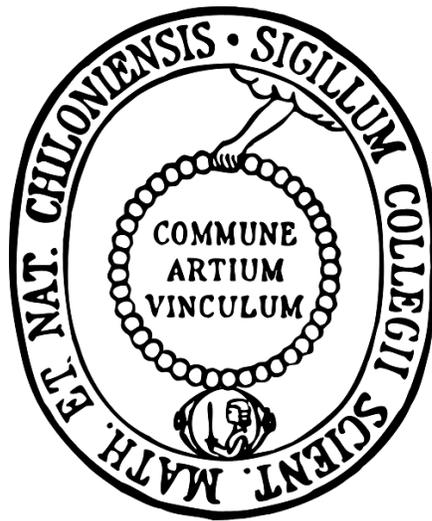


**Flavonoide als potentielle Inhibitoren des  
darmständigen Natrium-abhängigen Glucose-  
Cotransporters 1 (SGLT1)**



**Dissertation**

**zur**

**Erlangung des Doktorgrades**

**der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

**der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**vorgelegt von**

**Bettina Schwanck**

**Kiel im Sommer 2012**

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2009 bis Juni 2012 und wurde vom **Bundesministerium für Bildung und Forschung** finanziert.

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Blaschek

Korreferent: Prof. Dr. Markus Bleich

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 2012

Zum Druck genehmigt: Kiel, 02. Juli 2012

Prof. Dr. Lutz Kipp (Dekan)



Wer aufwärts will,  
muss aufwärts blicken.

Für meine Eltern Günther und Edith Schwanck  
und für meine ganze Familie



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>	
1.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	11
1.2	TABELLENVERZEICHNIS .....	12
1.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	13
<b>2.</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>15</b>
2.1	GRUNDLAGEN UND AKTUELLER STAND DER FORSCHUNG .....	20
2.1.1	<i>Glucosetransporter, insbesondere SGLT1</i> .....	20
2.1.2	<i>Polyphenole, insbesondere Flavonoide</i> .....	27
2.1.2.1	Allgemeine Klassifizierung, Biosynthese und Vorkommen .....	27
2.1.2.2	Bioverfügbarkeit von polyphenolischen Substanzen .....	31
2.1.2.2.1	Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) .....	33
2.1.2.3	Pharmakologische Effekte .....	35
<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>37</b>
3.1	CHEMIKALIEN .....	37
3.2	POLYPHENOLE .....	38
3.3	AUSGANGSMATERIALIEN .....	39
3.3.1	<i>Grünkohl</i> .....	39
3.3.2	<i>Zwiebelextrakte</i> .....	41
3.3.3	<i>Citrusextrakte</i> .....	42
3.3.4	<i>Apfelextrakte</i> .....	43
3.3.5	<i>Schwarzkarottenextrakte</i> .....	46
3.4	BESTIMMUNG DES TROCKENSUBSTANZGEHALTS .....	47
3.5	BLANCHIERPROZESS .....	47
3.6	EXTRAKTIONEN .....	48
3.6.1	<i>Saftherstellung</i> .....	48
3.6.2	<i>Anreicherung der Flavonoide</i> .....	49
3.6.3	<i>Methanolische Extraktion</i> .....	50
3.6.4	<i>Vereinfachte methanolische Extraktion</i> .....	50
3.6.5	<i>Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehalts nach Ph.Eur. 7.0/2.08.14.00</i> .....	51
3.7	HYDROLYSEN .....	52
3.7.1	<i>Bestimmung des Gesamtflavonoidgehalts nach Ph.Eur. 7.0/1174</i> .....	52
3.7.2	<i>saure Hydrolyse</i> .....	54

3.8	ANALYTISCHE METHODEN .....	54
3.8.1	<i>High performance liquid chromatography (HPLC)</i> .....	54
3.8.1.1	HPLC Analytik .....	54
3.8.1.2	HPLC/ESI/MS <sup>2</sup> Analytik .....	57
3.8.1.3	Semi-präparative HPLC Analytik .....	59
3.8.2	<i>Gaschromatographie - Acetylierung</i> .....	60
3.9	METHODENOPTIMIERUNG .....	61
3.9.1	<i>Optimierung der Flavonoidausbeute bei der Saftherstellung</i> .....	61
3.9.1.1	Saftherstellung mittels einer Tinkturenpresse .....	61
3.9.1.2	Saftherstellung unter Zusatz von Ethanol .....	62
3.9.1.3	Saftherstellung unter Zusatz von Detergentien.....	62
3.9.1.4	Variation des pH-Wertes des Saftes .....	62
3.9.2	<i>Optimierung der Anreicherung der Flavonoide</i> .....	63
3.9.2.1	Elution der Flavonoide.....	63
3.9.2.2	Kapazitätstest unterschiedlicher Harze .....	63
3.9.2.2.1	Variation der Elutionsmittelmenge im Batchverfahren .....	63
3.9.2.2.2	Batchverfahren.....	64
3.9.2.2.3	Säulenverfahren .....	64
3.9.2.3	Variation der Hydrolysezeit .....	65
3.10	INHIBITIONSMESSUNGEN AM RABBIT SGLT1 .....	65
3.10.1	<i>Der SURFE<sup>2</sup>R: Funktionsweise und Puffer</i> .....	65
3.10.2	<i>Sensorpräparation</i> .....	69
3.10.3	<i>Substratmessung</i> .....	71
3.10.4	<i>Messung der rbSGLT1 Inhibition durch polyphenolische Einzelsubstanzen</i> .....	71
3.10.5	<i>Messung der rbSGLT1 Inhibition durch Kombinationen</i> .....	71
3.11	INHIBITIONSMESSUNGEN AM HUMANEN SGLT1 .....	72
3.11.1	<i>„two-electrode-voltage-clamp“-Methode (TEVC)</i> .....	72
3.11.2	<i>Bestimmung der Kinetikparameter</i> .....	73
3.12	STABILITÄT DER FLAVONOIDE GEGENÜBER DER LACTASE-PHLORIZIN-HYDROLASE (LPH) – <i>IN VITRO</i> .....	75
3.12.1	<i>Zellkultur</i> .....	75
3.12.2	<i>Isolierung der Lactase-Phlorizin-Hydrolase und der Phlorizin-Hydrolase</i> .....	77
3.12.3	<i>Quantifizierung der Enzyme mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i> .....	77
3.12.4	<i>Enzymassay</i> .....	79
3.12.5	<i>K<sub>m</sub>-Bestimmungen von Lactose und Phlorizin</i> .....	80
3.12.6	<i>Kombinationsmessungen</i> .....	81
3.12.7	<i>Ex vivo-Versuche – „everted gut sac model“</i> .....	82
3.13	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	83

<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>84</b>
4.1	ERSTELLEN VON KALIBRIERREIHEN .....	84
4.2	CHARAKTERISIERUNG DER AUSGANGSMATERIALIEN .....	85
4.2.1	<i>Grünkohl</i> .....	85
4.2.1.1	Quantifizierung polyphenolischer Inhaltsstoffe in unterschiedlichen Grünkohlsorten .....	85
4.2.1.2	Peakidentifizierung per HPLC-ESI(-)-MS <sup>2</sup> in einem Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakt .....	87
4.2.1.3	Einfluss des Blanchierens auf den Flavonoidgehalt des Grünkohls .....	97
4.2.1.4	Fraktionierung eines Flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes und Inhibition des hSGLT1 .....	99
4.2.2	<i>Charakterisierung eines Zwiebelextraktes</i> .....	101
4.2.3	<i>Charakterisierung von Citrusextrakten</i> .....	103
4.2.4	<i>Charakterisierung der polyphenolischen Substanzen und Quantifizierung von Phlorizin in unterschiedlichen Apfelextrakten</i> .....	104
4.2.5	<i>Charakterisierung von Schwarzkarottenextrakten</i> .....	107
4.3	HERSTELLUNG EINES ANGEREICHERTEN GRÜNKOHLEXTRAKTES .....	108
4.3.1	<i>Herstellung eines Grünkohlssaftes und Anreicherung der Flavonoide</i> .....	108
4.4	METHODENOPTIMIERUNG .....	110
4.4.1	<i>Flavonoidausbeute bei der Saftherstellung</i> .....	110
4.4.1.1	Saftherstellung mittels einer Tinkturenpresse.....	110
4.4.1.2	Saftherstellung unter Zugabe von Ethanol .....	111
4.4.1.3	Saftherstellung unter Zugabe von Detergentien .....	112
4.4.1.4	Variation des pH-Wertes des Saftes .....	112
4.4.2	<i>Optimierung der Anreicherung der Flavonoide</i> .....	113
4.4.2.1	Elution der Flavonoide.....	113
4.4.2.2	Kapazitätstest unterschiedlicher Harze .....	114
4.4.2.3	Variation der Elutionsmittelmenge im Batchverfahren .....	114
4.4.2.4	Batchverfahren .....	115
4.4.2.5	Säulenverfahren .....	116
4.4.3	<i>Variation der Hydrolysezeit</i> .....	117
4.5	INHIBITIONSMESSUNGEN AM RABBIT SGLT1 .....	118
4.5.1	<i>K<sub>m</sub>-Wert von <math>\alpha</math>-Methyl-D-glucopyranosid</i> .....	118
4.5.2	<i>Inhibitionswerte ausgewählter Flavonoide</i> .....	119
4.5.3	<i>IC<sub>50</sub>-Bestimmung von Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid</i> .....	123
4.5.4	<i>Inhibitionseffekte von Kombinationen aus Phlorizin &amp; Quercetin-4'-O-glucosid</i> .....	124
4.6	INHIBITIONSMESSUNGEN AM HUMANEN SGLT1 .....	126
4.6.1	<i>Inhibitionswerte ausgewählter Flavonoide</i> .....	126
4.6.2	<i>Kinetikparameter von Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid</i> .....	128
4.6.3	<i>Inhibitionswerte ausgewählter Pflanzenextrakte</i> .....	128

4.7	STABILITÄT DER FLAVONOIDE GEGENÜBER DER LACTASE-PHLORIZIN-HYDROLASE (LPH) .....	129
4.7.1	<i>Substratspezifitäten isolierter LPH für Lactose und Phlorizin</i> .....	130
4.7.2	<i>Quantifizierung der Enzyme</i> .....	130
4.7.3	<i>Inkubation von Flavonoiden mit isolierter LPH und PH</i> .....	131
4.7.4	<i>Inkubation von Flavonoid-haltigen Pflanzenextrakten mit isolierter LPH und PH</i> .....	135
4.7.5	<i>Inkubation von Kombinationen mit isolierter LPH</i> .....	139
4.7.6	<i>Ex vivo-Versuche ‚everted gut sac model‘</i> .....	140
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>142</b>
5.1	CHARAKTERISIERUNG DER AUSGANGSMATERIALIEN .....	142
5.1.1	<i>Grünkohl</i> .....	142
5.1.2	<i>Zwiebelextrakte</i> .....	148
5.1.3	<i>Citrusextrakte</i> .....	150
5.1.4	<i>Apfelextrakte</i> .....	151
5.1.5	<i>Schwarzkarottenextrakte</i> .....	153
5.2	HERSTELLUNG EINES ANGEREICHERTEN GRÜNKOHLEXTRAKTES UND METHODENOPTIMIERUNG .....	154
5.2.1	<i>Anreicherung der Flavonoide mittels unterschiedlicher Adsorberharze</i> .....	156
5.2.2	<i>Vergleich der verwendeten Flavonoid-Hydrolyse-Verfahren</i> .....	159
5.3	INHIBITIONSMESSUNGEN AM SGLT1 .....	161
5.3.1	<i>SURFE<sup>2</sup>R-Technologie</i> .....	161
5.3.2	<i>TEVC</i> .....	162
5.3.3	<i>Ergebnisse der Einzelmessungen im Vergleich – rbSGLT1 und hSGLT1</i> .....	163
5.3.4	<i>Kombinationsmessungen von Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid</i> .....	167
5.4	STABILITÄT DER FLAVONOIDE GEGENÜBER DER LACTASE-PHLORIZIN-HYDROLASE (LPH) .....	169
5.5	AUSBLICK .....	174
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT</b> .....	<b>180</b>
6.1	ZUSAMMENFASSUNG.....	180
6.2	ABSTRACT .....	183
<b>7.</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>187</b>
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>199</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>201</b>
<b>10.</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG ZU §9 ABSATZ 2 DER PROMOTIONSORDNUNG</b> .....	<b>202</b>
<b>11.</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>203</b>

## 1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Phlorizin, Phloretin, Dapagliflozin und Quercetin-4'-O-glucosid .....	18
Abbildung 2: SGLT in der Niere, ( <i>Chao und Henry, 2010</i> ) .....	21
Abbildung 3: SGLT1 im Dünndarmepithel .....	22
Abbildung 4: Strukturmodell des humanen SGLT1, ( <i>Wright et al., 2004</i> ) .....	23
Abbildung 5: Kinetik des SGLT1, ( <i>Wright et al., 2004</i> ) .....	23
Abbildung 6: Inhibition des 1 mM $\alpha$ -MDG-Stroms durch unterschiedliche Flavonoide, ( <i>Kottra et al., 2007</i> ).....	26
Abbildung 7: Struktur von 2-Phenylchroman (Flavan) .....	27
Abbildung 8: Strukturübersicht relevanter polyphenolischer Substanzen aus unterschiedlichen Unterklassen	29
Abbildung 9: Biosynthese bzw. Klassifizierung der Flavonoide, ( <i>Hänsel und Sticher, 2007</i> ).....	30
Abbildung 10: Struktur der Chlorogensäure .....	46
Abbildung 11: Reaktion eines Flavonols mit Aluminiumchlorid zum gelb gefärbten Chelatkomplex .....	53
Abbildung 12: Surface-Electrogenic-Event-Reader One, ( <i>IonGate Biosciences GmbH</i> ) .....	66
Abbildung 13: Schema des inneren SURFE <sup>2</sup> R-Systems, ( <i>IonGate Biosciences GmbH</i> ) .....	67
Abbildung 14: SURFE <sup>2</sup> R-Sensor ( <i>Geibel, 2006</i> ) .....	68
Abbildung 15: Messsequenz der SGLT1-Messungen .....	70
Abbildung 16: Schema zur Durchführung .....	82
Abbildung 17: Overlay von HPLC-Chromatogrammen eines Grünkohlhydrolysats, Detektion bei 360 nm .....	87
Abbildung 18: HPLC-Chromatogramm eines Flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes .....	88
Abbildung 19: MS- und MS <sup>2</sup> -Spektrum von Peak 14 .....	92
Abbildung 20: Vergleich der Gesamtflavonoidgehalte (ppm bezogen auf die Frischmasse FM) von unbehandeltem und blanchiertem Grünkohl mit Verlustraten ( <i>n=3</i> ) .....	97
Abbildung 21: Quercetin- und Kaempferol-Gehalt (ppm, FM) des unbehandelten und blanchierten Grünkohls nach Hydrolyse ( <i>n=3</i> ) .....	98
Abbildung 22: HPLC-Chromatogramme der Fraktionen (4 min) eines Grünkohlextraktes mit jeweiliger Inhibition des $\alpha$ -MDG-Stroms.....	100
Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm eines Zwiebelextraktes, Detektion bei 330 nm .....	101
Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm eines Grapefruitextraktes, Detektion bei 280 nm .....	104
Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm eines Apfeltresters (HV S65), Detektion bei 280 nm .....	105
Abbildung 26: Quantifizierung von Phlorizin per HPLC bei 280 nm in unterschiedlichen Apfelsorten.....	107
Abbildung 27: HPLC-Chromatogramme von Schwarzkarottenextrakten bei 320 nm und der jeweiliger Chlorogensäuregehalt ( <i>n=3</i> ) .....	108
Abbildung 28: Verluste und Anreicherung bei der Safftherstellung und Extraktherstellung .....	109
Abbildung 29: Gesamtflavonoide (%) unterschiedlich hergestellter Grünkohlsäfte bezogen auf den eingesetzten Grünkohl ( <i>n=3</i> ) .....	110
Abbildung 30: Gesamtflavonoidgehalte der Eluate bei Variation des pH-Wertes des eingesetzten Saftes und Anreicherung in Bezug auf den eingesetzten Grünkohl ( <i>n=3</i> ) .....	113
Abbildung 31: Gesamtflavonoidgehalte von Grünkohleluaten bei Variation der Ethanolkonzentration ( <i>n=3</i> ). 113	
Abbildung 32: Wiederfindungsrate (%) von Quercetin und Kaempferol, bezogen auf den eingesetzten Saft ..	115
Abbildung 33: Wiederfindungsrate (%) von Quercetin und Kaempferol, bezogen auf den eingesetzten Saft ..	116
Abbildung 34: Flavonoidgehalt bei unterschiedlichen Hydrolysezeiten ( <i>n=5</i> ).....	117
Abbildung 35: Struktur $\alpha$ -Methyl-D-glucopyranosid.....	118
Abbildung 36: Signal-Konzentration Abhängigkeit für $\alpha$ -Methyl-D-glucopyranosid am <i>rbSGLT1</i> ( <i>n=8</i> ) .....	119
Abbildung 37: Unterschiedliche Darstellungen der Inhibition des $\alpha$ -MDG-Stroms durch Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid .....	123
Abbildung 38: ‚Median effect plots‘ und IC <sub>50</sub> -Werte von Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid .....	124
Abbildung 39: Dixon-Plot von Messungen der SGLT1-Inhibition bei unterschiedlichen Phlorizin- und $\alpha$ -MDG- Konzentrationen, (Daten der Projektpartner TUM) .....	128

Abbildung 40: SDS Gel (6%) mit LPH-Banden und Markern.....	131
Abbildung 41: Chromatogramm-Overlay von Luteolin-3',7-O-diglycosid.....	132
Abbildung 42: Chromatogramm-Overlay eines Zwiebelextraktes .....	136
Abbildung 43: Chromatogramm-Overlay eines flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes .....	137
Abbildung 44: Chromatogramm-Overlay eines Apfelextraktes .....	138
Abbildung 45: Reduktion (%) der Lactosespaltung durch Flavonoide .....	139
Abbildung 46: Abnahme (%) von Phlorizin (links) und Kaempferol-3-O-glucosid nach Inkubation mit Mäusedarm ( $n=3$ ) .....	140
Abbildung 47: HPLC-Chromatogramm von Phlorizin nach 30-minütiger Inkubation mit Mäusedarm, Detektion 280 nm .....	141
Abbildung 48: Struktur der im Grünkohl enthaltenen teilweise acylierten Flavonolglucoside .....	147
Abbildung 49: Inhibition des $\alpha$ -MDG-Stroms durch unterschiedliche Konzentrationen eines Apfelextraktes mittels TEVC ( $n_{\text{Oozyten}}=5$ ), (Daten der Projektpartner TUM) .....	152
Abbildung 50: Inhibition des $\alpha$ -MDG-Stroms durch Chlorogensäure mittels TEVC ( $n_{\text{Oozyten}}=5$ ), (Daten der Projektpartner TUM) .....	154
Abbildung 51: Signale einer Messsequenz am SGLT1 mit 5 mM $\alpha$ -MDG.....	162
Abbildung 52: Strom-/Spannungskennlinie von $\alpha$ -MDG mit und ohne Zusatz eines Flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes, (Daten der Projektpartner TUM) .....	163
Abbildung 53: Bindungsstelle der Glucose im simulierten <i>hSGLT1</i> , ( <i>Wright et al., 2011</i> ) .....	168
Abbildung 54: Flavonolstrukturen .....	170
Abbildung 55: Reduktion (%) der Spaltung von Kaempferol-7-O-glucosid durch Phlorizin .....	172
Abbildung 56: Venöser Blut-Glucosespiegel nach Weißbrotgabe (104 g) und zusätzlicher Gabe eines Apfel/GK Mischextraktes (600 mg Flavonoide/450 mg Phlorizin), (Daten der Projektpartner TUM) .....	177
Abbildung 57: Inhibition des 2-DG Transports in <i>hGLUT2</i> exprimierenden Oozyten, (Daten der Projektpartner TUM).....	178

## 1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: wichtige SGLTs und GLUTs.....	20
Tabelle 2: Überblick des verwendeten Ausgangsmaterials (Grünkohl) .....	41
Tabelle 3: Apfelsorten .....	44
Tabelle 4: Detektionswellenlängen, Geradengleichungen und Bestimmtheitsmaße der Kalibrierungen polyphenolischer Substanzen .....	84
Tabelle 5: Gesamtflavonoidgehalte ( $n=3$ ) unterschiedlicher Grünkohlsorten.....	85
Tabelle 6: Charakterisierung polyphenolischer Substanzen in einem Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakt .....	92
Tabelle 7: Identifizierte Flavonole in einem Zwiebelextrakt per HPLC-ESI(-)-MS <sup>2</sup> .....	102
Tabelle 8: Gehalt (ppm, TM) von Citrusflavonoiden abhängig vom Extraktionsmittel ( $n=3$ ).....	103
Tabelle 9: Spektroskopische Daten der Polyphenole im Apfeltrester (HV S65).....	105
Tabelle 10: Flavonoidausbeuten nach unterschiedlicher Art der Safftherstellung .....	111
Tabelle 11: Wiederfindung (%) der im Grünkohlsaft enthaltenen Flavonoide nach Anreicherung durch ein Adsorberharz und Elution mit unterschiedlichen Mengen an 75% Ethanol .....	114
Tabelle 12: Inhibition (%) des 5 mM $\alpha$ -MDG-Transports abhängig von der Konzentration ( $n_{\text{Sensor}}=3$ ) .....	120
Tabelle 13: Inhibition (%) des 5 mM $\alpha$ -MDG-Transports abhängig von der Konzentration ( $n_{\text{Sensor}}=1$ ) .....	121
Tabelle 14: Inhibition (%) des 5 mM $\alpha$ -MDG-Transports durch Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid .....	122
Tabelle 15: Inhibitionseffekte unterschiedlicher Kombinationen von Quercetin-4'-O-glucosid und Phlorizin ( $n_{\text{Sensor}}=3$ ) .....	125
Tabelle 16: Inhibition (%) des 1 mM $\alpha$ -MDG-Transports abhängig von der Konzentration ( $n_{\text{Oozyte}}=5$ ).....	127
Tabelle 17: Deglycosylierungsraten unterschiedlicher polyphenolischer Substanzen gegenüber der LPH innerhalb von 90 min, pH 7,4 ( $n\geq 3$ ).....	132

Tabelle 18: Deglycosylierungsraten unterschiedlicher polyphenolischer Substanzen gegenüber der LPH innerhalb von 90 min, pH 6 ( $n \geq 3$ ).....	134
Tabelle 19: Deglycosylierungsraten unterschiedlicher polyphenolischer Substanzen gegenüber der Phlorizin-Hydrolase innerhalb von 90 min, pH 7,4 ( $n \geq 3$ ).....	135
Tabelle 20: Deglycosylierungsraten der Hauptkomponenten unterschiedlicher Pflanzenextrakte nach 90-minütiger Inkubation mit LPH und PH bei pH 7,4 ( $n \geq 3$ ) .....	138

### 1.3 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -MDG	$\alpha$ -Methyl-D-glucoopyranosid
ACN	Acetonitril
AlCl <sub>3</sub>	Aluminiumchlorid
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dem.	Aqua demineralisata
BAF	BioActive Food GmbH
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CAU	Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
CBG	Cytosolische $\beta$ -Glucosidase
CHI	Chalkonflavanonisomerase
CHO	Chinese hamster ovary
DAD	Dioden Array Detektor/Detektion
DMSO	Dimethylsulfoxid
dd Wasser	Doppelt destilliertes Wasser
DTT	Dithiothreitol
EA	Ethylacetat (als Lösungsmittel) / (Etylacetatextrakt, GFB)
EL	Eluat
ESI	Elektro-Spray-Ionisation
FS	Flavonsynthase
GF	Gefriertrocknung
GKS	Grünkohlsaft
GKT	Grünkohltester
GLUT	Glucose-Transporter
<i>h</i>	human
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
kDa	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
LC	Liquid Chromatography
LPH	Lactase-Phlorizin-Hydrolase
MS	Massenspektrometrie
MPI	Max-Planck-Institut
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NMG	N-Methyl-D-glucamine
n.d.	nicht detektierbar
n.b.	nicht bestimmbar
p.a.	pro analysis

<i>Ph.Eur.</i>	Pharmacopoea europaea
ppm	part per million
<i>rb</i>	Rabbit (Kaninchen)
<i>rt</i>	Rat (Ratte)
SGLT	Sodium-dependent glucose-cotransporter
SLC5	Solute carrier family 5
SURFE <sup>2</sup> R	Surface Electrogenic Event Reader
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEVC	two-electrode-voltage-clamp
TFA	Trifluoressigsäure
TkÄ	Trockenkiloäquivalent
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TUM	Technische Universität München
WHO	World Health Organisation

## 2. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1835 isolierten französische Chemiker aus der Rinde des Apfelbaumes das Dihydrochalcon Phlorizin (*Review White, 2010*). 31 Jahre später 1886 wurde das pharmakologische Potential des Phlorizins durch den Mediziner Joseph Freiherr von Mering entdeckt. Durch Phlorizin-Gabe konnte er eine Glukosurie bei Hunden hervorrufen. Daraufhin folgten zahlreiche Experimente, die diesen Befund bestätigten und die physiologische Bedeutung von Phlorizin ausbauten. So konnte das Organ, das für das Auftreten der Glukosurie verantwortlich war, schon bald darauf als die Niere festgelegt werden. In den 50iger Jahren wurde der Wirkmechanismus des Phlorizins auf zellulärer und molekularer Ebene untersucht (*Review White, 2010*). Es konnte herausgefunden werden, dass Phlorizin in einer Konzentration von  $10^{-3}$  und  $10^{-4}$  M den aeroben Metabolismus hemmte, während Konzentrationen von  $10^{-4}$  und  $10^{-6}$  M die Glucoseaufnahme in die Enterozyten inhibierten (*Keller & Lotspeich, 1959*). *Alvarado & Crane* konnten 1962 in einem *in vitro* Hamster-Zell-Modell ebenfalls eine Inhibition der Glucoseaufnahme im Dünndarm und auch in der Niere verzeichnen. Um 1970 gelang es schließlich, bestimmte Zuckertransportsysteme zu identifizieren. Diese Transportsysteme bestehen aus zwei strukturell unterschiedlichen Transporter-Gruppen: Die Natrium-abhängigen Glucose-Cotransporter (SGLT), und die Natrium-unabhängigen Glucose-Transporter (GLUT) (*Review von Wood und Trayhurn, 2003*). Einige SGLTs transportieren Glucose und Galactose mit unterschiedlichen Affinitäten, gekoppelt an den Transport von Natrium (Symporter) und sind im Dünndarm und im proximalen Tubulus der Niere lokalisiert. Die GLUTs befinden sich ubiquitär im Körper und nutzen natriumunabhängig den Konzentrationsgradienten der Glucose als Energiequelle für den aktiven Transport. Mit Identifizierung dieser Transportsysteme und durch die bereits im 19. Jahrhundert durchgeführten Phlorizinstudien, die zeigten, dass Phlorizin in Tieren und auch im Menschen eine Glukosurie hervorrufen kann und somit Einfluss auf den Nüchternblutzucker, auf postprandiale Glucosespitzen und auf die Insulinresistenz ausübte (*Abdul-Ghani und DeRozzo, 2008*), war eine neue Strategie zur Behandlung von Diabetes und Hyperglykämie gefunden worden. Phlorizin, als Glucosid, wird im menschlichen Darm durch die  $\beta$ -Glucosidase Lactase-Phlorizin-Hydrolase gespalten und als Aglykon Phloretin

absorbiert (*Ramaswamy und Radhakrishnan, 1975*). Die entsprechenden Strukturen sind in Abbildung 1 dargestellt. Phloretin ist ein bekannter GLUT2 Inhibitor (*Kellet & Brot-Laroche, 2005*). GLUT2 wird vorrangig in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas exprimiert, in der Leber und außerdem ist dieser Transporter basolateral im proximalen Nierentubulus und in den Enterozyten des Dünndarms zu finden (*Kellet und Brot-Laroche, 2005; Wood und Trayhurn, 2003*).

Der SGLT1 ist vorwiegend in den Enterozyten der apikalen Bürstensaummembran des Dünndarms lokalisiert, während der SGLT2 an der apikalen Seite der Nierenepithelzellen im Segment 1 des proximalen Tubulus zu finden ist (*Ehrenkranz et al., 2005*). Hier reabsorbiert der SGLT2 die glomerulär filtrierte Glucose und stellt deshalb ein potentielles Target zur Behandlung von Diabetes mellitus dar. Phlorizin ist als kompetitiver Inhibitor des SGLT1 und auch des SGLT2 bekannt (*Panayotova-Heiermann et al., 1995*). Jedoch kam Phlorizin als SGLT2-Inhibitor aufgrund seiner schlechten Bioverfügbarkeit und Spaltung zu Phloretin und somit Hemmung eines ubiquitär vorkommenden Zuckertransporters (GLUT2) nicht in Frage (*Crespy et al., 2001*). Es wurden daher von unterschiedlichen pharmazeutischen Firmen Phlorizin-ähnliche Analoga entwickelt. Der zurzeit bekannteste selektive, oral verfügbare SGLT2 Inhibitor ist Dapagliflozin (Abbildung 1), für den die Wirksamkeit bereits in zahlreichen Studien belegt wurde (*Bailey et al., 2010*). Zurzeit laufen weitere Untersuchungen zur Wirksamkeit und besonders zur Sicherheit des Arzneimittels (<http://www.aerztezeitung.de>).

Im Jahr 2010 litten 4-6% der gesamten Erdbevölkerung an Diabetes, wobei 90% davon an Diabetes-Typ-2 erkrankt sind, einer komplexen progressiven metabolischen Erkrankung (*Bailey et al., 2010*). Diabetes mellitus ist durch eine verminderte Insulinsekretion aus pankreatischen  $\beta$ -Zellen (Typ-1-Diabetes, häufig bei jungen Menschen) oder mangelhafte Insulinwirkung (Typ-2-Diabetes, häufig im Alter) gekennzeichnet. Beide Typen rufen einen Anstieg des Blutzuckerspiegels (Hyperglykämie) hervor. Darüber hinaus führt die chronische Hyperglykämie zu einer progredienten Verschlechterung der Insulinsekretion und zu Insulinresistenz in peripheren Geweben (*Castaneda et al., 2007*). Diabetes mellitus Typ-1 ist eine Autoimmunerkrankung, wobei die  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse absterben und

somit kein Insulin mehr produziert werden kann. Daten der WHO besagen, dass im August 2011 weltweit 346 Millionen Menschen an Diabetes erkrankt waren. Im Jahr 2004 starben 3,4 Millionen Menschen an den Konsequenzen dieser Erkrankung ([www.who.int](http://www.who.int)). Die häufigste Form von Diabetes mellitus, Typ-2-Diabetes, geht einher mit Adipositas, Fettstoffwechselstörungen und Bluthochdruck. Diese Kombination aus schwerwiegenden Erkrankungen wird als metabolisches Syndrom bezeichnet und tritt überwiegend in fehl- und überernährten Gesellschaften mit sitzender Lebensweise auf (*Bailey et al., 2010*). Durch mikro- und makrovaskuläre Schäden, welche durch chemische Interaktion von überschüssiger Glucose mit Proteinen der Gefäßwände verursacht werden, besteht ein hohes Risiko an diabetesbezogenen Folgeerkrankungen zu erkranken (Herz-/Kreislauferkrankungen, Erblindung, Amputation von Extremitäten durch Mikroangiopathien usw.). Im April 2012 berichtete der Focus unter der Überschrift „Die süße Falle Diabetes“ und zeigte auf, wie bedrohend diese „stille Epidemie“ ist. Allein in Deutschland sind über 10% der Gesamtbevölkerung an Diabetes mellitus erkrankt, 95% davon an Typ-2 ([www.diabetes-deutschland.de](http://www.diabetes-deutschland.de)). Häufige Komplikationen der Diabetes Erkrankung sind Unterzuckerung, Nierenerkrankungen und Augenkrankheiten. Eine aktuelle Studie aus Großbritannien rekrutierte über 50 000 Probanden, die zu Beginn der Studie keine Augenerkrankungen aufwiesen. Nach 4 Jahren mit einer jährlichen Untersuchung der Augen, waren fast 30% der Typ-2-Diabetiker an einer diabetischen Retinopathie erkrankt (*Thomas et al., 2012*). Die Behandlung eines Diabetikers ohne Folgeerkrankung kostet laut Angaben der Barmer GEK durchschnittlich 5 000 € im Jahr, während beispielsweise bei einer Netzhautschädigung ca. 8 000 € für die jährliche Therapie ausgegeben werden. Die Behandlung betroffener Typ-2-Diabetiker beruht auf einer Kombination aus Ernährungs- und Bewegungsprogrammen mit eventuell notwendigem medikamentösem Eingriff, entweder allein durch Tabletten, durch Insulin oder durch eine Kombinationstherapie aus Tabletten und Insulin. Prospektive Studien zeigten überzeugend, dass bei Hochrisikopersonen das Auftreten der Erkrankung durch eine Veränderung des Lebensstils (bezüglich Nahrungsmittel, Sport usw.) oder durch eine medikamentöse Intervention verhindert bzw. zumindest verzögert werden konnte (*GBE kompakt, Robert Koch Institut, 2011*). Ein großer Fortschritt in der Diabetesforschung wäre es besonders im Frühstadium

bei beginnender Entwicklung eines Typ-2-Diabetes, bestehende Therapien sinnvoll zu ergänzen.

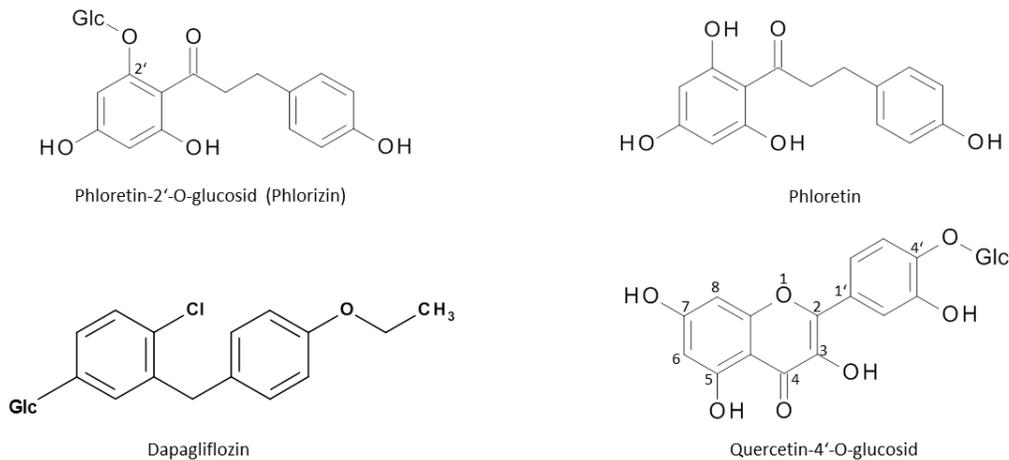


Abbildung 1: Struktur von Phlorizin, Phloretin, Dapagliflozin und Quercetin-4'-O-glucosid

Zahlreiche Studien, die schon vor über 120 Jahren begannen, konnten beweisen, dass Phlorizin einen Einfluss auf den Blutglucosespiegel u.a. durch Hemmung des intestinalen SGLT1 hat. Prof. Hannelore Daniel vom Lehrstuhl Ernährungsphysiologie an der TU München konnte 2007 in Zusammenarbeit mit Dr. Gabor Kottra zeigen, dass auch unterschiedliche polyphenolische Substanzen - strukturell dem Phlorizin ähnlich - den humanen SGLT1 *in vitro* inhibieren können. So wurde für einen bekannten Inhaltsstoff der Zwiebel, das Flavonol Quercetin-4'-O-glucosid (Abbildung 1), ein  $IC_{50}$ -Wert von 0,17 mM im Oozytenmodell per ‚two-electrode-voltage-clamp‘ Messungen ermittelt. Die Inhibition des SGLT1 könnte somit ebenfalls ein potentiell Ziel zur Behandlung und Prävention von Diabetes mellitus Typ-2 sein. Der Transporter zeigt eine hohe Affinität zu Glucose und spielt eine wichtige Rolle bei der Absorption dieser aus dem Dünndarm. Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) hat sich im Rahmen der Fördermaßnahme „Biomedizinische Ernährungsforschung“ dazu entschlossen, das Forschungsprojekt „Der Glucose Transporter SGLT: Schlüssel molekül zur Prävention von Diabetes?“ mit Partnern aus ganz Deutschland finanziell zu fördern. Ziel des Kooperationsprojektes ist, den modulierenden Einfluss von pflanzlichen Sekundärstoffen, insbesondere polyphenolischen Inhaltsstoffen mit struktureller Ähnlichkeit zum Phlorizin, auf den SGLT1 zu erforschen.

Dabei stand die Entwicklung eines Nahrungs- bzw. eines Nahrungsergänzungsmittels zur Prävention von Diabetes-Typ-2 im Vordergrund. Die beteiligten Projektpartner waren:

- Projektkoordination und Extraktionsoptimierung: Dr. Henning Vollert, *BioActive Food GmbH*, Bad Segeberg
- Projektkoordination, Polyphenolanalytik und Extraktionsoptimierung: Prof. Dr. Wolfgang Blaschek und Bettina Schwanck, Pharmazeutisches Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Abteilung Pharmazeutische Biologie, Kiel
- Assayentwicklung und Messung der SGLT1 Aktivität *in vitro* mittels der SURFE<sup>2</sup>R Methode: Dr. Inga Bick, *IonGate Biosciences GmbH*, Frankfurt am Main
- Messung der SGLT1 Aktivität einer Substanzbibliothek und von Pflanzenextrakten *in vitro* mittels der SURFE<sup>2</sup>R Methode: Prof. Dr. Klaus Fendler und Dr. Christine Keipert, Max Planck Institut (MPI) für Biophysik, Frankfurt am Main
- Messung der SGLT1 Aktivität *in vitro* mittels der TEVC Methode, *in vivo* Studien an Mensch und Tier: Prof. Dr. Hannelore Daniel, Dr. Gabor Kottra und Christine Schulze, Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie, Technische Universität München (TUM), Freising-Weihenstephan

### **Zielsetzung**

Im Rahmen dieser Arbeit waren eigene Schwerpunkte die qualitative und quantitative Charakterisierung des pflanzlichen Ausgangsmaterials und unterschiedlicher pflanzlicher Extrakte hinsichtlich der polyphenolischen Inhaltsstoffe. Außerdem wurden pflanzliche Extrakte selbst hergestellt und Extraktionsmethoden optimiert. Zudem wurden Stabilitätsuntersuchungen polyphenolischer Substanzen gegenüber der Lactase-Phlorizin-Hydrolase, einer darmständigen  $\beta$ -Glucosidase durchgeführt. Polyphenolische Einzelsubstanzen konnten in einem *in vitro* System (SURFE<sup>2</sup>R) auf inhibitorische Aktivität am Target (SGLT1) getestet werden.

## 2.1 Grundlagen und aktueller Stand der Forschung

### 2.1.1 Glucosetransporter, insbesondere SGLT1

Die Glucosetransporter werden von einer Gen-Familie vom SLC-Typ (*Solute-Carrier-Familie*) codiert. Dabei werden die SGL-Transporter (*sodium-dependent glucose-cotransporter*) und die GLU-Transporter (*Glucose-transporter*) unterscheiden. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Transporter mit jeweiligen Substraten und Lokalisation im Menschen aufgeführt.

Tabelle 1: wichtige SGLTs und GLUTs

Gen (SLC5A)	Substrate	K <sub>m</sub> (mM)	Lokalisation
<b>SGLT1 (SLC5A1) Cotransporter</b>	Glucose, Galactose	je 0,5	Dünndarm, Niere, Herz, Gehirn, Luftröhre, Prostata
<b>SGLT2 (SLC5A2) Cotransporter</b>	Glucose	6	Niere, Gehirn, Leber, Schilddrüse, Muskel, Herz,
<b>SGLT3 (SLC5A4) Glucosensensor</b>	Glucose	20	Dünndarm, Lunge, Gehirn, Schilddrüse, Hoden, Gebärmutter
<b>SGLT4 (SLC5A9) Cotransporter</b>	Glucose, Mannose	2 und 0,15	Dünndarm, Niere, Leber, Lunge, Gehirn, Schilddrüse, Hoden, Bauchspeicheldrüse
Gen (SLC2A)	Substrate	K <sub>m</sub> (mM)	Lokalisation
<b>GLUT1</b>	Glucose	-	Erythrozyten, Gehirn, ubiquitär
<b>GLUT2</b>	Glucose, Fructose	-	Leber, Bauchspeicheldrüse, Dünndarm, Niere
<b>GLUT4</b>	Glucose	-	Herz, Muskel, Gehirn
<b>GLUT5</b>	Fructose, Glucose	-	Dünndarm, Niere

(Wright et al., 2011 ; Wood & Trayhurn, 2003)

Bis heute sind 14 verschiedene Glucose-Transporter (GLUTs) im Menschen bekannt, wobei einige in Tabelle 1 aufgeführt sind. Sie werden in 3 Klassen eingeteilt, abhängig vom Aminosäuremuster und von spezifischen Charakteristika. GLUT1-4 und GLUT14 werden der Klasse I zugeordnet. GLUT1 befindet sich ubiquitär im Körper und ist für die Glucoseversorgung der Zelle verantwortlich, am stärksten wird er in Erythrozyten und im Gehirn exprimiert. GLUT2 transportiert Glucose mit geringer Affinität, aber hoher Kapazität und wird in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, in der Leber, in der Niere und basolateral im Dünndarm exprimiert. Die Glucoseaufnahme durch den GLUT2 ist abhängig von der Blutglucosekonzentration. GLUT2 kann ebenfalls Fructose transportieren. Die Translokation von GLUT4 wird insulinabhängig gesteuert, wobei GLUT4 vor allem im Herzen und in den

Muskeln exprimiert wird. GLUT5 gehört in die II. Klasse der GLUTs (GLUT5, 7, 9 und 11) und transportiert Fructose im Dünndarm und in der Niere (Review *Scheepers et al., 2004*).

Neben den GLUTs sind insgesamt 6 SGLTs im Menschen bekannt, die für den Transport unterschiedlicher Substrate verantwortlich sind. SGLTs finden sich in verschiedenen Körpergeweben (Tabelle 1). Wichtige Vertreter in dieser Familie sind die Glucosetransporter SGLT1, SGLT2 und der Glucosesensor SGLT3 (*Wood & Trayhurn, 2003*).

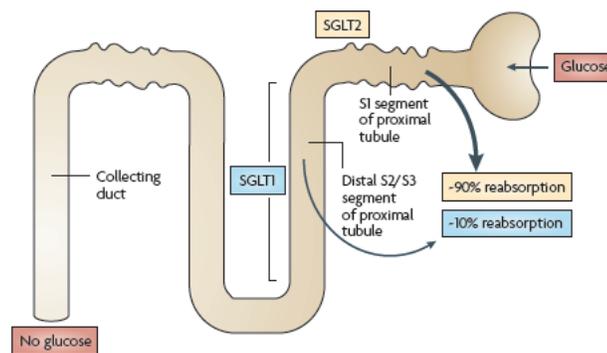


Abbildung 2: SGLT in der Niere, (*Chao und Henry, 2010*)

Beim Transport der Monosaccharide durch den SGLT1 und 2 findet ein aktiver  $\text{Na}^+$ -Cotransport bzw. ein  $\text{Na}^+$ -Symport statt, bei dem unter indirektem ATP-Verbrauch bei Anwesenheit von Natriumionen Glucose aktiv in die Zelle transportiert wird. Der SGLT1 hat eine etwa gleich hohe Affinität zu Glucose und Galactose, besitzt aber eine relativ niedrige Kapazität (*Wright et al., 2011*). Derivatisierte Zucker wie z.B.  $\alpha$ -Methyl-D-glucopyranosid ( $\alpha$ -MDG) können ebenfalls durch den SGLT1 transportiert werden, wobei  $\alpha$ -MDG nicht durch GLUT transportiert werden kann und so als Substrat für selektive funktionelle SGLT1-Studien zur Verfügung steht. Der SGLT1 wird auf der apikalen Seite des Dünndarmepithels und im distalen S2/S3 Abschnitt des proximalen Nierentubulus exprimiert (Abbildung 2). Das Transportverhältnis Glucose zu Natrium beträgt 1 zu 2. Der SGLT2 hingegen wird hauptsächlich im S1 Abschnitt des proximalen Tubulus der Niere exprimiert und ist für 90% der Glucose-Resorption aus dem Primärharn verantwortlich (Abbildung 2). Er hat eine niedrige Affinität, aber eine hohe Kapazität gegenüber Glucose. Das Transportverhältnis Glucose zu Natrium beträgt 1 zu 1. Der SGLT3 transportiert selbst keine Monosaccharide und wird als Glucose-Sensor bezeichnet, der sich u.a. im Dünndarm befindet. Er leitet

Glucose-konzentrationsabhängige Informationen an die Zelle weiter, vermutlich G-Protein-gekoppelt (Scheepers et al., 2004).

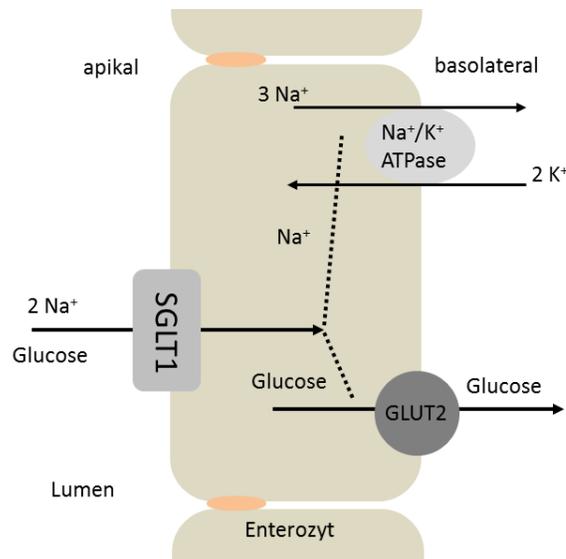


Abbildung 3: SGLT1 im Dünndarmepithel

Nach Nahrungsaufnahme wird der SGLT1 auf der luminalen Seite des Dünndarmepithels exprimiert (Abbildung 3). Glucose wird gleichzeitig mit Natriumionen *sekundär aktiv* vom SGLT1 durch die Bürstensaummembran in die Epithelzellen absorbiert und verlässt diese auf der basolateralen Seite mit Hilfe des GLUT2. Die Ionenkonzentration in der Epithelzelle wird durch die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aufrechterhalten und die entstandene hohe Natriumkonzentration durch Ausschleusen des Natriums gesenkt (Wright et al., 2004). Die Ionenpumpe verbraucht Energie in Form von ATP und funktioniert somit *primär aktiv*. Die Kaliumkonzentration in der Zelle wird durch unterschiedliche Kaliumkanäle aufrechterhalten, die treibende Kraft des Transports bildet dabei das Konzentrationsgefälle und bei geladenen Teilchen die Potentialdifferenz zwischen den Membranseiten. Durch einen spezifischen SGLT1-Antikörper (*rtSGLT1-ab*) konnte in immunochemischen Studien bei Ratten gezeigt werden, dass der SGLT1 mehr im Jejunum (Leerdarm) als im Ileum (Krummdarm) exprimiert wird (Balen et al., 2008). Selten vorkommende Mutationen des SGLT1 Gens resultieren in einer Glucose-Galactose-Malabsorption (Wright et al., 2011), im Jahr 2006 waren 300 Fälle weltweit bekannt (Drozdowski und Thomson, 2006).

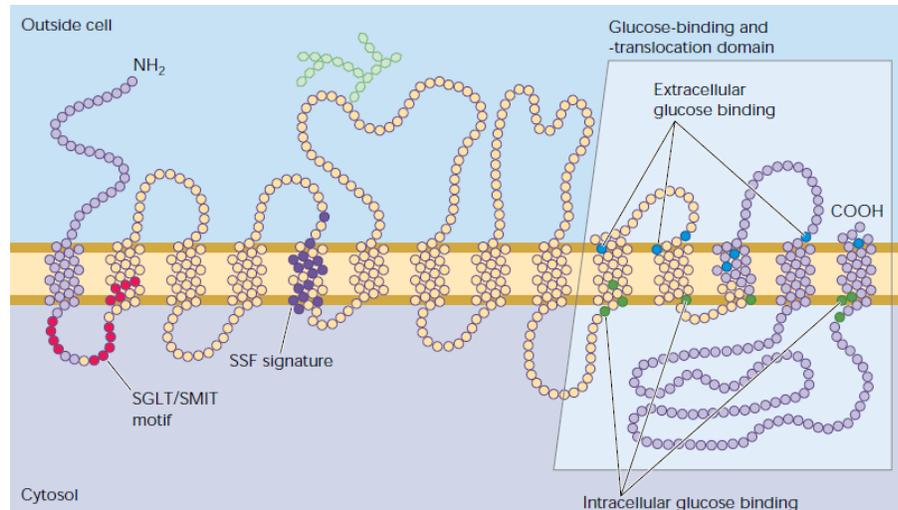


Abbildung 4: Strukturmodell des humanen SGLT1, (Wright et al., 2004)

Der SGLT1 ist ein 73,5 kDa schweres Glycoprotein mit 14 transmembranären Helices, besteht aus 664 Aminosäuren und bildet ein Homotetramer (Turk et al., 1996). Der N-Terminus und der hydrophobe C-Terminus befinden sich extrazellulär, während die 14. Helix stark ins Cytoplasma ragt (Abbildung 4). Die Domäne, die Glucose bindet, befindet sich zwischen der 11. und 14. Helix und ist in Abbildung 4 gekennzeichnet. Der kinetische Ablauf des Glucosetransports für den SGLT1 ist in Abbildung 5 dargestellt.

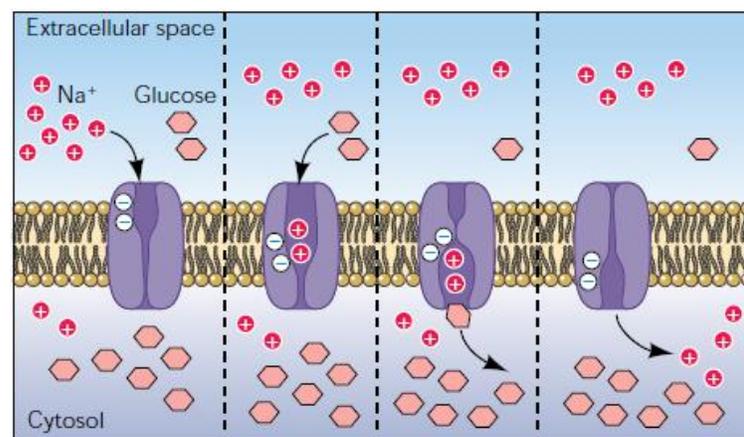


Abbildung 5: Kinetik des SGLT1, (Wright et al., 2004)

Nach der Nahrungsaufnahme und Spaltung der Kohlenhydrate durch Verdauungsenzyme in Monosaccharide müssen zunächst zwei extrazelluläre Natriumionen vom SGLT1 gebunden werden, um dann ein Glucose-Molekül nach Konformationsänderung des Transporters in

die Zelle zu transportieren. Nach Dissoziation der Glucose ins Cytoplasma folgen die Natriumionen. Anschließend nimmt der Transporter seine inaktive Konformation an, um den Rücktransport vom Cytoplasma ins Darmlumen zu verhindern (*Wright et al., 2004*).

Kurz nach kohlenhydratreicher Nahrungsaufnahme triggert Glucose im Dünndarm die Inkretinfreisetzung. Dazu gehört das insulinotrope Hormon (GIP-Glucose-dependent insulinotropic peptide), das aus sogenannten K-Zellen freigesetzt wird, die hauptsächlich im Duodenum und Jejunum lokalisiert sind. Über L-Zellen, welche hauptsächlich im Ileum und Kolon zu finden sind, wird durch ankommende Glucose das Inkretin Glucagon-like Peptid (GLP-1) sekretiert (*Baggio und Drucker, 2007; Brubaker, 2006; Holst, 2007*). Durch die Aktivierung von Inkretinrezeptoren wird glucoseabhängig Insulin freigesetzt. Das bei Diabetikern vermindert freigesetzte Hormon GLP-1 senkt außerdem die Glukagonkonzentration, reduziert den Appetit und fördert den Energieumsatz (*Mutschler et al., 2008*). Die Inkretinhormone werden durch Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP-4) schnell abgebaut und besitzen somit eine geringe Wirkdauer. Potentielle Glucose-Sensoren in enteroendokrinen Zellen sind die ‚sweet taste‘ Rezeptoren, und auch dem SGLT1 wird diese Eigenschaft zugeordnet. Neuste Erkenntnisse von *Gorboulev et al. (2012)* zeigen, dass nicht nur Glucose selbst, sondern auch der SGLT1 im Dünndarm die Glucose-induzierte Sekretion von GIP und GLP-1 und außerdem die basolaterale Hochregulierung des GLUT2 triggert. Der Arbeitsgruppe gelang es durch Fluoreszenzmarkierung mit spezifischen Antikörpern die Coexpression von SGLT1, GIP und GLP-1 in den L- und K-Zellen im Mäusejejunum nachzuweisen. *Mace et al. (2012)* konnte am isolierten Rattendarm zeigen, dass eine SGLT1 Inhibition durch Phlorizin ebenfalls die Sekretion der Inkretine (GLP-1 und GIP) teilweise vermindert. Durch den GLUT2 Inhibitor Phloretin konnte eine komplette Inhibition der Inkretinfreisetzung verzeichnet werden. Außerdem konnten *Gorboulev et al. (2012)* und auch *Kellet und Helliwell (2000)* zeigen, dass bei Mäusen und Ratten nach hohen Glucose-Gaben GLUT2 in die apikale Bürstensaummembran eingebaut wird. Dieser Effekt war in SGLT1-knock-out-Mäusen nicht erkennbar, so dass wohl eine Abhängigkeit des Einbaus von GLUT2 vom SGLT1 besteht. Die physiologische Rolle des basolateralen GLUT2 ist nach *Wright et al. (2011)* noch immer unklar. So zeigten Studien in GLUT2-knock-out-Mäusen einen normal verlaufenden Glucose-Toleranz-Test. Außerdem zeigten *in vivo* Experimente

an Ratten eine basolaterale Aufnahme des SGLT1-spezifischen Substrats  $\alpha$ -MDG (*Wright et al., 1980*). *Kellet* und *Helliwell* postulierten im Jahr 2000, dass eine Expression von GLUT2 in die apikale Bürstensaummembran möglich sei, wenn eine Sättigung des SGLT1 durch Glucose vorliegt. Das wurde durch die Gabe des bekannten GLUT2-Inhibitors Phloretin bewiesen, der die apikale Glucoseaufnahme teilweise hemmte. Nur 1 Jahr später konnten für Phloretin allerdings auch SGLT1-inhibitorische Eigenschaften festgestellt werden ( $K_i=50 \mu\text{M}$ , *Hirayama et al., 2001*).

Der Einfluss von pflanzlichen Sekundärstoffen auf Glucosetransporter wurde in zahlreichen Studien untersucht. Bereits im Jahr 2000 postulierten *Walgren et al.* mit Hilfe von Absorptionsstudien in Caco-2-Zellen und mittels Hamster-Ovarial-Zellen, dass Quercetin-4'-O-glucosid durch den SGLT1 transportiert wird. *Wolffram et al. (2002)* konnten eine Abnahme von Quercetin-3-O-glucosid auf der luminalen Seite des Rattendarms in der Ussing-Kammer verzeichnen. Die zusätzliche Gabe des SGLT1-Inhibitors Phlorizin verzögerte das Verschwinden des Flavonolderivats und ein Transport von Quercetin-3-O-glucosid durch den SGLT1 wurde angenommen. *Arts et al. (2002)* nahmen dazu Stellung und kritisierten, dass die verwendeten SGLT1-Inhibitoren nicht spezifisch genug waren und möglicherweise die Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) ebenfalls indirekt durch die Hydrolyse von Phlorizin zu Phloretin gehemmt worden war. *Day et al. (1998/2000)* und *Németh et al. (2003)* zeigten, dass unterschiedliche Flavonoide, so auch Quercetin-3- und -4'-O-glucosid von der LPH gespalten werden und die Aglyka durch passive Diffusion absorbiert werden können. Wenn die LPH nun mit Phlorizin beschäftigt war und so Quercetin-3-O-glucosid eben nicht so stark zu Quercetin gespalten wurde, verringerte sich so das Verschwinden auf der luminalen Seite des Dünndarms. *Kotra und Daniel (2007)* zeigten mittels *hSGLT1*-exprimierenden Oozyten, dass keines der oben genannten Flavonolderivate, ob glycosyliert oder nicht, vom SGLT1 transportiert wird. In den ‚two-electrode-voltage-clamp‘ Versuchen zeigten einige der verwendeten Testsubstanzen eine potentielle Inhibition des 1 mM  $\alpha$ -MDG-Stroms (Abbildung 6).

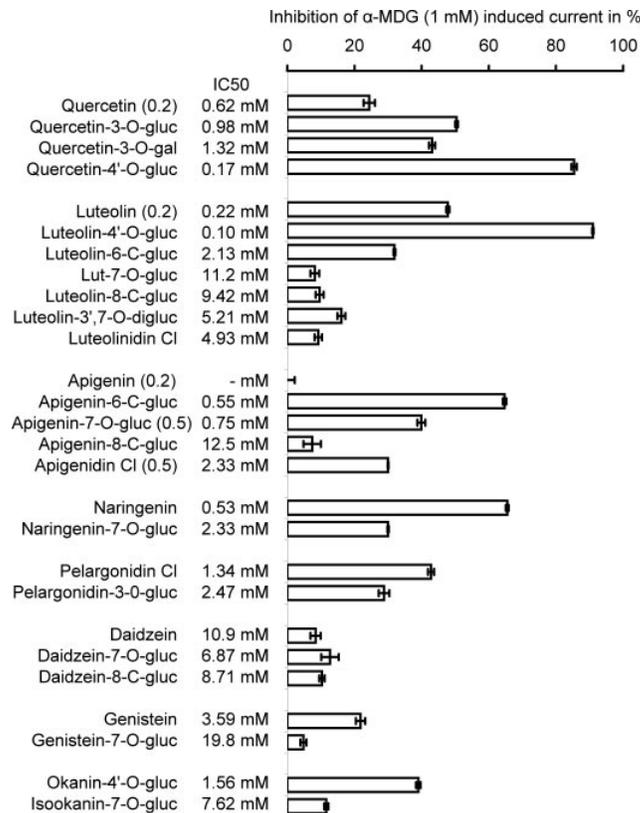


Abbildung 6: Inhibition des 1 mM  $\alpha$ -MDG-Stroms durch unterschiedliche Flavonoide, (Kottra *et al.*, 2007)

Die potentesten IC<sub>50</sub>-Werte konnten für Quercetin-4'-O-glucosid (0,17 mM) und Luteolin-4'-O-glucosid (0,10 mM) verzeichnet werden. Morita *et al.* (2009) isolierten aus der Rinde von *Acer nikoense* cyclische Diarylheptanoide, welche in der Lage waren, den Transport von radiomarkiertem  $\alpha$ -MDG in SGLT1 exprimierenden COS-1-Zellen zu hemmen. Manzano und Williamson konnten 2010 eine Verringerung der Glucoseaufnahme in einem Caco-2-Zell-Modell durch die Gabe von Erdbeer- und Apfelextrakt verzeichnen, wobei polyphenolische Substanzen für diesen Effekt verantwortlich gemacht wurden. Im gleichen Jahr konnten Rodriguez *et al.* die Glucoseabsorption durch einen Extrakt aus Blättern von *Bauhinia megalandra* reduzieren. Hauptverantwortlich dafür war das Kaempferol- $\alpha$ -3-O-rhamnosid, welches die Glucose-Aufnahme um ca. 30% reduzierte und als kompetitiver Inhibitor des SGLT1 fungieren soll. Eine Arbeitsgruppe aus Japan zeigte kürzlich, dass die Senkung der postprandialen Glucosespitzen in Mäusen, ohne Einflussnahme auf den Insulinhaushalt, durch Gabe eines Pfirsichblätter-Extraktes möglich war. Es wird ein Einfluss auf die intestinale Glucoseabsorption postuliert, wobei die genaue Zusammensetzung des Extraktes nicht näher untersucht wurde (Shirosaki *et al.*, 2012).

## 2.1.2 Polyphenole, insbesondere Flavonoide

### 2.1.2.1 Allgemeine Klassifizierung, Biosynthese und Vorkommen

Polyphenolische Verbindungen zählen zu den sekundären Pflanzenstoffen und werden hier grob in Phenolcarbonsäuren, Flavonoide und niedermolekulare Phenole eingeteilt. Es gehören außerdem Lignane, Cumarine, Anthranoide, Cannabinoide und auch Stilbene zu den Polyphenolen. Phenolische Verbindungen tragen an einem aromatischen Ringsystem mehrere freie Hydroxylgruppen und kommen in Nahrungs- und Genussmitteln pflanzlicher Herkunft fast überall und oft in beachtlichen Konzentrationen vor. Unter der Bezeichnung Phenolcarbonsäuren oder Phenolsäuren werden die in der Natur vorkommenden Hydroxyzimtsäuren und Hydroxybenzoesäuren zusammengefasst. Unterschiedlichste Derivate sind in frischen Pflanzenmaterialien und Drogen zu finden (Ester mit anderen Säuren oder Alkoholen, Ester an Zucker gebunden oder mit Phenolcarbonsäuren acylierte Flavonoide). Hydroxyzimtsäuren sind im Pflanzenreich häufiger verbreitet als die -benzoesäuren. Mit 66% ist die Kaffeesäure, gefolgt von *p*-Cumar-, Ferula- und Sinapinsäure, am stärksten in 500 geprüften Pflanzenarten vertreten (*Hänsel und Sticher, 2007*). Ester aromatischer Hydroxycarbonsäuren werden auch als Depside bezeichnet. Am häufigsten kommen Ester zwischen Kaffee- und Chinasäure mit Chlorogensäure (5-O-Caffeoylchinasäure) als Prototyp vor (MATERIAL UND METHODEN Abbildung 10). Flavonoide sind Phenylchromanderivate und bestehen aus einem 15-C-Kohlenstoffgrundgerüst mit einem O-Heterozyklus (Ring C) und zwei aromatischen Ringen A und B, die über eine C<sub>3</sub>-Brücke miteinander verknüpft sind (Abbildung 7).

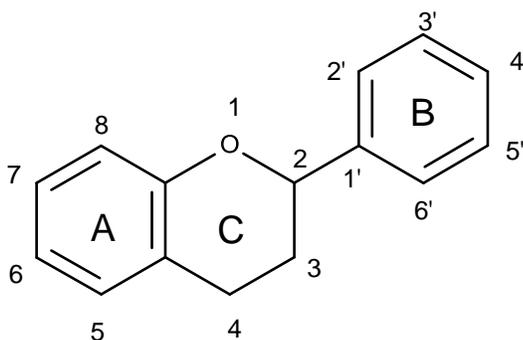
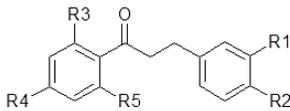


Abbildung 7: Struktur von 2-Phenylchroman (Flavan)

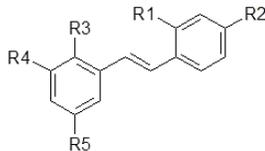
Durch verschiedene Oxidationsstufen im sauerstoffhaltigen Ring ( $C_4=O$ ;  $C_3-OH$ ), durch unterschiedliche Substitutionen an den aromatischen Ringen und durch das Anhängen von Zuckern, ergibt sich die Vielfalt der Flavonoidunterklassen und beeinflusst das analytische Verhalten. Die Flavonoide, deren Name vom lateinischen Begriff „flavus = gelb“ abgeleitet ist, werden je nach Oxidationsgrad der  $C_3$  Brücke in 8 Unterklassen eingeteilt: Flavanone, Flavone, Flavanonole, Flavonole, Flavandiole, Flavanole, Isoflavone und Anthocyane. Innerhalb der Unterklasse der Flavonole und Flavone kommen das Flavonolaglykon Quercetin und deren Derivate am häufigsten in der Pflanzenwelt vor, gefolgt von Kaempferol, Myricetin und den Flavonen Apigenin und Luteolin (*Miean und Mohammed, 2001*). Ausgewählte polyphenolische Substanzen, die in der vorliegenden Arbeit eine Rolle spielen, werden in Abbildung 8 dargestellt.

Dihydrochalcone



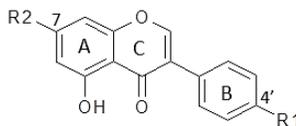
Name	R1	R2	R3	R4	R5
Phlorizin	H	OH	OGlc	OH	OH
Phloretin	H	OH	OH	OH	OH
Neohesperidindihydrochalcon	OH	OMe	OH	OGlcRha	OH

Stilbene



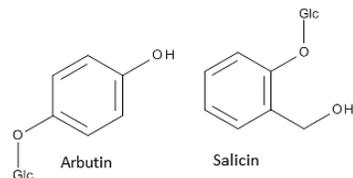
Name	R1	R2	R3	R4	R5
Polydatin	H	OH	H	OGlc	OH
2,3,4',5 Tetra-hydroxystilben-2-glucosid	H	OH	OGlc	OH	OH

Isoflavone

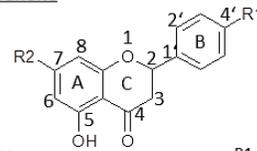


Name	R1	R2
Sophoricosid	OGlc	OH
Genistin	OH	OGlc

Niedermolekulare Phenolglycoside



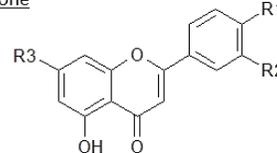
Flavanone



Name	R1	R2
Naringenin-7-O-glucosid	OH	OGlc
Naringin	OH	OGlc2←1Rha
Narirutin	OH	OGlc6←1Rha

Farblose Substanzen, keine olefinische Doppelbindung im Heterozyklus, ein Keton am C4

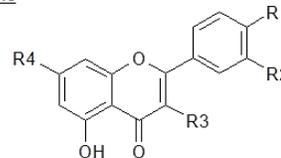
Flavone



Name	R1	R2	R3
Apigenin-7-O-glucosid	OH	H	OGlc
Luteolin-4'-O-glucosid	OGlc	OH	OH
Luteolin-7-O-glucosid	OH	OH	OGlc
Luteolin-3',7-O-diglucosid	OH	OGlc	OGlc

Gelbe Pflanzenstoffe; Doppelbindung zwischen C2 und C3, ein Keton am C4

Flavonole



Name	R1	R2	R3	R4
Kaempferol-3-O-glucosid	OH	H	OGlc	OH
Kaempferol-7-O-glucosid	OH	H	OH	OGlc
Kaempferol-3-O-rutinosid	OH	H	OGlcRha	OH
Quercetin-4'-O-glucosid	OGlc	OH	OH	OH
Quercetin-3-O-glucosid	OH	OH	OGlc	OH
Quercetin-3,4'-O-diglucosid	OGlc	OH	OGlc	OH
Quercetin-7-O-glucosid	OH	OH	OH	OGlc
Quercitrin	OH	OH	ORha	OH
Hyperosid	OH	OH	OGal	OH
Rutin	OH	OH	OGlcRha	OH

Cremefarbene, gelbe Kristalle, Doppelbindung zwischen C2 und C3, OH-Gruppe am C3, Keton am C4

Abbildung 8: Strukturübersicht relevanter polyphenolischer Substanzen aus unterschiedlichen Unterklassen

Flavonoide kommen nativ größtenteils als Glycoside (O-Glycoside und C-Glycosyle) im Pflanzenreich vor. Mehr als 80 verschiedene Zucker sind bisher in Flavonoidglycosiden nachgewiesen, allein für Quercetin sind 179 verschiedenen Glycoside beschrieben worden (Watzl und Rechkemmer, 2001). Ring A weist häufig das Substitutionsmuster des Phloroglucins auf; Ring B ist gewöhnlich in *meta*- bzw. *para*-Stellung hydroxyliert. Substituenten in den Positionen 6 und 8 kommen ebenfalls vor und sind meist C-glycosylisch gebundene Zucker. Alle im Molekül vorhandenen Hydroxylgruppen können frei,

methyliert oder glycosyliert vorliegen. Häufig vertreten sind O-Glycoside, die in Position 3 des C-Ringes glycosyliert sind (Hertog *et al.*, 1992b).

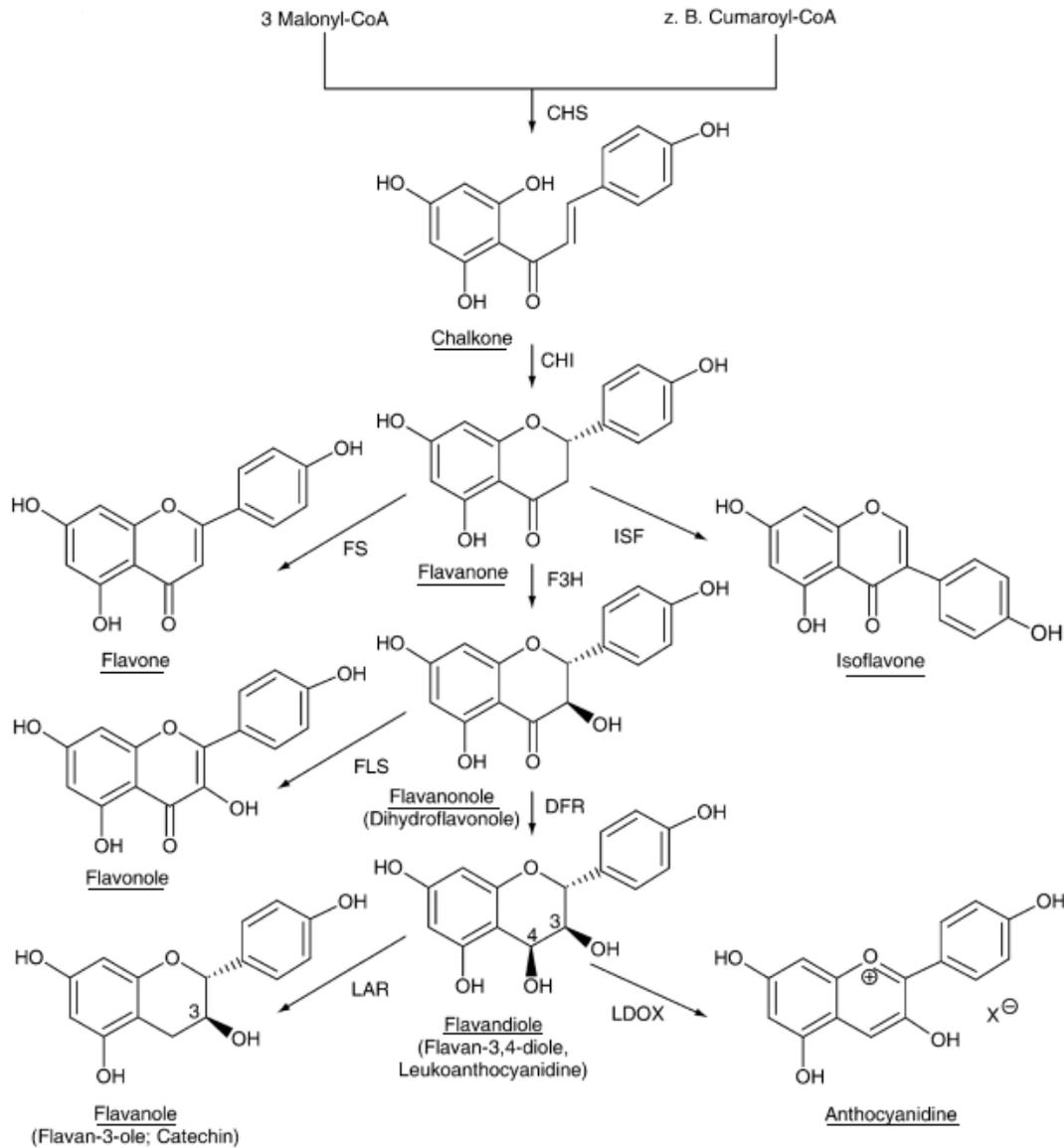


Abbildung 9: Biosynthese bzw. Klassifizierung der Flavonoide, (Hänsel und Sticher, 2007)

Die Biosynthese der Flavonoide in der Pflanze wird im endoplasmatischen Retikulum diskutiert (Stafford, 1990) und beginnt im Shikimisäureweg. Ausgangspunkt ist die aromatische Aminosäure Phenylalanin, wobei Phenylalanin durch die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) in *trans*-Zimtsäure umgewandelt wird. Diese wird durch die Zimtsäure-4-Hydroxylase zu *p*-Cumarsäure hydroxyliert. Die *p*-Cumarsäure wird zu Cumaroyl-Coenzym A aktiviert. Aus Cumaroyl-CoA und 3 Molekülen Malonyl-CoA aus dem

Acetat-Malonat-Weg, werden durch die Chalkonsynthase (CHS) die Chalcone synthetisiert (Abbildung 9). Die Chalconflavanonisomerase (CHI) katalysiert den Ringschluss des Heterozyklus zu Flavanonen. Durch unterschiedliche Enzyme entstehen daraus die wichtigen Unterklassen der Flavone, Isoflavone, Flavanone sowie der Flavone (Abbildung 9). Die Biosynthese wird durch Licht induziert, wobei die Lokalisation in der Pflanze noch diskutiert wird: *Koes et al. (1994)* und *Mol et al. (1989)* konnten Flavonoide in der Vakuole finden, während *Buer und Muday (2004)* zusätzlich im Cytoplasma Flavonoide nachweisen konnten. Über 5000 unterschiedliche polyphenolische Substanzen sind in der Literatur beschrieben (*Harborne et al., 1999*). In der Pflanze beeinflussen Flavonoide die Pflanzenentwicklung und das Pflanzenwachstum und besitzen unterschiedlichste Funktionen. Sie schützen durch ihre antioxidativen Eigenschaften vor UV-Strahlung und vor Schädlingsbefall. Sie gehören in die Gruppe der Blütenfarbstoffe und locken so Insekten zur Pollenverbreitung an. Sie spielen außerdem in der Regulation des Auxin-Transportes eine Rolle (*Grotewold, 2006*). Flavonoidreiche Nahrungsquellen sind Gemüse und Obst, wobei *Hertog et al. (1992b)* unterschiedlichste Gemüse- (28) und Obstarten (9) hinsichtlich des Flavonolgehalts untersucht haben. Der Gehalt an Quercetin lag generell unter 10 mg/kg essbarer Portion. Ausnahmen bildeten Gemüse wie Zwiebel (284-486 mg/kg), Kohl (110 mg/kg), Broccoli (30 mg/kg) und Bohnen. Kaempferol konnte in höheren Mengen nur im Kohl (211 mg/kg) quantifiziert werden. Detaillierte Angaben über den Flavonoidgehalt für ausgewählte Nahrungsmittel (> 380) geben die „USDA-Database“ des US Departments of Agriculture in Maryland, USA und die Online-Datenbank „Phenol-Explorer“.

#### 2.1.2.2 Bioverfügbarkeit von polyphenolischen Substanzen

Eine Vielzahl von Bioverfügbarkeitsstudien zu Polyphenolen untersuchten deren Plasmakonzentrationen und die Ausscheidung ihrer Metabolite durch den Urin, nach Gabe einer Einzelsubstanz oder eines Pflanzenextraktes. Quercetin gehört zu den am meisten untersuchtesten Aglyka. Natürlich vorkommende Flavonoide liegen jedoch überwiegend als  $\beta$ -Glycoside vor. Form, Ausmaß und Art der Glycosylierung scheinen einen Einfluss auf die Absorption zu haben (*Graefe et al., 2001; Nijveldt et al., 2001*). Flavonoidaglyka sind aufgrund ihrer Lipophilie besser absorbierbar und können bis zu einem gewissen Grad

passiv durch die Bürstensaummembran des Dünndarms diffundieren. Im Vergleich dazu müssen Flavonoidglycoside zuvor metabolisiert werden, um in den systemischen Kreislauf zu gelangen. Das intestinale membrangebundene Enzym Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) ist u.a. verantwortlich für die Spaltung der Glycoside im Dünndarm (*Day et al., 1998 & 2000; Németh et al. 2003; Hänsel und Sticher, 2007*). Flavonoidglycoside, die von der LPH nicht gespalten werden, können von den Enzymen der Dickdarmbakterien hydrolysiert werden. Die absorbierten Stoffwechselzwischenprodukte werden in einer direkten Phase-II-Reaktion glucuronidiert, methyliert, sulfatiert oder zu Benzoesäure-, Hydroxyphenylpropionsäure- bzw. Phenyllessigsäure-Derivaten abgebaut und ausgeschieden (*Wagner et al., 2007*). So konnten *Graefe et al. (2001)* bestätigen, dass nach Gabe von Quercetin-4'-O-glucosid als Monosubstanz und in Form eines Zwiebelextraktes keine Unterschiede in der Plasmakonzentration von Quercetinglucuroniden festgestellt werden konnte. Aglyka wurden im Plasma nicht detektiert. *Manach et al.* stellten 2005 ein Review über 97 verschiedene Bioverfügbarkeitsstudien von Polyphenolen zusammen. Quercetinglucoside, wie sie beispielsweise in der Zwiebel vorkommen, sind besser verfügbar als Flavonoidglycoside aus Apfel- oder Teeextrakten, die u.a. aus Rutin (Quercetin-3-O-rutinosid) bestehen. So konnten *Day et al. (2001)* nach Gabe eines charakterisierten Zwiebelextraktes im Plasma die Hauptmetabolite Quercetin-3-glucuronid, 3'-Methylquercetin-3-glucuronid und Quercetin-3'-sulfat mittels LC-MS Analysen detektieren. Polyphenole, für die eine Resorbierbarkeit über den Darm bereits bewiesen wurde, sind Isoflavone, Gallussäure, Catechine, Flavanone und Quercetinglucoside. Naringeninderivate, wie beispielsweise Naringeninrhamnoglycoside (Narirutin, Naringin) werden von den Enzymen der Darmbakterien gespalten und können als Aglyka aufgenommen werden. Die am schwächsten absorbierten Polyphenole sind die Proanthocyanidine, Catechine aus Teeblättern, die mit Gallussäure verestert sind und Anthocyane. Neuere Untersuchungen von *Kahle et al. (2011)* zur systemischen Metabolisierung von Apfel-Polyphenolen zeigen, dass eine Hydrolyse der Flavonoidglycoside auch von der bakteriellen Mundflora abhängt, während im simulierten Magenmodell (pH 1,8; 37°C; Inkubation 4 h) Hydroxyzimtsäure-derivate, Flavonole, Dihydrochalcone und Flavanole stabil waren. Der Inhaltsstoff Phlorizin konnte im Plasma als Phloretin-glucuronid und als Phloretin-sulfat detektiert werden. Auch

*Marks et al. (2009)* untersuchten die Absorption und den Metabolismus von Dihydrochalconen aus Apfel und identifizierten Phloretin-2'-O-glucuronid als Hauptmetabolit im Plasma und Urin nach oraler Gabe eines Apfelsaftes. Nach chronischer Gabe von Phlorizin bei diabetischen Mäusen entdeckte *Masumoto et al. (2009)* nach Behandlung der Plasma-Proben mit Sulfatase und  $\beta$ -Glucuronidase neben hohen Mengen an Phloretin, in geringen Mengen auch Phlorizin im Plasma. Hydroxyzimtsäuren, die auch in Apfelzubereitungen zu finden sind, beispielsweise die Chlorogensäure, werden hauptsächlich im Kolon nach Spaltung durch bakterielle Esterasen absorbiert (*Olthof et al., 2001*).

#### 2.1.2.2.1 Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH)

Die Lactase-Phlorizin-Hydrolase (EC 3.2.1.108) ist ein membrangebundenes Glycoprotein und in den Enterozyten des Dünndarms lokalisiert. Das Protein gehört zu den Disaccharidasen, wie auch die Sucrase-Isomaltase und Maltase-Glucoamylase (*Naim et al. 1987*) und besitzt zwei aktive Zentren. Die Lactase-Seite ist für die Spaltung von Lactose in Glucose und Galactose verantwortlich. Das 2. aktive Zentrum wird von einer Glycosylceramidase, der Phlorizin-Hydrolase gebildet, welche Substrate wie Glycosyl-N-acylsphingosine, Phlorizin und auch Flavonoidglycoside hydrolysieren kann (*Colombo et al., 1973; Zecca et al., 1998; Day et al., 1998, 2000; Németh et al. 2003*). Die Rolle dieser Hydrolase-Seite im Menschen ist noch unklar (*Naim 2001*). Lactose ist zu 7% in der Muttermilch vorhanden und wird durch die  $\beta$ -Glucosidase gespalten. Da die Muttermilch das Hauptnahrungsmittel im Säuglingsalter darstellt, ist eine hohe LPH-Aktivität in dieser Zeit fast immer vorhanden (*Swallow, 2003*). Nach dem Abstillen nimmt die LPH-Aktivität normalerweise ab. Eine daraus resultierende Lactose-Intoleranz verursacht durch Lactose im Dünndarm starken Durchfall, Flatulenz, Übelkeit und Bauchschmerzen. Allerdings reichen 50% der verbleibenden LPH-Aktivität aus, um Lactose aus unterschiedlichen Nahrungsmitteln verstoffwechseln zu können. In Europa variiert die Anzahl der Lactose-Intoleranten stark. Während in Skandinavien nur 2% der Bevölkerung von einem LPH-Defizit betroffen sind, leiden 70% der Südtaliener an einer Lactose-Unverträglichkeit. Dagegen sind in Südamerika, Afrika und Asien mehr als 50% der Bevölkerung Lactose-intolerant (*Furnari et al., 2012*). Die Phänotypen können durch eine Biopsie, durch einen H<sub>2</sub>-Atemtest oder

durch Messen des Blutglucosespiegels nach Lactose-Gabe bestimmt werden (*Furnari et al., 2012*).

Die LPH besteht aus vier homologen Domänen. Das LPH- $\alpha$ -Profragment I enthält die Domänen I und II und interagiert als ein intramolekulares Chaperon für die LPH- $\beta$ -Region der LPH. LPH wird im *trans*-Golgi-Apparat mittels einer Trypsin-ähnlichen Protease gespalten, dabei entsteht initial LPH- $\beta$  (160 kDa), und das Profragment LPH- $\alpha$ , welches gleich nach der Spaltung zerfällt (*Behrendt et al., 2010*). LPH- $\beta$ -initial wird mittels des *trans*-Golgi Netzwerks in Vesikeln zur apikalen Membran der Enterozyten transportiert. Hier wird das Protein wiederum durch luminales Trypsin zu LPH- $\beta$ -final (145 kDa) gespalten, wobei diese Form durch Domäne III (Phlorizin-Hydrolase) und Domäne IV (Lactose-Seite) voll funktionsfähig ist. Die LPH wird am stärksten im mittleren Jejunum exprimiert (*Newcomer und McGill, 1966*).

*Day et al. (1998)* konnten die Deglycosylierung von Flavonoid- und Isoflavonglycosiden durch Enzyme im Dünndarm und in der Leber zeigen. Im Jahr 2000 isolierten *Day et al.* LPH aus Schafsdärmen und konnten die Hydrolyse von Quercetin-4'-glucosid, Quercetin-3-O-glucosid, Genistin und Daidzin beobachten. Flavonoid-rhamnoglycoside (Rutin, Naringin) wurden nicht von der LPH gespalten (*Day et al., 2000*). Außerdem wurde postuliert, dass die genannten Flavonoide durch die Lactase-Seite der LPH hydrolysiert werden. *Németh et al. (2003)* zeigten in einer weiteren Studie mit aufgereinigter LPH aus Schafsdarm, dass der erste Schritt der Absorption und Metabolisierung von Flavonoidglycosiden ihre Deglycosylierung voraussetzt. Über 25 Flavonoide wurden getestet, wobei Quercetin-4'-O- und -3-O-glucosid, Naringenin- und Apigenin-7-O-glucosid und auch Luteolin-7-O- und -4'-O-glucosid gespalten werden. Flavonoid-rhamnoglycoside, -arabinside, -xyloside, -rhamnoside und auch Anthocyane stellten keine Substrate der LPH dar (*Németh et al., 2003*). Für das eigentliche Ziel, den SGLT1 durch Flavonoide oder flavonoidhaltiges Pflanzenmaterial zu inhibieren, muss die metabolische Stabilität der potentiellen Inhibitoren am Target gegeben sein. Es sind 3 humane  $\beta$ -Glucosidasen bekannt, die membrangebundene LPH und die Glucocerebrosidase, ein lysosomales Protein, welches Glucoceramide (Glucosyl-*N*-acylsphingosine) hydrolysiert. Außerdem existiert eine

cytosolische  $\beta$ -Glucosidase (CBG) mit breitem Substratspektrum, lokalisiert in der Leber, Niere und im Dünndarm. Die LPH ist jedoch die einzige  $\beta$ -Glucosidase, die wie der SGLT1 apikal im Dünndarm lokalisiert ist. So wurden ausgewählte polyphenolische Substanzen und potentielle Inhibitoren auf ihre metabolische Stabilität gegenüber der LPH untersucht.

### 2.1.2.3 Pharmakologische Effekte

Bedingt durch die große Vielfalt an chemischen Strukturen sind Flavonoide bekannt für ihre zahlreichen biologischen Aktivitäten, die *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen worden sind: teilweise wirken sie antiallergisch, antiphlogistisch, antiviral, antimikrobiell, antioxidativ, antiproliferativ und antikarzinogen (*Hänsel und Sticher, 2007*). Flavonoide sind in der Lage Interaktionen mit Biopolymeren (DNA, Enzyme, Transporter) einzugehen, als Radikalfänger zu dienen und Signaltransduktionswege zu beeinflussen. Ursprünglich bezeichnete man Flavonoide als Vitamin P (Permeabilitätssubstanzen), da man von einer essentiellen Bedeutung dieser sekundären Pflanzenstoffe für den menschlichen Organismus ausging. *Nijvelde et al.* stellten 2001 ein Review über nachgewiesene Wirkmechanismen von Flavonoiden zusammen. So weiß man, dass Flavonoide durch direkte Oxidation durch Radikale antioxidativ wirken oder indirekt mit körpereigenen Radikal-erzeugenden Enzymsystemen interagieren; so wird beispielsweise die Lipidperoxidation vermindert und damit die Zelle vor oxidativem Stress geschützt. Ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Catechinen aus Tee und einer erhöhten Knochendichte konnte in einer englischen Studie von *Hegarty et al. (2000)* festgestellt werden. *Hertog et al. (1995)* bestätigten, dass Flavonoide, die täglich mit der Nahrung aufgenommen werden, das Risiko vermindern an koronarer Herzkrankheit zu sterben. Epidemiologische Daten scheinen zu beweisen, dass die Inzidenz von cerebrovaskulären Erkrankungen niedriger ist bei einer höheren Kaempferol- und Naringenin-Aufnahme. Außerdem führt die Aufnahme von Quercetin bzw. Naringenin zu einer niedrigeren Asthma-Inzidenz. Eine Risikoverringerung von Typ-2-Diabetes soll mit höherer Quercetin- und Myricetin-Aufnahme verbunden sein (*Knekt et al., 2002*). Partialsynthetische Rutinderivate wie Troxerutin und O-( $\beta$ -Hydroxyethyl)-rutosid (in Fertigarzneimittel Venoruton®) kommen therapeutisch wegen ihrer kapillarabdichtenden Wirkung bei Varikosis, chronisch-venöser Insuffizienz und damit verbundenen

Stauungszuständen zum Einsatz (*Felix et al., 1984*). Bei leichten Formen von Herzinsuffizienz (NYHA I und II Stadien) kommen u. a. Präparate aus Crataegus-Extrakten zur Anwendung. Diese enthalten oligomere Procyanidine und auch Quercetinderivate. Weißdornpräparate steigern die Kontraktionskraft des Herzens (positiv inotrop), erweitern die Herzkranzgefäße und verbessern so die Sauerstoffversorgung des Herzmuskels. Auch eine antiinflammatorische Wirkung konnte von *Ferrandiz et al. (1991)* gezeigt werden. Flavonoide beeinflussen den Cyclooxygenase- und 5-Lipoxygenase-Weg. Die Inhibition dieser Entzündungswege vermindert die Umsetzung von Arachidonsäure, welche am Anfang der Entzündungsreaktion steht, und somit die Bildung von Entzündungsmediatoren (v.a. Prostaglandin E2 und Leukotrien B4). Es gibt zudem Hinweise, dass Flavonoide durch Hemmung des Cyclooxygenase- und 5-Lipoxygenase Weges antithrombotische Effekte aufweisen. In Tierversuchen wurde durch Quercetin, Kaempferol und Myricetin eine inhibitorische Wirkung auf die Thromboxan A<sub>2</sub>-Synthese festgestellt. Für einige Flavonoide wurden außerdem antibakterielle und antivirale Effekte nachgewiesen. *Wang et al.* konnte 1998 zeigen, dass Quercetin in den Replikationszyklus unterschiedlicher Viren (Herpes-simplex-Virus, Adenovirus und Parainfluenza-Virus) eingreifen kann. Die aufgeführten sehr vielfältigen Effekte konnten allerdings meist nur *in vitro* beobachtet werden. Bioverfügbarkeitsstudien machen deutlich, dass im Plasma hauptsächlich Metabolite der Aglyka detektierbar sind (siehe Absatz 2.1.2.2); daher müssten in Zukunft direkte Untersuchungen zu den entstehenden Metaboliten durchgeführt werden, um bessere Aussagen über *in vivo* Effekte machen zu können.

## 3. MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Chemikalien

Alle Reagenzien, die für chromatographische Zwecke verwendet wurden, waren HPLC grade. Chemikalien, die ganz spezifisch bei einem Versuch eingesetzt worden sind, sind bei dem dazugehörigen Versuch aufgeführt.

Aqua bidest. (Destillationskolone der Abteilung Pharmazeutische Technologie, CAU-Kiel)

#### Carl Roth GmbH, Karlsruhe:

(L)-Ascorbinsäure

Essigsäure 99-100%

HEPES

Natriumdeoxycholat

Natriumhydroxid

Magnesiumchlorid-hexahydrat

Rotiphorese Gel

TEMED

Trichloressigsäure

#### ThermoFisher, Germany:

Dithiothreitol,

D-Mannitol

Kaliumsulfat wasserfrei

Natriumchlorid

#### Mallinckrodt / J.T. Baker, Denver, USA

Acetonitril „HPLC grade“

#### Merck Chemicals, Darmstadt:

Aluminiumchlorid

Calciumchlorid

Salzsäure

Methenamin

Kaliumchlorid

Kaliumdihydrogenphosphat

Magnesiumsulfat

Natriumcarbonat

Natriumhydrogencarbonat

Natriumhydroxid

Natriumsulfat

Tween-20

**Riedel-de Haen/Honywell, Seelze:**

Ethylacetat

**Sigma-Aldrich GmbH, D-89555 Steinheim:**

Aceton

2,2'-Azino-bis-(3-ethylenbenzothiazolin-6-sulfonsäure)

Chloroform

Dikaliumhydrogenphosphat

Dimethylsulfoxid

Ethanol

HEPES, minimum 99,5% titration

Iso-Propanol

Kaliumhydroxid

Methanol

$\alpha$ -Methyl-D-glucopyranosid

N-Methyl-D-Glucamin

Natriumchlorid

## 3.2 Polyphenole

Polyphenole / MW (g/mol)	Firma
<b>Dihydrochalcone</b>	
Phlorizin / 436	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
Phloretin / 274	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
Neohesperidin-dihydrochalcon / 612	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
<b>Isoflavone</b>	
Sophoricosid / 432	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
Genistein / 270	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
Genistin / 432	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
<b>Flavonole</b>	
Quercetin / 302	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
Quercetin-4'-O-glucosid / 464	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
Quercetin-3-O-glucosid / 464	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
Quercetin-7-O-glucosid / 464	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
Quercetin-3,4'-O-diglucosid / 626	Extrasynthese SAS, 69726 GENAY, FRANCE
Quercitrin / 448	Extrasynthese SAS, 69726 GENAY, FRANCE
Hyperosid / 448	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rutin / 610	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth

Kaempferol / 286	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
Kaempferol-3-O-glucosid / 448	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
Kaempferol-7-O-glucosid / 448	TransMit GmbH, Marburg
Kaempferol-3-O-rutinosid / 594	Extrasynthese SAS, 69726 GENAY, FRANCE
Isorhamnetin / 316	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>Flavanole</b>	
(+)-Catechin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>Flavanone</b>	
Naringenin-7-O-glucosid / 434	Extrasynthese SAS, 69726 GENAY, FRANCE
Naringin / 580	Extrasynthese SAS, 69726 GENAY, FRANCE
Narirutin / 580	Extrasynthese SAS, 69726 GENAY, FRANCE
Naringenin / 272	Extrasynthese SAS, 69726 GENAY, FRANCE
<b>Flavone</b>	
Apigenin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Apigenin-7-O-glucosid / 432	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
Luteolin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Luteolin-4'-O-glucosid / 448	Extrasynthese SAS, 69726 GENAY, FRANCE
Luteolin-7-O-glucosid / 448	Extrasynthese SAS, 69726 GENAY, FRANCE
Luteolin-3',7-O-glucosid / 610	Extrasynthese SAS, 69726 GENAY, FRANCE
<b>Polyphenolische Säuren</b>	
Chlorogensäure / 354	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ferulasäure / 194	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gallussäure / 170	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaffeesäure / 180	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
p-Cumarsäure / 164	TransMit GmbH, Marburg
Sinapinsäure / 224	TransMit GmbH, Marburg
<b>Stilbene</b>	
Polydatin / 390	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
2,3,4',5-Tetrahydroxystilbene-2-glucoside / 406	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
<b>Andere</b>	
Arbutin / 272	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth
Salicin / 286	PytoLab GmbH & Co.KG, Vestenbergsreuth

### 3.3 Ausgangsmaterialien

#### 3.3.1 Grünkohl

##### Allgemeines:

Kopf- und Blattkohle sind die bedeutendsten Pflanzen unter den Blattgemüsen und stellen neben Tomaten die weltweit wichtigsten Gemüsepflanzen dar. Trotz der unterschiedlichsten Erscheinungsformen gehören alle europäischen Kohlsorten einer einzigen Art an: *Brassica oleracea* L. Nach IPNI (International Plant Name Index) wird der Grünkohl als *Brassica oleracea* var. *sabellica* L. bezeichnet. Er stammt aus der Klasse der

*Rosopsida*, Unterklasse der *Rosidae*, Ordnung der *Brassicales* und Familie der *Brassicaceae* (Kreuzblütlergewächse). Kohlpflanzen sind Rosettenpflanzen, die nach der Blüte und Fruchtbildung absterben. Sie bilden verzweigte Blütenstände mit gelben, für *Brassicaceae* typischen vierzähligen Kreuzblüten mit zwei kurzen und zwei langen Staubblättern. Aus dem oberständigen Fruchtknoten aus vier Karpellen entwickelt sich als weiteres charakteristisches Merkmal der *Brassicaceae* eine Schote. Der Grünkohl ist bekannt für seinen hohen Nährwert an Vitaminen (Vitamin C: 100 mg/100 g essbarem Anteil), Mineralien, Ballaststoffen und seinen Reichtum an sekundären Pflanzenstoffen wie Glucosinolaten und antioxidativen Verbindungen, inklusive Polyphenole und Phenolsäuren. Der charakteristische Geschmack beruht auf diesen schwefelhaltigen Senfölglycosiden (Franke, 2007).

#### **Verwendter Grünkohl, wenn nicht anders angegeben:**

*Grünkohl vom Großmarkt CITTI, Kiel*

Die Sorte Reflex F1 ist eine halb hohe, frostharte und daher sehr gut für die Winterernte geeignete Sorte mit dunkelgrünen, fein gekrausten Blättern. Der gelieferte Grünkohl wird im Bereich zwischen den Städten Janow Podlaski (PLZ 21-505), Miedzyrzeca Podlaski (PLZ 21-560) und Losice (PLZ 08-200) angebaut, weit im Osten von Polen. Der handgestrippte Kohl wurde von den Hauptnerven befreit und für 3 min bei 94-98°C blanchiert, dann tiefgefroren und in Kiel direkt für die Gefriertrocknung verwendet.

#### **Grünkohl für den Blanchierprozess:**

Sorte: Halbhoher Grüner Krauser Kohl, ausgesät nach dem 10. Mai 2009 in der Nähe von Schwerin/Mecklenburg-Vorpommern, gepflanzt Juli, Ernte der Blätter ohne Hauptnerven nach dem 1. Frost am 17. November 2009 und nochmals am 25. Januar 2010 (Höhe 30 bis 40 cm)

#### **Spezielle Grünkohlarten:**

Für die Auswahl des Grünkohls, der für die Produktion des Endproduktes verwendet werden soll, wurden innerhalb des Projektes unterschiedlichste Ausgangsmaterialien (Sorten, Bio-

Grünkohle etc.) für den Partner *BioActive Food GmbH* auf den Flavonoidgehalt untersucht (Tabelle 2). Hier wurde das frische Blattmaterial für die anschließende Gefrier Trocknung verwendet.

Tabelle 2: Überblick des verwendeten Ausgangsmaterials (Grünkohl)

Bezeichnung	Sorte/Herkunft	Charakteristika
<b>GK vom CITTI Markt</b>	Reflex F1/Polen	dunkelgrüne, fein gekrauste Blätter
<b>GK Lo 2301</b> <b>7.10. BAF-I-S.41</b>	Logabirum/Ostfriesland	hellgrüne Blattfarbe, starke Blattkräuselung sehr feinkrause Sorte
<b>GK Her 20</b> <b>7.10. BAF-I-S.41</b>	Holterfehn/Ostfriesland	hellgrüne Blattfarbe, mittlere Blattkräuselung, Sorte mit großen Blattabständen
<b>GK La</b> <b>7.10. BAF-I-S.41</b>	Lammertsfehn/Ostfriesland	grüne Blattfarbe, mittlere Blattkräuselung
<b>GK H 22</b> <b>7.10. BAF-I-S.41</b>	Holte/Ostfriesland	hellgrüne Blattfarbe, starke Blattkräuselung sehr feinkrause Sorte
<b>GK Schos</b> <b>7.10. BAF-I-S.41</b>	Schatteburg/Ostfriesland	mintgrüne Blattfarbe, mittlere Blattkräuselung
<b>Cord</b> <b>7.10. BAF-I-S.41</b>	Rückkreuzung der Sorte Cola	Cola: Kreuzung aus GK, Broccoli, Rosenkohl
<b>GK Gal P.</b> <b>7.10. BAF-I-S.41</b>	Galizische Palme	Galizische Palme in der Nähe des Jakobsweges gesammelt, Pilgerweg in Spanien
<b>GK Elmshorn W</b>	Westerländer Winter/Elmshorn	kräftige Pflanze mit gewelltem, blau-grünem Blatt, gute Winterhärte
<b>GK Elmshorn R</b>	Reflex F1/ Elmshorn	halbhohe, feingekrauste, sehr frostharte Sorte
<b>GK BIO Palette 3</b> <b>10600</b>	Reflex F1/Dittmarschen	halbhohe, feingekrauste, sehr frostharte Sorte
<b>GK BIO 10500</b>	Galiz. Palme/Dittmarschen	

### 3.3.2 Zwiebelextrakte

#### Allgemeines:

Die Küchenzwiebel (*Allium cepa* L.) gehört zur Familie der Amaryllisgewächse (*Amaryllidaceae*) und stammt aus Mittelasien und Afghanistan. Heute ist sie überall verbreitet und gilt als Gemüse- und Gewürzpflanze. Außerdem besitzt sie einen hohen Nährwert an Kohlenhydraten, Ballaststoffen, Mineralstoffen und zahlreichen Vitaminen wie Vitamin C, B<sub>1</sub>, und B<sub>2</sub> (Franke, 2007).

### Zwiebelextrakt

Der zu untersuchende Extrakt wurde von der Firma *Wellness & Health Care (wHc-Service GmbH, Neuenbürg)* zur Verfügung gestellt. Dieser Zwiebelextrakt namens ZE420 wurde in den Humanstudien und für alle *in vitro* Tests verwendet. Die Firma gab leider keine Informationen zum verwendeten Ausgangsmaterial, noch zur Extraktionsmethode.

### 3.3.3 Citrusextrakte

#### Allgemeines

##### Grapefruit

Die Grapefruit (*Citrus × paradisi* MACF) gehört zur Familie der Rautengewächse (*Rutaceae*). Sie ist ein Kreuzungsprodukt aus der Apfelsine (*Citrus sinensis* L.) und der Pampelmuse (*Citrus maxima* MERR) und hauptsächlich auf den Westindischen Inseln zu finden. Ein hoher Wert an Vitamin C, Kohlenhydraten, Ballaststoffen und organischen Säuren ist in Grapefruitfrüchten vorhanden (*Franke, 2007*). Grapefruitsaft kann Wechselwirkungen mit pharmazeutischen Wirkstoffen hervorrufen, wobei die Pharmakokinetik der Substanzen so verändert werden kann, dass unerwünschte pharmakologische Effekte auftreten können. Zahlreiche Arzneistoffe wie Statine (Simvastatin), Antiepileptika (Carbamazepin), Benzodiazepine (Diazepam) usw. können so in ihrer Bioverfügbarkeit und Metabolisierung verändert werden. Inhaltsstoffe der Grapefruit hemmen CYP3A4, eine Isoform der CYP450-Familie, die für die Metabolisierung der Arzneistoffe in der Leber verantwortlich sind. Dadurch werden die oben genannten Arzneistoffe langsamer abgebaut. Als hauptverantwortlicher Inhaltsstoff wurde 6',7'-Dihydroxybergamottin, ein Furanocumarinderivat, nachgewiesen (*Edwards et al., 1996*). Naringin als quantitativ wichtigstes Bioflavonoid in der Grapefruit ist kein potenter CYP-Inhibitor, aber Naringin wird teilweise durch darmständige Glucosidasen und enterale Bakterien in sein Aglykon Naringenin abgebaut, was wiederum ein potenter Inhibitor der P450-Enzyme ist (CYP3A4).

### **Bitterorange**

Die Bitterorange oder Pomeranze (*Citrus aurantium* L. ssp. *aurantium*) ist die Frucht eines immergrünen Citrusbaumes aus der Familie der Rautengewächse (*Rutaceae*). Sie stammt aus Nordindien (*Franke, 2007*). Bitterorangenblüten werden volksmedizinisch als beruhigendes Mittel bei Spannungszuständen, Nervosität und Schlafstörungen angewandt, wobei die Kommission E diese Anwendung negativ bewertet. Bitterorangenschale ist ein bekanntes Bittermittel zur Behandlung von Verdauungsstörungen und Appetitlosigkeit (*Schilcher, 2010*).

### **Bitterorangen- und Grapefruitextrakte**

Zwei Citrusextrakte der Firma *DENK Ingredients GmbH* (München, Germany) konnten für analytische und inhibitorische Testungen verwendet werden.

C1: CITROFLAVONOIDS SOLUBLE GF (50%) aus Grapefruit

C2: C.B.C 45% HPLC-SPD aus Bitterorange

## 3.3.4 Apfelextrakte

### **Allgemeines**

Der Kulturapfel (*Malus domestica* BORKH., *Rosaceae*) ist das Resultat der Domestikation und Kreuzung aus zahlreichen Malusarten der gemäßigten und subtropischen Breiten. Es ist ein bedeutendes Fruchtbst in Europa, da es von allen Obstarten am vielfältigsten verwendbar ist. Der Apfel ist reich an Nährstoffen wie Vitaminen (C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>), Kohlenhydraten, Mineralstoffen und Ballaststoffen (*Franke, 2007*) und stellt neben Zwiebel und Tee eine reichhaltige Quelle an Polyphenolen dar (*Hertog et al., 1992b*). Im Apfel sind u.a. monomere Flavan-3-ole, Flavonole und Dihydrochalcone zu finden. Das dominierende Polyphenol des Apfels soll die Chlorogensäure sein. Bei den Dihydrochalconen sind das -Xylosid und das -Glucosid des Phloretins vertreten. Im Vergleich zu den anderen Polyphenolgruppen sind Quercetin-3-O-glycoside in geringeren Mengen enthalten, es gibt jedoch auch Quercetin-reiche Apfelsorten wie Bittenfelder und Bohnapfel (*Guyot et al.,*

2003; Kahle et al., 2005a). Phlorizin, ein Dihydrochalcon aus Apfel und ein bekannter SGLT1-Inhibitor, ist im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse und daher wurden für die *BioActive Food GmbH* unterschiedlichste Apfelsorten (Schale und Kerngehäuse) auf ihren Phlorizingehalt untersucht.

### Apfelzubereitungen/-extrakte

Alle verwendeten Apfelzubereitungen wurden vom Projektpartner *BioActive Food GmbH* zur Verfügung gestellt. Es wurden zahlreiche Apfelzubereitungen wie ein Apfeltrester (ATI) und daraus mittels einer Adsorberharzmethode gewonnene Flavonoid-angereicherte Apfeleluate untersucht. Die Apfelproben der untersuchten unterschiedlichen Sorten stammen aus Gülzow, Mecklenburg-Vorpommern und wurden im Sommer/Herbst 2011 geerntet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Apfelsorten

Sorte	Charakteristika
<b>Danziger Kantapfel</b>	robuste Tafel- und Wirtschaftsorte, würzige Früchte; alte, frostharte Herbstsorte
<b>Undine</b>	Winterapfel, mittelgroße bis große Früchte, glatte, trockene, gelbgrüne Schale, grünlichweißes Fruchtfleisch, Geschmack angenehm säuerlich süß
<b>Pilot</b>	feinsäuerlicher, sehr bissfester und lange haltbarer Apfel
<b>Champagner Renette</b>	Früchte sitzen fest und sind direkt vom Baum noch ungenießbar
<b>Graue franz. Renette</b>	saftig, würzige Früchte
<b>Kassler Renette</b>	Früchte: mittelgroß, abgestumpft, rundlich Fruchtschale: glatt, glänzend, wird im Lager goldgelb; Fruchtfleisch: gelbweiß, fein, saftig, renettenartig gewürzt, hoher Zuckergehalt
<b>Doberaner Renette</b>	Früchte vorherrschend süß und sehr saftig, außerdem renettenartig gewürzt, guter Tafelapfel
<b>Pommerscher Krummstiel</b>	Winterapfel groß, rundlich; grünlich gelbe, später intensiv gelbe Schale ; Fruchtfleisch gelblichweiß, saftig; ein wenig Würze
<b>Claudius Herbstapfel</b>	Geschmack: alantartig, würzig, wenig, nicht so saftig
<b>Baumanns Renette</b>	festes Fruchtfleisch (weiß bis grünlich), süßlich, einigermäßen aromatisch, typ. Weihnachtsapfel
<b>Goldparmäne</b>	mittelgroße Früchte; glatte, glänzende, grünlichgelbe Schale, kräftiger Geruch; Fruchtfleisch gelblichweiß, saftig und edel gewürzt

<b>Roter Boskoop</b>	Früchte sehr groß, netzartig berostet, festes Fruchtfleisch: gelblichweiße Farbe; erfrischend süßsauer
<b>Wellant</b>	Fruchtschale: geflammt von hellrot bis dunkelrot Fruchtfleisch: gelbweiß bis grünweiß, knackig, saftig; Geschmack: intensiv, fruchtig, aromatisch süß-sauer
<b>Gravensteiner</b>	exzellenter Geschmack, robuster stark wachsender Baum, leicht schorfanfällig
<b>Mecklenburger Kantapfel</b>	groß, mittelfeinzellig, saftig, mildsauerlich, aromatisch, vor dem Aussterben bedroht
<b>Alkmene</b>	Früchte klein bis mittelgroß, feinzelliges, mittelfestes Fleisch säuerlich, mit edlem Aroma
<b>Welschissener</b>	mittelgroß, rund, kegelförmig, Schale glatt und leicht stumpf, Tafel- und Wirtschaftsapfel mäßig saftig bis trocken, weinsäuerlich, wenig gewürzt
<b>Riesen Boiken</b>	saftig, reinweiß, angenehm schwach süßsäuerlich, kaum aromatisch
<b>Ananas Renette</b>	kleinere Frucht, glatte, grünlichgelbe bis gelbe Farbe; saftiges, festes Fleisch, renettenartig gewürzt, weinsäuerlicher Geschmack, wenig Zuckergehalt
<b>Pommerscher Schneeapfel</b>	große bis sehr große Frucht, weißes Fruchtfleisch, im Geschmack angenehm, süßsäuerlich ausgeglichen und wenig
<b>Mecklenburger Prinz</b>	starkwachsend, schwieriger Kronenaufbau
<b>Ingrid Marie</b>	Früchte gelb-grün, sonnenseits dunkel-rot; Fruchtfleisch grünlichgelb feinsäuerlich begehrtter Weihnachtsapfel
<b>Hartmann Herbstapfel</b>	-
<b>gelber Richard</b>	sehr guter Tafelapfel, zunächst grünlichweiße Schale, später zitronengelb, reife Früchte rötlich gestrichelt; zartes, saftiges Fruchtfleisch
<b>roter Jungfernapfel</b>	kleiner, eiförmiger, roter, schwach gewürzter, saftiger Tafelapfel
<b>Topas</b>	mittelgroße Früchte, saftig, orangerote Schale fest aromatisch, süßsäuerlich
<b>Jonathan</b>	Früchte grüngelb, sonnenseits dunkel rot; Fruchtfleisch weiß-grün, fest mit säuerlichem, schwachen Aroma
<b>Kanada Renette</b>	sehr große Früchte, grünlichgelbe Schale
<b>Martens Sämling</b>	mittelgroß; grüngelb bis gelb, Fleisch weiß und gerötet; saftig, fein säuerlich und schwach aromatisch
<b>Grahams Jubiläumsapfel</b>	Herbstapfel, Schale gelbgrün bis hellgelb getönt, sonnenseits manchmal leicht gerötet; lockeres, hellgelbes Fruchtfleisch: schwaches Aroma mit feiner Säure und leichter Süße
<b>Ontario</b>	früher beliebter Winterapfel, ertragreich, frisch säuerliche Äpfel
<b>Seestermührer Zitronenapfel</b>	norddeutsche Regionalsorte, guter Küchen- und Mostapfel, Baum und Früchte wenig anfällig

**Nathusius Taubenapfel**ertragreich, Fruchtfleisch ist weich und saftig  
Bittermandelaroma, edelweinig GeschmackCharakteristika der Äpfel aus [www.baumschule-horstmann.de](http://www.baumschule-horstmann.de) und  
[www.garten-architektur.de](http://www.garten-architektur.de)

### 3.3.5 Schwarzkarottenextrakte

Die Schwarze Karotte (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens*) wird beispielsweise in der Türkei, Afghanistan, Indien und Ägypten angebaut und besitzt einen höheren Zuckergehalt als die Kulturmöhre (Kammerer et al., 2003). Aufgrund ihres hohen Anthocyangehalts ist diese Sorte stark bläulich gefärbt. Alle verwendeten Zubereitungen wurden vom Projektpartner *BioActive Food GmbH* zur Verfügung gestellt. Das für die Extrakte verwendete Schwarzkarottensaftkonzentrat wurde bei der Firma *Paradies Früchte* bezogen (400FE; Batch 10A012 ArtNr. 61841639H). Zum Vergleich der unterschiedlichen Extrakte (Herstellung durch *BioActive Food GmbH* nach Will et al., 2007) wurde Chlorogensäure als Marker quantifiziert. Das Anthocyanmuster wurde bereits in der Literatur beschrieben (Kammerer et al., 2003). Chlorogensäure, eine Esterverbindung aus Kaffee- und Chinasäure (Abbildung 10) soll unterschiedlichste biologische Aktivitäten aufweisen: antioxidativ, anti-inflammatorisch und auch antidiabetisch (dos Santos et al., 2006; Wei Ong et al., 2011).

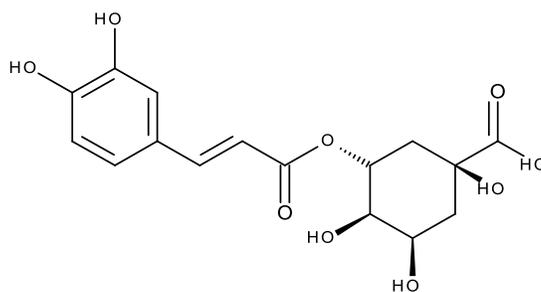


Abbildung 10: Struktur der Chlorogensäure

### 3.4 Bestimmung des Trockensubstanzgehalts

Der Trockensubstanzgehalt aller pflanzlichen Ausgangsmaterialien wurde mittels Differenzwägung vor und nach der Gefriertrocknung errechnet und in Prozent angegeben  $((\text{Trockenmasse}/\text{Feuchtmass}) \cdot 100)$ . Hierfür wurden bestimmte Mengen des Ausgangsmaterials eingewogen und in der Gefriertrocknung bis zur Massenkonstanz bei 25°C und einem Vakuum von 0,9 mBar getrocknet.

#### Geräte:

Gefriertrocknungsanlage: Alpha 1-4 LSC (Martin Christ GmbH, Osterode)

Vakuumpumpe: Chemistry hybrid pump,  $4 \times 10^{-4}$  mbar (Vaccubrand GmbH & Co KG, Wertheim)

### 3.5 Blanchierprozess

Blanchieren ist die Bezeichnung für das kurzzeitige Eintauchen von Lebensmitteln in kochendes Wasser. Dies wird häufig bei Gemüse und Pilzen zur Deaktivierung bestimmter Enzyme angewendet, umso unerwünschte Produktveränderungen zu verhindern (enzymatische Bräunung, Abbau von wichtigen Inhaltsstoffen). Durch das Blanchieren wird aus dem Gewebe Sauerstoff ausgetrieben und die Keimbelastung reduziert. Es genügt meist eine Behandlung des Ausgangsmaterials für 10 - 30 s. Anschließend empfiehlt es sich das Gemüse in Eiswasser abzuschrecken. Dadurch behält es Farbe, Geschmack und Struktur. Um den Verlust der Flavonoide beim Blanchieren zu testen, wurde selbst angebauter Grünkohl verwendet. Die Blätter des frisch geernteten Grünkohls wurden vom Spross abgetrennt, 30 s in einem Sieb mit kaltem Wasser gewaschen und in 1,5 L 98°C heißem Wasser für 1 bis 5 min blanchiert. Nach dem Blanchieren wurde der Grünkohl in Eiswasser getaucht und direkt nach kurzem Abtrocknen bei -20°C eingefroren. Als Vergleich wurden eine kalt gewaschene Grünkohl-Probe und eine unbehandelte Probe verwendet. Für die Analyse wurden alle Proben gefriergetrocknet und der Gesamtflavonoidgehalt (3.7.1) sowie die Gehalte an Quercetin und Kaempferol nach Hydrolyse mittels HPLC Analyse verglichen.

## 3.6 Extraktionen

### 3.6.1 Saftherstellung

Das Protokoll der Saftherstellung wurde vom Projektpartner *BioActive Food GmbH* übernommen. Eine definierte Menge tiefgefrorener Grünkohl wurde nach Zugabe von 1 g Ascorbinsäure pro kg Grünkohl im Käsekessel über Nacht aufgetaut. Nach Erwärmung des Kessels im Wasserbad auf 30°C wurden folgende Enzyme hinzugegeben: 1 mL Pektinase und 1,1 mL Cellulase pro kg Grünkohl. Nach 30 min bei 37 - 40°C wurde der Ansatz für 5 min püriert. Nach Einbau eines Rührwerks wurde anschließend wieder bei 37 - 40°C im Wasserbad für 2,5 h inkubiert. Nach ca. 1 h wurde nochmals für 5 min püriert. Die Maische wurde durch die „flotte Lotte“ passiert, danach durch ein Küchensieb filtriert und der erhaltene Trester durch ein Küchentuch ausgepresst. Der Trester wurde gewogen und eine definierte Menge des Tresters und des Vollsafte aliquotiert und für die Gesamtflavonoidbestimmung gefriergetrocknet. Der Vollsaft wurde zur Weiterverarbeitung 10 min bei 10800 g zentrifugiert (20°C) und durch ein Küchentuch filtriert. Eine bestimmte Menge vorbereiteter Saft (Filtrat) wurde aliquotiert und ebenfalls für die Gesamtflavonoidbestimmung gefriergetrocknet. Der Rückstand (Sediment) wurde gewogen, aliquotiert und der Rest verworfen. Nachdem der pH-Wert gemessen und auf pH 5 eingestellt wurde, wurde das Filtrat für die Anreicherung der Flavonoide mittels Adsorberharz verwendet.

#### Material:

Die Enzyme der Firma Erbslöh, Geisenheim waren kostenlose Muster mit freundlicher Empfehlung von Herrn German Hasselbeck:

Vegazym HC:

Cellulase aus *Trichoderma reesei*, C1-Cellulase mit Endocellulaseaktivität, Xylanaseaktivität, 1,4-Exoglucosidaseaktivität, Hemicellulaseaktivität

Vegazym P:

mazerierende Pektinase aus *Aspergillus niger*, Pektinesterase: Spaltung der Methylester bei pH 5-6, Esterase inaktiv, Endopolygalacturonase spaltet 1,4 glycosidische Bindung der Galacturonsäure, Pektinlyaseaktivität

#### Geräte:

Wasserbad/Käsekessel: Warmmaster Kochstar Universal 27 L mit Edelstahlbehälter-Einsatz 22 L mit Deckel (Rink GmbH, 88279 Amtzell)

Passiergerät „flotte Lotte“ (GEFU-Küchenboss GmbH, 59889 Eslohe)

Pürierstab: HR 1372/90 essential (Philips Electronics, N. V., NL-1096 Amsterdam)

Küchensieb (Fackelmann)

pH-Messgerät 761 Calimatic (Knick GmbH & Co KG, 14163 Berlin)

Zentrifuge: 6-16K Rotor 12500 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, 37520 Osterode)

### 3.6.2 Anreicherung der Flavonoide

Aus dem entstandenen Grünkohlsaft wurden die Polyphenole mit Hilfe eines Adsorberharzes angereichert (Amberlite™ FPX 66). Im Grunde handelte es sich um eine klassische Säulenchromatographie. Das verwendete Adsorberharz ist ein hochporöses Styrol-/Divinylbenzol-Copolymerisat, bei dem die unterschiedlich starken Wechselwirkungen (in 1. Linie van der Waals-Wechselwirkungen) der Polyphenole zum Harz in Abhängigkeit zur Polarität des verwendeten Lösungsmittels genutzt werden. Zur Vorquellung wurden 100 g Harz im Becherglas mit 99% Ethanol überschichtet. Nach Überführung in die Chromatographiesäule, wurde das Harz mit 2 L Aqua dem. gereinigt. Aus 500 mL Vollsaft aufbereitetes Versuchsmaterial wird in kleinen Portionen auf das Harzbett aufgegeben (Austropffrequenz: 2 Tropfen/s). Zur Abtrennung unerwünschter Substanzen wurde das Harz mit 1,2 L Aqua dem. mit erhöhter Austropffrequenz gewaschen. Dies diente zur Abtrennung von gut wasserlöslichen Begleitsubstanzen wie Mono- und Oligosacchariden, organischen Säuren und Salzen. Die Elution der Polyphenole erfolgte mit 600 mL Lösungsmittel bei wieder erniedrigter Austropffrequenz. (Standard: Ethanol 75%). Das erhaltene Eluat wurde am Rotationsverdampfer eingeeengt, mit einer definierten Menge Aqua bidest. aufgenommen und in 50 mL-Röhrchen überführt. Von dieser Menge wurden 2 mL für analytische Untersuchungen bei -20°C gelagert. Der Rest des Eluats wurde gefriergetrocknet, um den Gesamtflavonoidgehalt zu bestimmen.

#### **Material:**

Amberlite FPX 66, ROHM & HAAS, Frankfurt, Germany, Oberfläche:  $\geq 700 \text{ m}^2/\text{g}$ , Partikelgröße: 0,6 - 0,75 mm,

#### **Geräte:**

Chromatographiesäule, AD 60 mm, L 600 mm, PTFE Hahn, FP P00, Eydam, Kiel

Rotationsverdampfer:

Vaccubrand, Rotavapor R, IKA Labortechnik HB 4 basic (Heidolph Instruments GmbH, 93309 Kelheim)

Vaccubrand CVC 2000, PC 2001 vario; Heidolph Laborota 4000 efficient (Heidolph Instruments GmbH, 93309 Kelheim)

Vaccubrand CVC 3000, PC 3001 vario, Heidolph Laborota 4000 efficient (Heidolph Instruments GmbH, 93309 Kelheim)

### 3.6.3 Methanolische Extraktion

Die Vorschrift von *Edenharder et al. (2001)* für die Extraktion von Flavonoiden wurde in Anlehnung an *Olsen et al. (2009)* abgewandelt. Eine entsprechende Menge an getrocknetem Extrakt wurde in einen 100 mL Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 30 mL Methanol 70% versetzt. (Richtwert bei *Olsen et al. (2009)*: für 5 g frische Droge 15 mL Methanol 70%). Das Gemisch wurde für 2 h bei 40°C gerührt und bei 3900 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Messkolben überführt. Der Rückstand wurde nochmals mit 30 mL 70% Methanol versetzt, 2 h bei 40°C gerührt und zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Trockne einrotiert und in 2 mL 70% Methanol aufgenommen.

#### Geräte:

Magnetrührer mit integrierter Heizplatte von Ika Labortechnik mit digitalem Thermofühler

Zentrifuge: 3K30 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, 37520 Osterode)

Rotationsverdampfer: siehe 3.6.2

### 3.6.4 Vereinfachte methanolische Extraktion

Flavonoidglycoside werden oftmals mit Alkohol oder Alkohol-Wasser-Mischungen extrahiert. Für eine einfache Aufbereitung der Extrakte (Apfel, Schwarzkarotte etc.) wurde eine effiziente Methode entwickelt, Flavonoidglycoside oder Polyphenolsäuren möglichst simpel zu extrahieren. *Olsen et al. (2009)* konnten bereits zeigen, dass eine Ultraschallextraktion mit Methanol unabhängig von der Extraktionsdauer (5, 10, 15 und 60 min) eine gute Ausbeute der polyphenolischen Komponenten in Grünkohl erlaubte. Eigene Vortestungen ergaben, dass eine Ultraschallextraktion bei 30 min von 1 mg Flavonoid-angereicherten Eluaten in 1 mL 70% Methanol die höchsten Ausbeuten an gewünschten polyphenolischen Substanzen erzielten. Gefriergetrocknete Trester, Saftproben, Schalen oder Kerngehäuse unterschiedlicher Ausgangsmaterialien wurden mit 50 mg Trockensubstanz in 1 mL 70% Methanol aufbereitet. Die Proben wurden nach entsprechender Vorbereitung mittels HPLC vermessen.

#### Geräte:

Ultraschallbad: Bandelin sonorex (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany)

### 3.6.5 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehalts nach *Ph.Eur.* 7.0/2.08.14.00

Mit Hilfe der Bestimmung des Gerbstoffgehaltes nach *Ph.Eur.* konnte der Gesamtpolyphenolgehalt für unterschiedliche Ausgangsmaterialien bestimmt werden. Phenolische Substanzen geben in alkalischem Milieu mit dem Folin-Ciocalteus-Reagenz, einem Oxidationsgemisch aus Phosphorwolframsäure ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) und Phosphormolybdänsäure ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ), einen blau gefärbten Komplex. Der Mechanismus der Reaktion beruht auf der reduzierenden Wirkung der phenolischen OH-Gruppen. Dabei werden die Hydroxylgruppen zu Aldehydgruppen oxidiert und es kommt zur Bildung eines Komplexes unter Beteiligung der Polyphenole. Für die Bestimmung wurde eine bestimmte Menge an gefriergetrockneter pulverisierter Droge in einen 250 mL Rundkolben eingewogen. Das Pulver wurde mit 150 mL Aqua dem. versetzt und 30 min lang im Wasserbad erhitzt. Das Gemisch wurde anschließend unter fließendem Wasser gekühlt und quantitativ in einen 250 mL Messkolben überführt, wobei mit Aqua dem. nachgewaschen und zu 250 mL verdünnt wurde. Nach Absetzen der festen Bestandteile wurde die Flüssigkeit durch einen Papierfilter von 125 mm Durchmesser filtriert. Die ersten 50 mL des Filtrats wurden verworfen. Die Auswertung erfolgte anhand einer Eichkurve als Gesamt-Polyphenole in Bezug auf Gallussäure und (+)-Catechin als Referenzsubstanzen.

#### **Bestimmung der Gesamt-Polyphenole:**

5,0 mL Filtrat wurden mit Wasser zu 25,0 mL verdünnt. 2,0 mL dieser Lösung wurden mit 1,0 mL Folin-Ciocalteus-Reagenz gemischt, mit 10 mL Wasser vermennt und mit einer Lösung von Natriumcarbonat (290 g/L) zu 25,0 mL verdünnt. Nach 30 min wurde die Absorption bei 760 nm gegen Wasser als Kompensationsflüssigkeit gemessen.

#### **Referenzlösung:**

Es wurden je 2 Stammlösungen für (+)-Catechin und Gallussäure angesetzt (1 mg/mL in Aqua bidest.). Mit diesen Stammlösungen wurden die Kalibrierreihen mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 25, 50, 75, 100, 125  $\mu$ g ad 2,0 mL mit Aqua bidest. Diese

Lösungen wurden mit Natriumcarbonatlösung (290 g/L) zu 25,0 mL verdünnt und wie oben angegeben photometrisch vermessen.

**Material:**

Folin-Ciocalteus-Reagenz (Merck Chemicals, Darmstadt)

595 Rundfilter (Whatman Schleicher & Schuell)

**Geräte:**

Photometer: UV-1240 (Shimadzu Corp. JP 604-8511 Kyoto)

Wasserbad: Patz HWR

## 3.7 Hydrolysen

### 3.7.1 Bestimmung des Gesamtflavonoidgehalts nach *Ph.Eur. 7.0/1174*

Die Quantifizierung von Flavonoidglycosiden aus Naturstoffgemischen ist schwierig, da viele dieser Glycoside nicht käuflich als Referenzsubstanzen zur Verfügung stehen. Die Hydrolyse der Flavonoidglycoside in ihre Aglyka erweist sich so als praktische Methode ihrer quantitativen Bestimmung (*Hertog et al., 1992a*). Für Flavonoide sind im *Ph. Eur.*, *DAB* und *DAC* einheitliche Gehaltsbestimmungsmethoden vorgeschrieben. Die Methode nach *Ph. Eur. 7.0/1174* beinhaltet eine Hydrolyse der extrahierten Flavonoidglycoside mit Aceton/HCl und anschließendem Ausschütteln der Flavonoidaglyka mit Ethylacetat. Um eine Anthocyanidinbildung von Catechinderivaten aufgrund des Säurezusatzes zu verhindern, wird Methenamin als Reduktionsmittel zugesetzt. Die mögliche Bildung störender Cyanidinfarbstoffe wird dadurch reduziert. Nach Zusatz von  $\text{AlCl}_3$  wird der entstandene Komplex (Abbildung 11) photometrisch quantifiziert. Für die Quantifizierung wurde eine bestimmte Menge an gefriergetrockneter, pulverisierter Droge in einen 100 mL Rundkolben eingewogen. Das Pulver wurde mit 1 mL 0,5% wässriger Methenaminlösung, 20 mL Aceton und 2 mL 25% Salzsäure versetzt und 30 min unter Rückfluss erhitzt. Das Gemisch wurde durch einen Wattebausch in einen 100 mL Messkolben filtriert. Die verwendete Watte und der Rückstand im Rundkolben wurden zweimal 10 min mit je 20 mL Aceton unter Rückfluss erhitzt. Die abgekühlten Auszüge wurden durch einen Wattebausch und durch ein Filterpapier in den Messkolben filtriert und mit Aceton aufgefüllt. 20 mL vom Acetonextrakt wurden mit 20 mL Aqua dem. in einen Scheidetrichter überführt und einmal mit 15 mL,

dann dreimal mit 10 mL Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphasen wurden gesammelt, zweimal mit 50 mL Aqua dem. gereinigt und über wasserfreiem Natriumsulfat (10 g) in einen Messkolben (50 mL) filtriert. Der Extrakt wurde mit Ethylacetat aufgefüllt. Zu 10 mL des erhaltenen Ethylacetatextraktes wurde 1 mL 1%ige Aluminiumchlorid-Lösung gegeben und mit einer 5% Lösung (V/V) von Essigsäure 98% in Methanol auf 25 mL aufgefüllt. Nach 30 min konnte die Absorption dieser Lösung bei 425 nm gegen eine Mischung der Reagenzien ohne Aluminiumchloridreagenz photometrisch bestimmt werden. Der Prozentgehalt an Flavonoiden, berechnet als Hyperosid, errechnet sich nach folgender Formel:

$$\frac{A * 1,25}{m}$$

Die spezifische Absorption  $A \frac{1\%}{1 \text{ cm}}$  von Hyperosid wird mit 500 angenommen.

A: Absorption bei 425 nm; m: Trockenmasse der eingewogenen Droge

Der restliche Ethylacetatextrakt wurde mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt und in 2 mL Methanol gelöst. Die im Extrakt enthaltenen Aglyka wurden mittels HPLC (3.8.1.1) quantifiziert. Um die Genauigkeit der Methode zu bestimmen, wurde als innerer Standard Hyperosid zugegeben und die Wiederfindungsrate bestimmt.

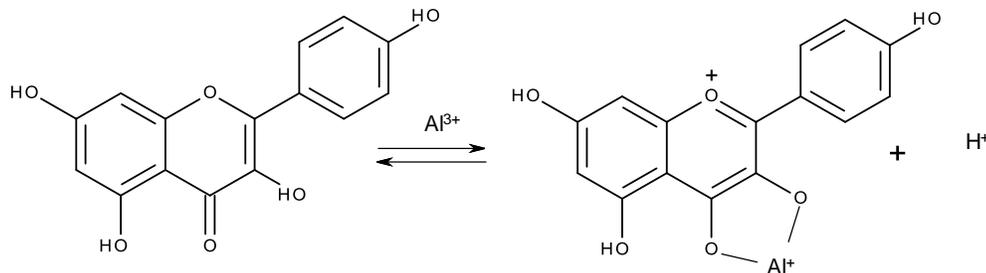


Abbildung 11: Reaktion eines Flavonols mit Aluminiumchlorid zum gelb gefärbten Chelatkomplex

#### Geräte:

Zerkleinerung des Drogenmaterials: Kaffeemühle Tefal prep'line und CLATronic; Reibschale

Photometer:

UV-1240 (Shimadzu Corp. JP 604-8511 Kyoto)

Cary 50 Scan UV-Visible Spectrophotometer (Cary WinUV)

Präzisionsküvetten aus optischem Glas, 10 mm, Hellma

Rotationsverdampfer: siehe 3.6.2

### 3.7.2 saure Hydrolyse

Es wurde eine Hydrolysemethode nach *Hertog et al. (1992a)* verwendet. Bereits 1965 charakterisierte *Harborne* Flavonoidglycoside mittels saurer Hydrolyse (2 M HCl, 100°C). Die Hydrolysedauer ist abhängig von der Glycosylierungsposition der Aglyka und auch vom Zuckerrest. Rhamnoside werden deutlich schneller (2-3 min) gespalten als Glucoside (10-30 min). Für die Spaltung der Glycoside nach *Hertog et al. (1992a)* wurden 0,5 g der gefriergetrockneten Probe in einen 250 mL Rundkolben eingewogen. Nach Zugabe von 40 mL 62,5% Methanol und 10 mL 6 M HCl (Extraktion und Hydrolyse erfolgt in die Mischung mit 1,2 M HCl in 50% Methanol) wurde der Extrakt für 2 h unter Rückfluss gekocht. Nach Abkühlen der Mischung wurde durch Watte filtriert und auf 100 mL mit 50% Methanol aufgefüllt. 20 mL des Extraktes wurden einrotiert und in 20 mL Aceton aufgenommen. Abweichend von *Hertog et al. (1992a)* erfolgte ein Ausschüttelprozess wie bei der Bestimmung des Gesamtflavonoidgehalts nach *Ph.Eur 7.0/1174*. 20 mL Acetonextrakt und 20 mL Aqua dem. wurden 4 x mit Ethylacetat ausgeschüttelt (15 mL, 3 x 10 mL). Danach wurde die Ethylacetatphase wiederum 1 x mit 50 mL Aqua dem. ausgeschüttelt. Der Extrakt wurde einrotiert, in 2 mL Methanol aufgenommen und die mit Ethylacetat ausgeschüttelten Flavonoidaglyka per HPLC (3.8.1.1) quantifiziert.

## 3.8 Analytische Methoden

### 3.8.1 High performance liquid chromatography (HPLC)

#### 3.8.1.1 HPLC Analytik

Die HPLC (Hochleistungs-Flüssigchromatographie) stellt eine der wichtigsten Methoden zur Charakterisierung von polyphenolischen Substanzen dar. Substanzgemische können ergänzend durch die Massenspektrometrie (LC-MS) noch detaillierter beschrieben und charakterisiert werden. Oft stehen Referenzsubstanzen zum Vergleich nicht zur Verfügung. Mittels MS können Molekülmassen mit Hilfe von unterschiedlichsten Detektionsmethoden identifiziert werden. Zur Identifizierung und Quantifizierung polyphenolischer Substanzen wurde eine HPLC-Methode etabliert. Erste Parameter für die chromatographischen

Grundbedingungen lieferte das Protokoll einer Auftragsanalyse bei der Firma *Phytos GmbH & Co KG* (Ulm). Die Bestimmung von Flavonoidglycosiden und Flavonoidaglyka nach saurer Hydrolyse unterschiedlichster Ausgangsmaterialien wurde mit Hilfe einer eigens für das Projekt angeschafften Waters HPLC Anlage mit Photodiodenarray-Detektor (DAD) durchgeführt. Gute Trennungen wurden innerhalb von 60 min erhalten unter Verwendung einer Reversed-Phase-Säule und eines Fließmittelgradienten (Aqua bidest./Acetonitril mit 0,01% TFA). Besonders schwer zu trennende Flavonoidglycoside, z.B. -galactoside und -glucoside können mit einem Wasser/Acetonitril Gradienten selektiver aufgetrennt werden (*Heigl, 2003*). *Wittig (2001)* verglich für eine Flavonoidbestimmung in unterschiedlichen Extrakten Wasser/Methanol- und Wasser/Acetonitril-Gradienten, wobei keine entscheidenden Unterschiede in Trennkraft und Peakform erkannt wurden. Die Wasserphase wurde mit unterschiedlichen Säuren auf pH 2 eingestellt, um das Protonierungsgleichgewicht der phenolischen Substanzen möglichst vollständig in die nicht dissoziierte Form zu drängen, wobei sich Peakform, Peaktrennung und -symmetrie nicht unterschieden. In eigenen Analysen wurde Trifluoressigsäure als Fließmittelzusatz verwendet. Die Identifizierung erfolgte über Co-Chromatographie von Referenzsubstanzen und Vergleich von UV-Spektren. Mit Hilfe von über 30 Referenzsubstanzen konnte eine Spektrenbibliothek angelegt werden. Die Quantifizierung spezifischer Inhaltsstoffe wurde mittels Kalibrierreihen bei entsprechenden Wellenlängen durchgeführt. Die Kalibrierreihen wurden aus einer Stammlösung (1 mg/mL) hergestellt und in mindestens 5 der folgenden Konzentrationen vermessen: 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 µg/mL.

### **Probenaufbereitung:**

#### *Pflanzenextrakte:*

Vor der analytischen Messung wurden alle Proben zentrifugiert (20200 g, 10 min, 25°C) und jeweils 2 x vermessen.

#### *Inkubationslösungen aus den ‚everted gut sac‘ Versuchen:*

Die Proben der Inkubationslösungen wurden bei 1800 g für 10 min zentrifugiert. Die serosalen Fluids (200-300 µL) aus diesen Inkubationsversuchen wurden mit 300 µL

Methanol 100% versetzt und bei -70°C 30 min gelagert um die Proteine auszufällen. Nach Zentrifugation bei 20200 g wurden die Überstände abgenommen und bis zur Trockne mittels einer Vakuumzentrifuge eingengt. Nach Zugabe von 250 µL Methanol 70% und lösen der Bestandteile wurde wieder bei 20200 g 10 min zentrifugiert. Für eine bessere Detektion der zu quantifizierenden Flavonoide wurden je Probe 20 µL injiziert.

### HPLC Bedingungen

Flussrate:	1 mL/min
Eluent A:	Aqua bidest, 0,01 % TFA / pH-Wert: 2,9
Eluent B:	Acetonitril, 0,01 % TFA
Detektionswellenlänge:	220 - 400 nm
Säulentemperatur:	30°C
Injektionsvolumen:	10-20 µL
Probenlauf:	60 min

### Gradientenverlauf:

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
10	100	0
40	50	50
50	0	100
51	100	0
60	100	0

### Geräte

HPLC Anlage:

HPLC Pumpe Waters e2695 Separation Module, Alliance (Waters Division, MA-01757 Milford, USA)

PDA Detektor Waters 2998 (Waters Division, MA-01757 Milford, USA)

Software Empower II

Trennsäule: Aqua 5 µm, C18, 125 Å, 250 x 4,6 mm, (Phenomenex Inc. CA 90504 Torrance, USA)

Vorsäule: security guard cartridge (AQ C18 4 x 3,0 mm), (Phenomenex Inc. CA 90504 Torrance, USA)

Zentrifugen:

Mikro 22 R (Hettich Industrietechnik GmbH, 97440 Werneck-Zeuzleben)

Megafuge 3.0 R (Heraeus Sepatech, Germany)

Vakuumzentrifuge: Heraeus Instrument-VR-1/120/240, Heto Cooling Trap – CT110, Vakuumpumpe Greifenberger-Vacuumbrand-MD4C

Vortex-Gerät: Genie 2 (Scientific Industries, NY-11716 Bohemia, USA)

### 3.8.1.2 HPLC/ESI/MS<sup>2</sup> Analytik

*Die LC-MS Analysen verschiedenster Probenaufbereitungen fanden in Zusammenarbeit mit der Abteilung Pharmazeutische Chemie der CAU Kiel statt. Durchgeführt wurden die Messungen von Dr. Ullrich Girreser und Sven Wichmann.*

Durch die Kopplung von flüssigkeitschromatographischen Systemen mit hochsensitiven Detektoren wie einem Massenspektrometer unter Verwendung von Elektro-Spray-Ionisation (ESI) und ‚Iontraps‘ (MS/MS) können Molekülmassen komplexer Strukturen in Naturstoffgemischen aufgeklärt werden (Olsen et al., 2009; Schmidt et al., 2010). Die HPLC Methode zur Identifizierung und Quantifizierung von Flavonoiden und Polyphenolsäuren wurde für die genaue Identifizierung von Flavonoidglycosiden mittels Massenspektrometrie mit unterschiedlichen Ionisierungstechniken etwas abgewandelt. Bei der Elektro-Spray-Ionisierung handelt es sich um eine sanfte Methode der Ionenerzeugung, die es in Kombination mit einer Iontrap ermöglicht, Fragmente der intensivsten Signale nochmals zu ionisieren, so dass kleinere spezifische Fragmente entstehen und das Molekül bis zur Grundstruktur des Aglykons aufgeklärt werden kann (MS<sup>2</sup>). Das Prinzip der Ionenverdampfung besteht darin, dass Nebeltröpfchen, die geladene Teilchen (+ oder -) im Überschuss enthalten, neutrale Lösungsmittelmoleküle durch Verdampfung verlieren. Bei der Elektro-Spray-Ionisation wird die Tröpfchenbildung durch ein starkes elektrisches Feld bewirkt. Ein neutrales Trägergas wie Stickstoff wird benutzt, um die Vernebelung der Lösung und die Verdampfung des Lösungsmittels zu unterstützen. Durch Anlegen einer hohen Spannung am Ende der Sprühkapillare entstehen hochgeladene Tröpfchen. Dieses Verfahren ist sehr schonend für das Analytmolekül und führt kaum zu Fragmentationen. Typischerweise werden Quasimolekül-Ionen detektiert ( $[M+H]^+$  bei positiver Spannung;  $[M-H]^-$  bei negativer Spannung). Ein charakteristisches Phänomen bei der ESI ist die Bildung von Addukt-Ionen mit Bestandteilen des Eluenten oder Puffers ( $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+Cl]^-$ ). Diese Adduktbildung ist ebenfalls mit Bestandteilen der Probenmatrix möglich. Im Iontrap-Massenspektrometer erfolgen Ionisation, Ionentrennung und Ionendetektion diskontinuierlich nacheinander in der gleichen Kammer. Die gebildeten Ionen befinden sich innerhalb einer Ringelektrode, an der eine variable Hochfrequenzspannung anliegt. Bei

niedriger Hochfrequenzspannung kreisen zunächst leichte Ionen (mit niedrigen  $m/z$  Wert) innerhalb des Ringes auf einer stabilen Bahn (Lissajous Bahn, Ellipse). Wird die Spannung erhöht, so fliegen diese Ionen nach außen, ihre Bahn wird destabilisiert. Teilweise gelangen sie durch eine Öffnung in der Abschirmung an den Empfänger (Multiplier). Bei kontinuierlicher Erhöhung der Hochfrequenzspannung können Ionen aller Massen nacheinander registriert werden. Um Fragmentierungen zu studieren oder auch um die Selektivität und Sensitivität einer Quantifizierungsmethode entscheidend zu verbessern, koppelt man entweder mehrere Analysatoren hintereinander oder arbeitet mit Iontraps. Zwischen zwei Analysatoren wird eine sogenannte Kollisionszelle eingebaut um den Ionen durch Stöße mit einem Inertgas (Helium) Energie zuzuführen. Daraufhin zerfallen die Ionen sehr spezifisch zu anderen (leichteren) Ionen. Das kann mit geeigneten Geräten beliebig oft hintereinander durchgeführt werden ( $MS^n$ ). Durch Anwendung einer Elektro-Spray-Ionisierung im negativen Modus [ESI(-)] musste Trifluoressigsäure (0,01% im HPLC Fließmittel) durch 0,1%ige Essigsäure ersetzt werden, da TFA die Messungen im negativen Modus massiv stört. Für eine gute Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit erfolgte die Auftrennung wie unter 3.8.1.1 (Aqua bidest./Acetonitril mit je 0,1%  $CH_3COOH$ ). Die Detektion der Signale wurde in einem Massenscan von 50–1600  $m/z$  durchgeführt.

### **MS Bedingungen**

Ionisierungsmodus:	ESI (-) und ESI (+), MS/MS
Temperatur:	350 °C
Vernebelungsdruck:	40 PSI
Flussrate Gas:	10 mL/min
Kollisionsgas:	Helium
Hochfrequenzspannung:	3,5 kV

### **Geräte:**

Massenspektrometer: Bruker Esquire LC

HPLC Anlage: Agilent 1100 binary pump, Agilent 1100 UV-Detektor

### 3.8.1.3 Semi-präparative HPLC Analytik

Für die Fraktionierung eines ausgewählten, Flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes wurde eine semi-präparative HPLC-Methode etabliert. Für diese Methode wurde eine HPLC Pumpe von Waters inklusive Waters Autosampler, PDA-Detektor in Kombination mit einem analogen Fraktionssammler eingesetzt. Zur Gewinnung der Fraktionen wurde eine Phenomenex Säule und ein Fließmittelgradient (Aqua bidest./Methanol) mit einer Flussrate von 5 mL/min verwendet. Die Umstellung von Acetonitril auf Methanol sollten Kosten und Toxizität gering halten. Ein Lauf von 55 min trennte dabei 200 µL eines Flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes (1 g Extrakt in 10 mL Aqua bidest.) auf, wobei die Fraktionen durch 10-maliges Wiederholen an 3 Tagen aufkonzentriert wurden. So konnte genügend Trockenmaterial für weitere analytische und inhibitorische Messungen gesammelt werden. Es wurde nach 4 min (11 Fraktionen) bzw. nach 2 min (20 Fraktionen) fraktioniert, um eine möglichst kleine Signalanzahl und eine gute Auftrennung zu erhalten. Die Charakterisierung der Fraktionen erfolgte über HPLC und HPLC/ESI(-)-MS<sup>2</sup> Messungen. Die Flavonoidpeaks wurden als Rutinäquivalente bestimmt, um die inhibitorische Aktivität am SGLT1 besser beurteilen und untereinander vergleichen zu können.

#### **HPLC Bedingungen**

Flussrate:	4 mL/min
Eluent A:	Aqua bidest.
Eluent B:	Methanol
Detektionswellenlänge:	220 – 400 nm
Säulentemperatur:	30 °C
Injektionsvolumen:	200 µL
Probenlauf:	55 min
Fraktionssammlung:	alle 2/4 min

**Gradientenverlauf:**

Zeit (min)	A (%)	B (%)
0	80	20
10	70	30
25	40	60
40	0	100
45	80	20
55	80	20

**Geräte:**

HPLC Pumpe Waters 600 (Waters Division, MA-01757 Milford, USA)

Waters Autosampler 717 plus (Waters Division, MA-01757 Milford, USA)

PDA Detektor Waters 2996 (Waters Division, MA-01757 Milford, USA)

Software Empower II

Fraktionssammler: Pharmacia LKB Frak-200

Trennsäule: Aqua 5 µm, C18, 125 Å, 250 x 10 mm, (Phenomenex Inc. CA 90504 Torrance, USA)

Vorsäule: AJ07512 security guard semi prep cartridge (AQ C18 10 x 10 mm), (Phenomenex Inc. CA 90504 Torrance, USA)

### 3.8.2 Gaschromatographie - Acetylierung

Zur Identifizierung der in einem hydrolysierten Grünkohlextrakt (Hydrolyse nach 3.7.1) enthaltenen Zuckern wurde eine Reduktion und Acetylierung nach *Blakeney et al. (1983)* durchgeführt. Nicht flüchtige Zucker werden dabei für die gaschromatographische Untersuchung in flüchtige Alditolacetate umgewandelt. Als interner Standard wurde 0,5 mg *myo*-Inositol verwendet. Die Zucker des Extraktes nach Hydrolyse der Flavonoide befinden sich nach dem Ausschüttelprozess in der Wasserphase (siehe 3.7.1). Die aus 0,1 g Extrakt gewonnene Wasserphase wurde einrotiert und nach Zugabe von 200 µL 1 M wässriger Ammoniak-Lösung und 1 mL Natriumborhydrid in Dimethylsulfoxid reduziert. Monosaccharide werden hierbei zu Alditolen umgewandelt. Nach 90 min wurde die Reaktion mit 100 µL konzentrierter Essigsäure abgestoppt. Als Katalysator für die Acetylierung wurde 200 µL Methylimidazol und als Acetylierungsreagenz 2,0 mL Acetanhydrid (getrocknet) zugegeben, geschüttelt, für 20 min bei Raumtemperatur (RT) stengelassen und durch Zugabe von 10 mL Aqua bidest. die Reaktion gestoppt. Die entstandenen Alditolacetate konnten nach Ansäuerung mit 1 mL 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit 1 mL Dichlormethan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ausgeschüttelt werden. 1 µL dieser Lösung wurde für die gaschromatographische Messung verwendet. Die detektierten Zucker wurden mittels Co-

chromatographie von Monosaccharidstandards identifiziert und in Bezug auf die Peakfläche von Inositol quantifiziert. Hierbei wurden Korrekturfaktoren berücksichtigt, da der Flammenionisationsdetektor unterschiedlich stark auf die Alditolacetate anspricht.

### **GC Bedingungen**

Flussrate: 1 mL/min  
Säule: WCOT-Kapillarsäule  
Trägergas: Helium  
Temperaturprogr.: 230°C isotherm, Injekt. 250°C u. Detekt. 240°C

#### **Material:**

Methylimidazol (Merck Chemicals, Darmstadt)

Natriumborhydrid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Acetanhydrid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

#### **Geräte:**

Gaschromatograph: HP 6890 Plus Series, Firma Hewlett Packard, USA, Detektor: FID

Säule: WCOT-Kapillarsäule (Fused Silica), Permabond OV-225-0.25; L 25 m, ID 0.25 mm, (Macherey & Nagel, Düren)

## **3.9 Methodenoptimierung**

### **3.9.1 Optimierung der Flavonoidausbeute bei der Saftherstellung**

#### **3.9.1.1 Saftherstellung mittels einer Tinkturenpresse**

Die Saftherstellung erfolgte wie unter Punkt 3.6.1 beschrieben, wobei für die Gewinnung des Vollsaftees nicht die „flotte Lotte“ sondern eine Tinkturenpresse verwendet wurde. Um die Flavonoidausbeute zu bestimmen, wurde der Gesamtflavonoidgehalt nach 3.7.1 bestimmt.

#### **Geräte**

Tinkturenpresse Hafico (Tinkturenpressen Schwanke, Germany)

### 3.9.1.2 Saftherstellung unter Zusatz von Ethanol

Die Saftherstellung wurde wie unter 3.6.1 beschrieben durchgeführt. Es folgte die Extraktion mit Ethanol, so dass eine Endkonzentration von 25% erreicht wurde. Es wurde nochmals für 5 min püriert und 2,5 h unter Einsatz des Rührwerks inkubiert. Nach ca. 1 h wurde nochmals 5 min püriert. Die Aufbereitung des ethanolschen Saftes wurde wie unter 3.6.1 beschrieben durchgeführt. Nachdem der Ethanolgehalt des Filtrats mit Aqua bidest. auf 15% Ethanol verdünnt wurde und der pH-Wert auf 5 eingestellt worden war, konnte der Saft auf das vorbereitete Adsorberharz aufgetragen werden.

**Geräte:**

Siehe 3.6.1

### 3.9.1.3 Saftherstellung unter Zusatz von Detergentien

Die Saftherstellung erfolgte wie unter Punkt 3.6.1 dargestellt. Nach 2,5 h Inkubation wurde die Maische in 4 x 100 mL aliquotiert. Die Portionen wurden mit 0,5 oder 5,0% Sojalecithin oder Triton-X-100 vermischt und für 30 min weiter gerührt (Heizplatte 40°C). Zum Schluss wurden die Ansätze durch die „flotte Lotte“ gepresst und die Trester durch ein Küchentuch ausgewrungen. Die Säfte wurden nochmals durch ein Küchensieb filtriert, das Volumen gemessen und für die Bestimmung des Gesamtflavonidgehalts nach 3.7.1 gefriergetrocknet.

**Geräte:**

Siehe 3.6.1

Heiz-/Magnetplatte IKAMAG RH (IKA Labortechnik, Staufen)

### 3.9.1.4 Variation des pH-Wertes des Saftes

Die Saftzubereitung erfolgte wie in Punkt 3.6.1. Vor der Aufgabe des Filtrats auf das vorbereitete Adsorberharz wurde der pH-Wert mit 1 M Natronlauge auf pH 5, 6, 7 und 8 eingestellt. Danach wurden die Filtrate wie unter Punkt 3.6.2 weiter aufgearbeitet.

**Geräte:**

Siehe 3.6.1 und 3.6.2

## 3.9.2 Optimierung der Anreicherung der Flavonoide

### 3.9.2.1 Elution der Flavonoide

Die Anreicherung der Flavonoide sollte aus toxikologischer Sicht im Hinblick auf die Entwicklung eines Nahrungs- oder Nahrungsergänzungsmittels mit Ethanol durchgeführt werden. Für die Elution wurden die gleichen Mengen von verschiedenen Ethanol-Wasser-Gemischen verwendet: 25, 50, 75 und 99% Ethanol.

### 3.9.2.2 Kapazitätstest unterschiedlicher Harze

#### 3.9.2.2.1 Variation der Elutionsmittelmenge im Batchverfahren

Je 10 g der unterschiedlichen Harze wurden in ein Becherglas eingewogen, mit 99% Ethanol überschichtet und für 30 min quellen gelassen. Die Harze wurden mittels Büchnertrichter und Nutsche durch einen Cellulosefilter filtriert, danach folgte eine Waschung mit 4 x 40 mL Aqua dem. Das Harz wurde ins Becherglas überführt und mit 200 mL eines Grünkohlfiltrats gleicher Charge überschichtet und je 30 min geschüttelt. Nach erfolgter Filtration wurde das Harz 3 x mit 70 mL Aqua dem. gewaschen. Pro Ansatz wurde mit einer anderen Menge an Ethanol 75% eluiert: 20, 40, 50, 60, 80, 100 mL. Nach 3 min auf dem Schüttler wurde das Eluat durch Filtration aufgefangen, einrotiert, 1 mL für analytische Zwecke aliquotiert und das restliche Eluat gefriergetrocknet. So wurden die Aglyka Quercetin und Kaempferol als repräsentative Marker-Substanzen in den Eluaten nach Hydrolyse (3.7.2) per HPLC (3.8.1.1) bestimmt

#### **Geräte:**

Schüttler: Edmund Bühler Stufe 4 – 4,5 von 8 Stufen

#### **Material:**

Die Adsorberharze wurden von Herrn Rudolf Weinand von der Firma CHEMRA GmbH zur Verfügung gestellt. Es sollte eine Alternative zum teuren Amberlite Produkt gefunden werden, wobei die Beschreibung dieser Testharze leider eher dürftig war. Nach Aussage von Herrn Weinand sollte ADS 200 dem Amberlite Harz am Ähnlichsten sein.

TreversORB (CHEMRA GmbH, Trier)

ADS500: aromatische Struktur, speziell für Farbstoffe, Pflanzenextrakte und Polyphenole 1000 m<sup>2</sup>/g, Partikelgröße: 0,25-0,7 mm. Dieses Harz wurde vor allem auf Elution ausgelegt, d.h. es soll die adsorbierten

Substanzen besser abgeben und Lösungsmittel einsparen helfen. Es hat eine große Oberfläche und ein großes Porenvolumen.

ADS100: kleine Poren; Styrol

ADS200: große Poren; Styrol

ADS300: Styrene/DVB

ADS3000: Styrene/DVB

### 3.9.2.2.2 Batchverfahren

Die Vorbereitung der Adsorberharze erfolgte wie unter Punkt 3.9.2.2.1 beschrieben. Die Harze wurden ins Becherglas überführt und mit je 100, 150, 200, 300, und 400 mL des Grünkohlfiltrats einer Charge überschichtet und 30 min geschüttelt. Nach Filtration, wurden die Harze wieder 4 x mit 50 mL Aqua dem. gewaschen und zurück ins Becherglas überführt. Nach Zugabe von 60 mL 75% Ethanol und 3 min Schütteln wurde nach Filtration das Eluat aufgefangen, einrotiert, für die analytischen Messungen aliquotiert und der Rest gefriergetrocknet. Dieser im Kleinmaßstab durchgeführte Versuch ließ eine Bestimmung der Gesamtflavonoidgehalte nicht zu, da die Eluatausbeuten zu gering waren. Die Gehaltsbestimmung erfolgte wie in Punkt 3.9.2.2.1 beschrieben.

#### Geräte:

Siehe 3.9.2.2.1

### 3.9.2.2.3 Säulenverfahren

Je 10 g der unterschiedlichen Harze wurden in Bechergläser eingewogen, das Volumen des Harzes bestimmt, mit 99% Ethanol überschichtet und für 30 min quellen gelassen. Die Chromatographiesäulen wurden mit etwas Aqua dem. befüllt und das Harz in die Säule gespült. Zunächst wurden die Harze mit 3 x 40 mL Ethanol 99% und danach mit 3 x 40 mL Aqua dem. gespült, um diese von evtl. Verunreinigungen zu befreien. Danach wurde der Grünkohlensaft von je 150, 175, 200, 225, 250 und 300 mL dazugeben und mit einer Tropfgeschwindigkeit von 2 Bettvolumen pro Stunde abgelassen. Nach Filtrataufgabe einer Charge wurde das Harz mit 3 x 70 mL Aqua dem. gewaschen und die Flavonoide mit der jeweiligen errechneten Tropfgeschwindigkeit mit 60 mL 75% Ethanol eluiert. Das Eluat wurde einrotiert, 1 mL für analytische Zwecke aliquotiert und der Rest gefriergetrocknet. Die Gehaltsbestimmung erfolgte wie in Punkt 3.9.2.2.1 erwähnt.

**Geräte:**

Chromatographiesäulen Polzin NS 12,5, Innendurchmesser 1,5 cm

### 3.9.2.3 Variation der Hydrolysezeit

Die Gesamtflavonoidbestimmung nach *Ph.Eur.* unter Punkt 3.7.1 gibt eine Hydrolysezeit von 30 min vor, unter milden Bedingungen mit 0,7 M Salzsäure als Endkonzentration im Extraktgemisch. Unter Punkt 3.7.2 wird die Hydrolyse nach *Hertog et al. (1992a)* beschrieben, in der 2 h mit 1,2 M Salzsäure hydrolysiert wird (Endkonz.). Die Hydrolysezeit der Gesamtflavonoidbestimmung wurde mit 30, 60 und 90 min durchgeführt und der resultierende Flavonoidgehalt photometrisch wie unter Punkt 3.7.1 verglichen.

## 3.10 Inhibitionsmessungen am rabbit SGLT1

*Die Entwicklung eines screening-tauglichen SGLT1-Assays übernahm das Team der Firma IonGate Biosciences GmbH, Frankfurt/Main (Projektpartner). Bei der SURFE<sup>2</sup>R-Technologie handelt es sich um eine zellfreie elektrophysiologische Messmethode. Projektpartner der Abteilung Biophysik, Max Planck Institut, Frankfurt/Main screenen mit diesem Assay über 30 Referenzsubstanzen sowie ausgewählte, in Kiel hergestellte Extrakte. Nach Ausscheiden beider Partner wurden einige Versuche zur Wirkung von Kombinationen aus Flavonoiden in Kiel getestet. Die Durchführung wurde nach einem vorgegebenen Protokoll von IonGate weitgehend übernommen. Für bestimmte Messungen wurde die Messsequenz etwas modifiziert.*

### 3.10.1 Der SURFE<sup>2</sup>R: Funktionsweise und Puffer

#### **SURFE<sup>2</sup>R**

Unter einer elektrophysiologischen Messmethode versteht man in der Biologie die elektrische Messung von Membranpotentialen. Die lipophile Zellmembran ist für Ionen undurchlässig und stellt die Grundlage für die unterschiedliche Ionenzusammensetzung der Extrazellulärflüssigkeit im Vergleich zur Intrazellulärflüssigkeit dar. Diese verschiedenen Ionenverhältnisse rufen ein Membranpotential hervor, das als Triebkraft für den

ionenselektiven Transport durch Ionenkanäle bzw. Ionentransporter dienen kann. Die dadurch entstehende Leitfähigkeit lässt sich messen. Der Natrium-abhängige Glucose-Cotransporter 1 (SGLT1) ist für die Glucoseaufnahme im Dünndarm verantwortlich und transportiert pro Glucosemolekül zwei Natriumionen. So kann der Natriumtransport, zur Beurteilung des Glucosetransports genutzt werden. Für eine zellfreie elektrophysiologische Messmethode hat die Firma *IonGate* das Gerät Surface-Electrogenic-Event-Reader One (SURFE<sup>2</sup>R) entwickelt, welches am pharmazeutischen Institut zur Verfügung stand (Abbildung 12).

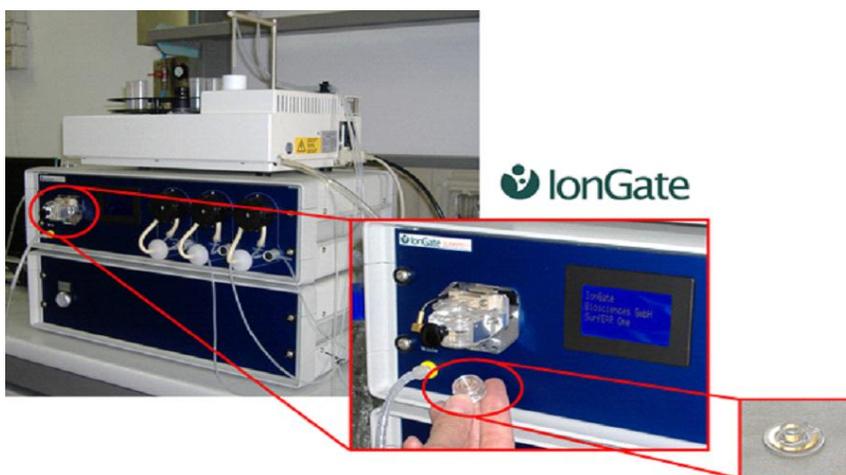


Abbildung 12: Surface-Electrogenic-Event-Reader One, (*IonGate Biosciences GmbH*)

Der SURFE<sup>2</sup>R wird zur präzisen und direkten Messung der Transporteraktivität verwendet und basiert auf mechanisch sehr stabilen, festkörperunterstützten Hybridmembranen. Auf der Goldoberfläche eines Sensors beschichtet mit Hybridmembranen werden Transporter enthaltene Membranfragmente bzw. Liposomen aufgebracht. Für die Messungen am SGLT1 wurden Chinese-Hamster-Ovary-Membranfragmente verwendet, die den *rabbit* SGLT1 (*rbSGLT*) exprimierten. Der Vorteil der Methode liegt in der Anreicherung zellfreier Membranen durch einen einfachen Zentrifugationsschritt. Dadurch können die Membranfragmente über Wochen stabil gelagert werden und der ständige Betrieb eines Zellkulturlabors ist nicht notwendig.

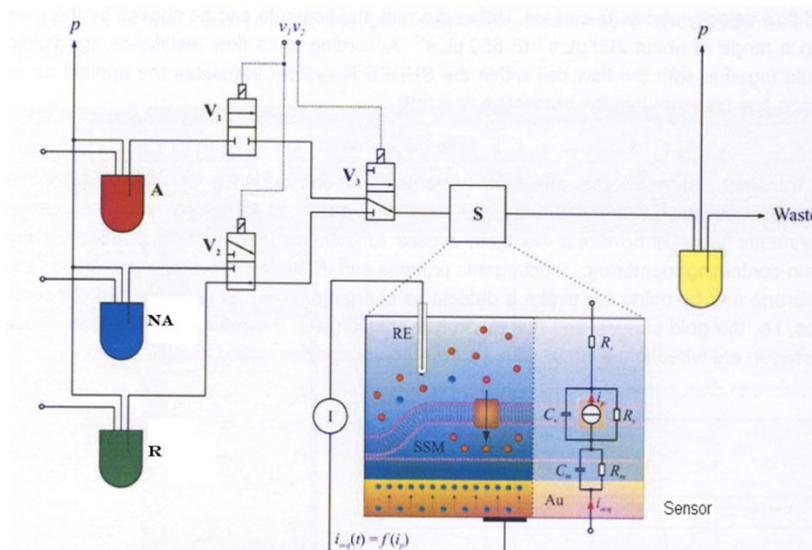


Abbildung 13: Schema des inneren SURFE<sup>2</sup>R-Systems, (IonGate Biosciences GmbH)

Abbildung 13 stellt das innere System des Gerätes schematisch dar. Im SURFE<sup>2</sup>R stehen drei verschließbare Behälter zur Verfügung, die mit definiertem Stickstoff-Überdruck betrieben werden und in denen sich Puffer befinden. Die Puffer sind mit A, NA, und R bezeichnet, wobei A für aktivierender Puffer, NA für nicht-aktivierenden Puffer und R für Ruhepuffer steht. Über elektromagnetisch ansteuerbare Ventile kann jeder Behälter über ein Schlauchsystem mit dem Sensor S verbunden werden. Der aktivierende Puffer A enthält das Substrat für den zu untersuchenden Transporter, so dass ein elektrogener Ionentransportvorgang induziert wird, wenn diese Pufferlösung den Sensor erreicht. In diesem Fall wird das spezifische SGLT1 Substrat  $\alpha$ -Methyl-D-glucopyranosid ( $\alpha$ -MDG) verwendet, welches von Mikroorganismen nicht verstoffwechselt werden kann und so eine Verkeimung des Geräts verhindert wird. Die Messwertaufnahme erfolgt mit einem Amperemeter, das den Stromfluss zwischen Goldelektrode und Puffer registriert und über einen Analog-Digital-Wandler mit dem Computer verbunden ist. Auf dem Sensor wird das fluidische System (A, NA, R) eingebracht. Die Membranen liegen sehr dicht beieinander und sind kapazitiv an die festkörperunterstützte Membran gekoppelt, weshalb eine Ladungsbewegung über die Membran elektrostatisch auf die freien Elektronen im Metall (Gold) Einfluss hat. Durch diese Ladungstrennung kommt eine entgegengesetzte Oberflächenladung in der Goldschicht zustande. Dadurch entsteht ein Strom, der sich als

transientes Signal detektieren lässt (Krause, 2007). Ein Sensor-Schema mit verschiedenen Schichten wird in Abbildung 14 dargestellt.

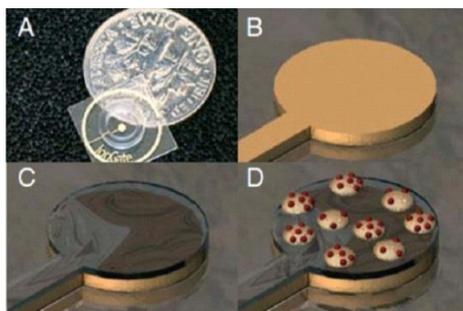


Abbildung 14: SURFE<sup>2</sup>R-Sensor (Geibel, 2006)

A: 3 mm Biosensor Chip ;B-D: Schema des Biosensors mit verschiedenen Schichten ; B: Gold-Oberfläche ; C: Schicht mit „chemischem Linker“ ; D: Adsorption der Fragmente an der Hybridmembran

Der Sensor besteht aus einem Biosensor-Chip mit einem Durchmesser von 3 mm, der der Goldoberfläche entspricht (Abbildung 14). Nach Beschichtung der Goldoberfläche können die Membranfragmente mit gewünschtem Transporter auf dieser stabilisiert werden.

### Puffer

#### Stocklösungen in dd Wasser:

1 M MgCl <sub>2</sub>	Frisch angesetzt:
1 M MgSO <sub>4</sub>	0,5 M Mannitol
1,4 M NaCl	0,5 M α-MDG
0,7 M K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,2 M DTT
0,3 M HEPES, mit NMG auf pH 7,0 eingestellt	

#### Messlösung

Puffer C (Ruhepuffer)		Puffer B (nicht-aktivierender Puffer)		Puffer A (aktivierender Puffer)	
Stocklösung		Stocklösung		Stocklösung	
30 mM HEPES	100 mL	30 mM HEPES	100 mL	30 mM HEPES	100 mL
140 mM K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200 mL	280 mM NaCl	100 mL	280 mM NaCl	100 mL
5 mM MgSO <sub>4</sub>	5 mL	5 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 mL	5 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 mL
50 mM Mannitol	50 mL	50 mM Mannitol	50 mL	45 mM Mannitol	45 mL
				5 mM α-MDG	5 mL
0,2 mM DTT	1 mL	0,2 mM DTT	0,5 mL	0,2 mM DTT	0,5 mL
ad 1000 mL dd Wasser		ad 500 mL dd Wasser		ad 500 mL dd Wasser	

Alle Bestandteile wurden in einen Messkolben vorgelegt und auf die entsprechende Menge mit dd Wasser aufgefüllt.

### **Bedeutung der Substanzen:**

Dithiothreitol (DTT): Proteinkonservierung

HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure): Puffersubstanz

K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ MgSO<sub>4</sub> und NaCl/ MgCl<sub>2</sub>: Gradientenbildner

Mannitol: Zuckeralkohol als Substratersatz für  $\alpha$ -Methyl-D-glucopyranosid

## 3.10.2 Sensorpräparation

### **Anlagerungspuffer für Sensoren**

140 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM HEPES und eine mini complete Tablette (Roche, Protease-Inhibitor-Mix) wurden mit dd Wasser auf 10 mL aufgefüllt. Für die Sensorpräparation wurde frisch DTT zur Pufferlösung gegeben (Endkonz.: 0,2  $\mu$ M).

### **Thiolierung:**

Der Sensor wurde mit 50  $\mu$ L SensorPrep A Lösung (Alkanthiol in 2-Propanol, *longate*) benetzt. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur in einer geschlossenen Petrischale. Das Lösungsmittel wurde durch Ausklopfen auf ein Filterpapier entfernt. Die Sensoren wurden mit dd Wasser dreimal gespült, mit Stickstoff getrocknet und zehn Minuten offen bei Raumtemperatur inkubiert, damit das restliche Lösungsmittel verdunstet.

### **Anlegen der Lipidschicht:**

Pro Sensor wurden 1,5  $\mu$ L SensorPrep B1 Lösung (Phospholipide, *IonGate*) vorsichtig auf die Oberfläche ohne Berührung der Goldelektrode pipettiert. Zügig wurde mit 50  $\mu$ L Anlagerungspuffer überschichtet und für 10 min inkubiert.

### **Membran-Vorbereitung:**

5  $\mu$ L der SGLT1-Membranpräparation wurde zügig aufgetaut, auf Eis gestellt und mit 95  $\mu$ L Anlagerungspuffer aufgefüllt. Danach wurde die Mischung mit einem Ultraschallstab homogenisiert (10 Schläge, jeweils 0,6 s, Amplitude 30%) und anschließend gekühlt. Der

*rbSGLT1* wird in einer stabil transfizierten CHO-Trex-Zelllinie überexprimiert. Die Induktion erfolgt mit Tetrazyklin. Hergestellte Membranfragmente dieser Zelllinie stellte *IonGate* zur Verfügung.

### **Anlegen der Membran-Suspension:**

Der Sensor wurde mit 10  $\mu\text{L}$  der verdünnten Membransuspension unterschichtet. Es wurde bei 4°C 60 min zentrifugiert (2500 g), danach mit 100  $\mu\text{L}$  Anlagerungspuffer vorsichtig aufgefüllt, die Sensoren mit Parafilm verschlossen und bei -20°C eingefroren. Am Messtag wurde ein Sensor aufgetaut, 220  $\mu\text{L}$  Ruhepuffer in den Sensor gefüllt, 3 bis 5 min inkubiert und anschließend in den SURFE<sup>2</sup>R eingebaut.

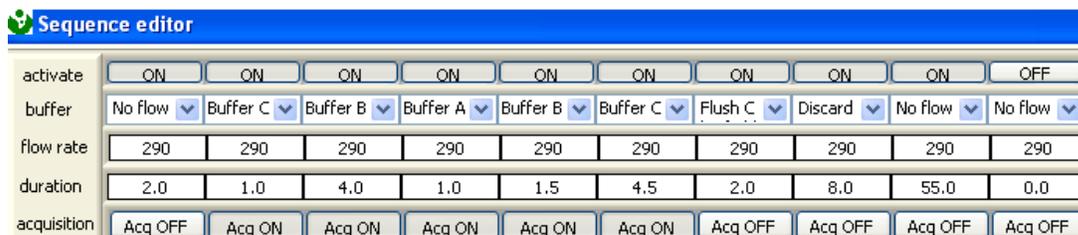
### **Geräte:**

Zentrifuge: Megafuge 3.0 R, Heraeus Sepatech, Germany

Ultraschallstab: Sonotrode MS 1.5 BANDELIN Sonopuls, Germany

SURFE<sup>2</sup>R One, SD 001-007 IonGate, Frankfurt am Main

### **Messesequenz**



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
activate	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	ON	OFF
buffer	No flow	Buffer C	Buffer B	Buffer A	Buffer B	Buffer C	Flush C	Discard	No flow	No flow
flow rate	290	290	290	290	290	290	290	290	290	290
duration	2.0	1.0	4.0	1.0	1.5	4.5	2.0	8.0	55.0	0.0
acquisition	Acq OFF	Acq ON	Acq OFF	Acq OFF	Acq OFF	Acq OFF				

Abbildung 15: Messesequenz der SGLT1-Messungen

Die Messesequenz wurde von *IonGate* übernommen (Abbildung 15), wobei die Flussrate der Puffer bei 290  $\mu\text{L}/\text{s}$  lag. Der Sensor wurde dabei nacheinander mit den jeweiligen Puffern umspült: 1 s Ruhepuffer (R oder C); 4 s nicht-aktivierender Puffer (NA oder B); 1 s aktivierender Puffer (A mit Substrat); 1,5 s NA und 4 s R (bis die Basislinie bei ca. 0 pA war). Nach dieser Messung folgte eine Messpause von ca. 60 s. Diese Sequenz lief pro Substanz bzw. Inhibitormessung mit je 7 Wiederholungen zweimal hintereinander, wobei daraus die letzten 10 Werte gemittelt wurden.

### 3.10.3 Substratmessung

Zur Charakterisierung der Affinität des *rbSGLT1* zum Substrat  $\alpha$ -Methyl-D-glucopyranosid ( $\alpha$ -MDG) wurde die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  bestimmt. Verschiedene  $\alpha$ -MDG Konzentrationen (0; 0,5; 1; 5; 10 und 50 mM) wurden nacheinander an einem Sensor gemessen. Acht Sensoren wurden für die  $K_m$ -Bestimmung verwendet. Mittels Graph-Pad-Prism® 5 wurden die Kinetikparameter durch nicht-lineare Regression berechnet (siehe Punkt 3.12.5).

### 3.10.4 Messung der *rbSGLT1* Inhibition durch polyphenolische Einzelsubstanzen

Für jedes Flavonoid wurde eine Stammlösung (1 M in 100% DMSO) hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden folgende Konzentrationen erstellt: 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 und 500 mM. Durch Verdünnung von 1:1000 mit der Pufferlösung entstanden die endgültigen Messkonzentrationen ( $\mu$ M) mit 0,1% DMSO. Zu Beginn der Inhibitionsmessung wurde eine Substratmessung ( $\alpha$ -MDG) durchgeführt. Pro Inhibitorkonzentration erfolgten zwei Messequenzen (mit je sieben Wiederholungen). Nach jeder Inhibitionsmessung wurde ein Wash-out durchgeführt, der eine zweimalige Substratmessung (nur  $\alpha$ -MDG) mit je sieben Wiederholungen beinhaltete. Mittels Excel wurde ein Mittelwert aus zehn Messungen gebildet. Die Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Transports wurde in Prozent berechnet. Für ausgewählte Einzelsubstanzen wurde eine ‚dose-effect curve‘ bestimmt, um die  $IC_{50}$ -Werte zu berechnen.

### 3.10.5 Messung der *rbSGLT1* Inhibition durch Kombinationen

Unterschiedliche Konzentrationen von Flavonoid-Referenzsubstanzen wurden miteinander gemischt und vermessen. Die Kombination wurde in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 250  $\mu$ M gemessen. Für die Beurteilung, ob eine Substanzkombination synergistische, additive oder antagonistische Effekte aufweist, wurde die Berechnungsmethode nach *Chou* und *Talalay (1984)* aus dem Review von *Chou 2006* verwendet. Somit konnte ein sogenannter ‚Combination Index (CI)‘ berechnet werden, durch den die Inhibitionswirkung

definiert werden kann. Voraussetzung für die Berechnung des CIs ist die Bestimmung der jeweiligen ‚dose-effect curve‘ der zu kombinierenden Substanzen.

### 3.11 Inhibitionsmessungen am humanen SGLT1

#### 3.11.1 ‚two-electrode-voltage-clamp‘-Methode (TEVC)

*Die Versuche der sog. "Zwei Elektroden Spannungsklemme" (Two-electrode-voltage-clamp, TEVC) wurden durch die Projektpartner Christine Schulze unter der Leitung von Prof. Hannelore Daniel am Zentralinstitut für Ernährung- und Lebensmittelforschung (Technische Universität München) in Freising durchgeführt.*

Die Charakterisierung der ausgewählten pflanzlichen Extrakte und polyphenolischen Reinsubstanzen bezüglich der Hemmung des Glucosetransports durch den *hSGLT1* wurde an isolierten Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* durchgeführt, in die 23 ng c-RNA des Transporters injiziert wurden mit anschließender 3-4 tägiger Inkubation bei 17°C. Da es sich beim *humanen* Natrium-abhängigen Glucose-Cotransporter (*hSGLT1*) um einen elektrogenen Transporter handelt, wurden die Untersuchungen mit Hilfe der TEVC durchgeführt. Diese von *Marmont et al. (1949)* entwickelte Technik ermöglicht es, die zur Konstanthaltung des Membranpotentials erforderlichen Ionenströme zu messen. Das Membranpotential wurde auf -60 mV gestellt. Dieser Wert liegt im Bereich des natürlichen Membranpotentials der meisten Epithelzellen, so auch der Dünndarmepithelzellen, in denen der SGLT1 hauptsächlich lokalisiert ist. Da die zur Konstanthaltung des Membranpotentials erforderlichen Ionenströme direkt proportional zur Transportrate sind, kann mit dieser Methode eine Aussage über die Aufnahme bzw. Inhibition der zu untersuchenden Substanzen durch den SGLT1 getroffen werden. In diesen Versuchen diente ebenfalls  $\alpha$ -Methyl-D-glucopyranosid ( $\alpha$ -MDG), ein Glucose-Analogon in 1 mM Konzentration als Transportsubstrat, um Verunreinigungen im System durch Glucose zu vermeiden. Die Oozyten wurden vor Beginn der Messung zusammen mit ca. 50  $\mu$ L Barth-Lösung in eine Messkammer gegeben. Für die Messung der Transportströme musste die Oozyte mit einer Strom- und einer Potentialelektrode punktiert werden. Das Membranpotential wurde auf -60 mV geklemmt und der dazugehörige Strom gemessen.

Anschließend wurde solange mit Barth-Lösung (pH 7,5) perfundiert, bis sich eine konstante Basislinie einstellte. Für die Inhibitionsmessungen wurden 100 mM Stammlösungen (entweder in DMSO oder in Ethanol) der Substanzen angesetzt und in der Endlösung mit einer Konzentration von 100-1000  $\mu\text{M}$  und max. 1% Lösungsmittel (LM) verwendet. Die Pflanzenextrakte wurden mit 2 mg/mL eingewogen, mit 20  $\mu\text{L}$  DMSO oder Ethanol versetzt und auf 2 mL mit Barth-Lösung aufgefüllt und entsprechend weiter verdünnt (max. 1% LM). Zur Kontrolle wurden die entsprechenden LM-Konzentrationen ebenfalls gemessen. Die Perfusion aller zu untersuchenden Versuchslösungen erfolgte manuell mit einer Mikropumpe. Dadurch war ein Lösungsaustausch innerhalb von 200-400 ms möglich. Nachdem eine konstante Basislinie erreicht war, erfolgte die Aufzeichnung einer Strom-Spannungs-Kennlinie (I-V-Kennlinie) mit anschließender Gabe von 50 bis 100  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -MDG-Lösung in An- oder Abwesenheit steigender Konzentrationen von Extrakten bzw. Reinsubstanzen. Nach ca. 30 s wurde erneut eine I-V-Kennlinie aufgezeichnet und bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie mit substratfreier Barth-Lösung ausgewaschen. Um ausschließen zu können, dass die Extrakte selbst vom *hSGLT1* transportiert werden, erfolgte eine Messung der Extrakte in Abwesenheit von  $\alpha$ -MDG. Die Strom-Spannungskennlinien wurden aus den Originaldaten ermittelt, indem die gemessenen Ströme bei den jeweiligen Potentialen mit und ohne Zugabe von Substrat in An- oder Abwesenheit der Untersuchungslösungen voneinander subtrahiert wurden. Die Inhibitionswerte wurden aus  $n=4-5$  Oozyten  $\pm$  STABW gebildet.

#### **Material:**

Barthlösung:

88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0,82 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,41 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,33 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 2,4 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 6 mM HEPES, 4 mM TRIS, dann pH-Wert auf 7,5 einstellen

In der Barth-Lösung zum Aufbewahren der Oozyten befindet sich noch: 2,5 mM Natrium-Pyruvat und ca. 70  $\mu\text{M}$  Gentamycin als Antibiotikum

### 3.11.2 Bestimmung der Kinetikparameter

Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert wurde mit der Methode der kleinsten Quadrate basierend auf der Michaelis-Menten-Gleichung berechnet:

$$I = \frac{I_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

wobei I den Transmembranstrom, [S] die Substratkonzentration,  $I_{max}$  den maximalen Transmembranstrom bei sättigender Substratkonzentration und  $K_m$  die Michaelis-Menten-Konstante symbolisiert. Für die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte wurde außerdem folgende Formal verwendet:

$$I = I_{max} * \frac{1 - [I]}{I_n C_{50} + [I]}$$

wobei I den Transmembranstrom, [I] die Inhibitorkonzentration,  $I_{max}$  den maximalen Transmembranstrom bei sättigender Substratkonzentration und  $I_n C_{50}$  die mittlere inhibitorische Konstante symbolisiert. Der  $IC_{50}$ -Wert ist die Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet werden kann. Bei der Methode der kleinsten Quadrate wird versucht die Parameter einer bekannten Gleichung zu finden, die am wahrscheinlichsten zur Entstehung eines gemessenen Datensatzes geführt haben. Das heißt, dass der Graph einer Gleichung so genau wie möglich an einen Messdatensatz angepasst wird. Dafür werden zunächst geschätzte Anfangswerte in die Gleichung eingesetzt und anschließend die in der Gleichung berechneten Werte mit den real gemessenen Werten (generierter Strom in nA) verglichen. Die Differenzen zu den tatsächlich gemessenen Punkten werden quadriert und aufsummiert. Mittels spezieller Algorithmen werden die Schätzungen der Gleichungsparameter immer mehr verfeinert. Dabei erfolgt die Minimierung der Quadratsummen solange bis keine signifikante Verminderung mehr zu erzielen ist. In diesem Fall hat man die bestmögliche Annäherung erreicht. Zur Ermittlung vom  $K_m$  und  $I_{max}$  wurden mindestens 4 Datenpunkte (variierende Substrat- und Inhibitorkonzentrationen) verwendet. Die Bestimmung der Dissoziationskonstante  $K_i$  sowie die Unterscheidung zwischen kompetitiver und nicht-kompetitiver Art der Hemmung wurde mit Hilfe des Dixon-Plot bestimmt. Dabei wurden die Messungen jeweils bei drei verschiedenen Substratkonzentrationen (0,5; 2 und 10 mM  $\alpha$ -MDG) und mindestens drei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen und einem Membranpotential von -60 mV durchgeführt. Die Berechnung der  $K_i$ -Werte erfolgte durch lineare Regression der

reziprok aufgetragenen Transportströme ( $1/nA$ ) für variierende Inhibitor- und Substratkonzentrationen. Die Werte für  $K_i$  wurden aus dem Schnittpunkt der Geraden für die drei Substratkonzentrationen ermittelt. Dabei zeigte ein Schnittpunkt der Geraden auf der Abszisse eine nicht-kompetitive Hemmung, ein Schnittpunkt links der Ordinate eine kompetitive Hemmung an. Die Werte wurden als Mittelwerte von  $n= 5-8$  Oozyten  $\pm$  SEM dargestellt.

### **3.12 Stabilität der Flavonoide gegenüber der Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) – *in vitro***

*Um die Stabilität der Flavonoide gegenüber der humanen  $\beta$ -Glucosidase Lactase-Phlorizin-Hydrolase zu testen, konnten Experimente an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover, Abteilung Physiologische Chemie, unter der Leitung von Professor Dr. Hassan Y. Naim durchgeführt werden. LPH ist käuflich nicht zu erwerben. Die LPH ist ein membranständiges Enzym, lokalisiert im Dünndarm und im Menschen wohl hauptverantwortlich für die Spaltung von Lactose in Glucose und Galactose. Das Enzym besitzt zwei aktive Zentren, das eine zuständig für die Lactosespaltung, das andere verantwortlich für die Phlorizinspaltung, aber auch für die Spaltung von Glycosyl-N-acylsphingosinen (Behrendt et al., 2009). Die Arbeitsgruppe von Prof. Naim stellte stabile Chinese-Hamster-Ovary (CHO)-Zellen mit exprimierter humaner LPH zur Verfügung. Außerdem konnten stabil-transfizierte Madine-Darby-Kidney (MDCK) Zellen verwendet werden, die nur Domäne III (Phlorizin-Hydrolase) exprimieren, um zu untersuchen, welches der aktiven Zentren für die eventuelle Spaltung der Flavonoide verantwortlich ist.*

#### **3.12.1 Zellkultur**

##### **Trypsinieren der Zellen**

Zur Vermehrung der Zellen wurde das Medium abgenommen. Es folgte ein einmaliges Waschen mit 4 mL PBS und eine sterile Inkubation der Zellen nach Zugabe von 2-4 mL Trypsin/EDTA für etwa 5 min bei 37°C (für CHO-Zellen) oder für ca. 45 min bei 37°C (für MDCK-Zellen), bis alle Zellen vom Boden abgelöst waren. Die Reaktion wurde mit 1 mL

Medium, das FKS enthält, abgestoppt. Abgelöste Zellen wurden dann in ein 15/50 mL-Röhrchen pipettiert und bei 900 g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet je nach Verdünnung in frischem Kulturmedium resuspendiert. 10-12 mL frisches Kulturmedium wurden auf neuen Zellkulturplatten vorgelegt und je nach Verdünnung eine entsprechende Menge der resuspendierten Zellen auf die neuen Zellkulturplatten pipettiert (1 mL pro Platte z.B. aus 5 Platten → 25 Platten). Am Schluss wurden die Zellkulturplatten vorsichtig geschwenkt, um die Zellen zu verteilen, und anschließend wieder bei 37°C bis zur Konfluenz (2-7 Tage) inkubiert.

### **Zellen lysieren**

Für die Isolierung des Enzyms mussten die Zellen zunächst zweimal mit 5 mL kaltem PBS gewaschen werden. Die Zellplatten wurden auf Eis gestellt und jeweils 1 mL Standard-Lysispuffer und 30 µL Proteinaseinhibitor-Mix zupipettiert. Dann wurde das Zelllysat zusammengeschabt, homogenisiert (zehnmal auf und ab pipettieren) und in ein Reaktionsgefäß (RG, 50 mL-Röhrchen) überführt. Die Lysate wurden für eine bessere Durchmischung und Verteilung gesammelt und in 1,5 mL-RG (1 Schale = 1 RG) aliquotiert. Die Lysate wurden für 30 min auf Eis gestellt, für 15 min bei 20000 g zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt.

### **Material:**

RPMI 1640 für CHO-Zellen: mit Glucose 1 g/500 mL (PAA Laboratories GmbH, Cölbe), 25 mL fötales Kälberserum (FKS, Invitrogen, Darmstadt), 5 mL Penicillin/Streptomycin (5 mg/mL, Invitrogen, Darmstadt)

DMEM für MDCK-Zellen: mit Glucose 0,5 g/500 mL (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) 50 mL fötales Kälberserum (FKS, Invitrogen, Darmstadt), 5 mL Penicillin/Streptomycin (5 mg/mL, Invitrogen, Darmstadt)

Trypsin-EDTA (Invitrogen, Darmstadt)

PBS-Puffer: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 1000 mL; pH 7,4 mit HCl

Standard-Lysispuffer: 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM NaCl, 0,5 % Deoxycholat, 0,5 % Triton X-100

Proteaseinhibitoren:

Endkonzentration: 1 mM PMSF; 1 µg Pepstatin; 5 µg Antipain; 5 µg Leupeptin; 1 µg Aprotinin; 100 µg Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor (Sigma Aldrich, Germany)

### **Geräte:**

Zentrifugen:

Thermo Scientific sorvall legend X1R (Thermo Scientific, Germany)

Heraeus sepatech, varifuge 3.0R (Thermo Scientific, Germany)

### 3.12.2 Isolierung der Lactase-Phlorizin-Hydrolase und der Phlorizin-Hydrolase

Die unter 3.12.1 erhaltenen Überstände des Lysate wurden mit 1,5-2,0  $\mu\text{L}$  eines Antikörper (AK)-Mixes versetzt (2,0  $\mu\text{L}$ : 1,5  $\mu\text{L}$  AK 909 + 0,5  $\mu\text{L}$  AK mLAC6; 1,5  $\mu\text{L}$ : 1,0  $\mu\text{L}$  AK 909 + 0,5  $\mu\text{L}$  AK mLAC6). Dann wurden zu jedem RG 250  $\mu\text{L}$  1:10 verdünnte Protein-A-Sepharose (PAS)-Lösung gegeben und im Kühlraum für 2 bis 3 h oder über Nacht (für die  $K_m$ -Wert-Bestimmungen) in einem Rotator drehend inkubiert. Nach der Inkubation wurden die RG bei 4000 g für 1 s zentrifugiert (Anzentrifugieren) und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nach Zugabe von 1 mL Waschpuffer I (WPI), wurde wieder anzentrifugiert und vorsichtig abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt zweimal mit WPI, dann zweimal mit WP II und zum Schluss mit PBS (inklusive 0,2 % Triton-X-100; pH 7,4) oder Phosphatpuffer (50 mM; pH 6) durchgeführt. Der Überstand wurde vollständig und vorsichtig abgesaugt, sodass keine Beads verloren gingen. Die Proben wurden je nach Zielsetzung gepoolt (bspw. 2 RG zu einem RG, um den Enzymanteil zu erhöhen). Zwei Proben wurden für die Protein-Quantifizierung zurückgestellt. Die sogenannten Immunpräzipitate (IPs), bestehend aus PAS, AK und Enzym, wurden weiterverwendet.

#### Material:

Monoklonale Antikörper gegen das Enzym Lactase-Phlorizin-Hydrolase waren HBB 909 (*Hauri et al., 1985*) und mLac 06 (*Maiuri et al., 1991*)

Protein-A-Sepharose (Fisher Scientific, Germany), 1:10 mit PBS verdünnt verwendet

Waschpuffer I: PBS + 0,5 % Triton X-100 + 0,05 % Na-Deoxycholat

Waschpuffer II: 500 mM NaCl + 125 mM Tris-HCl; pH 8,0 + 10 mM EDTA + 0,5 % Triton X-100

50 mM Phosphatpuffer pH 6 nach *Ph.Eur.*, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  in Aqua bidest., pH-Einstellung mit NaOH

#### Geräte:

Rotator ohne Geschwindigkeitseinstellung (Huber & Co. AG Schweiz)

### 3.12.3 Quantifizierung der Enzyme mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels SDS-PAGE können Proteine elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch das anionische Tensid Natriumlaurylsulfat (SDS) werden nicht-kovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen aufgelöst und somit die Quartär- und Tertiär-Strukturen zerstört. Das im Laemmli-Puffer enthaltene DTT führt zudem zur

Reduzierung der Disulfidbrücken. Die negativ geladenen SDS-Moleküle binden an die Polypeptidketten in einem durchschnittlichen Verhältnis von zwei SDS-Anionen pro Aminosäure der Polypeptidkette, so dass die Ladung des SDS-Proteinkomplexes der Masse des Proteins proportional ist. Die Behandlung der Proteine durch Hitze, SDS und DTT bewirkt die vollständige Denaturierung des Proteins. Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde wie von *Laemmli (1970)* beschrieben durchgeführt. Das gegossene Gel (6 oder 8%, 1,5 mm tief) für die Quantifizierung der LPH wurde in die Apparatur eingespannt und in die Laufkammer überführt (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Kurz vor dem Gellauf wurden für die Herstellung des verwendeten Lämmli-puffers 40 µL 3-fach-konzentrierter Lämmli-puffer mit je 7 µL 20%igem SDS und 1 M DTT versetzt. Die Proben aus Punkt 3.12.2 wurden in 30 µL Lämmli-puffer bei 95°C für 5 min inkubiert und kurz zentrifugiert (4000 g; 1 min). Das Gel wurde mit den Proben sowie dem Protein-Molekulargewichts-standard beladen und bei konstantem Strom (20 mA pro Gel) in einem Puffersystem nach *Laemmli (1970)* entwickelt. Nach ca. 30-45 min wurde auf eine Spannung von 120 V umgestellt (pro Kammer). Das Gel wurde für 30 min in eine Fixierlösung gelegt (10% Essigsäure, 40% Methanol) und wurde danach mit Blue-Silver-Lösung (40:10 mit Methanol) versetzt (*Candiano et al., 2004*) und über Nacht geschüttelt. Nach ca. 12 h wurde das Gel mit 10%iger Essigsäure entfärbt, mit Wasser gespült und luftblasenfrei gescannt. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte mittels Quantity-One®, wobei die Dichteintensität der Banden bestimmt wurde. Für die Quantifizierung der LPH wurde Myosin in 7 Konzentrationen (0,3, 0,4, 0,6, 1,2, 2,4, 3,2 und 4,8 µg/Bahn) in einem 6%igen Gel verwendet (Rotimarkstandard, Carl Roth), wobei die Quantifizierung der PH in einem 8% Gel mit Rinderserumalbumin (BSA, Sigma Aldrich) erfolgte (0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,5 µg/Bahn).

**Material:**

Trenngel 6%:

4,1 mL Aqua bidest.; 1,6 mL Rotiphorese Gel (Carl Roth GmbH, Karlsruhe); 1,9 mL 1,5 M Tris, pH 8,8; 78 µL 10 % SDS; 6 µL TEMED; 10 % Ammoniumperoxodisulfat 78 µL

Sammelgel: 2,9 mL Aqua bidest.; 0,9 mL Rotiphorese Gel; 0,5 mL 1 M Tris-HCl, pH 6,8, 58 µL 10 % SDS, 6 µL TEMED, 10 % Ammoniumperoxodisulfat 58 µL

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris-HCl (pH 8,4), 0,192 M Glycerin, 0,1 % SDS

3x Lämmli-puffer: 6 % SDS, 30 % Glycerin, 150 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,02 % Bromphenolblau

Prestained Marker, 3 µL in 40 µL LP (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

1L Kolloidal-Coomassie („Blue Silver“): 200 mL Aqua bidest., 117,7 mL 85%ige Phosphorsäure, 100 g Ammoniumsulfat; Rühren lassen und das  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nach und auch dazugeben, bis sich alles gelöst hat; 1,2 g Coomassie Blue G-250 ad 800 mL mit Aqua bidest. auffüllen

Fixierer: 40% Methanol, 10% Essigsäure

Entfärber: 10% Essigsäure

### 3.12.4 Enzymassay

Alle polyphenolischen Substanzen (20 mM) wurden in DMSO gelöst und auf 0,5 mM (2,5% DMSO) je nach Zielsetzung mit Puffer pH 7,4 oder pH 6 verdünnt. Pflanzenextrakte wurden ebenfalls in DMSO gelöst und in folgenden Konzentrationen getestet: 1, 2, und 4 mg/mL, (Endkonz. DMSO: 2,5%). 56 mM Lactose wurde in Puffer gelöst, für die Messungen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Als Negativkontrolle für Lactose wurde eine Puffer-Substrat-Lösung mitgeführt. Die Negativkontrollen der Flavonoide für die HPLC-Messungen wurden ohne Inkubationszeit durchgeführt. Je nach Zielsetzung erfolgte die Inkubation für 30, 60 und 90 min im Schüttler bei 37°C. Die freigesetzte Glucose wurde quantitativ mit Hilfe des Glucosenachweisreagens „Glucoquant“ bestimmt. Dafür wurden nach der Inkubation die Proben kurz bis 4000 g zentrifugiert, der Überstand (100 µL) vorsichtig in ein neues RG überführt und mit 1 mL der Glucoquantlösung versetzt (600 T Lösung I und 138 T Lösung II) und für 10 min inkubiert. Glucose reagiert in Gegenwart von ATP und Hexokinase zu Glucose-6-phosphat, welches mit  $\text{NADP}^+$  und der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase zu Gluconat-6-phosphat und  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  oxidiert. Die NADPH-Zunahme ist proportional zu der durch die LPH freigesetzten Glucose und wurde bei 339 nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte über eine Glucose-Kalibrierreihe im Konzentrationsbereich von 50 -300 µg/mL. Die Aktivitätsbestimmung der LPH gegenüber den polyphenolischen

Substanzen erfolgte über die HPLC (3.8.1.1). Nach erfolgter Inkubation auf dem Schüttler wurde hier die Reaktion durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  Methanol gestoppt.

Folgende Mengen wurden je nach Zielsetzung verwendet und zum isolierten Enzym (IP) pipettiert:

	Substratmessung	Polyphenolmessung	Extraktmessung
Puffer pH 7,4 oder Puffer pH 6	50 $\mu\text{L}$ PBS mit 0,2% Triton-X-100 oder 50 $\mu\text{L}$ 50 mM Phosphatpuffer	50 $\mu\text{L}$ PBS mit 0,2% Triton-X-100 oder 50 $\mu\text{L}$ 50 mM Phosphatpuffer	-
56 mM Lactose	50 $\mu\text{L}$		
1 mM Polyphenole		50 $\mu\text{L}$	
Extrakte 1, 2 oder 4 mg/mL			100 $\mu\text{L}$

#### Material:

Glucoquant (Roche Germany)

Polyphenole siehe Punkt 3.2

PBS-Puffer pH 7,4

50 mM Phosphatpuffer, pH 6 nach *Ph.Eur*, 50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  in Aqua bidest., pH-Einstellung mit NaOH

#### Geräte:

Photometer: Jenway 6300 (Bibby Scientific Limited Staffordshire, UK)

1 cm-Halbmikroküvetten

Zentrifuge: Sorvall Legend X1R (Thermo Scientific, Germany)

Thermoschüttler: HLC, Stufe 5, 37°C

### 3.12.5 $K_m$ -Bestimmungen von Lactose und Phlorizin

Eine Kenngröße für eine enzymatische Reaktion ist die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$ . Der  $K_m$ -Wert gibt die Substratkonzentration an, bei der die Umsatzgeschwindigkeit halbmaximal ist ( $v = v_{\text{max}}/2$ ), die also bei Halbsättigung vorliegt. Dafür wurden unterschiedliche Konzentrationen von Lactose (7, 14, 21, 28, 35, 49, 100, 150, 200, 400 mM) und Phlorizin (0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0  $\mu\text{M}$ ) bei 37°C für 60 min inkubiert. Diese Messungen wurden je 3- bis 5-mal wiederholt. Die quantitative Bestimmung der freiwerdenden Produkte wurde wie unter Punkt 3.12.4 durchgeführt.  $K_m$  und  $V_{\text{max}}$  wurden mittels GraphPad Prism® 5

berechnet. Bevor eine Berechnung von  $K_m$  und  $V_{max}$  durch nicht-lineare Regression möglich war, wurden unterschiedliche Linearisierungsverfahren verwendet. Die doppelt-reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk soll hier kurz erwähnt werden. Dieses Linearisierungsverfahren beruht auf der reziproken Form der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V} + \frac{K_m}{V} * \frac{1}{[S]}$$

Die Umsatzgeschwindigkeit wird mit  $v$  dargestellt, wobei  $S$  die Substratkonzentration,  $K_m$  die Michaelis-Konstante und  $V$  die Maximalgeschwindigkeit ist. Der Schnittpunkt dieser entstehenden Geraden mit der Ordinate stellt  $1/V$  dar, während  $1/K_m$  beim Schnittpunkt mit der Abszisse ablesbar ist. Es ist zwar das gebräuchlichste Linearisierungsverfahren der Michaelis-Menten-Gleichung, allerdings gilt es auch als das Ungeeignetste aufgrund einer Ungleichverteilung der Daten bei der Linearisierung (*Bisswanger, 1994*).

### 3.12.6 Kombinationsmessungen

Um genauere Aussagen über die Spaltung von Flavonoiden durch die LPH treffen zu können, wurden unterschiedliche Flavonoide gemeinsam (0,5 mM) mit Lactose (28 mM) inkubiert. Außerdem wurden ausgewählte Kombinationen von je zwei Flavonoiden (je 0,5 mM) getestet. Zur photometrischen Messung der freiwerdenden Glucose wurde der Ansatz geteilt und aus einem Ansatz das Flavonoid durch die Zugabe von 30 mg eines Adsorberharzes entfernt. Dazu wurden 50  $\mu$ L 56 mM Lactose und 50  $\mu$ L 1 mM Flavonoid zu den Immunobeads gegeben. Nach 90-minütiger Inkubation wurden 50  $\mu$ L der Reaktionslösung entnommen und mit 50  $\mu$ L PBS Triton-X-100 (0,2%) und 30 mg Adsorberharz versetzt. Nach 5 min Schütteln und kurzem Anzentrifugieren wurden die 100  $\mu$ L vorsichtig mit einer Pipette entnommen und mit 1 mL des Glucoquant-Reagenzes gemischt. Nach 10 min wurde bei 339 nm die Glucose photometrisch bestimmt. Die restlichen 50  $\mu$ L der Reaktionslösung wurden mit 250  $\mu$ L Methanol versetzt und per HPLC analysiert.

### 3.12.7 Ex vivo-Versuche – ‚everted gut sac model‘

Um die Absorption, die Metabolisierung und eventuelle Interaktionen von Flavonoiden im Darmlumen noch genauer zu beschreiben, wurden zusätzlich zu den in vitro Versuchen mit der Lactase-Phlorizin-Hydrolase ‚Everted gut sac‘-Versuche mit Mäusedarm etabliert. Diese wurden von Christine Schulze unter der Leitung von Prof. Hannelore Daniel am Zentralinstitut für Ernährung- und Lebensmittelforschung (Technische Universität München) in Freising durchgeführt.

Hierfür wurden C57Bl/6N Mäuse (Männchen, normale Fütterung) in einem Alter zwischen 8 und 12 Wochen verwendet. Es wurden 4 cm lange Jejunumabschnitte des Mäusedarms gewaschen, umgestülpt, an den Enden zugebunden, in 15 mL Falcon Tubes überführt und mit 3 mL Krebs-Puffer und unter Zugabe der Flavonoide für 30, 60 oder 90 min bei 37°C unter Carbogen-Begasung inkubiert (Abbildung 16). Flavonoide wurden in den Konzentrationen 10, 100 und 500 µM (Stammlösungen: 10, 100, 500 mM in Ethanol) verwendet, wobei Kontrollmessungen ohne Säckchen durchgeführt worden sind. Nach der Inkubation wurden die Säckchen aus der Inkubationslösung entnommen, aufgeschnitten, das serosale Fluid in Eppis überführt und die äußere Inkubationslösung bei -80 °C gelagert. Jede Inkubation wurde zweifach durchgeführt. Die entstandenen Metabolite in den Inkubationslösungen und im serosalen Fluid wurden in Kiel per HPLC und HPLC/MS identifiziert und quantifiziert.

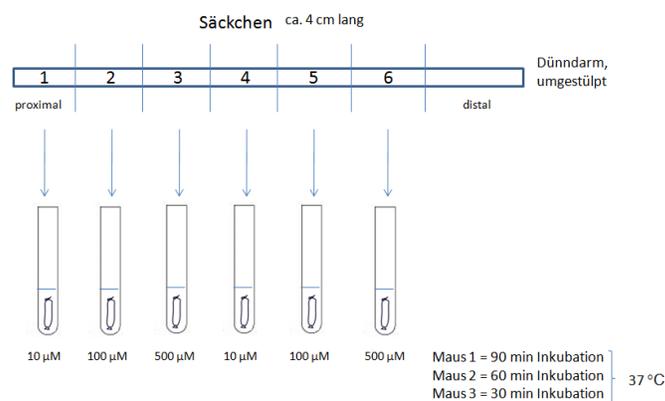


Abbildung 16: Schema zur Durchführung

**Material**

Krebs-Bicarbonat Puffer: NaCl 119 mM, KCl 4,7 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, dieser wurde 1 h mit Carbogen begast und auf pH 7,4 eingestellt

**3.13 Statistische Auswertung**

Eigene Daten wurden mittels Sigma Plot 11.0 auf Normalverteilung geprüft ( $n=5$ ) und mittels t-Test auf signifikante Unterschiede geprüft.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Erstellen von Kalibrierreihen

Die Quantifizierung polyphenolischer Substanzen erfolgte durch Kalibrierreihen, die mit Hilfe der Software Empower II erstellt wurden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Detektionswellenlängen, Geradengleichungen und Bestimmtheitsmaße der Kalibrierungen polyphenolischer Substanzen

Substanz	Detektionswellenlänge (nm)	Geradengleichung $y = mx + b$	Bestimmtheitsmaß $R^2$
Salicin	270	m= 2175,5; b= -2784,8	0,9998
Arbutin	280	m= 4196,6; b= -1362,3	0,9999
Quercetin	360	m=34547,8; b=-60512,3	0,9953
Quercetin-3,4'-O-diglucosid	330	m=18096,9; b= -28564,0	0,9997
Quercetin-3-O-glucosid	330	m= 18797,2; b=-14913,7	0,9995
Quercetin-7-O-glucosid	330	m=15192,8; b= -68226,1	0,9979
Quercetin-4'-O-glucosid	330	m=16798,2; b=-53545,6	0,9994
Quercitrin	330	m=17642,3; b=-58030,4	0,9998
Hyperosid	330	m=15027,1; b=-33483,4	0,9999
Rutin	330	m=11115,7; b=-29923,0	0,9998
Kaempferol	360	m=46507,7; b=-90966,8	0,9994
Kaempferol-3-O-glucosid	330	m=23758,2; b=-14229,1	0,9994
Kaempferol-7-O-glucosid	330	m=17706,1; b=-44377,3	0,9996
Isorhamnetin	360	m=45294,1; b=-137949,3	0,9984
Naringin	280	m=17334,0; b=-14986,5	0,9957
Narirutin	280	m=17164,5; b=-18950,9	0,9987
Naringenin-7-O-glucosid	280	m=24466,6; b=13074,1	0,9946
Naringenin	280	m=32137,4; b=-22774,3	0,9978
Luteolin-4'-O-glucosid	330	m=27633,4; b=396,699	0,9982
Luteolin	360	m=37926,6; b=-29558,3	0,9997
Luteolin-3',-O-diglucosid	330	m=21740,3; b=-77878,1	0,9987
Luteolin-7-O-glucosid	330	m=25352,6; b=-56653,3	0,9991
Phlorizin	280	m=21930,1; b=48,1334	0,9964
Phloretin	280	m=3914,64; b=-113,258	0,9956
Chlorogensäure	320	m=34179,4; b=1868,9	0,9993
Genistein	260	m=95880,0; b=24983,3	0,9995
Genistin	260	m=55062,9; b=-21656,6	0,9989
Apigenin	360	m=28915,5; b=-7633,1	0,9998
Apigenin-7-O-glucosid	330	m=30434,8; b=-23049,1	0,9990
Saponarin	330	m=18683,3; b=-1593,4	0,9995

## 4.2 Charakterisierung der Ausgangsmaterialien

### 4.2.1 Grünkohl

#### 4.2.1.1 Quantifizierung polyphenolischer Inhaltsstoffe in unterschiedlichen Grünkohlarten

Der Projektpartner *BioActive Food GmbH* stellte unterschiedliche Grünkohlarten zur Verfügung, die auf ihren Gesamtflavonoidgehalt (3.7.1) untersucht und miteinander verglichen wurden. In Tabelle 5 ist eine Auswahl dieser Sorten mit ermittelten Flavonoidgehalten bezogen auf die Trockenmasse (TM) und Frischmasse (FM) zusammengestellt. Im bereits blanchierten Grünkohl vom CITTI-Großmarkt konnten 1 540 ppm Flavonoide (150 mg/100 g Frischgewicht) quantifiziert werden. Ähnliche Werte wurden auch in den BIO-Grünkohlen der gleichen Sorte gefunden. Die Sorte ‚Galizische Palme‘ und alte Sorten aus Ostfriesland fielen mit hohen Flavonoidgehalten von 2 800 - 5 500 ppm auf. Die Trockenmasse des gefroren gelieferten Grünkohls vom CITTI-Markt war deutlich niedriger, als diejenige der frisch gelieferten Sorten aus Ostfriesland und der BIO-Grünkohle.

Tabelle 5: Gesamtflavonoidgehalte ( $n=3$ ) unterschiedlicher Grünkohlarten

Name	Sorte/Herkunft	TM (%)	Gesamtflavonoide (ppm, TM)	Gesamtflavonoide (ppm, FM)
<b>CITTI-GK</b>	Reflex F1/Polen	11,3	13 600±890	1 540±100
<b>GK Lo</b>	Logabirum/Ostfriesland	20,6	15 400±830	3 170±170
<b>GK Her</b>	Holterfehn/Ostfriesland	18,9	16 340±430	3 090±80
<b>GK La</b>	Lammertsfehn/Ostfriesland	17,8	18 060±610	3 210±110
<b>GK H</b>	Holte/Ostfriesland	18,4	15 250±430	2 800±80
<b>GK Schos</b>	Schatteburg/Ostfriesland	18,6	17 040±910	3 170±170
<b>Cord</b>	Rückkreuzung der Sorte Cola	12,1	13 810±860	1 670±100
<b>GK Gal P.</b>	Galizische Palme	29,4	18 590±200	5 470±60
<b>GK W</b>	Westerländer Winter/Elmshorn	12,5	14 000±330	1 750±40
<b>GK R</b>	Reflex F1/ Elmshorn	14,7	9 660±170	1 420±30
<b>GK BIO 10600</b>	Reflex F1/Dittmarschen	17,7	6 870±750	1 220±130
<b>GK BIO 10500</b>	Galiz. Palme/Dittmarschen	17,1	12 600±1 970	2 150±340

TM: Trockenmasse, FM: Frischmasse

Der Grünkohl vom Großmarkt CITTI (CITTI-GK) wurde per HPLC-MS detaillierter charakterisiert (siehe 4.2.1.2) und für unterschiedliche Untersuchungen verwendet, da er in großen Mengen beziehbar war. In der Literatur wird für die Beschreibung des polyphenolhaltigen Ausgangsmaterials meist eine Gesamtpolyphenolbestimmung (wie unter Punkt 3.6.5) durchgeführt. Der Polyphenolgehalt des frischen CITTI-GKs reichte von  $1\,870 \pm 90$  ppm (berechnet als Gallussäure-Äquivalente) bis  $2\,080 \pm 120$  ppm (berechnet als (+)-Catechin-Äquivalente). In einem Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakt, wie unter Punkt 3.6.2 hergestellt, konnten per HPLC über 50 Peaks bei 330 nm detektiert werden. Deren genauere Charakterisierung folgt in Punkt 4.2.1.2. In diesem Extrakt konnten genuin kaum Aglyka nachgewiesen werden. Nach saurer Hydrolyse zur Bestimmung des Gesamtflavonoidgehalts (Tabelle 5) wurde der CITTI-GK auf Aglyka untersucht. Die Flavonole Quercetin ( $85 \pm 5$  ppm) und Kaempferol ( $135 \pm 10$  ppm) konnten durch den Vergleich mit Referenzsubstanzen anhand der Retentionszeiten und der UV-Spektren eindeutig identifiziert und quantifiziert werden. Es konnte außerdem Sinapinsäure ( $120 \pm 5$  ppm) im Hydrolysat detektiert werden, welche zwischen zwei Flavonolderivaten mit Retentionszeiten um die 30 min eluierte. Nach einigen Untersuchungen und mithilfe von Referenzsubstanzen konnte die Identität der Peaks im Hydrolysat mit Quercetin- und Kaempferol-7-O-glucosid belegt werden (Abbildung 17). Auch konnte in einigen angereicherten Grünkohlextrakten Isorhamnetin ( $t_r$ : 40,1 min) und Ferulasäure ( $t_r$ : 31,3 min) nachgewiesen werden. Die benötigte Hydrolysezeit von Flavonoidglycosiden erwies sich, wie bei *Hertog et al. (1992a)* beschrieben, abhängig von der Glycosylierungsposition:  $C7 > C4 > C3$ . In Position 7 glycosylierte Flavonoide bleiben häufig in hydrolysierten Extrakten erhalten, da diese Bindung schwerer spaltbar ist. Die Gesamtflavonoidbestimmung inklusive der Hydrolyse von Flavonoidglycosiden wurde zur ersten Einschätzung von flavonoidhaltigem Ausgangsmaterial als Standardanalyse verwendet. Die Wiederfindungsrate der Methode wurde durch den Zusatz einer definierten Menge an Hyperosid bestimmt und betrug  $84 \pm 7\%$ . Zusätzlich wurde eine saure Flavonoid-Hydrolyse nach *Hertog et al. (1992a)* (3.7.2) durchgeführt, bei der die photometrische Gehaltsbestimmung entfiel und die resultierenden Extrakte direkt für eine HPLC-Analyse verwendet wurden. Quantitative Auswertungen zeigten höhere Ausbeuten der Aglyka

(Quercetin:  $130 \pm 20$  ppm und Kaempferol:  $195 \pm 10$  ppm). Dies wird ebenfalls durch höhere Peaks der Aglyka Quercetin und Kaempferol nach der ‚Hertog‘-Hydrolyse im Vergleich zur Hydrolyse nach dem *Ph. Eur.* in Abbildung 17 gezeigt.

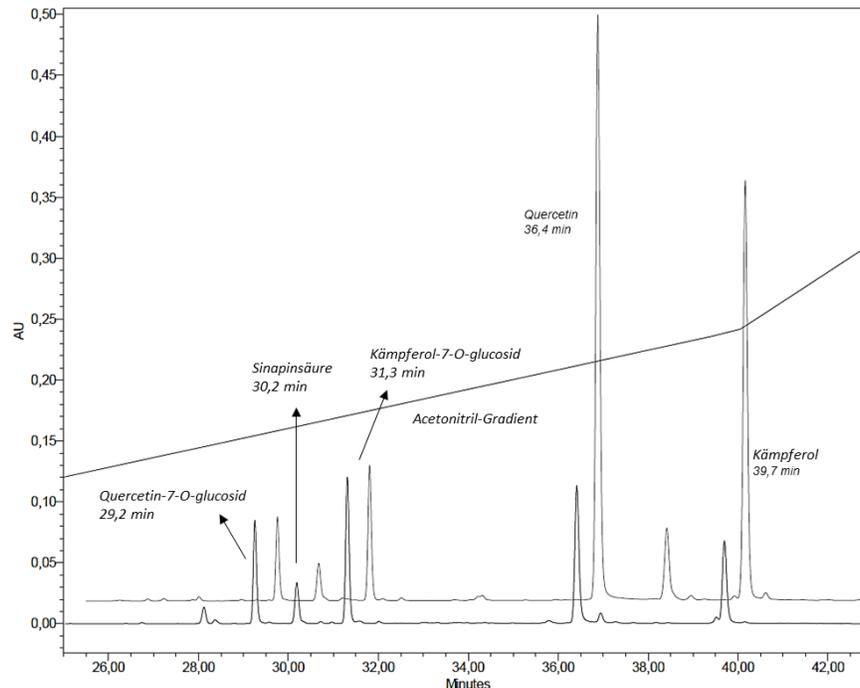


Abbildung 17: Overlay von HPLC-Chromatogrammen eines Grünkohlhydrolysats, Detektion bei 360 nm

vorne: Hydrolyse nach *Ph.Eur.* (3.7.1); hinten: saure ‚Hertog‘-Hydrolyse (3.7.2)

#### 4.2.1.2 Peakidentifizierung per HPLC-ESI(-)-MS<sup>2</sup> in einem Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakt

LC-ESI-MS<sup>2</sup> Untersuchungen eines Flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes mit einem Gesamtflavonoidgehalt von  $46\,720 \pm 4\,000$  ppm in der Trockenmasse offenbarten ein komplexes Muster der Flavonoide mit über 50 Peaks (Abbildung 18).

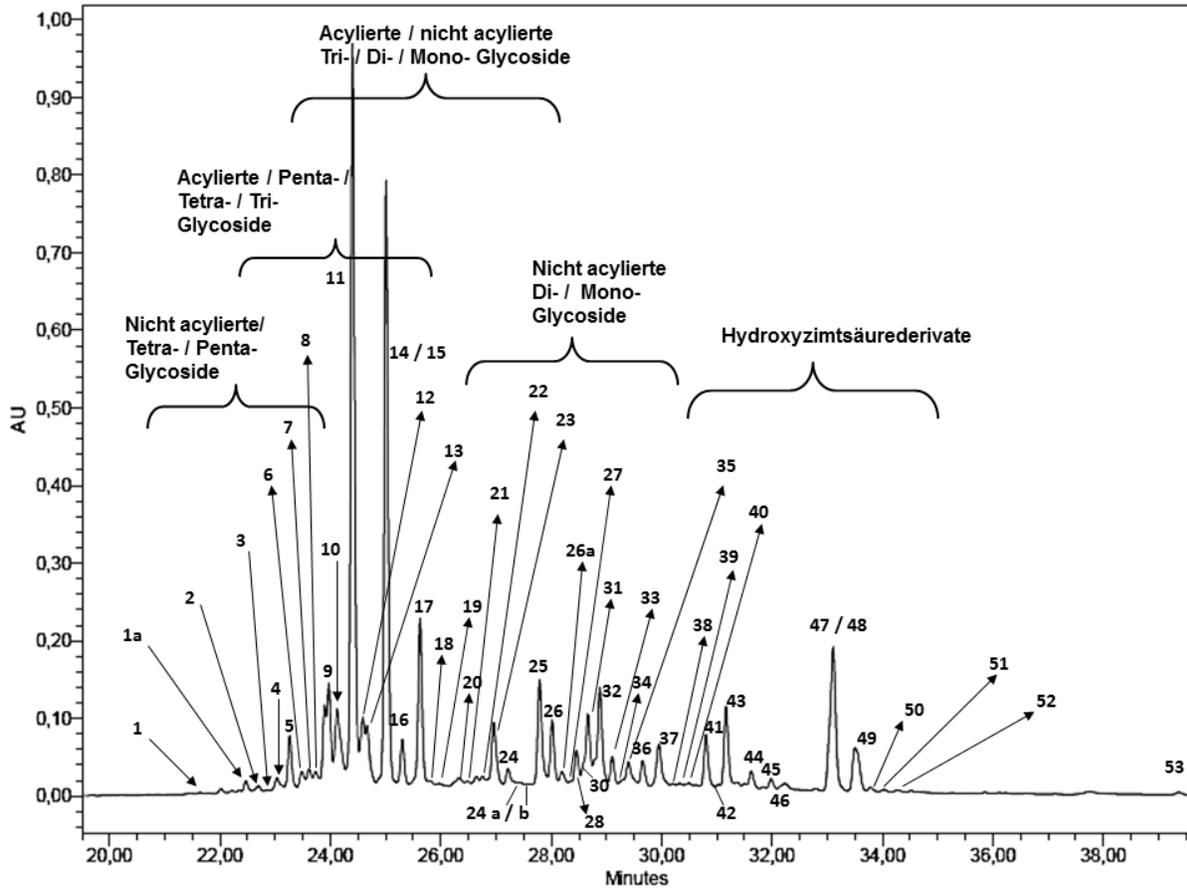


Abbildung 18: HPLC-Chromatogramm eines Flavonoid-angereicherten Grünkohl-extraktes

Elutionsmittel 75% Ethanol, Detektion bei 330 nm

Eine vollständige, eindeutige Identifizierung aller polyphenolischen Verbindungen war aufgrund fehlender Referenzsubstanzen nicht möglich; somit erfolgte u.a. ein Vergleich mit bereits identifizierten Flavonoiden in Grünkohl aus zwei publizierten Arbeiten (*Olsen et al., 2009; Schmidt et al., 2010*). Mittels LC-ESI(-)-MS<sup>2</sup> konnten Schlussfolgerungen zu Struktur der Flavonolglyka und der -glycoside, der Zuckerkomponenten, der Art der interglycosidischen Bindungen und der Acylierung getroffen werden. Das überaus komplexe Flavonoidmuster beinhaltet eine Vielzahl unterschiedlicher Derivate der Flavonolglyka Quercetin und Kaempferol. Diese waren in Position 3 und 7 mit insgesamt bis zu 5 Glucoseresen verknüpft, wobei eine zusätzliche Acylierung mit Hydroxyzimtsäuren gezeigt werden konnte. UV-Daten der Flavonoide konnten zusätzlich zur Identifizierung genutzt werden. Typische UV-Maxima für Quercetin waren 254 (Bande II) und 364 nm (Bande I); für Kaempferol lagen diese bei 265 und 364 nm. Die Wellenlänge der UV-Maxima wird durch

die Art und Position unterschiedlicher Substituenten beeinflusst. Eine Glucosylierung in Position 7 hat beispielsweise keinen großen Einfluss auf die UV-Maxima (*Olsen et al., 2009*). Die Zuordnung und Interpretation der per LC-ESI(-)-MS<sup>2</sup> gewonnenen Fragmente erfolgte nach einer Methode von *Ferreres et al. (2004)*. Es konnten 9 Quercetinglycoside, 19 acylierte Quercetinderivate, 8 Kaempferolglycoside, 13 acylierte Kaempferolderivate und 12 Hydroxyzimtsäurederivate im Flavonoid-angereicherten Extrakt identifiziert werden (Elutionsmittel 75% Ethanol). *Olsen et al. (2009)* und *Schmidt et al. (2010)* postulieren aufgrund spezifischer Fragmentationsmuster in HPLC/MS-Untersuchungen von Grünkohlextrakten, dass Glucose die einzige Zuckerkomponente der im Grünkohl enthaltenen Flavonoidglycoside darstellt. Das spezifische Fragment [M-H-162]<sup>-</sup> aus der ESI(-)-MS-Messung entspricht einem Molekulargewicht von 180 g/mol, welches nur einer Hexose zugeordnet werden kann. Mit Hilfe der Acetylierung und der anschließenden gaschromatographischen Untersuchung (3.8.2) der Wasserphase eines ausgeschüttelten Grünkohlhydrolysats konnte in eigenen Untersuchungen gezeigt werden, dass Glucose (39%) und Arabinose (50%) die Hauptzucker im untersuchten Extrakt bilden. Pentosen sind jedoch in den Massenspektren nicht identifiziert worden. Der hohe Anteil an Arabinose lässt sich durch restliche Verunreinigungen an Pektin- und Hemicellulosefragmente im Extrakt erklären, da bei der Herstellung des Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakts mit Hilfe von Pektinase und Cellulase gearbeitet wurde. *Will et al. (2006)* konnte in einem Apfelextrakt, der über ein Adsorberharz aufgereinigt war und aus einem Apfelsaft hergestellt wurde, neben den gewünschten polyphenolischen Substanzen auch 20% Oligo- oder Polysaccharide quantifizieren. Diese Zuckerfraktion bestand hauptsächlich aus Pektin und Hemicellulosezuckern wie Arabinose und Xylose.

Die Glucoseeinheiten der Flavonoide lagen teilweise als Sophorosid vor, ein Disaccharid aus zwei 1→2 glycosidisch verknüpften Glucosen, was durch definierte Fragmente im Massenspektrum bewiesen werden konnte. Eine detaillierte Auflistung der identifizierten Peaks mit den dazugehörigen analytischen Daten wurde in Tabelle 6 zusammengestellt (Retentionszeit ( $t_r$  in min), Area (%)) bei 330 nm, UV-Maxima ( $\lambda$  in nm), Molekulargewicht (MW in g/mol), Molpeak ([M-H]<sup>-</sup>), MS Fragmente). Flavonol-Sophoroside konnten von

Flavonol-X,Y-diglucosiden durch den entstandenen Basispeak und durch das Vorhandensein spezifischer Fragmente identifiziert werden. Die Abspaltung einer Glucose ist mit  $\Delta 162$  amu (atomic mass units), die Abspaltung eines Disaccharids mit  $\Delta 324$  amu detektierbar. Sind die Glucosereste 1 $\rightarrow$ 2 glycosidisch verknüpft, konnten im Massenspektrum die Fragmente 120 und 180 amu detektiert werden. *Llorach et al. (2003)* und *Ferreres et al. (2004)* konnten zeigen, dass das erste abgespaltene Fragment immer der Position 7 im Aglykon zuzuordnen ist, während die restlichen Glucoseeinheiten in Position 3 vorliegen. Bei Flavonoid-diglycosiden mit einem Basispeak bei  $[M-H-324]^-$ , wurde auf ein Flavonol-Sophorosid geschlossen, welches in Position 3 glycosyliert vorlag (Peak: 24a, 27, 29, 31, 33, 34, 36, 37). Flavonole mit drei Glucoseresten konnten wie folgt charakterisiert werden: ein Flavonol-X-Sophorosid-Y-glucosid zeigte im  $MS^2$ -Spektrum ausschließlich den Basispeak bei  $[M-162]^-$ , dazu gehörten die Peaks 1a, 10, 12, 16, 18, 23 und 38; wohingegen Sophorotrioside die charakteristischen Fragmente von 120, 180 und 324 amu aufwiesen (Peak 20, 24b, 25, 26, 32). Quercetin-3-O-sinapoyl-triglucosid (Peak 20) war in Position 3 mit einem Triglycosid verknüpft, wobei zusätzlich eine Acylierung mit Sinapinsäure vorlag. Außerdem konnte ein Shift der Bande II zu kleineren Wellenlängen beobachtet werden (364 $\rightarrow$ 327 nm), was für eine Acylierung mit Hydroxyzimtsäuren sprach (*Santos-Buelga et al., 2003*). Der Basispeak entsprach dem Quercetin-triglucosid (993 $\rightarrow$ 787,  $\Delta 206$ ), also einer Abspaltung einer Sinapinsäure.  $MS^2$ -Spektren von Flavonoid-tetraglycosiden können abhängig vom Basispeak als X-Sophorotriosid-Y-glucosid  $[M-H-162]^-$  oder als X-Sophorosid-Y-Sophorosid  $[M-H-324]^-$  charakterisiert werden. Peaks wie 1, 6, 8, 11, 13, 19 und 35 entsprachen dem X-Sophorotriosid-Y-glucosid-Typ, während die Peaks 5, 9 und 14 als Flavonol-X-Sophorosid-Y-Sophorosid identifiziert wurden. Mit einem Anteil von 15% an der Gesamtfläche eines angereicherten Grünkohlextraktes und einem Molekulargewicht von 1140 g/mol stellte Kaempferol-3-O-sinapoyl-Sophorosid-7-O-Sophorosid (Peak 14, Abbildung 19) neben Quercetin-3-O-sinapoyl-Sophorotriosid-7-O-glucosid (Peak 11) eines der Hauptflavonoide dar. Im  $MS^2$ -Spektrum von Peak 14 zeigte der Verlust von 162 amu eine Abspaltung von einem Molekül Glucose, während die Fragmente 180 und 120 amu ein Indiz für eine 1 $\rightarrow$ 2 glycosidische Bindung waren. Die Interpretation, welche glycosidische Bindung vorliegt, ist außerdem abhängig vom Basispeak; dieser ist deutlich in Abbildung 19 im  $MS^2$ -Spektrum bei

815  $m/z$  erkennbar und signalisierte mit der Abspaltung von 324 amu (Diglucosid) ein Sophorosid in Position 7 des Aglykons. Der Verlust von 206 amu (815→609) entsprach der Abspaltung der Sinapinsäure und signalisierte die Acylierung in Position 3 (Bandenshift 364→333 nm). Wurde der Basispeak bei einem Flavonol-tetraglycosid mit  $[M-162]^-$  gebildet und traten außerdem spezifische Fragmente wie 180 amu auf, konnte die erste Abspaltung (ein Glucosemolekül) Position 7 zugeordnet werden, während der Rest einem Sophorotriosid in Position 3 entsprach (Peak 19, Kaempferol-3-O-Sophorotriosid). Die Acylreste der Flavonolglycoside bildeten Sinapinsäure ( $\Delta$  206 amu), Ferulasäure ( $\Delta$  176 amu) oder Hydroxyferulasäure ( $\Delta$  192 amu). Die Interpretation welcher Glucoserest (ob in Position 3 oder 7 im Aglykon) acyliert vorliegt, ist noch umstritten, und könnte per NMR detaillierter untersucht werden (Llorach *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2010). Interglycosidische Bindungen der Flavonoidglycoside, die aufgrund unspezifischer Fragmente nicht zugeordnet werden konnten, wurden mit X, Y bezeichnet. Einige ausgewählte Massenspektren befinden sich im Anhang (Signal 6, 7, 8, 24b, 14, 16 und 32a).

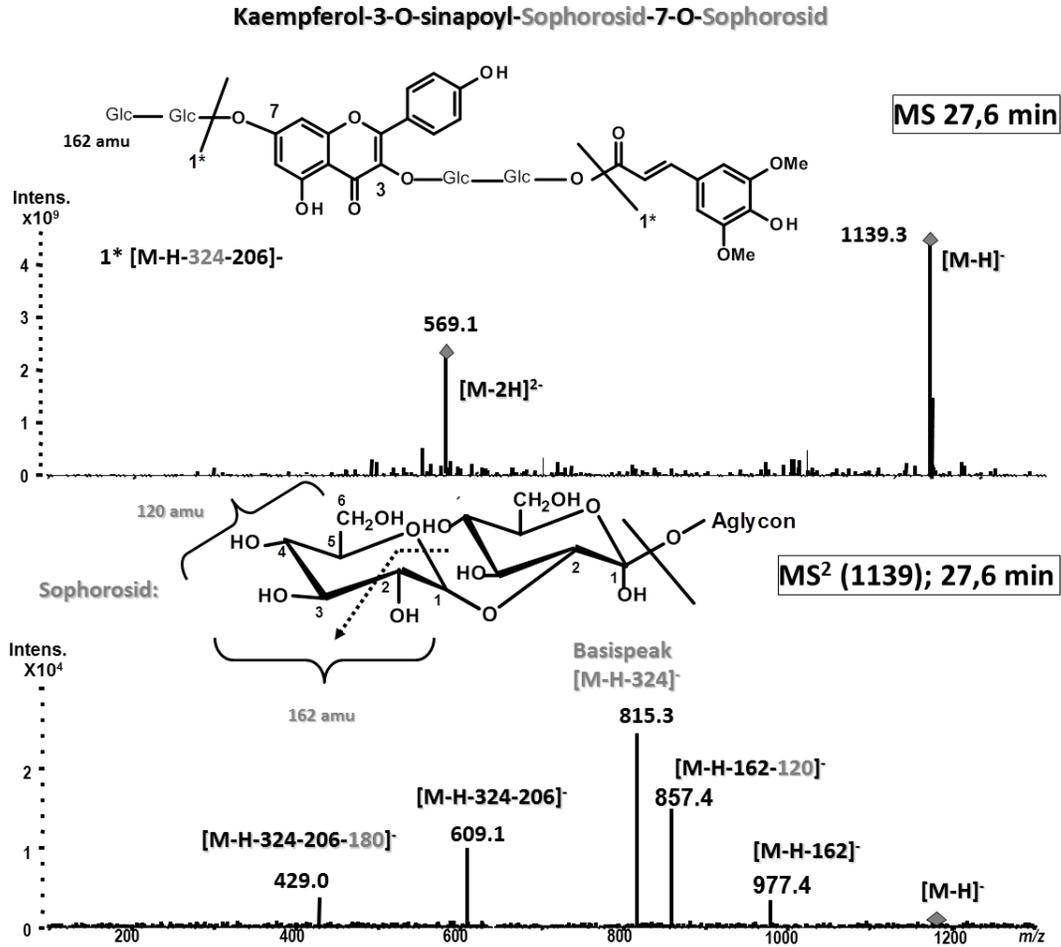


Tabelle 6: Charakterisierung polyphenolischer Substanzen in einem Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakt

Identifizierung	Peak	t <sub>r</sub> (min)	Area (%)	λ <sub>max</sub> (nm)	MW (g/mol)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmente / MS <sup>2</sup> (Basispeak)	Bindung
<b>Quercetinglycoside</b>								
Quercetin-3-O-triglucosid-7-O-glucosid	1	21,6	0,1	254/310	950	949	787 (-162) 625 (-162) 445 (-180) 301	Sophoro-triosid
Quercetin-3-O-triglucosid-7-O-glucosid	2	22,7	0,3	257/320	950	949	787 (-162) 625 (-162) 463 (-162)	X,Y
Quercetin-3-O-diglucosid-7-O-glucosid	1a	22,5	0,4	254/352	788	787	625 (-162) 505 (-120) 463 (-324)	Sophorosid
Quercetin-3-O-diglucosid-7-O-glucosid	23	27,0	2,9	254/352	788	787	625 (-162) 463 (-324)	Sophorosid
Quercetin-3-O-triglucosid	25	27,8	3,5	245/339	788	787	625 (-162) 463 (-324) 445 (-180)	Sophoro-triosid
Quercetin-3-O-diglucosid	34	29,3	n.d.		626	625	505 (-120) 463 (-162) 301 (-324)	Sophorosid

Quercetin-3-O-triglucosid-7-O-glucosid	35	29,4	1,6	254/350	950	949	787 (-162)	Sophoro-triosid
Quercetin-3-O-glucosid	35a	Co.35			464	463	927 [2M-H] <sup>-</sup> 301 (-162)	-
Quercetin-3-O-glucosid	44	31,6	0,6	241/329	464	463	301 (-162)	
<b>acylierte Quercetinglycoside</b>								
Quercetin-3-O-sinapoyl-triglucosid-7-O-glucosid	3	22,9	0,1	254/343	1156	1155	993 (-162) 787 (-368) 625 (-162) 463 (-162)	X,Y
Quercetin-3-O-hydroxyferuloyl-triglucosid-7-O-glucosid	6	23,5	0,7	250/337	1142	1141	978 (-162) 949 (-192) 625 (-516) 445 (-180)	Sophoro-triosid
Quercetin-3-O-hydroxyferuloyl-diglucosid-7-O-glucosid	7	23,6	0,8	246/340	980	979	817 (-162) 787 (-192) 625 (-162)	X,Y
Quercetin-3-O-sinapoyl-triglucosid-7-O-glucosid	8	23,7	0,7	246/335	1156	1155	577 [M-2H] <sup>2-</sup> 993 (-162) 831 (-162) 667 (-120) 949 (-206) 787 (-162) 625 (-162) 463 (-162)	Sophoro-triosid
Quercetin-3-O-sinapoyl-triglucosid-7-O-glucosid	11	24,4	18,9	246/341	1156	1155	577 [M-2H] <sup>2-</sup> 993 (-162) 949 (-206) 831 (-324) 787 (-162) 625 (-162)	Sophoro-triosid
Quercetin-3-O-sinapoyl-diglucosid-7-O-glucosid	12	24,6	2,1	250/340	994	993	496 [M-2H] <sup>2-</sup> 831 (-162) 787 (-206) 625 (-162) 463 (-162)	Sophorosid
Quercetin-3-O-feruloyl-diglucosid-7-O-glucosid	15	Co. 25,0	-	-	964	963	801 (-162) 787 (-176) 625 (-338)	X,Y
Quercetin-3-O-sinapoyl-diglucosid-7-O-glucosid	17	25,6	5,3	239/332	994	993	831 (-162) 787 (-206) 625 (-162) 463 (-162)	X,Y
Quercetin-3-O-sinapoyl-triglucosid	20	26,3	0,9	243/327	994	993	787 (-206) 667 (-120) 625 (-324) 445 (-180) 463 (-486) 301	Sophoro-triosid
Quercetin-3-O-feruloyl-diglucosid	22	26,7	0,5	240/ 327	818	817	625 (-192) 463 (-162)	X,Y
Quercetin-3-O-sinapoyl-diglucosid-7-O-glucosid	24b	27,6	0,3	247/335	994	993	831 (-162) 787 (-206) 625 (368) 505 (-120) 445 (-180) 463 (-486) 301	Sophorosid
Quercetin-3-O-sinapoyl-diglucosid	26a	28,2	0,8	244/334	832	831	625 (-206) 607 (224) 301	X,Y

Quercetin-3-O-disinapoyl-triglucosid-7-O-diglucosid	28	28,5	0,8	251/334	1524	761	761 [M-2H] <sup>2-</sup> 1200 [M-H-324] <sup>-</sup> , 993 [M-H-530] <sup>-</sup> 787 (993-162), 301	Sophorotriosid, Sophorosid
Quercetin-3-O-feruloyl-diglucosid	31	Co. 28,7			802	801	625 (-176) 445 (-180) 463 (-338) 301	Sophorosid
Quercetin-3-O-disinapoyl-triglucosid-7-O-glucosid	31	Co. 28,7			1362	680	680 [M-2H] <sup>2-</sup> 599 [M-2H] <sup>2-</sup> (1200) also -162	X,Y
Quercetin-3-O-sinapoyl-diglucosid-7-O-glucosid	38	30,2	0,3	240/328	994	993	831 (-162) 787 (-206) 625 (-368) 463 (-531)	Sophorosid
Quercetin-3-O-sinapoyl-glucosid-7-O-glucosid	39	30,5	0,3	241/330	832	831	669 (-162) 625 (-206) 463 (-368) 301	-
Quercetin-3-O-feruloyl-diglucosid	40	30,6	0,2	244/326	802	801	625 (-176) 463 (-338) 301	X,Y
Quercetin-3-O-sinapoyl-diglucosid	49	33,5	1,9	240/337	832	831	625 (-206)	X,Y

Identifizierung	Peak	t <sub>r</sub> (min)	Area (%)	λ <sub>max</sub> (nm)	MW (g/mol)	[M-H] <sup>-</sup>	Fragmente/ MS <sup>2</sup> (Basispeak)	Bindung
<b>Kaempferol-glucoside</b>								
Kaempferol-3-O-diglucosid-7-O-diglucosid	5	23,3	1,7	246/340	934	933	771 (-162), 807 [M-H-162+Cl] <sup>-</sup> , 651 (-120), 609 (-324)	Sophorosid - Sophorosid
Kaempferol-3-O-triglucosid-7-O-glucosid	13	24,7	2,1	268/335	934	933	771 (-162), 609 (-162)	Sophoro-triosid
Kaempferol-3-O-triglucosid-7-O-glucosid	19	26,0	0,6	268/331	934	933	771 (-162), 609 (-324), 591 (-180), 429 (-180), 285	Sophoro-triosid
Kaempferol-3-O-glucosid-7-O-glucosid	24a	27,4	0,4	246/334	610	609	489 (-120), 447 (-162), 285 (-324)	Sophorosid
Kaempferol-3-O-triglucosid	26	28,0	2,1	265/346	772	771	609 (-162), 591 (-180), 447 (-324), 285	Sophoro-triosid
Kaempferol-3-O-diglucosid	29	n.d.			610	609	645 [M+Cl] <sup>-</sup> , 447 (-162), 489 (-120), 429 (-180), 285	Sophorosid
Kaempferol-3-O-diglucosid	37	30,0	1,9	238/324	610	609	447 (-162), 429 (-180), 327 (-120), 285	Sophorosid
Kaempferol-3-O-glucosid	41	30,8	1,7	265 /347	448	447	895 [2M-H] <sup>-</sup>	
Kaempferol	53	39,4	0,1	265/364	286	285		
<b>acylierte Kaempferolglycoside</b>								
Kaempferol-3-O-hydroxyferuloyl-tetraglucosid	4	23,0	0,7	265/345	1126	1125	562 [M-2H] <sup>2-</sup> , 933 (-192), 771 (-162)	X;Y
Kaempferol-3-O-hydroxyferuloyl-diglucosid-7-O-hydroxyferuloyl-diglucosid	9	23,9	2,0	268/332	1318	1317	658 [M-2H] <sup>2-</sup> , 1125 (-192), 562 [M-2H] <sup>2-</sup> , 801 (-324), 963 (-162), 801 (-162), 609 (-192)	Sophorosid
Kaempferol-3-O-hydroxyferuloyl-diglucosid-7-O-glucosid	10	24,1	3,5	245/ 338	964	963	481 [M-2H] <sup>2-</sup> , 801 (-162), 609 (-192)	Sophorosid
Kaempferol-3-O-sinapoyl-diglucosid-7-O-diglucosid	14	25,0	15,5	268/333	1140	1139	569 [M-2H] <sup>2-</sup> , 977 (-162), 488 [M-2H] <sup>2-</sup> , 857 (-120), 815 (-324), 737 (-120), 609 (-206), 447 (-368), 429 (-180), 385 (223+162)	Sophorosid , Sophorosid
Kaempferol-3-O-sinapoyl-diglucosid-7-O-glucosid	16	25,3	1,7	268/332	978	977	815 (-162), 609 (-368)	Sophorosid

Identifizierung	Peak	t <sub>r</sub> (min)	Area (%)	λ <sub>max</sub> (nm)	MW (g/mol)	[M-H] <sup>-</sup>	Fragmente/ MS <sup>2</sup> (Basispeak)	Bindung
Kaempferol-3-O-feruloyl-diglucosid-7-O-glucosid	18	25,8	0,2	266	948	947	785 (-162), 771 (-176)	Sophorosid
Kaempferol-3-O-hydroxyferuloyl-diglucosid	27	28,4	2,1	243/346	802	801	609 (192), 429 (-180)	Sophorosid
Kaempferol-3-O-disinapoyl-triglucosid-7-O-diglucosid	30	28,6	n.b.	240/327	1508	753	753 [M-2H] <sup>2-</sup> , 1183 (-324), 977 (-206), 771 (-206), 591 (-180)	Sophorotriosid, Sophorosid
Kaempferol-3-O-sinapoyl-triglucosid	32	28,9	3,8	268/332	978	977	771 (-206), 609 (-368), 429 (-180), 285	Sophorotriosid
Kaempferol-3-O-sinapoyl-diglucosid	33	29,1	1,1	269/328	816	815	609 (-206), 429 (-180), 591 (-224), 285	Sophorosid
Kaempferol-3-O-disinapoyl-triglucosid-7-O-glucosid	33a	n.d.			1346	672	672 [M-2H] <sup>2-</sup> , 591 [M-2H] <sup>2-</sup> (1183) also -162	X,Y
Kaempferol-3-O-feruloyl-diglucosid	36	29,7	1,0	266/324	786	785	821 [M+Cl] <sup>-</sup> , 609 (-176), 429 (-180), 285	Sophorosid
Kaempferol-3-O-sinapoyl-diglucosid	52a	34,3	0,1		816	815	609 (-206), 591 (-224), 285	X,Y
<b>Hydroxyzimtsäure-derivate</b>								
Sinapoylferuloyl-triglucosid	21	26,5	0,4	245/331	886	885	723 (-162), 499 (-224)	X,Y
Disinapoyl-diglucosid	24	27,2	1,0	247/339	754	753	529 (-224)	X,Y
Sinapoylferuloyl-diglucosid	31	28,7	2,7	241/334	724	723	561 (-162), 337 (-224), 223	X,Y
Disinapoyl-feruloyl-triglucosid	32a	n.d.	-		1092	1091	929 (-162), 705 (-224)	X,Y
Disinapoyl-diglucosid	42	31,0	0,2	240/331	754	753	529 (-224), 223	X,Y
Sinapoyl-feruloyl-diglucosid	43	31,2	2,5	240/331	724	723	529 (-194), 499 (-224)	X,Y
Disinapoyl-diglucosid	45	32,0	0,3	239/331	754	753	591 (-162), 529 (-224), 223	X,Y
Sinapoylferuloyl-diglucosid	46	32,2	0,3	234/329	724	723	529 (-194), 499 (-224)	X,Y
Trisinapoyl-diglucosid	47	33,1	5,3	240/331	960	959	735 (-224), 529 (-206), 511, (-224)	X,Y
Disinapoyl-glucosid	48	33,1	n.b.		592	591	367 (-224), 223	X,Y
Disinapoyl-feruloyl-diglucosid	50	33,8	0,1	240/329	930	929	705 (-224), 591 (-338), 449 (-206)	X,Y
Sinapoyl-feruloyl-glucosid	51	34,3	0,1	241/337	562	561	337 (-224), 223 (Sinapinsäure)	

n.d. : nicht detektierbar, n.b. : nicht bestimmbar, Co.: Coelution ; t<sub>r</sub> : Retentionszeit (min) und λ (nm) der UV-Maxima unter den in Punkt 3.8.1.1 beschriebenen Bedingungen

### 4.2.1.3 Einfluss des Blanchierens auf den Flavonoidgehalt des Grünkohls

Grünkohl, der über den Großmarkt-CITTI in Kiel bezogen worden war, wurde nach der Ernte direkt blanchiert (bl.) (98 °C für 3 min). Im Vergleich zu diversen BIO-Sorten war der Gesamtflavonoidgehalt des CITTI-GKs wesentlich niedriger (Tabelle 5). Daher wurde der Einfluss des Blanchierens auf den Flavonoidgehalt untersucht. Die Gesamtflavonoidgehalte des im Januar 2010 geernteten und unterschiedlich behandelten Grünkohls aus Schwerin sind in Abbildung 20 dargestellt und wurden 3-mal analysiert. Der nicht behandelte GK wies einen Gesamtflavonoidgehalt von  $2\,650 \pm 230$  ppm in der Frischmasse (FM) auf. Durch das Waschen mit kaltem Wasser war ein Verlust an Flavonoiden von 15% zu verzeichnen. Eine signifikante Abnahme im Gesamtflavonoidgehalt war bereits bei einer Blanchierdauer von 1 min zu verzeichnen. Bei einer Blanchierdauer von 3 min gingen bis zu 36% der Flavonoide verloren und es konnten noch ca. 1 700 ppm quantifiziert werden. Nach 5 min des Blanchierens waren 50% der Gesamtflavonoide verloren gegangen. Die Untersuchungen eines im November 2009 geernteten Grünkohls ergaben ähnliche Ergebnisse (3 min Blanchieren → 25% Verlust und 5 min Blanchieren → 30% Verlust).

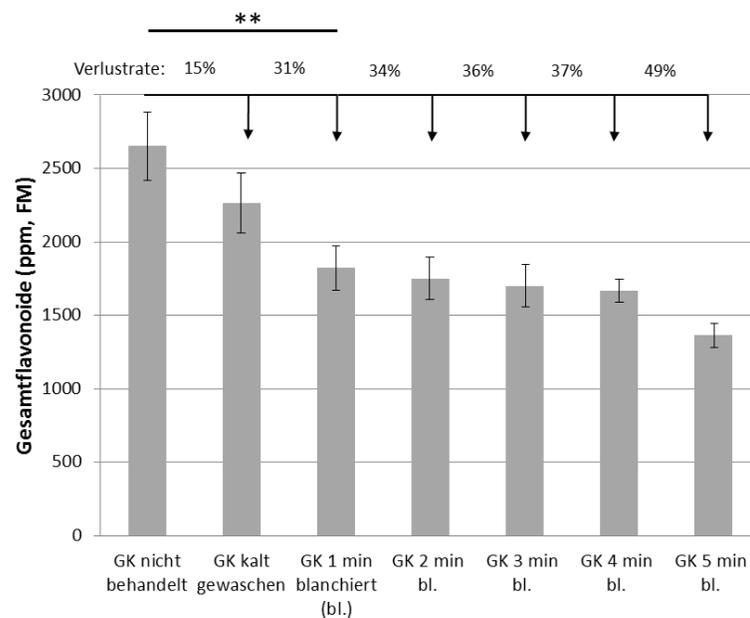


Abbildung 20: Vergleich der Gesamtflavonoidgehalte (ppm bezogen auf die Frischmasse FM) von unbehandeltem und blanchiertem Grünkohl mit Verlustraten (n=3)

Um präzisere Aussagen über den Verlust der Flavonoidbestandteile zu treffen, wurden nach Hydrolyse (3.7.1, 3 mal durchgeführt) und Abspaltung der Glycosidreste die Flavonoidaglyka-Gehalte der Grünkohlproben per HPLC quantifiziert (Abbildung 21). Im nicht behandelten Grünkohl vom Januar 2010 ist nach 30 minütiger Hydrolyse Quercetin mit  $270 \pm 60$  ppm und Kaempferol mit  $230 \pm 50$  ppm bezogen auf die Frischmasse quantifiziert worden. Nach einem 3 minütigen Blanchieren sind bereits bis zu 60% der Flavonoide verloren gegangen. Nach einem Blanchierprozess von 5 min konnten nur noch 30% der Flavonoide gefunden werden. Auch bei den Untersuchungen im November 2009 waren solche hohen Verluste zu verzeichnen. Hier waren bis zu 80% der Flavonoide nach 5 minütigem Blanchieren verloren gegangen. Die Aglyka-Gehalte des unbehandelten Grünkohls, der im November 2009 geerntet wurde, wiesen nach Hydrolyse  $132 \pm 10$  ppm Quercetin und  $240 \pm 20$  ppm Kaempferol auf. Die Gesamtflavonoidgehalte der im November 2009 und Januar 2010 geernteten unbehandelten Grünkohlproben unterschieden sich nicht voneinander und lagen bei 2 300-2 600 ppm in der Frischmasse.

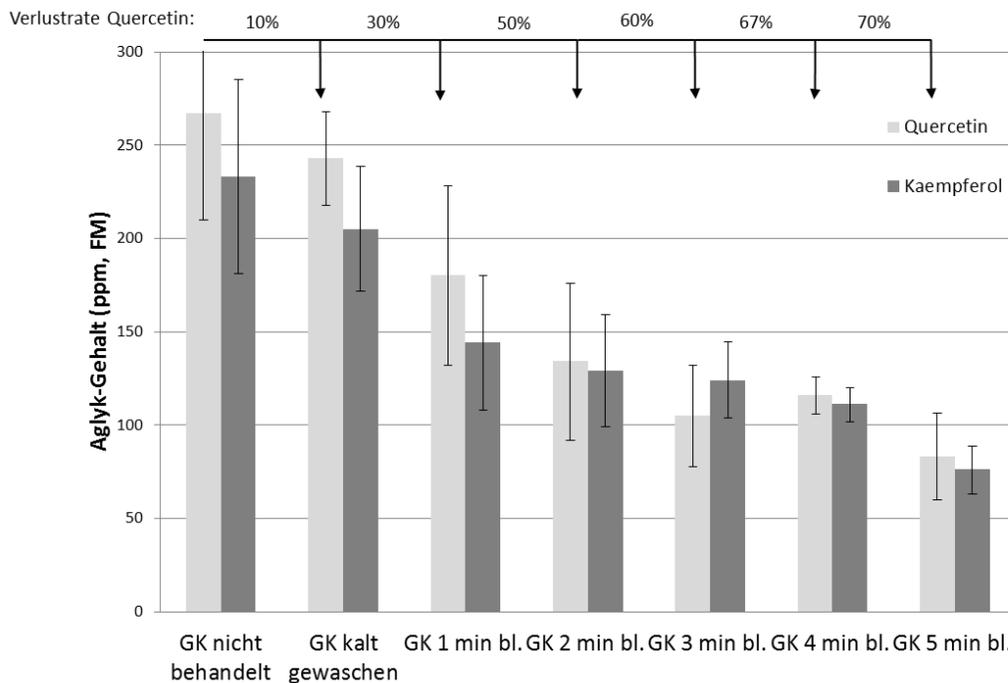


Abbildung 21: Quercetin- und Kaempferol-Gehalt (ppm, FM) des unbehandelten und blanchierten Grünkohls nach Hydrolyse ( $n=3$ )

#### 4.2.1.4 Fraktionierung eines Flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes und Inhibition des *hSGLT1*

Eine Fraktionierung eines Flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes (hergestellt wie unter 3.6.2 beschrieben) sollte anfangs über das unterschiedliche Lösungsverhalten der polyphenolischen Komponenten durchgeführt werden. Vorversuche hatten gezeigt, dass sich der Extrakt fast vollständig in Aqua bidest. gelöst hatte. Die Restmengen wurden nach Zentrifugation und Dekantieren nacheinander in unterschiedlichen Konzentrationen an Ethanol (5, 10, 25, 50, 75 und 100%) gelöst. Nach diesen Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass das Lösungsverhalten der teilweise acylierten Flavonoidglycoside sehr ähnlich ist und für eine Auftrennung der Substanzen nicht genutzt werden konnte. Die Etablierung einer semi-präparativen HPLC-Methode erlaubte die Gewinnung einzelner Grünkohlfraktionen. Fraktionen wurden je nach 2 min und nach 4 min gesammelt. Abbildung 22 zeigt beispielhaft HPLC-Chromatogramme der Fraktionen, die alle 4 min aus einem Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakt gewonnen wurden und die dazugehörige Inhibition des  $\alpha$ -MDG Stroms im ‚two-electrode-voltage-clamp‘ Versuch, der durch die Projektpartner der TUM durchgeführt wurde. Fraktionen 8-11 wurden verworfen, da hier im Vergleich zu Fraktionen 1-7 keine nennenswerten Mengen an Flavonoiden detektierbar waren. Die Inhibitionswerte gelten für je 1 mg/mL Extrakt, die für die Messungen am humanen SGLT1 (*hSGLT1*) eingesetzt wurden. Zur besseren Einschätzung und Vergleichbarkeit der Fraktionen hinsichtlich ihrer Inhibition am *hSGLT1*, wurden die Peaks bei 330 nm als Rutinäquivalente bestimmt und in Abbildung 22 mit aufgeführt (Rutin = Quercetin-3-O-diglucosid). In Fraktion 3, 4 und 5 konnten die höchsten Mengen an Flavonoiden quantifiziert werden. Die detaillierte Identifizierung und Quantifizierung der Signale in allen Fraktionen erfolgte per HPLC-ESI(-)-MS<sup>2</sup>, wobei hier nur ausgewählte Ergebnisse gezeigt werden. Im Rahmen dessen soll auf die drei Hauptfraktionen mit den höchsten Peaks eingegangen werden. Die Interpretation der MS-Spektren und der analytischen Daten sind aus Punkt 4.2.1.2 und Tabelle 4 entnehmbar. In Fraktion 3 fanden sich fast ausschließlich acylierte Quercetin- und Kaempferol-tri- und -tetraglucoside. Peak 12 mit 392 390 ppm Rutin und einer Retentionszeit von 24,6 min entsprach dem Quercetin-3-O-sinapoyl-Sophorosid-7-O-glucosid. 1 mg/mL dieser Fraktion mit einem Gehalt von 947 220 ppm

zeigte im Oozytenmodell eine Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Stroms (1 mM) von 10%. Peak 14 konnte mit 391 490 ppm in Fraktion 4 mit Kaempferol-3-O-sinapoyl-Sophorosid-7-O-Sophorosid als Hauptkomponente charakterisiert werden. In dieser Fraktion überwogen acylierte Flavonol-triglycoside, wobei auch -diglucoside detektierbar waren. Fraktion 4 mit einem Gehalt von 639 670 ppm in der Trockenmasse (TM) konnte den  $\alpha$ -MDG-Transport im Oozytenmodell mit 1 mg/mL um 22% reduzieren. 1 mg/mL Fraktion 5 mit einem Gehalt von 765 250 ppm zeigte mit 60% die stärkste Inhibition. In Fraktion 5 konnten eine Vielzahl von Flavonolderivaten detektiert werden. Hier waren u.a. acylierte Flavonol-tri und auch -diglucoside vertreten. Flavonolderivate mit den Peaks 27, 29 und 33 bildeten zusammen mit 349 890 ppm die Hauptkomponenten in dieser Fraktion. Bei einer Retentionszeit von 28,4 min eluierte Kaempferol-3-O-hydroxyferuloyl-Sophorosid (Peak 27) und konnte mit 118 300 ppm als Hauptkomponente dieser Fraktion identifiziert werden.

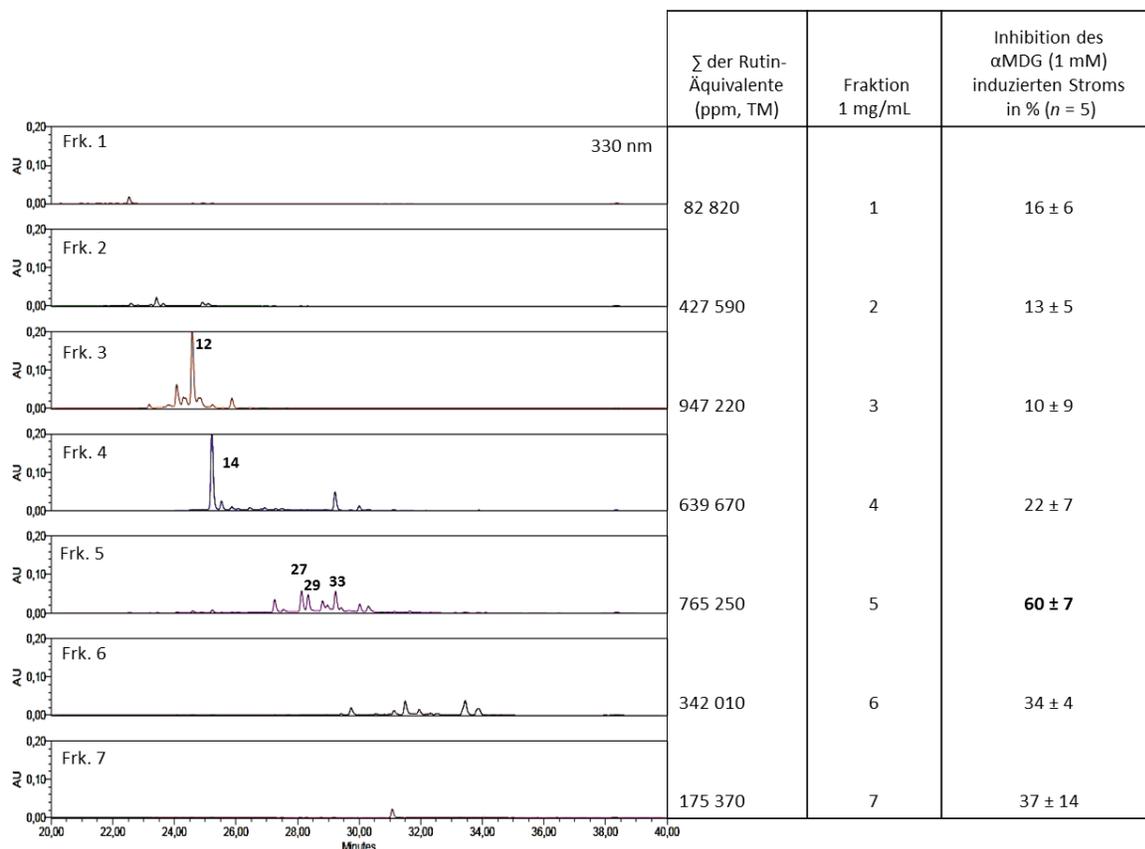


Abbildung 22: HPLC-Chromatogramme der Fraktionen (4 min) eines Grünkohlextraktes mit jeweiliger Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Stroms

Die 2 min Fraktionen ergaben in den Inhibitionstestungen ähnliche Werte, wobei Fraktion 9 mit 734 730 ppm Rutinäquivalenten die höchste Inhibition mit 66% aufzeigte. Fraktion 10 mit 662 550 ppm inhibierte den *hSGLT1* mit 59%. In diesen Fraktionen lagen zum Teil acylierte Quercetin und Kaempferol-tri und -diglucoside vor. Auch konnten in Fraktion 10 Flavonolglycoside detektiert werden, die nicht acyliert und mit 2 Glucosemolekülen glycosiliert waren. Fraktion 6 hingegen zeigte mit dem höchsten Wert an Flavonolderivaten (1 107 270 ppm) eine geringe Inhibition des 1 mM  $\alpha$ -MDG Stroms mit 15%. Hier lagen fast ausschließlich acylierte Flavonol-triglucoside im Extrakt vor.

#### 4.2.2 Charakterisierung eines Zwiebelextraktes

Ein Zwiebelextrakt der Firma *Wellness & Health Care* wurde per HPLC/ESI(-)-MS<sup>2</sup> charakterisiert. Für Humanstudien, die durch Projektpartner in Freising (TUM) durchgeführt worden sind, wurde der Gesamtflavonoidgehalt mit 188 030±20 460 ppm (berechnet als Hyperosid) im Trockenmaterial bestimmt. Abbildung 23 zeigt das Flavonoidmuster des Zwiebelextraktes an einem HPLC-Chromatogramm bei 330 nm. Durch den Vergleich mit Referenzsubstanzen, UV-Spektren und durch massenspektrometrische Untersuchungen mit Elektro-Spray-Ionisation im negativen Modus konnten bis zu 20 Inhaltsstoffe identifiziert werden (Tabelle 7).

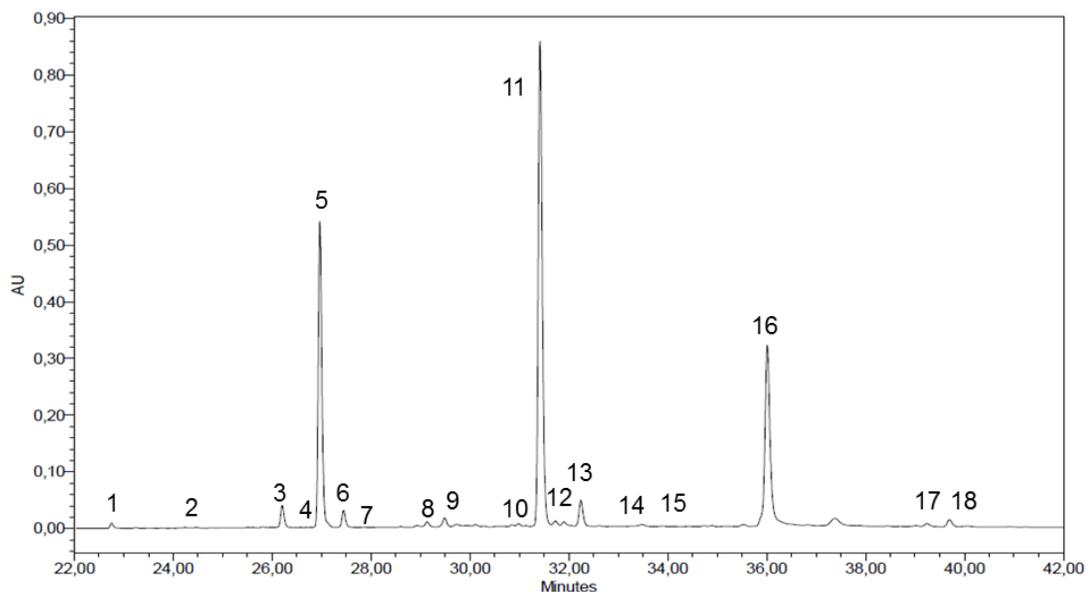


Abbildung 23: HPLC-Chromatogramm eines Zwiebelextraktes, Detektion bei 330 nm

Die drei Hauptflavonoide sind Quercetin-3,4'-O-diglucosid (Peak 5: 52 320±733 ppm), Quercetin-4'-O-glucosid (Peak 11: 95 100±390 ppm) und Quercetin (Peak 16: 57 990±2 980 ppm). LC-ESI-MS Untersuchungen zeigten für Peak 5 ein starkes Fragment mit  $m/z$  625  $[M-H]^-$ , welches nach Beschuss mit Helium in  $m/z$  463  $[M-H-162]^-$  und  $m/z$  301  $[M-H-324]^-$  fragmentierte und der Abspaltung von zwei Glucosemolekülen entsprach. Das MS-Spektrum von Peak 11 zeigte mit  $m/z$  463  $[M-H]^-$  ein Mono-glucosid an und ein  $[2M-H]^-$  Ion bei  $m/z$  927. Peak 16 konnte mit  $m/z$  301  $[M-H]^-$  Quercetin zugeordnet werden. Neben Kaempferol, konnte auch Isorhamnetin und deren Derivate detektiert werden. So sind die Derivate des Quercetins und das Aglykon selbst mit fast 21% im Gesamtextrakt vorhanden und bilden die Hauptvertreter der Flavonole. Mit Hilfe der TEVC-Messungen in Freising konnte mit 1 mg/mL Zwiebelextrakt eine Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Stroms von bis zu 86±3% erreicht werden.

Tabelle 7: Identifizierte Flavonole in einem Zwiebelextrakt per HPLC-ESI(-)-MS<sup>2</sup>

Peak	Identifizierung/ MW (g/mol)	t <sub>r</sub> (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	$[M-H]^-$ (m/z)	MS <sup>2</sup>
1	Quercetin-triglucosid / 788	22,8	250/345	787	823 $[M+Cl]^-$ , 625 (-162)
2	Quercetin-diglucosid / 626	24,2	253/355	625	463 (-162)
3	Quercetin-triglucosid / 788	26,2	252/364	787	823 $[M+Cl]^-$ , 625 (-162), 463 (-324)
4	Quercetin-triglucosid / 788	26,7	265/345	787	823 $[M+Cl]^-$ , 625 (-162)
5	Quercetin-3,4'-O-diglucosid / 626	26,9	265/345	625	463 (-162), 301 (-324)
6	Isorhamnetin-diglucosid / 640	27,4	251/345	639	477 (-162), 315 (-324)
7	Quercetin-diglucosid / 626	28,6	249/364	625	463 (-162), 301 (-324)
8	Quercetin-diglucosid / 626	29,1	254/364	625	
9	Quercetin-glucosid / 464	29,5	254/356	463	927 $[2M-H]^-$
10	Quercetin-diglucosid / 626	31,0	252/360	625	301 (-324)
11	Quercetin-4'-O-glucosid / 464	31,4	252/364	463	927 $[2M-H]^-$
12	Kaempferol-glucosid / 448	31,9	266/363	447	
13	Isorhamnetin-glucosid / 478	32,2	252/364	477	
14	Quercetin-glucosid / 464	33,5	250/360	463	301 (-162)
15	Quercetin-glucosid / 464	34,7	252/361	463	301 (-162)
16	Quercetin / 302	36,0	254/364	301	
17	Kaempferol / 286	39,2	265/364	285	
18	Isorhamnetin / 316	39,7	254/364	315	

### 4.2.3 Charakterisierung von Citrusextrakten

Die genaue Zusammensetzung zweier Citrusextrakte wurde per HPLC-DAD untersucht. Zunächst wurde die Löslichkeit eines Grapefruitextraktes (C1) und eines Bitterorangenextraktes (C2) getestet. Als Extraktionsmittel wurde Aqua bidest., Methanol 70% und Methanol 100% verwendet, wobei die Löslichkeit aller Citrusflavonoide bei 30-minütiger Ultraschallextraktion von 1 mg Extrakt in 1 mL Extraktionsmittel erfolgte. Die Extraktion wurde je 3-mal durchgeführt. Die höchste Ausbeute an Flavonoiden konnte mit 100% Methanol erreicht werden, ca. 20-30% mehr als mit 1 mL Aqua bidest. (Tabelle 8).

Tabelle 8: Gehalt (ppm, TM) von Citrusflavonoiden abhängig vom Extraktionsmittel (n=3)

Extrakt	Lösungs- mittel	Narirutin	Naringin	Naringenin-7- O-glucosid	Naringenin
C1:	Methanol 100%	103 530±8 620	255 730±18 980	8 970±470	30 360±2 350
Grapefruit Extrakt	Methanol 70%	88 170±21 140	250 530±13 490	7830±340	26 020±6 080
C2:	Aqua bidest.	90 210±2 240	222 470±4 580	8 250±580	25 650±550
Bitter- orangen Extrakt	Methanol 100%	-	295 010±18 290	145 590±880	6 940±290
	Methanol 70%	-	263 260±17 130	129 550±7 940	6 060±290
	Aqua bidest.	-	218 900±18 110	107 270±9 090	5 020±380

Abbildung 24 zeigt das Flavonoidmuster des Grapefruitextraktes (C1) mit den identifizierten Hauptflavanonen in einem HPLC-Chromatogramm. Die Identifizierung erfolgte durch den Vergleich mit UV-Spektren und Retentionszeiten vorhandener Referenzsubstanzen. Narirutin eluierte bei 30,2 min und war mit ca. 10% in C1 vorhanden, während es in C2 fehlte. Auffällig war außerdem der höhere Anteil von Naringenin-7-O-glucosid (31,5 min) mit ca. 14% in C2. In beiden Extrakten stellte Naringin das Hauptflavanon dar (20-30%). TEVC-Untersuchungen, die von den Projektpartnern in Freising durchgeführt worden sind, zeigten für C1 bei 1 mg/mL eine Inhibition des  $\alpha$ -MDG Stroms von 32±5% und für C2 bei gleicher Konzentration eine Hemmung von 37±8%.

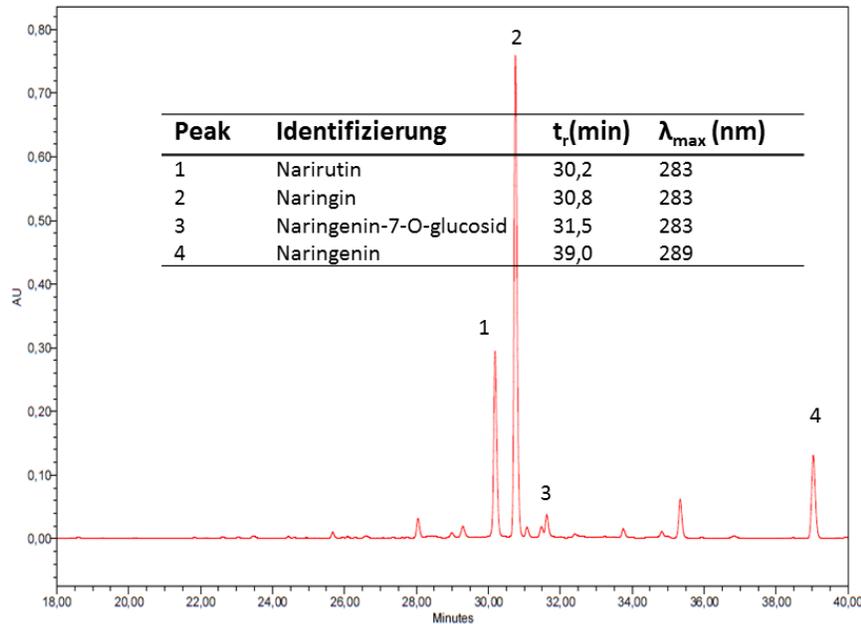


Abbildung 24: HPLC-Chromatogramm eines Grapefruitextraktes, Detektion bei 280 nm

#### 4.2.4 Charakterisierung der polyphenolischen Substanzen und Quantifizierung von Phlorizin in unterschiedlichen Apfelextrakten

Unterschiedliche Apfelextrakte wurden hinsichtlich der enthaltenen Polyphenole über HPLC-ESI(-)-MS<sup>2</sup> charakterisiert, mit Literaturdaten verglichen (Kahle *et al.*, 2010 & Marks *et al.*, 2007) und sofern Referenzsubstanzen zur Verfügung standen, quantifiziert. Für die Vergleichbarkeit der Extrakte im Hinblick auf Inhibitionseffekte am SGLT1 stand die Gehaltsbestimmung des Dihydrochalcon Phlorizin im Vordergrund, welches als kompetitiver SGLT1-Inhibitor bekannt ist (Ehrenkranz *et al.*, 2005). Projektinterne Untersuchungen mittels TEVC und auch mittels des SURFE<sup>2</sup>Rs konnten dies bestätigen (siehe Punkt 4.6.2). Abbildung 25 zeigt ein Chromatogramm eines Apfeltresters mit über 10 identifizierten Inhaltsstoffen. Auffällig ist der dominierende Peak des Phlorizins (12), gefolgt vom Phloretin-2'-xyloglucopyranosid (9). Insgesamt konnten drei Dihydrochalcone identifiziert werden, wobei eine  $m/z$  von 273 dem Aglykon Phloretin entsprach. Im Apfeltrester konnten  $520 \pm 20$  ppm Phlorizin in der Trockenmasse quantifiziert werden. Zusätzlich konnten fünf Flavonolderivate identifiziert werden und zwar Mono- und Diglycoside des Quercetins, wobei die Zuckerreste sowohl Pentosen ( $m/z$  433 [M-H]<sup>-</sup>) als auch Hexosen ( $m/z$  463 [M-H]<sup>-</sup>) darstellten. Die Abspaltung von 162 amu ist einem

Glucosemolekül zuzuordnen, während eine Abspaltung von 132 amu einer Pentose entsprach. Außerdem konnten unterschiedliche Hydroxyzimtsäuren (Cumarsäure, Chlorogensäure etc.), das Flavan-3-ol Catechin und auch Procyanidin mittels ihrer Molekülmassen im MS-Spektrum nachgewiesen werden.

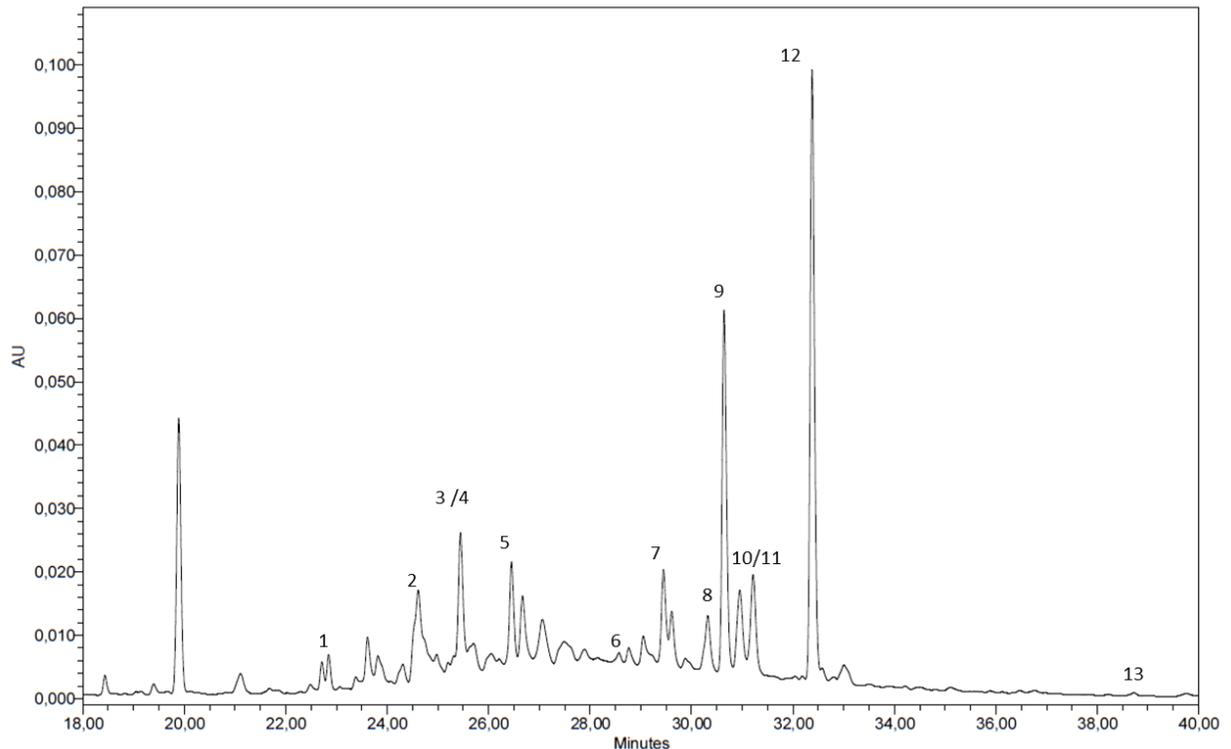


Abbildung 25: HPLC-Chromatogramm eines Apfeltresters (HV S65), Detektion bei 280 nm

Tabelle 9: Spektroskopische Daten der Polyphenole im Apfeltrester (HV S65)

Peak	Identifizierung / MW (g/mol)	$t_r$ (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)
1	Coumarsäure / 164	22,9	290	163
2	Chlorogensäure / 354	24,7	354	353
3	<i>p</i> -Coumaryl-L(-)-chinasäure / 338	25,4	280	337
4	Procyanidin / 578	25,5	280	577
5	Catechin / 290	26,5	280	289
6	Quercetin-3-O-rutinosid / 610	28,8	268/353	609
7	Quercetin-3-O-glucosid / 464	29,6	254/355	463
8	Quercetin-3-O-pentosid / 434 (xylo-oder arabinosid)	30,3	254/353	433
9	Phloretin-2'-O-xyloglucosid / 568	30,6	220/280	567
10	Quercetin-3-O-pentosid / 434 (xylo-oder arabinosid)	30,9	255/353	433
11	Quercetin-3-O-rhamnosid / 448	31,2	256/353	447
12	Phlorizin / 436	32,4	220/280	435
13	Phloretin / 274	38,7	225/285	273

Angereicherte Extrakte aus diesem Apfeltrester (Anreicherung über Adsorberharz, durchgeführt vom Projektpartner *BioActive Food GmbH*) wurden ebenfalls auf ihren Phlorizingehalt und auf die Inhibition im Oozytenmodell untersucht. Das Eluat HV S65 0,6-0,95 mit 19 480 ppm Phlorizin (Anreicherungsfaktor zum Ausgangsmaterial: ca. 40) in der TM wies eine Inhibition von  $84\pm 3\%$ , wobei nur 0,12 mg/mL Extrakt eingesetzt wurden. Ein weiterer Apfelextrakt (AE15) wurde von der Firma *BioActive Food GmbH* zur Verfügung gestellt und für die Humanstudien verwendet (Arbeitsgruppe von Prof. Hannelore Daniel). Den durchgeführten Analysen zur Folge wies er mit  $162\,980\pm 3\,170$  ppm in der Trockenmasse einen sehr hohen Gehalt an Phlorizin auf. Für die Humanstudien wurde einheitlich festgelegt, dass pflanzliche Extrakte anhand ihres Polyphenolgehalts bzw. des Gesamtflavonoidgehalts charakterisiert werden sollten und so die verwendete Dosis für die Studien am Menschen berechnet wird. Der Polyphenolgehalt des AE15 betrug  $444\,240\pm 15\,350$  ppm im Trockenextrakt, berechnet als (+)-Catechinäquivalente. Ein Beispiel-Chromatogramm des AE15 Extraktes findet sich unter Punkt 4.7.4. Abbildung 26 zeigt den Phlorizingehalt (in ppm, bezogen auf die Frischmasse) unterschiedlichster Apfelsorten, angebaut in Gülzow/Mecklenburg-Vorpommern. Die von der Firma *BioActive Food GmbH* geschickten Kerngehäuse und Schalen dieser 33 Sorten wurden gefriergetrocknet und wie unter Punkt 3.6.4 aufgearbeitet. Es sind deutliche Unterschiede im Phlorizingehalt zwischen Schale und Kerngehäuse zu erkennen. In fast allen Sorten war der Gehalt an Phlorizin im Kerngehäuse größer. Im Kerngehäuse vom ‚Nathusius Taubenapfel‘ konnten  $397\pm 96$  ppm Phlorizin quantifiziert werden, wobei bei dieser Sorte ebenfalls der Phlorizingehalt in der Schale sehr hoch war ( $359\pm 43$  ppm). Die Sorten ‚Kassler‘ Renette; ‚Kanada Renette‘; ‚Grahams Jubiläumsapfel‘; ‚Hartmanns Herbstapfel‘; ‚Seestermührer Zitronenapfel‘ und ‚Ontario‘ wiesen daneben die höchsten Phlorizingehalte im Kerngehäuse auf mit Werten von 260-380 ppm. Dies entspricht ca. 30-40 µg pro 100 mg Frischmasse. Die untersuchte Schale der ‚Kanada Renette‘ wies mit  $513\pm 18$  ppm in der Frischmasse den höchsten Gehalt an Phlorizin auf. Die Trockenmasse der Kerngehäuse variierte von 10 bis 20%, wobei die Schalen weniger Wasser enthielten und einen Trockensubstanzgehalt von 20 bis 30% aufwiesen.

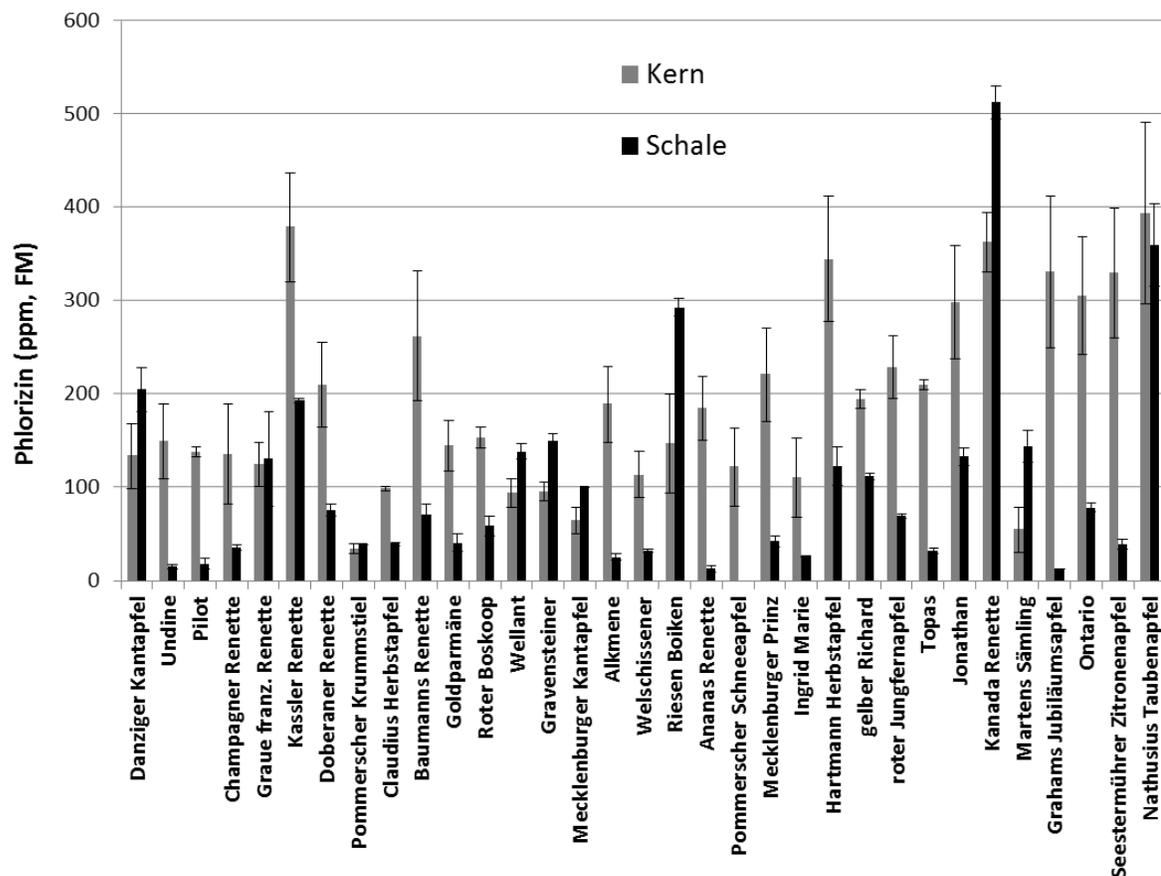


Abbildung 26: Quantifizierung von Phlorizin per HPLC bei 280 nm in unterschiedlichen Apfelsorten

(Kern und Schale, n=3)

#### 4.2.5 Charakterisierung von Schwarzkarottenextrakten

Der Projektpartner *BioActive Food GmbH* stellte unterschiedliche Schwarzkarottenextrakte zur Verfügung, die aus einem Schwarzkarottensaftkonzentrat mittels eines Adsorberharzes im Polyphenolgehalt angereichert worden waren. Die polyphenolischen Substanzen wurden mit Ethanol eluiert, wobei die Konzentration des Elutionsmittels anstieg. Unterschiedliche Extrakte wurden wie unter Punkt 3.6.4 beschrieben 3-mal per HPLC analysiert und Chlorogensäure bei 320 nm quantifiziert. Abbildung 27 zeigt ein HPLC-Chromatogramm von vier Schwarzkarottenextrakten [Eluat 1-4, Ethanolkonzentration (% V/V) des Elutionsmittels]. Eluat 3, welches mit 55% Ethanol als Elutionsmittel gewonnen worden war, enthielt die höchste Menge an Chlorogensäure im trockenen Extrakt (21%). Der Trockensubstanzgehalt zeigt, dass die gewonnenen Eluate bis zu 97% Extraktionsmittel

enthielten und der Chlorogensäuregehalt bezogen auf den noch flüssigen Extrakt sehr gering ausfiel (Eluat 3: < 1%).

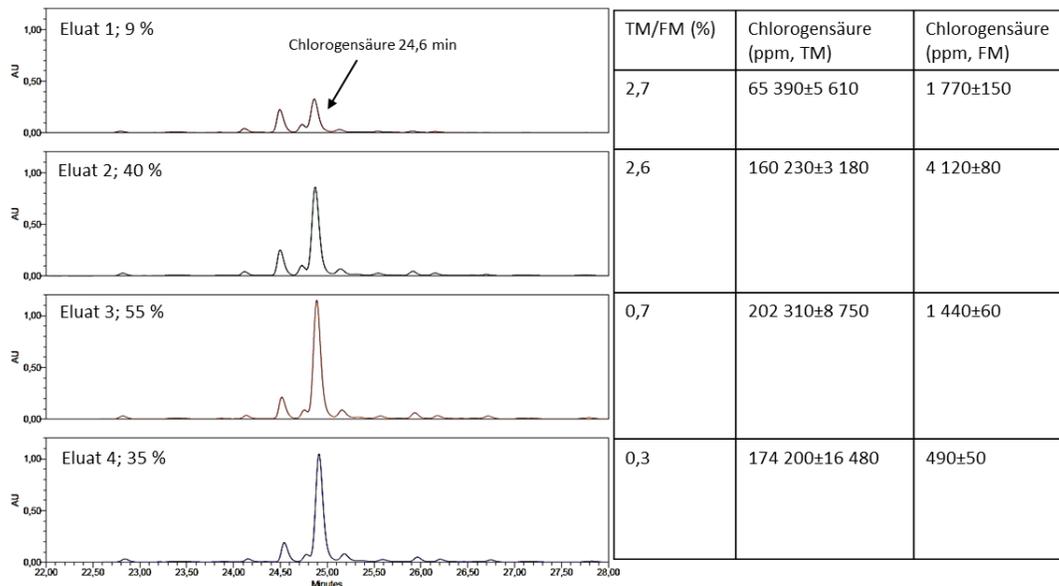


Abbildung 27: HPLC-Chromatogramme von Schwarzkarottenextrakten bei 320 nm und der jeweilige Chlorogensäuregehalt ( $n=3$ )

## 4.3 Herstellung eines angereicherten Grünkohlextraktes

### 4.3.1 Herstellung eines Grünkohlsaftes und Anreicherung der Flavonoide

In Abbildung 28 wurden die Gesamtflavonidgehalte (ppm) bezogen auf die Trockenmassen (TM) des Ausgangstoffes (Grünkohl), der Zwischenprodukte (Vollsaft, zentrif. Saft) und des Endproduktes (Eluat-Extrakt), die Anreicherung (Faktoren rechts) der Adsorberharzmethode und die Verluste (%), bezogen auf den Grünkohl und auf den Vollsaft bei der Safterstellung dargestellt. Das Trockenkiloäquivalent (TkÄ) stellte eine hypothetische Größe zur Berechnung und zum Vergleich der Gehalte und Verluste der Zwischenprodukte während der Saft- und Extrakterstellung dar (unterstrichener Wert unter den Produkten). Der Wert wurde als materialspezifische Trockenmasse (in g) definiert, welche 1000 g gefriergetrocknetem Grünkohl entsprachen. Die Anreicherung ließ sich gut aus dem Vergleich der Gesamtflavonoidkonzentrationen abschätzen. Bei dem über die Adsorberharzmethode gewonnenem Trockenextrakt (Ethanoleluat, Elutionsmittel 75%

Ethanol) konnte die Anreicherung bezogen auf das Ausgangsmaterial (dem gefriergetrocknetem Grünkohl) mit Faktor 5 bestimmt werden, während die Anreicherung, bezogen auf den vorbereiteten Saft, der direkt für die Adsorberharzmethode verwendet wurde, Faktor 10 betrug. Außerdem war zu verzeichnen, dass im CITTI-Grünkohlrestester nach der Saftherstellung bei 37°C und unter Einsatz des Rührwerks, 15% der Flavonoide bezogen auf das Trockenkiloäquivalent verbleiben, während der Verlust bei der Zentrifugation des Vollsaftes mit ca. 80% sehr deutlich zu erkennen war. Bei der Saftherstellung gingen über 70% der Flavonoide im Trester (Rückstand der Maische) und im Zentrifugations sediment verloren. Mit nur 20% der Gesamtflavonoide, die im Grünkohl enthalten waren, wurde die Adsorberharzmethode durchgeführt. Bei Einsatz von 500 mL zentrifugiertem Saft und Elution mit 600 mL 75% Ethanol bei einer definierten Tropfgeschwindigkeit wurden durchschnittlich 3,6 g trockenes Eluat gewonnen mit ca. 6% Flavonoiden. In Abbildung 28 ist mit Hilfe des TkÄ zu erkennen, dass aus 1000 g gefriergetrocknetem GK ca. 40 g Flavonoidangereicherter Extrakt entstehen mit einem Anreicherungsfaktor von ca. 4. Bei einem Trockensubstanzgehalt von ca. 12% entsprechen 1000 g trockener GK ca. 8300 g frischem GK. Um 1 g Flavonoidangereicherter Extrakt zu erhalten, müssen ca. 190 g frischer Grünkohl verarbeitet werden.

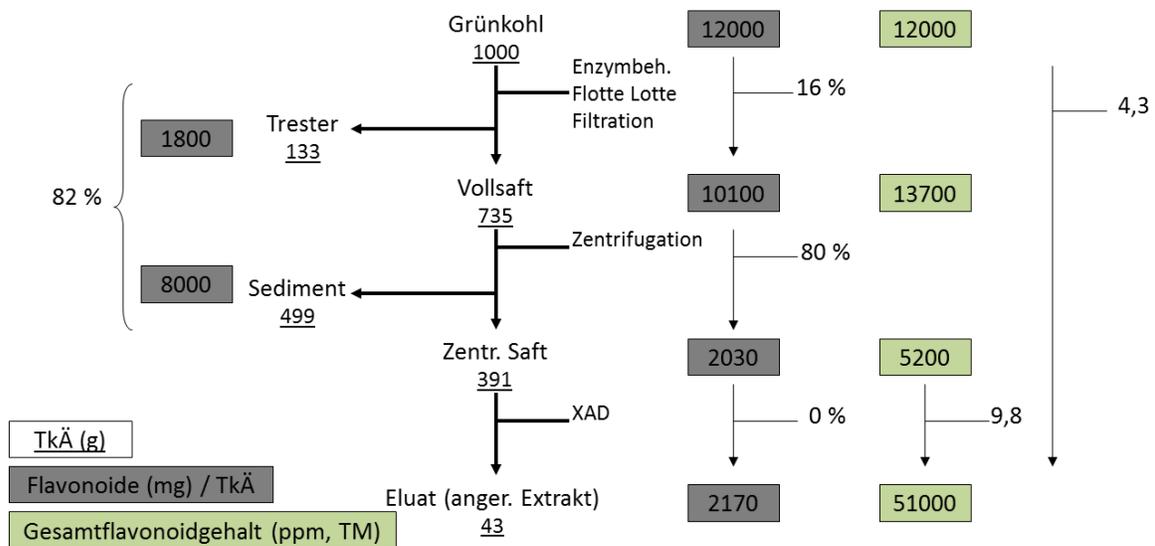


Abbildung 28: Verluste und Anreicherung bei der Saftherstellung und Extrakterstellung

Die Enzymzugabe und die Einführung des Rührwerks während der Saftherstellung bei 37°C erhöhten die Flavonoidausbeuten bezogen auf den eingesetzten Grünkohl auf bis zu 90% (Abbildung 29,  $n=3$  Werte dreimal quantifiziert). Auch wurden unterschiedliche Inkubationstemperaturen verwendet (RT, 37°C, 50 und 60°C), wobei bei 37°C die höchsten Flavonoidausbeuten verzeichnet werden konnten.

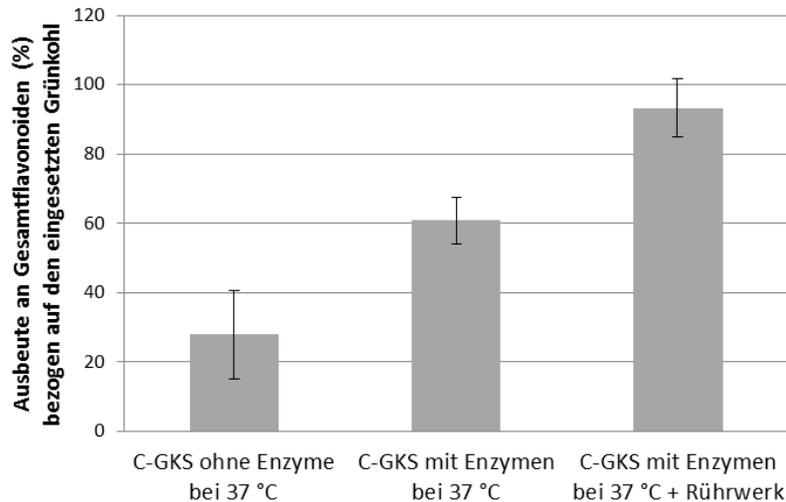


Abbildung 29: Gesamtflavonoide (%) unterschiedlich hergestellter Grünkohlsäfte bezogen auf den eingesetzten Grünkohl ( $n=3$ )

## 4.4 Methodenoptimierung

### 4.4.1 Flavonoidausbeute bei der Saftherstellung

#### 4.4.1.1 Saftherstellung mittels einer Tinkturenpresse

Der Vergleich der Flavonoidausbeuten im Labormaßstab nach Verwendung einer Tinkturenpresse und einer „flotten Lotte“ ist in Tabelle 10 dargestellt. Das Trockenkiloäquivalent (TkÄ) stellte erneut eine hypothetische Größe zur Berechnung und zum Vergleich der Gehalte und Verluste der Zwischenprodukte während der Saft- und Extrakterstellung dar. Der Wert wurde als materialspezifische Trockenmasse (in g) definiert, welche 1000 g gefriergetrocknetem Grünkohl entsprachen. Im Trester, der mittels Tinkturenpresse gewonnen worden war, verblieben 80% der Flavonoide. Die übrigen 20% der Flavonoide befanden sich im Vollsaft, welcher nach Zentrifugation nur noch 14% der im eingesetzten

Grünkohl vorhandenen Flavonoide enthielt. Im Vollsajt, der mit der „flotten Lotte“ gewonnen wurde, befanden sich fast 70% der Flavonoide, während nur ca. 30% im Trester verloren gingen. Allerdings verblieben über 50% der Flavonoide während des Zentrifugationsschrittes im Sediment und es konnte ebenfalls nur mit 15% der eingesetzten Menge weiter gearbeitet werden.

Tabelle 10: Flavonoidausbeuten nach unterschiedlicher Art der Sajterstellung

	Tinkturenpresse			„flotte Lotte“		
	TkÄ (g)	Flavonoide im TkÄ (mg)	Gehalt (%) bezogen auf den GK	TkÄ (g)	Flavonoide im TkÄ (mg)	Gehalt (%) bezogen auf den GK
Eingesetzter GK	1 000	11 120	100%	1 000	13 756	100%
Trester	437	8 784	79%	321	4 447	32%
Sajt	480	2 252	20%	660	9 142	67%
Zentrifugierter Sajt	418	1 527	14%	485	2 124	15%

#### 4.4.1.2 Sajterstellung unter Zugabe von Ethanol

Vorversuche hatten gezeigt, dass ein Ethanolgehalt im Grünkohl-sajt von bis zu 15% keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten der Flavonoide zum Adsorberharz hat. Durch die Zugabe von Ethanol in die Grünkohlmaische und anschließender Inkubation (Ethanolendkonzentration im Sajt: 25%) sollte die Löslichkeit der Flavonoide erhöht werden. Die Bestimmung der Flavonoide im Trester und im erhaltenen ethanolischen Sajt ergab folgende Ergebnisse: 30% der Flavonoide gingen im Trester verloren, mit 70% der Flavonoide im Vollsajt wurde weitergearbeitet. Der ethanolische Vollsajt hatte einen Trockensubstanzgehalt von 9%; dieser lag also im Bereich des nach Standardprotokoll gewonnenen Grünkohl-sajtes. Große Verluste der Flavonoide wurden wiederum nach der Zentrifugation verzeichnet (40%). So konnte das Adsorberharz mit 20% der Ausgangsflavonoide beladen werden (Zentrifugierter Sajt mit 15% Ethanol).

#### 4.4.1.3 Saftherstellung unter Zugabe von Detergentien

Einer definierten Menge CITTI-Grünkohlsaft wurde je 0,5 und 5% an Triton-X-100 oder Sojalecithin zugegeben, um die Löslichkeit der Flavonoide im wässrigen Milieu zu erhöhen. Grünkohlsäfte, die nach 3.6.1 hergestellt wurden, hatten im Mittel einen Gesamtflavonoidgehalt von  $13\,670 \pm 1\,480$  ppm bezogen auf den getrockneten Saft, wobei der Trockensubstanzgehalt bei  $9,8 \pm 0,6\%$  lag ( $n=7$ ). Der Gesamtflavonoidgehalt der gewonnenen Säfte nach Zugabe von 0,5% Triton-X-100 lag bei 10 520 ppm und von 5% bei 9 050 ppm. Unter Verwendung von Sojalecithin erniedrigten sich die Ausbeuten stark und lagen mit 4 400 ppm bei 0,5% und bei 3 700 ppm bei Einsatz von 5% deutlich unter dem Durchschnitt. Die Zugabe der Detergentien zum getrockneten Grünkohl hatten auf den Gesamtflavonoidgehalt und somit auf die Bestimmungsmethode nach 3.7.1 (Daten nicht gezeigt) keinen Einfluss. Diese Versuche wurden aufgrund der schlechten Ausbeuten nicht weiter verfolgt.

#### 4.4.1.4 Variation des pH-Wertes des Saftes

Der pH-Wert eines nach 3.6.1 gewonnenen Grünkohlsaftes lag genuin bei 4,6 bis 4,7. Der pH-Wert des Vollsaftes wurde mittels 1 M NaOH Lösung auf pH 5, 6, 7 und pH 8 eingestellt und mittels Adsorberharz angereichert (3.6.2). Alle Eluate wurden mit der gleichen Menge an 75% Ethanol als Elutionsmittel gewonnen und der Gesamtflavonoidgehalt ( $n=3$  Analysen) und die Anreicherungs-faktoren in Bezug auf den eingesetzten Grünkohl in Abbildung 30 dargestellt. Die beste Anreicherung (Faktor 4,5) und demnach der höchste Gesamtflavonoidgehalt (ca. 6%) konnte für den Saft bei pH-Wert 5 verzeichnet werden. Bei pH 6 und pH 7 konnten ähnliche, aber etwas geringere Ausbeuten und Anreicherungs-faktoren erreicht werden, wobei pH 8 für den Anreicherungsprozess nicht geeignet war.

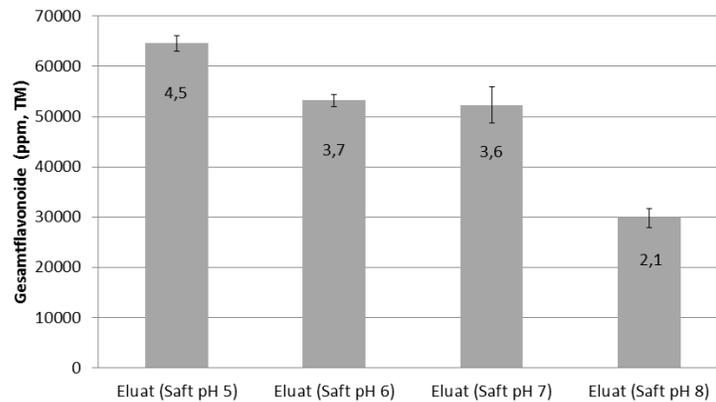


Abbildung 30: Gesamtflavonoidgehalte der Eluate bei Variation des pH-Wertes des eingesetzten Saftes und Anreicherung in Bezug auf den eingesetzten Grünkohl ( $n=3$ )

#### 4.4.2 Optimierung der Anreicherung der Flavonoide

##### 4.4.2.1 Elution der Flavonoide

In Abbildung 31 sind die Gesamtflavonoidgehalte bezogen auf den trockenen Extrakt verschieden gewonnener Eluate dargestellt. Es wurden unterschiedliche Ethanolkonzentrationen (25, 50, 75, 99%) zur Elution verwendet, wobei die Versuche 3-mal durchgeführt wurden. Mit 50% Ethanol eluierten  $61\,380 \pm 5\,050$  ppm Flavonoide, während mit der gleichen Menge 75%igem Ethanol  $63\,410 \pm 7\,580$  ppm Flavonoide gewonnen wurden.

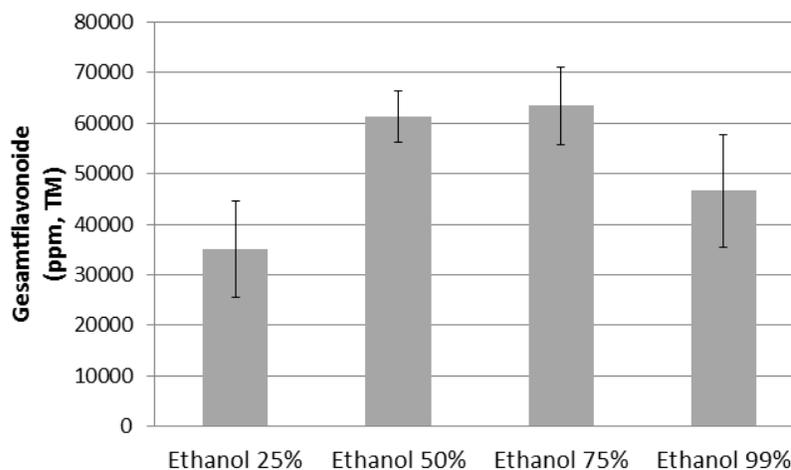


Abbildung 31: Gesamtflavonoidgehalte von Grünkohleluaten bei Variation der Ethanolkonzentration ( $n=3$ )

#### 4.4.2.2 Kapazitätstest unterschiedlicher Harze

#### 4.4.2.3 Variation der Elutionsmittelmenge im Batchverfahren

Um die Elutionsmittelmenge zu bestimmen, die notwendig war, um die Menge an Flavonoidglycosiden zu eluieren, die auf das Adsorberharz aufgegeben wurde, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt: Je 200 mL Grünkohlfiltrat (wie unter Punkt 3.6.1 beschrieben hergestellt) mit einem Durchschnittsgehalt ( $n=8$  Säfte) von  $30\pm 5$  mg Quercetin und  $50\pm 7$  mg Kaempferol pro Liter (quantifiziert nach Hydrolyse 3.7.2 per HPLC) wurden auf 10 g Harz gegeben und die Flavonoide mit unterschiedlichen Mengen an Ethanol 75% im Batchverfahren (3.9.2.2.2) eluiert. Für diese Untersuchungen wurden ADS 200, ADS 500 und Amberlite™ FPX 66 verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt und geben die prozentuale Wiederfindung der Flavonole im Eluat nach erfolgter Hydrolyse an, bezogen auf den verwendeten zentrifugierten Grünkohlensaft.

Tabelle 11: Wiederfindung (%) der im Grünkohlensaft enthaltenen Flavonoide nach Anreicherung durch ein Adsorberharz und Elution mit unterschiedlichen Mengen an 75% Ethanol

75% Ethanol	ADS 200		ADS 500		FPX 66	
	Wiederfindung (%)					
Menge (mL)	Quercetin	Kaempferol	Quercetin	Kaempferol	Quercetin	Kaempferol
20	40	70	50	80	50	50
40	100	80	80	90	50	60
50	100	100	60	80	90	80
60	100	100	80	80	90	90
80	100	90	100	100	70	90
100	80	90	-	-	80	80

Zur vollständigen Elution der Flavonoidglycoside (nach Hydrolyse als Quercetin und Kaempferol quantifiziert) vom ADS 200 waren 40 mL 75% Ethanol ausreichend. Eine vollständige Elution der Flavonoide bei Verwendung des ADS 500 konnte allerdings erst bei 80 mL Elutionsmittel erreicht werden, wobei Kaempferolderivate schon bei 40 mL zu 100% wiedergefunden wurden. Für FPX 66 mussten 50 mL Elutionsmittel verwendet werden, um 100% der Kaempferolderivate wiederzufinden. Quercetinderivate konnten mit 60 mL fast vollständig eluiert werden.

#### 4.4.2.4 Batchverfahren

Unterschiedliche Polymerharze wurden im Batchverfahren miteinander verglichen und auf die Kapazität und die Bindungsaffinität untersucht. Dafür wurden je 10 g Harz mit unterschiedlichen Saftmengen überschichtet. Der verwendete zentrifugierte Grünkohlssaft, der wie unter Punkt 3.6.1 beschrieben hergestellt wurde, wies einen Durchschnittsgehalt ( $n=8$  Säfte) von  $30\pm 5$  mg Quercetin und  $50\pm 7$  mg Kaempferol pro Liter auf (quantifiziert nach Hydrolyse 3.7.2 per HPLC) und eine Trockenmasse von  $6,3\pm 0,9\%$ . Nach Elution der Flavonoide mit je 60 mL 75% Ethanol wurde das Eluat mittels Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit, gefriergetrocknet und nach Hydrolyse (3.7.2) per HPLC vermessen. Ziel war es, ein geeignetes Ersatz-Harz für das sonst verwendete Amberlite™ FPX 66 zu finden. Das ADS 200 sollte nach Aussagen der Firma *Chemra* dem Amberlite™ FPX 66 in der Zusammensetzung, Porengröße, Bindungsverhalten etc. am ehesten entsprechen. Das ADS 100 war allerdings nicht geeignet; während des Versuches färbte sich das Harz grün gelblich ein, entfärbte sich aber bei der Elution nicht mehr. Es konnte keine Wiederfindung bestimmt werden, da keine Flavonoide eluierbar waren.

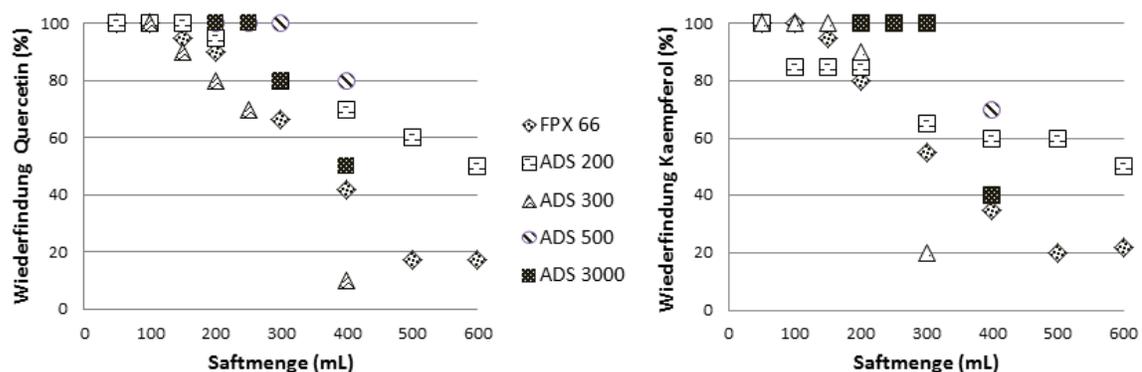


Abbildung 32: Wiederfindungsrate (%) von Quercetin und Kaempferol, bezogen auf den eingesetzten Saft

je 10 g Harz/Batch, Elution mit 60 mL Ethanol 75%

Die Wiederfindung der Flavonolglyka nach Hydrolyse sank für fast alle Harztypen ab 300 mL Saft bei Verwendung von 60 mL Elutionsmittel. Das ADS 3000 zeigte für Kaempferol, welches im Flavonolgerüst im B-Ring eine Hydroxylgruppe weniger aufweist als Quercetin, auch bei 300 mL Saftaufgabe eine Wiederfindungsrate von 100%. Bei 200 mL Grünkohlssaft schwankte die Wiederfindungsrate beider Flavonole von 80 - 100% abhängig vom

Adsorberharz. Das ADS 500 zeigte bei Verwendung von 300 mL Saft eine Wiederfindung von Quercetin von noch 100%. Ab 300 und 400 mL sieht man einen starken Abfall der Wiederfindung bei allen verwendeten Harzen, wobei das ADS 500 noch eine Wiederfindung der Aglyka von bis zu 80% ermöglichte.

#### 4.4.2.5 Säulenverfahren

Ausgewählte Harze (ADS 200, 300 und FPX 66) wurden sowohl im Säulenverfahren als auch im Batchverfahren auf ihre Bindungskapazität und Affinität zu den Flavonoiden getestet. Dafür wurden je 10 g Harz in eine Chromatographiesäule überführt, sein Volumen bestimmt, das Harz gewaschen und mit dem zentrifugierten Grünkohlsaft beladen. Abhängig vom Volumen des Harzes wurde die entsprechende Tropfgeschwindigkeit (2 Bettvolumen pro Stunde) fürs Ablassen des Saftes und für die Elution eingestellt. 10 g des ADS 200 entsprachen 16 mL, während das Volumen von ADS 300 bei 11,5 mL und für FPX 66 bei 13 mL lag. Der verwendete zentrifugierte Grünkohlsaft, der wie unter Punkt 3.6.1 beschrieben hergestellt wurde, wies einen Durchschnittsgehalt ( $n=8$ ) von  $30\pm 5$  mg Quercetin und  $50\pm 7$  mg Kaempferol pro Liter auf (quantifiziert nach Hydrolyse 3.7.2 per HPLC) und eine Trockenmasse von  $6,3\pm 0,9\%$ . Die Eluate wurden gefriergetrocknet und die Wiederfindungsrate der Aglyka nach Hydrolyse per HPLC bestimmt (Abbildung 33).

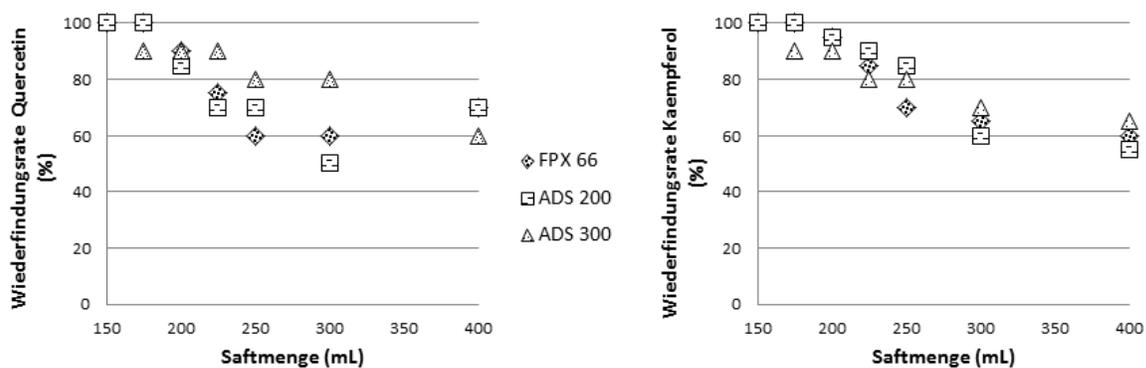


Abbildung 33: Wiederfindungsrate (%) von Quercetin und Kaempferol, bezogen auf den eingesetzten Saft

je 10 g Harz/Säule, Elution mit 60 mL 75% Ethanol

Für Quercetin und Kaempferol konnte für das Adsorberharz ADS 300 bei Einsatz von 150 mL Saft eine Wiederfindungsrate von ca. 90% bestimmt werden. Beide Flavonolglyka konnten

bei Verwendung der Harze ADS 200 und FPX 66 bei Auftrag von 175 mL Saft zu 100% nach Hydrolyse bei Verwendung von 60 mL Elutionsmittel wieder gefunden werden. Wurde mehr als 175 mL Saft eingesetzt, konnte eine abnehmende Wiederfindungsrate für beide Aglyka und für alle Harze verzeichnet werden. Auffallend ist eine höhere Wiederfindungsrate für alle Harze bei Bestimmung von Kaempferol nach Hydrolyse der erhaltenen Extrakte.

#### 4.4.3 Variation der Hydrolysezeit

Im Rahmen der Bestimmungsmethode der Gesamtflavonoide nach *Ph. Eur.* (3.7.1) wurde die Hydrolysezeit variiert, wobei die Ausbeuten in Abbildung 24 dargestellt sind. Die Versuche wurden 5-mal durchgeführt. Ein signifikant höherer Flavonoidgehalt war bei einer Hydrolysezeit von 60 und 90 min mit  $1\,473\pm 91$  und  $1\,525\pm 99$  ppm bezogen auf die Frischmasse zu verzeichnen. Die Hydrolyse der Flavonoidglycoside nach 30 min ergab einen Gehalt von  $1\,277\pm 1\,22$  ppm Flavonoiden berechnet als Hyperosid.

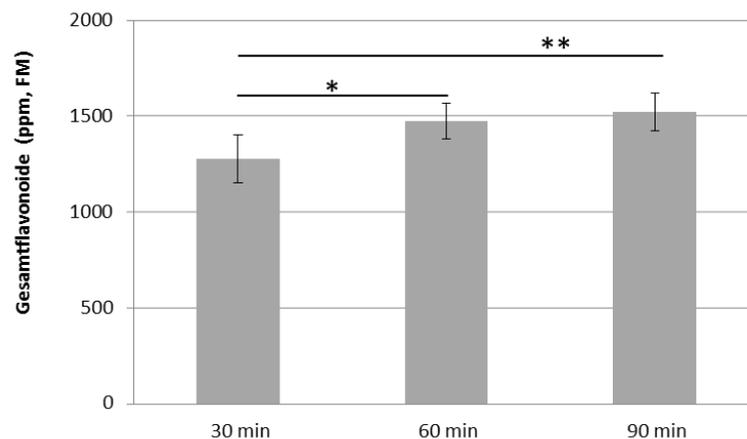


Abbildung 34: Flavonoidgehalt bei unterschiedlichen Hydrolysezeiten ( $n=5$ )

## 4.5 Inhibitionsmessungen am rabbit SGLT1

Untersuchungen zur Inhibition des *rbSGLT1* durch polyphenolische Einzelsubstanzen und flavonoidhaltige Pflanzenextrakte wurden anfangs durch die Projektpartner der Firma *IonGate* unter der Leitung von Dr. Inga Bick und durch das Max Planck Institut (Abt. Biophysik) von Dr. Christine Keipert unter der Leitung von Prof. Klaus Fendler in Frankfurt mittels der SURFE<sup>2</sup>R-Technologie durchgeführt. Nach Ausscheiden beider Projektpartner wurde das Messsystem selbständig im Arbeitskreis etabliert und somit in eigenen Untersuchungen einer Kombination potenter SGLT1-Inhibitoren getestet.

### 4.5.1 $K_m$ -Wert von $\alpha$ -Methyl-D-glucopyranosid

Die Firma *IonGate* konnte zeigen, dass die Affinität des *rbSGLT1* in Anwesenheit von einem  $\text{SO}_4^{2-}/2\text{Cl}^-$ -Gradienten im Puffersystem für das spezifische SGLT1-Substrat  $\alpha$ -Methyl-D-glucopyranosid ( $\alpha$ -MDG) höher als für D-Glucose ist (Obrdlik et al., 2008).

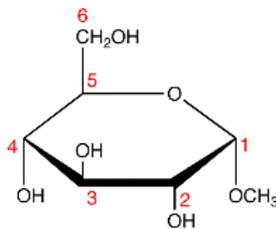


Abbildung 35: Struktur  $\alpha$ -Methyl-D-glucopyranosid

Die Affinität des *rbSGLT1* zum verwendeten Substrat wurde über die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  bestimmt. Je geringer der  $K_m$ -Wert ist, desto affiner verhält sich das Substrat zu seinem Transportsystem. Für die Messungen am SURFE<sup>2</sup>R können im verwendeten Puffersystem zwei Gradienten verwendet werden: ein  $\text{K}^+/\text{Na}^+$ -Gradient und ein  $\text{SO}_4^{2-}/2\text{Cl}^-$ -Gradient. Bei Verwendung beider Gradienten im Messsystem und einer resultierenden Verstärkung des  $\alpha$ -MDG-Signals, soll nach Angaben von *IonGate* der  $K_m$ -Wert zwischen 4 und 14 mM liegen. Verschiedene  $\alpha$ -MDG-Konzentrationen (0; 0,5; 1; 5; 10 und 50 mM) wurden an einem Sensor gemessen und mittels GraphPad Prism<sup>®</sup>5 ausgewertet (Abbildung 36). Für  $\alpha$ -MDG konnte ein  $K_m$ -Wert von  $10,3 \pm 3,1$  mM und  $V_{\text{max}}$  mit  $1181 \pm 130$  pA ermittelt werden.

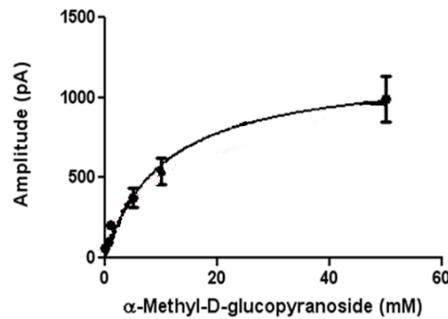


Abbildung 36: Signal-Konzentration Abhängigkeit für  $\alpha$ -Methyl-D-glucopyranosid am *rbSGLT1* ( $n=8$ )

#### 4.5.2 Inhibitionswerte ausgewählter Flavonoide

Die hier aufgeführten Ergebnisse stammen teilweise von Dr. Christine Keipert (MPI, Frankfurt), die mittels der SURFE<sup>2</sup>R-Technologie innerhalb des Projektes über 30 polyphenolische Referenzsubstanzen auf die inhibitorische Aktivität am rabbit-SGLT1 testen konnte. Einige der Ergebnisse stammen aus eigenen Untersuchungen, wobei der Fokus auf dem Dihydrochalcon Phlorizin (Inhaltsstoff im Apfelextrakt) und auf dem Flavonol Quercetin-4'-O-glucosid (Hauptflavonol im Zwiebelextrakt) lag.

Alle Flavonoidlösungen, die für die Inhibitionstestungen verwendet wurden, enthielten zur Verbesserung der Flavonoidlöslichkeit 0,1% bzw. 0,25% DMSO (Dimethylsulfoxid). Es konnte gezeigt werden, dass DMSO in diesen Konzentrationen keinen Einfluss auf die SGLT1-Aktivität hat. In Tabelle 12 sind ausgewählte Daten von Dr. Christine Keipert zusammengestellt. Alle Inhibitorkonzentrationen wurden an einem Sensor direkt nacheinander (kumulativ) gemessen, wobei der Inhibitor in allen 3 Pufferlösungen enthalten war (Ruhe-, nichtaktivierender-, aktivierender Puffer).

Tabelle 12: Inhibition (%) des 5 mM  $\alpha$ -MDG-Transports abhängig von der Konzentration ( $n_{\text{Sensor}}=3$ )

Substrate / MW (g/mol)	Inhibition (%)	
	bei 100 $\mu$ M	bei 250 $\mu$ M
<b>Dihydrochalcone</b>		
Phlorizin / 436	31 $\pm$ 2	75 $\pm$ 3
Phloretin / 274	33 $\pm$ 5	-
Neohesperidin-dihydrochalcon / 612	25 $\pm$ 7	43 $\pm$ 6
<b>Isoflavone</b>		
Sophoricosid / 432	Keine Inhibition	
Genistin / 432	Keine Inhibition	
<b>Flavonole</b>		
Quercetin-3-O-galactosid / 464	14 $\pm$ 6	17 $\pm$ 3
Quercetin-4'-O-glucosid / 464	22 $\pm$ 3	44 $\pm$ 6
Quercetin-3-O-glucosid / 464	-	-
Rutin / 610	34 $\pm$ 3	49 $\pm$ 4
Quercetin / 302	10 $\pm$ 6	4 $\pm$ 6
Kaempferol-7-O-glucosid / 448	38 $\pm$ 1	40 $\pm$ 4
Kaempferol-3-O-glucosid / 448	-	13 $\pm$ 4
Kaempferol / 286	Löslichkeit nicht gegeben	
<b>Flavone</b>		
Apigenin-7-O-glucosid / 432	12 $\pm$ 3	13 $\pm$ 1
Luteolin-7-O-glucosid / 448	8 $\pm$ 3	-
Luteolin-3',7-O-glucosid / 610	Keine Inhibition	
<b>Flavanone</b>		
Naringin / 580	77 $\pm$ 2	87 $\pm$ 1
Naringenin-7-O-glucosid / 434	59 $\pm$ 4	82 $\pm$ 5
Naringenin / 272	32 $\pm$ 3	56 $\pm$ 1
<b>Stilbene</b>		
Polydatin / 390	23 $\pm$ 3	34 $\pm$ 3
2,3,4',5-Tetrahydroxystilben-2-glucosid / 406	34 $\pm$ 1	55 $\pm$ 11
<b>Andere</b>		
Arbutin / 272	Keine Inhibition	
Salicin / 286	13 $\pm$ 1	8 $\pm$ 2

fehlende Messung (-); Daten der Projektpartner MPI

Das Dihydrochalcon Phlorizin und sein Aglykon Phloretin zeigten in den Untersuchungen am MPI mittels der SURFE<sup>2</sup>R-Technologie bei 100  $\mu$ M eine Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Transports um 30%. Auffällig sind außerdem das Quercetinderivat Rutin (mit einer terminalen Rhamnose), Quercetin-4'-O-glucosid und Kaempferol-7-O-glucosid, die den  $\alpha$ -MDG-Transport bei

250  $\mu\text{M}$  um 40-50% hemmen konnten. Andere Quercetinderivate zeigten keine potenten Hemmwirkungen in diesen Untersuchungen. Die stärkste Hemmung konnte für die Flavanone Naringenin und deren Derivate verzeichnet werden. In einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  konnten Naringin, Naringenin-7-O-glucosid und das Aglykon den  $\alpha$ -MDG-Transport um 60-80% inhibieren.

Die selbständig in Kiel durchgeführten Versuche wurden methodisch etwas abgewandelt. So wurde der Inhibitor in entsprechender Konzentration nur in den aktivierenden Puffer gegeben, der 5 mM des Substrates ( $\alpha$ -MDG) enthielt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengestellt. Nach jeder Inhibitionsmessung aller 3 Konzentrationen eines Inhibitors wurde nochmal eine Substratmessung ohne Inhibitor nachgeschaltet (wash out), um beurteilen zu können, ob der Transporter nach Einwirken eines Inhibitors noch voll funktionsfähig war.

Tabelle 13: Inhibition (%) des 5 mM  $\alpha$ -MDG-Transports abhängig von der Konzentration ( $n_{\text{Sensor}}=1$ )

Substrate / MW (g/mol)	Inhibition (%) bei			Wash out (Signalgröße % bezogen auf den Ausgangswert)
	50 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	250 $\mu\text{M}$	
<b>Dihydrochalcone</b>				
Phlorizin / 436	50	52	59	46
<b>Flavonole</b>				
Quercetin-4'-O-glucosid / 464	72	79	83	50
Quercetin-3-O-glucosid / 464	21	44	-	75
Quercetin-7-O-glucosid / 464	36	63	80	78
Rutin / 610	4	5	17	100
Kaempferol-3-O-glucosid / 448	23	42	-	92
Kaempferol-7-O-glucosid / 448	35	74	91	76
<b>Flavone</b>				
Luteolin-4'-O-glucosid / 448	72	86	90	75
<b>Flavanone</b>				
Naringin / 580	-	72	-	32
Naringenin-7-O-glucosid / 434	67	70	-	41
Naringenin / 272	13	40	67	43

fehlende Messung (-)

Es konnten einige Ergebnisse vom MPI reproduziert werden für z.B. Phlorizin und Kaempferol-7-O-glucosid. Auch die Flavanone zeigten eine ähnlich starke Inhibition. Weiterhin konnte eine sehr gute Hemmung für Quercetin-7-O-glucosid und auch für Quercetin-4'-O-glucosid gezeigt werden (80% bei 250  $\mu$ M). Auch konnte für das Flavonderivat Luteolin-4'-O-glucosid eine starke Hemmleistung verzeichnet werden (90% bei 250  $\mu$ M). Rutin inhibierte im Gegensatz zu den Ergebnissen des MPIs bei 250  $\mu$ M den  $\alpha$ -MDG-Transport um nur ca. 20%. Das Screening der polyphenolischen Substanzen durch das MPI und auch eigene Untersuchungen waren für weitere Einschätzungen der potentesten Flavonoide sehr wichtig. Daher wurden das Flavonol Quercetin-4'-O-glucosid und das Dihydrochalcon Phlorizin nochmals in weiteren Konzentrationen vermessen. Dabei wurde ein wash out (aktivierender Puffer A enthielt nur 5 mM  $\alpha$ -MDG) nach jeder Inhibitionsmessung durchgeführt. Die Inhibitionswerte des  $\alpha$ -MDG-Transports am *rbSGLT1* werden mit Standardabweichungen für  $n=3$  Sensoren in Tabelle 14 gelistet, innerhalb der Einzelmessungen an einem Sensor wurden  $n=10$  Messwerte verwendet.

Tabelle 14: Inhibition (%) des 5 mM  $\alpha$ -MDG-Transports durch Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid

Substrate / MW (g/mol)	Inhibition (%) bei							
	10 $\mu$ M	25 $\mu$ M	50 $\mu$ M	75 $\mu$ M	100 $\mu$ M	250 $\mu$ M	500 $\mu$ M	1000 $\mu$ M
<b>Dihydrochalcon</b>								
Phlorizin / 436	6 $\pm$ 6	4 $\pm$ 2	18 $\pm$ 8	27 $\pm$ 10	34 $\pm$ 9	78 $\pm$ 14	94 $\pm$ 7	99 $\pm$ 1
<b>Flavonol</b>								
Quercetin-4'-O-glucosid / 464	21 $\pm$ 11	41 $\pm$ 13	69 $\pm$ 17	82 $\pm$ 11	90 $\pm$ 6	98 $\pm$ 2	-	-

Für beide Substanzen konnte mit steigender Konzentration auch eine steigende Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Stroms verzeichnet werden, wobei bei 75  $\mu$ M Quercetin-4'-O-glucosid den  $\alpha$ -MDG-Strom bis zu 80% inhibieren konnten. Phlorizin erreichte diese Inhibition ab 250  $\mu$ M. In Abbildung 37 ist der Verlauf der Inhibition mit den jeweiligen wash-outs in einem Balkendiagramm dargestellt. Für Quercetin-4'-O-glucosid ist mit steigender Konzentration zu erkennen, dass die Amplitudenwerte der wash-outs (5 mM  $\alpha$ -MDG) abnehmen, während bei Phlorizin die wash-out-Werte fast kontinuierlich gleich bleiben. Außerdem sind in

Abbildung 37 in 2. Reihe die ‚effect-dose‘ Kurven der Einzelsubstanzen aufgeführt, wobei ein hyperbolischer Verlauf wahrscheinlich ist.

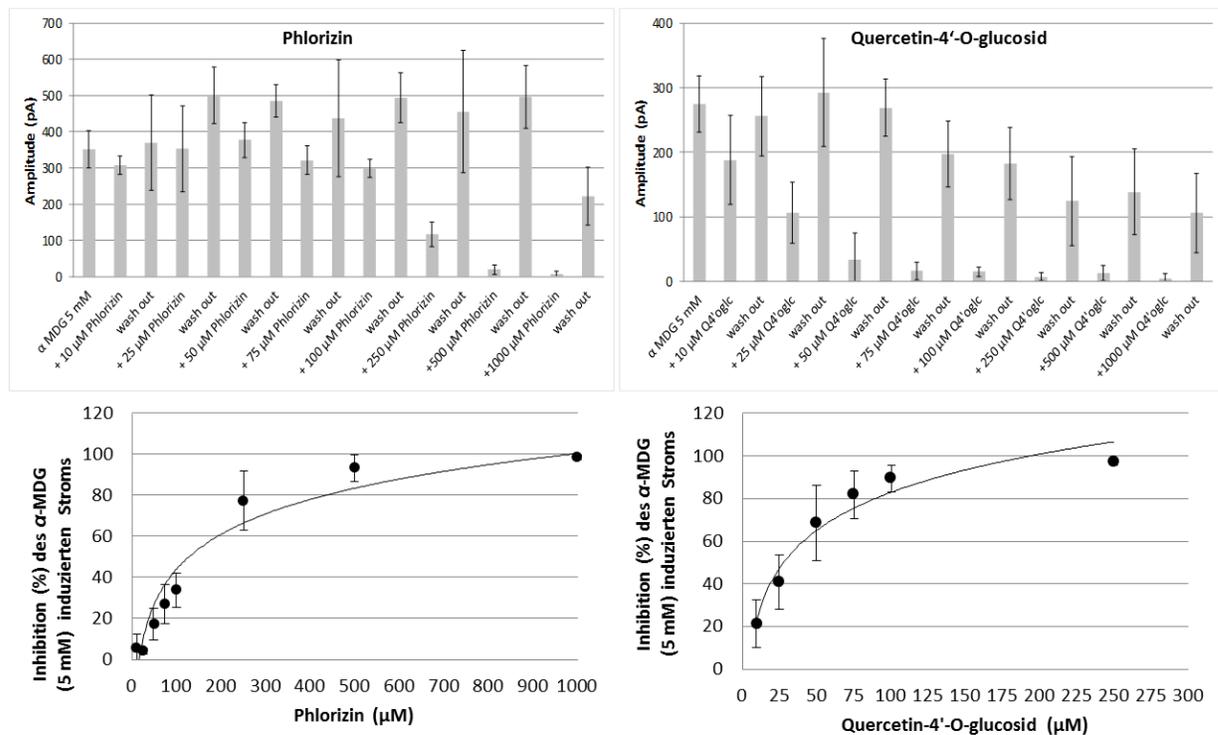


Abbildung 37: Unterschiedliche Darstellungen der Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Stroms durch Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid

1. Reihe: Signalstärken von 5 mM  $\alpha$ -MDG (+wash out) mit und ohne Zusatz von Phlorizin (links) und Quercetin-4'-O-glucosid (rechts), 2. Reihe: ‚dose-effect-curves‘ von Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid ( $n_{\text{Sensor}}=3$ )

### 4.5.3 $IC_{50}$ -Bestimmung von Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid

Für die Bestimmung der  $IC_{50}$  von Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid wurden die unter Punkt 4.5.2 erhaltenen Inhibitionswerte (Mittelwerte aus Messungen an 3 Sensoren) nach Chou 1976 aufgetragen:  $x = \log(D)$  und  $y = \log(fa-fu)$ , wobei D die Konzentration der Substanz darstellt,  $fa$  die absolute Inhibition und  $fu = 1-fa$ , also der ‚Nichteffekt‘. Die resultierende lineare Gleichung im ‚median effect plot‘ (Abbildung 38) lässt eine Berechnung, aber auch ein einfaches Ablesen der  $IC_{50}$ -Werte zu. Der Schnittpunkt mit der x-Achse ist gleichzeitig der  $IC_{50}$ -Wert. Außerdem kann aus der Steigung abgeleitet werden ( $m>1$ ), dass ein sigmoidaler Kurvenverlauf vorliegt (in Abbildung 37 nicht erkennbar). Der  $IC_{50}$ -Wert für Phlorizin ist mit 124  $\mu\text{M}$  deutlich höher als derjenige für Quercetin-4'-O-glucosid mit 27  $\mu\text{M}$ .

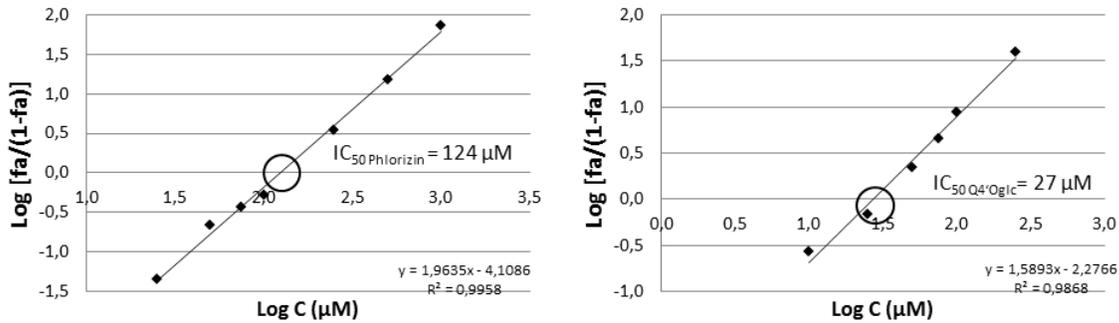


Abbildung 38: ‚Median effect plots‘ und  $IC_{50}$ -Werte von Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid

#### 4.5.4 Inhibitionseffekte von Kombinationen aus Phlorizin & Quercetin-4'-O-glucosid

Eine Kombination aus 2 Wirkstoffen wird in vielen Bereichen der Medizin angewendet, vor allem in der Onkologie. Dafür werden sogenannte ‚model of drug interactions‘ verwendet, um die Wirkung einer Arzneistoffkombination beurteilen zu können. *Chou* und *Talalay* entwickelten 1983 eine Berechnungsmethode für den *Combination Index CI*, mit dem synergistische, additive oder antagonistische Wirkungsweisen einer Arzneistoffkombination bestimmt werden können (*CI-isobol method of Chou and Talalay 1984*). *Zhao et al. (2004)* erläutert diese Berechnungsmethode detailliert und gibt zur Berechnung des Combination Index folgende vereinfachte Formel vor:

$$CI = \frac{C_{A,x}}{IC_{x,A}} + \frac{C_{B,x}}{IC_{x,B}}$$

$C_{A,x}$  und  $C_{B,x}$  sind die Konzentrationen von Substanz A und B, die in der Kombination verwendet werden und eine bestimmte Inhibition x% verursachen.  $IC_{x,A}$  und  $IC_{x,B}$  sind die Konzentrationen der Einzelsubstanzen, die denselben Inhibitionseffekt x% erreichen wie die Kombination.  $IC_{x,A}$  und  $IC_{x,B}$  können durch die lineare Gleichung des *median effect plots* berechnet werden. Ein  $CI < 1$ ,  $=1$  und  $> 1$  indiziert dabei Synergismus, additive Effekte und Antagonismus, wobei im Review von *Chou (2006)* noch eine detailliertere Einteilung zu finden ist. Auf diese Weise wurden die erzielten Ergebnisse aus Punkt 4.5.3 und einer Kombination aus Quercetin-4'-O-glucosid und Phlorizin ausgewertet und in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 15: Inhibitionseffekte unterschiedlicher Kombinationen von Quercetin-4'-O-glucosid und Phlorizin ( $n_{\text{Sensor}}=3$ )

Quercetin-4'-O-glucosid ( $\mu\text{M}$ )	Phlorizin ( $\mu\text{M}$ )	Inhibition der Kombination (%)	Combination index (CI)	Effekt
10	10	14,9±13,0	1,91±1,39	antagonistisch
10	25	15,3±6,9	1,73±0,69	antagonistisch
10	100	52,4±15,6	1,16±0,43	antagonistisch
25	10	32,2±6,2	1,62±0,32	antagonistisch
25	25	31,4±2,6	1,87±0,13	antagonistisch
50	10	45,3±9,2	2,54±0,65	antagonistisch
50	25	49,5±34,6	3,70±1,60	stark antagonistisch
75	10	97,3±0,7	0,40±0,21	synergistisch
75	25	98,6±0,6	0,21±0,06	synergistisch
100	10	97,7±2,9	0,33±0,29	synergistisch
100	25	99,5±0,5	0,11±0,09	stark synergistisch
250	10	99,4±0,8	0,40±0,28	synergistisch

Tabelle 13 zeigt, dass der Inhibitionseffekt der Kombination abhängig von den verwendeten Konzentrationen der Einzelsubstanzen und ihrer individuellen Kombination ist. So konnten synergistische Effekte erreicht werden bei Kombination von 75, 100, 250  $\mu\text{M}$  Quercetin-4'-O-glucosid mit geringeren Dosen an Phlorizin (10 und 25  $\mu\text{M}$ ). Erhöht man allerdings die Phlorizinkonzentration und kombiniert mit geringeren Quercetin-4'-O-glucosid-Konzentrationen, konnten nur antagonistische Effekte gezeigt werden (10  $\mu\text{M}$  Quercetin-4'-O-glucosid + 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin). Frühere erste Ergebnisse der Kombination von 10  $\mu\text{M}$  Quercetin-4'-O-glucosid mit 25, 50, 75, 100, 250  $\mu\text{M}$  Phlorizin zeigten ebenfalls eine antagonistische Wirkung und wurden nicht aufgeführt.

## 4.6 Inhibitionsmessungen am humanen SGLT1

*Die Charakterisierung der ausgewählten pflanzlichen Extrakte und polyphenolischen Reinsubstanzen bezüglich der Hemmung des Glucose Transports durch den humanen Transporter hSGLT-1 wurde an isolierten Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* mittels TEVC durch die Projektpartner Christine Schulze unter der Leitung von Prof. Hannelore Daniel am Zentralinstitut für Ernährung- und Lebensmittelforschung (ZIEL, Technische Universität München) in Freising durchgeführt.*

### 4.6.1 Inhibitionswerte ausgewählter Flavonoide

In Tabelle 16 sind die Inhibitionswerte (%) des 1 mM  $\alpha$ -MDG-Transports abhängig von der eingesetzten Konzentration unterschiedlicher polyphenolischer Substanzen aufgezeigt. Das Dihydrochalcon Phlorizin zeigte in den Untersuchungen am ZIEL mittels der TEVC-Versuche bei bereits 0,5  $\mu$ M eine Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Transports um 54%. Alle anderen gemessenen Konzentrationen polyphenolischer Substanzen liegen deutlich höher. So zeigte das Aglykon Phloretin diese Hemmung erst bei ca. 250  $\mu$ M. Auffällig sind außerdem das Quercetinderivat Quercetin-4'-O-glucosid und Quercetin-3-O-glucosid, die den  $\alpha$ -MDG Strom bei 1000  $\mu$ M um 50-80% hemmen konnten. Andere Quercetinderivate zeigten keine so potenten Hemmwirkungen in diesen Untersuchungen. Kaempferol-3-O-glucosid und -7-O-glucosid und das Aglykon Kaempferol konnten den Substrattransport bei 250  $\mu$ M um 30-40% hemmen. Unter den Flavonen konnte die stärkste Hemmung für Luteolin-4'-O-glucosid mit 86% bei 1000  $\mu$ M verzeichnet werden. Die Flavanone Naringenin und deren Derivate zeigten eher geringe Inhibitionen. Das Aglykon Naringenin inhibierte den  $\alpha$ -MDG-Strom um 60% bei 1000  $\mu$ M, Naringin konnte mit 30% bei 250  $\mu$ M ebenfalls den  $\alpha$ -MDG-Transport hemmen. Andere Substanzen wie z. B. Salicin oder Arbutin zeigten keine Inhibitionseffekte, wobei für Arbutin ein Transport durch den humanen SGLT1 verzeichnet werden konnte.

Tabelle 16: Inhibition (%) des 1 mM  $\alpha$ -MDG-Transports abhängig von der Konzentration ( $n_{\text{Oozyte}}=5$ )

Substrate / MW (g/mol)	Inhibition (%) bei			
	100 $\mu\text{M}$	250 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$
<b>Dihydrochalcone</b>				
Phlorizin / 436	20 $\pm$ 3 (0,125 $\mu\text{M}$ )	54 $\pm$ 3 ( <b>0,5 <math>\mu\text{M}</math></b> )	72 $\pm$ 1 ( <b>1 <math>\mu\text{M}</math></b> )	-
Phloretin / 274	23 $\pm$ 6	42 $\pm$ 3	64 $\pm$ 6	-
Neohesperidin-dihydrochalcon / 612	12 $\pm$ 6	11 $\pm$ 6	-	-
<b>Isoflavone</b>				
Sophoricosid / 432	14 $\pm$ 6	27 $\pm$ 4	-	-
Genistin / 432	-	-	-	5 $\pm$ 3
<b>Flavonole</b>				
Quercetin-3-O-galactosid / 464	-	-	-	43 $\pm$ 3
Quercetin-4'-O-glucosid / 464	48 $\pm$ 2	67 $\pm$ 10 ( <b>200 <math>\mu\text{M}</math></b> )	-	88 $\pm$ 1
Quercetin-3-O-glucosid / 464	-	-	-	50 $\pm$ 1
Rutin / 610	20 $\pm$ 10	29 $\pm$ 5	-	-
Quercetin / 302	-	24 $\pm$ 7 ( <b>200 <math>\mu\text{M}</math></b> )	-	-
Kaempferol-7-O-glucosid / 448	19 $\pm$ 1	27 $\pm$ 9	-	-
Kaempferol-3-O-glucosid / 448	16 $\pm$ 4	29 $\pm$ 1	54 $\pm$ 2	-
Kaempferol / 286	28 $\pm$ 5	42 $\pm$ 10	-	-
<b>Flavone</b>				
Apigenin-7-O-glucosid / 432	24 $\pm$ 3	30 $\pm$ 3	40 $\pm$ 6	-
Luteolin-7-O-glucosid / 448	-	-	-	8 $\pm$ 2
Luteolin-4'-O-glucosid / 448	60 $\pm$ 2	70 $\pm$ 1 ( <b>200 <math>\mu\text{M}</math></b> )	-	83 $\pm$ 2
Luteolin-3',7-O-glucosid / 610	6 $\pm$ 4	7 $\pm$ 3	-	16 $\pm$ 1
<b>Flavanon</b>				
Naringin / 580	14 $\pm$ 4	34 $\pm$ 6	-	-
Naringenin-7-O-glucosid / 434	1 $\pm$ 0	2 $\pm$ 2	-	-
Naringenin / 272	8 $\pm$ 4	12 $\pm$ 7	-	66 $\pm$ 6
<b>Stilbene</b>				
Polydatin / 390	47 $\pm$ 5	67 $\pm$ 7	-	-
2,3,4',5-Tetrahydroxystilben-2-glucosid / 406	keine Inhibition			
<b>Andere</b>				
Arbutin / 272	Transport			
Salicin / 286	keine Inhibition			

fehlende Messung (-) ; Daten der Projektpartner TUM

#### 4.6.2 Kinetikparameter von Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid

Der  $IC_{50}$ -Wert von Phlorizin wurde im Oozytenmodell mit  $0,46 \pm 0,19 \mu\text{M}$  bestimmt. Der  $IC_{50}$ -Wert von Quercetin-4'-O-glucosid lag dagegen bei  $0,17 \text{ mM}$  (Kottra und Daniel, 2007). Es wurde außerdem die Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Stroms durch die Aglyka gemessen, wobei Phloretin eine niedrigere  $IC_{50}$  mit  $0,35 \pm 0,09 \text{ mM}$  aufwies als Quercetin mit  $0,62 \text{ mM}$ . Abbildung 39 zeigt den Dixon-Plot von Phlorizin und lässt mit dem Schnittpunkt der Geraden links der Ordinate eine kompetitive Hemmung vermuten. Der berechnete  $K_i$  von Phlorizin lag bei  $0,14 \pm 0,006 \mu\text{M}$ .

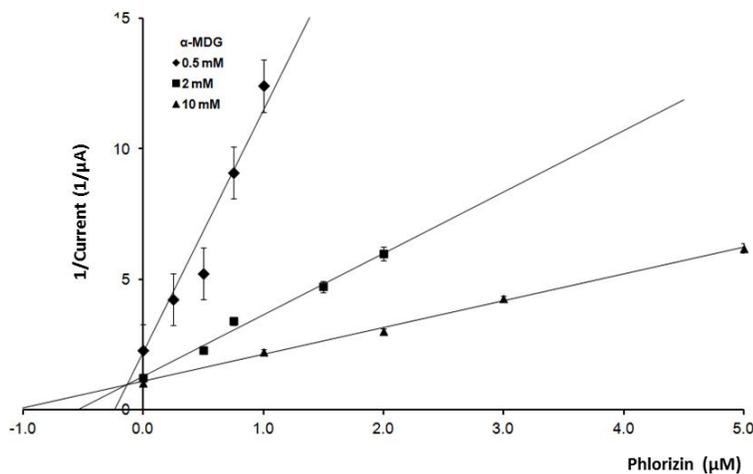


Abbildung 39: Dixon-Plot von Messungen der SGLT1-Inhibition bei unterschiedlichen Phlorizin- und  $\alpha$ -MDG-Konzentrationen, (Daten der Projektpartner TUM)

#### 4.6.3 Inhibitionswerte ausgewählter Pflanzenextrakte

Die Inhibitionswerte des  $1 \text{ mM}$   $\alpha$ -MDG-Stroms in den TEVC-Versuchen am humanen SGLT1 der unter Punkt 4.2 charakterisierten Pflanzenextrakten sind dort aufgeführt. Hier sollen Ergebnisse vorgestellt werden, die die Abhängigkeit der Inhibition vom Flavonoidgehalt unterschiedlich gewonnener Extrakte aufzeigen. Ein Flavonoid-angereicherter Grünkohl-extrakt, der wie unter Punkt 3.6.1 und 3.6.2 mit 15% Ethanol gewonnen und wie unter Punkt 3.6.5 charakterisiert wurde, enthielt  $8\,640 \pm 970 \text{ ppm}$  Gesamtflavonoide (GK-Extrakt-15%). Im Vergleich dazu wurde ein Extrakt getestet, der prinzipiell genauso hergestellt und charakterisiert wurde, allerdings wurden hier die Flavonoide mit 75% Ethanol eluiert, dieser Extrakt enthielt  $109\,370 \pm 16\,560 \text{ ppm}$  Gesamtflavonoide (GK-Extrakt-75%). In den TEVC-Versuchen zeigte der GK-Extrakt-15% bei  $1 \text{ mg/mL}$  keine nennenswerte Inhibition, während

der GK-Extrakt-75% den 1 mM  $\alpha$ -MDG-Stroms bei 1 mg/mL um  $50\pm 4\%$  reduzierte. Die Extrakte wurden ebenfalls am *rbSGLT1* mittels der SURFE<sup>2</sup>R-Technologie getestet. Hier inhibierte der GK-Extrakt-75% den 5 mM  $\alpha$ -MDG-Strom um  $84\pm 25\%$  ( $n_{\text{Sensor}} = 2$ ), während der GK-Extrakt-15% mit  $8\pm 6\%$  kaum eine Inhibition aufwies. Um die Selektivität der Hemmung zu bestätigen, wurden Testungen dieser Extrakte an einem anderen Transportsystem mittels des SURFE<sup>2</sup>Rs ( $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase) von Dr. Christine Keipert am MPI, Frankfurt/Main durchgeführt. Es zeigten sich für beide Extrakte keine Inhibitionseffekte.

#### **4.7 Stabilität der Flavonoide gegenüber der Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH)**

*Wie bereits 2007 herausgefunden worden war, sind einige Flavonoidglycoside in der Lage den SGLT1 im Dünndarmlumen zu inhibieren (Kottra und Daniel, 2007). Zur Entwicklung eines Nahrungsergänzungsmittels, ein Ziel des Projektes, sollte die Verfügbarkeit der Flavonoide am Target (SGLT1) gewährleistet sein. Flavonoide liegen als  $\beta$ -Glycoside vor und können durch  $\beta$ -Glucosidasen im Körper des Menschen gespalten werden. Es sind drei humane  $\beta$ -Glucosidasen bekannt (2.1.2.2.1), wobei nur eine davon in der Lage ist, die im Dünndarm ankommenden Flavonoide zu spalten (Day et al., 1998). Es handelt sich hierbei um die Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH, EC 3.2.1.108), ein membranständiges Enzym, lokalisiert im Dünndarm und hauptverantwortlich für die Spaltung von Lactose in Glucose und Galactose. Arbeiten von Day et al. (1998, 2000 und 2003) bestätigen die Vermutung, dass Flavonoide teilweise durch LPH gespalten werden können. Allerdings wurden tierische oder menschliche Gewebe, in denen die LPH nicht rein vorlag, für diese Testungen verwendet. Um eigene Extrakte und potentielle Inhibitoren des SGLT1 auf ihre metabolische Stabilität zu testen, wurden eigene Experimente an der Tierärztlichen Hochschule in Hannover, Abteilung Physiologische Chemie, unter der Leitung von Professor Dr. Hassan Y. Naim und Dr. Marc Behrendt durchgeführt (Dauer insgesamt ca. 4 Monate). LPH ist käuflich nicht zu erwerben. Die Arbeitsgruppe von Prof. Naim stellte stabile Chinesische-Hamster-Ovarial (CHO)-Zellen mit exprimierter humaner LPH zur Verfügung. Außerdem konnten stabil transfizierte MDCK-Zellen verwendet werden, die die Phlorizin-Hydrolase (Domäne III)*

exprimierten, jedoch nicht Domäne IV, die Lactose-Zentrum. Es konnten Aktivitätsmessungen mit Lactose und Phlorizin als Kontrollsubstanzen und mit über 20 Flavonoid-Referenzsubstanzen, einem Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakt, einem Zwiebelextrakt und einem Apfelextrakt durchgeführt werden.

#### 4.7.1 Substratspezifitäten isolierter LPH für Lactose und Phlorizin

Die  $K_m$ -Werte für Lactose und Phlorizin konnten mit  $149 \pm 32$  und  $2,4 \pm 0,6$  mM bestimmt werden. Folglich ergibt sich eine höhere Affinität der LPH zum Phlorizin. Die Untersuchungen wurden fünfmal in einem Zeitraum durchgeführt, in dem die Reaktion linear war.  $V_{max}$  betrug  $21\,092 \pm 2\,224$  mU\*mg<sup>-1</sup> für Lactose und  $1,1 \pm 0,1$  mU\*mg<sup>-1</sup> für Phlorizin. Kombinationen von 28 mM Lactose und 0,5 mM Phlorizin zeigten eine signifikante Reduktion der Lactosespaltung um 65% ( $n_{Inkubationen}=6$ ), während die Hydrolyse von Phlorizin signifikant um 40% anstieg ( $n_{Inkubationen}=14$ ). Vergleichbare Ergebnisse erhielten *Skovbjerg et al. (1981)*.

#### 4.7.2 Quantifizierung der Enzyme

Die Quantifizierung der isolierten LPH aus CHO-Zellen per SDS-PAGE zeigten, dass das aufgereinigte Enzym in drei Hauptbanden auftritt (Abbildung 40). Die Coomassie-Blue-Anfärbung offenbarte eine komplex glycosylierte Form mit einer Molekularmasse von 230 kDa und eine mannosereiche Form mit 215 kDa (*Behrendt et al. 2010*). Das funktionsfähige Enzym mit 160 kDa konnte ebenso detektiert werden. Die vierte Bande zeigt das Profragment LPH- $\alpha$ . Enzymatisch aktiv sind die mannosereiche Form und die LPH- $\beta$ , deren Banden zur Quantifizierung genutzt wurden. Die Isolation der LPH unterlag je nach Zellwachstum, Qualität der Zellen und Präparationstag starken Schwankungen und konnte mit  $4,75 \pm 3,83$  µg/100 µL Inkubationslösung ( $n=20$ ) bestimmt werden. Zusätzlich standen transfizierte MDCK-Zellen zur Verfügung, die nur Domäne III (MDCK-D3), also die intakte Phlorizin-Hydrolase mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa exprimierten. Dies konnten Aktivitätstests mit Lactose bestätigen, bei denen keine freiwerdende Glucose photometrisch gemessen werden konnte. Die Phlorizin-Hydrolase wurde ebenfalls mit starken Schwankungen mit  $4,05 \pm 3,41$  µg/100 µL Inkubationslösung quantifiziert ( $n=10$ ).

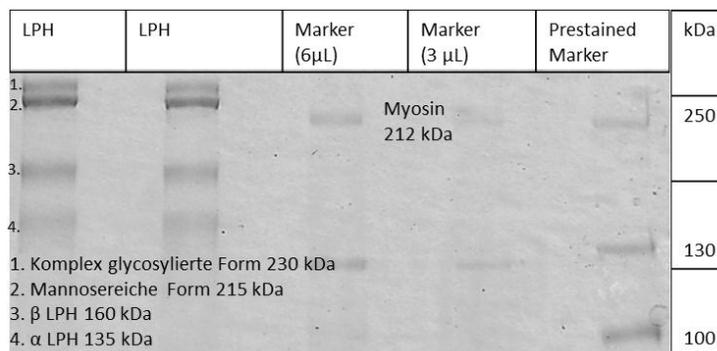


Abbildung 40: SDS Gel (6%) mit LPH-Banden und Markern

#### 4.7.3 Inkubation von Flavonoiden mit isolierter LPH und PH

Die Deglycosylierungsraten (% und  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$  LPH) unterschiedlicher polyphenolischer Substanzen, die mit isolierter LPH 90 min bei pH 7,4 inkubiert wurden ( $n\geq 3$ ), sind in Tabelle 17 aufgeführt. Die höchsten Deglycosylierungsraten (in Tabelle 17 grün), abgesehen vom Dihydrochalcon Phlorizin ( $48\pm 14\%$ ) wurden für Flavonoid-7-O-glucoside erhalten: Kaempferol-, Quercetin-, Naringenin-, Apigenin- und Luteolin-7-O-glucosid (30-60%). Außerdem wurde das Flavon-diglucosid Luteolin-3',7-O-diglucosid ebenfalls stark gespalten (ca. 50% in 90 min). Abbildung 41 zeigt ein Overlay des Luteolin-3',7-O-diglucosids vor und nach der Inkubation mit LPH. Anhand der Peakflächen (in % bezogen auf Luteolin-3',7-O-diglucosid vor der Inkubation) bei 330 nm zeigt sich, dass der Glucoserest in Position 7 stärker abgespalten wurde, als der in Position 3'. Flavonoidglucoside, die in Position 3 des C-Ringes deglycosyliert wurden, wurden zu ca. 20% innerhalb 90 min gespalten (in Tabelle 17 gelb, Kaempferol- und Quercetin-3-O-glucosid). Für Flavone und Flavonole, die in Position 4' glycosyliert sind, wurde ebenfalls eine schwächere Spaltung mit ca. 20% gezeigt. Flavonoid-mono- und -diglycoside mit einer terminalen Rhamnose (Rutin, Naringin, Narirutin und Quercitrin) oder Galactose (Hyperosid), so wie Isoflavonglycoside (Sophoricosid und Genistin) wurden unter den verwendeten Bedingungen durch die humane LPH nicht gespalten. Stilbene und auch kleinere polyphenolische Moleküle wie Salicin oder Arbutin wurden ebenfalls nicht durch die LPH hydrolysiert (in Tabelle 17 rot).

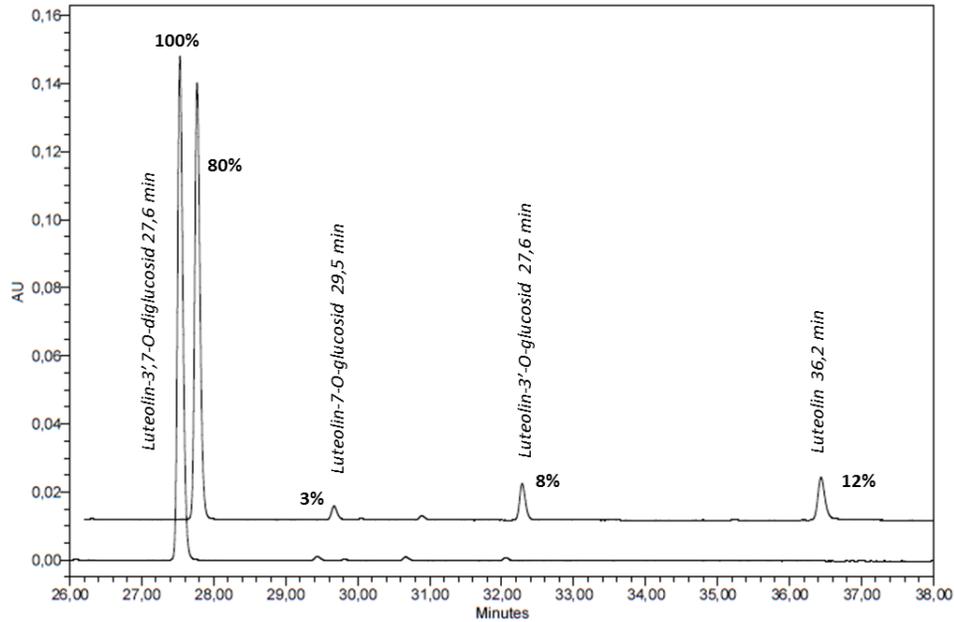


Abbildung 41: Chromatogramm-Overlay von Luteolin-3',7-O-diglucosid

vorn : vor der Inkubation, hinten : nach der Inkubation mit LPH bei 330 nm

Tabelle 17: Deglycosylierungsraten unterschiedlicher polyphenolischer Substanzen gegenüber der LPH innerhalb von 90 min, pH 7,4 ( $n \geq 3$ )

Substrate / MG (g/mol)	Deglycosylierung	
	$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg LPH}$	% in 90 min
<b>Dihydrochalcone</b>		
Phlorizin / 436	0,095±0,031	48±14
Neohesperidin-dihydrochalcon / 612	0	0
<b>Isoflavone</b>		
Sophoricosid / 432	0	0
Genistin / 432	*	*
<b>Flavonole</b>		
Quercetin-4'-O-glucosid / 464	0,022±0,005	17±2
Quercetin-3-O-glucosid / 464	0,033±0,015	17±7
Quercetin-7-O-glucosid / 464	0,056±0,010	29±1
Quercitrin (Q-3-O-rha) / 448	0	0
Hyperosid (Q-3-O-gal) / 464	0	0
Quercetin-3,4'-O-diglucosid/ 626	0	0

Rutin / 610	0	0
Kaempferol-3-O-glucosid / 448	0,026±0,009	14±5
Kaempferol-7-O-glucosid / 448	0,063±0,017	30±9
Kaempferol-3-O-rutinosid / 594	0	0
<b>Flavanone</b>		
Naringenin-7-O-glucosid / 434	0,065±0,020	31±10
Naringin / 580	0	0
Narirutin / 580	0	0
<b>Flavone</b>		
Apigenin-7-O-glucosid / 432	0,073±0,037	56±32
Luteolin-4'-O-glucosid / 448	0,026±0,004	15±2
Luteolin-7-O-glucosid / 448	0,057±0,024	30±13
Luteolin-3',7-O-glucosid / 610	0,097±0,039	48±19
<b>Stilbene</b>		
Polydatin / 390	0	0
2,3,4',5-Tetrahydroxystilben-2-glucosid / 406	0	0
<b>Andere</b>		
Arbutin / 272	0	0
Salicin / 286	0	0

\*Deglycosylierung hat stattgefunden, Menge war nicht bestimmbar ;  $n \geq 3$  ;  $n_{\text{Phlorizin}}=40$

Das pH-Optimum der humanen LPH liegt für die Spaltung von Lactose und Phlorizin laut *Skovbjerg et al. (1981)* zwischen pH 5,8 und pH 6. Für ausgewählte Flavonoidglycoside konnte bei pH 6 eine signifikant höhere Deglycosylierungsrate ( $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg LPH}$ ) aufgezeigt werden (Tabelle 18). So wurden Flavonoidglycoside, die in Position 4' glucosyliert sind, in der gleichen Inkubationszeit bei pH 6 um 40-60% stärker gespalten. Auch für Phlorizin konnte ein signifikanter Unterschied in der Deglycosylierungsrate abhängig vom pH-Wert verzeichnet werden (Anstieg bei pH 6 um 40%).

Tabelle 18: Deglycosylierungsraten unterschiedlicher polyphenolischer Substanzen gegenüber der LPH innerhalb von 90 min, pH 6 ( $n \geq 3$ )

Substrate / MG (g/mol)	Deglycosylierung $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$	% in 90 min
<b>Dihydrochalcone</b>		
Phlorizin / 436	0,167 $\pm$ 0,022*	66 $\pm$ 9
<b>Flavone/Flavonole</b>		
Quercetin-4'-O-glucosid / 464	0,051 $\pm$ 0,012*	26 $\pm$ 6
Quercetin-3-O-glucosid / 464	0,046 $\pm$ 0,007*	22 $\pm$ 2
Quercetin-7-O-glucosid / 464	0,119 $\pm$ 0,048	39 $\pm$ 8
Luteolin-4'-O-glucosid / 448	0,040 $\pm$ 0,004**	29 $\pm$ 10

\* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  Signifikante Erhöhung der Deglycosylierungsrate im Vergleich zur pH 7,4

Zur Ermittlung der für die Flavonoid Spaltung verantwortlichen LPH-Domäne wurden weitere Untersuchungen mit der isolierten Domäne III (Phlorizin-Hydrolase) mit ausgewählten Flavonoiden durchgeführt. In Tabelle 19 werden die Deglycosylierungsraten der Flavonoide vorgestellt, die mit isolierter Phlorizin-Hydrolase inkubiert wurden. In rot gekennzeichnet sind die Substanzen, die von der Domäne III nicht umgesetzt worden sind; hierbei handelte es sich um Flavonoide, die in Position 4' glucosyliert waren. Das namensgebende Substrat der LPH, Phlorizin, wurde von der isolierten Phlorizin-Hydrolase sogar deutlich besser umgesetzt, als von der gesamten LPH und ist vergleichbar mit dem Ergebnis der Inkubation bei pH 6. Für Flavonoidderivate, die einen Glucoserest in Position 3 und 7 tragen, konnten ebenfalls gute bis sehr gute Spaltungen gezeigt werden, wobei eine signifikante Erhöhung der Deglycosylierungsrate für Kaempferol- und Luteolin-7-O-glucosid zu verzeichnen war. Alle restlichen Deglycosylierungsraten unterschieden sich nicht signifikant von denen, die bei Inkubation mit der kompletten Lactase-Phlorizin-Hydrolase entstanden sind.

Tabelle 19: Deglycosylierungsraten unterschiedlicher polyphenolischer Substanzen gegenüber der Phlorizin-Hydrolase innerhalb von 90 min, pH 7,4 ( $n \geq 3$ )

Substrate / MG (g/mol)	Deglycosylierung $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg PH}$	% in 90 min
<b>Dihydrochalcone</b>		
Phlorizin / 436	0,167 $\pm$ 0,027***	61 $\pm$ 11
<b>Flavonole</b>		
Quercetin-4'-O-glucosid / 464	0	0
Quercetin-3-O-glucosid / 464	0,051 $\pm$ 0,018	14 $\pm$ 5
Quercetin-7-O-glucosid / 464	0,040 $\pm$ 0,001	16 $\pm$ 6
Kaempferol-3-O-glucosid / 448	0,039 $\pm$ 0,010	19 $\pm$ 4
Kaempferol-7-O-glucosid / 448	0,110 $\pm$ 0,011**	45 $\pm$ 9
<b>Flavone</b>		
Luteolin-4'-O-glucosid / 448	0	0
Luteolin-7-O-glucosid / 448	0,111 $\pm$ 0,017*	35 $\pm$ 11
<b>Flavanone</b>		
Naringenin-7-O-glucosid / 534	0,106 $\pm$ 0,017	43 $\pm$ 7

\* $P < 0,05$  ; \*\* $P < 0,01$  ; \*\*\* $P < 0,001$  ; Signifikante Erhöhung der Deglycosylierungsrate im Vergleich zur LPH

#### 4.7.4 Inkubation von Flavonoid-haltigen Pflanzenextrakten mit isolierter LPH und PH

Für weitere Inkubationstestungen ( $n \geq 3$ ) mit Lactase-Phlorizin-Hydrolase und Phlorizin-Hydrolase wurden bereits charakterisierte Pflanzenextrakte verwendet. Der unter 4.2.2 charakterisierte Zwiebelextrakt enthielt Quercetin-4'-O-glucosid mit etwa 10% in der Trockenmasse als Hauptkomponente. Nach 90 minütiger Inkubation unterschiedlicher Konzentrationen des Extraktes mit LPH bei pH 7,4 sind 40 $\pm$ 4% des Quercetin-4'-O-glucosids (Peak 11) deglycosyliert worden und Quercetin (Peak 16) stieg um Faktor 2,4 an (Abbildung 42). Quercetin-3,4'-O-glucosid (Peak 5), welches mit ca. 5% im Zwiebelextrakt vorhanden war, wurde durch die LPH nicht angegriffen, das bestätigten auch die Inkubationsversuche der Einzelsubstanz.

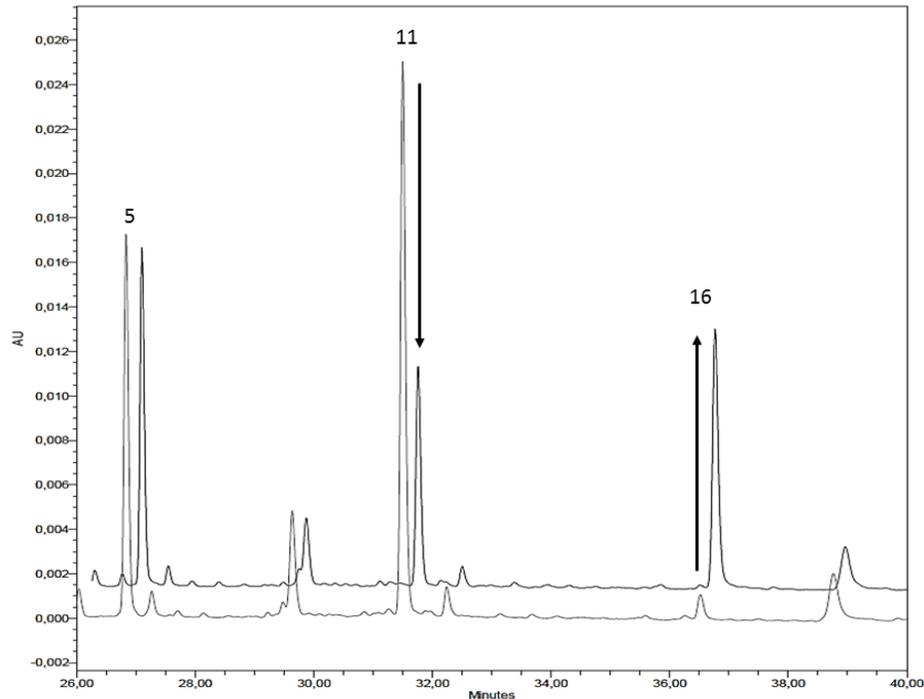


Abbildung 42: Chromatogramm-Overlay eines Zwiebelextraktes

vorn : vor der Inkubation, hinten : nach 90-minütiger Inkubation mit LPH bei pH 7,4; Detektion bei 330 nm

Inkubationsversuche der LPH mit einem wie unter Punkt 4.2.1.2 charakterisierten Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakt zeigten im HPLC-Chromatogramm (Abbildung 43) teilweise erhöhte und auch erniedrigte Peaks. Extrakte des Grünkohls enthalten Flavonoide, die in Position 3 und 7 der Flavonolglyka glucosyliert vorliegen, für unterschiedliche Einzelsubstanzen (siehe Tabelle 17) konnten bereits Spaltungen gezeigt werden. In dem untersuchten GK-Extrakt konnten jedoch keine Aglyka (Quercetin oder Kaempferol) detektiert werden. Flavonole im Grünkohl sind mit bis zu fünf Glucosemolekülen verknüpft, wobei diese Flavonoidglycoside teilweise mit Hydroxyzimtsäuren acyliert vorlagen. Peak 24b, 28 und 31 sind acylierte Flavonolglycoside, deren Flächen nach Inkubation mit LPH im Mittel um 16% sanken. Die Peakflächen von Peak 23 und 25, beides Flavonol-triglycoside stiegen um 13 und 40%, was auf eine Partial-Hydrolyse der acylierten und hochglucosylierten Flavonoide hindeutet. Die Peakflächen von 47/48 und 50, welche glycosylierte Hydroxyzimtsäurederivate darstellen, zeigten eine starke Abnahme um 40-50%. Auffällig sind zwei Peaks, die bei 38,2 und 38,8 min eluierten, UV-Daten aufwiesen, die der Sinapin- und Ferulasäure sehr ähnelten und deren Flächen nach

der Inkubation mit LPH stark anstiegen. Sinapin- und Ferulasäure als Referenzsubstanzen eluieren unter den verwendeten Bedingungen normalerweise bei 30,2 und 30,4 min. Diese Peaks könnten Ester oder Oligomere der oben genannten Säuren sein (*Dobberstein und Bunzel, 2010*).

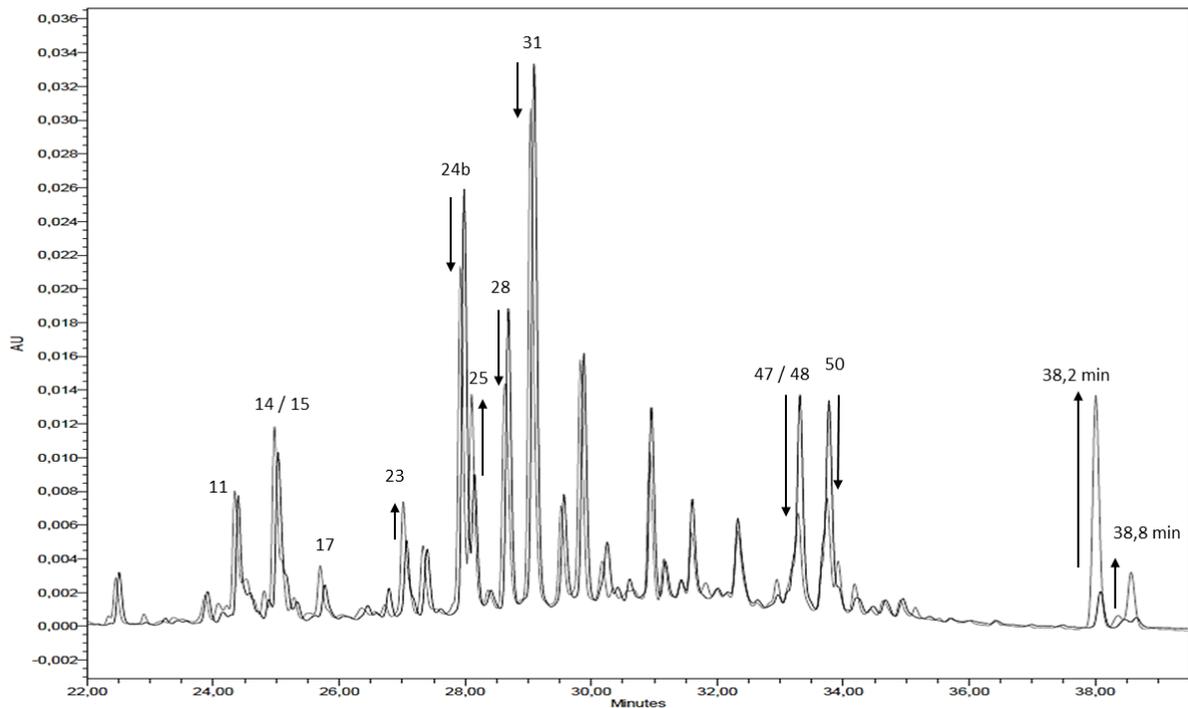


Abbildung 43: Chromatogramm-Overlay eines flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes

schwarz : vor und grau : nach 90-minütiger Inkubation mit LPH bei pH 7,4; Detektion bei 330 nm

Des Weiteren wurden Inkubations-Untersuchungen mit einem Apfelextrakt durchgeführt, der 16% Phlorizin enthält. Dieser Extrakt wurde bereits unter Punkt 4.2.4 beschrieben und charakterisiert. Die Inkubation mit LPH zeigte eine Deglycosylierung von Phlorizin um ca. 50%. Dies ist in der Abnahme des Peaks 12 in Abbildung 44 zu erkennen. Eine Inkubation mit isolierter Phlorizin-Hydrolase zeigte ähnliche Ergebnisse (Tabelle 20). Peak 7 stellt ein Quercetin-3-O-glucosid dar und zeigte ebenfalls eine Abnahme des Signals, wohingegen Quercetin bei 36,7 min zunimmt (eigentliche Detektionswellenlänge von Quercetin: 360 nm). Chlorogensäure (Peak 2) wurde logischerweise nicht von der LPH angegriffen.

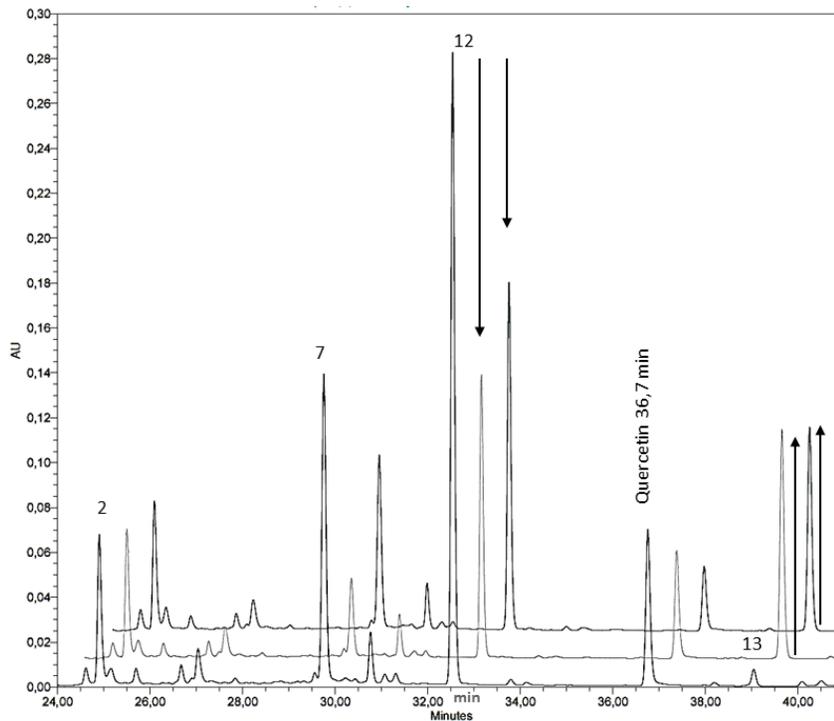


Abbildung 44: Chromatogramm-Overlay eines Apfelextraktes

1. Reihe vor ; 2. und 3. Reihe nach 90-minütiger Inkubation mit LPH bei pH 7,4 (3. Reihe) und mit PH bei pH 7,4 (2. Reihe), Detektion bei 280 nm

In Tabelle 20 sind die Deglycosylierungsraten der Hauptkomponenten eines Zwiebel- und Apfelextraktes aufgeführt. Phlorizin wurde sowohl nach Inkubation mit LPH als auch mit PH zu 50% gespalten, während Quercetin-4'-O-glucosid von der LPH bis zu 35% deglycosyliert wurde. Die Phlorizin-Hydrolase spaltet die Flavonol-Hauptkomponente im Zwiebelextrakt nicht, was Inkubationen der Einzelsubstanz ebenfalls zeigten.

Tabelle 20: Deglycosylierungsraten der Hauptkomponenten unterschiedlicher Pflanzenextrakte nach 90-minütiger Inkubation mit LPH und PH bei pH 7,4 ( $n \geq 3$ )

Pflanzenextrakte (LPH)	Deglycosylierung $\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$	% in 90 min
Zwiebelextrakt (ZE 420), Quercetin-4'-O-glucosid	0,024±0,014	35±8
Apfelextrakt (AE 15%), Phlorizin	0,205±0,102	55±17
Pflanzenextrakte (PH)		
Zwiebelextrakt (ZE 420), Quercetin-4'-O-glucosid	0	0
Apfelextrakt (AE 15%), Phlorizin	0,197±0,082	49±13

### 4.7.5 Inkubation von Kombinationen mit isolierter LPH

Es wurden außerdem Kombinationstests durchgeführt, die Informationen über die Spaltung und über die Affinität der LPH zu den Substraten geben sollten. Dabei wurde 28 mM Lactose mit 0,5 mM eines Flavonoids oder mit 1 mg/mL eines Flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes kombiniert. Außerdem wurden zwei Flavonoide in einer Konzentration von 0,5 mM miteinander kombiniert. Die Lactosespaltung wurde nicht nur durch Phlorizin signifikant reduziert (65%), sondern auch um 47% in einer Kombination mit Kaemferol-7-O-glucosid (Abbildung 45), wobei ein Lactosezusatz auf die Spaltung des Flavonolglucosids keinen Einfluss hatte (Daten nicht gezeigt). In Kombination mit einem Grünkohlextrakt wurde die Lactose normal umgesetzt. Inkubationstestungen von Quercetin-4'-O-glucosid zeigten, dass dieses Flavonolderivat nur von der LPH, nicht aber von der PH umgesetzt werden konnte. In Kombination mit Lactose reduzierte sich die Lactosespaltung um 78% (Abbildung 45), während die Spaltung des Quercetin-4'-O-glucosids nicht beeinflusst wurde (Daten nicht gezeigt). Kombinierte man dieses mit Phlorizin, beeinflussten sich beide nicht in ihrer Spaltung.

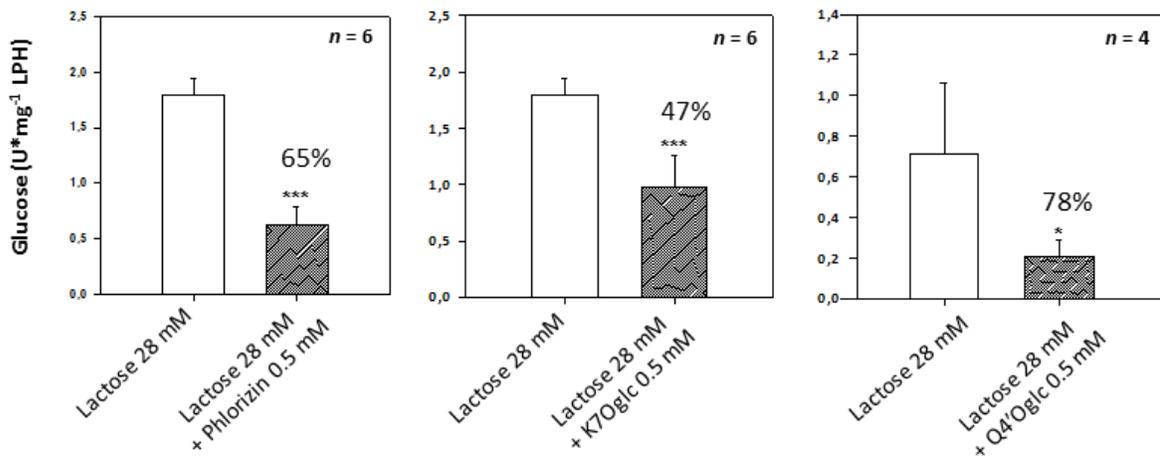


Abbildung 45: Reduktion (%) der Lactosespaltung durch Flavonoide

#### 4.7.6 *Ex vivo*-Versuche ‚everted gut sac model‘

‚Everted gut sac‘-Versuche mit Mäusedarm zeigten nach Inkubation mit Phlorizin ebenfalls eine Metabolisierung des Dihydrochalcon an. In Abbildung 46 ist die Phlorizinkonzentration nach der jeweiligen Inkubationszeit mit Mäusedarm für 100 und 500  $\mu\text{M}$  Phlorizin aufgezeigt. Eine deutliche Abnahme der Konzentration ist ersichtlich. Bei Verwendung von 100  $\mu\text{M}$  Phlorizin konnte eine Abnahme von 84% nach 90 min verzeichnet werden. Bei Einsatz von 500  $\mu\text{M}$  Phlorizin wurde dies nach 90 min um 61% hydrolysiert. Phlorizin wurde teilweise zu Phloretin gespalten, aber auch in Metabolite umgewandelt (Abbildung 47). Untersuchungen des serosalen Fluids ergaben eine Wiederfindung vom eingesetzten Phlorizingehalt von 0,1-1,5%. Die eventuelle Adsorption von Phlorizin an die Bürstensaummembran wurde nicht untersucht. Die Abnahme von Kaempferol-3-O-glucosid nach 30 und 60 min betrug ca. 30%. In der Inkubationslösung konnte eine Abnahme des Kaempferol-3-O-glucosid Signals detektiert werden, allerdings keine starke Zunahme des Aglykons.

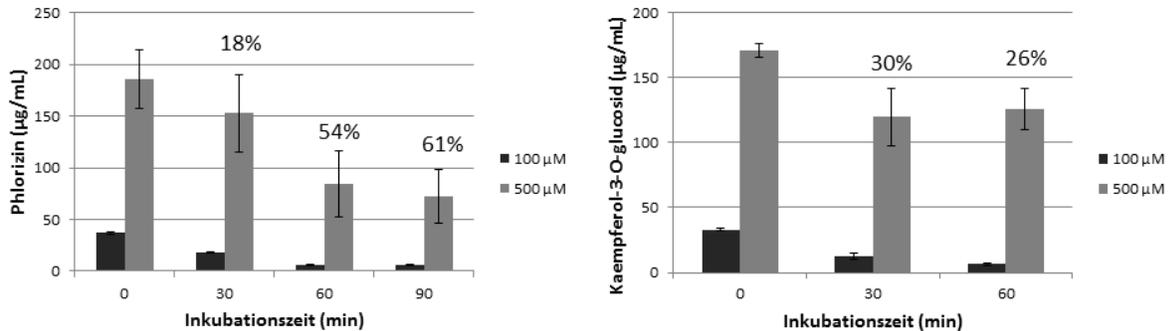


Abbildung 46: Abnahme (%) von Phlorizin (links) und Kaempferol-3-O-glucosid nach Inkubation mit Mäusedarm ( $n=3$ )

Mittels HPLC-ESI(-)-MS<sup>2</sup> Untersuchungen gelang es, die Metabolite nach der Inkubation zu identifizieren. Die Maxima der UV-Spektren der Peaks lagen mit 223/219 nm (Bande II) und 280/287 nm (Bande II) im Bereich des Phlorizin Spektrums (221/284 nm). Die MS-Daten bestätigten, dass es sich hierbei um Phlorizinderivate handelte. Beide Peaks mit den Retentionszeiten von 33,9 und 36,3 min konnten mit einem Molekulargewicht von 450 g/mol als Phloretin-glucuronide identifiziert werden. Der Molpeak lag demnach bei

449  $m/z$ . Nach Abspaltung ( $\Delta$  176 amu) der Glucuronsäure (194 g/mol) konnte das Aglykon Phloretin mit 273  $m/z$  detektiert werden.

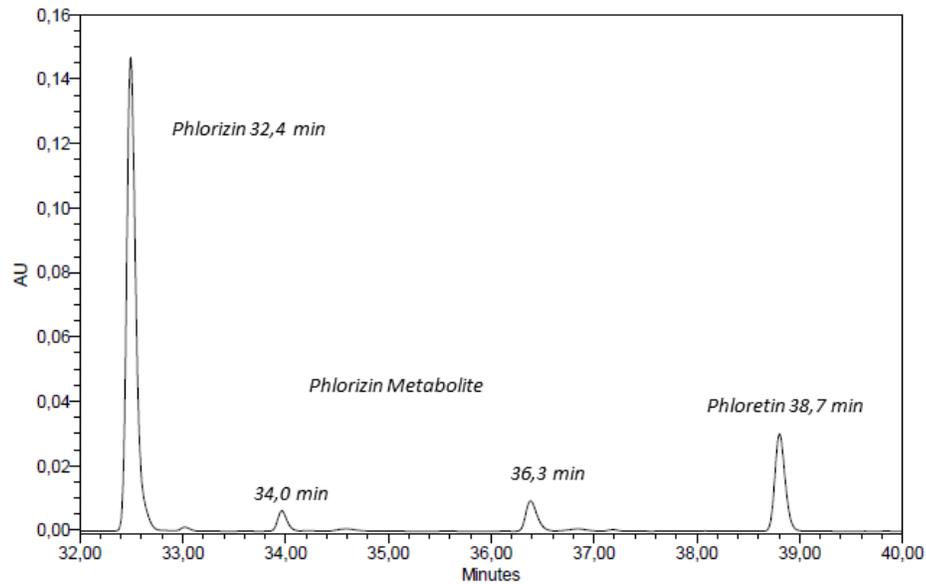


Abbildung 47: HPLC-Chromatogramm von Phlorizin nach 30-minütiger Inkubation mit Mäusedarm, Detektion 280 nm

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Charakterisierung der Ausgangsmaterialien

#### 5.1.1 Grünkohl

Unterschiedliche Grünkohlarten wurden auf ihren Gesamtflavonoidgehalt untersucht und miteinander verglichen. Die getesteten Grünkohlarten wiesen Gesamtflavonoidgehalte zwischen 1 200 und 5 500 ppm (120-550 mg/100 g) in der Frischmasse auf. Für *Brassica oleracea* var. *sabellica* L. lassen sich keine vergleichbaren Angaben zum Gesamtflavonoidgehalt in der Literatur finden. Jedoch werden polyphenolische Ausgangsmaterialien in der Literatur über den Gesamtpolyphenolgehalt charakterisiert, der den Flavonoidgehalt beinhaltet. Gesamtpolyphenolwerte für einen nicht vorbehandelten, frisch geernteten Grünkohl (Sorte Wintherbor) berechnet als Chlorogensäure lagen bei *Sikora et al. (2007)* bei 770 mg/100 g Frischmasse. Blanchierter, wieder eingefrorener Kohl wies hingegen einen geringeren Polyphenolgehalt von ca. 300 mg/100 g Frischgewicht auf. Der ermittelte Polyphenolgehalt des CITTI-Grünkohls, der in dieser Arbeit hauptsächlich verwendet wurde, lag bei ca. 2 000 ppm (200 mg/ 100 g berechnet als (+)-Catechin-äquivalente). Der CITTI-Grünkohl wurde schon blanchiert (3 min bei 94-98°C) geliefert und bei -18 °C gelagert; dementsprechend geringer ist hier auch der Gesamtflavonoidgehalt mit 1 540±100 ppm. Unbehandelte Sorten aus Ostfriesland wiesen dagegen höhere Gehalte zwischen 2 000 und 3 000 ppm auf. Bei *Ahmet Ayaz et al. (2007)* wird der Gesamtpolyphenolgehalt des Zierkohls (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) mit 137 mg/100 g berechnet als Gallussäure in der Frischmasse angegeben. Der ermittelte Wert des verwendeten CITTI-Grünkohls mit 187 mg/100 g berechnet als Gallussäureäquivalente liegt ebenfalls in diesem Konzentrationsbereich. Die Grünkohlart Reflex F1 wurde im Rahmen dieser Arbeit mehrmals untersucht, wobei der bereits blanchierte CITTI-GK hier die höchsten Flavonoidgehalte aufwies. Im CITTI-GK konnten nach saurer Hydrolyse (*Ph. Eur.*), also Spaltung glycosidischer Bindungen zu Flavonolaglyka, Kaempferol (135±10 ppm) und Quercetin (85±5 ppm) als Hauptaglyka identifiziert werden. Isorhamnetin dagegen konnte nach Hydrolyse nur in Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakten nachgewiesen werden.

*Hertog et al. (1992b)* konnte in ‚kale‘ (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) folgende Aglykawerte finden: Quercetin mit 110 mg/kg und Kaempferol 211 mg/kg in der Frischmasse. Diese lagen 5-10-mal höher als in fast allen anderen untersuchten 28 unterschiedlichen Gemüse- und 9 Fruchtarten. *Justesen et al. (1998)* finden im Grünkohl dagegen sehr hohe Aglykawerte für Kaempferol (47 mg/100 g) und Quercetin (12 mg/100 g). *Schmidt et al. (2010)* untersuchten den Aglykagehalt von 8 unbehandelten Grünkohlarten nach saurer Hydrolyse. Kaempferol konnte dabei mit 62-190 mg/100 g in der Frischmasse dieser Sorten quantifiziert werden und stellte neben Quercetin mit 16-82 mg/100 g das Hauptflavonol dar. Isorhamnetin konnte in 6 der 8 Sorten mit 10-60 mg/100 g nachgewiesen werden. *Zhang et al. (2003)* untersuchten zwei kommerzielle Grünkohlarten und fand 77-244 ppm Quercetin und 235-347 ppm Kaempferol. Außerdem wurde der Effekt eines Blanchierprozesses auf die Flavonolgehalte untersucht; so konnte ein Verlust an Aglyka nach erfolgter Hydrolyse der Ausgangsmaterialien von bis zu 60% verzeichnet werden. *Sikora et al. untersuchten 2007* den Einfluss unterschiedlicher Aufbereitungsverfahren auf den Vitamin C-, den Polyphenolgehalt und die antioxidative Kapazität unterschiedlicher Gemüsearten. Der Blanchierprozess (3 min, 80°C) beeinflusste die genannten Parameter im Kohl (*Brassica oleracea* var. *acephala*), dabei sank der Vitamin C Gehalt um 40% und auch der Polyphenolgehalt nahm um 30% ab. Die Lagerung des blanchierten Kohls bei -22°C minderte den Polyphenolgehalt nochmals um 30%. Eigene Untersuchungen eines unbehandelten Grünkohls (Sorte ‚Halbhoher Grüner Krauser‘), der Ende Januar 2010 in der Nähe von Schwerin geerntet worden war, zeigten mit 270±60 ppm Quercetin und 230±50 ppm Kaempferol in der Frischmasse höhere Aglykagehalte als im CITTI-GK. Nach 3 min des Blanchierens bei 98°C sank der Aglykagehalt um bis zu 60% auf ca. 100 ppm Quercetin und 120 ppm Kaempferol und lag somit im Bereich des Flavonolgehalts des CITTI-GKs. Weitere Untersuchungen mit diesem Grünkohl, allerdings Ende November 2009 geerntet, ergaben ähnliche Verluste im Flavonoidgehalt beim Blanchieren. Auffällig war, dass im noch unbehandelten Grünkohl (Ernte 2009) der Quercetiningehalt nach Hydrolyse mit 132±10 ppm in der Frischmasse deutlich niedriger war, als im Grünkohl, der Anfang 2010 geerntet wurde. Die Gesamtflavonoidgehalte der Grünkohle lagen zwischen 2 300 und 2 600 ppm. *Zietz et al. (2010)* konnten aufzeigen, dass Temperatur und

Sonneneinstrahlung Einfluss auf den Polyphenolgehalt unterschiedlicher Kohlsorten nehmen und je später geernteter Grünkohl höhere Quercetingehalte aufwies. Außerdem zeigten analytische Untersuchungen zu unterschiedlichen Kohlsorten von *Schmidt et al. (2010)* bei Temperaturabfall innerhalb eines definierten Erntezeitraums höhere Werte an Quercetin und einen Abfall von Kaempferol, während der Gesamtgehalt an Flavonolen gleich blieb. Geringe Temperaturen korrelieren mit der Anreicherung von reaktiven Sauerstoffspezies und verursachen dadurch einen Anstieg des Flavonoidgehalts (*Klimov et al., 2008*).

LC-ESI(-)-MS<sup>2</sup>-Untersuchungen offenbarten ein komplexes Flavonoidmuster im Grünkohl (siehe ERGEBNISSE Abbildung 18). Die Identifizierung der Peaks erfolgte in einem Flavonoidangereicherten Grünkohlextrakt anhand von Retentionszeiten, UV-Daten, Massenspektren und anhand von Literatur. Elektro-Spray-Ionisation gekoppelt mit HPLC erlaubte die direkte Strukturanalyse der polyphenolischen Sekundärstoffe aus den gewonnenen Grünkohl-extrakten und gab Auskunft über die Struktur der Aglyka, die glycosidischen Reste und deren interglycosidische Bindung. Elektro-Spray-Ionisation im positiven Modus (wurde ebenfalls durchgeführt, Daten nicht gezeigt) stellte bereits aussagekräftige Informationen über die Aglyka zur Verfügung. ESI im negativen Modus allerdings ergab eine stärkere Fragmentierung und ermöglichte damit eine bessere Aussage über glycosidisch gebundene Zuckerreste und Acylreste, die an Flavonoide gebunden sind (*Ferreres et al., 2004*). Es konnten über 60 Verbindungen detektiert werden, die aus 49 Flavonoidglycosiden und 12 Hydroxyzimtsäurederivaten bestanden. Flavonoidglycoside waren teilweise mit Hydroxyzimtsäuren acyliert. Die Elektro-Spray-Ionisierungsuntersuchungen bestätigten, dass die Aglykagerüste der Flavonoid-glycoside überwiegend aus den Flavonolen Quercetin und Kaempferol bestehen. Kaempferol und Quercetin waren mit bis zu 5 Glucoseresten verknüpft und diese wiederum teilweise mit unterschiedlichen Hydroxyzimtsäuren wie Sinapin-, Hydroxyferula- und Ferulasäure acyliert. Untersuchungen anderer *Brassica*-Arten zeigten ähnliche komplexe Zusammensetzungen der Flavonoid-Komposition (*Llorach et al., 2003; Rochfort et al., 2006; Harbaum et al., 2007*). Es wird postuliert, dass die Acylierung der Flavonoide mit Hydroxyzimtsäuren für die Akkumulation der Flavonoide in Zellvakuolen

verantwortlich ist (Matern *et al.*, 1986; Hopp und Seitz *et al.*, 1987). Die Acylreste führen zu einer stärkeren UV-Absorption (Heß, 2008).

Die Elutionszeiten der identifizierten Verbindungen spiegelten den Verlauf des verwendeten Acetonitril-Aqua bidest.-Gradienten wieder, der mit Aqua bidest. startete und langsam innerhalb von 30 min auf 100% Acetonitril anstieg. Zwei Quercetin-tetraglucoside konnten bei Retentionszeiten um die 22 min detektiert werden. Es konnten 2 Quercetin-monoglucoside und 1 Quercetindiglucoxid identifiziert werden, die bei ca. 30 min eluieren. Quercetrin-triglucoxid mit unterschiedlichen Glucosylierungspositionen konnten bei ca. 23, 27 und 28 min identifiziert werden. Es wurden außerdem 8 Kaempferolglucoside identifiziert. Kaempferol besitzt in Position 3' des B-Ringes eine Hydroxylgruppe weniger als Quercetin, weshalb Kaempferolderivate etwas später als korrespondierende Quercetinderivate eluieren. Bei 24-26 min konnten Kaempferoltetraglucoside detektiert werden, während bei 27-30 min Flavonoltri- und -diglucoxid eluieren. Außerdem gelang es 19 acylierte Quercetin- und 13 acylierte Kaempferolglucoside im Grünkohlextrakt zu identifizieren, die mit bis zu fünf Glucoseresten verknüpft vorlagen. Mittels spezifischen Fragmentmustern in den Massenspektren konnte eine 1→2 interglucosidische Bindung zwischen den Glucoseresten der Flavonole identifiziert werden (Sophoroside). Die Elutionsreihenfolge der Kaempferol-3-O-acyl-Sophoroside im HPLC-Chromatogramm ist abhängig vom Acylierungsrest und folgt der Reihenfolge: Hydroxyferuloyl- < Sinapoyl- < Feruloylrest (Rochfort *et al.*, 2006). Dieses Elutionsverhalten konnte für Kaempferol-3-O-sinapoyl-Sophorosid (Peak 33) und Kaempferol-3-O-feruloyl-Sophorosid (Peak 36) bestätigt werden (ERGEBNISSE Tabelle 6). Flavonol-3-O-acyl-diglucoxid konnten ebenfalls in unterschiedlich gewonnenen Extrakten verschiedener Grünkohlarten von Olsen *et al.* (2009) und Schmidt *et al.* (2010) charakterisiert werden. Für die Identifizierung wurde in beiden Arbeitsgruppen LC-ESI-MS<sup>5</sup> verwendet, was eine stärkere Fragmentierung und eine noch genauere Beschreibung und Interpretation der Flavonoidstrukturen ermöglicht. Die Retentionszeiten der acylierten Kaempferol-triglucoxid folgten ebenfalls dem oben beschriebenen Elutionsmuster. So eluierte Peak 10 (Kaempferol-3-O-hydroxyferuloyl-Sophorosid-7-O-glucosid) vor Peak 16 (Sinapoylrest) und vor Peak 18 (Feruloylrest). Schmidt

*et al. (2010)* konnten bis zu 71 unterschiedliche Flavonoide in einem methanolischen Grünkohlextrakt der Sorte ‚Altmärker Braunkohl‘ identifizieren, unter anderem vorher noch nie identifizierte acylierte Isorhamnetinglycoside. *Olsen et al. (2009)* verwendeten einen methanolischen Grünkohlextrakt der Sorte Reflex F1, die sich ebenfalls hinter dem CITTI-GK verbirgt und für die eigene Extrakterstellung verwendet wurde. Sie identifizierten 23 Flavonoide und 9 Hydroxyzimtsäurederivate, wobei Quercetin-3-O-sinapoyl-diglucosid-7-O-diglucosid mit 16,5% und Kaempferol-3-sinapoyl-diglucosid-7-O-diglucosid mit ca. 19% als Hauptkomponenten quantifiziert wurden. Diese Ergebnisse konnten durch eigene Untersuchungen bestätigt werden, so konnte in dem Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakt aus dem CITTI-GK mit fast 19% Quercetin-3-O-sinapoyl-triglucosid-7-O-glucosid und mit fast 16% Kaempferol-3-sinapoyl-diglucosid-7-O-diglucosid als Hauptverbindungen identifiziert werden. Quantitative Bestimmungen und die Interpretation der Glycosylierung weichen teilweise von den Literaturdaten ab, da diese abhängig von der Extraktion und der Art der verwendeten MS-Detektion ist. Flavonoide, die mittels eines Adsorberharzes (MATERIAL UND METHODEN 3.6.2) angereichert wurden, konnten durch unterschiedliche Ethanolkonzentrationen eluiert werden. Hier zeigte sich eine unterschiedliche Zusammensetzung der teils acylierten und glycosylierten Flavonolderivate (berechnet über die Peakflächen in % bei 330 nm). Beispielsweise waren im Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakt, der durch die Elution mit 75% Ethanol gewonnen worden war, weniger acylierte Kaempferolderivate enthalten (30%) als im einem Extrakt, der mit 100% Ethanol gewonnen worden war (46%). Acylierte Quercetinderivate waren dagegen im 75%-Ethanolextrakt stärker vertreten (37%), als im 100% Ethanolextrakt (18%). Flavonolglycoside und auch Hydroxyzimtsäurederivate waren in beiden Extrakten gleich stark vertreten. *Olsen et al. (2009)* identifizierten in einem wässrigen Methanolextrakt ca. 24% acylierte Quercetinderivate und 35% acylierte Kaempferolderivate. Derivate der Hydroxyzimtsäure konnten mit 32% der Signalgesamtläche bei 330 nm bestimmt werden, während Flavonolglycoside mit insgesamt 7% vorhanden waren, wobei hier Kaempferolglycoside überwogen. Außerdem konnten acylierte und stark glucosylierte Flavonolderivate bei relativ späten Retentionszeiten detektiert werden, z.B. Peak 28 als Quercetin-3-O-disinapoyl-triglucosid-7-O-diglucosid bei 28,5 min oder Peak 30 bei 28,6 min als Kaempferol-

3-O-disinapoyl-triglucosid-7-O-diglucosid. Diese Ergebnisse werden ebenfalls von *Olsen et al. (2009)* bestätigt. Neben Flavonolglycosiden konnten außerdem 12 Hydroxyzimtsäure-derivate identifiziert werden. Peak 47 als Tri-sinapoyl-diglucosid macht unter Beachtung der Coelution mit Peak 48 mehr als 5% bezogen auf die Gesamtflächen aller Peaks aus. Es folgen Peak 43 bei 31,2 min und Peak 31 bei 28,7 min, beide als Sinapoyl-feruloyl-diglucosid identifiziert mit je ca. 2,5%. Wie in der Literatur beschrieben (*Clifford, 2003*), liegen die Maxima der UV-Spektren in einem für Hydroxyzimtsäuren charakteristischen Bereich bei 240 und zwischen 320 und 340 nm.

Zusammenfassend konnte in den untersuchten Grünkohlextrakten ein komplexes polyphenolisches Muster identifiziert werden. Dieses besteht aus Flavonolen und Hydroxyzimtsäuren, wobei beide Strukturen teilweise stark glycosyliert und acyliert vorlagen (Abbildung 48). Die Acylierung der Glucose wird aufgrund der Fragmentationsmuster in MS-Untersuchungen in Position 3 der Flavonolgrundgerüsts vermutet. Die genaue Position der Acylgruppe beispielsweise bei Di- bzw. Triglycoseeinheiten kann ohne zusätzliche NMR-Untersuchungen nicht beschrieben werden kann. Die Verwendung von LC/UV-DAD/ESI/MS<sup>2</sup> als sensitive Methode ermöglichte ohne komplizierte Probenaufbereitung Flavonoidstrukturen komplexer Pflanzengemische detailliert zu beschreiben.

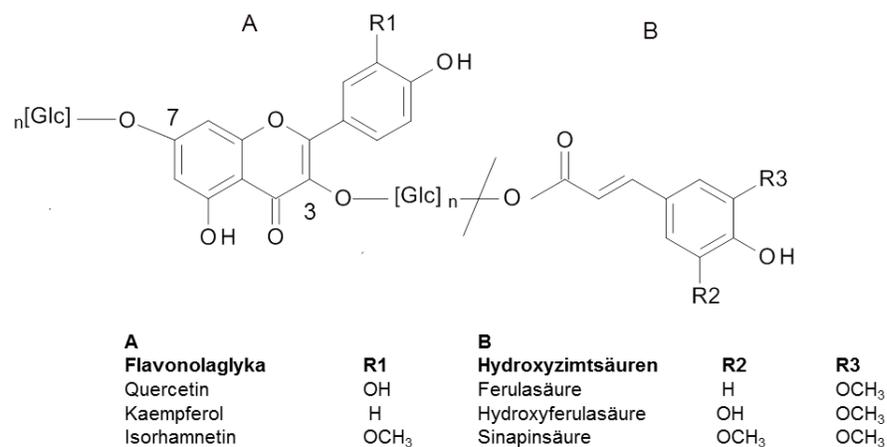


Abbildung 48: Struktur der im Grünkohl enthaltenen teilweise acylierten Flavonolglucoside

(A: Aglyka; B: Hydroxyzimtsäuren)

Die semi-präparative Fraktionierung eines Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakts ermöglichte eine Auftrennung von Inhaltsstoffgruppen, aber selbstverständlich noch keine Isolierung einzelner Substanzen. Im Rahmen des Projektes sollte herausgefunden werden, ob sich die inhibitorische Aktivität einzelner Fraktionen gegenüber dem SGLT1 hinsichtlich derjenigen eines Flavonoid-angereicherten Gesamtextraktes unterscheidet. Für Fraktion 5 (Fraktionssammlung alle 4 min) konnte bei einer Konzentration von 1 mg/mL eine Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Stroms im Oozytenmodell nach 3.11.1 von  $60\pm 7\%$  verzeichnet werden. Diese Fraktion enthielt mit 765 250 ppm den zweithöchsten Gehalt an Flavonoiden (berechnet als Rutin). Eine Vielzahl von teilweise acylierten Flavonolglucosiden konnte detektiert werden, wobei in dieser Fraktion alle Signale quantitativ gleichmäßig vertreten waren. Acylierte Kaempferoltri- und auch -diglucoside machten in dieser Fraktion den Hauptanteil aus. Fraktion 3 besaß den höchsten Gehalt an Flavonoiden, trotz geringer Inhibition des SGLT1 ( $10\pm 9\%$ ). Diese Fraktion wies im Gegensatz zu Fraktion 5 als quantitativ größtes Signal Peak 12 auf, wobei alle anderen Peakflächen sehr klein waren. Peak 12 konnte als Quercetin-3-O-sinapoyl-Sophorosid-7-O-glucosid identifiziert werden. Flavonoid-angereicherte Grünkohl-extrakte wiesen ohne Fraktionierung im TEVC-Experiment ebenfalls Hemmungen des  $\alpha$ -MDG-Stroms auf, die zwischen 60 und 80% bei 1 mg/mL Extrakt lagen. Dies zeigt, dass die Zusammensetzung der Gesamtfraktion bei der Inhibierung eine wichtige Rolle spielt und einzelne Komponenten wie beispielsweise in Fraktion 2 mit einem hohen Flavonoidgehalt nicht die gewünschte Inhibition am *h*SGLT1 zeigen.

### 5.1.2 Zwiebelextrakte

Mit Hilfe von LC/DAD/ESI/MS<sup>2</sup> wurde der Zwiebelextrakt ZE420 auf sein Polyphenolmuster besonders detailliert untersucht. Im Vergleich zu einem HPLC-Chromatogramm eines Flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes zeigte das HPLC-Chromatogramm des Zwiebelextraktes ein überschaubareres Peakmuster und genuin enthaltene Flavonolglyka ohne vorherige Hydrolyse (ERGEBNISSE Abbildung 23). Es konnten überwiegend Quercetinderivate identifiziert werden, wobei Quercetin-4'-O-glucosid (9,5 g/100 g Trockenmasse) neben Quercetin-3,4'-O-diglucosid (5,2 g/100 g) und dem Aglykon Quercetin (5,7 g/100 g) die Hauptkomponenten bildeten. Es konnten zudem Isorhamnetin und geringe

Mengen an Kaempferolderivaten detektiert werden. Der Gesamtflavonoidgehalt lag bei 19 mg/100 g Extrakt berechnet als Hyperosid. Nach Hydrolyse (nach Punkt 3.7.1), also Spaltung der enthaltenen Flavonoidglycoside konnten in 100 g Extrakt 10,2 mg Quercetin, 0,17 mg Kaempferol und 0,74 mg Isorhamnetin quantifiziert werden. Es konnten insgesamt bis zu 20 Flavonolderivate im Extrakt identifiziert werden, wobei eine maximale Glycosylierung mit 3 Glucoseresten und keine Acylierung der Flavonole vorlag. Diese Ergebnisse werden durch zahlreiche Literaturstellen bestätigt (*Price et al., 1997; Beesk et al. 2010; Lee et al., 2011*). *Lee et al. (2011)* quantifizierten in unterschiedlichen Zwiebeln 10-541 mg/100 g Quercetin-3,4'-O-diglucosid, 56-536 mg/100 g Quercetin-4'-O-glucosid und 20-1047 g Quercetin bezogen auf die Trockenmasse in der äußeren Schale und den ersten 2 Schichten der Zwiebel. In 100 g ‚Zwiebel-Trester‘ konnten 159 mg Quercetin-4'-O-glucosid in der Trockenmasse quantifiziert werden. Diese Daten zeigen, dass die Hauptflavonole im charakterisierten Zwiebelextrakt dieser Arbeit um Faktor 10-20 angereichert worden waren. Flavonole sind nach Aussagen von *Németh et al. (2007)* überwiegend in der Schale vieler Früchte- und Gemüsearten vorhanden. Die nicht essbare Schale der Zwiebel enthält demnach einen höheren Gehalt an Flavonolen als der essbare Teil. Der bei der Firma *Wellness & Health Care* bezogene Zwiebelextrakt (ZE420) war braun und roch sehr würzig, den Analysen zur Folge, wurde dieser Extrakt eventuell aus ganzen Zwiebeln mit Schale gewonnen.

*In vivo* Studien von *Jung et al. (2011)*, die in diabetischen Ratten durchgeführt wurden, zeigten nach chronischer Fütterung eines Zwiebelextraktes eine Reduktion der venösen Blutglucosekonzentration nach einem Glucose-Toleranztest. Die diabetischen Ratten wurden über 12 Wochen mit einer ‚High fat diet‘ (HFD) mit oder ohne Zusatz von 1% Zwiebelextrakt (ZE) gefüttert. Der Zwiebelextrakt enthielt 618 mg/g Polyphenole (photometrische Bestimmung mit Folin-Ciocalteu-Reagenz) und 101 mg/g Quercetin (HPLC-Bestimmung nach ‚Hertog‘ Hydrolyse). Außerdem konnten erhöhte Glycogenspiegel in Leber und Muskel in der HFD+1% ZE Gruppe festgestellt werden. SGLT1-Inhibitionsstudien, durchgeführt von Christine Schulze, bei denen der charakterisierte Zwiebelextrakt ZE420 verwendet wurde, zeigten konzentrationsabhängig *in vitro* (TEVC) und *ex vivo* (everted gut

rings) signifikante Hemmungen des SGLT1 durch Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Transports. Es konnten in gesunden Mäusen in der HFD-Gruppe (Fütterung über 12 Wochen) nach einem Glucosebolus mit und ohne Zusatz des Zwiebelextraktes (21,97 mg/Maus  $\pm$  3,95 mg Flavonoide) eine signifikante Reduktion der venösen Blutglucose bei 15 und 30 min verzeichnet werden. Die im Zwiebelextrakt identifizierte Hauptkomponente Quercetin-4'-O-glucosid wurde von *Kottra und Daniel (2007)* mittels der ‚two-electrode-voltage-clamp‘ Methode auf die Inhibition des  $\alpha$ -MDG-induzierten-Stroms am hSGLT1 getestet und gehörte zu den potentesten Inhibitoren innerhalb der getesteten Substanzen mit einer IC<sub>50</sub> von 0,17 mM.

### 5.1.3 Citrusextrakte

Die Isolierung von Flavonoiden aus Pflanzenmaterial erfolgt typischerweise mit Alkohol-Wasser-Mischungen, wobei der Einsatz der Ultraschallextraktion die Ausbeute effektiv erhöhen soll (*Herrera et al., 2004*). Quantitative HPLC-DAD-Untersuchungen zweier Citrusextrakte (Grapefruit C1 und Bitterorange C2) zeigten, dass eine Ultraschallextraktion mit 100% Methanol (1 mg/1 mL) eine höhere Ausbeute an Flavanonen ergab als eine Ultraschallextraktion mit 70% Methanol oder mit Aqua bidest. Naringenin-7-O-rhamnoglucosid (Naringin) war in den untersuchten Extrakten mit 29,5 - 25,6 g/100 g Extrakt vorhanden. Auch das Aglykon Naringenin konnte ohne vorherige Hydrolyse ebenfalls in beiden Extrakten nachgewiesen werden. Während im Grapefruit-Extrakt ca. 3 mg Naringenin/100 g Extrakt quantifiziert werden konnten, waren im Bitterorangenextrakt nur 0,7 mg Naringenin vorhanden. *Justesen et al. (1998)* untersuchten mittels HPLC-DAD/MS verschiedene Gemüse, Früchte und Getränke hinsichtlich der enthaltenen Polyphenole. Das Fruchtfleisch einer Grapefruit enthielt demnach 53 mg Naringenin in 100 g Frischmasse. Orangenfruchtfleisch lag mit 11 mg Naringenin deutlich darunter. Die Monosubstanz Naringenin zeigte in den TEVC-Experimenten mit 66% Inhibition bei 1 mg/mL potente Hemmeffekte. Diese hohen Hemmeffekte konnten allerdings mit den Citrusextrakten nicht gezeigt werden. Die Messungen der Extrakte ohne  $\alpha$ -MDG ergaben, dass die Extrakte frei von Zuckern waren und keinen Transport verursachten (Daten nicht gezeigt).

### 5.1.4 Apfelextrakte

In Äpfeln treten zahlreiche polyphenolische Substanzen wie Hydroxyzimtsäuren (Chlorogensäure, Cumaroylchinasäuren), Flavan-3-ole ((+)-Catechin, (-)-Epicatechin), Procyanidine (B1, B2) und verschiedene Glycoside des Flavonols Quercetin auf. Zusätzlich sind hohe Mengen an Dihydrochalconen wie Phlorizin und Phloretin-2'-xyloglucopyranosid zu finden (*Herrmann 2001*). Die Flavan-3-ole (+)-Catechin und (-)-Epicatechin und deren Oligomere, die Procyanidine sowie die Glycoside des Quercetins sind überwiegend in der Schale zu finden, jedoch auch zu geringen Anteilen im Parenchym der Scheinfrucht und im Kerngehäuse. Die phenolischen Inhaltsstoffe des Apfels machen etwa 0,01 - 1% des Frischgewichts aus. Neben Reifegrad, Erntejahr, Kulturbedingungen und Lagerung ist insbesondere die Apfelsorte für den Polyphenolgehalt und das Polyphenolmuster ausschlaggebend (*Guyot et al., 2003*). Unterschiedliche Apfelaufbereitungen und Apfelsorten wurden eigenständig mit HPLC-DAD/ESI/MS auf das polyphenolische Muster hin untersucht. Im Vordergrund stand dabei die Quantifizierung des Dihydrochalcon Phlorizin. In unterschiedlichen Apfelextrakten konnten neben Dihydrochalconen verschiedene freie Hydroxyzimtsäuren und Flavonolderivate identifiziert werden. Es wurden Quercetinglucoside, und auch Quercetinderivate mit Pentosen detektiert, wobei eine genauere Analyse der Zuckerreste hierfür nicht erfolgte. Die dominanteste Zuckerkomponente stellt nach *Guyot et al. (1998)* Galactose dar, gefolgt von Glucose, Rhamnose, Xylose und Arabinose. Auch Flavonol-rutinoside waren zu finden. Für einige Apfelextrakte konnten sehr hohe Polyphenolgehalte nachgewiesen werden. Der für die Humanstudien verwendete AE15 Extrakt mit 44% Polyphenolen in der Trockenmasse und 16% Phlorizin zeigte in den TEVC-Versuchen bereits bei 0,003 mg/mL ( $\cong$  0,48  $\mu$ g Phlorizin) eine starke Hemmung des  $\alpha$ -MDG-Stroms von über 50% (Abbildung 49). Es konnten während des Projektes durch die Projektpartner in München signifikante Effekte in der Aufnahmehemmung von  $\alpha$ -MDG in 'everted gut ring' Versuchen und in der Senkung des Blutzuckerspiegels nach Gabe eines Glucosebolus in Mäusen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

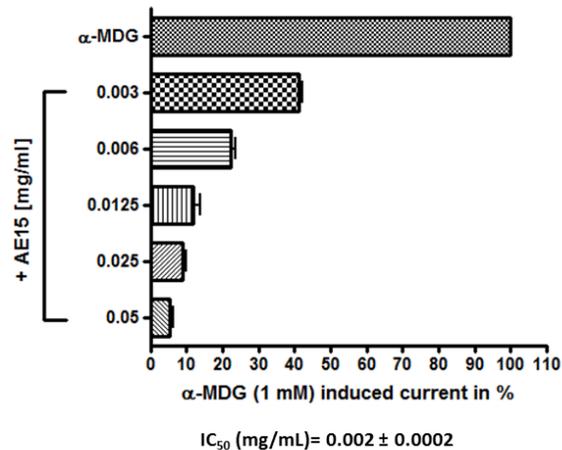


Abbildung 49: Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Stroms durch unterschiedliche Konzentrationen eines Apfelextraktes mittels TEVC ( $n_{\text{Oozyten}}=5$ ), (Daten der Projektpartner TUM)

*Johnston et al. (2002)* konnten nach Gabe eines klaren und eines trüben Apfelsaftes (je 400 mL) bei jungen gesunden Erwachsenen im Vergleich zu 400 mL Wasser eine Abnahme des Plasma-Glucose-Spiegels nach 15 und 30 min beobachteten. Insulinlevel zeigten keine signifikanten Veränderungen. *Manzano et al. (2010)* konnten in humanen Caco-2-Zellen eine Verringerung der apikalen Glucoseaufnahme durch einen Polyphenol-angereicherten Apfelextrakt der Sorte ‚Golden Delicious‘ aufzeigen. Es wurden zwar Flavonole und Catechine quantifiziert, jedoch erfolgte keine quantitative Angabe des Phlorizins. Phlorizin ist der bekannteste Inhibitor des SGLT1, hauptverantwortlich für die apikale Glucose-Absorption im Dünndarm. In frischen Apfelsorten quantifizierten *Tsao et al. (2003)* in Schale und Fruchtfleisch im Durchschnitt 72,3 und 14,4  $\mu\text{g}$  Phlorizin/g Frischmasse. Dihydrochalcone sind in sehr geringen Konzentrationen im Apfel vorhanden. Eigene Untersuchungen von über 30 unterschiedlichen Apfelsorten zeigten, dass die enthaltene Phlorizinmenge stark von der Sorte abhängt. Flavonole und monomere Flavan-3-ole sind eher in der Schale und die Dihydrochalcone überwiegend im Kerngehäuse zu finden. Außerdem sind die Konzentrationen an Polyphenolen in Schalen und Kerngehäuse erheblich höher als im Fruchtfleisch (*Pohl, 2005*). Die Ergebnisse der Phlorizin-Quantifizierungen der untersuchten Sorten bestätigten diese Aussage. In 26 Sorten war der Phlorizingehalt im Kerngehäuse größer, als in der Schale, wobei einige Apfelkerngehäuse Mengen von 200-400 ppm in der Frischmasse aufwiesen, also 200-400  $\mu\text{g/g}$ . Andere Sorten hingegen wiesen maximal 35  $\mu\text{g}$  Phlorizin/g auf (‚Pommerscher Krummstiel‘). In der Schale war Phlorizin von

14-200 µg pro g Frischmasse quantifizierbar. Mostäpfel können einen bis zu zehnmal höheren Phlorizingehalt aufweisen als Tafeläpfel. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Apfzubereitungen wurden vorwiegend aus klassischen Tafeläpfeln gewonnen. *Kahle et al. (2005b)* untersuchten das Polyphenolprofil verschiedener Tafel- und Mostapfelsorten. In klassischen Mostobstsorten wie ‚Boskoop‘; ‚Bohnapfel‘ und ‚Brettacher‘ konnte ein Gesamtgehalt zwischen 570-830 mg/L nachgewiesen werden, in ‚Boskoop‘ sogar bis zu 970 mg/L. Tafeläpfel wie ‚Granny Smith‘; ‚Golden Delicious‘ und ‚Fuji‘ wiesen mit 154-178 mg/L deutlich geringere Polyphenolgehalte auf. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Apfelsorte und das verwendete Material des Apfels (Schale, Kerngehäuse) den stark unterschiedliche Phlorizingehalte aufwiesen. Außerdem konnten signifikante *in vitro* und *in vivo* Effekte mit Apfelextrakten in der Hemmung der Glucoseaufnahme über den SGLT1 erzielt werden.

### 5.1.5 Schwarzkarottenextrakte

Aufgrund der starken Färbung genießen Schwarzkarotten und daraus gewonnene Extrakte einen hohen Stellenwert bei der Verwendung als natürliche Lebensmittelfarbstoffe (*Kammerer et al., 2003*). Das Anthocyanmuster in Schwarzkarotten ist bereits detailliert beschrieben und besteht hauptsächlich aus Cyanidinderivaten, die teilweise mit Hydroxyzimtsäuren acyliert vorliegen, z.B. mit Ferula- und Sinapinsäure. Anthocyane, darunter Derivate des Cyanidins und des Pelargonidins, wurden durch die Projektpartner in München in TEVC-Experimenten auf ihre inhibitorische Aktivität untersucht. Keine der Substanzen konnte den  $\alpha$ -MDG-Strom hemmen. Der für diese Arbeit interessantere Inhaltsstoff der Schwarzkarottenextrakte, Chlorogensäure, konnte mittels HPLC-DAD bei 320 nm quantifiziert werden. Die Chlorogensäuregehalte der untersuchten Extrakte lagen zwischen 6,5 und fast 21 mg in 100 g Extrakt. Chlorogensäure kommt ubiquitär im Pflanzenreich vor, wobei durch den Genuss von Kaffee wohl die höchsten Mengen vom Menschen aufgenommen werden. Unterschiedliche antidiabetische Effekte konnten bereits für Chlorogensäure gezeigt werden. So hemmt diese die Glucose-6-phosphatase, welche in der Gluconeogenese eine wichtige Rolle spielt. So wird eine verminderte Freisetzung von Glucose aus der Leber vermutet und somit eine Senkung des Blutglucosespiegels (*Parker et*

al., 1998). Welsch et al. konnten 1989 zeigen, dass Chlorogensäure die  $\text{Na}^+$ -abhängige Aufnahme der Glucose in isolierte Bürstensaum-Membran-Vesikel von Ratten hemmt. In den TEVC-Untersuchungen zeigte Chlorogensäure als Einzelsubstanz jedoch keine inhibitorische Aktivität (Abbildung 50).

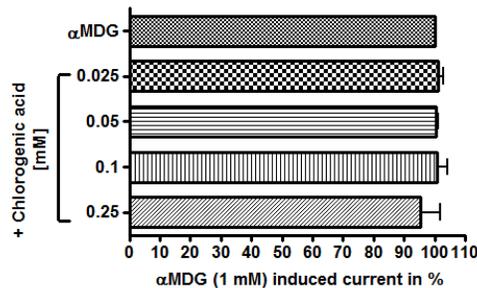


Abbildung 50: Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Stroms durch Chlorogensäure mittels TEVC ( $n_{\text{Oozyten}}=5$ ), (Daten der Projektpartner TUM)

## 5.2 Herstellung eines angereicherten Grünkohlextraktes und Methodenoptimierung

Im Hinblick auf die Entwicklung eines Nahrungsergänzungsmittels wurde eine sehr schonende Extraktionsmethode gewählt. Gewisse Vorgaben zur Saftherstellung, beispielsweise die Verwendung eines Enzymgemisches (Pektinase/Cellulase) lieferte ein Protokoll der *BioActive Food GmbH*. Die bei der Saftherstellung verwendete Temperatur bei 37-40°C stellte einen Kompromiss zu Lasten des Temperaturoptimums für die enzymatische Aktivität dar. Die Cellulase besitzt ein pH-Optimum zwischen pH 4 und 5 und hat ihr Temperatur-Optimum bei 50°C. Höhere Temperaturen führen zu einem Aktivitätsverlust. Die Pektinase spaltet Methylester optimal bei pH 5-6 und bei 55°C; als Endo-Polygalacturonase spaltet sie u.a. 1,4-glycosidische Bindungen der Galacturonsäure. Das Enzym kommt bei der Gewinnung dünnflüssiger Gemüsesäfte zum Einsatz. Flavonoide sind teilweise in der Vakuole oder direkt im Cytoplasma von pflanzlichen Epidermiszellen zu finden. Ein enzymatischer Zellaufschluss war für die Extraktion ohne lipophile Lösungsmittel also von Vorteil. Ein Saft, der ohne Enzyme gewonnen wurde, wies 30% weniger Flavonoide auf, als ein Saft mit Enzymzugabe. Da aus der Literatur bereits bekannt war, dass *Brassica*-Arten komplexe Flavonoidmuster aufweisen und teilweise acylierte Flavonoidglycoside

enthalten, die thermisch instabil sind (*Grotewold, 2006*), wurde die Herstellungstemperatur auf 37-40°C festgelegt. Die Erprobung einer Saftherstellung bei optimalen Temperaturbedingungen der Enzyme (50 und 60°C) ergab keine Erhöhung der Flavonoidausbeuten. Die zusätzliche Verwendung eines Rührwerks ermöglichte eine bessere Verteilung der Enzyme und eine gleichmäßige Erwärmung der relativ großen GK-Mengen (2-5 kg) und somit eine Erhöhung der Flavonoidausbeute um ca. 20%. Das Verfahren der Saftherstellung erzielte somit Flavonoidausbeuten von bis zu 80% bezogen auf den Flavonoidgehalt des eingesetzten Grünkohls. Der pH-Wert des Saftes lag genuin zwischen 4,6 und 4,7. Bevor der Grünkohlssaft für die Adsorberharzmethode verwendet wurde, erfolgte eine Zentrifugation, um Schwebstoffe weitgehend zu entfernen und damit Verstopfungen der Chromatographiesäule zu vermeiden. Allerdings gingen bei diesem Schritt mehr als 80% der Flavonoide aus dem Saft verloren. Im Rahmen des Projektes wurde versucht, die Flavonoidausbeute während der Saftherstellung zu erhöhen. Die Zugabe von Ethanol oder von unterschiedlichen Konzentrationen an Detergentien zum Grünkohlssaft ergab keine Erhöhung der Ausbeute. Die Zugabe von Ethanol war nur begrenzt möglich. Der ethanolische Saft musste auf max. 15% verdünnt werden, bevor die Aufgabe auf das Adsorberharz folgte. Ein höherer Ethanolgehalt im Saft zeigte in Vorversuchen Verluste der Flavonoide auf, die aufgrund des Ethanolgehalts nicht mehr vollständig am Adsorberharz binden konnten (Daten nicht gezeigt). Unter Verwendung von Triton-X-100 und Sojalecithin sanken die Flavonoidausbeuten. *Sun et al. (2008)* konnten aufzeigen, dass unter Verwendung von 5% Triton-X-100 die Ausbeuten an Glycyrrhizinsäure und Liquiritin aus Süßholzwurzeln gegenüber einer ethanolischen bzw. methanolischen Extraktion um den Faktor 13 erhöht wurden. Allerdings wurde die Extraktion bei 100°C mittels Mikrowellenbestrahlung durchgeführt. Eine Tinkturenpresse zur Saftherstellung wurde ebenfalls erprobt. Der erhaltene Saft war wesentlich schwebstofffreier nach Verwendung der Tinkturenpresse und enthielt noch 20% der eingesetzten Flavonoide. Im Trester verblieben 80%. Der Saft, der mittels „flotter Lotte“ gewonnen wurde, wies zwar ca. 70% der eingesetzten Flavonoide auf, war aber sehr schwebstoffreich, so dass durch die anschließenden Filtrations- und Zentrifugationsschritte wiederum ein Großteil der Flavonoide verloren ging und letztlich nur mit 15% der eingesetzten Flavonoide

weitergearbeitet wurde. Das Bedienen der Tinkturenpresse und auch die Verwendung der „flotten Lotte“ und das anschließende Auswringen der Trester über Küchentücher waren körperlich etwas anstrengend, aber in der gleichen Zeit machbar. Beide Methoden sind also für die Saftherstellung prinzipiell geeignet, aber hinsichtlich der Flavonoidausbeute nicht befriedigend. *Watzl und Rechkemmer (2001)* zeigen in einem *Review* über Flavonoide auf, das bis zu 80% der Flavonoide beim Herstellen eines Apfelsaftes im Pressrückstand verbleiben. Flavonoide sind überwiegend in Vakuolen der Epidermiszellen zu finden, aber wohl auch in der Kutikula (*Markham et al., 2000*). Man vermutet in der Akkumulation der Flavonoide innerhalb der Zellwand den Grund der geringen Extrahierbarkeit der Flavonoide aus verschiedenen Pflanzen. Es wird dabei keine Assoziation der Flavonoide mit Pektin oder Hemicellulosen der Zellwand vermutet, sondern eher mit Lignin (*Markham et al., 2000*). Anthocyane sind ebenfalls in den Vakuolen der Zellwand zu finden. *Vowinkel (1975)* konnte für eine Anthocyan-verwandte Substanz (Sphagnorubin) allerdings eine kovalente Bindung zur Zellwandstrukturen zeigen, sodass deren Extrahierbarkeit sehr beschränkt war. Das konnten *Schnitzler et al. (1996)* für polyphenolische Substanzen ebenfalls bestätigen. Ferulasäure, *p*-Cumarsäure und Sinapinsäure sind in Pflanzen über Ester- und Etherverbindungen an Zellwandpolymere gebunden (*Ishii, 1997*). *Dobberstein (2009)* konnte in Mais zeigen dass Ferulasäure bevorzugt an die Zellwandpolysaccharide bindet, wobei für Sinapinsäure ein ähnliches Verhalten angenommen wird.

Die Alkalisierung des Saft pH-Wertes bis zu pH 8 (genuin bei ca. pH 5) führte zu schlechteren Ausbeuten. Aus diesem Grund wurde der pH-Wert des Grünkohlensafts immer auf pH 5 für reproduzierbare Ergebnisse eingestellt.

### 5.2.1 Anreicherung der Flavonoide mittels unterschiedlicher Adsorberharze

Die Anreicherung der Flavonoide war für eine potentielle Wirkung bei *in vitro*- und *in vivo*-Tests unumgänglich. *In vitro*- und *in vivo*-Testungen, die die inhibitorische Aktivität auf den SGLT1 untersuchten, setzen voraus, dass Flavonoid-angereicherte Extrakte genuin keine Monosaccharide, insbesondere keine Glucose enthalten. Also diente die Aufarbeitung des Saftes über ein Adsorberharz nicht nur der Anreicherung der Flavonoide, sondern der

Aufreinigung und der Abtrennung wasserlöslicher Begleitstoffe. Während des gesamten Projektzeitraumes wurde das Amberlite™FPX 66 Harz der Firma Rohm & Haas verwendet. Dieses Harz ist für die Anreicherung von Polyphenolen oder zum Abtrennen farbiger Anthocyane im Bereich der Lebensmittelherstellung geeignet. Es handelt sich um ein nichtionisches, hochporöses Styrol-/Divinylbenzol-Copolymerisat (DVB), bei dem die unterschiedlich starken Wechselwirkungen (in erster Linie van der Waals-Wechselwirkungen) der Polyphenole zum Harz in Abhängigkeit zur Polarität des verwendeten Lösungsmittels genutzt wurden. Das Harz hatte eine Oberfläche von mehr als 700 m<sup>2</sup>/g und wies eine Partikelgröße von ca. 0,6-0,75 mm auf. Die Anreicherungs-methode wurde in Anlehnung an Will et al. (2006) durchgeführt. Die Durchführung wurde mittels Herstellerangaben erarbeitet und in einer Chromatographiesäule (Innendurchmesser 5,5 mm) durchgeführt. Bei Verwendung von 100 g Harz, 500 mL GK-Saft und Elution der Polyphenole mit 600 mL 75%iger Ethanol konnte eine Flavonoid-Anreicherung um Faktor 10 erreicht werden bei einer Wiederfindungsrate der aufgegebenen Polyphenole von 95-100%. Die Auswahl des Elutionsmittels beschränkte sich nach eingehenden Überlegungen auf Ethanol. Im Hinblick auf die Entwicklung eines Nahrungsergänzungsmittels oder eines Lebensmittels sollten im gesamten Produktionsprozess keine toxikologisch bedenklichen, organischen Lösungsmittel verwendet werden. Die Elution mit 75% Ethanol ergab die höchsten Ausbeuten an Gesamtflavonoiden und wurde als Standard-Elutionsverfahren eingesetzt. Zur Abtrennung wasserlöslicher Begleitsubstanzen wurde das Harz nach Saftaufgabe gewaschen. Die wässrige Spüllösung wurde einrotiert und ebenfalls auf Flavonoide untersucht, enthielt aber nur Spuren dieser Substanzen.

Um die Elutionsmittelmenge zu bestimmen, die nötig war, um 100% der auf das Harz aufgegebenen Flavonoide zu eluieren, wurde im Kleinmaßstab ein Batchverfahren mit 10 g Harz durchgeführt. Neben dem Amberlite™FPX Harz wurden die Harze ADS 500 und ADS 200 verwendet. ADS 200 besteht aus einem großporigen Styrol-Copolymerisat. ADS 500, ebenfalls mit einer aromatischen Struktur, ist speziell für die Abtrennung von Farbstoffen, Aufarbeitung von Pflanzenextrakten und Anreicherung von Polyphenolen ausgelegt. Es hat eine Oberfläche von 1000 m<sup>2</sup>/g bei einer Partikelgröße von 0,25-0,7 mm.

Dieses Harz sollte die adsorbierten Substanzen leichter abgeben und damit Lösungsmittel einsparen. Es wurde eine definierte, charakterisierte Menge GK-Saft (200 mL) verwendet und mit unterschiedlichen Mengen an 75% Ethanol eluiert. Zur vollständigen Elution der Flavonoidglycoside (nach Hydrolyse als Quercetin und Kaempferol bestimmt) von ADS 200 waren 40-50 mL 75% Ethanol ausreichend. Bei Verwendung des ADS 500 konnte die vollständige Elution aller Flavonoide erst bei 80 mL Elutionsmittel erreicht werden, wobei eine 100%ige Elution der aufgegebenen Kaempferolderivate schon bei 40 mL erreicht wurde. Beim FPX 66 Harz mussten 50 mL Elutionsmittel verwendet werden, um 100% der Kaempferolderivate wiederzufinden. Quercetinderivate konnten mit 60 mL fast vollständig eluiert werden. Dieser Versuch konnte nur einmal durchgeführt werden, da nur geringe Harzmengen zur Verfügung standen und somit eine genauere Aussage nicht möglich ist. Aufgrund der Ergebnisse können prinzipiell alle 3 Harze mit unterschiedlich hohen Volumina des Elutionsmittels (Ethanol 75%) für die Flavonoidanreicherung verwendet werden.

Ein weiterer im Kleinmaßstab durchgeführter Versuch sollte aufzeigen, wie viel Saft bei Verwendung von 10 g Harz im Batchverfahren mit 60 mL 75% Ethanol aufgearbeitet werden können. Hierzu wurden 5 unterschiedliche Harze verwendet (ADS 200, 300, 500, 3000 und FPX 66). Dabei zeigte ADS 3000 (DVB-Copolymerisat) bei der Wiederfindung der Flavonolaglyka nach Hydrolyse die höchste Beladungskapazität. Bei Verwendung von 250-300 mL GK-Saft konnten nach Elution teilweise noch 100% der aufgegebenen Flavonoide wiedergefunden werden. Bei 200 mL Grünkohlssaft schwankte die Wiederfindungsrate von Quercetin und Kaempferol je von 80-100% abhängig vom Adsorberharz. Bei Verwendung von 10 g Harz und einer Elutionsmittelmenge von 60 mL könnten somit alle getesteten Harze verwendet werden, wenn nicht mehr als 150-200 mL Grünkohlssaft (nach Punkt 3.6.1 hergestellt) aufbereitet werden sollen. Da nur begrenzte Menge der Harze zu Testung bereit standen, wurden die Versuche für FPX 66 und ADS 200 je zweimal, für die restlichen Harze nur einmal mit ausgewählten Saftmengen durchgeführt. Zu beachten ist, dass die Menge des Elutionsmittels bei 60 mL lag. Für eine genauere Beurteilung der Kapazität, müssten die Saftmengen und gleichzeitig die Elutionsmittelmengen variiert werden. Ferner wurde im Kleinmaßstab die Eignung der Harze ADS 200, 300 und FPX 66 im Säulenverfahren getestet. Im Gegensatz zum Batchverfahren lag bei Verwendung von 200 mL GK-Saft die

Wiederfindung bei allen verwendeten Harzen (je 10 g) eindeutig unter 100% für Quercetin und Kaempferol. Eine 100%ige Wiederfindung konnte für Quercetin und Kaempferol nach Hydrolyse bei Verwendung von ADS 200 mit 175 mL Saft verzeichnet werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Harze ADS 200 und 300 im Batch- und Säulenverfahren für die Anreicherung der Flavonoide genauso gut geeignet sind, wie Amberlite FPX 66, und für weiterführende Versuche verwendet werden könnten. ADS 3000 und 500 bewährten sich im Batchverfahren, wobei das Verhalten in der Säule ebenfalls interessant gewesen wäre. Ergebnisse mit ADS 500 im Batchverfahren zeigten, dass bei einer Saftaufgabe von 200, 250 und 300 mL und Elution mit 60 mL 75%igem Ethanol jeweils 100% der Aglyka nach Hydrolyse wiedergefunden werden konnten. Wurde die Elutionsmittelmenge bei 200 mL Saftaufgabe erhöht, zeigte ADS 500 allerdings nur eine 80%ige Wiederfindung derjenigen bei 60 mL Elutionsmittel. Es müsste abgeklärt werden, ob das Säulenverfahren, das im Rahmen dieser Arbeit für die Anreicherung der Flavonoide aus Grünkohl verwendet wurde, mit dem Batchverfahren ersetzt werden sollte, da es viel einfacher händelbar ist und eine durchgängige Benetzung des Harzes mit Saft im Batch besser möglich ist. Für eine gute Ausbeute spielt außerdem die Inkubationszeit des Harzes mit GK-Saft eine entscheidende Rolle. Lufteinschlüsse im Harz in der Chromatographiesäule sind nicht selten, und erniedrigen die Effektivität dieser Methode. Eine entscheidende Rolle spielt ebenfalls die Austropfgeschwindigkeit und die Höhe des Harzes in einer Säule, die beim Amberlite FPX 66 mit mind. 7 cm vom Hersteller angegeben wird.

### 5.2.2 Vergleich der verwendeten Flavonoid-Hydrolyse-Verfahren

Die Bestimmung der Flavonoidaglyka nach Hydrolyse der Flavonoidglycoside erwies sich als praktikable Methode für verschiedene Ausgangsmaterialien und diente zur ersten Einschätzung des flavonoidhaltigen Ausgangsmaterials. Die Gehaltsbestimmung der Flavonoid-O-glucoside über die Gesamtflavonoidbestimmung nach *Ph. Eur.* (3.7.1) beruht auf der Extraktion und gleichzeitigen Hydrolyse dieser mittels Aceton und Salzsäure (0,7 M) innerhalb von 30 min bei 100°C. Nach Ausschütteln der entstandenen Aglyka erfolgte eine photometrische Gehaltsbestimmung. Der Gehalt wird als Hyperosid berechnet und eine spezifische Extinktion von 500 (bei 425 nm) zugrunde gelegt. Im Hinblick auf die Anzahl der

durchzuführenden Analysen konnte dieses Verfahren in einem vernünftigen Zeitrahmen und idealerweise mit mehreren Proben simultan durchgeführt werden. Das Verfahren wurde durch Zugabe einer Reinsubstanz (Hyperosid) auf Reproduzierbarkeit untersucht. Die Wiederfindungsrate betrug  $84 \pm 7\%$ . Zusätzlich wurde eine Flavonoid-Hydrolyse nach *Hertog et al., 1992 (3.7.2)* etabliert, bei der die photometrische Gehaltsbestimmung entfiel und die resultierenden Extrakte direkt für eine HPLC-Analyse verwendet wurden. Für die 90 minütige Extraktion in 50%igen Methanol und gleichzeitige Hydrolyse wurde 1,2 M Salzsäure verwendet. Aglykagehalte von Ausgangsmaterialien, die nur in geringen Mengen zur Verfügung standen, wie beispielsweise die Flavonoid-angereicherten Extrakte, die aus den Kapazitätstestungen mit verschiedenen Adsorberharzen im Kleinmaßstab stammten, wurden mittels der ‚Hertog-Hydrolyse‘ analysiert. Die ‚Hertog-Hydrolyse‘ des CITTI-GKs zeigte höhere Ausbeuten der Aglyka (Quercetin:  $130 \pm 20$  ppm und Kaempferol:  $195 \pm 10$  ppm), als nach Hydrolyse innerhalb der Gesamtflavonoidbestimmung (GFB) nach *Ph. Eur. (3.7.1)* und anschließender HPLC-Analyse. Daraufhin wurden die Hydrolysezeiten innerhalb der GFB auf 60 und 90 min erhöht und die resultierenden Gesamtflavonoidgehalte verglichen. Es konnten signifikant höhere Flavonoid-ausbeuten nach 60 und nach 90 min Hydrolysezeit verzeichnet werden. Trotz der Erhöhung der Flavonoid-Gesamtausbeute bei 60 und 90 min Hydrolysezeit um 15-20% gegenüber 30 min, wurden weiterhin 30 min verwendet, um den Zeitaufwand gering zu halten. Bei *Hertog et al. (1992b)* und auch in eigenen Untersuchungen zeigte sich, dass unter den Hydrolysebedingungen (1,2 M HCl, 50% Methanol, 90 min) eine komplette Spaltung der Flavonol-3-O-glucoside stattfand, während Flavonol-7-O-glucoside innerhalb von 30-90 min nicht vollständig hydrolysiert werden konnten. Beide Hydrolysemethoden waren für die Quantifizierung der Ausgangsmaterialien im Rahmen dieses Projektes geeignet, wobei mittels GFB mit geringem Aufwand Gesamtflavonoidgehalte angegeben werden konnten, die eine schnelle Einschätzung von verschiedenen Grünkohlarten, unterschiedlich gewonnenen Grünkohlsäften und Grünkohlextrakten ermöglichten. Mittels der GFB mit photometrischer Bestimmung der Flavonoid- $\text{AlCl}_3$ -Chelate können allerdings nur Flavonole und Flavone bestimmt werden.  $\text{AlCl}_3$  reagiert mit der Ketogruppe in Position 4 des C-Ringes und kann entweder mit der OH-Gruppe in Position 3 oder bei Flavonen mit der OH-Gruppe in Position 5 einen Komplex

bilden. So musste für jedes Ausgangsmaterial eine passende individuelle Methode zu Charakterisierung gefunden werden (siehe ERGEBNISSE 4.2).

## 5.3 Inhibitionsmessungen am SGLT1

### 5.3.1 SURFE<sup>2</sup>R-Technologie

Die SURFE<sup>2</sup>R-Technologie wurde für elektrogene Messungen von ionischen Transportvorgängen entwickelt, um die Forschung an speziellen Arzneistoff-Targets voranzubringen. Diese zellfreie elektrophysiologische Messmethode benutzt dabei Gold-überschichtete Biochips, auf denen Membranvesikel angelagert werden, die das gewünschte Target exprimieren, in diesem Fall den *rbSGLT1*. Eine genauere Beschreibung der Methode erfolgt im MATERIAL UND METHODEN Teil Seite 65.

Die SURFE<sup>2</sup>R-Messungen erlaubten eine quantitative Charakterisierung von unterschiedlichen Transport- und Inhibitionsvorgängen. Mit Hilfe der SURFE<sup>2</sup>R-Technologie konnten erste Daten zur Hemmfähigkeit unterschiedlicher Polyphenole auf den *rbSGLT1* erhalten werden. Der Transport des spezifischen SGLT1-Substrats  $\alpha$ -MDG (5 mM) verursachte Stromstärkesignale zwischen 300 und 1 500 pA und diese waren u.a. stark abhängig von der Sensorpräparation. Abbildung 51 zeigt beispielhaft die Messequenz von 5 mM  $\alpha$ -MDG im SGLT1-SURFE<sup>2</sup>R-System mit Pufferwechsel. Das Signal von 5 mM  $\alpha$ -MDG liegt bei ca. 400 pA (On-Peak). Ein darauf folgender Off-Peak zeigt den Pufferwechsel von A (aktivierender Puffer, 5 mM  $\alpha$ -MDG enthaltend) zu NA an (nicht-aktivierender Puffer, kein  $\alpha$ -MDG enthaltend). Bei einem schlecht beschichteten/präparierten Sensor entstanden Stromstärkesignale von nur 100 pA, wodurch aussagekräftige Inhibitionsmessungen mit einem solchen Sensor nicht mehr möglich waren. *Krause (2006)* postulierte, dass die Anzahl der vorhandenen Transportproteine in der präparierten Membran Einfluss auf die Höhe des Signals hat, was plausibel ist. Die Konzentration von 5 mM  $\alpha$ -MDG ist für Inhibitionsmessungen bei richtiger Sensorpräparation ausreichend, könnte aber für Screeningmethoden, bei denen ein höherer Durchsatz von Substanzen erforderlich ist, erhöht werden. Im Rahmen dieses Projektes allerdings sollte dieses Verfahren ergänzende

Daten zu den Ergebnissen liefern, die im Oozytenmodell mittels TEVC erhalten wurden. In diesem Testsystem wurde 1 mM  $\alpha$ -MDG für die Substrat- und Inhibitionsmessungen verwendet.

In eigenen Versuchen wurde der Inhibitor nur in Puffer A gegeben, um einen kurzen Kontakt des Inhibitors mit dem Protein zu ermöglichen. Darüber hinaus wurde das System weniger verunreinigt und Kosten für Substanz-, Filter- und Schlauchmaterial verringert. Zur besseren Beurteilung der Messergebnisse wurde nach jeder Inhibitionsmessung eine wash-out Messung nachgeschaltet, die zwar noch 5 mM  $\alpha$ -MDG, aber kein Inhibitor mehr enthielt. So gelang es, die Regenerationsfähigkeit des Transporters nach Inhibition zu kontrollieren und zu beurteilen.

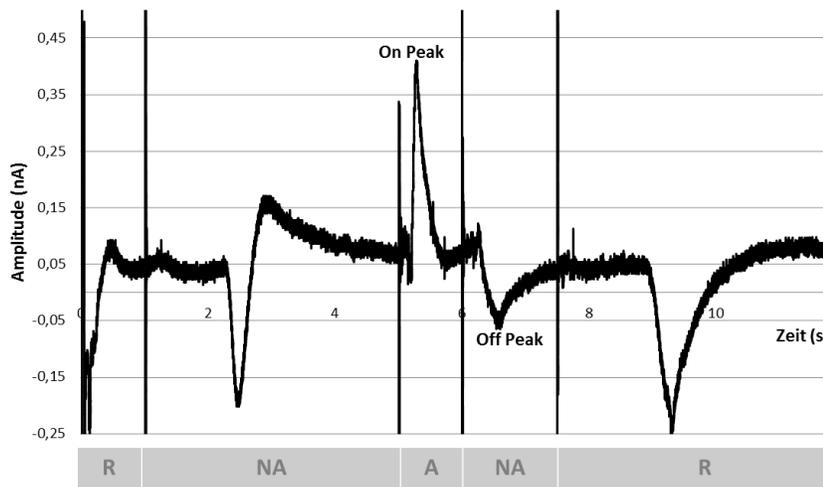


Abbildung 51: Signale einer Messesequenz am SGLT1 mit 5 mM  $\alpha$ -MDG

R-Ruhepuffer; NA-nicht aktivierender Puffer; A-aktivierender Puffer

### 5.3.2 TEVC

*Xenopus*-Oozyten waren für die Expression und elektrophysiologische Charakterisierung von SGLT1 sehr gut geeignet. Nach Injektion der c-RNA des humanen SGLT1 (*hSGLT1*) und Expression des Transporters in der Zellmembran, konnten unterschiedliche Substrat- und Inhibitionsmessungen unter Aufnahme von Strom-/Spannungskennlinien bei einem Membranpotential von -60 mV durchgeführt werden. Ein Vorteil im Vergleich zur verwendeten SURFE<sup>2</sup>R-Technologie war die Verwendung des *hSGLT1*. Abbildung 52 zeigt beispielhaft die Strom-/Spannungskennlinien von 1 mM  $\alpha$ -MDG mit und ohne Zusatz eines

Flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes (Fraktion 5 aus der semipräparativen Aufarbeitung, Fraktionen alle 4 min gesammelt) mit einem Flavonoidgehalt von 765 250 ppm (TM) berechnet als Rutin. Die Messungen des Extraktes zeigen deutlich, dass ohne  $\alpha$ -MDG-Zusatz kein Strom fließt, somit also die enthaltenden Flavonoide nicht durch den *hSGLT1* transportiert werden und keine störenden Zucker im Extrakt enthalten waren. Der  $\alpha$ -MDG-Strom konnte bei Verwendung von 1 mg/mL Extrakt und bei -60 mV um 60% inhibiert werden. Verschiedene Arbeitsgruppen postulieren eine Aufnahme von Flavonoidglycosiden durch den SGLT1, wobei unterschiedliche Testsysteme verwendet wurden, siehe EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG Absatz 2.1.1. Es konnte allerdings durch die Projektpartner der TUM gezeigt werden, dass weder Flavonoid-Monosubstanzen, noch Flavonoid-enthaltene Extrakte durch den *hSGLT1* transportiert werden.

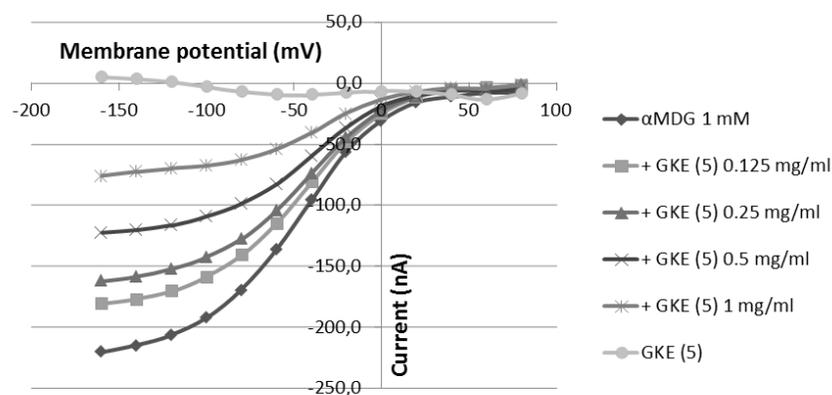


Abbildung 52: Strom-/Spannungskennlinie von  $\alpha$ -MDG mit und ohne Zusatz eines Flavonoid-angereicherten Grünkohlextraktes, (Daten der Projektpartner TUM)

### 5.3.3 Ergebnisse der Einzelmessungen im Vergleich – *rbSGLT1* und *hSGLT1*

Eigene Untersuchungen zu einzelnen Flavonoiden mittels der SURFE<sup>2</sup>R-Technologie mit einer etwas abgewandelten Messmethode konnten weitgehend die Inhibitionsdaten des MPIs bestätigen. Es konnten sehr gute Hemmungen des  $\alpha$ -MDG-Transports durch je 250  $\mu$ M Quercetin-4'-O-glucosid oder Luteolin-4'-O-glucosid von bis zu 90% gezeigt werden. Eine ebenfalls sehr starke Inhibition konnte für Quercetin-7-O-glucosid und Kaempferol-7-O-glucosid mit bis zu 90% bei je 250  $\mu$ M verzeichnet werden. Quercetin-3- und Kämpferol-3-O-glucosid zeigten bei gleicher Konzentration dagegen eine deutlich schwächere Inhibition von

bis zu 40% bei je 100  $\mu\text{M}$ . Auffällig war, dass Phlorizin, als bekanntester SGLT1-Inhibitor bei ebenfalls 250  $\mu\text{M}$  den  $\alpha$ -MDG-Strom nur um etwa 60% inhibierte. Projektinterne Untersuchungen mittels der TEVC-Methode zeigten für Phlorizin bei bereits 0,5  $\mu\text{M}$  eine 50%ige Hemmung des  $\alpha$ -MDG-Stroms (1 mM). Für Quercetin-4'-O-glucosid und Luteolin-4'-O-glucosid wurden mit dieser Messmethode ebenfalls sehr gute Inhibitionswerte erhalten. Bei je 200  $\mu\text{M}$  konnte der Substrattransport am *hSGLT1* um jeweils bis zu 70% inhibiert werden. Für Flavonolderivate, die in Position 3 glycosyliert vorlagen, konnten ebenfalls eher moderate Hemmungen verzeichnet werden (ca. 50% bei 1 mM). Die Glycosylierung in Position 3 im Heterozyklus scheint die Bindungsaffinität zum SGLT1 zu reduzieren, während eine Glycosylierung in Position 4' im B-Ring die Affinität und die Inhibitionsfähigkeit erhöht. Mittels TEVC-Messungen konnten keine potenten Inhibitionen für Flavonoidglycoside verzeichnet werden, die in Position 7 glycosyliert vorlagen. *Kottra und Daniel (2007)* konnten feststellen, dass Glucose in den Positionen 6,7 oder 8 im A-Ring die Affinität zu *hSGLT1* deutlich reduzieren. Studien zum Interaktionsmechanismus vom SGLT1 mit potenten Inhibitoren zeigen, dass die Zuckerbindungsstelle nahe einer Aminosäuresequenz liegt, die in der Lage ist, mit hydrophoben und aromatischen Ringsystemen zu interagieren (*Hirayama et al., 2001*). Danach könnten Flavonoidglycoside entweder über ihre Zuckerreste die Bindungsstelle für Glucose blockieren oder diese durch Bindung des aromatischen Ringsystems versperren (z.B. Ring B). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass verschiedene Parameter die Inhibition des SGLT1 beeinflussen wie z.B. die Position der Glycosylierung, der Monosaccharidtyp und das Vorhandensein von Hydroxylgruppen an verschiedenen Positionen der Flavonoidaglyka. Flavonoide glycosyliert mit einer Rhamnose (Quercitrin) oder mit einem Rutinosid (Glc6-1Rha, Rutin) in Position 3 zeigen mittelstarke bis keine Inhibition. Eine Galactose in Position 3 des Heterozyklus im Flavonolgerüst störte die Inhibitionsfähigkeit ebenfalls. Niedermolekulare Polyphenole wie Arbutin oder Salicin konnten den  $\alpha$ -MDG-Transport nicht hemmen, wobei Arbutin vom *hSGLT1* transportiert wurde, was bereits in der Literatur beschrieben wird (*Loftao et al., 1994*). Beide Substanzen liegen zwar glycosyliert vor, weisen aber kein so komplexes hydrophobes aromatisches Ringsystem auf. Das Dihydrochalcon-Aglykon Phloretin und das Flavanon-Aglykon Naringenin zeigten Inhibitionen bis zu 60% bei 500  $\mu\text{M}$  bzw. 1000  $\mu\text{M}$ .

Diese Daten zeigen auf, dass nicht die Zuckerkomponente die Inhibitionsfähigkeit bestimmt, sondern das hydrophobere Aglykon, wobei die Inhibition durch bestimmte Zuckerreste verstärkt werden kann. Quercetin beispielsweise inhibierte als Aglykon den  $\alpha$ -MDG-Transport nur um 25% bei 200  $\mu$ M, wobei glucosylierte Derivate eine deutlich höhere Inhibition zeigten. *Wright et al.* stellten in einem Review von 2011 Interaktionen des SGLT1 mit unterschiedlichen Glycosiden und Aglyka zusammen, wobei vermutet wird, dass das Aglykon die Bindung am SGLT1 bestimmt und so der Glucosetransport gehemmt wird. Die Flavonole Quercetin und Kaempferol unterscheiden sich nur in einer Hydroxylgruppe in Position 3' im B-Ring, was bei der Inhibition durch Flavonol-3- oder 7-O-glycoside keinen großen Einfluss zu haben scheint. Die stärkste Inhibition in beiden Systemen erreichten Quercetin- und Luteolin-4'-O-glucosid. Isoflavone, die den B-Ring in Position 3 des Heterozyklus tragen, zeigten keine Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Transports, obwohl Genistin ebenfalls in Position 4' des B-Ringes glucosyliert ist.

Phlorizin ist der bekannteste SGLT1-Inhibitor (*Ehrenkranz et al., 2005*) und doch unterscheiden sich die Inhibitionsdaten zwischen der SURFE<sup>2</sup>R-Technologie und den TEVC-Messungen erheblich. Ein möglicher Grund dafür könnten die unterschiedlichen Strukturen der Natrium-abhängigen Glucose-Transporter zwischen Mensch und Kaninchen sein. *Hirayama et al.* (1996) charakterisierten mittels des *Xenopus*-Oozyten-Expressionssystems und der Two-electrode-voltage-clamp-Methode (TEVC) die Na<sup>+</sup>-Aktivierung und Substratspezifitäten von SGLT1-Isoformen aus Mensch (*hSGLT1*), Kaninchen (*rbSGLT1*) und Ratte (*rtSGLT1*). Die drei unterscheiden sich mehr oder weniger in der Kinetik und Substratspezifität. SGLT1 aus Kaninchen besitzt eine doppelt so hohe Affinität für  $\alpha$ -MDG und 3-O-Methylglucose als derjenige vom Menschen oder von Ratten. Der  $K_m$ -Wert von  $\alpha$ -MDG bei einem verwendeten Membranpotential von -50 mV lag für *rbSGLT1* bei 0,17 mM, für *rtSGLT1* bei 0,31 mM und für *hSGLT1* bei 0,49 mM. Die Na<sup>+</sup>-Bindungsgeschwindigkeitskonstanten von *hSGLT1* und *rtSGLT1* sind ähnlich, aber vierfach größer als die von *rbSGLT1*. Die Affinität für Phlorizin, der bekannte kompetitive Inhibitor des SGLT1, variiert bei Mensch, Ratte und Kaninchen ebenfalls. Es wird angegeben, dass der  $K_i$  von Phlorizin für *rtSGLT* bei 0,012  $\mu$ M, für *hSGLT1* bei 0,22  $\mu$ M und für *rbSGLT1* bei 0,76  $\mu$ M lag. Das heißt,

dass am *rbSGLT1* größere Mengen an Inhibitor gebraucht werden, um den  $\alpha$ -MDG-Transport zu hemmen. Im Rahmen der eigenen SURFE<sup>2</sup>R-Messungen konnte für  $\alpha$ -MDG und *rbSGLT1* ein  $K_m$ -Wert von  $10,3 \pm 3,1$  mM bestimmt werden, der den Angaben der Firma *IonGate* entspricht (*Obrdlik et al., 2008*). Der von Projektpartnern der TUM ermittelte  $K_m$ -Wert im Oozytenmodell (*hSGLT1*) lag bei  $1,01 \pm 0,05$  mM. Der berechnete  $K_i$  von Phlorizin in den durchgeführten TEVC-Untersuchungen konnte mit  $0,14 \pm 0,006$   $\mu$ M für den *hSGLT1* angegeben werden. Für diese kinetische und substratspezifische Variabilität sind Unterschiede in den primären Aminosäuresequenzen bei diesen drei homologen Proteinen verantwortlich zu machen. Allerdings sind detaillierte dreidimensionale Strukturen für *hSGLT1* noch nicht verfügbar. In einem Review von *Wright et al. (2011)* wird folgendes Phänomen beschrieben: nach Induktion eines Auswärtsstroms (durch intrazelluläre Injektion der Substratlösung) in *hSGLT1* exprimierenden Oozyten lag der  $K_m$ -Wert für  $\alpha$ -MDG bei 37 mM. Die Affinitäten der Substrate bei 100 mM waren  $\alpha$ -MDG > Galactose > 3-O-Methyl-D-Glucose und > Glucose. Die Affinitäten dieser Substrate bei rightside-out (RSO) orientieren Transportern unterschieden sich davon enorm:  $\alpha$ -MDG  $\approx$  Galactose  $\approx$  Glucose  $\ggg$  3-O-Methyl-D-Glucose. Der ermittelte  $K_i$  von Phlorizin für die Inhibition des inside-out (ISO) Transports war > 1 mM, im Vergleich mit einem  $K_i$  von < 1  $\mu$ M für den RSO-orientieren Transport von  $\alpha$ -MDG. Ähnliche Ergebnisse ergaben Untersuchungen von RSO- und ISO-orientierten *hSGLT1* exprimierenden Vesikeln aus Bakterien. Der  $K_m$ -Wert für  $\alpha$ -MDG lag für den RSO-Transport bei 0,15 mM und für den ISO-Transport bei 56 mM. Der Transport durch den SGLT ist demnach also in beide Richtungen, ins Cytoplasma sowohl als auch ins Lumen möglich, wobei unterschiedliche Kinetiken und Substratspezifitäten auftreten. Bei den zur Verfügung gestellten Membranpräparationen aus CHO-Zellen, die den *rbSGLT1* exprimieren, wird davon ausgegangen, dass die Membranen in der überwiegenden Mehrheit ISO-orientiert vorliegen (laut *IonGate*: 95%). Im Oozytenmodell dagegen liegen RSO-orientierte Transporter vor. Das Ansprechen der *rbSGLT1*-Transporter auf  $\alpha$ -MDG ist somit reduziert und höhere  $K_{m/i}$ -Werte erklärbar. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass ISO-orientierte Transporter eventuell anders bzw. schlechter auf potentielle Inhibitoren wie das Phlorizin oder bestimmte Flavonoide ansprechen. Die Bindungsdomänen der Flavonoide am SGLT1 und damit Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Transports sind noch nicht bekannt. Diese

Bindungsdomänen könnten, ob ISO- oder RSO-orientierte Transporter vorliegen, aufgrund anderer Aminosäuresequenzen unterschiedlich sein und somit ebenfalls die Bindungsaffinitäten dieser Inhibitoren beeinflussen.

#### 5.3.4 Kombinationsmessungen von Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid

Im Projekt wurde abgesprochen, die potentesten Inhibitoren des SGLT1 aus SURFE<sup>2</sup>R sowie aus TEVC Messungen zu kombinieren und mittels der SURFE<sup>2</sup>R-Technologie in Kiel zu untersuchen. Neben Phlorizin zeigte Quercetin-4'-O-glucosid in den Einzelmessungen in beiden Systemen eine sehr gute Inhibition des  $\alpha$ -MDG-Transports. Eigene Untersuchungen der beiden Flavonoide mittels des SURFE<sup>2</sup>Rs in einem Konzentrationsbereich von 10-1000  $\mu$ M zeigten deutliche Unterschiede in der Inhibition. Bei 250  $\mu$ M hemmte Phlorizin den 5 mM  $\alpha$ -MDG-Transport um  $78 \pm 14\%$ , während Quercetin-4'-O-glucosid den Transport um bereits  $98 \pm 2\%$  inhibierte. Durch die Ermittlung einer ‚dose-effect-curve‘ und eines ‚median-effect-plots‘ nach *Chou (1976)* erfolgte die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte. So konnte unter den in Punkt 3.10 beschriebenen Bedingungen die IC<sub>50</sub> von Quercetin-4'-O-glucosid mit 27  $\mu$ M berechnet werden, während die IC<sub>50</sub> von Phlorizin mit 124  $\mu$ M um Faktor 5 höher war. TEVC-Untersuchungen zeigten abermals starke Unterschiede in den ermittelten Kinetikparametern. Hier wurde die IC<sub>50</sub> für Phlorizin mit 0,5  $\mu$ M und für Quercetin-4'-O-glucosid mit 170  $\mu$ M bestimmt.

Aufgrund der starken Hemmwirkung beider Einzelsubstanzen wurden sie in unterschiedlichen Konzentrationen kombiniert und mittels des SURFE<sup>2</sup>Rs gemessen. Dabei zeigten die Kombinationen aus 75-250  $\mu$ M Quercetin-4'-O-glucosid mit geringeren Mengen an Phlorizin (10-25  $\mu$ M) nach der CI-Isobol-Berechnungsmethode nach *Chow und Talalay (1984)* synergistische Effekte. Während 75  $\mu$ M Quercetin-4'-O-glucosid den  $\alpha$ -MDG-Strom um  $82 \pm 11\%$  und 25  $\mu$ M Phlorizin um  $4 \pm 2\%$  inhibierte, hemmte die Kombination den Strom um  $97,3 \pm 0,7\%$ . Ein möglicher Vorteil einer synergistischen Kombination zweier Arzneistoffe ist beispielsweise eine mögliche Minderung der Dosis bei gleichbleibender Wirkung und dadurch eine Minimierung von möglichen Nebenwirkungen durch eine der Substanzen. Die SURFE<sup>2</sup>R-Untersuchungen der Einzelsubstanzen lassen unterschiedliche Hemm-

mechanismen vermuten. Die zwischen den Inhibitionsmessungen durchgeführten wash-out Messungen zeigten, dass bei Phlorizin die Aktivität des SGLT1 gegenüber  $\alpha$ -MDG auch nach Gabe unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen vollständig wiederkehrt. Diese Beobachtung konnte für Quercetin-4'-O-glucosid so nicht gezeigt werden; je höher die Inhibitorkonzentration gewählt wurde, desto schwieriger regenerierte sich der SGLT1 und die Signalstärke von  $\alpha$ -MDG nahm ab. In allen Kombinationen der beiden Einzelsubstanzen war dieses Phänomen nicht so stark ersichtlich. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Peifer (Abteilung Pharmazeutische und Medizinische Chemie, CAU Kiel) konnten mittels der Schrödinger Software durch molekulares Modellieren Informationen über die Bindung von Inhibitoren am SGLT1 gesammelt werden. Dafür wurde die Kristallstruktur des vSGLTs verwendet, einem Natrium-abhängigen Galactose-Transporter aus dem Bakterium *Vibrio parahaemolyticus*. Die Aminosäuresequenz des hSGLT1 entspricht derjenigen des vSGLT zu 32% (Review Wright et al., 2011). Abbildung 53 zeigt die Bindungsstelle der Glucose im simulierten hSGLT1, aufbauend auf der Kristallstruktur des vSGLT, wobei die Bindungsstelle der Galactose gegen Glucose getauscht wurde.

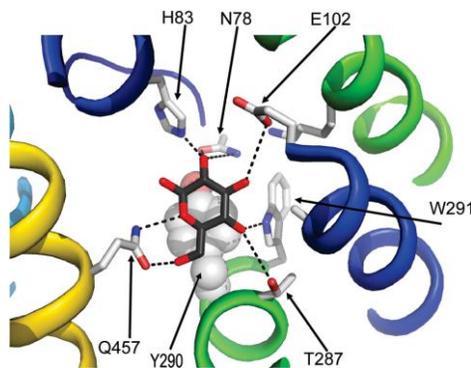


Abbildung 53: Bindungsstelle der Glucose im simulierten hSGLT1, (Wright et al., 2011)

Q: Glutamin; Y: Tyrosin; T: Threonin; W: Tryptophan; E: Glutaminsäure; N: Asparagin; H: Histidin

Interne Untersuchungen zum ‚molecular modeling‘ zeigten, dass der Inhibitor Phlorizin ebenfalls sehr gut in die Bindungsstelle der Glucose passt. Außerdem konnte so herausgefunden werden, dass das Flavonolderivat Quercetin-4'-O-glucosid sterisch nicht in diese Bindungsstelle passt und damit an einer anderen, noch unbekanntem Stelle bindet und inhibiert. Weitere Untersuchungen in diese Richtung sind sicherlich notwendig. So können

unterschiedliche Mechanismen der Hemmung für den kompetitiven Inhibitor Phlorizin und für Quercetin-4'-O-glucosid angenommen werden.

## 5.4 Stabilität der Flavonoide gegenüber der Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH)

Die Lactase-Phlorizin-Hydrolase ist die einzige  $\beta$ -Glucosidase im Darmlumen des Menschen. Diverse Studien konnten bereits zeigen, dass die LPH in der Lage ist, neben Lactose und Phlorizin auch unterschiedlichste Flavonoide zu spalten (*Day et al., 2000; Németh et al., 2003; Gee et al., 2000*). Jedoch wurden für diese Studien unterschiedliche Ausgangsgewebe und Präparationstechniken für die LPH verwendet (isolierte Schafs-LPH, menschlicher Darm oder Darmpräparationen der Ratte). In eigenen Experimenten wurde die humane LPH (hLPH) aus CHO-Zellen per Immunpräzipitation isoliert. Dies ermöglichte Inkubationsversuche mit verschiedenen polyphenolischen Substanzen. Die  $K_m$ -Werte der bekannten Substrate lagen für Lactose bei  $149 \pm 32$  mM und für Phlorizin bei  $2,4 \pm 0,6$  mM. Phlorizin wurde innerhalb von 90 min zu  $48 \pm 14\%$  gespalten und stellt damit unter allen getesteten Substanzen das beste Substrat der LPH dar. Polyphenolische Substanzen mit Strukturähnlichkeiten zu Phlorizin (Neohesperidin-Dihydrochalcon, Stilbene siehe EINLEITUNG Abbildung 8) wurden unter den verwendeten Bedingungen nicht gespalten. Flavonoidglycoside, die mit einer Rhamnose oder einer Galactose glycosidisch verknüpft vorlagen, wurden ebenfalls nicht hydrolysiert. Vergleichbare Erkenntnisse konnten *Day et al. (1998)* und *Németh et al. (2003)* erlangen. Weitere Inkubationsversuche konnten eine Spaltung von Flavonoid-mono-/di- $\beta$ -glycosiden mit Glucose-Resten in unterschiedlichen Positionen des Aglykons (3, 3', 4', 7) aufzeigen (Strukturbeispiel Abbildung 54), wobei die stärkste Spaltung für Flavanone, Flavone und Flavonole erhalten wurde, die in Position 7 des A-Ringes glycosyliert vorlagen. Apigenin-7-O-glucosid und Luteolin-3',7-O-glucosid wurden in dieser Gruppe am stärksten hydrolysiert (ca. 50-60% in 90 min). Auch *Németh et al. (2003)* erhielt die stärkste Spaltung, abgesehen für Phlorizin, unter den von ihnen getesteten Flavonoiden für Apigenin-7-O-glucosid. Flavonoidglycoside, die in Position 4' des B-Ringes oder in Position 3 glycosyliert sind, wurden ebenfalls von der LPH deglycosyliert.

Glycosylierte Isoflavone wie Genistin oder Sophoricosid, welche den B-Ring in Position 3 des Heterozyklus aufweisen, wurden von der LPH nicht deglycosyliert (siehe ERGEBNISSE Tabelle 17). *Day et al. (1998)* und *Németh et al. (2003)* hingegen konnten eine Spaltung von Genistin verzeichnen, wobei menschliches Darmgewebe bzw. isolierte Schafs-LPH verwendet wurde.

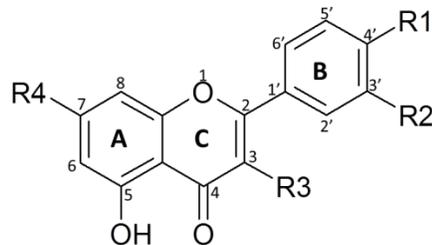


Abbildung 54: Flavonolstrukturen

R1-4 : abhängig von Substanz : H- oder OH Reste, teilweise glycosyliert

Die Lactase-Phlorizin-Hydrolase ist im Dünndarm überwiegend im Jejunum lokalisiert (*Estrada et al., 1996*). Pro Tag werden ca. 2,5 L Darmsaft gebildet. Die sogenannten *Brunner-Duodenaldrüsen* produzieren ein hochvisköses, schleimhaltiges Sekret, das aufgrund seiner hohen Hydrogencarbonatkonzentration einen pH-Wert von 8 - 9 aufweist (*Mutschler et al., 2008*). Zusammen mit saurem Speisebrei können so pH-Werte im Duodenum von 5 - 8 herrschen, im Jejunum von 7 - 9. Um diese Situation nachzuahmen, wurde ein mittlerer pH-Wert von 7,4 gewählt. Das pH-Optimum der LPH liegt jedoch bei pH 5,8 - 6 (*Skovbjerg et al., 1981*). In eigenen Untersuchungen konnte für ausgewählte Flavonoidglycoside bei pH 6 tatsächlich eine stärkere Deglycosylierung verzeichnet werden, vor allem für Flavonoide, die in Position 3 und 4' glycosyliert sind. Alle bisher genannten Studien zur Deglycosylierung von Flavonoiden durch die LPH wurden bei pH 6 durchgeführt und zeigten dadurch stärkere Umsatzraten. Beispielsweise konnten *Németh et al. (2003)* nach Inkubation mit isolierter Schafs-LPH bei pH 6,5 nicht nur für Apigenin-7-O-glucosid oder für Naringenin-7-O-glucosid hohe Deglycosylierungsraten verzeichnen, sondern auch für Quercetinderivate, die in Position 3 bzw. 4' glycosyliert vorlagen. Selbst für Quercetin-3,4'-O-diglucosid konnte hier eine Spaltung verzeichnet werden, während eigene Untersuchungen keine Spaltung der Monosubstanz als auch der Komponente im Zwiebelextrakt zeigen konnten.

Bis heute ist nicht klar, welche Domäne der LPH für die Spaltung von Flavonoiden verantwortlich ist. Schon 1975 vermuteten *Ramaswamy et al.*, dass 2 unterschiedliche, katalytisch aktive Zentren der LPH existieren, wobei eine Seite für die Phlorizinspaltung verantwortlich sei und eine Seite Cerebroside spalten kann, beide jedoch Lactose. *Day et al. (2000)* postulierten, dass die Lactase-Seite Flavonole wie Quercetin-4'-O-glucosid und Quercetin-3-O-glucosid spaltet, wobei diese Ergebnisse mit Hilfe eines LPH-Inhibitors erhalten worden waren. Eigene Untersuchungen mit MDCK-Zellen, die nur Domäne III, die Phlorizin-Hydrolase (PH) exprimierten, zeigten eine Spaltung von Phlorizin von bis zu 70% in 90 min, jedoch keine Hydrolyse von Lactose. Die Inkubation der isolierten PH mit Flavonoidglycosiden, die in Position 7 glycosyliert sind, zeigte eine signifikante Erhöhung der Deglycosylierung, während Flavonoid-4'-O-glycoside nicht gespalten wurden. Kombinationsmessungen mit unterschiedlichen LPH-Substraten ergaben weitere Informationen. In der Kombination von Quercetin-4'-O-glucosid mit Lactose und Inkubation mit isolierter LPH reduzierte sich der Lactoseumsatz um 78%, während umgekehrt die Spaltung von Quercetin-4'-O-glucosid nicht durch Lactose beeinflusst wurde. Außerdem wurde Quercetin-4'-O-glucosid nicht von der PH umgesetzt. Es ist also anzunehmen, dass Quercetin-4'-O-glucosid von Domäne IV (Lactase-Seite) hydrolysiert wird. Die Phlorizinspaltung wurde durch die Kombination mit Kaempferol-7-O-glucosid nicht beeinflusst, während Phlorizin die Hydrolyse des Flavonolderivats signifikant um 36% inhibierte (Abbildung 55). Somit ist davon auszugehen, dass Phlorizin nicht nur durch die Phlorizin-Hydrolase gespalten werden kann, sondern teilweise auch durch die Lactase Seite; darauf weisen ebenfalls Ergebnisse aus der Literatur hin (*Arribas et al., 2000*).

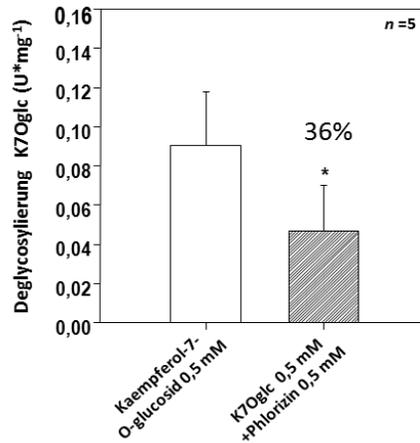


Abbildung 55: Reduktion (%) der Spaltung von Kaempferol-7-O-glucosid durch Phlorizin

Zusammenfassend konnte eine Aktivität der LPH gegenüber verschiedenen Flavonoiden gezeigt werden. Im Hinblick auf die Entwicklung eines Flavonoid-angereicherten Pflanzenextrakts zur Inhibition des SGLT1 wurden ausgewählte Extrakte mit isolierter LPH inkubiert. Quercetin-4'-O-glucosid zeigte sowohl in SURFE<sup>2</sup>R- als auch in TEVC-Untersuchungen potente Hemmungen des SGLT1. Inkubationen der Einzelsubstanz mit LPH zeigten eine Deglycosylierung bis zu 30% in 90 min. Der in dieser Arbeit charakterisierte Zwiebelextrakt (ZE420) wurde ebenfalls mit isolierter LPH inkubiert und eine Deglycosylierung der Hauptkomponente Quercetin-4'-O-glucosid mit bis zu 40% in 90 min konnte aufgezeigt werden. Die Inkubation des ZE420 mit isolierter PH führte zu keiner Spaltung der Hauptkomponente. Nach 90 min Inkubation von isolierter LPH mit einem Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakt konnte gezeigt werden, dass LPH nicht in der Lage ist, die im Grünkohl enthaltenen Flavonoide komplett zu Aglyka zu spalten. Das dürfte daran liegen, dass Flavonoide im Grünkohl teils acyliert sind und bis zu 5 Glucosereste aufweisen. Des Weiteren wurde ein Apfelextrakt (AE15) für 90 min mit der LPH inkubiert. Es konnte wie nach Inkubation der Einzelsubstanz Phlorizin eine Deglycosylierung von Phlorizin im Extrakt von bis 60% gezeigt werden. Die Deglycosylierungsraten zwischen der Inkubation mit LPH und PH unterschieden sich hierbei nicht signifikant.

Im Rahmen des Projektes konnte die Inhibition des SGLT1 durch Flavonoide in verschiedenen Testsystemen gezeigt werden. Quercetin-4'-O-glucosid inhibierte neben Phlorizin den  $\alpha$ -MDG-Transport in allen Systemen am stärksten. Projektpartner konnten die

stärksten Hemmungen des SGLT1 im TEVC-Test für Flavonoide zeigen, die in Position 4' des B-Rings glycosyliert sind (Quercetin- und Luteolin-4'-O-glucosid,  $88\pm 1\%$  bzw.  $83\pm 2\%$ ). Die SURFE<sup>2</sup>R-Messungen am MPI und die in Kiel durchgeführten Versuche bestätigen diese Ergebnisse. Die Inkubationsversuche dieser potenten SGLT1-Inhibitoren mit LPH zeigten, dass diese innerhalb von 90 min bis zu 30% deglycosyliert werden können. Kaempferol-7-O-glucosid, Apigenin-7-O-glucosid, Luteolin-7-O-glucosid, Luteolin-3',7-O-diglucosid und das Flavanon Naringenin-7-O-glucosid wurden durch die LPH am stärksten gespalten. Die Inhibition des SGLT1 durch die genannten Flavonoide variierte in den Testsystemen. Naringenin-, Quercetin- und Kaempferol-7-O-glucosid konnten den SGLT1 in SURFE<sup>2</sup>R-Messungen potent hemmen, was sich in TEVC-Messungen allerdings nicht bestätigen ließ. Einige Aglyka wie Quercetin, Kaempferol, Luteolin und Naringenin zeigten bei *Kottra und Daniel (2007)* und auch in projektinternen Untersuchungen teilweise eine gute Inhibition, wenn die Löslichkeit der eher lipophileren Substanzen in den jeweiligen Testsystemen gegeben war. Der Fokus lag allerdings auf der Testung von Flavonoidglycosiden. Rutin zeigte in den SURFE<sup>2</sup>R-Messungen eine geringe Inhibition, in projektinternen TEVC-Untersuchungen jedoch keine Inhibition. Quercitrin, Rutin und Kaempferol-3-O-rutinosid weisen eine terminale Rhamnose in Position 3 des Heterozyklus auf und werden nach eigenen Untersuchungen nicht von der LPH angegriffen. *Rodríguez et al. (2010)* identifizierte Kaempferol-3-O- $\alpha$ -rhamnosid in *Bauhinia megalandra* als Inhibitor der intestinalen Glucose-Aufnahme. Testungen durch Projektpartner der TUM des Kaempferol- $\alpha$ -3-O-rhamnosids (ein Geschenk von Freddy González-Mujica aus Venezuela) im TEVC-Versuch zeigten eine Hemmung des  $\alpha$ -MDG-Stroms um ca. 40% bei 250  $\mu$ M. Quercetin-3-O-rhamnosid, welches in Apfel vorkommt, inhibierte die Glucose-Aufnahme in Caco-2-Zellen mit einer IC<sub>50</sub> von  $0,38\pm 0,05$  mM (*Manzano et al., 2010*). Flavonoidrhamnoside sind gegenüber der LPH stabil und sollten für weitere Untersuchungen am SGLT1 berücksichtigt werden.

Die Aktivität der LPH gegenüber Flavonoiden konnte ebenfalls im ‚everted gut sac‘ Modell nachgewiesen werden. Inkubationsversuche mit Mäusedarm und Phlorizin zeigten eine deutliche Spaltung von Phlorizin von bis zu 60% in 90 min. Inkubationsuntersuchungen mit

Kaempferol-3-O-glucosid zeigten ebenfalls eine Spaltung, allerdings nicht so stark wie für Phlorizin. Die Deglycosylierung von Kaempferol-3-O-glucosid betrug ca. 30% in 90 min.

Die darmständige LPH deglycosyliert Phlorizin zu Phloretin und Glucose, wobei Phloretin als lipophileres Aglykon passiv in die Enterozyten diffundieren kann. In den Entero- und Hepatozyten werden die Aglyka glucuronidiert, methyliert und teils sulfatiert (*Watzl und Rechkemmer, 2001*). In der ‚äußeren Inkubationslösung‘ konnten neben Phloretin auch Phloretinglucuronide detektiert werden. *Crespy et al. (2001)* konnten in Ratten nach intestinaler Infusion von Phlorizin oder Isoquercetin (Quercetin-3-O-glucosid) Metabolite auf der luminalen Darmseite detektieren. *Plumb et al. (2000)* konnten in einem Caco-2-Zellsystem zeigen, dass nach Gabe von Quercetin, Quercetinglucuronide apikal wieder zu finden waren. Eine Absorption von Quercetin mit anschließender Metabolisierung und Rücktransport zur apikalen Seite wird dabei vermutet. *Day et al. (2003)* zeigten mittels ‚everted sac‘ Versuchen mit Rattenjejunum, dass Quercetin-4'-O-glucosid bzw. Phlorizin durch LPH in ihre Aglyka gespalten werden, wonach diese ungehindert die Bürstensaummembran passieren können. Durch die cytosolische UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) entstehen konjugierte Metabolite, die durch ein apikales MRP2 (multi-drug-resistance-protein 2) zurück ins Darmlumen geschleust werden oder durch einen noch unbekanntem Transporter ins Blut transportiert werden.

## 5.5 Ausblick

Aktuelle Strategien zur Behandlung von Diabetes sind vor allem auf die Verringerung der Glucose im Blut, auf die Reduzierung der Insulin-Resistenz (mit Glitazonen wie Rosiglitazon und Pioglitazon) und/oder auf die Kontrolle der hepatischen Glucosefreisetzung (mit Biguaniden wie Metformin) gerichtet. Außerdem kann exogenes Insulin verabreicht werden oder eine Erhöhung der endogenen Insulin-Produktion (mit Sulfonylharnstoffen) induziert werden. Ein anderer therapeutischer Ansatz zur Behandlung von Diabetes basiert auf der Reduzierung der Glucoseabsorption mit  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitoren wie Acarbose, Miglitol und Voglibose (*Castaneda et al., 2007*). Ein weiterer Angriffspunkt moderner Antidiabetika ist das Inkretin-System. Die im Darm gebildeten Inkretine GLP-1 und GIP (siehe EINLEITUNG

UND ZIELSEZUNG Absatz 2.1.1) regen glucose-abhängig die Ausschüttung von Insulin aus den  $\beta$ -Zellen des Pankreas an. Eine Verlängerung der Inkretin-Wirkung wird durch die Gabe von DPP-4 (Dipeptidyl-Peptidase)-Inhibitoren erreicht (Sitagliptin, Vildagliptin). DPP-4 baut Inkretine innerhalb weniger Minuten im Körper ab und inaktiviert so deren Wirkung. Eine imitierende Inkretin-Wirkung bieten Analoga des GLP-1 (Exenatid, Liraglutid), die ebenfalls wie Insulin subkutan gespritzt werden müssen.

Die medikamentöse Therapie von Typ-2-Diabetes beginnt meist mit Metformin-Gaben, die zusammen mit dem Lebensstilmanagement einen validierten ersten Schritt ausmacht. Obwohl Metformin anfangs eine effektive Monotherapie darstellt, erfordert die progressive Natur von Diabetes häufig zusätzliche Maßnahmen. Wenn die  $\beta$ -Zell-Funktion sich weiter verschlechtert, werden die Auswahl der Medikamente und das Management ihrer Nebenwirkungen immer schwieriger. Zum Beispiel führen Sulfonylharnstoffe und Insulin häufig zur Gewichtszunahme und Hypoglykämie. Auch Thiazolidindione (Glitazone) können eine Gewichtszunahme verursachen und sind bei Patienten mit Herzinsuffizienz kontraindiziert. Die Verwendung von  $\alpha$ -Glucosidase-Inhibitoren ist durch Magen-Darm-Nebenwirkungen begrenzt (*Bailey et al., 2010*).

Die Förderung der Zuckerausscheidung über die Nieren ist ein neuer Ansatzpunkt in der Therapie von Typ-2-Diabetes (*Hellwig, 2012*). Die Hemmung des SGLT2 im proximalen Tubulus der Niere, hauptverantwortlich für die Rückresorption der Glucose aus dem Primärharn, erhöht die Glucoseausscheidung über den Urin. Insulinwirkung und -ausschüttung werden nicht beeinflusst. Theoretisch mögliche Nebenwirkungen sind Harnwegsinfekte und Flüssigkeitsmangel. Derzeit testen mehrere Firmen selektive SGLT2-Inhibitoren wie beispielsweise das Dapagliflozin (siehe EINLEITUNG UND ZIELSEZUNG Absatz 2.1)

Die SGLT1-Inhibition stellt ein weiteres interessantes Ziel für die Entwicklung innovativer Substanzen zur effektiven Behandlung von beginnender Hyperglykämie dar. SGLT1-Inhibitoren könnten die Glucose-Absorption im Darm bei bereits übergewichtigen Menschen bzw. bei sogenannten Prädiabetikern mindern und damit postprandiale

Blutzuckerspitzen bei beginnendem Typ-2-Diabetes verringern. Ratsam wären bei dieser Therapie natürlich wie oben schon erwähnt, zusätzliche Bewegungsmaßnahmen und eine Ernährungsumstellung. Die im Rahmen des Projektes erhaltenen Ergebnisse zeigen die potentielle Inhibition des SGLT1 in zwei *in vitro* Systemen besonders durch Phlorizin, Luteolin-4'-O-glucosid und Quercetin-4'-O-glucosid, aber auch durch Pflanzenextrakte aus Grünkohl, Zwiebel und Apfel. Allerdings spiegeln diese *in vitro* Systeme nicht die realen Bedingungen im Tier oder im Menschen wider. Die *rbSGLT1*-exprimierenden CHO-Zellen oder die *hSGLT1* exprimierenden Oozyten verfügen über keine Glycosidasen, die die potentiellen SGLT1-Inhibitoren in ihrer metabolischen Stabilität beeinflussen könnten. Ein zu untersuchender Punkt war somit die metabolische Stabilität und damit Verfügbarkeit der Flavonoide im Dünndarm des Menschen. Die Untersuchungen zeigten auf, dass Flavonoidglycoside, abhängig von Struktur, Glycosylierungsmuster und -grad von der LPH zumindest teilweise gespalten werden können und somit ihre potentielle Hemmwirkung auf den SGLT1 nur eingeschränkt entfalten können. Somit könnte die SGLT1-inhibitorische Aktivität der Hauptinhaltsstoffe von Apfel- und Zwiebelextrakten gemindert werden. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Expression der LPH von Mensch zu Mensch variiert (siehe EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG Absatz 2.1.2.2.1). Flavonoide im Grünkohl, die mit bis zu fünf Glucosen glucosyliert und diese zusätzlich acyliert sind, werden kaum von der LPH hydrolysiert. Daher könnte Grünkohl in Kombination mit Apfel- oder Zwiebelextrakten für ein potentielles Nahrungsergänzungsmittel zur Senkung postprandialer Glucosespitzen in Frage kommen, wobei der Effekt von Grünkohlextrakten durch Kombination mit Zwiebel- oder Apfelextrakt verstärkt werden könnte. Projektinterne *in vivo*-Testungen am Menschen durch die Partner der TUM sind zur Zeit der Abfassung dieser Arbeit noch in Bearbeitung. Humanstudien mit jungen gesunden Probanden zeigten nach Grünkohl-, Zwiebel- und Apfelextrakt-Gabe (je 600 mg Flavonoide bzw. 450 mg Phlorizin als Einmalgabe) und einem darauf folgenden oralen Glucosetoleranz-Test keine signifikanten Veränderungen der Plasma-Glucose- bzw. -Insulinspiegel. In einer weiteren, zu diesem Zeitpunkt weitgehend abgeschlossenen Humanstudie, in der gesunde Probanden Weißbrot verabreicht bekamen ( $\approx 50$  g Kohlenhydrate), konnte nach Einnahme eines Apfel/Grünkohl Extraktgemisches eine

Reduktion der postprandialen venösen Plasmaglukosekonzentration gezeigt werden (Abbildung 56).

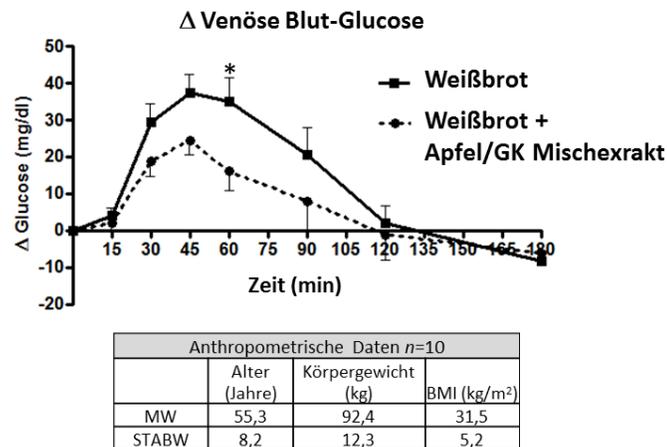


Abbildung 56: Venöser Blut-Glucosespiegel nach Weißbrotgabe (104 g) und zusätzlicher Gabe eines Apfel/GK Mischextraktes (600 mg Flavonoide/450 mg Phlorizin), (Daten der Projektpartner TUM)

Die Auswertung der Insulinspiegel ist noch nicht abgeschlossen und weitere Humanstudien sind während dieser Niederschrift ebenfalls noch in Bearbeitung (mit ZE420, AE15, GK-Extrakt, Apfel/Zwiebel Mischextrakt). Zusätzlich befindet sich eine Humanstudie mit einem Apfel/Grünkohl Extraktgemisch bei Prädiabetikern in der Durchführung. Eine weitere, sehr interessante Studie mit Lactose-intoleranten Probanden sollte in Betracht gezogen werden und würde Aufschluss über eine eventuelle Steigerung der Wirkung durch flavonoidhaltige Extrakte aufzeigen. Des Weiteren ist abzuwarten, wie sich die Insulinspiegel, als auch der Glucosegehalt im Urin durch die Einnahme der Pflanzenextrakte verändern.

Nach Gabe eines Flavonoid-haltigen Pflanzenextraktes können durch die Spaltung der Flavonoid-glycoside durch LPH entstehende Aglyka passiv durch die Bürstensaummembran diffundieren (Kahle *et al.*, 2010), wobei eine Metabolisierung zu Glucuroniden etc. wahrscheinlich ist. Phloretin ist dabei in der Lage, den ubiquitär vorkommenden GLUT2 zu inhibieren (Kwon *et al.*, 2007). Eine potente Hemmung des Transports von radiomarkierter 2-Deoxyglucose (2DG) und somit eine Inhibition des GLUT2 konnte die Arbeitsgruppe im Oozytenmodell außerdem für das Flavonolaglykon Quercetin feststellen ( $IC_{50}=12,7 \mu M$ ). Projektinterne Untersuchungen unter der Leitung von Prof. Hannelore Daniel zeigten unter Verwendung des gleichen Systems ähnliche Ergebnisse (Abbildung 57). Nicht nur Phloretin

und Quercetin inhibierten die Aufnahme von 2-DG, auch Quercetin-4'-O-glucosid und Quercetin-3-O-glucosid erzielten inhibitorische Effekte. Chlorogensäure dagegen zeigte keinen Effekt. GLUT2 ist verantwortlich für den basolateralen Fructose- und Glucose-Transport aus den Enterozyten in den systemischen Kreislauf. GLUT2 sitzt außerdem in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas und in den Hepatozyten, fungiert dort als Glucosesensor und ist so an der Insulinsekretion bzw. an der Regulierung der Aufnahme bzw. Abgabe von Glucose aus der Leber beteiligt (Brown, 2000).

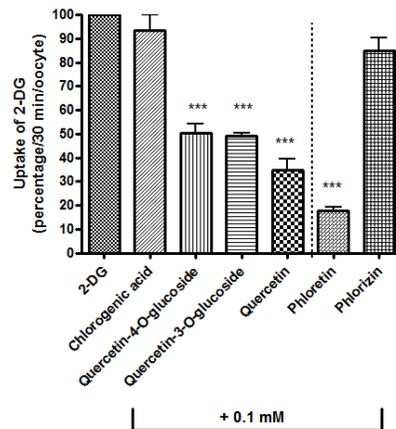


Abbildung 57: Inhibition des 2-DG Transports in *h*GLUT2 exprimierenden Oozyten, (Daten der Projektpartner TUM)

Eine Inhibition des basolateralen GLUT2 durch aufgenommene Flavonoidaglyka würde die Wirkung der SGLT1-Inhibition verstärken. Die Inhibition des GLUT2 im Pankreas und in der Leber könnte allerdings den Insulin-Stoffwechsel bzw. die Aufnahme von Glucose in die Leber beeinflussen und sich für die Therapie von postprandialen Glucosespitzen nachteilig auswirken. Des Weiteren würde die Inhibition des SGLT1 eine Aufkonzentrierung von Glucose im Darm verursachen, was zu Verdauungsproblemen und Blähungen führen kann. In wie weit Nebenwirkungen durch entstehende Flavonoid-Metabolite bzw. durch nicht absorbierte Glucose auftreten können, ist im Rahmen dieses Projektes nicht abschätzbar, sollte aber in weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden.

Ein apikaler Einbau des GLUT2 bei definierten Glucosemengen im Darm wird diskutiert. *Scow et al. (2010)* konnten unter verschiedenen Bedingungen im Rattendarm *in vitro* keine Translokation des GLUT2 in die apikale Bürstensaummembran nachweisen, während *Kellet et al. (2000)* in einem *in vivo* Rattendarmmodell die Rekrutierung des GLUT2 detektierte.

Scow konnte 2011 mit einem ähnlichen Modell wie *Kellet et al. (2000) in vivo* zeigen, dass GLUT2 apikal bei Glucosekonzentrationen von über 100 mM exprimiert wird (*Chaudhry et al., 2012*). Flavonoide, die eine potente Inhibition des SGLT1 zeigten, wie beispielsweise Quercetin-4'-O-glucosid, inhibierten im Oozytenmodell ebenfalls den GLUT2 (Abbildung 57). *Mace et al. (2012)* konnten am isolierten Rattendarm zeigen, dass eine SGLT1-Inhibition durch Phlorizin die Sekretion der Inkretine (GLP-1 und GIP) teilweise vermindert. Inkretine übernehmen jedoch im Insulinstoffwechsel und in der Therapie von Diabetes mellitus Typ-2 ebenfalls eine wichtige Funktion. Die aufgeführten komplexen Zusammenhänge sind bis heute noch nicht aufgeklärt und zeigen, dass weitere Studien am Menschen unabdingbar sind. 4-6% der adulten Gesamtbevölkerung sind an Diabetes mellitus erkrankt. In Deutschland liegt die Zahl der Diabetesfälle derzeit unter Berücksichtigung der Dunkelziffer bei bereits 10 Millionen. Die Zahlen zeigen auf, wie wichtig neue wissenschaftliche Erkenntnisse zur Vorbeugung und Therapie des Diabetes mellitus sind. Können Flavonoid-angereicherte Extrakte Prädiabetikern helfen der „süßen Falle Diabetes“ zu entkommen?

## 6. ZUSAMMENFASSUNG/ABSTRACT

### 6.1 Zusammenfassung

Diabetes mellitus ist eine der häufigsten Stoffwechselerkrankungen, wobei es sich bei etwa 90% aller Diabetesfälle weltweit um Typ-2-Diabetes handelt. Jährlich erkranken etwa 270 000 Menschen allein in Deutschland neu an Diabetes-Typ-2. Hauptaufgabe des vom BMBF geförderten Projektes „Der Glucose Transporter SGLT: Schlüsselmolekül zur Prävention von Diabetes mellitus?“ waren Untersuchungen zur Inhibition des darmständigen Natrium-abhängigen Glucose-Cotransporters (SGLT1) durch Flavonoide. Natrium-abhängige Glucose-Cotransporter sind in der apikalen Bürstensaummembran des Dünndarms zu finden (SGLT1), aber auch im proximalen Tubulus der Niere (SGLT2). Zurzeit steht die Entwicklung von selektiven SGLT2-Inhibitoren im Fokus der Diabetes-Forschung. Der SGLT2 ist hauptverantwortlich für die Reabsorption der Glucose aus dem Primärharn. Phlorizin, ein Dihydrochalcon aus Apfel und bekannter kompetitiver Inhibitor von SGLT1 und 2, fungierte als Modellsubstanz für die Suche von selektiven SGLT2-Inhibitoren, aber auch von SGLT1-Hemmstoffen. Die Inhibition des SGLT1 im Darm und die damit einhergehende Verminderung der Glucoseabsorption könnte eine zusätzliche Strategie besonders in der Prävention von Diabetes mellitus sein. So könnten bei beginnendem Diabetes problematische postprandiale Glucosespitzen verringert werden, ohne dass Flavonoide dazu intestinal absorbiert werden müssen.

Im Rahmen des Kooperationsprojektes wurden über 50 polyphenolische Substanzen sowie unterschiedliche flavonoidhaltige Pflanzenextrakte in *in vitro*- und *in vivo*- Testsystemen auf ihre Inhibitionsfähigkeit des SGLT1 untersucht. Im Oozytenmodell mittels ‚two-electrode-voltage-clamp‘ gemessen, inhibierten neben Phlorizin ( $IC_{50}=0,5 \mu M$ ) Luteolin-4'-O-glucosid ( $IC_{50}=100 \mu M$ ) und Quercetin-4'-O-glucosid ( $IC_{50}=170 \mu M$ ) den *hSGLT1* am stärksten. Vergleichbare Ergebnisse zeigten eigene Untersuchungen am *rbSGLT1* mittels der SURFE<sup>2</sup>R-Technologie. Neben den oben genannten Substanzen hemmte Quercetin-7-O-glucosid den *rbSGLT1* ebenfalls sehr gut. Flavonoidglucoside, die in Position 3 des Aglykons glucosyliert vorlagen, zeigten in beiden Systemen eine eher moderate Hemmwirkung. Inhibitions-

unterschiede können u.a. auf die unterschiedlichen verwendeten SGLTs (*human & rabbit*) zurückgeführt werden. Bestimmte Kombinationen aus Phlorizin und Quercetin-4'-O-glucosid zeigten im SURFE<sup>2</sup>R-System synergistische Inhibitionseffekte, was auf unterschiedliche Wirkmechanismen hinweist. Darüber hinaus zeigten Flavonoid-haltige Pflanzenextrakte wie z.B. Grünkohl-, Zwiebel- und Apfelextrakte gute bis sehr gute Hemmungen des *hSGLT1* im Oozytenmodell. Ein Apfelextrakt wies mit einer IC<sub>50</sub> von 2 µg/mL ( $\cong$  0,32 µg Phlorizin) die stärkste Hemmung am *hSGLT1* auf.

Grünkohlextrakte wurden über eine Saftherstellung mit Hilfe Zellwand-degradierender Enzyme gewonnen, wobei 15-20% der im Ausgangsmaterial enthaltenen Flavonoide extrahiert werden konnten. Eine Erhöhung der Flavonoidausbeute im Saft konnte durch die Zugabe von Ethanol oder Detergentien nicht erreicht werden. Mittels eines Adsorberharzes konnte der Flavonoidgehalt, bezogen auf den Saft, um den Faktor 10 angereichert werden. Außerdem wurden 6 unterschiedliche Adsorberharze und unterschiedliche Elutionsmethoden auf ihre Verwendbarkeit für die Anreicherung der polyphenolischen Inhaltsstoffe im Batch- und Säulenverfahren geprüft.

Das Flavonoidmuster im pflanzlichen Ausgangsmaterial wurde mit Hilfe von HPLC-DAD und ESI(-)-MS<sup>2</sup> identifiziert und quantifiziert. Die selbständig etablierte Methode ermöglichte eine nahezu vollständige Auftrennung und Charakterisierung unterschiedlichster polyphenolischer Substanzen. Grünkohlextrakte offenbarten ein komplexes Flavonoidmuster, in dem über 40 teilweise acylierte Flavonoidderivate und über 10 Hydroxymitsäurederivate identifiziert werden konnten. Die Hauptflavonoide bildeten Quercetin-3-O-sinapoyl-Sophorotriosid-7-O-glucosid und Kaempferol-3-O-sinapoyl-Sophorosid-7-O-Sophorosid. Die Quantifizierung der komplexen Flavonoidglycoside im Grünkohl erfolgte über die Aglyka nach saurer Hydrolyse. Hierbei wurden 2 Hydrolyse-Methoden miteinander verglichen. Neben Kaempferol und Quercetin konnte auch Isorhamnetin als Aglykakomponente in Flavonoid-angereicherten Grünkohlextrakten detektiert werden. Verschiedene Grünkohlsorten und der Einfluss des Blanchierens auf den Flavonoidgehalt wurden ebenfalls untersucht. Bestimmte unbehandelte Sorten wiesen dabei Gesamtflavonoidgehalte von bis zu 3 000 ppm bezogen auf die Frischmasse auf. Ein

Blanchierprozess bei 98°C für 3 min verminderte den Flavonoidgehalt um fast 40%. Apfel- und Zwiebelextrakte wiesen im Gegensatz zum Grünkohl ein einfacheres Flavonoidmuster auf mit Phlorizin bzw. Quercetin-4'-O-glucosid als Hauptinhaltsstoffen. Der Phlorizingehalt in Schalen und Kerngehäusen von über 30 Apfelsorten wurde verglichen, wobei die höchsten Phlorizinmengen im Kerngehäuse von ‚Nathusius Taubenapfel‘ und in der Schale von ‚Kanada Renette‘ quantifiziert wurden.

Flavonoidaglyka liegen nativ überwiegend  $\beta$ -glycosidisch mit unterschiedlichen Zuckerkomponenten verknüpft vor. Die mögliche Absorption dieser sekundären Pflanzenstoffe im Darm ist wahrscheinlich von einer intestinalen Deglycosylierung abhängig. Lactase-Phlorizin-Hydrolase, eine darmständige  $\beta$ -Glycosidase, die apikal in der Bürstensaummembran lokalisiert ist, könnte für die Deglycosylierung mit verantwortlich sein. Die LPH besitzt zwei aktive Zentren, eines verantwortlich für die Hydrolyse der Lactose, das andere für die Hydrolyse von Glycosyl-N-acylsphingosinen und Phlorizin. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die LPH Flavonoide spalten kann, die eine gute inhibitorische Aktivität gegenüber dem SGLT1 aufzeigen. Hierfür wurde humane LPH aus CHO-exprimierenden Zellen mit Hilfe monoklonaler LPH-Antikörper isoliert und mit über 20 Flavonoiden sowie 3 Flavonoid-haltigen Pflanzenextrakten inkubiert. Die Untersuchung der Hydrolyse der Flavonoidglycoside erfolgte per HPLC-DAD, während die Spaltung von Lactose zu Glucose und Galactose photometrisch bestimmt wurde. Flavonoidglycoside mit terminaler Rhamnose (Quercitrin, Rutin, Naringin) sowie Isoflavonoide (Genistin, Sophoricosid) wurden nicht hydrolysiert. Flavonoidglucoside, die in Position 3', 4', 3 oder 7 glycosyliert vorlagen, wurden von der LPH in unterschiedlichem Ausmaß gespalten (Kaempferol-3-O-glucosid, Quercetin-4'-O-glucosid, Apigenin-7-O-glucosid, Luteolin-3',7-O-diglucosid). Eine Spaltung der Hauptflavonoide in einem Zwiebel- und Apfelextrakt konnte ebenfalls aufgezeigt werden. 40% der Hauptkomponente eines Zwiebelextraktes (Quercetin-4'-O-glucosid) wurde in 90 min von der LPH deglycosyliert, was ihre Bedeutung bei der Flavonoid-Metabolisierung zeigt. Die teils acylierten und hochglycosylierten Flavonoidderivate im Grünkohl wurden von der LPH kaum angegriffen. Inkubationsversuche mit einer isolierten Phlorizin-Hydrolase (PH), die keine Lactaseaktivität aufweist, zeigten, dass neben Phlorizin auch einige Flavonoide gespalten wurden. Flavonoide, die in Position 7 bzw. 3 im

Grundgerüst glucosyliert sind, wurden aktiv durch die PH gespalten, während andere wie Quercetin- und Luteolin-4'-O-glucosid nicht hydrolysiert wurden. Diese Ergebnisse weisen insgesamt auf eine mögliche Deglycosylierung potentieller SGLT1-Inhibitoren durch die LPH hin, was bei *in vivo* Studien berücksichtigt werden sollte. Erste Daten einer Humanstudie, durchgeführt von Projektpartnern, zeigten eine Reduktion der postprandialen Plasma-Glucosespiegel nach Einnahme eines Apfel/Grünkohl-Mischextraktes.

## 6.2 Abstract

Diabetes mellitus is one of the most common metabolic disorders, the majority of patients (90%) suffering from diabetes-mellitus type-2. Every year 270 000 people only in Germany are diagnosed with this disease. The main objective of the project: 'glucose transporters SGLTs: key molecule in prevention of diabetes mellitus?', financially supported by the federal ministry of education and research, was to investigate the inhibitory activity of flavonoids on the sodium-dependent glucose-cotransporter 1 (SGLT1), responsible for intestinal glucose absorption. Sodium-dependent glucose-cotransporters (SGLTs) are predominantly found in the brush border membrane of the small intestine (SGLT1) and the proximal tubule of the nephron in the kidney (SGLT2). The current focus of diabetes research is the development of selective inhibitors of SGLT2 - responsible for glucose reabsorption from the primary urine. Phlorizin, a flavonoid belonging to the subgroup of dihydrochalcones, is known to inhibit both, SGLT1 and SGLT2. Phlorizin was lead compound for the development of SGLT-inhibitors. The search for SGLT1-inhibitors to reduce intestinal uptake of glucose could be another effective strategy to decrease blood glucose levels. By reducing the intestinal uptake of glucose in prediabetic patients, increased postprandial blood glucose concentrations might be avoided. An advantage would be that SGLT1-inhibitors could act without the necessity of being absorbed.

In the course of a screening for other SGLT1 inhibiting flavonoids more than 50 flavonoids and some flavonoid containing plant extracts were tested with different *in vitro* and *in vivo* test-systems. In *hSGLT1* expressing oocytes, using the two-electrode-voltage-clamp technology, phlorizin, luteolin-4'-O-glucoside and quercetin-4'-O-glucoside showed

strongest inhibitory activity with  $IC_{50}$  values of 0.5  $\mu$ M; 100  $\mu$ M and 170  $\mu$ M, respectively (results achieved by partners). Comparable results were obtained by own measurements using the SURFE<sup>2</sup>R-technology. In *rbSGLT1* expressing CHO-cells quercetin-7-O-glucoside in addition showed good inhibitory effects. Flavonoids which were glycosylated in position 3 of the aglycone showed moderate inhibition in both systems. Differences between inhibition results in both systems most likely are caused by the use of different SGLTs (*human & rabbit*). Specific combinations of phlorizin and quercetin-4'-O-glucoside exhibited synergistic inhibitory effects in the SURFE<sup>2</sup>R-system indicating different mechanisms of inhibition. Furthermore flavonoid containing plant extracts, e.g. extracts of curly kale, onion and apple, showed good inhibitory activity against *hSGLT1*. An apple extract achieved the strongest inhibition with an  $IC_{50}$  of 2  $\mu$ g/mL ( $\cong$  0.32  $\mu$ g phlorizin).

In order to produce an extract of curly kale with high flavonoid content, an aqueous juice was prepared with the help of cell wall-degrading enzymes. The total flavonoid yield usually was 15-20% referring to the starting material. Neither the use of ethanol nor of solubilizers could increase the content of flavonoids in the juice. But flavonoids could be enriched by factor 10 using an adsorber resin. Six adsorber resins and different methods of elution were tested in batch- or column-procedures.

The development of an HPLC separation method with DAD and ESI(-)-MS<sup>2</sup> detection allowed the identification and quantification of individual flavonoids. The composition of flavonoid enriched extracts of curly kale exhibited a very complex pattern of flavonoids. Approximately 10 different hydroxycinnamic acid derivatives and about 40 highly glycosylated and additionally acylated kaempferol and quercetin derivatives could be identified and quantified. Main flavonoid derivatives could be shown to be quercetin-3-O-sinapoyl-sophorotrioside-7-O-glucoside and kaempferol-3-O-sinapoyl-sophoroside-7-O-sophoroside. The quantification of flavonoids in curly kale was done after hydrolyzing them into their aglyca. Two different hydrolyses were compared. Besides kaempferol and quercetin also isorhamnetin could be identified as aglycone in flavonoid enriched extracts of curly kale. Different varieties of curly kale showed total flavonoid contents up to 3 000 ppm/fresh weight. Blanching at 98°C for 3 min caused a loss of 40% of flavonoids.

Furthermore the flavonoid compositions of extracts of apple and onion were characterized revealing a less complex flavonoid pattern in comparison to curly kale with phlorizin and quercetin-4'-O-glucoside as main components. The content of phlorizin was compared in the peel and the apple core of different apple varieties. The highest content of phlorizin was found in the apple-core of ‚Nathusius Taubenapfel‘ and in the peel of ‚Kanada Renette‘.

Flavonoids naturally occur mainly as  $\beta$ -glycosides in plant-based food and herbal medicinal products. Bioavailability of flavonoids may depend on their intestinal hydrolysis before absorption and delivery to systemic circulation. Lactase-phlorizin-hydrolase (LPH), a  $\beta$ -glucosidase present at the apical side of the intestinal brush border membrane, might be one of the flavonoid hydrolyzing enzymes. LPH has two catalytic sites, one being responsible for hydrolysis of lactose, whereas the other exhibits activity against substrates like glycosyl-N-acylsphingosines and phlorizin. The ability of purified human LPH to hydrolyze various flavonoid glycosides was investigated in order to determine their metabolic stability as putative inhibitors of SGLT1. Human LPH was isolated from stably transfected CHO-cells by immunoprecipitation with monoclonal LPH antibodies. Specific activity measurements with known substrates, individual flavonoids and flavonoid containing plant extracts were performed. Deglycosylation of about 20 flavonoidglycosides was tested by HPLC-DAD. Hydrolysis of lactose into glucose and galactose was determined by a photometric method. Flavonoidglycosides with a terminal rhamnose residue (e.g. rutin, naringin and quercitrin) and isoflavone glycosides (e.g. sophoricosid and genistin) were not hydrolyzed by human LPH. A cleavage of flavonoid-mono-/di- $\beta$ -glycosides with glucose residues in different positions (3, 4', 3', 7) of the aglycone could be observed (e.g. kaempferol-3-O-glucoside, quercetin-4'-O-glucoside, apigenin-7-O-glucoside and luteolin-3',7-O-diglucoside). Hydrolysis of specific flavonoids could also be shown for a plant extract of onion and apple. On the one hand about 40% of quercetin-4'-O-glucoside, the main component of an onion extract, was deglycosylated by LPH, demonstrating its importance in the metabolism of flavonoids. On the other hand acylated flavonoidglycosides of curly kale were hardly hydrolyzed by LPH. Incubation with purified phlorizin-hydrolase (PH), which is not able to cleave lactose, showed deglycosylation of phlorizin and flavonoids being glycosylated in

position 7 or 3 of the aglycone. Quercetin- and luteolin-4'-O-glucoside were not deglycosylated by PH. These results show that LPH is able to hydrolyze various flavonoids to different extents, showing good inhibitory effects on SGLT1. This has to be considered in *in vivo* studies. New *in vivo* data of project partners showed decreasing blood glucose levels in humans after ingesting bread in combination with a mixture of a flavonoid enriched extract of apple and curly kale.

## 7. Literatur

- Abdul-Ghani M. A.; DeFronzo R. A. (2008) Inhibition of renal Glucose reabsorption: a novel strategy for achieving Glucose control in type 2 diabetes mellitus. *In Endocrine Practice* 14: pp. 782-790
- Alvarado F.; Crane A. K. (1962) Phlorizin as a competitive inhibitor of the active transport of sugars by hamster small intestine in vitro. *In Biochimica et Biophysica Acta* 56: pp. 170-172
- Arribas J. C. D.; Herrero A. G.; Martin-Lomas M.; Canada F. J.; He S.; Withers G. W. (2000) Differential mechanism-based labeling and unequivocal activity assignment of the two active sites of intestinal Lactase/phlorizin hydrolase. *In European Journal of Biochemistry* 267: pp. 6996-7005
- Arts I. C. W.; Sesink A. L. A.; Hollman P. C. H. (2002) Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *In Nutrition Journal* 132 (9): p. 2823
- Ayaz F. A.; Hayirioglu-Ayaz S.; Alpay-Karaoglu S.; Gruz J.; Valentova K.; Ulrichova J.; Strnad M. (2007) Phenolic acid contents of kale (*Brassica olearacea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *In Food Chemistry* 107: pp. 19-25
- Baggio L. L.; Drucker D. J. (2007) Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *In Gastroenterology* 132: pp. 2131-2157
- Bailey C. J.; Gross J. L.; Pieters A.; Bastien A.; List J. F. (2010) Effect of dapagliflozin in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycaemic control with metformin: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *In Lancet* 375 (9733): pp. 2223-2233
- Balen D.; Ljubojevic M.; Breljak D.; Brzica H.; Zlender V.; Koepsell H.; Sabolic I. (2008) Revised immunolocalization of the Na<sup>+</sup>-D-glucose cotransporter SGLT1 in rat organs with an improved antibody. *In American Journal of Physiology* 295 (2): pp. C475-89
- Behrendt M.; Keiser M.; Hoch M.; Naim H. Y. (2009) Impaired Trafficking and Subcellular Localization of a Mutant Lactase Associated with Congenital Lactase Deficiency. *In Gastroenterology* 136: pp. 2295-2303
- Behrendt M.; Polaina J.; Naim H. Y. (2010) Structural hierarchy of regulatory elements in the folding and transport of an intestinal multidomain protein. *In Journal of Biological Chemistry* 285: pp. 4143-4152
- Bell G. I.; Polonsky K. S. (2001) Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta cell functions. *In Nature* 414: pp. 788-791
- Blakeney A. B.; Harris P. J.; Henry R. B.; Stone B. A. (1983) A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *In Carbohydrate Research* (113): pp. 291-299
- Beesk N.; Perner H.; Schwarz D.; George E.; Kroh L.W.; Rohn S. (2010) Distribution of quercetin-3,4'-O-diglucoside, quercetin-4'-O-monoglucoside, and quercetin in different parts

- of the onion bulb (*Allium cepa* L.) influenced by genotype. In *Food Chemistry* 122 (3): pp. 566-571
- Brown, G. K. (2000) Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. In *Journal of inherited metabolic disease* 23 (3): pp. 237-246
- Brubaker P. L. (2006) The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis. In *Annals of the New York Academy of Science* (10701): pp. 0-26
- Buer C. S.; Muday G. K.; Djordjevic M. A. (2004) The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. In *Plant Cell* 16: pp. 1191-1205
- Castaneda F.; Burse A.; Boland W.; Kinne R. K.-H. (2007) Thioglycosides as inhibitors of hSGLT1 and hSGLT2: Potential therapeutic agents for the control of hyperglycemia in diabetes. In *International Journal of Medical Sciences* 4(3): pp. 131-139
- Candiano G.; Bruschi B.; Musante L.; Santucci L.; Ghiggeri G. M.; Carnemolla B.; Orecchia P.; Zardi L.; Righetti P. G. (2004) Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. In *Electrophoresis* 25: pp. 1327-1333
- Chao E. C.; Henry R. R. (2010) SGLT2 inhibition-a novel strategy for diabetes treatment. In *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 201: pp. 551-559
- Chaudhry R. M.; Scow J. S.; Madhavan S.; Duenes J. A.; Sarr M. G. (2012) Acute enterocyte adaptation to luminal glucose: a posttranslational mechanism for rapid apical recruitment of the transporter GLUT2. In *Journal of gastrointestinal Surgery* 16: pp. 312-319
- Chou T. C. (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. In *Pharmacological Reviews* 58 (3): 621-681
- Clifford M. N. (2003) The analysis and characterization of chlorogenic foods and other cinnamates, In *Methods in Polyphenol Analysis*; Santos-Buelga, C. W. G., Ed. In *The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K.* pp 314-333.
- Colombo V.; Lorenz-Meyer H.; Semenza G. (1973) Small intestinal phlorizin hydrolase: the "beta-glycosidase complex". In *Biochimica et Biophysica Acta* 327 (2): pp. 412-424
- Crespy V.; Morand C.; Besson C.; Manach C.; Démigné C.; Rémésy C. (2001) Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. In *Nutrition Journal* 131 (8): pp. 2109-2114
- Crespy V.; Aprikian O.; Morand C.; Besson C.; Manach C.; Demigne C.; Rémésy C. (2002) Bioavailability of Phloretin and Phloridzin in rats. In *Journal of Nutrition*, 132: pp. 3227-3230
- Day A. J.; DuPont M. S.; Ridley S.; Rhodes M.; Rhodes M. J.; Morgan M. R.; Williamson G. (1998) Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. In *Federation of European Biochemical Societies letters* 436 (1): pp. 71-75

- Day A. J.; Canada F.; Diaz J.; Kroon P. A.; Mclauchlan R.; Faulds C.; Plump G. (2000): Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *In Federation of European Biochemical Societies letters* 468: pp. 166–170
- Day A. J.; Gee J. M.; DuPont M. S.; Johnson I. T.; Williamson G. (2003): Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *In Biochemical Pharmacology* 65 (7): pp. 1199-1206
- Dobberstein D.; Bunzel M. (2010) Identification of ferulate oligomers from corn stover. *In Journal the Science of Food and Agriculture* 90 (11): pp. 1802-1810
- dos Santos M. D.; Almeida M. C.; Lopes N. P.; Petto de Souza G. E. (2006) Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *In Biological & pharmaceutical Bulletin* 29 (11): 2236-2240
- Drozdowski L. A.; Thomson A. B. R. (2006) Intestinal sugar transport. *In World Journal of Gastroenterology* 12(11): pp. 1657-1670
- Edenharder R.; Keller G.; Platt K. L.; Unger K. K. (2001) Isolation and characterization of structurally novel antimutagenic flavonoids from spinach (*Spinacia oleracea*). *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (6): pp. 2767-2773
- Edwards D. J.; Bellevue F. H.; Woster P. M. (1996) Identification of 6', 7'-dihydroxybergamottin, a cytochrome P450 inhibitor, in grapefruit juice. *In Drug Metabolism and Disposition* 24 (12): pp. 1287-1290
- Ehrenkranz R. R. L.; Lewis N. G.; Kahn C. R.; Roth J. (2005) Phlorizin: a review. *In Diabetes/metabolism Research and Reviews Rev* 21: pp. 31-38
- Estrada G.; Krasinski S.D.; Montgomery R.K.; Grand R.J.; Garcia-Valero J.; López-Tejero M.D. L (1996) Quantitative analysis of lactase-phlorizin hydrolase expression in the absorptive enterocytes of newborn rat small intestine. *In Journal of cellular Physiology* 167: pp. 349-353
- Felix W.; Backhans H. J.; Eichler P.; Hennings G. (1984) Protective effect of ruscus against injury of vascular endothelium and vascular smooth muscle caused by etacrynic acid, *In Inter Angio*, 77, Suppl. 1
- Ferrandiz M. L; Alcaraz M. J. (1991) Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *In Agents Actions* 32: pp. 283-288
- Ferreres F.; Llorach R.; Gil-Izquierdo A. (2004): Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *In Journal of Mass Spectrometry* 39 (3): pp. 312-321
- Furnari M.; Bonfanti D.; Parodi A.; Franzè J.; Savarino E.; Bruzzone L.; Moscatelli A.; Di Mario F.; Dulbecco P.; Savarino V. (2012): A comparison between lactose breath test and quick test on duodenal biopsies for diagnosing Lactase deficiency in patients with self-reported lactose intolerance. *In Journal of Clinical Gastroenterology* In print (04/12)

- 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. *In Nutrition Journal* 130 (11): pp. 2765-2771
- Geibel S. (2006) Zellfreie Elektrophysiologie zur Charakterisierung pharmazeutisch wirksamer Substanzen (Forschungszentrum Jülich GmbH, Highlights der Proteom-Forschung, 22-23)
- Gorboulev V.; Schürmann A.; Vallon V.; Kipp H.; Jaschke A.; Klessen D.; Friedrich A.; Scherneck S. et al. (2012) Na<sup>+</sup>-D-Glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal Glucose absorption and Glucose-dependent incretin secretion. *In Diabetes* 61(1): pp. 187-196
- Graefe E.; 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. *In Journal of Clinical Pharmacology* (41): pp. 492-499
- Guyot S.; Marnet N.; Laraba D.; Sanoner P.; Drilleau J. F. (1998) Reversed-phase HPLC following thiolysis for quantitative estimation and characterization of the four main classes of phenolic compounds in different tissue zones of a French cider apple variety (*Malus domestica* var. Kermerrien). *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: pp. 1698-1705
- Guyot S.; Marnet N.; Sanoner P.; Drilleau J. F. (2003) Variability of the polyphenolic composition of cider apple (*Malus domestica*) fruits and juices. *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (21): pp. 6240-6247
- Harbaum B.; Hubbermann E. M.; Wolff C.; Herges R.; Zhu Z.; Schwarz K. (2007) Identification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in pak choi varieties (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*) by HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> and NMR and their quantification by HPLC-DAD. *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (20): pp. 8251-8260
- Harborne J. B. (1965) Plant Polyphenols-XIV: Characterization of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolyses. *In Phytochemistry* 4: pp. 107-120
- Hauri H.-P.; Sterchi E. E.; Bienz D.; Fransen J. A. M.; Marxer A. (1985) Expression and Intracellular Transport of Microvillus Membrane Hydrolases in Human Intestinal Epithelial Cells. *In Journal of Cell Biology* 101 (3): pp. 838-851
- Hegarty V. M.; May H. M.; Khaw K.-T. (2000) Tea drinking and bone mineral density in older women. *In The American Journal of Clinical Nutrition* 71: pp. 1003-1007
- Hellwig B. (2012) Antidiabetika Update, *In PTA heute* 10: pp. 22-26
- Herrera M. C.; Luque de Castro M. D. (2004) Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *In Analytical and Bioanalytical Chemistry* 379 (7-8): pp. 1106-1112
- Hertog M. G.; Hollmann P. C.; Venema D. P. (1992a) Optimization of quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: pp. 1591-1598

- Hertog M. G.; Hollmann P. C.; Katan M. B. (1992b) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: pp. 2379-2383
- Hertog M. G.; Kromhout D.; Aravanis C.; Blackburn H.; Buzina R.; Fidanza F.; Giampaoli S.; Jansen A.; Menotti A.; Nedeljkovic S. (1995) Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *In Archives of Internal Medicine* 155: pp. 381-286
- Hirayama B. A.; Lostao M. P.; Panayotova-Heiermann M.; Loo D. D.; Turk E.; Wright E. M. (1996) Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters (SGLT-1). *In The American Journal of Physiology* 270 (6 Pt 1): pp. G919-926
- Hirayama B. A.; Díez-Sampedro A.; Wright E. M. (2001) Common mechanisms of inhibition for the Na<sup>+</sup>/Glucose (hSGLT1) and Na<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>GABA (hGAT1) cotransporters. *In British Journal of Pharmacology* 134: pp. 484-495
- Holst J. J. (2007) The physiology of glucagon-like peptide 1. *In Physiological Reviews* 87: pp. 1409-1439
- Hopp W.; Seitz H. U. (1987) The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell suspension culture of *Daucus carota*. *In Planta* 170: 74-85
- Ishii T. (1997) Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *In Plant Science* 127: pp. 111-127
- Johnston K. J.; Clifford M. N.; Morgan L. M. (2002) Possible role for apple juice phenolic compounds in the acute modification of Glucose tolerance and gastrointestinal hormone secretion in humans. *In Journal of the Science of Food and Agriculture* 82: pp. 1800-1805
- Jung J. Y.; Lim Y.; Moon M. S.; Kim J. Y.; Kwon O. (2011) Onion peel extracts ameliorate hyperglycemia and insulin resistance in high fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. *In Nutrition & Metabolism* 8 (1): p. 18
- Justesen U.; Knuthsen P.; Leth T. (1998): Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *In Journal of Chromatography* 799 (1-2): pp. 101-110
- Kahle K.; Kempf M.; Schreier P.; Scheppach W.; Schrenk D.; Kautenburger T.; Hecker D.; Huemmer W.; Ackermann M.; Richling E. (2010) Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. *In European Journal of Nutrition* 50 (7): pp. 507-522
- Kahle K.; Huemmer W.; Kempf M.; Scheppach W.; Erk T.; Richling E. (2007) Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption. *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: pp. 10605-10614
- Kahle K.; Kraus M.; Richling E. (2005a) Polyphenol profiles of apple juices. *In Molecular Nutrition & Food Research* 49: pp. 797-806

- Kahle K.; Kraus M.; Scheppach W.; Richling E. (2005b) Colonic availability of apple polyphenols—a study in ileostomy subjects. *In Molecular Nutrition & Food Research* 49: pp.1143-1150
- Kammerer D.; Carle R.; Schieber A. (2003) Detection of peonidin and pelargonidin glycosides in black carrots (*Daucus carota* ssp. *Sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *In Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17: pp. 2407-2412
- Keller D. M.; Lotspeich W. D. (1959) Effect of Phlorizin on the osmotic behaviour of mitochondria in isotonic sucrose. *In Journal of Biological Chemistry* 224 (3): pp. 552-557
- Kellet G. L.; Helliwell P. A. (2000) The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *In the Biochemical Journal* 350 Pt 1: pp. 155-162
- Kellet G.; Brot-Laroche E. (2005) Apical GLUT2 A major pathway of intestinal sugar absorption. *In Diabetes* 54: pp. 3056-3062
- Ong K. W.; Hsu A.; Song L.; Huang D.; Tan B. K. (2011) Polyphenols-rich *Vernonia amygdalina* shows anti-diabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. *In Journal of Ethnopharmacology* 133: pp. 598-607
- Klimov S. V.; Burakhanova E. A.; Dubinina I. M.; Alieva G. P.; Sal'nikova E. B.; Olenichenko N. A.; Zagoskina N. V.; Trunova T. I. (2008) Suppression of the source activity affects carbon distribution and frost hardiness of vegetating winter wheat plants. *In Russian Journal of Plant Physiology* 55 (3): pp. 308-314
- Kwon O.; Eck P.; Chen S.; Corpe C. P.; Lee J. H.; Kruhlak M.; Levine M. (2007) Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. *In Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 21 (2): pp. 366-377
- Koes R. E.; Quattrocchio F.; Mol N. M. (1994) The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *In Bio Essays* 216: pp. 123-132
- Kottra G.; Daniel H. (2007) Flavonoid glycosides are not transported by the human Na/Glucose Transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic Glucose uptake. *In Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322: pp. 829-835
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T. *In Nature* 227 (5259): pp. 680-685
- Lee J.; Mitchell A. E. (2001) Quercetin and isorhamnetin glycosides in onion (*Allium cepa* L.): varietal comparison, physical distribution, coproduct evaluation, and long-term storage stability. *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: pp. 857-863
- Lin L. Z.; Harnly J. M. (2009) Identification of the Phenolic Components of Collard Greens, Kale, and Chinese Broccoli. *In Journal of agricultural and food chemistry* 57: pp. 7401-7408

- Llorach R.; Gil-Izquierdo A.; Ferreres F.; Tomas-Barberan F. A. (2003) HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acylated flavonoids from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) agroindustrial byproducts. *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (13): pp. 3895-3899
- Lostao M. P.; Hirayama B. A.; Loo D. D.; Wright E. M. (1994) Phenylglucosides and the Na<sup>+</sup>/Glucose cotransporter (SGLT1): Analysis of Interactions. *In Journal of Membrane Biology* 142: pp. 161-170
- Mace O. J.; Schindler M.; Patel S. (2012) The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and CasR in rat small intestine. *In Journal of Physiology* In print
- Manzano S.; Williamson G. (2010) Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. *In Molecular Nutrition & Food Research* 54 (12): pp. 1773-1780
- Maiuri L.; Raia V.; Potter J.; Swallow D.; Ho M. W.; Fiocca R.; Finzi G.; Cornaggia M.; Capella C.; Quaroni A. (1991) Mosaic pattern of Lactase expression by villous enterocytes in human adult-type hypolactasia. *In Gastroenterology* 100: pp. 359-369
- Markham K. R.; Ryan K. G.; Gould K. S.; Rickards G. K. (2000) Cell wall sited favonoids in *lisianthus* fower petals. *In Phytochemistry* 54: pp. 681-687
- Marks S. C.; Mullen W.; Crozier A. (2007) Flavonoid and hydroxycinnamate profiles of english apple cider. *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: pp. 8723-8730
- Marmont G. (1949) Studies on the axon membrane; a new method. *In Journal of Cellular Physiology* 34 (3): pp. 351-382
- Masumoto S.; Akimoto Y.; Oike H.; Kobori M. (2009) Dietary phloridzin reduces blood glucose levels and reverses SGLT1 expression in the small intestine in streptozotocin-induced diabetic mice. *In Journal of agricultural and food chemistry* 57 (11): pp. 4651-4656
- Matern U.; Reichenbach C.; Heller W. (1986) Efficient uptake of flavonoids into parsley (*Petroselinum hortense*) vacuoles require acylated glycosides. *In Planta* 167: pp. 183-189
- Miean K. H.; Mohamed S. (2001) Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (6): pp. 3106-3112
- Mol J.; Grotewold E.; Koes R. (1998) How genes paint flowers and seeds. *In Trends Plant Science* 3: pp. 212-217
- Morita, H.; Deguchi, J.; Motegi, Y.; Sato, S.; Aoyama, C.; Takeo, J. et al. (2009): Cyclic diarylheptanoids as Na(+)-glucose cotransporter (SGLT) inhibitors from *Acer nikoense*. *In Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20 (3): pp. 1070-1074
- Naim H. Y.; Sterchi E. E.; Lentze M. J. (1987) Biosynthesis and maturation of lactose-phlorizin hydrolase in the human small intestinal epithelial cells. *In Biochemical Journal* 241: pp. 427-434

- Naim H. Y. (2001) Molecular and cellular aspects and regulation of intestinal Lactase-phlorizin hydrolase. *In Histology and Histopathology* 16: pp. 553-561
- Németh K.; Plumb G. W.; Berrin J. G.; Juge N.; Jacob R.; Naim H. Y. et al. (2003) Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *In European Journal of Nutrition* 42 (1): pp. 29-42
- Németh K.; Piskula M. K. (2007) Food content, processing, absorption and metabolism of onion flavonoids. *In Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47 (4): pp. 397-409
- Newcomer A. D.; McGill D. B. (1966) Distribution of disaccharidase activity in the small bowel of normal and Lactase-deficient subjects. *In Gastroenterology* 51(4): pp. 481-488
- Nijveldt R. J.; van Nood E.; van Hoorn D. E.; Boelens P. G.; van Norren K.; van Leeuwen P. A. (2001) Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *In American Journal of Clinical Nutrition* 74: pp. 418-425
- Olsen H.; Aaby K.; Borge G. I. (2009) Characterization and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in curly kale (*Brassica oleracea* L. Convar. *acephala* Var. *sabellica*) by HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>. *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (7): pp. 2816-2825
- Olthof M. R., Hollman P. C.; Katan M. B. (2001) Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *In Nutrition Journal* 131: pp. 66-71
- Obrdlik P.; Steensen C.; Watzke N.; Bick I.; Schreiter M.; Ruitenbergh M.; Kelety B. (2008) Cell-free electrophysiology of Glucose transporter *rbSGLT1*. Detection of proteins in reverse and forward transport mode (Poster-Präsentation, Firma IonGate)
- Panayotova-Heiermann M.; Loo D. D. F.; Wright E. M. (1995) Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na<sup>+</sup>/Glucose cotransporter. *In Journal of Biological Chemistry* 270: pp. 27099-27105
- Parker J. C.; VanVolkenburg M. A.; Levy C. B.; Martin W. H.; Burk S. H.; Kwon Y.; Giragossian C.; Gant T. G.; Carpino P. A.; McPherson R. K.; Vestergaard P.; Treadway J. L. (1998) Plasma Glucose levels are reduced in rats and mice treated with an inhibitor of Glucose-6-phosphate translocase. *In Diabetes* 47: pp. 1630-1636
- Plumb G. W.; McLauchlan R.; Kroon P. A.; Day A.; Faulds C. B.; Gee J. M.; Supont S; Williamson G. (2000) Uptake and metabolism of quercetin glycosides in Caco-2 cell culture and everted gut sacs. *In Polyphenols Communications* 200, 20th International Conference on Polyphenols
- Price K. R.; Rhodes M. J. C. (1997) Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis. *In Journal of the Science of Food and Agriculture* 74 (3): pp. 331-339
- Ramaswamy S.; Radhakrishnan A. N. (1975) Lactase-phlorizin hydrolase complex from monkey small intestine: Purification, properties and evidence for two catalytic sites. *In Biochimica et Biophysica Acta* 403 (2): pp. 446-455

- Rochfort S. J.; Imsic M.; Jones R.; Trenerry V. C.; Tomkins B. (2006) Characterization of flavonol conjugates in immature leaves of pak choi [*Brassica rapa* L. Ssp. *chinensis* L. (Hanelt.)] by HPLC-DAD and LC-MS/MS. *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (13): pp. 4855-4860
- Rodríguez P.; González-Mujica F.; Bermúdez J.; Hasegawa M. (2010) Inhibition of glucose intestinal absorption by kaempferol 3-O- $\alpha$ -rhamnoside purified from *Bauhinia megalandra* leaves. *In Fitoterapia* 81 (8): pp. 1220-1223
- Santos-Buelga C.; García-Viguera C.; Tomás-Barberán F. (2003) On-line identification of flavonoids by HPLC coupled to diode array detection. *In Methods in Polyphenol Analysis*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K. pp. 94-127
- Scow J. S.; Iqbal C. W.; Jones T. W.; Qandeel H. G.; Zheng Y.; Duenes J. A.; Nagao M.; Madhavan S.; Sarr M. G. (2010): Absence of evidence of translocation of GLUT2 to the apical membrane of enterocytes in everted intestinal sleeves. *In The Journal of Surgical Research* 167 (1): pp. 56-61
- Skovbjerg H.; Sjöström H.; Norén O. (1981) Purification and characterisation of amphiphilic lactase/phlorizin hydrolase from human small intestine. *In European Journal of Biochemistry* 114 (3): pp. 653-661
- Scheepers A.; Joost H.-G.; Schürmann A. (2004) Glucose Transporter Families SGLT and GLUT: Molecular Basis of Normal and Aberrant Function. *In Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* (28): pp. 364-371
- Schmidt S.; Zietz M.; Schreiner M.; Rohn S.; Kroh L.W.; Krumbein A. (2009) Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *In Food Chemistry* 119: pp. 1293-1299
- Schmidt S.; Zietz M.; Schreiner M.; Rohn S.; Kroh L. W.; Krumbein A. (2010) Identification of complex, naturally occurring flavonoid glycosides in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) by high-performance liquid chromatography diode-array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *In Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24 (14): pp. 2009-2022
- Schnitzler J. P.; Jungblut T. P.; Heller W.; Köfferlein M.; Hutzler P.; Heinzmann U.; Schmelzer E. et al. (1996) Tissue localization of u.v.-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *In New Phytologist* 132: pp. 247-258
- Shirosaki M.; Koyama T.; Yazawa K. (2012) Suppressive effect of peach leaf extract on Glucose absorption from small intestine of mice. *In Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 76 (1): pp. 89-94
- Sikora E.; Cieslik E.; Leszczynska T.; Filipiak-Florkiewicz A.; Pisulewski P. (2008) The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *In Food Chemistry* 107: pp. 55-59

- Sun C.; Xie Y.; Tian Q.; Liu H. (2008) Analysis of glycyrrhizic acid and liquiritin in liquorice root with microwave-assisted micellar extraction and pre-concentration. *In Phytochemical Analysis* 19(2): pp. 160-163
- Swallow D. M. (2003) Genetics of Lactase Persistence and Lactose Intolerance. *In Annual Review of Genetics* 37: pp. 197-219
- Thomas R. L.; Dunstan F.; Luzio S. D.; Roy Chowdury S.; Hale S. L.; North R. V.; Gibbins R. L.; Owens D. R. (2012) Incidence of diabetic retinopathy in people with type 2 diabetes mellitus attending the Diabetic Retinopathy Screening Service for Wales: retrospective analysis. *In British Medical Journal* 344: pp. 1-11
- Tsao R.; Yang R.; Young J. C.; Zhu H. (2003) Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: pp. 6347-6353
- Tunncliffe J. M.; Eller L. K.; Reimer R. A.; Hittel D. S.; Shearer J. (2012) Chlorogenic acid differentially affects postprandial Glucose and Glucose-dependent insulinotropic polypeptide response in rats. *In Applied Physiology, Nutrition and Metabolism* 36 (5): pp. 650-659
- Turk E.; Kerner C. J.; Lostao M. P.; Wright E. M. (1996) Membrane Topology of the Human Na<sup>+</sup>/Glucose Cotransporter SGLT-1. *In Journal of Biological Chemistry* 271 (4): pp. 1925-1934
- Vowinkel E. (1975) Cell wall pigments of peat mosses. *In Chemische Berichte* 108: pp. 1166-1181
- Walgren R. A., Lin J. T.; Kinne R. K.-H; Walle T. (2000) Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin-4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1. *In Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (294): pp. 837-843
- Wang H. K.; Xia Y.; Yang Z. Y.; Natschke S. L.; Lee K. H. (1998) Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. *In Advances in experimental Medicine and Biology* 439: pp. 191-225
- Watzl B.; Rechkemmer G. (2001) Flavonoide, *In Ernährungs-Umschau* 48, 12: pp. 498-502
- Welsch C. A.; Lachance P. A.; Wasserman B. P. (1989) Dietary phenolic compounds: inhibition of Na<sup>+</sup>-dependent glucose uptake in rat intestinal brushborder membrane vesicles. *Nutrition Journal* 119: pp. 1698-1704
- White J. (2010) Apple trees to Sodium Glucose Co-Transporter Inhibitors: A review of SGLT2 Inhibition. *In Clinical Diabetes* 28 (1): pp. 5-10.
- Will F.; Zessner H.; Becker H.; Dietrich H. (2006) Semi-preparative isolation and physico-chemical characterisation of 4-coumaroylquinic acid and phlaretin-2-xyloglucoside from laccase-oxidized apple juice. *In Food Science and Technology* 40 (8): pp. 1344-1351

- 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. *In Nutrition Journal* 132 (4): pp. 630-635.
- Wood I. S.; Trayhurn P. (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *In The British journal of nutrition* 89 (1): pp. 3–9
- Wright E. M.; Van Os C. H.; Mircheff A. K. (1980) Sugar uptake by intestinal basolateral membrane vesicles. *In Biochimica et Biophysica Acta* 597: pp. 112-124
- Wright E. M.; Loo D. D. F.; Hirayama B. A.; Turk E. (2004) Surprising Versatility of Na<sup>+</sup>/Glucose Cotransporters: SLC5. *In Physiology* 19: pp. 370-376
- Wright E. M.; Loo D. D. F.; Hirayama B. A. (2011) Biology of human sodium glucose transporters. *In Physiological Reviews* 91 (2): pp. 733–794
- Zecca I.; Mesonero J. E.; Stutz A.; Poiree J. C.; Giudicelli J.; Cursio R.; Gloor S.M.; Semenza U. G. (1998) Intestinal lactase-phlorizin hydrolase (LPH): the two catalytic sites; the role of the pancreas in pro-LPH maturation. *In In Federation of European Biochemical Societies letters* 435: pp. 225–228
- Zhang J.; Satterfield M. B.; Brodbelt J. S.; Britz S. J.; Clevidence B.; Novotny J. A. (2003) Structural characterization and detection of kale flavonoids by electrospray ionization mass spectrometry. *In Analytical Chemistry* 75 (23): pp. 6401-6407
- Zhao L.; Guillaume Wientjes M.; Au J. L. S. (2004) Evaluation of Combination Chemotherapy: Integration of Nonlinear Regression, Curve Shift, Isobologram, and Combination Index Analyses. *In Clinical Cancer Research* Vol. 10: pp. 7994-8004
- Zietz M.; Weckmüller A.; Schmidt S.; Rohn S.; Schreiner M.; Krumbein A.; Kroh L. W. (2010): Genotypic and climatic influence on the antioxidant activity of flavonoids in Kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *In Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (4): pp. 2123-2130

### **Bücher:**

- Franke Wolfgang, (2007) Nutzpflanzenkunde: Nutzbare Gewächse der gemäßigten Breiten, Subtropen und Tropen Thieme Verlag, 7. Auflage
- Grotewold Erich, (2006) The science of flavonoids, Springer Science + Business Media, LLC
- Bisswanger Hans, (1994) Enzymkinetik Theorie und Methoden, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 2. Auflage, S. 81
- Harborne and Baxter, (1999) Handbook of Natural Flavonoids, Wiley, 2 Volume Set edition
- Heß Dieter, (2008) Pflanzenphysiologie, Verlag Eugen Ulmer Stuttgart, 11. Auflage
- Wagner Hildebert, Vollmar Angelika, Bechthold Andreas, (2007) Pharmazeutische Biologie 2, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 7. Auflage

Schilcher Heinz, Kammerer Susanne, Wegener Tankred, (2010) Leitfaden der Phytotherapie, 4.Auflage

Stafford, (1990) Flavonoid Metabolism, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 202-208

### **Dissertationen:**

Pohl Christine (2005) Flavonoide des Apfels: Transport in Caco-2-Kolonzellen und Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus, Technische Universität, Kaiserslautern

Heigl Dietmar (2003) Untersuchungen zur Stabilität von flavonoid- und gerbstoffhaltigen Drogen, naturwissenschaftliche Fakultät IV – Chemie und Pharmazie –der Universität Regensburg

Krause Robin (2006) Festkörperunterstützte Membranen zur Untersuchung von elektrogenen Transportvorgängen und deren Potential für die Hochdurchsatz-Wirkstoffsuche, Goethe Universität, Frankfurt am Main

Wittig Jörg (2001) Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Flavonoiden - analytische und biochemische Untersuchungen, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

### **Zeitschriften:**

Gesundheitliche Berichterstattung (GBE) kompakt: Diabetes in Deutschland, Robert Koch Institut, 03/2011, 2. Jahrgang

### **Internetseiten:**

<http://www.aerztezeitung.de/medizin/krankheiten/diabetes/article/802353/fda-zulassung-neuem-antidiabetikum.html> (Stand 01/2012)

<http://www.baumschule-horstmann.de>

<http://www.garten-architektur.de/Aktionen/Obstbaumschnitt/obstsortenempfehlung.htm>

[www.zmp.de/](http://www.zmp.de/): Marktbeobachtung für land- und forstwirtschaftliche Erzeugnisse

<http://www.ars.usda.gov/services/docs.htm?docid=6231> Stand März 2012

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> Stand August 2011

<http://www.diabetes-deutschland.de/aktuellesituation.html> Stand 2010

<http://www.phenol-explorer.eu/> Stand: 2.0

<http://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de> Stand Mai 2012

## 8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater **Prof. Dr. Wolfgang Blaschek**, der mir die Möglichkeit gab, als Doktorandin für dieses Kooperationsprojekt zu arbeiten. Ich danke Ihm besonders für sein Vertrauen, seine Hilfestellungen und Denkanstöße. Er hatte immer Zeit für mich und stand mir mit seinem enormen Wissen zur Seite, auch in schwierigen Situationen. Außerdem danke ich ihm für die nette Atmosphäre in dieser Zeit, den spannenden Unternehmungen und Tagungen. Ich freue mich, dass ich die Möglichkeit hatte, mich während der Promotion mit solch einem aktuellen Forschungsthema zu beschäftigen. Ich danke außerdem seiner Frau **Heidi Blaschek** für ihre liebevolle Unterstützung.

Ich danke allen Projektpartnern für die kooperative und nette Zusammenarbeit. Besonders danke ich **Christine Schulze**.

Ganz besonders möchte ich mich bei **Patrycja Kozak** bedanken, die mir als Technische Assistentin fast im gesamten Projektzeitraum zur Seite stand, ohne Sie wäre das Pensum an Arbeit nicht zu schaffen und die vielen Ergebnisse nicht möglich gewesen. Ich danke außerdem ihrer Nachfolgerin **Frauke Geerds**.

Ich möchte mich herzlich bei all meinen lieben Kollegen und Freunden bedanken, die mir immer geholfen haben und für mich da waren, insbesondere **Dr. Esther Marie Göllner**, **Janine Berg** und **Stefanie Duchow**.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei **Prof. Dr. Hassan Y. Naim**, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seinem Institut die LPH-Experimente durchzuführen und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich habe mich in seinem Arbeitskreis immer Willkommen gefühlt und danke besonders: **Dr. Marc Behrendt**, **Susanne Berger-Sohns**, **Gabi Wetzels**, **Heike Kanapin** und **Lena Diekmann** für die Anleitung und Unterstützung im Labor.

Ich danke Herrn **Prof. Dr. Markus Bleich** für die doch eher spontane Übernahme des Korreferats.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Dr. Ullrich Girreser** und **Sven Wichmann** für die Durchführung der MS-Messungen und für Ihre Unterstützung und guten Ratschläge bei der Entwicklung von neuen Methoden und bei der Auswertung der Daten.

Ich danke allen Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders danke ich meinen **Eltern**, dass sie mich immer unterstützen, mir immer Mut machen und an mich glauben. Außerdem danke ich meinem Freund **Henrik**, der mich die gesamte Zeit begleitet hat und meinen besten Freundinnen **Melli, Nine** und **Irene!**

## 9. LEBENS LAUF

### Persönliche Angaben

Name	Bettina Schwanck
Geburtsdatum	31. März 1984
Geburtsort	Schwerin
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Berufliche Tätigkeit

Januar 2009 - Juni 2012	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis von Prof. Dr. Wolfgang Blaschek, Pharmazeutisches Institut der Christian-Albrechts- Universität zu Kiel, Abteilung Pharmazeutische Biologie, Anfertigung der Dissertation
-------------------------	---

### Hochschulausbildung

Oktober 2003 - November 2007	Studium der Pharmazie an der CAU Kiel
August 2005	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 2007	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Januar 2008 - Dezember 2008	Pharmaziepraktikum in der Skarabäus Apotheke in Kiel
Februar 2009	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Februar 2009	Approbation zur Apothekerin

### Schulbildung

Oktober 1999 - Juni 2003	Gymnasium Pampow, Pampow bei Schwerin Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
September 1994 - September 1999	Schliemann Gymnasium, Schwerin
September 1990 - Juni 1994	Ernst Thälmann Grundschule, Schwerin

## 10. Ehrenwörtliche Erklärung zu §9 Absatz 2 der Promotionsordnung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die im Fachbereich Pharmazie eingereichte Arbeit zum Zwecke der Promotion am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Abteilung Pharmazeutische Biologie, unter Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Blaschek allein durchgeführt habe, bei der Abfassung der Arbeit keine sonstigen Hilfsmittel als die in der Arbeit genannten benutzt habe. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Außerdem erkläre ich, dass ich diese Arbeit bisher weder der Math.-Nat. Fakultät der CAU, noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Promotion bzw. zur Veröffentlichung vorgelegt habe.


Kiel,

---

Bettina Schwanck


# 11. Anhang



Ausgewählte massenspektrometrische Daten des Flavonoid-angereicherten Grünkohl-extraktes welcher in Punkt 4.2.1.2 charakterisiert wurde:






— Base Peak Chromatogramm des Flavonoid-angereicherten Grünkohl-extraktes 100-1500 ± All

Peak 8: MS-Spektrum Quercetin-3-O-sinapoyl-sophorotriosid-7-O-glucosid







Peak 16: MS<sup>2</sup> Spektrum Kaempferol-3-O-sinapoyl-sophorosid-7-O-glucosidPeak 14: MS<sup>2</sup> Spektrum Kaempferol-3-O-sinapoyl-sophorosid-7-O-sophorosid