

Aus dem Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

---

**Einfluss einer Ballaststoff-Zulage  
(Citrus- bzw. Weizenfaser) auf die Bioverfügbarkeit von  
Quercetin beim wachsenden Schwein**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**M.Sc. Birga Müller-Siegwardt**

aus Kiel

Kiel 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen  
Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Dekan: Prof. Dr. Latacz-Lohmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfram

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wisker

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Februar 2009

Die Dissertation wurde mit dankenswerter Unterstützung des Bundesministeriums  
für Bildung und Forschung angefertigt.

*für Harald und meinen Vater*

**PER ASPERA AD ASTRA**

# I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
2. Literaturübersicht .....	3
2.1    Einordnung, Struktur und Biosynthese von Flavonoiden .....	3
2.2    Vorkommen und Aufnahme von Flavonoiden mit der Nahrung .....	6
2.3    Biologische Effekte von Flavonoiden im menschlichen bzw. tierischem Organismus.....	8
2.3.1    Flavonoide als Antioxidantien .....	9
2.3.2    Einfluss auf Enzyme, Signaltransduktion und Genexpression.....	13
2.4    Bioverfügbarkeit von Quercetin und Rutin .....	15
2.4.1    Intestinale Absorptionsmechanismen.....	16
2.4.2    Metabolisierung und Ausscheidung .....	20
2.4.3    Plasmatransport und Gewebeverteilung.....	23
2.5    Ballaststoffe und Rohfaser .....	26
2.5.1    Definition und Klassifikation von Ballaststoffen und Rohfaser .....	26
2.5.1.1    Nicht-Stärke Polysaccharide (NSP) .....	27
2.5.2    Physikalisch-chemische Eigenschaften der Ballaststoffe .....	29
2.5.2.1    Wasserbindungskapazität .....	29
2.5.2.2    Adsorptionseigenschaften .....	29
2.5.2.3    Fermentierbarkeit .....	30
2.5.3    Wirkungen von Ballaststoffen im GIT von Monogastriden.....	30
2.5.3.1    Magen-Darm-Motilität und Transitzeit.....	31
2.5.3.1.1    Magenentleerung.....	31
2.5.3.1.2    Einfluss auf die Transitzeit der Digesta durch den Dünn- und Dickdarm.....	32
2.5.4    Intestinale Mikroflora.....	34
2.5.4.1    Beeinflussung der mikrobiellen Dichte und -Zusammensetzung durch die Aufnahme von Ballaststoffen beim Schwein.....	35

3. Material und Methoden .....	37
3.1 Bioverfügbarkeitsstudien am Schwein.....	37
3.1.1 Versuchstiere und Fütterung .....	37
3.1.2 Versuchsdurchführung .....	39
3.1.3 Analytik.....	40
3.1.3.1 Futtermittelanalysen .....	40
3.1.3.2 Probenaufarbeitung .....	41
3.1.3.3 HPLC-Methode .....	41
3.1.3.4 Kalibrierung, Nachweisgrenze und Wiederfindung.....	42
3.1.4 Pharmakokinetische Parameter .....	46
3.1.4.1 Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) .....	46
3.1.4.2 Relative Bioverfügbarkeit .....	46
3.2 <i>In vitro</i> -Fermentationsstudien mit Schweinefaeces als Inokulum .....	47
3.2.1 Versuchstiere und Diäten .....	47
3.2.2 Simulierte Magen-Dünndarm-Verdauung.....	47
3.2.3 Inokulum .....	49
3.2.4 <i>In vitro</i> -Fermentation .....	50
3.3 Statistik.....	52
3.3.1 <i>In vivo</i> -Bioverfügbarkeitsstudien am Schwein .....	52
3.3.2 <i>In vitro</i> -Fermentationsstudien mit Schweinefaeces als Inokulum ....	53
4. Ergebnisse .....	54
4.1 Bioverfügbarkeitsstudien .....	54
4.2 <i>In vitro</i> -Fermentationsstudien .....	63
5. Diskussion .....	65
6. Zusammenfassung.....	77
7. Summary .....	79
8. Literaturverzeichnis.....	80

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundstruktur von Flavonoiden.....	3
Abbildung 2: Struktur der Unterklassen von Flavonoiden .....	4
Abbildung 3: Hydroxylierungs-, Methylierungs- und Glykosylierungsmuster verschiedener Flavonole .....	5
Abbildung 4: Postulierte Absorptions- und Metabolisierungsprozesse von Quercetin-Glukosiden im Dünndarm.....	20
Abbildung 5: Fraktionen und Komponenten der Ballaststoffe .....	27
Abbildung 6: Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin.....	44
Abbildung 7: Chromatogram eines Standards und einer Plasmaprobe vom Schwein aus der SMF-Gruppe 150 min nach Verabreichung von 165,4 µmol Quercetin /kg KGW als Aglykon.....	45
Abbildung 8: Gesamtflavonolkonzentrations-Zeit-Kurven nach oraler Gabe einer äquivalenten Dosis von 165,4 µmol Quercetin /kg KGW nach Aglykon- bzw. Rutin-Applikation. ....	56
Abbildung 9: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Quercetin und Quercetinmetaboliten nach oraler Gabe von 165,4 µmol Quercetin/kg KGW als Aglykon zur SMF-, CF- und WF-Ration..	59
Abbildung 10: Kummulative Gasbildung bei der <i>in vitro</i> -Fermentation der enzymatisch vorbehandelten Versuchsrationen.....	64

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vorkommen von Flavonoiden in pflanzlichen Nahrungsmitteln.....	7
Tabelle 2: mögliche Effekte verschiedener Ballaststoffquellen auf den GIT .....	33
Tabelle 3: Chemische Zusammensetzung der Versuchsdiäten .....	38
Tabelle 4: Chemische Zusammensetzung der eingesetzten Citrus- bzw. Weizenfaser .....	38
Tabelle 5: Fasergehalte der vorverdauten Rationen.....	48
Tabelle 6: Zusammensetzung des Inkubationsmediums (IM) .....	50
Tabelle 7: Vergleich der pharmakokinetischen Parameter der Gesamtflavonolkonzentration (Quercetin + Isorhamnetin + Tamarixetin) nach einer einmaligen Gabe von 165,4 µmol Quercetin/kg KGW als Aglykon (QA) oder Rutin (R). .....	57
Tabelle 8: Vergleich der pharmakokinetischen Parameter von Quercetin (Q), Isorhamnetin (I) und Tamamrixetin (T) nach einer einmaligen Gabe von 165,4 µmol Quercetin/kg KGW als Aglykon zu den jeweiligen Testmahlzeiten. ....	60
Tabelle 9: Vergleich der pharmakokinetischen Parameter von Quercetin (Q), Isorhamnetin (I) und Tamarixetin (T) nach einer einmaligen Gabe von 165,4 µmol Quercetin /kg KGW aus Rutin zu den jeweiligen Testmahlzeiten. ....	61
Tabelle 10: Ergebnisse der <i>in vitro</i> -Fermentationsversuche nach Inkubation der vorverdauten Rationen mit Schweinefaeces als Inokulum .....	63

## IV. Abkürzungsverzeichnis

ADF	Acid Detergent Fiber
ADL	Acid Detergent Lignin
AEC	Adenylate Energy Charge
AOAC	Association of Analytical Communities
AP-1	Aktivator-Protein-1
AUC	Area under the curve
CF	Citrusfaser
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CYP	Cytochrom P <sub>450</sub>
DE	Deutsches Edelschwein
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DL	Deutsche Landrasse
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EC	Enzyme Commission Number
g	Gravidationsbeschleunigung
GIT	Gastrointestinaltrakt
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSF	Hitze-Schock-Faktoren
I	Isorhamnetin
I.E.	Internationale Einheiten
IM	Inkubationsmedium
JNK	c-Jun-N-terminalen-Kinasen
KBE	Koloniebildende Einheiten
KGW	Körpergewicht
LDL	Low Density Lipoprotein
LPH	Laktase-Phloridzin-Hydrolase
MAP	mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MRPs	Multidrug-Resistent-Associated-Proteins
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NDF	Neutral Detergent Fiber
NF-κB	Nuklear-Transkriptions-Faktor-Kappa B
NSP	Nicht-Stärke-Polysaccharide
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat

Q	Quercetin
Q3G	Quercetin-3-O- $\beta$ -D-Glucuronid
R	Rhamnetin
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
SGLT1	Sodium depend glucose transporter 1
SMF	Schweinemastfutter
SULT	Phenol-Sulfotransferase
TM	Trockenmasse
T	Tamarixetin
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
UGT	UDP-Glukuronoyltransferase
UV	Ultraviolettstrahlung
VDLUFA	Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
WF	Weizenfaser
XF	Rohfaser

# 1. Einleitung

Hinsichtlich des steigenden Gesundheitsbewusstseins und einer zunehmenden Nachfrage der Verbraucher nach sogenannten „Functional Foods“ und den damit verbundenen positiven Marktentwicklungen ist die Lebensmittelindustrie bestrebt, die Entwicklung weiterer funktioneller Produkte voranzutreiben. „Functional Foods“ beinhalten funktionelle „Wirkstoffe“, wie z. B. sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe und Ballaststoffe, welchen gesundheitsfördernde Effekte zugeschrieben werden.

Quercetin gehört zu den Flavonoiden und wird als sekundärer Pflanzeninhaltsstoff höherer Pflanzen von Mensch und Tier mit der Nahrung aufgenommen. Den zu den polyphenolischen Verbindungen gehörenden Flavonoiden werden zahlreiche biologische Effekte zugesprochen. Insbesondere das antioxidative Potential, die Interaktionen mit einer Vielzahl von Enzymsystemen und die Beeinflussung von Signaltransduktionskaskaden und Genexpressionen wirken protektiv auf chronische Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs und Arthritis, aber auch auf neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson. Voraussetzung für die postulierten Wirkungen *in vivo* ist eine ausreichend hohe systemische Verfügbarkeit der Flavonoide. Vorhergehende Untersuchungen zeigten, dass die Nahrungs- bzw. Futtermittelzusammensetzung einen Einfluss auf die orale Bioverfügbarkeit des Quercetins ausübt.

Ballaststoffe wirken präventiv auf ernährungsbedingte Krankheiten wie Diabetes mellitus, Adipositas, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Obstipationen, Divertikulose bzw. Divertikulitis und Kolonkarzinome und sind aufgrund dieser Vielzahl an gesundheitsfördernden Effekten ebenfalls Bestandteile von „Functional Foods“.

Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, am Modelltier Schwein zu prüfen, ob der Zusatz von löslichen und unlöslichen Ballaststoff-Komponenten, der sich an einer täglichen Ballaststoffaufnahme in der Humanernährung orientierte, zu einem kommerziellen Schweinemastfutter, die orale Bioverfügbarkeit von Quercetin aus

unterschiedlichen Quercetinquellen (Aglykon, Rutin) über Modulationen der Magen-Darm-Motilität und/oder der gastrointestinalen Mikroflora beeinflusst.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Einordnung, Struktur und Biosynthese von Flavonoiden

Flavonoide gehören zu den mehr als 8000 polyphenolischen Verbindungen, welche als sekundäre Inhaltsstoffe im Pflanzenreich gebildet und über Früchte, Gemüse und Getränke aufgenommen werden (*Urquiaga & Leighton 2000*). Sie stellen die größte Gruppe der Polyphenole dar (*Harborne & Williams 2000*) und besitzen eine Drei-Ring-Grundstruktur (Abb.1), welche aus zwei Benzolringen (A und B) bestehen, die über drei C-Atome miteinander verbunden sind. Diese bilden mit Sauerstoff den heterozyklischen C-Ring und komplettieren so das C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (Diphenylpropan) -Flavon-Skelett.

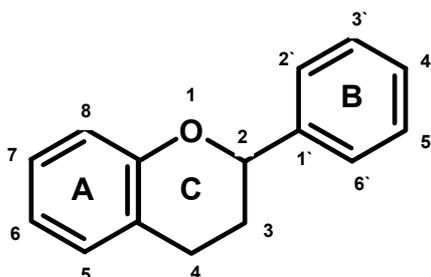
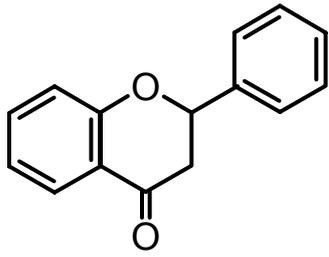
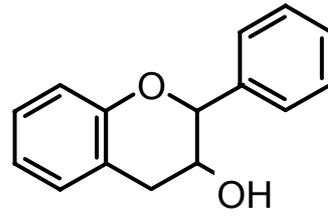


Abb. 1: Grundstruktur von Flavonoiden (modifiziert nach *Beecher 2003*)

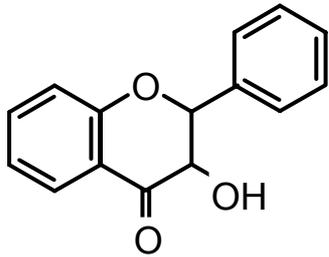
Je nach Sättigungs- und Oxidationsgrad des C-Rings können Flavonoide in die Unterklassen Flavanone, Flavanole, Flavanonole, Flavone, Flavonole, Anthocyanidine und Isoflavone eingeordnet werden (Abb.2). Wie in der Abbildung 3 am Beispiel der Flavonole dargestellt, sind innerhalb der Unterklassen weitere Differenzierungen aufgrund von Hydroxylierung, Glykosylierung und Methylierung am Ringsystem möglich (*Robards et al. 1999*).



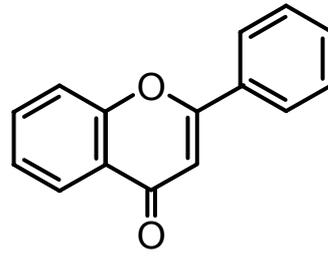
Flavanone



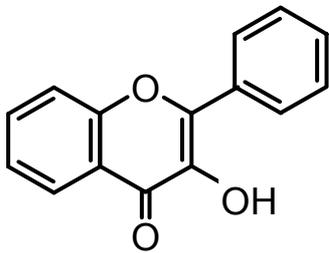
Flavanole



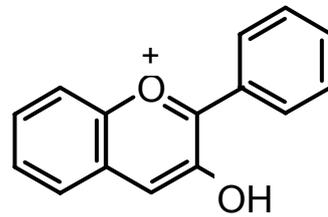
Flavanonole



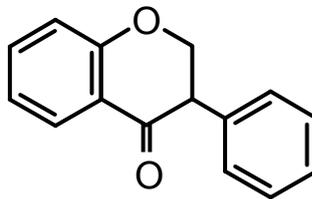
Flavone



Flavonole

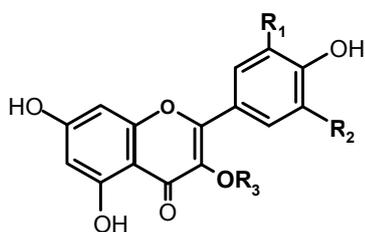


Anthocyanidine



Isoflavone

Abb. 2: Struktur der Unterklassen von Flavonoiden



Flavonole	R1	R2	R3
Quercetin	OH	H	H
Kaempferol	H	H	H
Isorhamnetin	OCH <sub>3</sub>	H	H
Myricetin	OH	OH	H
Isoquercitrin	OH	H	Glucose
Spiraeosid	OH	Glucose	H
Rutin	OH	H	Rutinose

Abb. 3: Hydroxylierungs-, Methylierungs- und Glykosylierungsmuster verschiedener Flavonole

Zu den häufigsten Vertretern der Flavonole, welche sich durch eine Doppelbindung zwischen C-Atom 2 und 3 sowie eine 4-Oxo-Gruppe und einer Hydroxylgruppe an Position C-3 auszeichnen, zählen Quercetin, Kaempferol, Myricetin und Isorhamnetin. Flavonoide kommen in Pflanzen überwiegend als Glykoside mit D-Glukose, D-Galaktose, L-Rhamnose, D-Xylose, L-Arabinose oder auch mit Disacchariden wie Rutinose vor, die überwiegend  $\beta$ -glykosidisch an das Flavonoid-Aglykon gebunden sind. Die Bindung des Zuckerrestes erfolgt bevorzugt an der C- 3-Position (*Herrmann* 1988, 1990, *Williams & Harborne* 1994). Die Glykosylierung erhöht u. a. die Löslichkeit der Flavonoide im wässrigen Milieu und reduziert die Reaktivität gegenüber freien Radikalen (*Urquiaga & Leighton* 2000).

## 2.2 Vorkommen und Aufnahme von Flavonoiden mit der Nahrung

Flavonoide kommen praktisch in allen höheren Pflanzen vor und werden deshalb kontinuierlich in geringen Mengen mit der Nahrung z. B. über Früchte, Gemüse, Getreide, Nüsse, Gewürze, Tee und Wein aufgenommen (*Hertog & Katan 1998, Verhoeyen et al. 2002*). In vielen Nahrungspflanzen sind Flavonole die quantitativ bedeutendste Gruppe der Flavonoide, wobei Quercetinglykoside wiederum die Hauptfraktion bilden (*Herrmann 1976, 1988, 1991*). Mehr als 179 verschiedene Quercetinglykoside sind in der Literatur beschrieben worden (*Williams & Harborne 1986*). Hohe Flavonoidgehalte (>30 mg/kg Frischsubstanz) lassen sich z. B. in Zwiebeln, Grünkohl, Brokkoli, grünen Bohnen, Sellerie, Erdbeeren, Äpfel und Aprikosen nachweisen. Zwiebeln haben mit 280 bis 490 mg/kg Frischesubstanz den höchsten Quercetingehalt (*Hertog et al. 1992a, Crozier et al. 1997, Hollman & Arts 2000*). Doldengewächse, wie z. B. Sellerie und Pastinaken beinhalten überwiegend das Flavon Luteolin und seine glykosidischen Formen (*Herrmann 1976, 1988, 1991*). Die meisten Blüten verdanken ihre Färbung den Anthocyanidinen, die man ebenfalls überwiegend in glykosidischer Form (Anthocyanine) in Beerenobst wie Holunder, Schwarze Johannesbeere, Blau- und Brombeeren vorfindet (*Mazza & Miniati 1993, Herrmann 1995, Eder 1996*). Zitrusfrüchte weisen überwiegend Flavanone auf, Isoflavone findet man in Leguminosen wie Sojabohnen und Flavonole in Tee, Wein und Obst (*Bravo 1998*). Flavanonole sind nur in geringen Mengen in Pflanzen enthalten (*Rasmussen & Miller Breinholt 2003*). Eine kleine Übersicht über die in pflanzlichen Nahrungsmitteln vorkommenden Flavonoide enthält Tabelle 1.

Tab.1: Vorkommen von Flavonoiden in pflanzlichen Nahrungsmitteln

<b>Flavonoidklasse</b>	<b>Hauptflavonoid (Aglyka)</b>	<b>Vorkommen in Nahrungsmitteln</b>
Flavonole	Quercetin, Kaempferol, Myricetin	Zwiebeln, Brokkoli, Äpfel, Tee
Flavone	Apigenin, Luteolin	Petersilie, Thymian, Sellerie
Flavanone	Naringenin, Hesperedin	Citrusfrüchte
Flavanole	Epicatechin, Gallocatechin Epigallocatechingallat	grüner Tee, Äpfel, Kakao
Anthocyanidine	Cyanidin	Kirschen, Trauben
Isoflavone	Genistein, Daidzein	Sojabohnen, Leguminosen

Da Flavonoide die Pflanze u. a. vor UV-B Bestrahlung schützen (*Li et al. 1993*), treten die höchsten Konzentrationen in der Blattepidermis sowie in Blüten und Früchten auf (*Herrmann 1990, Shirley 1996*). Eine gesteigerte UV-B Bestrahlung induziert bei Pflanzen die Synthese von Flavonoiden (*Shirley 1996, Treutter 2005*). Der Flavonoidgehalt in pflanzlichen Nahrungsmitteln ist nicht konstant, sondern wird u. a. durch genetische, saisonale und klimatische Faktoren sowie durch den Reifegrad zum Erntezeitpunkt und die Lagerung beeinflusst. Des Weiteren kommt es bei der Verarbeitung, wie z. B. Konservierung, Kochen und Braten zu Verlusten (*Hertog et al. 1992a, Patil et al. 1995, Price et al. 1997, Aherne & O'Brien 2002*). Nicht nur aufgrund dieser Fakten ist eine Bestimmung der täglichen Aufnahme von Flavonoiden über die pflanzlichen Nahrungsmittel schwierig. Da international unterschiedliche Präferenzen und Verzehrsgewohnheiten in den Bevölkerungen existieren und teilweise nur geringe Kenntnisse über die Flavonoidgehalte in einigen Lebensmitteln bestehen, lässt sich eine allgemein gültige Aussage über die Flavonoidaufnahme nicht treffen

(Aherne & O'Brien 2002, Rasmussen & Miller Breiholt 2003). Hollman & Katan (1999) schätzten die tägliche Flavonoidaufnahme beim Menschen auf ein paar hundert Milligramm. Untersuchungen in verschiedenen Ländern ergaben wesentlich geringere tägliche Flavonoidaufnahmen, die im Bereich von 20 mg (Vereinigten Staaten, Dänemark, Finnland) bis über 70 mg (Holland) lagen (Beecher 2003). Hertog *et al.* (1993) untersuchten die Verzehrsgewohnheiten der niederländischen Bevölkerung und ermittelten in den relevanten Lebensmitteln die vorherrschenden Flavonol- (Quercetin, Kaempferol, Myricetin) und Flavonkonzentrationen (Luteolin, Apigenin). Letztere Studie zeigte, dass die täglichen Flavonol- und Flavonoidaufnahmen hier bei durchschnittlich 23 mg lagen, wobei Quercetin mit 16 mg das dominierende Flavonol ausmachte. Hauptquellen der Flavonoide waren Schwarztee mit 48 %, Zwiebeln und Äpfel mit 29 % bzw. 7 %. Die Untersuchung von Linseisen *et al.* (1997) ermittelte eine tägliche Flavonoid-Aufnahme von ca. 54 mg bei der bayerischen Bevölkerung. Die Flavonoidmenge lag bei ca. 12 mg, von denen ebenfalls Quercetin mit 10,3 mg den Hauptteil ausmachte.

### 2.3 Biologische Effekte von Flavonoiden im menschlichen bzw. tierischem Organismus

Ergebnisse, die vornehmlich aus *in vitro*, *ex vivo* und Tierstudien stammen, weisen auf eine Vielzahl gesundheitsfördernder Effekte von Flavonoiden hin. Dazu zählen u. a. antiinflammatorische, antiallergische, antimikrobielle, antivirale, antithrombotische und antimutagene bzw. antikarzinogene Wirkungen (Kandaswami & Middleton 1994). Eine herausragende Rolle spielt dabei das antioxidative Potential von Flavonoiden, das im Zusammenhang mit Herz-Kreislaufkrankungen, Krebs und Arthritis, aber auch mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson diskutiert wird (Diplock *et al.* 1998, Behl & Moosmann 2002).

### 2.3.1 Flavonoide als Antioxidantien

Auch unter physiologischen Bedingungen werden im Stoffwechsel aerob lebender Organismen reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) kontinuierlich gebildet und erfüllen u. a. bei der Bekämpfung von Infektionen, bei der Regulation des Zellwachstums und bei Signaltransduktionen wichtige Aufgaben (*de Groot 1994, Halliwell 1997*). Exogene Faktoren wie z. B. Nikotinkonsum, UV-Strahlung und Luftverunreinigungen führen zu einer verstärkten Bildung von ROS, die aufgrund ihres hohen Reaktionsvermögens u. a. zu Schädigungen von Lipiden, Proteinen und DNA führen können. Zum Schutz verfügt der Organismus über enzymatische und nichtenzymatische Abwehrmechanismen. Superoxiddismutasen, Katalasen und Glutathionperoxidasen sind u. a. Bestandteil des enzymatischen Schutzsystems. Bei den nichtenzymatischen Antioxidantien kann einerseits zwischen hydrophilen und lipophilen, andererseits zwischen endogenen und exogenen Substanzen unterschieden werden. So zählen Ascorbin- und Harnsäure zu den hydrophilen Antioxidantien, während z. B. Ubiquinon, Carotinoide, Flavonoide und Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherole) zu den lipophilen Antioxidantien gezählt werden. Glutathion und Harnsäure sind endogene Antioxidantien, während Ascorbinsäure (z. B. beim Menschen), Carotinoide, Tocopherole und Flavonoide über die Nahrung aufgenommen werden (*Kandaswami & Middleton 1994*). Bei einem Ungleichgewicht zwischen Bildung und Abbau von ROS zugunsten der Bildung entsteht „Oxidativer Stress“. Oxidativer Stress schädigt u. a. durch Oxidation ungesättigter Fettsäuren Zellmembranen, was zu Dysfunktionen und Zelllysis führen kann. Des Weiteren beeinflussen ROS sowohl Strukturproteine als auch Enzyme in ihren Funktionen und schädigen das Erbgut (*Sies 1986, Halliwell & Gutteridge 1999*). Oxidativer Stress kann dadurch begünstigend auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Krebs, Diabetes mellitus, Osteoporose und Arthritis wirken und wird auch mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson in Verbindung gebracht (*Sies 1993, Behl & Moosmann 2002, Scalbert et al. 2005*). An dieser Stelle muss allerdings klar zum Ausdruck gebracht werden, dass das hohe

antioxidative Potential von Flavonoiden überwiegend unter extremen und unphysiologischen *in vitro*-Bedingungen nachgewiesen wurde. Phenolische Hydroxylgruppen der Flavonoide können als Elektronendonatoren radikalische ROS „abfangen“. Des Weiteren führt eine Doppelbindung des C-Ringes bei den Flavonen und Flavonolen zusätzlich zu einer Elektronen-Delokalisierung (Youdim *et al.* 2002). Sowohl die Anzahl als auch die Positionen der Hydroxylgruppen der Flavonoide sind für das antioxidative Potential von Bedeutung. Die höchste antioxidative Kapazität weisen Flavonoide mit vier bis sechs Hydroxylgruppen auf, wobei die Anordnung in der 3` und 4`-Position des B-Ringes und eine Hydroxylgruppe am C-3 des C-Ringes häufig mit einer starken Fähigkeit zum Abfangen von Superoxid-, Peroxyl-, Alkoxy- und Hydroxylradikale verbunden ist. Flavonoide mit Hydroxyl- bzw. Methoxylgruppen an den Positionen 3, 5 und 7 der Ringe A und C weisen eine geringere antioxidative Aktivität auf. Glykosilierungen in Position 3 (z. B. Rutin) führen zu einer deutlichen Minderung der Fähigkeit, freie Radikale abzufangen (Rice-Evans *et al.* 1995, Pietta 2000). Flavonoide sind nicht nur in der Lage, direkt als Radikalfänger zu fungieren, sondern besitzen auch die Fähigkeit, Übergangsmetalle wie Kupfer und Eisen zu chelatieren und somit indirekt antioxidativ zu wirken (Thompsen & Williams 1976, Kühnau 1976). Aufgrund ihres amphiphilen Charakters sind Flavonoide in der Lage, sowohl in wässrigen als auch in lipophilen Kompartimenten zu wirken. So konnten *in vitro*-Studien zeigen, dass Flavonoide, insbesondere die Flavonole, Flavanole und Isoflavane, die Oxidation von Low-Density-Lipoproteinen (LDL) hemmen. Oxidierte LDL spielen die Schlüsselrolle in der Pathogenese arteriosklerotischer Veränderungen. Die Oxidation der LDL erfolgt nicht nur durch den Einfluss freier Radikale, sondern ebenfalls durch zelluläre Dioxygenasen wie der 15-Lipooxygenase. Da Silva *et al.* (1998) zeigten in ihrer Studie, dass Quercetinglykoside und Quercetinaglykon eine Lipoxygenase-induzierte LDL-Oxidation effizienter hemmen können als Ascorbinsäure und Vitamin E. Neben den Lipoxygenasen werden auch andere Enzyme, die zur Bildung von ROS führen wie z. B. die NADPH-Oxidase, Xanthinoxidase, Cyclooxygenasen und Myeloperoxidase, durch Flavonoide gehemmt (Tauber *et*

al. 1984, Pincemail et al. 1988, Pietta 2000). Flavonoide können in ihrer Eigenschaft als Radikalfänger endogene antioxidative Schutzmechanismen des Organismus unterstützen. Das lipophile Vitamin E schützt Zellmembranen vor den oxidativen Angriffen radikaler Verbindungen und wird dabei selbst zum Radikal, welches aber im Vergleich zu den Lipidperoxyl-Radikalen reaktionsträger ist und mit Hilfe von Vitamin C und Glutathion wieder regeneriert wird (Van Acker et al. 1993). Flavonoide können die Oxidation von  $\alpha$ -Tocopherol in LDL hemmen, indem sie selbst oxidiert werden und können zudem zur Regenerierung des  $\alpha$ -Tocopheryloxylradikal beitragen (Torel et al. 1986, De Whalley et al. 1990, Frankel et al. 1993, Bravo 1998, Zhu et al. 1999). Die *ex vivo*-Untersuchung von Van Acker et al. (2000) an  $\alpha$ -Tocopherol-armen Lebermikrosomen zeigte, dass Flavonoide die antioxidative Funktionen des  $\alpha$ -Tocopherols in Membranen übernehmen können.

Die Metabolisierung von Quercetin durch Methylierung oder Konjugation mit Glucuroniden oder Sulfaten senkt die antioxidative Aktivität (Prior 2003). Shirai et al. (2001) haben u. a. Quercetin-3-O- $\beta$ -D-Glucuronid (Q3G) bezüglich der Hemmung der Lipidperoxidation an einem Biomembranmodell untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie ergaben, dass Q3G eine durch ROS induzierte Fettsäureperoxidation hemmen kann, jedoch eine signifikant geringere Wirkung im Vergleich zum Quercetinaglykon aufweist. Auch Da Silva et al. (1998) konnten in ihrer Rattenstudie einen hemmenden Einfluss von Quercetinmetaboliten auf eine mit Kupfer induzierte Lipidperoxidation nachweisen.

Im Rahmen der systemischen Verfügbarkeit von Flavonoiden ist zu beachten, dass Flavonoide - zumeist *in vitro* - eine hohe Bindungsaffinität zu Albumin zeigen (Dufour & Dangles 2005). So werden mehr als 98 % des Quercetins an Albumin gebunden (Gugler et al. 1975). Es stellt sich somit die Frage, ob proteingebundenes Quercetin bzw. proteingebundene Quercetinmetaboliten ebenfalls antioxidative Eigenschaften besitzen. Neuere Studien mit bovinen und humanen Serumalbuminen belegen, dass eine kovalente Bindung mit Quercetin und seiner Derivate und Konjugate die Fähigkeit, LDL-Partikel vor Oxidationen

zu schützen, beibehalten. Jedoch ist die Proteinbindung mit einer Abnahme der antioxidativen Aktivität verbunden (*Janisch et al.* 2004, *Rohn et al.* 2004, *Dufour et al.* 2007).

Darüberhinaus sei darauf hingewiesen, dass eine Vielzahl von Studien mit kontroversen Ergebnissen vorliegen. Beispielsweise konnten *Ishikawa et al.* (1997) durch eine Supplementierung mit Tee-Flavonoiden einen Anstieg der LDL-Resistenz gegenüber Oxidationen nachweisen, wohingegen *Princen et al.* (1998) durch einen Konsum von Grün- und Schwarztee keinen Effekt auf die LDL-Oxidation verzeichnen konnten.

Wie schon mehrfach erwähnt, beruht der Großteil der beschriebenen antioxidativen Fähigkeiten von Flavonoiden und der daraus postulierten gesundheitsfördernden Effekte auf den menschlichen und tierischen Organismus auf *in vitro*-bzw. *ex vivo*-Untersuchungen. Bei der Übertragung dieser Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation muss vor allem die Bioverfügbarkeit (s. 2.4) berücksichtigt werden. Zudem existieren zur Zeit nur wenige Studien, die sich mit den antioxidativen Fähigkeiten der im systemischen Kreislauf zirkulierenden Flavonoidmetaboliten befassen haben. In epidemiologischen Studien von *Hertog et al.* (1994, 1995) konnte gezeigt werden, dass die Höhe der täglichen Flavonidaufnahme eine signifikante inverse Beziehung zu der Sterblichkeit an Herz-Kreislauf-Erkrankungen zeigte. Hinsichtlich postulierter antikarzinogener Effekte von Flavonoiden konnte jedoch kein Einfluss der Flavonidaufnahme auf das Gesamtkrebsrisiko bzw. auf das Auftreten von Darm- und Lungenkrebs nachgewiesen werden (*Hertog et al.* 1994).

Grundsätzlich ist ein Vergleich verschiedener Studienergebnisse aufgrund unterschiedlicher Versuchsanordnungen und Versuchsbedingungen schwierig und die Übertragbarkeit auf die tatsächliche *in vivo*-Situation zur Zeit nur sehr eingeschränkt möglich. Abschließend ist noch zu erwähnen, dass Polyphenole nicht nur antioxidative, sondern unter bestimmten Bedingungen (z. B. der pH-Wert in Geweben) sogar prooxidative Effekte aufweisen (*Morgan et al.* 1997,

*Decker 1997, Miura et al. 1998*). Als Prooxidantien schädigen sie DNA, Kohlenhydrate oder Proteine (*Aruoma et al. 1997*). Sie induzieren jedoch u. a. auch Apoptosen und verhindern das Tumorwachstum (*Lambert et al. 2005*).

### 2.3.2 Einfluss auf Enzyme, Signaltransduktion und Genexpression

Die in einer Vielzahl von Untersuchungen postulierten neuroprotektiven, cardioprotektiven und chemopräventiven Eigenschaften von Flavonoiden können nur teilweise durch direkte antioxidative Wirkungsmechanismen zurückgeführt werden. So halten es Autoren einiger Studien für unwahrscheinlich, dass Flavonoide in ihrer antioxidativen Funktion als Elektronen-Donatoren in der Lage sind, Effekte auf zellulärer Ebene zu erzielen (*Spencer et al. 2001, Schroeter et al. 2001*). Diese Aussage wird dadurch gestützt, dass oral aufgenommene Flavonoide intensiv metabolisiert werden und durch Phase I - und Phase II-Reaktionen in Darmmucosa und Leber die Konzentrationen der Flavonoide und deren Metaboliten *in vivo* im Plasma und in Organen wesentlich geringer sind als z. B. die Konzentration etablierter Antioxidantien wie Ascorbinsäure und  $\alpha$ -Tocopherol (*Halliwell et al. 2000, Abd El Mohsen et al. 2002*). Vielmehr scheinen biologische Effekte der Flavonoide und deren Metaboliten auf Interaktionen mit Schlüsselenzymen, Transportern, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und mit Effekten auf die Genexpression zu beruhen (*Middleton et al. 2000, Wadsworth et al. 2001, Gupta & Panda 2002*). Flavonoide und ihre Metaboliten üben modulierende Effekte auf verschiedene Proteinkinasen wie z. B. Phosphatidylinositol-3-Kinase, Tyrosin-Kinasen, Proteinkinase-C und verschiedene Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen (MAP) aus. Die inhibitorischen Effekte auf diese Enzyme wirken sich auf den Phosphorylierungsstatus von Schlüssel-molekülen aus, welche einen Einfluss auf die Steuerung wichtiger Zellfunktionen wie z. B. Proliferationen, Differenzierungsvorgänge und Apoptosen haben und/oder modulierende Effekte auf Genexpressionen ausüben (Signaltransduktionswege). Am Ende solcher Signaltransduktionswege stehen

Transduktionsfaktoren, welche sich an die Promoterregionen der Zielgene binden und so die Transkription beeinflussen (*van den Berg et al.* 2001). Zu den redoxsensitiven Transkriptionsfaktoren zählt man den Nuklear-Transkriptionsfaktor  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ), der für die Transkription von Genen verantwortlich ist, die entzündliche Prozesse bzw. Krankheiten wie Arthritis, Asthma, Atherosklerose, AIDS und Krebs auslösen können (*Chen et al.* 1999). Die Aktivierung von NF- $\kappa\text{B}$  kann durch Flavonoide (Quercetin) gehemmt werden (*Musonda & Chipman* 1998). *Nair et al.* (2006) zeigten, dass eine durch Quercetin induzierte Hemmung von NF- $\kappa\text{B}$  zu einer verminderten Expression des Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in  $\text{CD4}^+$  T-Zellen und  $\text{CD14}^+$  Monocyten führt. TNF- $\alpha$  ist als proinflammatorisches Cytokin bei chronischen Entzündungserkrankungen involviert. Auch beeinflussen Flavonoide Aktivator-Protein-1 (AP-1), Hitze-Schock-Faktoren (HSF), die zur Klasse der MAP-Kinasen gehörenden p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38-MAPK) und die c-Jun-N-terminalen-Kinasen (JNK), welche alle an der Induktion von Genen beteiligt sind, die modulierend auf Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Zellalterung wirken (*Ishikawa & Kitamura* 2000, *Schroeter et al.* 2001, *Youdim et al.* 2002). Ebenso können die zur Familie der ABC-Transporter gehörenden „Multidrug-Resistent-Associated-Proteins“ (MRPs) wie MRP1, MRP4 und MRP5 durch Flavonoide gehemmt, bzw. die in Tumorgewebe vermehrte Expression dieser Transporter durch den Einsatz von Polyphenolen vermindert werden (*Mei et al.* 2004, *Wu et al.* 2005, *Munoz et al.* 2007). *In vitro*- und *in vivo*-Studien haben sowohl hemmende als auch induzierende Effekte von Flavonoiden auf verschiedene Cytochrom P<sub>450</sub>-Isoenzyme gezeigt (*Trela & Carlson* 1987, *Obermeier et al.* 1995). Die Induktion der Isoenzyme CYP1A1 und CYP1A2 wird mit verschiedenen Krebsformen in Verbindung gebracht (*Kawajiri et al.* 1993). Die Studie von *Zhai et al.* (1998) ergab, dass einige Flavonoide mit hoher Wirksamkeit und Selektivität die CYP1A Isoenzyme kompetitiv hemmen und somit zur Krebsprävention beitragen könnten. Zudem können Flavonoide den Arachidonsäuremetabolismus in vielfacher Weise modulieren und infolgedessen Entzündungsprozesse beeinflussen. Flavonoide beeinflussen des Weiteren

Enzyme wie z. B. Glutathion *S*-Transferase, Malat-Dehydrogenase, Pyruvat-Kinase, RNA- und DNA-Polymerase, Topoisomerase, HIV-1-Proteinase und HIV-1-Integrase (*Middleton et al.* 2000).

Abschließend sei erwähnt, dass auch die in diesem Abschnitt aufgeführten Effekte ebenfalls überwiegend aus *in vitro*-Studien abgeleitet sind und zumeist Aglyka in unphysiologischen Konzentrationen eingesetzt wurden (*Kroon et al.* 2004).

## 2.4 Bioverfügbarkeit von Quercetin und Rutin

Die postulierten gesundheitsfördernden Effekte setzen eine ausreichend hohe Bioverfügbarkeit voraus. Die Bioverfügbarkeit eines Stoffes umfasst die Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt (GIT), die systemische Verteilung und Metabolisierung sowie die Ausscheidung. Da sich die vorliegende Arbeit mit dem Flavonol Quercetin beschäftigt, wird im Folgenden auf die Bioverfügbarkeit dieses Flavonols näher eingegangen.

*Gugler et al.* (1975) konnten in ihrer Humanstudie nach oraler Applikation von 4 g Quercetinaglykon weder im Plasma noch im Urin messbare Konzentrationen von Quercetin und/oder seiner Metaboliten nachweisen. Man ging davon aus, dass weniger als 1 % der verabreichten Dosis absorbiert wurde. Spätere Untersuchungen an ileostomierten Probanden ergaben nach Aufnahme von gedünsteten Zwiebeln eine Bioverfügbarkeit von 52 % für Quercetinglykoside, für das Aglykon 24 % und für Rutin 17 % (*Hollman et al.* 1995). In einer weiteren Folgestudie an Probanden mit intaktem Darm zeigte sich, dass die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Äpfeln und Quercetin-3-O-Glukorhamnosid (Rutin) um 30 % geringer war als die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Zwiebeln. *Hollman et al.* (1997) schlossen daraus, dass die Art des gebundenen Zuckerrestes eine bedeutende Rolle bei der Absorption und damit auf die Bioverfügbarkeit der Flavonole spielt. Weiter nahm man an, dass das frühe Auftreten der maximalen Plasmakonzentrationen nach Aufnahme der

zwiebelhaltigen Mahlzeit für eine Absorption der Quercetinglykoside im vorderen Dünndarm sprechen könnte und dass Quercetinaglyka aus  $\beta$ -Glukosiden erst nach vorhergehender mikrobieller Deglykosilierung im Dickdarm absorbiert werden können. Weitere *in vivo*-Untersuchungen an Menschen und Tieren konnten diese Ergebnisse bestätigen (Manach *et al.* 1997; McAnlis *et al.* 1999; Hollman *et al.* 1999; Graefe *et al.* 2001; Cermak *et al.* 2003).

Die Untersuchungen zeigen, dass je nach beobachteter Spezies und Ausgangssubstanz Unterschiede in der systemischen Verfügbarkeit von Quercetin bestehen. Ueno *et al.* (1983) ermittelten nach Applikation einer Einzeldosis von 2,3 mg/kg Körpergewicht (KGW) radioaktiv markiertem Quercetin bei der Ratte eine Absorption von 20 %, wohingegen Graf *et al.* (2005) nach einer oralen Gabe von 7,6 mg Quercetin-4'-O-Glucosid pro kg KGW lediglich 6 % der Dosis in der systemischen Zirkulation nachweisen konnten. Die Untersuchungen von Chen *et al.* (2005) ergaben sogar eine 48 %ige Bioverfügbarkeit von Quercetin nach oraler Applikation des Aglykons (10 mg/kg KGW). Die Bioverfügbarkeitsstudie von Ader *et al.* (2000) am Schwein ergab nach oraler Verabreichung von 50 mg Aglyka/kg KGW über das Futter eine 17 %ige systemische Verfügbarkeit. Neben den Erkenntnissen, dass die Bioverfügbarkeit vom Glykosylierungsmuster, der Flavonoidquelle und Spezies abhängig ist, zeigten die Untersuchungen von Cermak *et al.* (2003), Lesser *et al.* (2004) und Tamura *et al.* (2007) auch einen Einfluss der Nahrungs- bzw. Futtermittelzusammensetzung auf die orale Bioverfügbarkeit von Quercetin.

#### 2.4.1 Intestinale Absorptionsmechanismen

Lange Zeit ging man davon aus, dass die oral aufgenommenen polaren und damit wasserlöslichen Flavonoid-Glykoside im oberen Darmtrakt nicht bzw. nur sehr spärlich absorbiert werden können und erst nach bakterieller enzymatischer Hydrolyse in den tieferen Darmabschnitten freigesetzten lipophilen Aglyka passiv absorbiert werden bzw. weiteren Metabolisierungsprozessen unterliegen (Griffiths

& Barrow 1972, Bokkenheuser et al. 1987, Manach et al. 1995, 1997). Humanstudien von Hollman et al. (1995, 1996b, 1999) zeigten, dass maximale Plasmakonzentrationen von Quercetinäquivalenten bereits innerhalb einer halben Stunde nach oraler Aufnahme von Quercetin-Glukosiden bzw. erst nach sechs Stunden nach Applikation des Glukorhamnosids detektiert werden konnten. Als Erklärung für die bessere Absorption und damit höhere relative Bioverfügbarkeit des Quercetins aus dem Glukosid wurde der aktive Transport des Glukosids über den in der Bürstensaummembran des Dünndarms lokalisierten  $\text{Na}^+$ -Glukosetransporter SGLT1 (Sodium depend glucose transporter 1) postuliert. Diese Hypothese stützte sich auf die Untersuchungen von Mizuma et al. (1993, 1994), welche zeigten, dass bei der Ratte  $\beta$ -Glukoside und  $\beta$ -Galaktoside des *p*-Nitrophenols und  $\beta$ -Naphthols mittels des SGLT1 transportiert werden. Auch die Studien von Gee et al. (1998, 2000) an umgestülpten Darmsäckchen weisen auf eine Interaktion zwischen Quercetin-3-Glukosid, Quercetin-4'-Glukosid, nicht aber von Quercetin-3,4'-Diglukosid und dem SGLT1 hin. Diese Studien zeigten ferner, dass Quercetin-Glukoside während des Absorptionsvorganges bzw. im Cytosol Deglykosilierungs- und Konjugationsprozessen unterliegen und das freigesetzte Aglykon aufgrund des lipophilen Charakters passiv in die Enterozyten diffundieren kann. Walgren et al. (2000b) konnten erstmals den direkten  $\text{Na}^+$ -abhängigen Transport von Quercetin-4'-Glukosid sowohl an humanen CaCo-2-Zellen als auch an SGLT1 transfizierten Hamsterovarzellen (G6D3-Zellen) nachweisen. Die Aufnahme konnte durch Glukose und Phloridzin gehemmt werden. Außerdem ergab diese Studie, dass Quercetin-4'-Glukosid über den in der apikalen Bürstensaummembran lokalisierten Multidrug Resistance Associated Protein 2 (MRP2) reseziert wird, was eine verringerte Nettoabsorption zur Folge hat. Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass in früheren Experimenten keine Absorption von Quercetin-4'-Glukosid mittels des SGLT1 nachgewiesen werden konnte (Walgren et al. 2000a, b). Studien von Ader et al. (2001), Wolfram et al. (2002) sowie Cermak et al. (2004) zeigten, dass neben Quercetin-4'-Glukosid (Spiraeosid) ebenfalls Quercetin-3-Glukosid (Isoquercitrin), nicht aber Quercetin-3-O-Galaktosid, Quercetin-3-O-

Glukorhamnosid oder Quercetinaglykon, die  $\text{Na}^+$ -abhängige-Glukoseaufnahme über den nur im Jejunum exprimierten SGLT1 hemmen können. Die Beteiligung des SGLT1 an der Absorption der genannten Quercetinmonoglukoside könnte auch deren höhere Bioverfügbarkeiten im Vergleich zum Aglykon und komplexeren Quercetinglykosiden erklären (Hollman *et al.* 1999, Crespy *et al.* 2001, Cermak *et al.* 2003).

Die Position und die Art des gebundenen Zuckermoleküls spielen für die Deglykosylierung und Absorption im GIT eine entscheidende Rolle (Day *et al.* 1998). Wie bereits eingangs erwähnt, ging man davon aus, dass aufgrund des Fehlens körpereigener Enzyme eine Spaltung von  $\beta$ -glykosidischen Verbindung nicht möglich sei, sondern erst die mikrobiellen Enzymsysteme im distalen Darmtrakt eine Spaltung dieser Verbindung ermöglichen. Mittlerweile sind jedoch drei  $\beta$ -Glukosidasen bei Säugetieren identifiziert, die eine Rolle bei der Metabolisierung von Flavonoiden spielen. Zwei dieser Enzyme sind membrangebunden. Die lysosomale Glukocerebrosidase (EC 3.2.1.62), welche Glukosylceramide hydrolysiert, und die Laktase-Phlorizin-Hydrolase (EC 3.2.1.108; LPH), die im Dünndarm primär für die Hydrolyse der Laktase verantwortlich ist. Das dritte Enzym ist eine cytosolische  $\beta$ -Glukosidase (EC 3.2.1.21), welche überwiegend in Leber, Nieren und Dünndarm von Säugetieren lokalisiert ist und u. a. an der Detoxifikation von Xenobiotika beteiligt ist (Hays *et al.* 1996, Day *et al.* 1998). Ioku *et al.* (1998) wiesen in ihren Untersuchungen eine  $\beta$ -Glukosidase-Aktivität im Dünndarmtrakt der Ratte nach, wobei die  $\beta$ -Glukosidase des Jejunums die größte Aktivität aufwies. Die hydrolytische Effizienz wurde an verschiedenen Quercetinmonoglukosiden sowie an Rutin untersucht. Es zeigte sich, dass Quercetin-4'-Glukosid das bevorzugte Substrat der  $\beta$ -Glukosidase war, die gegenüber Rutin nur eine geringe Affinität aufweist. Day *et al.* (1998) kamen ebenfalls zum Ergebnis, dass die  $\beta$ -Glukosidase eine hohe Affinität gegenüber Quercetin-4'-Glukosid aufweist. Des Weiteren konnte auch hier bestätigt werden, dass u. a. Quercetin-3,4'-Diglukosid, Quercetin-3-Glukosid und Rutin keine Substrate der hepatischen- als auch der intestinalen  $\beta$ -Glukosidasen sind. Mit Ausnahme der LPH handelt es sich bei den oben

genannten  $\beta$ -Glukosidasen um intrazelluläre Enzyme, was eine intakte Aufnahme von Flavonoid-Glukosiden in die Enterozyten voraussetzt. Die LPH ist ein bürstensaummembranständiges Enzym mit zwei katalytischen Zentren, wobei eines die Hydrolyse von Laktose und das zweite Zentrum in die Deglykosilierung hydrophober Substrate wie Phlorizin involviert ist. Überraschenderweise weist das Laktase-Zentrum eine höhere Glukosidase-Aktivität auf und ist überwiegend für die Hydrolyse der Flavonoid-Glukoside verantwortlich (*Morand et al.* 2000, *Day et al.* 2000). *Day et al.* (2000) zeigten, dass die LPH aus dem Dünndarm von Schafen u. a. Quercetin-4'-Glukosid, Quercetin-3-Glukosid und Quercetin-3,4'-Diglukosid, nicht aber Rutin deglykosilieren. Die bei der luminalen Hydrolyse entstehenden Aglyka gelangen per Diffusion in die Enterozyten. Konjugationsprozesse mit Glukuroniden und Sulfaten mit anschließender basaler Sekretion halten den Konzentrationsgradienten für die passive Aufnahme der Aglyka aufrecht (*Day et al.* 2000). In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Ergebnissen aus den Bioverfügbarkeitsstudien mit oraler Rutinapplikation und der Erkenntnis, dass Rutin weder Substrat der LPH noch der cytosolischen  $\beta$ -Glukosidasen ist und keine körpereigenen  $\beta$ -Rhamnosidasen existieren, passieren nicht absorbierte Quercetin-Glykoside und insbesondere Quercetin-Rutinoside unverändert den Dünndarm und unterliegen im Dickdarm der mikrobiellen Hydrolyse und Degradation (*Hollman et al.* 1995, *Scalbert & Williamson* 2000, *Németh et al.* 2003). Mögliche Absorptions- und Meabolisierungsprozesse von Quercetin-Glukosiden im Dünndarm sind aus der Abbildung 4 zu entnehmen.

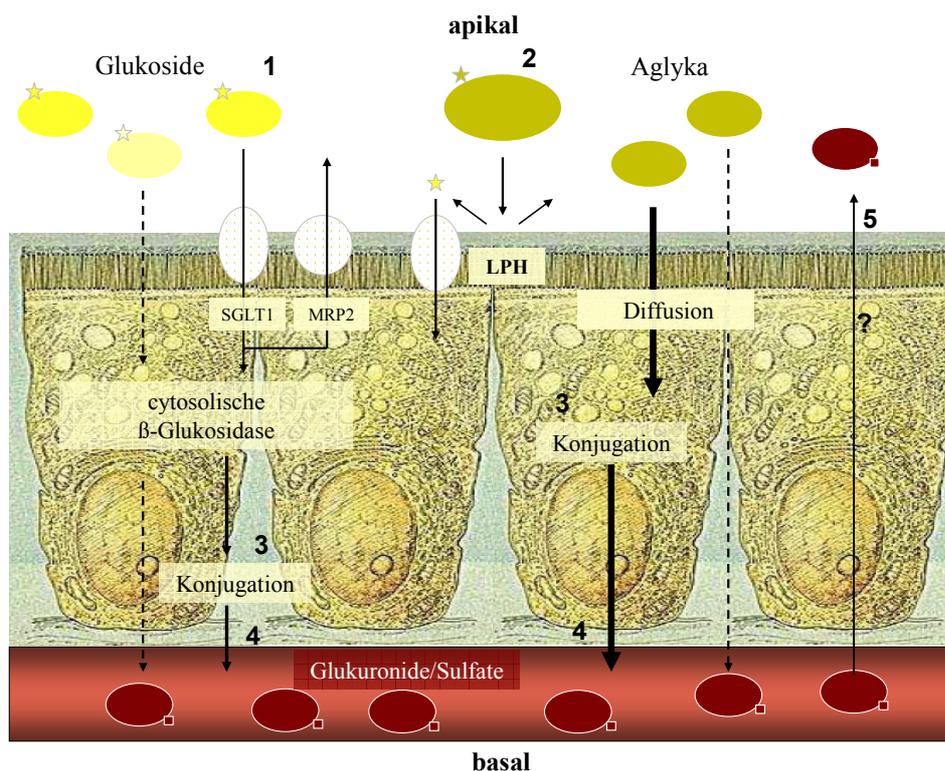


Abb. 4: Postulierte Absorptions- und Metabolisierungsprozesse von Quercetin-Glukosiden im Dünndarm (modifiziert nach *Murota & Terao* 2003)

1: Quercetin-Glukoside werden aktiv über den SGLT1 absorbiert und im Folgenden durch die cytosolische  $\beta$ -Glukosidase hydrolysiert oder über den MRP-2 wieder ins Lumen sezerniert. 2: Quercetin-Glukoside werden durch die luminalen LPH hydrolysiert und das Aglykon gelangt passiv per Diffusion in die Epithelzellen. 3: Quercetinaglykon wird in der Mucosa durch UDP-Glukuronyltransferasen und/oder Phenol-Sulfotransferasen in konjugierte Metaboliten konvertiert. 4/5: Konjugierte Metaboliten gelangen in die *Vena portae* (4) oder werden ins Lumen abgegeben (5). LPH, Laktase-Phloridzin-Hydrolase; SGLT1, Sodium dependent glucose transporter 1; MRP-2, Multidrug Resistance Associated Protein 2.

#### 2.4.2 Metabolisierung und Ausscheidung

Die im Darmepithel aufgenommenen bzw. nach Hydrolyse in den Enterozyten freigesetzten Aglyka unterliegen Phase-I- und Phase-II-Metabolisierungsvorgängen. Cytochrom  $P_{450}$ -Monooxygenasen sind an Hydroxylierungs- und Demethylierungsreaktionen von Flavonolen beteiligt.

Voraussetzung für die Hydroxylierungen ist das Fehlen bzw. das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe am B-Ring. Zwei und mehr Hydroxylierungen des B-Ring verhindern weitere Hydroxylierungsvorgänge. Demethylierungen werden überwiegend an der 4'-Position, weniger an der 3'-Position beobachtet (*Nielsen et al.* 1998, *Williamson et al.* 2000). Es ist jedoch nicht davon auszugehen, dass mit der Nahrung aufgenommene Flavonoide *in vivo* einem ausgeprägten Phase-I-Metabolismus unterliegen, da diese bereits Hydroxylgruppen in der Ausgangsform enthalten und empfänglich für Phase-II-Konjugationen sind (*Day et al.* 2004). Im Falle von Quercetin spielen insbesondere Konjugationen der Hydroxylgruppen mit Glukuronsäuren, Sulfaten und Methylgruppen eine Rolle. Die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) methyliert Flavonole überwiegend in Leber und Niere (*Tilgmann & Ulmanen* 1996), wird aber ebenfalls in den Enterozyten exprimiert (*Piskula & Terao* 1998a). Die Methylierung des Quercetins scheint bei Ratten im Vergleich zum Menschen eine stärkere Rolle zu spielen. In der Humanstudie von *Manach et al.* (1998) konnte 3'-Methylquercetin in einer Konzentration von 0.1-0.2 µmol/l im Plasma nachgewiesen werden, was nur 20-30 % der Gesamtquercetinkonzentration entsprach. Bei Ratten hingegen findet man überwiegend methylierte Quercetinmetabolite, v. a. Isorhamnetin in Plasma (ca. 70 %), Galle und Urin, da die COMT bevorzugt die 3'-Position (Isorhamnetin) im Vergleich zur 4'-Position (Tamarixetin) zu methylieren scheint (*Manach et al.* 1995, 1996, *Williamson et al.* 2000).

Die UDP-Glukuronyltransferasen (UDPGT, UGT) - im Besonderen aus der Familie der UGT1A - katalysieren die Konjugation der Flavonoide mit Glukuronsäuren in Dünndarm, Leber und Niere.

Die Phenol-Sulfotransferasen (P-PST, SULT) bilden eine kleine Gruppe von cytosolischen Enzymen, die Sulfatreste auf Hydroxylgruppen übertragen. Die Sulfotransferasen aus den Familien der SULTA1 und SULTA3 weisen überwiegend in der Leber bzw. im Kolon hohe Aktivitäten auf (*Scalbert & Williamson* 2000). Auf den Umfang der Konjugationen wird später eingegangen (s. S. 24).

Wie bereits angedeutet, existieren hinsichtlich der möglichen Konjugationsreaktionen enzym- und speziesspezifische Unterschiede. Bei Mensch und Ratte werden überwiegend methylierte Sulfat- und Glukuronidkonjugate des Quercetins nachgewiesen (*Morand et al.* 1998, *Piskula & Terao* 1998b), wohingegen bei Schweinen keine Sulfatkonjugate und bei Katzen keine Quercetin-glukuronidate gefunden wurden (*Gibson & Skett* 1994).

Die Quercetinmetaboliten werden zum Teil wieder ins Darmlumen reseziert oder gelangen über die *Vena portae* zur Leber, unterliegen dort weiteren Konjugationen durch hepatische Phase-I- und Phase-II-Enzyme, bevor sie über die systemische Zirkulation ihre Zielgewebe erreichen bzw. über die Galle wieder ins Dünndarmlumen sezerniert und reabsorbiert werden können (*Morand et al.* 1998, *Crespy et al.* 1999, *Day et al.* 2004). *Murota & Terao* (2005) konnten in einer Rattenstudie neben den in der Lymphe üblicherweise enthaltenden Lipiden und/oder lipidhaltigen Verbindungen Quercetinkonjugate, aber kein Aglykon nachweisen. Die höchsten lymphatischen Konzentrationen an Quercetin-konjugaten ( $2,54 \pm 0,43 \mu\text{mol/l}$ ) konnten bereits eine halbe Stunde nach Infusionsbeginn ermittelt werden.

Flavonole, die über den enterohepatischen Kreislauf wieder ins Dünndarmlumen abgegeben und nicht reabsorbiert werden, erreichen zusammen mit den im Dünndarm nicht absorbierten Flavonoiden, wie z. B. Rutin, das Kolon, wo sie einer intensiven mikrobiellen Verstoffwechslung unterliegen. Das Kolon enthält ca.  $10^{12}$  Mikroorganismen/cm<sup>3</sup>, welche ein enormes katalytisches und hydrolytisches Potential aufweisen. Mit ihren  $\beta$ -Glucosidasen,  $\beta$ -Rhamnosidasen und Esterasen sind sie in der Lage glykosidische Bindungen bzw. Esterbindungen zu hydrolysieren. Einige Bakterienarten sind ausschließlich nur zur Verstoffwechslung des Zuckerrestes befähigt. So setzt z. B. *Enterococcus casseliflavus* den Zuckerrest des Quercetins-3-Glukosids zu Formiat, Acetat und Laktat um. Das Aglykon wird nicht weiter umgesetzt. Dieses kann im Kolon absorbiert werden, oder von anderen Mikroorganismenarten durch Spaltung des Flavonoid-Grundgerüsts durch z. B. *Clostridium orbiscindens* und *Eubacterium*

*ramulus* zu hydroxylierten Phenolsäuren abgebaut werden (*Kühnau* 1976, *Heilmann & Merfort* 1998a,b, *Hollman & Katan* 1998, *Braune et al.* 2001, *Schoefer et al.* 2003, *Blaut et al.* 2003). Als Hauptabbauprodukt des Aglykons aus Quercetinglukuroniden, -glykosiden und auch aus -rutosiden entsteht u. a. 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, welche zum Teil zu 3-Hydroxyphenylelessigsäure umgesetzt wird. Diese beiden Phenylelessigsäuren gelangen in die systemische Zirkulation. 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure wird in der Leber zu 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylelessigsäure umgewandelt und zusammen mit 3-Hydroxyphenylelessigsäure und 3,4 Dihydroxyphenylelessigsäure über den Urin ausgeschieden (*Jaganath et al.* 2006). Des Weiteren wurden noch Mono-Hydroxyhippursäuren im Urin der Probanden nachgewiesen.

Die Tierstudie von *Ueno et al.* (1983) mit radioaktiv markierten Quercetin ergab, dass bei der Spaltung des Flavon-Skeletts als Hauptabbauprodukt des A-Ringes 2,4,6-Trihydroxybenzoesäure entsteht, welche bis zu Kohlendioxid oxidiert wird. Auch *Walle et al.* (2001) stellten in ihrer Humanstudie fest, dass sowohl nach oraler als auch intravenöser Applikation von radioaktiv markiertem Quercetin, Kohlendioxid als Hauptmetabolit (23 % bis 81 %) bei der Verstoffwechslung des Flavonols gebildet und mit der Atemluft abgegeben wird. In Urin und Faeces der Probanden konnten unabhängig von der Applikationsart nur <10 % der applizierten Menge des [<sup>14</sup>C]-Quercetins wieder gefunden werden.

Nicht alle Flavonoidmetaboliten, die das Kolon erreichen unterliegen auch einem Abbau. Die Abwesenheit von Hydroxylgruppen an den Positionen 5, 7 und/oder 4' oder die Methylierung an diesen Positionen können das Flavonoid vor der mikrobiellen Ringspaltung schützen (*Rice-Evans* 2001).

### 2.4.3 Plasmatransport und Gewebeverteilung

Die absorbierten Flavonole, die in den Blutkreislauf gelangen, zirkulieren zum überwiegenden Teil nicht in freier Form, sondern weisen umfangreiche Interaktionen mit Plasmaproteinen auf (*Boulton et al.* 1998, *Janisch et al.* 2004,

*Papadopoulou et al.* 2005, *Martini et al.* 2008). Die *in vitro*-Untersuchung von *Boulton et al.* (1998) mit radioaktiv markiertem [<sup>14</sup>C] Quercetin zeigte, dass das Quercetinaglykon zu 99,4 % an humanes Serumalbumin gebunden wurde. Ein geringer Anteil des Quercetins wurde an  $\alpha_1$ -Glykoprotein gebunden bzw. fand sich in den Low-Density-Lipoproteinen (LDLs) wieder. *Janisch et al.* (2004) untersuchten das Bindungsverhalten zwischen humanem Serumalbumin und Quercetinkonjugaten und stellten fest, dass auch Quercetinkonjugate in Abhängigkeit von der Konjugationsart unterschiedliche Affinitäten zum humanen Serumalbumin aufweisen und Bindungen eingehen (Quercetin-3'-Sulfat = Quercetin  $\geq$  Quercetin-7-Glukuronid > Quercetin-3-Glukuronid = Quercetin-3-Glukosid > Isorhamnetin-3-Glukuronid > Quercetin-4'-Glukuronid). Die Affinität zwischen den verschiedenen Flavonoiden und den Plasmaproteinen wird u. a. durch die Hydrophobie der Verbindung, die An- bzw. Abwesenheit funktioneller Gruppen sowie die sterischen Anordnung bestimmt (*Diniz et al.* 2008). Beispielsweise erhöht sich die Affinität zum bovinen Serumalbumin mit steigender Anzahl von Hydroxylgruppen am B-Ring, wohingegen die Substitution von Glykosiden am C-Ring zu einer verminderten Affinität führt (*Xiao et al.* 2008).

Im Anschluss an die Absorption findet die systemische Verteilung im Organismus statt. *Mullen et al.* (2002) untersuchten die Flavonolmetaboliten im Plasma und die Gewebeverteilung nach oraler Aufnahme von radioaktiv markiertem [<sup>14</sup>C] Quercetin-4'-Glukosid bei Ratten. Nach 60 min konnten ca. 94 % der Gesamtradioaktivität im GIT in Form von 18 verschiedenen methylierten, glukuronierten und/oder sulfatierten Quercetinkonjugaten wiedergefunden werden. Im Vergleich zu denen im Darmtrakt nachgewiesenen Mengen an Quercetinkonjugaten fanden sich nur noch geringe Mengen der Metaboliten in Plasma (2,8 %), Leber (1,2 %), Nieren (0,8 %) und im Muskelgewebe (1,4 %) wieder. Nur im Darm und in der Leber wurden geringe Mengen an freiem Quercetin detektiert. In Plasma und Nieren wurden hingegen nur Konjugate (Glukuronide/Sulfate) nachgewiesen. In einer weiteren Studie wurden innerhalb

von 2 Stunden 85 % des applizierten [<sup>14</sup>C] Quercetin-4'-Glukosids in Form von mehr als 20 Metaboliten im Darmtrakt nachgewiesen. Lediglich 6 % erreichten die systemische Zirkulation und Zielorgane, vor allem Leber und Nieren. Fünf Stunden nach der Aufnahme fanden sich in Darm, Leber und Nieren überwiegend Quercetindiglukuronide wieder, wohingegen im Plasma glukuronidierte Sulfate und methylierte Quercetinderivate zirkulierten (*Graf et al. 2005*). *De Boer et al. (2005)* untersuchten in einer Langzeitstudie die Gewebeverteilung von Quercetin bzw. der Quercetinmetaboliten in zwölf Organen bei Ratten. Die Tiere erhielten über einen Zeitraum von 11 Wochen eine 0,1 bzw. 1 % quercetinangereicherte Diät, was einer Dosis von 50 bzw. 500 mg/kg KGW entsprach. Die höchsten Konzentrationen von Quercetin sowie den methylierten Quercetinmetaboliten Isorhamnetin und Tamarixetin konnten - abgesehen vom Plasma - in den Lungen nachgewiesen werden (3,98 bzw. 15,3 nmol/g Gewebe). Die geringsten Konzentrationen wiesen Gehirn, weißes Fettgewebe sowie die Milz auf. *Bieger et al. (2008)* untersuchten nach chronischer Applikation (4 Wochen) von Quercetin (50 mg/kg KGW/Tag) die Verteilung des Flavonols in Organen und Geweben beim Schwein. Die höchsten Gesamtflavonolkonzentrationen wurden in Dünndarm, Leber und Nieren nachgewiesen. Wesentlich niedrigere Konzentrationen wurden in Muskulatur, Lunge, Gehirn und Fett bestimmt. Bei den Metaboliten handelte es sich in allen untersuchten Geweben überwiegend um Quercetinkonjugate (67 - 98 %). In den Geweben konnten im Gegensatz zum Plasma regelmäßig Gehalte von dekonjugiertem Quercetin nachgewiesen werden, die ca. 30 - 100 % der Gesamtkonzentration ausmachten. Dieser hohe Aglykonanteil korrelierte jedoch nicht mit der spezifischen Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase in den entsprechenden Geweben. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch bei einer Langzeitapplikation das zugeführte Flavonol umfangreich metabolisiert und eliminiert wird und keine nennenswerten Anreicherungen von Quercetin in den untersuchten Geweben beim Schwein stattfinden (*Bieger et al. 2008*).

## 2.5 Ballaststoffe und Rohfaser

### 2.5.1 Definition und Klassifikation von Ballaststoffen und Rohfaser

Die Bezeichnung „Ballaststoffe“ ist uneinheitlich und unterliegt bis zum heutigen Tage weiteren Definitionsversuchen (*Cummings & Stephen 2007*). Ursprünglich stammt der Begriff „Ballaststoff“ aus einer Zeit, in der diese Stoffgruppe als überflüssige und unerwünschte Nahrungsbestandteile galten (*Huth & Cremer 1977, Thomas 1980, Elmadfa & Leitzmann 2004*). *Trowell (1977)* definierte Ballaststoffe als Rückstände von Pflanzenzellen, die bei der Hydrolyse mit menschlichen Verdauungsenzymen nicht abgebaut werden können. Heutzutage definiert man Ballaststoffe als heterogene Zusammensetzung aus Struktur- und Nicht-Struktur-Polysacchariden und Lignin, welche nicht durch Verdauungsenzyme des GIT abgebaut werden können (*Mosenthin et al. 2001, Souffrant 2001*). Eine anerkannte „chemische“ Definition für Ballaststoffe lautet „die Summe aller pflanzlichen Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) plus Lignin“ (*Mosenthin et al. 2001, Elmadfa & Leitzmann 2004*).

Der Begriff „Rohfaser“ wurde im Bereich der Tierernährung geprägt und findet bis heute Verwendung. Die „Weender-Analyse“ kann lediglich die Gerüstsubstanzen Cellulose, einen Teil der Hemicellulosen und Lignin als Rohfaser sowie die N-freien Extraktstoffe, die u. a. auch lösliche Faseranteile beinhalten, erfassen. Zur besseren Differenzierung der Kohlenhydrate wurde von *Van Soest 1973* ein neues Analyseverfahren mittels Kochens des entsprechenden Futtermittels mit neutraler und schwefelsaurer Detergenzienlösung eingeführt. Begriffe wie Neutral Detergent Fiber (NDF), Acid Detergent Fiber (ADF) und Acid Detergent Lignin (ADL) wurden geprägt (Abb. 5). Allerdings wird der Hemicellulosegehalt lediglich grob geschätzt. Lösliche Faserbestandteile werden nicht erfasst und sind Bestandteile des „organischen Restes“.

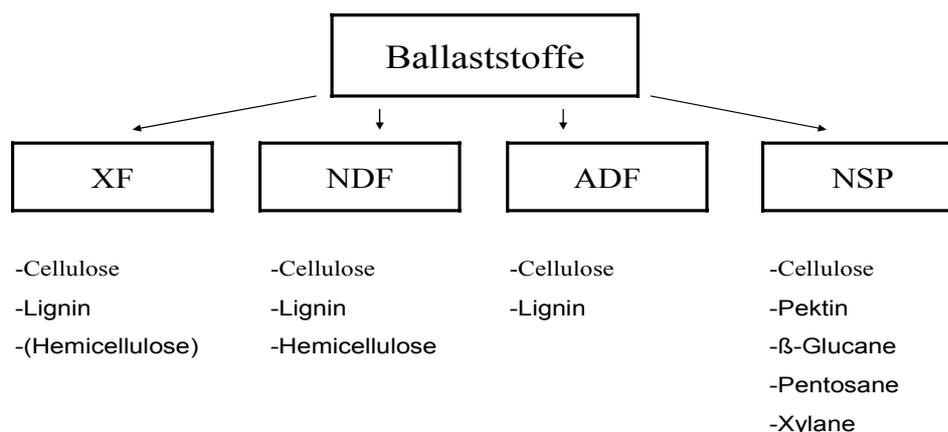


Abb. 5: Fraktionen und Komponenten der Ballaststoffe (*Souffrant 2001*)

XF = Rohfaser; NDF = neutrale Detergetienfaser; ADF = saure Detergetienfaser; NSP = Nicht-Stärke-Polysaccharide

Eine differenziertere Betrachtung der Ballaststoffe in Nahrungsmitteln bzw. Futtermitteln ermöglichen Methoden wie die AOAC-Methode nach *Prosky et al.* (1985) oder die Komponenten-Analyse nach *Englyst et al.* (1994) bzw. nach *Theander et al.* (1994).

Grundsätzlich bleibt festzuhalten, dass der „Ballaststoffgehalt“ um ein Vielfaches höher als der „Rohfasergehalt“ eines Nahrungsmittels ist (*Eastwood et al.* 1980). Beim Getreide macht der Rohfaserwert nur 1/4 bis 1/5 des Ballaststoffgehaltes aus, bei Gemüse mehr als die Hälfte (*Thomas 1980*).

#### 2.5.1.1 Nicht-Stärke Polysaccharide (NSP)

Als Nicht-Stärke-Polysaccharide (NSP) werden alle pflanzlichen Polysaccharide mit Ausnahme der Stärke bezeichnet. Gemäß der bereits erläuterten chemischen Definition stellen NSP den Hauptbestandteil der „Ballaststoffe“ dar. Zu den NSP gehören komplexe Kohlenhydratverbindungen wie Cellulose, Hemicellulose und Pektine sowie  $\beta$ -Glucane, Pentosane, Mannane, Galaktane und Xyloglucane (*Jeroch et al.* 1999, *Grieshop et al.* 2001). Sie können kovalent gebundene Nicht-

Kohlenhydratbestandteile wie Phenolsäuren, Proteine und Lignin enthalten (*De Lange* 2000). Des Weiteren werden unter chemischen Gesichtspunkten ebenfalls Pflanzengummis und -schleime sowie Algenpolysaccharide zu den NSP gerechnet (*Cummings & Stephen* 2007). NSP werden dem Organismus über Cerealien, Obst und Gemüse zugeführt. Aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften (s. 2.5.2) können NSP u. a. die Magen- und Darmmotilitäten, die Passagezeiten der Ingesta sowie Verdauungs- und Absorptionsprozesse beeinflussen (*Bach Knudsen* 2001, *Wenk* 2001). NSP können aufgrund ihrer  $\beta$ -glykosidischen Bindungen nicht durch endogene Enzyme des Dünndarms abgebaut und absorbiert werden, sondern werden durch die gastrointestinale Mikroflora fermentiert. Bereits im Dünndarm kann eine mikrobielle Spaltung von NSP stattfinden, jedoch ist der Dickdarm Hauptort der mikrobiellen Hydrolyse (*Graham et al.* 1986, *Pluske et al.* 1999).

Die Löslichkeit der NSP ist von der chemischen Struktur abhängig (*Dänicke* 1999, *Englyst & Englyst* 2005). Cellulose<sup>1</sup> gehört zu den unlöslichen-, Pektine<sup>2</sup> dagegen zu den löslichen NSP. So liegt beispielsweise die Verdaulichkeit unlöslicher NSP aus Weizen- bzw. Haferflocken im porcinen Dickdarm zwischen 46 bis 86 %, die der löslichen NSP bei über 92 % im Darmtrakt (*Bach Knudsen & Canibe* 1997).

---

<sup>1</sup> **Cellulose:** Cellulose ist im Pflanzenreich die am häufigsten vorkommende Gerüstsubstanz. Cellulose ist ein lineares, unverzweigtes Makromolekül, welches aus bis zu 10000 1,4- $\beta$ -glykosidisch verbundenen Glucosemonomeren besteht. Lange Ketten aus Glucosemolekülen aggregieren und bilden kristalline Strukturen, die als Mikrofibrillen bezeichnet werden. Diese Mikrofibrillen sind Bestandteil pflanzlicher Zellwände und werden von einer Matrix anderer Zellwandbestandteile wie Hemicellulosen und Pektinen umgeben (*Thomas* 1980, *Theander et al.* 1989).

<sup>2</sup> **Pektine:** Pektine sind komplexe Polysaccharide und kommen vorwiegend als Calcium- oder Magnesiumsalze in Primärwänden und Mittellamellen in Zellwänden von zweikeimblättrigen Pflanzen vor (*Aspinall* 1970, *Selvendran* 1984). Obst und Gemüse zählen zu den pektinreichen Nahrungsmitteln, während nur geringe Pektingehalte in Getreiden und Leguminosen nachzuweisen sind (*Drochner et al.* 2004). Nebenprodukte aus der Lebensmittelindustrie wie Apfeltrester oder Citruschalen enthalten bis zu 72-88 % Pektine in der Fasertrockensubstanz (*Thibault & Ralet* 2001).

## 2.5.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften der Ballaststoffe

### 2.5.2.1 Wasserbindungskapazität

Die Wasserbindungskapazität hängt von der Partikelgröße, der Partikelstruktur sowie der chemischen Zusammensetzung des Präparates ab (*Rey & Labuza 1981, Wallingford & Labuza 1983*). Während Cellulose Wasser aufgrund des faserhaltigen Grundgerüsts mit feinen kapillarartigen Hohlräumen bindet, bilden lösliche Ballaststoffe kolloidale Lösungen oder Gele und verändern die Fließeigenschaften (rheologische Verhalten) und die Viskosität von Lösungen. Die Fähigkeit, Gele auszubilden, hängt von der Länge der Polymere, der freien Beweglichkeit der Seitenketten, der Verknäuelung und der intermolekularen Vernetzung ab (*Huth et al. 1980, Schulze & Bock 1993*). Die durch die Wasserbindung bedingte Quellung von Ballaststoffen führt zur Volumen- und Gewichtsvergrößerung des Chymus bzw. der Faeces, was sich u. a. auf die Magen- und Darmmotilität und damit auf die Transitzeit des Chymus durch den GIT auswirken kann (*Thomas 1980, Bach Knudsen 2001, Elmadfa & Leitzmann 2004*).

### 2.5.2.2 Adsorptionseigenschaften

Eine weitere physiko-chemische Eigenschaft von Ballaststoffen ist die Fähigkeit zur Bindung organischer Stoffe, wobei das Adsorptionsvermögen löslicher Ballaststoffe (Pektine) weitaus höher ist als das der unlöslichen Ballaststoffe (Cellulose). Beispielsweise werden Gallensäuren und Cholesterin an Pektine gebunden und so dem enterohepatischen Kreislauf entzogen (*Birkner & Kern 1974, Selvendran et al. 1987, Elmadfa & Leitzmann 2004*).

Aufgrund der funktionellen Gruppen (beispielsweise die Carboxylgruppen der Uronsäuren bei Pektinen) sind einige Ballaststoffe in der Lage, Kationen wie Eisen, Calcium, Kupfer und Zink zu binden (*Elmadfa & Leitzmann 2004*). Die Kationen-Austausch-Kapazität der Pektine ist u. a. vom pH-Wert, der Löslichkeit,

der Anzahl freier Carboxylgruppen und vom Veresterungsgrad abhängig (Zelter 1999, Drochner *et al.* 2004).

#### 2.5.2.3 Fermentierbarkeit

Der überwiegende Teil der Ballaststoffe - insbesondere NSP, resistente Stärke und nicht verdauliche Oligosaccharide - wird aufgrund der schlechten Löslichkeit bzw. des Fehlens endogener Enzyme im Magen und Dünndarm von Monogastriden nicht verdaut und erreicht zusammen mit weiteren nicht verdauten Nahrungsbestandteilen und endogenen Substraten den Dickdarm (Rérat 1978, Jeroch *et al.* 1999, Wenk 2007). Die überwiegend anaerobe Mikroflora des Intestinaltraktes fermentiert diese Substrate hauptsächlich zu flüchtigen Fettsäuren wie Essig-, Propion- und Buttersäure sowie Milchsäure, Ammoniak, Wasserstoff, Methan und Kohlendioxid. Der Grad und die Geschwindigkeit des Abbaus werden u. a. durch den Ballaststofftyp (z. B. Lignifizierungsgrad, Löslichkeit), die physikalische Form und durch die Darmflora beeinflusst. Die unlöslichen Ballaststoffe wie Cellulose werden nur geringfügig durch mikrobielle Enzyme abgebaut (Bach Knudsen 2001, Elmadfa & Leitzmann 2004), wo hingegen lösliche Ballaststoffe wie Pektine zu über 90 % durch die Darmbakterien im Intestinaltrakt fermentiert werden können (Drochner *et al.* 2004). Der Einfluss ballaststoffreicher Diäten/Rationen auf die gastrointestinale Mikroflora und die mikrobiellen Fermentationsprozesse sowie deren physiologischen Auswirkungen auf den Magen- und Darmtrakt werden im folgenden Kapitel näher betrachtet.

#### 2.5.3 Wirkungen von Ballaststoffen im GIT von Monogastriden

Da die vorliegende Arbeit auf der Hypothese basiert, dass lösliche bzw. unlösliche Ballaststoffe durch Beeinflussung der Magen-Darm-Motilität und damit der Transitzeit des Chymus durch den GIT und/oder aufgrund von Änderungen der

gastrointestinalen Mikroflora die Bioverfügbarkeit der eingesetzten Flavonole beeinflussen könnten, werden im Folgenden nur diese Aspekte näher betrachtet.

#### 2.5.3.1 Magen-Darm-Motilität und Transitzeit

Zahlreiche Human- und Tierstudien haben sich mit den möglichen Auswirkungen der Aufnahme von unterschiedlichsten Ballaststoffquellen und -mengen auf die Magen-Darm-Motilität und damit einhergehenden Veränderungen der Transitzeit der Digesta im GIT beschäftigt. Allerdings sind die Ergebnisse dieser Studien oft widersprüchlich und schwer interpretierbar.

##### 2.5.3.1.1 Magenentleerung

Aufgrund der bereits erläuterten physiko-chemischen Eigenschaften der löslichen und unlöslichen Ballaststoffe wurden in mehreren Studien mögliche Einflüsse auf die Magenentleerung nach Ballaststoffaufnahmen untersucht. Die Ergebnisse der Studien von *Rainbird & Low* (1986a, b) am Schwein zeigten, dass insbesondere die Verfütterung des stark viskositätssteigernden Guar Gums in Höhe von 40 g/kg TM zu einer Diät zu einer verzögerten Magenentleerung der flüssigen Phase der Ingesta führte, während der Trockenmasseabfluss weniger bzw. gar nicht beeinflusst wurde. Die Zulage der gleichen Menge an Citruspektin führte in diesen Studien jedoch zu keiner viskositätsbedingten Verzögerung der Magenentleerung. Der Einsatz natürlicher, löslicher Ballaststoffe wie Haferkleie und -mehl zeigten ebenfalls einen Trend zu einer verzögerten Magenentleerung der flüssigen Phase beim Schwein (*Johansen et al.* 1996). *Guerin et al.* (2001) konnten bei der Verfütterung einer zuckerrübenpulpehaltigen und damit pektinreicher Ration eine verzögerte Magenentleerung sowohl der flüssigen als auch der festen Phase beobachten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier erwähnten Studien, die entweder eine tendenzielle bzw. signifikant verzögerte Magenentleerung nach dem Verzehr löslicher Ballaststoff-Komponenten aufwiesen, konnte in der Studie von *Potkins et al.* (1991) eine Beschleunigung der

Magenentleerung nach der Substitution von Gerste mit Guar Gum oder Pektin beim Schwein (50g/kg Diät TM) beobachtet werden.

Ähnlich kontroverse Ergebnisse zeigten sich auch in Humanstudien. *Flourie et al.* (1985) und *Sandhu et al.* (1987) verzeichneten bei einer Pektinzulage von 10 bis 15 g pro Mahlzeit eine Verzögerung in der Magenentleerung sowohl nach Aufnahme von flüssigen als auch von festen Mahlzeiten. Keinen Einfluss auf die Magenentleerung konnte bei der Aufnahme von 4,5 g Guar Gum bei einer halblöslichen niederkalorischen Diät (200 ml) in der Humanstudie von *van Nieuwenhoven et al.* (2001) beobachtet werden.

Unlösliche Ballaststoffe wie Cellulose oder Weizenkleie üben in der überwiegenden Anzahl der betrachteten Studien kaum bzw. keine signifikanten Effekte auf die Magenentleerung aus (*Rainbird & Low* 1986b, *Wilfahrt et al.* 2007). Abweichend von diesen Ergebnissen zeigte sich in der Studie von *Guerin et al.* (2001) nach Aufnahme von Weizenkleie eine signifikant schnellere Magenentleerung, und der Einsatz von aufgereinigter Cellulose äußerte sich in einer verzögerten Magenentleerung der festen und flüssigen Phase der Digesta beim Schwein

Grundsätzlich lässt sich aus den Beobachtungen schließen, dass nicht allein der Gehalt an löslichen Ballaststoffen in einer Diät, sondern Faktoren wie Textur und Menge der aufgenommenen Mahlzeit, Partikelgröße und andere Nahrungsbestandteile (z. B. Lipide) in der Diät/Ration einen Einfluss auf die Magenentleerung ausüben (*Johansen & Bach Knudsen* 1994).

#### 2.5.3.1.2 Einfluss auf die Transitzeit der Digesta durch den Dün- und Dickdarm

Auch hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung auf die intestinalen Transitzeiten in Dün- und Dickdarm nach der Aufnahme ballaststoffreicher Diäten liegen unterschiedliche Studienergebnisse vor. Die überwiegende Anzahl der Untersuchungen zeigen bei steigenden Zulagen unlöslicher Ballaststoffe wie Weizenkleie eine Minderung der durchschnittlichen Retentionszeit der Digesta im porcinen Darmtrakt (*Potkins et al.* 1991, *Le Goff et al.* 2002, *Wilfahrt et al.* 2007).

Auch auf den gesamten Magen- und Darmtrakt bezogen tendieren steigende Gehalte von Weizenfaser dazu, die Passagerate der Digesta zu beschleunigen. Im Gegensatz hierzu ergaben die Untersuchung von *Owusu-Asiedu et al.* (2006), dass der Einsatz von 7 % Cellulose zu einer Diät die Passagerate der Digesta durch den Dünndarm um 18 % signifikant verlängerte. Bezogen auf den gesamten GIT hatte Cellulose jedoch keinen Einfluss auf die totale Retentionszeit der Digesta im Vergleich zur Kontrolldiät.

Bei der Betrachtung möglicher Effekte löslicher Ballaststoffkomponenten auf die Transitzeit ergab die Zulage von Zuckerrübenpulpe zu einer Schweineration keine Auswirkungen (*Le Goff et al.* 2002). *Stasse-Wolthuis et al.* (1980) verglichen in ihrer Humanstudie u. a. ebenfalls den Einsatz pektinreicher Nahrungsmittel (Gemüse, Früchte) vs. isoliertem Citruspektin (9 g/Tag) mit identischen Gehalten an Polygalakturonsäuren. Die Gemüse-Früchte-Diät verkürzte die durchschnittliche intestinale Transitzeit um 13 Stunden, wohingegen die Aufnahme des isolierten Citruspektins keinen Einfluss auf die Transitzeit hatte. Auch *Hillman et al.* (1983) konnten keine signifikante Beeinflussung der Transitzeit nach der Aufnahme von 12 g isoliertem Citruspektin pro Tag beobachten. Einen Überblick über mögliche Effekte verschiedener Ballaststoffquellen auf den GIT beim Tier ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab. 2: mögliche Effekte verschiedener Ballaststoffquellen auf den GIT (modifiziert nach *Wenk* 2007)

mögliche Effekte verschiedener Ballaststoffquellen auf den GIT				
Ballaststoff-Quelle	verzögerte Magenentleerung	Sättigung	Verkürzung der faecalen Transitzeit	steigende mikrobielle Aktivitäten
Cellulose	*	*	***	-
Pektin/Guar	****	***	*	****
Früchte/Gemüse	**	**	*	****
Unlösl. B.	*	*	****	*
- keinen Einfluss	* gering	** mittel	*** relevant	****erheblich

Abschließend ist anzumerken, dass die Digestapassage durch den gesamten GIT hauptsächlich durch die Retentionszeit im Dickdarm determiniert wird, welche von der Abbaubarkeit, der Wasserbindungskapazität der noch nicht abgebauten Faserbestandteile und der mikrobiellen Masse abhängig ist (*Mosenthin et al.* 2001).

#### 2.5.4 Intestinale Mikroflora

Die Mikroflora schützt den GIT u. a. vor der Besiedlung pathogener Keime, stimuliert das intestinale Immunabwehrsystem und liefert aus Fermentationsprozessen unverdaulicher Nahrungsbestandteile und endogenen Substanzen Nährstoffe bzw. organische Verbindungen wie die kurzkettige Fettsäuren Essig-, Butter- und Propionsäure sowie Milchsäure, Aminosäuren und Vitamine für den Wirt. Ebenfalls entstehen während des Fermentationsprozesses geringe Gehalte an Succinat, Formiat, verschiedene Gase (Wasserstoff, Kohlendioxid, Methan, Schwefelwasserstoff, Ammoniak) und Wärme (*Macfarlane & Gibson* 1997, *Stevens & Hume* 1998, *Snel et al.* 2002).

Zu den obligaten Darmkeimen beim Schwein zählen *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, Keime der *Bacteroides-Prevotella-Porphyrromonas*-Gruppe, *Bifidobacterium spp.* und *Clostridium spp.* (*Beckmann & Ruffer* 1999). Prinzipiell ist eine steigende Besiedlungszunahme vom proximalen zum distalen Darmtrakt festzustellen. Im Magen und proximalen Dünndarm werden lediglich  $10^3$  bis  $10^5$  KBE/g Digesta vorgefunden, wohingegen die Keimzahlen im Caecum und Kolon die höchsten Werte mit ca.  $10^{10}$  -  $10^{12}$  Keime/g Darminhalt mit mehr als 500 verschiedenen Spezies erreichen (*Moore et al.* 1987). Auch der GIT des Menschen, im Besonderen das Kolon, ist von einer Vielzahl von Mikroorganismen besiedelt. Den überwiegenden Anteil der Mikroflora bilden Bakterien mit ebenfalls über 500 verschiedenen Spezies und erreichen im Kolon bis zu  $10^{12}$  KBE/g Darminhalt. Zu den vorherrschenden Gattungen der bis zu 99 % anaeroben Bakterien zählt man *Bacteroides*,

*Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus* und *Fusobacterium* (Berg 1996, Salminen et al. 1998, Bourlioux et al. 2003).

#### 2.5.4.1 Beeinflussung der mikrobiellen Dichte und -Zusammensetzung durch die Aufnahme von Ballaststoffen beim Schwein

Die Mikrobiota wird in ihrer Zusammensetzung und Funktion u. a. durch die Verfügbarkeit von Substanzen, den pH-Wert, die Temperatur, das Redoxpotential, die Osmolarität und mikrobielle Interaktionen beeinflusst (Pluske et al. 2001). Die Mikroflora kann hinsichtlich ihrer Dichte und Zusammensetzung ebenfalls durch die Zulage von Ballaststoffen in Diäten bzw. Rationen modifiziert werden. Varel & Pond (1985), Moore et al. (1987), und Varel et al. (1988) konnten eine Modulation der bakteriellen Flora durch die Verfütterung ballaststoffreicher Diäten (Luzernemehl) verzeichnen, welche sich in einem Anstieg der cellulolytischen Bakterienpopulationen, die bis zu 10 % der gesamten Mikroflora ausmachten und hauptsächlich durch *Bacteroides succinogenes* und *Ruminococcus flavefaciens* im Dickdarm wachsender Schweine repräsentiert wurden, manifestierte. Owusu-Asiedu et al. (2006) berichten, dass eine zusätzliche Aufnahme von Guar Gum einen Anstieg der Gesamtzahlen der Anaeroben und der Aeroben, *Lactobacilli*, *Enterobacteria* und *Clostridia* und der *Bifidobacteria* und *Enterococci* verursachen. Im Gegensatz dazu führte der Einsatz von Cellulose zu einem Anstieg der Populationen der *Bifidobacteria* und der *Enterobacteria* und der Gesamtzahl der Anaeroben und *Enterococci*, jedoch nicht der Aeroben, *Lactobacilli* und *Clostridia*. Gleichzeitig konnte mit dem Anstieg cellulolytischer Bakterien auch eine gesteigerte Aktivität dieser Spezies festgestellt werden (Varel et al. 1982, 1984, Varel 1987). Jensen & Jørgensen (1994) untersuchten die mikrobiellen Aktivitäten anhand der ATP-Konzentrationen, des AEC-Wertes (Adenylate Energy Charge)<sup>3</sup> und des pH-Wertes im Verdauungstrakt. Die Tiere, die eine ballaststoffreichere (Erbsenfaser) Diät erhielten, zeigten eine gesteigerte

---

<sup>3</sup> Der AEC-Wert ist definiert als  $(ATP + 0.5 ADP) / (ATP + ADP + AMP)$  und beschreibt den Umsatz von ATP (Atkinson & Walton 1967)

mikrobielle Aktivität im Vergleich zu den Tieren, die eine ballaststoffarme, auf Stärke basierende Diät erhielten. Im Caecum und Kolon waren die höchsten mikrobiellen Aktivitäten (hohe AT-Konzentration und AEC-Wert, niedriger pH-Wert) zu verzeichnen. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Fermentation, insbesondere von unlöslichen Ballaststoffen überwiegend im Caecum und Kolon stattfindet. Ein Anstieg der Gesamtzahl an Mikroorganismen/g TM in Faeces konnte nicht beobachtet werden.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Bioverfügbarkeitsstudien am Schwein

#### 3.1.1 Versuchstiere und Fütterung

Die Studie wurde mit insgesamt 18 männlich kastrierten Hybridschweinen (DL × DE; Versuchsgut Hohenschulen der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) mit einem Anfangsgewicht von  $20,9 \pm 0,5$  kg in drei aufeinander folgenden Durchgängen mit jeweils 6 Schweinen durchgeführt. Die Tiere wurden in Einzelbuchten ohne Einstreu bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 - 70 % und einer Raumtemperatur von 22 bis 24 °C gehalten. Nach einer fünftägigen Eingewöhnungsphase, in der die Tiere ein handelsübliches Schweinmastfutter (Schweinmastfutter Kombi, J. Aug. Plambeck, 24582 Brügge) erhielten, wurden die Tiere in drei Fütterungsgruppen mit gleichen mittleren Körpermassen eingeteilt. Die Grundlage der drei Rationen stellte das o. g. kommerzielle Schweinmastfutter dar, welches im Wesentlichen aus Weizen, Gerstenfuttermehl, Roggenkleie, Gerste, Raps- und Sojaextraktionsschroten bestand. Die Kontrollgruppe (SMF) erhielt ausschließlich das o. g. Schweinmastfutter. Den beiden anderen Diäten wurden zusätzlich zum Schweinmastfutter 10 % Citrusfaser (CF) (Herbacel AQ Plus Citrus Fibre-F, Herbafood Ingredients GmbH, Werder) bzw. 10 % Weizenfaser (WF) (Vitacel<sup>®</sup> Weizenfaser WF 400, J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co. KG, Rosenberg) als gereinigte Faserquellen zugesetzt. Die Fütterung der Tiere erfolgte zweimal täglich (7:00 und 16:00 Uhr) bei restriktiver Futterzuteilung (80 % der *ad libitum*-Futteraufnahme), um ein zu schnelles Wachstum während des Versuches zu verhindern und um die vollständige Aufnahme der entsprechenden Versuchsdieten zu gewährleisten.

Nach analytischen Untersuchungen und Angaben der Hersteller enthielt die Citrusfaser einen Ballaststoffgehalt von 88 - 93 %, wovon 20 % auf lösliche Ballaststoffe entfielen. Die Weizenfaser wies einen Ballaststoffgehalt in Höhe von

97 % auf, wovon 95 % auf die unlöslichen Ballaststoffe entfielen. Die unlöslichen Ballaststoffe der Weizenfaser setzten sich aus 74 % Cellulose, 26 % Hemicellulose und maximal 0,5 % Lignin zusammen.

Die eigenen Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung der eingesetzten Rationen (Tab. 3) und der einzelnen Faser-Komponenten (Tab. 4) erfolgte mittels Weender-Futtermittelanalyse und nach der Methode von *Van Soest et al.* (1991).

Tab. 3: Chemische Zusammensetzung der Versuchsdieten (% der Trockenmasse)

	SMF <sup>1)</sup>	CF <sup>2)</sup>	WF <sup>3)</sup>
Rohprotein	19,04	17,69	17,17
Rohfett	2,40	2,18	2,18
Rohasche	5,66	5,27	5,15
Rohfaser	6,00	11,07	13,12
NDF <sup>4)</sup> aschefrei	23,20*	28,40	30,73
ADF <sup>5)</sup>	10,13	15,67	17,86
Stärke	37,83	34,20	34,09

weitere Inhaltsstoffe des Schweinemastfutters: 0,50 % Phosphor, 0,70 % Calcium, 0,15 % Natrium, 0,90 % Lysin. Zusatzstoffe: 10.000 I. E. Vitamin A, 1.200 I. E. Vitamin D<sub>3</sub>, 80 mg  $\alpha$ -Tocopherolacetat, 15 mg Kupfer, 500 FTU-3-Phytase; Umsetzbare Energie: 12,6 MJ ME/kg.

\* mit Termamyl-Behandlung

<sup>1)</sup> SMF = 100 % Schweinemastfutter (Kontrollration)

<sup>2)</sup> CF = 100 % SMF + 10 % Citrusfaser

<sup>3)</sup> WF = 100 % SMF + 10 % Weizenfaser

<sup>4)</sup> NDF = Neutral Detergent Fiber (Cellulose, Lignin, Hemicellulose)

<sup>5)</sup> ADF = Acid Detergent Fiber (Cellulose, Lignin)

Tab. 4: Chemische Zusammensetzung der eingesetzten Citrus- bzw. Weizenfaser (% der Trockenmasse)

	Citrusfaser	Weizenfaser
Rohprotein	5,49	0,35
Rohfett	0,22	0,15
Rohasche	1,71	0,57
Rohfaser	56,68	77,16
NDF <sup>1)</sup> aschefrei	75,16	98,52
ADF <sup>2)</sup>	65,57	87,41
Stärke	1,51	0,39

<sup>1)</sup> NDF = Neutral Detergent Fiber (Cellulose, Lignin, Hemicellulose)

<sup>2)</sup> ADF = Acid Detergent Fiber (Cellulose, Lignin)

Nach einer zweiwöchigen Adaptionphase wurde jedem Tier durch eine erfahrene Operateurin ein Verweilkatheter (einlumiger Katheter der Firma COOK<sup>®</sup>, C-TPN-9.5-90-REDO) in die *Vena jugularis* implantiert, um eine stressfreie Blutprobenentnahmen zu ermöglichen. Die Tiere wurden zunächst sediert und für die Narkose-Infusion (1000 mg Ketamin + 200 mg Azaperon ad 500ml NaCl Infusionslösung) ein Venenverweilkatheter in eine Ohrvene installiert. Das Operationsgebiet wurde zusätzlich lokal anästhesiert (10 ml Lidocain 2%). Unter möglichst sterilen Bedingungen erfolgte die stumpfe Präparation der *Vena jugularis*. Der Katheter wurde nach Eröffnen der Jugularvene und Ligatur des cranialen Gefäßabschnittes so weit in Richtung caudal eingeführt, dass sein Ende in der *Vena cava cranialis* im Bereich vor dem rechten Vorhof zum liegen kam. Der Katheter wurde im Gefäß und im umliegenden Gewebe befestigt, bevor er subkutan zwischen die Schulterblätter geführt wurde. Systemisch erfolgte eine prophylaktische Antibiose sowie Analgetikatherapie über 3 Tage und die Wunde wurde mit antiseptischem Sprühverband und Wundauflage versorgt. Zum Schutz der Wunde und des Katheters wurde den Tieren ein Mäntelchen aus Segeltuch mit Klettverschluss-Öffnungen für den Zugang zu den Kathetern angelegt. Um die Durchgängigkeit der Katheter zu gewährleisten, wurden diese dreimal täglich mit einer heparinisierten isotonischen Kochsalzlösung (500 I. E. Heparin-Na/ml 0,9 % NaCl) gespült. Wasser stand den Tieren über Nippeltränken zur freien Aufnahme zur Verfügung.

### 3.1.2 Versuchsdurchführung

Nach einer einwöchigen Rekonvaleszenz im Anschluss an die Operation wurde den Tieren mit einer morgendlichen Testmahlzeit (200 g der entsprechenden Diäten) eine einmalige Dosis der Testsubstanz (Quercetinaglykon bzw. Rutin) verabreicht. Jedes Tier erhielt beide Quercetinquellen in einem zeitlichen Abstand von 24 Stunden, um eine vollständige bzw. weitgehende Elimination nach oraler Applikation zu gewährleisten (Ader et al. 2000). Die Dosierung des

Quercetinaglykons bzw. Rutins (50 mg Quercetinaglykon/kg KGW bzw. 101 mg Rutin/kg KGW) wurde so gewählt, dass jeweils eine äquimolare Dosis von Quercetin (165,4  $\mu\text{mol/kg KGW}$ ) aufgenommen wurde. Die erste Blutentnahme erfolgte unmittelbar vor der Aufnahme der Testmahlzeit (Zeitpunkt  $t = 0$ ). Bis zum Zeitpunkt  $t = 300$  min erfolgte die Blutentnahme in halbstündigem Abstand. Weitere Blutproben wurden zu den Zeitpunkten 360, 480, 720 und 1440 min entnommen. Bei jeder Blutentnahme wurden die ersten 2-3 ml Blut über den Katheter verworfen. Im Anschluss wurden 8 ml Blut entnommen und in Li-Heparinröhrchen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) überführt. Durch sofortige Zentrifugation (Zentrifuge: 3K12, Sigma) für 10 min bei  $2000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  wurde das Plasma gewonnen, aliquotiert (2 ml) und bei  $-70^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Analyse gelagert. Das entnommene Blutvolumen wurde durch isotonische Kochsalzlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) ersetzt und abschließend 2 ml heparinisierte isotonische Kochsalzlösung (500 I. E. Heparin-Na/ml NaCl) in den Katheter instilliert, um Gerinnungsprozesse im Katheter zu vermeiden.

### 3.1.3 Analytik

#### 3.1.3.1 Futtermittelanalysen

Die Trockenmassebestimmungen und Rohnährstoffanalysen erfolgten nach der Weender-Futtermittelanalyse gemäß den VDLUFA-Methoden (Naumann & Bassler 1976). Die Analysen der NDF-, ADF- und ADL-Gehalte wurden nach der Methode von Van Soest *et al.* (1991) durchgeführt. Des Weiteren wurden die eingesetzten Rationen auf einen möglichen Flavonoidgehalt nach der analytischen Methode von Hertog *et al.* (1992b) untersucht. Die Futterkomponenten wiesen keine nennenswerten Gehalte an Quercetin auf (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.3.2 Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung der Plasmaproben erfolgte in modifizierter Form nach *Morand et al.* (2000). 980 µl der aufgetauten Plasmaproben wurden mit 130 µl Essigsäure (0,583 mol/l) versetzt, um das pH-Optimum (4,5 - 6,2) der eingesetzten β-Glucuronidase/Sulfatase (Type H-1 aus *Helix pomatia*, 7300 bzw. 130 U/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) einzustellen. Da mit der verwendeten HPLC-Analysemethode Konjugate von Quercetin und der zu erwartenden Metaboliten nicht direkt erfasst werden, wurden den angesäuerten Proben 75 µl der o. g. Enzymmischung zugeführt, um konjugierte Formen vollständig in Aglyka zu überführen. Als interner Standard wurde dem Gemisch 20 µl einer methanolischen Rhamnetinlösung (1 mg/20 ml Methanol; Rotichrom<sup>®</sup> HPLC, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) hinzugefügt. Nach gründlicher Durchmischung (Vortex) des Ansatzes wurde dieser für 60 min in einem 37 °C warmen Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden durch Zusatz von 3 ml Aceton (J.T. Baker, Deventer, Holland) lösliche Proteine präzipitert und die Proben zunächst für 20 min auf einem Horizontalschüttler gründlich durchmischt und anschließend für 45 min bei 4000 × g und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge: 5810 R, Eppendorf). Der Überstand wurde bei 45 °C und einem partiellen Vakuum bis zur Trockene eingedampft (SPD 2010 SpeedVac<sup>®</sup> System). Die Proben wurden durch Zugabe von 200 µl Methanol (J.T. Baker, Deventer, Holland) resuspendiert und für 15 min in ein Ultraschallbad verbracht. Im Anschluss wurden 77,5 µl Aqua bidest und 22,5 µl HCl (32 %, Merck KGaA, Darmstadt) zugegeben und die unlöslichen Bestandteile mittels einer Tischzentrifuge (Zentrifuge: 5415 C, Eppendorf) bei 14.000 U/min abzentrifugiert. Vom verbliebenen Überstand wurden 200 µl für die HPLC-Analyse verwendet.

### 3.1.3.3 HPLC-Methode

Zur Trennung und Darstellung des in den Plasmaproben enthaltenen Quercetins und seiner methylierten Metaboliten Isorhamnetin und Tamarixetin wurde eine

leicht modifizierte Form der Methode von *Hollmann et al.* (1996a) verwendet. Hierbei nutzt man die Fähigkeit der Flavonole, mit dreiwertigen Aluminiumionen fluoreszierende Komplexe zu bilden. Über einen Autosampler (AS-2057 Plus, Jasco, Gross Umstadt, Deutschland) wurden jeweils 30 µl der Proben in die HPLC-Anlage injiziert. Als stationäre Phase diente eine „Reversed-Phase“-Trennsäule (C-18 Kromasil 100, 250 × 4 mm, Partikelgröße: 5 µm, Jasco), welcher eine Vorsäule (C-18 Inertsil ODS-2, 10 × 4 mm, Partikelgröße: 5 µm, Jasco) vorgeschaltet war. Die mobile Phase bestand aus einem Gemisch aus Natrium-Dihydrogen-Phosphat-Monohydrat-Puffer (0,025 mmol/l, pH 2,4; Merck KGaA, Darmstadt), Acetonitril (J.T. Baker, Deventer, Holland) und Methanol in einem Volumenverhältnis von 68:27:5. Der pH-Wert des Fließmittels lag bei 2,9 und die Flussrate betrug 1 ml/min. Die Nachsäulenderivatisierung (Komplexierung mit Al<sup>3+</sup>) erfolgte in einem Kapillarreaktor (geflochtene Teflonkapillare, Innendurchmesser 0,5 mm, Länge 3 m) mittels einer methanolischen Aluminiumnitratlösung (1 mmol/l Aluminiumnitrat in 7,2 %iger Essigsäure; Fluka, Taufkirchen), die mit einer Flussrate von 0,4 ml/min über ein „low-dead-volume“-T-Mischstück zugeführt wurde. Säulen und Reaktor waren in einem 30 °C warmen Säulenofen untergebracht. Die Detektion der gebildeten Komplexe erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (920-FP, Jasco) bei einer Anregungswellenlänge von 422 nm und einer Emissionswellenlänge von 485 nm. Die Identifikation der Flavonole erfolgte anhand der Retentionszeiten durch den Vergleich mit entsprechenden Standardsubstanzen. Die Peakflächen wurden mit Hilfe der Borwin Chromatography Software (Version 1.50, Jasco Co. Ltd., Japan) ausgewertet.

#### 3.1.3.4 Kalibrierung, Nachweisgrenze und Wiederfindung

Zur Erstellung der Eichgeraden (Abb. 6) für Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin (Rotichrom<sup>®</sup> HPLC, Carl-Roth GmbH, Karlsruhe) wurden 960 µl natives Schweineplasma mit 20 µl der jeweiligen methanolischen Standardlösung, welche alle drei Substanzen enthielt, versetzt. Zusätzlich wurden auch hier 20 µl

des internen Standards Rhamnetin zugegeben. Um vergleichbare Bedingungen wie im Versuchsansatz zu schaffen, erfolgte die Aufarbeitung auf exakt dieselbe Weise wie bei den Plasmaproben aus den Versuchen (s. 3.1.3.2). Das für die Standardreihen verwendete Plasma enthielt keine nachweisbaren Mengen der relevanten Flavonole. Die Auswertung erfolgte anhand der relativen Peakflächen, wobei für die Berechnung der Quercetin- bzw. Isorhamnetingehalte die relativen Flächen (Fläche Quercetin bzw. Isorhamnetin/Fläche Rhamnetin) genutzt wurde. Die Berechnung der Tamarixetinkonzentration in den Proben erfolgte dagegen anhand der absoluten Peakflächen von Tamarixetin, da Tamarixetin im Vergleich zu Quercetin, Isorhamnetin und Rhamnetin (die eine vergleichbare Stabilität bei der Probenaufarbeitung zeigen) wesentlich stabiler ist und daher Rhamnetin in diesem Fall als interner Standard ungeeignet ist. Für jede der drei Substanzen ergab sich eine lineare Konzentrationsabhängigkeit (Abb. 6). Die Wiederfindung der verwendeten Testsubstanzen aus nativen Schweineplasma betrug für Quercetin 83 bzw. 101 %. Die Wiederfindung für Isorhamnetin und Tamarixetin betrugen 87 bzw. 83 %. Die Nachweisgrenze der Flavonole lag bei 0,01  $\mu\text{mol/l}$  Plasma. Es wurden lediglich Peaks ausgewertet, die mindestens fünfmal so hoch wie der Mittelwert des „Basisrauschens“ waren.

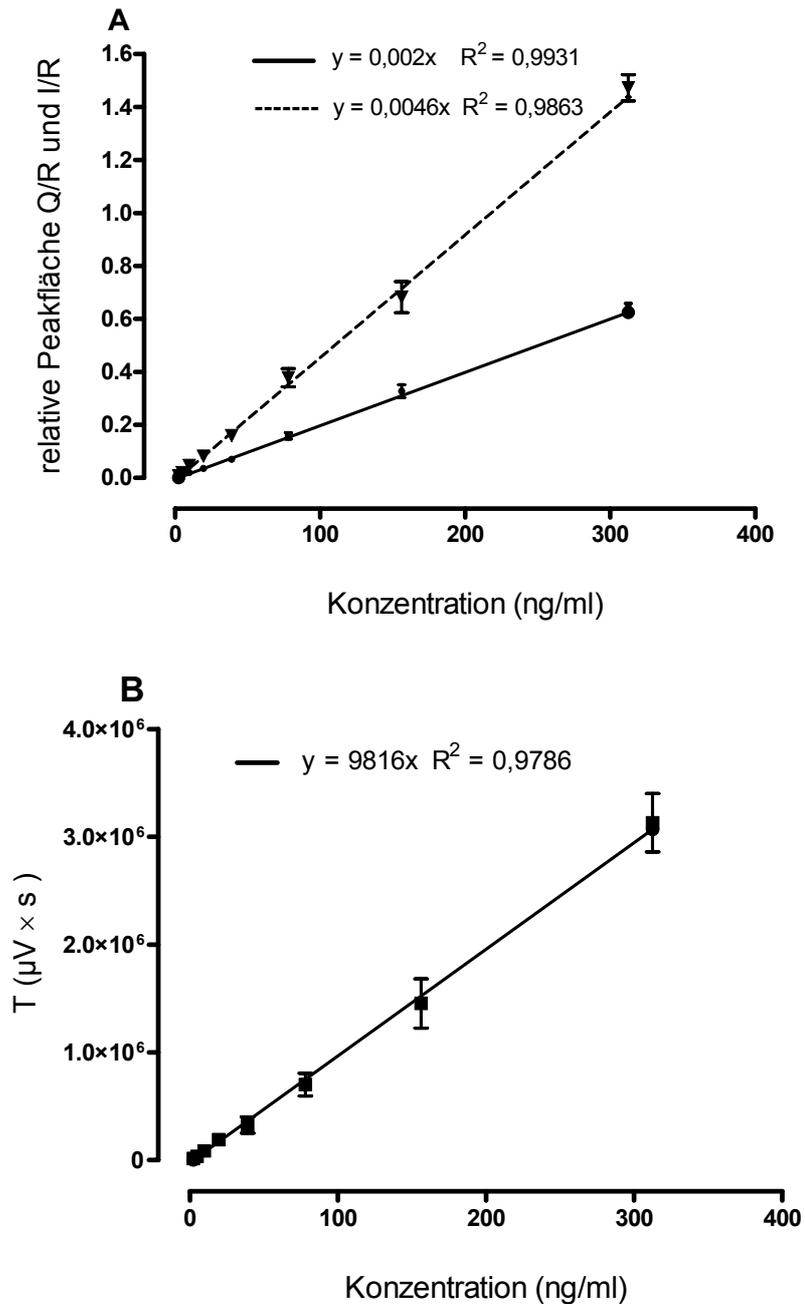


Abb. 6: Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von (A) Quercetin (durchgezogene Linie) und Isorhamnetin (gestrichelte Linie) und (B) Tamarixetin. Mittelwerte und Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. ( $R^2$  = Bestimmtheitsmaß; Q/R = Peakfläche Quercetin/Peakfläche Rhamnetin; I/R = Peakfläche Isorhamnetin/Peakfläche Rhamnetin; T = Tamarixetin)

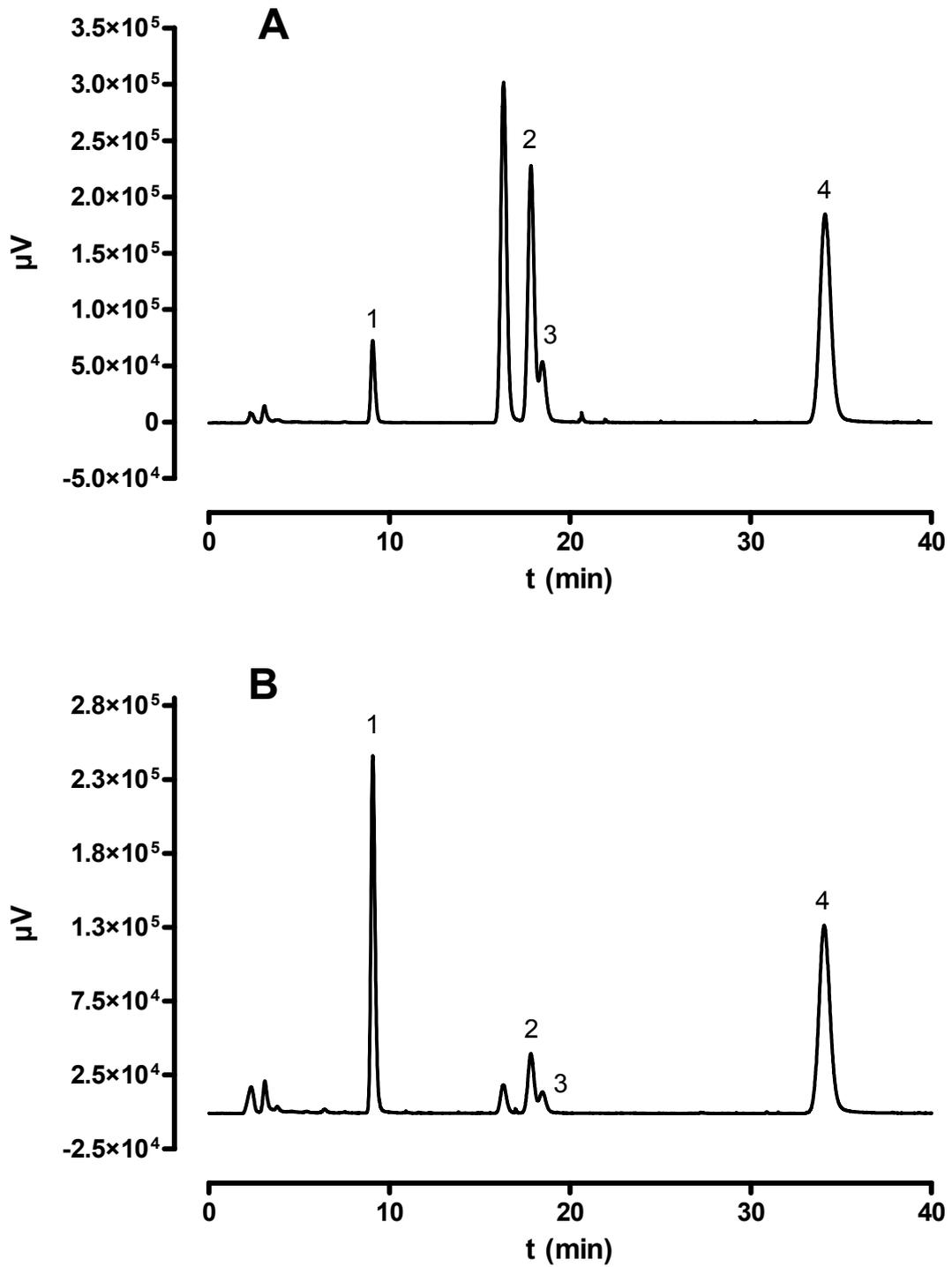


Abb. 7: Chromatogram eines Standards (A) und einer Plasmaprobe (B) vom Schwein aus der SMF-Gruppe 150 min nach Verabreichung von  $165,4 \mu\text{mol}$  Quercetin/kg KGW als Aglykon.

1 = Quercetin, 2 = Isorhamnetin, 3 = Tamarixetin, 4 = Rhamnetin als interner Standard

### 3.1.4 Pharmakokinetische Parameter

#### 3.1.4.1 Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC)

Die Bioverfügbarkeit gehört zu den beschreibenden Parametern in der Pharmakokinetik. Sie ist eine Messgröße für den Anteil eines Wirkstoffes, der in die systemische Zirkulation gelangt und wird anhand der Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC) mittels der Trapezregel berechnet. Folgende Formel lag den Berechnungen zugrunde:

$$\text{Trapezfläche} = (t_{n-1} - t_n) \times (c_n + c_{n+1}) / 2$$

Durch Addition aller Trapezflächen unter einer Plasmaspiegelkurve, die sich über einen Zeitraum von 0 bis 24 h erstreckte, erhält man die Gesamtfläche ( $AUC_{(0-24h)}$ ). Durch Addition der Einzel-AUCs von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin erhielt man die Gesamt-AUC:

$$\text{Gesamt-AUC} = AUC_{\text{Quercetin}} + AUC_{\text{Isorhamnetin}} + AUC_{\text{Tamarixetin}}$$

Die Berechnung der AUCs und die graphische Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurven erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms GraphPadPrism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, Version 4.01).

#### 3.1.4.2 Relative Bioverfügbarkeit

Zur Berechnung der Relativen Bioverfügbarkeit wurden die Gesamt-AUCs (s. o.), die nach Applikation des Rutins bzw. nach Quercetinaglykon-Applikation in der CF- und WF-Fütterungsgruppen erhalten wurden, auf die Gesamt-AUC nach Quercetinaglykon-Applikation in der SMF-Ration bezogen, die als 100 % gesetzt wurde.

## 3.2 *In vitro*-Fermentationsstudien mit Schweinefaeces als Inokulum

### 3.2.1 Versuchstiere und Diäten

Jeweils im Anschluss an den zweiten und dritten Durchgang der Bioverfügbarkeitsstudien (s. 3.1) wurden Kotproben von insgesamt 12 Tieren für die nachfolgend beschriebene *in vitro*-Fermentationsstudie gesammelt. Die Tiere erhielten durchgehend die gleichen Rationen (s. 3.1.1) und die Fütterung erfolgte weiterhin zweimal täglich (7:00 und 16:00 Uhr) bei restriktiver Futterzuteilung. Die Versuchstiere erreichten zum Zeitpunkt der Kotprobenentnahmen ein durchschnittliches Lebendgewicht von  $25,1 \pm 0,6$  kg.

### 3.2.2 Simulierte Magen-Dünndarm-Verdauung

Die *in vitro*-Fermentationsstudien mit Schweinefaeces als Inokulum wurden nach der Methode von *Bindelle et al.* (2007) durchgeführt. Als Substrate wurden die unter Abschnitt 3.1.1 vorgestellten Rationen verwendet. Vor der eigentlichen Fermentation wurden zur Simulierung von Verdauungsvorgängen im Magen- und Darmtrakt die Futtermittel einer Pepsin-Pankreatin-Behandlung nach der Methode von *Boisen und Fernández* (1997) unterzogen. Die entsprechenden Substrate wurden auf 1 mm gemahlen und jeweils 2 g mit 100 ml Phosphatpuffer (0,1 mol/l; pH 6) und 40 ml HCl (0,2 mol/l) in 300 ml-Erlenmeyerkolben verbracht. Die Einstellung des pH-Wertes von 2 erfolgte durch die Zugabe von HCl oder NaOH (Konzentration 1 mol/l). Um das Bakterienwachstum zu unterdrücken wurden den Lösungen 2 ml einer Chloramphenicol-Lösung (0,5 g Chloramphenicol/ 100 ml Ethanol, Sigma C-0378) zugefügt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 4 ml frischer Pepsin-Lösung (71,43 g/l porcines Pepsin; 0,7 FIP-U/mg; Merck KGaA, Darmstadt). Die Kolben wurden verschlossen und für 2 h bei 39 °C in ein leicht schüttelndes Wasserbad inkubiert. Im Anschluss an die Pepsin-Hydrolyse wurden

40 ml eines Phosphatpuffers (0,2 mol/l; pH 6,8) und 20 ml einer NaOH-Lösung (0,6 mol/l) hinzugefügt und ein pH-Wert von 6,8 mittels HCl (1 mol/l) bzw. NaOH (1 mol/l) eingestellt. Des Weiteren wurden 2 ml einer frischen Pankreatin-Lösung (100 g/l Pankreatin; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) zugeführt und die geschlossenen Kolben nochmals für 4 h bei 39 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Filtration durch ein Nylontuch (Porengröße: 50 µm; Ankom Technology, Macedon, NY, USA) mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurden die festen Rückstände mit 2 x 25 ml Ethanol (95 %) und 2 x 25 ml Aceton (99,5 %) gewaschen und für 24 h bei 60 °C im Trockenofen getrocknet. Um genügend Material für die *in vitro*-Fermentationsversuche und die Bestimmung des Rohfasergehaltes (Weender Analyse und der Methode von *Van Soest et al.* 1991) zu erhalten, wurden die Rückstände aus mehreren Vorverdauungsansätzen gepoolt. Tabelle 5 zeigt den Fasergehalt der bei den *in vitro*-Fermentationsversuchen eingesetzten Rationen nach simulierter Magen-Dünndarm-Verdauung.

Tab. 5: Fasergehalte der vorverdauten Rationen<sup>1)</sup> (% der Trockenmasse)

	SMF <sup>2)</sup>	CF <sup>3)</sup>	WF <sup>4)</sup>
Rohasche	7,27	7,43	6,90
Rohfaser	23,47	27,09	28,64
NDF <sup>5)</sup> aschefrei	77,93	78,48	79,59
ADF <sup>6)</sup>	36,39	39,91	40,87

<sup>1)</sup> vorverdauter Rationen durch eine Pepsin-Pankreatin-Behandlung

<sup>2)</sup> SMF = 100 % Schweinemastfutter (Kontrollration)

<sup>3)</sup> CF = 100 % SMF + 10 % Citrusfaser

<sup>4)</sup> WF = 100 % SMF + 10 % Weizenfaser

<sup>5)</sup> NDF = Neutral Detergent Fiber (Cellulose, Lignin, Hemicellulose)

<sup>6)</sup> ADF = Acid Detergent Fiber (Cellulose, Lignin)

### 3.2.3 Inokulum

Zur Herstellung des Inokulums wurde frischer Kot von jedem Tier gesammelt und sofort unter anaeroben Bedingungen in verschließbaren Gefäßen (Best. Nr.: 60.9922.212PC; Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) bis zur weiteren Aufbereitung in einem 39 °C warmen Wasserbad aufbewahrt. Für die Aufarbeitung wurden der Kot eines jeden Tieres innerhalb einer jeden Gruppe unter ständiger CO<sub>2</sub>-Begasung gemixt und 25 g Faeces in Plastikbeutel (Seward Medical Stomacher<sup>®</sup> 400 Bags, London, UK) überführt. 60 ml eines vorgewärmten (39 °C) Inkubationsmediums wurden mit dem Kotgemisch für 60 s intensiv vermischt (Stomacher<sup>®</sup> Lab Blender 400; Seward Medical, London, UK), um faserassoziierte Bakterien in Lösung zu bringen (*Merry & MacAllan* 1983). Das Faecesgemisch wurde durch ein grobes Baumwolltuch in eine vorgewärmte Thermoskanne filtriert und das Filtrat mit Inkubationsmedium auf eine Endkonzentration 0,05 g Faeces/ml Inkubationsmedium eingestellt. Die für das Inkubationsmedium verwendeten Reagenzien (Mengen-, Spuren-, Puffer-, Resazurin- und Reduktionslösungen, Tab. 6) wurden gemäß der VDLUFA-Methoden (*Naumann & Bassler* 1976) beschriebenen Methode zur Bestimmung der Nettoenergie-Laktation-Gasbildung nach dem Hohenheimer Futterwerttest hergestellt. Die für die Reagenzien und Lösungen benötigten Chemikalien wurden von der Firma Merck KGaA aus Darmstadt bezogen. Alle Lösungen wurden mit destilliertem Wasser angesetzt.

Tab. 6: Zusammensetzung des Inkubationsmediums (IM)

	Konzentration	eingesetzte Menge/ Fütterungsgruppe
NaHCO <sub>3</sub>	416 mmol/l	250 ml/l IM <sup>1)</sup>
(NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub>	50,6 mmol/l	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40,2 mmol/l	250 ml/l IM <sup>2)</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub>	45,6 mmol/l	
MgSO <sub>4</sub> × 7 H <sub>2</sub> O	2,4 mmol/l	
Spurenelementlösung <sup>3)</sup>	-	ad. 0,12 ml/l IM
Reduktionslösung <sup>4)</sup>	-	ad. 61,78 ml/l IM
Resazurinlösung <sup>5)</sup>	-	ad. 1,2 ml/l IM

<sup>1)</sup> Pufferlösung

<sup>2)</sup> Mengenelementlösung

<sup>3)</sup> Spurenelementlösung (g/100 ml): 13,2 (CaCl<sub>2</sub> × 2 H<sub>2</sub>O); 10,0 (MnCl<sub>2</sub> × H<sub>2</sub>O); 1,0 (CoCl<sub>2</sub> × 6 H<sub>2</sub>O); 8,0 (FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O)

<sup>4)</sup> Reduktionslösung: 47,5 ml H<sub>2</sub>O; 2 ml NaOH (1 mol/l); 285 mg (Na<sub>2</sub>S × 7 H<sub>2</sub>O)

<sup>5)</sup> Resazurinlösung (mg/100 ml): 100 mg Resazurin

### 3.2.4 *In vitro*-Fermentation

Zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität des Inokulums bzw. der Fermentierbarkeit der vorbehandelten Futterproben wurde der Hohenheimer-Futterwert-Test (HFT) verwendet (Menke & Steingass 1988). Diese Methode erlaubt die Einschätzung der Fermentierbarkeit einer Probe anhand der kumulativen Gasbildung. Von den enzymatisch behandelten Rationen (s. 3.2.2) wurden 200 mg in 39 °C vorgewärmte Kolbenprober überführt und mit jeweils 30 ml des gruppenspezifischen Inokulums (s. o.) versetzt. Die mit Substrat und Inokulum befüllten Kolben werden in einen 39 °C ± 0,5 °C temperierten Rotorschrank verbracht. Die Volumenablesung erfolgte 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 30, 36 und 48 h nach Inkubationsbeginn. Innerhalb einer Versuchsgruppe bzw. Ration wurde eine fünffach- Bestimmung durchgeführt. Zusätzlich wurden von jeder Gruppe drei Ansätze ausschließlich mit 30 ml des entsprechenden Inokulums,

d. h. ohne Substratzusatz, mitgeführt. Die hierbei gebildeten Gasvolumen werden als Blindwerte ( $B_{(t)}$ ) bezeichnet und bei der Ermittlung der Gasvolumen (s. 3.2.5) abgezogen. Das bei der *in vitro*-Fermentation gebildeten Gasvolumen  $V_{\text{corr } (t)}$  (ml/g TM) zum Zeitpunkt  $t$  (h) einer jeden Probe wurden um die Volumina der Inokula und Blindwerte zum Zeitpunkt  $t$  korrigiert und nach folgender Formel berechnet:

$$V_{\text{corr } (t)} = \frac{V_{(t)} - V_0 - B_{(t)} \times V_0}{W}$$

$V_{\text{corr } (t)}$ (ml/g TM)	=	korrigierte Gasvolumen
$V_{(t)}$ (ml)	=	Gesamtvolumen (Inokulum + Gas) zum Zeitpunkt $t$
$V_0$ (ml)	=	Volumen des Inokulums zum Zeitpunkt $t_0$
$B_{(t)}$ (ml Gas / ml Inokulum)	=	durchschnittl. Gasproduktion der Blindwerte zum Zeitpunkt $t$ /ml Inokulum und $W$
$W$ (g TM)	=	Substratmenge

Die maximale, kumulative Gasproduktion sowie die kinetischen Parameter der Gasbildung wurden mittels einer modifizierten Gompertz-Funktion (*Zwietering et al.* 1992) ermittelt. Die Gompertz-Funktion wird zur Modellierung sigmoidaler Wachstumsprozesse verwendet. Das modifizierte Modell unterstellt, dass das Substratangebot das Wachstum in einer logarithmischen Beziehung limitiert (*Schofield et al.* 1994):

$$V = V_F \exp \{-\exp [1 + (\mu_m e / V_F) (\lambda - t)]\}$$

$V$ (ml)	=	kumulative Gasproduktion
$V_F$ (ml)	=	theoretische Maximum der Gasproduktion
$\mu_m$ (ml/h)	=	maximale Rate der Gasproduktion (Wendepunkt im Verlauf der Gasbildungskurve)
$\lambda$ (h)	=	lag-Zeit: Zeit bis zum Beginn der Gasbildung
$t$ (h)	=	Fermentationsdauer

Die Dauer der exponentiellen Phase wurde mit Hilfe der geschätzten Parameter aus der modifizierten Gompertz-Funktion wie folgt ermittelt:

$$\text{exponentielle Phase (h)} = \log \text{ Phase} = V_F / (\mu_m e) \{1 - \ln [3 - \sqrt{5}] / 2\}.$$

Die Zeit vom Beginn der Fermentation bis zur maximalen Rate der Gasproduktion wurde nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zeit vom Zeitpunkt 0 bis zum Wendepunkt (TIP, h)} = \lambda + (\log \text{ Phase} / 2).$$

### 3.3 Statistik

#### 3.3.1 *In vivo*-Bioverfügbarkeitsstudien am Schwein

Die Regressionsgeraden bei der Bestimmung der Eichgeraden (Abb.6) wurden mit Hilfe von *Excel* (Microsoft Office, Version 2003) erstellt. Ergebnisse sind im Allgemeinen als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern dargestellt. Die statistische Auswertung der pharmakokinetischen Parameter AUC,  $c_{\max}$  und  $t_{\max}$  der Einzel- und Gesamtflavonole erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit den Faktoren Diät, Quercetinquelle und deren Interaktion mittels der General Linear Model-Prozedur. Es wurde eine Signifikanzgrenze von  $p < 0,05$  gewählt.

An dieser Stelle sei erwähnt, dass sich im Ergebnisteil die Werte für  $c_{\max}$  und  $t_{\max}$  in den graphischen Darstellungen der Konzentrations-Zeit-Verläufe von den Werten in den Tabellen unterscheiden können. Grund dafür ist, dass bei den Konzentrations-Zeit-Verläufen die Mittelwertskurven, in den Tabellen dagegen die Mittelwerte der individuellen, maximalen Plasmakonzentrationen ( $c_{\max}$ ) dargestellt sind. Dies gilt sinngemäß auch für die Darstellung der  $t_{\max}$ -Werte.

### 3.3.2 *In vitro*-Fermentationsstudien mit Schweinefaeces als Inokulum

Die Kurvenanpassung und die erhobenen Parameter (s. 3.2.5) nach Gompertz wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse und einem anschließendem Vergleich der Gruppenmittelwerte nach Student-Newman-Keuls analysiert. Es wurde eine Signifikanzgrenze von  $p < 0,05$  gewählt. Die statistischen Berechnungen und graphische Darstellung der kumulativen Gasbildung wurden mittels der Programme GraphPadPrism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, Version 4.01) und SAS (SAS Institute, Inc. 8.0) durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Bioverfügbarkeitsstudien

Die im Folgenden dargestellten Konzentrations-Zeit-Verläufe wurden nach enzymatischer Behandlung der Plasmaproben mit  $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase erstellt, da ohne vorhergehende enzymatische Hydrolyse kein freies Quercetin oder freie Quercetinmetabolite im Jugularvenenblut nachgewiesen werden können. Sowohl bei der Aglykon- als auch bei der Rutinapplikation konnten im Plasma neben konjugiertem Quercetin die 3'- und 4'-Methylether des Quercetins Isorhamnetin und Tamarixetin als Metaboliten detektiert werden. Abbildung 8 zeigt die Gesamtflavonolkonzentrations<sup>4</sup>-Zeit-Verläufe nach oraler Applikation der beiden Quercetinquellen Quercetinaglykon (A) und Rutin (B) mit den entsprechenden Diäten (Schweinemastfutter SMF, Citrusfaser CF und Weizenfaser WF) über einen Zeitverlauf von 24 Stunden.

Nach Aufnahme des Aglykons lagen bei den eingesetzten Rationen die maximalen Plasmakonzentrationen ( $c_{\max}$ ) im Bereich von  $1,23 \pm 0,21$  bis  $1,53 \pm 0,15 \mu\text{mol/l}$ . Diese Werte traten  $156 \pm 36$  bis  $215 \pm 31$  min ( $t_{\max}$ ) nach Aufnahme der Testmahlzeiten auf. Weder bezüglich  $c_{\max}$  noch  $t_{\max}$  ergaben sich dabei signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen. Der statistische Vergleich der applizierten Quercetinquellen innerhalb einer Fütterungsgruppe ergab signifikante Unterschiede in allen pharmakokinetischen Parametern ( $p < 0,05$ ). Nach Applikation von Rutin konnte bei allen Diäten erst nach 150 min ein langsamer Anstieg der Gesamtflavonolkonzentration verzeichnet werden. Zudem wurden wesentlich niedrigere Konzentrationen als nach Applikation des Aglykons erreicht. Die maximalen Plasmakonzentrationen lagen hier zwischen  $0,56 \pm 0,12$  und  $0,68 \pm 0,18 \mu\text{mol/l}$  und wurden erst  $400 \pm 74$  bis  $500 \pm 48$  min nach Aufnahme der Testmahlzeiten erreicht. Die Absorption von Quercetin aus Rutin erfolgte also wesentlich später und in einem deutlich geringeren Umfang. Als

---

<sup>4</sup> Summe der Plasmakonzentrationen von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin

Maß für die Bioverfügbarkeit dient die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC s. 3.1.4.1). Die Gesamt-AUC<sup>5</sup> nach der Aufnahme des Aglykons war ca. 3mal so groß wie nach der Applikation des Rutins ( $p < 0,05$ ). Die Rationszusammensetzung zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Gesamtflavonole (Abb. 8).

Setzt man die Gesamt-AUC der SMF-Ration nach Gabe des Aglykons als 100 %, war die relative Bioverfügbarkeit in der WF-Ration mit 105 % am höchsten. Die höchste systemische Verfügbarkeit nach der Rutinapplikation wurde mit 38 % in der SMF-Ration erzielt.

Zusammenfassend lässt sich für die Gesamtflavonol-Konzentration festhalten, dass die Rationszusammensetzung keinen signifikanten Einfluss auf die pharmakokinetischen Parameter ausübte. Dagegen ergaben sich für alle erhobenen pharmakokinetischen Parameter signifikante Unterschiede zwischen der Applikation von Quercetin und Rutin. Die entsprechenden Mittelwerte mit Standardfehlern sind der Tabelle 7 zu entnehmen.

---

<sup>5</sup> Summe der AUCs von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin

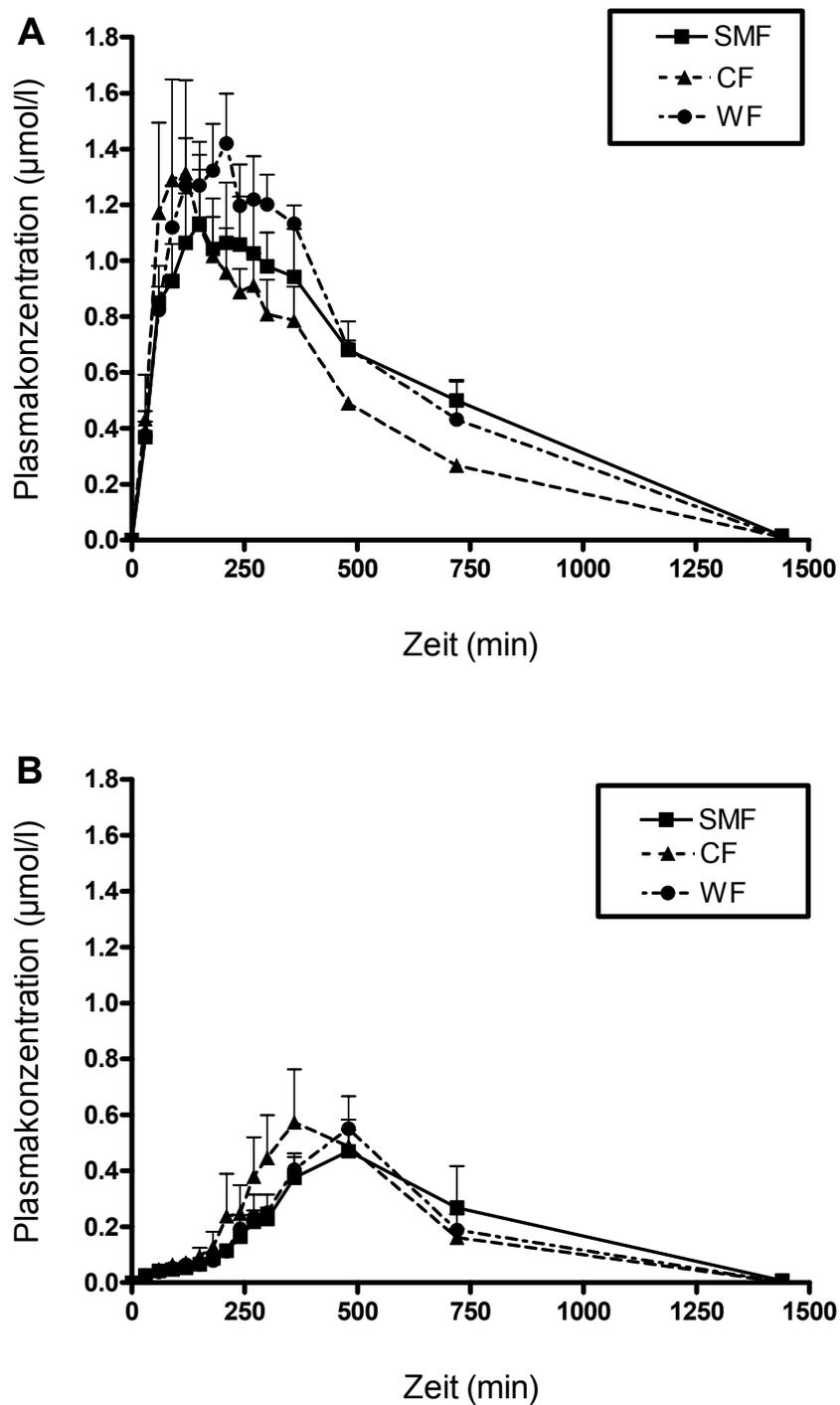


Abb. 8: Gesamtflavonolkonzentrations-Zeit-Kurven nach oraler Gabe einer äquivalenten Dosis von 165,4  $\mu\text{mol}$  Quercetin /kg KGW als Aglykon (A) bzw. als Rutin (B). Mittelwerte mit Standardfehler.

Tab. 7: Vergleich der pharmakokinetischen Parameter der Gesamtflavonolkonzentration<sup>1)</sup> (Quercetin + Isorhamnetin + Tamarixetin) nach einer einmaligen Gabe von 165,4 µmol Quercetin/kg KGW als Aglykon (QA) oder Rutin (R).

Parameter	Behandlung					
	Schweinemastfutter-Ration (n = 6)		Citrusfaser-Ration (n = 5)		Weizenfaser-Ration (n = 6)	
	QA	R	QA	R	QA	R
$c_{\max}$ <sup>2)</sup>	1,23 <sup>a</sup> ± 0,21	0,56 <sup>b</sup> ± 0,12	1,47 <sup>a</sup> ± 0,32	0,68 <sup>b</sup> ± 0,18	1,53 <sup>a</sup> ± 0,15	0,56 <sup>b</sup> ± 0,11
$t_{\max}$ <sup>3)</sup>	190 <sup>a</sup> ± 31	500 <sup>b</sup> ± 48	156 <sup>a</sup> ± 36	400 <sup>b</sup> ± 74	215 <sup>a</sup> ± 31	456 <sup>b</sup> ± 24
Gesamt-AUC <sup>4)</sup>	751 <sup>a</sup> ± 116	285 <sup>b</sup> ± 78	608 <sup>a</sup> ± 71	274 <sup>b</sup> ± 54	787 <sup>a</sup> ± 73	265 <sup>b</sup> ± 55
Relative Bioverfügbarkeit <sup>5)</sup>	100	38	81	37	105	35

Mittelwerte mit Standardfehler

<sup>a, b</sup> Werte innerhalb einer Reihe, die keinen gemeinsamen Buchstaben tragen, unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,05$ )

<sup>1)</sup> nach Behandlung der Plasmaproben mit  $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase

<sup>2)</sup>  $c_{\max}$  [µmol/l] = maximale Plasmakonzentration

<sup>3)</sup>  $t_{\max}$  [min] = Zeit zwischen Applikation und Erreichen der  $c_{\max}$

<sup>4)</sup> Gesamt-AUC [min × µmol/l] = Summe der AUCs (Quercetin+Isorhamnetin+Tamarixetin) von 0 bis 24 Stunden

<sup>5)</sup> Relative Bioverfügbarkeit [%] = Quercetinaglykon der SMF-Ration = 100%

Konjugiertes Quercetin trat sowohl nach Aglykon- als auch nach der Rutinapplikation als Hauptmetabolit bei allen Rationen auf (s. Abb. 9 und Tab. 8, 9). Die Aufnahme des Aglykons über die Testmahlzeiten resultierte in maximalen Quercetinkonzentrationen von  $1,07 \pm 0,19$  bis  $1,30 \pm 0,28$   $\mu\text{mol/l}$ , die  $156 \pm 36$  bis  $215 \pm 31$  min nach Aufnahme erreicht wurden. Der Anteil der konjugierten, methylierten Formen von Quercetin Isorhamnetin und Tamarixetin an der Gesamtflavonolkonzentration betrug maximal 8 bzw. 13 %. Dieses Verhältnis spiegelt sich auch bei der Betrachtung der Flächen unter den Kurven (AUC) wider: Relativ gesehen zur Gesamtfläche unter den Kurven (Gesamt-AUC = Summe der AUC von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin) lag der Anteil von Isorhamnetin bei 8 bis 9 %, der des Tamarixetins bei 9 bis 13 %. Die relative AUC von Quercetin betrug zwischen 79 und 82 %. Bezogen auf die Gesamt-AUC entfiel auf die methylierten Formen ein Anteil von 18 bis 21 %. Die Ergebnisse der Varianzanalyse zeigten nach Applikation des Quercetinaglykons bei der AUC von Tamarixetin in der CF-Ration einen signifikanten Rationseffekt ( $p < 0,05$ ). Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve war geringer im Vergleich zu den anderen Fütterungsgruppen. Des Weiteren zeigte sich ein Trend hinsichtlich eines früheren Auftretens der maximalen Plasmakonzentration von Tamarixetin ( $t_{\text{max}}$ ) in der CF-Ration nach Aufnahme des Aglykons. Weitere Signifikanzen zwischen den Rationen konnten nicht ermittelt werden. Die pharmakokinetischen Parameter der Metaboliten nach Aglykonapplikation über die verschiedenen Rationen sind Tabelle 8 zu entnehmen.

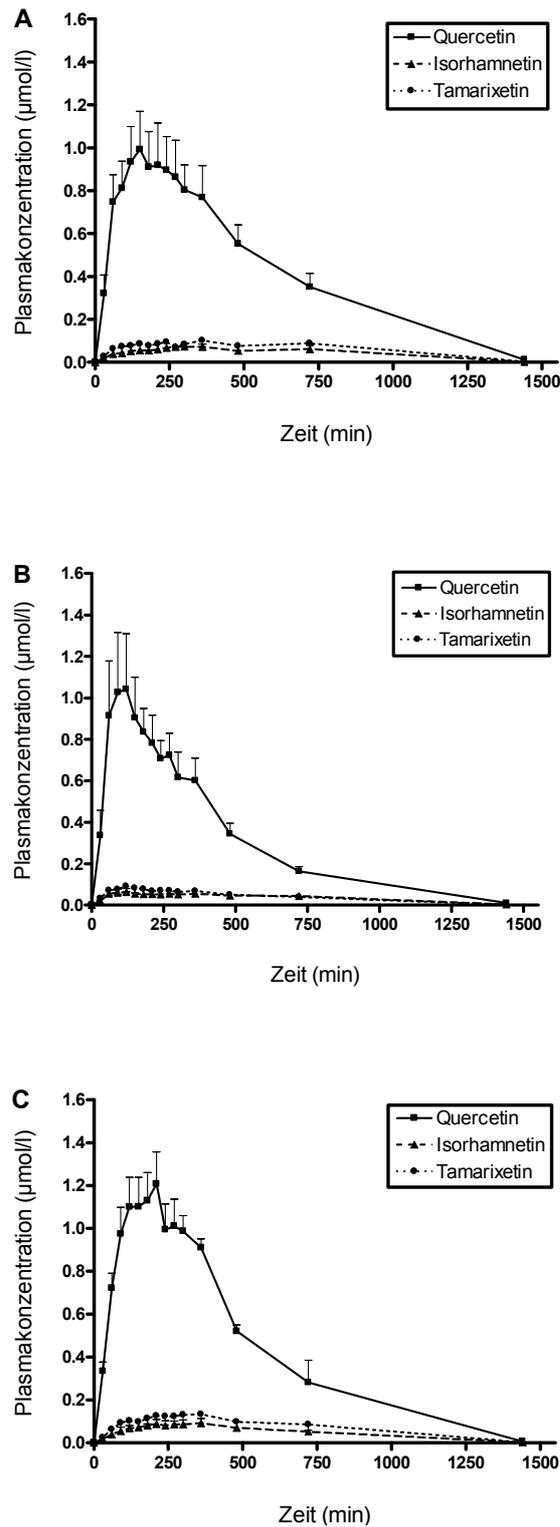


Abb. 9: Konzentrations-Zeit-Verläufe von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin nach oraler Gabe von  $165,4 \mu\text{mol}$  Quercetin/kg KGW als Aglykon zur SMF-Ration (A), CF-Ration (B) und WF-Ration (C). Mittelwerte mit Standardfehler.

Tab. 8: Vergleich der pharmakokinetischen Parameter von Quercetin (Q), Isorhamnetin (I) und Tamamrixetin (T)<sup>1)</sup> nach einer einmaligen Gabe von 165,4 µmol Quercetin/kg KGW als Aglykon zu den jeweiligen Testmahlzeiten.

Parameter	Behandlung								
	Schweinemastfutter-Ration (n = 6)			Citrusfaser-Ration (n = 5)			Weizenfaser-Ration (n = 6)		
	Q	I	T	Q	I	T	Q	I	T
$c_{\max}^{2)}$	1,07 ± 0,19	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,02	1,30 ± 0,28	0,08 ± 0,01	0,11 ± 0,03	1,29 ± 0,13	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,02
$t_{\max}^{3)}$	165 ± 22	385 ± 69	285 ± 39	156 ± 36	240 ± 72	162 ± 39	215 ± 31	275 ± 30	370 ± 77
AUC <sup>4)</sup>	597 ± 93	63 ± 11	91 ± 12	500 ± 60	51 ± 5	57* ± 6	621 ± 58	66 ± 4	100 ± 11

Mittelwerte mit Standardfehler

\* signifikanter Unterschied bei T zwischen den Rationen für jeweiligen Parameter ( $p < 0,05$ )

<sup>1)</sup> nach Behandlung der Plasmaproben mit β-Glucuronidase/Sulfatase

<sup>2)</sup>  $c_{\max}$  [µmol/l] = maximale Plasmakonzentration

<sup>3)</sup>  $t_{\max}$  [min] = Zeit zwischen Applikation und Erreichen der  $c_{\max}$

<sup>4)</sup> AUC [min × µmol/l] = Fläche unter der Plasmaspiegelkurve von 0-24 Stunden

Tab. 9: Vergleich der pharmakokinetischen Parametervon Quercetin (Q), Isorhamnetin (I) und Tamarixetin (T)<sup>1)</sup> nach einer einmaligen Gabe von 165,4  $\mu\text{mol}$  Quercetin /kg KGW aus Rutin zu den jeweiligen Testmahlzeiten.

Parameter	Behandlung								
	Schweinemastfutter-Ration (n = 6)			Citrusfaser-Ration (n = 5)			Weizenfaser-Ration (n = 6)		
	Q	I	T	Q	I	T	Q	I	T
$c_{\text{max}}$ <sup>2)</sup>	0,48 $\pm 0,11$	0,03 $\pm 0$	0,05 $\pm 0,01$	0,60 $\pm 0,17$	0,03 $\pm 0$	0,06 $\pm 0,01$	0,48 $\pm 0,10$	0,04 $\pm 0,01$	0,05 $\pm 0,01$
$t_{\text{max}}$ <sup>3)</sup>	500 $\pm 48$	440 $\pm 59$	520 $\pm 40$	435 $\pm 70$	420 $\pm 75$	450 $\pm 61$	456 $\pm 24$	552 $\pm 72$	486 $\pm 71$
AUC <sup>4)</sup>	228 $\pm 68$	23 $\pm 3$	34 $\pm 7$	220 $\pm 46$	21 $\pm 3$	33 $\pm 5$	204 $\pm 44$	26 $\pm 5$	35 $\pm 6$

Mittelwerte mit Standardfehler

<sup>1)</sup> nach Behandlung der Plasmaproben mit  $\beta$ -Glucuronidase/Sulfatase

<sup>2)</sup>  $c_{\text{max}}$  [ $\mu\text{mol/l}$ ] = maximale Plasmakonzentration

<sup>3)</sup>  $t_{\text{max}}$  [min] = Zeit zwischen Applikation und Erreichen der  $c_{\text{max}}$

<sup>4)</sup> AUC [min  $\times$   $\mu\text{mol/l}$ ] = Fläche unter der Plasmaspiegelkurve von 0-24 Stunden

Nach Applikation von Rutin lag die Plasmakonzentration von Quercetin bei  $0,48 \pm 0,11$  bis  $0,60 \pm 0,17$   $\mu\text{mol/l}$  und wurde erst  $435 \pm 70$  bis  $500 \pm 48$  min nach Aufnahme erreicht. Die maximalen Plasmakonzentrationen der methylierten Quercetinmetaboliten Isorhamnetin und Tamarixetin lagen mit  $0,03 \pm 0$  bis  $0,04 \pm 0,01$  bzw.  $0,05 \pm 0,01$  bis  $0,06 \pm 0,01$   $\mu\text{mol/l}$  deutlich niedriger im Vergleich zum konjugierten Quercetin. Die auf die verschiedenen Metaboliten anfallenden Anteile an der Gesamt-AUC spiegeln die gleichen Verhältnisse wie nach Gabe des Aglykons wider. Die relative AUC von Quercetin lag bei 77 bis 80 %, auf die methylierten Formen entfiel ein Anteil von 20 bis 29 %.

Die statistischen Auswertungen ergab keine Signifikanzen bei den erhobenen pharmakokinetischen Parametern zwischen den drei Fütterungsgruppen. Die ermittelten Parameter nach Rutinapplikation sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach Applikation einer einmaligen Dosis von  $165,4$   $\mu\text{mol}$  Quercetin/kg KGW in Form von Quercetinaglykon oder Rutin zu einer „Kontrolldiät“ oder zu ballaststoffangereicherten Rationen jeweils konjugiertes Quercetin als Hauptmetabolit nachgewiesen werden konnte. Als weitere Metaboliten wurden konjugiertes Isorhamnetin und Tamarixetin detektiert. Dabei wurde das Verhältnis der nachgewiesenen Metaboliten zueinander weder durch die Quercetinquelle noch durch die Rationszusammensetzung beeinflusst. Des Weiteren zeigten sich innerhalb jeder Fütterungsgruppe nach oraler Aufnahme des Aglykons statistisch signifikant höhere Bioverfügbarkeiten im Vergleich zur Rutin-Applikation. Mit Ausnahme der nach der Aglykon-Applikation signifikanten Unterschiede des pharmakokinetischen Parameters AUC bei Tamarixetin in der CF-Gruppe konnten zwischen den verschiedenen Diäten keine weiteren Signifikanzen ermittelt werden.

## 4.2 *In vitro*-Fermentationsstudien

Tabelle 10 zeigt die kumulative Gasproduktion und die kinetischen Parameter aus den *in vitro*-Fermentationsversuchen. Als Substrat wurden in den Untersuchungen die „Faserkomponente“ der jeweiligen Ration verwendet, die durch eine simulierte Magen- und Dünndarmverdauung erhalten wurde (s. 3.2.2). Die Inokulation wurde mit Faeces der Tiere aus den jeweiligen Fütterungsgruppen vorgenommen. Die Parameter wurden mittels einer modifizierten Gompertz-Funktion (Zwietering *et al.* 1992) ermittelt, die auch in anderen *in vitro*-Fermentationsstudien angewendet wurde (Piva *et al.* 2002, Liu *et al.* 2002).

Tab.10: Ergebnisse der *in vitro*-Fermentationsversuche nach Inkubation der vorverdauten Rationen mit Schweinefaeces als Inokulum.

Variable	Ration		
	SMF (n=10)	CF (n=10)	WF (n=10)
$V_F$ <sup>1)</sup>	115,7 ± 10,2 <sup>a</sup>	229,6 ± 3,3 <sup>b</sup>	159,5 ± 12,1 <sup>c</sup>
$\mu_m$ <sup>2)</sup>	7,8 ± 1,4 <sup>a</sup>	16,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	9,6 ± 0,4 <sup>c</sup>
$\lambda$ <sup>3)</sup>	4,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	6,0 ± 0,6 <sup>c</sup>
log-Phase <sup>4)</sup>	13,1 ± 1,5 <sup>a</sup>	10,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	11,9 ± 0,4 <sup>c</sup>
TIP <sup>5)</sup>	11,1 ± 1,2 <sup>a</sup>	8,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	11,9 ± 0,4 <sup>c</sup>
$R^2$ <sup>6)</sup>	0,997	0,994	0,995

Mittelwerte mit Standardfehler

Werte in einer Reihe ohne gemeinsamen Buchstaben  $p < 0,0001$

<sup>1)</sup>  $V_F$  [ml] = maximale Gasproduktion

<sup>2)</sup>  $\mu_m$  [ml/h] = maximale Gasproduktionsrate

<sup>3)</sup>  $\lambda$  [h] = Zeitpunkt des Auftretens von  $\mu_m$

<sup>4)</sup> log-Phase [h] = Dauer der exponentiellen Phase

<sup>5)</sup> TIP [h] = Zeit vom Beginn der Fermentation bis zu Erreichen von  $\mu_m$

<sup>6)</sup>  $R^2$  = Bestimmtheitsmaß

Die maximale Gasproduktion ( $V_F$ ) ist ein Indikator für die Fermentierbarkeit der im Magen- und Darmtrakt unverdaulichen Bestandteile der eingesetzten Rationen. Für die maximale Gasbildung ergab sich die Reihenfolge  $CF > WF > SMF$  (s. Tab.10, Abb. 10). Die maximale Rate der Gasproduktion ( $\mu_m$ ) war in der CF-Ration doppelt so hoch im Vergleich zur SMF-Ration und lag um fast 40 % höher

als der  $\mu_m$ -Wert der WF-Ration. Die Dauer der exponentiellen Phase war in der SMF-Ration mit  $13,10 \pm 1,50$  h am längsten, gefolgt von der WF- und CF-Ration mit  $11,90 \pm 0,44$  bzw.  $10,29 \pm 0,19$  Stunden. Die Zeit vom Beginn der Fermentation bis zur maximalen Rate der Gasproduktion (TIP) war mit  $8,53 \pm 0,3$  Stunden in der CF-Ration am kürzesten, gefolgt von der SMF- und der WF-Ration mit  $11,08 \pm 1,22$  bzw.  $11,93 \pm 0,44$  Stunden. Für alle Parameter ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen allen Versuchsgruppen ( $p > 0,0001$ ). Die kumulativen Gasbildungen und die Gasbildungskurven sind der Abbildung 10 dargestellt.

Zusammengefasst zeigen die Resultate, dass in der CF-Ration ein deutlich höheres Fermentationspotential im GIT vorlag. Allerdings ist diese Aussage nur eingeschränkt für die CF-Ration gültig, da in der vorliegenden Untersuchung die jeweilige Fermentierbarkeit der anderen Ration nicht überprüft wurde.

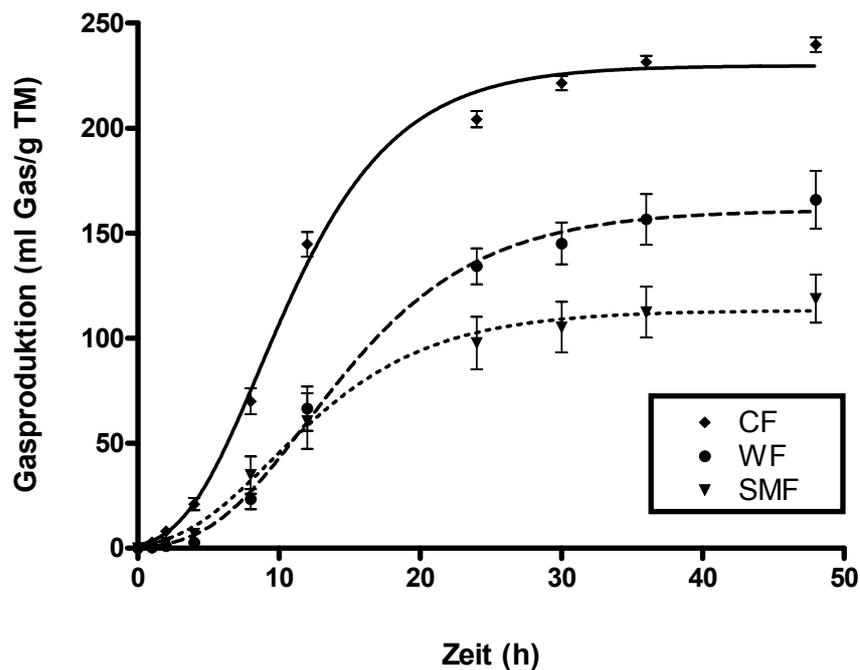


Abb.10: Kummulative Gasbildung bei der *in vitro*-Fermentation der enzymatisch vorbehandelten Versuchsrationen. Als Inokulum wurde Faeces von Tieren aus den entsprechenden Fütterungsgruppen verwendet. Die Kurven wurden anhand einer modifizierten Gompertz-Funktion berechnet. Mittelwerte mit Standardfehler.

## 5. Diskussion

Das Flavonol Quercetin wird als sekundärer Pflanzeninhaltsstoff von Mensch und Tier mit der Nahrung aufgenommen. Eine Vielzahl von *in vitro*-Untersuchungen sprechen dem Quercetin gesundheitsfördernde Effekte zu, welche nach oraler Aufnahme *in vivo* nur durch eine ausreichende systemische Verfügbarkeit realisiert werden können. Zu den Faktoren, die die Bioverfügbarkeit oral aufgenommener Substanzen beeinflussen können, zählt u. a. die physikalisch-chemische Beschaffenheit der Nahrung bzw. die Interaktion mit anderen Nahrungskomponenten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss einer moderaten Zulage an löslichen (Citrusfaser) und unlöslichen (Weizenfaser) Ballaststoffen auf die systemische Verfügbarkeit des Quercetins aus verschiedenen Quercetinquellen (Aglykon und Rutin) untersucht. Da aus früheren Untersuchungen (*Hollman et al.* 1999, *Cermak et al.* 2003) bekannt ist, dass insbesondere die Verfügbarkeit von Quercetin aus Rutin sehr gering ist, wurde bei beiden Quercetinquellen eine äquivalente Dosis Quercetin in Höhe von 165,4  $\mu\text{mol/kg}$  KGW (entspricht 50 mg Quercetinaglykon bzw. 101 mg Rutin/kg KGW) gewählt. Die Zulage der löslichen bzw. unlöslichen Ballaststoff-Komponenten in Höhe von 10 % orientierte sich an einer im Humanbereich noch möglichen täglichen Aufnahme. Aufgrund der anatomischen und physiologischen Ähnlichkeiten zwischen Mensch und Schwein (*Stevens* 1988, *Almond* 1996) wurden für die Bioverfügbarkeitsstudien Schweine als Versuchstiere gewählt. Zur Charakterisierung der Fermentationsabläufe *in vivo* wurden zusätzlich *in vitro*-Untersuchungen zum Umfang und der Geschwindigkeit der Fermentation der „Faserkomponente“ (unverdaute Rückstände nach simulierter Magen- und Dünndarmverdauung) der jeweiligen Rationen durch die entsprechend über drei Wochen adaptierte Darmflora durchgeführt.

Übereinstimmend mit vorhergehenden Untersuchungen (*Gee et al.* 2000, *Crespy et al.* 2001) konnte auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass unabhängig von der Quercetinquelle kein freies Quercetin oder freie

Quercetinmetaboliten, sondern ausschließlich konjugierte Derivate in der systemischen Zirkulation nachweisbar waren, was für eine umfangreiche Konjugation in der Dünn- bzw. in der Dickdarmmucosa sowie in der Leber spricht (First-Pass-Effekt). Aufgrund der bereits beschriebenen Speziesunterschiede (s. 2.4.2) hinsichtlich möglicher enzymatischer Konjugationsreaktionen lässt sich vermuten, dass es sich bei den konjugierten Derivaten im Plasma überwiegend um Glucuronide handelt, da bei Schweinen keine Sulfatkonjugate aufzutreten scheinen (*Caldwell* 1982). Eine diesbezügliche Differenzierung der eigenen Daten wurde allerdings nicht durchgeführt, da die Dekonjugation im Rahmen der Analyse mit einem Gemisch aus  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase durchgeführt wurde (s. 3.1.3.2). Konjugiertes Quercetin stellte unabhängig von der applizierten Quercetinquelle und der aufgenommenen Ration mit einem Anteil von ca. 80 % den Hauptmetaboliten. Als weitere Metaboliten mit einem jeweiligen Anteil von ca. 10 % konnten die konjugierten 3'- und 4'-Methylether des Quercetins Isorhamnetin und Tamarixetin identifiziert werden. Die Befunde zum Profil der aufgetretenen Plasmametaboliten nach oraler Applikation von Quercetin stimmen mit den Untersuchungen von *Ader et al.* (2000) und *Cermak et al.* (2003) überein. Ein Vergleich des Metabolitenmusters zwischen verschiedenen Spezies zeigt, dass bei der Ratte deutlich höhere Konzentrationen methylierter Metaboliten - im Besonderen von Isorhamnetin - auftreten (50 - 70 % der Gesamtkonzentration im Plasma), was sich durch eine höhere Aktivität der COMT bei der Ratte im Vergleich zum Schwein erklären ließe (*de Boer et al.* 2005, *Morand et al.* 2000).

In Abhängigkeit der applizierten Quercetinquelle ergaben sich in der vorliegenden Arbeit, wie auch in der Untersuchung von *Cermak et al.* (2003), nach oraler Applikation des Aglykons signifikant höhere Gesamtflavonolkonzentrationen (Quercetin + Isorhamnetin + Tamarixetin) im Plasma und eine höhere systemische Verfügbarkeit im Vergleich zur Aufnahme von Rutin. Das wesentlich spätere Auftauchen von Quercetinmetaboliten in der systemischen Zirkulation nach Applikation von Rutin im Vergleich zur Aufnahme des Quercetinaglykons bestätigt die Schlussfolgerung, dass freies Quercetin bereits im Dünndarm

absorbiert wird, wohingegen Quercetin aus Rutin erst nach mikrobieller Hydrolyse des Glykosids in den distalen Darmabschnitten (Ileum, Kolon) freigesetzt und absorbiert werden kann (*Manach et al. 1995, Hollman et al. 1997, Erlund 2000, Morand et al. 2000, Graefe et al. 2001, Cermak et al. 2003*).

Die wesentlich geringere Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Rutin im Vergleich zum Quercetinaglykon spricht für eine geringere Absorptionskapazität bzw. für einen raschen mikrobiellen Abbau von Quercetin im Dickdarm. Während keine vergleichenden Untersuchungen zur Absorptionskapazität von Quercetin in verschiedenen Darmabschnitten vorliegen, belegen zahlreiche Untersuchungen einen umfangreichen mikrobiellen Abbau von Quercetin im Dickdarm (*Kühnau 1976, Heilmann & Merfort 1998a,b, Hollman & Katan 1998, Braune et al. 2001, Walle et al. 2001, Schoefer et al. 2003, Blaut et al. 2003*).

Die statistischen Analysen der vorliegenden Bioverfügbarkeitsstudie ergaben einen Unterschied in der AUC (signifikant niedrigere AUC) und einen Trend für ein frühzeitigeres Auftreten des  $c_{\max}$  für den Quercetinmetaboliten Tamarixetin in der CF-Ration nach Applikation des Aglykons. Da diese Ergebnisse nur nach Aufnahme des Aglykons, nicht aber nach Rutinapplikation zu verzeichnen waren, lässt sich dieser Befund möglicherweise auf eine im Dünndarmbereich lokalisierte Modifikation zurückführen. Das frühe Auftreten von Tamarixetin im Plasma in der CF-Ration im Vergleich zur WF-Gruppe ist theoretisch durch eine bevorzugte Bildung dieses Metaboliten im Vergleich zu Isorhamnetin zu erklären, wohingegen die geringere AUC durch eine rasche Elimination von Tamarixetin in der CF-Gruppe bedingt sein könnte. Ob und wie allerdings die moderate Zulage von Citrusfaser die entsprechenden zugrunde liegenden Mechanismen beeinflusst, ist vollständig unklar. Nach dem derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand ist eine schlüssige Erklärung dieser Beobachtungen derzeit nicht möglich. Bei der Interpretation dieses Befundes hinsichtlich einer biologischen Signifikanz sollte auch bedacht werden, dass es sich bei Tamarixetin um einen minoren Metaboliten von Quercetin handelt, der beim Menschen (*Graefe et al. 2001*) und teilweise auch bei der Ratte nicht im Plasma detektiert werden konnte (*de Boer et al. 2005*).

Der Einfluss von Ballaststoffen auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin wurde bisher nicht systematisch beim Schwein untersucht. Somit ist ein direkter Vergleich der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde mit publizierten Daten nicht möglich. Die Studie von *Tamura et al.* (2007) gibt Hinweise darauf, dass die Aufnahme pektinhaltiger Rationen die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus Rutin bei Mäusen beeinflussen kann. Die Tiere erhielten über zwei Wochen eine mit 5 % Pektin bzw. Cellulose und 0.5 % Rutin angereicherte Diät. Die Untersuchung ergab signifikant höhere Plasmakonzentrationen von Quercetin und Isorhamnetin bei den Tieren, die die pektinhaltige Diät erhielten.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bioverfügbarkeitsstudien beim Schwein zeigten, dass eine 10 % Zulage von Citrus- bzw. Weizenfaser als lösliche bzw. unlösliche Ballaststoff-Komponenten zu einer handelsüblichen Schweinemastfutter-Ration unabhängig von der eingesetzten Quercetinquelle (Aglykon, Rutin) keinen Einfluss auf die orale Bioverfügbarkeit von Quercetin hatte. Hinsichtlich dieses Resultates können folgende Hypothesen formuliert werden:

- 1) die 10 %ige Zulage an löslichen bzw. unlöslichen Ballaststoff-Komponenten (CF- bzw. WF-Ration) zur SMF-Ration hatten keinen Einfluss auf die Magen-Darm-Motilität und/oder auf die gastrointestinale Mikroflora
- 2) aufgrund des hohen Faser- bzw. Ballaststoffgehaltes in der SMF-Ration haben sich mögliche Auswirkungen einer Faserzulage auf die Digestapassage und/oder die Mikroflora und damit auf die Bioverfügbarkeit des Quercetins zwischen den Rationen nicht mehr deutlich abgebildet
- 3) der Ballaststoffgehalt einer Ration bzw. Diät hat grundsätzlich keinen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Quercetinquellen beim Schwein.

Die in der Literatur beschriebenen möglichen Einflüsse einer höheren Zufuhr an löslichen und unlöslichen Faser- bzw. Ballaststoffen-Komponenten auf die Motilität des GIT sowie auf die Mikroflora ließen mögliche Veränderungen in der Bioverfügbarkeit von Quercetin aus unterschiedlichen Quercetinquellen vermuten, die im Folgenden diskutiert werden.

*Einfluss des Ballaststoffgehaltes und der chemischen Natur von Ballaststoffen*

Ergebnisse aus der Literatur deuten darauf hin, dass die Aufnahme löslicher Ballaststoffe (wie z. B. Guar Gum, Pektine) aufgrund der viskositätssteigernden Eigenschaften, die Magenentleerung verzögern und die Magen- und Dünndarmpassage verlangsamen können (Jenkins *et al.* 1978, Flourie *et al.* 1985, Sandhu *et al.* 1987, Johansen *et al.* 1996). Des Weiteren resultiert ein Anstieg der Viskosität u. a. in einer verminderten Durchmischung des Darminhaltes und erschwert die Diffusion und Absorption von Nährstoffen durch die Darmmucosa (Low 1985, Häglund *et al.* 1988). Diese Beobachtungen lassen eine Verzögerung und möglicherweise eine Abnahme der systemischen Verfügbarkeit des Quercetins nach oraler Aufnahme von Quercetin mit der CF-Ration aufgrund der oben genannten Auswirkungen einer gesteigerten Viskosität vermuten. Bei einem Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Studie mit den Resultaten einer unter nahezu identischen Bedingungen durchgeführten Studie zur Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Quellen (Cermak *et al.* 2003) fällt auf, dass die maximalen Quercetinkonzentrationen nach Applikation von Rutin bereits nach 210 min, in der vorliegenden Arbeit jedoch erst nach 500 min bei der SMF-Ration auftraten. Die maximalen Konzentrationen von Quercetin und seiner methylierten Metaboliten waren in beiden Studien ähnlich. Eine Gegenüberstellung der NDF-Gehalte der eingesetzten Rationen ergab, dass der NDF-Gehalt der SMF-Ration dieser Arbeit mit 23 % doppelt so hoch wie in der Studie von Cermak *et al.* (2003) lag. Eine Beeinflussung der Magen- und Darmmotilität durch den NDF-Gehalt der Ration scheint jedoch unwahrscheinlich, da bei einer verzögerten Magen-Darm-Passage die maximalen Quercetinkonzentrationen auch nach Applikation des Aglykons zu einem späteren Zeitpunkt zu erwarten wäre, was

jedoch nicht der Fall war. Bezüglich der unterschiedlichen  $t_{\max}$ -Zeiten zwischen den beiden oben genannten Studien sei auch darauf hingewiesen, dass den Ergebnissen der Untersuchung von *Cermak et al.* (2003) lediglich Daten von zwei Tieren zugrunde lagen und Ergebnisse aus Humanstudien mit  $t_{\max}$ -Werten für Quercetin von 6 bis 9 Stunden nach Aufnahme von Rutin mit den hier erhobenen Resultaten übereinstimmen (*Hollman et al.* 1997, *Hollman et al.* 1999, *Graefe et al.* 2001).

Möglicherweise konnten in der vorliegenden Arbeit zwischen den Diäten keine Unterschiede in der systemischen Verfügbarkeit von Quercetin gezeigt werden, da bereits die Kontroll-Ration (SMF-Ration) mit 23 % einen hohen NDF-Gehalt aufwies und so Unterschiede zwischen den Rationen durch die 10 %ige Faserzulage relativ gering waren (s. Tab. 3). Andererseits kann die weitgehende Übereinstimmung der ermittelten Bioverfügbarkeiten (AUC) in der vorliegenden Studie mit den von *Cermak et al.* (2003) publizierten Daten aus Versuchen, die mit einem NDF-Gehalt von nur 12 % in der Ration durchgeführt wurden, dahingehend interpretiert werden, dass beim Schwein auch größere Unterschiede im NDF-Gehalt der Rationen die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus den beiden unterschiedlichen Quellen (Aglykon bzw. Rutin) nicht beeinflussen.

Die Übertragbarkeit der in diesen Bioverfügbarkeitsstudien am Schwein eingesetzten Rationen bezüglich des Ballaststoff- bzw. Fasergehalts auf den Humanbereich ist kritisch zu bewerten. Die von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfohlene tägliche Zufuhr an Ballaststoffen für Erwachsene liegt bei 30 g, was bei einer geschätzten TM-Aufnahme von 500 g einem Ballaststoffgehalt von 6 % entspricht. Diversen Studien zufolge liegt die geschätzte tatsächliche Ballaststoffaufnahme mit unter 20 g pro Tag zum Teil deutlich unter diesen Empfehlungen (*Park et al.* 2005).

Untersuchungen, die den Ballaststoffgehalt bzw. die -zusammensetzung der in der vorliegenden Schweinestudie eingesetzten Rationen bestimmten, wurden zwar nicht durchgeführt, grundsätzlich kann aber davon ausgegangen werden, dass der

Ballaststoffgehalt um ein Vielfaches höher als der Rohfasergehalt ist (*Eastwood et al.* 1980) und dass bei Getreide der Rohfaserwert nur 1/4 bis 1/5 des Ballaststoffgehaltes ausmacht (*Thomas* 1980). Auf Basis dieser Annahmen sowie aus Berechnungen anhand der chemischen Zusammensetzung der eingesetzten Rationen (s. Tab. 3), lag der geschätzte Ballaststoffgehalt in der Kontroll-Ration (SMF-Ration) bei ca. 35 %. Damit übersteigt der Ballaststoffgehalt allein schon in der nicht-faserangereicherten SMF-Ration das 6fache der empfohlenen sowie einer realisierbaren Ballaststoffaufnahme in der Humanernährung. Auch ist anzumerken, dass grundsätzlich nicht allein der Ballaststoffgehalt, sondern Einflussfaktoren wie Textur und Menge einer Mahlzeit, die Partikelgröße sowie weitere Nahrungsbestandteile wie beispielsweise Lipide in einer Ration/Diät die Digestapassage durch den GIT beeinflussen können (*Wrick et al.* 1983, *Johansen & Bach Knudsen* 1994). In diesem Zusammenhang ist insbesondere von Bedeutung, dass zur Ermittlung der Bioverfügbarkeit von Quercetin in der aktuellen Studie lediglich eine quercetinhaltige „Testmahlzeit“ von 200g appliziert wurde. Die dabei erzielte moderate Füllung des Magens bzw. Darms war möglicherweise nicht ausreichend, um Effekte auf die Digestapassage erfassen zu können. Zudem scheinen viskositätssteigernde Eigenschaften löslicher Ballaststoffe speziesabhängig zu sein. So sind beim Schwein Effekte aufgrund des insgesamt längeren Dünndarms und des höheren Mikrobenbesatzes geringer als beispielsweise beim Geflügel (*Dierick* 1989, *Haberer & Schulz* 1998, *Dänicke* 1999). Die Viskositätssteigerung der Digesta durch die in dieser Studie eingesetzten Citrusfaser war daher möglicherweise nur gering ausgeprägt und hatte daher keinen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin. Auch in der Literatur finden sich Studien, die nach der Aufnahme von Citruspektin keinen Einfluss auf die Magenentleerung bzw. auf die Passagerate der Digesta im Darmtrakt beobachten konnten. *Rainbird & Low* (1986b) vermochten durch die Zulage von Citruspektin (40 g/kg Diät) zu einer Basaldiät keine viskositätsbedingte Verzögerung der Magenentleerung beim wachsenden Schwein feststellen. Auch in den Humanstudien von *Stasse-Wolthuis et al.* (1980) und

*Hillman et al.* (1983) führte die tägliche Aufnahme von 9 bzw. 12 g isoliertem Citruspektin zu keiner signifikanten Beeinflussung der Transitzeit.

In Anbetracht zahlreicher Befunde, dass höhere Gehalte unlöslicher Ballaststoffe (wie z. B. Weizenfaser, Cellulose) in der Ration zu einer Beschleunigung der Digestapassage durch den gesamten GIT führen (*Potkins et al.* 1991, *Le Goff et al.* 2002, *Wilfart et al.* 2007), wobei hauptsächlich die Dickdarmpassage beschleunigt ist, könnte die Zulage von Weizenfaser insbesondere die Verfügbarkeit von Quercetin nach oraler Applikation von Rutin reduzieren, da Quercetin aus Rutin erst im Dickdarmbereich freigesetzt und absorbiert wird (s. 2.4.1). Allerdings gibt es auch Untersuchungen, die durch die Zulage unlöslicher Ballaststoffe keinen Einfluss auf die Digestapassage beobachten konnten. *Owusu-Asiedu et al.* (2006) untersuchten, ob steigende Anteile löslicher bzw. unlöslicher Ballaststoffe in einer Ration die Passage der Digesta durch den GIT beim Schwein modulieren. Einer auf Getreide, Sojamehl und Getreidestärke basierenden Basaldiät wurden jeweils 7 % Guar Gum als löslicher bzw. Cellulose als unlöslicher Ballaststoff zugefügt und die Digestapassage durch den Dünndarm und den gesamten GIT bestimmt. Dabei zeigte sich, dass sowohl der Zusatz des löslichen als auch des unlöslichen Ballaststoffes zwar die Passagerate der Digesta durch den Dünndarm um 26 bzw. 18 % signifikant verlängerte, bezogen auf den gesamten GIT erhöhte jedoch lediglich die Ration mit Guar Gum als löslicher Ballaststoff die totale Retentionszeit der Digesta signifikant um 14 % (Basaldiät 24,5 h; Guar Gum-Diät 28 h). Die Ration mit Cellulose als unlösliche Ballaststoffquelle hatte dagegen keinen Einfluss auf die totale Retentionszeit der Digesta (24,6 h) im Vergleich zur Basaldiät.

#### *Einfluss der Ballaststoffe auf die gastrointestinale Zusammensetzung der Mikroflora*

Zum einen kann die intestinale Mikroflora die Bioverfügbarkeit von Quercetin positiv zum anderen aber auch negativ beeinflussen. Wird Quercetin in Form von Glykosiden erst nach mikrobieller Deglykosylierung im Dickdarm freigesetzt und

absorbiert (z. B. bei Verwendung von Rutin), so könnte eine Steigerung der deglykosylierenden, mikrobiellen Aktivität zu einer Steigerung der Bioverfügbarkeit von Quercetin führen. Andererseits ist bekannt, dass Quercetin auch umfangreich durch Mikroorganismen abgebaut wird (*Aura et al.* 2002), was wiederum die absorbierte Menge von Quercetin und damit seine Bioverfügbarkeit reduzieren könnte. Die Mikroflora kann hinsichtlich ihrer Dichte und Zusammensetzung durch die Zulage von Ballaststoffen zu Diäten bzw. Rationen modifiziert werden. Einen Anstieg der mikrobiellen Populationen durch die Aufnahme gereinigter Ballaststoffe erklären *Drew et al.* (2002) mit einer erhöhten Digesta-Viskosität und einem Rückgang der Nährstoffverdaulichkeit. Eine verminderte Nährstoffverdaulichkeit ist mit einem steigenden mikrobiellem Substratangebot verbunden. Die Kombination eines erhöhten Substratangebotes und einer verlangsamt Passagerate geht mit einer gesteigerten Besiedlung mit Mikroorganismen einher (*Wagner & Thomas* 1978). *Owusu-Asiedu et al.* (2006) untersuchten den Einfluss löslicher und unlöslicher Ballaststoffe (Guar Gum bzw. Cellulose) hinsichtlich möglicher Modifizierungen der ilealen Mikroflora beim wachsenden Schwein. Die Untersuchungen zeigten einen Anstieg der Populationen der Gesamtzahlen von Anaerobier und Aerobier sowie der *Lactobacilli*, *Enterobacteria*, *Clostridia*, *Bifidobacteria* und *Enterococci* durch die zusätzliche Aufnahme des löslichen Ballaststoffes Guar Gum. Der Einsatz der unlöslichen Ballaststoffquelle (Cellulose) führte zu einem Anstieg der Populationen der *Bifidobacteria* und der *Enterobacteria* und der Gesamtzahl der Anaerobier und *Enterococci*, jedoch nicht der der Gesamtzahl der Aerobier, *Lactobacilli* und *Chlostridia*. *Varel et al.* (1982, 1984, 1987) zeigten in ihren Studien ebenfalls einen Anstieg der cellulolytischen Bakterien sowie eine gesteigerte Aktivität dieser Species nach Verfütterung ballaststoffreicher Diäten (mit Luzernemehl angereicherte Rationen) an wachsende Schweine.

Unter Zugrundelegung dieser Erkenntnisse hätte man in dieser Studie bei der Verfütterung der CF-Ration einen Anstieg in der Population der *Clostridia* und anderer Mikroorganismen erwarten können, welche in der Lage sind, Flavonoidgrundgerüste zu spalten (*Schoefer et al.* 2003) und somit die

Bioverfügbarkeit von Quercetin zu reduzieren. Der Zusatz von Weizenfaser hätte u. a. zu einer Populationsverschiebung zugunsten der *Enterococci* und einer Vielzahl anderer Bakterienstämme führen können, welche durch ihre  $\beta$ -Glucosidasen und  $\beta$ -Rhamnosidasen die meist  $\beta$ -O-glycosidischen Bindungen des Zuckerrestes an das Flavonolgrundgerüst abspalten und metabolisieren können (Schneider *et al.* 1999). Dieses hätte sich bei der Applikation von Rutin in einer gesteigerten Bioverfügbarkeit von Quercetin und seiner methylierten Metaboliten manifestieren können.

Die Mikroflora fermentiert die mit der Nahrung aufgenommenen Ballaststoffe überwiegend zu den kurzkettigen Fettsäuren Essig-, Butter- und Propionsäure. Des Weiteren geht die Fermentation mit der Bildung von Kohlendioxid, Methan und Wasserstoff einher. Die Aufnahme ballaststoffreicher Diäten führt zu einer Intensivierung von Fermentationsprozessen im Dickdarm (Bolduan *et al.* 1991, Bach Knudsen *et al.* 1993, Drochner *et al.* 2004, Anguita *et al.* 2006). Pektine fördern im Ileum und Kolon die mikrobielle Fermentation und werden selbst in großem Umfang post-ileal metabolisiert (Drochner *et al.* 2004). Aufgrund der geringeren mikrobiellen Besiedlung werden praececal nur zwischen 10 - 15 % der Pektine fermentiert (Kerler 2002), während im Kolon bis zu 90 % der Pektine mikrobiell abgebaut werden (Drochner 1991). Die Fermentierbarkeit der Cellulose und damit die Bildung von Fermentationsprodukten ist in Abhängigkeit des Lignifizierungsgrades im Kolon wesentlich geringer als die der Pektine (Glitsø *et al.* 1999, Bach Knudsen 2001). Die in den *in vitro*-Fermentationsstudien eingesetzten vorverdauten Rationen in der vorliegenden Arbeit enthielten nahezu identische Fasergehalte (s. Tab. 5), unterschieden sich jedoch hinsichtlich der Geschwindigkeit der Fermentationsprozesse sowie in den gebildeten Gasmengen signifikant voneinander. Daraus lässt sich ableiten, dass die Zulage löslicher bzw. unlöslicher Ballaststoff-Komponenten zu der SMF-Ration Änderungen in der Zusammensetzung, der Dichte und/oder der Aktivitäten der gastrointestinalen Mikroflora hervorgerufen haben könnte. Unter den jeweils vorherrschenden Bedingungen bezüglich der mikrobiellen Population wurden die Faserfraktionen

der entsprechenden Diät am schnellsten und umfangreichsten in der CF-Ration, gefolgt von der WF- und der SMF-Ration fermentiert. Hieraus könnte man schließen, dass tatsächlich auch *in vivo* Unterschiede bezüglich des Umfangs und der Geschwindigkeit der Fermentation vorgelegen haben, die allerdings keinen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin hatten. Anzumerken ist, dass in der vorliegenden *in vitro*-Fermentationsstudie eine rektale Kotprobenentnahme erfolgte, was nur einen geringen tierexperimentellen Aufwand erforderte. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass innerhalb der einzelnen Darmsegmente eine unterschiedliche bakterielle Besiedlung vorherrscht und sich dieses in Abhängigkeit des Entnahmeortes des Inokulums auf den *in vitro*-Fermentationsablauf auswirken könnte (Robinson *et al.* 1981, Moore *et al.* 1987). Die *in vitro*-Fermentation kann somit lediglich eine Annäherung an die *in vivo*-Verhältnisse darstellen.

#### *Zusammenfassung und Ausblick*

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier erhobenen Resultate hinsichtlich der höheren Bioverfügbarkeit von Quercetin nach oraler Applikation des Aglykons im Vergleich zur Aufnahme von Rutin mit den bereits in der Literatur beschriebenen Befunden übereinstimmen. Obwohl anhand von Literaturdaten eine Beeinflussung der Digestapassage sowie der mikrobiellen Populationen durch den Zusatz von löslichen- und unlöslichen Ballaststoff-Komponenten belegt ist, zeigte der in der vorliegenden Studie gewählte Ansatz keine Auswirkungen einer Faserzulage auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Quercetinquellen beim Schwein. Damit bleibt die Frage offen, ob die durchgeführten diätetischen Maßnahmen nicht ausreichend waren, um Veränderungen in der Magen-Darm-Motilität bzw. bei der Fermentation zu erzielen, oder ob entsprechende Veränderungen vorlagen, jedoch kein Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin besteht.

In zukünftigen Studien sollte im Sinne einer besseren Übertragbarkeit der Resultate auf den Humanbereich eine ballaststoffärmere, beispielsweise auf Stärke basierende Kontroll-Diät gewählt werden. Des Weiteren sollte in künftigen

Studien die Digestapassage anhand des Einsatzes nichtabsorbierter Marker (z. B.  $\text{TiO}_2$ ) gemessen werden. Auch die Messung der Viskosität des Chymus sowie Untersuchung über mögliche Veränderungen in der Zusammensetzung und Dichte der mikrobiellen Populationen in verschiedenen Darmsegmenten erscheinen sinnvoll, um erhobene Befunde besser interpretieren zu können.

Abschließend muss auch erwähnt werden, dass trotz der bereits beschriebenen anatomischen und physiologischen Ähnlichkeiten zwischen Schwein und Mensch Unterschiede in der mikrobiellen Besiedlung im Magen- Darmtrakt vorliegen (*Johansen & Bach Knudsen 1997*), die sich möglicherweise auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin auswirken und die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus Versuchen am Schwein auf den Menschen erschweren könnte.

## 6. Zusammenfassung

Die orale Bioverfügbarkeit des Quercetins wird durch die Nahrungs- bzw. Futtermittelzusammensetzung beeinflusst. Der vorliegenden Arbeit lag die Hypothese zu Grunde, dass Ballaststoffe aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften die Magen-Darm-Motilität und/oder die gastrointestinale Mikroflora modulieren und somit die Bioverfügbarkeit der Flavonole beeinflussen könnten. Hierzu wurde am Modelltier Schwein in einer Bioverfügbarkeitsstudie der Einfluss moderater Zulagen löslicher und unlöslicher Ballaststoffe zu einer Diät auf die systemische Verfügbarkeit des Quercetins aus verschiedenen Quercetinquellen (Aglykon und Rutin) nach einer jeweils einmaligen oralen Applikation in Höhe von 165,4  $\mu\text{mol}$  Quercetin/kg KGW untersucht. Des Weiteren wurden die eingesetzten und vorverdauten Rationen hinsichtlich ihrer Fermentierbarkeit in *in vitro*-Fermentationsstudien mit Schweinefaeces als Inokulum untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von 10 % löslicher bzw. unlöslicher Ballaststoff-Komponenten in Form von Citrus- bzw. Weizenfaser zu einem kommerziellen Schweinemastfutter keinen Einfluss auf die systemische Verfügbarkeit sowie die Pharmakokinetik von Quercetin ausübte. Wie Ergebnisse vorhergehender Untersuchungen gezeigt haben, konnte auch in dieser Studie konjugiertes Quercetin (77 - 82 %) sowie die 3'- und 4'-methylierten Metaboliten des Quercetins (Isorhamnetin bzw. Tamarixetin) in konjugierter Form identifiziert werden. Weder die Quercetinquelle noch die Rationszusammensetzung hatten Einfluss auf das Flavonolmuster im Plasma. Unabhängig von den Rationen waren die relativen Bioverfügbarkeiten von Quercetin nach Gabe des Aglykons signifikant höher als nach Applikation von Rutin. Die *in vitro*-Fermentationsstudien mit Schweinefaeces als Inokulum ergaben, dass zunächst *in vitro* die Fermentationsprozesse in der CF-Ration am intensivsten ablaufen. Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass in der vorliegenden Studie entweder keine Veränderung der Digestapassage und/oder der fermentativen Prozesse

vorlagen, oder dass entsprechende Veränderungen keinen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Quercetin beim Schwein haben. Eine Übertragbarkeit der Befunde auf den Menschen ist nur eingeschränkt möglich.

## 7. Summary

Recent studies have indicated substantial effects of dietary composition on the oral bioavailability of the flavonol quercetin. Thus the aim of the present study was to investigate the impact of dietary fibre - with their specific physico-chemical characteristics known to influence gastrointestinal motility and /or gut microflora - on the systemic availability of the two flavonols quercetin and rutin. Pigs were fed with a commercial pig diet (SMF-ration) whereas two rations were supplemented either 10 % soluble (citrus fibre, CF-ration) or insoluble (wheat fibre, WF-ration) type of fibre. Pigs received a single oral dose of 165,4  $\mu\text{mol}$  quercetin/kg body weight (equivalent to 50 mg/kg) provided quercetin aglycone and rutin as part of their respective diet, respectively. Furthermore the *in vitro* fermentability of the enzymatically pretreated diets were analysed using the inoculum from pigs fed the respective diet.

The present results indicate that in comparison to the SMF-ration, the fibre-enriched diets had no significant influence on the oral bioavailability and the pharmacokinetic of quercetin. In concordance with previous results, we have showed that conjugated quercetin (77 - 82 %) and the conjugated 3'- and 4'-methylethers isorhamnetin and tamarixetin were the main metabolites. With respect to the total area under the curve (AUC) there were no differences in the relative ratios among quercetin and quercetin metabolites within the quercetin sources and diets. Furthermore the systemic availability of quercetin from quercetin aglycone was considerably higher than from rutin. The results from *in vitro*-fermentationstudy of the basal and the fibre-enriched diets using faecal as inoculum demonstrated that the CF-ration yielded the fastest and highest gas production. The results of the present study indicate that probably no changes in the digesta passage and/or in the fermentative process exist or that these changes seem not to influence the oral bioavailability of quercetin in the pig. It should be kept in mind that the transferability of these results on humans are only limited.

## 8. Literaturverzeichnis

**Abd El Mohsen, M.M., Kuhnle, G., Rechner, A.R., Schroeter, H., Rose, S., Jenner, P., Rice-Evans, C.A. (2002).** Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 1693-1702.

**Ader, P., Blöck, M., Pietzsch, S., Wolfram, S. (2001).** Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT1). *Cancer Lett.* **162**, 175-180.

**Ader, P., Weißmann, A., Wolfram, S. (2000).** Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Rad. Biol. Med.*, **28**, 1056-1067.

**Aherne, S.A., O'Brien, N.M. (2002).** Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* **18**, 75-81.

**Almond, G.W. (1996).** Research applications using pigs. *Anesthesiology Update* **12**, 707-716.

**Anguita, M., Canibe, N., Pérez, J.F., Jensen, B.B. (2006).** Influence of the amount of dietary fiber on the available energy from hindgut fermentation in growing pigs: Use of cannulated pigs and its in vitro fermentation. *J. Anim. Sci.* **84**, 2766-2778.

**Aruoma, O.I., Halliwell, B., Williamson, G. (1997).** *In vitro* methods for characterizing potential prooxidant and antioxidant actions of non-nutritive substances in plant foods. In: *Antioxidant Methodology*; Aruoma, O.I., Cuppett, S.I. (Eds.); AOCS Press: Champaign, I.L. pp 173-204.

**Aspinall, G.O. (1970).** Pectins, plant gums and other plant polysaccharides. In: *The carbohydrates*. W. Pigman, D. Horton (Hrsg.). Academic Press, New York.

**Atkinson, D.E., Walton, G.M (1967).** Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. *J. Biol. Chem.* **424**, 3239-3241.

**Aura, A.-M., O’Leary, K.A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Puupponen-Pimiä, R., Nuutila, A.M., Oksman-Caldentey, K.-M., Poutanen, K. (2002).** Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1725-1730.

**Bach Knudsen, K.E. (2001).** The nutritional significance of dietary fibre analysis. *Animal Feed Science and Technology* **90**, 3-20.

**Bach Knudsen, K.E., Canibe, N. (1997).** Digestion of carbohydrates in the small and large intestine of pigs fed on wheat or oat based rolls. In: 7<sup>th</sup> *Sympos. Dig. Physiol. in pigs*. Saint Malo.

**Bach Knudsen, K.E., Jensen, B.B., Hansen, I. (1993).** Digestion of polysaccharides and other major components in the small and large intestine of pigs fed on diets consisting of oat fractions rich in  $\beta$ -D-glucan. *Br. J. Nutr.* **70**, 537-556.

**Beckman, G., Ruffer, A. (1999).** *Mikroökologie des Darms*. Schlütersche Verlag.

**Beecher, G.R. (2003).** Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence, and intake. *J. Nutr.* **133**, 3248-3254.

**Behl, C., Moosmann, B. (2002).** Oxidative nerve cell death in Alzheimer’s disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biol. Chem.* **383**, 521-536.

**Berg, R.D. (1996).** The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* **4**, 430–435.

**Bieger, J., Cermak, R., Blank, R., de Boer, V.C., Hollman, P.C., Kamphues, J., Wolfram, S. (2008).** Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *J. Nutr.* **138**, 1417-1420.

**Bindelle, J., Buldgen, A., Lambotte, D., Wavreille, J., Leterme, P. (2007).** Effect of pig faecal donor and of pig diet composition on *in vitro* fermentation of sugar beet pulp. *Animal Feed Science and Technology* **132**, 212-226.

**Birkner, H.-J., Kern, F. (1974).** In vitro adsorption of bile salts to food residues, salicylazosulfapyridine, and hemicellulose. *Gastroenterology* **67**, 237-241.

**Blaut, M., Schoefer, L., Braune, A. (2003).** Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **73**, 79-87.

**Boisen, S., Fernández, J.A. (1997).** Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by *in vitro* analyses. *Animal Feed Science and Technology* **68**, 277-286.

**Bokkenheuser, V.D., Shackleton, C.H.L., Winter, J. (1987).** Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochem. J.* **248**, 953-956.

**Bolduan, G., Schnabel, E., Beck, M. (1991).** Fermentationseffekte in Dickdarmabschnitten beim Schwein. In: *Verdauungsphysiologie des Dickdarms. Fortschritte in der Tierphysiologie und Tierernährung* 22. M. Kirchgessner (Hrsg.), Verlag Paul Parey, Hamburg, Berlin, 80-83.

**Boulton, D.W., Walle, K., Walle, K. (1998).** Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J. Pharm. Pharmacol.* **50**, 243-249.

**Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F., Braesco, V. (2003).** The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium „The intelligent intestine“, held in Paris, June, 14, 2002. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, 675-683.

**Braune, A., Gutschow, M., Engst, W., Blaut, M. (2001).** Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Appl. Environ. Mikrobiol.* **67**, 5558-5567.

**Bravo, L. (1998).** Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.

**Caldwell, J. (1982).** Conjugation reactions in foreign-compound metabolism: definition, consequences, and species variations. *Drug Metabolism Rev.* **13**, 745-777.

**Cermak, R., Landgraf, S., Wolfram, S. (2003).** The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. *J. Nutr.* **133**, 2802-2807.

**Cermak, R., Landgraf, S., Wolfram, S. (2004).** Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum. *Br. J. Nutr.* **91**, 849-855.

**Chen, F., Castranova, V., Shi, X., Demers, L.M. (1999).** New insights into the role of nuclear factor- $\kappa$ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem.* **45**, 7-17.

**Chen, C.-Y., Milbury, P.E., Lapsley, K., Blumberg, J.B. (2005).** Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J. Nutr.* **135**, 1366-1373.

**Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigné, C., Rémésy, C. (2001).** Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *J. Nutr.* **131**, 2109-2114.

**Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C., Rémésy, C. (1999).** Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am. J. Physiol.* **40**, 120-126.

**Crozier, A., Lean, M.E.J., McDonald, M.S., Black, C. (1997).** Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 590-595.

**Cummings, J.H., Stephen, A.M. (2007).** Carbohydrate terminology and classification. *Eur. J. Clin. Nutr.* **61**, (Suppl. 1), 5-18.

**Da Silva, E.L., Tsushida, T., Terao, J. (1998).** Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. *Arch. Biochem. Biophys.* **349**, 313-320.

**Dänicke, S. (1999).** Zum Einfluss von Nicht-Stärke-Polysacchariden (NSP) und NSP-spaltenden Enzymen auf die Passagezeit der Ingesta sowie den Energie- und Proteinumsatz von wachsenden Schweinen und Broilern. *Übers. Tierernährg.* **27**, 221-273.

**Day, A.J., Cañada, F.J., Diaz, J.C., Kroon, P.A., Mclauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R.A., Williamson, G. (2000).** Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett.* **468**, 166-170.

**Day, A.J., Dopont, M.S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M.J.C., Morgan, M.R.A., Williamson, G. (1998).** Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity. *FEBS Lett.* **436**, 71-75.

**Day, A.J., Rothwell, J.A., Morgan, R.A. (2004).** Characterization of polyphenol metabolites. In: *Phytochemicals in health and disease*. Eds.: Bao, Y.P. & Fenwick, R. Marcel Dekker Inc., New York

**de Boer, V.C.J., Dihal, A.A., van der Woude, H., Arts, I.C.W., Wolffram, S., Alink, G.M., Rietjens, I.M.C.M., Keijer, J., Hollman, P.C.H. (2005).** Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *J. Nutr.* **135**, 1617-1618.

**de Groot, H. (1994).** Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepatology* **41**, 328-332.

**De Lange, C.F.D. (2000).** Charakterization of the non-starch polysaccharides. In: *Feed evaluation - principles and practice*. P.J. Moughan, M.W.A. Verstegen, M.I. Visser-Reyneveld (Hrsg.). Wageningen Press, Wageningen.

**De Whalley, C.V., Rankin, S.M., Hoult, J.R.S., Jessup, W., Leake, D.S. (1990).** Flavonoids inhibit the oxidative modification of low-density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **39**, 1743-1750.

**Decker, E.A. (1997).** Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutrition Reviews* **55**, 396-398.

**Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V.(2002).** *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*. 1. Ausgabe, Umschau Braus GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland.

**Diereck, N.A. (1989).** Biotechnology aids to improve feed and feed digestion: enzymes and fermentation. *Arch. Anim. Nutr.* **39**, 241-261.

**Diniz, A., Escuder-Gilabert, L., Lopes, N.P., Villanueva-Camañas, R.M., Sagrado, S., Medina-Hernández, M.J. (2008).** Characterization of interactions between polyphenolic compounds and human serum proteins by capillary electrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.* Accepted 29. Februar 2008.

**Diplock, A.T., Charleux, Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evance, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Vina-Ribes, J. (1998).** Functional food science and defense against reactive oxidative species. *Br. J. Nutr.* **80**, 77-112.

**Drew, M.D., van Kessel, A.G., Estrada, A.E., Ekpe, E.D., Zijlstra, R.T. (2002).** Effect of dietary cereal on intestinal bacteria populations in weaned pigs. *Can. J. Anim. Sci.* **82**, 607-609.

**Drochner, W. (1991).** Digestion of carbohydrates in the pig. In: *Proceedings of the 5th international symposium on digestive physiology in pigs*. M.W.A. Versteegen, J. Huisman, L.A. Hartog (Hrsg.), Wageningen, pp. 367-387.

**Drochner, W., Kerler, A., Zacharias, B. (2004).** Pectin in pig nutrition, a comparative review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **88**, 367-380.

**Dufour, C., Dangles, O. (2005).** Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1721**, 164-173.

**Dufour, C., Loonis, M., Dangles, O. (2007).** Inhibition of the peroxidation of linoleic acid by the flavonoid Quercetin within their complex with human serum albumin. *Free Rad. Biol. Med.* **43**, 241-252.

**Eastwood, M.A., Huth, K., Mitchell, W.D. (1980).** Ernährungsphysiologische Bedeutung der Ballaststoffe. In: *Ernährungslehre und Diätetik*. H.-D. Cremer, D. Hötzel, J. Kühnau (Hrsg.), Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

**Eder, R. (1996).** Pigments. In: *Food analysis*. Nollet, L. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York, pp. 937-1014.

**Elmadfa, J., Leitzmann, C. (2004).** Ernährung des Menschen. *UTB Verlag*, Stuttgart, 4. Auflage.

**Englyst, H.N., Quigley, M.E., Hudson, G.J. (1994).** Determination of dietary fibre as non-starch polysaccharides with gas-liquid chromatography, high-performance liquid chromatography or spectrophotometric measurements of constituent sugars. *Analyst* **119**, 1497-1509.

**Englyst, K.N., Englyst, H.N. (2005).** Carbohydrate bioavailability. *Br. J. Nutr.* **94**, 1-11.

**Erlund, I. (2000).** Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **56**, 545-553.

**Flourie, B., Vidon, N., Chayvialle, J.-A., Palma, R., Franchisseur, C., Bernier, J.-J. (1985).** Effect of increased amounts of pectin on a solid-liquid meal digestion in healthy man. *Am. J. Clin. Nutr.* **42**, 495-503.

**Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E., Kinsella, J.E. (1993).** Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **341**, 454-457.

**Gee, J.M., DuPont, M.S., Day, A.J., Plumb, G.W., Williamson, G., Johnson, I.T. (2000).** Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J. Nutr.* **130**, 2765-2771.

**Gee, J.M., DuPont, M.S., Rhodes, M.J.C., Johnson, I.T. (1998).** Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Rad. Biol. Med.* **25**, 19-25.

**Gibson, G.G., Skett, P. (1994).** In: Introduction to drug metabolism, p. 107. *Blackie Academic and Professional*, London.

**Glitsø, L.V., Gruppen, H., Schols, H.A., Højsgaard, S., Sandstrøm, B., Bach Knudsen, K.E. (1999).** Degradation of rye arabinoxylans in the large intestine of pigs. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 961-969.

**Graefe, E.U., Wittig, J., Mueller, S., Riethling, A.K., Uehleke, B., Drewelow, B., Pforte, H., Jacobasch, G., Derendorf, H., Veit, M. (2001).** Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J. Clin. Pharmacol.* **41**, 492-499.

**Graf, B.A., Mullen, W., Caldwell, S.T., Hartley, R.C., Duthie, G.G., Lean, M.E., Crozier, A., Edwards, C.A. (2005).** Disposition and metabolism of [2-<sup>14</sup>C]quercetin-4'-glucoside in rats. *Drug Metabol. Dispos.* **33**, 1036-1043.

**Graham, H., Hesselman, K., Åman, P. (1986).** The influence of wheat bran and sugar-beet pulp on the digestibility of dietary components in a cereal-based pig diet. *J. Nutr.* **116**, 246-251.

**Griffiths, L.A., Barrow, A. (1972).** Metabolism of flavonoid compounds in germ-free rats. *Biochem. J.* **130**, 1161-1162.

**Grieshop, C.M., Reese, D.E., Fahey, G.C. jr. (2001).** Nonstarch polysaccharides and oligosaccharides in swine nutrition. In: *Swine nutrition*. A.J. Lewis, L.L. Southern (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton, London, NY, Washington.

**Guerin, S., Ramonet, Y., LeCloarec, J., Meunier-Salaün, M.C., Bourguet, P., Malbert, C.H. (2001).** Changes in intragastric meal distribution are better predictors of gastric emptying rate in conscious pigs than are meal viscosity or dietary fibre concentration. *Br. J. Nutr.* **85**, 343-350.

**Gugler, R., Leschik, M., Dengler, H.J. (1975).** Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **9**, 229-234.

**Gupta, K., Panda, D. (2002).** Perturbation of microtubule polymerization by quercetin through tubulin binding: a novel mechanism of its antiproliferative activity. *Biochemistry* **41**, 13029-13038.

**Haberer, B., Schulz, E. (1998).** Zum Einfluss NSP-hydrolysierender Enzyme in der Schweinefütterung. *Übers. Tierernährg.* **26**, 25-64.

**Häglund, B.O., Elisson, M., Sundelöf, L.O. (1988).** Diffusion permeability in concentrated polymer solutions. *Chemica Scripta* **28**, 129-131.

**Halliwell, B. (1997).** Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr. Rev.* **55**, 44-49.

**Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1999).** Free radicals in biology and medicine. Third Edition, *Oxford University Press., Oxford, UK.*

**Halliwell, B., Zhao, K., Whiteman, M. (2000).** The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant action ?. *Free Radic. Res.* **33**, 819-830.

**Harborne, J.B., Williams, C.A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**, 481-504.

**Hays, W.S., Jenison, S.A., Yamada, T., Pastuszyn, A., Glew, R.H. (1996).** Primary structure of the cytosolic  $\beta$ -glucosidase of guinea pig liver. *Biochem. J.* **319**, 829-837.

**Heilmann, J., Merford, I. (1998a).** Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden. I. Resorption und Metabolismus von Flavonolen. *Pharmazie in unserer Zeit* **27**, 58-65.

**Heilmann, J., Merford, I. (1998b).** Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden. II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. *Pharmazie in unserer Zeit* **27**, 173-183.

**Herrmann, K. (1976).** Flavonols and flavones in food plants: a review. *J. Fd. Technol.* **11**, 433-448.

**Herrmann, K. (1988).** On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.* **186**, 1-5.

**Herrmann, K. (1990).** Vorkommen und Gehalte der Flavonoide in Obst. *Erwerbsobstbau*, **32**, 32-37, Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

**Herrmann, K. (1991).** Vorkommen, Gehalte und Bedeutung von Inhaltsstoffen des Obstes und Gemüses III. *Die industrielle Obst- und Gemüseverwertung*: 156-160.

**Herrmann, K. (1995).** Hinweise auf eine antioxidative Wirkung von Anthocyaninen. *Gordian* **95**, 84-86.

**Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. (1992a).** Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2379-2383.

**Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Venema, D.P. (1992b).** Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 1591-1598.

**Hertog, M.G.L., Feskens, E.J., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., Kromhout, D. (1994).** Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen Elderly Study. *Nutrition and Cancer* **22**, 175-184.

**Hertog, M.G.L., Katan, M.B. (1998).** Quercetin in foods, cardiovascular disease, and cancer. In: *Flavonoids in Health and Disease*. Rice-Evans, C.A. & Packer, L. (Hrsg.), Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 447-467.

**Hertog, M.G.L., Kromhout, D., Aravanis, C., et al. (1995).** Flavonoid intake and long term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Intern. Med.* **155**, 381-386.

**Hillman, L., Peters, S., Fisher, A., Pomare, E.W. (1983).** Differing effects of pectin, cellulose and lignin on stool pH, transit time and weight. *Br. J. Nutr.* **50**, 189-195.

**Hollman, P.C., de Vries, J.H., van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J., Katan, M.B. (1995).** Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 1276-1282.

**Hollman, P.C., v.d. Gaag, M., Mengelers, M.J., van Trijp, J.M., de Vries, J.H., Katan, M.B. (1996b).** Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 703-707.

**Hollman, P.C.H., Arts, I.C.W. (2000).** Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Agric.* **80**, 1081-1093.

**Hollman, P.C.H., Buysman, M.N.C.P., van Gameren, Y., Cnossen, E.P.J., de Vries, J.H.M., Katan, M.B. (1999).** The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Rad. Res.* **31**, 569-573.

**Hollman, P.C.H., Katan, M.B. (1998).** Absorption, metabolism, and bioavailability of flavonoids. In: *Flavonoids in health and disease*. Eds.: Rice-Evans, C.A., Packer, L. Marcel Dekker, New York, pp. 483-522.

**Hollman, P.C.H., Katan, M.B. (1999).** Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food and Chemical Toxicology* **37**, 937-942.

**Hollman, P.C.H., Van Trijp, J.H.M., Buysman, M.N.C.P. (1996a).** Fluorescence detection of flavonols in HPLC by postcolumn chelation with aluminium. *Anal. Chem.* **68**, 3511-3515.

**Hollman, P.C.H., van Trijp, J.M.P., Buysman, M.N.C.P., Gaag, M.S., Mengelers, M.J.B., de Vries, J.H.M., Katan, M.B. (1997).** Relative bioavailability of the antioxidant quercetin from various foods in man. *FEBS Letter* **418**, 152-156.

**Huth, K., Cremer, H.-D. (1977).** Zur Physiologie unverdaulicher Kohlenhydrate. *Ernähr. Umschau* **24**, 72.

**Huth, K., Pötter, C., Cremer, H.-D. (1980).** Füll- und Quellstoffe als Zusatz industriell hergestellter Lebensmittel. In: *Pflanzenfasern - Ballaststoffe in der menschlichen Ernährung*. H. Rottka (Hrsg.), Thieme Verlag Stuttgart, New York.

**Ioku, K., Pongpiriyadacha, Y., Konishi, Y., Takei, Y., Nakatani, N., Terao, J. (1998).**  $\beta$ -glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **62**, 1428-1431.

**Ishikawa, T., Suzukawa, M., Ito, T., Yoshida, H., Ayaori, M., Nishiwaki, M., Yonemura, A., Hara, Y., Nakamura, H. (1997).** Effect of tea flavonoid supplementation on the susceptibility of low-density lipoprotein oxidative modification. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 261-266.

**Ishikawa, Y., Kitamura, M. (2000).** Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kindney International* **58**, 1078-1087.

**Jaganath, I.B., Mullen, W., Edwards, C.A., Crozier, A. (2006).** The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. *Free Rad. Res.* **40**, 1035-1046.

**Janisch, K.M., Williamson, G., Needs, P., Plumb, G.W. (2004).** Properties of quercetin conjugates: modulation of LDL oxidation and binding of human serum albumin. *Free Radic. Res.* **38**, 877-884.

**Jenkins, D.J.A., Wolever, T.M.S., Leeds, A.R., Gassull, M.A., Haisman, P., Dilawari, J., Goff, D.V., Metz, G.L., Alberti, K.G.M.M. (1978).** Dietary fibres, fibre analogues and glucose tolerance: importance of viscosity. *Br. Med. J.* **1**, 1392-1394.

**Jensen, B.B., Jørgensen, H. (1994).** Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1897-1904.

**Jeroch, H., Drochner, W., Simon, O. (1999).** Ernährung landwirtschaftlicher Nutztiere. *Ulmer Verlag*, Stuttgart.

**Johansen, H.N., Bach Knudsen, K.E. (1994).** Effects of reducing the starch content in oat-based cellulose on jejunal flow and absorption of glucose over an isolated loop of jejunum in pigs. *Br. J. Nutr.* **72**, 717-729.

**Johansen, H.N., Bach Knudsen, K.E. (1997).** Physico-chemical properties and the degradation of oat bran polysaccharides in the gut of pigs. *J. Sci. Agric.* **73**, 81-92.

**Johansen, H.N., Bach Knudsen, K.E., Sandström, B., Skjøth, F. (1996).** Effects of varying content of soluble dietary fibre from wheat flour and oat milling fractions on gastric emptying in pigs. *Br. J. Nutr.* **75**, 339-351.

**Kandaswami, C., Middleton, E. (1994).** Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* **366**, 351-376.

**Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Watanabe, J., Hayashi, S. (1993).** The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **14**, 77-87.

**Kerler, A. (2002).** Zur Wirkung verschiedener Pektindosierungen und Verdauungsprozesse beim Absatzferkel. *Diss. med. vet. Universitäten München/Hohenheim*.

**Kroon, P.A., Clifford, M.N., Crozier, A. et al. (2004).** How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*? *Am. J. Clin. Nutr.* **80**, 15-21.

**Kühnau, J. (1976).** The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet* **24**, 117-191.

**Lambert, J.D., Hong, J., Yang, G., Liao, J., Yang, C.S. (2005).** Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 284-291.

**Le Goff, G., van Milgen, J., Noblet, J. (2002).** Influence of dietary fibre on digestive utilization and rate of passage in growing pigs, finishing pigs and adult sows. *Animal Science* **74**, 503-515.

**Lesser, S., Cermak, R., Wolfram, S. (2004).** Bioavailability of Quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *J. Nutr.* **134**, 1508-1511.

**Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R.G., Last, L. (1993).** Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *The Plant Cell* **5**, 171-179.

**Linseisen, J., Radtke, J., Wolfram, G. (1997).** Flavonoidzufuhr Erwachsener in einem bayrischem Teilkollektiv der Nationalen Verzehrsstudie. *Z. Ernährungswiss.* **36**, 403-412.

**Liu, J. X., Susenbeth, A., Südekum, K. H. (2002).** *In vitro* gas production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves. *J. Anim. Sci.* **80**, 517-524.

**Low, A.G. (1985).** Role of dietary fibre in pig diets. In: *Recent advances in animal nutrition*. W. Haresign & D.J.A. Cole (Hrsg.) Butterworths 1985 London, pp. 87-112.

**Macfarlane, G.T., Gibson, G.R. (1997).** Carbohydrate fermentation, energy transduction and gas metabolism in the human large intestine. In: *Gastrointestinal microbiology*. R.I. Macjic, B.A. White (Hrsg.), Chapman and Hall, New York, NY, pp. 269-318.

**Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigné, C., Texier, O., Régéat, F., Rémésy, C. (1998).** Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett.* **426**, 331-336.

**Manach, C., Morand, C., Demigné, C., Texier, O., Régéat, F., Rémésy, C. (1997).** Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters* **409**, 12-16.

**Manach, C., Morand, C., Texier, O., Favier, M.L., Agullo, G., Demigné, C., Regerat, F., Rémésy, C. (1995).** Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J. Nutr.* **125**, 1911-1922.

**Manach, C., Texier, O., Régérat, F., Agullo, G., Demigné, C., Rémésy, C. (1996).** Dietary quercetin is recovered in rat plasma as conjugated derivatives of isorhamnetin and quercetin. *Nutr. Biochem.* **7**, 375-380.

**Martini, S., Bonechi, C., Rossi, C. (2008).** Interaction of quercetin and its conjugate quercetin  $-O-\beta$ -D-glucopyranoside with albumin as determined by NMR relaxation data. *J. Nat. Prod.* **71**, 175-178.

**Mazza, G., Miniati, E. (1993).** Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. *CRC Press*, Boca Raton.

**McAnlis, G.T., McEneny, J., Pearce, J., Young, I.S. (1999).** Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. *European Journal of Clinical Nutrition* **53**, 92-96.

**Mei, Y., Qian, F., Wei, D., Liu, J. (2004).** Reversal of cancer multidrug resistance by green tea polyphenols. *J. Pharm. Pharmacol.* **56**, 1307-1314.

**Menke, K.H., Steingass, H. (1988).** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Rev.* **28**, 7-55.

**Merry, R.J., MacAllan, A.B. (1983).** A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and the solid fractions of rumen digesta. *Br. J. Nutr.* **50**, 701-709.

**Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000).** The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Res.* **52**, 673-751.

**Miura, Y.H., Tomita, I., Watanabe, T., Hirayama, T., Fukui, S. (1998).** Active oxygens generation by flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* **21**, 93-96.

**Mizuma, T., Ohta, K., Awazu, S. (1994).** The  $\beta$ -anomeric and Glucose preferences of Glucose transport carrier for intestinal active absorption on monosaccharide conjugates. *Biochim. Biophys. Acta.* **1200**, 117-122.

**Mizuma, T., Ohta, K., Hayashi, M., Awazu, S. (1993).** Comparative study of active absorption by the intestine and disposition of anomers of sugar-conjugated compounds. *Biochemical Pharmacology* **45**, 1520-1523.

**Moore, W.E.C., Moore, L.V.H., Cato, E.P., Wilkins, T.D., Kornegay, E.T. (1987).** Effect of high-fiber and high-oil diets on the fecal flora of swine. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1638-1644.

**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**, 212-219.

**Morand, C., Manach, C., Crespy, V., Remesy, C. (2000).** Respective bioavailability of quercetin aglycone and its glycosides in a rat model. *Biofactors* **12**, 169-174.

**Morgan, J-F., Klucas, R.V., Grayer, R.J., et al. (1997).** Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissue: prooxidant and antioxidant properties. *Free Rad. Biol. Med.* **22**, 861-870.

**Mosenthin, R., Hambrecht, E., Sauer, W.C. (2001).** Utilisation of different fibres in piglet feeds. In: *Recent Development in Pigs 3*. J. Wiseman, P.C. Garnsworthy (Eds.), Nottingham University Press.

**Mullen, W., Graf, B.A., Caldwell, S.T., Hartley, R.C., Duthie, G.G., Edwards, C.A., Lean, M.E., Crozier, A. (2002).** Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-(14)C]quercetin-4'-glucoside. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6902-6909.

**Munoz, M., Henderson, M., Haber, M., Norris, M. (2007).** Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life* **59**, 752-757.

**Murota, K., Terao, J. (2005).** Quercetin appears in the lymph of unanesthetized rats as its phase II metabolites after administered into the stomach. *FEBS Lett.* **579**, 5343-5346.

**Murota, K., Terao, J. (2003).** Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* **417**, 12-17.

**Musonda, C.A., Chipman, J.K. (1998).** Quercetin inhibits hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced NF- $\kappa$ B DNA binding activity and DNA damage in HepG2 cells. *Carcinogenesis* **19**, 1583-1589.

**Nair, M.P., Mahajan, S., Reynolds, J.L., Aalinkeel, R., Nair, H., Schwartz, S.A., Kandaswami, C. (2006).** The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- $\kappa$ B system. *Clinical and Vaccine Immunology* **13**, 319-328.

**Naumann, C., Bassler, R. (1976).** Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. In: *Methodenbuch, Vol III, mit Supplementen von 1983, 1988, 1993 und 1997*, VDLUFA Verlag, Darmstadt, Deutschland.

**Németh, K., Plumb, G.W., Berrin, J.-G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H.Y., Williamson, G., Swallow, D.M., Kroon, P.A. (2003).** Deglycosylation by small intestinal epithelial cell  $\beta$ -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur. J. Nutr.* **42**, 29-42.

**Nielsen, S.E., Breinholt, V., Justesen, U., Cornett, C., Dragsted, L.O. (1998).** *In vitro* biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotika* **28**, 289-401.

**Obermeier, M.T., White, R.E., Yang, C.S. (1995).** Effects of bioflavonoids on hepatic P<sub>450</sub> activities. *Xenobiotika* **25**, 575-584.

**Owusu-Asiedu, A., Patience, J.F., Laarveld, B., Van Kessel, A.G., Simmins, P.H., Zijlstra, R.T. (2006).** Effects of guar gum and cellulose on digesta passage rate, ileal microbial populations, energy and protein digestibility, and performance of grower pigs. *J. Anim. Sci.* **84**, 843-852.

**Papadopoulou, A., Green, R.J., Frazier, R.A. (2005).** Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 158-163.

**Park, Y., Hunter, D.J., Spiegelman, D. et al. (2005).** Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer. *J.A.M.A.* **294**, 2849-2857.

**Patil, B.S., Pike, L.M., Hamilton, B.K. (1995).** Changes in quercetin concentration in onion (*Allium cepa L*) owing to location, growth stage and soil type. *New Phytologist* **130**, 349-355.

**Pietta, P.-G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042.

**Pincemail J., Deby, C., Thirion, A., de Bruyn-Dister, M., Goutier R. (1988).** Human myeloperoxidase activity is inhibited *in vitro* by quercetin. Comparison with three related compounds. *Experientia* **44**, 450-452.

**Piskula, M.K., Terao, J. (1998a).** Accumulation of (-)-Epicatechin in rat of plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J. Nutr.* **128**, 1172-1178.

**Piskula, M.K., Terao, J. (1998b).** Quercetin's solubility affects its accumulation in rat plasma after oral administration. *J. Agric. Food. Chem.* **46**, 4313-4317.

**Piva, A., Casadei, G., Biagi, G. (2002).** An organic acid blend can modulate swine intestinal fermentation and reduce microbial proteolysis. *Can. J. Anim. Sci.* **82**, 527-532.

**Pluske, J.R., Pethick, D.W., Durmic, Z., Hampson, D.J., Mullan, B.P. (1999).** Non-starch polysaccharides in pig diets and their influence on intestinal microflora, digestive physiology and enteric disease. In: *Recent Advances in animal nutrition*. P.C. Garnsworthy, J. Wiseman (Hrsg.), Nottingham University Press, Nottingham.

**Pluske, J.R., Pethick, D.W., Durmic, Z., Hampson, D.J., Mullan, B.P. (2001).** Non-starch polysaccharides on intestinal microflora, digestive physiology and enteric disease. In: *Recent developments in pig nutrition 3*. J. Wiseman, P.C. Garnsworthy (Hrsg.), Nottingham University Press.

**Potkins, Z.V., Lawrence, T.L.J., Thomlinson, J.R. (1991).** Effects of structural and non-structural polysaccharides in the diet of the growing pig on gastric emptying rate and the rate of passage of digesta to the terminal ileum and through the total gastrointestinal tract. *Br. J. Nutr.* **65**, 391-413.

**Price, K.R., Bacon, J.R., Rhodes, M.J.C. (1997).** Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*). *J. Agric. Food Chem.* **45**, 938-942.

**Princen, H.M.G., van Duyvenvoorde, W., Buytenhek, R., Blonk, C., Tijburg, L.B.M., Languis, J.A.E., Meinders, A.E., Pijl, H. (1998).** No effect of consumption of green and black tea on plasma lipid, and antioxidant levels and on LDL oxidation in smokers. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* **18**, 833-841.

**Prior, R.L. (2003).** Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, 570-578.

**Prosky, L., Asp, N.-G., Furda, I., DeVries, J.W., Schweizer, T.F., Harland, B.F. (1985).** Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *J. AOAC* **68**, 677-679.

**Rainbird, A.L., Low, A.G. (1986a).** Effect of guar gum on gastric emptying in growing pigs. *Br. J. Nutr.* **55**, 87-98.

**Rainbird, A.L., Low, A.G. (1986b).** Effect of various types of dietary fibre on gastric emptying in growing pigs. *Br. J. Nutr.* **55**, 111-121.

**Rasmussen, S.E., Miller Breinholt, V. (2003).** Non-nutritive bioactive food constituents of plants: bioavailability of flavonoids. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **73**, 101-111.

**Rérat, A. (1978).** Digestion and absorption of carbohydrates and nitrogenous matters in the hindgut of the omnivorous nonruminant animal. *J. Anim. Sci.* **46**, 1808-1837.

**Rey, D.K., Labuza, T.P. (1981).** Characterization of the effect of solutes on the water binding and gel strength properties of carrageenan. *J. Food Sci.* **46**, 786-789.

**Rice-Evans, C. (2001).** Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* **8**, 797-807.

**Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Bolwell, P.G., Bramley, P.M., Pridham, J.B. (1995).** The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad Res* **22**, 375-383.

**Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999).** Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* **66**, 401-436.

**Robinson I.M., Allison, M.J., Bucklin, J.A. (1981).** Characterization of the cecal bacteria of normal pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 950-955.

**Rohn, S., Rawel, H.M., Kroll, J. (2004).** Antioxidant activity of protein-bound quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4725-4729.

**Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault M.C., et al. (1998).** Functional foodscience and gastrointestinal physiology and function. *B.r J. Nutr.* **80**, 147–171.

**Sandhu, K.S., El Samahi, M.M., Mena, I., Dooley, C.P., Valenzuela, J.E. (1987).** Effect of pectin on gastric emptying and gastroduodenal motility in normal subjects. *Gastroenterology* **92**, 486-492.

**Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2005).** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit. Rev. Food Sci Nutr.* **45**, 287-306.

**Scalbert, A., Williamson, G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **130**, 2073-2085.

**Schneider, H., Schwartz, A., Collins, M.D., Blaut, M. (1999).** Anaerobic transformation by bacteria from the human intestinal tract. *Arch. Microbiol.* **171**, 981-91.

**Schoefer, L., Mohan, R., Schwartz, A., Braune, A., Blaut, M. (2003).** Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5849-5854.

**Schofield, P., Pitt, R.E., Pell, A.N. (1994).** Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *J. Anim. Sci.* **72**, 2980-2991.

**Schroeter, H., Spencer, J.P., Rice-Evans, C., Williams, R.J. (2001).** Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem. J.* **358**, 547-557.

**Schulze, J., Bock, W. (1993).** Aktuelle Aspekte der Ballaststoffforschung. Behr's Verlag, Hamburg.

**Selvendran, R.R. (1984).** The plant cell wall as a source of dietary fibre: chemistry and structure. *Am. J. Clin. Nutr.* **39**, 320-337.

**Selvendran, R.R., Stevens, B.J.H., Du Pont, M.S. (1987).** Dietary fiber: Chemistry, analysis and properties. *Adv. Food Res.* **31**, 117.

**Shirai, M., Moon, J.-H., Tsushida, T., Terao, J. (2001).** Inhibitory effect of a quercetin metabolite, quercetin 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronide, on lipid peroxidation in liposomal membranes. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5602-5608.

**Shirley, B.W. (1996).** Flavonoid biosynthesis: "new" function for an old pathway. *Trends Plant Sci.* **1**, 377-382.

**Sies, H. (1986).** Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed.* **25**, 1058-1071.

**Sies, H. (1993).** Strategies of antioxidant defence. *Eur. J. Biochem.* **215**, 213-219.

**Snel, J., Harmsen, H.J.M., van der Wielen, P.W.J.J., Williams, B.A. (2002).** Dietary strategies to influence the gastrointestinal microflora of young animals, and its potential to improve intestinal health. In: *Nutrition and health of the gastrointestinal tract*. M.C. Blok, H.A. Vahl, L. de Lange, A.E. van de Braak, G. Hemke, and H. Hessing (Hrsg.). Wageningen Academic Publishers, Niederlande, pp. 37-69.

**Souffrant, W.B. (2001).** Effect of dietary fibre on ileal digestibility and endogenous nitrogen losses in the pig. *Anim. Feed Sci. Technol.* **90**, 93-102.

**Spencer J.P.E., Schroeter, H., Crossthwaite, A.J., Kuhnle, G., Williams, R.J., Rice-Evans, C. (2001).** Contrasting influences of glucuronidation and *o*-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1139-1146.

**Spencer, J.P.E., Schroeter, H., Rechner, A.R., Rice-Evans, C. (2001).** Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms *in vivo*. *Antioxid. Redox. Signal.* **3**, 1023-1039.

**Stasse-Wolthuis, M., Albers, H.F.F., van Jeveren, J.G.C., Wil de Jong, J., Hautvast, J.G.A.J., Hermus, R.J.J., Katan, M.B., Brydon, W.G., Eastwood, M.A. (1980).** Influence of dietary fiber from vegetables and fruits, bran or citrus pectin on serum lipids, fecal lipids, and colonic function. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**, 1745-1756.

**Stevens, C.E. (1988).** General characteristics of the digestive system. In: *Comparative physiology of the vertebrate digestive system*. C.E. Stevens (Hrsg.) Cambridge: Cambridge University Press, 1-21.

**Stevens, C.E., Hume, I.D. (1998).** Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiol. Rev.* **78**, 393-427.

**Tamura, M., Nakagawa, H., Tsushida, T., Hirayama, K., Itoh, K. (2007).** Effect of pectin enhancement on plasma quercetin and fecal flora in rutin-supplemented mice. *J. Food Sci.* **72**, 648-651.

**Tauber A.I., Fay, J.R., Marletta M.A. (1984).** Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxydase. *Biochem. Pharmacol.* **33**, 1367-1369.

**Theander, O., Åman, P., Westerlund, E., Graham, H. (1994).** Enzymatic/chemical analysis of dietary fiber. *J. AOAC Inter.* **77**, 703-709.

**Theander, O., Westerlund, E., Åman, P., Graham, H. (1989).** Plant cell walls and monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* **23**, 205-225.

- Thibault, J.-F., Ralet, M.-C. (2001).** Pectins, their origin, structure and functions. In: *Advanced dietary fibre technology*. B.V. McCleary, L. Prosky (Hrsg.), Blackwell Science Ltd, Oxford, Berlin.
- Thomas, B. (1980).** Definition, Zusammensetzung und Eigenschaften von Ballaststoffen. In: *Pflanzenfasern - Ballaststoffe in der menschlichen Ernährung*. H. Rottka (Hrsg.), Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Thompson, M., Williams, C.R. (1976).** Stability of flavonoid complexes of copper(II) and flavonoid antioxidant activity. *Anal. Chim. Acta* **85**, 375-381.
- Tilgmann, C., Ulmanen, I. (1996).** Purification methods of mammalian catechol-O-methyltransferases. *J. Chromatogr. B.* **684**, 147-161.
- Torel, J., Cillard, J., Cillard, P. (1986).** Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* **25**, 383-385.
- Trela, B.A., Carlson, G.P. (1987).** Effect of flavonone on mixed-function oxidase and conjugation reactions in rats. *Xenobiotica* **17**, 11-16.
- Treutter, D. (2005).** Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol.* **7**, 581-591.
- Trowell, H.C. (1977).** Food and dietary fibre. *Nutr. Rev.* **35**, 6.
- Ueno, I., Nakano, N., Hirono, I. (1983).** Metabolic fate of [14C] quercetin in the ACI rat. *Jpn. J. Exp. Med.* **53**, 41-50.
- Urquiaga, I., Leighton, F. (2000).** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biol. Res.* **33**, 55-64.
- Van Acker, F.A.A., Schouten, O., Haenen, G.R.M.M., Van der Vijgh, W.J.F., Bast, A. (2000).** Flavonoids can replace  $\alpha$ -tocopherol as an antioxidant. *FEBS* **473**, 145-148.

**Van Acker, S.A.B.E., Koymans, L.M.H., Bast, A. (1993).** Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. *Free Radic. Biol. Med.* **15**, 311-328.

**Van den Berg, R., Haenen, G.R.M.M., van den Berg, H., Bast, A. (2001).** Transcription factor NF- $\kappa$ B as a potential biomarker for oxidative stress. *Brit. J. Nutr.* **86**, 121-127.

**Van Nieuwenhoven, M.A., Kovacs, E.M.R., Brummer, R-J.M., Westerterp-Plantenga, M.S., Brouns, F. (2001).** The effect of different dosages of guar gum on gastric emptying and small intestinal transit of a consumed semisolid meal. *J. Am. Col. Nutr.* **20**, 97-91.

**Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. (1991).** Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **74**, 3583-3597.

**Varel, V.H. (1987).** Activity of fiber-degrading microorganisms in the pig large intestine. *J. Anim. Sci.* **65**, 488-496.

**Varel, V.H., Jung, H.G., Pond, W.G. (1988).** Effects of dietary fiber of young adult genetically lean, obese and contemporary pigs: rate of passage, digestibility and microbiological data. *J. Anim. Sci.* **66**, 707-712.

**Varel, V.H., Pond, W.G. (1985).** Enumeration and activity of cellulolytic bacteria from gestating swine fed various levels of dietary fiber. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 858-862.

**Varel, V.H., Pond, W.G., Pekas, J.C., Yen, J.T. (1982).** Influence of high-fiber diet on bacterial populations in gastrointestinal tracts of obese- and lean-genotype pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 107-112.

**Varel, V.H., Pond, W.G., Yen, J.T. (1984).** Influence of dietary fiber on the performance and cellulose activity of growing-finishing swine. *J. Anim Sci.* **59**, 388-393.

**Verhoeven, M.E., Bovy, A., Collins, G., Muir, S., Robinson, S., de Vos, C.H.R., Colliver, S. (2002).** Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of experimental Botany.* **53**, 2099-2106.

**Wadsworth, T.L., McDonald, T.L., Koop, D.R. (2001).** Effects of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) and Quercetin on lipopolysaccharid-induced signalling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 963-974.

**Wagner, D.D., Thomas, O.P. (1978).** Influence of diets containing rye or pectin on intestinal flora of chicks. *Poult. Sci.* **57**, 971-975.

**Walgren, R.A., Karnaky, K.J. Jr., Lindenmayer, G.E., Walle, T. (2000a).** Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'- $\beta$ -glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 830-836.

**Walgren, R.A., Lin, J.-T., Kinne, R.K.-H., Walle, T. (2000b).** Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'- $\beta$ -glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **294**, 837-843.

**Walle, T., Walle, U.K., Halushka, P.V. (2001).** Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *J. Nutr.* **131**, 2648-2652.

**Wallingford, L., Labuza, T.P. (1983).** Evaluation of the water binding properties of food hydrocolloids by physical/chemical methods and in a low fat meat emulsion. *J. Food Sci.* **48**, 1-5.

**Wenk, C. (2001).** The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. *Anim. Feed Sci. Technol.* **90**, 21-33.

**Wenk, C. (2007).** Secondary effects of dietary fibre in the nutrition of monogastric farm animals. In: *Sekundärwirkungen von Futterinhaltsstoffen - vom Nährstoff zum Wirkstoff*, 6. BOKU-Symposium Tierernährung, Wien 2007.

**Wilfart, A., Montagne, L., Simmins, H., Noblet, J., van Milgen, J. (2007).** Effect of fibre content in the diet on the mean retention time in different segments of the digestive tract in growing pigs. *Livestock Science* **109**, 27-29.

**Williams, C.A., Harborne, J.B. (1986).** Flavone and flavonol glycosides. In: *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*. Harborne, J.B. (Hrsg.). Chapman and Hall, pp. 337-385.

**Williams, C.A., Harborne, J.B. (1994).** Advances in research since 1986. In: *The Flavonoids*. J.B. Harborne (Hrsg.), Chapman and Hall, London, BG, pp. 337-385.

**Williamson, G., Day, A.J., Plumb, G.W., Couteau, D. (2000).** Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochem. Soc.* **28**, 16-22.

**Wolffram, S., Blöck, 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**, 630-635.

**Wrick, K. L., Robertson, J. B., Van Soest, P. J., Lewis, B. A., Rivers, J. M., D. A. Roe, Hackler L. R. (1983).** The influence of dietary fiber source on human intestinal transit and stool output. *J. Nutr.* **113**, 1464-1479.

**Wu, C.-P., Calcagno, A.M., Hladky, S.B., Ambudkar, S.V., Barrand, M.A. (2005).** Modulatory effects of plant phenols on human multidrug-resistance proteins 1, 4 and 5 (ASCC1, 4 and 5). *FEBS Journal* **272**, 4725-4740.

**Xiao, J., Suzuki, M., Jiang, X., Chen, X., Yamamoto, K., Ren, F., Xu, M. (2008).** Influence of B-ring hydroxylation on interactions of flavonols with bovine serum albumin. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 2350-2356.

**Youdim, K.A., Spencer, J.P.E., Schroeter, H., Rice-Evans, C. (2002).** Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol. Chem.* **383**, 503-519.

**Zelter, J. (1999).** Untersuchungen zum Einfluss eines steigenden Zellulosegehaltes im Futter auf an der Pufferung beteiligte Parameter des Ileuminhaltes beim Göttinger Miniaturschwein. *Diss. Agr. Sc. Universität Hohenheim*.

**Zhai, S., Dai, R., Frieman, F.K., Vestal, R.E. (1998).** Comparative inhibition of human cytochromes P<sub>450</sub>1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metabolism and Disposition* **26**, 989-992.

**Zhu, Q.Y., Huang, Y., Chen, Z.-Y. (1999).** Interaction between flavonoids and  $\alpha$ -tocopherol in human low density lipoprotein. *J. Nutr. Biochem.* **11**, 14-21.

**Zwietiering, M.H., Rombouts, F.M., van't Riet, K. (1992).** Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 139-145.

## Danksagung

Ein herzliches Dankeschön an:

Herrn Prof. Dr. Siegfried Wolfram für die Überlassung der Promotionsarbeit und die zu jeder Zeit gewährte Unterstützung und Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Ralf Blank für die Hilfe bei der Versuchsplanung und im Besonderen für die stetige Bereitschaft auch in frühen Morgenstunden an diversen Wochenenden mir bei der Blutabnahme behilflich zu sein sowie der ausgezeichneten Unterstützung bei der Auswertung der Versuchsdaten.

Frau Dr. Silvia Wein für die zahlreich gelungen OP's zur Implantierung der "richtigen" Katheter und die 24-stündige Einsatzbereitschaft für das Wohl der Tiere während aller Versuchsdurchgänge.

Das Spitzen-OP-Team bestehend aus Jane, Norma, Miriam und den zahlreichen fleißigen Hiwis im Stall und der TA's, ohne die die OP's und die Blutprobenentnahmen nicht möglich gewesen wären.

Miriam und Sabine für Ihre "Fingerfertigkeiten" bei der rektalen Kotprobenentnahmen unter Gefährdung von Leib und Seele (gut, dass es im Stall Fenster gab...).

Petra Schulz für die "Einweihung" in die Geheimnisse der HPLC-Analyse und bei der tatkräftigen (und "früh"zeitigen) Unterstützung bei der Aufarbeitung der zahlreichen Plasmaproben.

Maike Jürgensen, die bei "HPLC-Notfällen" mir stets behilflich zur Seite stand und mich über die "Feen-Tätigkeiten" im Labor aufgeklärt hat.

Wiebke Kühl für die tatkräftige Unterstützung bei den *in vitro*-Fermentationsversuchen und den heilenden Fähigkeiten, die ich in Anspruch nehmen durfte.

Anne, Uschi, Moni, Wiebke, Petra, Maike und Jessi, die u. a. für mich die Analysen der Futtermittelproben durchgeführt haben und im Besonderen zu der familiären Atmosphäre im Institut beigetragen haben. Ich werde mich immer gerne an meine Doktorandenzeit bei Euch zurück erinnern!

Allen Doktoranden für die stetige Hilfsbereitschaft mich in der Durchführung meiner Arbeit zu unterstützen und auch mit tröstenden Worten, Umarmungen und Gesprächen mir zur Seite standen, wenn es mal nicht so lief, wie ich es mir vorgestellt hatte.

Frau Käseberg für die Versorgung mit allem Notwendigen, was ein Doktorand zur Fertigstellung seiner Dissertation so benötigt.

Marga, Heinz, Herbert und "meiner großen Freundin" Ruth für die fortwährende Anteilnahme und Ermutigungen während der gesamten Studien- und Promotionszeit.

Meinem Vater, Ute - und ein besonders herzlicher Dank an Harald - für die vor allem moralische und finanzielle Unterstützung sowie das große Interesse und die tatkräftigen Hilfestellungen an der praktischen Durchführung dieser Doktorarbeit.

Ich freue mich, dass Ihr stolz auf mich seid!

# Lebenslauf

Birga Müller-Siegwardt, geboren am 01. Juli 1971 in Kiel

## Schul- und Berufsausbildung

---

1977 – 1988	Grund- und Realschule Abschluss: mittlere Reife
1988 – 1991	Sozialwirtschaftliches Fachgymnasium am Königsweg in Kiel Abschluss: Abitur
08/1991 – 06/1994	Ausbildung zur Sozialversicherungsfachangestellten mit Schwerpunkt Krankenversicherung bei der Gmünder Ersatzkasse in Neumünster
01/2009 – 02/2009	Qualifikation zur Qualitätsmanagementbeauftragten bei der FAW in Kiel

## Hochschulstudium

---

10/1999 – 03/2002	Veterinärmedizin an der FU Berlin
04/2002 – 08/2006	Agrarwissenschaften an der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der CAU zu Kiel

## Promotion

---

09/2006 – 02/2009	am Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der CAU zu Kiel
-------------------	--

## Praktikum und Nebentätigkeiten

---

04/2002 – 03/2004	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der CAU zu Kiel
04/2002 – 09/2005	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Agrar- und Ernährungs- wissenschaftlichen Fakultät der CAU zu Kiel
07/2004 – 10/2004	Landwirtschaftliches Praktikum auf einem milchwirtschaftlichen Betriebshof

## Berufstätigkeiten

---

07/1994 – 09/1999	Sozialversicherungsfachangestellte bei der Gmünder Ersatzkasse in Neumünster
09/2006 – 08/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Tierernährung und Stoffwechselphysiologie der Agrar- und Ernährungs- wissenschaftlichen Fakultät der CAU zu Kiel