdarm- und Brustkrebsrisiko verantwortlich gemacht wird (Hermann et al., 2002). Auch in tierexperimentellen Versuchen wurde eine antikanzerogene Wirkung von Flavonoiden gegenüber Brust-, Dickdarm-, Haut-, Magenkrebs sowie oralen Krebsformen festgestellt (Markaverich et al., 1988; Fergusson et al., 2004). Da die Entstehung solcher Erkrankungen im Detail noch nicht geklärt ist, man aber von einem multifaktoriellen Geschehen ausgehen muss, werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Durch ihre strukturelle Ähnlichkeit mit Nukleotiden können sich einige Flavonoide möglicherweise direkt an die DNA anlagern und dadurch Bindungsstellen für Kanzerogene maskieren (Ahmed et al., 1994; Wiltrout und Hornung, 1988). Es wurde auch herausgefunden, dass Flavonoide aufgrund ihrer Redoxaktivität DNA-Schäden verhindern können. Sowohl in Leberzellen (HepG2) und menschlichen Lymphozyten, in denen durch Behandlung mit H₂O₂ DNA-Schäden induziert wurden, als auch in monozytischen Zellen (U-937), die mit tert-Butylhydroperoxid behandelt wurden, konnten signifikante Effekte festgestellt werden (Johnson und Loo, 2000).

Die Flavonoide Quercetin, Kämpferol und Morin können die Aktivität von Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen beeinflussen. Die Hemmung solcher Enzyme aus dem Phase-I-Metabolismus durch Xenobiotika kann eine Aktivierung möglicher Kanzerogene verzögern oder sogar verhindern. Allerdings sind diese Ergebnisse oftmals dosisabhängig und möglicherweise spielen auch synergistische Effekte dabei eine wesentliche Rolle (Siess et al., 1992). Der protektive Mechanismus vieler Flavonoide, Phase-II-Enzyme (z.B. Glutathion-S-transferase) zu induzieren, kann zudem die Entgiftung von Kanzerogenen erhöhen (Hodek et al., 2002).

Für Tangeritin und Quercetin konnte *in vitro* eine dosisabhängige Induktion der Apoptose nachgewiesen werden, die allerdings auch stark vom verwendeten Zelltyp abhängt (Wie et al., 1994; Hirano et al., 1996). Zudem können Flavonoide *in vitro* die Proliferation von Krebszelllinien hemmen, indem sie die Expression von Protoonkogenen vermindern (Csokay et al., 1997). Einige Flavonoide können die Aktivität bzw. die Wirkung von Östrogen modulieren. Daneben beeinflussen Polyphenole (z.B. Isoflavone) durch reversible Hemmung der Aromatase die Östrogen-Plasmakonzentration (Yang et al., 2001; Hodek et al. 2002). Daher werden Präparate auf Basis pflanzlicher Polyphenole mit östrogenen Effekten seit einiger Zeit als potentielle Nahrungsergänzungsmittel gegen Wechseljahresbeschwerden angeboten.

Die Fähigkeit von Flavonoiden, als Antagonisten von Östrogen zu wirken, hängt von der Anzahl und der Position der Hydroxylgruppen ab, wobei eine steigende Zahl von Hydroxylgruppen an Ring A und B die Hemmwirkung vermindert, während eine Anordnung in ortho-Stellung die Hemmwirkung verstärkt (Hodek et al., 2002).

3. Material, Methoden und Studien

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien

Aceton, LiChrosolv (Merck 100020)

2,4-Dinitrophenylhydrazin, purissimum p.a. (Sigma 2630)

Acetonitril, HPLC Ultra Gradient Grade (Baker 9017)

Chloroform, Analysed (Baker)

Dichlormethan, LiChrosolv (Merck 106044)

Enzymatischer Farbtest zur Triglyceridbestimmung (Boehringer 701912)

Essigsäure 100 % (Merck 818755)

Ethanol, absolut, p.a. (Merck 100983)

Kontrollserum Precinorm L (Boehringer 781827)

Kupfersulfat, p.a. (Merck 2790)

L(+)-Ascorbinsäure, p.a. (Merck 127)

Methanol, LiChrosolv (Merck 106018)

Natriumacetat, p.a. (Merck 6268)

n-Hexan, LiChrosolv (104391)

ortho-Phosphorsäure 85 % (Merck 573)

Salzsäure, p.a. (Merck 319)

Schwefelsäure 96%, purum (Roth 9316)

Stickstoff 4.8 (Linde)

Sulfatase mit sekundärer Aktivität: β -Glucuronidase (Sigma S9626)

Thioharnstoff, p.a. (Merck 7979)

Trichloressigsäure, p.a. (Merck 807)

3.1.2 Standardsubstanzen

Die eingesetzten Standardsubstanzen sind in Tabelle 1 und 2 beschrieben.

Tab. 1: Verwendete Standardsubstanzen für die Polyphenolbestimmung

Standardsubstanz	Bezugsquelle	Reinheit
(-)-Epicatechin (3,3',4',5,7-Flavanpentol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Nr. E-1753	99 %
(-)-Epigallocatechin (3,3',4',5',5,7-Flavanhexol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Nr. E-3768	98 %
(-)-Epigallocatechingallat (3',4',5',5,7-Flavanpentol-3-gallussäureester)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Nr. E-4143	95 %
(-)-Gallocatechin (3,3',4',5',5,7-Flavanhexol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Nr. G-6657	98 %
(+)-Catechin (3,3',4',5,7-Flavanpentol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Nr. C-1215	98 %
Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon)	Fluka Chemie AG, Buchs CH, Nr. 10798	98 %
Daidzein (4',7-Dihydroxyisoflavon)	Fluka Chemie AG, Buchs CH, Nr. 30405	98 %
Ellagsäure (2,3,7,8-Tetrahydroxy-1-benzopyrano [5,4,3]-[1]-benzopyran-5,10- dion)	Fluka Chemie AG, Buchs CH, Nr. 45140	98 %
Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure)	Fluka Chemie AG, Buchs CH, Nr. 46278	99 %
Fisetin (3,3',4',7-Tetrahydroxyflavon)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Nr. F50-5	93 %
Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavon)	Fluka Chemie AG, Buchs CH, Nr. 91955	98 %
Gentisinsäure (2,5-Dihydroxybenzoesäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Nr. 14,935-7	98 %
Hesperetin (3',5,7-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Nr. H-4125	95 %
Isorhamnetin (3,5,7,4'-Tetrahydroxy-3'-methoxyflavon)	Roth GmbH, Karlsruhe, Nr. 7589	98 %
Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Nr. C-0625	99 %
Kämpferol (3,4',5,7-Tetrahydroxyflavon)	Fluka Chemie AG, Buchs CH, Nr. 60010	96 %
Luteolin (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon)	Fluka Chemie AG, Buchs CH, Nr. 62696	99 %
Naringenin (4',5,7-Trihydroxyflavanon)	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, Nr. 102430	97 %
p-Cumarsäure (4-Hydroxyzimtsäure)	Fluka Chemie AG, Buchs CH, Nr. 28200	98 %
Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure)	Fluka Chemie AG, Buchs CH, Nr. 37580	97 %
Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon)	Fluka Chemie AG, Buchs CH, Nr. 83370	99 %
Salicylsäure (2-Hydroxybenzoesäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Nr. S-5922	99 %
Syringasäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure)	Fluka Chemie AG, Buchs CH, Nr. 86230	97 %
Vanillinsäure (4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Nr. V-2250	98 %

Tab. 2: Standardsubstanzen zur Carotinoid- und Tocopherolbestimmung

Standardsubstanz	Bezugsquelle	Reinheit
(±)- α -Tocopherol	Sigma-Aldrich (3251)	95 %
(+)- γ -Tocopherol	Sigma-Aldrich (1782)	99 %
(+)- α -Tocopherylacetat	Sigma-Aldrich (3376)	98 %
Canthaxanthin	Hoffmann-La Roche, Basel CH, Nr. A 9413781	99 %
Lutein	Fluka Chemie AG, Buchs CH, Nr. 95507	90 %
Lycopin	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Nr. L 9879	90 %
α -Carotin	Hoffmann-La Roche, Basel CH, Nr. Ro-01-9175/000	97 %
β -Apo-8' Carotinsäureethylester	Hoffmann-La Roche, Basel CH, Nr. A 9520313	97 %
β -Carotin	Fluka Chemie AG, Buchs CH, Nr. 22040	97 %
β -Cryptoxanthin	Hoffmann-La Roche, Basel CH, Nr. Ro-04-0763/001	98,7 %

3.1.3 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage AT 261 DeltaRange (Mettler GmbH, Gießen)
 EDTA-Röhrchen (Monovette[®], Sarstedt)
 Elektrochemischer Detektor ED 40 (Dionex Softron, Idstein)
 HPLC-Degasser Liliput (Gynkotec GmbH, Germering/München)
 HPLC-Detektor UV/VIS UVD 170 S (Gynkotec GmbH, Germering/München)
 HPLC-Detektor UV/VIS UVD 340 S (Gynkotec GmbH, Germering/München)
 HPLC-Dilutor 401 C (Gilson, Villiers le Bel, Frankreich)
 HPLC-Probengeber Gina 50 (Gynkotec GmbH, Germering/München)
 HPLC-Pumpe M480 (Gynkotec GmbH, Germering/München)
 HPLC-Pumpe P 580 (Gynkotec GmbH, Germering/München)
 HPLC-Sampling Injector 231 XL (Gilson, Villiers le Bel, Frankreich)
 HPLC-Säule Luna C18, 4.6 mm x 150 mm, 5 μ m (Phenomenex)
 HPLC-Säule Zorbax Eclipse XDB-C18, 3.0 mm x 150 mm, 3.5 μ m (Agilent Technologies)
 HPLC-Säulenthermostat STH 585 (Gynkotec GmbH, Germering/München)
 HPLC-Software Chromeleon Version 4.32 (Gynkotec GmbH, Germering/München)
 HPLC-Software Chromeleon Version 6.03 (Gynkotec GmbH, Germering/München)
 Kühlzentrifuge 2K15 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode)
 Membranfilter Spartan, (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
 Mikroröhre mit Verschluss; Sarstedt (Nümbrecht) No./Ref. 72.694
 pH-Meter (Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim i. OB)
 Photometer UV/VIS Spektrometer Lambda 2S (Perkin Elmer GmbH, Bodenseewerk)
 Rotationsverdampfer Rotavapor-R114 (Büchi, Konstanz)
 Safe- Lock Tubes 0,5 ml, Eppendorf (Hamburg); No. 0030121.023
 S-Monovette[®] Blutentnahmesystem 9 ml KE; Sarstedt (Nümbrecht); No. 02.1066.001
 SPE-Säule Oasis HLB 1cc; Waters (Milford, Massachusetts); Part No. WAT094225
 Temperatur Regulator 832 (Gilson, Villiers le Bel, Frankreich)
 Thermostat Haake CH Fisons (Haake Mess-Technik GmbH & Co., Karlsruhe)
 Tischzentrifuge Z 200 M/H (Hermlle, Wehingen)
 Ultraschallbad Bandelin Sonorex RK 510 H (Bandelin Electronic GmbH & Co., Berlin)
 Ultra-Turax T 25 (Jahnke & Kunkel, Staufen i. Br.)
 Vakuumkammer (Macherey-Nagel, Düren)
 Vortex Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich/Schweiz)

3.2 Methoden

3.2.1 Plasmagewinnung

Zur Plasmagewinnung wurde venöses Blut in EDTA-Röhrchen bzw. Serumröhrchen (Monovette[®], Sarstedt) abgenommen. Nach sorgfältigem Umschwenken zur vollständigen Durchmischung und Abkühlung wurden die Blutproben 15 Minuten bei 4000 U/min. (1500 g) zentrifugiert und das Plasma bzw. Serum mittels Pasteurpipette abgenommen. Die Proben wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt, am folgenden Tag fraktioniert und bei -80°C gelagert. Bei Lagerung und Transport der Blutproben ins Labor wurden Temperaturen von 4 bis 8 °C nicht überschritten.

3.2.2 Polyphenolbestimmung in Plasma und Urin mittels HPLC

Es wurden 1 ml Plasma bzw. Urin in ein Reagenzglas gegeben. Dann wurden 110 µl Natriumacetat (0,78 M) und 100 µl Ascorbinsäure (0,1 M) sowie 100 µl des internen Standards Fisetin (1934,4 ng/ml; 6,75 mmol/l) zugeben. Nach Zugabe von 232,5 U Sulfatase wurde der Ansatz am Vortexer gründlich gemischt. Anschließend wurde die Probe 30 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zum Stopp der enzymatischen Reaktion und zur Protonierung der freien Säuren wurden der Probe 20 µl H₃PO₄ (85%ig) zugeben. Zur Vorbereitung der SPE-Extraktions-Säule wurde die Kartusche mit 1 ml Methanol konditioniert und mit 1 ml aqua dest. equilibriert, wobei die Flussrate 10 ml/min. nicht überstieg. Dann wurde die so vorbereitete Kartusche mit der zuvor präparierten Probe bei einem Fluss von < 2 ml/min. beladen. Die Probe wurde zunächst mit 1 ml einer Waschlösung (Mischung aus 5% Methanol und 2% Essigsäure in aqua dest.) bei einem Fluss von < 10 ml/min. aufgereinigt. Anschließend wurden die interessierenden Probestandteile mit zweimal 1 ml Methanol in einen Spitzkolben eluiert (< 2 ml/min.). Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Dann wurde der Rückstand in 100 µl Methanol/aqua_{dest.} (60/40; v/v) aufgenommen und zum Lösen am Vortexer kräftig geschüttelt. Die Lösung wurde 3 Minuten bei 12000 U/min. zentrifugiert und der Überstand zur Analyse in die HPLC injiziert.

3.2.3 Polyphenolbestimmung in Erythrozyten mittels HPLC

Bei der Bestimmung von Apigenin in Erythrozyten wurden in einem Reagenzglas 4 ml Aceton vorgelegt. In einem weiteren Reagenzglas wurde zur Hämolyse 1 ml entionisiertes Wasser mit 1 ml Erythrozytensuspension vermischt. Dann wurden der Erythrozytenlösung 100 µl Fisetin (1934,4 ng/ml) als ISTD und 200 µl Ascorbinsäure (0,1 M) sowie 220 µl Natriumacetatlösung

(0,78 M) beigefügt. Die Lösung wurde am Vortexschüttler kurz durchmischt. Anschließend wurde das Gemisch langsam in das Aceton pipettiert, um das in der Erythrozytenlösung enthaltene Hämoglobin auszufällen. Das Gemisch wurde erneut am Vortexer gründlich durchmischt und dann 5 Minuten lang mit 5000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Faltenfilter in ein Reagenzglas mit Schliff abfiltriert und die Extraktion des Sediments mit Aceton wurde wiederholt. Nach Vereinigung wurden die Überstände am Rotationsverdampfer auf etwa 0,9 ml eingengt, um sicher zugehen, dass kein Aceton mehr in der Probe vorhanden ist und somit das im nächsten Schritt beigefügte Sulfatase-Glucoronidase-Enzymgemisch nicht präzipitiert. Nachdem der Probe 232,5 U Sulfatase zugegeben worden sind, wurde das System zur enzymatischen Hydrolyse 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, die Reaktion danach durch Zugabe von 20 µl o-Phosphorsäure (85%) gestoppt und am Laborschüttler gründlich durchgemischt. Die an diese Bearbeitungsschritte anschließende Festphasenextraktion über SPE-Säulen, die Einengung der Probe am Rotationsverdampfer, die Aufnahme des Rückstandes in Methanol, die Zentrifugation, die Abfüllung der Lösung in das HPLC-Fläschchen, die Untersuchung mittels RP-HPLC-ECD und die Auswertung entsprechen der für Plasma und Urin beschriebenen Methode.

3.2.4 Polyphenolbestimmung im Lebensmittel mittels HPLC

Zur quantitativen Bestimmung von Apigenin wurden Petersilienblätter ohne Stiel mit dem Ultra-Turrax gründlich homogenisiert. 500 mg davon wurden in ein Reagenzglas eingewogen. Die Proben wurden als Doppelansatz untersucht. Nach einer abgeänderten Methode von Mayr et al. (1995) wurden zu jeder Petersilieneinwaage 5 ml Methanol sowie 100 µl ISTD Fisetin-Lösung (1934,4 ng/ml) zugegeben und die Probe am Laborschüttler sorgfältig vermischt. Danach wurden die Reagenzgläser mit einem Stopfen verschlossen und für 30 Minuten zur Extraktion ins gekühlte Ultraschallbad gestellt. Nach Beendigung der Extraktion wurde der Ansatz 10 Minuten bei 4 °C mit 5000 U/min. zentrifugiert und der Überstand durch einen Faltenfilter in ein Schraubverschlussreagenzglas überführt. Nach einer modifizierten Methode von Hertog et al. (1992) wurden die Proben nach Zugabe von 5 ml Salzsäure (2,4 M) zur Säurehydrolyse für 2 Stunden auf 90 °C im verschlossenen Reaktionsgefäß im Trockenschrank erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösungen wurden die in Reagenzgläser umgefüllten Proben erneut zentrifugiert (4 °C, 5000 U/min., 10 min) und membranfiltriert (0,45 µm). Die Lösung wurde in einem 10 ml Messkolben auf Volumen gebracht, von welchem 100 µl in ein HPLC-Fläschchen pipettiert wurden. Die Untersuchung mittels RP-HPLC-ECD und die Auswertung entsprechen der Methode von Plasma und Urin.

3.2.5 HPLC-Bedingungen

Pro Einspritzung wurden 30 µl des Probenextraktes injiziert. Als Elutionsmittel wurde in Anlehnung an die Methode von Maiani et al. (1997) ein Gemisch aus entionisiertem Wasser (pH = 2,07) und Methanol verwendet. Das entionisierte Wasser war mit o-Phosphorsäure angesäuert. Die genaue Beschreibung der HPLC-Bedingungen und das Gradientenprogramm gehen aus Tabelle 3 und Tabelle 4 hervor.

Tab. 3: Gradientenprofil der HPLC-Fließmittel zur Polyphenolbestimmung

Zeit (min)	0	15	50	65	109	110	115	120
Fließmittel A (%)	100	82	75	60	44	0	0	100
Fließmittel B (%)	0	18	25	40	56	100	100	0
Flussrate µl/min	400							

Tab. 4: HPLC-Bedingungen zur Bestimmung der Polyphenole

Parameter	Bedingungen
HPLC-Säulen	Luna C18, 4.6 mm x 150 mm, 5 µm Zorbax Eclipse XDB-C18, 3.0 mm x 150 mm, 3.5 µm
Vorsäule	Eclipse XDB-C8 Narrow-Bore, 5µm (2.1 mm x 12.5 mm)
Probenschleife	250 µl
Fliessmittel A	Bidest. Wasser / Phosphorsäure (99,9/0,1; v/v)
Fliessmittel B	Methanol
Flussrate	0,4 ml/min
Säulentemperatur	60°C
Detektoren:	
UV-DAD: (Wellenlängen)	225 nm (Flavanole, Isoflavone, Phenolsäuren) 287 nm (Flavanone) 360 nm (Flavonole, Flavone)
ECD: (Meßspannung)	+ 1100 mV (Gleichspannungsamperometrie)
Laufzeit	120 min

Identifikation

Die qualitative Bestimmung der Polyphenole erfolgte anhand ihrer Retentionszeiten im Vergleich mit den Standardsubstanzen sowie über den Vergleich der UV-Spektren des Analyten in der Probe mit dem UV-Spektrum der Standardsubstanz. Typische Chromatogramme von Standardsubstanzen der Flavonoide und Phenolsäuren sowie der Analyten in Plasmaproben sind in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt.

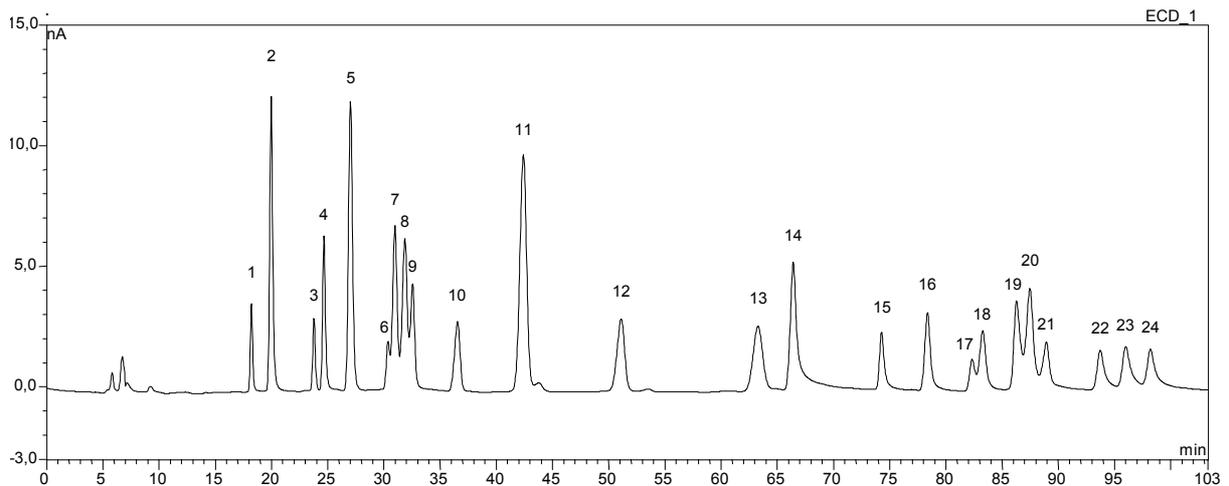


Abb. 8: HPLC-Chromatogramm einer Polyphenol-Standardmischung

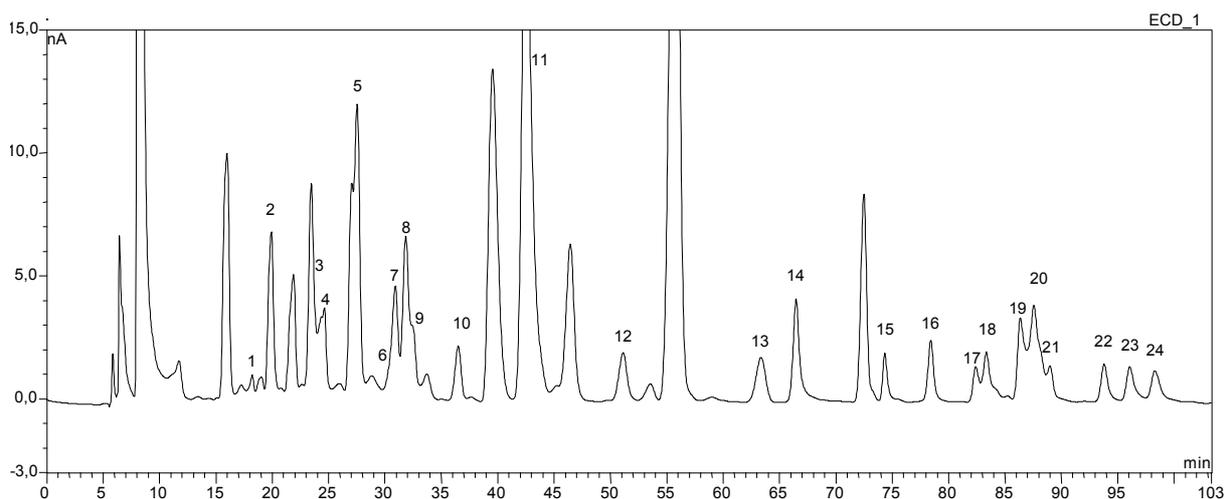


Abb. 9: HPLC-Chromatogramm einer Humanplasma-Probe mit zugesetzten Referenzstandards

Quantifizierung

Die quantitative Bestimmung der enthaltenen Polyphenolmenge (C_x) erfolgte anhand der Methode des internen Standards (ISTD) über die Menge des zugesetzten internen Standards (C_{ISTD}), der Peakfläche des Analyten (A_x), der Peakfläche des internen Standards (A_{ISTD}) und der ermittelten Responsefaktoren (Rf_x). Die Responsefaktoren (siehe Tabelle 16) wurden mit Standardsubstanzen mit Hilfe der Software Microsoft Office Excel 2000 Version 9.0 nach folgender Formel berechnet:

$$Rf_x = \frac{A_{ISTD}}{A_x} \cdot \frac{C_x}{C_{ISTD}}$$

Zur Berechnung der Responsefaktoren wurden die Standardsubstanzen doppelt eingespritzt und der Mittelwert aus beiden für die Berechnungen verwendet. Aus den resultierenden Responsefaktoren wurden die Mittelwerte gebildet.

Die Peakflächen wurden mit Hilfe der Software Chromeleon Version 4.32 (Gynkotek GmbH, Germering/München) integriert. Die entsprechenden Konzentrationen wurden mit Excel nach folgender Formel errechnet:

$$C_x = \frac{A_x}{A_{ISTD}} \cdot Rf_x \cdot C_{ISTD}$$

Jede Probe wurde in Doppeleinspritzung gemessen. Die resultierenden Mittelwerte und die entsprechenden Konzentrationen wurden mit Excel berechnet und in Nanomol pro Liter (nmol/l) angegeben.

3.2.6 Carotinoid- und Tocopherolbestimmung im Plasma mittels HPLC

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach einer modifizierten Methode von Hess et al. (1991). Das Fließmittel wurde nach der Methode von Ito et al. (1987) bereitet. Die Analyse der Carotinoide und Tocopherole erfolgte mittels HPLC unter den in Tabelle 5 angeführten Bedingungen.

Tab. 5: HPLC-Bedingungen der Carotinoid- und Tocopherolbestimmung in Plasma

Parameter	Bedingungen
HPLC-Säule	Ultraspher ODS, C ₁₈ , 4,6 x 150 mm, Beckmann, München
HPLC-Vorsäule	Ultraspher ODS, C ₁₈ , 4,6 x 150 mm, Beckmann, München
Fließmittel	Acetonitril/Dichlormethan/Methanol 7/2/1 (v/v/v) - isokratisch
Flussrate	1200 µl/min
Säulentemperatur	18°C
Wellenlänge	292 nm für Tocopherole, 450 nm für Carotinoide
Laufzeit	19 Minuten

Identifikation

Die qualitative Bestimmung der Carotinoide und Tocopherole erfolgte anhand ihrer Retentionszeiten im Vergleich mit Standardsubstanzen. Typische Chromatogramme der Standardsubstanzen sowie der Analyten in Plasmaproben sind in den Abbildungen 10 bis 13 dargestellt. Mit der verwendeten HPLC-Methode konnten Lutein und Zeaxanthin nicht getrennt werden. Die ermittelten Lutein-Konzentrationen beinhalten deshalb auch immer die nicht gesondert berechneten Zeaxanthin-Konzentrationen, deren Menge sehr gering ist.

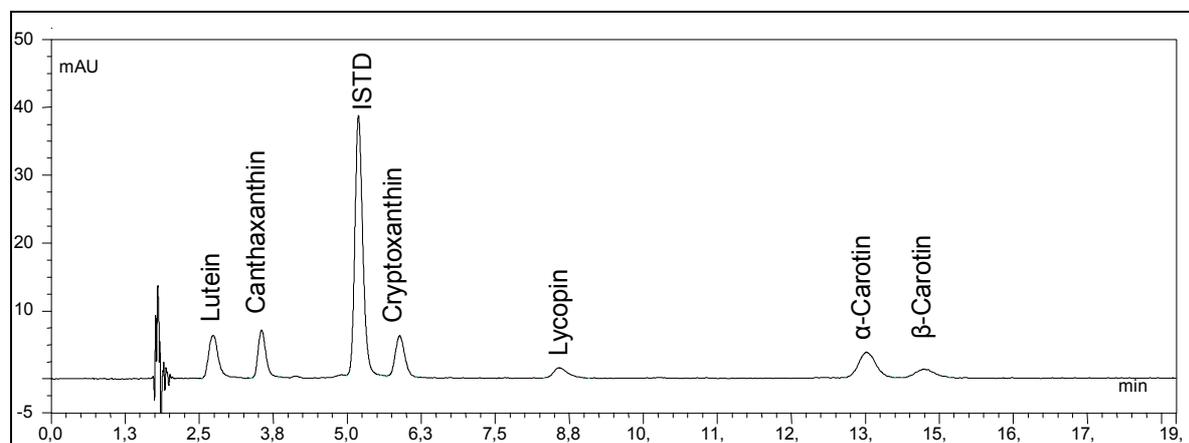


Abb. 10: HPLC-Chromatogramm der Carotinoide als Standardmischung unter den oben beschriebenen Geräteparametern (ISTD = β -Apo-8'-carotinsäureethylester)

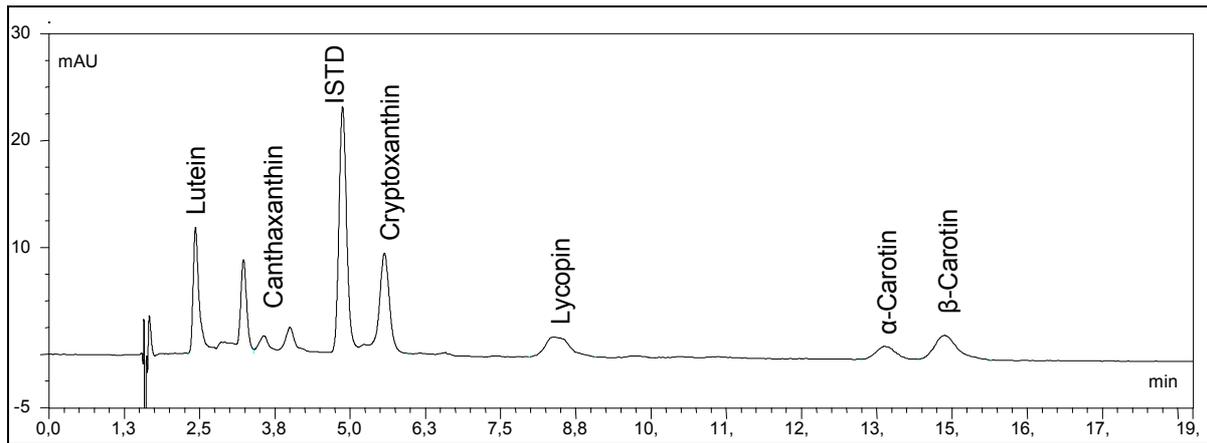


Abb. 11: HPLC-Chromatogramm der Carotinoide im Plasma unter den oben beschriebenen Geräteparametern (ISTD = β -Apo-8'-carotinsäureethylester)

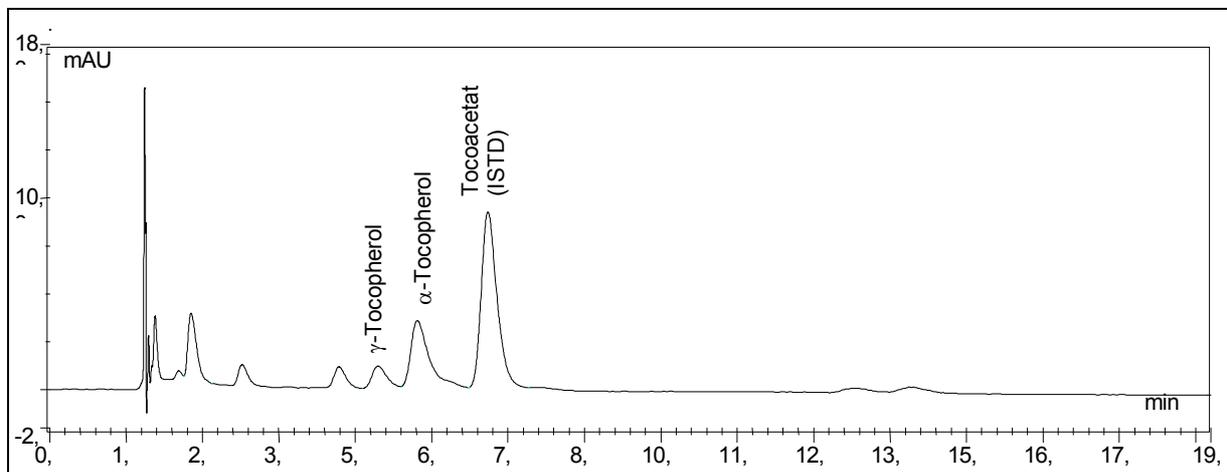


Abb. 12: HPLC-Chromatogramm der Tocopherole als Standardmischung unter den oben beschriebenen Geräteparametern (ISTD = (+)- α -Tocopheryl-acetat)

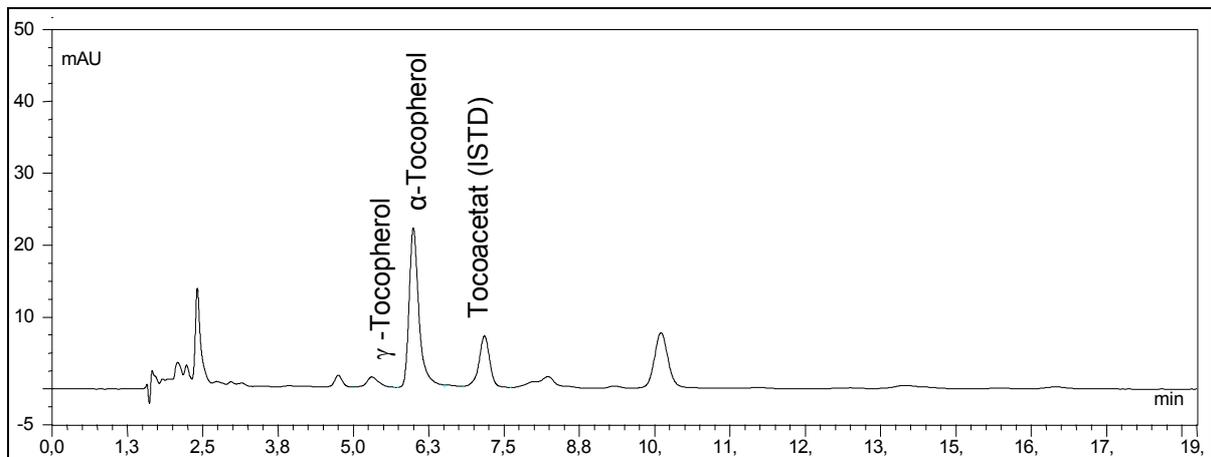


Abb. 13: HPLC-Chromatogramm der Tocopherole im Plasma unter den oben beschriebenen Geräteparametern (ISTD = (+)- α -Tocopherylacetat)

Quantifizierung

Die quantitative Bestimmung der enthaltenen Carotinoid- und Tocopherolmenge (C_x) erfolgte anhand der Methode des internen Standards (ISTD). Mit Standardsubstanzen wurden die Responsefaktoren (siehe Tabelle 6) mit Excel nach folgender Formel berechnet:

$$Rf_x = \frac{A_{ISTD}}{A_x} \cdot \frac{C_x}{C_{ISTD}}$$

Zur Berechnung der Responsefaktoren wurden die Standardsubstanzen doppelt eingespritzt und der Mittelwert aus beiden für die Berechnungen verwendet.

Tab. 6: Standardsubstanzen und Responsefaktoren der Carotinoide und der Tocopherole

Standardsubstanz	Rf_x
γ-Tocopherol	0,154
α-Tocopherol	0,293
Lutein	1,014
Canthaxanthin	1,042
Cryptoxanthin	1,066
Lycopin	2,594
α-Carotin	1,679
β-Carotin	1,418

Die Peakflächen wurden mit Hilfe der Software Chromeleon Version 4.32 (Gynkotek GmbH, Germering/München) integriert. Die entsprechenden Konzentrationen wurden mit Excel nach folgender Formel errechnet:

$$C_x = \frac{A_x}{A_{ISTD}} \cdot Rf_x \cdot C_{ISTD}$$

Jede Probe wurde in Doppelspritzung gemessen. Die resultierenden Mittelwerte und die entsprechenden Konzentrationen wurden mit Excel berechnet und in Mikromol pro Liter ($\mu\text{mol/l}$) angegeben.

Wiederfindung und Reproduzierbarkeit

Durch Zudotieren der Standardsubstanzen zu Plasmaproben (n=5) derselben Person wurden bei doppelter Einspritzung durchschnittliche Wiederfindungsraten von 92 % für Lutein/Zeaxanthin, 99 % für Canthaxanthin, 107 % für Cryptoxanthin, je 96 % für α -Carotin und β -Carotin, 102 % für γ -Tocopherol und 94 % für α -Tocopherol ermittelt. Die Reproduzierbarkeit wurde mit Plasmaproben (n=7) überprüft. Mit den ermittelten Variationskoeffizienten von 4,52 % für γ -Tocopherol, 4,44 % für α -Tocopherol, 4,76 % für Lutein, 3,83 % für Canthaxanthin, 2,54 % für Cryptoxanthin, 4,47 % für Lycopin, 4,48 % für α -Carotin und 4,54 % für β -Carotin ergab sich eine gute Reproduzierbarkeit.

3.2.7 Vitamin C-Bestimmung im Serum

Die Vitamin C-Bestimmung im Serum erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1943), die in der VERA-Studie von Kübler et al. (1992) beschrieben wurde. Zur Qualitätskontrolle wurde bei jeder Probenanalyse ein Standard mitgeführt. Dazu wurden 10 mg Ascorbinsäure in 100 ml TCA gelöst. Diese Stammlösung wurde mit TCA 1/10 verdünnt. 400 μ l dieser Verdünnung wurden mit 600 μ l TCA versetzt, kräftig geschüttelt und wie die Proben analysiert (3-fach-Ansatz). Die Extinktion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 520 nm am Photometer gegen Meßschwefelsäure gemessen. Die Extinktion des Blindwertes wurde von den Extinktionen der Proben und der Kalibrierstandards subtrahiert. Die Extinktion der Kalibrierlösungen wurden gegen deren Konzentrationen aufgetragen und die Kalibriergerade durch lineare Regression ermittelt. Für Vitamin C wurde eine Wiederfindungsrate von 101,6 % und ein Variationskoeffizient von 0,7 % ermittelt, indem Standardsubstanzen zu Plasmaproben (n=7) zugesetzt und nach dem oben beschriebenen Verfahren untersucht wurden (Linseisen 1999).

3.3 Studien

3.3.1 Bayerische Verzehrsstudie II

Die Bayerische Verzehrsstudie II ist eine repräsentative Querschnittsstudie von in Privathaushalten lebenden, deutsch sprechenden Personen in Bayern. Das Gemeinschaftsprojekt wird von der Arbeitsgruppe Humanernährung und Krebsprävention in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Wirtschaftslehre des Haushalts der Technischen Universität München-Weihenstephan durchgeführt. Im Auftrag der Technischen Universität München ist NFO Infratest Gesundheitsforschung München für die Stichprobenplanung und -ziehung, die Entwicklung der Erhebungsinstrumente (in Zusammenarbeit mit der TU München), die Feldarbeit sowie die Datenaufbereitung (Datenerfassung, Datenprüfung, Datengewichtung und Grundausswertung) zuständig. Das Projekt wird mit Mitteln des Bayerischen Staatsministeriums für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz finanziert. Für die Durchführung der Studie liegt ein positives Votum der zuständigen Ethikkommission vor. Anknüpfend an die Nationale Verzehrsstudie (1985-1988) und die erste Bayerische Verzehrsstudie (1995) soll in der zweiten Bayerischen Verzehrsstudie (2002/2003) anhand einer repräsentativen Stichprobe das Ernährungsverhalten in Bayern untersucht werden. Um dieses Studienziel zu erreichen und darauf basierend Richtlinien für gezielte Maßnahmen zur Vorbeugung ernährungsbedingter Erkrankungen zu erarbeiten, werden ergänzend zu der Erhebung des Ernährungsverhaltens in gleichzeitig gewonnenen Blutproben Nährstoffe und Biomarker für chronische Krankheiten gemessen.

Die Ziehung der Stichproben erfolgte durch ein dreistufiges Random-Route-Verfahren. Der persönliche Erstkontakt wurde durch Mitarbeiter der Firma NFO Infratest Gesundheitsforschung München hergestellt. Dabei wurden in einem computergestützten Erst-Interview allgemeine Daten zur Person, sozioökonomische und anthropometrische Daten sowie Antworten auf spezielle Fragen zu Ernährungswissen und -einstellungen erfasst. Innerhalb von vier Wochen nach diesem Erstkontakt wurde jede Person dreimal telefonisch kontaktiert, um computergestützt und damit standardisiert mit Hilfe der Software EPIC-SOFT 24-Stunden-Erinnerungsprotokolle über die Ernährung am jeweiligen Vortag (zwei Werktage, ein Wochenend- oder Feiertag) aufzunehmen. Die Auswertung der erhobenen Daten hinsichtlich Lebensmittelaufnahme und Nährstoffzufuhr erfolgte, im Anschluss an die Feldphase, an der TU München. Zusätzlich dazu wurde von jedem volljährigen Studienteilnehmer eine Blutprobe innerhalb von sechs Wochen nach dem Erstkontakt erbeten. In dem jeweils zuständigen

Gesundheitsamt wurden den Personen dazu kurze Fragebögen ausgehändigt und anthropometrische Messungen durchgeführt.

Die Grundgesamtheit der Bayerischen Verzehrstudie II umfasst alle, zum Zeitpunkt der Stichprobenziehung in bayerischen Privathaushalten lebenden, deutschsprachigen Personen männlichen und weiblichen Geschlechts, die zum Zeitpunkt der Erhebung (September 2002 bis Juli 2003) zwischen 14 und 80 Jahre alt waren. Die Teilnehmerrate der Studie betrug 71 % (n = 1050). Von diesen nahmen 1008 Personen aus 42 bayerischen Gemeinden an den telefonischen 24-Stunden-Erinnerungsprotokollen über ihre Ernährung am Vortag teil. Alle Erwachsenen (älter als 18 Jahre), die wenigstens ein 24-Stunden-Erinnerungsprotokoll vollendet hatten (n = 879) wurden zu einem Blutabnahmetermin eingeladen. Von diesen nahmen wiederum 65 % (n = 568) an der Blutabnahme teil. Für diese Arbeit wurden alle Plasmaproben auf ihre Gehalte an Polyphenolen, Carotinoiden, Tocopherolen und Vitamin C hin untersucht und statistisch ausgewertet. Wichtige Kenndaten dieses Studienkollektives sind Tabelle 7 zu entnehmen. Das Körpergewicht wurde ohne Schuhe gemessen und als fixe Variable für Kleidung wurde 1 kg vom gemessenen Wert abgezogen. Die Messung der Körpergröße erfolgte ebenfalls ohne Schuhe. Aus den beiden vor Ort gemessenen Werten wurde der Body-Mass-Index (BMI = Körpergewicht in kg / Quadrat der Körpergröße in m) berechnet. Für beide Messungen wurden jeweils geeichte Messgeräte verwendet.

Tab. 7: Verteilung der soziodemographischen und anthropometrischen Variablen (Mean \pm SD, Minimum und Maximum in Klammern) des Studienkollektives (BVS II)

	Gesamt (n = 568)		Männer (n = 243)		Frauen (n = 325)		<i>p-Wert</i> ¹
	n	%	n	%	n	%	
Altersgruppen							< 0,001
18 – <30	58	10,2	23	9,5	35	10,8	
30 – <40	130	22,9	44	18,1	86	26,5	
40 – <50	125	22,0	41	16,9	84	25,8	
50 – <65	157	27,6	81	33,3	76	23,4	
≥ 65	98	17,3	54	22,2	44	13,5	
BMI – Gruppen							0,005
Untergewicht	7	1,2	1	0,4	6	1,8	
Normalgewicht	229	40,3	81	33,3	148	45,5	
Übergewicht	218	38,4	110	45,3	108	33,2	
Adipositas	114	20,1	51	21,0	63	19,4	
WHR – Gruppen*							< 0,001
# < 0,85 / ## < 1,0	404	72,1	203	83,9	201	63,2	
# ≥ 0,85 / ## ≥ 1,0	156	27,9	39	16,1	117	36,8	
Rauchstatus							< 0,001
Nichtraucher	294	51,9	98	40,3	196	60,5	
Ex-Raucher	133	23,5	72	29,6	61	18,8	
Raucher	140	24,7	73	30,0	67	20,7	
Schichtzugehörigkeit							0,184
Unterschicht	79	13,9	32	13,2	47	14,5	
Untere Mittelschicht	137	24,1	58	23,9	79	24,3	
Mittelschicht	177	31,2	74	30,5	103	31,7	
Obere Mittelschicht	120	21,1	47	19,3	73	22,5	
Oberschicht	55	9,7	32	13,2	23	7,1	
Alter (Jahre)	48,5 \pm 15,3 (19 – 81)		51,3 \pm 15,7 (19 – 80)		46,4 \pm 14,5 (19 – 81)		< 0,001 ²
Gewicht ~ (kg)	75,6 \pm 15,1 (43,3 – 126,7)		83,3 \pm 13,9 (52,4 – 126,7)		69,9 \pm 13,4 (43,4 – 121,7)		< 0,001 ²
Größe (cm)	168,2 \pm 8,7 (135,5 – 198,0)		174,7 \pm 7,1 (155,0 – 198,0)		163,3 \pm 6,4 (135,5 – 181,5)		< 0,001 ²
BMI (kg/m²)	26,7 \pm 5,0 (16,6 – 50,5)		27,3 \pm 4,2 (16,8 – 43,2)		26,2 \pm 5,5 (16,6 – 50,5)		0,014 ²
WHR*	0,88 \pm 0,86 (0,68 – 1,10)		0,94 \pm 0,07 (0,76 – 1,10)		0,83 \pm 0,07 (0,68 – 1,00)		< 0,001 ²

¹Chi² – Test²Unabhängiger t-Test

*Werte von acht Probanden fehlen

für Frauen, ## für Männer

~ bei 4 Schwangeren wurde das Gewicht vor der Schwangerschaft verwendet

3.3.2 Brustkrebsstudie im Rahmen der EPIC-Studie

Wegen des beträchtlichen Einflusses der Ernährung auf die Primärprävention von Erkrankungen wurde die „European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition“ (EPIC) mit dem Richtungspunkt initiiert, die Beziehung zwischen Ernährung und Krebs sowie zwischen Ernährung und anderen chronischen Erkrankungen, unter Einbeziehung von Umweltfaktoren und genetischer Veranlagung, weiterführend aufzuklären. EPIC, welche von der „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) koordiniert wird, ist eine der größten epidemiologischen Studien zu diesem Thema weltweit und ist angelegt als multizentrische, prospektive Kohortenstudie. In 23 Studienzentren in zehn europäischen Ländern (Dänemark, Deutschland, Frankreich, Griechenland, Großbritannien, Italien, Niederlande, Norwegen, Schweden, Spanien) wurden über 520.000 Probanden überwiegend im Alter von 35 bis 70 Jahren rekrutiert.

Mit der Heterogenität der Stichprobe (z.B. hinsichtlich der Ernährungsmuster) und durch die Anwendung biologischer Marker sollen Beschränkungen früherer epidemiologischer Studien hinsichtlich der Präzision und Validität klassischer Ernährungsfragebögen überwunden werden. Deutschland ist an diesem Konzept mit zwei Studienzentren, Heidelberg und Potsdam, beteiligt. In beiden Zentren wurde die Rekrutierung in den Jahren 1994 bis 1998 durchgeführt, wobei die Einladung zur Teilnahme an der Studie durch Ziehung einer Zufallsstichprobe aus den Einwohnermeldedaten erfolgte. Die Heidelberger EPIC-Kohorte umfasst insgesamt 13.615 Frauen im Alter von 35 bis 65 Jahren. Bei der Basiserhebung wurden von den Teilnehmerinnen Daten zu Ernährungsgewohnheiten, Lebensstil, Rauchgewohnheiten, körperlicher Aktivität, subjektivem Empfinden, Krankheitsgeschichte und Medikamenteneinnahme erhoben. Ergänzend zu der Befragung wurden Blutdruck- und Körpermessungen durchgeführt. Wichtige Kenndaten des Studienkollektives sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Von fast allen Studienteilnehmern konnte eine Blutprobe genommen werden, die für künftige Forschungsvorhaben sofort fraktioniert und in Flüssigstickstoff (196 °C) eingelagert wurde. Diese Proben bilden auf Grund des Umfangs eine einzigartige biologische Datenbank. Regelmäßige Nachbeobachtungen der Kohorte werden mit dem Ziel durchgeführt, die im Laufe der Zeit auftretenden Krebsfälle zu identifizieren. Das Risiko für die Entstehung von Krankheiten kann dann in Bezugnahme auf die (vor der Erkrankung) ermittelten Daten zur langfristigen Nahrungsaufnahme bewertet werden. Der hier angewendete, prospektive Studienansatz kombiniert mit der Untersuchung von Plasmaproben ist im Gegensatz zu den

häufigeren Fall-Kontroll-Studien zu bevorzugen, da dieses Modell nicht anfällig für Verzerrungen durch Erinnerungsfehler („recall bias“) ist. In vielen der europäischen EPIC-Zentren werden für diese Nachbeobachtung Krebsregister eingesetzt. Da in der Studienregion kein betriebsbereites Register existiert, ist das Heidelberger Zentrum auf die aktive Erkundigung bei den Studienteilnehmern zu neu aufgetretenen Erkrankungen angewiesen, um anschließend durch Verifizierung bei den betreffenden Ärzten die inzidenten Krebsfälle selbst zu ermitteln („aktives Follow-up“). In der Heidelberger Kohorte wurden bisher über 1200 Neuerkrankungen an Krebs erfasst und zum großen Teil unter Mithilfe der behandelnden Ärzte verifiziert. Die gewonnenen Blutproben dienen in erster Hinsicht als biologisches Material zur Untersuchung möglicher Biomarker.

Mit EPIC wurde folglich ein einzigartiger Fundus an Daten und biologischem Material geschaffen, von welchem ein wesentlicher Beitrag zur Klärung des Zusammenhangs zwischen Ernährung und Krebs sowie anderen chronischen Erkrankungen zu erwarten ist. Die Fragestellungen dieser „Brustkrebsstudie im Rahmen der EPIC-Studie“, die hier bearbeitet werden sollen, bestehen insbesondere darin, in welchem Ausmaß die ausgewählten Polyphenole als spezifische Nahrungskomponenten mit der Entstehung von Brustkrebs assoziiert sind und welche protektive Rolle die hier betrachteten Flavonoide und Phenolsäuren spielen könnten.

Tab. 8: Verteilung der soziodemographischen und anthropometrischen Variablen (Mean \pm SD, Minimum und Maximum in Klammern) bei Fällen und Kontrollen in der Brustkrebsstudie im Rahmen von EPIC

	Fälle (n = 198)		Kontrollen (n = 204)		p-Wert ¹
	n	%	n	%	
Altersgruppen					0,993
Min. – 39	14	7,1	14	6,9	
40 – 49	48	24,2	52	25,5	
50 – 59	94	47,5	96	47,1	
60 – Max.	42	21,2	42	20,6	
BMI – Gruppen					0,838
Untergewicht	4	2,0	3	1,5	
Normalgewicht	99	50,3	109	53,4	
Übergewicht	63	32,0	58	28,4	
Adipositas	31	15,7	34	16,7	
Sport im letzten Jahr?					0,029
Ja	96	48,5	121	59,3	
Nein	102	51,5	83	40,7	
1. Regelblutung					0,371
< 12 Jahre	57	28,9	72	35,5	
13 Jahre	52	26,4	50	24,6	
> 13 Jahre	88	44,7	81	39,9	
Anzahl der Kinder					0,988
Keine Kinder	41	20,8	41	20,2	
1 – 2 Kinder	123	62,4	128	63,1	
> 2 Kinder	33	16,8	34	16,7	
Stilldauer					0,041
< 3 Monate	63	50,0	56	42,4	
3 – 6 Monate	26	20,6	24	18,2	
6 – 12 Monate	10	7,9	27	20,5	
> 12 Monate	27	21,4	25	18,9	
Schulbildung					0,240
Hauptschulabschluss	77	38,9	76	37,3	
Realschulabschluss	53	26,8	66	32,4	
Fachhochschulreife	5	2,5	11	5,4	
Hochschulreife	60	30,3	50	24,5	
Kein Schulabschluss	3	1,5	1	0,5	
Rauchstatus					0,565
Nichtraucher	120	60,6	113	55,4	
Ex-Raucher	48	24,2	57	27,9	
Raucher	30	15,2	34	16,7	
Menopause					0,886
Prämenopausal	45	24,6	52	27,8	
Postmenopausal	118	64,5	115	61,5	
nach Ovariectomie	4	2,2	5	2,7	
Perimenopausal	16	8,7	15	8,0	
Alter (Jahre)		53 \pm 8 (36 – 65)		53 \pm 8 (36 – 65)	0,809 ²
BMI (kg/cm²)		25,5 \pm 4,9 (17,9 – 44,9)		25,6 \pm 4,4 (18,0 – 43,6)	0,894 ²
Zeitpunkt der 1. Regelblutung		13 \pm 1 (9 – 18)		13 \pm 2 (8 – 19)	0,292 ²
Stilldauer (Monate)		7 \pm 8 (0 – 36)		7 \pm 8 (0 – 48)	0,549 ²
gerauchte Zigaretten/Tag		14 \pm 10 (0 – 40)		13 \pm 10 (0 – 50)	0,449 ²

¹Chi² – Test, ²Unabhängiger t-Test

3.3.3 Studie zur Absorption von Apigenin beim Menschen

Ziel der Studie war es, die Frage zu klären, ob Apigenin über den menschlichen Gastrointestinaltrakt absorbiert wird und wie viel des zugeführten Apigenin nach vorbestimmten Zeitabständen im Plasma nachgewiesen werden kann. Zudem wurden die Erythrozyten und der Urin (24 Stunden) der Probanden auf Apigenin untersucht. Als Apigeninquelle wurde Petersilie (*Petroselinum crispum var. crispum*) verwendet.

Zur Überprüfung der Bioverfügbarkeit von Apigenin nach Verzehr einer Portion Petersilie wurde eine Interventionsstudie mit einmaliger Bolusgabe von 2 g Petersilie pro kg Körpergewicht an elf Probanden durchgeführt und Plasma-, Erythrozyten- sowie Urinproben über 24 Stunden hinweg gesammelt. Die erhaltenen Proben wurden mit der entwickelten HPLC-Methode für Polyphenole ausgewertet.

Zur Festlegung des Studienablaufs war die Wahl eines geeigneten Zeitfensters zur Erfassung des Maximums der Apigeninresorption von großer Bedeutung. Nachdem Apigenin noch wenig untersucht ist, gab es kaum Daten darüber, wann eine maximale Konzentration im Plasma zu erwarten ist. Aziz et al. (1998) machen Angaben über die Maxima von Quercetinglykosiden im humanen Plasma (0,5 - 4 Stunden nach Lebensmittelverzehr. Die interpersonellen Schwankungen dabei werden jedoch als sehr hoch beschrieben.

Nach den Auswertung der Voruntersuchungen wurde der endgültige Ablauf der Blutabnahmen festgelegt. In Abbildung 14 werden die Zeitpunkte der Blutabnahmen beschrieben.

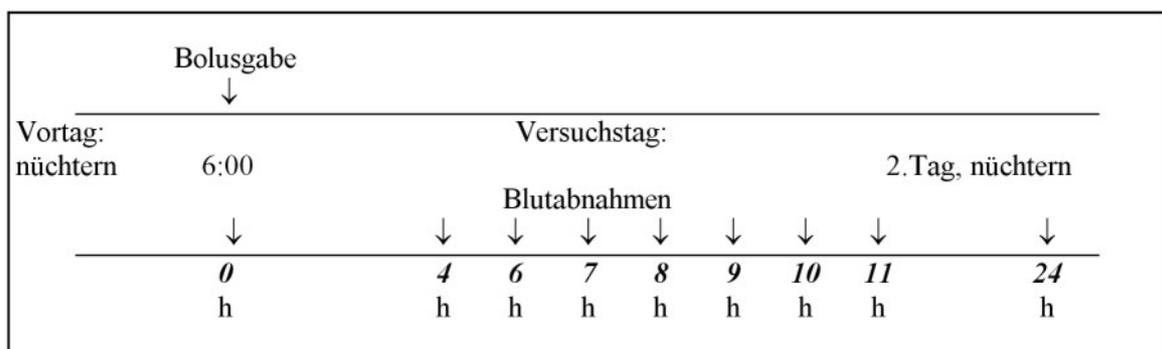


Abb. 14: Zeitlicher Ablauf des Absorptionsversuches

Studienkollektiv

Das Studienkollektiv der Interventionsstudie bestand aus elf offensichtlich gesunden Personen. Das durchschnittliche Alter der Probanden lag bei $28,8 \pm 5,4$ Jahren (Mean \pm SD), das mittlere Gewicht bei $75,4 \pm 17,3$ kg (Mean \pm SD) und die mittlere Größe bei $1,77 \pm 0,11$ m (Mean \pm

SD). Gewicht und Größe der Versuchspersonen wurden als Selbstangabe erfasst. Der mittlere BMI des Kollektivs war $23,9 \pm 4,1 \text{ kg/m}^2$ (Mean \pm SD). Die Daten sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: Lebensalter und anthropometrische Daten des Studienkollektivs (n= 11 mit n_{Frauen} = 5, n_{Männer} = 6) unter Angabe von Mittelwert, Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwertes (SEM), Median, Min. und Max.

		Mittelwert	SD	SEM	Median	Min	Max
Alter (Jahre)	männlich	29,0	4,3	1,8	28,0	23,0	35,0
	weiblich	28,6	6,9	3,1	26,0	25,0	41,0
	gesamt	28,8	5,4	1,6	27,0	23,0	41,0
Größe (m)	männlich	1,84	0,11	0,04	1,86	1,64	1,95
	weiblich	1,69	0,03	0,02	1,72	1,65	1,73
	gesamt	1,77	0,11	0,03	1,73	1,64	1,95
Gewicht (kg)	männlich	89,3	8,4	3,4	87,0	80,0	100,0
	weiblich	58,8	4,4	2,0	59,8	52,0	64,0
	gesamt	75,4	17,3	5,2	80,0	52,0	100,0
BMI (kg/m²)	männlich	26,6	3,4	1,4	26,4	23,1	31,6
	weiblich	20,6	1,2	0,6	21,3	18,6	21,6
	gesamt	23,9	4,1	1,2	23,1	18,6	31,6

Die Probanden wurden in einem Vorgespräch über den Ablauf des Versuches informiert und auf die Beachtung der Negativliste (siehe Abbildung 15) hingewiesen. Alle gaben ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

Ernährung der Studienteilnehmer während der Studiendauer

Da die Ernährung der Probanden einen direkten Einfluss auf das Ergebnis der Studie hat, musste die Auswahl der Lebensmittel während der Studiendauer kontrolliert werden. Sowohl am Vortag als auch am Versuchstag selbst verzehrten die Studienteilnehmer keines der Lebensmittel der in Abbildung 15 dargestellten Negativliste, um zu gewährleisten, dass durch ihre reguläre Ernährung kein zusätzliches Apigenin zugeführt wird. Darüber hinaus war am Vortag der Untersuchung keine bestimmte Kostform vorgeschrieben.

<p><u>Gemüse / Obst</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - (Blatt-) Salate - Blumenkohl - Chilischoten - Chinakohl - Eisberg - Fenchel - Grünkohl - Karotte - Knollensellerie - Kohlrabi - Kürbis - Oliven - Paprika - Peperoni - Rosenkohl - Rotkohl - Runkelrübe - Spinat, roh - Staudensellerie - weiße Bohnen - Weißkohl - Grapefruit 	<p><u>Kräuter (frisch und getrocknet)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Estragon - Meerrettich - Oregano - Petersilie - Pfefferminze - Rosmarin - Schnittlauch - Thymian <p><u>Getränke</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Grapefruitsaft - Gemüsesaft - Kamillentee - Grüner Tee <p><u>Sonstiges</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Buchweizen - Gänseblümchen - Mohn
---	--

Abb. 15: Negativliste für Apigenin und Luteolin zur Vermeidung durch die Probanden (nach Linseisen et al. (1997) und USDA-Flavonoid (2003))

Energiezufuhr und Anteil der Formularnahrung

Die mittlere Tagesenergiebedarf (Schätzwert mit 30 kcal/ kg Körpergewicht, siehe Tabelle 10) betrug im untersuchten Kollektiv $2680 \pm 102,96$ kcal/ Tag (Mean \pm SD) für das männliche und $1762,80 \pm 58,62$ kcal/ Tag (Mean \pm SD) für das weibliche Teilkollektiv.

Tab. 10: Geschätzter Energiebedarf und Anteil der Formularnahrung des Studienkollektives ($n_{\text{Gesamt}} = 11$, $n_{\text{Frauen}} = 5$, $n_{\text{Männer}} = 6$)

		Mittelwert	SD	Median	SEM
Geschätzter Energiebedarf	Männer	2680	102,96	2610	102,96
	Frauen	1763	58,62	1794	58,62
	Gesamt	2263	156,12	2400	156,12
60% des Energiebedarfs	Männer	1608	61,77	1566	61,77
	Frauen	1058	35,17	1076	35,17
	Gesamt	1358	28,24	1440	28,24

Für den Zeitraum zwischen den einzelnen Blutabnahmen am Versuchstag war es erforderlich, die Ernährung der Probanden zu standardisieren, da sich verschiedene Nahrungskomponenten auf die Absorption von Flavonoiden auswirken können (Birt et al., 2001). Aus diesem Grund

wurden die Probanden zwischen den Blutabnahmezeitpunkten 2 bis 8 (4 bis 11 Stunden nach Verzehr der Petersilientestmahlzeit) mit Formulanahrung ernährt. Da die Probanden am Versuchstag abends ab libitum unter Beachtung der Negativliste essen konnten, wurde angenommen, dass noch 60 % des Tagesenergiebedarfs durch Formulanahrung geliefert werden mussten. Diese Energiemenge wurde auf vier Zeitpunkte aufgeteilt: 4, 6, 8 und 10 Stunden nach Verzehr der Petersilie. Somit wurden im Mittel $1608 \pm 151,31$ kcal für die Männer und $1057,68 \pm 78,64$ kcal (Mean \pm SD) für die Frauen mit Formulanahrung zugeführt. Als Formulanahrung wurde der normkalorische Fresubin[®]-Original Drink in den Geschmacksrichtungen Vanille, Schokolade, Pfirsich, Nuss und Waldfrucht angeboten, um den Versuchspersonen eine persönliche Auswahl der Geschmacksrichtung zu ermöglichen und zu gewährleisten, dass die Formulanahrung verzehrt wird. Nährstoffzusammensetzung und Energiegehalt der Formulanahrung waren für die Bedürfnisse eines gesunden Menschen ausgerichtet und sind in Tabelle 11 und in Anhangstabelle A1 aufgeführt.

Tab. 11: Nährstoffträger der Formulanahrung (Fresubin[®]-Original) und Nährstoffrelation

Nährstoff	Nährstoffträger	Nährstoffrelation
Eiweiß	Milcheiweiß, Sojaeiweiß	15 Energie %
Fett	Pflanzliche Öle	30 Energie %
Kohlenhydrate	Maltodextrin, Saccharose	55 Energie %

Quelle: Gebrauchsinformationen Fresenius Kabi

Zubereitung der Petersilie

In Vorversuchen wurden die Apigeningehalte verschiedener Petersilie-Sorten untersucht. Es zeigte sich sowohl in den Vorversuchen als auch in der Literatur, dass krause Petersilie höhere Konzentrationen an Apigenin besitzt als glatte, weshalb den Studienteilnehmern krause Petersilie aus Italien zum Verzehr dargereicht wurde (siehe Tabelle 12).

Tab. 12: Apigeningehalte in Petersilie in Abhängigkeit vom Sorte und Herkunft

Quelle	Petersilie	mg Apigenin / 100 g frischer Petersilie	Anmerkung
Literatur	USDA Datenbank (2003): Petersilie, roh	302,00	Mittelwert
	Justesen et al. (1998)	185 (\pm 5)	Mittelwert (\pm SD)
Eigene Tests	Türkische Petersilie, (glatt)	48,25	Bund
	Freisinger Wochenmarkt (25.11.2003), (glatt)	70,69	Bund
	Freisinger Wochenmarkt (30.11.2003), (glatt)	26,52	Bund
	Freisinger Petersilie (8.12.2003), (krause,)	146,88	Topf
	Ital. Petersilie, Absorptionsstudie, (krause)	11,89	Bund

Da Mullen et al. (2002) bestätigten, dass Gefrierlagerung den Flavonoidgehalt nicht negativ beeinflusst, wurden die gewaschenen Blätter der Petersilie ohne Stängel in Portionen von 100 g abgefüllt und bis zur Zubereitung für den Verzehr bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank gelagert. Die Petersilie wurde am Versuchsvortag nachmittags zubereitet und dann bis zum Verzehr durch die Probanden im Kühlschrank gelagert. Um die Aufnahme der Inhaltsstoffe zu verbessern, wurde die Petersilie zum Zellaufschluss bei geschlossenem Deckel und mittlerer Hitze zehn Minuten mit Butter (10 % des Petersiliengewichts) erhitzt. Dann wurde die Petersilie mit Salz gewürzt.

Tab. 13: Menge an Petersilie und Butter pro Bolus ($n_{\text{Gesamt}} = 11$, $n_{\text{Frauen}} = 5$, $n_{\text{Männer}} = 6$)

Person	verzehrte Petersilie [g]	Butteranteil [g]
1	200	20
2	170	17
3	166	16,6
5	104	10,4
6	116	11,6
7	116	11,6
8	144	14,4
9	120	12
10	128	12,8
11	180	18
12	200	20
Mean	149,45	14,95
SD	35,21	3,52
SEM	10,62	1,06
Min	104,00	10,40
Max	200,00	20,00

Die Probanden durften die Petersilie wahlweise kalt oder warm verzehren, wobei auch Mikrowellen-Erwärmung zulässig war, da Flavone stabil gegenüber Mikrowellenstrahlung sind (Nielsen et al., 1999). Zur Erleichterung der Einnahme der Testmahlzeit durften die Versuchspersonen zusätzlich Weißbrot ad libitum verzehren und die Petersilienportion mit Salz nachwürzen. Wasser, Kaffee und Schwarztee ohne Milch war als morgendliches Getränk erlaubt.

Von den Probanden wurden 2 g Petersilie/kg Körpergewicht verzehrt (entsprechend 0,24 mg Apigenin/kg KG), was im Mittel einer Menge von $149,45 \pm 35,21$ g Petersilie (Mean \pm SD) entsprach, die mit $14,95 \pm 3,52$ g Butter (Mean \pm SD) gedünstet worden war (siehe Tabelle 13). Das männliche Teilkollektiv verzehrte im Mittel $176,67 \pm 21,57$ g Petersilie (Mean \pm SD), das weibliche Teilkollektiv durchschnittlich $116,80 \pm 8,67$ g Petersilie (Mean \pm SD). Da die verwendete italienische, krause Petersilie 11,89 mg Apigenin / 100 g frischem Lebensmittel enthielt (siehe Tabelle 12), nahmen die Männer im Durchschnitt $21,01 \pm 2,56$ mg Apigenin / Bolus (Mean \pm SD) und die Frauen $13,89 \pm 1,03$ mg Apigenin / Bolus (Mean \pm SD) auf, wie in Tabelle 14 dargestellt wird.

Tab. 14: Petersilienmenge und Apigeningehalt pro Bolus angegeben als Mittelwerte, Standardabweichung (SD), Standardfehler (SEM), Median, Min. und Max. der ($n_{\text{Gesamt}} = 11$, $n_{\text{Frauen}} = 5$, $n_{\text{Männer}} = 6$)

		Mittelwert	SD	SEM	Median	Min.	Max.
verzehrte Petersilie [g]	Männer	176,67	21,57	8,80	175,00	144,00	200,00
	Frauen	116,80	8,67	3,88	116,00	104,00	128,00
	gesamt	149,45	35,21	10,62	144,00	104,00	200,00
Apigenin / Bolusgabe [mg/ Bolus]	Männer	21,01	2,56	1,05	20,81	17,12	23,78
	Frauen	13,89	1,03	0,46	17,12	12,37	15,22
	gesamt	17,77	4,19	1,26	17,12	12,37	23,78
Apigenin / Bolusgabe [µmol/ Bolus]	Männer	77,72	9,48	3,87	76,99	63,35	87,99
	Frauen	51,38	13,13	5,87	51,03	45,75	56,31
	gesamt	65,75	15,49	4,67	63,35	45,75	87,99

Studienablauf – Versuchstag

Am Vortag der Studie wurde morgens (10:00 Uhr) nachtünchtern Blut abgenommen, um einen Nüchternwert zu ermitteln. (Blutabnahmezeitpunkt 1 = 0 h). Am Vortag orientierten sich die Probanden bei der Wahl der zu verzehrenden Lebensmittel an der Negativliste.

Am Versuchstag verzehrte jeder Proband morgens um 6:00 Uhr in Eigenkontrolle die gesamte

Menge Petersilie. Die Probanden sammelten ausgehend vom Studientag morgens nach dem ersten Spontanurin bis zum nächsten Tag morgens inklusive des ersten Spontanurins Urin (24 Stunden-Urin). Ab 10:00 Uhr erfolgten die Blutabnahmen gemäß Tabelle 15. Ab diesem Zeitpunkt wurde alle zwei Stunden Formelnahrung zugeführt.

Tab. 15: Zeitlicher Ablauf am Versuchstag

Blutabnahme	Uhrzeit	Zeit [h] nach Bolusgabe
2. Blutabnahme + Mahlzeit	10:00	4
3. Blutabnahme + Mahlzeit	12:00	6
4. Blutabnahme	13:00	7
5. Blutabnahme + Mahlzeit	14:00	8
6. Blutabnahme	15:00	9
7. Blutabnahme + Mahlzeit	16:00	10
8. Blutabnahme	17:00	11

Am Folgetag wurde morgens (10:00 Uhr) erneut Nüchternblut abgenommen, um einen Endwert ermitteln zu können (Blutabnahmezeitpunkt 9 = 24 h). Nach dem ersten Spontanurin war die 24 Stunden-Urinsammlung beendet.

Probengewinnung und Lagerung

Pro Versuchsperson wurden neun Plasmaproben und eine Urinprobe gewonnen und zur Analyse aufbereitet. Von acht der elf Studienteilnehmer konnten je neun Erythrozytenproben gewonnen werden. Den Probanden wurde zu jedem Zeitpunkt jeweils 15 ml venöses Blut abgenommen, welches sofort in EDTA-Röhrchen (S Monovette®, 1,6 mg Kalium- EDTA/ml Blut; Sarstedt) umgefüllt wurde. Die Röhrchen wurden mehrmals gekippt, um Blut und EDTA zu vermischen und eine Agglutination des Blutes zu verhindern. Dann wurden die Röhrchen mindestens 45 Minuten im Kühlschrank aufbewahrt, bevor sie mit 4000 U/min (1500 g) für 15 Minuten bei 10°C zentrifugiert wurden. Mit einer Pasteurpipette wurde das Plasma abgehoben und in Mikroröhrchen mit Verschluss (Sarstedt, Nümbrecht) übergeführt. So konnten je ca. vier Aliquote á 1 ml Plasma gewonnen werden. Die im EDTA-Röhrchen verbliebenen Erythrozyten wurden zweimal mit je 5 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl-Lösung) gewaschen, jeweils bei 5000 U/min 5 Minuten lang zentrifugiert und die Überstände verworfen. Der gesammelte Urin wurde im Kühlschrank gelagert. Nach 24 Stunden wurde der Urin einer Person jeweils vereinigt, das Volumen bestimmt und drei Aliquote á 100 ml abgefüllt. Bis zur Analyse wurden die Plasma-, Erythrozyten- und Urinproben bei -80°C gelagert.

3.4 Statistische Auswertung

Die Polyphenolkonzentrationen der untersuchten Plasma-, Erythrozyten-, Urin- und Lebensmittelproben wurden mit der Software Microsoft Office Excel 2000 Version 9.0 berechnet, die Graphiken wurden mit Excel erstellt. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS Version 12.0 (SPSS Inc., Chicago/USA). Die Validitätsparameter Linearität, Präzision und Richtigkeit wurden mit Excel berechnet, die Graphiken wurden mit Excel erstellt. Die Polyphenolkonzentrationen im Plasma wurden in nmol/l Plasma angegeben, die Carotinoid-, Tocopherol- und Vitamin C-Konzentrationen wurden in $\mu\text{mol/l}$ Plasma dargestellt.

Bei der Beschreibung der Unterschiede in den Polyphenolkonzentrationen zwischen zwei Gruppen wird der p-Wert des Mann-Whitney U-Tests (Signifikanzniveau $p < 0,05$) verwendet. Signifikant unterschiedliche Variablen sind gekennzeichnet (*). Bei der Beurteilung der Signifikanz von Gruppen mit mehr als zwei Untergruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Zur Überprüfung der Frage, zwischen welchen der Untergruppen signifikante Unterschiede bestehen, wurde der verteilungsfreie Mann-Whitney U-Test verwendet (Signifikanzniveau $p < 0,05$). Die Teilkollektive werden in folgender Art dargestellt: Untergruppen (a - e), die einen Buchstaben (Index) enthalten, unterscheiden sich signifikant von der durch den entsprechenden Buchstaben (Index) gekennzeichneten Gruppe. Untergruppen, die keine Buchstaben (Indices) enthalten, sind zu keiner anderen Untergruppe signifikant unterschiedlich.

Die Ergebnisse sind nicht nach Bonferoni korrigiert, da diese Statistik vorrangig beschreibenden Charakter hat und weiterführende statistische Untersuchungen nicht durchgeführt wurden.

Polyphenolbestimmung im Plasma der Studienteilnehmer/innen der Bayerischen Verzehrsstudie II

Die folgenden Parameter der deskriptiven Statistik wurden geprüft:

Arithmetischer Mittelwert (Mean), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), die Perzentilen 10 %, 25 %, 50 %, 75 % und 90 % sowie Minimum und Maximum der Polyphenolkonzentrationen.

Die Überprüfung auf Normalverteilung der Polyphenolkonzentrationen wurde anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests mit Lilliefors-Korrektur durchgeführt. Der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde auf der Basis entwickelt, dass die Populationsparameter Mittelwert und Standardabweichung bekannt sind. Bei den vorliegenden Daten müssen diese Parameter jedoch anhand der Daten selbst geschätzt werden. Die Lillieforskorrektur zieht diese Schätzung der Parameter bei der Berechnung der Signifikanz mit in Betracht. Die teststatistische Überprüfung zum Einfluss von Geschlecht und Waist-to-Hip-Ratio auf die Polyphenolkonzentration erfolgte mit Hilfe des verteilungsfreien Mann-Whitney-U-Tests bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

Die teststatistische Überprüfung zum Einfluss von Alter, Body-Mass-Index, Rauchstatus und Schichtzugehörigkeit auf die Polyphenolkonzentration erfolgte mit Hilfe des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests für multiple, gegenseitig abhängige Tests bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$. Die Unterscheidung der sich voneinander unterscheidenden Gruppen erfolgte mittels des verteilungsfreien Mann-Whitney-U-Tests bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$. Die Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationen der Polyphenole und der Konzentrationen der Carotinoide, Tocopherole und von Vitamin C sowie den Faktoren Alter, Body-Mass-Index, Waist-to-Hip-Ratio, Rauchstatus und Schichtzugehörigkeit wurden anhand der Spearman'schen Korrelationskoeffizienten für nicht normalverteilte Fälle errechnet. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$.

Polyphenolkonzentrationen im Plasma der Teilnehmerinnen einer Fall-Kontrollstudie zu Brustkrebs im Rahmen der EPIC-Studie

Die folgenden Parameter der deskriptiven Statistik wurden geprüft: 10% – 90 % Perzentilen, 50 % Prezentile (Mean), Minimum und Maximum der Polyphenolkonzentrationen. Die Überprüfung auf Normalverteilung der Polyphenolkonzentrationen wurde anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests mit Lillieforskorrektur durchgeführt. Die teststatistische Überprüfung der signifikanten Unterschiede von Alter, BMI, Zeitpunkt der ersten Regelblutung, Stilldauer, gerauchten Zigaretten/Tag der Fälle und der Kontrollen wurden mit dem unabhängigen t-Test durchgeführt, mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ untersucht. Die Verteilung der anthropometrischen und soziodemographischen Variablen des Studienkollektives wurde mit dem Chi²-Test ($p < 0,05$) erfasst. Der Vergleich der Polyphenolkonzentrationen der Fälle und der Kontrollen erfolgte mittels des verteilungsfreien Mann-Whitney-U-Tests bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,30$. Die Risikoabschätzung wurde über logistische Regression erfasst. Es werden hierfür kategorielle und kontinuierliche Werte (p trend) angegeben. Die Odds ratios sind roh und adjustiert für die Quartilen Q1 - Q4 angeführt.

Polyphenolbestimmung in der Studie zur Absorption von Apigenin beim Menschen

Die Überprüfung auf Normalverteilung der Polyphenolkonzentrationen wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests mit Lillieforskorrektur durchgeführt. Die folgenden Parameter der deskriptiven Statistik wurden geprüft: Arithmetischer Mittelwert (Mean), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), Median sowie Minimum und Maximum der Apigeninkonzentrationen.

Der Apigeningehalt der Testmahlzeit und die Apigeninkonzentrationen in Plasma, Urin und Erythrozyten wurden mit dem arithmetischen Mittelwert und der Standardabweichung der Gruppe der Versuchspersonen angegeben. Zusätzlich wurden die Einzelwerte der Versuchspersonen graphisch dargestellt bzw. im Anhang einzeln aufgeführt. Die vergleichende Statistik wurde mit dem unabhängigen Student t-Test bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ durchgeführt. Die Werte für die Fläche unter der Kurve (AUC: Area Under the Curve) wurden anhand der Integrationsfunktion der Software Origin Version 6 (Microcal Inc., Northampton/USA) ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1 Entwicklung der Nachweismethode

Bei der Bestimmung der Polyphenol-Konzentration in Blutplasma werden vorwiegend chromatographische Systeme eingesetzt. Wie bereits in Kapitel 1 erläutert, wurden aber meist nur wenige Vertreter unterschiedlicher Substanzklassen untersucht. Die spezielle Problemstellung einer Methodenentwicklung für die beschriebenen Einsatzbereiche in Humanstudien liegt in der teilweise sehr ähnlichen Leitstruktur einiger Flavonoide (z.B. Flavone und Flavonole) und andererseits in den Unterschieden in Strukturen, und somit in den Polaritätsunterschieden der Flavonoide und Phenolsäuren, begründet. Daher müssen bei Extraktion und Trennung einerseits breite Polaritätsbereiche berücksichtigt, andererseits hohe Auflösung ähnlicher Strukturen gewährleistet werden. Die durch Verunreinigungen mit Matrixbestandteilen auftretenden Interferenzen sollten dabei aber möglichst gering gehalten werden, ohne die Nachweisgrenzen drastisch zu verschlechtern.

Hieraus wird deutlich, dass bei Aufarbeitung und chromatographischer Trennung einige genau abgestimmte Maßnahmen durchgeführt werden müssen, um die geforderte Leistung der Methode und verlässliche Ergebnisse zu liefern.

Folgende Übersicht beschreibt die wesentlichen Schritte, die als Resultat der durchgeführten Vorversuche zu stabilen Ergebnissen bei der Bestimmung der ausgewählten Polyphenole führten (Parameter siehe Kapitel 3.2.2 – 3.2.5). Anschließend werden die Ergebnisse der Validierung vorgestellt.

1. Stabilisierung der in den Proben enthaltenen Polyphenole
2. Zugabe des Internen Standards (ISTD)
3. Hydrolyse
4. Extraktion
5. High Performance Liquid Chromatographie
 - Mobile Phase
 - Stationäre Phase
 - Temperatur
 - Detektion

Dieses Schema enthält alle wesentlichen Schritte der Probenaufbereitung, die im Verlauf der Methodenentwicklung überprüft wurden. Darauf folgend wird dann auf die Ergebnisse der jeweiligen Punkte der Probenaufarbeitung eingegangen. Die aufgeführten Schritte waren besonders im Bezug auf die Aufgabenstellung wesentlich.

4.1.1 Stabilisierung der Polyphenole

Die Anfälligkeit von Polyphenolen gegenüber oxidativen Prozessen (siehe Kapitel 2.4) ist eine der Ursachen für die bereits beschriebenen Probleme bei deren quantitativen Bestimmung.

Aufgrund ihrer Eigenschaften ist die Stabilisierung durch Zugabe von antioxidativ wirksamen Hilfsstoffen ein naheliegender Lösungsansatz. Die Stabilität von Polyphenolen während den Analysen wurde geprüft. Für weitere Untersuchungen wurden, repräsentativ für alle ausgewählten Polyphenole, folgende fünf Catechine kontrolliert: Gallocatechin, Epigallocatechin, Catechin, Epigallocatechingallat und Epicatechin. Um die Catechine über einen Autosampler in automatisierten Serien über mehrere Stunden hinweg bestimmen zu können, ist eine ausreichende Stabilität der Catechine in der Messlösung notwendig. Zur Bestimmung der erforderlichen Parameter für die benötigte Stabilität wurde eine wässrig-methanolische Mischstandardlösung in Klarglasvials über einen Zeitraum von 24 Stunden bei Raumtemperatur mittels HPLC-ECD gemessen. In Abbildung 16 sind die Gehalte der Catechin-Derivate nach 6, 12, 18 und 24 Stunden, bezogen auf die Anfangsgehalte, dargestellt.

Für die untersuchten Catechine wurden bei Raumtemperatur deutliche Degradationen festgestellt. Besonders Epigallocatechin war von diesen Abbaureaktionen betroffen. Nach 24 Stunden waren nur noch rund 25 % des Anfangsgehalts nachweisbar. Gallocatechin, Catechin, Epigallocatechingallat und Epicatechin erwiesen sich in dieser Versuchsanordnung als stabiler. Sie konnten mit über 50 % der Anfangsgehalte nachgewiesen werden. Abbildung 16 zeigt klar, dass eine reproduzierbare Messung der Catechine – als polare und oxidationssensible Stellvertreter für alle ausgewählten Polyphenole – ohne angemessene Stabilisierung über einen längeren Zeitraum nicht möglich ist.

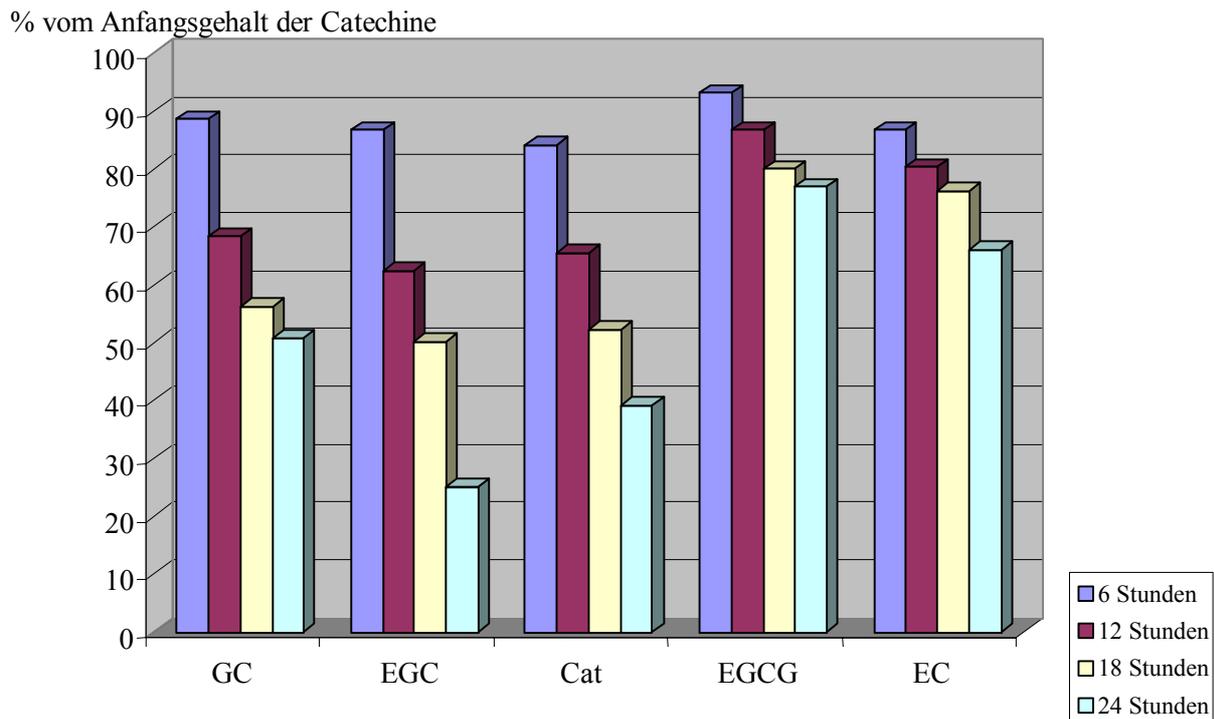


Abb. 16: Stabilität der Catechine bei Raumtemperatur ohne Oxidationsschutz (Gehalte bezogen auf die Anfangskonzentrationen)

Verbesserung der Stabilität von Catechinen durch Zusätze

Zur Verbesserung der Stabilität während der Messung wurden verschiedene Ansätze untersucht, wobei Epigallocatechin, das in der vorherigen Testreihe die geringste Stabilität aufwies, als Markersubstanz gewählt wurde. Nachdem die Verwendung von Braunglasvials zu keiner deutlichen Verbesserung der Stabilität führte, wurde der Einfluß von zugesetzten Antioxidantien untersucht. Eine wässrig-methanolische Epigallocatechin-Standardlösung wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an BHA, BHT und Ascorbinsäure versetzt. Die erhaltenen Lösungen wurden kurz nach der Herstellung sowie nach 6, 12, 18 und nach 24 Stunden gemessen. Das Ergebnis dieser Stabilisierungsversuche ist in Abbildung 17 dargestellt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den Anfangsgehalt an Epigallocatechin. Die Zusätze an BHA und BHT (je 0,005 M bzw 0,05 M) zur Messlösung unterdrückten den Abbau von Epigallocatechin in deutlich geringerem Maße als Ascorbinsäure. Die höhere Konzentration der zugegebenen Ascorbinsäure (0,05 M) konnte die Wiederfindung noch weiter verbessern, sodass in diesem Ansatz nach 24 Stunden noch 80,6 % der Ausgangskonzentration an Epigallocatechin gefunden werden konnte. Der Zusatz von 0,5 M Ascorbinsäure hatte bei der Bestimmung von Epigallocatechin keinen negativen Einfluss auf Trennung oder den elektrochemischen Nachweis dieser Substanz.

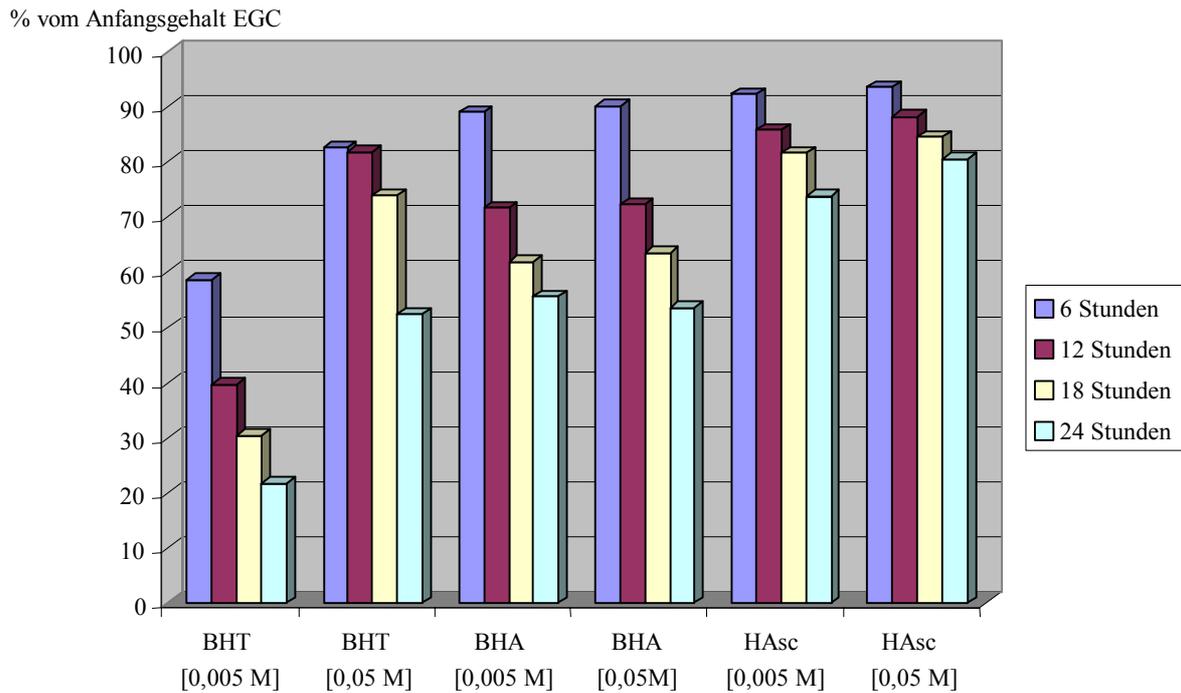


Abb. 17: Stabilität von (-)-Epigallocatechin in einer wässrig-methanolischen Testlösung mit Zusätzen von Antioxidantien bei Raumtemperatur nach 6, 12, 18 und 24 Stunden

Stabilisierung aller untersuchten Polyphenole mit Ascorbinsäure

Der schützende Effekt von Ascorbinsäure (HAsc) auf die Stabilität der anderen interessierenden Polyphenole wurde in einer weiteren Versuchsreihe bestätigt. Um den stabilisierenden Effekt zu verstärken, wurde die verwendete Konzentration auf 0,1 M Ascorbinsäure erhöht.

Wie aus Abbildung 18 zu entnehmen ist, wurden für die untersuchten Polyphenole nach 24 Stunden, Wiederfindungsraten von über 85 % ermittelt. Durch Zusatz von 0,1 M Ascorbinsäure konnte die Stabilität der oxidationsanfälligen Polyphenole bei Raumtemperatur in der Standardlösung bedeutend verbessert werden. Die Gehalte der interessierenden Polyphenole nach 6, 12, 18 und 24 Stunden können der Anhangstabelle A2 entnommen werden.

Weitere Erhöhungen der Vitamin C-Konzentration führten zu keiner messbaren Verbesserung der Stabilität dieser Polyphenole. Daher wurden jeder Plasmaprobe zu Beginn der Aufarbeitungsprozedur 0,1 M Ascorbinsäure zugegeben. Zusätzlich wurden an dieser Stelle 0,78 M Natrium-Acetat zugegeben, um den pH-Wert zu regulieren, da die Aktivität der verwendeten Sulfatase pH-abhängige Aktivität aufweist. Diese Pufferlösung dient weiterhin dazu, den pH-Wert des Extraktes gegenüber den in der Probelösung enthaltenen Phenolsäuren zu stabilisieren.

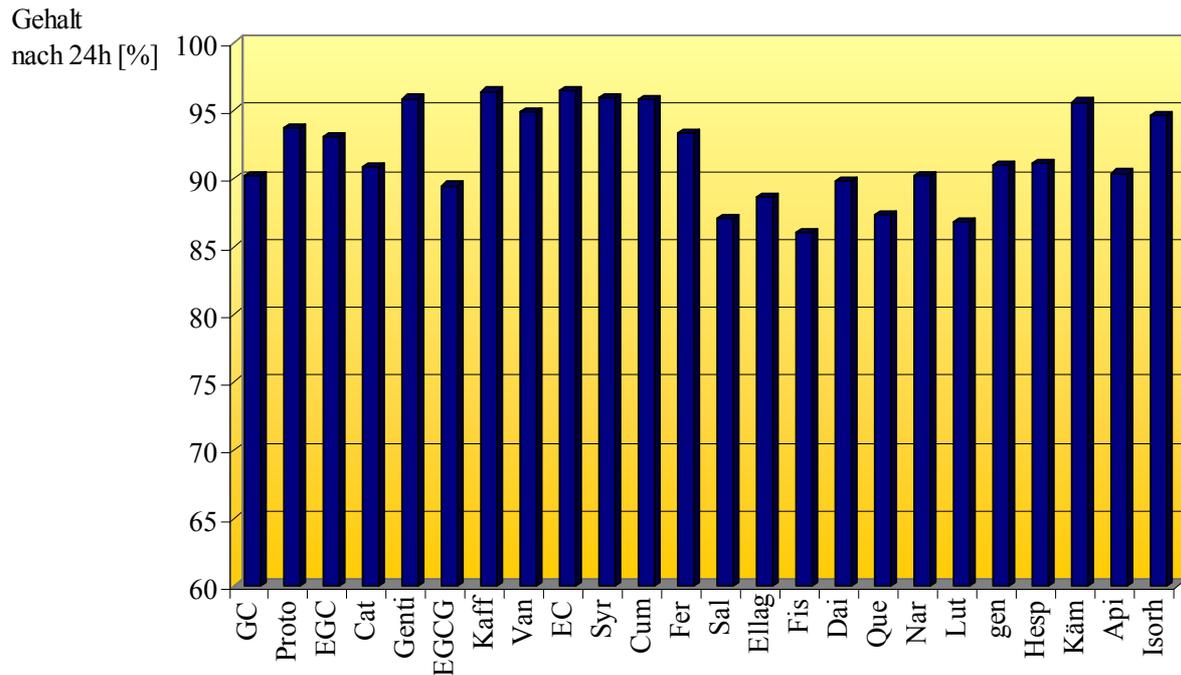


Abb. 18: Stabilität der untersuchten Polyphenole in einer wässrig-methanolischen Standardlösung, stabilisiert mit 0,1 M Ascorbinsäure bei Raumtempertur nach 24 Stunden (Gehalte bezogen auf die Anfangskonzentration)

4.1.2 Interner Standard

Als interner Standard für die chromatographische Untersuchung der Proben wurde Fisetin verwendet. Fisetin gehört zu den Flavonolen und weist sowohl für die übrigen Flavonoide als auch für die untersuchten Vertreter der Phenolsäuren ähnliche chromatographische Eigenschaften und somit akzeptable Response Faktoren (Rf) auf (siehe Tabelle 16). Der Responsefaktor wurde nicht aus einer Referenzstandardverdünnung berechnet, sondern aus dem Mittelwert der fünf Arbeitsstandards im Bereich 1:10 bis 1:1000. Zur Bestimmung der Proben wurden pro ml Plasma 100 μ l einer Lösung des internen Standards (Fisetin) mit der Konzentration 1,93 μ g/ml zugegeben.

Tab. 16: Standardsubstanzen und Responsefaktoren

Standardsubstanz	Rf _x	Standardsubstanz	Rf _x
Gallocatechin	1,35	Salicylsäure	1,35
Protocatechusäure	0,57	Ellagsäure	0,78
Epigallocatechin	4,89	Daidzein	0,69
Catechin	0,65	Quercetin	1,17
Gentisinsäure	0,56	Naringenin	0,63
Epigallocatechingallat	1,16	Luteolin	1,25
Kaffeesäure	0,80	Genistein	0,39
Vanillinsäure	0,45	Hesperetin	0,78
Epicatechin	0,60	Kämpferol	0,81
Syringasäure	0,92	Apigenin	0,59
p-Cumarsäure	0,32	Isorhamnetin	1,14
Ferulasäure	0,91		

4.1.3 Hydrolyse

Flavonoide und Phenolsäuren kommen im Lebensmittel meist als Derivate vor. So liegen beispielsweise viele Hydroxyzimtsäuren als Ester mit D-Chinasäure oder D-Glukose vor. Hydroxybezoensäuren sind oftmals verestert mit verschiedenen Hydroxykomponenten wie β -D-Glucogallin, Theogallin oder auch Catechinen (z.B. Epigallocatechingallat). Flavonoide sind häufig als Glykoside zu finden, z.B. die bitter schmeckenden Flavanon-7-neohesperidoside oder die 3-Glykoside (z.B. Rutin = Quercetin-3-rutinosid) sowie die selteneren 7-Glykoside der Flavonole.

Da vermutet wurde, dass viele der interessierenden Polyphenole in den Proben in teilweise außerordentlich geringen Mengen vorliegen, sollten die Polyphenole in Form ihrer Aglykone bzw. als freie Säure bestimmt werden. Die dafür notwendige Hydrolyse wurde enzymatisch mittels Sulfatase aus *Helix pomatia* von der Firma (E.C. 3.1.6.1, Sigma Aldrich) mit der Sekundäraktivität β -Glucuronidase (Sulfatase: 15 – 40 U/mg, β -Glucuronidase: 300 U/mg) durchgeführt. Die benötigten Parameter wie Sulfatasemenge und Inkubationszeit wurden ermittelt, indem Quercetin-Sulfat und Quercetin-4'-Glucosid (je 0,22 mg/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Sulfatase aufgearbeitet wurden und jeweils 10, 30, 60 und 120 Minuten lang sowie über Nacht inkubiert wurden.

Mit 232,5 U Sulfatase pro Probenansatz konnten nach 30 Minuten Inkubationszeit Quercetin-Sulfat und Quercetin-4'-Glucosid im Chromatogramm nicht mehr gefunden werden. Als einzig nachweisbare Substanz wurde Quercetin gefunden. Die Identität des entstandenen Substanzsignals wurde mittels Retentionszeit und UV-Spektrum geprüft (Chromatogramm, siehe Abbildung 19).

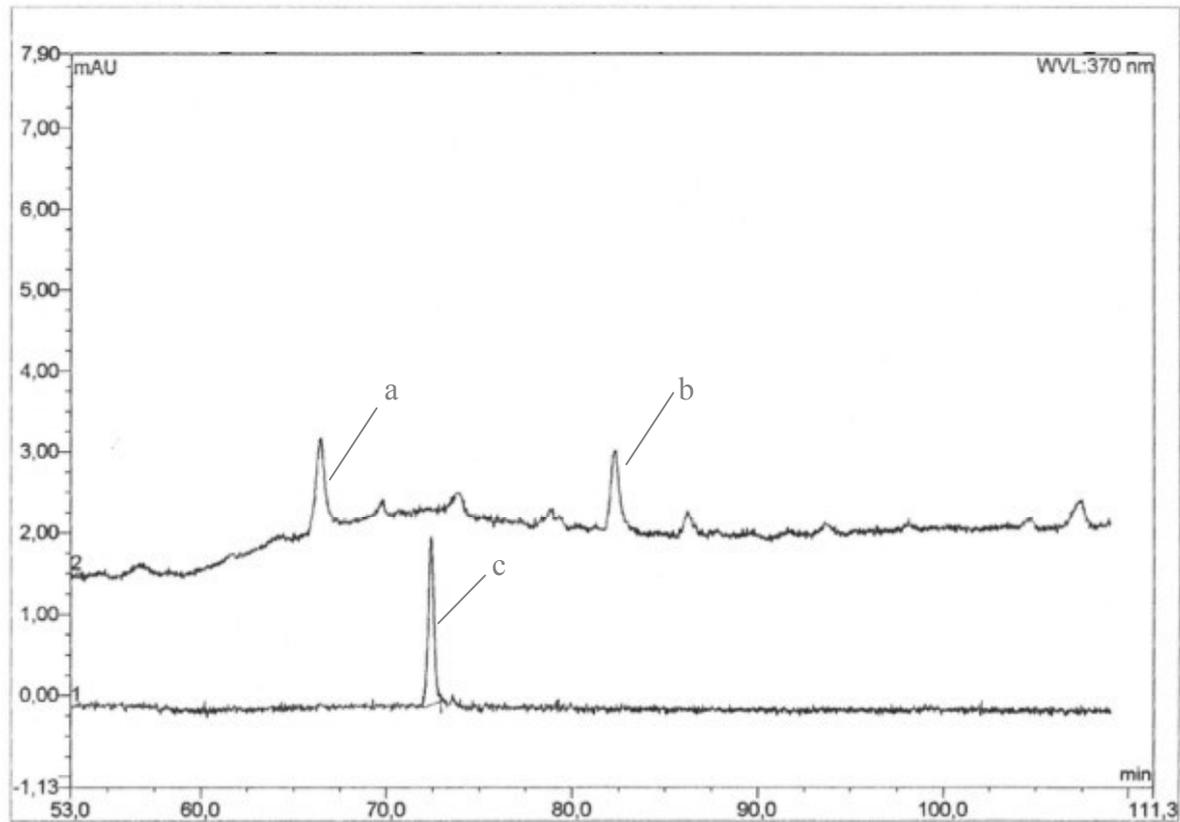


Abb. 19: Chromatogramm zur Prüfung der Hydrolyseaktivität von Sulfatase vor Hydrolyse (2) und nach Hydrolyse (1) von Quercetin-Sulfat (a) und Quercetin-4'-Glucosid (b); Quercetin (c);

Das verwendete Enzympräparat enthielt Verschmutzungen an Ellagsäure, die in allen verwendeten Chargen, innerhalb geringer Schwankungsbreiten, die gleiche Konzentration aufwiesen. Um diesen Fehler bei der Berechnung der Ellagsäure in der Probe zu entfernen, wurde die Konzentration an Ellagsäure aus dem Enzympräparat (für jede verwendete Charge separat ermittelt) von der Konzentration an Ellagsäure, die für die Probe bestimmt wurde (unter Verwendung der entsprechenden Charge Ellagsäure), abgezogen.

4.1.4 Extraktion

Die Auswahl des Adsorbens bei der Festphasenextraktion ist ein wesentlicher Arbeitsschritt, der erheblich zum Ergebnis der Extraktion beiträgt und dessen Eignung in einem System sich in den erreichten Wiederfindungsraten niederschlägt.

Für diese Methode wurde die Festphasenextraktion mit einem makro-porösen Copolymer, Poly(divinyl-benzol-co-N-vinylpyrrolidon), als Festphasenmaterial durchgeführt. Dieses Copolymer, das sowohl hydrophile als auch lipophile Kapazität aufweist (HLB-SPE, Hydrophile-Lipophile-Balance), besteht aus zwei monomeren Komponenten: dem lipophilen

Divinylbenzol und dem hydrophilen N-Vinylpyrrolidon (siehe Abbildung 20). Die Substanz wurde speziell zur Anreicherung von phenolischen Verbindungen entwickelt und zeichnet sich gegenüber den gebräuchlicheren C18-Phasen aufgrund seiner größeren Adsorbensoberfläche durch höhere Kapazität und einfachere Handhabung aus.

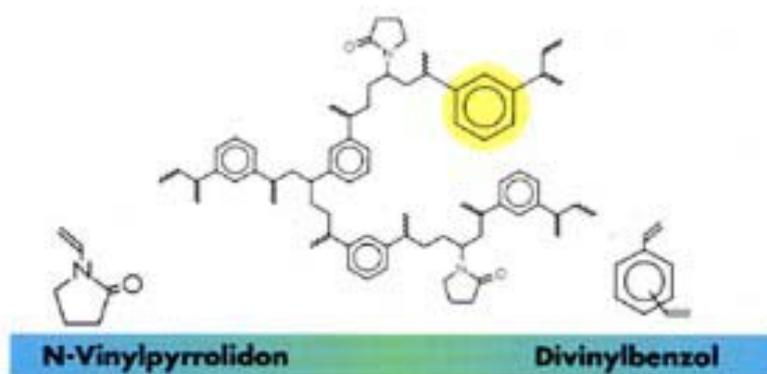


Abb. 20: Festphasenextraktions Sorbens Poly(divinyl-benzol-co-N-vinylpyrrolidon)

Diese SPE-Säulen wurden bereits erfolgreich von verschiedenen Forschungsgruppen eingesetzt und zeigten dabei gute Ergebnisse (Pirker et al., 2004; Peruzzi et al., 2000; Blackwell et al. 2004). Die physikalischen Eigenschaften des verwendeten Adsorbentmaterials sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tab. 17: Physikalische Eigenschaften der HLB-SPE-Säulen (Oasis HLB 1cc; Waters)

Spezifische Oberfläche	810 m ² /g
Mittlere Porengröße	80 Å
Porengesamtvolumen	1,3 cm ³ /g
Mittlere Partikelgröße	30 µm/60 µm

Zwei-dimensionale Festphasenextraktions- und Aufreinigungsmethode

Um eine optimale Isolierung der Polyphenole zu erreichen, wurde eine spezifische Methode zur Entfernung von Plasma- und Urin-Interferenzen erstellt. Die allgemeine 1-dimensionale Festphasenextraktion wurde dabei so modifiziert, dass die Waschlösung, neben dem Anteil an organischen Lösungsmitteln, mit Essigsäure angesäuert wurde. Dadurch kann der Extrakt gereinigt werden, sowohl in Bezug auf die gegebene Polarität als auch in Bezug auf den optimalen pH-Wert. Es wurde die hydrolisierte Probelösung mit 20 µl H₃PO₄ (85 %ig) versetzt und die Waschlösung der Festphasenextraktion wurde auf 2 % wässrige Essigsäure eingestellt, um die Ionisierung der polaren Phenolsäuren im Extrakt zu verhindern.

Um die optimale Zusammensetzung der Waschlösung zu ermitteln, wurde folgende Testserie durchgeführt. Die 2% wässrige Essigsäure-Waschlösung wurde daraufhin mit Methanol versetzt. Die Gehalte an Methanol wurden in 5 % Schritten erhöht. Nach diesen Waschschrritten wurden die Analyten jeweils mit 2 ml Methanol eluiert, da Methanol in den vorangegangenen Flüssig-Flüssig-Extraktions-Versuchen die besten Ergebnisse zeigte. Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der Methanol-Eluate für Quercetin und Salicylsäure als wichtigen Leitsubstanzen für die Flavonole und Hydroxybenzoesäuren in Abhängigkeit von den verschiedenen Gehalten an Methanol in der Waschlösung.

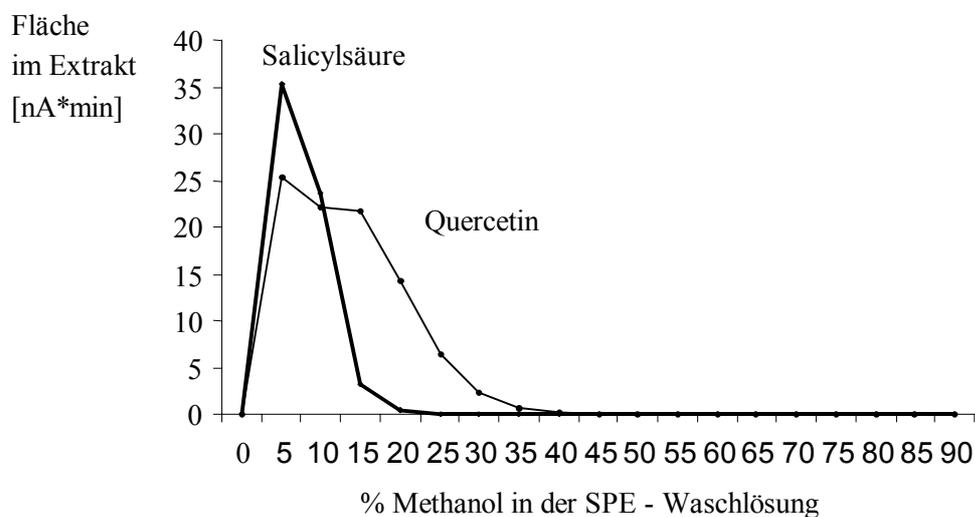


Abb. 21: Gehalte an Quercetin bzw. Salicylsäure im Methanolextrakt der Festphasenextraktion bei den verschiedenen Mengen an Methanol in der Waschlösung

Mit 5 % Methanol in der Waschlösung war die Wiederfindung im methanolischen Extrakt maximal. Daher wurde für alle weiteren Untersuchungen das in Abbildung 22 dargestellte Extraktionsverfahren angewandt. Die so gewonnene Extraktionslösung wurde im Rotationsverdampfer evakuiert.

Bei Aufnahme des Rückstandes der Extraktion in reinem Methanol konnte beobachtet werden, dass die Substanzpeaks des Chromatogramms deutliches „fronting“ aufwiesen und als „Doppelpeaks“ eluiert wurden (Chromatogramm nicht abgebildet). Der Effekt tritt auf, wenn die Ionenstärke der Extraktionslösung (hier: Methanol) größer ist als die Ionenstärke des Eluenten zur Retentionszeit (maximal 56 % B, bei 109 Minuten). Durch Verwendung eines

modifizierten Extraktionsgemisches (Methanol/Wasser (60/40; v/v)) konnte diese Erscheinung unterdrückt werden. Der getrocknete Rückstand wurde daher in 100 µl Extraktionslösung Methanol/Wasser (60/40; v/v) aufgenommen und in Probefläschen (Chromacol, Welwyn Garden city, UK) zur HPLC Analyse gebracht. Von der so gewonnenen Extraktionslösung wurden 30µl in die HPLC-Anlage injiziert.

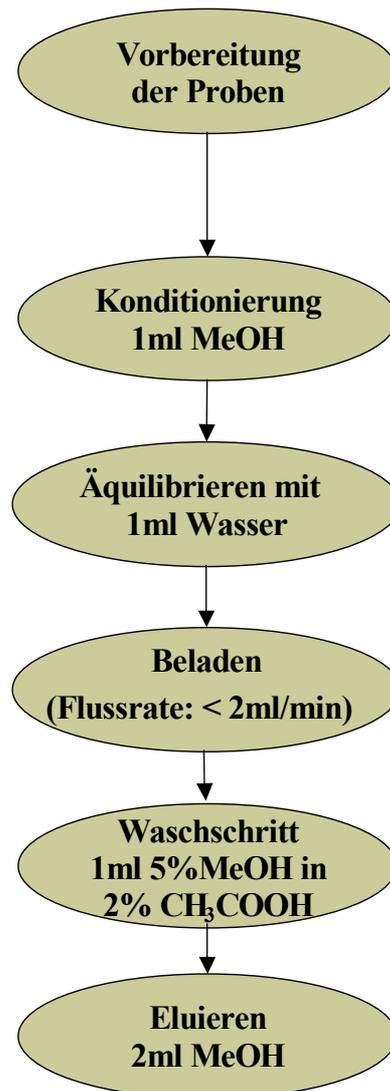


Abb. 22: HLB-Festphasenextraktionsverfahren zur Bestimmung von Polyphenolen

4.1.5 High Performance Liquid Chromatographie

Mobile Phase

In den voran gegangenen Schritten hat sich Methanol als geeignetes Lösungsmittel sowohl für die polaren Phenolsäuren als auch für die unpolaren Flavonoide erwiesen. Daher wurde auch bei der HPLC-Trennung der Polyphenole Methanol als organische Lösungsmittelkomponente verwendet (Eluent B). Als polare Eluentenkomponente wurde in Anlehnung an das Fließmittelsystem von Maiani et al. (1997) eine 0,1 %ige wässrige Phosphorsäurelösung eingesetzt (Eluent A). Aufgrund der Komplexizität der zu untersuchenden Substanzen, ihrer Ähnlichkeit in Struktur und Löslichkeit – bezogen auf die Gruppe der unpolaren Flavonoide einerseits, aufgrund der Unterschiede zu den polaren Catechinen und Phenolsäuren andererseits – wurde zur Trennung der Polyphenole folgendes Gradientensystem eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.5; Tabelle 3). Die nachstehende Abbildung 23 zeigt das Gradientenelutionsprogramm als Graph der Retentionszeit und der Zusammensetzung des Eluenten.

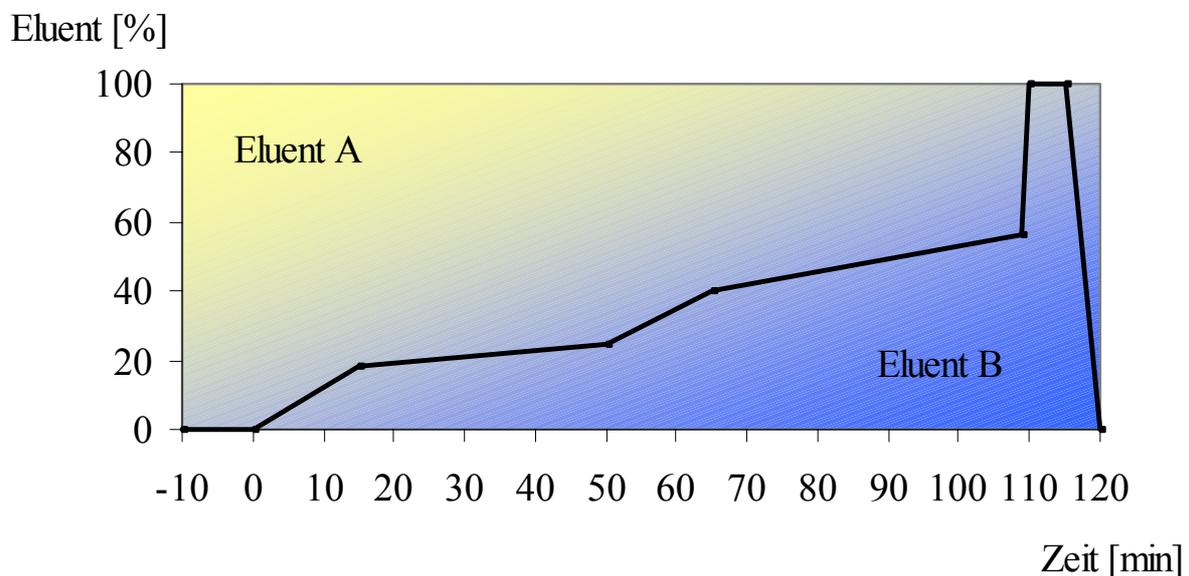


Abb. 23: Gradientenelutionsprogramm zur HPLC-Trennung der Polyphenole

Das Programm der Trennung beginnt 10 Minuten vor der Injektion der Probe (-10 min). Zu diesem Zeitpunkt werden 100 % Fließmittel A (0,1 %ige Phosphorsäure) isokratisch gefördert.

Auf diese Weise werden organische Rückstände von vorangegangenen Trennungen aus dem System entfernt, damit die injizierten Polyphenole nicht mit Methanolresten mittransportiert und somit zu früh eluiert werden. Zum Zeitpunkt 0 min erfolgt die Injektion des Probevolumens (30 µl). Der Methanolgehalt steigt dann in 15 Minuten graduierlich bis auf 18 % Fließmittel B an. Dieser Zeitpunkt liegt kurz vor dem Augenblick, da die ersten Substanzen von der Säule eluiert werden. Daher steigt der Gradient nun weniger steil, in den nächsten 35 Minuten um 7 % auf 25 % Methanol, an.

In diesem Abschnitt werden die polaren Catechine und Phenolsäuren getrennt. In den folgenden 15 Minuten wird der Methanolgehalt vergleichsweise schnell um 15 % auf 40 % Methanol erhöht. Auf dieser Teilstrecke werden Ferulasäure sowie die Hydroxybenzoesäuren Salicylsäure und Ellagsäure voneinander getrennt.

Im letzten Teil der Trennung – zwischen 65 und 109 Minuten – werden die Flavonole, Flavanone, Flavone und die Isoflavone bei Methanolgehalten zwischen 40 % und 56 % voneinander getrennt. Nach Ende der Separation wird der Methanolgehalt in einer Minute auf 100 % hochgepült. Die HPLC-Anlage wird 5 Minuten isokratisch auf 100 % Methanol gehalten, um eventuell vorhandene unpolare Probenbestandteile aus dem System zu entfernen, und dann in weiteren 5 Minuten wieder auf die Anfangszusammensetzung von 0 % Methanol zurückgesetzt.

Stationäre Phase

Die stationäre Phase dieses Systems besteht aus zwei Reversed Phase Säulen, Luna C18 (4.6 mm x 150 mm, 5 µm, Phenomenex) und Zorbax Eclipse XDB-C18 (3.0 mm x 150 mm, 3.5 µm, Agilent Technologies), die in Reihe geschaltet wurden. Die beiden Säulen werden von einer Vorsäule geschützt (siehe Kapitel 3.2.5; Tabelle 4). Bei der Methodenerstellung wurde eine Reihe von RP-HPLC-Säulen getestet, die in der Polyphenolanalytik häufig Verwendung finden. Die getesteten Säulenmaterialien erwiesen sich bei dieser Methode jedoch nur als bedingt einsatzfähig, weil Komponenten mit ähnlicher Polarität, also Catechine und Phenolsäuren sowie Flavonole und Flavone, nicht getrennt werden konnten. Die Kombination von zwei Säulen hingegen führte zur Trennung der 23 Polyphenole mit einer ausreichenden Auflösung in allen Bereichen. Vor allem Peaks 6 – 9 und 17 – 21 (Kapitel 3.2.5; Abbildung 8) konnten auf diese Weise gut getrennt werden. Durch den Einsatz von zwei Säulen erhöht sich allerdings der Säulendruck soweit (320 – 375 bar), dass bei Dauerbetrieb Schäden am System zu befürchten sind. Daher wurde die Säulentemperatur auf 60°C erhöht, was die Viskosität des Fließmittelsystems je nach Gradientenzeitpunkt verringerte und einen Säulendruck zwischen 70

und 130 bar ermöglichte. Das Säulenmaterial beider Säulen sowie der Vorsäule war bei diesen Temperaturen zum Dauerbetrieb geeignet. Tabelle 18 zeigt die untersuchten Polyphenole und den Internen Standard in der Reihenfolge ihrer Retentionszeiten.

Tab. 18: Liste der untersuchten Polyphenole entsprechend ihrer Retentionszeiten unter Angabe von Mittelwert und Standardabweichung (SD)

Nr.	Name	Retentionszeit	
		[min.]	SD
1	Gallocatechin	18.20	± 0.03
2	Protocatechusäure	19.95	± 0.02
3	Epigallocatechin	23.75	± 0.02
4	Catechin	24.63	± 0.03
5	Gentisinsäure	26.98	± 0.04
6	Epigallocatechingallat	30.32	± 0.03
7	Kaffeensäure	30.94	± 0.03
8	Vanillinsäure	31.83	± 0.03
9	Epicatechin	32.50	± 0.04
10	Syringasäure	36.50	± 0.03
11	p-Cumarsäure	42.33	± 0.04
12	Ferulasäure	51.03	± 0.04
13	Salicylsäure	63.19	± 0.06
14	Ellagsäure	66.38	± 0.03
15	Fisetin	74.26	± 0.03
16	Daidzein	78.32	± 0.02
17	Quercetin	82.28	± 0.03
18	Naringenin	83.22	± 0.02
19	Luteolin	86.24	± 0.03
20	Genistein	87.43	± 0.03
21	Hesperetin	88.90	± 0.02
22	Kämpferol	93.70	± 0.03
23	Apigenin	95.97	± 0.03
24	Isorhamnetin	98.18	± 0.04

Detektor

Zur Detektion der Polyphenole wurden für diese Arbeit zwei Detektorsysteme verwendet. Mit einem UV-spezifischen Dioden Array Detektor (UV-DAD) wurden die UV-Spektren der detektierten Substanzen bestimmt.

Die Chromatogramme und Retentionszeiten der zu untersuchenden Substanzen wurden an einem elektrochemischen Detektor (ED40, Dionex) mittels Gleichspannungsamperometrie bestimmt und über die Chromatographie-Software Chromeleon Version 6.03 ausgewertet.

Da der elektrochemische Detektor für die Bestimmung von Phenolen äußerst sensitiv ist, wurde die Meßspannung des elektrochemischen Detektors für die Bestimmung von Flavonolen optimiert. Aufgrund ihres häufigen Vorkommens in pflanzlichen Lebensmitteln, wurden Quercetin und Kämpferol als Leitsubstanzen ausgewählt.

Da diese Methode in epidemiologischen Studien, bei denen oftmals nur geringe Mengen an Probenmaterial zur Verfügung stehen, eingesetzt werden sollte, war es äußerst wichtig, möglichst geringe Nachweisgrenzen zu erreichen. Um die Nachweisgrenze zu verringern, wurde anhand des in Abbildung 24 dargestellten Diagramms die Spannung, die das stärkste Signal für die beiden Leitsubstanzen ergab (+1100 mV), als Meßspannung für die Untersuchung der Polyphenole ausgewählt.

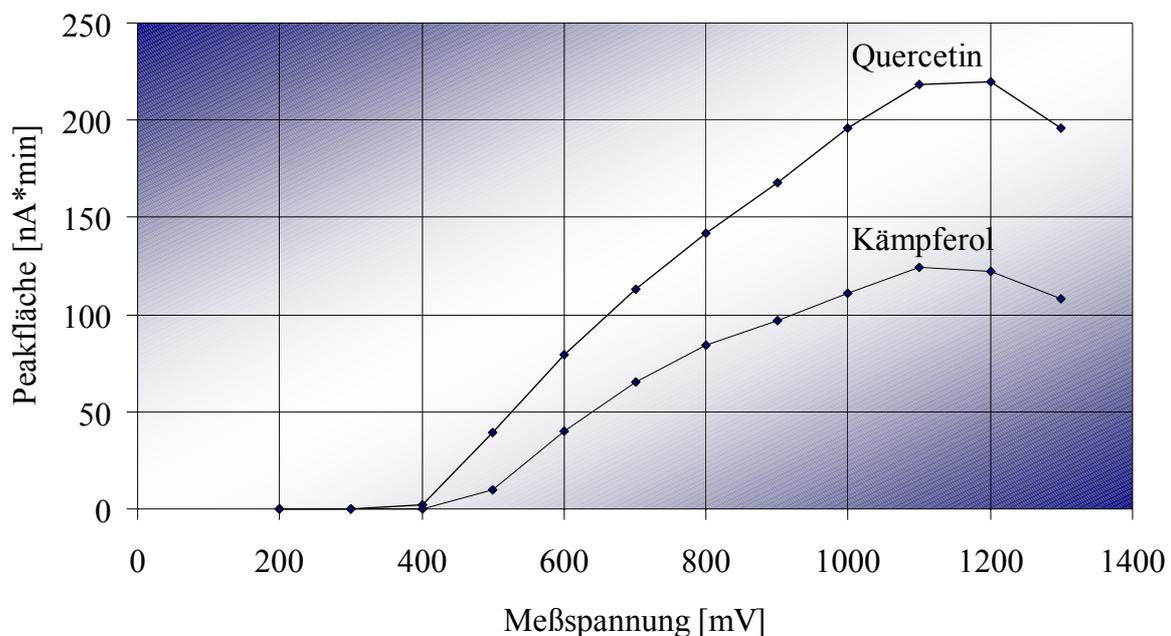


Abb. 24: Bestimmung der optimalen Meßspannung am elektrochemischen Detektor anhand von Quercetin und Kämpferol

Identifizierung

Die Polyphenole wurden anhand ihrer Retentionszeiten und ihrer UV-Spektren sowie durch deren Vergleich mit denen der Standardsubstanzen identifiziert. Der chromatographischen Bestimmung der Proben ging jeden Tag die Untersuchung einer Lösung aller Standardsubstanzen voraus, um eventuelle Schwankungen erkennen zu können. Unter den beschriebenen Bedingungen waren die Retentionszeiten der Analyten konstant (siehe Tabelle 18). Aufgrund der hohen Meßspannung wiesen die Chromatogramme einige Interferenzen auf, die die Analytenpeaks jedoch nur in Ausnahmefällen überdeckten. In diesen Fällen wurde die fragliche Substanz nicht weiter ausgewertet. Zur Detektion der Polyphenole wurden, um die Selektivität der Methode zu prüfen und die Identität der detektierten Substanzen zu bestätigen, zusätzlich die UV-Spektren der Substanzpeaks mittels DAD aufgezeichnet und mit der UV-Spektrenbibliothek, die zu diesem Zweck angelegt worden war, verglichen.

Das Chromatogramm in Abbildung 25 zeigt die detektierten Polyphenole in einer Nüchternplasmaprobe (ECD). Die UV-Spektren der jeweiligen Peaks zeigen ausreichend gute Selektivität für die Bestimmung der Analyten aus Nüchternplasma. Um die Möglichkeit von Interferenzen, die durch den Gebrauch einer hohen Meßspannung entsteht, zu verringern, wurden die Proben mittels Festphasenextraktion gereinigt (siehe Kapitel 4.2.4).

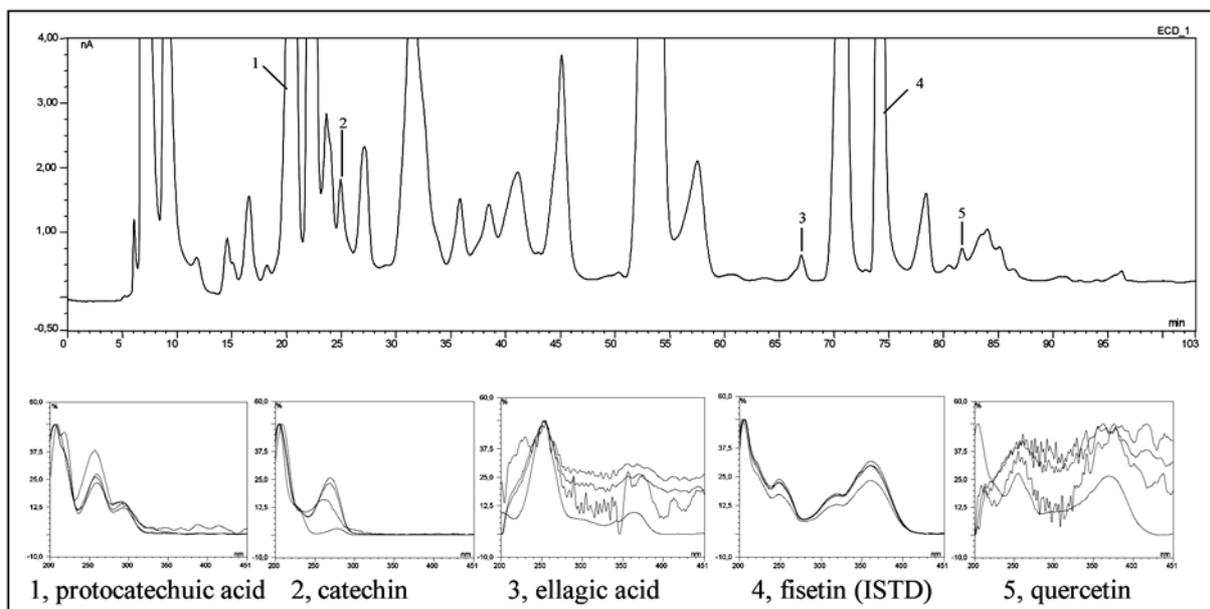


Abb. 25: Chromatogramm einer Nüchternplasmaprobe mit den UV-Spektren der detektierten Polyphenole

Quantifizierung

Die Quantifizierung erfolgte über die Methode des internen Standards. Dadurch wurden Empfindlichkeitsunterschiede des elektrochemischen Detektors auf die unterschiedlichen Testsubstanzen und innerhalb verschiedener HPLC-Läufe berücksichtigt. Wichtig bei der Verwendung eines internen Standards war, dass jeder Probe die gleiche Menge zugesetzt wurde. In diesem Zusammenhang sei auch auf die Qualitätskontrolle bei der Responsefaktorbestimmung hingewiesen (siehe Kapitel 4.1.2).

4.2 Validierung der Nachweismethode

Um die richtige Durchführung der quantitativen Bestimmungen zu gewährleisten, ist eine Validierung der verwendeten Methoden unerlässlich. Als Grundlage für die Validierung der Methodik boten sich die Leitlinien „Analytical Validation: Methodology and Validation of Analytical Procedures: Definition and Terminology“ (2000) der ICH an. Art und Umfang der Validierungsschritte sind jeweils abhängig vom analytischen Problem. So konnte im Umfang dieser Arbeit, soweit es sich als sinnvoll erwies, auf einige Schritte verzichtet werden. Die linearen Bereiche wurden z.B. so weit überprüft, dass sich alle Messwerte möglichst innerhalb dieser Bereiche befanden. Die Überprüfung der Nachweisgrenzen war erforderlich, da nicht in allen Fällen die interessierenden Inhaltsstoffe nachgewiesen werden konnten und es sich bei den Studien um Grenzprüfungen handelte.

Bei der Durchführung der Validierung wurde ein jeweils frisch bereiteter Extrakt verwendet. Bei den gekauften Standards wurde die Reinheit mit dem dargestellten HPLC-System überprüft. Die Identität der Polyphenole in der Testmatrix ergab sich aus der Lage der Peaks im Chromatogramm im Vergleich zu einem Chromatogramm der Einzelstandards. Die Berechnung der Polyphenole erfolgte als kristallwasserfrei. Dies wurde bei der rechnerischen Korrektur der Einwaagen berücksichtigt. Alle HPLC-Bestimmungen der Validierung wurden hintereinander anhand eines Extraktes unter denjenigen Bedingungen bearbeitet, die auch bei den Gehaltsbestimmungen vorlagen.

4.2.1 Linearität

Die Linearität gibt Aufschluss darüber, in welchem Konzentrationsbereich der geprüften Substanzen die Substanzmenge mit der Größe des Messsignals linear ist. Die Linearität der verwendeten Substanzen im gemessenen Bereich wurde anhand von Eichgeraden überprüft. Die Eichgeraden wurden mit Excel erstellt und sind in $\mu\text{mol/l}$ dargestellt (siehe Tabelle 19). Zur Erstellung der Standardgeraden wurden je $30 \mu\text{l}$ der 5 Kalibrierlösungen jeweils dreimal injiziert.

Tab. 19: Geradengleichung und Regressionskoeffizienten der Eichkurven für die untersuchten Polyphenole

Name	Geradengleichung	Regressionskoeffizient r
Gallocatechin	$y = 1,009 x + 0,055$	0,9991
Protocatechusäure	$y = 1,299 x + 0,048$	0,9989
Epigallocatechin	$y = 1,006 x + 0,050$	0,9988
Catechin	$y = 0,945 x + 0,109$	0,9993
Gentisinsäure	$y = 1,507 x + 0,057$	0,9998
Epigallocatechingallat	$y = 0,886 x + 0,042$	0,9993
Kaffeesäure	$y = 1,035 x + 0,085$	0,9992
Vanillinsäure	$y = 0,991 x + 0,031$	0,9994
Epicatechin	$y = 0,941 x + 0,144$	0,9989
Syringasäure	$y = 0,571 x + 0,082$	0,9993
p-Cumarsäure	$y = 1,908 x + 0,109$	0,9986
Ferulasäure	$y = 0,847 x + 0,035$	0,9994
Salicylsäure	$y = 0,414 x + 0,035$	0,9999
Ellagsäure	$y = 0,894 x + 0,080$	0,9996
Fisetin	$y = 1,219 x + 0,096$	0,9989
Daidzein	$y = 0,788 x + 0,271$	0,9989
Quercetin	$y = 1,390 x + 0,089$	0,9991
Naringenin	$y = 0,525 x + 0,082$	0,9990
Luteolin	$y = 0,734 x + 0,056$	0,9997
Genistein	$y = 0,919 x + 0,169$	0,9990
Hesperetin	$y = 0,475 x + 0,075$	0,9991
Kämpferol	$y = 0,988 x + 0,102$	0,9986
Apigenin	$y = 0,627 x + 0,106$	0,9987
Isorhamnetin	$y = 1,429 x + 0,180$	0,9990

Die Konzentrationsbereiche der Linearitätsbestimmung sind in Tabelle 20 wiedergegeben. Die Eichgeraden verliefen über einen großen Bereich linear und es ergaben sich lineare Regressionen mit hohen Regressionskoeffizienten (siehe Tabelle 19), diese zeigen eine hohe lineare Abhängigkeit zwischen injizierter Menge und Messsignal.

Tab. 20: Konzentrationsbereiche der Linearitätsbestimmung bei der Eichung der Polyphenole

Polyphenole	Konzentrationsbereich	
	min.	max.
	[µmol/l]	
Gallocatechin	0,006	2,399
Protocatechusäure	0,003	6,743
Epigallocatechin	0,022	2,452
Catechin	0,003	5,090
Gentisinsäure	0,003	8,741
Epigallocatechingallat	0,005	2,002
Kaffeesäure	0,004	9,955
Vanillinsäure	0,002	5,293
Epicatechin	0,003	6,152
Syringasäure	0,004	9,571
p-Cumarsäure	0,002	10,540
Ferulasäure	0,004	9,570
Salicylsäure	0,006	15,038
Ellagsäure	0,003	6,105
Fisetin	0,003	6,462
Daidzein	0,005	6,872
Quercetin	0,003	5,685
Naringenin	0,005	7,148
Luteolin	0,003	3,332
Genistein	0,006	7,613
Hesperetin	0,002	7,048
Kämpferol	0,004	5,969
Apigenin	0,004	7,734
Isorhamnetin	0,003	4,439

4.2.2 Reproduzierbarkeit

Durch die Ermittlung der Präzision wird nachgewiesen, dass die jeweiligen Messwerte unter den spezifischen Bedingungen der Analyse reproduzierbar sind.

Bei der Ermittlung der intra-day-Präzision wurden acht Proben desselben Plasmapools Standards zugesetzt, aufgearbeitet und als Doppeleinspritzung analysiert (siehe Tabelle 21). Dargestellt sind Mittelwert \pm Standardabweichung und der Variationskoeffizient. Die Reproduzierbarkeit für den inter-day-assay wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen anhand der Mittelwerte derselben Plasmaprobe (n=6) als Doppeleinspritzung überprüft. Aus den ermittelten und in Tabelle 21 dargestellten Variationskoeffizienten lässt sich eine gute Intra-day- und Inter-day-Reproduzierbarkeit der Methode ableiten.

Tab. 21: Reproduzierbarkeit [Mittelwert \pm SD ($\mu\text{mol/l}$) und VK (%)] zugesetzter Standards

Standardsubstanz	Intra-day ^a		Inter-day ^b	
	Mittelwert \pm SD	VK %	Mittelwert \pm SD	VK %
Galocatechin	1,18 \pm 0,03	2,86	1,20 \pm 0,05	4,26
Protocatechusäure	2,36 \pm 0,04	1,86	2,41 \pm 0,04	2,06
Epigallocatechin	1,62 \pm 0,10	6,19	1,46 \pm 0,03	2,61
Catechin	1,46 \pm 0,02	1,56	1,49 \pm 0,08	5,43
Gentisinsäure	2,77 \pm 0,04	1,54	2,84 \pm 0,13	4,85
Epigallocatechingallat	0,85 \pm 0,05	6,49	0,82 \pm 0,07	9,50
Kaffeesäure	1,98 \pm 0,02	0,98	2,03 \pm 0,19	9,54
Vanillinsäure	2,42 \pm 0,04	1,84	2,50 \pm 0,23	9,58
Epicatechin	1,43 \pm 0,03s	2,00	1,45 \pm 0,05	3,48
Syringasäure	2,21 \pm 0,05	2,36	2,25 \pm 0,11	5,02
p-Cumarsäure	2,01 \pm 0,04	2,00	2,07 \pm 0,12	6,24
Ferulasäure	1,86 \pm 0,05	2,50	1,89 \pm 0,15	8,18
Salicylsäure	3,16 \pm 0,09	2,87	3,18 \pm 0,12	3,82
Ellagsäure	3,86 \pm 0,10	2,54	3,97 \pm 0,06	1,52
Daidzein	1,48 \pm 0,03	1,75	1,51 \pm 0,14	9,63
Quercetin	1,31 \pm 0,06	4,64	1,31 \pm 0,08	6,26
Naringenin	1,33 \pm 0,03	2,62	1,36 \pm 0,09	7,26
Luteolin	4,58 \pm 0,09	1,98	4,68 \pm 0,24	5,31
Genistein	1,36 \pm 0,04	2,93	1,39 \pm 0,05	3,81
Hesperetin	1,41 \pm 0,05	3,49	1,44 \pm 0,08	6,20
Kämpferol	1,47 \pm 0,03	2,26	1,48 \pm 0,08	5,88
Apigenin	1,58 \pm 0,03	2,05	1,61 \pm 0,11	7,40
Isorhamnetin	3,98 \pm 0,08	1,89	4,06 \pm 0,08	2,07

^a acht Proben, Doppeleinspritzung;

^b Doppeleinspritzung, an fünf Tagen, Mittelwert von je sechs Bestimmungen

4.2.3 Wiederfindung

Der Nachweis der Richtigkeit wird durch Ermittlung der Wiederfindungsrate erbracht. Durch Zudotieren definierter Mengen der Polyphenol-Standardmischung zu Wasser (n=6) (theoretische Wiederfindung) und zu gepoolten Plasmaproben (n=8) (analytische Wiederfindung), wurden bei doppelter Einspritzung die in Tabelle 22 beschriebenen Wiederfindungsraten ermittelt. Die theoretische Wiederfindung aller untersuchten Polyphenole aus Wasser beträgt im Mittel $96,88 \pm 2,68\%$. Die analytische Wiederfindung aller untersuchten Polyphenole aus Plasma beträgt im Mittel $95,57 \pm 6,72\%$. Wie aus den gezeigten Ergebnissen hervorgeht, können die Ergebnisse der Methode als richtig bewertet werden.

Tab. 22: Wiederfindung einer Polyphenol-Standard-Mischung in Wasser und einer Humanplasma-Probe mit zugesetzter Polyphenol-Standard-Mischung

Standardsubstanz	Konz.	Wiederfindung aus Wasser ^a	Wiederfindung aus Plasma ^b
	$\mu\text{mol/l}$	%	%
Gallocatechin	0,58	$92,65 \pm 3,11$	$81,32 \pm 2,55$
Protocatechusäure	1,59	$94,85 \pm 1,62$	$93,10 \pm 6,87$
Epigallocatechin	0,59	$98,94 \pm 4,38$	$97,01 \pm 4,71$
Catechin	1,22	$96,43 \pm 1,39$	$98,55 \pm 8,19$
Gentisinsäure	2,10	$98,11 \pm 3,80$	$102,52 \pm 7,51$
Epigallocatechingallat	0,45	$97,20 \pm 2,92$	$100,89 \pm 7,69$
Kaffeesäure	2,44	$91,27 \pm 5,01$	$106,79 \pm 5,63$
Vanillinsäure	1,27	$96,22 \pm 4,04$	$88,45 \pm 7,74$
Epicatechin	1,51	$97,73 \pm 1,79$	$84,12 \pm 5,95$
Syringasäure	2,25	$98,05 \pm 1,91$	$83,36 \pm 5,55$
p-Cumarsäure	2,53	$95,91 \pm 2,76$	$98,90 \pm 7,26$
Ferulasäure	2,35	$92,98 \pm 4,42$	$102,58 \pm 9,22$
Salicylsäure	3,68	$98,02 \pm 3,37$	$105,43 \pm 7,32$
Ellagsäure	1,47	$99,26 \pm 1,50$	$95,98 \pm 9,44$
Daidzein	1,65	$98,49 \pm 1,22$	$96,14 \pm 6,56$
Quercetin	1,39	$97,36 \pm 3,25$	$101,30 \pm 5,37$
Naringenin	1,68	$98,92 \pm 2,13$	$95,31 \pm 9,34$
Luteolin	0,82	$95,61 \pm 1,22$	$94,73 \pm 7,29$
Genistein	1,83	$96,71 \pm 2,85$	$98,82 \pm 7,67$
Hesperetin	1,59	$98,84 \pm 3,04$	$85,84 \pm 6,63$
Kämpferol	1,38	$97,71 \pm 2,06$	$102,79 \pm 8,05$
Apigenin	1,86	$99,36 \pm 2,06$	$83,09 \pm 4,51$
Isorhamnetin	1,07	$97,61 \pm 1,68$	$101,03 \pm 3,43$

^a sechs Doppeleinspritzungen;

^b acht Doppeleinspritzungen

4.2.4 Nachweisgrenze

Unter der Nachweisgrenze eines Analysenverfahrens wird die niedrigste Konzentration eines Analyten in der Probe verstanden, die noch detektierbar ist. Zur Bestimmung dieses Validierungsparameters wird daher die Definition der Nachweisgrenze aus den IUPAC-Richtlinien zur Nomenklatur in der Chromatographie herangezogen. Dabei ist die Nachweisgrenze definiert als die Summe des Mittelwertes des Grundrauschens für das Detektorsignal und dessen 3-facher Standardabweichung. Für die ECD-Detektion erfolgte die Ermittlung des Grundrauschens anhand von 20 willkürlich ausgewählten Chromatogrammen von Humanplasmaproben. Die Nachweisgrenzen wurden anhand von acht Doppeleinspritzungen ermittelt. Um die Selektivität bei niedrigen Konzentrationen zu berücksichtigen, wurden die Untersuchungen in gepooltem „Low-Polyphenol-Plasma“ durchgeführt. Die in Tabelle 23 dargestellten Nachweisgrenzen zeigen die Polyphenolkonzentrationen bei elektrochemischer Detektion.

Tab. 23: Nachweisgrenzen der untersuchten Polyphenole

Name	Nachweisgrenze [nmol/l]	Name	Nachweisgrenze [nmol/l]
Gallocatechin	5,14	Salicylsäure	6,16
Protocatechusäure	2,59	Ellagsäure	2,53
Epigallocatechin	22,27	Daidzein	1,54
Catechin	2,97	Quercetin	5,31
Gentisinsäure	2,56	Naringenin	2,85
Epigallocatechingallat	3,29	Luteolin	5,68
Kaffeesäure	3,63	Genistein	1,60
Vanillinsäure	2,05	Hesperetin	2,55
Epicatechin	1,72	Kämpferol	1,70
Syringasäure	4,18	Apigenin	2,39
p-Cumarsäure	1,45	Isorhamnetin	2,18
Ferulasäure	4,13		

4.3 Polyphenolkonzentrationen im Plasma eines repräsentativen Kollektivs der Bayerischen Verzehrsstudie II

4.3.1 Polyphenolkonzentrationen im Plasma gesamt und nach Geschlecht

Das vorliegende Studienkollektiv zeigt charakteristische Besonderheiten in seinen soziodemographischen und anthropometrischen Einflussgrößen (siehe Tabelle 7). Die Männer und Frauen dieser Population wiesen signifikante Unterschiede in Alter, Gewicht, Größe, BMI und WHR sowie Rauchstatus und Schichtzugehörigkeit auf ($p < 0,05$). Die weiblichen Studienteilnehmer waren mit $46,4 \pm 14,5$ Jahren signifikant jünger als die Männer mit $51,3 \pm 15,7$ Jahren (Mean). 40,3 % aller untersuchten Männer und 60,5 % der Frauen gaben an, noch nie geraucht zu haben, während 30 % der männlichen Studienteilnehmer und 20,7 % der Frauen Raucher waren.

In allen Proben konnten Vertreter der Flavonoide und der Phenolsäuren gefunden werden. Wie erwartet, streuen die Ergebnisse aber über einen sehr breiten Konzentrationsbereich. In Tabelle 24 sind die Konzentrationen aller untersuchten Polyphenole des gesamten Studienkollektivs ($n_{\text{gesamt}} = 568$, $n_{\text{weiblich}} = 325$, $n_{\text{männlich}}=243$) unter Angabe von Mittelwert (Mean), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwertes (SEM), Minimalwert (Min), Maximalwert (Max), Median (50. Perzentile) und den Perzentilen (10., 25., 75., 90.) zusammengestellt. Die niedrigsten Konzentrationen wurden für Apigenin bzw. Daidzein gefunden und liegen im Mittel bei 9,3 nmol/l bzw. 10,1 nmol/l. Die Minimum-Konzentrationen für die Einzelsubstanzen liegen unterhalb der Nachweisgrenzen.

Die mit Abstand höchsten Mittelwerte im gesamten Kollektiv wurden für Stellvertreter der Hydroxybenzoesäuren ermittelt: für Salicylsäure 7456,71 nmol/l, für Syringasäure 2409,37 nmol/l und für Gentisinsäure 1678,28 nmol/l.

Die Plasmakonzentrationen der Flavonoide sind insgesamt deutlich unter den Konzentrationen der Phenolsäuren (Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren) angesiedelt. Epigallocatechin jedoch liegt mit 904,96 nmol/l erkennbar über dem Durchschnitt der übrigen Flavonoide. Die Verteilung der Polyphenole fällt sehr heterogen aus. Während bei den meisten der untersuchten Substanzen die 10. Perzentile unter der Nachweisgrenze liegt, sind für einige Vertreter der Catechine (Epigallocatechingallat und Epicatechin) sowie für beide Isoflavone erst in der 75. Perzentile messbare Konzentrationen zu ermitteln. Für Gentisinsäure, Vanillinsäure und Kaffeesäure können jedoch bereits in der untersten Perzentile Ergebnisse gefunden werden. Die jeweiligen Summen der Substanzklassen der untersuchten Flavonole, Flavanone und der

Flavone liegen im Mittel in ähnlichen Konzentrationsbereichen (139,44 nmol/l bis 177,69 nmol/l). Die Summe der Isoflavone liegt im Mittel mit 48,31 nmol/l deutlich darunter, während die beiden Phenolsäuregruppen im Durchschnitt beträchtlich höhere Konzentrationen aufweisen (12276,15 nmol bzw. 1130,6 nmol/l).

Die Flavonoidkonzentrationen des männlichen Teilkollektives (siehe Tabelle 25) liegen nahe der Mittelwerte des gesamten Studienkollektives und unterscheiden sich auch bei den Phenolsäuren nur wenig von den Werten des gesamten Kollektives. Die Konzentration für Salicylsäure liegt mit 2602,67 nmol/l jedoch erkennbar unter dem Mittel für beide Geschlechter (7456,71 nmol/l). Derweil die Bereiche der Perzentilen gut übereinstimmen, ist die maximal erreichte Konzentration von Salicylsäure beim männlichen Teilkollektiv um das zehnfache geringer (104,47 μ mol/l) als im gesamten Studienkollektiv (1,12 mmol/l).

Im weiblichen Teilkollektiv (Tabelle 26) liegen die Plasmakonzentrationen der Flavan-3-ole, Flavonole, Flavone und Isoflavone sowie beider Phenolsäureklassen über den jeweiligen Summen des gesamten Studienkollektives. Die deutlichsten Unterschiede der Ergebnisse des gesamten Kollektivs zeigt sich bei Salicylsäure mit einem Mittelwert von 11,09 μ mol/l und einer maximalen Konzentration von 1,12 mmol/l.

Der Vergleich der Polyphenolkonzentrationen von männlichen und weiblichen Studienteilnehmern (siehe Tabelle 27) zeigt signifikante Mittelwertsunterschiede in der Klasse der Catechine für Epicatechin (0,010) sowie für die Summe der untersuchten Flavan-3-ole (0,030). In der Klasse der Flavonole unterscheiden sich die Konzentrationen von Isorhamnetin signifikant. Bei den Flavanone liegt der Wert für Naringenin bei den Frauen signifikant über dem der Männer. Hesperetin ebenso wie die Stellvertreter der Flavone und Isoflavone weisen keine charakteristische Mittelwertsunterscheidung bei der geschlechtsspezifischen Prüfung auf (204,67 nmol/l). Die Hydroxybenzoesäuren zeigen nur für Salicylsäure signifikante Unterschiede (0,033) der Konzentrationen von Männern und Frauen wie oben bereits beschrieben. In der Gruppe der Hydroxymitsäuren ist die Konzentration für Ferulasäure bei den Frauen (269,02 nmol/l) signifikant höher als bei den Männern.

Tab. 24: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma des gesamten Studienkollektives der BVS II-Studie (n = 568) unter Angabe von Mittelwert (Mean), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwertes (SEM), Minimum (Min.), Maximum (Max.) und Perzentilen

Poly-phenole	Mean	SD	SEM	Min.	Max.	Perzentilen				
						10	25	50	75	90
Flavan-3-ole:										
GC	35,98	75,73	3,18	n.d.	620,41	n.d.	n.d.	13,59	33,91	87,39
EGC	904,96	744,88	31,25	n.d.	2916,34	n.d.	324,82	700,02	1367,69	2075,51
Cat	49,88	97,51	4,09	n.d.	687,52	n.d.	n.d.	12,46	50,68	154,76
EGCG	69,07	139,91	5,87	n.d.	906,60	n.d.	n.d.	n.d.	69,78	254,77
EC	34,74	95,94	4,03	n.d.	876,85	n.d.	n.d.	n.d.	20,79	102,56
<i>Summe:</i>	1094,63	797,81	33,48	n.d.	3646,77	181,49	476,30	929,24	1546,00	2299,22
Flavonole:										
Quer	81,18	70,98	2,98	n.d.	563,79	n.d.	36,55	70,24	112,17	162,55
Käm	43,96	115,40	4,84	n.d.	1356,76	n.d.	5,83	13,90	37,14	88,52
Isorh	14,31	24,95	1,05	n.d.	308,45	n.d.	2,67	7,87	16,30	31,05
<i>Summe:</i>	139,44	160,77	6,75	n.d.	1777,81	20,88	59,93	102,43	168,38	255,68
Flavanone:										
Nar	39,15	70,25	2,95	n.d.	580,75	n.d.	n.d.	15,77	43,85	101,53
Hesp	103,09	158,70	6,66	n.d.	899,48	n.d.	n.d.	26,78	159,56	309,04
<i>Summe:</i>	142,25	172,37	7,23	n.d.	961,77	n.d.	8,41	84,70	212,15	373,94
Flavone:										
Lut	163,94	351,73	14,76	n.d.	3405,95	n.d.	10,21	46,47	114,75	455,15
Api	13,75	34,83	1,46	n.d.	332,83	n.d.	n.d.	3,49	11,85	32,33
<i>Summe:</i>	177,69	353,08	14,81	n.d.	3405,95	4,43	18,72	59,75	154,03	466,51
Isoflavone:										
Dai	10,92	28,70	1,20	n.d.	432,57	n.d.	n.d.	n.d.	12,42	29,84
Gen	37,39	95,55	4,01	n.d.	821,22	n.d.	n.d.	n.d.	15,72	128,72
<i>Summe:</i>	48,31	101,58	4,26	n.d.	821,22	n.d.	n.d.	9,95	41,86	137,11
Hydroxybenzoesäuren:										
Proto	487,05	498,34	20,91	n.d.	3573,5	n.d.	125,62	377,26	676,49	1065,85
Genti	1678,28	1377,15	57,78	n.d.	10136	476,21	879,08	1332,45	2065,37	3194,32
Van	214,55	404,01	16,95	n.d.	3913,5	6,76	35,10	93,31	205,61	484,08
Syr	2409,37	4265,57	178,98	n.d.	25478	n.d.	91,36	598,79	2366,92	7513,91
Sal	7456,71	67693,31	2840,3	n.d.	1122686	n.d.	68,21	258,79	648,78	1329,78
Ellag	30,21	76,21	3,20	n.d.	624,75	n.d.	n.d.	n.d.	14,31	116,51
<i>Summe:</i>	12276,15	68084,78	2856,7	26,82	1129418	1612,1	2374,7	3810,88	7267,09	15076,3
Hydroxyzimtsäuren:										
Kaff	495,78	356,50	14,96	n.d.	2372,61	183,05	272,09	415,20	600,08	912,75
Cum	393,32	966,86	40,57	n.d.	6494,62	n.d.	7,09	32,43	273,09	993,20
Fer	241,49	425,02	17,83	n.d.	3395,35	n.d.	30,78	97,20	260,88	603,06
<i>Summe:</i>	1130,60	1270,83	53,32	12,01	9043,62	286,93	433,77	684,71	1275,97	2407,20

Tab. 25: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma der männlichen Studienteilnehmer (n = 243) der BVS II-Studie unter Angabe von Mittelwert (Mean), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwertes (SEM), Minimum (Min.), Maximum (Max.) und Perzentilen

Poly-phenole	Mean	SD	SEM	Min.	Max.	Perzentilen				
						10	25	50	75	90
Flavan-3-ole:										
GC	34,55	73,62	4,72	n.d.	620,41	n.d.	n.d.	13,55	36,76	86,84
EGC	862,35	778,12	49,92	n.d.	2916,34	n.d.	234,44	657,35	1350,57	2116,23
Cat	40,71	76,44	4,90	n.d.	457,49	n.d.	n.d.	10,17	39,00	123,11
EGCG	50,62	114,43	7,34	n.d.	895,42	n.d.	n.d.	n.d.	38,14	178,73
EC	36,61	115,09	7,38	n.d.	876,85	n.d.	n.d.	n.d.	14,88	109,10
<i>Summe:</i>	1024,84	814,97	52,28	n.d.	3582,61	77,00	384,15	860,57	1474,52	2290,66
Flavonole:										
Quer	80,17	69,95	4,49	n.d.	563,79	2,13	39,77	66,25	107,75	160,84
Käm	41,22	118,12	7,58	n.d.	1356,76	n.d.	5,33	13,20	34,47	83,33
Isorh	15,83	25,51	1,64	n.d.	204,76	n.d.	2,75	9,11	19,44	37,31
<i>Summe:</i>	137,22	166,13	10,66	3,26	1777,81	26,04	60,16	94,93	163,97	271,38
Flavanone:										
Nar	34,16	72,67	4,66	n.d.	533,13	n.d.	n.d.	11,05	32,97	95,67
Hesp	119,45	182,20	11,69	n.d.	899,48	n.d.	n.d.	26,41	177,46	380,24
<i>Summe:</i>	153,61	196,74	12,62	n.d.	961,77	n.d.	3,99	70,09	230,58	425,60
Flavone:										
Lut	135,01	294,97	18,92	n.d.	2555,23	n.d.	11,90	41,87	100,27	345,04
Api	11,59	29,21	1,87	n.d.	332,83	n.d.	n.d.	2,70	11,40	30,77
<i>Summe:</i>	146,61	295,63	18,96	n.d.	2588,02	5,07	18,72	55,48	112,72	354,00
Isoflavone:										
Dai	13,23	28,77	1,85	n.d.	275,97	n.d.	n.d.	n.d.	15,99	39,47
Gen	33,21	94,81	6,08	n.d.	639,73	n.d.	n.d.	n.d.	9,69	101,15
<i>Summe:</i>	46,44	100,89	6,47	n.d.	689,29	n.d.	n.d.	9,42	41,44	123,93
Hydroxybenzoesäuren:										
Proto	478,79	524,24	33,63	n.d.	3573,5	n.d.	111,03	366,26	633,26	1056,81
Genti	1751,57	1556,27	99,83	n.d.	10136,8	187,15	798,33	1300,73	2254,41	3545,16
Van	184,80	337,81	21,67	n.d.	3475,4	n.d.	31,78	84,92	187,57	431,21
Syr	2652,15	4646,06	298,04	n.d.	25478	n.d.	118,35	559,37	2573,29	8656,95
Sal	2602,67	10578	678,61	n.d.	104468	n.d.	51,65	212,75	543,90	1477,64
Ellag	25,25	68,43	4,39	n.d.	513,96	n.d.	n.d.	n.d.	7,05	89,26
<i>Summe:</i>	7695,24	12010	770,50	186,81	110954	1507,1	2281,54	3917,32	7235,61	17045,43
Hydroxyzimtsäuren:										
Kaff	511,96	375,17	24,07	n.d.	2290,83	166,34	258,87	421,19	627,08	1051,63
Cum	379,59	896,15	57,49	n.d.	6103,37	n.d.	9,71	47,78	304,89	971,80
Fer	204,67	346,86	22,25	n.d.	2904,41	n.d.	19,15	80,40	249,12	520,69
<i>Summe:</i>	1096,22	1219,17	78,21	17,03	8384,55	256,45	425,54	698,01	1278,35	2151,46

Tab. 26: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma der weiblichen Studienteilnehmerinnen (n = 243) der BVS II-Studie unter Angabe von Mittelwert (Mean), Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwertes (SEM), Minimum (Min.), Maximum (Max.) und Perzentilen

Poly-phenole	Mean	SD	SEM	Min.	Max.	Perzentilen				
						10	25	50	75	90
Flavan-3-ole:										
GC	37,05	77,36	4,29	n.d.	580,44	n.d.	n.d.	13,77	33,64	88,44
EGC	936,83	718,59	39,86	n.d.	2868,66	118,23	365,02	740,47	1384,72	2077,55
Cat	56,73	110,29	6,12	n.d.	687,52	n.d.	n.d.	15,67	55,23	170,36
EGCG	82,87	155,02	8,60	n.d.	906,60	n.d.	n.d.	n.d.	108,53	280,94
EC	33,34	78,79	4,37	n.d.	738,32	n.d.	n.d.	n.d.	27,66	95,86
<i>Summe:</i>	1146,81	781,92	43,37	n.d.	3646,77	274,44	507,59	976,17	1616,30	2335,16
Flavonole:										
Quer	81,93	71,83	3,98	n.d.	525,88	n.d.	34,06	73,12	113,70	163,82
Käm	46,00	113,46	6,29	n.d.	1009,29	n.d.	5,93	14,04	39,33	91,14
Isorh	13,17	24,51	1,36	n.d.	308,45	n.d.	2,43	6,90	14,20	29,61
<i>Summe:</i>	141,11	156,88	8,70	n.d.	1343,26	18,90	58,45	110,03	170,70	245,68
Flavanone:										
Nar	42,89	68,25	3,79	n.d.	580,75	n.d.	n.d.	19,56	53,20	114,46
Hesp	90,86	137,59	7,63	n.d.	856,69	n.d.	n.d.	27,01	141,20	263,27
<i>Summe:</i>	133,75	151,37	8,40	n.d.	909,06	n.d.	12,20	89,00	205,90	345,14
Flavone:										
Lut	185,57	387,83	21,51	n.d.	3405,95	n.d.	8,87	51,30	143,75	536,80
Api	15,36	38,46	2,13	n.d.	312,90	n.d.	n.d.	3,82	12,69	33,43
<i>Summe:</i>	200,94	389,38	21,60	n.d.	3405,95	3,72	18,57	65,47	186,36	554,17
Isoflavone:										
Dai	9,19	28,56	1,58	n.d.	432,57	n.d.	n.d.	n.d.	10,79	23,82
Gen	40,51	96,13	5,33	n.d.	821,22	n.d.	n.d.	n.d.	25,15	139,68
<i>Summe:</i>	49,70	102,22	5,67	n.d.	821,22	n.d.	n.d.	10,41	43,06	156,04
Hydroxybenzoesäuren:										
Proto	493,22	478,79	26,56	n.d.	3301,94	n.d.	129,80	383,42	703,70	1077,86
Genti	1623,47	1225,93	68,00	n.d.	9307,21	522,91	921,54	1337,38	1963,72	2956,18
Van	236,79	446,37	24,76	n.d.	3913,56	8,62	36,97	103,95	222,33	517,63
Syr	2227,85	3954,92	219,38	n.d.	25360,74	n.d.	86,66	620,10	2182,54	7292,54
Sal	11086,03	88908	4931,75	n.d.	1122686	n.d.	91,99	299,00	688,33	1279,40
Ellag	33,91	81,44	4,52	n.d.	624,75	n.d.	n.d.	n.d.	18,37	130,13
<i>Summe:</i>	15701,27	89313	4954,23	26,82	1129418	1619,68	2394,57	3722,47	7331,43	12999,34
Hydroxyzimtsäuren:										
Kaff	483,69	341,96	18,97	n.d.	2372,61	194,10	279,32	400,27	597,48	868,70
Cum	403,60	1017,78	56,46	n.d.	6494,62	n.d.	6,14	27,88	248,80	1115,65
Fer	269,02	473,80	26,28	n.d.	3395,35	8,32	37,38	103,29	279,76	687,80
<i>Summe:</i>	1156,30	1309,40	72,63	12,01	9043,62	300,52	451,44	682,57	1272,36	2650,69

Tab. 27: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma von Männern ($n_m = 243$) und Frauen ($n_w = 325$) der BVS II-Studie unter Angabe von Mittelwert (Mean), Standardabweichung (SD) und p -Wert des Mann-Whitney U-Tests

Poly-phenole	Männer		Frauen		p -Wert*
	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:					
GC	34,55	73,62	37,05	77,36	0,622
EGC	862,35	778,12	936,83	718,59	0,077
Cat	40,71	76,44	56,73	110,29	0,066
EGCG	50,62	114,43	82,87	155,02	0,057
EC	36,61	115,09	33,34	78,79	0,010*
Summe:	1024,84	814,97	1146,81	781,92	0,030*
Flavonole:					
Quer	80,17	69,95	81,93	71,83	0,627
Käm	41,22	118,12	46,00	113,46	0,255
Isorh	15,83	25,51	13,17	24,51	0,039*
Summe:	137,22	166,13	141,11	156,88	0,515
Flavanone:					
Nar	34,16	72,67	42,89	68,25	0,006*
Hesp	119,45	182,20	90,86	137,59	0,594
Summe:	153,61	196,74	133,75	151,37	0,807
Flavone:					
Lut	135,01	294,97	185,57	387,83	0,260
Api	11,59	29,21	15,36	38,46	0,112
Summe:	146,61	295,63	200,94	389,38	0,135
Isoflavone:					
Dai	13,23	28,77	9,19	28,56	0,136
Gen	33,21	94,81	40,51	96,13	0,285
Summe:	46,44	100,89	49,70	102,22	0,998
Hydroxybenzoesäuren:					
Proto	478,79	524,24	493,22	478,79	0,497
Genti	1751,57	1556,27	1623,47	1225,93	0,951
Van	184,80	337,81	236,79	446,37	0,131
Syr	2652,15	4646,06	2227,85	3954,92	0,756
Sal	2602,67	10578,51	11086,03	88908,45	0,033*
Ellag	25,25	68,43	33,91	81,44	0,090
Summe:	7695,24	12010,86	15701,27	89313,68	0,741
Hydroxyzimtsäuren:					
Kaff	511,96	375,17	483,69	341,96	0,736
Cum	379,59	896,15	403,60	1017,78	0,196
Fer	204,67	346,86	269,02	473,80	0,039*
Summe:	1096,22	1219,17	1156,30	1309,40	0,661

* signifikant nach Mann-Whitney U-Test

4.3.2 Korrelation der Plasmakonzentrationen von Polyphenolen mit anthropometrischen und sozioökonomischen Faktoren

Um zu prüfen, ob ein Zusammenhang zwischen den Polyphenolkonzentrationen und den Faktoren Lebensalter, Body-Mass-Index, Waist-to-Hip-Ratio, Schichtzugehörigkeit und Rauchstatus besteht, wurden die Korrelationskoeffizienten nach Spearman ermittelt (Tabelle 28).

Das Alter zeigt eine signifikante Korrelation mit Catechin (0,096). Mit den übrigen Flavan-3-olen zeigt sich kein Zusammenhang. Das Alter der Probanden korreliert außerdem auch mit den Plasmakonzentrationen der Flavane Kämpferol und Isorhamnetin (0,092 und 0,170), mit der Plasmakonzentration von Naringenin (0,091) sowie mit der Plasmakonzentrationen von Daidzein (0,088). Darüber hinaus ergaben sich signifikante Zusammenhänge zwischen dem Alter und den Plasmakonzentrationen von Gentisinsäure (0,240) und Salicylsäure (0,142) aus der Gruppe der Hydroxybenzoesäuren und den Plasmakonzentrationen der Hydroxyzimtsäuren (Kaffeensäure 0,162; p-Cumarsäure 0,085 und Ferulasäure 0,222; siehe Abbildung 26).

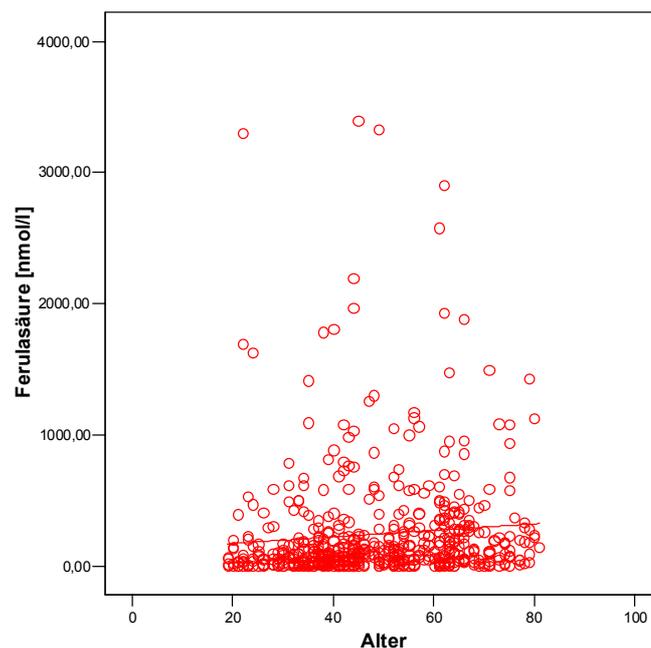


Abb. 26: Korrelation zwischen der Ferulasäurekonzentration und dem Lebensalter

Der Body-Mass-Index weist nur mit der Konzentration von Apigenin einen signifikanten Zusammenhang auf (-0,130). Die Waist-to-Hip-Ratio korreliert positiv signifikant mit der Plasmakonzentration von Isorhamnetin (0,131) und negativ signifikant mit der

Plasmakonzentration von Ellagsäure (-0,101). Die Schichtzugehörigkeit korreliert negativ signifikant mit der Plasmakonzentration von Gentsinsäure (-0,086) und das Rauchverhalten weist negativ signifikante Zusammenhänge mit Catechin (-0,110) und Hesperetin (-0,098) auf. Der deutlichste Zusammenhang der Plasmakonzentrationen von Polyphenolen mit anthropometrischen und sozioökonomischen Faktoren konnte in dieser Untersuchung für das Alter der Probanden festgestellt werden. Darüber hinaus sind alle signifikanten Korrelationen des Alters mit den Polyphenolkonzentrationen positiv. Die Plasmakonzentrationen steigen also mit steigendem Alter.

Tab. 28: Spearman'sche Korrelationskoeffizienten zwischen den Polyphenolkonzentrationen [nmol/l] und dem Alter, Body-Mass-Index, Waist-to-Hip-Ratio, Schichtzugehörigkeit sowie dem Rauchstatus des gesamten Studienkollektives (n = 568)

	Alter	BMI	WHR	Schicht	Rauchen
Flavan-3-ole:					
GC	0,048	-0,064	-0,067	0,068	0,043
EGC	0,030	-0,038	-0,052	0,059	-0,055
Cat	0,096*	-0,045	-0,045	-0,037	-0,110**
EGCG	0,028	-0,055	-0,017	0,021	-0,006
EC	0,057	-0,071	-0,067	0,034	-0,016
Flavonole:					
Que	0,076	0,011	0,016	0,036	0,057
Käm	0,092*	0,009	0,032	0,018	0,006
Isorh	0,170**	0,076	0,131**	0,001	0,055
Flavanone:					
Nar	0,091*	-0,068	-0,042	0,074	0,054
Hesp	-0,008	-0,032	-0,031	0,062	-0,098*
Flavone:					
Lut	0,061	-0,039	0,014	0,022	0,023
Api	0,033	-0,130**	-0,052	0,009	-0,032
Isoflavone:					
Dai	0,088*	-0,022	0,052	0,023	-0,065
Gen	0,055	-0,027	0,015	0,014	-0,052
Hydroxybenzoesäuren:					
Proto	0,041	-0,082	-0,059	0,047	-0,036
Genti	0,240**	0,077	0,064	-0,086*	-0,040
Van	0,076	0,038	0,003	0,020	0,009
Syr	0,002	-0,022	0,015	0,007	-0,006
Sal	0,142**	0,020	-0,018	-0,019	0,079
Ellag	-0,014	-0,064	-0,101*	0,049	-0,013
Hydroxyzimtsäuren:					
Kaff	0,162**	-0,025	0,032	-0,002	0,063
Cum	0,085*	-0,044	0,071	-0,005	0,026
Fer	0,222**	-0,022	0,022	0,035	0,071

* Korrelation ist signifikant mit $p < 0.05$ (2-seitig)

** Korrelation ist signifikant mit $p < 0.01$ (2-seitig)

4.3.3 Polyphenolkonzentrationen im Plasma nach Altersgruppen

Um einen Einfluss des Alters auf die Plasmapolyphenolkonzentration zu überprüfen, wurde das Kollektiv in fünf Altersgruppen eingeteilt:

Gruppe a	–	18 – 30 Jahre
Gruppe b	–	30 – 40 Jahre
Gruppe c	–	40 – 50 Jahre
Gruppe d	–	50 – 65 Jahre
Gruppe e	–	≥ 65 Jahre

Im gesamten ($n = 568$), nach Lebensalter unterteilten Studienkollektiv (siehe Tabelle 29) gibt es signifikante Unterschiede der Plasmakonzentrationen nach Mann-Whitney ($p < 0,05$). Im Test nach Kruskal-Wallis zeigen sich einige Unterschiede aufgrund der hohen Probandenzahl und der daraus resultierenden großen Streuung nicht. In den beiden jüngsten Altersgruppen und in der ältesten Altersgruppe sind die Gallocatechinkonzentrationen signifikant niedriger als in der zweitältesten Gruppe. Die Catechinkonzentration im Plasma der ältesten Gruppe hingegen ist signifikant höher als in der Gruppe der 30 – 40-Jährigen und in der Gruppe der 40 – 50-Jährigen. Die Epigallocatechingallatkonzentration der jüngsten Altersgruppe ist signifikant höher als die der älteren Gruppe (30 – 40-Jährige) wohingegen die Epicatechinkonzentration der 30 – 40-Jährigen deutlich unter der Epicatechinkonzentration liegt, die in der Gruppe der 50 – 65-Jährigen gefunden wurde. Die Kämpferolkonzentration der 30 – 40-Jährigen ist niedriger als in den älteren Gruppen und auch die Quercetinkonzentration in der Gruppe der 30 – 40-Jährigen ist niedriger als in den beiden älteren Gruppen (40 – 50-Jährige und 50 – 65-Jährige). Die Plasmakonzentration von Isorhamnetin in der jüngsten Altersgruppe ist signifikant niedriger als die Isorhamnetinkonzentration in der ältesten Altersgruppe und die Isorhamnetinkonzentration der zweitjüngsten Gruppe ist signifikant niedriger als in allen älteren Gruppen. Die Naringeninkonzentration in der Gruppe der 30 – 40-Jährigen ist etwa halb so groß wie in der Gruppe der 50 – 65-Jährigen, und auch die Luteolinkonzentration in der Gruppe der 30 – 40-Jährigen ist etwa halb so groß wie in der Gruppe der 50 – 65-Jährigen. Die Daidzeinkonzentration der ältesten Studienteilnehmer ist höher als seine Konzentration bei den 40 – 50-Jährigen oder den jüngsten Studienteilnehmern (18 – 30 Jahre).

Die Protocatechusäurekonzentration der 40 – 50-Jährigen liegt niedriger als in der älteren Gruppe. Die Gentisinsäurekonzentration der 18 – 30-Jährigen ist niedriger als in den beiden ältesten Gruppen und in der Gruppe der 30 – 40-Jährigen niedriger als bei allen älteren Untersuchungsgruppen. Die Gentisinsäurekonzentration bei den 40 – 50-Jährigen und den 50 – 65-Jährigen ist niedriger, als in der ältesten Gruppe. Die Salicylsäurekonzentration der jüngsten Altersgruppe und der 30 – 40-Jährigen ist niedriger als in der ältesten Gruppe.

Die Kaffeesäurekonzentration in der ältesten Gruppe ist jeweils höher als in den drei jüngsten

Gruppen und in der Gruppe der 50 – 65-Jährigen höher als in der Gruppe der 30 – 40-Jährigen. Die p-Cumarsäurekonzentration der Gruppe der 30 – 40-Jährigen ist niedriger als in den beiden ältesten Gruppen. Die Ferulasäurekonzentration der beiden jüngsten Altersgruppen ist signifikant niedriger als in den drei ältesten Gruppen.

Im männlichen (n = 243), nach Lebensalter unterteilten Studienkollektiv (siehe Tabelle 30) gibt es signifikante Unterschiede der Plasmakonzentrationen nach Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Die Catechinkonzentration der 30 – 40-Jährigen ist niedriger bei den ältesten Studienteilnehmern (≥ 65 Jahre) und die Catechinkonzentration der 40 – 50-jährigen Studienteilnehmern ist niedriger als die Catechinkonzentration in den beiden älteren Gruppierungen. Die Konzentration an Epigallocatechingallat die für die jüngste Teilnehmergruppe (18 – 30 Jahre) gefunden wurde, ist signifikant höher als bei den zwei darauffolgenden Altersgruppen. Die Epicatechinkonzentration der jüngsten Gruppe ist höher als bei der Gruppe der 30 – 40-Jährigen.

Die Konzentration an Quercetin im Plasma der 30 – 40-Jährigen ist signifikant niedriger als die Konzentration bei den zwei älteren Gruppen (40 – 50-Jährige und 50 – 65-Jährige). Auch die Konzentration an Kämpferol bei den 30 – 40-Jährigen ist niedriger als die Kämpferolkonzentration der 40 – 50-jährigen, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der Gruppe der 50 – 65-Jährigen, sondern von der ältesten Gruppe (≥ 65 Jahre). Die Isorhamnetinkonzentration der Gruppe der 30 – 40-Jährigen ist signifikant niedriger bei den zwei ältesten Gruppen (50 – 65 Jahre und älter als 65 Jahre) und die Isorhamnetinkonzentration in der Gruppe der 40 – 50-Jährigen ist signifikant niedriger als in der ältesten Gruppe (älter als 65 Jahre). Die Naringeninkonzentration der 40 – 50-Jährigen ist niedriger als in der darauf folgenden Gruppe der 50 – 60-Jährigen. Die Luteolinkonzentration der 30 – 40-jährigen Studienteilnehmer ist niedriger als in der jüngsten Gruppe und niedriger als bei den 50 – 65-jährigen Probanden. Die Isoflavone zeigen im männlichen Studienkollektiv keine signifikanten Mittelwertsunterschiede.

Die Protocatechusäurekonzentration der 40 – 50-Jährigen ist niedriger als in der Gruppe der 50 – 65-Jährigen. Die Gentisinsäurekonzentrationen der jüngsten Gruppe und der 40 – 50-Jährigen sind niedriger als bei der ältesten Gruppe. Die Gentisinsäurekonzentration der 30 – 40-Jährigen ist niedriger als bei den zwei ältesten Gruppen und die Gentisinsäurekonzentration der Gruppe der 50 – 65-Jährigen ist niedriger als bei der ältesten Gruppe. Die Kaffeesäurekonzentration der jüngsten Gruppe ist niedriger als in der ältesten Gruppe. In der Gruppe der 30 – 40-Jährigen wurde signifikant weniger Kaffeesäure gefunden als bei den zwei ältesten Gruppen und für die älteste Gruppe wurde signifikant mehr p-Cumarsäure gefunden als für die Gruppe der 40 – 50-

Jährigen. Die Ferulasäurekonzentration sowohl in der Gruppe der 30 – 40-Jährigen als auch in der Gruppe der 40 – 50-Jährigen ist signifikant niedriger als in den zwei ältesten Gruppen.

Im weiblichen ($n = 325$), nach Lebensalter unterteilten Studienkollektiv (siehe Tabelle 31) gibt es signifikante Unterschiede der Plasmakonzentrationen nach Mann-Whitney ($p < 0,05$). Die Gallocatechinkonzentration und die Epicatechinkonzentration der 30 – 40-Jährigen sind beide signifikant niedriger als in der Gruppe der 50 – 65-Jährigen. Die Isorhamnetinkonzentrationen der jüngsten Untergruppe ist niedriger als bei der Gruppe der 40 – 50-Jährigen und die Werte der 30 – 40-jährigen Altersgruppe ist niedriger als bei allen älteren Gruppen. Die Naringeninkonzentrationen der 30 – 40-Jährigen ist deutlich niedriger als in den beiden älteren Gruppen (40 – 50-Jährige und 50 – 65-Jährige). Die Konzentrationen der untersuchten Flavone sind bei den weiblichen Studienteilnehmern nicht signifikant unterschiedlich. Die Daidzeinkonzentration der jüngsten Altersgruppe ist niedriger als bei der darauf folgenden Altersgruppe und niedriger als bei der ältesten Gruppe. Die Gentisinsäurekonzentration der 30 – 40-Jährigen und die Vanillinsäurekonzentration der 18 – 30-jährigen Probandinnen sind niedriger als bei den drei ältesten Gruppen. Die Syringasäurekonzentration der 50 – 65-Jährigen ist signifikant höher als bei der ältesten Gruppe. Die Salicylsäurekonzentrationen der 18 – 30-Jährigen und der 30 – 40-Jährigen sind niedriger als bei der ältesten Gruppe. Die Ferulasäurekonzentration der jüngsten Altersgruppe ist niedriger als bei den drei ältesten Gruppen, und die Ferulasäurekonzentration der 30 – 40-Jährigen ist niedriger als bei den beiden darauffolgenden Altersgruppen.

Tab. 29: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma des gesamten Studienkollektives der BVS II-Studie (n = 568) unterteilt nach Lebensalter (Jahre) unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Poly-phenole	Lebensalter										p-Wert ¹
	(a) 18 – 30 (n = 58)		(b) 30 – 40 (n = 130)		(c) 40 – 50 (n = 125)		(d) 50 – 65 (n = 157)		(e) ≥ 65 (n = 98)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:											
GC	19,45^d	27,50	19,94^d	26,23	42,18	92,57	57,10^{abe}	106,56	25,31^d	39,35	0,019
EGC	764,58	609,74	958,06	763,83	877,13	779,03	931,05	760,58	911,32	724,60	0,608
Cat	32,53	46,42	37,66^e	73,90	54,15^e	117,57	58,70	110,63	56,78^{bc}	95,51	0,027
EGCG	66,87^b	111,20	48,37^a	111,43	58,82	130,72	80,81	153,02	92,12	172,27	0,108
EC	26,90	70,00	16,73^d	76,89	34,16	90,27	50,98^b	123,36	37,97	85,18	0,227
Flavonole:											
Quer	73,31	67,71	67,87^{cd}	60,32	87,78^b	71,50	90,79^b	84,39	79,64	58,69	0,039
Käm	24,60	37,50	24,03^{cde}	45,34	54,10^b	138,98	55,42^b	154,69	50,54^b	99,79	0,057
Isorh	9,00^e	10,56	8,56^{cde}	12,78	13,15^b	18,45	15,81^b	21,29	24,17^{ab}	45,03	< 0,001
Flavanone:											
Nar	31,21	51,36	25,70^d	44,71	38,88	73,41	48,64^b	82,62	46,86	79,27	0,127
Hesp	104,36	158,23	91,26	125,74	93,71	140,67	119,87	190,01	103,12	165,42	0,744
Flavone:											
Lut	125,94	235,02	96,18^d	184,27	162,55	355,00	220,44^b	430,93	187,59	415,95	0,253
Api	26,40	67,72	10,99	23,70	12,42	36,10	13,19	28,55	12,51	23,70	0,922
Isoflavone:											
Dai	6,56^e	14,31	9,75	21,90	12,48^e	44,04	9,92	18,47	14,66^{ac}	31,56	0,097
Gen	29,56	68,17	19,12	48,55	33,83	80,93	53,85	123,35	44,43	116,94	0,572
Hydroxybenzoesäuren:											
Proto	573,60	617,63	448,72	412,41	439,81^d	546,96	526,68^c	517,75	483,41	419,38	0,377
Genti	1578,55^{de}	1456,93	1264,39^{cde}	940,84	1632,39^{be}	1313,04	1735,45^{abe}	1385,81	2253,26^{abcd}	1670,75	< 0,001
Van	224,06	366,39	239,39	503,98	231,04	442,72	194,14	359,16	187,63	277,07	0,386
Syr	2629,55	4760,72	1792,58	3134,11	2746,99	4372,36	2446,37	4409,86	2607,34	4851,15	0,679
Sal	313,45^e	360,47	3781,17^e	24076,77	10012,13	100577,51	11518,52	88374,57	6793,42^{ab}	20938,69	0,031
Ellag	37,12	77,29	23,61	76,42	29,02	70,59	30,96	71,22	35,16	89,59	0,766
Hydroxyzimtsäuren:											
Kaff	451,34^e	322,25	425,05^{de}	287,26	479,21^e	348,57	541,85^b	420,99	563,26^{abc}	339,88	0,006
Cum	276,07	567,01	276,65^{de}	715,13	290,15	732,66	526,37^b	1284,76	535,94^b	1079,44	0,133
Fer	209,96^{cde}	521,49	152,96^{cde}	261,90	291,63^{ab}	554,73	269,55^{ab}	413,06	268,68^{ab}	347,52	< 0,001

¹ Kruskal- Wallis – Test

a, b, c, d, e signifikant nach Mann-Whitney U-Test

Tab. 30: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma der männlichen Studienteilnehmer der BVS II- Studie (n = 243) unterteilt nach Lebensalter (Jahre) unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Polyphenole	Lebensalter										p-Wert ¹
	(a) 18 – 30 (n = 23)		(b) 30 – 40 (n = 44)		(c) 40 – 50 (n = 41)		(d) 50 – 65 (n = 81)		(e) ≥ 65 (n = 54)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:											
GC	17,42	22,49	19,36	25,12	27,41	71,24	56,79	107,24	26,27	40,64	0,122
EGC	688,12	714,41	931,40	805,67	758,35	730,52	913,19	816,87	883,00	765,68	0,601
Cat	25,89	36,94	21,70^e	40,73	25,24^{de}	66,68	55,54^c	96,40	52,01^{bc}	79,63	0,006
EGCG	77,32^{bc}	114,13	12,45^a	26,80	30,98^a	84,19	55,74	108,46	77,61	167,61	0,091
EC	30,90^b	83,45	20,91^a	123,96	18,99	45,73	56,54	150,63	35,34	90,70	0,364
Flavonole:											
Quer	61,32	48,78	59,70^{cd}	49,45	87,53^b	61,43	94,23^b	90,21	78,19	58,23	0,068
Käm	25,74	46,45	20,41^{ce}	40,75	39,15^b	42,45	59,39	190,89	39,09^b	64,27	0,095
Isorh	12,11	12,80	8,37^{de}	9,93	12,49^e	23,21	15,13^b	17,32	27,09^{bc}	42,11	0,018
Flavanone:											
Nar	26,18	36,45	14,58	19,59	13,79^d	19,84	48,67^c	96,77	47,24	87,52	0,143
Hesp	121,84	208,12	112,31	137,13	133,44	182,69	119,94	197,81	112,88	184,00	0,954
Flavone:											
Lut	125,76^b	188,67	43,23^{ad}	73,55	69,29	94,17	200,03^b	343,86	166,13	418,47	0,016
Api	25,26	72,04	8,08	16,28	9,16	15,53	12,06	26,25	9,79	14,33	0,847
Isoflavone:											
Dai	11,56	20,87	10,29	22,58	12,62	30,64	11,53	22,71	19,35	40,59	0,307
Gen	32,26	52,47	12,32	46,50	12,66	30,24	48,79	117,57	42,88	124,25	0,479
Hydroxybenzoesäuren:											
Proto	621,31	703,60	381,34	362,89	354,46^d	590,44	562,94^c	559,28	465,68	409,43	0,035
Genti	1340,12^e	1045,91	1127,29^{de}	861,81	1456,12^e	1254,54	1841,65^{be}	1687,96	2524,71^{abcd}	1851,42	< 0,001
Van	295,39	401,49	209,81	552,92	156,03	176,84	166,70	254,89	166,29	277,71	0,602
Syr	3141,14	6451,44	1956,46	3270,79	3500,76	4804,46	1733,99	3163,62	3743,64	6042,57	0,349
Sal	287,90	411,35	1518,05	8468,50	330,61	348,72	3390,80	10888,73	5015,26	16108,25	0,223
Ellag	38,08	67,41	17,23	75,49	13,76	39,71	23,80	53,80	37,23	94,53	0,363
Hydroxyzimtsäuren:											
Kaff	435,18^e	358,49	373,37^{de}	221,71	493,67	311,35	559,77^b	463,87	599,76^{ab}	348,43	0,003
Cum	273,88	639,99	264,70	617,16	97,95^e	206,08	397,85	918,83	704,66^c	1302,35	0,149
Fer	259,77	473,45	73,45^{de}	98,36	121,78^{de}	184,27	258,97^{bc}	424,46	269,61^{bc}	348,05	< 0,001

¹ Kruskal- Wallis – Test

a, b, c, d, e signifikant nach Mann-Whitney U-Test

Tab. 31: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma der weiblichen Studienteilnehmerinnen der BVS II-Studie (n = 325) unterteilt nach Lebensalter (Jahre) unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Polyphenole	Lebensalter										p-Wert ¹
	(a) 18 – 30 (n = 35)		(b) 30 – 40 (n = 86)		(c) 40 – 50 (n = 84)		(d) 50 – 65 (n = 76)		(e) ≥ 65 (n = 44)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:											
GC	20,77	30,59	20,23^d	26,92	49,39	100,97	57,43^b	106,56	24,12	38,14	0,182
EGC	814,83	535,24	971,70	746,00	935,11	799,46	950,09	700,56	946,06	677,91	0,926
Cat	36,88	51,77	45,82	85,14	68,26	133,77	62,07	124,58	62,63	112,69	0,585
EGCG	60,00	110,36	66,74	132,18	72,40	146,77	107,54	186,42	109,92	178,13	0,236
EC	24,26	60,74	14,60^d	34,44	41,56	104,87	45,07^b	85,92	41,20	78,80	0,137
Flavonole:											
Quer	81,19	77,36	72,06	65,06	87,91	76,29	87,12	78,14	81,43	59,88	0,476
Käm	23,84	30,99	25,89	47,65	61,40	166,80	51,19	104,25	64,60	130,41	0,251
Isorh	6,96^c	8,37	8,66^{cde}	14,07	13,47^{ab}	15,76	16,54^b	24,94	20,57^b	48,64	0,013
Flavanone:											
Nar	34,52	59,45	31,39^{cd}	52,37	51,12^b	86,01	48,61^b	64,89	46,40	68,81	0,095
Hesp	92,87	116,65	80,48	118,89	74,32	110,99	119,80	182,65	91,15	140,48	0,436
Flavone:											
Lut	126,05	263,74	123,26	215,88	208,08	421,44	242,20	509,12	213,93	416,13	0,310
Api	27,15	65,80	12,48	26,68	14,02	42,69	14,40	30,94	15,86	31,51	0,973
Isoflavone:											
Dai	3,27^{be}	5,78	9,47^a	21,67	12,41	49,44	8,20	12,40	8,90^a	12,44	0,212
Gen	27,78	77,47	22,60	49,47	44,16	94,95	59,23	129,80	46,34	108,69	0,604
Hydroxybenzoesäuren:											
Proto	542,24	562,71	483,19	433,53	481,47	523,05	488,04	470,11	505,17	435,02	0,989
Genti	1735,23	1669,43	1334,53^{cde}	976,20	1718,43^b	1339,55	1622,27^b	964,49	1920,11^b	1365,98	0,015
Van	177,19^{cde}	339,18	254,52	479,72	267,65^a	523,08	223,38^a	444,22	213,82^a	277,21	0,047
Syr	2293,37	3282,02	1708,74	3078,05	2379,08	4125,44	3205,61^e	5351,77	1212,78^d	2114,71	0,160
Sal	330,23^e	328,06	4939,04^e	28973,77	14737,63	122653,39	20180,96	126376,75	8975,70^{ab}	25697,29	0,136
Ellag	36,49	84,11	26,87	77,12	36,47	80,71	38,60	85,72	32,62	84,13	0,521
Hydroxyzimtsäuren:											
Kaff	461,96	301,08	451,50	313,49	472,14	366,94	522,75	372,03	518,47	327,44	0,530
Cum	277,51	523,41	282,77	763,76	383,95	868,52	663,35	1579,83	328,88	676,96	0,514
Fer	177,22^{cde}	555,07	193,64^{cd}	307,01	374,53^{ab}	649,74	280,83^{ab}	403,06	267,54^a	350,88	0,001

¹ Kruskal- Wallis – Test

a, b, c, d, e signifikant nach Mann-Whitney U-Test

4.3.4 Polyphenolkonzentrationen im Plasma nach Body-Mass-Index

Die Studienteilnehmer/innen wurden nach dem Body-Mass-Index eingeordnet in die Gruppen

Untergewicht	(Gruppe a)	–	BMI (kg/m ²)	< 18,5
Normalgewicht	(Gruppe b)	–	BMI (kg/m ²)	18,5 - 25
Übergewicht	(Gruppe c)	–	BMI (kg/m ²)	25 - 30
Adipositas	(Gruppe d)	–	BMI (kg/m ²)	> 30,0

Im gesamten (n = 568), nach Body-Mass-Index unterteilten Studienkollektiv (siehe Tabelle 32) gibt es signifikante Unterschiede der Plasmakonzentrationen nach Mann-Whitney ($p < 0,05$) bei den Catechinen, den Flavonolen und den Flavonen. Die Epigallocatechingallatkonzentration in der Gruppe der Übergewichtigen ist signifikant niedriger als in der Gruppe der Normalgewichtigen, aber auch niedriger als in der Gruppe der adipösen Studienteilnehmer, und die Epigallocatechingallatkonzentration der normalgewichtigen (74,46 nmol/l) und der adipösen Studienteilnehmer (74,31 nmol/l) sind sich sehr ähnlich. Die ermittelten Gehalte an Kämpferol sind bei den untergewichtigen Probanden niedriger als bei den normalgewichtigen und auch niedriger als bei den adipösen Testpersonen. Die untergewichtige Gruppe weist dabei im Mittel die niedrigste, die adipöse Gruppe die höchste Kämpferolkonzentration auf. Die Isorhametinkonzentration in der übergewichtigen Gruppe ist höher als in der Gruppe der Normalgewichtigen. Die Apigeninkonzentration der Normalgewichtigen ist höher als in der Gruppe der übergewichtigen und der adipösen Personen.

Im männlichen (n = 243), nach Body-Mass-Index unterteilten Studienkollektiv (siehe Tabelle 33) gibt es signifikante Unterschiede der Plasmakonzentrationen nach Mann-Whitney ($p < 0,05$). Die Epigallocatechingallatkonzentration der adipösen Gruppe ist signifikant höher als in der normalgewichtigen und der übergewichtigen Gruppe, und auch die Gentsinsäurekonzentration der adipösen Studienteilnehmer ist signifikant höher als in der übergewichtigen Gruppe.

Im weiblichen (n = 325), nach Body-Mass-Index unterteilten Studienkollektiv (siehe Tabelle 34) gibt es signifikante Unterschiede der Plasmakonzentrationen nach Mann-Whitney ($p < 0,05$). Die Galloocatechinkonzentration der normalgewichtigen Gruppe übersteigen die Werte der adipösen Studienmitwirkenden signifikant. Die Kämpferolkonzentration der untergewichtigen Studienteilnehmerinnen ist niedriger als bei allen anderen Gruppen. Die mittlere Apigeninkonzentration der Normalgewichtigen ist signifikant höher als in der Gruppe der fettsüchtigen Studienteilnehmer. Die Gentsinsäurekonzentration in der Gruppe der Normalgewichtigen ist allerdings niedriger als bei den Übergewichtigen und die Kaffesäurekonzentration der Übergewichtigen ist höher als in der die Gruppe der an Fettsucht erkrankten Studienteilnehmer.

Tab. 32: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma des gesamten Studienkollektives der BVS II- Studie (n = 568) unterteilt nach BMI-Gruppen unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Polyphenole	BMI – Gruppen								p-Wert ¹
	(a) Untergewicht (n = 7)		(b) Normalgewicht (n = 229)		(c) Übergewicht (n = 218)		(d) Adipositas (n = 114)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:									
GC	14,10	17,06	38,94	85,81	39,75	75,84	24,16	51,38	0,340
EGC	807,86	451,20	906,47	745,90	981,58	782,76	761,38	664,33	0,125
Cat	25,19	24,38	46,36	83,62	58,52	107,97	41,94	104,48	0,304
EGCG	44,22	60,15	74,46^c	148,85	61,47^{bd}	122,64	74,31^c	155,58	0,163
EC	44,96	93,18	36,23	97,97	33,58	95,42	33,33	94,09	0,764
Flavonole:									
Quer	95,78	55,06	79,30	71,44	84,91	73,40	76,91	66,40	0,444
Käm	8,79^{bd}	12,76	33,77^a	67,55	54,56	134,87	46,31^a	148,88	0,255
Isorh	13,28	15,05	11,00^c	15,08	18,46^b	33,83	13,10	19,97	0,149
Flavanone:									
Nar	43,50	41,28	37,68	66,09	41,31	76,54	37,72	67,75	0,505
Hesp	175,57	320,79	109,31	163,56	89,52	137,03	112,10	173,31	0,661
Flavone:									
Lut	241,62	416,79	155,28	319,78	174,68	401,92	156,06	306,87	0,652
Api	6,82	5,87	16,54^{cd}	41,71	13,91^b	33,89	8,26^b	17,88	0,015
Isoflavone:									
Dai	5,45	14,42	12,71	36,27	9,93	23,58	9,54	19,65	0,363
Gen	51,28	115,54	34,17	77,57	40,65	112,11	36,78	93,69	0,603
Hydroxybenzoesäuren:									
Proto	366,28	324,71	548,86	551,85	448,98	463,26	443,07	447,80	0,172
Genti	1622,33	1269,25	1568,45	1277,73	1777,13	1491,77	1713,29	1348,50	0,332
Van	143,20	126,03	221,70	404,16	206,74	430,92	219,50	362,51	0,391
Syr	1201,00	1384,93	1953,22	3245,86	2785,79	4855,20	2680,06	4879,57	0,944
Sal	322,15	252,28	3202,57	18998,41	14071,85	106955,64	3790,39	12611,63	0,544
Ellag	49,19	79,15	34,05	83,39	28,25	70,82	25,07	71,12	0,526
Hydroxymzimsäuren:									
Kaff	551,00	452,44	486,59	339,12	523,62	376,48	457,64	345,41	0,553
Cum	420,57	889,19	340,32	890,18	412,17	912,56	462,09	1199,77	0,271
Fer	232,99	255,97	279,45	496,35	220,70	371,20	205,51	369,03	0,889

¹ Kruskal- Wallis – Test

a, b, c, d signifikant nach Mann-Whitney U-Test

Tab. 33: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma der männlichen Studienteilnehmer (n = 243) unterteilt nach BMI-Gruppen unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Polyphenole	BMI – Gruppen								p-Wert ¹
	(a) Untergewicht (n = 1)		(b) Normalgewicht (n = 81)		(c) Übergewicht (n = 110)		(d) Adipositas (n = 51)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:									
GC	n.d.	-	43,51	107,42	34,70	55,95	20,66	24,38	0,531
EGC	1649,09	-	910,85	789,40	920,39	813,06	644,71	648,37	0,089
Cat	15,02	-	45,45	94,15	42,16	71,94	30,56	51,58	0,688
EGCG	70,83	-	52,17^d	113,58	41,71^d	83,76	67,00^{bc}	164,26	0,146
EC	2,39	-	34,86	111,95	37,05	119,96	39,14	112,46	0,540
Flavonole:									
Quer	n.d.	-	82,76	85,74	76,49	55,52	85,56	70,74	0,351
Käm	14,13	-	34,03	52,60	43,79	112,15	47,65	188,51	0,792
Isorh	2,29	-	12,08	15,70	19,31	31,73	14,56	22,49	0,347
Flavanone:									
Nar	14,62	-	32,27	77,49	36,14	72,28	33,29	67,40	0,919
Hesp	312,20	-	140,15	190,40	99,01	162,41	126,85	206,78	0,163
Flavone:									
Lut	39,25	-	115,82	221,31	142,27	349,14	151,73	275,34	0,524
Api	16,23	-	17,28	43,01	9,59	21,21	6,79	10,19	0,197
Isoflavone:									
Dai	n.d.	-	12,93	27,12	13,37	31,16	13,67	26,64	0,797
Gen	n.d.	-	29,14	71,05	39,09	116,29	27,64	76,09	0,434
Hydroxybenzoesäuren:									
Proto	301,69	-	529,88	605,95	452,58	491,66	457,68	457,03	0,943
Genti	544,99	-	1666,40	1476,64	1677,88^d	1550,79	2069,45^c	1683,73	0,081
Van	41,42	-	201,11	308,74	169,77	371,96	194,11	311,08	0,731
Syr	2402,86	-	2283,77	4106,43	2585,16	4520,14	3386,58	5672,12	0,828
Sal	n.d.	-	1715,95	8847,59	3010,81	12286,13	3181,74	9229,61	0,318
Ellag	n.d.	-	28,66	73,96	21,73	56,95	27,93	82,32	0,935
Hydroxyzimtsäuren:									
Kaff	158,16	-	518,65	356,47	510,13	373,61	512,22	413,60	0,535
Cum	15,79	-	252,32	506,01	472,87	992,52	387,66	1132,09	0,295
Fer	20,76	-	227,62	364,91	201,37	299,21	178,95	414,56	0,738

¹ Kruskal- Wallis – Test

a, b, c, d signifikant nach Mann-Whitney U-Test

Tab. 34: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma der weiblichen Studienteilnehmerinnen (n = 325) unterteilt nach BMI-Gruppen unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Polyphenole	BMI – Gruppen								p-Wert ¹
	(a) Untergewicht (n = 6)		(b) Normalgewicht (n = 148)		(c) Übergewicht (n = 108)		(d) Adipositas (n = 63)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:									
GC	16,45	17,40	36,44^d	71,58	44,90	91,77	26,99^b	65,68	0,208
EGC	667,66	281,38	904,08	723,74	1043,90	749,27	855,83	667,15	0,304
Cat	26,89	26,25	46,85	77,59	75,19	133,47	51,15	132,50	0,344
EGCG	39,79	64,63	86,66	164,08	81,61	150,15	80,22	149,27	0,847
EC	52,06	99,98	36,98	89,80	30,04	61,49	28,63	76,73	0,976
Flavonole:									
Quer	111,74	38,71	77,40	62,49	93,49	87,40	69,91	62,36	0,084
Käm	7,90^{bcd}	13,74	33,63^a	74,64	65,52^a	154,39	45,23^a	108,34	0,139
Isorh	15,11	15,61	10,41	14,75	17,59	35,97	11,92	17,77	0,405
Flavanone:									
Nar	48,31	43,02	40,64	59,01	46,58	80,65	41,31	68,36	0,545
Hesp	152,80	345,15	92,43	144,75	79,85	104,99	100,16	141,20	0,945
Flavone:									
Lut	275,35	445,99	176,87	361,42	207,69	448,61	159,56	332,37	0,803
Api	5,26	4,55	16,14^d	41,12	18,31	42,80	9,46^b	22,26	0,053
Isoflavone:									
Dai	6,36	15,57	12,59	40,51	6,43	10,68	6,19	10,30	0,342
Gen	59,83	124,12	36,91	81,01	42,23	108,19	44,18	105,85	0,985
Hydroxybenzoesäuren:									
Proto	377,05	354,33	559,25	521,74	445,32	434,70	431,25	443,51	0,135
Genti	1801,89	1289,33	1514,85^c	1156,44	1878,21^b	1429,27	1424,96	916,07	0,067
Van	160,17	129,01	232,97	448,47	244,39	482,51	240,06	400,64	0,415
Syr	1000,69	1401,64	1772,31	2659,09	2990,13	5187,45	2108,12	4087,43	0,599
Sal	375,84	228,38	4016,19	22701,08	25337,72	150970,53	4283,10	14853,89	0,608
Ellag	57,39	83,38	36,99	88,23	34,89	82,34	22,75	61,16	0,294
Hydroxyzimtsäuren:									
Kaff	616,47	457,86	469,04	329,14	537,36^d	380,62	413,46^c	273,96	0,220
Cum	488,03	954,23	388,49	1040,72	350,35	823,25	522,34	1257,64	0,725
Fer	268,36	260,99	307,82	554,40	240,39	432,97	227,01	329,49	0,845

¹ Kruskal- Wallis – Test

a, b, c, d signifikant nach Mann-Whitney U-Test

4.3.5 Polyphenolkonzentrationen im Plasma nach Waist-to-Hip-Ratio

Unterteilt nach ihrer Waist-to-Hip-Ratio unterscheiden sich die Plasmakonzentrationen des männlichen Teilkollektives (n = 242) für Hesperetin und Genistein nach Mann-Whitney auf signifikantem Niveau ($p < 0,05$), wobei in beiden Fällen die Gruppe mit niedriger Waist-to-Hip-Ratio die höheren Plasmakonzentrationen aufweist (siehe Tabelle 35). Bei den Frauen zeigt die Gruppe mit der höheren Waist-to-Hip-Ratio für Isorhamnetin signifikant höhere Werte als die Vergleichsgruppe (siehe Tabelle 36).

Tab. 35: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma der männlichen Studienteilnehmer (n = 242) unterteilt nach WHR-Gruppen unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Polyphenole	WHR – Gruppen				p-Wert*
	< 1,0 (n = 203)		≥ 1,0 (n = 39)		
	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:					
GC	36,59	79,37	24,82	29,58	0,668
EGC	885,42	792,98	694,69	625,15	0,211
Cat	39,22	76,99	43,82	69,44	0,977
EGCG	47,86	113,13	65,53	122,80	0,352
EC	40,23	124,09	18,52	45,56	0,069
Flavonole:					
Quer	81,57	73,19	74,94	49,81	0,901
Käm	38,89	109,46	53,82	158,01	0,107
Isorh	15,24	23,41	19,24	34,84	0,374
Flavanone:					
Nar	35,45	77,33	28,37	42,08	0,902
Hesp	129,60*	181,53	67,10*	181,32	0,004
Flavone:					
Lut	132,95	304,29	146,31	248,40	0,268
Api	12,20	31,36	7,58	12,45	0,466
Isoflavone:					
Dai	12,87	29,02	15,46	28,01	0,989
Gen	33,94*	99,39	30,26*	68,55	0,047
Hydroxybenzoesäuren:					
Proto	486,97	540,11	416,72	424,21	0,517
Genti	1700,93	1565,49	2007,81	1520,93	0,174
Van	185,51	342,88	184,65	318,23	0,442
Syr	2649,18	4731,50	2703,75	4290,43	0,844
Sal	1981,59	8083,45	5883,37	18764,71	0,750
Ellag	24,59	70,31	29,34	59,20	0,269
Hydroxymzimtsäuren:					
Kaff	510,01	378,90	512,78	360,14	0,705
Cum	323,02	789,25	683,66	1299,00	0,228
Fer	211,08	366,42	176,09	224,69	0,662

* signifikant nach Mann-Whitney U-Test

Tab. 36: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma der weiblichen Studienteilnehmerinnen (n = 318) unterteilt nach WHR-Gruppen unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Polyphenole	WHR – Gruppen				p-Wert*
	< 0,85 (n = 201)		≥ 0,85 (n = 117)		
	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:					
GC	36,75	75,42	38,49	82,81	0,146
EGC	970,75	742,50	879,39	683,79	0,394
Cat	51,87	85,86	67,08	144,96	0,194
EGCG	77,26	149,43	93,14	166,45	0,531
EC	33,77	82,59	33,70	74,34	0,900
Flavonole:					
Quer	82,24	71,22	82,53	74,56	0,829
Käm	48,86	128,43	41,09	85,59	0,664
Isorh	10,37*	14,57	18,35*	35,59	0,043
Flavanone:					
Nar	40,47	68,02	47,89	69,47	0,674
Hesp	93,04	144,36	88,95	128,93	0,630
Flavone:					
Lut	170,40	341,23	212,87	462,43	0,786
Api	15,11	37,62	16,19	40,92	0,371
Isoflavone:					
Dai	10,61	34,96	7,14	12,58	0,619
Gen	37,23	83,78	46,59	115,81	0,895
Hydroxybenzoesäuren:					
Proto	504,41	449,20	476,48	527,15	0,153
Genti	1620,37	1214,10	1622,74	1186,58	0,829
Van	228,63	423,25	261,10	494,93	0,069
Syr	2038,61	3272,26	2594,77	4918,97	0,378
Sal	9294,52	81836,23	14811,30	102494,90	0,384
Ellag	36,95	88,15	30,15	71,08	0,329
Hydroxyzimtsäuren:					
Kaff	483,02	326,76	493,27	372,99	0,847
Cum	345,79	877,21	518,35	1241,48	0,678
Fer	290,96	544,02	243,78	335,10	0,490

* signifikant nach Mann-Whitney U-Test

4.3.6 Polyphenolkonzentrationen im Plasma nach Rauchstatus

Im gesamten ($n = 568$), nach Rauchstatus unterteilten Studienkollektiv (siehe Tabelle 37) gibt es signifikante Unterschiede der Plasmakonzentrationen nach Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Die Gallocatechinkonzentration im Plasma der ehemaligen Raucher ist höher als bei den Rauchern. Im Plasma der Nichtraucher wurden noch höhere Konzentrationen an Gallocatechin gefunden, jedoch nicht auf statistisch signifikantem Niveau. Die Catechinkonzentration der Nichtraucher ist höher als bei den ehemaligen Rauchern und den Rauchern, wobei für die Raucher die niedrigsten Plasma-Catechinkonzentrationen nachgewiesen werden konnten.

Bei den Flavanonen liegt die mittlere Hesperetinkonzentration der Nichtraucher über denen der ehemaligen Raucher. Im Plasma der Raucher wurden noch niedrigere Konzentrationen an Hesperetin gefunden, jedoch nicht auf statistisch signifikantem Niveau. Die Luteolinkonzentration der Raucher ist höher als die Luteolinkonzentration der ehemaligen Raucher, zu den Nichtrauchern besteht jedoch kein signifikanter Zusammenhang. Der Gehalt an Salicylsäure im Plasma der Nichtraucher ist signifikant höher als der Gehalt an Salicylsäure im Plasma der Raucher. Der Gehalt an Ellagsäure im Plasma der ehemaligen Raucher ist signifikant niedriger als der Gehalt an Ellagsäure bei Rauchern und Nichtrauchern.

Im männlichen ($n = 243$), nach Rauchstatus unterteilten Studienkollektiv (siehe Tabelle 38) gibt es einen signifikanten Unterschied der Plasmakonzentrationen nach Mann-Whitney ($p < 0,05$). Die mittlere Plasma-Luteolinkonzentration der Raucher liegt über derjenigen der Nichtraucher und der ehemaligen Raucher.

Im weiblichen ($n = 325$), nach Rauchstatus unterteilten Studienkollektiv (siehe Tabelle 39) gibt es signifikante Unterschiede der Plasmakonzentrationen nach Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Der Gehalt an Epigallocatechin im Plasma der Nichtraucher ist höher als im Plasma der ehemaligen Raucher. Die Catechinkonzentration im Plasma der ehemaligen Raucher ist höher als im Plasma der Nichtraucher und bei den Rauchern ist die Quercetinkonzentration höher, als bei den Nichtrauchern.

Hesperetin zeigt auch einen signifikanten Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern, hier ist jedoch die Hesperetinkonzentration in der Gruppe der Nichtraucher doppelt so groß wie bei den Rauchern.

Tab. 37: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma des gesamten Studienkollektives der BVS II-Studie (n = 568) unterteilt nach Rauchstatus unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Polyphenole	Rauchstatus						p-Wert ¹
	(a) Nichtraucher (n=294)		(b) Ex – Raucher (n=133)		(c) Raucher (n=140)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:							
GC	37,30	83,99	35,21^c	82,18	34,20^b	45,72	0,063
EGC	954,69	774,72	831,84	697,83	873,42	723,00	0,317
Cat	55,25^{bc}	101,91	46,39^a	100,27	42,26^a	84,82	0,022
EGCG	71,39	140,17	62,49	139,35	70,96	141,08	0,443
EC	34,36	92,90	30,55	78,42	39,76	116,01	0,414
Flavonole:							
Quer	77,29	67,70	84,22	80,09	86,47	68,76	0,407
Käm	44,64	101,91	38,00	90,60	48,46	156,73	0,973
Isorh	12,86	19,98	15,18	25,80	16,59	32,49	0,422
Flavanone:							
Nar	38,39	67,16	37,17	71,87	42,76	75,48	0,205
Hesp	119,14^b	171,78	92,88^a	156,54	79,84	126,50	0,057
Flavone:							
Lut	168,80	360,48	140,89^c	371,18	176,65^b	314,69	0,052
Api	13,41	29,55	14,06	38,87	14,27	40,87	0,352
Isoflavone:							
Dai	11,03	25,10	13,21	41,12	8,58	20,34	0,175
Gen	39,27	97,59	40,33	113,23	30,92	70,18	0,469
Hydroxybenzoesäuren:							
Proto	494,10	467,36	447,38	471,85	513,38	580,66	0,618
Genti	1695,39	1335,25	1721,59	1616,38	1599,24	1219,73	0,668
Van	218,42	422,41	187,72	306,57	232,06	446,55	0,797
Syr	2468,59	4475,77	2677,46	4271,40	2044,24	3798,63	0,791
Sal	3565,43^c	16767,99	20477,90	135815,3	3309,67^a	19252,87	0,115
Ellag	33,22^b	80,79	19,71^{ac}	56,32	33,88^b	82,33	0,066
Hydroxyzimtsäuren:							
Kaff	478,75	344,95	488,87	318,60	540,02	409,96	0,373
Cum	383,53	990,49	446,18	975,96	366,25	914,43	0,392
Fer	208,13	373,40	215,77	337,80	337,27	567,57	0,226

¹ Kruskal- Wallis – Test

a, b, c signifikant nach Mann-Whitney U-Test

Tab. 38: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma der männlichen Studienteilnehmer (n = 243) unterteilt nach Rauchstatus unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Polyphenole	Rauchstatus						p-Wert ¹
	(a) Nichtraucher (n=98)		(b) Ex – Raucher (n= 72)		(c) Raucher (n = 73)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:							
GC	44,00	101,90	23,29	42,30	32,96	47,01	0,188
EGC	882,17	843,94	865,83	690,20	832,32	777,37	0,742
Cat	50,36	93,40	35,36	61,71	33,03	62,60	0,692
EGCG	45,68	102,07	53,54	137,15	54,39	106,62	0,459
EC	28,40	98,86	29,23	88,03	54,92	152,39	0,409
Flavonole:							
Quer	85,46	78,47	74,85	58,41	78,30	68,69	0,722
Käm	46,70	116,46	31,96	57,88	43,00	158,72	0,912
Isorh	15,32	24,47	17,10	30,04	15,27	22,10	0,849
Flavanone:							
Nar	35,86	83,25	26,66	39,43	39,28	82,43	0,218
Hesp	134,83	192,26	115,63	193,32	102,56	155,88	0,592
Flavone:							
Lut	137,02^c	347,21	111,77^c	248,64	155,24^{ab}	260,94	0,024
Api	11,60	21,93	14,58	45,10	8,64	14,02	0,781
Isoflavone:							
Dai	16,68	38,09	12,43	22,09	9,39	17,76	0,399
Gen	34,58	107,87	36,37	101,88	28,26	65,32	0,927
Hydroxybenzoesäuren:							
Proto	488,07	531,14	412,71	501,36	531,52	537,11	0,283
Genti	1874,37	1646,58	1730,45	1632,42	1607,55	1348,39	0,504
Van	147,13	209,32	173,66	298,03	246,35	480,67	0,238
Syr	3353,18	5527,61	2312,66	3956,31	2045,87	3846,70	0,232
Sal	2619,80	9957,25	4395,90	15213,94	811,02	2798,60	0,254
Ellag	31,34	86,32	11,71	31,78	30,44	66,67	0,301
Hydroxyzimtsäuren:							
Kaff	488,79	339,65	482,54	327,20	572,08	454,80	0,777
Cum	325,29	804,20	526,84	1158,41	307,24	688,23	0,328
Fer	149,80	253,88	184,02	255,13	298,70	489,76	0,170

1 Kruskal- Wallis – Test

a, b, c signifikant nach Mann-Whitney U-Test

Tab. 39: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma der weiblichen Studienteilnehmerinnen (n = 324) unterteilt nach Rauchstatus unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Polyphenole	Rauchstatus						p-Wert ¹
	(a) Nichtraucher (n = 196)		(b) Ex – Raucher (n = 61)		(c) Raucher (n = 67)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:							
GC	33,95	73,49	49,28	111,21	35,55	44,59	0,198
EGC	990,95^b	737,28	791,73^a	710,35	918,22	661,61	0,091
Cat	57,70^b	106,06	59,41^a	131,51	52,33	103,35	0,039
EGCG	84,24	154,41	73,06	142,32	89,01	169,95	0,828
EC	37,34	89,89	32,10	65,99	23,24	49,79	0,804
Flavonole:							
Quer	73,21^c	61,43	95,28	99,23	95,36^a	68,23	0,050
Käm	43,61	94,11	45,13	118,32	54,42	155,50	0,917
Isorh	11,64	17,24	12,90	19,67	18,04	41,06	0,382
Flavanone:							
Nar	39,66	57,66	49,57	96,11	46,55	67,50	0,378
Hesp	111,29^c	160,51	66,02	91,26	55,09^a	77,47	0,040
Flavone:							
Lut	184,68	366,77	175,26	477,21	199,98	364,99	0,643
Api	14,32	32,72	13,45	30,27	20,39	56,83	0,570
Isoflavone:							
Dai	8,21	14,19	14,12	56,04	7,71	22,93	0,268
Gen	41,61	92,23	45,00	126,04	33,81	75,52	0,558
Hydroxybenzoesäuren:							
Proto	497,12	433,39	488,31	435,00	493,62	628,19	0,298
Genti	1605,90	1142,85	1711,12	1610,70	1590,20	1072,24	0,989
Van	254,06	492,42	204,32	318,02	216,49	409,19	0,839
Syr	2026,29	3783,05	3108,04	4611,78	2042,47	3774,56	0,152
Sal	4038,24	19299,63	39459,92	199073,3	6032,08	27526,10	0,141
Ellag	34,15	78,10	29,16	74,94	37,63	96,96	0,284
Hydroxymizimtsäuren:							
Kaff	473,73	348,33	496,33	310,68	505,09	354,88	0,288
Cum	412,65	1072,32	350,99	700,39	430,54	1111,87	0,727
Fer	237,29	418,18	253,26	413,98	379,30	642,91	0,446

1 Kruskal- Wallis – Test

a, b, c signifikant nach Mann-Whitney U-Test

4.3.7 Polyphenolkonzentrationen im Plasma nach Schichtzugehörigkeit

Der sozio-ökonomische Status der Probanden wurde, basierend auf der Ausprägung dreier Charakteristika, in Gruppen eingeteilt (Unterschicht, untere Mittelschicht, Mittelschicht, obere Mittelschicht, Oberschicht). Diese umfassten den Bildungsgrad, die gesellschaftliche Stellung der Studienteilnehmer sowie das Haushalts-Nettoeinkommen (Winkler und Stolzenberg, 1999). Im gesamten ($n = 568$), nach Schichtzugehörigkeit unterteilten Studienkollektiv (siehe Tabelle 40) sind die Gehalte an Gallocatechin im Plasma der Studienteilnehmer aus der Unterschicht signifikant niedriger als bei der Mittelschicht und der oberen Mittelschicht (nach Mann-Whitney, $p < 0,05$). Die Epigallocatechinkonzentration im Plasma der unteren Mittelschicht ist im Mittel niedriger als bei Probanden aus der Oberschicht. Die Gehalte an Kämpferol hingegen sind im Plasma aus der Oberschicht niedriger als bei der oberen Mittelschicht. Die Plasma-Naringeninkonzentration in der Gruppe der Mittelschicht ist signifikant höher als dessen Gehalte bei den Probanden aus der Unterschicht, der unteren Mittelschicht und der Oberschicht. Die mittlere Plasma-Gentisinsäurekonzentration aus der oberen Mittelschicht ist niedriger als bei der unteren Mittelschicht und die Ellagsäurekonzentration ist bei der oberen Mittelschicht höher als bei der Mittelschicht und bei der unteren Mittelschicht.

Im männlichen ($n = 243$), nach Schichtzugehörigkeit unterteilten Studienkollektiv (siehe Tabelle 41) gibt es signifikante Unterschiede der Plasmakonzentrationen nach Mann-Whitney ($p < 0,05$). Die mittlere Konzentration an Gallocatechin im Plasma der Unterschicht ist höher als bei der Mittelschicht. Der Kämpferolgehalt im Plasma der oberen Mittelschicht ist signifikant höher als bei der Unterschicht, der Mittelschicht und der Oberschicht. Der Gehalt an Naringenin im Plasma der Unterschicht ist niedriger als die Naringeninkonzentration bei der Mittelschicht und der oberen Mittelschicht. Die Mittelschicht weist jedoch eine niedrigere Plasma-Naringeninkonzentrationen auf als die untere Mittelschicht und die Oberschicht wiederum hat eine niedrigere Plasmakonzentrationen als die Mittelschicht und die obere Mittelschicht. Die Hesperetinkonzentration der Oberschicht ist höher als bei der Unterschicht. Die Hesperetinkonzentration der unteren Mittelschicht ist niedriger als bei der Mittelschicht und der Oberschicht. Die Daidzeinkonzentration im Plasma der Unterschicht ist höher als im Plasma der oberen Mittelschicht. Die Daidzeingehalte in der unteren Mittelschicht und der oberen Mittelschicht liegen unterhalb von dem in der Oberschicht. Im Plasma der unteren Mittelschicht konnte mehr Gentisinsäure nachgewiesen werden als bei der Mittelschicht und der oberen Mittelschicht. Der Syringasäuregehalt im Plasma der unteren Mittelschicht liegt über dem bei der Unterschicht.

Im weiblichen ($n = 325$), nach Schichtzugehörigkeit unterteilten Studienkollektiv (siehe Tabelle 42) gibt es signifikante Unterschiede der Plasmakonzentrationen nach Mann-Whitney ($p < 0,05$). Die Plasma-Epigallocatechinkonzentration der unteren Mittelschicht ist niedriger als bei der Mittelschicht und der Oberschicht. Die Oberschicht weist dabei die höchste Plasma-Epigallocatechinkonzentration auf (1055,96 nmol/l). Die Genisteinkonzentration im Plasma der unteren Mittelschicht liegt unter den Plasmakonzentrationen der oberen Mittelschicht sowie der Oberschicht. Die obere Mittelschicht weist dabei die höchste Plasma-Genisteinkonzentration auf (53,54 nmol/l). Die Plasma-Gentisinsäurekonzentration in der Unterschicht ist niedriger als in der oberen Mittelschicht und die Ellagsäurekonzentrationen in der unteren Mittelschicht ist niedriger als in der oberen Mittelschicht. Die Ferulasäurekonzentration im Plasma der Mittelschicht ist niedriger als die Konzentrationen bei der Oberschicht.

Tab. 40: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma des gesamten Studienkollektives (n = 568) unterteilt nach Schichtzugehörigkeit unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Polyphenole	Schichtzugehörigkeit										p-Wert ¹
	(a) Unterschicht (n = 79)		(b) Untere Mittelschicht (n = 137)		(c) Mittelschicht (n = 177)		(d) Obere Mittelschicht (n = 120)		(e) Oberschicht (n = 55)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:											
GC	37,19^{cd}	101,17	32,02	68,53	39,42^a	74,74	39,61^a	77,49	25,13	43,94	0,076
EGC	952,64	805,54	770,63^e	623,59	932,18	777,01	948,31	794,76	988,95^b	697,63	0,344
Cat	60,09	121,39	43,07	69,45	53,37	112,25	49,04	90,44	42,75	83,38	0,677
EGCG	62,05	126,16	72,76	151,33	61,52	137,29	69,96	125,78	92,35	166,55	0,832
EC	19,51	42,21	44,80	128,24	34,89	89,73	37,28	101,89	25,53	53,24	0,888
Flavonole:											
Quer	76,03	66,99	78,34	74,90	86,64	76,78	83,88	66,59	72,14	55,21	0,568
Käm	35,93	55,83	47,37	139,90	42,48	110,25	53,71^e	137,57	30,45^d	64,62	0,176
Isorh	12,11	16,08	15,00	22,80	13,86	25,55	17,29	33,57	10,74	14,24	0,853
Flavanone:											
Nar	30,06^c	55,46	34,96^c	76,42	49,72^{abe}	84,00	40,81	59,48	25,05^c	33,61	0,021
Hesp	100,70	145,65	94,01	163,03	110,33	166,95	97,46	145,69	118,13	169,01	0,460
Flavone:											
Lut	139,12	295,62	112,64	214,29	194,89	452,07	205,47	381,28	137,19	235,28	0,816
Api	13,04	26,20	15,16	42,83	14,39	34,19	14,41	37,35	7,77	13,95	0,435
Isoflavone:											
Dai	11,99	20,28	8,22	15,99	11,66	40,31	9,81	22,66	16,12	30,48	0,441
Gen	31,45	85,32	26,56	70,03	45,06	116,49	40,61	90,73	41,17	100,27	0,851
Hydroxybenzoesäuren:											
Proto	491,46	556,84	440,00	430,44	502,13	490,55	537,45	574,87	439,38	407,69	0,671
Genti	1903,03	1737,95	1883,23^d	1590,93	1599,65	1283,85	1445,28^b	962,46	1606,30	1198,45	0,178
Van	200,07	320,81	167,85	259,45	278,10	580,91	223,80	333,54	126,96	153,46	0,377
Syr	2544,91	4383,47	2588,55	4694,40	2270,99	3712,16	2358,31	4588,40	2325,12	4037,26	0,877
Sal	3026,15	9074,48	3425,91	17523,31	14950,99	117923,	5094,97	20195,72	4895,87	26977,10	0,672
Ellag	26,91	69,66	30,18^d	84,92	26,68^d	75,83	41,31^{bc}	80,14	22,14	50,14	0,116
Hydroxizimtsäuren:											
Kaff	491,53	352,23	490,27	359,22	507,79	367,20	472,21	288,49	528,41	452,25	0,996
Cum	248,69	480,95	446,98	1064,07	322,48	760,67	521,81	1293,99	415,07	981,17	0,938
Fer	187,16	249,01	245,94	466,55	239,99	404,88	271,56	519,67	247,67	350,92	0,910

1 Kruskal- Wallis – Test

a, b, c, d, e signifikant nach Mann-Whitney U-Test

Tab. 41: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma der männlichen Studienteilnehmer (n = 243) unterteilt nach Schichtzugehörigkeit unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Polyphenole	Schichtzugehörigkeit										p-Wert ¹
	(a)Unterschicht (n = 32)		(b)Untere Mittelschicht (n = 58)		(c)Mittelschicht (n = 74)		(d)Obere Mittelschicht (n = 47)		(e)Oberschicht (n = 32)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:											
GC	40,24^c	117,54	34,81	78,29	33,22^a	62,69	34,20	57,39	31,97	55,11	0,401
EGC	901,97	918,99	849,64	732,20	793,31	730,12	906,37	874,72	940,80	695,00	0,814
Cat	30,60	47,18	49,66	81,90	40,11	77,35	35,60	75,36	43,48	90,76	0,708
EGCG	25,02	65,54	76,98	167,01	43,09	102,05	41,71	71,73	58,97	110,35	0,862
EC	15,90	40,18	51,96	148,15	36,79	112,88	41,31	136,29	22,22	52,26	0,955
Flavonole:											
Quer	67,58	63,14	90,55	91,59	82,91	66,96	74,25	52,33	76,29	60,97	0,681
Käm	24,94^d	35,69	54,68	181,59	25,72^d	42,07	60,62^{ace}	151,96	40,48^d	82,62	0,033
Isorh	14,58	16,05	18,81	28,28	18,12	34,56	13,50	15,12	9,82	11,16	0,700
Flavanone:											
Nar	13,73^{cd}	23,56	43,57^c	106,52	42,85^{abe}	75,46	35,47^{ae}	55,93	15,55^{cd}	25,01	0,004
Hesp	86,96^e	142,10	99,78^{ce}	184,36	136,94^b	192,84	112,92	173,24	156,72^{ab}	200,80	0,068
Flavone:											
Lut	141,31	304,97	137,99	267,91	150,20	379,96	117,98	197,92	113,22	233,64	0,546
Api	13,21	23,15	9,55	14,15	12,14	28,81	14,20	48,82	8,60	15,32	0,796
Isoflavone:											
Dai	17,53^d	26,77	10,37^e	21,41	14,31	36,15	6,03^{ae}	11,67	22,20^{bd}	37,75	0,034
Gen	29,69	87,76	35,49	90,98	37,74	110,88	20,53	48,92	40,78	119,90	0,473
Hydroxybenzoesäuren:											
Proto	555,56	699,39	430,03	449,10	501,23	481,44	532,03	634,50	360,34	334,26	0,676
Genti	1883,95	2308,78	2228,88^{cd}	1761,34	1545,19^b	1369,49	1563,57^b	1128,06	1507,46	952,08	0,090
Van	207,27	344,16	175,79	250,39	217,49	490,77	180,95	215,49	108,69	108,62	0,812
Syr	2251,44^b	3870,00	3155,06^a	5007,55	2347,16	4369,65	3055,61	5491,87	2254,00	4054,22	0,211
Sal	2358,39	8589,03	3842,62	11929,65	2532,84	12731,42	2341,59	9356,32	1144,53	4614,10	0,506
Ellag	10,11	28,87	35,97	100,35	19,99	44,71	38,39	82,72	13,84	37,85	0,468
Hydroxyzimtsäuren:											
Kaff	508,37	382,95	517,44	374,73	495,10	347,35	501,45	330,90	560,04	494,02	0,988
Cum	261,85	547,97	564,79	1203,35	321,63	858,98	325,54	656,50	375,04	915,64	0,776
Fer	165,99	231,71	250,85	479,70	213,24	368,37	196,05	265,61	152,51	171,83	0,969

¹ Kruskal- Wallis – Test

a, b, c, d, e signifikant nach Mann-Whitney U-Test

Tab. 42: Polyphenolkonzentration (nmol/l) im Plasma der weiblichen Studienteilnehmerinnen (n = 325) unterteilt nach Schichtzugehörigkeit unter Angabe von Mittelwert (Mean) und Standardabweichung (SD)

Polyphenole	Schichtzugehörigkeit										p-Wert ¹
	(a)Unterschicht (n=47)		(b)Untere Mittelschicht (n=79)		(c)Mittelschicht (n=103)		(d)Obere Mittelschicht (n=73)		(e)Oberschicht (n=23)		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Flavan-3-ole:											
GC	35,11	89,62	29,97	60,83	43,88	82,32	43,09	88,26	15,61	17,26	0,227
EGC	987,14	726,74	712,63^{ce}	527,45	1031,95^b	797,61	975,31	743,80	1055,96^b	711,29	0,121
Cat	80,16	149,89	38,23	58,74	62,90	131,30	57,70	98,47	41,73	73,87	0,603
EGCG	87,26	149,97	69,67	139,73	74,76	156,99	88,14	148,35	138,79	216,92	0,430
EC	21,96	43,80	39,55	112,10	33,52	69,05	34,69	72,62	30,13	55,41	0,815
Flavonole:											
Quer	81,78	69,57	69,38	58,81	89,32	83,34	90,08	74,02	66,36	46,73	0,374
Käm	43,42	65,46	42,01	99,79	54,52	139,13	49,26	128,36	16,50	16,72	0,641
Isorh	10,43	16,05	12,19	17,40	10,80	15,78	19,72	41,25	12,02	17,87	0,710
Flavanone:											
Nar	41,18	67,30	28,63	42,39	54,66	89,67	44,25	61,78	38,28	39,72	0,401
Hesp	110,06	148,81	89,78	146,50	91,21	143,51	87,51	125,11	64,44	90,08	0,907
Flavone:											
Lut	137,63	292,41	94,03	163,67	227,00	496,82	261,79	455,00	170,54	238,67	0,446
Api	12,93	28,33	19,27	54,88	16,01	37,64	14,55	27,99	6,63	12,01	0,200
Isoflavone:											
Dai	8,22	13,36	6,64	10,23	9,76	43,12	12,25	27,33	7,67	12,00	0,520
Gen	32,65	84,55	20,01^{de}	49,00	50,33	120,62	53,54^b	107,91	41,71^b	66,47	0,110
Hydroxybenzoesäuren:											
Proto	447,82	437,40	447,31	418,95	502,78	499,33	540,94	537,54	549,34	478,34	0,673
Genti	1916,02^d	1236,51	1629,46	1411,37	1638,78	1223,96	1369,12^a	838,44	1743,80	1488,01	0,180
Van	195,17	307,63	162,02	267,34	321,64	636,64	251,39	390,18	152,39	200,04	0,614
Syr	2744,73	4731,57	2172,63	4436,88	2216,26	3178,85	1909,36	3873,71	2424,07	4102,36	0,697
Sal	3480,79	9454,82	3119,97	20764,72	23872,77	153903,59	6867,69	24699,18	10115,13	41320,49	0,588
Ellag	38,35	85,65	25,93^d	71,91	31,48	91,85	43,18^b	78,95	33,68	62,56	0,098
Hydroxyzimtsäuren:											
Kaff	480,07	333,49	470,33	348,45	516,91	382,23	453,38	258,23	484,41	393,24	0,937
Cum	239,73	435,52	360,48	947,67	323,10	685,80	648,17	1565,48	470,77	1084,44	0,977
Fer	201,58	261,60	242,33	459,72	259,21^e	429,94	320,18	628,61	380,06^c	478,72	0,294

¹ Kruskal- Wallis – Test

a, b, c, d, e signifikant nach Mann-Whitney U-Test

4.3.8 Korrelation der Plasmakonzentrationen von Polyphenolen

Im Folgenden wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen den Plasmakonzentrationen der Flavonoide und Phenolsäuren zueinander besteht. Zu diesem Zweck wurden die jeweiligen Korrelationskoeffizienten nach Spearman errechnet (siehe Tabelle 43). Nachstehend werden nur die Polyphenole dargestellt, die signifikante Korrelationskoeffizienten aufweisen.

Flavan-3-ole

Catechin zeigt Zusammenhänge zu allen übrigen Catechinderivaten. Gallocatechin, Epigallocatechingallat und Epicatechin weisen signifikante Korrelationskoeffizienten zu allen Catechinderivaten außer zu Epigallocatechin auf. Zwischen Gallocatechin und Quercetin sowie Kämpferol bestehen positive Zusammenhänge, Epigallocatechin korreliert negativ mit Quercetin und Isorhamnetin. Für Catechin, Epigallocatechin und Epicatechin korrelieren positiv mit Kämpferol.

Zwischen Gallocatechin, Catechin, Epigallocatechingallat und Epicatechin gibt es Zusammenhänge zu den Flavanonen. Epigallocatechin korreliert mit Hesperetin. Gallocatechin, Catechin und Epigallocatechingallat korrelieren mit Luteolin, wohingegen Epigallocatechin zu Apigenin und Epicatechin zu beiden Flavonen Zusammenhänge aufweist. Für die Isoflavone konnten charakteristische Beziehungen von Gallocatechin, Catechin, Epigallocatechingallat und Epicatechin zu Genistein gefunden werden. Epigallocatechin und Daidzein zeigen keine Wechselwirkungen zu den Vertretern der jeweils anderen Gruppe.

Gallocatechin, Epigallocatechingallat und Epicatechin korrelieren mit allen untersuchten Hydroxybenzoesäuren, außer mit Syringasäure, welche zu gar keinem Vertreter der Flavan-3-ole signifikante Korrelationskoeffizienten aufweist. Catechin korreliert mit allen Hydroxybenzoesäuren außer mit Syringasäure und Salicylsäure. Epigallocatechin hingegen korreliert nur mit Protocatechusäure. Die Catechine zeigen jeweils positive Zusammenhänge zwischen Gallocatechin, Catechin, Epicatechin und den Hydroxyzimtsäuren p-Cumarsäure sowie Ferulasäure. Auch Epigallocatechingallat korreliert positiv mit diesen beiden Hydroxyzimtsäuren und zusätzlich dazu negativ mit Kaffeesäure. Epigallocatechin dagegen korreliert nur mit Kaffeesäure.

Flavonole

Alle ausgewählten Vertreter der Flavonole korrelieren miteinander. In Bezug auf die Flavanone zeigt nur Quercetin signifikante Korrelationskoeffizienten mit beiden Stellvertretern der Zitrusflavonoide. Kämpferol korreliert positiv mit Naringenin. Isorhamnetin hat zu Hesperetin

eine negative Beziehung. Alle untersuchten Flavonole korrelieren positiv mit Luteolin, nicht jedoch mit Apigenin. Alle drei Flavonole korrelieren mit Genistein, zu Daidzein zeigt jedoch nur Quercetin einen Zusammenhang. Quercetin und Kämpferol korrelieren positiv mit den Hydroxybenzoesäuren Gentisinsäure, Vanillinsäure und Ellagsäure, wohingegen Isorhamnetin zusätzlich dazu positiv mit Salicylsäure und negativ mit Protocatechusäure in Beziehung steht. Quercetin korreliert mit allen untersuchten Hydroxyzimtsäuren. Kämpferol und Isorhamnetin korrelieren mit p-Cumarsäure und Ferulasäure.

Flavanone

Die Plasmakonzentrationen von Naringenin und Hesperetin hängen erwartungsgemäß voneinander ab (0,284). Bezogen auf die Plasmakonzentrationen der Flavone zeigen nur Hesperetin und Luteolin keine signifikanten Korrelationskoeffizienten. Der einzige Zusammenhang zwischen Flavanonen und Isoflavonen besteht zwischen Naringenin und Genistein (0,406). Zwischen Naringenin und allen Hydroxybenzoesäuren, außer Syringasäure, konnten signifikante Korrelationskoeffizienten gefunden werden. Darüber hinaus besteht zwischen Hesperetin und Protocatechusäure, Gentisinsäure, Syringasäure sowie Ellagsäure jeweils ein Zusammenhang. Naringenin korrespondiert mit allen Hydroxyzimtsäuren. Zu Ferulasäure besteht ein vergleichsweise ausgeprägter Zusammenhang ($r = 0,531$, siehe Abbildung 27), während Hesperetin zu keinem Vertreter dieser Phenolsäureklasse auffällige Zusammenhänge zeigt.

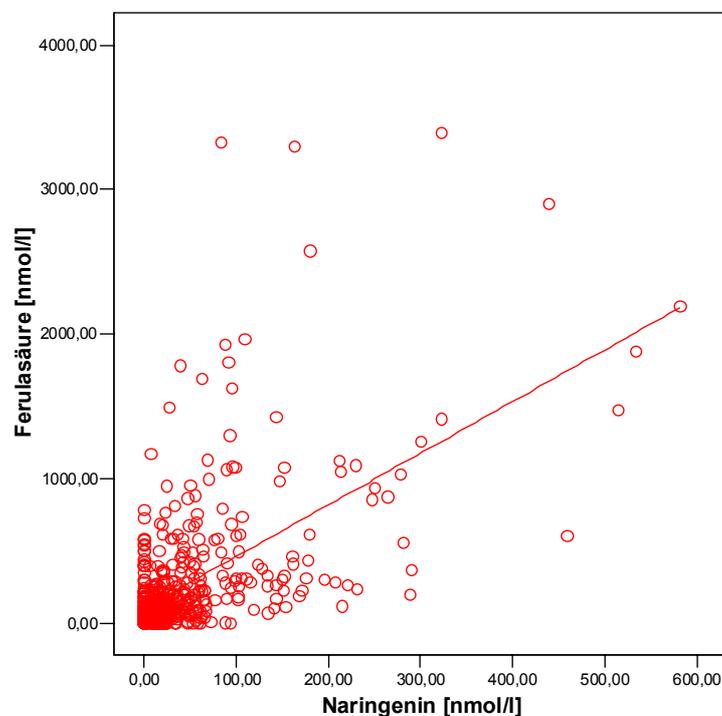


Abb. 27: Korrelation zwischen den Konzentrationen von Ferulasäure und Naringenin im Plasma des gesamten Studienkollektives

Flavone

Die Flavone Luteolin und Apigenin korrelieren nicht miteinander. Die Prüfung der Beziehung von Flavonen und Isoflavonen weist nur für Luteolin und Genistein einen signifikanten und vergleichsweise ausgeprägten Korrelationskoeffizienten auf (0,520).

Zwischen den Plasmakonzentrationen von Luteolin und Gentisinsäure, Vanillinsäure, Salicylsäure sowie Ellagsäure lässt sich ebenfalls ein Zusammenhang feststellen. Apigenin weist signifikante Korrelationskoeffizienten mit Protocatechusäure, Gentisinsäure und Ellagsäure auf. Luteolin zeigt zu jedem Vertreter der Klasse der Hydroxyzimtsäuren signifikante Korrelationskoeffizienten. Apigenin hingegen korreliert nur mit Ferulasäure auf signifikantem Niveau.

Isoflavone

Bei der Untersuchung der Isoflavone auf Korrelationen fällt besonders der Unterschied zwischen ihnen und den anderen Polyphenolen auf. Daidzein und Genistein weisen keine signifikanten Korrelationskoeffizienten zueinander auf. Daidzein zeigt nur mit Quercetin (siehe oben) und Gentisinsäure positive und mit Ellagsäure negative Korrelationskoeffizienten. Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Polyphenolen (siehe oben) korrespondiert Genistein aber mit allen Hydroxybenzoesäuren und mit allen Hydroxyzimtsäuren.

Hydroxybenzoesäuren

Die Beziehungen der Hydroxybenzoesäuren zueinander und zu den Hydroxyzimtsäuren sind sehr heterogen. Protocatechusäure zeigt mit Gentisinsäure und Ellagsäure signifikante Korrelationskoeffizienten. Gentisinsäure korrespondiert mit Vanillinsäure, Salicylsäure und Ellagsäure. Vanillinsäure steht mit Salicylsäure und Ellagsäure in Zusammenhang. Syringasäure zeigt weder mit Hydroxybenzoesäuren, noch mit Hydroxyzimtsäuren signifikante Korrelationskoeffizienten. Protocatechusäure und Gentisinsäure weisen mit Kaffeesäure und Ferulasäure signifikante Korrelationskoeffizienten auf. Vanillinsäure, Salicylsäure und Ellagsäure weisen mit allen Hydroxyzimtsäuren signifikante Korrelationskoeffizienten auf.

Hydroxyzimtsäuren

Ferulasäure weist mit Kaffeesäure und p-Cumarsäure signifikante Korrelationskoeffizienten auf. Zwischen Kaffeesäure und p-Cumarsäure besteht jedoch kein Zusammenhang.

Tab. 43: Spearman'sche Korrelationskoeffizienten der Polyphenolkonzentrationen im gesamten Studienkollektiv (n = 568)

	GC	EGC	Ca	EGCC	EC	Que	Kän	Isorl	Na	Hesj	Lu	Ap
GC		-0,01	0,19 *	0,21 *	0,23 *	0,21 *	0,10	0,00	0,35 *	0,18 *	0,18 *	0,02
EGC	-0,01		0,11 *	-0,00	0,05	-0,11 *	0,03	-0,11 *	0,04	0,16 *	-0,04	0,10
Cat	0,19 *	0,11 *		0,32 *	0,32 *	0,02	0,11 *	-0,05	0,24 *	0,22 *	0,22 *	0,06
EGCG	0,21 *	-0,00	0,32 *		0,48 *	0,06	0,19 *	0,01	0,38 *	0,16 *	0,37 *	0,07
EC	0,23 *	0,05	0,32 *	0,48 *		0,05	0,20 *	0,02	0,43 *	0,22 *	0,40 *	0,09
Que	0,21 *	-0,11 *	0,02	0,06	0,05		0,20 *	0,25 *	0,16 *	-0,09	0,18 *	-0,05
Käm	0,10	0,03	0,11 *	0,19 *	0,20 *	0,20 *		0,15 *	0,18 *	0,02	0,22 *	0,07
Isorh	0,00	-0,11 *	-0,05	0,01	0,02	0,25 *	0,15 *		0,03	-0,25 *	0,17 *	-0,03
Nar	0,35 *	0,04	0,24 *	0,38 *	0,43 *	0,16 *	0,18 *	0,03		0,28 *	0,36 *	0,17 *
Hesp	0,18 *	0,16 *	0,22 *	0,16 *	0,22 *	-0,09	0,02	-0,25 *	0,28 *		-0,02	0,12 *
Lut	0,18 *	-0,04	0,22 *	0,37 *	0,40 *	0,18 *	0,22 *	0,17 *	0,36 *	-0,02		0,05
Api	0,02	0,10	0,06	0,07	0,09	-0,05	0,07	-0,03	0,17 *	0,12 *	0,05	
Dai	-0,02	-0,04	-0,00	0,03	0,00	0,08	-0,05	0,06	-0,00	0,00	-0,05	0,05
Gen	0,20 *	-0,06	0,28 *	0,50 *	0,49 *	0,22 *	0,24 *	0,15 *	0,40 *	0,05	0,52 *	0,02
Proto	0,21 *	0,09	0,27 *	0,12 *	0,18 *	0,05	0,07	-0,08	0,25 *	0,35 *	0,07	0,09
Genti	0,12 *	0,05	0,12 *	0,13 *	0,14 *	0,18 *	0,14 *	0,12 *	0,17 *	0,18 *	0,12 *	0,09
Van	0,08	-0,02	0,09	0,08	0,12 *	0,10	0,10	0,14 *	0,21 *	-0,01	0,21 *	0,04
Syr	0,06	0,03	-0,00	0,05	-0,02	-0,01	0,02	-0,03	0,01	0,11 *	-0,05	-0,01
Sal	0,08	0,00	0,03	0,13 *	0,16 *	0,06	0,03	0,09	0,15 *	-0,02	0,14 *	0,01
Ellag	0,20 *	0,06	0,21 *	0,27 *	0,28 *	0,14 *	0,25 *	0,15 *	0,32 *	0,17 *	0,32 *	0,10
Kaff	0,06	0,13 *	-0,04	-0,24 *	-0,00	0,09	0,05	0,07	0,09	0,02	-0,08	0,03
Cum	0,12 *	-0,05	0,19 *	0,25 *	0,29 *	0,12 *	0,22 *	0,19 *	0,27 *	-0,07	0,39 *	0,03
Fer	0,33 *	0,02	0,18 *	0,38 *	0,41 *	0,18 *	0,10 *	0,11 *	0,53 *	0,07	0,30 *	0,10

* Korrelation ist signifikant mit $p < 0.05$ (2-seitig)** Korrelation ist signifikant mit $p < 0.01$ (2-seitig)

Fortsetzung Tabelle 43: Spearman'sche Korrelationskoeffizienten der Polyphenolkonzentrationen im gesamten Studienkollektiv (n = 568)

	Da	Gei	Proto	Gent	Vai	Syr	Sa	Ellag	Kaff	Cum	Fer
GC	-0,02	0,20 *	0,21 *	0,12 *	0,08	0,06	0,08	0,20 **	0,06	0,12 **	0,33 *
EGC	-0,04	-0,06	0,09	0,05	-0,02	0,03	0,00	0,06	0,13 *	-0,05	0,02
Cat	-0,00	0,28 *	0,27 *	0,12 *	0,09	-0,00	0,03	0,21 *	-0,04	0,19 *	0,18 *
EGCG	0,03	0,50 *	0,12 *	0,13 *	0,08	0,05	0,13 *	0,27 *	-0,24 *	0,25 *	0,38 *
EC	0,00	0,49 *	0,18 *	0,14 *	0,12 *	-0,02	0,16 *	0,28 *	-0,00	0,29 *	0,41 *
Que	0,08	0,22 *	0,05	0,18 *	0,10	-0,01	0,06	0,14 *	0,09	0,12 *	0,18 *
Käm	-0,05	0,24 *	0,07	0,14 *	0,10	0,02	0,03	0,25 *	0,05	0,22 *	0,10 *
Isorh	0,06	0,15 *	-0,08	0,12 *	0,14 *	-0,03	0,09	0,15 *	0,07	0,19 *	0,11 *
Nar	-0,00	0,40 *	0,25 *	0,17 *	0,21 *	0,01	0,15 *	0,32 *	0,09	0,27 *	0,53 *
Hesp	0,00	0,05	0,35 *	0,18 *	-0,01	0,11 *	-0,02	0,17 *	0,02	-0,07	0,07
Lut	-0,05	0,52 *	0,07	0,12 *	0,21 *	-0,05	0,14 *	0,32 *	-0,08	0,39 *	0,30 *
Api	0,05	0,02	0,09	0,09	0,04	-0,01	0,01	0,10	0,03	0,03	0,10
Dai		0,07	0,04	0,09	0,00	0,02	0,00	-0,10	0,06	-0,03	0,03
Gen	0,07		0,08	0,12 *	0,24 *	-0,09	0,15 *	0,28 *	-0,09	0,39 *	0,40 *
Proto	0,04	0,08		0,19 *	0,06	0,02	-0,00	0,18 *	0,23 *	0,01	0,15 *
Genti	0,09	0,12 *	0,19 *		0,19 *	0,06	0,13 *	0,14 *	0,21 *	0,05	0,27 *
Van	0,00	0,24 *	0,06	0,19 *		0,04	0,27 *	0,15 *	0,08	0,20 *	0,34 *
Syr	0,02	-0,09	0,02	0,06	0,04		0,01	0,02	0,05	-0,01	-0,02
Sal	0,00	0,15 *	-0,00	0,13 *	0,27 *	0,01		-0,00	0,14 *	0,14 *	0,38 *
Ellag	-0,10	0,28 *	0,18 *	0,14 *	0,15 *	0,02	-0,00		0,12 *	0,18 *	0,22 *
Kaff	0,06	-0,09	0,23 *	0,21 *	0,08	0,05	0,14 *	0,12 *		-0,01	0,26 *
Cum	-0,03	0,39 *	0,01	0,05	0,20 *	-0,01	0,14 *	0,18 *	-0,01		0,36 *
Fer	0,03	0,40 *	0,15 *	0,27 *	0,34 *	-0,02	0,38 *	0,22 *	0,26 *	0,36 *	

* Korrelation ist signifikant mit $p < 0.05$ (2-seitig)** Korrelation ist signifikant mit $p < 0.01$ (2-seitig)

4.3.9 Plasmakonzentrationen von Tocopherolen, Carotinoiden und Vitamin C sowie deren Korrelation mit den Plasmakonzentrationen der Polyphenole

In vielen epidemiologischen Arbeiten werden die vorbeugenden Effekte einer obst- und gemüsereichen Ernährung, besonders bezüglich Herz-Kreislaufkrankungen und Carzinombildung, positiv bewertet. Solche Schutzwirkungen sind aber nicht ausschließlich in den Auswirkungen von Einzelsubstanzen begründet. Daher im Folgenden geprüft, ob eine Beziehung zwischen den Antioxidantien aus der Gruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe im Blutplasma besteht. Zu diesem Zweck wurden die Korrelationskoeffizienten nach Spearman (siehe Tabelle 45) zwischen den Plasmakonzentrationen der Polyphenole (Tabellen 24 – 26) und den Plasmakonzentrationen der Tocopherole, Carotinoide und Vitamin C (Tabelle 44) im Plasma des Studienkollektives berechnet.

Tab. 44: Plasmakonzentration von Tocopherolen, Carotinoiden ($\mu\text{mol/l}$) unter Angabe von Mittelwert (Mean), Standardabweichung (SD) und Median

	gesamt (n=568)			männlich (n=243)			weiblich (n=325)		
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median
γ -Toco	1,22	0,66	1,09	1,16	0,65	1,01	1,26	0,67	1,18
α -Toco	30,38	9,98	29,27	31,55	10,65	30,29	29,51	9,37	28,45
Lutein	0,25	0,13	0,22	0,24	0,13	0,22	0,25	0,13	0,23
Cantha	0,07	0,06	0,06	0,08	0,06	0,07	0,06	0,06	0,05
Crypto	0,22	0,19	0,16	0,17	0,12	0,13	0,25	0,22	0,18
Lycopin	0,50	0,30	0,46	0,47	0,28	0,44	0,53	0,31	0,48
α -Caro	0,10	0,10	0,07	0,08	0,10	0,06	0,11	0,10	0,08
β -Caro	0,35	0,38	0,25	0,29	0,39	0,20	0,39	0,36	0,31
Vit. C	78,03	22,12	78,50	74,07	23,05	74,32	81,02	20,95	80,23

Vit. C: $n_g=551$, $n_m=237$, $n_w=314$)

Flavan-3-ole

In der Gruppe der Flavan-3-ole zeigen sich für Gallocatechin signifikante Korrelationskoeffizienten [r] bei γ -Tocopherol und α -Tocopherol (-0,124 und -0,124) sowie bei Cryptoxanthin (0,089) (Tabelle 45). Weitere signifikante Zusammenhänge zu γ -Tocopherol und α -Tocopherol konnten für Epigallocatechingallat (-0,150 und -0,129) und Epicatechin (-0,176 und -0,162) gefunden werden.

Flavonole

Quercetin ist mit γ -Tocopherol (-0,314, siehe Abbildung 28) und α -Tocopherol (0,099) korreliert. Kämpferol ist mit α -Tocopherol (-0,094) korreliert, und Isorhamnetin korreliert mit Cryptoxanthin (-0,114).

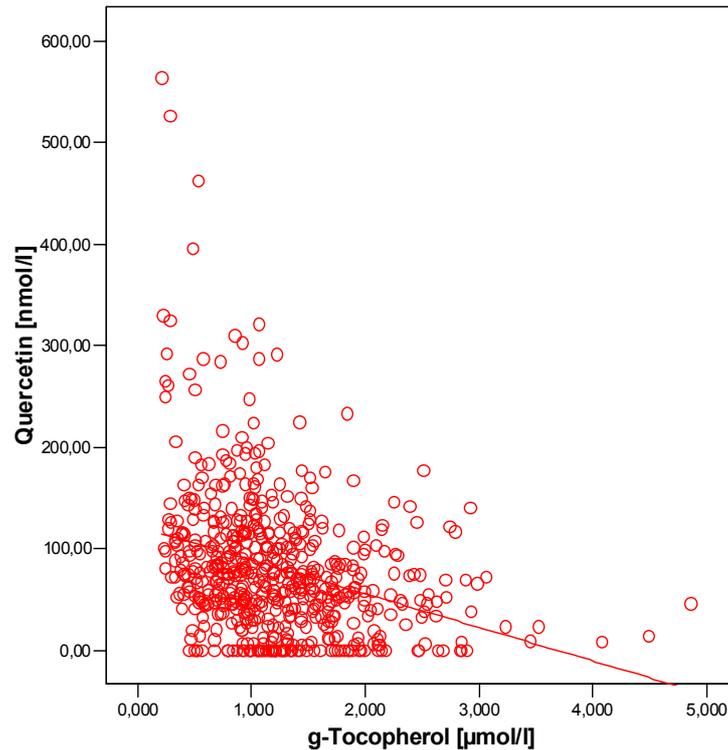


Abb. 28: Korrelation zwischen den Konzentrationen von Quercetin und γ -Tocopherol im Plasma des gesamten Studienkollektives

Flavanone

Naringenin korreliert mit γ -Tocopherol und α -Tocopherol (-0,192 und -0,125). Hesperetin hingegen korreliert mit Cryptoxanthin (0,184) und mit Vitamin C (0,103).

Flavone

Luteolin korreliert mit γ -Tocopherol und α -Tocopherol (-0,173 und -0,141). Apigenin hingegen korreliert mit Lutein (0,104), Cryptoxanthin (0,122) und α -Carotin (0,086)

Isoflavone

Daidzein korreliert positiv mit Canthaxanthin (0,127), mit Cryptoxanthin (0,099) und mit Vitamin C (0,138). Genistein korreliert mit α - und γ -Tocopherol (-0,179 und -0,142).

Hydroxybenzoesäuren

Vanillinsäure hat signifikante Korrelationskoeffizienten mit Cryptoxanthin (-0,084) und α -Carotin (-0,104). Syringasäure korreliert mit Canthaxanthin (0,089). Ellagsäure weist Zusammenhänge zu γ -Tocopherol und α -Tocopherol (-0,093 und -0,129) sowie zu α -Carotin und β -Carotin (0,130 und 0,122) auf.

Hydroxyzimtsäuren

Kaffeesäure korreliert sowohl mit α -Tocopherol (0,084) als auch mit Lutein (0,084). p-Cumarsäure weist mit γ -Tocopherol (-0,157) und Cryptoxanthin (-0,099) eine signifikant inverse Beziehung auf. Ferulasäure zeigt für die Beziehung zu α -Tocopherol (-0,140) einen signifikanten Zusammenhang.

Mit Ausnahme der Kaffeesäure korrelieren alle Polyphenole negativ mit den Tocopherolen. Cryptoxanthin zeigt signifikante Korrelationskoeffizienten mit jeweils einem Vertreter jeder Klasse der Polyphenole. Lycopin zeigt mit keinem der untersuchten Polyphenole signifikante Korrelationskoeffizienten. Analog dazu sind keine signifikanten Zusammenhänge für Epigallocatechin und Catechin (Flavan-3-ole) und für Protocatechusäure und Salicylsäure (Hydroxybenzoesäuren) zu finden.

Tab. 45: Spearman'sche Korrelationskoeffizienten zwischen den Polyphenolkonzentrationen [nmol/l] und den Tocopherol- [$\mu\text{mol/l}$], Carotinoid- [$\mu\text{mol/l}$], Vitamin C-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] im Plasma des gesamten Studienkollektives (n = 568)

	γ -Toco	α -Toco	Lutein	Cantha	Crypto	Lycopin	α -Caro	β -Caro	Vit. C
Flavan-3-ole:									
GC	-0,124**	-0,124**	0,028	0,078	0,089*	-0,022	0,002	0,050	0,038
EGC	0,074	-0,009	0,050	0,002	0,025	-0,045	0,028	0,061	-0,017
Cat	-0,010	-0,064	0,022	-0,015	0,037	-0,054	0,060	0,026	0,073
EGCG	-0,150**	-0,129**	-0,044	-0,041	-0,015	-0,015	0,010	0,017	0,028
EC	-0,176**	-0,162**	-0,059	-0,046	0,039	-0,050	0,009	-0,007	0,023
Flavonole:									
Que	-0,314**	-0,099*	0,000	0,022	-0,034	0,009	0,018	0,020	0,057
Käm	-0,078	-0,094*	-0,026	-0,033	-0,003	0,004	-0,022	0,013	0,026
Isorh	-0,053	0,031	0,003	-0,021	-0,114**	-0,024	-0,018	-0,004	0,013
Flavanone:									
Nar	-0,192**	-0,125**	-0,048	-0,041	0,043	-0,028	0,060	0,076	0,027
Hesp	-0,031	-0,071	0,000	0,061	0,184**	-0,006	0,012	0,008	0,103*
Flavone:									
Lut	-0,173**	-0,141**	-0,051	-0,026	-0,074	-0,016	0,000	0,028	0,002
Api	0,043	-0,006	0,104*	0,027	0,122**	-0,054	0,086*	0,048	0,081
Isoflavone:									
Dai	-0,048	0,053	0,038	0,127**	0,099*	0,009	0,026	0,055	0,138**
Gen	-0,179**	-0,142**	-0,040	-0,011	-0,035	-0,013	-0,008	0,024	0,023
Hydroxybenzoesäuren:									
Proto	-0,064	-0,068	-0,004	-0,003	0,076	-0,054	0,067	0,038	-0,009
Genti	-0,038	0,014	0,070	0,038	0,033	-0,044	-0,066	-0,020	0,029
Van	-0,022	-0,063	-0,021	-0,049	-0,084*	-0,027	-0,104*	-0,063	0,009
Syr	-0,013	0,062	0,074	0,089*	0,074	-0,024	-0,044	-0,023	0,016
Sal	-0,054	0,019	0,020	0,029	0,026	-0,015	0,062	0,033	0,059
Ellag	-0,093*	-0,129**	-0,026	-0,054	0,061	0,079	0,130**	0,122**	0,060
Hydroxyzimtsäuren:									
Kaff	0,001	0,084*	0,084*	-0,019	0,013	-0,034	0,016	-0,002	0,017
Cum	-0,157**	-0,062	-0,019	0,010	-0,099*	-0,020	-0,009	0,007	-0,012
Fer	-0,140**	-0,020	0,017	0,006	-0,032	-0,059	-0,005	0,003	0,040

* Korrelation ist signifikant mit $p < 0.05$ (2-seitig)** Korrelation ist signifikant mit $p < 0.01$ (2-seitig)

4.4 Polyphenolkonzentrationen im Plasma der Teilnehmerinnen der Brustkrebsstudie im Rahmen der EPIC-Studie

Die in der vorliegenden Studie untersuchte Population unterscheidet sich signifikant ($p < 0,05$) betreffs ihrer soziodemographischen und anthropometrischen Parameter in Bezug auf die sportliche Betätigung in den letzten 12 Monaten vor der Befragung und in Bezug auf die Stilldauer (siehe Tabelle 8).

Die Plasmakonzentrationen der Polyphenole in dieser Population ($n = 402$) schwanken je nach Substanzklasse über einen sehr breiten Bereich. Bei den Fällen ($n = 198$) hat aus der Gruppe der Flavan-3-ole Epigallocatechin mit 920 nmol/l (Median) den größten Anteil im Plasma gegenüber den anderen Catechine. Epicatechin, Epigallocatechingallat und Catechin sind mit vergleichbaren Konzentrationen von 62 – 66 nmol/l (Median) im Humanplasma dieses Kollektives vertreten. Galocatechin ist dagegen in geringeren Mengen enthalten (15 nmol/l). Die Plasmakonzentrationen (Median) der Kontrollen ($n = 204$) sind etwas niedriger, bezüglich der Verteilung der Flavan-3-ole jedoch ähnlich wie in der Vergleichsgruppe gelagert. Epigallocatechin tritt auch hier mengenmäßig gegenüber den anderen Catechinen deutlich hervor (865 nmol/l). Catechin, Epicatechin und Epigallocatechingallat schwanken zwischen 57 – 67 nmol/l und die Konzentration von Galocatechin liegt im Mittel bei 13 nmol/l (siehe Tabelle 46). Der mengenmäßig höchste Anteil der Flavonole geht mit 103 nmol/l für die Fälle bzw. 104 nmol/l für die Kontrollen von Quercetin aus. Kämpferol ist im Median mit Konzentrationen von 10 bzw. 12 nmol/l (Fälle / Kontrollen) im Plasma der Studienteilnehmer enthalten. Die ermittelte Plasmakonzentration von Isorhamnetin beträgt im Median bei Fällen wie Kontrollen 18 nmol/l (siehe Tabelle 46).

Auffälligerweise liegt die Konzentration der Zitrusfrucht-Flavonoide Naringenin und Hesperetin sowohl für die minimal ermittelten Plasmakonzentration wie auch für den Median bei Fällen und Kontrollen gleichermaßen unterhalb den Nachweisgrenzen (2,85 bzw. 2,55 nmol/l). Erst die 90. Perzentile der Fälle weist einen Naringeningehalt von 31 nmol/l und einen ähnlichen Hesperetiningehalt von 34 nmol/l auf. Die Kontrollen hingegen haben mit 41 nmol/l Naringenin und 26 nmol/l Hesperetin jedoch unterschiedlichere Flavonkonzentrationen.

Tab. 46: Plasma-Polyphenolkonzentrationen (nmol/l) der Teilnehmerinnen der Fall-Kontroll-Studie zu Brustkrebs im Rahmen der EPIC-Studie unter Angabe von Median, Minimum (Min.), Maximum (Max.) und des Perzentilenbereiches 10 - 90 %

	Fälle (n = 198)				Kontrollen (n = 204)				p-Wert*	
	Median	Min.	Max.	Perzentilen 10 – 90 %	Median	Min	Max	Perzentilen 10 – 90 %		
Flavan-3-ole:										
GC	15	0	473	0 – 126	13	0	961	0 – 136	0,354	
EGC	920	0	10054	200 – 4084	865	0	7857	131 – 3419	0,606	
Cat	62	0	1028	14 – 220	58	0	1754	13 – 205	0,941	
EGCG	62	0	3688	0 – 414	57	0	3377	0 – 386	0,933	
EC	66	0	1709	0 – 404	67	0	4106	0 – 384	0,626	
Summe:	1442	39	11465	381 – 4792	1180	40	8705	395 – 4202	0,619	
Flavonole:										
Que	103	0	1124	46 – 276	104	0	1291	48 – 389	0,368	
Käm	10	0	914	0 – 92	12	0	1159	0 – 269	0,120	
Isorh	18	0	246	0 – 62	18	0	332	0 – 63	0,657	
Summe:	154	0	1422	65 – 404	164	0	1318	76 – 564	0,053	
Flavanone:										
Nar	0	0	176	0 – 31	0	0	392	0 – 41	0,705	
Hesp	0	0	706	0 – 34	0	0	342	0 – 26	0,992	
Summe:	0	0	737	0 – 67	0	0	410	0 – 71	0,623	
Flavone:										
Lut	82	0	4126	7 – 236	71	0	2039	11 – 226	0,267	
Api	4	0	426	0 – 13	4	0	135	0 – 15	0,936	
Summe:	88	0	4142	13 – 254	73	0	2039	17 – 229	0,206	
Isoflavone:										
Dai	0	0	506	0 – 55	0	0	363	0 – 93	0,416	
Gen	10	0	164	2 – 28	11	0	323	3 – 36	0,483	
Summe:	15	0	520	3 – 109	16	0	685	3 – 125	0,391	
Hydroxybenzoesäuren:										
Proto	3438	0	19134	209 – 9897	1963	0	21088	162 – 8405	0,112	
Genti	927	0	5737	263 – 2640	1054	0	9938	269 – 2672	0,541	
Van	74	0	3307	0 – 630	70	0	3145	0 – 512	0,951	
Syr	268	0	33871	0 – 1805	289	0	12968	7 – 1721	0,951	
Sal	178	0	84815	0 – 2468	162	0	270571	0 – 2637	0,767	
Ellag	0	0	557	0 – 144	0	0	737	0 – 158	0,581	
Summe:	6524	126	89040	1444 – 19325	5615	340	285400	1239 – 17803	0,152	
Hydroxyzimtsäuren:										
Kaff	280	0	8165	15 – 1239	304	0	17653	42 – 1190	0,807	
Cum	388	0	6985	5 – 1403	365	0	5371	3 – 1176	0,474	
Fer	248	0	3827	10 – 1283	364	0	6400	32 – 1347	0,053	
Summe:	1165	34	9963	372 – 3829	1326	87	19110	319 – 3066	0,609	

* signifikant nach Mann-Whitney U-Test ($p < 0,300$)

Für die Gruppe der Flavone wurden für Luteolin 82 nmol/l (Fälle) bzw. 71 nmol/l (Kontrollen) gefunden. Für Apigenin wurden in beiden Gruppen 4 nmol/l ermittelt. Mit 13 nmol/l (Fälle) bzw. 15 nmol/l (Kontrollen) in der 90. Perzentile stellen die ermittelten Konzentration an Apigenin die niedrigsten Polyphenolkonzentrationen dieses Kollektivs dar.

In der 10. – 90. Perzentile der Fälle zeigen die Isoflavone Daidzein (0 – 55 nmol/l) und Genistein (2 – 28 nmol/l) ähnliche Konzentrationsbereiche wie die Flavanone. Im Median unterscheiden sich die Isoflavonkonzentrationen der Fälle (Daidzein: 0 nmol/l, Genistein: 10 nmol/l) nicht signifikant von den Kontrollen. Der Median Isoflavonkonzentrationen der Kontrollen wies für Daidzein 0 nmol/l und für Genistein 11 nmol/l auf. Für die 10. – 90. Perzentile der Kontrollen konnten für Daidzein 0 – 93 nmol/l und für Genistein 3 – 36 nmol/l ermittelt werden.

Die Plasmakonzentrationen (Median) der Hydroxybenzoesäuren sind äußerst heterogen verteilt. Für Protocatechusäure (3438 nmol/l), Vanillinsäure (74 nmol/l) und Salicylsäure (178 nmol/l) sind die Konzentrationen der Fälle größer als die der Kontrollpersonen. Für Gentsinsäure (1054 nmol/l) und Syringasäure (289 nmol/l) verhält es sich umgekehrt. Der Median der Ellagsäurekonzentration hingegen liegt in beiden Fällen unter der Nachweisgrenze (2,53 nmol/l). Protocatechusäure und Gentsinsäure stellen den größten Teil der hier untersuchten Hydroxybenzoesäuren dar. Die 10. – 90. Perzentile der Fälle von Protocatechusäure lag bei 209 – 9897 nmol/l und die 10. – 90. Perzentile der Kontrollen von Gentsinsäure lag bei 269 – 2672 nmol/l, das Maximum der ermittelten Protocatechusäurekonzentrationen lag bei 19,1 µmol/l, das Maximum der Gentsinsäurekonzentrationen bei den Kontrollen war 5,7 µmol/l. Die höchste Plasmakonzentration der Hydroxyphenolsäuren wurde mit 84,8 µmol/l (Fälle) und mit 270,6 µmol/l (Kontrollen) für Salicylsäure bestimmt, wobei die 10. – 90. Perzentile 0 – 2468 nmol/l (Fälle) und 0 – 2637 nmol/l (Kontrollen) erreichte (siehe Tabelle 46).

Die ermittelten Konzentrationen an Hydroxyzimtsäuren sind einheitlicher und homogener, als die Konzentrationen der Hydroxybenzoesäuren. In der Gruppe der Fälle wurden für Kaffeesäure 280 nmol/l, für p-Cumarsäure 388 nmol/l und für Ferulasäure 248 nmol/l ermittelt (Median). Im Teilkollektiv der gesunden Kontrollen wurden insgesamt etwas höhere Plasmakonzentrationen festgestellt (304 nmol/l, 365 nmol/l und 364 nmol/l), wobei auch die Bereiche der 10. – 90. Perzentile Konzentrationen zwischen 5 nmol/l und 1403 nmol/l (p-Cumarsäure) bzw. 3 nmol/l und 1176 nmol/l (p-Cumarsäure) aufwiesen. Die Plasmakonzentrationen der Catechine, der Flavanone und der Isoflavone von erkrankten Fällen und gesunden Kontrollen unterscheiden sich nicht signifikant ($p < 0.30$). Für Kämpferol, die Summe der Flavonole, Luteolin, die Summe der Flavone, Protocatechusäure, die Summe der Hydroxybenzoesäuren und für Ferulasäure (siehe Tabelle 46) bestehen jedoch signifikante Unterschiede.

Die Kämpferolkonzentration (Median) der Kontrollen (12 nmol/l) sind signifikant höher als bei den Fällen (10 nmol/l). In der Summe der Flavonole sind die Ergebnisse der Kontrollen (164 nmol/l) signifikant höher als bei den Fällen (154 nmol/l).

In der Gruppe der Flavone hingegen sind die Plasmawerte für Luteolin (82 nmol/l) sowie für die Summe der Flavone (88 nmol/l) bei den Fällen signifikant höher als die Resultate der Kontrollgruppe (71 bzw. 73 nmol/l).

In der Klasse der Hydroxybenzoesäuren lassen sich für Protocatechusäure (3438 nmol/l) und für die Summe der Hydroxybenzoesäuren (1963 nmol/l) signifikant höhere Plasmakonzentrationen bei den Fällen gegenüber den Kontrollen feststellen.

Bei den Hydroxyzimtsäuren besteht ein signifikanter Unterschied zwischen Fällen (248 nmol/l) und Kontrollen (364 nmol/l) nur für Ferulasäure (Tabelle 46).

Im Rahmen logistischer Regressionsmodelle auf die Assoziation der Plasmakonzentration mit dem Risiko für Brustkrebs wurden im Folgenden nur diejenigen Polyphenole herangezogen, deren Plasmakonzentrationen sich zwischen Fällen und Kontrollen auf dem Niveau zu $p < 0,30$ unterschieden (siehe Tabelle 46). Die Ergebnisse in Tabelle 47 und 48 sind nach steigenden Plasmakonzentrationen in Quartilen (Q1 – Q4) angeordnet.

Die odds ratio für die Plasmakonzentration der Summe aller Flavonole war 0,533 mit einem 95% Konfidenzintervall von 0,30 – 0,95. Die odds ratio für die Plasmakonzentration von Ferulasäure war 0,548, mit einem 95% Konfidenzintervall von 0,31 – 0,97 (siehe Tabelle 47).

Von den getesteten Substanzen oder Substanzgruppen zeigten bei Verwendung der kontinuierlichen Plasmawerte nur Kämpferol ($p_{\text{cont.}} = 0,028$) und die Summe der Flavonole ($p_{\text{cont.}} = 0,010$) statistisch signifikante, inverse Assoziationen mit dem Risiko für Brustkrebs. Beide Signifikanzen verschwinden allerdings bei der Gruppierung der Konzentrationen in Quartilen (Kämpferol: $p_{\text{cat.}} = 0,205$; Summe der Flavonole: $p_{\text{cat.}} = 0,089$).

Bei Verwendung der kategoriellen Plasmawerte zeigte Ferulasäure eine statistisch signifikante, inverse Assoziationen mit dem Risiko für Brustkrebs ($p_{\text{cat.}} = 0,028$). Diese Signifikanz wiederum verschwindet allerdings bei Verwendung der kontinuierlichen Plasmawerte ($p_{\text{cat.}} = 0,228$; siehe Tabelle 47).

Nachdem in Tabelle 48 die Plasmakonzentrationen für wichtige Einflussparameter der Kanzerogenese adjustiert worden waren (*Alter, BMI, Zeitpunkt der 1. Regelblutung, Anzahl der Kinder, Stilldauer, Schulbildung, sportliche Aktivität, Rauchgewohnheiten, Tabletteneinnahme, Hormoneinnahme, Status der Menopause*), verschwand die Signifikanz des Effekts für die Summe der Flavonole auf das Brustkrebsrisiko. Die odds ratio für die Plasmakonzentration der

Summe der Flavonole war 0,543 (C.I. 95% 0,29 – 1,02). Die Signifikanz des Quartileffekts bei Ferulasäure blieb jedoch bestehen. Die odds ratio für die Plasmakonzentration von Ferulasäure war 0,516, mit einem 95% Konfidenzintervall von 0,27 – 0,98 (siehe Tabelle 48).

Auch bei der adjustierten logistischen Regression für die Effekte der Plasmakonzentrationen auf das Brustkrebsrisiko zeigten sich bei Verwendung der kontinuierlichen Plasmawerte für Kämpferol ($p_{\text{cont.}} = 0,046$) und für die Summe der Flavonole ($p_{\text{cont.}} = 0,019$) statistisch signifikante, inverse Assoziationen mit dem Risiko für Brustkrebs. Beide Signifikanzen verschwinden auch hier bei der Gruppierung in Quartilen (Kämpferol: $p_{\text{cat.}} = 0,264$; Summe der Flavonole: $p_{\text{cat.}} = 0,141$).

Bei Verwendung der kategoriellen Plasmawerte zeigte auch Ferulasäure weiterhin eine statistisch signifikante, inverse Assoziationen mit dem Risiko für Brustkrebs ($p_{\text{cat.}} = 0,037$) und auch diese Signifikanz verschwindet jedoch bei Verwendung der kontinuierlichen Plasmakonzentrationen ($p_{\text{cat.}} = 0,288$; siehe Tabelle 48).

Tab. 47: Nicht-Adjustierte logistische Regression für die Effekte der Plasmakonzentrationen ausgewählter Polyphenole auf das Brustkrebsrisiko

		Quartilen				Ptrend (cat.)	Ptrend (cont.)
		Q1	Q2	Q3	Q4		
Kämpferol	# Fälle / Kontrollen	51 / 51	55 / 51	61 / 51	31 / 51		
	Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 3,25	3,25 -< 11,83	11,83 -< 41,43	≥ 41,43		
	Median (nmol/l)	0	7,05	20,605	123,75		
	Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	1,078 (0,63 - 1,86)	1,196 (0,70 - 2,05)	0,608 (0,34 - 1,10)	0,205	0,028
Summe Flavonole	# Fälle / Kontrollen	60 / 51	48 / 51	58 / 51	32 / 51		
	Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 112,45	112,45 -< 163,66	163,66 -< 347,85	≥ 347,85		
	Median (nmol/l)	80,71	137,49	231,91	503,38		
	Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	0,800 (0,47 - 1,38)	0,967 (0,57 - 1,64)	0,533 (0,30 - 0,95)	0,089	0,010
Luteolin	# Fälle / Kontrollen	40 / 51	45 / 51	52 / 51	61 / 51		
	Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 25,54	25,54 -< 70,56	70,56 -< 127,72	≥ 127,72		
	Median (nmol/l)	11,92	46,415	96,26	196,11		
	Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	1,125 (0,63 - 2,00)	1,300 (0,74 - 2,29)	1,525 (0,87 - 2,66)	0,114	0,364
Summe Flavone	# Fälle / Kontrollen	42 / 51	40 / 51	54 / 51	62 / 51		
	Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 35,16	35,16 -< 72,54	72,54 -< 131,60	≥ 131,60		
	Median (nmol/l)	19,8	53,76	98,79	206,16		
	Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	0,952 (0,53 - 1,70)	1,286 (0,74 - 2,25)	1,476 (0,85 - 2,56)	0,097	0,332
Protocatechusäure	# Fälle / Kontrollen	44 / 51	42 / 51	47 / 51	65 / 51		
	Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 438,27	438,27 -< 1962,99	1962,99 -< 5814,60	≥ 5814,60		
	Median (nmol/l)	233,97	799,87	4170,815	7898,71		
	Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	0,955 (0,54 - 1,70)	1,068 (0,61 - 1,88)	1,477 (0,86 - 2,55)	0,131	0,124
Summe Hydroxybenzoesäuren	# Fälle / Kontrollen	52 / 51	34 / 51	51 / 51	61 / 51		
	Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 2312,35	2312,35 -< 5614,50	5614,50 -< 9344,39	≥ 9344,39		
	Median (nmol/l)	1506,86	3498,79	7449,55	14406,785		
	Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	0,654 (0,37 - 1,17)	0,981 (0,57 - 1,70)	1,173 (0,69 - 2,01)	0,332	0,797
Ferulasäure	# Fälle / Kontrollen	62 / 51	57 / 51	45 / 51	34 / 51		
	Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 105,31	105,31 -< 364,38	364,375 -< 798,17	≥ 798,17		
	Median (nmol/l)	42,15	196,97	526,125	1291,27		
	Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	0,919 (0,54 - 1,56)	0,726 (0,42 - 1,25)	0,548 (0,31 - 0,97)	0,028	0,228

Tab. 48: Adjustierte logistische Regression für die Effekte der Plasmakonzentrationen ausgewählter Polyphenole auf das Brustkrebsrisiko

	Quartilen				Ptrend (cat.)	Ptrend (cont.)
	Q1	Q2	Q3	Q4		
Kämpferol						
# Fälle / Kontrollen	51 / 51	55 / 51	61 / 51	31 / 51		
Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 3,25	3,25 -< 11,83	11,83 -< 41,43	≥ 41,43		
Median (nmol/l)	0	7,05	20,605	123,75		
Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	0,976 (0,54 - 1,76)	1,096 (0,61 - 1,97)	0,621 (0,33 - 1,19)	0,264	0,046
Summe Flavonole						
# Fälle / Kontrollen	60 / 51	48 / 51	58 / 51	32 / 51		
Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 112,45	112,45 -< 163,66	163,66 -< 347,85	≥ 347,85		
Median (nmol/l)	80,71	137,49	231,91	503,38		
Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	0,772 (0,43 - 1,39)	0,953 (0,54 - 1,69)	0,543 (0,29 - 1,02)	0,141	0,019
Luteolin						
# Fälle / Kontrollen	40 / 51	45 / 51	52 / 51	61 / 51		
Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 25,54	25,54 -< 70,56	70,56 -< 127,72	≥ 127,72		
Median (nmol/l)	11,92	46,415	96,26	196,11		
Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	1,054 (0,57 - 1,97)	1,431 (0,77 - 2,65)	1,555 (0,85 - 2,86)	0,102	0,409
Summe Flavone						
# Fälle / Kontrollen	42 / 51	40 / 51	54 / 51	62 / 51		
Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 35,16	35,16 -< 72,54	72,54 -< 131,60	≥ 131,60		
Median (nmol/l)	19,8	53,76	98,79	206,16		
Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	0,816 (0,43 - 1,54)	1,337 (0,73 - 2,45)	1,435 (0,79 - 2,61)	0,113	0,385
Protocatechusäure						
# Fälle / Kontrollen	44 / 51	42 / 51	47 / 51	65 / 51		
Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 438,27	438,27 -< 1962,99	1962,99 -< 5814,60	≥ 5814,60		
Median (nmol/l)	233,97	799,87	4170,815	7898,71		
Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	0,920 (0,50 - 1,71)	1,013 (0,55 - 1,87)	1,348 (0,74 - 2,47)	0,293	0,298
Summe Hydroxybenzoesäuren						
# Fälle / Kontrollen	52 / 51	34 / 51	51 / 51	61 / 51		
Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 2312,35	2312,35 -< 5614,50	5614,50 -< 9344,39	≥ 9344,39		
Median (nmol/l)	1506,86	3498,79	7449,55	14406,785		
Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	0,686 (0,37 - 1,29)	1,057 (0,58 - 1,93)	1,207 (0,67 - 2,17)	0,349	0,498
Ferulasäure						
# Fälle / Kontrollen	62 / 51	57 / 51	45 / 51	34 / 51		
Quartilsgrenzen (nmol/l)	≤ 105,31	105,31 -< 364,38	364,375 -< 798,17	≥ 798,17		
Median (nmol/l)	42,15	196,97	526,125	1291,27		
Odds ratio (95% CI)	1 (ref.)	1,031 (0,58 - 1,84)	0,814 (0,45 - 1,47)	0,516 (0,27 - 0,98)	0,037	0,288

Adjustiert für: Alter, BMI, Zeitpunkt der 1. Regelblutung, Anzahl der Kinder, Stilldauer, Schulbildung, Sportliche Aktivität, Rauchgewohnheiten, Tabletteneinnahme, Hormoneinnahme, Status der Menopause

Die graphische Darstellung verdeutlicht den Absorptionsverlauf der männlichen Studienteilnehmer (Abbildung 29) und der weiblichen Studienteilnehmer (Abbildung 30)

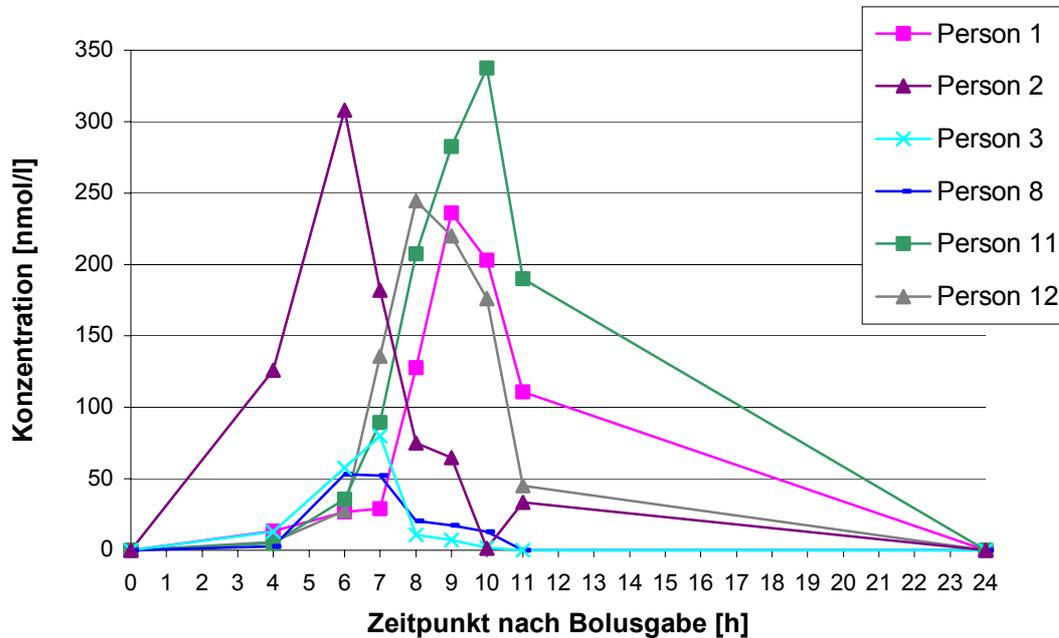


Abb. 29: Apigeninplasmakonzentrationen [nmol/l] aller männlichen Studienteilnehmer ($n_{\text{Männer}} = 6$) zu verschiedenen Zeitpunkten [h] nach Einnahme der Petersilienmahlzeit

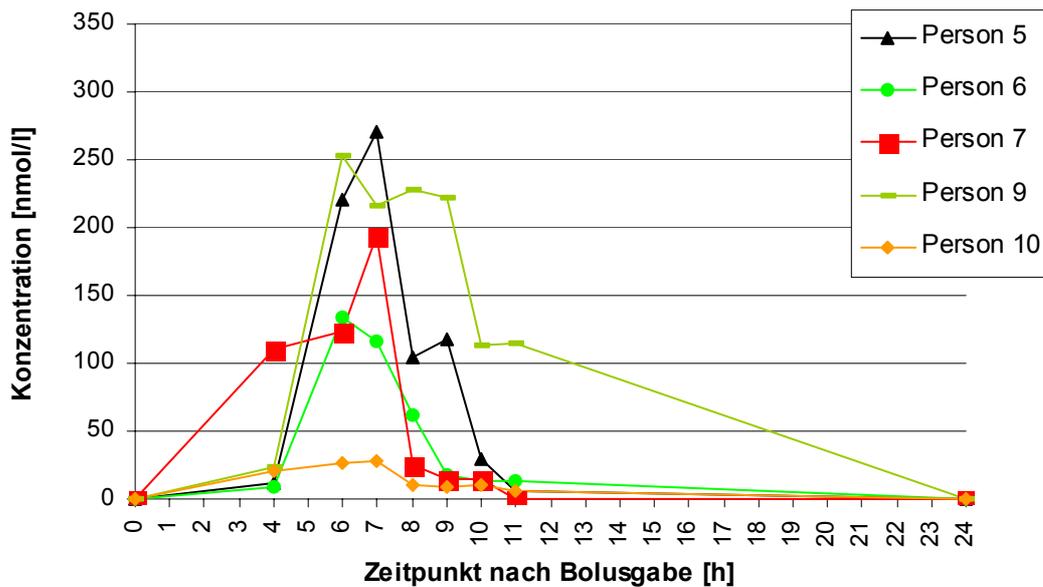


Abb. 30: Apigeninplasmakonzentrationen [nmol/l] aller weiblichen Studienteilnehmerinnen ($n_{\text{Frauen}} = 5$) zu verschiedenen Zeitpunkten [h] nach Einnahme der Petersilienmahlzeit

Der geschlechtsspezifische Vergleich (Abbildungen 29 und 30) zeigt, dass das weibliche Teilkollektiv im Durchschnitt schneller resorbierte. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant, wie aus folgender Tabelle 50 zu entnehmen ist.

Tab. 50: Vergleich der Apigeninplasmakonzentration [nmol/l] von Männern ($n_{\text{Männer}} = 6$) und Frauen ($n_{\text{Frauen}} = 5$) mit dem Student t-Test zu verschiedenen Zeitpunkten [h] nach dem Verzehr einer Petersilienmahlzeit

Zeitpunkte [h]	Männer		Frauen		<i>p</i> -Wert ¹
	Mean	SD	Mean	SD	
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
4	27,66	48,35	35,04	42,66	0,790
6	84,76	110,03	151,89	89,15	0,300
7	94,76	55,89	164,85	94,65	0,160
8	114,42	96,81	86,00	87,10	0,620
9	137,98	121,89	76,28	93,46	0,370
10	122,05	139,17	36,25	43,48	0,220
11	63,29	74,26	27,92	48,53	0,380
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

¹Unabhängiger t-Test

Auch der Vergleich Sportler / Nichtsportler zeigt keine signifikanten Unterschiede in den Gruppen (siehe Tabelle 51).

Tab. 51: Vergleich der Apigeninplasmakonzentration [nmol/l] von Sportlern ($n_{\text{Sportler}} = 6$) und Nichtsportlern ($n_{\text{Nichtsportler}} = 5$) mit dem Student t-Test zu verschiedenen Zeitpunkten [h] nach Verzehr einer Petersilienmahlzeit

Zeitpunkte [h]	Sportler		Nicht - Sportler		<i>p</i> -Wert ¹
	Mean	SD	Mean	SD	
0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
4	29,78	40,29	32,49	52,40	0,920
6	87,45	89,01	148,66	117,03	0,340
7	123,82	71,89	129,99	98,63	0,900
8	121,18	116,23	77,90	41,08	0,450
9	125,93	128,83	90,75	91,16	0,620
10	108,88	131,73	52,05	85,01	0,420
11	59,22	77,76	32,81	45,47	0,520
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

¹Unabhängiger t-Test

Der statistische Vergleich der einzelnen Mittelwerte zeigt eine signifikante Steigung der Apigeninkonzentration im Plasma nach 4 Stunden und der Apigeninkonzentration im Plasma nach 6 Stunden (0,009) sowie der Apigeninkonzentration im Plasma nach 7 Stunden (0,002) (siehe Abbildung 31).

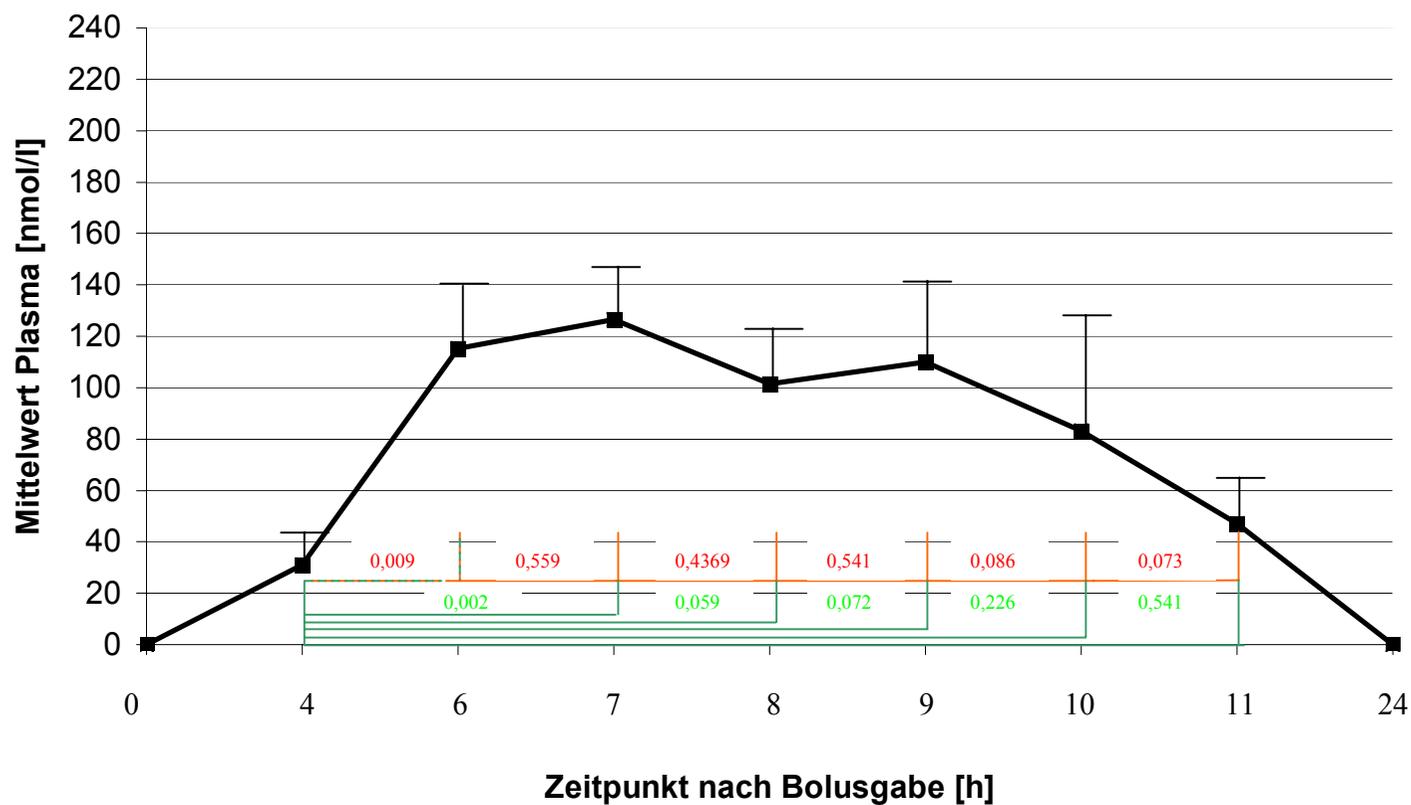


Abb. 31: Darstellung der Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) und Angabe des Signifikanzniveaus p (gepaarter Student-t-Test) beim Vergleich der einzelnen Zeitpunkte untereinander (orange) und jeweils mit dem Zeitpunkt der Blutabnahme nach 4 Stunden (grün)

Die AUC (Area Under the Curve) ist proportional zu der Menge Apigenin, die in einem Zeitraum von 24 Stunden nach Verzehr der Testmahlzeit in den Organismus gelangt ist. Die AUC-Werte der Probanden streuen in einem breiten Bereich zwischen 8,37 min x $\mu\text{mol/l}$ und 149,99 min x $\mu\text{mol/l}$. Im Mittel ergab die AUC $61,98 \pm 48,56$ min x $\mu\text{mol/l}$ (Mean \pm SD) (siehe Tabelle 52).

Tab. 52: AUC- Werte [minuten x $\mu\text{mol/l}$] aller Studienteilnehmer sowie Mittelwert, Standardabweichung (SD), Standardfehler (SEM), Min. und Max.

Person	AUC [min x $\mu\text{mol/l}$]
1	86,64
2	70,32
3	11,10
5	58,05
6	31,94
7	45,95
8	11,49
9	149,99
10	8,37
11	138,93
12	69,05
Mean	61,98
SD	48,56
SEM	14,64
Min	8,37
Max	149,99

Der Vergleich der AUC für die Apigeninkonzentration im Plasma der einzelnen Studienteilnehmer zeigt, dass Person 9 einen höheren AUC-Wert (149,99 min x $\mu\text{mol/l}$) aufweist als Person 11 (138,93 min x $\mu\text{mol/l}$), obwohl Person 11 bei Betrachtung der Maximalkonzentrationen die höchste Konzentration anzeigte (siehe Anhangstabelle A3). Der Grund hierfür lässt sich in den Abbildungen 29 und 30 erkennen. Während bei Person 11 ein ausgeprägtes Maximum in der Apigenin-Konzentrationskurve nach 10 Stunden zu beobachten ist, findet man bei Person 9 zwei Absorptionsmaxima (nach 6 und 8 Stunden), die in einem größeren AUC- Wert resultieren.

4.5.2 Verlauf der Apigeninkonzentration im Urin

In der vorliegenden Studie wurde die Konzentration von Apigenin im Urin der Probanden im 24-Stunden-Urin ermittelt. Die Urinvolumina lagen bei durchschnittlich $3,7 \text{ l} \pm 2,2 \text{ l}$ (Mean \pm SD) pro 24 Stunden. Dabei schwankten die Einzelwerte innerhalb des Studienkollektives zwischen 1,5 l und 8,1 l (Tabelle 53). Von den im Durchschnitt zugeführten $17,77 \pm 4,19$ mg Apigenin (Mean \pm SD) pro Bolus (siehe Tabelle 53) konnten im Urin der Probanden durchschnittlich $143,81 \pm$

109,65 nmol Apigenin / 24 h bzw. $0,039 \pm 0,03$ mg Apigenin / 24 h (Mean \pm SD) wieder gefunden werden.

Tab. 53: Apigeningehalte in der Testmahlzeit [mg] und im Urin [nmol/l; mg/l], Urinvolumen [l], Apigeninausscheidung im 24-Stunden-Urin [nmol/l; mg] sowie Mittelwert, Standardabweichung (SD), Standardfehler (SEM), Min. und Max.

Person	Apigenin / Bolus	Apigenin im Urin		Urin / 24 h	Apigenin / 24 h Urin	
	[mg]	nmol/l	mg/l	[l]	nmol	mg
1	23,78	78,15	0,0211	3,35	261,80	0,071
2	20,21	114,18	0,0309	2,13	243,20	0,066
3	19,74	17,66	0,0048	5,08	89,71	0,023
5	12,37	43,45	0,0117	3,85	167,47	0,045
6	13,79	13,81	0,0037	1,92	26,46	0,007
7	13,79	13,76	0,0037	3,40	46,73	0,013
8	17,12	20,24	0,0055	1,55	31,37	0,009
9	14,27	39,81	0,0108	1,50	59,71	0,016
10	15,22	39,26	0,0106	6,97	273,99	0,074
11	21,40	38,42	0,0104	8,08	310,52	0,084
12	23,78	24,48	0,0066	2,90	70,98	0,019
Mean	17,77	40,29	0,0109	3,70	143,81	0,039
SD	4,19	30,78	0,0083	2,19	109,65	0,030
SEM	1,26	9,28	0,0025	0,66	33,06	0,009
Min	12,37	13,76	0,0037	1,5	26,46	0,007
Max	23,78	114,18	0,0309	8,08	310,52	0,084

Der geschlechtsspezifische Vergleich der renalen Apigeninexkretion zeigt keine signifikanten Mittelwertsunterschiede (siehe Tabelle 54) und ein Vergleich zwischen Sportlern und Nichtsportlern weist keine signifikanten Unterschiede der Apigeninkonzentration auf (siehe Tabelle 55).

Tab. 54: Vergleich der renalen 24 h-Apigeninexkretion [nmol/l] von Männern ($n_{\text{Männer}} = 6$) und Frauen ($n_{\text{Frauen}} = 5$) mit dem Student t-Test

	Apigeninkonzentration im 24-h Urin [nmol/l]		<i>p</i> -Wert ¹
	Frauen	Männer	
Mean	114,87	167,93	0,450
SD	104,39	117,45	
SEM	46,69	47,95	

¹ Unabhängiger t-Test

Tab. 55: Vergleich der renalen 24 h-Apigeninexkretion [nmol/l] von Sportlern ($n_{\text{Sportler}} = 6$) und Nichtsportlern ($n_{\text{Nichtsportler}} = 5$) mit dem Student t-Test

	Apigeninkonzentration im 24-h Urin [nmol/l]		<i>p</i> -Wert ¹
	Sportler	Nicht- Sportler	
Mean	141,94	146,06	0,950
SD	117,85	112,64	
SEM	48,11	50,37	

¹ Unabhängiger t-Test

Wie aus Tabelle 56 zu entnehmen ist, konnten im 24-Stunden-Urin je nach Versuchsperson zwischen 0,05 % und 0,49 % des verzehrten Apigenins nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der Analysenergebnisse von Urin und Plasma ist festzuhalten, dass die Apigenin-Konzentration im 24 Stunden-Urin in einigen Fällen der höchsten Konzentration an Apigenin im Plasma entsprach.

Tab. 56: Apigeningehalte in Testmahlzeit [μmol], und 24-h-Urin [nmol/l] und prozentualer Anteil der zugeführten Menge

Person	Apigenin / Bolus	Apigenin / 24 h Urin	Ausscheidung der zugeführten Menge Apigenin im Urin	Maximale Plasmakonzentration
	[μmol]	[nmol]	%	[nmol/l]
1	87,996	261,80	0,30	236,13
2	74,796	243,20	0,33	307,80
3	73,035	89,71	0,12	80,06
5	45,758	167,47	0,37	270,81
6	51,038	26,46	0,05	134,42
7	51,038	46,73	0,09	194,27
8	63,357	31,37	0,05	53,25
9	52,798	59,71	0,11	227,81
10	56,317	274,00	0,49	27,85
11	79,196	310,52	0,39	337,46
12	87,996	70,98	0,08	244,55
Mittelwert	65,757	143,81	0,22	192,22
SD	1,550	109,66	0,16	104,32
SEM	4,672	33,06	0,05	31,45
Min	45,758	26,46	0,05	27,85
Max	87,996	310,52	0,49	337,46

4.5.3 Verlauf der Apigeninkonzentration in den Erythrozyten

Bei 8 der 11 Probanden ($n_{\text{Frauen}} = 5$; $n_{\text{Männer}} = 3$) wurde die Apigeninkonzentration in den Erythrozyten bestimmt (siehe Anhangstabelle A6).

Tabelle 57 informiert über die mittleren Apigeninkonzentrationen in Erythrozyten des gesamten Studienkollektives. Im Gegensatz zu den Plasmakonzentrationen von Apigenin (siehe Tabelle 49) war die Apigeninkonzentration in den Erythrozyten geringer und wies zu keinem Zeitpunkt ein Maximum der Absorption auf. Die mittlere Apigeninkonzentration zeigte innerhalb von 24 Stunden vielmehr nur geringe Schwankungen (2,06 – 4,52 nmol/l). Die maximal erreichte Konzentration von Apigenin in den Erythrozyten betrug 12,00 nmol/l nach 9 Stunden. Bei 4 der untersuchten Proben konnte auch in den Erythrozyten aus dem Nüchternplasma Apigenin in geringen Mengen nachgewiesen werden. Die Eliminierung von Apigenin aus den roten Blutkörperchen fand bei 4 Probanden innerhalb von 11 Stunden statt. 5 Probanden hatten nach 24 Stunden kein Apigenin mehr in den Zellen. Bei 3 der Probanden war jedoch auch nach 24 Stunden noch Apigenin in geringen Mengen nachweisbar.

Tab. 57: Konzentration von Apigenin in den Erythrozyten [nmol/l], Mittelwert, Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), Median, Min. und Max. aller untersuchten Probanden ($n = 8$) nach Verzehr der Petersilienmahlzeit

Zeitpunkte	Mittelwert	SD	SEM	Median	Min	Max
[h]	[nmol/l]					
0	3,72	4,56	1,27	1,61	n.d.	10,14
4	3,24	3,50	2,80	1,24	n.d.	7,35
6	3,99	3,94	4,04	1,39	n.d.	9,80
7	3,64	4,56	2,03	1,61	n.d.	10,94
8	2,88	3,54	1,51	1,25	n.d.	8,72
9	4,52	4,15	3,66	1,47	n.d.	12,00
10	3,03	3,02	3,43	1,07	n.d.	8,70
11	2,71	3,78	1,55	1,34	n.d.	10,94
24	2,06	3,04	n.d.	1,07	n.d.	7,08

Nach Geschlecht unterteilt lässt sich erkennen, dass das männliche Teilkollektiv (siehe Anhangstabelle A7) insgesamt niedrigere Mittelwerte zeigte als das weibliche Teilkollektiv (siehe Anhangstabelle A8). Die graphische Darstellung verdeutlicht die Apigeninkonzentration des Erythrozyten im weiblichen und männlichen Teilkollektiv zu den einzelnen Zeitpunkten nach der Bolusgabe.

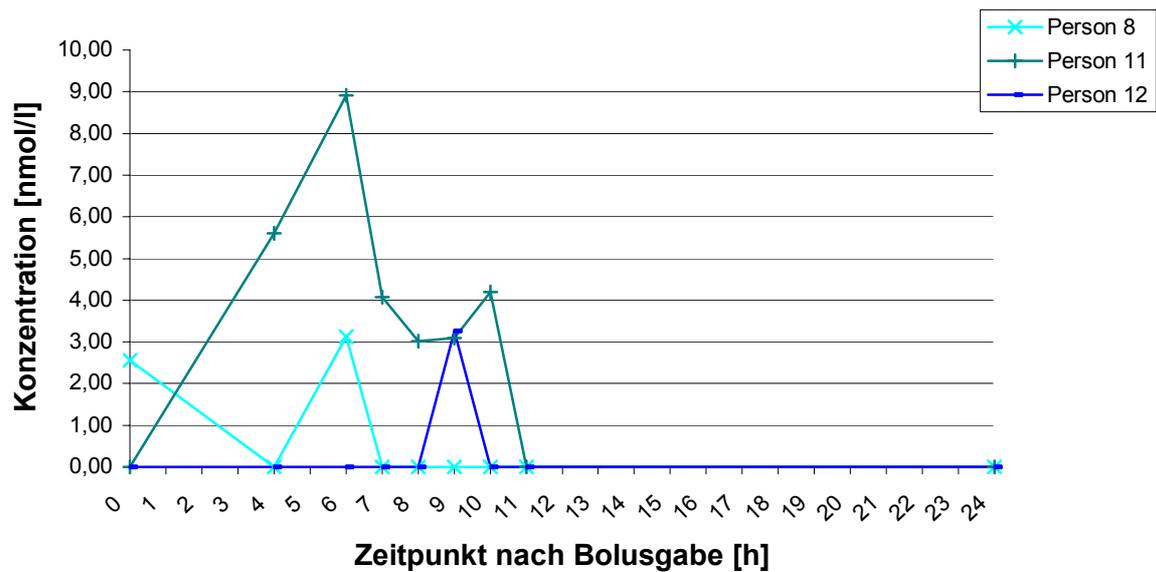


Abb. 32: Apigeninkonzentrationen der Erythrozyten [nmol/l] aller männlichen Studienteilnehmer ($n_{\text{Männer}} = 3$) zu verschiedenen Zeitpunkten [h] nach Verzehr der Testmahlzeit

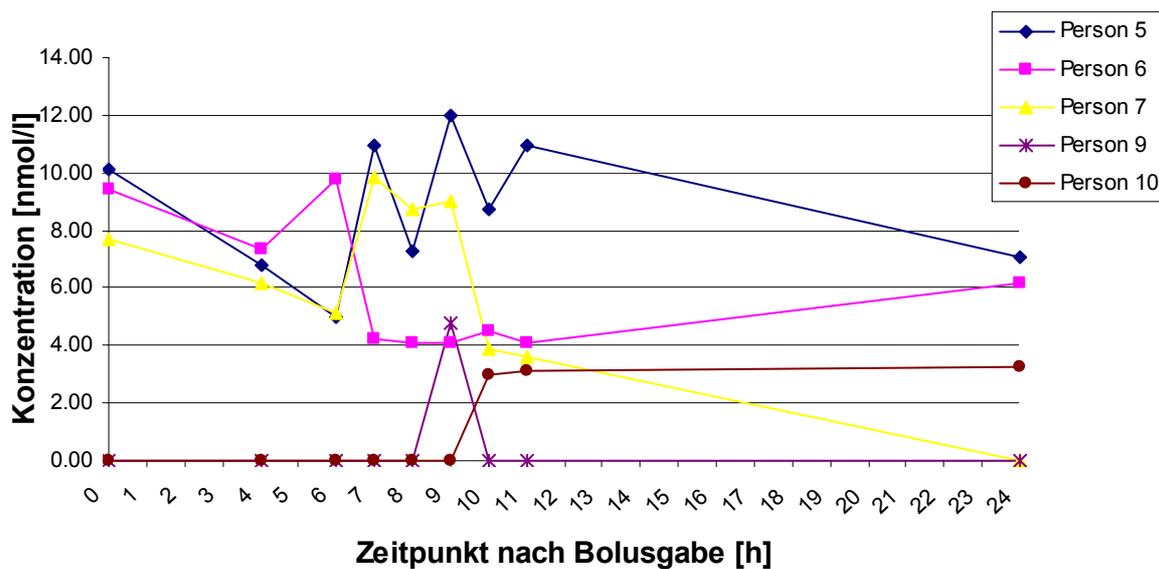


Abb. 33: Apigeninkonzentrationen der Erythrozyten [nmol/l] aller weiblichen Studienteilnehmer ($n_{\text{Frauen}} = 5$) zu verschiedenen Zeitpunkten [h] nach Verzehr der Testmahlzeit

Die geschlechtsspezifischen Unterschied wiesen jedoch keine signifikanten Mittelwertsunterschiede auf ($p > 0,05$), wie Tabelle 58 zu entnehmen ist.

Tab. 58: Vergleich der Erythrozytenkonzentration [nmol/l] von Männern ($n_{\text{Männer}} = 3$) und Frauen ($n_{\text{Frauen}} = 5$) mit dem Student t-Test zu verschiedenen Zeitpunkten [h] nach Verzehr der Testmahlzeit

BA	Erythrozytenkonzentration						<i>p</i> -Wert ¹
	Männer			Frauen			
[h]	Mittelwert	SD	SEM	Mittelwert	SD	SEM	
	nmol/l						
0	0,85	1,47	0,6	5,44	5,05	2,26	0,190
4	1,87	3,24	1,32	4,06	3,73	1,67	0,430
6	4,01	4,52	1,85	3,98	4,12	1,84	0,990
7	1,36	2,35	0,96	5,01	5,23	2,34	0,310
8	1,01	1,74	0,71	4,00	4,02	1,8	0,280
9	2,11	1,83	0,75	5,97	4,64	2,07	0,230
10	1,40	2,43	0,99	4,01	3,14	1,4	0,270
11	n.d.	n.d.	n.d.	4,34	4,02	1,8	0,120
24	n.d.	n.d.	n.d.	3,29	3,33	1,49	0,150

¹Unabhängiger t-Test

Auch ein Vergleich von Sportlern und Nichtsportlern zeigte keine signifikanten Mittelwertsunterschiede auf (siehe Tabelle 59).

Tab. 59: Vergleich der Erythrozytenkonzentration [nmol/l] von Sportlern ($n_{\text{Sportler}} = 5$) und Nichtsportlern ($n_{\text{Nichtsportler}} = 3$) mit dem Student t-Test zu verschiedenen Zeitpunkten [h] nach Verzehr der Petersilienmahlzeit

BA	Erythrozytenkonzentration						<i>p</i> -Wert ¹
	Sportler			Nichtsportler			
[h]	Mittelwert	SD	SEM	Mittelwert	SD	SEM	
	nmol/l			nmol/l			
0	1,53	3,43	1,53	7,36	4,18	2,42	0,070
4	2,35	3,23	1,44	4,71	4,09	2,36	0,400
6	2,80	4,07	1,82	5,96	3,45	1,99	0,310
7	2,78	4,32	1,93	5,06	5,52	3,18	0,540
8	2,35	3,79	1,7	3,77	3,63	2,1	0,620
9	4,02	3,27	1,46	5,36	6,1	3,52	0,690
10	2,21	2,07	0,92	4,4	4,35	2,51	0,360
11	1,33	1,83	0,82	5,01	5,53	3,19	0,200
24	0,65	1,44	0,65	4,41	3,85	2,22	0,090

¹Unabhängiger t-Test

5. Diskussion

Flavonoide und Hydroxyphenolsäuren sind potentiell bioaktive Inhaltsstoffe pflanzlicher Lebensmittel. Ergebnisse aus *in vitro* Studien und Versuche am Tiermodell lassen ein erhebliches Potential zur Prävention von Krebs und anderen chronischen Krankheiten vermuten (Hollman und Katan, 1999). Den Polyphenolen werden dabei viele unterschiedliche physiologische Wirkungen zugesprochen. Vor allem ihre antioxidative Aktivität, ihre antithrombotischen, antikarzinogenen, antibakteriellen, anti-inflammatorischen und immunmodulierenden Effekte werden hervorgehoben (Yang et al., 2001; Cook und Samman, 1996; Rice-Evans et al., 1996).

Da die Zufuhrberechnung dieser sekundären Pflanzenstoffe mit Fehlern behaftet sein kann, die sich erheblich auf die Ergebnisse dieser Berechnungen auswirken, stellen Biomarkermessungen für die Zufuhr von Polyphenolen eine wertvolle Möglichkeit dar, um wichtige und valide Informationen zu erhalten und postulierte Effekte im Menschen zu prüfen.

Bislang sind Untersuchungen über die Bioverfügbarkeit der Polyphenole, ihren Metabolismus und synergistische Wechselwirkungen im Menschen widersprüchlich. Dieser Mangel an Information ist verknüpft mit dem Fehlen sensitiver, leicht zugänglicher Methoden zur Bestimmung eines ausgedehnten Spektrums phenolischer Antioxidantien im Plasma, verglichen mit der großen Anzahl an Methoden zur Bestimmung dieser Stoffe im Lebensmittel (Hertoget al., 1992; Schieber et al., 2001; Shui und Loeng, 2002).

Viele frühere Studien untersuchten ausschließlich Flavonoide einer speziellen Unterklasse oder einzelne Flavonoide, die in einem interessierenden Lebensmittel (z.B. Tee, Äpfel, u.a.) vorkommen, aber die Nahrungsmittel in unserer Ernährung stellen üblicherweise eine Mischung der unterschiedlichsten Polyphenole zur Verfügung. Diese Arbeit stellt daher eine neue, sensitive und reproduzierbare Methode zur Analyse von ausgewählten Komponenten aus allen wichtigen Gruppen der Flavonoide und Hydroxyphenolsäuren (Flavan-3-ole, Flavonole, Flavanone, Flavone, Isoflavone, Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren) in Blutplasma vor.

5.1 Entwicklung der Nachweismethode

Die Trennung der für diese Arbeit ausgewählten Polyphenole wurde an zwei Reversed-Phase-HPLC-Säulen durchgeführt, die hintereinander geschaltet wurden. Die Analyten eluieren entsprechend ihrer Polarität, zuerst die polareren Phenole (Phenolsäuren und Catechine) und anschließend die unpolaren Flavonole, Isoflavone, Flavanone und Flavone (siehe Abbildung 8). Die Polarität der Flavonoide wird dabei hauptsächlich von den Hydroxylsubstituenten am B-Ring beeinflusst (Merken und Beecher, 2000). Table 20 zeigt die 23 untersuchten Polyphenole in der

Reihenfolge ihrer Retentionszeiten. In einigen Bereichen ist die Auflösung der Substanzpeaks vermindert. Die Integration der detektierten Standards wurde dadurch jedoch nicht negativ beeinflusst.

Die Verwendung der Luna RP-C18 Säule von Phenomenex resultierte bereits in einer erfolgreichen Trennung der Phenolsäuren von einigen Flavonoidgruppen. Jedoch verbesserte erst die Kombination von zwei RP-Säulen die Performance und ermöglichte die Trennung von Epigallocatechingallat, Kaffeesäure, Vanillinsäure und Epicatechin (Peaks 6-9) sowie von Quercetin, Naringenin, Luteolin, Genistein und Hesperetin (Peaks 17-21) (siehe Abbildung 8). In früheren Publikationen konnte bereits gezeigt werden, dass die Säule Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies) sehr gute Trenneigenschaften aufweist (Dalluge et al., 1998). Um die Trennleistung der Methode zu optimieren, wurde diese stationäre Phase hinter der Säule Luna RP-C18 column (Phenomenex) angebracht, und durch Modifikation der Säulentemperatur, des Gradienten und der Flußrate wurden die HPLC Parameter auf die angegebenen Werte eingestellt (siehe Tabelle 3). Auf diese Weise konnten die vorangegangenen Ergebnisse weiter optimiert werden, wie aus Abbildung 8 hervorgeht. Die resultierenden Chromatogramme wiesen darüber hinaus, nach der Einführung einer zweiten analytischen stationären Phase und durch Variation der Gradientenzusammensetzung, eine bessere Auflösung, Peaks ohne auffälliges Fronting/Tailing und stabile Retentionszeiten auf.

Beispielchromatogramme einer Standardmischung und einer Plasmaprobe, der eine Standardmischung zudotiert wurde (20-120 nmol/l), sind in Abbildung 8 und 9 dargestellt. Die Identifizierung der Peaks wurde durch Vergleich ihrer Retentionszeiten (siehe Tabelle 18) mit denen der Standardsubstanzen erreicht und weiter bestätigt durch den Vergleich ihrer UV-Spektren mit den Referenzspektren der jeweiligen Standards, die mittels des verwendeten Dioden-Array-Detektors aufgezeichnet wurden. Abbildung 25 zeigt ein Beispiel für ein Chromatogramm einer "low-polyphenol" Plasmaprobe. Dabei werden die UV-Spektren der detektierten Analyten im Vergleich mit den UV-Spektren der Standards dargestellt. Andere Studien sind aufgrund der ausschließlichen Verwendung von UV-Detektoren bei einer Wellenlänge von 270 nm (Brolis et al., 1998) bzw. 370 nm (Ewald et al., 1999) zum Nachweis von Flavonen und Flavonolen in ihrer Sensitivität und Selektivität limitiert.

Es gibt eine Reihe von Veröffentlichungen, die sich mit der Untersuchung phenolischer Substanzen aus verschiedenen Matrices beschäftigen. Trennsysteme für Polyphenole in Lebensmitteln sind bisher aber hauptsächlich auf die Messung spezifischer Flavonoide in einem bestimmten Nahrungsmittel wie z.B. Weintrauben oder Weine (Faustino et al., 2003; Chamkha et al., 2003), Tee (Powell et al., 1993; Shao et al., 1995; Manning und Roberts 2003; Bronner und

Beecher, 1995) oder Äpfel (Treutter, 1988; Lister et al., 1994) hin ausgerichtet. Viele dieser Systeme wurden auch bereits erfolgreich angewendet, um verschiedene Gesichtspunkte der Pflanzenphysiologie oder ihrer Biosynthese zu klären. Diese Untersuchungen bilden die Basis für Lebensmittel-Zufuhrtabellen von Flavonoiden und Phenolsäuren.

Bislang ist allerdings noch kein HPLC-Verfahren entwickelt worden, das Polyphenole aus fünf Flavonoid- sowie beiden Phenolsäureklassen in Humanplasma qualitativ und quantitativ bestimmt (Merken und Beecher, 2000; Paganga et al., 1999). Früher wurden schon viele analytische Untersuchungen in biologischen Matrices durchgeführt, die ein besseres Verständnis der vermuteten Rolle von Polyphenolen beim Schutz vor Krankheiten, die durch oxidative Schädigungen hervorgerufen werden, prüfen (Manach et al., 1998; Nie et al., 2001) oder ihre Bioverfügbarkeit untersuchen (Scalbert und Williamson, 2000; Lesser et al., 2004). Bis jetzt konzentrierten sich aber auch solche Untersuchungen auf einzelne Substanzen, z.B. Quercetin (Jones et al., 1998), Apigenin (Nielsen und Dragsted, 1998), oder einzelne Untergruppen, wie die der Isoflavone (Nurmi und Adlercreutz, 1999; Verkasalo et al., 2001). Der Bedarf an weiterführenden in vivo Studien und an Methoden zur gleichzeitigen Bestimmung der fünf wichtigsten Flavonoidgruppen (Catechine, Flavonole, Flavanone, Flavone und Isoflavone) sowie beider Phenolsäureklassen (Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren) wurde wiederholt angesprochen (Merken und Beecher, 2000; Robbins, 2003). Der hier vorgestellte Beitrag erfüllt diese Forderung und stellt damit eine Methode bereit, die auf verschiedene Humanstudien angewendet werden kann, um auf diese Weise die Bedeutung der Polyphenolen in der Ernährung weiter aufzuklären.

In der Literatur wird die RP-HPLC mit UV-spezifischer Detektion als die verbreitetste Technik zur Bestimmung phenolischer Antioxidantien beschrieben (Merken und Beecher, 2000; Robbins, 2003). Andere weniger häufig genutzte Detektionssysteme, die jedoch eine höhere Empfindlichkeit ermöglichen, sind vor allem elektrochemische, fluoreszenz und massenselektive Detektoren (Robbins, 2003). Bekanntermaßen ist die massenselektive Detektion eine fortschrittliche Detektionstechnik, die immer häufiger angewendet wird (Robbins, 2003; Pirker et al., 2004). Kammerer et al. (2004) untersuchten den Gehalt phenolischer Komponenten in roten und weißen Trauben mittels HPLC-DAD-MS/MS und berücksichtigten dabei als erste Studie alle Untergruppen der Polyphenole in Lebensmitteln. Bisher steht jedoch noch keine LC/MS- oder GC/MS-Methode zur Verfügung, mit der die wichtigsten fünf Gruppen der Flavanoide und beide Phenolsäuregruppen in Plasma bestimmt werden und die daher in epidemiologischen Studien angewendet werden kann und dadurch geeignet ist, vergleichbare Daten zu diesem Thema zu liefern. Um die hier vorgelegten Ergebnisse mit Daten zu vergleichen, die mittels HPLC-ESI-MS gewonnen wurden, sind Plasmaproben (0,5 – 1,0 ml) von einem Kooperationspartner untersucht

worden (Dr. R.W. Owen, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg; Owen et al., 2000). Außer den Isoflavonen und in Proben mit hohen Catechin- oder Salicylsäurekonzentrationen (Aspirineinnahme) konnten die Polyphenole jedoch nicht detektiert werden.

Die lange Laufzeit der vorliegenden Methode resultiert daraus, dass die untersuchten Substanzen sich in ihrer Struktur/Polarität einerseits stark ähneln, da es sich zum Teil um Vertreter der gleichen Substanzklasse handelt (z.B. Epigallocatechin und Catechin). Daher wurde die Trenndauer erhöht, um eine ausreichende Auflösung zu erhalten. Andererseits unterscheiden sich die polaren, wasserlöslichen Phenolsäuren und Catechine von den unpolaren Flavonoiden in ihren Charakteristika gegenüber den verwendeten Sorbentien, was die Verwendung relativ großer Polaritätsbereiche (0 – 60 % Methode) und einen komplexeren Gradienten erforderlich machte. Da für die Bestimmung nur sehr geringe Probenvolumina (0,3 – 1,0 ml) benötigt werden, ist diese Methode zum Einsatz in epidemiologischen Studien, zur Untersuchung der postulierten Wirkungen sekundärer Pflanzenstoffe beim Menschen sehr gut geeignet.

5.1.1 Stabilität während der Probenmessung

Um die lange Laufzeit der HPLC-Bestimmung zu berücksichtigen, wurde eine Test-Serie durchgeführt, mit der das Maß eines möglichen Abbaus der oxidationsempfindlichen Polyphenole innerhalb von 24 Stunden bei Raumtemperatur bestimmt werden sollte. Zu diesem Zweck wurde gepooltes Humanplasma mit einer Standardmischung zu den zu prüfenden Polyphenolen dotiert. Das gespikete Plasma wurde bei Raumtemperatur über eine Zeitspanne von 24 h hinweg mittels HPLC untersucht. Die Peakflächen wurden alle zwei Stunden integriert und Änderungen der Peakflächen wurden aufgezeichnet. Die Peakflächen sowohl des internen Standard (Fisetin) als auch der Analyten verringerten sich innerhalb von 24 h durchschnittlich um 9 %, (siehe Abbildung 34). Diese geringe Abbaurate, wurde durch den Zusatz von Ascorbinsäure als Antioxidant erreicht. Ohne Zusatz von Antioxidantien zum Schutz der Polyphenole vor Degradation war die Wiederfindung der Analyten in diesem Versuchsansatz sehr gering und schwankte zwischen 2 – 67 %.

5.1.2 Interner Standard

Aufgrund seines ähnlichen chromatographischen Trennverhaltens wurde Fisetin als interner Standard zur Quantifizierung ausgewählt. Um eine richtige Analyse zu erreichen, musste die Abwesenheit dieser Verbindung in der Probe geprüft werden. Fisetin wird, wie anzunehmen ist, in den hier zu untersuchenden Plasma-, Erythrozyten- und Lebensmittelproben nicht vorkommen, da natürliche Quellen mit hohen Gehalten an Fisetin Färbersumach (wird zum Teppichfärben verwendet) und Nesseln sind, die in der erwarteten Ernährung keine Rolle spielen.

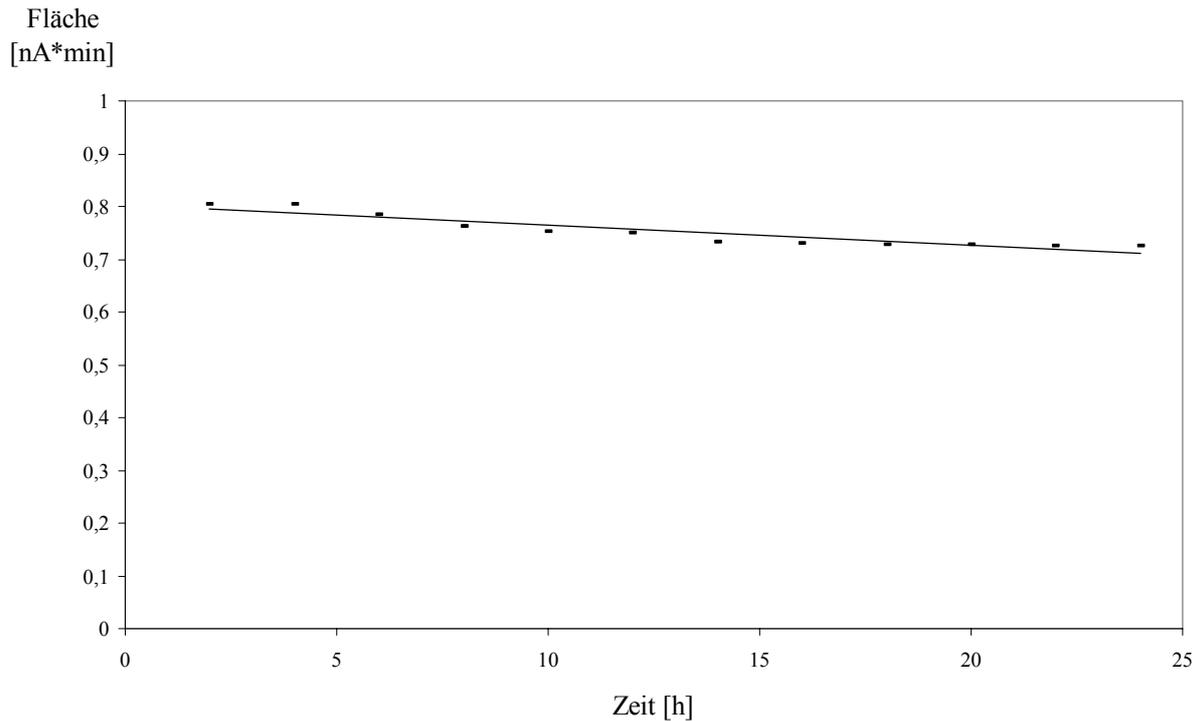


Abb. 34: Abnahme der Peakfläche von Galocatechin innerhalb von 24 h bei Raumtemperatur

5.1.3 Extraktionstechniken

Bei der Probenaufarbeitung fällt der Extraktion der Analyten aus der Probenmatrix eine besondere Bedeutung zu. Da die Methode im Rahmen dieser Arbeit in epidemiologischen Studien angewandt werden sollte, war es in erster Linie wichtig, die Detektorsensitivität zu erhöhen. Deshalb wurde zur elektrochemischen Detektion der Polyphenole eine hohe Meßspannung angelegt (siehe Kapitel 4.2.5). Um die Interferenzen, die beim Einsatz einer hohen Meßspannung zu erwarten sind, zu minimieren, muss ein Aufreinigungsverfahren verwendet werden, welches störende Matrixbestandteile ausreichend entfernen kann. Die Extraktionstechniken, die im Rahmen der Methodenentwicklung zur Bestimmung der phenolischen Antioxidantien in wässrigen Proben getestet wurden, basieren auf dem Flüssig-Flüssig- und dem Fest-Flüssig-Verteilungsprinzip. Als Testmatrizes wurden demineralisiertes Wasser und gepooltes Humanplasma verwendet, die beide jeweils mit den interessierenden phenolischen Komponenten dotiert wurden.

Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion (Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln im Reagenzglas) wurde in Anlehnung an die Methode von Maiani et al. (1997) durchgeführt. Es wurden verschiedene Extraktionsmittel, unter anderem Aceton, Ethylacetat, Methanol, Ethanol,

Acetonitril und verschiedene Mischungen daraus getestet. Mit den meisten Vorversuchen zur Flüssig-Flüssig-Extraktion von gepooltem Humanplasma ließ sich jedoch keine ausreichend hohe Isolierung der Polyphenole von Matrixbestandteilen erreichen und diese Vorversuche resultierten in Chromatogrammen, die Störpeaks aufwiesen, welche die Polyphenolsignale überdeckten und somit die weitere Auswertung verhinderten. Die Extraktionen mit Ethylacetat und Methanol erbrachten zwar bessere Ergebnisse, allerdings war die Wiederfindung nicht für alle 23 Substanzen befriedigend. Das Ausschütteln im Reagenzglas wurde daher aufgrund des aufwändigen Verfahrens und vor allem wegen mangelnder Reproduzierbarkeit und niedriger Wiederfindungsraten nicht verwendet.

Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (engl.: Solid Phase Extraction (SPE)) stellt eine sehr gute Alternative zur Flüssig-Flüssig-Extraktion dar. Merken und Beecher (2000) berichten, dass sich die Festphasenextraktion (SPE) aufgrund ihrer höheren Substratspezifität zur Aufarbeitung von Lebensmitteln mit niedrigen Flavongehalten eignet. Die Festphasenextraktionsmethode wurde daher auch in der vorliegenden Studie zur Extraktion von Plasma-, Urin- und Erythrozytenproben verwendet. Bei der SPE werden die zu extrahierenden Komponenten auf speziellen Adsorbentien angereichert und anschließend mit einem Lösungsmittel eluiert (siehe Abbildung 35). Durch Auswahl des Adsorbens (Festphasenmaterial) und eines geeigneten Elutionsmittels ist neben der Extraktion eine Abtrennung von Matrixbestandteilen möglich.

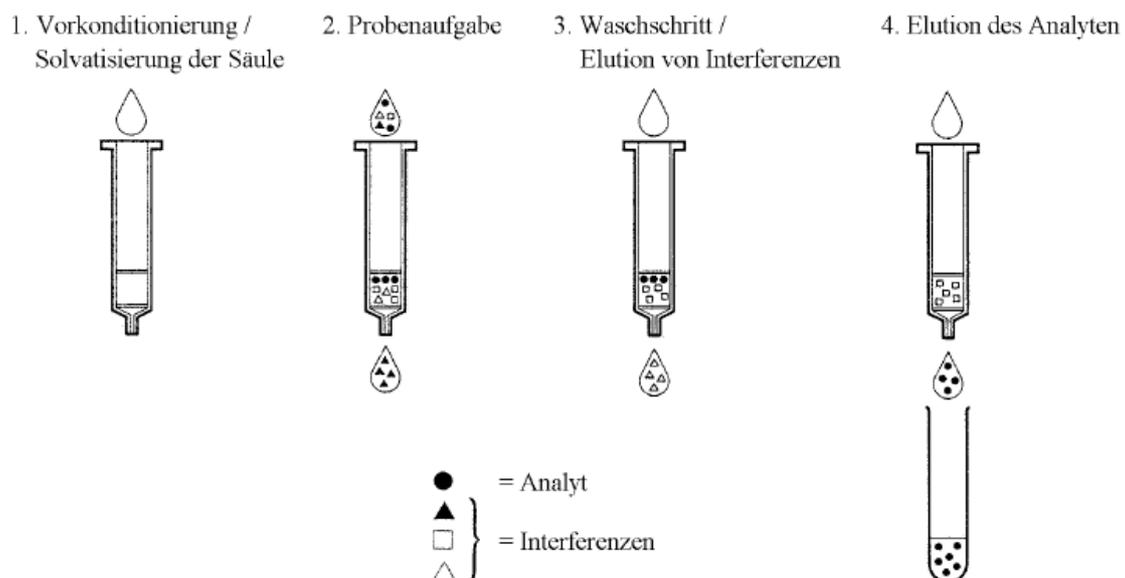


Abb. 35: Schematischer Ablauf der Festphasenextraktion für Plasma, Erythrozyten und Urin

Eine Vielfalt an chemisch modifizierten Silikatphasen (z.B. Reversed Phase mit n-Alkyl-, Cyanopropyl-, Phenylgruppen etc.), die zur Extraktion eingesetzt werden können, decken einen breiten Polaritätsbereich ab. Weitere Vorteile der SPE sind ein geringer Lösungsmittelverbrauch und vor allem eine einfache Handhabung, die die Extraktion von mehreren Proben bei gleichem Arbeitsaufwand ermöglicht. Die Festphasenextraktion ist eine sehr gängige Methode zur Anreicherung von Komponenten im Spurenbereich aus geringen Plasmavolumina. Bisher wurde jedoch noch kein SPE-Verfahren beschrieben, mit dem alle 23 in dieser Arbeit untersuchten Polyphenole isoliert werden konnten.

Ziel bei der Entwicklung eines Festphasenextraktionsverfahrens war es, Matrixbestandteile derart zu entfernen, dass Interferenzen mit den Analyten soweit wie möglich vermieden werden können und dabei ausreichende Wiederfindungsraten und akzeptable Reproduzierbarkeiten (sowohl interday als auch intraday) für alle Substanzen zu erreichen.

5.2 Validierung der Methode

5.2.1 Linearität und Nachweisgrenzen

Die Linearität, die der chromatographischen Analyse zugrunde gelegt ist, wurde mittels linearer Regression geprüft und ist anhand von Kalibrationskurven dargestellt worden (siehe Anhangstabelle A2). Die Kalibrationskurven der interessierenden Polyphenole wurden erstellt, indem die Peakflächen, aus der Einspritzung einer Verdünnungsreihe von Standardsubstanzen, gegen die bekannten Konzentrationen der jeweiligen Standardverdünnung aufgetragen wurden. Die resultierenden Regressionsgeraden waren für alle Analyten linear, mit einem Regressionskoeffizienten von $r^2 > 0,99$ (siehe Tabelle 19). Die ermittelten, linearen Bereiche umfassen den zu erwartenden Konzentrationsbereich der Polyphenole (siehe Tabelle 20). Bei der Messung der Proben der BVS II-Studie und der EPIC-Studie stellte sich jedoch heraus, dass in einigen Proben Konzentrationen vorkamen, die über dem erwarteten Bereich lagen. Betroffen waren die Hydroxybenzoesäuren Salicylsäure, Syringasäure und Gentsinsäure. Ihre hohen Konzentrationen sind gesondert zu betrachten, da sie nicht im linearen Bereich des Messverfahrens liegen.

Die Nachweisgrenzen wurden definiert als diejenige Konzentration, die einem Peak entspricht, der durch ein Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1 hervorgerufen wird. Die Nachweisgrenzen wurden anhand von acht Doppeleinspritzungen (je 30 μ l) bestimmt. Die Prüfung der Sensitivität wurde mit gepooltem, „low-polyphenol“ Humanplasma durchgeführt, welches mit einer Polyphenol-Standardmischung gespiked wurde. Die Konzentration an Polyphenolen im gepoolten

Plasma wurde zur Berechnung von der Gesamtkonzentration abgezogen. Die Methode ist mit Nachweisgrenzen zwischen 1,5 – 22,3 nmol/l für die betreffenden Substanzen äußerst sensitiv, was hauptsächlich auf den Einsatz eines elektrochemischen Detektors zurückzuführen ist. (siehe Tabelle 23).

Der elektrochemische Detektor spricht auf Stoffe an, die entweder oxidierbar oder reduzierbar sind, wie z.B. Phenole. Die mobile Phase strömt kontinuierlich an den Elektroden dieses Detektors vorbei und erzeugt dabei einen Grundstrom, der im Optimalfall konstant ist, im Normalfall jedoch innerhalb gewisser Bereiche schwankt (Grundrauschen). Wenn die grundliniengetrennten Analyten an der Elektrodenoberfläche vorbeiströmen, entsteht ein Detektorsignal, das durch den Elektronenfluss erzeugt wird, der auf der Elektrodenoberfläche im Detektor durch diese Oxidations- oder Reduktionsprozesse entsteht. Wenn die Reaktion quantitativ abläuft (dabei werden alle Analyten oxidiert oder reduziert), hört der Elektronenfluss auf und das elektronische Detektorsignal ist proportional zur Gesamtmenge der Analyten in der Probe. Diese Arbeitsweise wird amperometrische Detektion genannt und wurde in dieser Arbeit angewandt. Der elektrochemische Detektor benötigt drei Elektroden, eine Arbeitselektrode (hier findet die Oxidation oder Reduktion statt), eine Hilfselektrode und eine Referenzelektrode, die eventuelle Schwankungen in der background-Leitfähigkeit der mobilen Phase kompensiert. Die Prozesse, die auf der Elektrodenoberfläche stattfinden, sind sehr komplex, aber die Vorgänge die hauptsächlich stattfinden, lassen sich folgendermaßen charakterisieren. An der Oberfläche der Arbeitselektrode läuft die Oxidation sehr schnell und nahezu vollständig ab. Als Folge davon wird der Analyt in der Schicht, die direkt an die Elektrodenoberfläche angrenzt, praktisch völlig abgebaut. Dadurch entsteht ein Konzentrationsgradient zwischen der Elektrodenoberfläche und dem restlichen Lumen der Detektorzelle. Dieser Gradient verursacht einen Zustrom des Analyten zur Oberfläche der Arbeitselektrode der von der Konzentration des Analyten in der Probe und der Schärfe der Trennung abhängig ist. Somit wird der Elektronenfluss mit der Rate gemessen, mit der die Analyten der Elektrode zuströmen, und da der Prozess diffusionskontrolliert abläuft, hängt das Detektorsignal neben der Analytenkonzentration von der Viskosität bzw. dem Diffusionsvermögen der mobilen Phase ab.

Der Einsatz eines elektrochemischen Detektors bei dieser Methode führt zu Grenzen der Nachweisbarkeit, die niedriger liegen als die mittels LC/ESI-MS ermittelten Nachweisgrenzen (Cremin et al., 2001; Crozier et al., 1997; Franke et al., 2002; Soleas et al., 2001). Cremin et al. (2001) ermittelten für Kaffeesäure und Ferulasäure mittels LC/ESI-MS Nachweisgrenzen von 10,0 nmol/l und 12,0 nmol/l respektive. In einem Methodenvergleich von Bocchi et al. (1996) erwies sich die elektrochemische Detektion von Kaffeesäure und Ferulasäure bezüglich Sensitivität und Selektivität der UV- und MS-Detektion als überlegen. In früheren

Veröffentlichungen wurden Nachweisgrenzen von 1,9 nmol/l (Quercetin) für elektrochemische Detektion (Erlund et al., 1999), 17,2 nmol/l (Catechin) für fluoreszenz Detektion (Jones et al., 1998) und 275 nmol/l (Catechin) für UV-Detektion (Erlund et al., 1999) dargestellt.

Wie bereits diskutiert, liegt die Nachweisgrenze mit UV-Detektoren höher als die Detektion von fluorochromen Derivaten der Catechine, die aus der Gruppe der Polyphenole am häufigsten mit dieser Nachweismethode detektiert werden. Durch Verwendung eines elektrochemischen Detektors konnte die Nachweisgrenze für aromatische Polyphenole häufig noch weiter gesenkt werden, was zu Grenzwerten führte, die auch im Rahmen dieser Arbeit erreicht wurden. Da eine Reihe von Substanzen untersucht wurden, die sich in ihrem Redoxverhalten an der Detektorelektrode merklich unterscheiden können, musste die Meßspannung der Detektion anhand geeigneter Leitsubstanzen ermittelt werden. Wie in Kapitel 4.1.5 beschrieben (siehe Abbildung 24), wurden Quercetin und Kämpferol aufgrund ihres vermuteten hohen Vorkommens in den zu untersuchenden Proben als Leitsubstanzen zur Optimierung des elektrochemischen Detektors ausgewählt. Naturgemäß variieren die Nachweisgrenzen in Abhängigkeit von der eingesetzten Meßspannung. Im Bezug auf die Frage nach der Verlässlichkeit von Messwerten die nahe der Nachweisgrenzen eines Systems liegen, arbeitet man heute häufig mit einer Bestimmungsgrenze, die sich für gewöhnlich aus der dreifachen Nachweisgrenze herleitet. Da aber in dieser Arbeit teilweise sehr niedrige Konzentrationen erwartet wurden, besonders in Bezug auf Stoffe, die bevorzugt in Lebensmitteln vorkommen, welche in den betrachteten Studienkollektiven nur selten verzehrt werden (z.B. Daidzein ein Isoflavon aus Sojaprodukten), oder solche, die manigfaltigen Abbaureaktionen unterworfen sind (z.B. Epigallocatechingallat zu Epigallocatechin), war es bei der Methodenerstellung sehr wichtig, auch geringe Konzentrationen noch erfassen zu können. Deshalb wurde hier auf die Festlegung einer Bestimmungsgrenze verzichtet, da es sich bei dieser Untersuchung um ein Verfahren handelt, das als bisher erster Versuchsansatz eine Reihe von Polyphenolen aus unterschiedlichen Substanzklassen aus Plasma in epidemiologischen Studien prüft.

5.2.2 Wiederfindung und Reproduzierbarkeit

Die Richtigkeit dieser Methode wurde anhand der prozentualen Wiederfindung aus einer Reagenzienblindprobe (dest. Wasser) bestimmt sowie aus gepooltem Humanplasma, dem eine Standardlösung mit bekannten Konzentrationen zudosiert wurde. Da eine Analyten-freie Plasmamatrix nicht zur Verfügung stand, wurde gepooltes Humanplasma analog untersucht und die Ergebnisse wurden von den Konzentrationen des gespikten Humanplasma abgezogen. Dabei wurde jeder Versuch als Doppeleinspritzung durchgeführt. Der Vergleich der Wiederfindung aus

der Reagenzienblindprobe mit der Wiederfindung aus Plasma zeigt, dass mit der verwendeten Extraktionsmethode alle interessierenden Probekomponenten quantitativ erfasst werden können (siehe Tabelle 22), da es zu keinen auffälligen Abweichungen zwischen der Wiederfindung aus matrixfreiem Medium (dest. Wasser) und Plasma kommt. Mit der verwendeten Extraktionsmethode können demnach polyphenolbindende Plasmaproteine entfernt werden und es kommt zu vollständiger oder nahezu vollständiger Desorption der Analyten von Matrixbestandteilen.

Die Reproduzierbarkeit dient als Maß für die Präzision einer Messmethode und wurde in der vorliegenden Arbeit durch Doppelanalyse von acht gespikten Humanplasmaproben als Intra-day-assay und durch Doppelanalyse von sechs gespikten Humanplasmaproben an fünf aufeinanderfolgenden Tagen als Inter-day-assay (siehe Tabelle 21) untersucht. Die Ergebnisse der Intra- und Inter-day-assays (ausgedrückt als Variationskoeffizienten VK %) lagen für alle Komponenten unter 10 % und reflektieren auf diese Weise eine Methode von ausreichender Genauigkeit für die vorgesehenen Anwendungen.

5.2.3 Selektivität

Das Thema der Selektivität und der Reproduzierbarkeit wurde bereits ausführlich von den Kollegen Dolan et al. (2000) angesprochen. Da diese Methode unter anderem in epidemiologischen Studien eingesetzt werden soll, in denen oft nur geringe Plasmavolumina zur Verfügung stehen, war es äußerst wichtig, die Detektorsensitivität zu optimieren. In einem Methodenvergleich zur Bestimmung von Kaffeesäure und Ferulasäure erwies sich die elektrochemische Detektion bezüglich Sensitivität und Selektivität der UV- und MS-Detektion als überlegen (Bocchi et al. 1996). Auch für verschiedene Flavonoide konnten mittels HPLC und elektrochemischer Detektion bereits Nachweisgrenzen im unteren nmol Bereich erzielt werden (Erlund et al. 1999; Lee et al. 2000). Aufgrund der hohen Selektivität gegenüber phenolischen Substanzen (Robbins, 2003; Peaston und Weinkove, 2004) wurde die HPLC-Detektion zur quantitativen Bestimmung mittels Gleichstromamperometrie durchgeführt. Das Screening für ein geeignetes Potential wurde ausgeführt, indem verschiedene elektrochemische Spannungen und die resultierenden Peakflächen gegeneinander aufgetragen wurden (siehe Abbildung 24). Cao et al. (1997) berichteten schon früher, dass Flavonoide hohe Oxidationspotentiale haben, was die Entscheidung für die Verwendung einer hohen Meßspannung mitbeeinflusst hat. Zusätzlich zur empfindlichen, elektrochemischen Detektion wurde die Signalidentität mittels Dioden-Array Detektor verifiziert, da Flavonoide und Phenolsäuren UV-Licht in einem Bereich zwischen 230 und 380 nm absorbieren (Robbins, 2003). Das Chromatogramm in Abbildung 25 zeigt die

Polyphenole, die in Nüchternplasma detektiert werden konnten (ECD). Die UV-Spektren der Peaks zeigen, dass mit dieser Methode eine gute Selektivität für die in Nüchternplasma detektierten Polyphenolen erreicht werden kann und weisen in Verbindung mit der jeweiligen Retentionszeit eine hohe Nachweisgenauigkeit auf.

Um die Möglichkeit von Interferenzen mit der Probematrix, die aus der Anwendung hoher Potentiale entstehen könnte, zu minimieren, wurde zur Festphasenextraktion ein makro-poröses Co-Polymer [Poly(divinyl-benzol-co-N-vinylpyrrolidon)] als stationäre Phase der SPE-Säule verwendet, die sowohl hydrophile als auch lipophile Kapazität aufweist (Oasis HLB, Waters). Dieses Säulenmaterial wurde bereits zuvor von verschiedenen Arbeitskreisen erfolgreich eingesetzt und zeigte dabei gute Trennungseigenschaften (Peruzzi et al., 2000; Pirker et al, 2004; Blackwell et al., 2004).

5.3 Polyphenolkonzentrationen im Plasma der Teilnehmer/innen der Bayerischen Verzehrsstudie II

Die Plasmaproben der hier untersuchten 568 Testpersonen stammen aus dem Kollektiv der BVS II-Studie (siehe Kapitel 2.3.1). Es wurden alle gewonnenen Plasmaproben der befragten Probanden zur HPLC-Analyse verwendet. Da die Ziehung der Stichproben durch ein dreistufiges Random-Route-Verfahren erfolgte, ist das vorliegende bayerische Teilkollektiv als hinreichend repräsentativ anzusehen, obwohl eine bevorzugte Teilnahme durch ernährungsbewusste Studienteilnehmer an dieser Studie nicht auszuschließen ist.

Während es sich bei den meisten der bisher veröffentlichten Publikationen zur Messung von Plasma-Polyphenolkonzentrationen im Wesentlichen um Interventionsstudien handelt, steht diesen Untersuchungen mit der Bayerischen Verzehrsstudie II eine Querschnittsstudie von in Privathaushalten lebenden, deutsch sprechenden Personen in Bayern gegenüber. Dieser Unterschied dürfte sich dementsprechend auch in den jeweils beobachteten Plasmakonzentrationen widerspiegeln.

Vor einigen Jahren wurde die Notwendigkeit betont, die Resorption von sekundären Pflanzenstoffen zu untersuchen, um weiterführende Einsichten über deren Bioverfügbarkeit oder über die Möglichkeit ihrer Verwendung als Biomarker zu erhalten. Heute steht eine große Anzahl von Studien zur Bioverfügbarkeit von speziellen phenolischen Inhaltsstoffen zur Verfügung (Kern et al., 2003; Erlund et al., 1999; Seeram et al., 2004). Dabei werden jedoch in erster Linie die durch Zufuhr eines speziellen, polyphenolreichen Lebensmittels (z.B. Zwiebeln) erreichten Plasmakonzentrationen bestimmt und der Resorptionsverlauf gemessen. Meist stammen die zugeführten, interessierenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe bei diesen Untersuchungen aus einer Polyphenolquelle und die untersuchten Leitstrukturen beinhalten meist nur eine Substanzklasse der Flavonoide oder der Phenolsäuren (Kern et al., 2003; Manach et al., 2003). Wenn man die große Anzahl von Komponenten und die Komplexität von Plasma bedenkt, ist die Identifizierung mehrerer Peaks ein problematisches Thema (Robbins, 2003). Bei Plasmaproben können Interferenzen auch unter den gegebenen Bedingungen nicht gänzlich vermieden werden. Das trifft besonders auf die Untersuchung von sehr geringen Konzentrationen zu. Störende Interferenzen wurden in dieser Methode durch die Auswahl schonender und selektiver Aufarbeitungsmethoden und durch angepasste Systemparameter vermindert, wie bereits in Kapitel 5.2 erläutert. Wenn Störungen auftraten (gemessen am UV-Spektrum), wurden die Daten verworfen. Die ermittelten Plasmakonzentrationen wurden statistisch geprüft und signifikante Unterschiede sowie Korrelationskoeffizienten in ausgewählten Teilgruppen

dargestellt (siehe Kapitel 4.3). Die Tabellen 24 – 26 zeigen die Polyphenolkonzentrationen im Plasma des Studienkollektives, die Tabellen 29 – 42 zeigen die Polyphenolkonzentrationen nach Alter, BMI, Waist-to-Hip-Ratio, Rauchstatus und Schichtzugehörigkeit. Ebenso wie bei Hertog et al. (1992) basieren unsere Berechnungen auf den Aglykonmassen bzw. den Massen der freien Säuren (Hertog et al., 1992a; Hertog et al., 1992b; Hertog et al., 1993a). Die Bestimmung der Aglykone bringt den analytischen Vorteil mit sich, dass alle unterschiedlichen, bekannten und unbekanntem Konjugate eines Analyten erfasst werden können und sich somit Konzentrationen an freien Flavonoiden und Phenolsäuren ergeben, die über den jeweiligen Einzelkonzentrationen liegen und dadurch eher über den entsprechenden Nachweisgrenzen erfasst werden können. Sowohl im Hinblick auf die Absorption als auch auf die biologische Wirksamkeit der Polyphenole dürfte es jedoch von Bedeutung sein, dass der Großteil der Flavonoide im Lebensmittel in glykosidischer Form vorliegt (Herrmann, 1993; Hollman et al., 1995; Hollman und Katan, 1995). Für Flavonoide wie beispielsweise Quercetin (Hollman et al., 1995; Hollman et al., 1997a) oder Naringenin und Hesperetin (Erlund et al., 2001) liegen auch Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit der Flavonoidglykoside aus Lebensmitteln vor. Häufig beziehen sich solche Untersuchungen auf die Glykoside in Form von Standardsubstanzen oder auf einzelne Lebensmittel (Hollman et al., 1999; Morand et al., 2000; Felgines et al., 2000).

Bei den vorliegenden Untersuchungen konnten alle ausgewählten Analyten in den Plasmaproben gefunden werden. Wie erwartet streuen die gefundenen Werte über einen sehr weiten Bereich (siehe Tabelle 24 – 26). Die bei den Männern gefundene minimale Plasmakonzentration für die Summe der Flavonole betrug 3,26 nmol/l. Für alle anderen Flavonoide lagen die Minimalkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze. Dieses Ergebnis korrespondiert gut mit der Annahme, dass die Flavonole und besonders deren Vertreter Quercetin und Kämpferol von allen Flavonoiden in der Ernährung am weitesten verbreitet sind (Manach et al., 2004). Allerdings ist zu beachten, dass auch die Gruppe der Catechine in Lebensmitteln in großen Mengen vorkommen (Scalbert und Williamson, 2000). Diese Tatsache wird in der hier vorliegenden Studie durch die hohe Plasmakonzentration der Catechine, im Vergleich zu den anderen Flavonoiden belegt. In Abbildung 35 werden die Verhältnisse der ermittelten Konzentrationen an Flavonoiden und Phenolsäuren für das gesamte Studienkollektiv graphisch dargestellt.

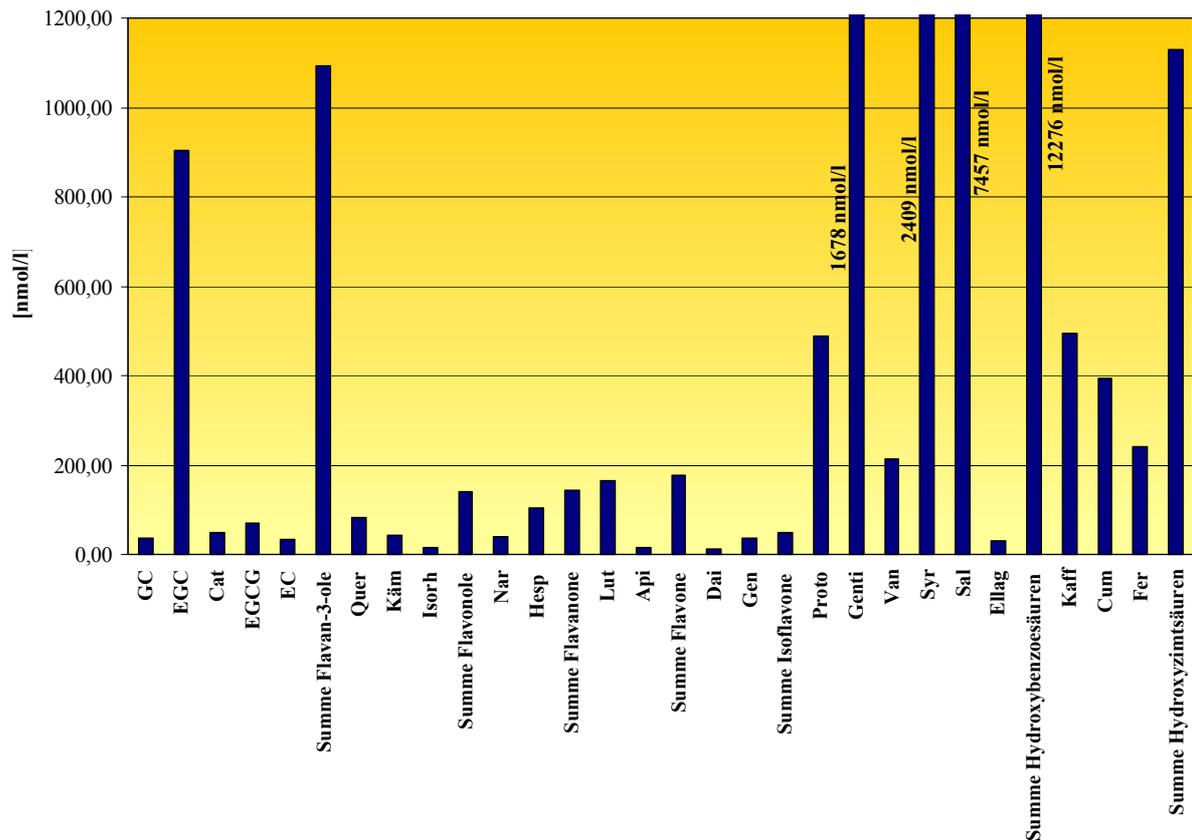


Abb. 36: Mittlere Polyphenolkonzentrationen im Studienkollektiv der BVS II-Studie (n=568)

Die große Variation der Plasmakonzentration resultiert aus verschiedenen Faktoren, zB. die Variation der Polyphenole aus verschiedenen Lebensmittelquellen (Perez-Illarbe et al., 1991; Pierpoint, 1986). Die Schwankung der Flavonoidgehalte in pflanzlichen Lebensmitteln (siehe Tabelle 12), ist abhängig von Sorte, Wachstumsbedingungen, Reifestadium und küchentechnischer Verarbeitung. Es ist aber auch davon auszugehen, dass Ernährungsgewohnheiten und Verwendung von Nahrungsergänzungsmitteln oder Arzneimitteln (z.B. Aspirin) zu der beobachteten breiten Streuung der Plasmakonzentrationen führen.

Der Hauptfaktor für die große Variation der Plasmakonzentration sind jedoch die Unterschiede in der Bioverfügbarkeit und die schnelle Metabolisierung der Polyphenole. Die Frage nach der Bioverfügbarkeit von Polyphenolen beinhaltet Themen wie die intestinale Absorptionsrate, die Metabolisierung durch die Darmflora, den intestinalen und hepatischen Metabolismus, die Plasmakinetik, die Beschaffenheit der im Blutkreislauf zirkulierenden Metaboliten, das Bindungsverhalten an Albumin, die Aufnahme in die Zellen, den intrazellulären Metabolismus, Anreicherung in den Organen und die Art der Ausscheidung (Hollman et al., 1995; Zubig und Meydan, 2003; Setchell et al., 2002; Erlund et al., 2000; Morand et al., 1998; Boulton et al., 1998; Fiorani et al., 2003; Wolfram et al., 2002; Williamson et al., 2000; Choudhury et al., 1999).

Aufgrund des schnellen Umsatzes der Substanzen im Körper (Manach et al., 2004; Erlund, 2001) können nur die in den letzten Tagen zugeführten Substanzen gefunden werden (siehe Tabelle 50). Daher sind die Plasmawerte für diese Polyphenole vermutlich als short-term Biomarker anzusehen.

Flavan-3-ole

Manach et al. (2004) berichten, dass die Plasmakonzentration der Catechine von ihrer Zufuhrquelle abhängig ist. Bei Verzehr von Grünem Tee (90 – 150 mg Flavanol), Kakao (70 – 165 mg Flavanol) oder Rotwein (35 mg Flavanol) wurden 0,1 – 0,7 $\mu\text{mol/l}$, 0,25 – 0,7 $\mu\text{mol/l}$ und 0,09 $\mu\text{mol/l}$ Catechin bzw. Epicatechin respektive, im Plasma der teilnehmenden Probanden gefunden. Diese Flavanole wurden dabei ebenso effektiv absorbiert, wie z.B. Quercetin aus Äpfeln oder Zwiebeln. In unserem Kollektiv liegt die mittlere Plasmakonzentration der Catechine mit 1,09 $\mu\text{mol/l}$ über dem oben beschriebenen Bereich. Den größten Anteil davon liefert Epigallocatechin mit 0,90 $\mu\text{mol/l}$. Epicatechin und Catechin hingegen wiesen mit 0,035 $\mu\text{mol/l}$ und 0,05 $\mu\text{mol/l}$ im Mittel niedrigere Plasmakonzentrationen auf (siehe Tabelle 24).

In anderen Untersuchungen wurden nach einmaliger Gabe von 1,5 mmol Epigallocatechingallat oder Epigallocatechin maximale Plasmakonzentrationen gefunden, die zwischen 1 – 5 $\mu\text{mol/l}$ schwankten (Van Amelsvoort et al., 2001). Die Eliminationshalbwertzeiten von Epigallocatechingallat und Epigallocatechin betragen 2 – 4 h. In unserem Kollektiv liegen die maximalen Plasmakonzentrationen mit 0,91 – 2,92 $\mu\text{mol/l}$ im Bereich dieser Werte. Anhand ihrer Ergebnisse vermuten Van Amelsvoort et al. (2001), dass die beobachteten Catechine in begrenztem Maße Umwandlungsreaktionen unterliegen ($\text{ECG} \rightarrow \text{EGCG} \rightarrow \text{EGC}$) und schlussfolgern, dass sich Catechine in ihrem pharmakokinetischen Verhalten deutlich voneinander unterscheiden.

Ruidavets et al. (2000) untersuchten, durch welche Lebensmittel der so genannten mediterranen Kost, die aufgrund ihres hohen Gehaltes an Obst und Gemüse als der Gesundheit förderlich bewertet wird, hauptsächlich Catechine zugeführt werden. Bei obst- und gemüsereicher Ernährung, aber ohne Weinkonsum, fanden sie Plasmakonzentrationen an (+)-Catechin von 1,5 $\mu\text{mol/l}$, bei Verzehr von Wein, aber obst- und gemüsearmer Ernährung 2,1 $\mu\text{mol/l}$, bei obst- und gemüsearmer Ernährung ohne Weinkonsum 0,45 $\mu\text{mol/l}$ und bei obst- und gemüsereicher Ernährung und Weinkonsum 2,21 $\mu\text{mol/l}$. Neben der Zufuhrmenge scheint sich also auch die Zufuhrquelle auf die Plasmakonzentration der Flavan-3-ole auszuwirken (Ruidavets et al., 2000; Manach et al., 2004).

Flavonole

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Quercetin wurden in der Literatur bisher hauptsächlich für kleinere Kollektive beschrieben. Manach et al. (1998) fanden im Nüchternplasma von Versuchspersonen (n=10), die sich während der letzten 24 h Quercetin-frei ernährten, Konzentrationen von 28 – 142 nmol/l Quercetin. 3 Stunden nach einer Mahlzeit mit Quercetin-reichen Lebensmitteln konnten im Mittel 373 nmol/l Quercetin nachgewiesen werden. Erlund et al. (2002) fanden im Plasma von 37 weiblichen Testpersonen (nachtnüchtern), die sich vor der Blutabnahme 2 Wochen lang normal ernährt hatten, 52,0 nmol/l (Mean) Quercetin. Nach 5 Wochen, in denen die Testpersonen eine Diät mit einem sehr niedrigen Anteil an Obst und Gemüse erhielten, wurden Plasmakonzentrationen von 26,8 nmol/l (Mean) Quercetin gemessen (nachtnüchtern). Nach weiteren 5 Wochen, in denen die Testpersonen jedoch eine Diät mit einem hohen Anteil an Obst & Gemüse erhielten, wurden Plasmakonzentrationen von 32,1 nmol/l (Mean) Quercetin gemessen. Die Quercetinkonzentrationen waren sowohl nach der Diät mit viel Obst und Gemüse als auch nach der Diät mit wenig Obst und Gemüse niedriger (jedoch nicht statistisch signifikant) als nach der Zeit in der die Probanden sich regulär ernährten. Dies liegt nach Angaben der Autoren möglicherweise daran, dass die anordnete Diät weniger Quercetin-reiche Zwiebeln enthielt, als ihre übliche Ernährung.

Höhere Konzentrationen wurden von Noroozi et al. (2002) beobachtet. 10 Diabetes-Typ 2-Patienten (5 Männer, 5 Frauen) verzehrten zu Beginn der Studie ihre gewohnten Lebensmittel, ohne dass die Flavonoidzufuhr erfasst wurde. Sie wiesen eine mittlere Quercetinkonzentration (nachtnüchtern) von $70,4 \pm 13,6$ nmol/l auf (Mean \pm SEM), bei einer Schwankungsbreite von 0 – 138,1 nmol/l.

Hollman et. al. (1997b) haben die Plasmakonzentration von Quercetin bei 9 Testpersonen gemessen. Die Testpersonen verzehrten 225 ± 43 μ mol (Mean \pm SD) Quercetin aus Zwiebeln (Quercetin-4'-O- β -D-glukosid), 325 ± 7 μ mol (Mean \pm SD) Quercetin aus Äpfeln (Quercetin-3-O- β -D-galaktosid) oder 331 μ mol Quercetin-3-O- β -rutosid aus Kapseln. Die maximalen Konzentrationen wurden nach 0,7 Stunden (nach Verzehr von Zwiebeln), 2,5 Stunden (nach Verzehr von Äpfeln) und nach 9 Stunden (nach Verzehr der Kapseln) ermittelt und betragen $0,74 \pm 0,15$ μ mol/l (Zwiebeln), $0,30 \pm 0,06$ μ mol/l (Äpfel) und $0,30 \pm 0,30$ μ mol/l (Rutosid-Kapseln).

Die Minimal- bis Maximalkonzentration von Quercetin im Plasma der Teilnehmer/innen der BVSII-Studie lag zwischen 0,0 – 563,8 nmol/l. Die mittlere Quercetin-Plasmakonzentration in dieser Studie betrug $81,2 \pm 70,98$ nmol/l (Mean \pm SD) und liegt damit etwa im Bereich der Plasmakonzentrationen, die von Erlund et al. (2002) und Noroozi et al. (2002) ermittelt wurden. Die Interventionsstudien von Manach et al. (1998) und Hollman et al. (1997b) ergaben im

Vergleich wesentlich höhere Plasmakonzentrationen. Die Ergebnisse der vorgelegten Studie deuten somit auf eine niedrigere mittlere Quercetinzufuhr in den letzten 3 Stunden vor der Blutabnahme hin. Zweifellos üben aber noch weitere Faktoren einen wesentlichen Einfluss auf die Plasmakonzentration der Polyphenole aus. Lesser et al. (2004) z.B. konnten den Fettgehalt eines Lebensmittels als Einflussfaktor auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin *in vivo* identifizieren. Die bekannten Daten zur Quercetinkonzentration in Humanplasma zeigen also teilweise sehr unterschiedliche Werte und sind aufgrund unterschiedlicher Versuchsansätze schwer zu vergleichen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass sich die Quercetin-Plasmakonzentration dosisabhängig erhöht und dass die Eliminations-Halbwertszeit von Quercetin mit etwa 25 h relativ lange ist (Hollman und Katan 1997a). Erlund et al. (2001) schlussfolgern daher, dass die Plasmakonzentration von Quercetin als short-term Biomarker für seine Zufuhr verwendet werden kann (Erlund et al., 2000; de Vries et al., 1998).

Bisher wurden erst wenige Untersuchungen zur Kämpferolkonzentration in Humanplasma beschrieben. Die mittlere Kämpferolkonzentration im Plasma der Teilnehmer/innen der BVSII-Studie betrug $43,96 \pm 115,4$ nmol/l (Mean \pm SD) und stimmt gut mit der gemessenen Kämpferol-Plasmakonzentrationen überein, die von de Vries et al. (1998) ermittelt wurden. De Vries et al. (1998) berichten, dass 15 Probanden durch dreitägigen Verzehr einer Teeinfusion 27 mg Kämpferol/d zugeführt wurden. Die Plasmaproben wurden am Mittag des dritten Tages der Studie genommen und in den so gewonnenen Plasmaproben konnten $52,4 \pm 17,5$ nmol/l (Mean \pm SD) Kämpferol gemessen werden. Im Nüchternplasma konnte jedoch kein Kämpferol nachgewiesen werden.

Du Pont et al. (2004) haben die Kämpferolkonzentration im Plasma von 8 Testpersonen (4 Männer, 4 Frauen) untersucht, nachdem diese Testpersonen eine relativ kleine Menge Kämpferol aus Endivien (9 mg) verzehrt hatten. Die Plasmakonzentrationen erreichen nach 5,8 Stunden ein Maximum. Die Plasmakonzentration zu diesem Zeitpunkt betrug $0,10 \pm 0,01$ μ mol/l Kämpferol. Die Testpersonen schieden mit dem Urin im Mittel 160 ± 24 μ g/24 h Kämpferol aus. Aufgrund der beobachteten niedrigen interindividuellen Variation der Absorption und Exkretion schlussfolgern die Autoren, dass die Kämpferol-Urinkonzentration als Biomarker für seinen Verzehr verwendet werden könnte.

Radtke et al. (2002) beschreiben die Plasmakonzentrationen von Quercetin und Kämpferol. Bei den Testpersonen (48 Frauen) konnten $22,8 \pm 16,61$ nmol /l (Mean \pm SD) Quercetin und $10,65 \pm 7,89$ nmol /l (Mean \pm SD) Kämpferol im Nüchternplasma nachgewiesen werden. Die intraindividuelle Variation der gemessenen Plasmakonzentrationen war mit 82 – 91 % vergleichsweise hoch. Die Autoren belegen, dass die gemessene Kämpferol-Plasmakonzentration im Mittel niedriger ist als die Quercetin-Plasmakonzentration und dass auch die Zufuhr von

Kämpferol geringer ist als die Zufuhr von Quercetin. Radtke et. al. (2002) schlussfolgern aus ihren Ergebnissen, dass die Plasmakonzentrationen von Quercetin und Kämpferol geeignete Biomarker für die kurzfristige Zufuhr und einen möglichen Biomarker für die mittelfristige Zufuhr darstellen.

Für die Gehalte an Isorhamnetin im Plasma der Teilnehmer/innen der BVSII-Studie wurden $14,31 \pm 42,95$ nmol/l (Mean) ermittelt. Boyle et al. (2000b) haben die Konzentration von Isorhamnetin im Plasma von 18 Probanden vor und nach einer sechswöchigen Supplementierungsphase mit Rutinpräparaten gemessen (500 mg Rutin/d). Neben Quercetin und Kämpferol konnten messbare Isorhamnetingehalte für beide Zeitpunkte nachgewiesen werden. Im Nüchternplasma wurden 2,85 nmol/l Isorhamnetin gefunden. Nach Abschluss der sechswöchigen Studie wurde im Plasma ein Isoramnetingehalt von 9,88 nmol/l ermittelt (24 h nach der letzten Supplementierung).

Flavanone

Die Naringenin- bzw. Hesperetinkonzentrationen in der vorliegenden Untersuchung lagen bei $39,15 \pm 70,98$ nmol/l bzw. $103,09 \pm 158,70$ nmol/l (Mean \pm SD) und wiesen eine erhebliche Spannweite auf (0,0 – 580,75 nmol/l bzw. 0,0 – 899,48 nmol/l).

Erlund et al. (2000) untersuchten, ob die Plasmakonzentration von Flavanonen als Biomarker für deren Zufuhr aus Zitrusfrüchten geeignet sind. 13 Probanden verzehrten einmalig Orangen- oder Grapefruitsaft (8 ml/kg Körpergewicht). Vor Studienbeginn und während der folgenden 24 h wurden Plasmaproben genommen. Im Nüchternplasma (vor Studienbeginn) konnte weder Naringenin noch Hesperetin nachgewiesen werden. Nach 4,8 – 5,5h wurden die höchsten Flavanonkonzentrationen im Plasma der Testpersonen gemessen. Diese Naringeninkonzentration (C_{\max}) betrug nach Verzehr von Orangensaft $0,6 \pm 0,4$ μ mol/l (Mean \pm SD) und nach Verzehr von Grapefruitsaft $6,0 \pm 5,4$ μ mol/l (Mean \pm SD). Die Hesperetinkonzentrationen (C_{\max}) betrug nach Verzehr von Orangensaft $2,2 \pm 1,6$ μ mol/l (Mean \pm SD). Die Halbwertszeit der Elimination lag zwischen 1,3 – 2,2h. Daher schlussfolgern die Autoren, dass die Plasmakonzentrationen von Naringenin und Hesperetin zwar relativ hoch sind, dass sie aber aufgrund der beobachteten Eliminations-Halbwertszeit keine passenden Biomarker für die Langzeit-Zufuhr sein können.

Ein Jahr später wurden von Erlund et al. (2002) die Naringenin- und Hesperetinkonzentrationen im Plasma von 37 Probanden gemessen. Die Studie umfasste eine Periode von fünf Wochen, in der von den Testpersonen eine Diät verzehrt wurde, die keine Flavanone enthielt („low-vegetable diet“) und eine weitere fünfwöchige Periode, in der von den Testpersonen eine komplexe Diät verzehrt wurde, die reich an flavanonhaltigen Lebensmitteln war (132 mg Hesperetin und 29 mg Naringenin pro Mahlzeit). Die Plasmaproben wurden am Morgen nach Abschluss der jeweiligen Periode gewonnen („overnight fast“). Die so erhaltenen Plasma-Naringeninkonzentrationen

erhöhten sich im Mittel von $< 73,5$ nmol/l nach der „low-vegetable diet“ auf 112,9 nmol/l nach der darauffolgenden „high-vegetable diet“. Die Hesperetinkonzentration stieg von 12,2 nmol/l (Mean) nach der „low-vegetable diet“ auf 325 nmol/l (Mean) nach der „high-vegetable diet“ an. Die beobachtete interindividuelle Variation der Plasmakonzentrationen in dieser Studie war hoch und in einigen Proben waren Flavanone sogar nach der „high-vegetable diet“ im Plasma nicht mehr nachweisbar. Die Autoren vermuten, dass der Grund dafür in der kurzen Halbwerts-Eliminationszeit der Flavanone liegt. Erlund et al. (2001) konnten, wie zuvor schon Fuhr und Kummert (1995a), die eine Eliminations-Halbwertszeit von 2,9 h für Naringenin ermittelten, nach einmaliger Gabe von Orangen- oder Grapefruitsaft mit 1,3 und 2,2 h außerordentlich kurze Eliminations-Halbwertszeiten für Naringenin und Hesperetin zeigen. Sie räumen aber auch ein, dass bei Gabe der Säfte zusammen mit einer Mahlzeit die Kurve der Flavanonkonzentrationen im Plasma möglicherweise flacher verlaufen wäre und auch nach längerer Zeit noch Flavanone nachweisbar gewesen wären. Darüber hinaus erklären Erlund et al. (2002), dass die Ergebnisse ihrer Studie nicht auf eine Akkumulation von Flavanonen im Plasma hinweisen, dass jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine Verteilung und Anreicherung von Flavanonen im Gewebe stattfindet und dass Flavanone danach als Metaboliten oder Abbauprodukte wieder in den Blutkreislauf abgegeben werden können. Erlund et al. (2002) folgern daher, dass die Plasmakonzentrationen von Naringenin und Hesperetin Biomarker für ihre kurzfristige Zufuhr sind.

Bugianesi et al. (2002) untersuchten, ob nach Verzehr von Lebensmitteln aus Tomaten Naringenin im Plasma gefunden werden kann. In den 3 Tagen vor Studienbeginn verzehrten 5 Probanden keine Zitrusfrüchte oder Tomaten und reduzierten ihren Verzehr von Obst und Gemüse. Im Nüchternplasma der Probanden konnte Naringenin nicht nachgewiesen werden. Die Testpersonen verzehrten dann 150 mg Tomatenpaste (3,8 g Naringenin) in einer Testmahlzeit. Die höchste Naringeninkonzentration wurde mit $0,12 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/l}$ (Mean \pm SD) nach 2 Stunden gemessen.

Radtke et. al. (2002) beschreiben die Konzentrationen von Naringenin und Hesperetin im Nüchternplasma. Im Nüchternplasma von 48 Probanden wurden $8,15 \pm 15,43$ nmol /l Naringenin (Mean \pm SD) und $22,16 \pm 44,85$ nmol /l Hesperetin (Mean \pm SD) ermittelt. Da die ermittelten Naringenin-Plasmakonzentrationen in mehreren Studien im Mittel niedriger sind, als die Hesperetin-Plasmakonzentrationen, kann angenommen werden, dass die Beobachtung diesbezüglich für die Flavonole Quercetin und Kämpferol gemacht wurde auch für Naringenin und Hesperetin zutreffen könnte, da auch die Zufuhr von Naringenin geringer ist, als die Zufuhr von Hesperetin (Radtke et. al., 2002). Darüber hinaus könnten aber auch Unterschiede im Stoffwechsel der Flavanone für die beobachteten Ergebnisse verantwortlich sein. Hollman (1997d) beispielsweise beschreibt, dass nach Aufnahme von Naringin eine Phenolsäure im Urin

ausgeschieden wurde, wohingegen Hesperidin anscheinend ohne Abbau absorbiert wurde (Booth et al., 1958).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie kann abgeleitet werden, dass die Plasmakonzentrationen von Naringenin und Hesperetin geeignete Biomarker für die kurzfristige Zufuhr darstellen können und es wird vorgeschlagen, dass eine geeignete Herangehensweise für die epidemiologische Untersuchung gesundheitsbezogener Effekte von Flavonoiden darin bestehen sollte, ihre Plasmakonzentrationen mit den entsprechenden Zufuhrberechnungen zu kombinieren.

Flavone

Die Plasmakonzentration von Luteolin in der vorliegenden Studie betrug $163,94 \pm 351$ nmol/l (Mean \pm SD). Die Spannbreite der dabei beobachteten Einzelkonzentrationen lag bei 0,0 – 3405,95 nmol/l und die 10. – 90. Perzentile lag bei 10,21 – 455 nmol/l. Flavone werden hauptsächlich in Umbelliferen und anderen aromatischen Kräutern und Gewürzen gefunden. Manach et al. (2004) geben Gehalte für Luteolin in schwarzem Pfeffer an (5 – 10 mg/kg). Hollman et al. (2000) nennen darüber hinaus auch roten Pfeffer („sweet red pepper“) als Luteolinquelle (15 ± 30 mg/kg). Als Lebensmittel, die zur Luteolinzufuhr beitragen, sind in der „USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods – 2003“ des US Department of Agriculture (2003) grüner Tee (0,17 mg/100 g), Kohlrabi (1,30 mg/100 g) und Sellerie (3,5 mg/100 g) sowie die Gewürze Petersilie (1,24 mg/100g), Oregano (1,50 mg/100 g), Pfefferminze (11,33 mg/100 g) und Thymian (51,00 mg/100 g) als luteolinhaltige Lebensmittel angegeben.

Die Bioverfügbarkeit und der Metabolismus von Luteolin wurden bisher vorwiegend am Tiermodell untersucht. Shimoi et al. (1998) zeigten die Deglucosylierung von Luteolin-7-O-glucosid zu Luteolin-Aglykon und die Glucuronisierung beim Transport durch die Darmwand bei Ratten. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, dass in Humanserum auch freies Luteolin nachweisbar ist (Shimoi et al., 1998), wohingegen Manach et al. (1995) berichten, dass Quercetin nicht in seiner freien Form in Plasma nachgewiesen werden kann.

In einer Humanstudie untersuchten Wittemer et al. (2005) kürzlich die Absorption von Luteolin und Luteolin-7-O-glucosid beim Menschen nach Verzehr eines Artischockenblättereextrakts (35,2 mg Luteolin). Im Plasma von 14 Versuchspersonen wurden 30 – 40 Minuten nach Bolusgabe die höchsten Plasmakonzentrationen von Luteolin erreicht. Die Konzentrationen betragen im Mittel $546,82 \pm 322,33$ nmol/l (Mean \pm SD). Die Luteolin-Plasmakonzentration erhöhte sich dosisabhängig und die Eliminations-Halbwertszeit war mit 2 – 3 h relativ kurz.

Eine andere Arbeitsgruppe stellte fest, dass das Konzentration-Zeit-Profil von Luteolin dem der anderen Flavonoide, nach Zufuhr ihrer respektiven Glucoside, entspricht (Graefe et al., 2001). Die

höchsten Konzentrationen von Luteolin werden deutlich früher gemessen als im Falle von Quercetin. Auch ist die Eliminations-Halbwertszeit von Luteolin mit 2 – 3 h kürzer als von Quercetin (etwa 25 h). Trotz der eingeschränkten Zufuhr und der frühen Eliminationszeit von Luteolin konnten im Plasma der Probanden der BVS II-Studie aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze auch niedrige Luteolinkonzentrationen (10,21 nmol/l) erfasst werden. In der vorliegenden Studie (BVS II) konnten Luteolin ab der 25. Perzentile und Apigenin ab der 50. Perzentile nachgewiesen werden. Es werden also anscheinend ausreichende Mengen flavonhaltiger Lebensmittel verzehrt, sodass Luteolin häufig im Nüchternplasma gefunden werden kann.

Die meisten Veröffentlichungen über Apigenin beleuchten die physiologische Wirksamkeit in Bezug auf postulierte Effekte der Substanz. Zu Bioverfügbarkeit und Metabolismus gibt es bislang hingegen nur wenige Angaben.

Janssen et al. (1998) untersuchten die Konzentration von Apigenin im Plasma von 18 gesunden männlichen Testpersonen. Die Blutabnahme erfolgte 90 Minuten nachdem die Probanden eine Testmahlzeit von 5 g getrockneter Petersilie (84 mg Apigenin) verzehrt hatten. Es konnte kein Apigenin im Plasma nachgewiesen werden, und die Autoren nahmen an, dass Apigenin nicht absorbiert wird (Janssen et al., 1998). Ihre Nachweisgrenze lag mit 1100 nmol/l allerdings wesentlich höher als die Nachweisgrenze der hier vorgestellten Methode (2,3 nmol/l) und es ist anzunehmen, dass die Konzentrationen an Apigenin im Plasma bei dieser Studie unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

Auch Tschiersch und Hölzl (1993) konnten nach Verzehr eines apigeninhaltigen Kamillenextraktes, aufgrund von zu geringer Sensitivität der Methode, Apigenin nicht nachweisen (Nielsen und Dragsted, 1998b).

In der Studie zur Absorption von Apigenin beim Menschen, die auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, schwankten die Maximalkonzentrationen an Apigenin zwischen 27,85 und 337,46 nmol/l und wurden nach 6 – 10 h erreicht (siehe Tabelle 45). 24 h nach Verzehr der Testmahlzeit (2 g Petersilie pro kg Körpergewicht) war kein Apigenin mehr im Plasma nachweisbar (Meyer et al., 2006). Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Plasmakonzentrationen von Apigenin betragen im Mittel $13,75 \pm 34,83$ nmol/l (Mean \pm SD). Die Spannweite der ermittelten Einzelkonzentrationen lag bei 0,0 – 332,83 nmol/l (Min – Max). Die 10. – 90. Perzentile enthielt 0,0 – 32,33 nmol/l Apigenin.

Apigenin kommt, wie in der „USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods – 2003“ des US Department of Agriculture (2003) beschrieben, in grünem Tee (0,17 mg/100 g), in Gemüse wie Sellerie (19,10 mg/100 g) und in Gewürzen wie Oregano (3,00 mg/100 g), Thymian (5,00 mg/100 g), Pfefferminze (8,71 mg/100 g) sowie in Petersilie (302,00 mg/100 g) vor.

Apigenin ist aber auch in Orangen (1,96 mg/240 g) und in Kamille enthalten (Nielsen et al., 1998; Gil-Izquierdo et al., 2001; Tschiersch und Höltzl, 1993). Auf das Vorkommen von Flavonen in Lebensmitteln wurde ebenfalls in Kapitel 3.3.3 eingegangen (siehe Abbildung 15).

Liu and Hu (2002) deuten an, dass ein möglicher extensiver „first-pass“-Metabolismus der Hauptgrund für die schnelle Absorption von Apigenin sein könnte, und dass daher dessen Bioverfügbarkeit vermutlich gering ist. Apigenin ist aber nach Hollman und Katan (1999) in Lebensmitteln, die häufig verwendet werden, in teilweise beträchtlichen Konzentrationen enthalten (v.a. Sellerie, Petersilie, Kamillentee), und in einer niederländischen Studie betrug die durchschnittliche tägliche Zufuhr der Flavone Luteolin und Apigenin 1 mg (Hertog et al., 1993a). Den Ergebnissen der vorliegenden Studie zufolge kann Apigenin, besonders bei wiederholter Zufuhr, häufig im Plasma wiedergefunden werden und die Plasma-Apigeninkonzentration sollte daher als short-term Biomarker für ihren Verzehr berücksichtigt werden. Da bisher jedoch vergleichsweise wenig über die Absorption und den Metabolismus der Flavone im Menschen bekannt ist (Chen et al., 2003), sind weitere Untersuchungen, vor allem epidemiologische Studien zur Bioverfügbarkeit und die Aufklärung möglicher Abbauprodukte sehr wünschenswert, um die Eigenschaften der Flavone als Biomarker weiter zu prüfen.

Isoflavone

In neueren Untersuchungen wird die Gruppe der Isoflavone aufgrund ihres Potentials als Phytoöstrogene mit östrogenen Wirksamkeit diskutiert.

Frankenfeld et al. (2003) untersuchten eine Gruppe postmenopausaler Frauen (n=96) im Alter zwischen 50 – 79 Jahren. Während der Studiendauer (zwei Wochen) wurde die zugeführte Menge an Daidzein und Genistein durch Verzehr von Sojaprodukten (hauptsächlich Tofu und Sojamilch) unter Verwendung von zwei verschiedenen Food-Frequency-Questionnaires ermittelt. Die zugeführte Menge an Daidzein betrug dabei durchschnittlich $6,2 \pm 6,6$ mg/Woche (Mean \pm SD). Der minimale bis maximale Bereich der Zufuhr an Daidzein lag zwischen 0 – 500,1 mg/Woche. Die mittels LC-MS gewonnenen Konzentrationen im Nüchternplasma der Probanden betragen für Daidzein durchschnittlich $6,9 \pm 3,6$ nmol/l (Mean \pm SD) und der minimale bis maximale Bereich der Plasmakonzentrationen lag bei 2,0 – 157,6 nmol/l.

Im Durchschnitt wurden $8,1 \pm 7,7$ mg Genistein/Woche zugeführt (Mean \pm SD), mit einer Streuung der Zufuhrmengen von minimal 0 mg/Woche bis maximal 613,7 mg/Woche. Die Plasmakonzentrationen von Genistein waren mit $12,2 \pm 4,3$ nmol/l (Mean \pm SD) etwa doppelt so hoch wie die Daidzeinkonzentration und umfassten 0 – 420,9 nmol/l. Bei 19 Probanden (20 %) lag die Plasmakonzentration von Genistein und bei 31 Probanden (32 %) die Plasmakonzentration von Daidzein unter den Nachweisgrenzen (Daidzein: 1,97 nmol/l bzw. Genistein: 1,85 nmol/l).

Die Zufuhr von Genistein bzw. Daidzein war signifikant mit den ermittelten Plasmakonzentrationen von Genistein bzw. Daidzein korreliert ($p < 0,001$).

Wiseman et al. (2004) untersuchten den Einfluss einer soja-reichen Ernährung im Vergleich zu einer soja-armen Ernährung auf die Plasmakonzentrationen von Isoflavonoiden. Jeweils 38 Testpersonen verzehrten 10 Wochen lang eine soja-reiche Diät (104 ± 24 mg Gesamt-Isoflavonoide/Tag) oder eine soja-arme Diät ($0,54 \pm 0,58$ mg Gesamt-Isoflavonoide/Tag). Vor Studienbeginn wurde den Testpersonen Nüchternplasma entnommen. Die Genistein- und Daidzeinkonzentrationen im Nüchternplasma der Testpersonen aus beiden Gruppen betragen 24 ± 44 nmol/l Genistein und 18 ± 25 nmol/l Daidzein. Nach 10 Wochen waren die Konzentrationen von Genistein und Daidzein im Plasma der Probanden, die eine soja-reiche Diät verzehrten signifikant höher ($p < 0,001$), als im Plasma der Probanden, die eine soja-arme Diät verzehrten. Die Plasmakonzentration nach 10 Wochen soja-reicher Ernährung betrug 691 ± 690 nmol/l Genistein und 369 ± 456 nmol/l Daidzein (Wiseman et al., 2004). Die Genistein- und Daidzeinkonzentrationen im Plasma der Gruppe, die die soja-reiche Diät verzehrte, wiesen eine hohe interindividuelle Variation auf. Die Genistein- und Daidzein-Plasmakonzentrationen der Männer ($n=38$) und Frauen ($n=38$) waren nicht signifikant unterschiedlich, ein Ergebnis, das die vorliegende Arbeit bestätigt. Diese Beobachtung unterstützt damit die Vermutung der Autoren, dass das Geschlecht keinen Einfluss auf die Resorption der Isoflavone aus Soja hat (Wiseman et al., 2004).

Die Plasmakonzentrationen von Daidzein und Genistein betragen in der vorliegenden BVSII-Studie im Mittel $10,92 \pm 28,70$ nmol/l und $37,39 \pm 95,55$ nmol/l bei einer Verteilung von $0,0 - 432,57$ nmol/l Daidzein und $0,0 - 821,22$ nmol/l Genistein (Min. – Max.). Die 10. – 90. Perzentile umfasste im Falle von Daidzein $0,0 - 29,84$ nmol/l und von Genistein $0,0 - 128,72$ nmol/l. Dabei ist zu bemerken, dass in beiden Fällen erst ab der 75. Perzentile messbare Plasmakonzentrationen erfasst werden konnten ($12,42$ nmol/l Daidzein / $15,72$ nmol/l Genistein). Die Konzentrationen in den niedrigeren Perzentilen liegen jeweils unter den Nachweisgrenzen, was als Maß für die geringe Zufuhr an diesen Isoflavonen in Deutschland aufzufassen ist.

Toda et al. (1997) und Arai et al. (2000) beschreiben die Gehalte von Genistein und Daidzein in handelsüblichen japanischen Lebensmitteln aus verarbeiteten Sojabohnen. Die ermittelten Isoflavongehalte (Summe von Daidzein und Genistein) dieser beiden Arbeitsgruppen betragen für Tofu: $422/435$ $\mu\text{g/g}$, Miso: $476/457$ $\mu\text{g/g}$ und für Natto: $1081/974$ $\mu\text{g/g}$. Die Gehalte in Tofu schwanken jedoch beträchtlich und betragen für Daidzein $7,2$ $\mu\text{g/g}$ – $168,6$ $\mu\text{g/g}$ und für Genistein $184,0$ $\mu\text{g/g}$ – $556,7$ $\mu\text{g/g}$. Das von Arai et al. (2000) dokumentierte Verhältnis von Genistein zu Daidzein im Lebensmittel variiert je nach dem verwendeten Lebensmittel als Zufuhrquelle. Für Sojamilch ist das Verhältnis vergleichsweise konstant und beträgt im Mittel 2:1

(Genistein:Daidzein). Bei Tofu liegt das Verhältnis der Isoflavone zueinander, zwischen 1,8:1 und 3,3:1 (Arai et al., 2000).

Das Verhältnis von Genistein (24 ± 44 nmol/l) und Daidzein (18 ± 25 nmol/l) im Nüchternplasma der Probanden betrug in der Untersuchung von Wiseman et al. (2004) im Mittel 1,3:1 (Genistein:Daidzein). Die Verteilung von Genistein ($12,2 \pm 4,3$ nmol/l) und Daidzein ($6,9 \pm 3,6$ nmol/l) im Plasma der Probanden betrug in der Untersuchung von Frankenfeld et al. (2003) im Mittel 1,7:1 (Genistein:Daidzein). In der BVSII-Studie lag die Verteilung von Genistein ($37,39 \pm 95,55$ nmol/l) zu Daidzein ($10,92 \pm 28,70$ nmol/l) bei 3,4:1 (Genistein:Daidzein). Das Verhältnis dieser Isoflavone im Plasma entspricht demgemäss nahezu der Situation in Soja-Produkten und kann somit die Situation im Lebensmittel wiedergeben.

Die tägliche Zufuhr liegt in Japan bei 30 – 50 g Sojaprotein (entspricht 10 – 30 mg Isoflavonoide), während die Zufuhr von Isoflavonen in westlichen Ländern, wegen des eingeschränkten Verzehrs von Sojaprodukten, bedeutend niedriger ist und durchschnittlich ca. 1 g an Sojaprotein aufgenommen wird. In vitro Studien zeigten eine hohe Bioverfügbarkeit von Isoflavonglukosiden nach Applikation einer Sojamahlzeit (Setchell et al., 2002), und obwohl die Isoflavone einem beträchtlichen Abbau im Darm unterliegen, können in Interventionsstudien am Menschen messbare Plasmakonzentrationen, möglicherweise sogar auf biologisch aktivem Niveau, gefunden werden (Scalbert und Williamson, 2000; Frankenfeld et al., 2003).

Die Plasmakonzentrationen der Aglykone liegen in einem Bereich von 0,01 – 0,4 μ mol/l (Setchell et al., 2002). Die Eliminations-Halbwertszeit der Isoflavone liegt in einem Bereich von 3 – 10 h (Lu et al., 1995; Setchell et al., 2002) und nach Auffassung der Autoren spiegeln auch Urinkonzentrationen ihren kürzlichen Verzehr wider. Die Plasmakonzentrationen in der vorliegenden Studie sind mit den Ergebnissen der oben beschriebenen Studien sowohl in Höhe der gemessenen Konzentrationen als auch im Verhältnis von Genistein zu Daidzein vergleichbar. Genistein und Daidzein können daher auch im Nüchternplasma gefunden werden, sodass ihre Plasmakonzentrationen als Marker für ihren Verzehr verwendet werden können. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für das bayerische Kollektiv gibt auch die Literatur Hinweise darauf, dass die Plasmakonzentrationen der Isoflavone zumindest kurzfristige Biomarker für ihren Verzehr sind und folglich auch als Marker für andere gesundheitsrelevante Ernährungsgewohnheiten verwendet werden können (Frankenfeld et al., 2003; Peeters et al., 2003; Zubik und Meydani, 2003; Wiseman et al., 2004). Die der Bioverfügbarkeit zugrunde liegende, intestinale Absorptionsrate, die Metabolisierung durch die Darmflora, der intestinale und hepatische Metabolismus und die Plasmakinetik müssen dem ungeachtet aber weiter aufgeklärt werden, um die Bedeutung der Isoflavone als Biomarker für ihren Verzehr einwandfrei zu definieren und ihren Einfluss in der menschlichen Ernährung bestimmen zu können.

Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren

Bislang gibt es wenige ausführliche, quantitative Ergebnisse zum Gehalt einer repräsentativen Auswahl von Hydroxybenzoesäuren im Plasma. In den letzten Jahren wurden aber diverse Humanstudien durchgeführt, die sich mit der Absorption der zwei bedeutenden Hydroxyphenolsäuren Ferulasäure und Kaffeesäure befassen. Dabei wurden Bioverfügbarkeitsstudien mit Bier (Bourne et al., 2000), Tomaten (Bourne und Rice-Evans, 1998a), Kaffee (Rechner et al., 2001), Rotwein (Simonetti et al., 2001), Früchten (Bourne und Rice-Evans, 1998b) und mit polyphenolreicher Kost (Rechner et al., 2002) durchgeführt. Ferulasäure konnte dabei als Biomarker für die Absorption und den Stoffwechsel von Kaffeesäure- sowie Ferulasäurederivaten aus Kaffee identifiziert werden. Vanillinsäure wurde als Metabolit von Ferulasäure identifiziert, dessen Vorläufer im Kaffee Ester der Feruloylchinasäure und der Caffeoylechinasäure sind. Durch Methylierung entsteht aus Kaffeesäure Ferulasäure oder Isoferulasäure. Durch Reduktion wird Dihydroferulasäure und daraus wiederum durch β -Oxidation Vanillinsäure gebildet. Der Nachweis dieser Substanzen weist auf den Abbau der Hydroxyzimtsäurederivate durch die Mikroflora des Darms hin. Die Hydroxyzimtsäuren können in einfachere Phenole umgewandelt werden, die wiederum absorbiert und ihrerseits weiter umgewandelt werden können (Rechner et al., 2001).

Die Phenolsäuren werden in teilweise beträchtlichen Mengen aus unterschiedlichen Lebensmitteln zugeführt. Dementsprechend sind die Plasmakonzentrationen dieser Polyphenole meist höher als die der Flavonoide. Auch die Gehalte der Phenolsäuren im Lebensmittel sind in Abhängigkeit von Sorte und Anbau zum Teil starken Schwankungen unterworfen und können sich beispielsweise in Äpfeln mit einem Faktor von 1:4 voneinander unterscheiden (Pietta, 2000).

Die Zufuhr von Hydroxybenzoesäuren ist relativ niedrig, verglichen mit der Zufuhr von Hydroxyzimtsäuren. In einer deutschen Studie wird die tägliche Aufnahme von Hydroxybenzoesäuren auf 11 mg/d und die Aufnahme von Hydroxyzimtsäuren auf 211 mg/d geschätzt. Alleine die Kaffeesäurezufuhr betrug demzufolge 206 mg/d. Die Hauptquelle für Hydroxyzimtsäuren stellen Kaffeeprodukte dar, die alleine bereits 92 % der zugeführten Kaffeesäure liefern, sowie Früchte und Obstsaft, die zusammen 59 % der aufgenommenen *p*-Cumarsäure liefern (Radtke et al., 1998). Im Gegensatz zu dieser berechneten Zufuhr war die Plasmakonzentration der Hydroxyzimtsäuren in unserer Studie mit 1,13 $\mu\text{mol/l}$ geringer als die im Mittel aufgefundenen Hydroxybenzoesäuren (12,28 $\mu\text{mol/l}$). Den größten Anteil machten dabei Salicylsäure mit 7,46 $\mu\text{mol/l}$, Syringasäure mit 2,41 $\mu\text{mol/l}$ und Gentisinsäure mit 1,68 $\mu\text{mol/l}$ (Mean) aus. Die Gründe für die Unterschiede der Phenolsäurekonzentrationen im Lebensmittel und der entsprechenden Plasmakonzentrationen im Plasma sind nicht geklärt, könnten aber darin liegen, dass die untersuchten Hydroxybenzoesäuren im Menschen, wie von Pietta (2000) und

Caccetta et al. (2000) beschrieben, in Abhängigkeit von ihrer Struktur, auch als Abbauprodukte von bestimmten Flavonoiden gebildet werden (siehe Abbildung 36).

Der gastrointestinale Metabolismus der Flavonoide ist in hohem Maße von der intestinalen Mikroflora abhängig. Darmbakterien, z.B. *Enterococcus casseliflavus*, wandeln Flavonoidglykoside durch Hydrolyse in die entsprechenden Aglykone um, welche dann von der Darmwand absorbiert werden können. Aglykone, die nicht absorbiert werden, können von einer anderen Art von Darmbakterien, z.B. von *Eubacterium ramulus*, zu Phenolsäuren abgebaut werden (Chao et al., 2002; Pietta, 2000).

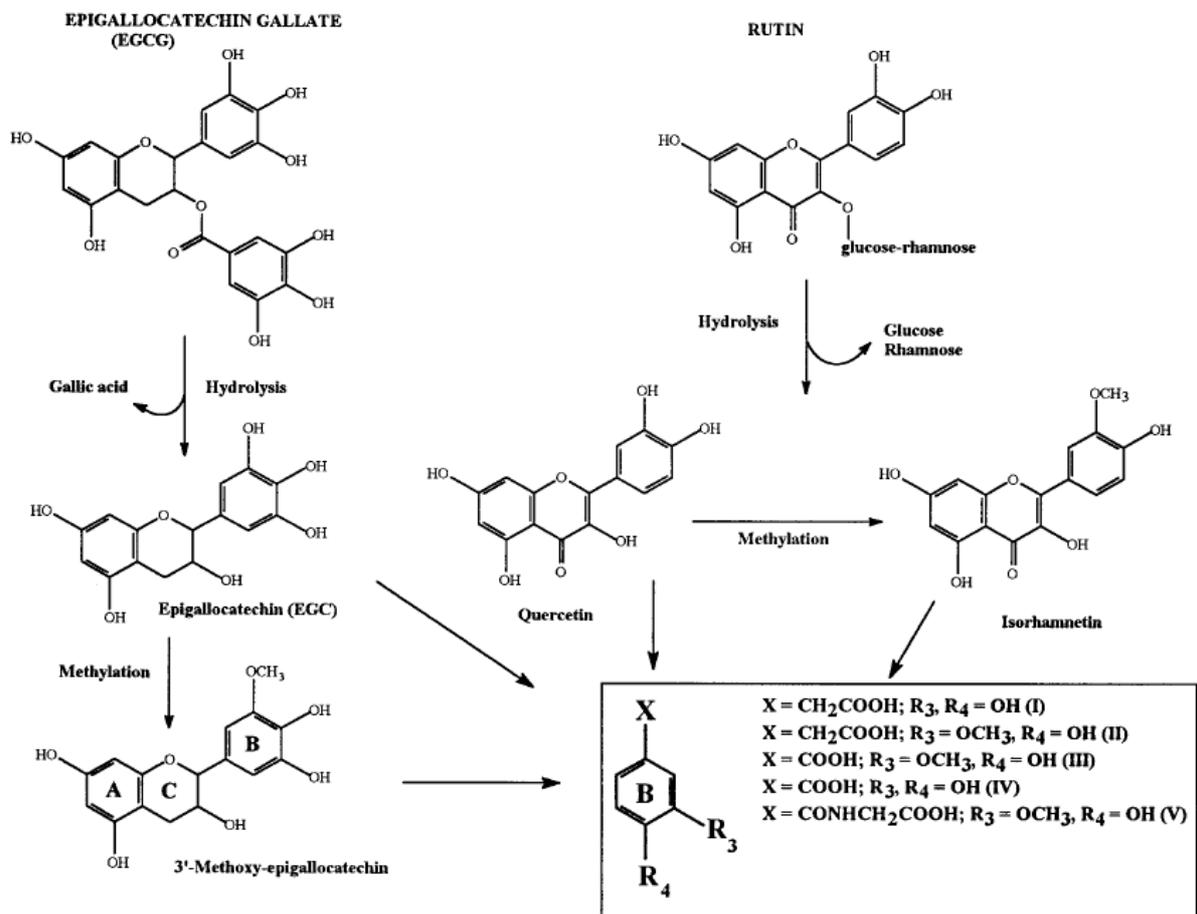


Abb. 37: Die metabolische Umwandlung von Epigallocatechingallat und Rutin zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (I), 3-Methoxy-4-hydroxyphenylelessigsäure (II), 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure (III), 3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure) (IV) und 3-Methoxy-4-hydroxyhippursäure (V) (Pietta, 2000).

Diese Phenolsäuren sowie die Flavonoide selbst, können im Darm absorbiert, in der Leber konjugiert und O-methyliert werden und können dann wieder in den Blutkreislauf eintreten. Dieser Aspekt ist für den antioxidativen Schutz besonders aus zwei Gründen wichtig. Zum Einen haben die Phenolsäuren im Plasma einen relativ großen Anteil an der Gesamtmenge der antioxidativ im Blut wirksamen Stoffe (30 – 60 %) und zum Anderen besitzen etliche dieser

Säuren aufgrund ihrer Catecholstruktur Fähigkeiten als Radikalfänger, die mit denen ihrer Vorläuferstrukturen vergleichbar sind. Pietta (2000) legt nahe, dass diese Metaboliten auch am antioxidativen Schutz beteiligt sind.

Aufgrund der beschriebenen Abbaureaktionen der Flavonoide zu Phenolsäuren sollte die Eignung der Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren als Biomarker weiter geprüft werden, um besser einschätzen zu können, ob ihre Plasmakonzentrationen als Marker für die Zufuhr in der Ernährung verwendet werden können.

Von McMahon und Kelly (1998) werden Plasma-Salicylsäurekonzentrationen beschrieben, die 1 – 2 h nach Verzehr von 500 – 650 mg Aspirin Maximalkonzentrationen von 195,51 $\mu\text{mol/l}$ – 325,85 $\mu\text{mol/l}$ erreichten. Die Bestimmung der mittleren Salicylsäurekonzentration im Plasma der Teilnehmer an der BVSII-Studie ergab $7,46 \pm 67,69 \mu\text{mol/l}$ und der Median (0,26 $\mu\text{mol/l}$) war niedriger als dieser arithmetische Mittelwert, sodass die Häufigkeitsverteilung von einer Normalverteilung abweicht. Die höchsten Konzentrationen lagen mit 1,122 mmol/l jedoch beträchtlich höher. Diese hohen Salicylsäurekonzentrationen in der BVSII-Studie sind ebenfalls auf Aspirin-Einnahme zurückzuführen.

Über den Salicylsäuregehalt im Lebensmittel informieren Radtke et. al. (1998). Die höchsten Salicylsäurekonzentrationen wurden in Beeren und Südfrüchten gefunden (Orangen: 23 mg/kg, Aprikosen: 26 mg/kg, rote Johannisbeeren und Himbeeren: 51 mg/kg). Über die Plasma-Salicylsäurekonzentration nach Verzehr einer Testmahlzeit oder im Nüchternplasma (mit/ohne Einnahme von Aspirin) steht, außer den hier vorgestellten Ergebnissen, jedoch noch keine Literatur zur Verfügung. Daher ist es notwendig weitere Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Salicylsäure durchführen.

Obwohl den Phenolsäuren ähnliche antioxidative Eigenschaften und ein gesundheitlicher Nutzen wie den Flavonoiden zugeschrieben wird und obwohl Weizenkleie und andere Vollkornprodukte mit etwa 268,32 mg Ferulasäure/100 g Weizenkleie große Mengen an Phenolsäuren enthalten, liegen bislang erst wenige Berichte zur Bioverfügbarkeit der Hydroxyzimtsäuren und noch weniger Darstellungen der Hydroxybenzoesäuren im Menschen vor (Kern et al., 2003).

In einer Untersuchung zum Einfluss von Rotwein auf die Plasma-Kaffeensäurekonzentration und den antioxidativen Status in Serum zeigten Caccetta et al. (2000) 4 Stunden nach Konsum von 5 ml Rotwein/kg KG einen signifikanten Anstieg der Plasmakonzentration von Kaffeensäure und 4-O-Methylgallussäure, dem Hauptmetabolit von Gallussäure. Der Anstieg von Protocatechusäure war hingegen nicht signifikant. Als möglicher Grund für die geringe Absorption von Protocatechusäure wird von den Autoren angegeben, dass der verwendete Wein etwa zehnmal weniger Protocatechusäure als Kaffeensäure enthielt. Die Konzentrationen, die im Plasma erreicht wurden, waren zu gering, um die Cu^{2+} -induzierte LDL- bzw. Serumoxidation zu verzögern. Die

maximalen Konzentrationen an Kaffeesäure, 4-O-Methylgallussäure und Protocatechusäure in diesem Versuch betragen 4 h nach Verzehr von Rotwein (Maximum) 84 ± 18 nmol/l, 176 ± 19 nmol/l und 161 ± 11 nmol/l respektive. Die erforderlichen Konzentrationen zur Verzögerung der Serumoxidation um 50 %, wurden in vitro jedoch mit $0,5$ μ mol/l Kaffeesäure, $0,9$ μ mol/l Protocatechusäure und $1,8$ μ mol/l Gallussäure angegeben. Eine Erhöhung der lag-Phase der LDL-Oxidation um 50 % wurde bei Plasmakonzentrationen von $0,4$ μ mol/l (Kaffeesäure), $2,0$ μ mol/l (Protocatechusäure) und $2,6$ μ mol/l (Gallussäure) festgestellt.

In einigen Veröffentlichungen über die gesundheitliche Wirkung der Polyphenole wird daher gefolgert, dass im Prinzip die physiologische Wirksamkeit vieler Flavonoide und Phenolsäuren ex vivo gezeigt werden kann, dass die hierzu erforderlichen Konzentrationen im Menschen jedoch nicht erreicht würden (Caccetta et al., 2000; Kern et. al., 2003). Es ist dabei aber zu Bedenken, dass die in solchen Versuchen eingesetzten Lebensmittel auf nur ein Nahrungsmittel und damit auf wenige Polyphenole beschränkt sind. Es werden damit Einzelwirkungen gezeigt, die in der Praxis nicht gegeben sind, da über die Nahrung eine große Vielfalt an Polyphenolen aufgenommen wird, deren Wirkungen sich in vivo akkumulieren könnten.

In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurden im Plasma aller Probanden der BVSII-Studie im Durchschnitt 496 nmol/l Kaffeesäure und 487 nmol/l Protocatechusäure gemessen (siehe Tabelle 24). Die Plasmakonzentrationen in der vorliegenden Studie liegen damit über den in der Untersuchung von Caccetta et al. (2000) ermittelten Konzentrationen für Kaffeesäure (84 nmol/l) und Protocatechusäure (161 nmol/l) und deuten eher darauf hin, dass sich Phenolsäuren aus unterschiedlichen Lebensmitteln im Körper akkumulieren, und dass die Konzentrationen, bei denen physiologische Wirkung gezeigt werden, im Plasma erreicht werden können.

Simonetti et al. (2001) untersuchten 10 Testpersonen, die jeweils 200 ml Rotwein erhielten (entsprechend $1,8$ mg Kaffeesäure). Die Ernährung während der letzten 3 Tage vor Studienbeginn enthielt kein Obst oder Gemüse. Die höchsten Kaffeesäure-Plasmakonzentrationen wurden bei den Männern ($n=5$) nach etwa 1 Stunde mit $59,93 \pm 12,76$ nmol/l und bei den Frauen ($n=5$) nach etwa 20 – 40 Minuten mit $36,63 \pm 6,10$ nmol/l ermittelt. Die Autoren leiten aus ihren Befunden ab, dass die Plasmakonzentration von Kaffeesäure ein geeigneter Biomarker für die Zufuhr von Getränken ist, die diese Phenolsäure enthalten (Simonetti et al., 2001; Caccetta et al., 2000).

Kern et al. (2003) untersuchten die Absorption von Ferulasäure im Plasma von 6 Probanden. Die höchsten Ferulasäurekonzentrationen wurden mit $150 - 210$ nmol/l 1 – 3 Stunden nach Verzehr von 100 g Weizenkleie (entsprechend 268 mg Ferulasäure) gemessen. Im Nüchternplasma konnten 24 h nach Verzehr der Testmahlzeit Ferulasäurekonzentrationen zwischen $5 - 30$ nmol/l ermittelt werden, weshalb angenommen wird, dass Ferulasäure durch die gewöhnliche Ernährung zugeführt wurde und somit die Zufuhr an Ferulasäure aus Vollkornprodukten beschreiben kann.

Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass Ferulasäure als Metabolit aus anderen phenolischen Antioxidantien gebildet wurde (Pietta, 2000) (siehe Abbildung 36). Die Ferulasäurekonzentration in den Plasmaproben der vorliegenden Arbeit lag im Mittel bei 241,49 nmol/l und erreichte mit einer Maximalkonzentration von 3,395 µmol/l den ausgewiesenen Konzentrationsbereich an Phenolsäuren, der schädliche oxidative Prozesse hemmen kann (Caccetta et al., 2000; Kern et al., 2003). Aufgrund ihrer Untersuchungen am Tiermodell geben Adam et al. (2002) jedoch an, dass die Lebensmittelmatrix die Absorption von Ferulasäure im Gegensatz zur Applikation der Reinsubstanz einschränken kann.

Seeram et al. (2004) informieren über die grundsätzliche Bioverfügbarkeit von Ellagsäure in Humanplasma (n = 1) nach Verzehr von 180 ml Granatapfelsaft (entsprechend 25 mg Ellagsäure). Im Plasma konnte 1 h nach Verzehr des Saftes Ellagsäure in Konzentrationen von maximal 106 nmol/l gefunden werden, die nach 4 h wieder ausgeschieden wurde. Seeram et al. (2004) betrachten Ellagsäure daher als einen Biomarker, der in künftigen Humanstudien zur Bioverfügbarkeit von Ellagsäure aus Lebensmitteln beachtet werden sollte.

Flavonole und Isoflavone sind wegen ihrer besonderen biologischen Aktivität die am besten untersuchten phenolischen Substanzen in der menschlichen Ernährung. Andere phenolische Komponenten, die zum Schutz vor oxidativem Stress beitragen können (z.B. Phenolsäuren), sollten allerdings noch eingehender untersucht werden, da sie vermutlich noch unbekannte und spezifische, biologische Aktivität besitzen, die früher beobachtete Effekte erklären könnten (Pietta, 2000).

Die Mittelwerte der Plasmakonzentrationen aller männlichen und weiblichen Testpersonen in der BVS II-Studie sind in Abbildung 37 graphisch dargestellt (siehe auch Tabelle 27). Die Summen der dargestellten Polyphenole sind bei den weiblichen Versuchsteilnehmerinnen in allen Gruppen und bei den meisten Einzelsubstanzen mit Ausnahme der Flavanone und Kaffeesäure größer als im männlichen Teilkollektiv. Signifikante Unterschiede der Konzentrationen treten bei Epigallocatechin (862,35 nmol/l bei den Männern bzw. 936,83 nmol/l bei den Frauen), bei der Summe der Flavan-3-ole (1024,84 bzw. 1146,81 nmol/l), bei Gentisinsäure (11751,57 bzw. 1623,47 nmol/l), Syringasäure (2652,15 bzw. 2227,85 nmol/l) und Salicylsäure (2602,67 bzw. 11086,03 nmol/l) bei den Hydroxybenzoesäuren gesamt (7695,24 bzw. 15701,27 nmol/l) sowie in der Summe der Hydroxyzimtsäuren (1096,22 bzw. 1156,30 nmol/l) auf.

In Untersuchungen von Radtke et al. (2002) ergaben sich für vier im Nüchternplasma untersuchten Flavonoide (Quercetin, Kämpferol, Naringenin und Hesperetin) signifikante Korrelationen zur 7-d-Zufuhr ($r = 0,30 - 0,50$; $p < 0,05$). Es wurden auch die Korrelationen zur Zufuhr am Tag unmittelbar vor der Blutabnahme berechnet. Für alle vier Flavonoide waren diese

Korrelationen ($r = 0,42 - 0,64$; $p < 0,05$) größer als die zur 7-d-Zufuhr. Die höchste Korrelation ergab sich dabei für Hesperetin ($r = 0,64$; $p < 0,01$).

Diese Ergebnisse stützen die Ansicht, dass neben den Plasmakonzentrationen von Kämpferol und Quercetin auch Naringenin und Hesperetin trotz ihrer relativ kurzen Eliminations-Halbwertszeit von 1,3 – 2,9 h (Fuhr und Kummert, 1995a; Erlund et al., 2001) mögliche Biomarker für die mittelfristige Zufuhr und gute Biomarker für ihre kurzfristige Zufuhr darstellen.

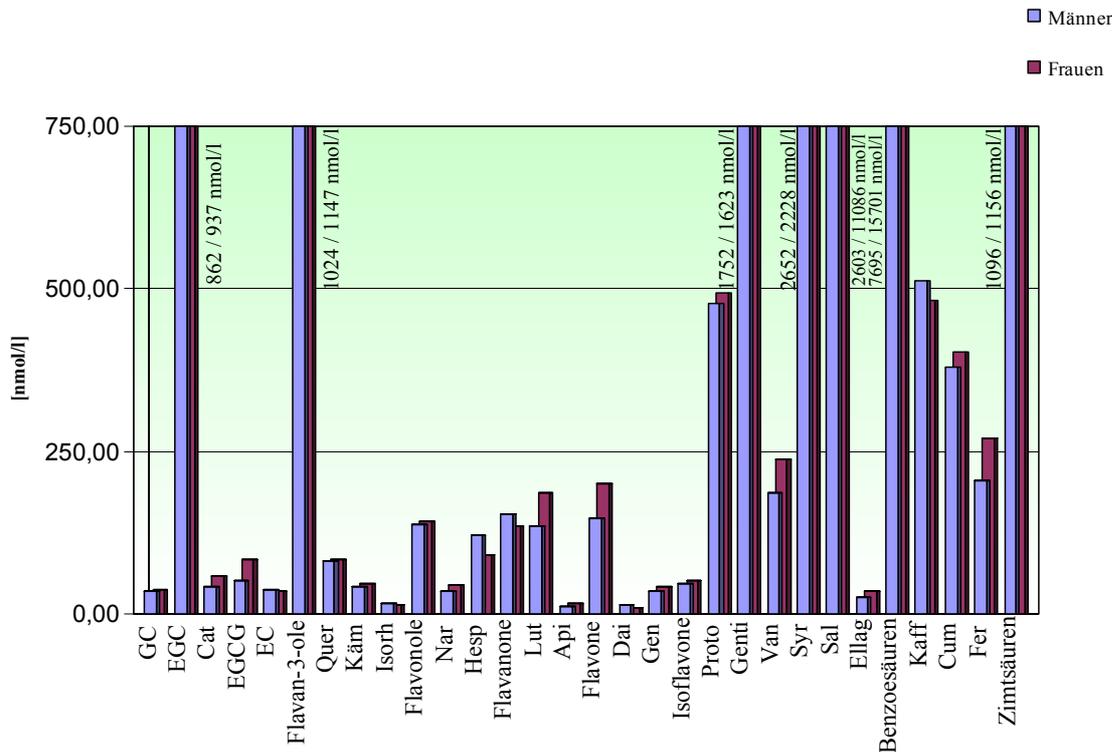


Abb. 38: Vergleich der Polyphenolkonzentrationen der Männer und Frauen

Daher werden auch die oben erwähnten Flavonoide, zumindest als Biomarker für die kurzfristige Zufuhr angesehen. Die Übertragbarkeit auf andere Flavonoide oder auf die Phenolsäuren sollte in weiteren Untersuchungen mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode überprüft werden. Es sollten auch, wie von Erlund et al. (2001) angesprochen, für weitere Untersuchungen sowohl Zufuhrdaten anhand von Ernährungsprotokollen als auch die Flavanonkonzentrationen im Plasma ermittelt werden, um diese Ergebnisse miteinander zu kombinieren. Denn vor Allem dann, wenn, wie von Erlund et al. (2001) angenommen, Personen, die anführen Zitrusfrüchte zu verzehren, dies auch regelmäßig tun, kann von einer Akkumulierung von Naringenin und Hesperetin im Plasma ausgegangen werden, was zu hohen Plasmakonzentrationen führt, wie sie auch in der vorliegenden Studie nachgewiesen wurden.

Gemäß Noroozi et al. (2000) ist die Konzentration der Polyphenole im Plasma aufgrund der von

ihnen beschriebenen Wechselbeziehungen zur Polyphenolzufuhr ($r = 0,7 - 0,8$) genauso ein geeigneter Marker für ihre Zufuhr wie dies bereits für Vitamin C ($r = 0,3 - 0,4$), für Carotinoide ($r = 0,1 - 0,5$) oder Vitamin E ($r = 0,1$) beschrieben wurde (Bingham et al., 1997; Marshall et al., 1997; Sinha et al., 1992). De Vries et al. (1998) machten allerdings die Einschränkung, dass die Flavonoidkonzentrationen im Plasma möglicherweise eher ein Marker für die mittelfristige Zufuhr sind und dass für die langfristige Zufuhr wiederholte Messungen erfolgen müssten.

Viele Autoren führen den gesundheitlichen Nutzen einer obst- und gemüsereichen Ernährung nicht nur auf die Zufuhr antioxidativer Vitamine und Carotinoide zurück, sondern schließen auch die bioaktiven Polyphenole in diese Überlegungen mit ein (Wattenberg, 1990; Steinmetz und Potter, 1991a; Stähelin, 1995). Sie sprechen dabei von einem antioxidativen Cocktail, den wir mit Obst und Gemüse zuführen und schließen eine unbekannte Zahl von nutritiven und nicht-nutritiven Substanzen mit ein. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Untersuchung die Korrelationen zwischen den Polyphenolkonzentrationen und den Carotinoid- und Tocopherolkonzentrationen sowie Vitamin C im Plasma errechnet, um so einen möglichen Zusammenhang dieser Antioxidantien zu zeigen.

Zwischen den Plasmakonzentrationen von Catechin und Epigallocatechin wurde keine signifikante Korrelationen mit den Carotinoid-, den Tocopherol- oder den Vitamin C-Konzentrationen im Plasma gefunden. Ein möglicher Grund hierfür könnte in der Beobachtung liegen, dass sich die Plasmagehalte von Catechin und Epigallocatechin durch Umlagerungs- oder Abbaureaktionen verändern können und dass daher die Konzentration an Epigallocatechin in der vorliegenden Studie deutlich über dem Niveau der übrigen Flavan-3-ole detektiert worden sind (siehe Tabelle 24). Zwischen α -Tocopherol sowie γ -Tocopherol und den übrigen Flavan-3-olen lassen sich hingegen signifikante Zusammenhänge finden. Die Tocopherole sind, ebenso wie mit den Catechinen, mit jeweils mindestens einem Vertreter der anderen Polyphenolgruppen korreliert. (siehe Tabelle 45). Während Quercetin mit beiden Tocopherolen und Kämpferol mit α -Tocopherol korreliert, wies Isorhamnetin mit Cryptoxanthin, nicht aber mit den Tocopherolen, signifikante Korrelationskoeffizienten auf. Analog dazu sind Naringenin, Luteolin, Genistein und Ellagsäure mit den untersuchten Tocopherolen negativ korreliert. Für Hesperetin, Apigenin, Daidzein und alle übrigen Hydroxybenzoesäuren hingegen wurden mit den untersuchten Carotinoiden positive Korrelationskoeffizienten gefunden. Vanillinsäure wies eine negative Korrelation zu Cryptoxanthin und α -Carotin auf. Die Hydroxyzimtsäuren Kaffeesäure und p-Cumarsäure korrelierten sowohl mit den Tocopherolen als auch mit den Carotinoiden. Hesperetin und Daidzein zeigten einen signifikanten Zusammenhang mit Vitamin C (siehe Tabelle 45).

Möglicherweise zeigt sich in diesen Ergebnissen die allgemeine Annahme bestätigt, dass durch Einwirkung antioxidativ wirksamer Substanzen Vitamine regeneriert werden können und dass so

eine Steigerung oder Aufrechterhaltung ihrer Vitaminleistung herbeiführt wird, was auch in den Untersuchungen von Steinmetz und Potter (1991a) beobachtet wurde. Allerdings können die Unterschiede der Beziehungen zu den Tocopherolen und den Carotinoiden innerhalb der jeweiligen Polyphenolgruppen hier nicht geklärt werden und es ist davon auszugehen, dass eine Reihe von noch unbekanntem Gründen für diese Zusammenhänge verantwortlich sind.

Auch Boyle et al (2000) untersuchten den wechselseitigen Einfluss von Polyphenolen und Carotinoiden bei der Resorption. Nach einmaliger Gabe von Zwiebeln und Tomaten konnten erhöhte Plasmakonzentrationen von Quercetin gefunden werden, aber kein Isorhamnetin und auch keine signifikante Erhöhung der Lycopinkonzentration. Die Ursachen für diese Beobachtungen blieben jedoch unklar und analoge Ergebnisse wurden bisher nicht beschrieben. Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Korrelationen könnte darin liegen, dass Personen, die viel Flavanone (Zitrusfrüchte), Flavone (Kräuter und Kräutertees) Flavonole und Catechine (Tee und Gemüse) sowie Hydroxyphenolsäuren (Kaffee, Getreide und Obst) zuführen, im Zuge ihres gesunden Lebensstils auch viel carotinoidreiches Obst und vor allem Gemüse verzehren. Es bestehen also viele Zusammenhänge zwischen den Polyphenolen im Plasma, deren Bedeutung unter Berücksichtigung der gebildeten, absorbierten und re-absorbierten Metaboliten in Zukunft jedoch noch weiter untersucht werden muss. Der Zusammenhang zwischen dem Konsum von Obst oder Gemüse und einem niedrigen Krebsrisiko ist davon abgesehen mittlerweile jedoch hinreichend gesichert (Steinmetz und Potter, 1991a; Block et al., 1992). Da, von wenigen Ausnahmen abgesehen, einzelne Nährstoffe in Lebensmitteln naturgemäß allerdings nicht isoliert vorkommen, scheint es, wie oben beschrieben, naheliegend, dass Inhaltsstoffe im Verbund gemeinsam wirksam sind.

5.4 Polyphenolkonzentrationen im Plasma und Brustkrebsrisiko in der EPIC-Studie

Einige epidemiologische Studien deuten auf eine protektive Wirkung polyphenolreicher Ernährung hin. Es konnte mehrfach eine negative Korrelation zwischen der Häufigkeit des Auftretens von „Free Radical Diseases“ wie koronaren Herzerkrankungen oder Krebs und der Aufnahme von Polyphenolen mit der Nahrung gezeigt werden (Keli et al., 1996; Yochum et al., 1999; Geleijnse et al., 1999; Hirvonen et al., 2001; Geleijnse et al., 2002). Viele Arbeiten haben jedoch mit Schwierigkeiten bei der Abschätzung der Zufuhr von Polyphenolen zu kämpfen und derartige Untersuchungen lieferten bisher oft widersprüchliche Ergebnisse, die ihre Ursachen z.B. in der Verwendung unterschiedlicher Zufuhrtabellen haben könnten. Die Abschätzung der Zufuhr kann darüber hinaus fehlerbehaftet sein, wenn allgemeingültige Informationen über ihre Gehalte im Lebensmittel nur begrenzt zur Verfügung stehen. Außerdem können sich die biologischen Eigenschaften der Polyphenole durch Umwandlungsprozesse beim Metabolismus verändern, was eine Abschätzung ihrer Wirkung zusätzlich erschwert. Crews et al. (2001) heben hervor, dass es zwar Informationen über die Zufuhr von Flavonolen (Quercetin, Kämpferol, Myricetin) und Flavonen (Luteolin und Apigenin) in verschiedenen Populationen gibt (Hertog et al., 1993; Keli et al., 1996; Knekt et al., 1996; Rimm et al., 1996), dass aber keine Plasma- oder Urinkonzentrationen der Polyphenole aus diesen Studien zu Verfügung stehen, die deren Ergebnisse ergänzen könnten. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit das Risiko an Brustkrebs zu erkranken anhand der Plasmakonzentrationen von Flavonoiden und Phenolsäuren untersucht.

Die Plasma-Polyphenolkonzentrationen der Teilnehmer an der Bayerischen Verzehrsstudie II (n = 568) und die Plasma-Polyphenolkonzentrationen der Teilnehmer an der EPIC-Studie (n = 402) sind in Tabelle 60 im Vergleich dargestellt. Im Mittel (Median) liegen die Plasmakonzentrationen der untersuchten Flavan-3-ole des bayerischen Kollektivs unterhalb der entsprechenden Konzentrationen in der EPIC-Studie. Auch die maximal erreichten Plasmakonzentrationen der Flavan-3-ole sind bei den Teilnehmern der BVS II-Studie niedriger als im Vergleichskollektiv der EPIC-Studie (siehe Tabelle 60).

Bei den Plasmakonzentrationen der Flavonole sind die Unterschiede der beiden Gruppen weniger stark ausgeprägt. Die Kämpferolkonzentration ist im Gegensatz zu Quercetin und Isorhamnetin in beiden Teilnehmergruppen der EPIC -Studie niedriger als im bayerischen Kollektiv (BVS II).

Die Plasmakonzentrationen der Flavanone Naringenin und Hesperetin liegen im Plasma der Probanden der EPIC-Studie im Mittel unterhalb der Nachweisgrenze. Bei den Probanden der BVS II-Studie sind in der 50. Perzentile jedoch beide Flavanone nachweisbar und die maximal

erreichten Konzentrationen sind bis zum Dreifachen höher als bei den Teilnehmern an der EPIC-Studie.

Die nachgewiesene Menge der Flavone Luteolin und Apigenin ist bei den Teilnehmern der BVS II-Studie im Mittel etwas geringer als in der Vergleichsstudie. Da die in beiden Kollektiven ermittelte Menge an Apigenin mit 4 nmol/l jedoch gleich hoch ist, geht der Unterschied hauptsächlich auf die Unterschiede in der Verteilung der Luteolinkonzentration zurück, die in der BVS II-Studie geringer als bei den Fällen, aber größer als bei den Kontrollen der EPIC-Studie ist. Daidzein war in der 50. Perzentile weder im Plasma der Teilnehmer der BVS II-Studie noch im Plasma der Teilnehmer der EPIC-Studie nachweisbar und nur bei den Probanden der EPIC-Studie konnte Genistein in der 50. Perzentile gefunden werden. Die höchsten Plasmakonzentrationen der Isoflavone wurden allerdings bei den Teilnehmern der BVS II-Studie gemessen.

Die Plasmakonzentrationen von Protocatechusäure sind im Kollektiv der Bayerischen Verzehrsstudie II bedeutend niedriger als bei der EPIC-Studie, wohingegen die Plasmakonzentrationen von Gentisinsäure, Vanillinsäure, Syringasäure und Salicylsäure im Kollektiv der EPIC-Studie niedriger sind. Die Konzentrationen von Ellagsäure unterscheiden sich in beiden untersuchten Gruppen allerdings kaum und im Mittel liegen ihre Plasmakonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze.

Die Kaffeesäurekonzentration ist bei den Probanden der BVS II-Studie zwar im Mittel höher, aber die höchsten gemessenen Plasmakonzentrationen überschreiten in der EPIC-Studie bei den Fällen und besonders bei den Kontrollen die höchsten ermittelten Konzentrationen bei den Probanden der Bayerischen Verzehrsstudie II um das 4 – 8fache, und auch die Plasmakonzentrationen von p-Cumarsäure und besonders Ferulasäure sind bei den Probanden aus EPIC-Heidelberg höher als im Kollektiv der BVS II.

Die Plasmakonzentrationen der Polyphenole im Kollektiv der EPIC-Studie (n = 402) schwankten über einen sehr breiten Bereich. Während die Hydroxybenzoesäuren in Konzentrationen bis zu 6 µmol/l nachgewiesen werden konnten (Median), waren die Flavan-3-ole und Hydroxyzimtsäuren in etwa in vergleichbaren Konzentrationen im Plasma enthalten (1,2 – 1,4 µmol/l). Die Flavonole, Flavone und Isoflavone wiesen deutlich geringere Konzentrationen auf (15 nmol/l – 160 nmol/l). Die Flavanone waren im Plasma in sehr geringen Mengen zu finden. In der 50. Perzentile lagen die Konzentrationen von Naringenin und Hesperetin unter der Nachweisgrenze (siehe Tabelle 46).

Tab. 60: Vergleich der Plasmakonzentrationen der Probanden aus der BVS II – Studie mit denen der Probanden aus der EPIC – Studie

Polyphenole	BVS II – Studie			EPIC – Studie					
	Median	Min.	Max.	Fälle (n = 198)			Kontrollen (n = 204)		
Flavan-3-ole:	Median	Min.	Max.	Median	Min.	Max.	Median	Min.	Max.
GC	14	0	620	15	0	473	13	0	961
EGC	700	0	2916	920	0	10054	865	0	7857
Cat	13	0	688	62	0	1028	58	0	1754
EGCG	0	0	907	62	0	3688	57	0	3377
EC	0	0	877	66	0	1709	67	0	4106
<i>Summe:</i>	929	0	3647	1442	39	11465	1180	40	8705
Flavonole:									
Quer	70	0	564	103	0	1124	104	0	1291
Käm	14	0	1357	10	0	914	12	0	1159
Isorh	8	0	309	18	0	246	18	0	332
<i>Summe:</i>	102	0	1778	154	0	1422	164	0	1318
Flavanone:									
Nar	16	0	581	0	0	176	0	0	392
Hesp	27	0	900	0	0	706	0	0	342
<i>Summe:</i>	85	0	962	0	0	737	0	0	410
Flavone:									
Lut	47	0	3406	82	0	4126	71	0	2039
Api	4	0	333	4	0	426	4	0	135
<i>Summe:</i>	60	0	3406	88	0	4142	73	0	2039
Isoflavone:									
Dai	0	0	433	0	0	506	0	0	363
Gen	0	0	821	10	0	164	11	0	323
<i>Summe:</i>	10	0	821	15	0	520	16	0	685
Hydroxybenzoesäuren:									
Proto	377	0	3574	3438	0	19134	1963	0	21088
Genti	1333	0	10136	927	0	5737	1054	0	9938
Van	93	0	3914	74	0	3307	70	0	3145
Syr	599	0	25478	268	0	33871	289	0	12968
Sal	259	0	1122686	178	0	84815	162	0	270571
Ellag	0	0	625	0	0	557	0	0	737
<i>Summe:</i>	3811	27	1129418	6524	126	89040	5615	340	285400
Hydroxymitsäuren:									
Kaff	415	0	2373	280	0	8165	304	0	17653
Cum	32	0	6495	388	0	6985	365	0	5371
Fer	97	0	3395	248	0	3827	364	0	6400
Summe:	685	12	9044	1165	34	9963	1326	87	19110

Die Plasmakonzentrationen der Probanden von Luteolin, der Summe der Flavone, von Protocatechusäure und der Summe der Hydroxybenzoesäuren waren in der EPIC-Studie bei den Fällen signifikant höher als bei den Kontrollen. Die Plasmakonzentrationen von Kämpferol und der Summe der Flavonole sowie von Ferulasäure hingegen waren bei den Kontrollen signifikant höher als bei den Fällen. Passend zu diesen Ergebnissen zeigte die logistische Regression der Plasmakonzentrationen von Kämpferol, der Summe der Flavonole und von Ferulasäure einen

Effekt auf das Brustkrebsrisiko, die logistische Regression der Plasmakonzentrationen von Luteolin, der Summe der Flavone, von Protocatechusäure und der Summe der Hydroxybenzoesäuren hingegen nicht (siehe Tabellen 47 und 48).

Die Plasmakonzentration von Kämpferol war 10 nmol/l (Median) bei den Fällen und 12 nmol/l (Median) bei den Kontrollen. Die Odds Ratio in der höchsten Quartile der Kämpferolkonzentration im Vergleich zu der Quartile mit der niedrigsten Konzentration war 0,608. Der Effekt war jedoch nicht signifikant (95% C.I. 0,33 – 1,10).

Die mittlere Plasmakonzentration der Summe der Flavonole war bei den Fällen 154 nmol/l (Median) und 164 nmol/l (Median) bei den Kontrollen. Der Effekt bei der Summe der Flavonole war mit einem relativen Risiko von 0,533 stärker als für Kämpferol alleine und war statistisch signifikant (95% C.I. 0,30 – 0,95).

Die mittlere Plasmakonzentration von Ferulasäure war bei den Fällen 248 nmol/l (Median) und bei den Kontrollen 364 nmol/l (Median). Die Odds Ratio in der Quartile mit der höchsten Ferulasäurekonzentration im Vergleich zu der Quartile mit der niedrigsten Konzentration war 0,548 und ebenfalls statistisch signifikant (95% C.I. 0,31 – 0,97).

Der p-Wert für den Trend bei Verwendung der kontinuierlichen Plasmawerte von Kämpferol ($p_{\text{cont.}} = 0,028$) und der Summe der Flavonole ($p_{\text{cont.}} = 0,010$) zeigte eine statistisch signifikante, inverse Assoziation mit dem Risiko für Brustkrebs. Ebenso zeigte der p-Wert für den Trend bei Verwendung der kategoriellen Plasmawerte von Ferulasäure eine statistisch signifikante, inverse Assoziation mit dem Risiko für Brustkrebs ($p_{\text{cat.}} = 0,028$).

Nach der Adjustierung für einige wichtige Modulatoren des Brustkrebsrisikos (siehe Tabelle 48) konnte eine Senkung des Brustkrebsrisikos bei Kämpferol (OR 0,621; 95% C.I. 0,33 - 1,19) und bei der Summe der Flavonole (OR 0,543; 95% C.I. 0,29-1,02) gefunden werden, die aber in beiden Fällen statistisch nicht signifikant war. Im Gegensatz dazu blieb der statistisch signifikante, inverse Effekt von Ferulasäure weiterhin bestehen. Die Odds Ratio der höchsten Quartile der Ferulasäurekonzentration im Vergleich zur niedrigsten Quartile war 0,516 (95% C.I. 0,27-0,98). Der p-Wert für den Trend bei der adjustierten logistischen Regression für die Effekte der Plasmakonzentrationen auf das Brustkrebsrisiko zeigte bei Verwendung der kontinuierlichen Plasmawerte für Kämpferol ($p_{\text{cont.}} = 0,046$) und für die Summe der Flavonole ($p_{\text{cont.}} = 0,019$) weiterhin eine statistisch signifikante, inverse Assoziation mit dem Risiko für Brustkrebs. Bei Verwendung der kategoriellen Plasmawerte zeigte auch Ferulasäure weiterhin eine statistisch signifikante, inverse Assoziation mit dem Risiko für Brustkrebs ($p_{\text{cat.}} = 0,037$, siehe Tabelle 48).

Ein großer Teil der Literatur, die zu der protektiven Wirkung von Polyphenolen auf das Brustkrebsrisiko vorliegt, besteht in epidemiologischen Studien über die Zufuhr von polyphenolreichen Lebensmitteln.

Wu et al. (2003) führten eine populationsbasierte Fall-Kontroll-Studie über den Zusammenhang von Tee (*Camellia sinensis*) und Brustkrebs durch. Die Arbeitsgruppe unterschied dabei erstmalig zwischen dem Verzehr von grünem Tee und schwarzem Tee im gleichen Kollektiv. Die Studie wurde mit 501 Brustkrebspatientinnen und 594 gesunden Kontrollpersonen (US-Amerikanerinnen asiatischer Herkunft) durchgeführt. Wu et al. (2003) fanden dabei keinen Zusammenhang zwischen dem Verzehr von schwarzem Tee und dem Risiko für Brustkrebs. Im Gegensatz dazu zeigten Probanden, die grünen Tee trinken ($>85,7$ ml/Tag), im Vergleich zu Testpersonen, die angaben, keinen grünen Tee zu trinken, ein statistisch signifikant verringertes Risiko für Brustkrebs (OR 0,53; 95% C.I. 0,35-0,78), und der Trend blieb auch nach der Adjustierung auf Verzehr von schwarzem Tee signifikant ($p_{\text{trend}} = 0,001$). Im Vergleich zu Frauen, die gewöhnlich weder schwarzen noch grünen Tee trinken, war das Risiko für Brustkrebs bei den Frauen am niedrigsten, die nur grünen Tee trinken (OR 0,57; 95% C.I. 0,36-0,90), etwas weniger verringert bei den Frauen, die sowohl schwarzen als auch grünen Tee trinken (OR 0,69; 95% C.I. 0,47-1,00) und unverändert bei den Frauen, die nur schwarzen Tee trinken (OR 1,00; 95% C.I. 0,71-1,42). Ferner weisen die Autoren darauf hin, dass die inverse Assoziation zwischen dem Risiko für Brustkrebs und dem Verzehr von grünem Tee vor allem bei Frauen gefunden wurde, die Sojaprodukte nur in geringen Mengen verzehren, und folgern, dass es noch zu klärende Zusammenhänge zwischen den Schutzmechanismen der Catechine und der Isoflavone gibt.

Frühere Fall-Kontroll-Studien und Kohortenstudien, die in anderen westlichen Populationen durchgeführt wurden und auch die Plasmakonzentrationen der Tee-Polyphenole aus der Gruppe der Catechine, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden, zeigten keine Assoziation zwischen Teekonsum und dem Risiko für Brustkrebs. So konnten etwa Goldbohm et al. (1996) in einer prospektiven Kohortenstudie zum Einfluss von schwarzem Tee auf das Brustkrebsrisiko mit 650 Brustkrebspatientinnen (The Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer) auch keine Assoziation zwischen Tee und dem Risiko für Brustkrebs finden. In der Gruppe mit dem höchsten Konsum an schwarzem Tee (> 5 Tassen/Tag) war die Odds Ratio 1,31 (95% C.I. 0,86-1,99). Auch der Trend war statistisch nicht signifikant ($p_{\text{trend}} = 0,185$). Als möglicher Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte angeführt werden, dass in westlichen Populationen in früheren Jahren vorwiegend schwarzer Tee konsumiert wurde und dass daher der Effekt von grünem Tee nicht berücksichtigt wurde. In diesem Zusammenhang ist daher auch noch nicht geklärt, inwiefern sich die Zufuhrquelle der Catechine aus schwarzem oder grünem Tee auf ihre Plasmakonzentration oder die Form der auftretenden Flavan-3-ole auswirkt (Wu et al, 2003;

Goldbohm et al., 1996).

Die Bedeutung von grünem Tee in Bezug auf das Brustkrebsrisiko wurde auch in einer japanischen Kohortenstudie untersucht. In dieser Arbeit konnten Nagano et al. (2001) bei 270 Brustkrebspatientinnen aus einer Gruppe Überlebender der Atombombenabwürfe auf Hiroshima und Nagasaki keine Assoziation zwischen dem Brustkrebsrisiko und dem Verzehr von mehr als fünf Tassen grünem Tee/Tag im Vergleich zu Testpersonen, die 0 – 1 Tasse/Tag trinken, nachweisen (OR 1,0; 95% C.I. 0,67 – 1,6).

In einer früheren Arbeit untersuchten Zheng et al. (1996) die Assoziation zwischen dem Verzehr von Tee und dem Risiko für Krebs in einer prospektiven Kohortenstudie an 35.369 postmenopausalen Frauen in den USA. Es konnte kein Effekt des Verzehrs von > 2 Tassen Tee/Tag auf das Risiko für Brustkrebs gefunden werden, wobei aber die dabei eingesetzte Menge an Teeblättern nicht weiter differenziert wurde. Zheng et al. (1996) konnten in der Quartile mit dem höchsten Teekonsum (> 2 Tassen/Tag) jedoch einen risikosenkenden Einfluss auf Krebserkrankungen des Verdauungstrakts, des Urinaltrakts und eine geringfügige Risikosenkung auf die Summe aller Krebsarten nachweisen, im Vergleich zu Frauen, die nie oder unregelmäßig Tee tranken. Die mit Tee zugeführten Polyphenole stammen überwiegend aus der Gruppe der Flavan-3-ole (Catechine), für die auch in der hier vorliegenden Studie kein Effekt gefunden werden konnte.

Bezüglich der Assoziation zwischen dem Verzehr von Obst bzw. Gemüse und Brustkrebs ist eine neuere Arbeit von Riboli und Norat (2003) zu nennen, die 15 Fall-Kontroll-Studien und 10 Kohortenstudien hinsichtlich möglicher Effekte prüften. Die Autoren stellten fest, dass es zwischen den Ergebnissen von Fall-Kontroll-Studien und denen von Kohortenstudien bedeutende Abweichungen bezüglich des Effektes von Obst und Gemüse auf das Krebsrisiko gibt. Wenn alle Studien zusammen betrachtet wurden, war nämlich ein protektiver Effekt des Gemüseverzehrs auf das Brustkrebsrisiko ebenso erkennbar (OR 0,96; 95% C.I. 0,94 – 0,98), wie bei der Untersuchung aller Fall-Kontroll-Studien (OR 0,86; 95% C.I. 0,78 – 0,94). Bei der Untersuchung aller ausgewählten Kohortenstudien konnte jedoch keine Assoziation des Gemüseverzehrs mit dem Brustkrebsrisiko gefunden werden und weder die Fall-Kontroll-Studien noch die Kohortenstudien zeigten eine Assoziation des Obstverzehrs mit dem Brustkrebsrisiko. Auch in der prospektiven Kohortenstudie, der European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition Studie (EPIC), konnte in Übereinstimmung mit den Beobachtungen einer früheren prospektiven Studie bei 351825 gesunden Frauen und 7377 Brustkrebsfällen (Smith-Warner et al., 2001) keine Assoziation zwischen der Zufuhr von Obst und Gemüse und dem Risiko für Brustkrebs gefunden werden (van Gils et al., 2005).

Prospektive Studien lieferten demzufolge geringere Evidenz als Fall-Kontroll-Studien in Bezug

auf die Reduzierung des Brustkrebsrisikos durch den Verzehr von pflanzlichen Lebensmitteln. In einer Fall-Kontroll-Studie wird die Zufuhr aber üblicherweise erst erfasst, nachdem die Erkrankung eingetreten ist. Dadurch muss die angenommene Zufuhr retrospektiv erfasst werden, und es ist demzufolge ungewiss, ob die postulierte Zufuhr tatsächlich dem Krankheitsgeschehen vorausgegangen ist. Auch eine mögliche Erinnerungs-Verzerrung („recall bias“) ist bei solch einem Studiendesign zu berücksichtigen. Bei prospektiven Kohortenstudien hingegen wird die Zufuhr zu Beginn der Studie erhoben bzw. das Plasma der Probanden entnommen und zukünftig auftretende Krankheitsfälle im Verlauf der Studie untersucht. Die zu Beginn der Studie erfassten Expositionsfaktoren der Probanden (Zufuhr oder Plasmakonzentration) werden mit der auftretenden Krankheit in Verbindung gebracht. Daraus lässt sich dann das Erkrankungsrisiko ermitteln und es werden dadurch vermutlich genauere und realistischere Ergebnisse erzielt. Auch in der EPIC-Studie wurde diese Vorgehensweise angewendet. Für die vorliegende Studie wurden aus der Heidelberger EPIC-Kohorte (insgesamt über 25.000 Frauen im Alter von 35 bis 65 Jahren) 198 Plasmaproben von Frauen ausgewählt, die später an Brustkrebs erkrankten und mit 204 gesunden Kontrollen verglichen. Der hier angewendete, prospektive Studienansatz kombiniert mit der Untersuchung von Plasmaproben ist im Gegensatz zu den üblichen Fall-Kontroll-Studien zu bevorzugen, da dieses Modell nicht anfällig für Verzerrungen durch „recall bias“ ist.

Der Zusammenhang von Gemüseverzehr und Brustkrebsinzidenz in Fall-Kontroll-Studien zeigte sich auch schon früher in einer deutschen Studie mit Frauen unter 50 Jahren (706 Fälle und 1.381 Kontrollen). In dieser Fall-Kontroll-Studie von Hermann et al. (2002) war das Brustkrebsrisiko mit dem Gemüseverzehr signifikant invers assoziiert ($p_{\text{trend}}: 0,034$). Das Risiko für Brustkrebs in der Quartile mit dem höchsten im Vergleich zu der Quartile mit dem niedrigsten Gemüseverzehr war dabei niedriger als in der Meta-Analyse von Riboli und Norat (2003) und war bei premenopausalen Frauen sogar noch deutlicher ausgeprägt (OR 0,64; 95% C.I. 0,43 – 0,96). Die Ergebnisse dieser Studien stimmen gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein, da Kämpferol, die Flavonole (gesamt) und Ferulasäure, für die in der vorliegenden Studie ein risikosenkender Effekt auf das Brustkrebsrisiko gezeigt werden konnte (siehe Tabelle 48), zu einem wesentlichen Anteil durch Gemüse zugeführt werden (Linseisen et al., 1997; Radtke et al., 1998).

Die in Sojaprodukten in teilweise beträchtlichen Mengen vorkommenden Isoflavone werden seit einiger Zeit aufgrund ihrer östrogenen Eigenschaften im Zusammenhang mit Brustkrebs diskutiert. Peeters et al. (2003) haben 9 Fall-Kontroll-Studien und 4 prospektive Studien auf die

Assoziation zwischen der Zufuhr von Sojaprodukten und dem Risiko für Brustkrebs hin überprüft. Zwei frühe Studien (Lee et al., 1991, Hirose et al., 1995) zeigten dabei für premenopausale Frauen einen protektiven Effekt von häufigem Sojaverzehr auf das Brustkrebsrisiko. Einige spätere Studien fanden jedoch keine protektiven Effekte von häufigem Sojaverzehr (Yuan et al., 1995; Witte et al., 1997; Horn-Ross et al., 2001). Wu et al. (1996) hingegen fanden nur bei US-Amerikanerinnen asiatischer Herkunft, die nicht in den Vereinigten Staaten geboren wurden eine signifikante Risikosenkung (OR 0,8; 95% C.I. 0,7-0,9), bei in den USA geborenen Frauen war der Effekt hingegen nicht signifikant. Aus dieser Beobachtung leiten die Autoren ab, dass Soja nur schützend wirkt, wenn sein Verzehr in hohen Mengen und in jungen Jahren stattfindet. Neuere Untersuchungen aus Shanghai unterstützen diese Beobachtungen. In einer Untersuchung konnte ein risikosenkender Effekt (OR 0,5 95% C.I. 0,4-0,7) von Sojaverzehr im jugendlichen Alter gezeigt werden (Shu et al., 2001). Dieser Effekt zeigte sich auch bei postmenopausalen Frauen, aber nur dann, wenn hohe Mengen zugeführt wurden (Dai et al., 2001). Diese beiden Feststellungen passen zu den Ergebnissen der hier vorgelegten Arbeit, da die mittleren Konzentrationen der Isoflavone mit 0 nmol/l Daidzein und 10 nmol/l Genistein sehr niedrig sind und auch das durchschnittliche Alter der Probanden war höher (53 Jahre) als bei Shu et al. (2001) beschrieben. Entsprechend konnte für die Isoflavone in diesem Kollektiv kein risikosenkender Effekt der Plasmakonzentration auf das Brustkrebsrisiko festgestellt werden. Vier prospektive Studien in drei asiatischen Populationen und einem nicht asiatischen Kollektiv (The Iowa Women's Health Study), zeigten jeweils eine geringfügige Risikosenkung für die Entstehung von Brustkrebs bei Frauen, die häufig Sojaprodukte verzehren, aber keines der Ergebnisse war statistisch signifikant. Ob der protektive Effekt dabei also durch Phytoöstrogene in der Nahrung verursacht wird oder ob sie als Biomarker für eine gesunde Ernährung dienen, ist bislang noch ungeklärt, wie auch Adlercreutz (2003) in einer jüngeren Veröffentlichung darlegte.

Bisher wurde vor allem der wichtige Einfluss der Zufuhr von Obst, Gemüse oder Tee auf das Risiko für Krebs besprochen (Riboli und Norat, 2003). Glade (1999) schätzte in einer vom American Institute for Cancer Research (AICR) und vom World Cancer Research Fund (WCRF) unterstützten Veröffentlichung den Anteil der durch Fehlernährung verursachten Todesfälle durch Krebs auf 33 %. Er folgerte daraus, dass 30 – 40 % aller inzidenten Krebsfälle durch gesunde Ernährung, ausreichend körperliche Aktivität und durch das Halten des Normalgewichtes zu verhindern sind, und hebt hervor, dass alleine durch eine gesunde Ernährungsweise, die reich an verschiedenen Obst- und Gemüsesorten ist, etwa 20 % aller auftretenden Krebsfälle verhindert werden könnten.

Um die für diesen beachtlichen Effekt verantwortlichen Stoffe zu identifizieren, untersuchen

einige Studien den Einfluss der Zufuhr ausgewählter Polyphenole, für die *in vitro* antikanzerogene Wirkung gezeigt wurde, auf das Risiko für Brustkrebs. Dabei wurden bisher vorwiegend Flavan-3-ole (Catechin, Epicatechin, Epigallocatechin), Flavonole (Quercetin, Kämpferol, Myricetin), Flavone (Apigenin, Luteolin), Flavanone (Naringenin, Hesperetin) und Isoflavone (Genistein, Daidzein) berücksichtigt. Zu dem Zusammenhang zwischen der Zufuhr von Phenolsäuren und Brustkrebs liegen bisher jedoch noch keine Untersuchungen vor.

Catechine (Flavan-3-ole) sind bioaktive Flavonoide, die besonders in Tee und Früchten vorkommen. Viele Effekte, die in epidemiologischen Studien z.B. mit Tee beobachtet wurden, werden daher der Wirkung der Catechine zugesprochen. Einige solcher Studien zeigen, damit übereinstimmend, inverse Assoziationen zwischen der Zufuhr von Catechinen und Brustkrebs, obwohl die beobachteten Effekte derzeit aber auch hier noch widersprüchlich sind. Dabei scheint die Zufuhr von Catechinen, vor allem in Abhängigkeit von der Lokalisierung der Erkrankung, einen unterschiedlichen Einfluss auf das Krebsrisiko zu haben. Arts et al. (2002) untersuchten in einer Kohortenstudie (The Iowa Women's Health Study, United States) mit postmenopausalen Frauen im Alter von 55 – 69 Jahren ($n = 1069$) das Risiko, an Krebs zu erkranken. Sie fanden dabei jedoch keine inverse Assoziation zwischen der Zufuhr von Catechinen und Brustkrebs in der Quintile mit der höchsten Zufuhr an Catechinen (75,1 mg/d) im Vergleich zur Quintile mit der niedrigsten Zufuhr (3,6 mg/d) (OR 1,04; 95% C.I. 0,84-1,28). Das Risiko für Rektalkrebs in der Quartile mit der höchsten Zufuhr war hingegen statistisch signifikant verringert (OR 0,55; 95% C.I. 0,32-0,95). Die Autoren unterscheiden weiterhin, dass die Catechine, welche hauptsächlich über Früchte zugeführt wurden, (+)-Catechin und (-)-Epicatechin waren und dass ihre Zufuhr invers assoziiert war mit dem Risiko für Krebserkrankungen des oberen Verdauungsapparats (OR 0,60; 95% C.I. 0,37-0,97), wohingegen eine hohe Zufuhr von Catechinen, welche über Tee zugeführt werden, vor Rektalkrebs schützen könnte. Arts et al. (2002) nehmen an, dass diese Differenzen durch Unterschiede in der Bioverfügbarkeit oder dem Metabolismus der Catechine oder aufgrund von Interaktionen mit anderen Lebensmittelinhaltstoffen hervorgerufen werden. Die Plasma-Catechinkonzentrationen der vorliegenden Studie zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen, und es konnte ebenfalls kein Effekt auf das Brustkrebsrisiko gefunden werden.

Peterson et al. (2003) untersuchten die Zufuhr aller Flavonoidgruppen (Flavan-3-ole, Flavonole, Flavone, Flavanone, Isoflavone) sowie die Zufuhr der Anthocyanidine von 820 Brustkrebspatientinnen und 1548 gesunden Kontrollpersonen. Die Flavonoidgehalte der Lebensmittel wurden den US Department of Agriculture databases entnommen (US Department of Agriculture-Iowa State University Database, 2002; US Department of Agriculture, 2003). Diese griechische Fall-Kontroll-Studie fand eine statistisch signifikante, inverse Assoziation

(OR 0,84; 95% C.I. 0,75-0,93) zwischen der Zufuhr von Flavonen und dem Risiko für Brustkrebs in der Quintile mit der höchsten Zufuhr (1,1 mg/d) im Vergleich zur Quintile mit der niedrigsten Zufuhr (< 0,3 mg/d). Dieser Effekt blieb auch nach Adjustierung für Obst und Gemüseverzehr noch bestehen (OR 0,86; 95% C.I. 0,77-0,96). Die Autoren leiten daraus ab, dass der beobachtete Effekt nicht durch andere Bestandteile der verzehrten pflanzlichen Lebensmittel hervorgerufen wird, sondern auf die Wirkung der Flavone zurückzuführen ist. Auch für die Quintile mit der höchsten Flavan-3-ol-Zufuhr (45,2 mg/d) im Vergleich zur Quintile mit der niedrigsten Zufuhr (< 9,1 mg/d) wurde eine inverse Assoziation mit dem Risiko für Brustkrebs (OR 0,83; 95% C.I. 0,75-0,93) gefunden, ebenso wie für die Flavonol-Zufuhr (höchste Quintile: 30,6 mg/d; niedrigste Quintile: < 9,7 mg/d) (OR 0,81; 95% C.I. 0,73-0,90) und für die Anthocyanidin-Zufuhr (höchste Quintile: 81,4 mg/d; niedrigste Quintile: < 5,1 mg/d) (OR 0,86; 95% C.I. 0,76-0,97) gefunden. Diese Effekte wurden aber bei weiterer Adjustierung (für Obst- bzw. Gemüseverzehr und für die Zufuhr der anderen Flavonoide) abgeschwächt und waren statistisch nicht mehr signifikant. In der hier vorliegenden Arbeit zeigte die Plasmakonzentrationen der Flavonole eine statistisch signifikante Risikominderung um 47 % (OR 0,533; 95% C.I. 0,30 – 0,95), die nach der Adjustierung für einige wichtige Modulatoren des Brustkrebsrisikos bestehen blieb, deren Signifikanz dabei aber, wie auch bei Peterson et al. (2003) beschrieben, verschwand (OR 0,543; 95% C.I. 0,29-1,02). Der Trendtest für die lineare Assoziation der kontinuierlichen Plasmawerte der Flavonole ($p_{\text{cont.}} = 0,019$) blieb jedoch weiterhin signifikant. Peterson et al. (2003) untersuchten die Summe der zugeführten Flavonoide. Es wurde allerdings nicht weiter beschrieben, auf welche Struktur die beobachteten Effekte zurückgehen könnten. In der vorliegenden Studie zeigte die Odds Ratio für Kämpferol, einem wichtigen Flavonol, eine Risikosenkung von 38 %, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Der Trendtest für Kämpferol blieb auch nach Adjustierung statistisch signifikant ($p_{\text{cont.}} = 0,046$) und könnte somit einen Teil des beobachteten Effektes der Flavonole erklären.

Die Plasmakonzentration der Flavan-3-ole zeigte in diesem Kollektiv der EPIC-Studie keinen signifikanten Unterschied zwischen Fällen und Kontrollen und wurde daher in der logistischen Regression nicht weiter untersucht. Bei den untersuchten Flavonen unterschied sich die Plasmakonzentration von Luteolin und die Summe der Flavone signifikant zwischen Fällen und Kontrollen. Die Konzentrationen waren aber bei den Fällen höher und die logistische Regression zeigte weder für die Summe der Flavone noch für Luteolin eine inverse Assoziation mit dem Brustkrebsrisiko.

Goldbohm et al. (1998) untersuchten den Einfluss der Zufuhr von Flavonoiden auf das Brustkrebsrisiko bei 605 Fällen aus dem Kollektiv einer prospektiven Kohortenstudie (The Netherlands Cohort Study). Sie fanden jedoch weder für die Summe aus Quercetin, Kämpferol,

Myricetin und Luteolin ($p_{\text{trend}}: 0,740$) noch für Quercetin ($p_{\text{trend}}: 0,957$) oder für Kämpferol ($p_{\text{trend}}: 0,286$) einen Effekt auf das Brustkrebsrisiko.

Bei einer Untersuchung von Knekt et al. (2002) in einem finnischen Kollektiv ($n = 125$) wurde für Quercetin (hauptsächlich mit Äpfeln zugeführt) und Kämpferol (hauptsächlich mit Weißkohl zugeführt) ein relatives Risiko für Brustkrebs von 0,62 (95% C.I. 1,37-1,03) und 0,87 (95% C.I. 0,53-1,42) gefunden. Knekt et al. (2002) sehen den hauptsächlichsten Gesundheitsnutzen in der Zufuhr von Quercetin, räumen aber ein, dass dessen Wirkung von den anderen Antioxidantien, z.B. Kämpferol und Myricetin, verstärkt werden könnte. Die Plasmakonzentration von Quercetin unterschied sich in der hier vorgestellten Studie nicht signifikant zwischen Fällen und Kontrollen und wurde daher in der logistischen Regression nicht weiter untersucht. Der Effekt der Kämpferolkonzentration in der vorliegenden Studie ist allerdings größer als der von Knekt et al. (2002) beobachtete Effekt der Zufuhr, jedoch statistisch ebenfalls nicht signifikant. Die Ergebnisse dieser finnischen Studie bestätigen im Wesentlichen die Beobachtungen, die die Autoren in einer früheren Untersuchung machten. In dieser früheren Studie (Knekt et al., 1997) über die Gesamtzufuhr von fünf Flavonoiden (Quercetin, Kämpferol, Myricetin, Apigenin und Luteolin) wurde für die Quartile mit der höchsten Gesamtzufuhr ($> 5,5$ mg/d) im Vergleich zur niedrigsten Gesamtzufuhr ($< 2,1$ mg/d) eine inverse Assoziation mit dem Risiko für Brustkrebs gefunden, die jedoch statistisch nicht signifikant war (OR 0,72; C.I. 0,36-1,48).

Neue Studienergebnisse zeigen einen Zusammenhang der Phytoöstrogenaufnahme und Brustkrebs. Linseisen et al. (2004) untersuchten kürzlich den Zusammenhang zwischen der Zufuhr von Genistein und Daidzein und dem premenopausalen Brustkrebsrisiko in einer Fall-Kontroll-Studie bei Frauen unter 50 Jahren in Süddeutschland (278 Fälle und 666 Kontrollen). Die Zufuhrdaten wurden durch Verwendung eines validierten Food-Frequency-Questionnaire ermittelt. Sowohl Daidzein (OR 0,62; 95% C.I. 0,47-0,95) als auch Genistein (OR 0,47; 95% C.I. 0,29-0,74) zeigten ein signifikant verringertes Risiko für Brustkrebs. Für die Gesamtzufuhr aller untersuchten Phytoöstrogene konnte jedoch kein Effekt gefunden werden. Die Isoflavonkonzentrationen von Daidzein und Genistein waren in dem Kollektiv der EPIC-Studie, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, zwischen Fällen und Kontrollen nicht signifikant verschieden und zeigten keine risikosenkenden Effekte auf das Brustkrebsrisiko. Diese gegensätzlichen Befunde bezüglich eines Effektes der Zufuhr und der Plasmakonzentration von sekundären Pflanzenstoffen auf das Brustkrebsrisiko wurde auch schon in einer frühen Übersichtsarbeit von Block et al. (1992) beschrieben. In Bezug auf den Vergleich der Assoziation von Zufuhrdaten mit dem Brustkrebsrisiko und der Assoziation von Plasmakonzentrationen mit dem Brustkrebsrisiko sollte berücksichtigt werden, dass es sich bei den Plasmakonzentrationen der Polyphenole um kurzfristige Biomarker handelt, die in erster Linie den kurzzeitigen Verzehr

widerspiegeln und für sich alleine möglicherweise nicht geeignet sind, die langfristig relevante Zufuhr zu schätzen. Daher ist in Zukunft die Kombination von Biomarkerdaten und Ernährungs- bzw. Zufuhrdaten aus erweiterten Lebensmitteltabellen sinnvoll, um die epidemiologische Methodik zunehmend in die Lage zu versetzen, die Wirkung der Polyphenole oder anderer bioaktiver Inhaltsstoffe auf die menschliche Gesundheit zu charakterisieren.

Auch Horn-Ross et al. (2001) fanden keinen Zusammenhang zwischen der Zufuhr von Phytoöstrogenen (Isoflavone, Lignane und Coumestane) und Brustkrebs. Diese US-amerikanische Fall-Kontroll-Studie (1326 Fälle und 1657 Kontrollen) konnte weder bei premenopausalen noch bei postmenopausalen Frauen für die Gesamtzufuhr von Isoflavonen oder Phytoöstrogenen einen Effekt auf das Brustkrebsrisiko finden. In der Quartile mit der höchsten Zufuhr ($> 2,77$ mg/d Isoflavone und Phytoöstrogene) war das relative Risiko für Brustkrebs unverändert OR 1,0 (95% C.I. 0,8-1,3) im Vergleich zur Quartile mit der geringsten Zufuhr ($< 1,05$ mg/d Isoflavone und Phytoöstrogene) (Horn-Ross et al., 2001, Peeters et al., 2003). Die Ergebnisse für premenopausale und postmenopausale Frauen unterschieden sich dabei nicht signifikant.

Messina et al. (1994) überprüften eine Reihe von epidemiologischen Studien, welche sich mit Sojaprodukten und deren Effekt auf hormonabhängige Krebserkrankungen beschäftigten, und die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass keine definitive Aussage über einen protektiven Einfluss von Soja möglich sei. Einer der Gründe für negative Untersuchungsergebnisse zu Phytoöstrogenen und Brustkrebs könnte darin liegen, dass sowohl die Zufuhr der Isoflavone als auch ihre Plasmakonzentrationen, wie auch in der vorliegenden Studie, meist bei erwachsenen Frauen durchgeführt wurde. Diese Ergebnisse sind daher als Hinweis darauf zu verstehen, dass es keinen direkten Bezug zwischen den Plasmakonzentrationen von Phytoöstrogenen durch Sojaverzehr erwachsener Frauen in der westlichen Hemisphäre und dem Entstehen von Brustkrebs gibt, dass der langfristige Verzehr von Soja, beginnend im Jugendalter, jedoch risikosenkende Wirkung haben könnte.

Vor allem große, prospektive Studien in Populationen mit Personen, die über einen längeren Zeitraum regelmäßig Flavonoide und Phenolsäuren mit der Nahrung aufnehmen, können weitere wichtige Hinweise auf den Einfluss dieser sekundären Pflanzenstoffe in der Ernährung liefern. Polyphenole in Plasma oder Urin stellen zu diesem Zweck gute Biomarker ihrer Zufuhr dar, obwohl ihr Vorhandensein in „low-risk“ Populationen nicht notwendigerweise bedeutet, dass ihnen, als aktivem Element, die Hauptrolle in der Prävention von Brustkrebs zukommt. In Brustkrebszellen könnte z.B. Genistein die Proliferation und die Signaltransduktion am Estrogenrezeptor herabregulieren (Adlercreutz, 2003). Es ist also wahrscheinlich, dass mehrere verschiedene Komponenten physiologisch eng zusammenwirken und dass ferner die generelle Ernährungsweise eine wichtige Rolle spielt (Adlercreutz et al., 1992).

In anderen Studien wird nicht die Zufuhr von Polyphenolen untersucht, sondern ihre Konzentration im Plasma oder Urin bestimmt und dadurch der Einfluss auf das Risiko für Brustkrebs untersucht, wie es auch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Über den Zusammenhang der Polyphenolkonzentration und dem Risiko für Brustkrebs in biologischem Material liegen bislang jedoch fast nur Untersuchungen zu Phytoöstrogenen vor. Der Einfluss anderer Flavonoide wurde bisher überwiegend mittels Zufuhrschätzungen untersucht und über den Einfluss der Plasmakonzentration von Phenolsäuren auf das Risiko für Brustkrebs liegen bisher noch keine Studien vor.

Die erste ausführliche Fall-Kontroll-Studie mit Konzentrationsmessungen der Flavonoide aus Urin wurde von Ingram et al. (1997) veröffentlicht. Diese australische Studie fand bei pre- und postmenopausalen Frauen (144 Fälle und 144 Kontrollen) für Equol einen statistisch signifikanten Effekt auf das Brustkrebsrisiko (OR 0,3; 95% C.I. 0,1-0,7). Zheng et al. (1999) zeigten in einer weiteren Fall-Kontroll-Studie (The Shanghai Breast Cancer Study) protektive Effekte einer höheren Exkretion von Daidzein und Genistein. Die Urinexkretion dieser Isoflavone und der Gesamt-Phytoöstrogene war bei den Fällen signifikant niedriger als bei den Kontrollen. Die Assoziation mit dem Risiko für Brustkrebs war allerdings weder für Daidzein (OR 0,54; 95% C.I. 0,22-1,32) noch für Genistein (OR 0,70; 95% C.I. 0,27-1,84) statistisch signifikant. Das Kollektiv (60 Fälle und 60 Kontrollen) bestand wie bei Ingram et al. (1997) aus premenopausalen und postmenopausalen Frauen. Weil die Urinproben allerdings in beiden Studien erst nach der Diagnose auf Brustkrebs genommen wurden, könnten die Ergebnisse aufgrund veränderter Ernährungsgewohnheiten, als Reaktion auf die Diagnose, verfälscht sein, da Isoflavone als kurzfristige Biomarker ihrer Zufuhr aufzufassen sind (Peeters et al., 2003).

Eine weitere Untersuchung aus derselben Studie (The Shanghai Breast Cancer Study) wurde von Dai et al. (2002) durchgeführt. In dieser Arbeit (250 Fälle und 250 Kontrollen) wurde neben dem Einfluss von Phytoöstrogenen erstmals auch die Assoziation zwischen der Urinkonzentration von Flavanonen (Naringenin und Hesperetin) und dem Risiko für Brustkrebs untersucht. Das Risiko für Brustkrebs war für die Summe der Phytoöstrogene (Daidzein, Genistein, Glycitein, *O*-Desmethylangolensin, Dihydrodaidzein und Dihydrogenistein) in der Terzile mit der höchsten Urinkonzentration im Vergleich zur Niedrigsten statistisch signifikant verringert (OR 0,62; 95% C.I. 0,39-0,99). Auch für Daidzein war das Risiko für Brustkrebs signifikant niedriger (OR 0,54; 95% C.I. 0,34-0,85). Aber der Effekt für Genistein OR 0,65 war statistisch nicht signifikant (95% C.I. 0,41-1,03). Die Urinkonzentration der Flavanone unterschied sich zwischen Fällen und Kontrollen nicht signifikant, und es wurde für Naringenin und Hesperetin auch keine Assoziation mit dem Brustkrebsrisiko gefunden (Peeters et al., 2003).

In der vorliegenden Studie waren die Plasmakonzentrationen der Isoflavone (Daidzein und Genistein) und der Flavanone (Naringenin und Hesperetin) bei den Fällen und Kontrollen nicht signifikant verschieden, und es wurde für diese Stoffklassen keine Assoziation mit dem Brustkrebsrisiko gefunden.

In einer neueren prospektiven Studie (European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition-Studie; Norfolk, England) von Grace et al. (2004) wurde die Beziehung zwischen der Urin- und Blutserumkonzentration von Phytoöstrogenen (Daidzein, Genistein, Glycitein, *O*-Desmethylangolensin, Equol, Enterodiol und Enterolacton) und dem Risiko für Brustkrebs bei 97 Frauen, bei denen später Brustkrebs festgestellt wurde, und 187 gesunden Kontrollpersonen zwischen 45 – 75 Jahren untersucht. Die mittleren Daidzein- und Genisteinkonzentrationen im Serum waren 7,9 nmol/l und 15,2 nmol/l (Median). Die ermittelten Urinkonzentrationen der Phytoöstrogene korrelierten gut mit ihren Serumkonzentrationen (Korrelation nach Pearson > 0,8) und auch die Serum- und Urinkonzentrationen wiesen einen klaren Zusammenhang mit ihrer Zufuhr auf ($p < 0,02$). Die Phytoöstrogenen hatten allerdings keinen protektiven Einfluss auf das Brustkrebsrisiko. Die Odds Ratio für die Serumkonzentration von Daidzein war 1,22 ($p = 0,044$), die Odds Ratio für Genistein war 1,24 ($p = 0,077$). Auch die Urinkonzentrationen von Daidzein und Genistein zeigten keine inverse Assoziation mit dem Brustkrebsrisiko (OR 1,12 und 1,16). Nur 3 % der Probanden konsumierte Sojaprodukte. Der Grossteil der Isoflavone (61 %) wurde dabei durch Verzehr von Sojazusätzen in Brot und Backwaren zugeführt.

Für die Plasmakonzentrationen der Isoflavone Daidzein und Genistein konnte auch in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss auf das Brustkrebsrisiko gefunden werden. In der Studie von Grace et al. (2004) war die mittlere Konzentration von Genistein im Serum höher als die Konzentration von Daidzein. Im Urin hingegen war dieses Verhältnis umgekehrt. Auch in der hier vorliegenden Arbeit war die Plasmakonzentration von Genistein im Mittel mit 10 nmol/l bzw. 11 nmol/l (Median) höher als die Daidzeinkonzentration, die bei den Fällen wie auch bei den Kontrollen im Median unterhalb der Nachweisgrenze lag. Das Verhältnis der Exkretion dieser beiden Isoflavone im Urin konnte in der vorliegenden Studie jedoch nicht beschrieben werden, da die entsprechenden Proben nicht zur Verfügung standen.

Über den Einfluss von Phenolsäuren auf das Risiko für Brustkrebs gibt es bisher, wie bereits erwähnt, noch wenige Berichte. Der Effekt der Plasmakonzentration von Ferulasäure auf das Brustkrebsrisiko wird somit in dieser Studie zum ersten Mal beschrieben. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen für die Plasmakonzentrationen von Ferulasäure in der Quartile mit der höchsten Plasmakonzentration ($> 1,3 \mu\text{mol/l}$) eine signifikante Risikosenkung um 48 % (OR 0,52; 95% C.I. 0,27-0,98) im Vergleich zur Quartile mit der niedrigsten Plasmakonzentration (< 105

nmol/l). Auch der Trendtest für die kontinuierlichen Konzentrationen von Kämpferol ($p_{\text{trend}} 0,046$) und die Summe der Flavonole ($p_{\text{trend}} 0,019$) zeigen statistisch signifikante Risikosenkungen bei Kämpferol ($> 123,78$ nmol/l) und bei der Summe aller untersuchten Flavonole ($> 347,9$ nmol/l).

Phenolsäuren, die häufig in Lebensmitteln vorkommen, sind Kaffeesäure und Ferulasäure. Ferulasäure kommt in hohen Konzentrationen vor allem in Gemüse wie Brokkoli (8,3 mg/kg), roten Rüben (60 mg/kg) und Grünkohl (200 mg/kg) oder in Obstsorten wie Äpfeln (2,2 mg/kg) Pflaumen (8,9 mg/kg), schwarzen Johannisbeeren (9,2 mg/kg), Apfelsinen (10 mg/kg) und Kakifrukt (520 mg/kg) vor und wird hauptsächlich durch Verzehr von Zerealien zugeführt (Kroon et al., 1997; Radtke et al., 1998). Weizenkleie enthält 5 g Ferulasäure/kg, Vollkornweizen enthält 500 mg Ferulasäure/kg und ausgemahlene Weizenmehl enthält nur etwa 50 mg Ferulasäure/kg. Weizenkleie stellt durch seinen hohen Anteil an Hydroxyzimtsäuren und Diferulaten eine reiche Quelle an zellwandgebundener Ferulasäure dar. Getreidekleie enthält vor allem große Mengen an Ferulasäure, aber auch Dehydrodimere der Ferulasäure, welche jedoch vorwiegend mit Hemizellulosekomponenten, z.B. mit Arabinofuranose und mit Xylose, verestert und deshalb in dieser Form nicht verfügbar sind (Faulds und Williamson, 1999).

Die relativ hohen mittleren Plasmakonzentrationen von Ferulasäure (248 nmol/l / 364 nmol/l; Fälle/Kontrollen) im Vergleich zu Kaffeesäure (280 nmol/l / 304 nmol/l; Fälle/Kontrollen) überraschen, angesichts der vorherrschenden Zufuhr von Kaffeesäure durch die Nahrung (206 mg Kaffeesäure/d, 2 mg Ferulasäure/d) im Vergleich zu Ferulasäure (Radtke et al., 1998). Ein Grund für diese hohen Ferulasäurekonzentrationen im Plasma liegt vermutlich in der Tatsache, dass Ferulasäure neben seiner direkten Zufuhr durch die Nahrung auch durch die Methylierung anderer Phenolsäuren, z.B. Chlorogensäure oder Kaffeesäure, durch die Mikroflora im Dickdarm entstehen kann. In einem Experiment von Azuma et al. (2000) erhielten Ratten 247 mg/kg Chlorogensäure oral appliziert. Chlorogensäure konnte bei der Plasma-Analyse aber weder in freier Form noch konjugiert nachgewiesen werden. Nach Behandlung mit β -Glucuronidase bzw. Sulfatase konnten in den Proben jedoch neben Kaffeesäure auch 100-300 nmol/l Ferulasäure mittels HPLC-ECD nachgewiesen werden.

Moridani et al. (2002). führten Untersuchungen an isolierten Hepatozyten der Ratte und einzelnen Zellfraktionen daraus durch. Sie konnten zeigen, dass Kaffeesäure durch Methylierung zu Ferulasäure und weiter durch Hydrogenierung zu Dihydrokaffeesäure umgewandelt wird. Dihydrokaffeesäure wurde ebenfalls methyliert, und es entstand entsprechend Dihydroferulasäure, aus der durch Dehydrogenierung wiederum Ferulasäure gebildet wurde. Alle Schritte waren reversible Prozesse, die jedoch überwiegend in die beschriebene Richtung verliefen.

Die Metabolisierung von Kaffeesäure nach Spaltung der Caffeoylechinasäuren wurde auch in verschiedenen in vitro Experimenten dargestellt. Spencer et al. (1999) fanden nach der Perfusion

von Rattendünndarm, im Resorbat 63,7 % der Kaffeesäure in Form von Glucuroniden wieder. Im Resorbat wurden daraufhin erst nach Behandlung mit β -Glucuronidase die Phase-I-Metabolite Ferulasäure und Isoferulasäure (4'-Methylkaffeesäure) nachgewiesen. Analog dazu wird Ferulasäure, die kovalent an Pflanzenzellwände gebunden ist, im Menschen nicht durch endogene Enzyme freigesetzt, denn im menschlichen Gewebe stehen diese Esterasen nicht zur Verfügung (Plumb et al. 1999). Im Dickdarm wird ihre Freisetzung durch die Einwirkung von Enzymen (Xylanasen und Esterasen) aus der Mikroflora erreicht (Kroon et al., 1996).

Da Ferulasäure im gastrointestinalen Trakt des Menschen absorbiert wird, kann sich seine antioxidative Wirkung im Körper entfalten. Der Einfluss der chemischen Struktur von Kaffeesäure, p-Cumarsäure und Ferulasäure auf die antioxidative Hemmung der Kupferkatalysierten LDL-Oxidation wurde bereits von Meyer et al. (1998) beschrieben. Sachez-Moreno et al. (2000) haben gezeigt, dass Polyphenole, darunter Kaffeesäure, Ferulasäure oder Quercetin bzw. Rutin, sogar eine stärkere antioxidative Wirkung auf die Hemmung der LDL-Oxidation haben als α -Tocopherol oder Ascorbinsäure. Auch Cao et al. (1996) und Wang et al. (1996) vermuteten, dass Polyphenole weitaus wirksamere Antioxidantien sind als α -Tocopherol oder Ascorbinsäure. Sie zeigten, dass mehr als 80 % der antioxidativen Aktivität von Obst und Gemüse auf andere Inhaltsstoffe als Vitamin E, Vitamin C und β -Carotin zurückzuführen sind. Allerdings wurde der Beitrag von Hydroxyphenolsäuren aus Getreideprodukten in der Literatur offenbar deshalb noch unterschätzt, weil gebundene Konjugate weitgehend unberücksichtigt blieben (Adom und Liu, 2002). Die gebundenen Konjugate der Ferulasäure stellten jedoch bei Untersuchungen ihres antioxidativen Potentials, den Grossteil (90 % in Weizen) der beobachteten Wirkung dar. Ferulasäure kann überdies einige Promotoren der Krebsbildung blockieren. So konnte beispielsweise die Bildung von stark krebserregenden Nitrosaminen und Nitrosamiden in vitro und im Tiermodell blockiert werden (Newmark, 1992).

Obwohl die Zufuhr der Hydroxyphenolsäuren die der Flavonoide mengenmäßig weit übersteigt und trotz der bekannten bioaktiven Wirkung einiger Phenolsäuren, liegen bisher erst wenige Humanstudien zu ihrer möglichen Rolle bei der Krebsprävention vor. Anhand der Ergebnisse von in vitro Studien wird allerdings vermutet, dass die durch den Verzehr von ballaststoffreichen Vollkornprodukten aufgenommenen Polyphenole zumindest teilweise für die gesundheitsfördernden Effekte hinsichtlich Herz-Kreislauf-Erkrankungen und bestimmter Formen von Krebs, speziell von Darm- und Brustkrebs, verantwortlich sind (Ferguson und Harris, 1999). Kampa et al. (2001) beschreiben in einer in vitro Studie den antiproliferativen Effekt ausgewählter Phenolsäuren auf menschliche, hormonsensitive T47D Brustkrebszellen. Die getesteten Komponenten (Kaffeesäure, Ferulasäure, Syringasäure, Sinapinsäure, Protocatechusäure, 3,4-

Dihydroxyphenylelessigsäure) zeigten schon bei geringen Konzentrationen einen zeit- und dosisabhängigen, hemmenden Effekt auf das Zellwachstum. Dabei war Kaffeesäure der wirksamste Inhibitor ($IC_{50} = 2,17 \text{ nmol/l}$). Ferulasäure war halb so wirksam, zeigte aber einen länger anhaltenden Verlauf als Kaffeesäure, mit einem doppeltem Maximum, und hemmte das Zellwachstum um 40 % ($IC_{50} = 2,3 \text{ nmol/l}$). Dabei entsprach das erste Maximum dem Effekt von Sinapinsäure und Syringasäure, wohingegen das zweite Maximum im Bereich von Protocatechusäure und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure lag. Protocatechusäure und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure waren etwa ebenso aktiv wie Ferulasäure. Sinapinsäure und Syringasäure hingegen wiesen eine eindeutig geringere Wirksamkeit als die übrigen Komponenten auf. Die Abweichung von Kaffeesäure und Ferulasäure in ihrem zeitlichen Verlauf deutet möglicherweise auf verschiedene Wirkmechanismen hin. In der vorliegenden Studie zeigte Ferulasäure eine inverse Assoziation mit dem Risiko für Brustkrebs. Für Kaffeesäure konnte dieser Effekt jedoch nicht gezeigt werden. Es sind also weitere Untersuchungen notwendig, um die unterschiedlichen Wirkmechanismen und die daraus resultierenden Effekte der Phenolsäuren weiter aufzuklären.

Wattenberg (1985) klassifizierte Kaffeesäure und Ferulasäure schon sehr früh als potente Inhibitoren, die sowohl die Bildung von Karzinogenen aus ihren Vorläufer-Strukturen verhindern können sowie die Reaktionen dieser Karzinogene mit bestimmten zellularen Makromolekülen zu blockieren in der Lage sind. Zukünftig werden also vor allem solche Humanstudien benötigt, die auch Phenolsäuren wie Ferulasäure beinhalten und die sowohl ihre Zufuhr, wie auch ihre Plasma- und Urinkonzentrationen mit dem Risiko für Krebs assoziieren, um ihre Wirkung im Menschen besser zu verstehen.

In einer weiteren *in vitro* Studie von Hudson et al. (2000) wurden die suppressiven Eigenschaften von braunem Reis gegenüber Kolonkrebs und Brustkrebs untersucht. Dabei wurde die Hypothese geprüft, wonach Reis Phenole enthält, welche die Proliferation von Brustkrebszellen (MDA MB468, MCF7, HBL100) oder Kolonkrebszellen (HT29, SW480, HCEC) hemmen können. Im Ethylacetat-Extrakt von intaktem braunem Reis und von Reiskleie wurden acht Phenolsäuren (Protocatechusäure, p-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure, Vanillinsäure, Methoxyzimtsäure und Tricin) mittels HPLC-MS identifiziert. Weißer Reis enthielt dagegen nur Spuren dieser Phenolsäuren, was darauf schließen lässt, dass diese phenolischen Bestandteile in der Frucht- und Samenschale (Silberhäutchen), im Keimling und der Aleuronschicht des Getreidekorns lokalisiert sind. Ferulasäure war mit $334 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ (Trockenmasse) nach p-Cumarsäure ($390 \mu\text{g}/100 \text{ g}$) die zweithäufigste Komponente. In zwei von neun Fraktionen war Ferulasäure die Hauptkomponente. Diese beiden Fraktionen zeigten im clonogenic assay die stärkste Wirkung bezüglich der Hemmung des Wachstums von SW 480 human Kolonkrebszellen.

Das Wachstum von MDA MB468 Brustkrebszellen wurde im clonogenic assay ebenfalls durch diese Fraktionen gehemmt, wenn auch nicht so stark wie bei den Kolonkrebszellen.

Im MTS assay zeigten diese Fraktionen jedoch keine cytostatische bzw. cytotoxische Wirkung auf Brustkrebs- oder Kolonkrebszellen.

Die identifizierten Komponenten wurden daraufhin einzeln auf ihre antiproliferative Wirkung hin untersucht. 50 $\mu\text{mol/l}$ Ferulasäure reduzierten im MTS assay die Anzahl der lebensfähigen HCEC Kolonkrebszellen. Auf das Wachstum der untersuchten Brustkrebszellen hatte Ferulasäure hingegen keine signifikante Hemmwirkung.

Beim clonogenic assay wurde die Koloniebildung von SW480 Zellen durch 200 $\mu\text{mol/l}$ Ferulasäure gehemmt. Auch die anderen Phenolsäuren wiesen hier eine Hemmwirkung auf. Das Zellwachstum von MDA MB468 Brustkrebszellen hingegen wurde nur von Kaffeesäure, Ferulasäure und Tricin (je 50 $\mu\text{mol/l}$) gehemmt.

Die Autoren folgern daraus, dass Ferulasäure einen Beitrag zur Antiklonogenizität in Brust- und Kolonkrebszellen leisten kann. Allerdings stellen sie auch fest, dass ihre Ergebnisse sowohl wachstumshemmende wie auch wachstumsfördernde Inhaltsstoffe in Reiskleie aufweisen, was dazu führen kann, dass der potentiell nützliche Effekt von Phenolsäuren maskiert oder dass diesem Effekt durch andere Bestandteile entgegen gewirkt werden könnte. Dieser widersprüchliche Effekt zeigt sich z.B. in den unterschiedlichen Ergebnissen der Ferulasäure-Fraktionen im clonogenic assay und im MTS assay. Auch die starke Wirkung der Ferulasäure-Fraktionen auf das Wachstum der SW480 Zellen steht in ausgeprägtem Kontrast zu dem vergleichsweise schwachen Effekt ihrer isolierten Hauptkomponenten (Ferulasäure und Methoxyzimtsäure) auf diese Zellkultur. Diese Diskrepanz wurde aber auch bei anderen Phenolsäuren, wie z.B. Tricin und den sie enthaltenden Ethylacetatextrakt-Fraktionen, beobachtet. Der Unterschied zwischen der Aktivität der Fraktionen von braunem Reis und ihren phenolischen Bestandteilen deutet darauf hin, dass andere als die charakterisierten Komponenten für die beobachteten Effekte der Fraktionen mitverantwortlich sind und verstärkt die Vermutung, dass Reiskleie sowohl wachstumshemmende als auch wachstumsfördernde Inhaltsstoffe enthält. Darüber hinaus bleibt aber dennoch die Auffassung bestehen, dass Ferulasäure, Kaffeesäure und Tricin das Wachstum von Brustkrebszellen signifikant hemmen. Es ist also möglich, dass die intakte Matrix der äußeren Frucht- und Samenschale von Getreide, die in Vollkornprodukten noch erhalten ist, die Summe der Nährstoffe enthält, die benötigt wird, um eine optimale chemoprotektive Wirkung zu entfalten und dass diese Gesamtwirkung verloren geht oder vermindert wird, wenn einzelne Fraktionen oder Bestandteile untersucht werden (Hudson et al., 2000). Auch in der vorgelegten Studie zeigt Ferulasäure, wie oben beschrieben, eine bioaktive Wirkung. Da Kaffeesäure in der vorgelegten Studie aber keine risikosenkende Wirkung zeigte,

obwohl die Wirkung von Kaffeesäure *in vitro* oft stärker ausgeprägt ist die als von Ferulasäure, lässt sich vermuten, dass, wie von Hudson et al (2000) beschrieben, mehrere Prozesse an einer biologischen Schutzwirkung beteiligt sind.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass diese *in vitro* Effekte von Ferulasäure auch im Menschen auftreten und dass eine hohe Plasmakonzentration von Ferulasäure das Risiko für Brustkrebs *in vivo* verringern kann. Die Ergebnisse dieser Studie weisen somit darauf hin, dass die durch den Verzehr von ballaststoffreichen Vollkornprodukten aufgenommene Ferulasäure für die gesundheitlich vorteilige Wirkung verantwortlich ist. Darüber hinaus ist auch die kumulative Wirkung von mehreren Phenolsäuren nicht zu unterschätzen. Es bleibt zu prüfen, welche Mengen verzehrt werden müssen, um die beschriebenen Ergebnisse *in vivo* zu erreichen. Es sollte außerdem untersucht werden, ob der von Ferulasäure, Kämpferol und Flavonolen hervorgerufene Effekt mit der Zufuhr dieser sekundären Pflanzenstoffe zusammenhängt. Darüber hinaus sollte in Zukunft auch getestet werden, inwiefern die Kombination mehrerer Polyphenole ihre Wirkung verändern kann.

Die Limitationen dieser Studie liegen unter anderem in der relativ geringen Anzahl von Fällen und Kontrollen. Es standen auch keine weiteren Parameter wie z.B. Zufuhrdaten oder Exkretionsraten zur Verfügung, mit denen die ermittelten Plasmakonzentrationen in Zusammenhang gesetzt werden könnten, um ein ausführlicheres Bild zu erhalten. Es können daher weitere Einflüsse, die möglicherweise für die beobachteten Effekte mitverantwortlich sind, nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Die Beziehung zwischen dem Verzehr von Obst und Gemüse und einem niedrigen Krebsrisiko ist inzwischen gut belegt (Steinmetz und Potter, 1991b; Block et al., 1992). Ausgehend von der epidemiologischen Evidenz, dass es Lebensmittelinhaltsstoffe gibt, die bei ausreichendem Verzehr zu einem verringertem Auftreten chronischer Erkrankungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen führt, muss also die Rolle der als präventiv erkannten Inhaltsstoffe für die Entstehung einer Erkrankung weiter geprüft werden. Da in der Natur, von wenigen Ausnahmen abgesehen, einzelne Nährstoffe nicht isoliert in Lebensmitteln vorliegen, scheint es natürlich, dass Nährstoffe gemeinsam im Verbund wirksam sind. Es scheint darüber hinaus für eine optimale Schutzwirkung notwendig zu sein, dass mehrere Nährstoffe in einer optimalen Konzentration vorliegen, ohne dass alle diese Nährstoffe bisher im Einzelnen genannt werden können (Block et al., 1992). Die Resultate epidemiologischer Studien zur Bedeutung eines ursächlichen Zusammenhanges zwischen antioxidativ wirksamen Stoffen in einem pflanzlichen Lebensmittel und der Entstehung gewisser Erkrankungen sollten also differenziert betrachtet werden, da Pflanzen eine Vielzahl von

teilweise noch unbekannt, physiologisch potentiell wirksamen Verbindungen enthalten können, deren Wirkungen sich in vivo akkumulieren können und die so für die beobachtete gesundheitsfördernde Wirkung einer obst- und gemüsereichen Ernährung verantwortlich sein könnten. (Birt et al., 2001).

Um weitere Einflussfaktoren zu identifizieren entsteht die Notwendigkeit, in großen, prospektiven Studien eine wachsende Zahl von relevanten Verbindungen zu berücksichtigen und sowohl ihre Zufuhrmenge zu bestimmen, wie auch umfassende Ernährungsdaten mit den daraus resultierenden Plasmakonzentrationen zu verbinden.

5.5 Polyphenolbestimmung der Studie zur Absorption von Apigenin beim Menschen

Petersilie wird überwiegend frisch oder getrocknet in Form von Kräutern eingesetzt und verfügt über eine Vielzahl positiver Effekte. Sie wirkt antimikrobiell, antikoagulativ, antihepatotoxisch, abführend und blutdruckregulierend. Neben Flavonoiden wie Apigenin enthält Petersilie auch Ascorbinsäure, Carotinoide und α -Tocopherol (Yanardağ et al., 2003).

In der vorliegenden Studie wurde für alle Probanden Petersilie der gleichen Herkunft verwendet. Die eingesetzte Petersilie wurde über den Großmarkt bezogen. Da diese Studie im Winter durchgeführt wurde, stand keine regionale Petersilie zur Verfügung. Daher wurde italienische Petersilie benutzt. Es gibt Untersuchungen von Mullen et al. (2002) bei schottischen Himbeeren in denen, nach Kühlagerung bei +4°C für drei Tage und anschließend bei +18°C für vierundzwanzig Stunden, als Simulation des Transportes vom Produzenten bis zum Supermarkt, die Anthocyan- und Flavonolkonzentration nicht verändert wurde und auch das antioxidative Potential stabil blieb. Für Apigenin gibt es aber bislang keine derartigen Untersuchungen, sodass ein Abbau des Flavons bei der Lagerung möglich wäre. Bei spanischen Himbeeren konnte festgestellt werden, dass in Früchten, die im Frühling geerntet werden, die Anthocyane stabiler sind als bei im Herbst geernteten Früchten (Ancos et al., 2000), obwohl der Gehalt an Polyphenolen insgesamt in den Herbst-Früchten höher war. Weil die in der vorliegenden Studie verwendete Petersilie im Winter geerntet wurde, könnte ihr Gehalt an Apigenin niedriger sein. Dies könnte möglicherweise die geringe Apigeninkonzentration von 11,89 mg/ 100 g Petersilie in dieser Studie erklären (siehe Tabelle 12).

Das ausgewählte Studienkollektiv ($n= 11$ mit $n_{\text{Frauen}} = 5$ und $n_{\text{Männer}} = 6$) lag mit einer mittleren Körpergröße 1,77 m (männlich) und 1,69 m (weiblich) etwa im bundesdeutschen Durchschnitt, der mit 1,77 m für Männer bzw. 1,65 m für Frauen angegeben wurde (Statistisches Bundesamt, Mai 2003). Das mittlere Körpergewicht der männlichen Studienteilnehmer lag mit 89,3 kg über dem bundesdeutschen Durchschnitt (81,8 kg) und das mittlere Körpergewicht der weiblichen Studienteilnehmer lag mit 58,8 kg unter dem bundesdeutschen Durchschnitt, das vom statistischen Bundesamt mit durchschnittlich 67,3 kg angegeben wurde (Mai 2003).

Die auf der Basis von 30 kcal/ kg Körpergewicht errechnete Energiezufuhr von durchschnittlich 1763 kcal/d für das weibliche und 2680 kcal/d für das männliche Teilkollektiv lag im Bereich der von der DGE empfohlenen Energieaufnahme für Erwachsene (DGE, 2000). 60 % der Tagesenergie, die über Formelnahrung zugeführt wurden, hatten in etwa die von der DGE empfohlene Nährstoffrelation (siehe Tabelle 11).

Alle Versuchspersonen dieser Untersuchung waren zum Zeitpunkt der Studie nach eigenen

Aussagen gesund. Im vorliegenden Kollektiv gab es zwei männliche Raucher und eine Vegetarierin. Von den fünf weiblichen Studienteilnehmern nahmen drei orale Kontrazeptiva ein. Bei der Betrachtung dieser individuellen Besonderheiten im Vergleich zu den restlichen Personen ließ sich aber weder bei den Rauchern (Person 8, 11), noch der Vegetarierin (Person 6) oder den mit Kontrazeptiva verhütenden Frauen (Person 5, 7, 10) eine Auffälligkeit hinsichtlich der Apigeninabsorption feststellen.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Absorption von Apigenin, in Form von Apiin (Apigenin- 7-apioseglucosid, siehe Abbildung 38), aus Petersilie untersucht. Die Ergebnisse werden dabei mit zwei Studien verglichen, bei denen Apigenin über Lebensmittel alimentär verabreicht wurde. Die vorliegende Studie wurde bei jungen Erwachsenen mit einem mittleren Alter von $28,8 \pm 5,4$ Jahren (Mean \pm SD) durchgeführt. Es wurden einmalig 2 g Petersilie/kg KG verzehrt (im Mittel 149,45 g Petersilie oder 17,77 mg Apigenin).

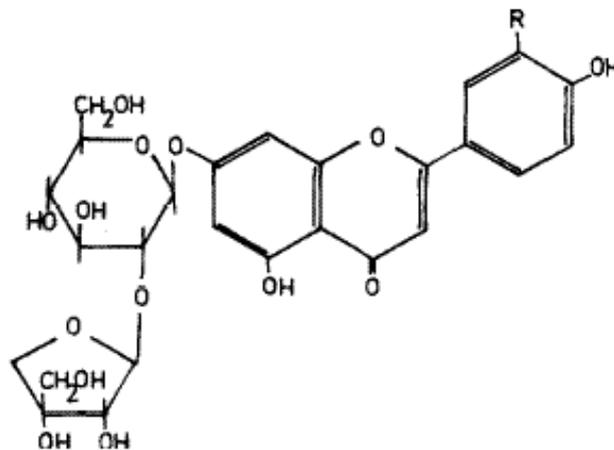


Fig. Apiin, R = H; Chrysoeriol, R = OCH₃.

Abb. 39: Strukturformel von Apiin (Ortmann et al., 1970)

Bei allen Studienteilnehmern (n= 11) konnte Apigenin im Plasma nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 29 und 30). Der Verlauf der Apigeninkonzentration wurde innerhalb von 24 Stunden an neun verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Ausgehend von einem Nüchternwert (unterhalb der Nachweisgrenze) stiegen die Konzentrationen bis zu einem Maximalwert an und fiel danach bei allen Probanden wieder auf den Nüchternwert ab. Die höchste mittlere Apigeninkonzentration im Plasma des Studienkollektives lag bei $126,62 \pm 80,53$ nmol/l (Mean \pm SD) und wurde nach 7 Stunden erreicht (siehe Tabelle 49). Der Bereich der ermittelten Plasmakonzentrationen lag zwischen 2,87 – 337,46 nmol/l und wurde nach 4 – 10 Stunden erreicht. Die Apigeninkonzentrationen wiesen hohe interpersonelle Schwankungen auf und es wurden teilweise sehr geringe Konzentrationen gemessen. Da die Nachweisgrenze in der vorliegenden Arbeit für

Apigenin aber mit 2,39 nmol/l deutlich niedriger lag als in vergleichbaren Studien, konnte hier gezeigt werden, dass Apigenin nach einmaligem Verzehr von 2g Petersilie pro kg Körpergewicht im Plasma gefunden werden kann.

In der vorliegenden Studie wurde auch die AUC (Area under Curve) der Apigenin-Plasmakonzentration errechnet. Die Bestimmung der AUC gilt als Maß für die Absorption. Sie entspricht der Wirkstoffmenge, die in den Organismus gelangt ist oder den systemischen Kreislauf erreicht. Nach Kostic et al. (1995) ist die AUC einer Substanz im Plasma die beste Möglichkeit, beim Menschen die Absorption im Gastrointestinaltrakt zu messen. Es konnte bei allen Probanden eine mittlere AUC von $61,98 \pm 48,56$ min \times $\mu\text{mol/l}$ (Mean \pm SD) berechnet werden, die zwischen 8,37 min \times $\mu\text{mol/l}$ (Minimum) und 149,99 min \times $\mu\text{mol/l}$ (Maximum) starke Schwankungen aufwies (siehe Tabelle 52).

Im Urin der Probanden konnten durchschnittlich 143,81 nmol Apigenin/24 h (39 μg Apigenin/24 h) wiedergefunden werden (siehe Tabelle 53). Das entspricht einer mittleren renalen Absorptionsrate von $0,22 \pm 0,16$ %. Die niedrigste gemessene Absorptionsrate lag bei 0,05 %, die höchste Absorptionsrate lag bei 0,49 %. In der vorliegenden Studie wurde außerdem die Apigeninkonzentration in Erythrozyten gemessen. Die ermittelten Konzentrationen waren mit maximal 12 nmol/l vergleichsweise niedrig, es konnte aber dennoch gezeigt werden, dass Erythrozyten innerhalb von 24 h nach Verzehr einer Petersilienmahlzeit mittlere Apigeninkonzentrationen von 2,71 – 4,52 nmol/l mit geringen Schwankungen aufweisen.

In einer früheren Studie von Tschiersch und Hölzl (1993) wurden von einer weiblichen Versuchsperson einmalig 40 ml eines ethanolisch-wässrigen Kamillenextraktes, der 9 mg Apigenin und 90,2 mg Apigenin-7-glucosid enthielt, verzehrt. Es konnte jedoch kein Apigenin im Plasma der Testperson nachgewiesen werden und die Autoren vermuteten, dass Apigenin an Plasmaproteine gebunden wird (Nielsen und Dragsted, 1998b). Allerdings lag hier die Nachweisgrenze der Methode mit 700 nmol/l relativ hoch, und es ist daher nicht auszuschließen, dass Apigenin in niedrigeren Konzentrationen vorlag. Es gibt noch zwei weitere Studien, in denen die Absorption von Apigenin am Menschen geprüft wurde.

Janssen et al. (1998) untersuchten die Apigenin-Plasmakonzentration von 18 Testpersonen (neun Frauen und neun Männern) nach Verzehr von 5 g getrockneter Petersilie in 400 g Bouillon pro Tag (entsprechend 84 mg Apigenin/d). Kurz vor dem Verzehr wurde die Testmahlzeit in der Mikrowelle erhitzt. Diese Petersilienmenge wurde daraufhin über 7 Tage hinweg zugeführt. Die Testpersonen waren zum Zeitpunkt des Verzehrs über Nacht nüchtern. Nach Bolusgabe verzehrten die Probanden zwei Stunden lang keine Lebensmittel außer Mineralwasser und über

die gesamte Studiendauer hinweg wurden keine flavonhaltigen Lebensmittel verzehrt. Darüber hinaus wurden die Testpersonen aber dazu angehalten, ihre normalen Ess- und Trinkgewohnheiten beizubehalten. Die Blutproben wurden 90 Minuten nach Bolusgabe am siebten Tag der Studie abgenommen. Die Apigeninkonzentration in den so gewonnenen Plasmaproben lag aber unterhalb der Nachweisgrenze von 1100 nmol/l, und es konnte daher nicht geklärt werden, ob Apigenin vom Menschen absorbiert werden kann.

Daraufhin untersuchten Nielsen et al. (1999) die Beziehung zwischen der täglichen Zufuhr von 20g Petersilie (10 g frisch und 10 g mikrowellenerhitzt) und der Ausscheidung von Apigenin im Urin bei 14 Probanden (sieben Frauen und sieben Männer). Die Interventionsstudie, in der eine flavonarmer Basisdiät verzehrt wurde, dauerte zwei Wochen. Die Basisdiät wurde durch einen Petersilienbolus supplementiert, der 33,5 – 87,8 mg Apigenin/d enthielt (3,73 – 4,49 mg Apigenin/MJ/Woche). Den Probanden war es nicht erlaubt, andere Getränke und Lebensmittel zu verzehren. Während der Intervention mit Petersilie wurden signifikant ($p < 0,05$) größere Mengen Apigenin ausgeschieden (20,7 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ – 5,73 mg) als während der Basisdiät (0 – 1,56 mg/24 h), die kein Apigenin enthielt. Die Studie ergab eine durchschnittliche Apigenin-Ausscheidungsrate von $0,58 \pm 0,16\%$ (Mean \pm SD). Der geschlechtsspezifische Vergleich der Apigeninkonzentration zeigte, wie auch in unseren Untersuchungen, keine signifikanten Unterschiede. Nielsen et al. (1999) zeigten, dass Apigenin vom Menschen nach dem Verzehr von Petersilie renal ausgeschieden wird und dass demzufolge dieses Flavon vom Menschen absorbiert werden kann. Darüber hinaus konnten die Autoren einen Einfluss von Apigenin auf humorale, antioxidativ wirksame Enzyme im Blut nachweisen. Sowohl die Glutathionreduktase als auch die Superoxiddismutase der Erythrozyten erfuhren nur nach Petersilienverzehr einen signifikanten Aktivitätsanstieg, wohingegen die Erythrozytenkatalase und die Glutathionperoxidase keine Reaktion zeigten. Dabei kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass andere Inhaltsstoffe der Petersilie als Apigenin für diese Effekte verantwortlich gemacht werden müssen. Nielsen et al. (1999) konnten jedoch nicht klären, ob die renale Ausscheidung von Apigenin auch seine Konzentration im Blut wiedergibt, erklären jedoch, dass unter dieser Voraussetzung die Eliminations-Halbwertszeit für Apigenin etwa 12 h beträgt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass diese Voraussetzung unter den gegebenen Bedingungen erfüllt wird und es kann auch die Beobachtung bestätigt werden, dass Apigenin binnen 24 h ausgeschieden wird.

Bei Nielsen et al. (1999) ergab sich eine durchschnittliche Apigeninausscheidungsrate von $0,58 \pm 0,16\%$ (Mean \pm SD). Die Absorptionsrate in der vorliegenden Studie ist mit $0,22 \pm 0,16\%$ Apigenin (Mean \pm SD) niedriger als von Nielsen et al. (1999) beschrieben. Dieser Unterschied

kann auf die unterschiedliche Dosierung zurückzuführen sein, da in der vorliegenden Studie im Durchschnitt weniger Apigenin verzehrt wurde und die Zufuhr von Petersilie, im Gegensatz zu Nielsen et al. (1999), einmalig erfolgte. Demnach scheint sich die Absorptionsrate von Apigenin bei regelmäßiger Zufuhr zu erhöhen. Birt et al. (2001) berichteten zwar, dass die Bioverfügbarkeit von Apigenin generell gering sei, aber die Zufuhrquelle von Apigenin könnte sich beträchtlich auf ihre Absorptionsrate auswirken. Für die Flavonole beispielsweise konnten Hollman et al. (1997b) in einer Studie mit Ileostomie-Patienten nachweisen, dass nach Verzehr von Zwiebeln 1,39 % der Quercetin-Dosis, bei Äpfeln aber nur 0,44 % der zugeführten Dosis im Urin ausgeschieden wurden. Fernerhin weisen sowohl die vorliegende Absorptionsstudie als auch die Ergebnisse von Nielsen et al. (1999) hohe interpersonelle Schwankungen der Apigeninexkretion auf, die auf individuelle Unterschiede in der Absorption und im Stoffwechsel von Apigenin zurückzuführen sind.

Im Unterschied zu Janssen et al. (1998) und Nielsen et al. (1999) war das Studienkollektiv in der vorliegenden Studie etwas älter und schwerer (siehe Tabelle 9). Bei den genannten Vergleichsstudien war das mittlere Alter 25 ± 8 Jahre und der mittlere BMI betrug 22 ± 1 kg/m² (Janssen et al., 1998) bzw. 23 Jahre und 23,2 kg/m² (Nielsen et al., 1999). Die Unterschiede hinsichtlich Nährstoffzusammensetzung und Energiegehalt sind in Tabelle 61 dargestellt. Bei Nielsen et al. (1999) wurden zusätzlich Mikronährstoffe (2980,8 Retinoläquivalente, 6,0 α -Tocopherol-Äquivalente und 23 mg Vitamin C) supplementiert.

Tab. 61: Vergleich der Energiezufuhr und der Zufuhr von Makronährstoffen der untersuchten Probanden (n= 11) mit den Studien von Janssen et al. (1998) und Nielsen et al. (1999)

	<i>Vorliegende Studie</i>	<i>JANSSEN et al. (1998)</i>	<i>NIELSEN et al. (1999)</i>
Energie [kcal]	2263	2214	2870
Kohlenhydrate [%]	55	53	45
Fett [%]	30	31	39
Protein [%]	15	14	16
Alkohol [%]	-	1	-

Nach Waschen und Abzupfen der Stängel wurden in der vorliegenden Studie die Blätter der Petersilie eingefroren. Während Nielsen et al. (1999) mitteilen, die Blätter der Petersilie zur Zubereitung der Testmahlzeit verwendet zu haben, finden sich bei Janssen et al. (1998) keine Angaben, welche Teile der Pflanze in der verzehrten, getrockneten Petersilie verwendet wurden. Bei Nielsen et al. (1999) wurden Raucher ausgeschlossen, bei Janssen et al. (1998) die Einnahme von Kontrazeptiva. Die Studienteilnehmer in den beiden Vergleichsstudien waren angewiesen, im Zeitraum von einem Monat vor der Studie bis zum Ende der Studie keine homöopathischen Medikamente und Vitamin- und Mineralstoffsupplemente einzunehmen. Paracetamol war als

Schmerzmittel erlaubt. Im Unterschied dazu wurden in unserer Studie keine diesbezüglichen Einschränkungen gemacht. Fünf der elf Personen gaben an, in den letzten vier Wochen vor der Studie eines oder mehrere der folgenden Präparate genommen zu haben: Aspirin, Tetrazepam, Vitamin- und Mineralstoffsupplemente, Kieselerde.

Da Flavone vergleichsweise unpolar sind, wird Apigenin in Gegenwart von Fett vermutlich besser resorbiert. Aus diesem Grund wurde die Petersilienmahlzeit mit 10 % Prozent Butter zubereitet. Dadurch, dass die verabreichte Menge pro kg Körpergewicht berechnet worden war, wurde berücksichtigt, dass das Körpergewicht Einfluss auf die Absorption haben könnte. Die Testmahlzeit durfte warm oder kalt verzehrt werden, da die Petersilie im Zuge der Zubereitung schon erhitzt worden war und die Zellen somit bereits aufgeschlossen waren. Zur Testmahlzeit durfte Weißbrot (ad libitum) verzehrt werden.

Die Unterschiede unserer Nachweismethode im Vergleich zu denen von Janssen et al. (1999) und Nielsen et al. (1999) sind in Tabelle 62 dargestellt. Die Aufarbeitung eines Lebensmittels zur HPLC-Bestimmung erfordert einen Zellaufschluß, was wiederum eine ausreichende Homogenisierung oder Gefriertrocknung voraussetzt (Merken und Beecher, 2000). In der vorliegenden Studie wurde die frische Petersilie mittels Ultra Turrax zerkleinert und homogenisiert, im Ultraschallbad 30 Minuten lang extrahiert und dann nach Zugabe von 5 ml Salzsäure zur Säurehydrolyse für 2 Stunden auf 90 °C erhitzt. Diese Methode wurde früher bereits von Ewald et al. (1999) und Mattila et al. (2000) verwendet.

Tab. 62: Vergleich der HPLC- Parameter, Methodenbedingungen und Art der Proben der vorliegenden Studie mit den Studien von Janssen et al. (1998) und Nielsen et al. (1999)

	Vorliegende Studie	Janssen et al. (1998)	Nielsen et al. (1999)
Nachweismethode	HPLC / ECD –DAD	HPLC – UVD	HPLC / DAD – MS
Fließmittel A	0,1 % Phosphorsäure	25 % Acetonitril in KH ₂ PO ₄	23,8 mM Citrat (ph 2)
Fließmittel B	Methanol	45 % Methanol in KH ₂ PO ₄	Acetonitril
Fließmittel C	-	-	Methanol
Flussrate [ml/min]	0,4	0,9	1,0
Säulentemp. [°C]	60	30	40
Nachweisgrenze	2 nmol/l	1100 nmol/l	37 nmol/l
Hydrolyse	Enzymatisch, 37 °C, 30 min	Säurehydrolyse 90 °C, 2 h	Enzymatisch, 37 °C, 1h

Für Apigenin sind bisher keine Zufuhrwerte bekannt. Im Zuge der Seven Country Studie wurde die Zufuhr von Flavonolen (Quercetin, Kämpferol, Myricetin) und Flavonen (Luteolin, Apigenin) als Summe angegeben, die zwischen 3 mg/Tag in einer finnischen Kohorte und 70 mg/Tag in einer japanischen Kohorte schwankte (Hertog et al., 1995; Hollman und Katan, 1997). Hollman und Arts (2000) schätzen die Gesamtzufuhr an Flavonen/Tag auf 7 % der Flavonoidzufuhr, was bei einer täglichen Zufuhr von 54 mg Flavonoiden (Linseisen et al., 1997) etwa 3,78 mg Flavone/d ausmacht.

Die Absorption der Polyphenole im Darm ist eine Grundvoraussetzung für ihre protektive Wirkung im Menschen. Der Stoffwechselweg der Flavonoide wurde von Griffith (1982) schon früh am Tiermodell untersucht. Inzwischen besteht aber auch über Absorption und Stoffwechsel der Flavonoide beim Menschen etwas mehr Klarheit (siehe Abbildung 39). Man nahm lange Zeit an, dass der menschliche Körper nur Polyphenolaglykone absorbieren kann, die beispielsweise durch die Enzymaktivität der Darmflora im Kolon aus ihren Glykosiden gebildet werden. Hollman und Katan (1997) belegten jedoch, dass die menschliche Absorption von Quercetinglykosiden aus Zwiebeln (52 %) besser ist als die Absorption des Aglykons (24 %).

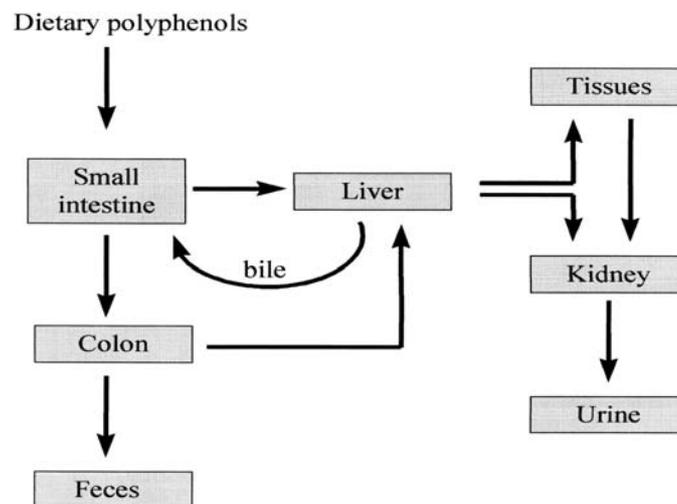


Abb. 40: Stoffwechselwege der Polyphenole im menschlichen Körper (Scalbert und Williamson, 2000)

Chen et al. (2003) untersuchten die Absorption von Apigenin im Gastrointestinaltrakt an Leber- und Darmmikrosomen von Ratten in Zellkultur, die mit Apigenin und Genistein inkubiert wurden. Außerdem wurde die Gallenexkretion sowie Blutproben und vier verschiedene Darmsegmente (Duodenum, oberes Jejunum, terminales Ileum und Kolon) von Ratten analysiert. Dabei ließ sich feststellen, dass die Apigeninabsorption im Kolon mit 40 % am höchsten und im terminalen Ileum mit 21 % am niedrigsten war und dass signifikant mehr Apigeninkonjugate ausgeschieden wurden ($p < 0,05$) als Konjugate von Genistein (siehe Abbildung 40 B). Mit Ausnahme des Duodenums wurde auch mehr Apigenin absorbiert als Genistein (siehe Abbildung 40 A). Innerhalb von 30 Minuten wurden 448 ± 31 nmol Genistein und 476 ± 31 nmol Apigenin (Mean \pm SD) absorbiert. Chen et al. (2003) konnten aber weder in der Gallenflüssigkeit, noch im Plasma die freien Aglykone nachweisen. Nach Hydrolyse mit β -Glukuronidase und Sulfatase wurde festgestellt, dass die Genisteinexkretion in Darm- und Gallensekret etwa gleich groß war (61 nmol/30 min. bzw. 50 nmol/30 min., wohingegen bei Apigenin mehr Konjugate im Darmsekret zu finden waren (127 nmol/ 30 min) als in der Gallenflüssigkeit (29 nmol/ 30 min). Die Untersuchung des

Genistein- und Apigeninmetabolismus in den Mikrosomen ergab, dass Apigenin schneller als Genistein glukuronidiert wird und dass Apigenin in den Zellen des Jejunums die höchste Metabolisierungsrate aufwies. Chen et al. (2003) konnten zeigen, dass Apigenin im Tiermodell in hohem Maße absorbiert werden kann und relativ schnell metabolisiert wird, außerdem enteraler Wiederverwertung unterliegt und einem starken Umbau unterworfen ist.

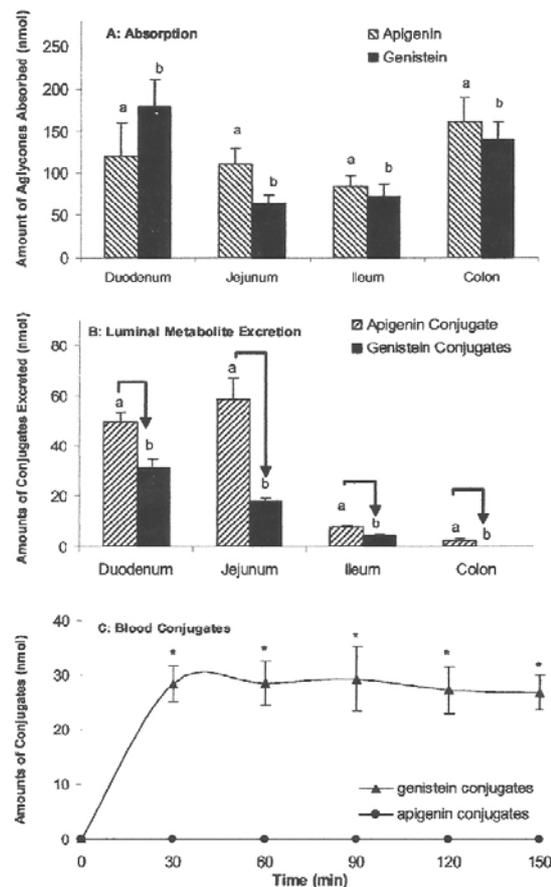


Abb. 41: Absorbierte Menge an Aglykon (A), Glykosiden (B) und Konjugaten im Blut (C) (Chen et al., 2003)

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Apigenin in den Erythrozyten nachweisbar ist (siehe Tabelle 57). Trotz der niedrigen Konzentrationen wurde durch diese Studie gezeigt, dass generell ein Apigenintransport, z.B. durch passive Diffusion in die Zelle, stattfindet. Speicherung und Transport der Substanz in den Erythrozyten ist daher ebenso möglich wie eine Beteiligung an Redoxreaktionen. Ob das Flavon hier funktionelle Bedeutung hat, konnte bisher jedoch noch nicht geklärt werden. Es könnte aber, aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften, beispielsweise am oxidativen Schutz der Zellen beteiligt sein. Die durchgeführte Studie ist die erste Arbeit, die Apigenin in roten Blutkörpern untersucht. Zuvor konnten Fiorani et al. (2003) zeigen, dass das Flavonol Quercetin durch passive Diffusion, die durch reversible Adsorption an

Hämoglobin und Albumin gesteuert wird, schnell in isolierte Erythrozyten aufgenommen werden kann. Bereits nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden 85 % der eingesetzten Menge Quercetin in der Zelle akkumuliert. Dieses zellgebundene, überwiegend im Cytosol nachweisbare Quercetin war biologisch aktiv und konnte zur Reduktion extrazellulärer Oxidantien beitragen, weil es offenbar als Substrat einer Oxidoreduktase (*RBC plasma-membrane oxidoreductase*) dient. Auf diese Weise kann ein reduzierendes Milieu aufrechterhalten werden. In der Untersuchung von Fiorani et al. (2003) wurde Quercetin nur in Anwesenheit von Albumin (35 mg/ml) aus den roten Blutkörpern freigesetzt. Darum könnten die Erythrozyten eine Schlüsselrolle bei der Verteilung und Bioverfügbarkeit der zirkulierenden Flavonoide spielen (Fiorani et al., 2003). Nachdem Quercetin und Apigenin strukturelle Ähnlichkeit aufweisen, besteht folglich die Möglichkeit, dass die eben erwähnten Erkenntnisse analog auf Apigenin anzuwenden sind. In der vorliegenden Studie konnte festgestellt werden, dass bei den meisten Probanden die Apigeninkonzentration in den Erythrozyten (siehe Abbildungen 32 und 33) innerhalb von 24 Stunden wieder unter die Nachweisgrenze (2,3 nmol/l) abfiel. Dies könnte bedeuten, dass Apigenin nach Aufnahme die Erythrozyten wieder ins Plasma abgegeben oder durch Oxidationsprozesse in den roten Blutkörpern abgebaut wird.

De Vries et al. (1998) beschreiben für Quercetin und Kämpferol, dass sich nach wiederholtem Verzehr von Zwiebeln, Äpfel und Tee bei den Probanden nach etwa vier Tagen ein "steady state" einstellt. In der vorliegenden Studie waren die Plasmakonzentrationen von Apigenin bei allen Studienteilnehmern jedoch innerhalb von 24 Stunden wieder unter die Nachweisgrenze abgesunken (siehe Tabelle 49). Allerdings wurde in dieser Studie nur einmal morgens eine Testmahlzeit verzehrt. Bei vier der acht Studienteilnehmer war bereits im Nüchternblut Apigenin in den Erythrozyten nachweisbar. Eine dieser Personen gab vegetarische Ernährung an. Diese Ergebnisse könnten also möglicherweise als Hinweis darauf verstanden werden, dass sich bei stetig hoher Zufuhr ein "steady state"-Zustand einstellt.

6. Zusammenfassung

In den letzten Jahren haben Flavonoide und Phenolsäuren in der Diskussion um mögliche gesundheitliche Wirkungen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Der Nutzen einer obst- und gemüsereichen Ernährung könnte zum Teil durch sekundäre Pflanzenstoffe erklärt werden. Bei manchen Vertretern dieser sekundären Pflanzenstoffe wurden sowohl in vitro als auch am Tiermodell antioxidative und antikanzerogene Eigenschaften gefunden. In einigen epidemiologischen Studien ergaben sich Hinweise auf gesundheitlich vorteilhafte Wirkungen auch für den Menschen. So werden einige Polyphenole aufgrund ihres Potentials, den Organismus vor Schädigung durch freie Radikale oder reaktive Sauerstoffspezies zu schützen, nicht nur bei der Prävention von Arteriosklerose sondern auch in Zusammenhang mit Krebserkrankungen diskutiert. Diese Untersuchungen wurden bislang jedoch hauptsächlich für einzelne Substanzen oder isolierte Untergruppen der Flavonoide, z.B. Quercetin, Catechine oder den als Phytoöstrogenen bekannten Isoflavonen Daidzein und Genistein, durchgeführt. Meist wird dafür der Verzehr von polyphenolhaltigen Lebensmitteln oder die daraus errechnete Zufuhr von Flavonoiden und Phenolsäuren herangezogen. Durch Unsicherheiten bei der Ernährungserhebung und Unterschiede in den verwendeten Lebensmitteldatenbanken kann die Zufuhrberechnung der Flavonoide und Phenolsäuren jedoch mit deutlichen methodischen Fehlern behaftet sein. Daher stellt die Suche nach geeigneten Biomarkern für die Zufuhr von Polyphenolen eine wertvolle Möglichkeit dar, um mögliche Effekte beim Menschen zu untersuchen. Daten über die Konzentrationen von Polyphenolen in Blutplasma bei normaler Ernährung stehen jedoch bisher nur begrenzt zur Verfügung.

Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine HPLC-Methode zur Bestimmung von ausgewählten Flavonoiden und Phenolsäuren aus Humanplasma, Urin, Erythrozyten und Lebensmitteln entwickelt und validiert. Aus zwei Unterklassen der Hydroxyphenolsäuren und aus fünf Unterklassen der Flavonoide wurden insgesamt 23 Polyphenole ausgewählt. Die Plasmapolyphebole wurden mit Ascorbinsäure-Puffer gegenüber Oxidation stabilisiert, mit Hilfe von Sulfatase und Glucuronidase enzymatisch hydrolysiert und mittels selektiver, zweidimensionaler Festphasenextraktion isoliert. Die Trennung der Polyphenole erfolgte mittels zwei RP-HPLC Säulen, die in Reihe geschaltet wurden. Die Analyten wurden mit einem empfindlichen, elektrochemischen Detektor nachgewiesen (HPLC-ECD-DAD). Identifikation und Prüfung der Peakreinheit wurden über den Vergleich der Retentionszeiten mit denen von Standardsubstanzen und mittels Vergleich der UV-Spektren mit Standardspektren unter Verwendung eines UV-spezifischen Dioden-Array-Detektors durchgeführt. Die

Polyphenolkonzentrationen im Plasma wurden über die Methode des internen Standards berechnet. Die Methode wurde entsprechend internationaler Richtlinien zur Validierung bioanalytischer Methoden validiert. Die Prüfung der Linearität ergab hohe Korrelationskoeffizienten ($r^2 > 0,99$). Der Variationskoeffizient für die Reproduzierbarkeit lag für alle Analyten bei $<10\%$ (V.K.). Die Wiederholbarkeit im Intra-day-assay ergab für alle Analyten Variationskoeffizienten zwischen $0,98\%$ (V.K.) und $6,49\%$ (V.K.) und die Wiederholbarkeit im Inter-day-assay ergab Variationskoeffizienten zwischen $1,52\%$ (V.K.) und $9,63\%$ (V.K.). Die analytische Wiederfindung für alle Substanzen lag zwischen 81% und 107% und für die Nachweisgrenzen der Polyphenole ergaben sich Konzentrationen zwischen $1,45\text{ nmol/l}$ (p-Cumarsäure) und $22,27\text{ nmol/l}$ (Epigallocatechin). Die Analysenzeit betrug 120 Minuten. Alle gesuchten Analyten konnten in Plasma-, Urin-, Erythrozytenproben und im Lebensmittel (z.B. Petersilie) bestimmt werden. Diese Methode eignet sich sowohl für den Einsatz in beobachtenden epidemiologischen Untersuchungen als auch in Interventionsstudien.

Diese neu entwickelte HPLC-Methode wurde für die Analyse von Plasmaproben ($n = 568$) von Teilnehmern einer repräsentativen Querschnittsstudie in Bayern (BVS II) eingesetzt. Es standen Proben von 243 männlichen und 325 weiblichen erwachsenen Teilnehmern zur Verfügung. Darüber hinaus wurden anthropometrische Parameter, z.B. Gewicht, Größe und BMI, gemessen und soziodemographische Charakteristika erhoben. In allen Proben konnten Vertreter der Flavonoide und der Phenolsäuren gefunden werden, deren Konzentrationen aber über einen sehr breiten Bereich streuen. Die jeweiligen Summen der Substanzklassen der untersuchten Flavonole, Flavanone und der Flavone liegen im Mittel in einem ähnlichen Konzentrationsbereich ($139,44\text{ nmol/l}$ bis $177,69\text{ nmol/l}$). Die Summe der Catechine liegt im Mittel mit $1094,63\text{ nmol/l}$ deutlich darüber und die Summe der Isoflavone liegt im Mittel mit $48,31\text{ nmol/l}$ deutlich darunter, während für die Summe der Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren im Durchschnitt beträchtlich höhere Konzentrationen gemessen wurden ($12276,15\text{ nmol}$ bzw. $1130,6\text{ nmol/l}$). Der Vergleich der Polyphenolkonzentrationen von männlichen und weiblichen Studienteilnehmern zeigt signifikant höhere Konzentrationen der Männer für Epicatechin und Isorhamnetin. Für die Summe der untersuchten Catechine, für Naringenin, Salicylsäure und Ferulasäure wurden hingegen signifikant höhere Konzentrationen bei den Frauen gefunden.

Die Untersuchung der Plasmakonzentrationen auf Unterschiede in verschiedenen Gruppen (z.B. Rauchstatus, BMI) ergab kein klares Bild. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen den Plasmastatus der Polyphenole in dieser repräsentativen Gruppe. Die ermittelten Plasmakonzentrationen sind teilweise beachtlich und sollten zukünftig in Untersuchungen zum Wert der Ernährung bei Erkrankungen wie koronarer Herzerkrankung und Krebs einbezogen werden.

In der zweiten Studie wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Polyphenolkonzentration im Plasma und dem Risiko an Brustkrebs zu erkranken, besteht. Diese Studie war eine, in EPIC-Heidelberg eingebettete, Fall-Kontroll-Studie mit 198 Fällen und 204 Kontrollen. Die Heidelberger EPIC-Kohorte umfasst insgesamt 13.615 Frauen im Alter von 35 bis 65 Jahren. Bei der Basiserhebung wurden von den Teilnehmerinnen Daten zu Ernährungsgewohnheiten, Lebensstil, Rauchgewohnheiten, Krankheitsgeschichte und Medikamenteneinnahme angegeben. Ergänzend zu der Erhebung wurden Blutdruck- und Körpermessungen durchgeführt sowie Blutproben genommen. Die Plasmaproben von insgesamt 402 Studienteilnehmerinnen aus der Heidelberger EPIC-Kohorte wurden mittels der entwickelten HPLC-Methode untersucht. Die Plasmakonzentrationen der Polyphenole in dieser Gruppe waren je nach Substanzklasse über einen sehr breiten Konzentrationsbereich verteilt. Im Plasma der Fälle waren im Mittel 6 $\mu\text{mol/l}$ Hydroxybenzoesäuren und im Plasma der Kontrollen waren mit 5,6 $\mu\text{mol/l}$ (Median) etwas weniger Hydroxybenzoesäuren enthalten. Der Summe der Hydroxybenzoesäuren umfasste bei den Fällen 0,126 – 89 $\mu\text{mol/l}$ und bei den Kontrollen 0,340 – 285 $\mu\text{mol/l}$. Die Flavan-3-ole und Hydroxyzimtsäuren waren im Plasma in etwa in gleichen Mengen enthalten (1,2 – 1,4 $\mu\text{mol/l}$). Deutlich geringere Konzentrationen wiesen die Flavonole, Flavone und Isoflavone auf (15 nmol/l – 160 nmol/l). Die Flavanone waren in sehr geringen Mengen zu finden und lagen im Mittel unter der Nachweisgrenze. Die Konzentrationen von Fällen und Kontrollen unterschieden sich signifikant für Kämpferol, die Summe der Flavonole, Luteolin, die Summe der Flavone, Protocatechusäure, die Summe der Hydroxybenzoesäuren und für Ferulasäure. Nach der Adjustierung für einige Einflussfaktoren auf das Brustkrebsrisiko konnte für Ferulasäure ein statistisch signifikanter, inverser Effekt gefunden werden. Die Odds Ratio für die höchste Quartile der Plasmakonzentration von Ferulasäure war 0,52, mit einem 95% Konfidenzintervall von 0,27 – 0,98 im Vergleich zur niedrigsten Quartile. Auch der Trendtest für die lineare Assoziation der kontinuierlichen Plasmawerte von Kämpferol ($p_{\text{cont.}} = 0,046$) und der Summe der Flavonole ($p_{\text{cont.}} = 0,019$) zeigte eine statistisch signifikante, inverse Assoziationen mit dem Risiko für Brustkrebs. Zwischen der Plasmakonzentration von Luteolin, der Summe der Flavone, Protocatechusäure und der Summe der Hydroxybenzoesäuren wurde hingegen kein statistisch gesicherter Zusammenhang zum Brustkrebsrisiko gefunden. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass die, durch den Verzehr von ballaststoffreichen Vollkornprodukten, aufgenommene Ferulasäure sowie flavonolreiches Obst und Gemüse zum Teil für die gesundheitlich vorteilige Wirkung hinsichtlich Brustkrebs verantwortlich sind.

In der dritten Studie wurde die entwickelte HPLC-Methode zur Überprüfung der Absorption von Apigenin aus Lebensmitteln beim Menschen eingesetzt. Dazu wurde elf gesunden Erwachsenen (5 Frauen und 6 Männer) im Alter von 23 – 41 Jahren einmalig eine Petersilienmahlzeit gegeben. Von den Probanden wurden 2 g Petersilie/kg Körpergewicht verzehrt (entsprechend 0,24 mg Apigenin/kg KG). Anschließend wurde der Verlauf der Plasmakonzentration von Apigenin zu neun Zeitpunkten innerhalb von 24 Stunden gemessen, die 24 Stunden-Urinausscheidung wurde gemessen und so die Absorptionsrate errechnet sowie die mögliche Anreicherung in Zellen (Erythrozyten) untersucht.

Bei allen Teilnehmern der Studie konnte eine Erhöhung der Apigeninkonzentration vom Nüchternplasma (unterhalb der Nachweisgrenze) auf Maximalkonzentrationen von 27,85 bis 337,46 nmol/l im Plasma, nach Verzehr der Petersilienmahlzeit festgestellt werden. Die mittleren Maximalkonzentrationen sowie der Zeitpunkt der maximalen Absorption (6 – 10 Stunden) zeigten erhebliche interpersonelle Schwankungen. Innerhalb von 24 Stunden sank die Apigenin-Plasmakonzentration bei allen Testpersonen wieder unter die Nachweisgrenze. Im Urin der Probanden wurde im Mittel 0,22 % der verzehrten Apigeninmenge wiedergefunden. Ein Einfluss von Geschlecht oder sportlicher Aktivität war nicht erkennbar. Es konnte gezeigt werden, dass Apigenin aus Lebensmitteln für den Menschen bioverfügbar ist. Weiterhin konnte der Beweis für die Anwesenheit von Apigenin in Erythrozyten erbracht werden. Apigenin ist also prinzipiell auch intrazellulär verfügbar und könnte folglich, bei ausreichend hoher und regelmäßiger Zufuhr, biologische Wirkungen in vivo entfalten.

Polyphenole haben in den vergangenen Jahrzehnten in zunehmendem Maße aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften wissenschaftliches Interesse geweckt. Diese Substanzen sind in den letzten Jahren auch zunehmend in das Interesse der Öffentlichkeit gerückt und unter Bezeichnungen wie z.B. „Pytamine, Phytalstoffe, Bioflavonoide, Citrusflavonoide, Phytoöstrogene“ u.a. bekannt geworden. Die hier entwickelte Methode zur Untersuchung der Plasmakonzentrationen von Flavonoiden und Phenolsäuren als Biomarker ihrer Zufuhr kann dazu genutzt werden, einen postulierten Zusammenhang zwischen der Zufuhr dieser Substanzen mit der Nahrung und dem Auftreten chronischer Krankheiten zu untersuchen. Darüber hinaus können diese Biomarker für die kurzfristige Aufnahme der Polyphenole in Kombination mit Ernährungsdaten, die die längerfristige Aufnahme erfassen sollten, die Genauigkeit der Expositionsschätzung erheblich verbessern und so zu sichereren Aussagen führen. Daher sollte in der Zukunft durch die Analyse von Polyphenolen im Plasma die Wirkung verschiedener Antioxidantien überprüft werden, um somit einen weiteren Beitrag zur Aufklärung der präventiven Eigenschaften und protektiven Wirksamkeit von Polyphenolen zu erbringen.

7. Literaturverzeichnis

- Ader P, Wessmann A, Wolfram S (2000) Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Rad Biol Med* 7: 1056-1067
- Adlercreutz H, Mousavi Y, Höckerstedt K (1992) Diet and breast cancer. *Acta Oncol* 31: 175-181
- Adlercreutz H (2003) Phytoestrogens and breast cancer. *J Biochem Mol Biol* 1803: 1-6
- Agullo G, Gamet-Payraastre L, Fernandez Y, Anciaux N, Demigné C, Rémésy C (1996) Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer Lett* 105: 61-70
- Aherne S, O'Brien N (2002) Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. *Nutr* 18: 75-81
- Ahmed MS, Ramsh V, Nagaraja V, Parish JH, Hadi SM (1994) Mode of binding of quercetin to DNA. *Mutagenesis* 9: 193-197
- Ancos B de, González EM, Cano MP (2000) Ellagic acid, vitamin C, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruits. *J Agric Food Chem* 48: 4565-4570
- Anzellotti D, Ibrahim RK (2000) Novel flavonol 2-oxoglutarate dependent dioxygenase: Affinity purification, characterization and kinetic properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 15: 161-172
- Arai Y, Watanabe S, Kimura M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinoshita N (2000) Dietary Intakes of Flavonols, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and the Inverse Correlation between Quercetin Intake and Plasma LDL Cholesterol Concentration. *J Nutr* 130: 2243-2250
- Aziz AA, Edwards CA, Lean ME, Crozier A (1998) Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-O-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Radic Res* 29 (3): 257-269
- Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, Terao J (2000) Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem* 48 (11): 5496-5500
- Berhow, M.A. und Vaughn, S.F. (1999) Higher plant flavonoids: biosynthesis and chemical ecology. In: *Principles and Practices of Plant Ecology*, W. V. Dashk, ed., CRC Press Inc., 425-438
- Bingham SA, Gill C, Welch A, Cassidy A, Runswick SA, Oakes S, Lubin R, Thurnham DI, Key TJ, Roe L, Khaw KT, Day NE (1997) Validation of dietary assessment methods in the UK arm of EPIC using weighed records, and 24-hour urinary nitrogen and potassium and serum vitamin C and carotenoids as biomarkers. *Int J Epidemiol* 26 Suppl 1: S137-S151
- Birt DF, Hendrich S, Wang W (2001) Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther* 90: 157-177
- Blackwell PA, Lutzhoft HC, Ma HP, Halling-Sorensen B, Boxall A, Kay P (2004) Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detection. *J Chromatogr A* 1045: 111-117
- Block GB, Patterson A, Subar A (1992). Fruit, vegetable, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr and Cancer*, 18: 1-29

- Bocchi C, Careri M, Groppi F, Mangia A, Manini P, Mori G (1996) Comparative investigation of UV, electrochemical and particle beam mass spectrometric detection for the high-performance liquid chromatographic determination of benzoic and cinnamic acids and of their corresponding phenolic acids. *J Chrom A* 753: 157-170
- Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke A (1998) Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Z Ernährungswiss* 37: 147-163
- Böhm, H (2000) Das Französische Paradoxon-Gesundheit durch Phenole des Weins? Teil 1: Phenolische Inhaltsstoffe des Weins. *Ernähr Umsch* 47, 44-49
- Booth AN, Jones FT, De Eds F (1958) Metabolic glucosuria studies on naringin and phlorhizin. *J Biol Chem* 233: 280-288
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1990) Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 186: 343-355
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1992) Struktural principles of flavonoid antioxidants. In: *Free Radicals and the Liver*. (G. Csomòs & J. Fehèr, eds.), Springer-Verlag, Berlin, 77-95
- Boulton DW, Walle UK, Walle T (1998) Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J Pharm Pharmacol* 50 (2): 243-249
- Boulton DW, Walle UK, Walle T (1999) Fate of the flavonoid quercetin in human cell lines: chemical instability and metabolism. *J Pharm Pharmacol* 51 (3): 353-359
- Bourne LC, Rice-Evans C (1998a) Bioavailability of ferulic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 222-227
- Bourne LC, Rice-Evans CA (1998b) Urinary detection of hydroxycinnamates and flavonoids in humans after high dietary intake of fruit. *Free Rad Res* 28:429-438
- Bourne L, Paganga G, Baxter D, Hughes P, Rice-Evans C (2000) Absorption of ferulic acid from low-alcohol beer. *Free Rad Res* 32: 273-280
- Boyle SP, Dobson VL, Duthie SJ, Kyle JA, Collins AR (2000a) Absorption and DNA protective effects of flavonoid glycosides from an onion meal. *Eur J Nutr* 39: 213-223
- Boyle SP, Dobson VL, Duthie SJ, Hinselwood DC, Kylev JAM, Collins AR (2000b) Bioavailability and efficiency of rutin as an antioxidant: a human supplementation study. *Eur J Clin Nutr* 54 : 774-782
- Braga C, La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Parpinel M (1997) Intake of selected Foods and Nutrients and Breast Cancer Risk: an Age- and Menopause-specific Analysis. *Nutr and Cancer* 28 (3): 258-263
- Brandl W, Herrmann K (1984) Über das Vorkommen der Chlorogensäure in der Kartoffel. *Z Lebensm Unters Forsch* 178: 192-194
- Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Chem Toxicol* 26: 99-103
- Brolis M, Gabetta B, Fuzzati N, Pace R, Panzeri F, Peterlongo F (1998) Identification by high-performance liquid chromatography- diode array detection- mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography- UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. *J Chromatogr A* 825: 9- 16
- Bronner WE, Beecher GR (1998) Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 805: 137-42

- Caccetta RA-A, Croft KD, Beilin LJ, Puddey IB (2000) Ingestion of red wine significantly increases plasma phenolic acid concentrations but does not acutely affect ex vivo lipoprotein oxidizability. *Am J Clin Nutr* 71: 67-74
- Cao G, Sofic E, Prior RL (1996) Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *J Agric Food Chem* 44: 3426-3431
- Cao G, Sofic E, Prior RL (1997) Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22: 749-760
- Chamkha M, Cathala B, Cheynier V, Douillard R (2003) Phenolic composition of champagnes from Chardonnay and Pinot Noir vintages. *J Agric Food Chem* 51: 3179-84
- Chao PDL, Hsiu SL, Hou YC (2002) Flavonoids in Herbs : Biological Fates and Potential Interactions with Xenobiotics. *J Food Drug Anal* 10 (4): 219-228
- Chen J, Lin H, Hu M (2003) Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition. *Pharmacol Exp Ther* 304: 1228-1235
- Choudhury R, Srail SK, Debnam E, Rice-Evans CA (1999) Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Rad Biol Med* 27: 278-286
- Cook NC, Samman S (1996) Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 7: 66-76
- Cozzi R, Ricordy R, Bartolini F, Ramadori L, Perticone P, De Salvia R (1995) Taurine and ellagic acid: two differently-acting natural antioxidants. *Environ Mol Mutagen* 26: 248-254
- Cremin P, Kasmin-Karakas S, Waterhouse L (2001) LC/ESI-MS Detection of Hydroxycinnamates in Human Plasma and Urine. *J Agric Food Chem* 49: 1747-1750
- Crespy V, Morant C, Manach C, Besson C, Demingè C, Rèmèsy C (1999) Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* 277: 120-126
- Crews H, Alink G, Andersen R, Braesco V, Holst B, Maiani G, Ovesen L, Scotter M, Solfrizzo M, van den Berg R, Verhagen H, Williamson G (2001) *Brit J Nutr* 86(1): 5-35
- Croft KD (1998) The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* 854 (20): 435-442
- Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C (1997) Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *J Agric Food Chem* 45: 590-595
- Csokay B, Prajda N, Weber G, Olah E (1997) Molecular mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sciences* 60: 2157-2163
- Dai Q, Shu XO, Jin F, Potter JD, Kushi LH, Teas J, Gao YT, Zheng W (2001) Population based case control study of soyfood intake and breast cancer risk in Shanghai. *Br J Cancer* 85: 372-378
- Das NP (1971) Studies on flavonoid metabolism: Absorption and metabolism of (+)-catechin in man. *Biochem Pharmacol* 20: 3435–3445
- De Vries JHM, Hollman PCH, Meyboom S, Buysman MNCP, Zock PL, Van Staveren WA, Katan MB (1998) Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *Am J Clin Nutr* 68: 60-65

- Den Tonkelaar I, Keinan-Boker L, van't Peer P, Arts CJM, Adlercreutz H, Thijssen JHH, Peeters PHM (2001) Urinary phytoestrogens and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 223-228
- Del Rio D, Stewart AJ, Mullen W, Burns J, Lean ME, Brighenti F, Crozier A (2004) HPLC-MS (n) Analysis of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids in Green Tea and Black Tea. *J Agric Food Chem* 52 (10): 2807-2815
- Dixit R, Gold B (1986) Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8039-8043
- Dolan JW, Snyder LR, Blanc T, Van Heukelem L (2000a) Selectivity differences for C18 and C8 reversed-phase columns as a function of temperature and gradient steepness. I. Optimizing selectivity and resolution. *J Chromatogr A* 897: 37-50
- Dolan JW, Snyder LR, Blanc T (2000b) Selectivity differences for C18 and C8 reversed-phase columns as a function of temperature and gradient steepness. II. Minimizing column reproducibility problems. *J Chromatogr A* 897: 51-63
- Du Pont MS, Day AJ, Bennett RN, Mellon FA, Kroon PA (2004) Absorption of kaempferol from endive, a source of kaempferol-3-glucuronide, in humans
- Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JAM (2000) Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev* 13: 79-106
- Eastwood MA (2001) A molecular biological basis for the nutritional and pharmacological benefits of dietary plants. *Q J Med* 94: 45-48
- Ehrling J, Shin JK, Douglas CJ (2001) Identification of 4-coumarate: coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains. *Plant J* 27: 455-465
- Elmadfa I, Leitzmann C (1998) Ernährung des Menschen. 3. Auflage; Stuttgart (Hohenheim); Verlag Ulmer. S. 311
- Meyer H, Bolarinwa A, Wolfram G, Linseisen J (2006) Bioavailability of Apigenin from Apiin-Rich Parsley in Humans. *Ann Nutr Metab* 50: 167-172
- Erlund I, Alfthan G, Siren H, Ariniemi K, Aro A (1999) Validated method for the quantification of quercetin from human plasma using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B* 727: 179-189
- Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Mäenpää J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A (2000) Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 56: 545-553
- Erlund I, Meririnne E, Alfthan G, Aro A (2001) Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J Nutr* 131: 235-241
- Erlund I, Silaste ML, Alfthan G, Rantala M, Kesäniemi YA, Aro A (2002) Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur J Clin Nutr* 56: 891-898
- Ewald C, Fjellkner-Modig S, Johansson K, Sjöholm I, Åkesson B (1999) Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chem* 64: 231-235
- Faulds CB, Williamson G (1999) The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *J Sci Food Agric* 79: 393-395

- Faustino RS, Sobrattee S, Edel AL, Pierce GN (2003) Comparative analysis of the phenolic content of selected Chilean, Canadian and American Merlot red wines. *Mol Cell Biochem* 249:11-9
- Felgines C, Texier O, Morand C, Manach C, Scalbert A, Regeat F, Remesy C (2000) Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G1148-G1154
- Ferguson LR, Harris PJ (1999) Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *Eur J Cancer Prev* 8:17-25
- Fergusson PJ, Kurowska E, Freeman DJ, Chambers AF, Koropatnick DJ (2004) A flavonoid fraction from cranberry extract inhibits proliferation of human tumor cell lines. *J Nutr* 134 (6): 1529-1535
- Fiorani M, Accorsi A, Cantoni O (2003) Human Red Blood Cells as Natural Flavonoid Reservoir. *Free Rad Res* 37 (12): 1331-1338
- Foley S, Navaratnam S, McGarvey DJ, Land EJ, Truscott TG, Rice-Evans CA (1999) Singlet oxygen quenching and the redox properties of hydroxycinnamic acids. *Free Radic Biol Med* 26: 1202-1208
- Forkmann G, Heller W (1999) Biosynthesis of flavonoids: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, ed Barton D, Nakanishi K, Elsevier, 713
- Franke AA, Custer LJ, Wilkens LR, Le Marchand L, AMY Nomura, Goodman MT, Kolonel LN (2002) Liquid chromatographic-photodiode array mass spectrometric analysis of dietary phytoestrogens from human urine and blood. *J Chromatogr B* 777: 45-59
- Frankenfeld CL, Patterson RE, Horner NK, Neuhauser ML, Skor HE, Kalthorn TF, Howald WN Lampe JW (2003) Validation of a food-frequency questionnaire and evaluation of correlates of plasma isoflavone concentrations in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 77: 674-680
- Freudenheim JL, Marshall JR, Vena JE, Laughlin R, Brasure JR et al (1996) Premenopausal Breast Cancer Risk and Intake of Vegetable, Fruit and Related Nutrients. *J Natl Cancer Inst* 88: 340-348
- Fritsch H, Griesebach H (1975) Biosynthesis of cyanidin in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Phytochemistry* 14: 2437-2442
- Fuhr U, Kummert AL (1995) The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions? *Clin Pharmacol Ther* 58: 365-373
- Gee JM, Du Pont MS, Day AJ, Plump GW, Williamson G, Johnson IT (2000) Intestinal transport of quercetin glycosides in rat involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 130: 2765-2771
- Geleijnse JM, Launer LJ, Hofman A, Pols HAP, Witteman M (1999) Tea flavonoids may protect against atherosclerosis. *Arch Intern Med* 159 (18): 2170-2174
- Geleijnse JM, Launer LJ, van der Kuip DAM, Hofman A, Witteman JCM (2002) Inverse association of tea and flavonoid intakes with myocardial infarction: the Rotterdam study. *Am J Clin Nutr* 75: 880-886
- Gey KF, Stahelin HB, Eichholzer M (1993) Poor plasma status of carotene and vitamin C is associated with higher mortality from ischemic heart disease and stroke: Basel Prospective Study. *Clin Investig* 71: 3-6
- Gil-Izquierdo A, Gil MI, Ferreres F, Tomás-Barberán AF (2001) *in vitro* Availability of Flavonoids and Other Polyphenolics in Orange Juice. *J Agric Food Chem* 49: 1035-1041
- Glade MJ (1999) Food, Nutrition, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. *Nutrition* 15: 523-526

- Goldbohm AR, Hertog MGL, Brants HAM, van Poppel G, van den Brandt PA (1996) Consumption of Black Tea and Cancer Risk: a Prospective Study. *J Natl Cancer Inst* 88: 93-100
- Goldbohm AR, Hertog MGL, Brants HAM, van Poppel G, van den Brandt PA (1998) Intake of flavonoids and cancer risk: a prospective cohort study. In: *Polyphenols in Food* (ed. Amado R, Andersson H, Badocz S, Serra F), COST 916, Luxembourg, Office for Official Publication of the European Communities 1998, pp 159-166
- Graefe EU, Derendorf H, Veeit M (1999) Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther* 37: 219-233
- Graf E, Eaton JW (1993) Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr Cancer* 19: 11-19
- Griffith LA (1982) Mammalian metabolism of flavonoids. In: *The flavonoids: Advances in research*, Harborne. (J.B., Marbry, T.J., eds.), pp. 681-718, Chapman and Hall, London, New-York
- Gross M, Pfeiffer M, Martini M, Campbell D, Slavin J, Potter J (1996) The quantitation of metabolites of quercetin flavonols in human urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 711-720
- Gugler R, Leschik M, Dengler HJ (1975) Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Europ J clin Pharmacol* 9: 229-234
- Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR (1999) Content of the flavonols quercetin, myricetin and kämpferol in 25 edible berries. *J. Agric Food Chem* 47: 2274-2279
- Harborne, JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504
- Haslam E, Lilley TH (1988) Natural astringency in foodstuffs – a molecular interpretation. *Crit Rev Food Sci Nutr* 27 (1): 1-40
- Heilmann J, Merfort I (1998a) Current understanding of the metabolism of flavonoids. I. Adsorption and metabolism of flavonols. *Pharm Unserer Zeit* 27 (2): 58-65
- Heilmann J, Merfort I (1998b) Current understanding of the metabolism of flavonoids. II. Adsorption and metabolism of flavones, flavonones, flavanes, proanthocyanidens and isoflavonoids. *Pharm Unserer Zeit* 27 (4): 173-183
- Heller W, Forkmann G (1993) Biosynthesis of flavonoids. In: *The Flavonoids: Advances in reserach since 1986*. Harborne J.B. ed., London: Chapman and Hall, 499-535
- Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, Belanger C, LaMotte F, Gaziano JM, Ridker PM, Willett W, Peto R (1996) Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334: 1145-1149
- Hermann S, Linseisen J, Chang-Claude J (2002) Nutrition and breast cancer risk by age 50: a population-based case-control study in Germany. *Nutr Cancer* 44: 23-34
- Herrmann K (1988) On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z Lebensm Unters Forsch* 186: 1-5
- Herrmann K (1989) Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 28 (4): 315-347
- Herrmann K (1990) Vorkommen und Gehalte der Flavonoide in Obst. *Erwerbsobstbau* 32: 32-37
- Herrmann K (1993) In pflanzlichen Lebensmitteln vorkommende Flavonoide als Antioxidantien. *Gordian* 93: 108-111

- Herrmann K (1995) Flavone und Flavonole als wichtige Inhaltsstoffe von Gewürzen. *Gordian* 6: 104-107
- Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP (1992a) Optimization of a Quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. *J Agric Food Chem* 40: 1591-1598
- Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB (1992b) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 40: 2379-2383
- Hertog MGL, Hollmann PCH, Katan MB, Kromhout D (1993a) Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. *Nutr Cancer* 20: 21-29
- Hertog MGL, Hollmann PCH, Van de Putte B (1993b) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices. *J Agr Food Chem* 41: 1242-1246
- Hertog MG, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D (1997) Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. *Am J Clin Nutr* 65 (5): 1489-1494
- Hess D, Keller HE, Oberlin B, Bonfanti R, Schuep W (1991) Simultaneous determination of retinol, tocopherols, carotene and lycopene in plasma by means of high-performance liquid chromatography on reversed phase. *Int J Vit Nutr Res* 61:232-238
- Hirano T, Abe K, Gotoh M, Oka K (1996) Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Brit J Cancer* 72: 1380-1388
- Hirose K, Tajima K, Hamajima N, Inoue M, Takezaki T, Kuroishi T, Yoshida M, Tokudome S (1995) A large-scale, hospital-based case-control study of risk factors for breast cancer according to menopausal status. *Jpn J Cancer Res* 86: 146-154
- Hirvonen T, Pietinen P, Virtanen M, Ovaskainen M, Häkkinen S, Albanes D, Virtamo J (2001) Intake of Flavonols and Flavones and Risk of coronary heart disease in male smokers. *Epidemiology* 12: 62-67
- Hodek P, Trefil P, Stiborova M (2002) Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol Interact* 139: 1-21
- Hollman PCH, de Vries JHM, van Leeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 62: 1276-1282
- Hollmann PCH, Gaag VDM, Mengelers MJB, van Trijp JMP, de Vries JHM, Katan MB (1996) Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med* 21: 703-707
- Hollman PCH, Katan MB (1997a) Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother* 51 (8): 305-310
- Hollman PCH, van Trijp JMP, Buysman MNCP., Gaag MSv.d., Mengelers MJB., de Vries JHM., Katan MB (1997b) Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* 418: 152- 156
- Hollman PCH., van Trijp JMP., Mengelers MJB., de Vries JHM., Katan MB (1997c) Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Lett* 114: 139-140
- Hollman PCH (1997d) Bioavailability of flavonoids. *Eu J Clin Nutr* 51: S66-S69
- Hollman PC, Katan MB (1998) Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch Toxicol Suppl* 20: 237-48

- Hollman PCH, Katan MB (1999) Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. *Food Chem Toxicol* 37: 937-942
- Hollman PCH, Arts ICW (2000) Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, 80: 1081-1093
- Horn-Ross PL, John EM, Lee M, Steward SL, Koo J, Sakoda LC, Shiao AC, Goldstein J, Davis P, Perez-Stable EJ (2001) Phytoestrogen consumption and breast cancer risk in a multiethnic population: the Bay Area Breast cancer Study. *Am J Epidemiol* 154: 434-441
- Huang MT, Ho CT, Wang ZY, Ferraro T, Finnegan-Olive T, Lou YR, Mitchell JM, Laskin JD, Newmark H, Yang CS (1992) Inhibitory effect of topical application of a green tea polyphenol fraction on tumor initiation and promotion in mouse skin. *Carcinogenesis* 13: 947 – 954
- Huang MT, Smart RC, Wong C-Q, Conney AH (1988) Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 48: 5941-5946
- Hudson AE, Dinh AP, Kokubun T, Simmons MSJ, Gescher A (2000) Charakterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 1163-1170
- IME (Wissenschaftlicher Informationsdienst, Informationskreis Mundhygiene und Ernährungsverhalten) Coffeinaufnahme und Flüssigkeitsbilanz: eine Übersicht. Ausgabe Januar 2004, Beitrag Nr. 3. Webside: <http://www.ime-info.de>
- Ingram D, Sanders K, Kolybaba M, Lopez D (1997) Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet* 350: 990-994
- Ito Y, Sasaki R, Minohara M, Otani M, Aoki K (1987) Quantitation of serum carotenoid concentrations in healthy inhabitants by high-performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* 169: 197-208
- IUPAC (1993) *Pure and Applied Chemistry* 65: 819-872
- Janssen K, Mensink RP, Cox FJJ, Harryvan JL, Hovenier R, Hollman PCH., Katan MB (1998) Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr* 67: 255-62
- Johnson KM, Loo G (2000) Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutation Research* 459: 211-218
- Jones DJ, Lim CK, Ferry DR, Gescher A (1998) Determination of Quercetin in Human Plasma by HPLC with Spectrophotometric or Electrochemical Detection. *Biomed Chromatogr* 12: 232-235
- Jungbluth G, Ternes W (2000) HPLC separation of flavonols, flavones and oxidized flavonols with UV-, DAD-, electrochemical and ESI-ion trap MS detection. *Fresenius Anal Chem* 367: 661-666
- Justesen U, Knutsen P, Leth T (1998) Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high- performance liquid chromatography with photo- diode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 799: 11-110
- Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A (2004) Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J Agric Food Chem* 52: 4360-4367
- Kampa M, Vassilia-Ismini A, Notas G, Nifli AP, Nistikaki A, Hatzoglou, Bakogeorgou E, Kouimtoglou E, Blekas G, Boskou D, G ravanis A, Castanas E (2003) Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res* 6: 63-74

- Kanaze FI, Kokkalou E, Georgakis M, Niopas I (2004) Validated high-performance liquid chromatographic method utilizing solid-phase extraction for the simultaneous determination of naringenin and hesperetin in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technicol Biomed Life Sci* 801 (2): 363-367
- Kardinaal AF, Kok FJ, Ringstad J, Gomez-Aracena J, Mazaev VP, Kohlmeier L, Martin BC, Aro A, Kark JD, Delgado-Rodriguez M (1993) Antioxidants in adipose tissue and risk of myocardial infarction: the EURAMIC Study. *Lancet* 342: 1379-1384
- Keli SO, Hertog MGL, Feskens EJM, Kromhout D (1996) Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke. The Zutphen study. *Arch Intern Med* 154: 637-642
- Kern SM, Bennett RN, Mellon FA, Kroon PA, Garcia-Conesa MT (2003) Adsorption of Hydroxycinnamates in Humans after High-Bran Cereal Consumption. *J Agric Food Chem* 51: 6050-6055
- Knekt P, Järvinen R, Reunanen A, Moatela J (1996) Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Brit Med J* 312: 478-481
- Knekt P, Järvinen R, Seppänen R, Heliövaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A (1997) Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasma. *Am J Epidemiol* 146: 223-230
- Kostic D, White WS, Olson JA (1995) Intestinal absorption, serum clearance and interactions between lutein and beta-carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *Am J Clin Nutr* 62 (3): 604-610
- Krauze-Baranowska M, Cisowski W (1995) Flavone C-glycosides from *bryonia alba* and *B. dioica*. *Phytochemistry* 39 (3): 727-729
- Kreydiyyeh SI, Usta J (2002) Diuretic effect and mechanism of action of parsley. *J Ethnopharmacol* 79: 353-357
- Kroon PA., Faulds CB, Ryden P, Williamson G (1996) Solubilisation of ferulic acid from plant cell wall materials in a model human gut system. *Biochem Soc Trans* 24: S384-S384
- Kroon PA, Faulds CB, Ryden P, Robertson JA, Williamson G (1997) Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *J Agric Food Chem* 45: 661-667
- Kübler W, Anders HJ, Heeschen W, Kohlmeier M (1992) VERA-Schriftenreihe, Band V, Methodenhandbuch der Verbundstudie Ernährungserhebung und Risikofaktoren Analytik. Wiss Fachverlag, Niederkleen
- Kühnau J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *Wld Rev Nutr Diet* 24: 117-191
- Kühnau J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24: 117-191
- Lee HP, Gourley L, Duffy SW, Esteve J, Lee J, Day NE (1991) Dietary effects on breast cancer risk in Singapore. *Lancet* 331: 1197-1200
- Lee MJ, Prabhu S, Meng X, Li C, Yang CS (2000) An improved method for the determination of green and black tea polyphenols in biomatrices by high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. *Anal Biochem* 279 (2): 164-169.
- Lesser S, Cermak R, Wolffram S (2004) Bioavailability of Quercetin in Pigs is Influenced by the Dietary Fat Content. *J Nutr* 134: 1508-1511

- Linseisen J, Piller R, Hermann S, Chang-Claude J; German Case-Control Study (2004) Dietary phytoestrogen intake and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. *Int J Cancer* 110 (2): 284-290
- Linseisen J, Radtke J, Wolfram G (1997) Flavonoidzufuhr Erwachsener in einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie. *Z Ernährungswiss* 36: 403-412
- Linseisen J, Wilhelm M, Hoffmann J, Hailer S, Keller CH, Wolfram G (1999) Acute effects of LDL-apheresis on cholesterol oxidation products and antioxidants in plasma and lipoproteins of patients with familial hypercholesterolemia. *Eur J Med Res* 4: 433-441
- Linseisen J, Wolfram G (1997) Differences in nutrient intake using different nutrient databases -- an example. *Z Ernährungswiss* 36: 127-132
- Liu Y and Hu M (2002) Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perfused rat intestinal model. *Drug Metab Dispos* 30:370-377
- Lowry OH, Lopez JA, Bessey OA (1943) The determination of ascorbic acid in small amounts of serum. *J Biol Chem* 147:609-615
- Lu LJ, Grady JJ, Marshall MV, Ramanujam VM, Anderson KE (1995) Altered time course of urinary daidzein and genistein excretion during chronic soya diet in healthy male subjects. *Nutr Cancer* 24: 311-323.
- Macheix JJ, Sapis JC, Fleuriet A (1991) Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Crit Rev Food Sci Nutr* 30(4): 441-486
- Maiani G, Serafini M, Salucci M, Azzini E, Ferro-Luzzi A (1997) Application of a new high-performance liquid chromatographic method for measuring selected polyphenols in human plasma. *J Chromatogr B* 692: 311-317
- Manach C, Morand C, Texier O, Favier M-L, Agullo G, Règeat F, Rémésy C (1995) Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr.* 125: 1911-1922
- Manach C, Morand C, Demigné C, Texier O, Règeat F, Rémésy C. (1997) Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett.* 409: 12-16
- Manach C, Morand C, Crespy V, Demigne C, Texier O, Regerat F, Remesy C (1998) Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 426:331-336
- Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Rémésy C (2003) Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Am J Clin Nutr* 57: 235-242
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79: 727-747
- Manning J, Roberts JC. (2003) Analysis of catechin content of commercial green tea products. *J Herb Pharmacother* 3: 19-32
- Markaverich BM, Roberts RR, Alejandro MA, Johnson GA, Middleditch BS, Clark JH (1988) Bioflavonoid interaction with rat uterine type II binding sites and cell growth inhibition. *J Steroid Biochem* 30: 71-78

- Marshall JR, Lanza E, Bloch A, Caan B, Caggiula A, Quandt S, Iber F, Kikendall W, Slattery M, Sowell A (1997) Indexes of food and nutrient intakes as predictors of serum concentrations of nutrients: the problem of inadequate discriminant validity. The Polyp Prevention Trial Study Group. *Am J Clin Nutr* 65: 1269S-1274S
- Martens S, Forkmann G (1999) Cloning and expression of flavone synthase II from *Gerbera* hybrids. *Plant J* 20: 611-618
- Martens S, Forkmann G, Matern U, Lukacin R (2001) Cloning of parsley flavone synthase I. *Phytochemistry* 58: 43-46
- Mattila P, Astola J, Kumpulainen J (2000) Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode- array and electro- array detection. *J Agric Food Chem* 48: 5834- 5841
- Mayr U, Treutter D, Santos-Buelga C, Bauer H, Feucht W (1995) Developmental changes in the phenol concentrations of 'golden delicious' apple fruits and leaves. *Phytochemistry* 38: 1151-1155
- McIntosh CA, Mansell RL (1997) Three-dimensional distribution of limonin, limonoate A-ring monolactone, and naringin in the fruit tissues of three varieties of *Citrus paradisi*. *J Agric Food Chem* 45: 2876-2883
- McMahon GP und Kelly MT (1998) Determination of Aspirin and Salicylic Acid in Human Plasma by Column-Switching Liquid Chromatography Using On-Line Solid-Phase Extraction. *Anal Chem* 70: 409-414
- Merken HM, Beecher GR (2000) Measurement of food flavonoids by high- performance liquid chromatography: a Review. *J Agric Food Chem* 48 (3): 577-599
- Merken HM, Beecher GR (2000) Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *J Chromatogr A* 897: 177-184
- Messina M (1994) To recommend or not to recommend soy foods. *J Am Diet Assoc* 94 (11): 1253-1254
- Meyer AS, Donovan JL, Pearson DA, Waterhouse AL, Frankel EN (1998) Fruit hydroycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 1783-1787
- Middleton E, Kandaswami C (1994) The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In *The Flavonoids: Advances in reserach since 1986*, Harborne JB, ed. London: Chapman and Hall, 619-652
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Colch)* 84: 407-412
- Miller NJ (1998) Nonvitamin plasma antioxidants. *Methods Mol Biol* 108:285-97: 285-297
- Morand C, Crespy V, Manach C, Besson C, Demigné C, Rémésy C (1998) Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am J Physiol* 275: R212-R219
- Morand C, Manach C, Crespy V, Remesy C (2000) Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radic Res* 33: 667-676
- Moridani MY, Scobie H, O'Brien PJ (2002) Metabolism of caffeic acid by isolated rat hepatocytes and subcellular fractions. *Toxicol Lett* 133 (2-3): 141-151
- Morton MS, Wilcox G, Wahlqvist ML, Griffiths K (1994) Determination of lignans and isoflavonoids in human female plasma following dietary supplementation. *J Endocrin* 142: 251-259

- Morton LW, Croft KD, Puddlerly IB, Byrne L (2000) Phenolic acids protect low density lipoproteins from peroxynitrite-mediated modification in vitro. *Lipids* 35(6): 633-638
- Mukhtar H, Das M, Bickers DR (1986) Inhibition of 3-methylcholanthrene-induced skin tumorigenicity in BALB/c mice by chronic oral feeding of trace amounts of ellagic acid in drinking water. *Cancer Res* 46: 2262-2265
- Mullen W, Stewart AJ, Lean MEJ, Gardner P, Duthie GG, Crozier A (2002) Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagittannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J Agric Food Chem* 50: 5197-5201
- Nagano J, Kono S, Preston DL, Mabuchi K (2001) A prospective study of green tea consumption and cancer incidence, Hiroshima and Nagasaki (Japan). *Cancer Causes and Control* 12: 501-508
- Newmark HL (1992) Plant phenolic compounds as inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. In Huang HT, Ho CT, Lee CY: Phenolic compounds in Food and their effect on health II. Antioxidant and cancer prevention. *Am Chem Soc: Symposium Series* 507: 48-53
- Nie G, Wei T, Shen S, Zhao B (2001) Polyphenol Protection of DNA Damage. *Methods Enzymol* 335: 232-245
- Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C, Dragsted LO (1998a) in vitro biotransformation of flavonoids by rat liver mikrosomes. *Xenobiotica* 28: 389-401
- Nielsen SE, Dragsted LO (1998b) Column-switching high-performance liquid chromatographic assay for determination of apigenin and acacetin in humane urine with ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr A* 713: 379-386
- Nielsen SE, Young JF, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Sandström B, Dragsted LO (1999) Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *Br J Nutr* 81: 447-455
- Noroozi M, Burns J, Crozier A, Kelly IE, Lean ME (2000) Prediction of dietary flavonol consumption from fasting plasma concentration or urinary excretion. *Eur J Clin Nutr* 54: 143-149
- Nurmi T, Adlercreutz H (1999) Sensitive High-Performance Liquid Chromatographic Method for Profiling Phytoestrogens Using Coulometric Electrode Array Detection: Application to Plasma Analysis. *Anal Biochem* 274: 110-117
- Olmedilla B, Granado F, Southon S, Wright AJ, Blanco I, Gil-Martinez E, Berg H, Corridan B, Roussel AM, Chopra M, Thurnham DI (2001) Serum concentrations of carotenoids and vitamins A, E, and C in control subjects from five European countries. *Br J Nutr* 85: 227-238
- Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S (1996) Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 334: 1150-1155
- Onyeneho SN, Hettiarachchy NS (1992) Antioxidant activity of durum wheat bran. *J Agric Food Chem* 40: 1496-1500
- Ortmann R, Sandermann H Jr., Grisebach H (1970) Transfer of apiose from UDP- apiose to 7- O- (β - D- glycosyl)- apigenin and 7- O- (β - D- glycosyl)- chrysoeriol with an enzyme preparation of parsley. *FEBS Lett* 7: 164-166
- Owen RW, Giacosa A, Hull WE, Haubner R, Wurtele G, Spiegelhalder B, Bartsch H (2000) Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *Lancet Oncol.* 2000 Oct;1:107-112. Review

- Paganga G, Miller N, Rice-Evans CA (1999) The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Radic Res* 30: 153-612
- Peaston RT, Weinkove C (2004) Measurement of catecholamines and their metabolites. *Ann Clin Biochem* 41: 17-38. Review
- Peeters PHM, Keinan-Boker L, van der Schouw, DE Grobbee (2003) Phytoestrogens and breast cancer risk – Review of the epidemiological evidence *Breast cancer res treat* 77: 171-183
- Pelletier MW, Murell JR, Shirley BW (1997) Characterization of Flavonol Synthase and Leucoanthocyanidin Dioxygenase Genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* 113: 1437-1445
- Perez-Illzarbe J, Hernandez T, Estrella I (1991) Phenolic compounds in apples: varietal differences. *Z Lebensm Unters Forsch* 192: 551-554
- Peruzzi M, Bartolucci G, Cioni F (2000) Determination of phenoxyalkanoic acids and other herbicides at the ng/ml level in water by solid-phase extraction with poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) sorbent and high-performance liquid chromatography--diode-array detection. *J Chromatogr A* 867: 169-75
- Peeters PHM, Keinan-Boker L, van der Schouw YT, DE Grobbee (2003) Phytoestrogens and breast cancer risk. *Cancer Res* 77: 171-183
- Peterson J, Lagiou P, Samoli E, Lagiou A, Katsouyanni K, La Vecchia C, Dywer J, Trichopoulos D (2003) Flavonoid intake and breast cancer risk: a case-control study in Greece. *Br J Cancer* 89: 1255-1259
- Pierpoint WS (1986) Flavonoids in the human diet. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological, and Structure-Activity Relationships*, Piepoint, WS (ed) pp 125-140. Alan List: London
- Pietta PG (2000) Flavonoids as Antioxidants *J Nat Prod* 63: 1035-1042
- Pirker R, Huck CW, Popp M, Bonn GK (2004) Simultaneous determination of gentisic, salicylic and salicylic acid in human plasma using solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B* 809: 257-264
- Plumb GW, Garcia-Conesa MT, Kroon PA, Rhodes M, Ridley S, Williamson G (1999) Metabolism of chlorogenic acid by human plasma, liver, intestine and gut microflora. *J Sci Food Agric* 79: 390–392
- Radtke J, Linseisen J, Wolfram G (1998) Phenolsäurezufuhr Erwachsener in einem bayerischen Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie. *Z Ernährungswiss* 37: 190-197
- Radtke J, Linseisen J, Wolfram G (2002) Fasting Plasma concentrations of selected flavonoids as markers of their ordinary diet intake. *Eur J Nutr* 41: 203-209
- Rechner AR, Spencer JP, Kuhnle G, Hahn U, Rice-Evans CA (2001) Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radic Biol Med* 30: 1213-1222
- Rechner AR, Kuhnle G, Bremner P, Hubbard GP, Moore KP, Rice-Evans CA (2002) The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radic Biol Med.* 33(2): 220-235
- Riboli E, Norat T (2003) Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr* 78: 559S-569S
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell PG, Bramley PM, Pridham JB (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Res* 22: 375-383
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol Med* 20: 933-956

- Rimm EB, Katan MB, Ascherio A, Stampfer MJ, Willett WC (1996) Relation between intake of flavonoids and risk of coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med* 125: 384-389
- Robbins RJ (2003) Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J Agric Food Chem* 51: 3866-2887
- Ruidavets J-B, Teissedre P-L, Ferrières J, Carrado S, Bougard G, Cabanis J-C (2000) Catechin in the Mediterranean diet: vegetable, fruit or wine? *Artherosclerosis* 153: 107-117
- Salunkhe DK, Chavan JK., Kadam SS. (1990) Plant phenolics: structure, classification, and biosynthesis. In: *Dietary Tannins: Consequences and Remedies*, Salunkhe D.K. ed., CRC Press Inc., 469-482
- Sanchez-Moreno C, Jimenez-Escrig A, Saura-Calixto F (2000) Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. *Nutrition Research* 20: 941-953
- Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J Nutr* 130: 2073S-2085S
- Schieber A, Keller P, Carle R (2001) Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 910: 265-273
- Schmidt RE, Thews G (Hrsg.) *Physiologie des Menschen*. 23. Auflage; Berlin; Springer – Verlag; 1987; S. 431
- Schuster B, Retey J (1995) The mechanism of action of phenylalanine ammonia-lyase: the role of prosthetic dehydroalanine. *Proc Natl Acad Sci* 92 (18): 8433-8437
- Seeram NP, Lee R, Heber D (2004) Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clinica Chimica Acta* 348: 63-68
- Setchell KDR, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE (2002) Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *J Am Clin Nutr* 76: 447-453
- Shahidi F, Wanasundara PK (1992) Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 32: 67-103
- Shahrzad S, Bitsch I (1998) Determination of gallic acid and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromat B Biomed Sci Appl* 705: 87-95
- Shimoi K, Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S, Suzuki M, Hara Y, Yamamoto H and Kinae N (1998) Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans. *FEBS Lett* 438: 220-224
- Shu XO, Jin F, Dai Q, Wen W, Potter JD, Kushi LH, Ruan Z, Gao YT, Zheng W (2001) Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 483-488
- Shui G, Loeng LP (2002) Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 977: 89-96
- Siess MH, Le Bon A, Suschetet M (1992) Dietary modification of drug-metabolizing enzyme activities: dose response effect of flavonoids. *J Toxicol Environ Health* 35: 141-152
- Simonetti P, Gardana C, Pietta P (2001) Caffeic acid as biomarker of red wine intake. *Methods Enzymol* 355: 122-130

- Sinha R, Block G, Taylor PR (1992) Determinants of plasma ascorbic acid in a healthy male population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1: 297-302
- Smith-Warner S, Spiegelman D, Yaun S-S, Adami HO, Beeson WL et al. (2001) Intake of Fruits and Vegetables and Risk of Breast Cancer. A Pooled Analysis of Cohort Studies. *JAMA* 285: 769-782
- Steinmetz KA, Potter JD (1991a) Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control* 2: 325-357
- Steinmetz KA, Potter JD (1991b) Vegetables, fruit, and cancer. II. Mechanisms. *Cancer Causes Control* 2: 427-442
- Souci, Fachmann, Kraut (1994) Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwerttabelle. 5. Auflage; Stuttgart; Medpharm Scientific Publishers. S. 685
- Spencer JPE, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srini SK, Rice-Evans C (1999) The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 458: 224-230
- Stähelin HB (1995) Ernährung und Krebsprävention. *Akt Ernähr-Med* 20: 260-263
- Stähelin HB, Gey KF, Eichholzer M, Ludin E, Bernasconi F, Thurneysen J, Brubacher G (1991) Plasma antioxidant vitamins and subsequent cancer mortality in the 12-year follow-up of the prospective Basel Study. *Am J Epidemiol* 133: 766-775
- Street DA, Comstock GW, Salkeld RM, Schup W, Klag MJ (1994) Serum antioxidants and myocardial infarction. Are low levels of carotenoids and alpha-tocopherol risk factors for myocardial infarction? *Circulation* 90: 1154-1161
- The Alpha-Tocopherol Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group (1994) The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *N Engl J Med* 330: 1029-1035
- Teuscher E (1997) Biogene Arzneimittel. Wiss. Verl. Ges. Stuttgart, 5. Auflage
- Treutter D (1988) Separation of naturally occurring mixtures of phenolic compounds from various Prunus tissues by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 436: 490-496
- Treutter, D (1995) Empfindlicher Nachweis von Catechinen und Proanthocyanidinen in Obst und Wein. In *Geschmacksstoffe in pflanzlichen Nahrungsmitteln*. Deutsche Gesellschaft für Qualitätsforschung 334-340.
- Tschiersch K und Hölzl J (1993) Resorption und Ausscheidung von Apigenin, Apigenin-7-glucosid und Herniarin nach peroraler Gabe eines Extraktes von *Marticairea recruta*. *Pharmazie* 48: 554
- Turnbull JJ, Nakajima J, Welford RW, Yamazaki M, Saito K, Schofield CJ (2004) Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate-dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis: anthocyanidin synthase, flavonol synthase, and flavone 3beta-hydroxylase. *J Biol Chem* 279 (2): 1206-1216
- Ueno I, Nakano N, Hirono I (1983) Metabolic fate of [14C] quercetin in the ACI rat. *Jpn J Exp Med* 53: 41-50
- US Department of Agriculture-Iowa State University Database, 2002; US Department of Agriculture, 2003; Agricultural Research Service, Beltsville Human Nutrition Research Center, Nutrient Data Laboratory (2003) USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>
- van Gils CH, Peeters PHM, Bueno-de-Mesquita HB (2005) Consumption of vegetables and fruits and risk of breast cancer. *JAMA* 293: 183-193

- Verkasalo PK, Appleby PN, Allen NE, Davey G, Adlerkreutz H, Key TJ (2001) Soya intake and plasma concentrations of daidzein and genistein: validity of dietary assessment among eighty British women (Oxford arm of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition). *Brit J Nutr* 86: 415-421
- Wang ZY, Hong JY, Huang MT, Reuhl KR, Conney AH, Yang CS (1992) Inhibition of N-nitrosodiethylamine- and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced tumorigenesis in A/J Mice by green tea and black tea. *Cancer Research* 52: 1943-1947
- Wang H, Cao G, Prior RL (1996) Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem* 44: 701-705
- Warden BA, Smith LS, Beecher GR, Balantine DA, Clevidence BA (2001) Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day. *J Nutr* 131: 1731-1737
- Wattenberg LW (1985) Chemoprevention of cancer. *Cancer Res* 45: 1-8
- Wattenberg LW, Coccia JB, Lam LKT (1980) Inhibitory effects of phenolic compounds on benzo(a)pyrene-induced neoplasia. *Cancer Res* 40: 2820-2823
- Wattenberg LW (1990) Inhibition of carcinogenesis by minor nutrient constituents of the diet. *Proc Nutr Soc* 49: 173-183
- Watzl B, Rechkemmer G (2001) Phenolsäuren. *Ernaehr-Umsch* 48: 413-416
- Wie Y, Zhao X, Kariya Y, Fukata H, Teshigawara K, Uchida A (1994) Induction of apoptosis by quercetin: involvement of heat shock protein. *Cancer Res* 54: 4952-4957
- Wiltout RH, Hornung RL (1988) Natural products as antitumor agents: direct versus indirect mechanisms of activity of flavonoids. *J Natl Cancer Inst* 80: 2385-2387
- Williamson G, Day AJ, Plumb GW, Couteau D (2000) Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem Soc Trans* 28(2): 16-22
- Winkler J, Stolzenberg H (1999) Social class index in the Federal Health Survey. *Gesundheitswesen*: 178-183
- Wiseman H, Casey K, Bowey EA, Rosanna D, Davies M, Rowland IR, Lloyd AS, Murray A, Thompson R, Clarke DB (2004) Influence of 10 wk of soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 80: 692-699
- Witte JS, Ursin G, Siemiatycki J, Thompson WD, Paganini-Hill A et al. (1997) Diet and Premenopausal bilateral Breast Cancer: A case-control Study. *Breast Cancer Res Treat* 42: 243-251
- Wittig J, Leipolz I, Graefe EU, Jaki B, Treutter D, Veit M (2002) Quantification of Procyanidins in Oral Herbal Medicinal Products Containing Extracts of *Crataegus* Species. *Drug Res* 52 (2): 89-96
- Wolffram S, Block M, Ader P (2002) Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *J Nutr* 132(4): 630-635.
- Wu AH, Ziegler RG, Horn-Ross PL, Nomura AMY, West DW, Kolonel LN, Rosenthal JF, Hoover RN, Pike MC (1996) Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 901-906
- Wu AH, Yu MC, Tseng CC, Hankin J, Pike MC (2003) Green Tea and Risk of Breast Cancer in Asian Americans. *Int J Cancer* 106: 574-579
- Yanardağ R, Bolkent S, Tabakoğlu-Oğuz A, Özsoy-Sacan Ö (2003) Effects of petroselinum crispum extract on pancreatic B cells and blood glucose of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull* 26 (8): 1206-1210

Yang B, Arai K, Kusu F (2000) Determination of Catechins in Human Urine Subsequent to Tea Ingestion by High-performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Anal Biochem* 283: 77-82

Yang B, Kotani A, Arai K, Kusu F (2001) Estimation of the Antioxidant Activities of Flavonoids from Their Oxidation Potentials. *Anal Sci* 17: 599-604

Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL (2001) Inhibition of Carcinogenesis by Dietary Polyphenolic Compounds. *Annu Rev Nutr* 21: 381-406

Yochum L, Kushi LW, Meyer K, Folsom AR (1999) Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 149: 943-949

Yuan JM, Wang QS, Ross RK, Henderson BE, Yu MC (1995) Diet and breast cancer in Shanghai and Tianjin, China. *Br J Cancer* 71: 1353-1358

Zhang S, Yang X, Morris ME (2004) Combined Effects of Multiple Flavonoids on Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)-Mediated Transport. *Pharmaceutical Research* 21(7): 1263-1273

Zheng W, Doyle TJ, Kushi LH, Sellers TA, Hong CP, Folsom AR (1996) Tea consumption and cancer incidence in a prospective Cohort Study of postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 144 (2): 175-182

Zheng W, Dai Q, Custer LJ, Shu XO, Wen WQ, Jin F, Franke AA (1999) Urinary excretion of isoflavonoids and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8: 35-40

Zubig L, Meydani M (2003) Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *Am J Clin Nutr* 77: 1459-1465

SUMMARY OF DATA FOR CHEMICAL SELECTION (Apigenin – 520-36-5). Prepared for NCI by Technical Resources International, Inc. under contract no. N02-CB-50511 (5/00) & N02-CB-07007 (11/00)

Anhang

Tab. A1: Nährstoffzusammensetzung der Formularnahrung (Fresubin®-original)

Nährstoff	Gehalt pro100 ml	Nährstoff	Gehalt pro100 ml
Eiweiß	3,8 g	Vitamin A	0,12 mg
Kohlenhydrate	13,8 g	β- Carotin	0,3 mg
Fett	3,4 g	Vitamin D	2,0 µg
Wasser	84 ml	Vitamin E	3 mg
Natrium	75 mg	Vitamin K	16,7 µg
Kalium	125 mg	Vitamin B ₁	0,23 mg
Chlorid	85 mg	Vitamin B ₂	0,32 mg
Calcium	60 mg	Nicotinsäureamid	3 mg
Magnesium	20 mg	Vitamin B ₆	0,33 mg
Phosphor	47 mg	Vitamin B ₁₂	0,6 µg
Eisen	2 mg	Pantothensäure	1,2 mg
Zink	1,5 mg	Biotin	7,5 µg
Kupfer	0,3 mg	Folsäure	50 µg
Mangan	0,4 mg	Vitamin C	15 mg
Iodid	30 µg	Cholin	20 mg
Molybdän	15 µg		
Chrom	10 µg		
Fluorid	0,2 µg		
Selen	10 µg		

Quelle: Gebrauchsinformationen Fresenius Kabi

Tab. A2: Stabilität der untersuchten Polyphenole (angegeben in %) in einer wässrig-methanolischen Standardlösung, stabilisiert mit 0,1M Ascorbinsäure bei Raumtemperatur, nach 6, 12, 18 und 24 Stunden (Gehalte bezogen auf die Anfangskonzentration)

Polyphenole	Gehalte (in %) der Polyphenole nach 6, 12, 18 und 24 h			
	6 h	12 h	18 h	24 h
Gallocatechin	97,6	93,4	90,7	90,2
Protocatechusäure	95,5	94,6	94,0	93,8
Epigallocatechin	94,6	90,0	93,4	93,1
Catechin	93,9	92,2	91,0	90,8
Gentisinsäure	97,0	96,6	95,7	95,9
Epigallocatechingallat	95,2	93,5	92,4	89,5
Kaffeesäure	98,9	97,8	96,9	96,4
Vanillinsäure	96,2	95,4	95,1	94,9
Epicatechin	98,0	98,3	97,7	96,5
Syringasäure	98,0	98,3	97,5	96,0
p-Cumarsäure	99,1	97,6	97,2	95,8
Ferulasäure	97,2	95,0	94,8	93,3
Salicylsäure	95,6	91,6	89,4	87,1
Ellagsäure	94,1	89,5	89,3	88,6
Fisetin	97,4	89,4	86,3	86,0
Daidzein	98,8	94,1	93,6	89,8
Quercetin	91,3	89,4	89,4	87,4
Naringenin	96,8	94,5	92,5	90,2
Luteolin	97,9	93,8	88,9	86,8
Genistein	94,7	94,0	92,5	90,9
Hesperetin	97,4	95,5	93,3	91,1
Kämpferol	96,6	96,4	96,8	95,6
Apigenin	96,8	94,5	91,4	90,4
Isorhamnetin	96,2	86,7	92,6	94,6

Tab. A6: Apigeninkonzentration in den Erythrozyten [nmol/l] der Versuchspersonen (n= 8 mit n_{Frauen} = 5, n_{Männer} = 3) zu verschiedenen Zeitpunkten [h] nach der Bolusgabe von Petersilie

Zeitpunkt [h]	Person							
	5	6	7	8	9	10	11	12
0	10,14	9,39	7,67	2,55	0,00	0,00	0,00	0,00
4	6,79	7,35	6,17	0,00	0,00	0,00	5,60	0,00
6	4,96	9,80	5,12	3,12	0,00	0,00	8,91	0,00
7	10,94	4,24	9,84	0,00	0,00	0,00	4,07	0,00
8	7,24	4,06	8,72	0,00	0,00	0,00	3,02	0,00
9	12,00	4,07	8,98	0,00	4,79	0,00	3,09	3,26
10	8,70	4,50	3,87	0,00	0,00	2,99	4,20	0,00
11	10,94	4,10	3,57	0,00	0,00	3,10	0,00	0,00
24	7,08	6,16	0,00	0,00	0,00	3,23	0,00	0,00

Tab. A7: Apigeninkonzentration in den Erythrozyten aller männlichen Probanden (n = 3) nach Verzehr einer Petersilienmahlzeit unter Angabe von Mittelwert, Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), Median, Min. und Max

Zeitpunkt [h]	Mittelwert	SD	SEM	Median	Min	Max
	[nmol/l]					
0	0,85	1,47	n.d.	0,85	n.d.	2,55
4	1,87	3,24	n.d.	1,87	n.d.	5,60
6	4,01	4,52	3,12	2,61	n.d.	8,91
7	1,36	2,35	n.d.	1,36	n.d.	4,07
8	1,01	1,74	n.d.	1,01	n.d.	3,02
9	2,11	1,83	3,09	1,06	n.d.	3,26
10	1,40	2,43	n.d.	1,40	n.d.	4,20
11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tab. A8: Apigeninkonzentration in den Erythrozyten aller weiblichen Probanden (n = 5) nach Verzehr einer Petersilienmahlzeit unter Angabe von Mittelwert, Standardabweichung (SD), Standardfehler des Mittelwerts (SEM), Median, Min und Max

Zeitpunkt [h]	Mean	SD	SEM	Median	Min	Max
	[nmol/l]					
0	5,44	5,05	7,67	2,26	n.d.	10,14
4	4,06	3,73	6,17	1,67	n.d.	7,35
6	3,98	4,12	4,96	1,84	n.d.	9,80
7	5,01	5,23	4,24	2,34	n.d.	10,94
8	4,00	4,02	4,06	1,80	n.d.	8,72
9	5,97	4,64	4,79	2,07	n.d.	12,00
10	4,01	3,14	3,87	1,40	n.d.	8,70
11	4,34	4,02	3,57	1,80	n.d.	10,94
24	3,29	3,33	3,23	1,49	n.d.	7,08

Tab A9: Vergleich der Erythrozytenkonzentration [nmol/l] von Sportlern ($n_{\text{Sportler}} = 5$) und Nichtsportlern ($n_{\text{Nichtsportler}} = 3$) mit dem Student t- Test zu verschiedenen Zeitpunkten [h] nach der Bolusgabe von Petersilie

	Blutabnahmezeitpunkt [Erythrozyten nmol/l]								
	0	4	6	7	8	9	10	11	24
Sportler									
Mittelwert	1,53	2,35	2,80	2,78	2,35	4,02	2,21	1,33	0,65
SD	3,43	3,23	4,07	4,32	3,79	3,27	2,07	1,83	1,44
SEM	1,53	1,44	1,82	1,93	1,70	1,46	0,92	0,82	0,65
Nicht-Sportler									
Mittelwert	7,36	4,71	5,96	5,06	3,77	5,36	4,40	5,01	4,41
SD	4,18	4,09	3,45	5,52	3,63	6,10	4,35	5,53	3,85
SEM	2,42	2,36	1,99	3,18	2,10	3,52	2,51	3,19	2,22
t - Test	0,07	0,40	0,31	0,54	0,62	0,69	0,36	0,20	0,09

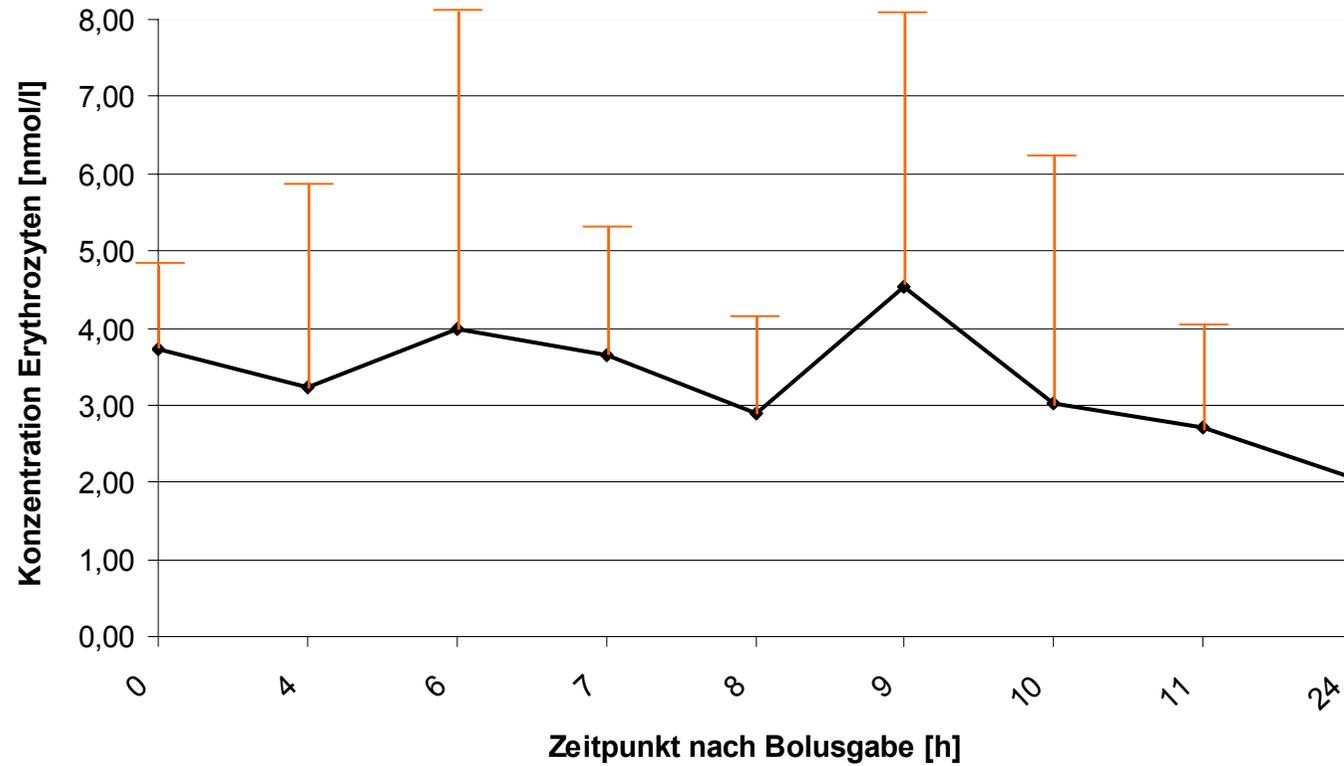


Abb. A1: Darstellung der Mittelwerte der Apigeninkonzentration in den Erythrozyten mit Standardfehler SEM (orange) zu jedem Zeitpunkt nach Verzehr der Testmahlzeit [h]

Peakfläche
[AU*min]

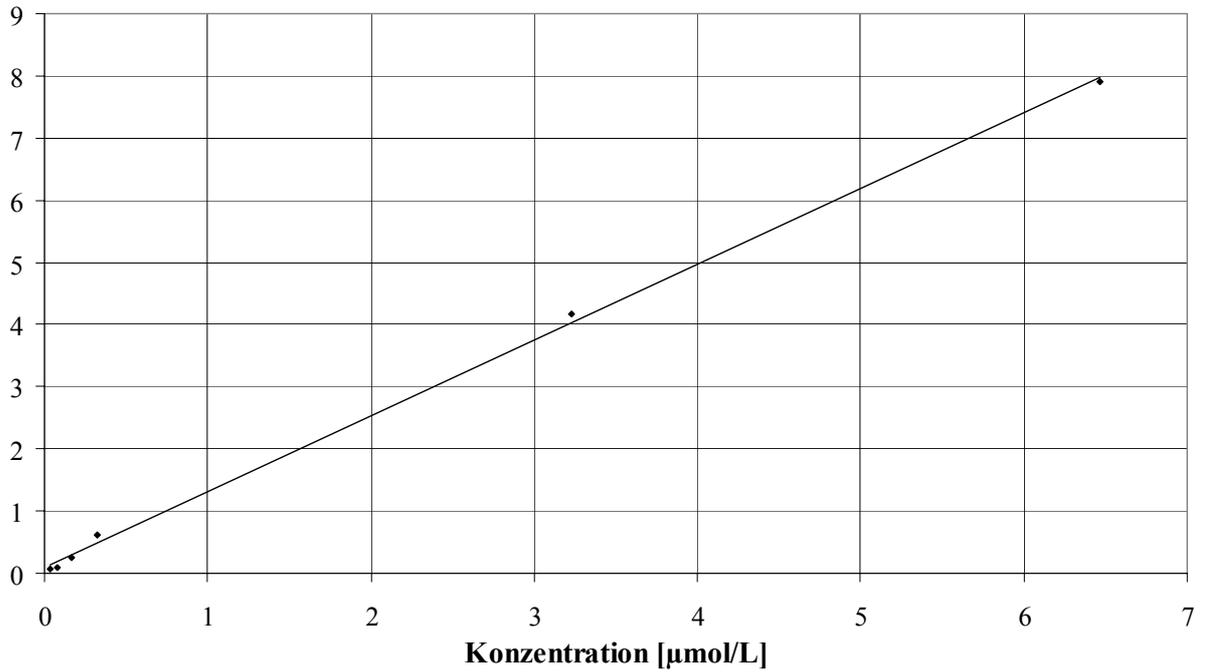


Abb. A2: Kalibrationskurve zur Untersuchung des linearen Bereiches für die chromatographische Bestimmung von Polyphenolen am Beispiel von Fisetin (ISTD)

Lebenslauf

Name Adrian-Marvin Bolarinwa
Geburtsdatum 11. 06. 1975
Geburtsort München
Familienstand ledig
Staatsangehörigkeit deutsch

Schulausbildung

1982 – 1985 Grundschule Hebertshausen
1985 – 1986 Hauptschule Hebertshausen
1986 – 1995 Luisengymnasium München

Studium

1996 – 1997 Studium der Lebensmittelchemie an der LMU München
1997 – 2001 Studium der Lebensmittelchemie an der TU München

Promotion

2002 – 2006 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Hochschuldozentur für Humanernährung und Krebsprävention der TUM-Weihenstephan