

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

Supplementierung des Flavonols Quercetin bei der Kuh
Bioverfügbarkeit und Beeinflussung der Fermentation

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

vorgelegt von
M.Sc. Laura Marie Berger
aus Eckernförde

Kiel, 2012

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

Dekan: Prof. Dr. Rainer Horn

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Siegfried Wolffram
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Edgar Schallenberger

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Januar 2013

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

Für Torben

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------------|
| Inhaltsverzeichnis | I |
| Tabellenverzeichnis | III |
| Abbildungsverzeichnis | V |
| Abkürzungsverzeichnis | VII |
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Literaturübersicht | 3 |
| 2.1. Vorkommen und Aufnahme von Flavonoiden bei Nutztieren | 3 |
| 2.2. Biologische Effekte von Flavonolen | 7 |
| 2.2.1. Wirkungen und Wirkungsmechanismen | 7 |
| 2.2.2. Einfluss auf Fermentationsprozesse..... | 8 |
| 2.2.3. Einfluss auf den Glucose- und Fettstoffwechsel..... | 12 |
| 2.3. Bioverfügbarkeit von Flavonolen | 14 |
| 2.3.1. Intestinale Absorptionsmechanismen | 14 |
| 2.3.2. Vorkommen im Plasma, Metabolisierung und Ausscheidung..... | 16 |
| 2.3.3. Mikrobieller Abbau..... | 21 |
| 3. Material und Methoden | 27 |
| 3.1. In vivo-Versuche | 27 |
| 3.1.1. Versuchstiere und Ration | 27 |
| 3.1.2. Versuchsdesign | 28 |
| 3.1.3. Futtermittelanalytik..... | 29 |
| 3.1.4. Bestimmung von Flavonolen im Plasma | 30 |
| 3.1.4.1. Extraktion der Flavonole aus dem Plasma | 30 |
| 3.1.4.2. HPLC-Methode | 31 |
| 3.1.4.3. Kalibrierung, Nachweisgrenze und Wiederfindung | 32 |
| 3.1.4.4. Pharmakokinetische Parameter..... | 34 |
| 3.1.5. Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren im Panseninhalt | 35 |
| 3.1.5.1. Probenaufarbeitung..... | 35 |
| 3.1.5.2. Gaschromatographische Analyse | 35 |
| 3.1.5.3. Kalibrierung, Nachweisgrenze und Wiederfindung | 36 |
| 3.1.5.4. Auswertung der Versuche zur Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren im Panseninhalt | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2. <i>In vitro</i>-Versuche | 37 |
| 3.2.1. Hohenheimer Futterwerttest | 37 |
| 3.2.2. Versuche zur Erfassung der Gasbildung | 38 |
| 3.2.3. Versuche zum ruminalen Abbau von Quercetin | 40 |
| 3.2.3.1. Probenaufarbeitung | 41 |
| 3.2.3.2. HPLC-Methode | 42 |
| 3.2.3.3. Kalibrierung, Nachweisgrenze und Wiederfindung..... | 42 |
| 3.3. Statistik..... | 45 |
| 3.3.1. <i>In vivo</i> -Versuche..... | 45 |
| 3.3.1.1. Bioverfügbarkeitsstudien | 45 |
| 3.3.1.2. Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren im Panseninhalt..... | 45 |
| 3.3.2. <i>In vitro</i> -Versuche..... | 46 |
| 4. Ergebnisse | 47 |
| 4.1. Ergebnisse der <i>in vivo</i>-Versuche | 47 |
| 4.1.1. Bioverfügbarkeitsstudien..... | 47 |
| 4.1.2. Einfluss von Quercetin auf die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren und das Fettsäuremuster im Pansen | 54 |
| 4.2. Ergebnisse der <i>in vitro</i>-Versuche | 58 |
| 4.2.1. Einfluss von Quercetin auf die Gasbildung..... | 58 |
| 4.2.2. Ruminaler Abbau von Quercetin..... | 61 |
| 5. Diskussion | 63 |
| 6. Zusammenfassung..... | 77 |
| 7. Summary | 79 |
| 8. Literaturverzeichnis..... | 81 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Flavonolgehalte von Pflanzenextrakten..... | 7 |
| Tabelle 2: Chemische Zusammensetzung der Futtermittel im Versuch..... | 29 |
| Tabelle 3: Zusammensetzung des Inokulums im Hohenheimer Futterwerttest..... | 38 |
| Tabelle 4: Pharmakokinetische Parameter und relative Bioverfügbarkeit nach intraruminaler Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse als Quercetin-Aglycon bzw. Rutin | 52 |
| Tabelle 5: Parameter zur Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der ruminalen Konzentration der Gesamtfettsäuren (GFS) nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Quercetin-Aglycon..... | 55 |
| Tabelle 6: Parameter zur Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der ruminalen Konzentration der Gesamtfettsäuren (GFS) nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Rutin..... | 56 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Strukturformel vom Flavan | 3 |
| Abbildung 2: Strukturformeln der Flavonoidunterklassen..... | 4 |
| Abbildung 3: Strukturformeln von Quercetin, Rutin und Kämpferol sowie der Quercetinmetabolite mit intakter Flavonolstruktur | 5 |
| Abbildung 4: Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von Quercetin, Isorhamnetin, Kämpferol und Tamarixetin | 33 |
| Abbildung 5: Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von Quercetin (a) bzw. beim Abbau von Quercetin gebildeter Metabolite (b)..... | 44 |
| Abbildung 6: Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach intraruminaler Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse als Rutin. Die Plasmaproben wurden mit bzw. ohne β -Glucuronidase/-Sulfatase-Behandlung analysiert | 47 |
| Abbildung 7: Plasmakonzentrations-Zeitkurve der Gesamtflavonole 5-360 min nach intravenöser Applikation von 0,8 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse als Quercetin-Aglycon. Inset: Plasmakonzentrations-Zeitkurven von Quercetin, Isorhamnetin, Tamarixetin und Kämpferol | 48 |
| Abbildung 8: Anteile von Quercetin bzw. Quercetinmetaboliten (Summe aus Isorhamnetin, Tamarixetin und Kämpferol) an der Gesamtflavonolkonzentration im Plasma 5-50 min nach intravenöser Applikation von 0,8 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse als Quercetin-Aglycon..... | 49 |
| Abbildung 9: Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Quercetin-Aglycon. Inset: Darstellung der Daten mit transformierter y-Achse (Log-Skala)..... | 51 |
| Abbildung 10: Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Rutin. Inset: Darstellung der Daten mit transformierter y-Achse (Log-Skala)..... | 53 |
| Abbildung 11: Konzentrations-Zeitverläufe der Gesamtfettsäuren (GFS) im Panseninhalt nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Quercetin-Aglycon | 55 |
| Abbildung 12: Konzentrations-Zeitverläufe der Gesamtfettsäuren (GFS) im Panseninhalt nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Rutin | 56 |
| Abbildung 13: Anteile von Acetat, Propionat und Butyrat an der Konzentration der Gesamtfettsäuren (GFS) 2 h nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Quercetin-Aglycon | 57 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 14: Anteile von Acetat, Propionat und Butyrat an der Konzentration der Gesamtfettsäuren (GFS) 2 h nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Rutin..... | 57 |
| Abbildung 15: Zeitverlauf der kumulativen Gasbildung ohne (Kontrolle) bzw. mit Zusatz von 50 bzw. 100 µmol Quercetinäquivalenten/l als Quercetin-Aglycon (a) bzw. Rutin (b) mit Milchleistungsfutter als Substrat..... | 59 |
| Abbildung 16: Zeitverlauf der kumulativen Gasbildung ohne (Kontrolle) bzw. mit Zusatz von 50 bzw. 100 µmol Quercetinäquivalenten/l als Quercetin-Aglycon (a) bzw. Rutin (b) mit Heu als Substrat | 60 |
| Abbildung 17: Zeitverlauf der Konzentration von Quercetin, Phloroglucinol, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und 4-Methylcatechol im Inokulum (initiale Quercetinkonzentration: 100 µmol/l). Inset: Zeitverlauf der Quercetinkonzentration bei Verwendung von inaktiviertem Pansensaft (initiale Quercetinkonzentration: 100 µmol/l) | 62 |
| Abbildung 18: Möglicher Abbauweg von Quercetin..... | 66 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------------|---|
| ADF | Saure Detergenzienfaser (Acid Detergent Fiber) |
| ADL | Saures Detergenzienlignin (Acid Detergent Lignin) |
| ANOVA | Varianzanalyse (Analysis of Variance) |
| ATP (-ase) | Adenosintriphosphat (-ase) |
| AUC | Area Under the Curve |
| CBG | Cytosolische β -Glucosidase |
| COMT | Catechol-O-Methyltransferase |
| COSITEC | Kolon-Simulationstechnik (Colon-Simulation Technique) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure (Desoxyribonucleic Acid) |
| Faktor _H | Faktor _{Heu} |
| Faktor _{KF} | Faktor _{Krafftutter} |
| FM | Frischmasse |
| GC | Gaschromatograph |
| GFS | Gesamtfettsäuren |
| GIT | Gastrointestinaltrakt |
| HFT | Hohenheimer Futterwerttest |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography) |
| i.r. | intraruminal |
| i.v. | intravenös |
| KKFS | kurzkettige Fettsäure |
| KM | Körpermasse |
| LPH | Lactase-Phlorizin-Hydrolase |
| MAP-Kinase | mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| MLF | Milchleistungsfutter |
| NAD(H) | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (oxidierte bzw. reduzierte Form) |
| NDF | Neutrale Detergenzienfaser (Neutral Detergent Fiber) |
| NEFA | nicht-veresterte Fettsäure (Non-Esterified Fatty Acid) |
| R ² | Bestimmtheitsmaß |
| SEM | Standardfehler (Standard Error of the Mean) |

| | |
|---------------|--|
| SGLT1 | Natrium-abhängiger Glucosetransporter 1 (Sodium-Dependent Glucose Transporter 1) |
| TM | Trockenmasse |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor α |
| UDP | Uridin 5'-Diphosphat |
| USDA | United States Department of Agriculture |
| VDLUFA | Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten |
| XA | Rohasche |
| XF | Rohfaser |
| XL | Rohfett |
| XP | Rohprotein |

1. Einleitung

Flavonoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe mit polyphenolischer Struktur und in variierenden Konzentrationen natürlicher Bestandteil von Lebens- und Futtermitteln. Bei monogastrischen Spezies wurde mittels zahlreicher vor allem *in vitro* durchgeführter Experimente bereits eine Vielzahl positiver gesundheitsfördernder Wirkungen der Flavonoide nachgewiesen, entsprechende Untersuchungen beim Wiederkäuer gibt es jedoch nicht. Da bei Hochleistungskühen insbesondere in der Früh lactation z.T. erhebliche metabolische Störungen wie Fettlebersyndrom, Ketoacidosen und Labmagenverlagerung auftreten, ist der Einsatz von Flavonoiden jedoch auch bei dieser Spezies von grundsätzlichem Interesse.

Unter den Flavonoiden ist das Flavonol Quercetin eines der am weitesten verbreiteten und daher häufig Gegenstand von Untersuchungen. Es weist ausgeprägte antioxidative, antimikrobielle und antiinflammatorische Eigenschaften auf und besitzt des Weiteren einen Einfluss auf die Expression zahlreicher Gene sowie die Aktivität von Schlüsselenzymen des Stoffwechsels, so dass dessen Einsatz aus den bereits genannten Gründen auch beim Wiederkäuer von Bedeutung sein könnte. Voraussetzung für jegliche postabsorptive Wirkung einer Substanz *in vivo* ist allerdings deren Bioverfügbarkeit im Organismus. Somit ist die Kenntnis der Bioverfügbarkeit für die Bestimmung der biologischen Wirksamkeit dieser Substanz unerlässlich. Die Bioverfügbarkeit von Quercetin wurde bei verschiedenen monogastrischen Spezies wie Mensch, Ratte, Schwein und Hund umfangreich untersucht, dürfte sich beim Wiederkäuer aufgrund der anatomischen Besonderheiten im Gastrointestinaltrakt jedoch deutlich von den bisherigen Ergebnissen beim Monogastriden unterscheiden. So wurde anhand zahlreicher *in vitro*-Studien im Dickdarm von monogastrischen Spezies und im Pansen von Wiederkäuern ein umfangreicher Abbau von Quercetin belegt. Aufgrund der Symbiose zwischen Wirtstier und den in den Vormägen angesiedelten Mikroorganismen ist auch ein möglicher antimikrobieller Einfluss von Quercetin auf die ruminale Fermentation von Interesse. Demnach macht der Einsatz von Flavonoiden im Hinblick auf postabsorptive Effekte beim Wiederkäuer nur dann einen Sinn, wenn im Rahmen der Fermentation auftretende negative Effekte ausgeschlossen werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bioverfügbarkeit von Quercetin sowie dessen Einfluss auf die ruminale Fermentation (Konzentration kurzkettiger Fettsäuren und das

Fettsäuremuster) von Kühen nach intraruminaler Applikation aus zwei unterschiedlichen Quellen (als Aglycon und in Form des Glucorhamnosids Rutin) zu bestimmen. In zwei *in vitro*-Versuchen wurde zudem der ruminale Abbau von Quercetin sowie der Einfluss des Aglycons bzw. von Rutin auf die ruminale Gasbildung untersucht.

2. Literaturübersicht

2.1. Vorkommen und Aufnahme von Flavonoiden bei Nutztieren

Flavonoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe mit polyphenolischer Struktur und weit verbreitet in Nahrungs- und Futtermitteln pflanzlichen Ursprungs. Neben den Phenolsäuren, Lignanen und Stilbenen gehören sie zur Gruppe der pflanzlichen Polyphenole und stellen dort mit mehr als 5.000 bisher identifizierten Flavonoiden die größte Gruppe dar [1;2]. Ihre Synthese erfolgt in den Pflanzen aus Phenylalanin und Essigsäure [3]. Flavonoide leiten sich in ihrer Struktur vom Flavan (2-Phenyl-benzo-dihydropyran) ab und kommen in allen höheren Pflanzen vor. Die Grundstruktur umfasst drei Kohlenstoffringe mit zwei aromatischen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring (C) [4] (Abb. 1). Die jeweilige chemische Struktur sowie die relative Ausrichtung variierender Reste am Flavonoidmolekül bestimmen den biologischen Wirkungsgrad der Flavonoide und ihrer Metabolite. So beruht die große Variabilität der Flavonoide auf dem unterschiedlichen Hydroxylierungs- und/oder Methylierungsmuster der drei Ringe sowie vor allem auf Art, Anzahl und Anordnung nicht acylierter und acylierter Zuckerreste [5].

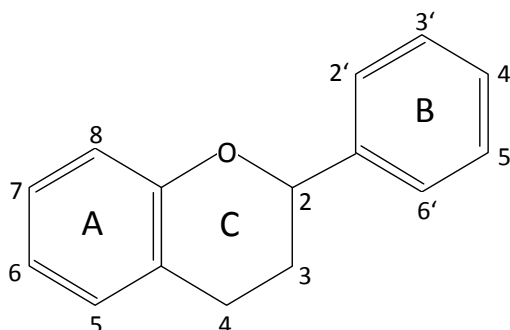


Abbildung 1: Strukturformel vom Flavan

Flavonoide können je nach Sättigungs- und Oxidationsgrad des heterozyklischen Ringes in sechs Unterklassen eingeteilt werden, dazu zählen Flavanole (z.B. Epicatechin, Gallocatechin), Flavanone (z. B. Eriodictyol, Hesperidin, Naringenin), Flavone (z. B. Apigenin, Luteolin), Flavonole (z. B. Quercetin, Myricetin, Kämpferol), Anthocyanidine (z. B. Malvidin, Cyanidin, Pelargonidin) und Isoflavone (z. B. Daidzein, Genistein) [6;7] (Abb. 2).

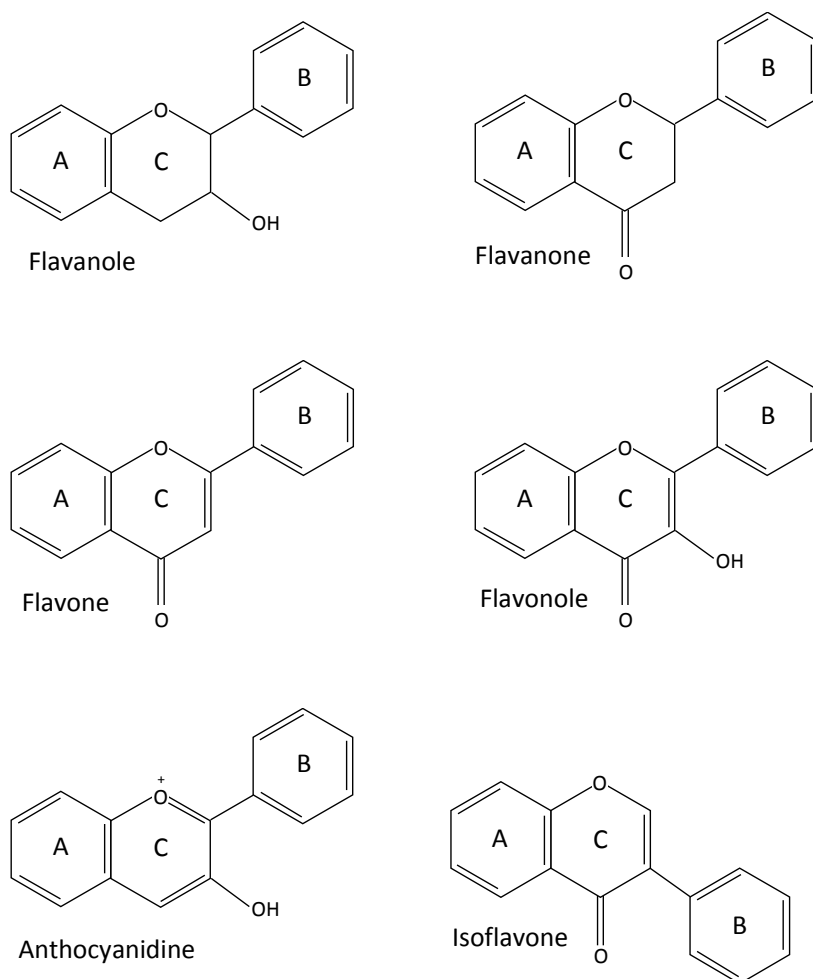


Abbildung 2: Strukturformeln der Flavonoidunterklassen

In der Unterklasse der Flavonole ist Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon) in der Nahrung von Mensch und Tier am weitesten verbreitet und daher häufig Gegenstand von Untersuchungen [3]. In der Pflanze liegt Quercetin jedoch selten in freier Form als Aglycon, sondern meistens an verschiedene Zucker gebunden in Form von Quercetinglucosiden bzw. -glycosiden vor. Durch die Glycosylierung wird die Polarität und somit die Wasserlöslichkeit von Quercetin erhöht [3]. In den meisten Fällen erfolgt die Verknüpfung mit dem Zuckerrest mittels β -O-glycosidischer Bindung [4], wobei die Glycosylierung bevorzugt an der Hydroxylgruppe in Position C-3, weniger häufig in Position C-7 erfolgt [3]. Glucose ist dabei der am häufigsten vorkommende Zucker, allerdings kommen auch Glycosylierungen mit Arabinose, Galactose, Lignin, Rhamnose und Xylose sowie Kombinationen dieser Zucker

(Di- oder Trisaccharide) vor [4]. So entsteht beispielsweise durch Verknüpfung des Quercetins mit einem Disaccharid aus Glucose und Rhamnose (Rutinose) in Position C-3 das Glucorhamnosid Rutin. Die Strukturen von Quercetin und Rutin sowie Kämpferol, einem Flavonol, das sich vom Quercetin durch Fehlen der Hydroxylgruppe am C-3' unterscheidet, sind in Abbildung 3 dargestellt [4]. In den folgenden Kapiteln soll überwiegend auf die im Rahmen dieser Arbeit zu behandelnden Verbindungen, die Flavonole, eingegangen werden.

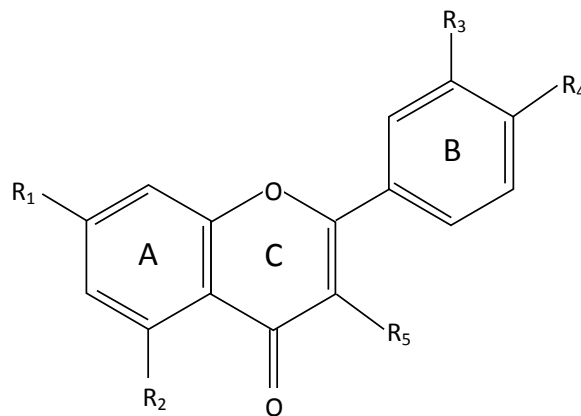


Abbildung 3: Strukturformeln von Quercetin, Rutin und Kämpferol sowie der Quercetinmetabolite mit intakter Flavonolstruktur; Quercetin: R1, R2, R3, R4, R5 = OH; Rutin: R1, R2, R3, R4 = OH, R5 = O-Glucorhamnose; Kämpferol: R1, R2, R4, R5 = OH, R3 = H; Isorhamnetin: R1, R2, R4, R5 = OH, R3 = OCH₃; Tamarixetin: R1, R2, R3, R5 = OH, R4 = OCH₃.

In Pflanzen sind Flavonole in hohen Konzentrationen in den äußeren, dem Licht zugewandten Schichten zu finden [8]. Ihre Aufgaben bestehen im Schutz der Pflanzen vor schädlichen Einflüssen wie UV-Licht und Krankheitserregern, des Weiteren sind sie an der Reparatur von Zellschäden beteiligt [8;9]. In Pflanzen sind Flavonoide tolerant gegenüber Hitze, Sauerstoff, Trockenheit und gemäßigter Säureeinwirkung, können jedoch unter Lichteinfluss modifiziert werden [4], wobei die Glycosylierung der Hydroxylgruppe die Stabilität gegenüber Licht erhöht [10]. Allerdings können auch während der Verarbeitung und Lagerung zum Teil erhebliche Verluste auftreten [11;12].

Neben unterschiedlichen Nahrungsmitteln enthalten auch diverse Futtermittel für Nutztiere Flavonoide [13;14]. Demzufolge werden sie in unterschiedlichen Mengen mit der regulären Ration aufgenommen. Die Gehalte in Futterpflanzen sind allerdings gering. So untersuchten Besle et al. [13] verschiedene Futtermittel aus der Milchviehhaltung auf ihren Polyphenolgehalt. Es zeigte sich, dass Grünfutter den höchsten Polyphenolgehalt (35,3 g/kg

Trockenmasse (TM)) der in der Studie untersuchten Futtermittel aufwies, wohingegen Maissilage (3,2 g/kg TM) den Niedrigsten besaß. In Bezug auf die Quercetingehalte der Futtermittel wurde Weidelgrassilage mit 0,68 g/kg TM angegeben, wohingegen das Flavonol in Grünfutter und Maissilage nicht quantifiziert werden konnte. In der Datenbank des United States Department of Agriculture (USDA) sind die Flavonoidgehalte verschiedener ausgewählter Nahrungs- bzw. Futtermittel aufgelistet [15]. So besitzt Luzerne (gekeimtes, rohes Saatgut), die auch in der Milchviehfütterung eine Rolle spielt, einen Quercetingehalt von 17 mg/kg Frischmasse (FM). Buchweizen, der als Hauptpolyphenolquelle Rutin enthält, käme aufgrund seiner positiven Wirkungen, u.a. fördert es den Transfer von α -Linolensäure aus dem Futter in die Milch [16], ebenfalls als Futtermittel in der Milchviehhaltung in Frage [17;18]. Laut der USDA enthält Buchweizen, bei Betrachtung der gesamten Pflanze, 153,8 mg Quercetin/kg FM [15]. Des Weiteren kann man beim Buchweizen Buchweizenmehl, Buchweizenschrot sowie Buchweizenkleie hinsichtlich ihrer Quercetingehalte unterscheiden (34,7, 70,9 bzw. 149 mg/kg FM) [15].

Mittlerweile werden zahlreiche Pflanzenextrakte (Tab. 1), welche teilweise beträchtliche Konzentrationen an polyphenolischen Verbindungen einschließlich verschiedener Flavonole enthalten, kommerziell vertrieben. Diese sollen ergänzend zur Ration eingesetzt werden mit dem Ziel, die Leistung zu erhöhen sowie den Gesundheitsstatus der Tiere positiv zu beeinflussen. Mit Hinblick auf das seit 1. Januar 2006 in der Europäischen Union geltende Verbot über den Einsatz von Antibiotika als leistungsfördernde Futterzusatzstoffe (Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung), kann der Einsatz flavonolhaltiger Pflanzenextrakte als vielversprechende Alternative angesehen werden [19-21].

Tabelle 1: Flavonolgehalte von Pflanzenextrakten (modifiziert nach Broudiscou et al. [22]).

| | extrahierte Pflanzenteile | Lösungsmittel | Flavonol | Gehalt in der Trockenmasse (%) |
|---------------------------|----------------------------------|----------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Blauer Eukalyptus | Blätter | Wasser | Rutin | 0,52 |
| Ginkgo | Blätter | Ethanol (25 %) | Quercetin | 4,2 |
| Buschklees | Zweige | Wasser | Rutin | 36,5 |
| Ackerschachtelhalm | ganze Pflanze | Wasser | Quercetin-3 -Glucosid | > 0,3 |
| Buchweizen | ganze Pflanze | Wasser | Rutin | 5,5 |
| Goldrute | Blüten | Wasser | Rutin | 16,2 |

2.2. Biologische Effekte von Flavonolen

2.2.1. Wirkungen und Wirkungsmechanismen

Flavonole besitzen diverse gesundheitsfördernde Effekte, die in zahlreichen Studien nachgewiesen wurden [23]. Dazu zählen u.a. antiinflammatorische, antioxidative, antivirale, antimikrobielle und antikanzerogene Wirkungen [23]. Zahlreiche Studien haben auch den Einfluss von Flavonolen auf die Genexpression sowie die Aktivität von Schlüsselenzymen des Stoffwechsels untersucht, wobei Interaktionen mit antioxidativen Effekten nicht ausgeschlossen sind. Den genannten Effekten können dabei diverse Wirkungsmechanismen zugrunde liegen. Antioxidative Effekte können beispielsweise aus der Bildung von Metallchelaten, dem Abfangen freier Radikale, Enzymhemmung, und/oder der Induktion der Expression protektiver Enzyme resultieren, während bei antikanzerogenen Wirkungen Enzyminhibierung, antioxidative Effekte und Einfluss auf Genexpression eine Rolle spielen können [24]. Im Hinblick auf die Beeinflussung von Enzymen hat sich gezeigt, dass Quercetin diverse im Rahmen der Signaltransduktion wirkende Enzyme wie Phospholipase A2, Phospholipase C, Proteinkinase C, Proteintyrosinkinase, mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase) und zyklische Nucleotid-Phosphodiesterase hemmt [23;25-27], und des Weiteren verschiedene Adenosintriphosphatasen (ATPasen), Polymerasen, reverse

Transkriptase, Cytochrom P450-Oxidoreductasen, Desoxyribonucleinsäure-Gyrase (DNA) und Topoisomerase inhibiert [23;28-31]. Enzyme des Fettstoffwechsels wie Lipoxygenasen, Cyclooxygenasen, Acetyl-Co-A-Carboxylase und Diacylglycerol-Acyltransferase werden durch Quercetin ebenfalls nachweisbar gehemmt [23;32-35].

Im Hinblick auf mögliche biologische Wirkungen von Flavonolen beim Wiederkäuer ist kritisch anzumerken, dass die in der Literatur vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich Wirkungen und Wirkungsweisen von Quercetin bzw. Flavonolen überwiegend unter *in vitro*-Bedingungen ermittelt wurden [23] und dass die vorliegenden Studien bis auf wenige, die die antimikrobielle Wirkung von Quercetin betreffen [18;22;36-39], ausschließlich an monogastrischen Spezies durchgeführt wurden. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass viele der Effekte aus *in vitro*-Studien auch *in vivo* Relevanz haben und zumindest teilweise auf den Wiederkäuer übertragbar sind. Im Folgenden soll nun auf zwei Wirkungsbereiche von Quercetin bzw. dessen Glycosiden eingegangen werden, die speziell beim Wiederkäuer von Interesse sein können.

2.2.2. Einfluss auf Fermentationsprozesse

Unter den genannten Effekten (s. 2.2.1.) ist beim Wiederkäuer aufgrund der bereits in den Vormägen stattfindenden mikrobiellen Prozesse und einem daraus resultierenden bedeutenden Einfluss der mikrobiellen Aktivität auf Futterverwertung und damit die Leistung des Tieres die antimikrobielle Wirkung der Flavonole von besonderem Interesse [40]. In diesem Zusammenhang sollten antimikrobielle Effekte durchaus kritisch betrachtet werden, obwohl sie auch positive Wirkungen haben können, wie z.B. Reduktion der Methanproduktion [18;36]. Im Folgenden soll nun auf antimikrobielle Wirkungen und Wirkungsmechanismen eingegangen werden. So untersuchten Rauha et al. [41] die antimikrobielle Wirkung verschiedener Flavonoide, darunter Quercetin, Rutin und Kämpferol, in Bakterienkulturen, die neun verschiedene aus der Bakterienflora des Menschen stammende Bakterienspezies, darunter *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*, enthielten. Es zeigte sich, dass Quercetin das Wachstum aller Bakterienspezies inhibierte, wohingegen Rutin gegenüber allen Bakterienarten wirkungslos blieb. Wie sich zeigte, besaß auch keines der anderen in der Studie eingesetzten Glycoside eine antimikrobielle Wirkung. Arima et al. [42] konnten antimikrobielle Aktivität von Quercetin, nicht jedoch der Glycoside Quercetin-3-Rhamnosid

(Quercitrin) und Rutin gegenüber *Salmonella enteritidis* und *Bacillus cereus* nachweisen. Sie prüften des Weiteren, wie sich die antimikrobielle Aktivität veränderte, wenn die Flavonole in Kombination eingesetzt wurden. Demnach führten die Kombinationen Quercetin und Quercitrin sowie Quercetin und Rutin zu einer Erhöhung der antimikrobiellen Wirkung von Quercetin und bewirkten so eine deutlich höhere Inhibierung des bakteriellen Wachstums von *Salmonella enteritidis* und *Bacillus cereus* als dies mit den Einzelsubstanzen der Fall war. Wenn drei oder vier Flavonole miteinander kombiniert wurden, führte dies ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg der antimikrobiellen Aktivität. Durch die Kombination von zwei oder mehr Flavonolen konnte außerdem die minimale Hemmstoffkonzentration herabgesetzt werden. In einem weiteren Versuch innerhalb dieser Studie konnten Arima et al. [42] anhand des Quercetinisomers Morin sowohl ohne als auch in Kombination mit Rutin eine Hemmung der DNA- und Ribonucleinsäure-Synthese nachweisen, womit, laut der Autoren, zumindest ein Teil der antimikrobiellen Wirkung von Flavonolen begründet werden kann. Ohemeng et al. [29] wiesen eine hemmende Wirkung verschiedener Flavone auf die DNA-Gyrase von *Escherichia coli*-Bakterien nach. Ergänzend dazu zeigten Plaper et al. [30], dass Quercetin an die DNA-Gyrase B-Untereinheit von *Escherichia coli* bindet, was zu einer Hemmung des Enzyms führte. Dabei stellte sich heraus, dass die Bindungsstellen von Quercetin und ATP überlappen, was zu einer Konkurrenz um die Bindungsstelle führte und die Hemmung der Gyrase B durch Quercetin bewirkte [29;30]. Ohemeng et al. [29] vermuten, dass eine Inhibierung der mikrobiellen Aktivität nur teilweise durch die Hemmung der DNA-Gyrase begründet werden kann, da antimikrobielle Aktivität und Enzymhemmung nicht zwangsläufig miteinander korrelieren. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studien von Arima et al. [42] und Rauha et al. [41] zeigten Bernard et al. [28], dass auch Rutin antibakterielle Wirkung gegenüber *Escherichia coli* besitzt. So stimulierte Rutin die Topoisomerase IV-abhängige Spaltung der DNA, welche wiederum zu einer SOS-Antwort und einer Hemmung des Wachstums des *Escherichia coli*-Stammes führte. Gegenüber der DNA-Gyrase zeigte Rutin keine Wirkung [28].

Cushnie et al. [43] fanden heraus, dass das Flavonol Galangin bei *Staphylococcus aureus* eine Aggregation von Bakterienzellen bewirkte und Mirzoeva et al. [44] zeigten in ihrer Studie, dass Quercetin die Membranpermeabilität der bakteriellen Zellmembran erhöhte und zu einem Verlust des elektrischen Membranpotenzials führte. Auch die bakterielle Motilität wurde gehemmt. Der elektrochemische Gradient der Protonen über der Membran ist essentiell

für die Bildung von ATP und den Membrantransport [44]. All diese Effekte von Flavonolen, so vermuten Mirzoeva et al. [44], erhöhen zusätzlich die Anfälligkeit von Bakterien gegenüber anderen antibakteriellen Agentia.

Basierend auf einer möglichen antimikrobiellen Wirkung wurden verschiedene Flavonoide bzw. flavonoidhaltige Pflanzenextrakte bzw. -zusätze hinsichtlich ihres Einflusses auf die mikrobielle Fermentation wie z.B. die Produktion kurzkettiger Fettsäuren sowie die Gasbildung (CO₂- und CH₄-Produktion) untersucht. Cermak et al. [45] konnten bei Fermentationsversuchen mit der semikontinuierlichen Kolon-Simulationstechnik (COSITEC = Colon-Simulation Technique) nach Zugabe von Quercetin, Quercetin-3-Glucosid (Isoquercitrin) bzw. Rutin (50 bzw. 100 µmol/l) allerdings keine Beeinflussung der mikrobiellen Aktivität hinsichtlich der Parameter Produktion kurzkettiger Fettsäuren (KKFS), Redoxpotential und pH-Wert feststellen. Lourenço et al. [39] zeigten anhand eines dualen Durchflussfermenters hingegen, dass Quercetin bei einer Konzentration von 1,5 mmol/l zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtkonzentration kurzkettiger Fettsäuren führte. Ein Einfluss auf die Biohydrogenierung mehrfach ungesättigter Fettsäuren, der ebenfalls untersucht wurde, wurde jedoch nicht beobachtet. Leiber et al. [18] untersuchten den Einfluss von Rutin (0, 5, 50 und 500 µmol Quercetinäquivalente/l) bzw. Buchweizen auf verschiedene Fermentationsparameter im Hohenheimer Futterwerttest (HFT) mit anschließender separater Erfassung der Methankonzentration. Die Inkubation erfolgte mit Weidelgrasheu als Substrat über 24 h. Beim Buchweizen wurde die Wirkung verschiedener Teile der Pflanze (oberirdische Pflanzenteile, Blüten, Blätter, Stängel, Körner) untersucht, deren Effekte im Folgenden jedoch zusammengefasst werden. Es zeigte sich, dass Buchweizen die Gasbildung und Konzentration der Gesamtfettsäuren (GFS = Summe aus Acetat, Propionat, Butyrat, Isobutytrat, Valeriat und Isovaleriat) insgesamt hemmte, wohingegen durch Rutinzusatz (5 und 500 µmol Quercetinäquivalente/l) beide Parameter anstiegen. Auch die Methanproduktion wurde durch Buchweizen signifikant reduziert. Aufgrund der insgesamt gegenläufigen Effekte von Buchweizen und Rutin, vermuten Leiber et al. [18], dass die Effekte beim Buchweizen durch andere polyphenolische Substanzen als Rutin verursacht wurden. Bodas et al. [36] untersuchten den Einfluss von 450 polyphenolhaltigen Pflanzenzusätzen (Pflanzenteile, überwiegend Blattmaterial), darunter auch einige flavonoidhaltige, auf den pH-Wert, die Konzentration der KKFS, das Fettsäuremuster, die Verdaulichkeit der TM sowie die CO₂- und CH₄-Produktion. Hierfür wurden 50 mg Zusatz mit 50 ml einer Kultur aus

Pansenmikroben über 24 h mit Heu und Kraftfutter (90:10) inkubiert. Von den 450 Zusätzen führten 35 zu einer Senkung der Methanproduktion um 15, sechs sogar um 25 %. Dies geschah ohne eine Hemmung der anderen in der Studie untersuchten Fermentationsparameter. Broudiscou et al. [22;37;38] untersuchten in mehreren Studien mittels eines dualen Durchflussfermenters verschiedene flavonoidhaltige Pflanzenextrakte (Flavonolgehalte s. Tab. 1) sowie das Quercetinglucosid Isoquercitrin hinsichtlich ihres Einflusses auf verschiedene Fermentationsparameter im Pansen. In einem der Versuche wurde jedes der Pflanzenextrakte mit einer Einsatzmenge von 3,4 % der TM im Fermenter, dem eine Ration bestehend aus Heu und Gerste im Verhältnis 50:50 zugesetzt war, getestet [22]. *Solidago virgaurea* (Goldrute, 16,2 % Rutin) bewirkte einen Anstieg der Acetat- und Propionatproduktion von 11,3 und 15,8 %. Des Weiteren führte der Zusatz dieses Extraktes zu einer Erhöhung des Abbaus von Hexosen um 6,7 % und einer Steigerung der CO₂- und CH₄-Produktion um 7,8 bzw. 7,7 %. *Ginkgo biloba* (4,2 % Quercetin) erhöhte den Acetatanteil um 5,7 %, während es denjenigen von Butyrat um 7,6 % senkte. *Equisetum arvense* (Ackerschachtelhalm, > 0,3 % Isoquercitrin) verursachte keine Veränderung der Fettsäurekonzentration, führte jedoch zu einem Rückgang der CO₂- und CH₄-Produktion um 10,6 und 14,2 %. In einer weiteren Studie von Broudiscou et al. [38] bewirkte *Equisetum arvense* zudem eine Verringerung des Abbaus der Fraktionen der neutralen bzw. sauren Detergenzienfaser (NDF bzw. ADF) von jeweils 6,2 %, wobei die Basalwerte für die Abbaubarkeiten von NDF bzw. ADF bei 40,2 bzw. 39,4 % lagen. Beim Vergleich des Einflusses von *Equisetum arvense* und Isoquercitrin auf die ruminale Fermentation einer Ration mit unterschiedlichem Heuanteil (50, 75 bzw. 100 % der TM) in einer Batchkultur, stieg die Menge an Acetat und Propionat um 59 und 40 % durch Zusatz von *Equisetum arvense* zu der 100 % Heuration [37]. Der Zusatz von Isoquercitrin führte bei der gleichen Ration ebenfalls zu einem Anstieg von Acetat und Propionat um 29 bzw. 15 % und einer gesteigerten Fermentationsleistung, wohingegen diese Parameter sich mit sinkendem Heuanteil (75 bzw. 50 %) verringerten. Hinsichtlich der Butyratproduktion gab es keine signifikanten Interaktionen zwischen Zusatz und Heuanteil. Allerdings stieg der Butyratanteil erwartungsgemäß mit steigendem Kraftfuttergehalt der Ration. CO₂- und CH₄-Produktion blieben durch die Zusätze nahezu unbeeinflusst [37]. Die Ergebnisse der Studien von Broudiscou et al. [22;37;38] zeigen, dass ein hoher Flavonoidgehalt eines Extraktes nicht unbedingt auch die größten Veränderungen hinsichtlich der untersuchten Parameter bewirkt

und dass neben antimikrobiellen Effekten auch eine Stimulation der mikrobiellen Aktivität möglich ist. Aufgrund nicht genau definierter Polyphenolgehalte der in den Studien von Broudiscou et al. [22;37;38] bzw. Bodas et al. [36] verwendeten Pflanzenextrakte bzw. –zusätze können auftretende Effekte jedoch nicht einer bestimmten Substanz wie z.B. Quercetin zugeordnet werden und sollten daher kritisch betrachtet werden.

2.2.3. Einfluss auf den Glucose- und Fettstoffwechsel

Im Bereich der Milchviehhaltung ist der Einsatz von Flavonoiden und damit einhergehende Wirkungen vor allem in der Phase der frühen Laktation von besonderem Interesse. Kühe mit hoher Milchleistung befinden sich in dieser Phase aufgrund einer unzureichenden Energieaufnahme i. d. R. in einer negativen Energiebilanz und damit stoffwechselphysiologisch in einer Ausnahmesituation [46]. Um das Energiedefizit auszugleichen, erfolgt eine z. T. massive Mobilisierung von Körperfett. Diese Mobilisierung führt zu einer Erhöhung der Plasmakonzentration nicht-veresterter Fettsäuren (NEFA), welche in der Leber entweder in Form von Triacylglyceriden akkumulieren oder im Zuge der β -Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut werden [47]. Das anfallende Acetyl-CoA kann nicht mehr vollständig in den Citratzyklus eingeschleust werden, da das dafür notwendige Oxalacetat zusätzlich für den Aufbau von Glucose zur Lactosebildung in der Milchdrüse benötigt wird [48]. Infolgedessen wird das überschüssige Acetyl-CoA vermehrt zur Bildung von Ketonkörpern (Aceton, Acetoacetat, β -Hydroxybutyrat) herangezogen [49;50]. Aufgrund des übermäßigen Anstiegs der Ketonkörperkonzentration im Blut und eines erhöhten Fettgehaltes in der Leber, kann es zu metabolischen Imbalancen kommen, die zu klinischen Erkrankungen wie Ketoacidosen und Fettleber führen können [47;51]. Im Rahmen des Auftretens dieser Stoffwechselstörungen in der Frühlaktation wurde in den letzten Jahren auch von einer erhöhten Konzentration des proinflammatorischen Cytokins Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), einem Insulinmangel und einer damit einhergehenden Insulinresistenz der Milchkühe in dieser Phase berichtet [46]. Laut Martens und Breves [46] wird durch die Erhöhung der NEFA-Konzentrationen als Folge der Fettmobilisierung die Bildung von TNF- α induziert, was wiederum die Insulinresistenz bei den Tieren verursachen könnte. Die Situation, in der sich die Milchkuh in der frühen Laktation befindet ist somit in gewisser Weise vergleichbar mit derjenigen eines an Diabetes Erkrankten, beim dem

Insulinmangel bzw. Insulinresistenz ebenfalls das Krankheitsbild bestimmen [46;49]. Mehrere Studien haben herausgefunden, dass Quercetin sich auf verschiedene Stoffwechselfparameter (Glucose, Insulin), die im Rahmen von Diabeteserkrankungen eine Rolle spielen, positiv auswirkt [52-54]. So fanden Rivera et al. [53] heraus, dass Quercetin nach chronischer Applikation (2 bzw. 10 mg/kg Körpermasse (KM)) zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität bei adipösen diabetischen Ratten führte. Nach Applikation der hohen Dosis (10 mg/kg KM) wurde zudem ein antiinflammatorischer Effekt in adipösem Gewebe beobachtet [53]. Da das Auftreten entzündungsbedingter Erkrankungen wie Mastitiden insbesondere in der Phase der frühen Laktation auch bei der Milchkuh eine Rolle spielt, wäre ein solch positiver Effekt dort ebenfalls von Bedeutung [47]. In der Studie von Youl et al. [54], die ebenfalls mit diabetischen Ratten durchgeführt wurde, verstärkte die Quercetinapplikation (20 $\mu\text{mol/l}$) sowohl die Glucose- als auch die Glibenclamid-induzierte Insulinsekretion. Bei letztgenannter Verbindung handelt es sich um ein Sulfonylharnstoffderivat [55]. Die Autoren vermuten, dass die Aktivierung einer an der Signaltransduktion beteiligten MAP-Kinase durch Quercetin dabei eine Rolle spielt [54]. Die Erkenntnisse aus den Versuchen zu den Wirkungen von Quercetin bei Diabeteserkrankungen könnten aufgrund der bereits erläuterten Zusammenhänge auch für die bei der Milchkuh in der frühen Laktation stattfindenden Stoffwechselprozesse und die mit dieser Phase einhergehenden Problematik von Bedeutung sein.

Neben den im Zusammenhang mit Diabetes durchgeführten Studien haben sich einige Arbeiten auch mit den Wirkungen von Quercetin bei „physiologischer“ Stoffwechsellage beschäftigt [34;56;57]. So untersuchten Gasparin et al. [56] den Einfluss von Quercetin auf den Glykogenabbau und den damit zusammenhängenden Parametern *ex vivo* an der perfundierten Leber von Ratten. Dabei wurde die Leber über 30 min mit Quercetin infundiert. Es zeigte sich, dass durch Quercetin (50-300 $\mu\text{mol/l}$) die Glykogenolyse gesteigert wurde. In einer weiteren Studie von Gasparin et al. [57] wurde bei der Verwendung der isolierten, perfundierten Leber von Ratten und unter Einsatz verschiedener Glucosekonzentrationen gezeigt, dass bei Infusion der Leber mit Quercetin sowohl die Glykolyse als auch die Gluconeogenese gehemmt wurden. So führte der Quercetinzusatz (50-100 $\mu\text{mol/l}$) in beiden Studien zu einer Reduktion der Lactatproduktion, während die Pyruvatproduktion unbeeinflusst blieb [56;57]. Das daraus resultierende engere Verhältnis von Lactat zu Pyruvat spiegelt, so die Autoren, letztendlich das NAD^+/NADH -Redoxpotential (Nicotinsäureamid-

Adenin-Dinucleotid; oxidierte bzw. reduzierte Form) wider [56;57]. Die Autoren schlossen aus ihren Ergebnissen, dass Quercetin eine Erhöhung des NAD^+ -/ NADH -Verhältnisses bewirkt und damit ein zusätzliches Hindernis bei der Glucosesynthese darstellt. Laut Gasparin et al. [56;57] scheinen alle Mechanismen, die den genannten Effekten unterliegen, auf der Hemmung enzymatischer Enzymsysteme wie z.B. der Glucose-6-Phosphatase und ATPasen wie K^+ -ATPase/ Na^+ -ATPase sowie auf der Verbesserung der mitochondrialen Energieübertragung durch Quercetin zu beruhen.

Inwiefern die hier genannten Effekte von Quercetin *in vivo* und speziell beim Wiederkäuer eine Rolle spielen kann noch nicht gesagt werden. Im Hinblick auf die hier sowie in Kapitel 2.2.1. genannten bzw. dargestellten *in vitro*-Studien ist jedoch anzumerken, dass oral appliziertes Quercetin nur begrenzt systemisch verfügbar ist und zudem umfangreichen Metabolisierungsprozessen im Organismus unterliegt (s. Kapitel 2.3.2.). Die unter *in vitro*-Bedingungen erhobenen Daten liefern somit nur einen Hinweis über das theoretisch mögliche Wirkungspotenzial von Quercetin, welches unter *in vivo*-Bedingungen aus den genannten Gründen nur eingeschränkt zum Tragen kommen kann. Die in diesem und den beiden vorhergehenden Kapiteln dargestellten Studien zeigen demnach, dass Quercetin grundsätzlich ein breites Wirkungsspektrum besitzt. Zumindest die postabsorptiven Effekte kommen jedoch nur dann zum Tragen, wenn Flavonoide in ausreichenden Konzentrationen systemisch verfügbar sind. Aus diesem Grund ist vor der Untersuchung der möglichen Wirkung einer Substanz, die Feststellung ihrer Bioverfügbarkeit von zentraler Bedeutung.

2.3. Bioverfügbarkeit von Flavonolen

2.3.1. Intestinale Absorptionsmechanismen

In mehreren Studien mit monogastrischen Spezies (Schwein, Ratte, Mensch) wurde der Dünndarm als Hauptort der Absorption des Quercetin-Aglycons und von Quercetinmonoglucosiden identifiziert [58-62]. Crespy et al. [63] zeigten zudem, dass nach Applikation von Quercetin-Aglycon in den am Pylorus ligierten Magen bei Ratten nach 30 min 38 % der initialen Menge verschwunden waren und nach 20 min Quercetin in der Galle nachweisbar war. Im Gegensatz dazu änderte sich die Menge an Isoquercitrin bzw.

Rutin im gastralen Lumen nicht signifikant im entsprechenden Zeitraum. Die Autoren folgerten daraus, dass Quercetin als Aglycon, jedoch nicht in Form von Glycosiden, bereits partiell aus dem Magen absorbiert wird [63]. In einer anderen Studie wurde über ähnliche Ergebnisse bei Einsatz der Isoflavone Daidzein und Genistein sowie der entsprechenden Glucoside berichtet [64]. Diese Befunde lassen sich wahrscheinlich damit erklären, dass das Aglycon aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften passiv absorbiert werden kann, während es sich bei den Quercetinglycosiden um hydrophilere Verbindungen handelt, aus denen das Aglycon erst nach enzymatischer Spaltung der glycosidischen Bindung im Dünn- bzw. Dickdarm freigesetzt und absorbiert wird [65]. In der Bürstensaummembran bzw. im Cytosol von Dünndarmenterocyten wurden demnach zwei Glucosidasen identifiziert, die zur Hydrolyse von Quercetinmonoglucosiden und damit Freisetzung des Aglycons in der Lage sind: die Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) sowie eine cytosolische β -Glucosidase (CBG) [66-70]. Die Absorption von Quercetin aus Quercetinmonoglucosiden kann somit über zwei Wege erfolgen: entweder mittels passiver Diffusion nach Deglycosylierung des entsprechenden Glucosids durch die LPH, oder nach aktiver Aufnahme der Quercetinmonoglucoside über den Natrium-abhängigen Glucosetransporter (SGLT1) in die Enterocyten, wo die CBG das Aglycon freisetzt [65;68;71-73]. LPH und CBG bevorzugen die glucosidische Bindung in der 4'-Position (Quercetin-4'-Glucosid, Spiraeosid) gegenüber der 3-Position (Isoquercitrin), wobei letztgenannte Verbindung vor allem Substrat für die LPH zu sein scheint [68;69;74]. Die Deglycosylierung durch die LPH und die anschließende passive Absorption des freigesetzten Aglycons wird dabei als Hauptweg der Absorption von Quercetinmonoglucosiden favorisiert [67;68].

Quercetinmonoglycoside wie Quercetin-3-Galactosid, Quercitrin und Quercetin-3-Arabinosid sowie das Quercetindiglycosid Rutin sind nur begrenzt bzw. kein Substrat der genannten Enzyme [58;66;74-76]. Demnach kann Quercetin aus Rutin erst im terminalen Dünndarm bzw. vor allem im Dickdarm absorbiert werden, nachdem die glycosidische Bindung durch mikrobielle α -Rhamnosidasen und β -Glucosidasen gespalten wurde [77;78]. Mittlerweile gilt es als bewiesen, dass die Art des Zuckerrestes die Unterschiede bezüglich der Absorption und damit letztlich auch Bioverfügbarkeit (s. Kapitel 2.3.2.) von Quercetin aus verschiedenen Glycosiden bedingt [58;75;76;79]. So untersuchten Hollman et al. [62] die Absorption von Quercetin aus verschiedenen Quercetinquellen beim Menschen. Um einen bakteriellen Abbau im Kolon ausschließen zu können, führten sie den Versuch mit Ileostomiepatienten durch. Die

Absorption von Quercetin aus Quercetinglucosiden in Zwiebeln betrug 52 %, während sie für das Quercetin-Aglycon bzw. Quercetin aus Rutin bei 24 bzw. 17 % lag. Diese Ergebnisse stimmen mit denjenigen von Morand et al. [80] bei Ratten überein, bei denen die Absorption nach Applikation von Isoquercitrin (184 %) deutlich höher war als nach Applikation äquivalenter Konzentrationen Rutin (25 %).

Die Unterschiede in der Absorption zwischen Quercetin-Aglycon und den Monoglucosiden, die im Dünndarm absorbiert werden [62;73;81] könnten darin begründet sein, dass nach der Spaltung der Monoglucoside durch die in der Bürstensaummembran lokalisierte LPH, das freigesetzte Aglycon aufgrund der Nähe zur Membran und damit kurzer Diffusionswege zügig absorbiert werden kann [66;81]. Des Weiteren wird eine Stimulation der Diffusion durch die lokal ansteigende Quercetinkonzentration im Bereich der Membran diskutiert [68]. Wenngleich die LPH eine größere Rolle bei der Absorption von Glucosiden spielt (s.o.), könnte auch die Aufnahme der intakten Glucoside durch den SGLT1 zu einer schnelleren und effizienteren Aufnahme gegenüber dem Aglycon führen [62;73;81]. Die deutlich geringere Absorption von Quercetin aus Rutin lässt sich dadurch erklären, dass es nach der Deglycosylierung, die überwiegend im Dickdarm stattfindet, in erheblichem Umfang den dort stattfindenden mikrobiellen Abbauprozessen ausgesetzt ist [82;83].

2.3.2. Vorkommen im Plasma, Metabolisierung und Ausscheidung

Die im Darmlumen bzw. den Enterocyten freigesetzten Aglyca unterliegen bereits den Phase-I- und Phase-II-Reaktionen in der Darmmucosa, wobei nicht umgesetzte Aglyca via Portalblut zu Leber gelangen und dort metabolisiert werden. Mehrere Studien bei Schwein, Mensch, Ratte und Hund belegen, dass im Plasma keine intakten Glycoside sowie keine bzw. kaum freie Aglyca auftauchen [58;61;66;73;80;84-87].

Die für die Phase-I-Reaktionen hauptsächlich verantwortlichen Enzyme sind die Cytochrom P450-Oxidoreductasen. Die von ihnen katalysierten Hydroxylierungen und Demethylierungen werden allerdings beim Vorhandensein von zwei oder mehr Hydroxylierungen am B-Ring verhindert und dürften demnach bei den Flavonolen, die im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen, kaum eine Rolle spielen [9;88]. Allerdings unterliegen auch Flavonole in großem Umfang dem Phase-II-Metabolismus durch Uridin 5'-Diphosphat-Glucuronosyltransferasen (UDP), Sulfotransferasen und Methyltransferasen wie z.B. der Catechol-O-Methyltransferase

(COMT) in Leber, Gastrointestinaltrakt (GIT) sowie weiteren extrahepatischen Geweben [89-94]. So handelt es sich bei den im Plasma zirkulierenden Formen nach Applikation des Flavonols Quercetin neben glucuronidiertem und sulfatiertem Quercetin auch um dessen methylierte Derivate Isorhamnetin (3'-Methylquercetin) und Tamarixetin (4'-Methylquercetin) (s. Abb. 3), die wiederum ebenfalls zum größten Teil konjugiert mit Glucuroniden und Sulfaten im Plasma vorliegen [58;61;85;95;96]. Der Anteil glucuronidierter und sulfatierter Quercetinformen im Plasma monogastrischer Spezies (Schwein, Ratte, Mensch, Hund) liegt im Bereich von 80 bis 100 % [58;61;85;95;96]. Im Plasma von Schwein, Hund und Mensch stellt glucuronidiertes bzw. sulfatiertes Quercetin die Hauptform im Plasma dar (80-90 %), während die entsprechend konjugierten Formen von Isorhamnetin und Tamarixetin nur einen geringen Anteil ausmachen [58;85;97]. Im Gegensatz dazu ist bei der Ratte konjugiertes Isorhamnetin die Hauptform im Plasma [98;99]. In der Studie von Morand et al. [99] machte es 80 % der Quercetinformen im Plasma von Ratten aus, die über mehrere Wochen eine Ration mit Quercetin erhalten hatten. Der Anteil an Quercetin lag bei 20 %, wohingegen Tamarixetin kaum detektiert wurde. An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass die Konjugationreaktionen durch Blockieren von reaktiven Hydroxylgruppen zu einer Abnahme zumindest der antioxidativen Wirkung der Verbindungen führen. So besitzen glucuronidierte und sulfatierte Formen von Quercetin bzw. seiner Metabolite teilweise nur etwa die Hälfte der antioxidativen Wirkung des Aglycons wie in diversen *in vitro*-Experimenten nachgewiesen wurde [100-104].

Wie bereits erwähnt, findet der Phase-II-Metabolismus von Flavonolen bereits im Dünndarmepithel statt. So konnten Gee et al. [73] anhand isolierter Dünndarmpräparate von Ratten zeigen, dass nach Quercetinzusatz weder im mucosalen noch im serosalen Geweben nicht-konjugierte Formen von Quercetin vorlagen. Cermak et al. [58] postulierten aus ihren Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Quercetin beim Schwein ebenfalls auf eine umfangreiche Metabolisierung im Dünndarmepithel, da sie im Portalblut ausschließlich Konjugate von Quercetin und dessen methylierten Metaboliten detektieren konnten. Anhand der Ergebnisse verschiedener Studien konnte zudem gezeigt werden, dass im Darmepithel hauptsächlich Glucuronidierungsreaktionen stattfinden [59;90;91;105], während in der Leber die Sulfatierung überwiegt [90]. Experimente mit Ratten haben des Weiteren gezeigt, dass auch aus der Schleimhaut des Caecums gewonnene Mikrosomen eine UDP-

Glucuronsyltransferaseaktivität besitzen. Die Fähigkeit, Quercetin mit Glucuronsäure zu konjugieren, scheint dort sogar größer zu sein (83 %) als in der Leber (69 %) [99].

Basierend auf den in Kapitel 2.3.1. erwähnten Unterschieden in der Absorption, unterscheiden sich Quercetin-Aglycon, -glucoside und -glycoside auch hinsichtlich ihrer Bioverfügbarkeit [58;61;80;81;85;106]. Demnach ergibt sich bei Schwein, Mensch, Ratte und Hund für die Bioverfügbarkeit von Quercetin aus unterschiedlichen Quellen die Reihenfolge Monoglucosid > Aglycon > Rutin [58;61;80;85;98;106]. Cermak et al. [58] berechneten nach Applikation äquivalenter Konzentrationen von Quercetin-Aglycon, Isoquercitrin bzw. Rutin an wachsende Schweine eine relative Bioverfügbarkeit (Quercetin-Aglycon = 100 %) von Quercetin und seiner postabsorptiv im Organismus gebildeten Derivate mit intakter Flavonolstruktur (Isorhamnetin, Tamarixetin) von 148 bzw. 23 % für Isoquercitrin bzw. Rutin. Die absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin, bei deren Berechnung die Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation von Quercetin-Aglycon in Relation zur Bioverfügbarkeit nach intravenöser (i.v.) Applikation gesetzt wird (s. Kapitel 3.1.4.4.), lag unter Einbeziehung konjugierten und nicht-konjugierten Quercetins bei Hunden, Schweinen und Ratten bei 4, 17 bzw. 59 % [85;95;96]. Diese niedrigen Werte für die Bioverfügbarkeit können durch die Ergebnisse der Studie von Crespy et al. [60] erklärt werden. So konnten die Wissenschaftler anhand der *in situ*-Perfusion des Dünndarms von Ratten zeigen, dass nur 15 % des applizierten Quercetins netto absorbiert wurden, wobei aufgrund der hohen Sekretion des in den Enterocyten metabolisierten Quercetins ins intestinale Lumen (52 %) letztendlich nur 9 % für die peripheren Gewebe zur Verfügung standen [60].

Neben der Quercetinquelle hat auch die Nahrungsmatrix einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Flavonolen. So war bei Graefe et al. [61] nach Applikation von Rutin aus Buchweizen die Bioverfügbarkeit von Quercetin gegenüber direkt appliziertem Rutin deutlich erhöht. Tamura et al. [107] zeigten in Experimenten mit Mäusen, dass die Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Verabreichung einer pektinhaltigen Diät im Vergleich zu einer cellulosehaltigen Diät um 48 % erhöht war. Tamura et al. [107] erklären diesen Effekt mit einer effektiveren Nutzung des wasserlöslichen Pektins gegenüber der wasserunlöslichen Cellulose durch die Bakterien sowie einer Beeinflussung bzw. Steigerung der mikrobiellen Aktivität durch Pektin. Der Zuckeranteil des Rutins diente den Bakterien dabei als zusätzliche Energiequelle und beeinflusste überdies Aktivität und Zusammensetzung der fäkalen Flora [107]. Azuma et al. [108] und Lesser et al. [109] berichten von einer

Steigerung der Quercetinabsorption nach Koadministration mit Emulgatoren bzw. Fetten. In der Studie von Lesser et al. [109] war die Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Applikation von Quercetin-Aglycon bzw. Isoquercitrin über eine Ration mit 3 bzw. 17 % Fett an Schweine bei höherem Fettgehalt deutlich gesteigert.

Mehrere Arbeitsgruppen haben neben dem Blutplasma auch die Gehalte an Quercetin und Quercetinmetaboliten in weiteren Organen/Geweben von Ratten und Schweinen untersucht [110-112]. Außer in Darmgewebe (v. a. Dünndarm), fanden sich nach einmaliger Quercetinapplikation Flavonolkonzentrationen von bis zu 8,6 bzw. 3,96 nmol/g Frischgewebe in Leber und Niere beider Spezies, die teilweise sogar höher waren verglichen mit denjenigen im Plasma [110;111]. Die niedrigsten Gehalte mit maximal 0,57 nmol/g Frischgewebe fanden sich in Lunge, Gehirn, Muskulatur (*longissimus dorsi*), Herz und Milz [110;111]. Bieger et al. [110] und Graf et al. [112], die zudem das Metabolitenprofil in den verschiedenen Organen untersuchten, kamen anhand ihrer Ergebnisse zu dem Schluss, dass es in allen der in ihren Studien untersuchten Geweben abgesehen vom Plasma zu weiteren Reaktionen im Rahmen der Biotransformation, teilweise sogar zu Dekonjugationen kommt. So lag der Gehalt an dekonjugiertem Quercetin in den Geweben zwischen 30 und 100 % der Gesamtflavonole (Summe aus Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin nach enzymatischer Hydrolyse) [110;112]. Eine Korrelation zwischen der Aktivität der β -Glucuronidase/-Sulfatase und dem Anteil dekonjugierten Quercetins und seiner Metabolite in den entsprechenden Geweben gab es nicht. Die Ergebnisse von Bieger et al. [110] sowie einer früheren Studie bei Ratten von Manach et al. [113] zeigen des Weiteren, dass auch nach einer Langzeitapplikation keine Akkumulation von Flavonolen in Leber, Plasma oder anderen extrahepatischen Geweben stattfindet. So betrug beispielsweise die Flavonolkonzentration (konjugiertes und nicht-konjugiertes Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin) im Plasma von Schweinen sowohl nach einmaliger Applikation von Quercetin-Aglycon als auch nach einer vier Wochen andauernden täglichen Quercetinapplikation (25 bzw. 50 mg Quercetinäquivalente/kg KM) 1,63 bzw. 0,81 $\mu\text{mol/l}$ [110].

Im Blut werden Flavonole überwiegend gebunden an Plasmaproteine transportiert [102;114-116]. Boulton et al. [115] ermittelten *in vitro* bei Verwendung von radioaktiv markiertem Quercetin, dass das Quercetin-Aglycon zu 99,4 % an humanes Serumalbumin gebunden wird, während ein wesentlich geringerer Anteil an α_1 -Glycoprotein (39,2 %) und Low Density Lipoproteins (< 0,5 %) gebunden vorlag. Janisch et al. [102] untersuchten das

Bindungsverhalten verschiedener Quercetinkonjugate im Plasma. Sie konnten zeigen, dass die Konjugate vollständig an Serumalbumin gebunden waren, was mit den Ergebnissen von Boulton et al. [115] übereinstimmt.

Die in der Literatur für Flavonole angegebenen Eliminationshalbwertszeiten innerhalb einer Spezies sowie zwischen verschiedenen Spezies schwanken teilweise erheblich. So fassten Manach et al. [14] die Ergebnisse mehrerer Humanstudien zusammen, in denen die Eliminationshalbwertszeiten nach Quercetinapplikation aus unterschiedlichen Quercetinquellen (Aglycon, Glucoside, Glycoside) zwischen 2 und 28 h variieren. An der Heterogenität der publizierten Daten sind dabei u. a. auch die Anwendung unterschiedlich empfindlicher Nachweisverfahren sowie Unterschiede bei der Auswertung der Daten beteiligt [95].

Die Ausscheidung von Quercetin und seiner Metabolite erfolgt über Galle und Urin. Bei der Ausscheidung über die Galle werden die Flavonole im Sinne eines enterohepatischen Kreislaufs teilweise rückresorbiert [59;60]. Crespy et al. [60] fanden in dem bereits beschriebenen Experiment bei der Perfusion von Quercetin im Dünndarm von Ratten heraus, dass von den 15 % netto absorbierten Quercetins 6 % mit der Galle ausgeschieden wurden. Insgesamt wurden 91 % des perfusierten Quercetins entweder auf direktem Wege ohne Absorption oder nach Absorption und der Metabolisierung in Enterocyten und Leber ins intestinale Lumen sezerniert [60]. Arts et al. [75] spezifizierten anhand eines *in situ*-Perfusionsmodells im Dünndarm von Ratten den Gehalt an Quercetin bzw. dessen Metaboliten in der Galle nach Applikation verschiedener Quercetinglycoside. Nach enzymatischer Hydrolyse wurden dort Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin in äquimolaren Konzentrationen detektiert. Da Tamarixetin in der Galle, jedoch kaum im Plasma auftauchte, vermuten die Autoren, dass dieser Metabolit in der Leber gebildet und im Folgenden relativ zügig mit der Galle ausgeschieden wurde [75]. Im Gegensatz zur Galle spielt die renale Ausscheidung von Quercetin und seiner Metabolite eine untergeordnete Rolle. So betrug die Exkretion von konjugiertem Quercetin sowie dessen methylierten Derivaten bei gallen- und duodenalkanülierten Ratten in der Studie von Matsukawa et al. [117] nach Applikation von Isoquercitrin nach 24 h 11,9 %, wohingegen der mit der Galle ausgeschiedene Anteil mit 20,4 % fast doppelt so hoch war. Graefe et al. [61] wiesen in einer Humanstudie nach Aufnahme von Rutin bzw. Spiraeosid die Ausscheidung von Quercetin- und Isorhamnetinglucuroniden im 48-h-Urin nach, deren Anteil, gemessen an der

verabreichten Dosis, bei 0,9 bzw. 4,5 % lag. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit denjenigen von Mullen et al. [118] und Walle et al. [119] (4,7 bzw. 3,3-5,7 %). Walle et al. [119] errechneten nach oraler Applikation von [¹⁴C]Quercetin eine Absorption zwischen 36,4-53 %. Davon wurden 1,6-4,6 % mit den Fäzes ausgeschieden und 41,8-63,9 % in Form von ¹⁴CO₂ in der Atemluft gemessen. Sie zeigten des Weiteren, dass die renale Ausscheidung von Quercetin nach i.v. Applikation deutlich höher war (18,4-26,8 %) als nach oraler Applikation, wohingegen die Anteile in Fäzes und Atemluft mit 1,5-5,0 % bzw. 23-81,8 % in ähnlichen Bereichen lagen [119]. In einer Humanstudie zeigten Moon et al. [120] zudem erstmalig die Ausscheidung unveränderten Quercetins mit dem Urin. Dessen Anteil variierte zwischen 0,05-3,6 % der aufgenommenen Dosis, während der Anteil konjugierter Quercetinmetabolite zwischen 0,08-2,6 % lag. Die Eliminierung von Quercetin aus dem Urin erfolgte in den Studien von Graefe et al. [61] und Ueno et al. [121] innerhalb von 48 h.

Die Ergebnisse der Studien von Crespy et al. [60] und Walle et al. [119] zeigen den immensen Einfluss von Absorption und Resekretionsprozessen auf die Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation und liefern eine Erklärung für die in mehreren Studien veröffentlichte niedrige absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin [85;95;96].

2.3.3. Mikrobieller Abbau

Beim Monogastriden unterliegen Quercetinglycoside, die nicht bzw. nicht vollständig im Dünndarm absorbiert werden, dem mikrobiellen Abbau im Dickdarm, wo sie durch mikrobielle Enzyme zum großen Teil zu einfachen phenolischen Verbindungen wie z. B. mehr- bzw. einfach-hydroxylierten Phenylessigsäuren abgebaut werden [82]. Grundsätzlich ist dazu anzumerken, dass entsprechende Studien überwiegend *in vitro*-Ansätze benutzten und sich vorwiegend mit dem Abbau bei monogastrischen Spezies befassten [45;83;122-126]. Obwohl auch einige Studien zum mikrobiellen Abbau von Quercetin und dessen Glycosiden im Pansen von Wiederkäuern vorliegen [127-129], sind die Kenntnisse bezüglich des Abbaus sowie der beim Abbau entstehenden Metabolite beim Wiederkäuer eher gering. Allerdings kann davon ausgegangen werden, dass die Prozesse hinsichtlich des mikrobiellen Abbaus von Flavonolen sowie die dabei entstehenden Metabolite denjenigen im Dickdarm monogastrischer Spezies ähneln. Beim Wiederkäuer nehmen die mikrobiellen Prozesse gegenüber den Flavonolen jedoch eine zentrale Stellung ein, da auch die bei monogastrischen

Spezies bereits umfangreich im Dünndarm absorbierbaren Aglycone und Monoglucoside vollständig dem Abbau durch die Pansenbakterien ausgesetzt sind.

Der erste Schritt beim mikrobiellen Abbau von Quercetinglycosiden besteht in der Freisetzung des Aglycons durch Spaltung der glycosidischen Bindung. In Übereinstimmung damit wurde in einigen Studien beim Abbau von Quercetinglycosiden Quercetin als vorübergehender Metabolit sowohl bei monogastrischen Spezies als auch Wiederkäuern detektiert [45;77;79;122;125;127;130;131]. Bokkenheuser et al. [77], Kim et al. [78] und MacDonald et al. [130] identifizierten aus menschlichen Fäzes mehrere obligat anaerobe Bakterienstämme, die in der Lage sind, Glycoside zu spalten, und spezifizierten die für die Deglycosylierung verantwortlichen Enzyme. So bilden einige Stämme von *Bacteroides* spp. eine Mischung aus α -Rhamnosidase und β -Galactosidase [77;78], während einige andere Stämme von *Bacteroides* spp. und Stämme von *Streptococcus* spp. eine β -Glucosidase produzieren [77;78;130]. Die genannten Bakterienstämme waren in der Lage, Rutin unter Freisetzung von Quercetin zu deglycosylieren, wohingegen das Rhamnosid Quercitrin nicht abgebaut wurde [77;130]. Aura et al. [122] ermittelten die Aktivität von β -Glucosidase, α -Rhamnosidase und β -Glucuronidase in menschlichen Fäzes anhand des Umsatzes der entsprechenden Quercetinderivate. Hier zeigte sich, dass die α -Rhamnosidase gegenüber den beiden anderen Enzymen eine geringere Aktivität besaß, was zu einer langsameren Freisetzung des Aglycons aus Rutin verglichen mit dem Isoquercitrin bzw. den Quercetinglucuroniden führte. Bei Einsatz äquivalenter Konzentrationen waren Isoquercitrin und die Glucuronidmischung bereits innerhalb 10 bzw. 20 min Inkubationszeit dekonjugiert, während dies für Rutin erst nach 60 min der Fall war [122]. Cermak et al. [45], die den mikrobiellen Abbau von Quercetin-Aglycon, Isoquercitrin und Rutin im Colon des Schweines mittels des COSITEC-Modells untersuchten, sowie Hein et al. [79], die das Schweinecäcum-Modell anwandten, beim dem der Inhalt des Cäcums frisch geschlachteter Schweine inkubiert wird, kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Hein et al. [79] haben im Schweinecäcum-Modell den Abbau verschiedener Flavonolglycoside über 24 h untersucht. Die eingesetzten Glycoside unterschieden sich dabei sowohl in der Anzahl (Mono-, Di-, Triglycoside) als auch im Hydroxylierungsmuster (Glucose, Galactose, Rhamnose) des gebundenen Zuckerrestes. Alle Quercetinglycoside wurden innerhalb von ein bis vier Stunden deglycosyliert. Die Abbaugeschwindigkeit zeigte eine deutliche Abhängigkeit vom Zuckerrest und der Art der glycosidischen Bindung (C- bzw. O-Glycosid). So wurde Isoquercitrin am schnellsten

hydrolysiert (1 h), gefolgt von Quercetin-3-Galactosid (1,5 h) und Quercitrin (4 h). Die Deglycosylierung von Rutin erfolgte innerhalb von 4 h, wobei das freigesetzte Aglycon innerhalb von 8 h zu Phloroglucinol und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure abgebaut wurde [79].

Unter den am Abbau von Quercetinglycosiden beteiligten Bakterien lassen sich zwei Arten unterscheiden. So isolierten neben Bokkenheuser et al. [77], Kim et al. [78] und MacDonald et al. [130] auch Krishnamurty et al. [128] und Schneider et al. [131] Bakterienstämme (*Butyrivibrio fibrisolvens* D1, *Selemonas ruminantium* GA192 aus dem bovinen Pansen sowie *Eubacterium casseliflavus* aus menschlichen Fäzes), die zwar die glycosidische Bindung spalten konnten, jedoch nicht in der Lage waren das dabei freigesetzte Quercetin weiter abzubauen. Aus den Fäzes von Mensch, Schwein und Rind wurden jedoch auch diverse Bakterienstämme isoliert und identifiziert, die dazu in der Lage sind [82]. So wurde Quercetin in der Studie von Braune et al. [132] durch *Eubacterium ramulus* in menschlichen Fäzes in Anwesenheit von Glucose zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure abgebaut, wobei Taxifolin und Alphitonin als lösliche Zwischenprodukte detektiert wurden. Auch *Butyrivibrio* sp. C3 aus dem bovinen Pansen war in der Lage, Rutin unter *in vitro*-Bedingungen zu fermentieren [127;128]. Dabei entstanden Phloroglucinol, CO₂, 3,4-Dihydroxybenzaldehyd und 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure. Das Aglycon allein konnten *Butyrivibrio* sp. C3 und *Eubacterium ramulus* ohne zusätzliche Energie- bzw. Kohlenstoffquelle jedoch nicht abbauen [127;128;131]. Im Gegensatz dazu konnte *Eubacterium oxidoreducens* aus dem bovinen Pansen Quercetin als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen und es mit H₂ oder Formiat als Reduktionsmittel zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, Acetat, Butyrat und CO₂ fermentieren [129]. Nach der Freisetzung des Aglycons aus Rutin isolierten Kim et al. [78;133] in ihren Studien des Weiteren Stämme von *Streptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. und *Pediococcus* spp., die Quercetin ebenfalls zu verschiedenen phenolischen Säuren abbauten. Tsai et al. [134] konnten in ihrer Studie zeigen, dass auch *Coprococcus* sp. Pe₁₅ aus dem bovinen Pansen in der Lage ist Quercetin jedoch nicht Rutin abzubauen, und bei Winter et al. [135;136] wurde Quercetin innerhalb von 24 h durch vier Stämme von *Clostridium orbiscindens* sp. nov. in menschlichen Fäzes zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure abgebaut. Da es sich bei *Clostridium orbiscindens* um asaccharolytische Organismen handelt, wurden die beiden Glycoside Isoquercitrin und Rutin nicht abgebaut [135;136].

3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und Phloroglucinol sind die in den Studien zum mikrobiellen Abbau von Quercetin und dessen Glycosiden am häufigsten genannten Metabolite [79;122-124;132;135-137]. So wurde Phloroglucinol in einigen Studien als Zwischenprodukt des Abbaus von Flavonolen detektiert [124;131;134;137;138], wobei dessen Entstehung *in vivo* nur in zwei Studien im Urin nachgewiesen wurde [139;140]. Der Grund dafür dürfte darin liegen, dass Phloroglucinol vollständig zu Acetat, Butyrat und CO₂ abgebaut wird [131;134;137;138]. Tsai und Jones [141] isolierten insgesamt acht gram-positive Bakterienstämme aus dem Pansen, die in der Lage sind Phloroglucinol abzubauen. Dabei erfolgte der Abbau durch drei obligat anaerobe *Coprococcus*-Stämme zu mehr als 80 %, während es mit fünf fakultativ anaeroben *Streptococcus bovis*-Stämmen nur 50-80 % waren. Patel et al. [142] zeigten, dass der Abbau von Phloroglucinol durch *Coprococcus* sp. Pe₁₅ über die Reduktion zu Dihydrophloroglucinol erfolgte.

Aus 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure entsteht vermutlich durch Dehydroxylierung 3-Hydroxyphenylelessigsäure, die in mehreren Studie als Metabolit identifiziert wurde [122;123;125]. So ging der Rückgang der zweifach-hydroxylierten Phenylelessigsäure in der Studie von Aura et al. [122] mit dem Anstieg der einfach-hydroxylierten einher.

Ein weiterer Metabolit aus dem Quercetinabbau, 3,4-Dihydroxytoluol, wurde von Labib et al. [124] beim Abbau von Quercetin im Schweinecäcum-Modell sowie von Justesen et al. [123] beim Abbau von Rutin bzw. Quercetin in menschlichen Fäzes *in vitro* nachgewiesen. Der Anstieg ging dabei mit dem Absinken von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure einher, was vermuten lässt, dass eine Decarboxylierung von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure zu 3,4-Dihydroxytoluol stattgefunden hat. Neben den bereits genannten Metaboliten wurden in einigen Studien beim Abbau der Glycoside Isoquercitrin und Rutin noch 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure, 3- bzw. 4-Hydroxyphenylpropionsäure sowie 4-Hydroxyphenylelessigsäure detektiert [78;122;123;127;128;131]. Letztgenannte Verbindung entstand in der Studie von Hein et al. [79] neben 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und Phloroglucinol auch aus dem Flavonol Kämpferol.

Die phenolischen Säuren aus dem mikrobiellen Abbau im Dickdarm werden teilweise mit dem Urin ausgeschieden. So wurden nach Applikation von Quercetin-Aglycon bzw. Rutin 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, m-Hydroxyphenylelessigsäure sowie 4-Hydroxy-3-Methoxyphenylelessigsäure (Homovanillinsäure) im Urin von Menschen, Kaninchen und Ratten detektiert [139;143-146]. Baba et al. [143;144] wiesen nach Rutinapplikation bei

Mensch und Ratte neben den genannten Metaboliten 3,4-Dihydroxytoluol sowie eine einfach-hydroxylierte Phenylpropionsäure im Urin nach. Die Phenolsäuren lagen in der Studie von Olthof et al. [147] überwiegend in Form von Glucuroniden und Sulfaten vor und machten dort ca. 50 % der aufgenommenen Rutinmenge aus. Der andere Teil wurde vermutlich mittels Monocarboxylat-Transporter und/oder parazellulärer Diffusion absorbiert [148], weiter metabolisiert und anschließend mit dem Urin ausgeschieden [147]. Kim et al. [133] zeigten, dass die Quercetinkonzentration im Urin von Ratten, die Rutin erhalten hatten, deutlich sank, wenn zusätzlich Antibiotika aufgenommen wurden. Somit kann geschlossen werden, dass das im Urin detektierte Quercetin hauptsächlich im Zuge mikrobieller Prozesse aus Rutin freigesetzt wird. Phenolische Säuren wurden bei Antibiotikazusatz nicht detektiert, was bestätigt, dass ihre Entstehung ausschließlich auf der extensiven Fermentation im Colon beruht [133].

3. Material und Methoden

3.1. *In vivo*-Versuche

3.1.1. Versuchstiere und Ration

Als Versuchstiere dienten fünf pansenfistulierte, nicht-laktierende Kühe der Rasse Deutsches Schwarzbuntes Niederungsrind. Zum Versuchszeitpunkt waren sie ca. 6 Jahre alt und besaßen ein Körpergewicht von 479 ± 15 kg. Die Haltung der Tiere erfolgte in Anbindehaltung ohne Einstreu.

Die Tiere wurden mit einer Ration bestehend aus 3 kg Milchleistungsfutter (MLF) 18/3 (August Plambeck GmbH & Co. KG, Brügge, Deutschland) und 3 kg Heu morgens und abends restriktiv gefüttert. Das MLF enthielt (in %) 23,2 Roggen, 21 Rapsextraktionsschrot, 18,5 Maiskleberfutter, 15 Gerstenfuttermehl, 12 Roggenkleie, 4,5 Trockenschnitzel, 4 Mais und 1,05 Calciumcarbonat sowie pro kg MLF 7 I.E. Vitamin A, 850 I.E. Vitamin D₃ und 7,5 mg Kupfer. Der Energiegehalt des MLF betrug laut Herstellerangaben (s.o.) 6,7 MJ Nettoenergie-Laktation/kg TM. Zusätzlich erhielten die Tiere einmal pro Tag 75 g eines Mineralprämixes bestehend aus (in %) 41,6 Calciumcarbonat, 24,4 Natriumchlorid, 13,9 Calcium-Natriumphosphat, 7,2 Magnesiumoxid, 5 Trockenschnitzel und 2 Monocalciumphosphat. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser. Die Vorfütterungsphase der Tiere mit dieser Ration begann eine Woche vor Versuchsbeginn.

Zwei Tage vor Versuchsbeginn wurde jedem Tier unter möglichst sterilen Bedingungen ein permanenter Verweilkatheter (WVI-Jugularis-Katheter AD 2,4 mm, Länge 20 cm mit Teflonkatheter; C. Walter, Baruth/Mark, Deutschland) in eine *Vena jugularis* implantiert. Anschließend wurde der Katheter mit dem dazu gehörenden Mandrin verschlossen und durch Annähen in der Haut fixiert. Nach jeder Blutentnahme wurden die Katheter mit 10 ml einer sterilen, heparinisierten 0,9 %igen Kochsalzlösung (Heparin: 50 I.E. Heparin/ml; Rathipharm, Ulm, Deutschland; NaCl: steril, endotoxinfrei; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gespült, um das entnommene Blutvolumen zu ersetzen, die Thrombosegefahr zu reduzieren und den Katheter durchgängig zu erhalten. An versuchsfreien Tagen wurden die Katheter zweimal täglich mit je 10 ml heparinisierte Kochsalzlösung gespült.

3.1.2. Versuchsdesign

Drei Tage nach Implantation der Katheter erhielt jedes Tier dem Crossover-Design entsprechend pro Behandlung eine der zwei Quercetinquellen, d.h. Aglycon (Quercetin Dihydrat, ≥ 98 % Reinheit; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) bzw. Rutin (Rutin Trihydrat, $\geq 98,5$ % Reinheit; Carl Roth GmbH & Co KG) in niedriger bzw. hoher Dosierung (10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalente/kg KM) und mit einer Auswaschungsphase von zwei Tagen zwischen den einzelnen Behandlungen via Pansenfistel während der Morgenfütterung verabreicht. Jedes Tier wurde allen Behandlungen unterzogen. Die entsprechenden Mengen wurden in 0,5 Liter physiologischer Kochsalzlösung suspendiert (0,9 %; B. Braun Melsungen AG). Durch die Auswaschungszeit kann eine vollständige bzw. weitgehende Elimination der Testsubstanzen nach Applikation gewährleistet werden. Zusätzlich zur Quercetin- bzw. Rutinapplikation erhielten die Tiere ausschließlich 0,5 Liter physiologische Kochsalzlösung (Kontrolle).

In einem weiteren Versuch erhielten zwei Kühe via i.v. Bolusinjektion 0,8 mg Quercetinäquivalente/kg KM als Quercetin-Aglycon (Quercetin Dihydrat, ≥ 98 % Reinheit; Carl Roth GmbH & Co KG) gelöst in einer Mischung aus 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO: 99,8 %; Carl Roth GmbH & Co KG) und 10 ml physiologischer Kochsalzlösung. Dabei wurde der eisgekühlten DMSO-Lösung unter ständigem Rühren die Kochsalzlösung tropfenweise hinzugegeben. Direkt im Anschluss an die Herstellung wurde die Lösung (20 ml) durch einen sterilen Filter (Sterifix Injektionsfilter LL, 0,2 μm Porengröße; Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) innerhalb von 1–2 min über den Jugularkatheter appliziert. Die Quercetinkonzentration der frisch hergestellten Lösung wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert.

Die Blutentnahme (9 ml) nach intraruminaler (i.r.) Applikation erfolgte zu den verschiedenen Zeitpunkten (Z) mittels Lithium-Heparin Monovetten (Sarstedt AG & Co), wobei die erste Blutentnahme (Z0) unmittelbar vor der Morgenfütterung und vor Applikation der Testsubstanzen lag. Während der ersten 3 h des Versuchs erfolgte die Blutentnahme in halbstündigem Abstand, weitere Blutproben wurden nach 4, 6, 8, 12 und 24 h entnommen. Bei den Versuchen mit i.v. Applikation erfolgten die Blutprobenentnahmen (jeweils 5 ml) ebenfalls unmittelbar vor Applikation (Z0) sowie mit 5- bzw. 10-minütigem Abstand in der

ersten bzw. zweiten Stunde nach Applikation. Weitere Proben wurden nach 3 und 6 h entnommen.

Alle Blutproben wurden direkt nach der Entnahme auf Eis gestellt und zur Gewinnung des Plasmas für 10 min bei 3.000 g und 4 °C in einer Kühlzentrifuge (3K12, Sigma, Deutschland) zentrifugiert, aliquotiert (2 × 1-2 ml) und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

Bei den Versuchen mit i.r. Applikation der Testsubstanzen erfolgte zeitgleich zur Entnahme der Blutproben eine Entnahme von Pansensaftproben (ca. 50 ml) bis 8 h nach Applikation. Dabei wurde der Pansensaft über die Pansenfistel mittels einer Vakuumpumpe entnommen und unmittelbar nach Entnahme eisgekühlt, um die mikrobiellen Aktivitäten weitgehend zu unterbinden. Bis zur weiteren Aufarbeitung und Analyse wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

3.1.3. Futtermittelanalytik

Die Futterproben wurden für die Analytik auf einen Durchmesser von 1 mm gemahlen (Ultra-Zentrifugalmühle ZM1, Retsch GmbH, Haan, Deutschland). Die Trockenmassebestimmung und Rohnährstoffanalyse erfolgte mittels Weender-Futtermittelanalyse gemäß der Methoden des Verbands Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA) [149]. Die Analysen von NDF, ADF und saurem Detergenzienlignin (ADL) wurden nach dem Verfahren von Van Soest et al. [150] durchgeführt. Die ermittelten Gehalte sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Chemische Zusammensetzung der Futtermittel im Versuch. Alle Angaben sind in % der Trockenmasse (TM) und berechnet aus Mittelwerten, n = 2.

| Substrat | TM | XA ¹ | XF ¹ | XL ¹ | XP ¹ | NDF ¹ | NDF ¹ org. | ADF ¹ | ADL ¹ |
|----------------------|-------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|--------------------------|------------------|------------------|
| Milchleistungsfutter | 89,31 | 7,23 | 9,32 | 2,56 | 20,43 | 30,06 | 28,74 | 13,80 | 3,39 |
| Heu | 91,46 | 3,63 | 35,02 | 0,85 | 6,78 | 71,33 | 69,73 | 42,95 | 5,60 |

¹XA = Rohasche, XF = Rohfaser, XL = Rohfett, XP = Rohprotein, NDF = Neutrale Detergenzienfaser, ADF = Saure Detergenzienfaser, ADL = Saures Detergenzienlignin

3.1.4. Bestimmung von Flavonolen im Plasma

3.1.4.1. Extraktion der Flavonole aus dem Plasma

Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden bei 40 °C in einem Wasserbad langsam aufgetaut. Anschließend wurden 980 µl der Probe mit 130 µl Essigsäure (Rotipuran®, 0,583 mol/l; Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) versetzt, um das pH-Optimum (4,5 - 6,2) der eingesetzten Enzymmischung (s.u.) einzustellen. Den angesäuerten Proben wurden 75 µl einer Enzymmischung (β-Glucuronidase und –Sulfatase, Typ H-1, Sigma Aldrich Chemie GmbH, finale Aktivitäten 7.300/130 U/ml Glucuronidase/Sulfatase) zugesetzt, um in den Proben vorliegende Glucuronide bzw. Sulfate der Flavonole zu spalten. Zusätzlich wurden die Plasmaproben von zwei Tieren, denen 50 mg Quercetinäquivalente/kg KM als Rutin i.r. appliziert wurden sowie die Plasmaproben der zwei Tiere nach i.v. Applikation von Quercetin-Aglycon ohne enzymatische Behandlung analysiert (Zusatz von 75 µl aqua bidest anstelle der Enzymmischung), um den Gehalt an nicht konjugierten Flavonolen im Plasma zu erfassen. Aus der Differenz der Werte, die mit bzw. ohne Enzymzusatz ermittelt wurden, ergibt sich der Anteil an im Plasma konjugiert vorliegenden Flavonolen.

Als interner Standard wurden allen angesäuerten Proben 20 µl einer methanolischen Rhamnetinlösung (Rhamnetin: 50 µg/ml; Carl Roth GmbH & Co KG; Methanol: J.T. Baker, Deventer, Niederlande) hinzugefügt und anschließend gründlich gemischt (IKA Vortex, Genius 3; IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland). Danach wurden die Ansätze 60 min bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert und danach nochmals gründlich gemischt. Anschließend erfolgte die Extraktion der Flavonole nach Zusatz von 3 ml Aceton (Rotisolv® HPLC; Carl Roth GmbH & Co KG) durch Ausschütteln (20 min, Horizontalschüttler). Danach wurden die Proben 45 min bei 3.703 g und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge 5810 R; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und der Überstand unter Vakuum bei 45 °C bis zur vollständigen Trockene eingedampft (Speed-Vac SPD2010; Thermo Savant Instruments, Holbrook, NY, USA). Der Rückstand wurde dann in 200 µl Methanol gelöst und anschließend 15 min bei 37 °C zur vollständigen Lösung des Rückstands in ein Ultraschallbad verbracht. Anschließend wurden 77,5 µl aqua bidest und 22,5 µl HCl (10 mol/l; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zugesetzt, gut gemischt und 10 min bei

12.961 g abzentrifugiert (Zentrifuge 5415 C; Eppendorf AG). Für die HPLC-Analyse wurden 200 µl des verbliebenen Überstandes verwendet.

3.1.4.2. HPLC-Methode

Die Bestimmung von Quercetin und seiner Metabolite mit intakter Flavonolstruktur erfolgte nach der Methode von Ader et al. [95]. Hierbei wird die Fähigkeit der Flavonole genutzt, mit dreiwertigen Aluminiumionen fluoreszierende Komplexe zu bilden. Alle im Folgenden genannten Komponenten der HPLC-Anlage sowie die Software wurden von der Firma Jasco (Gross Umstadt, Deutschland) bezogen.

Über einen Autosampler (AS 2057 Plus) wurden 30 µl der Probe auf eine reversed-phase Trennsäule (C-18 Kromasil 100, 250 × 4 mm, 5 µm Partikelgröße), welcher eine Vorsäule (C-18 Inertsil ODS-2, 10 × 4 mm, 5 µm Partikelgröße) vorgeschaltet war, injiziert. Als Fließmittel wurde eine Lösung aus Phosphatpuffer (25 mmol/l Natriumdihydrogenphosphat, pH = 2,4; Merck KGaA), Acetonitril (Chromasolv[®], Sigma Aldrich Chemie GmbH) und Methanol (J.T. Baker) in einem Volumenverhältnis von 68:27:5 (v/v/v) verwendet. Der pH-Wert des Fließmittels betrug 2,9 und die Flussrate 1 ml/min. Die Nachsäulenderivatisierung (Komplexierung mit Al³⁺) der Flavonole erfolgte in einem Kapillarreaktor (Teflonschlauch, Innendurchmesser 0,5 mm, Länge 3 m) mittels einer methanolischen Aluminiumnitratlösung (1 mol/l Aluminiumnitrat in 7,2 %iger Essigsäure; Fluka, Taufkirchen, Deutschland), die mit einer Flussrate von 0,4 ml/min über ein T-Mischstück mit geringem Totraumvolumen nach Passage der Säule zugeführt wurde. Säulen und Reaktor waren in einem 30 °C warmen Säulenofen (Jetstream II Plus) untergebracht. Die Detektion von Quercetin und dessen Metaboliten erfolgte mittels eines Fluoreszenzdetektors (FP 920) bei einer Anregungswellenlänge von 422 nm und einer Emissionswellenlänge von 485 nm. Die Identifikation der Flavonole erfolgte anhand der Retentionszeiten entsprechender Standardsubstanzen (s. Abschnitt 3.1.4.3.). Die Peakflächen wurden mit Hilfe der Borwin Chromatography Software (Version 1.50) ausgewertet.

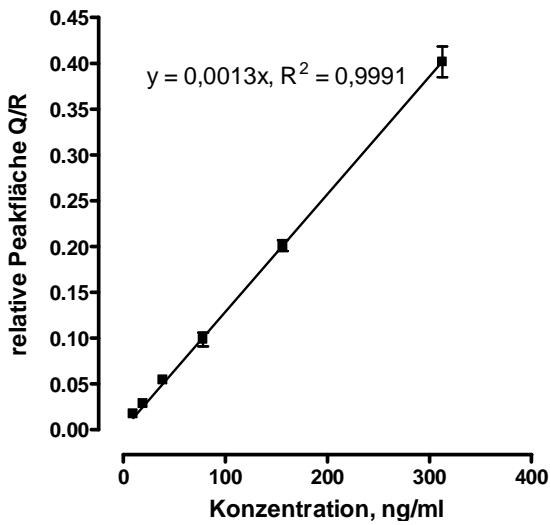
3.1.4.3. Kalibrierung, Nachweisgrenze und Wiederfindung

Zur Erstellung der Eichgeraden (Abb. 4) für Quercetin, Isorhamnetin, Tamarixetin und Kämpferol (Rotichrom[®] HPLC, Carl-Roth GmbH & Co KG) wurden 960 µl einer wässrigen Lösung von bovinem Serumalbumin (7,1 % in 0,5 mol/l NaCl, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) mit 20 µl einer methanolischen Stammlösung (Methanol: J.T. Baker), welche alle vier Substanzen enthielt, versetzt. Die jeweiligen Stammlösungen für die Eichreihen wurden durch schrittweise Verdünnung aus einer methanolischen Stocklösung (2.500 ng/ml) hergestellt. Den final verdünnten Standardlösungen (960 µl Serumalbumin plus 20 µl Stammlösung) wurden jeweils 20 µl einer methanolischen Rhamnetin-Lösung (s. Kapitel 3.1.4.1.) als interner Standard zugesetzt. Die Standardproben wurden analog den Plasmaproben behandelt, um eventuelle Verluste von Flavonolen bei der Probenaufarbeitung zu simulieren.

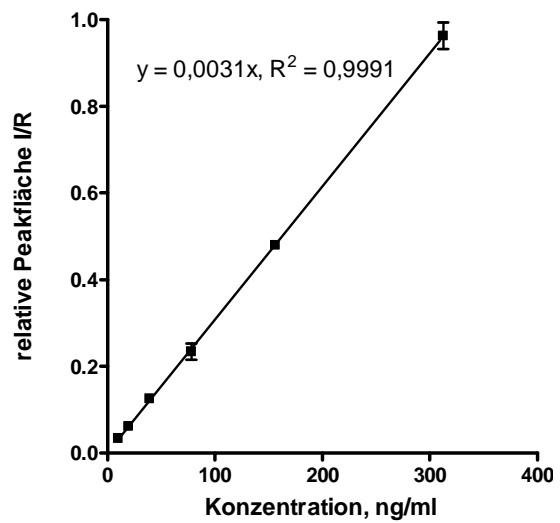
Die Auswertung erfolgte anhand der relativen Peakflächen, wobei für die Berechnung der Quercetin- bzw. Isorhamnetingehalte die relativen Flächen (Fläche Quercetin/Fläche Rhamnetin bzw. Isorhamnetin/Fläche Rhamnetin) genutzt wurde. Die Berechnung der Tamarixetin- bzw. Kämpferolkonzentrationen in den Proben erfolgte dagegen anhand der absoluten Peakflächen der jeweiligen Verbindung, da diese beiden Flavonole im Unterschied zu Quercetin und Isorhamnetin, die eine vergleichbare Stabilität wie Rhamnetin bei der Probenaufarbeitung aufweisen, wesentlich stabiler sind und Rhamnetin daher für die Bestimmung von Tamarixetin und Kämpferol als interner Standard ungeeignet ist. Die erhaltenen Eichgeraden sind in Abbildung 4 dargestellt.

Die Berechnung der Wiederfindung der Flavonole erfolgte anhand des Vergleichs der Standards aus den Eichgeraden, die mit Methanol bzw. mit bovinem Serumalbumin erstellt wurden (jeweils $n = 2$), wobei der jeweilige Wert der methanolischen Standards als 100 % gesetzt wurde. Die Wiederfindung von Quercetin, Isorhamnetin, Tamarixetin und Kämpferol lag bei 92 ± 2 %. Die Nachweisgrenze lag im Bereich von 0,01 µmol/l Plasma.

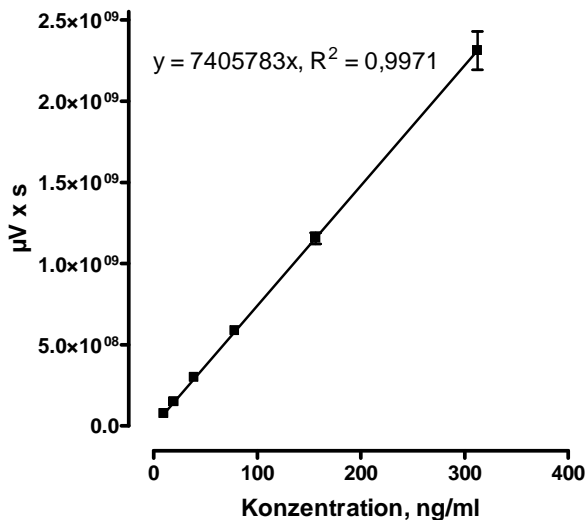
Quercetin



Isorhamnetin



Kämpferol



Tamarixetin

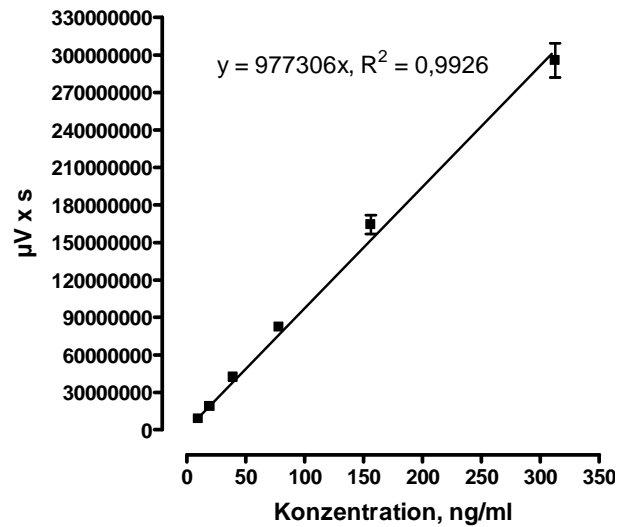


Abbildung 4: Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von Quercetin, Isorhamnetin, Kämpferol und Tamarixetin. Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM), $n = 3$; $R^2 =$ Bestimmtheitsmaß; Q/R = Peakfläche Quercetin/Peakfläche Rhamnetin; I/R = Peakfläche Isorhamnetin/Peakfläche Rhamnetin.

3.1.4.4. Pharmakokinetische Parameter

Als Maß für die systemisch verfügbare Substanzmenge im Organismus wurde die Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve (AUC = Area Under the Curve) jeweils bis zum letzten Messpunkt (0-24 h nach i.r. Applikation bzw. 0-6 h nach i.v. Applikation) bestimmt. Die AUC ist proportional zu der in den Kreislauf gelangten Menge. Sie wurde mit dem Programm GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Version 4.01, San Diego, Kalifornien, USA) berechnet.

Bei den Versuchen mit i.r. Applikation der Testsubstanzen wurde die AUC für die Gesamtflavonole (Summe aus Quercetin, Isorhamnetin, Tamarixetin und Kämpferol in konjugierter und nicht-konjugierter Form) nach Applikation der jeweils höheren Dosierung (50 mg Quercetinäquivalente/kg KM) von Quercetin-Aglycon bzw. Rutin sowie für die Gesamtflavonole nach i.v. Applikation von Quercetin-Aglycon berechnet (AUC_{Total}). Nach i.v. Applikation erfolgte des Weiteren die Berechnung der individuellen AUC für Quercetin, Isorhamnetin, Tamarixetin und Kämpferol. Bei der Berechnung der relativen Bioverfügbarkeit des in Form von Quercetin-Aglycon bzw. Rutin i.r. applizierten Quercetins auf Basis der Plasmagesamtflavonole (s.o.) wurde die nach Applikation des Aglycons ermittelte AUC gleich 100 % gesetzt. Die absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Applikation des Aglycons bzw. von Rutin wurde anhand folgender modifizierter Formel nach Pfeifer et al. [151] berechnet:

$$f = \frac{AUC_{i.r.} \times D_{i.v.}}{AUC_{i.v.} \times D_{i.r.}}$$

wobei f für die absolute Bioverfügbarkeit, D für die jeweils applizierte Dosis, i.r. für intraruminal. und i.v. für intravenös steht.

Zur weiteren Charakterisierung der Konzentrations-Zeit-Kurve wurden außerdem die maximale Plasmakonzentration (c_{max}) für die Gesamtflavonole sowie die Zeit zwischen Applikation der Testsubstanz und Erreichen von c_{max} (t_{max}) aus den individuellen Kurvenverläufen nach i.r. Applikation der höheren Dosierungen (s.o.) bestimmt. Bei der Auswertung aller Daten aus den Bioverfügbarkeitsversuchen wurde der zum Zeitpunkt Null (also vor Applikation) gemessene Basalwert von allen folgenden Werten abgezogen.

3.1.5. Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren im Panseninhalt

3.1.5.1. Probenaufarbeitung

Die Pansensaftproben wurden aufgetaut und im Anschluss daran 20 min bei 12.035 g und 4 °C zentrifugiert (Sorvall RC28S; Sorvall Products L. P., Connecticut, USA). Anschließend wurden 25 ml des Überstandes mit 2,5 ml Ameisensäure (90 %; Merck KGaA) versetzt, erneut zentrifugiert (12.035 g und 4 °C) und aliquotiert (2 × 10 ml). Bis zur weiteren Aufarbeitung und Analytik wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

Die Bestimmung der KKFS (Acetat, Propionat, Butyrat, Isobutyrat, Valeriat, Isovaleriat) erfolgte am Institut für Tierernährung der Universität Hohenheim, Stuttgart. Dazu wurden die Proben mittels Vakuumdestillation analog der Methode von Zijlstra et al. [152] mit den folgenden Modifikationen aufbereitet: Die aufgetauten Proben wurden bei 4.000 g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml des Überstandes in einen Erlenmeyerkolben überführt und 0,1 ml eines internen Standards (80 mmol/l 2-Methylvaleriansäure in 50 %iger Ameisensäure) zugesetzt. Im Anschluss daran wurden die Proben in einem Alkoholbad unter kontinuierlichem Rühren bei -20 °C gefroren.

Für die Vakuumdestillation wurde ein Verteilungsring, welcher acht Dreiwege-Auffanggefäße enthielt, mit einer Vakuumpumpe (RZ 16, Vacuubrand, Wertheim, Deutschland) verbunden. Jedes dieser Gefäße war an einen Erlenmeyerkolben angeschlossen, der die gefrorene Probe sowie einen Auffangröhrchen enthielt. Die Auffangröhrchen befanden sich in einem Dewargefäß, welches flüssigen Stickstoff enthielt. Die Proben wurden bis zur vollständigen Trocknung unter Vakuum eingedampft und im Anschluss daran wurde das gefrorene Destillat bei Raumtemperatur aufgetaut.

3.1.5.2. Gaschromatographische Analyse

Die Proben wurden in Doppelbestimmung mittels Gaschromatograph (GC) (Hewlett-Packard 6890; Agilent, Waldbronn, Deutschland), der mit einem Flammenionisationsdetektor, einem Autosampler und einer HP-FFAP Quarzkapillarsäule (25 m × 0,32 mm, Schichtdicke 0,5 µm, HP 7683; Agilent) ausgestattet war, analysiert. Die Temperatur des Säulenofens lag zu Beginn für eine Minute bei 80 °C, dann wurde sie mit 20 °C/min auf 205 °C erhöht und für zwei Minuten bei dieser Temperatur gehalten. Die Temperaturen des Detektors und des

Injektors lagen bei 260 °C. Der Säulendruck des Trägergases Helium (Reinheit $\geq 99,999$) lag bei 227 kPa, die Flussrate betrug 62,5 ml/min. Der Detektor wurde im Splitmodus bei einem Splitverhältnis von 40:1 und einem Splitfluss von 60 ml/min betrieben. Das Injektionsvolumen betrug 0,1 μ l. Die Gaszufuhr des Detektors lag bei 40 ml/min Wasserstoff (Reinheit $\geq 99,999$), 450 ml/min Luft (frei von Kohlenwasserstoffen), und 45 ml/min Stickstoff (Reinheit $\geq 99,999$).

3.1.5.3. Kalibrierung, Nachweisgrenze und Wiederfindung

Für die Erstellung von Eichgeraden wurden Fettsäurestandards verwendet (GC-grade, Fluka), wobei sich im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 180 mmol/l lineare Verläufe für alle untersuchten Fettsäuren ergaben (Bestimmtheitsmaß = $R^2 > 0,998$). Die Nachweisgrenzen lagen zwischen 2 und 8 μ mol/l bei einem Signal-Rausch-Verhältnis von 3. Bei einem Spikinglevel von 40 mmol/l für Acetat und Propionat und 2 mmol/l für alle anderen Standards lag die Wiederfindung bei 98 und 101 %. Die relativen Standardabweichungen lagen zwischen 1,8 und 3,6 % (n = 8).

3.1.5.4. Auswertung der Versuche zur Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren im Panseninhalt

In der Auswertung wurde die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve für die GFS (Summe aus Acetat, Propionat, Butyrat, Isobutytrat, Valeriat und Isovaleriat) jeweils bis zum letzten Messpunkt, d.h. von 0-8 h nach i.r. Applikation, bestimmt (AUC_{Total}). Des Weiteren wurde die maximale Konzentration der GFS (c_{max}), die Zeit zwischen Applikation der Testsubstanz und Erreichen von c_{max} (t_{max}) sowie die Anteile der Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat an den GFS zum Zeitpunkt 2 h aus den individuellen Kurvenverläufen nach i.r. Applikation bestimmt, letzteres repräsentativ für den gesamten Zeitverlauf. Alle Parameter wurden mit dem Programm GraphPad Prism 4 (s.o.) bestimmt.

3.2. *In vitro*-Versuche

3.2.1. Hohenheimer Futterwerttest

Zur Beurteilung möglicher Einflüsse von Quercetin auf ruminale Fermentationsprozesse (Versuch 1, Kapitel 3.2.2.) sowie zur Erfassung des ruminalen Abbaus von Quercetin (Versuch 2, Kapitel 3.2.3.) wurde der HFT herangezogen. Der HFT ist ein *in vitro*-Verfahren, bei dem über die kumulative Gasbildung der mikrobielle Abbau einer Substratprobe erfasst wird [153].

Als Spendertiere für den Pansensaft dienten zwei (Versuch 1) bzw. vier (Versuch 2) pansenfistulierte Kühe (s. Kapitel 3.1.1.). Der Pansensaft wurde wie bereits in Kapitel 3.1.2. beschrieben entnommen (ca. 1 Liter, je nach benötigter Menge, s. Tab. 3) und im Anschluss an die Entnahme durch ein Baumwolltuch (Häberle Labortechnik GmbH & Co. KG, Lonsee-Ettlenschieß, Deutschland) gefiltert, um grobe Futterreste zu entfernen. Bis zur Inkubation wurde der Pansensaft unter anaeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 39 °C in einer vorgewärmten Thermoskanne aufbewahrt. Die Pansensaftentnahme erfolgte gemäß den Vorgaben von Menke und Steingass [153] vor der Morgenfütterung. Für Versuch 1 wurde den Inkubationsansätzen (s. Tab. 3) gemischter Pansensaft von zwei Spendertieren zugesetzt, bei Versuch 2 stammte der Pansensaft von einzelnen Spendertieren. Die Zusammensetzung des im HFT verwendeten Inokulums entsprach der Vorschrift von Menke und Steingass [153] und ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Inokulums¹ im Hohenheimer Futterwerttest

| Chemikalien | Konzentration Stammlösung (mmol/l) | Volumen (ml/l Inokulum) |
|---|---|------------------------------------|
| H ₂ O | - | 316 |
| CaCl ₂ × 2 H ₂ O ² | 898 | |
| MnCl ₂ × 4 H ₂ O ² | 505 | 0,08 |
| CoCl ₂ × 6 H ₂ O ² | 42 | |
| FeCl ₃ × 6 H ₂ O ² | 296 | |
| NaHCO ₃ ³ | 417 | 158 |
| (NH ₄)HCO ₃ ³ | 50,6 | |
| Na ₂ HPO ₄ ⁴ | 40,2 | |
| KH ₂ PO ₃ ⁴ | 45,6 | 158 |
| MgSO ₄ × 7 H ₂ O ⁴ | 2,4 | |
| Resazurinlösung | 0,4 | 0,81 |
| Pansensaft | - | 334 |
| H ₂ O ⁵ | - | 31,7 |
| NaOH ⁵ | 1.000 | 1,3 |
| Natriumsulfid ⁵ | 73,8 | - |

¹Das für die Herstellung der Lösungen benötigte Kobaltchlorid kam von der Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland). Alle anderen für die Herstellung der Lösungen benötigten Chemikalien wurden von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Alle Lösungen wurden mit destilliertem Wasser angesetzt.

²Mineralstofflösung, ³Pufferlösung, ⁴Mengenelementlösung, ⁵Reduktionslösung

3.2.2. Versuche zur Erfassung der Gasbildung

Als Substrat für die Inkubation dienten MLF 18/3 bzw. Heu. Dabei wurden die bereits in den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.3. dargestellten Futtermittel verwendet, die auf einen Durchmesser von 1 mm gemahlen wurden. Je Substrat wurden drei Dosierungen von Quercetin (0, 50 und 100 µmol Quercetinäquivalente/l) als Quercetin Dihydrat (≥ 98 % Reinheit; Carl Roth GmbH & Co KG) bzw. Rutin Trihydrat (≥ 98,5 % Reinheit; Carl Roth GmbH & Co KG) mit insgesamt sechs (Versuche mit Heu) bzw. acht (Versuche mit MLF) Wiederholungen in drei bzw. vier Durchgängen getestet. Die Inkubation erfolgte pro Kolben mit 30 ml des Inokulums und 200

mg Futter, dem die jeweilige Testsubstanz beigemischt wurde. Zusätzlich zu den Futterproben wurden je sechs (Versuche mit Heu) bzw. acht (Versuche mit MLF) Ansätze ohne Substratzusatz mit den entsprechenden Konzentrationen der Testsubstanzen und Inokulum (Blindwerte) mitgeführt, um eine mögliche Gasbildung aus der Fermentation der Testsubstanzen zu erfassen. Des Weiteren wurde zur Validierung des Versuchsansatzes die Gasbildung aus jeweils 200 mg eines Heustandards sowie eines Kraftfutterstandards (Institut für Tierernährung, Universität Hohenheim, Stuttgart) mit jeweils zwei Ansätzen pro Versuchsdurchgang mit bekannter Gasbildung gemessen. Mithilfe dieser Standards ist ein Vergleich der Gasbildung zwischen verschiedenen Durchgängen möglich. Dabei werden der Faktor_{Heu} (F_H) und Faktor_{Kraftfutter} (F_{KF}) anhand folgender Formeln berechnet:

$$\text{Faktor}_{\text{Heu}} = \frac{\text{Sollwert}^1}{\text{gemessene Gasbildung des Heu-Standards}}$$

$$\text{Faktor}_{\text{Kraftfutter}} = \frac{\text{Sollwert}^2}{\text{gemessene Gasbildung des KF-Standards}}$$

¹ 49,61 ml/200 mg TM; ² 65,18 ml/200 mg TM (jeweilige Gasbildungswerte nach 24 h)

Lag einer der beiden Faktoren mehr als 10 % vom Normwert (= 1) entfernt, wurden entsprechende Versuchsdurchgänge nicht in die Auswertung mit einbezogen. Für die Korrektur der Gasbildungswerte der Proben wurde der Mittelwert der beiden Faktoren verwendet (s. Formel unten). Die Futtermittel wurden jeweils am Vortag jedes Durchgangs eingewogen und über Nacht im Kühlschrank verwahrt. Die Kolben wurden am Versuchstag im Trockenschrank bei 39 °C für die Befüllung vorgewärmt. Die Ablesung der gebildeten Gasmenge erfolgte nach 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36 und 48 h.

Die Berechnung der zu einem bestimmten Zeitpunkt gebildeten Gasmenge erfolgte nach folgender Formel:

$$Gb_{(t)} = \frac{(V_{(t)} - V_0 - Gb_0) \times \frac{F_H + F_{KF}}{2}}{W}$$

| | |
|-----------------------|---|
| $Gb_{(t)}$ (ml/mg TM) | = Gasbildung zum Zeitpunkt t |
| $V_{(t)}$ (ml) | = Gesamtvolumen (Inokulum + Gas) zum Zeitpunkt t |
| V_0 (ml) | = Volumen des Inokulums zu Beginn der Inkubation |
| Gb_0 (ml) | = durchschnittliche Gasbildung der Blindwerte zum Zeitpunkt t |
| F_H | = Faktor _{Heu} (s.o.) |
| F_{KF} | = Faktor _{Krafftutter} (s.o.) |
| W (mg) | = Einwaage Substrat (TM) |

3.2.3. Versuche zum ruminalem Abbau von Quercetin

Die Herstellung des Inokulums sowie die Handhabung der Kolben entsprachen dem unter 3.2.1. und 3.2.2. beschriebenen Vorgehen. Als Substrat diente eine Mischung aus MLF 18/3 und Heu (s.o.) im Verhältnis 50:50. Die Inkubation erfolgte mit Quercetin Dihydrat (≥ 98 % Reinheit; Carl Roth GmbH & Co KG) in zwei Dosierungen (0 und 100 μ mol Quercetinäquivalente/l), wobei insgesamt acht Wiederholungen in acht Durchgängen getestet wurden. Zusätzlich wurden auch hier Ansätze ohne Substratzusatz mit den entsprechenden Konzentrationen der Testsubstanzen durchgeführt (Blindwerte), um eine mögliche Gasbildung aus der Fermentation der Testsubstanzen zu erfassen. Die Entnahme der Kolben erfolgte nach 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 6, 8, 12 und 24 h. Nach Entnahme der Kolben wurde dessen Inhalt in ein Probenröhrchen überführt, welches zum Unterbinden der mikrobiellen Aktivität des Inokulums auf Eis gestellt und anschließend bei -80 °C eingefroren wurde. Zur Validierung des Versuchsansatzes wurden auch bei diesen Versuchen pro Durchgang jeweils zwei Kolben mit je 200 mg FM eines Heustandards bzw. eines Krafftutterstandards mitgeführt, bei denen die Gasbildung erfasst wurde (Erläuterungen dazu s. Kapitel 3.2.2.).

Zur Erfassung der Stabilität von Quercetin bzw. dessen nicht durch mikrobiellen Abbau bedingten Zerfalls unter den gegebenen Inkubationsbedingungen wurden vier weitere Durchgänge angesetzt. Dabei wurde je Durchgang ein Kolben pro Zeitpunkt ohne Substratzusatz mit 100 µmol/l der Testsubstanz mitgeführt. Das Inokulum enthielt in diesem Fall aufgekochten (und dadurch inaktivierten) Pansensaft, um jeglichen Abbau durch mikrobielle Aktivität ausschließen zu können. Alle Proben wurden bis zur Analyse bei -70 °C gelagert.

3.2.3.1. Probenaufarbeitung

In den HFT-Proben aus dem in Kapitel 3.2.3. beschriebenen Versuch wurde neben der Quercetinkonzentration auch diejenige von drei beim mikrobiellen Abbau potenziell entstehenden Metaboliten (Phloroglucinol, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und 4-Methylcatechol) mittels HPLC bestimmt. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass in den Studien von Cermak et al. [45], Justesen et al. [123] und Labib et al. [124] anstelle von 4-Methylcatechol das Synonym 3,4-Dihydroxytoluol angegeben wird. Es handelt sich somit um die gleiche Verbindung.

Die Aufarbeitung der HFT-Proben entsprach derjenigen der Flavonolanalytik im Plasma (Kapitel 3.1.4.1.) mit einigen Modifikationen. Für die Analyse wurden zu 950 µl (Quercetinanalytik) bzw. 1 ml (Metabolitenanalytik) der Probe 140 µl Essigsäure (Rotipuran[®], 100 %, p.a.; Sigma Aldrich Chemie GmbH) hinzugefügt. Für die Quercetinanalyse wurden den Proben zusätzlich 50 µl eines internen Standards (Kämpferol: 1 mol/l; Rotichrom[®] HPLC; Carl-Roth GmbH & Co KG) zugesetzt. Die Extraktion erfolgte durch Zusatz von 2 ml Aceton (Rotisolv[®] HPLC; Carl Roth GmbH & Co KG) und anschließendem Ausschütteln (20 min auf Horizontalschüttler). Im Anschluss daran wurden die Proben für 15 min bei 11.109 g und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge 5810 R; Eppendorf AG) und der Überstand unter Vakuum bei 45 °C bis zur vollständigen Trockene verdampft (Speed-Vac SPD2010, Thermo Savant Instruments). Der nach dem Verdampfen verbliebene Rest wurde in 1 ml des jeweiligen Fließmittels gelöst, gut durchmischt und anschließend 15 min bei 37 °C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Nach erneutem Mischen wurden die Proben 10 min bei 12.405 g mittels einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (MiniSpin[®]; Eppendorf AG). Für die HPLC-Analyse wurden 200 µl des Überstandes verwendet.

3.2.3.2. HPLC-Methode

Das Fließmittel für die Quercetinbestimmung in den HFT-Proben entsprach dem in der Plasmaanalytik Verwendeten (siehe Kapitel 3.1.4.2.). Die Flussrate betrug 1 ml/min. Als Fließmittel für die Bestimmung von Quercetinabbauprodukten wurde eine Mischung aus Acetonitril (Chromasolv[®] HPLC, $\geq 99,9$ %; Sigma Aldrich Chemie GmbH), aqua bidest und Trifluoressigsäure (Carl Roth GmbH & Co KG) im Verhältnis 81:19:0.1 (v/v/v), einem pH-Wert von 2,5 und einer Flussrate von 0,8 ml/min verwendet.

Die verwendeten Komponenten der HPLC-Anlage abgesehen vom Detektor (s.u.) sowie die dazugehörige Software entsprachen denjenigen in Kapitel 3.1.4.2. genannten. Auch Injektionsvolumen und Temperatur des Säulenofens entsprachen den in der Plasmaanalytik bereits genannten Bedingungen. Während die Vorsäule der in Kapitel 3.1.4.2. genannten entsprach, erfolgte die Injektion über eine reversed-phase Trennsäule (C-18 Kromasil 100, 25 \times 4,6 mm, Partikelgröße 5 μ m; Jasco). Die Detektion von Quercetin bzw. dessen Abbauprodukten erfolgte mittels eines elektrochemischen 4-Kanaldetektors (Coul Array 5600A; ESA Biosciences, Inc., Chelmsford, Massachusetts, USA). Die verwendeten Spannungen auf den 4 Kanälen lagen zwischen 420 und 580 mV. Für die Auswertung der chromatographischen Daten wurde jeweils das stärkste Signal ausgewählt. Demnach erfolgte die Auswertung der Peaks von Quercetin, 4-Methylcatechol und der 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure bei 420 mV, diejenige von Phloroglucinol bei 580 mV.

Die Identifizierung von Quercetin bzw. dessen Metaboliten erfolgte anhand der Retentionszeiten im Vergleich mit entsprechenden Standardsubstanzen (s. Kapitel 3.2.3.3.). Die Peakflächen wurden mit Hilfe der Coul Array Software (Coul Array[®] Data Station 3.00, Version 3.10; ESA Biosciences, Inc.) ausgewertet.

3.2.3.3. Kalibrierung, Nachweisgrenze und Wiederfindung

Für die Erstellung der Eichgeraden für Quercetin (Abb. 5a) bzw. die drei potenziellen Abbauprodukte (Abb. 5b) wurden analog zur Aufarbeitung der Proben zwei separate Ansätze verwendet. Dazu wurden 750 μ l (Quercetinanalytik) bzw. 800 μ l (Metabolitenanalytik) des im HFT verwendeten Inokulums (s. Tab. 3; der darin enthaltene Pansensaft war zur Inaktivierung mikrobieller Aktivitäten abgekocht worden) mit 200 μ l einer methanolischen Stammlösung (Methanol: J.T. Baker), welche Quercetin (Rotichrom[®] HPLC; Carl-Roth

GmbH & Co KG; Methanol: J.T. Baker) bzw. die drei Metabolite (Phloroglucinol, ≥ 99 % Reinheit; 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, 98 % Reinheit; 4-Methylcatechol, ≥ 95 % Reinheit; Sigma Aldrich Chemie GmbH) enthielt, versetzt. Die jeweiligen Stammlösungen für die Eichreihen wurden durch schrittweise Verdünnung aus der jeweiligen methanolischen Stocklösung (500 $\mu\text{mol/l}$) hergestellt. Den final verdünnten Standardlösungen (750 μl Inokulum plus 200 μl Stammlösung) für die Quercetinanalytik wurden analog zur Behandlung der Proben 50 μl methanolische Kämpferollösung (s.o.) als interner Standard zugesetzt. Die Standardproben wurden analog den Proben behandelt, um eventuelle Verluste der zu untersuchenden Verbindungen bei der Probenaufarbeitung zu simulieren.

Die Wiederfindung betrug für Quercetin, Phloroglucinol, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und 4-Methylcatechol 90 ± 4 %. Die Nachweisgrenzen für Quercetin, Phloroglucinol, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und 4-Methylcatechol lagen im Bereich von 1 $\mu\text{mol/l}$.

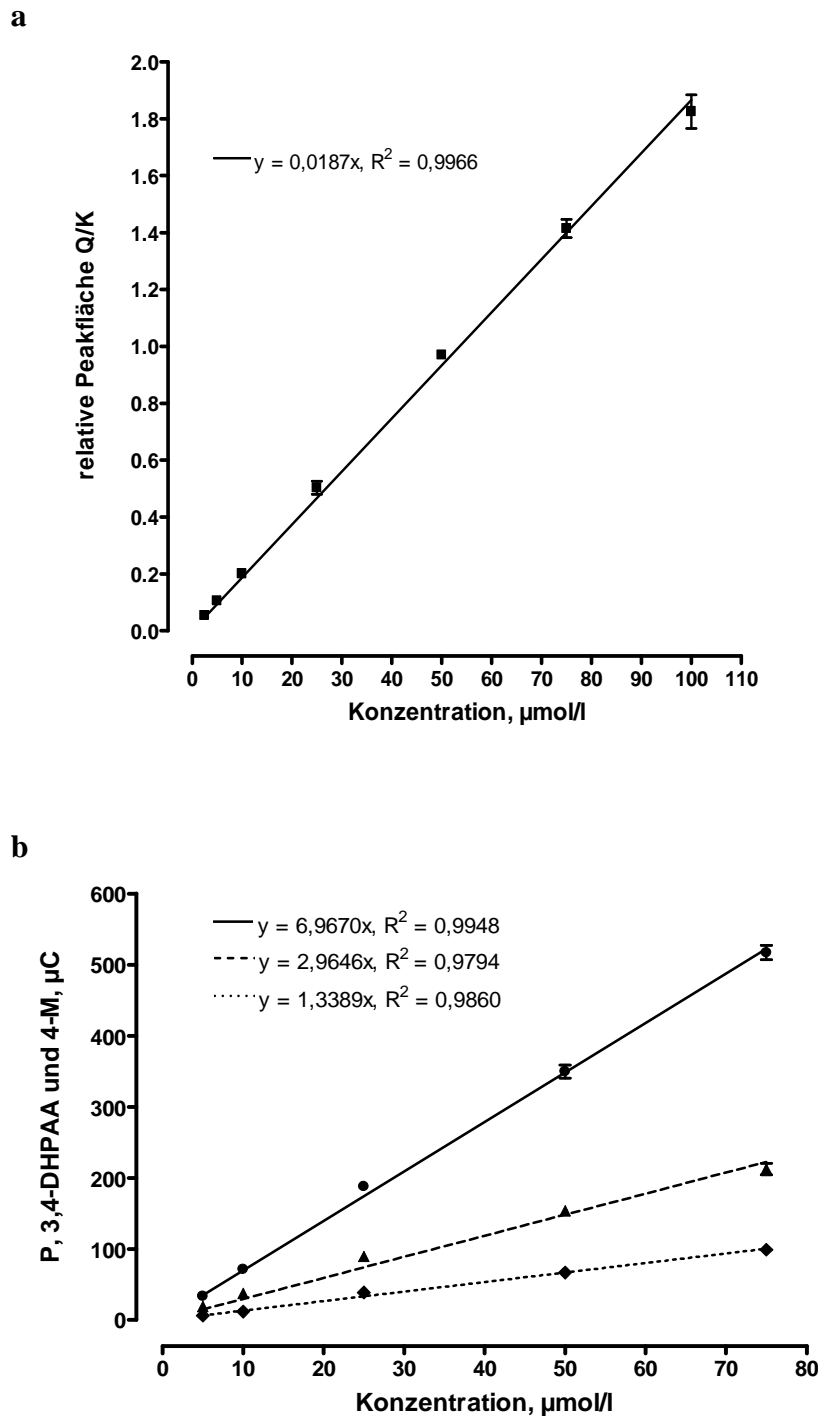


Abbildung 5: Eichgeraden zur quantitativen Bestimmung von Quercetin (a) bzw. beim Abbau von Quercetin gebildeter Metabolite (b); P = Phloroglucinol (gepunktete Linie), 3,4-DHPAA = 3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (gestrichelte Linie) und 4-M = 4-Methylcatechol (durchgezogene Linie), Mittelwerte \pm SEM, n = 5; Q/K = Peakfläche Quercetin/Peakfläche Kämpferol.

3.3. Statistik

3.3.1. *In vivo*-Versuche

3.3.1.1. Bioverfügbarkeitsstudien

Die Ergebnisse aus den Bioverfügbarkeitsstudien sind in Form von Mittelwerten mit den dazugehörigen Standardfehlern (SEM) dargestellt. Die Regressionsgeraden für die Bestimmung der Eichgeraden wurden mit Hilfe von Excel (Microsoft Office, Version 2007) erstellt.

Die statistische Auswertung der pharmakokinetischen Parameter AUC_{Total} , c_{max} und t_{max} nach i.r. Quercetin- bzw. Rutinapplikation (50 mg Quercetinäquivalente/kg KM) erfolgte mittels eines gepaarten t-Tests. Dabei wurde eine Signifikanzgrenze von $P < 0,05$ festgelegt. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse aus den Bioverfügbarkeitsstudien erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism4 (s.o.). An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass sich die im Ergebnisteil in den Tabellen für c_{max} und t_{max} angegebenen Werte von den graphischen Darstellungen der Konzentrations-Zeitverläufe unterscheiden können. Grund dafür ist, dass in den Tabellen die Mittelwerte der individuellen, maximalen Plasmakonzentrationen (c_{max}) dargestellt sind, bei den Konzentrationszeitverläufen dagegen Mittelwertskurven. Dies gilt sinngemäß auch für die t_{max} -Werte.

3.3.1.2. Bestimmung kurzkettiger Fettsäuren im Panseninhalt

Die Ergebnisse sind in Form von Mittelwerten mit den dazugehörigen Standardfehlern dargestellt. Die graphische Darstellung und die statistische Auswertung der Ergebnisse aus der Analyse der kurzkettigen Fettsäuren erfolgten mittels des Programms GraphPad Prism 4. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA = Analysis of Variance), der ein post-hoc Test nach Bonferroni angeschlossen wurde ($P \leq 0,05$).

3.3.2. *In vitro*-Versuche

Die Ergebnisse beider *in vitro*-Versuche sind in Form von Mittelwerten mit den dazugehörigen Standardfehlern dargestellt. Für die grafische Darstellung und statistische Auswertung wurden die Gasbildungsdaten in ml/g TM umgerechnet. Die graphische Darstellung der kumulativen Gasbildung erfolgte mittels des Programms GraphPad Prism 4, die statistische Auswertung erfolgte in SAS (SAS Institute, Inc., Version 9.2) separat für die Substrate MLF und Heu mittels der Prozedur Proc Mixed und einer zweifaktoriellen ANOVA, der ein post-hoc Test nach Tukey-Kramer angeschlossen war. Die Signifikanzgrenze wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt.

Die Regressionsgeraden für die Bestimmung der Eichgeraden für die Versuche zum ruminalen Abbau von Quercetin wurden mit Excel erstellt. Die graphische Darstellung der Konzentrations-Zeitverläufe erfolgte mittels GraphPad Prism 4.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der *in vivo*-Versuche

4.1.1. Bioverfügbarkeitsstudien

In Abbildung 6 sind die Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach i.r. Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM als Rutin an zwei Tiere mit bzw. ohne Enzymbehandlung der Plasmaproben dargestellt. Der Anteil nicht-konjugierter Flavonole im Plasma wurde aus den jeweiligen AUC-Werten mit bzw. ohne Enzymbehandlung berechnet und betrug 12 %.

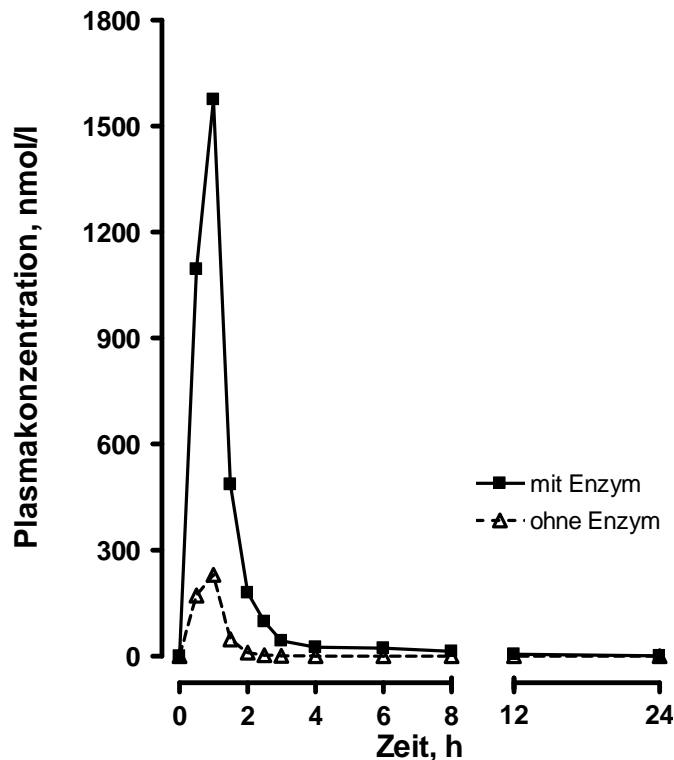


Abbildung 6: Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach intraruminaler Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse als Rutin. Die Plasmaproben wurden mit bzw. ohne β -Glucuronidase/-Sulfatase-Behandlung analysiert. Mittelwerte, $n = 2$.

Im Gegensatz dazu stieg der Anteil der Flavonole in den Plasmaproben nach i.v. Applikation auch mit Enzymbehandlung nicht substantiell an (Daten nicht gezeigt). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Flavonolkonzentrationen nach i.r. Applikation der Testsubstanzen nach enzymatischer Behandlung der Plasmaproben bestimmt. Im Folgenden beschreiben die

Konzentrationsangaben der Flavonole im Plasma somit die Summe aus konjugierten und nicht-konjugierten Formen von Quercetin, dessen methylierter Metabolite (Isorhamnetin und Tamarixetin) und Kämpferol.

In Abbildung 7 sind die Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole sowie der einzelnen Flavonole (Quercetin, Isorhamnetin, Tamarixetin, Kämpferol) nach i.v. Applikation des Quercetin-Aglycons dargestellt.

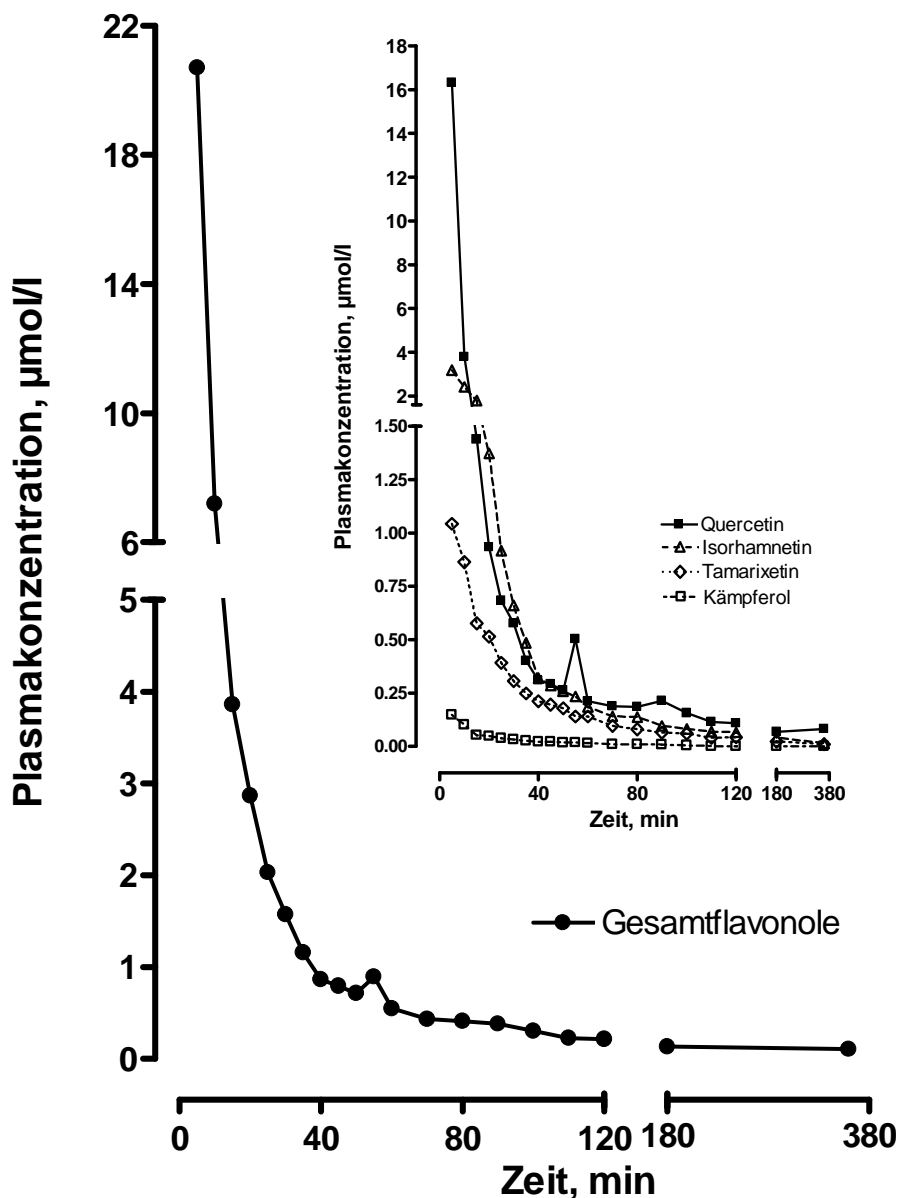


Abbildung 7: Plasmakonzentrations-Zeitkurve der Gesamtflavonole 5-360 min nach intravenöser Applikation von 0,8 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse als Quercetin-Aglycon. **Inset:** Plasmakonzentrations-Zeitkurven von Quercetin, Isorhamnetin, Tamarixetin und Kämpferol. Mittelwerte, n = 2.

Anhand des jeweiligen AUC-Wertes wurde der Anteil jedes Metaboliten an den Gesamtflavonolen bestimmt. Dabei war Quercetin die Hauptform im Plasma (57 % der Gesamtflavonole), gefolgt von Isorhamnetin (35,7 %), Tamarixetin (29,2 %) und Kämpferol (12,3 %). Während die Plasmakonzentration der Gesamtflavonole sowie der einzelnen Flavonole relativ zügig sank, veränderte sich der relative Anteil von Quercetin bzw. seiner Metabolite über die Zeit (Abb. 8). Demnach sank die relative Quercetinkonzentration zwischen 5 und 50 min nach i.v. Applikation kontinuierlich von 80 auf 35 %, während gleichzeitig die Summe der Metabolite von 20 auf 70 % anstieg.

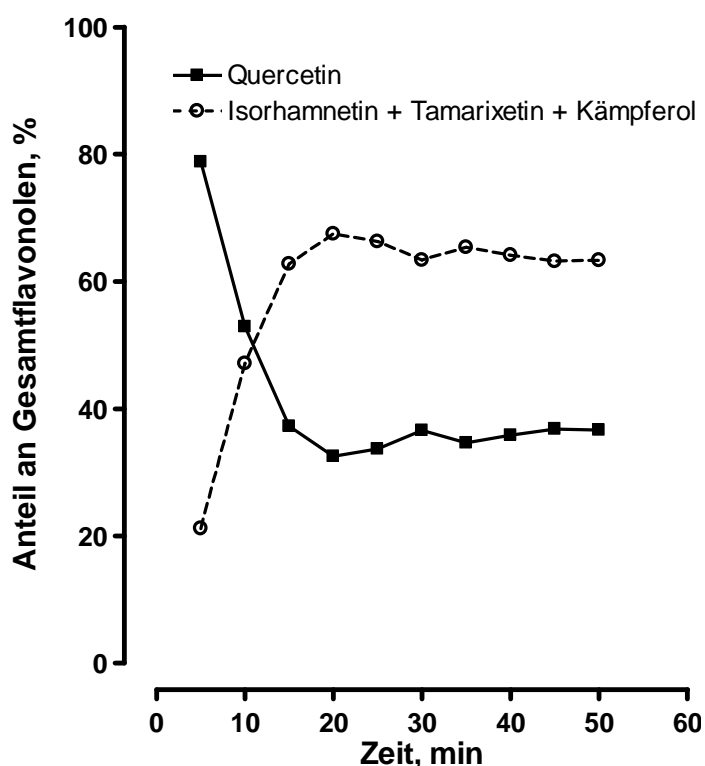


Abbildung 8: Anteile von Quercetin bzw. Quercetinmetaboliten (Summe aus Isorhamnetin, Tamarixetin und Kämpferol) an der Gesamtflavonolkonzentration im Plasma 5-50 min nach intravenöser Applikation von 0,8 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse als Quercetin-Aglycon. Mittelwerte, n = 2.

Die Zeitverläufe der Gesamtflavonolkonzentrationen im Plasma nach i.r. Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM als Quercetin-Aglycon sind in Abbildung 9 dargestellt. Nach i.r. Applikation der physiologischen Kochsalzlösung lag die Plasmakonzentration der Gesamtflavonole über den gesamten Zeitraum der Probenentnahme im Bereich bzw. unterhalb der Nachweisgrenze

(Abb. 9 und 10). Die Quercetinmetabolite Isorhamnetin, Tamarixetin und Kämpferol wurden nicht detektiert. Nach Applikation von 10 mg Quercetinäquivalenten/kg KM als Quercetin-Aglycon lag die Plasmakonzentration der Gesamtflavonole beinahe über den gesamten Zeitraum der Probenentnahme im Bereich der Nachweisgrenze (Abb. 9), wobei methylierte Quercetinmetabolite und Kämpferol nicht detektiert wurden. Nach Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM in Form des Aglycons trat die maximale Plasmakonzentration der Gesamtflavonole im Mittel nach 30 min auf (Abb. 9, Tab. 4), wobei neben Quercetin Spuren von Kämpferol detektierbar waren. Die absolute Bioverfügbarkeit nach i.r. Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg BW als Quercetin-Aglycon lag bei 0,1 %.

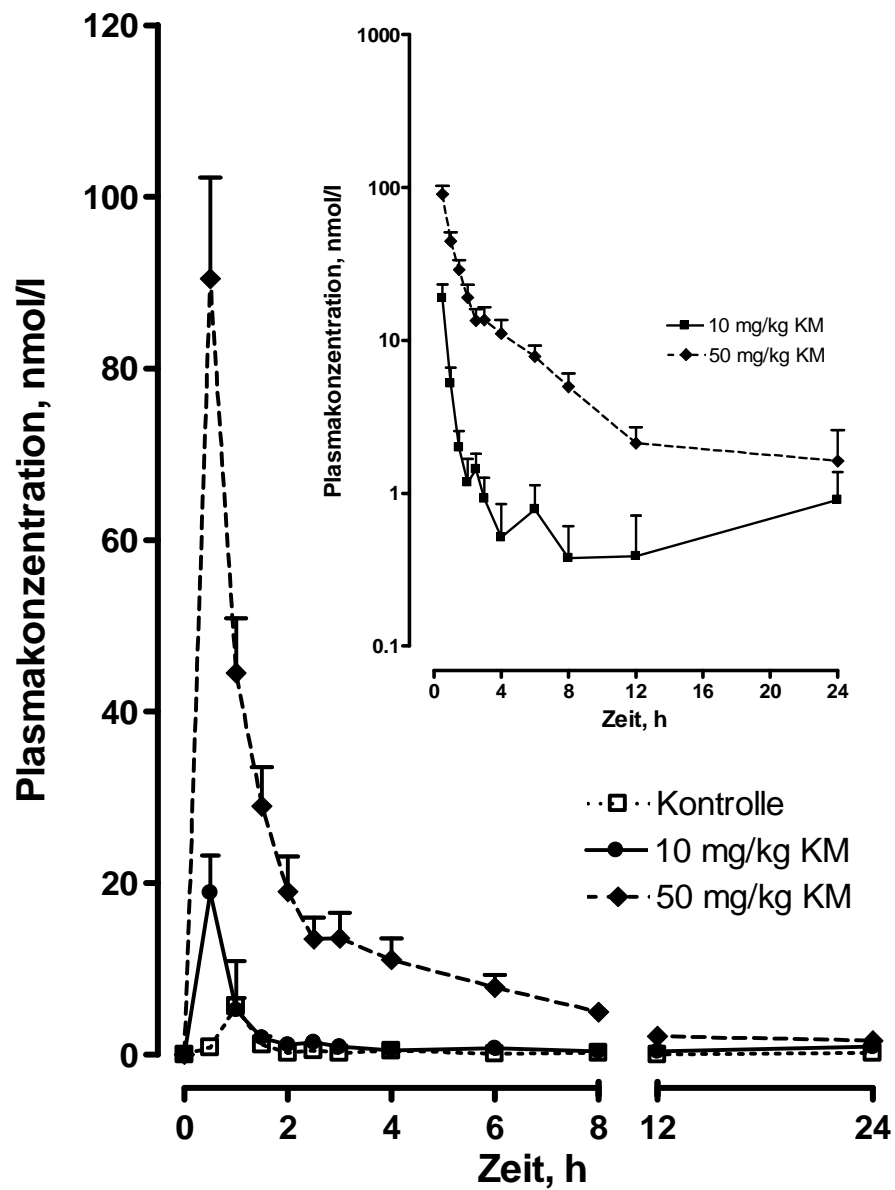


Abbildung 9: Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Quercetin-Aglycon. Mittelwerte + SEM, n = 5 (10 und 50 mg Quercetinäquivalente/kg KM) bzw. n = 4 (Kontrolle); **Inset:** Darstellung der Daten mit transformierter y-Achse (Log-Skala).

Tabelle 4: Pharmakokinetische Parameter und relative Bioverfügbarkeit nach intraruminaler Applikation von 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse als Quercetin-Aglycon bzw. Rutin.

| | Quercetin | Rutin |
|--|--------------------|--------------------|
| c_{\max} , ¹ $\mu\text{mol/l}$ | $0,09 \pm 0,01^a$ | $1,0 \pm 0,10^b$ |
| t_{\max} , ² min | $30,0 \pm 0,0^a$ | $42,0 \pm 7,3^a$ |
| $\text{AUC}_{\text{Total}}$, ³ $\mu\text{mol/l} \times \text{min}$ | $10,94 \pm 1,76^a$ | $83,96 \pm 9,35^b$ |
| Relative Bioverfügbarkeit, ⁴ % | 100 | 767,3 |

^{1, 2, 3} Mittelwerte \pm SEM, n = 5. Mittelwerte in einer Zeile ohne einen gemeinsamen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander, $P < 0,05$.

¹ c_{\max} , maximale Plasmakonzentration der Gesamtflavonole

² t_{\max} , Zeit zwischen Applikation der Testsubstanz und Erreichen von c_{\max}

³ $\text{AUC}_{\text{Total}}$, Area Under the Curve = Fläche unter der Plasmakonzentrations-Zeitkurve von 0 bis 1440 min für die Gesamtflavonole (Quercetin, Isorhamnetin, Tamarixetin und Kämpferol)

⁴ Relative Bioverfügbarkeit der Gesamtflavonole aus Rutin verglichen mit Quercetin berechnet aus den mittleren $\text{AUC}_{\text{Total}}$ -Werten.

In Gegensatz zur Applikation des Aglycons (Abb. 9) führte die i.r. Applikation von 10 mg Quercetinäquivalenten/kg KM als Rutin zu wesentlich höheren Konzentrationen der Gesamtflavonole im Plasma, wobei die maximale Konzentration ebenfalls bereits nach 30 min erreicht wurde (Abb. 10). Über den gesamten Zeitraum der Probenentnahme lagen die Quercetinmetaboliten Isorhamnetin, Tamarixetin und Kämpferol nur in geringen Konzentrationen vor und machten anteilig weniger als 1 % der Gesamtflavonole aus. Die Konzentration der Gesamtflavonole sank innerhalb von 8 h unter die Nachweisgrenze. Nach Applikation der hohen Rutindosis (50 mg Quercetinäquivalente/kg KM) wurde nach 42 min die maximale Plasmakonzentration der Gesamtflavonole beobachtet, die zehnmal höher war verglichen mit derjenigen nach Applikation der hohen Dosis des Quercetin-Aglycons (Abb. 10, Tab. 4). Die Summe der Konzentrationen von Isorhamnetin, Tamarixetin und Kämpferol ($c_{\max} = 0,125 \mu\text{mol/l}$) betrug zum Zeitpunkt des Auftretens von c_{\max} 12,5 % der Gesamtflavonole, wobei die Konzentration dieser Quercetinmetabolite innerhalb von zwei Stunden nach Applikation unter die Nachweisgrenze sank. Die relative Bioverfügbarkeit von Quercetin nach i.r. Applikation der hohen Rutindosis (verglichen mit der entsprechenden Dosis des Aglycons), lag bei 767,3 %, während die absolute Bioverfügbarkeit 0,5 % betrug. Nach Applikation von Quercetin- bzw. Rutin (10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalente/kg KM) sank die Konzentration der Gesamtflavonole innerhalb von 24 h unter die Nachweisgrenze.

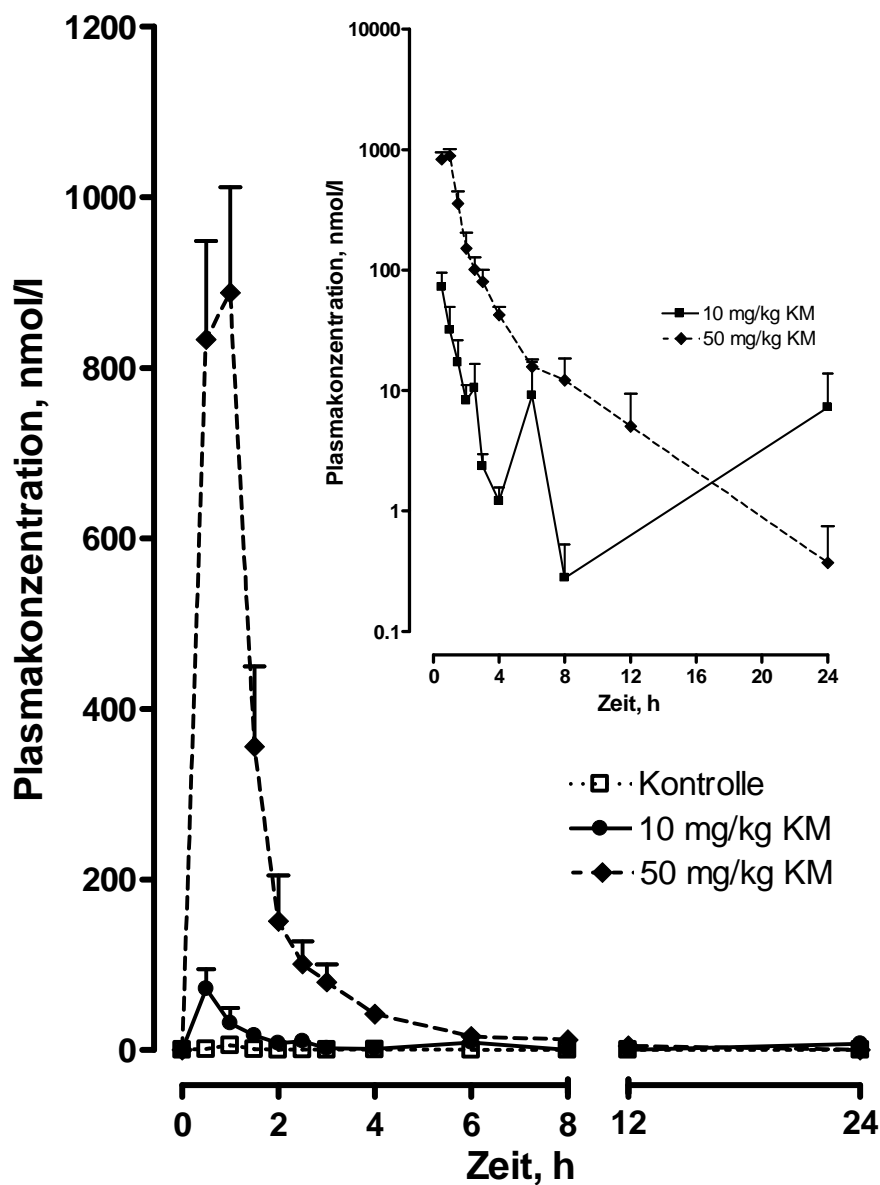


Abbildung 10: Plasmakonzentrations-Zeitkurven der Gesamtflavonole nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Rutin. Mittelwerte + SEM, $n = 5$ (10 und 50 mg Quercetinäquivalente/kg KM) bzw. $n = 4$ (Kontrolle). **Inset:** Darstellung der Daten mit transformierter y-Achse (Log-Skala).

4.1.2. Einfluss von Quercetin auf die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren und das Fettsäuremuster im Pansen

Die Zeitverläufe der ruminalen Konzentration der GFS (s. Kapitel 3.1.5.4.) nach Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg KM als Quercetin-Aglycon bzw. Rutin sind in den Abbildungen 11 bzw. 12 dargestellt.

Die GFS-Konzentration lag vor der Morgenfütterung und damit vor Applikation der jeweiligen Testsubstanzen (Z_0) an allen Versuchstagen bei $61,0 \pm 1,1$ mmol/l. Nach der Morgenfütterung stieg die GFS-Konzentration kontinuierlich an, wobei sich die AUC und die maximalen Konzentrationen (c_{\max}) unter Kontrollbedingungen (Applikation physiologischer Kochsalzlösung) bzw. nach Applikation der Testsubstanzen sowie die jeweiligen Zeitpunkte des Auftretens der maximalen Konzentrationen (t_{\max}) zwischen den Behandlungen nicht signifikant voneinander unterschieden (Abb. 11 und 12, Tab. 5 und 6).

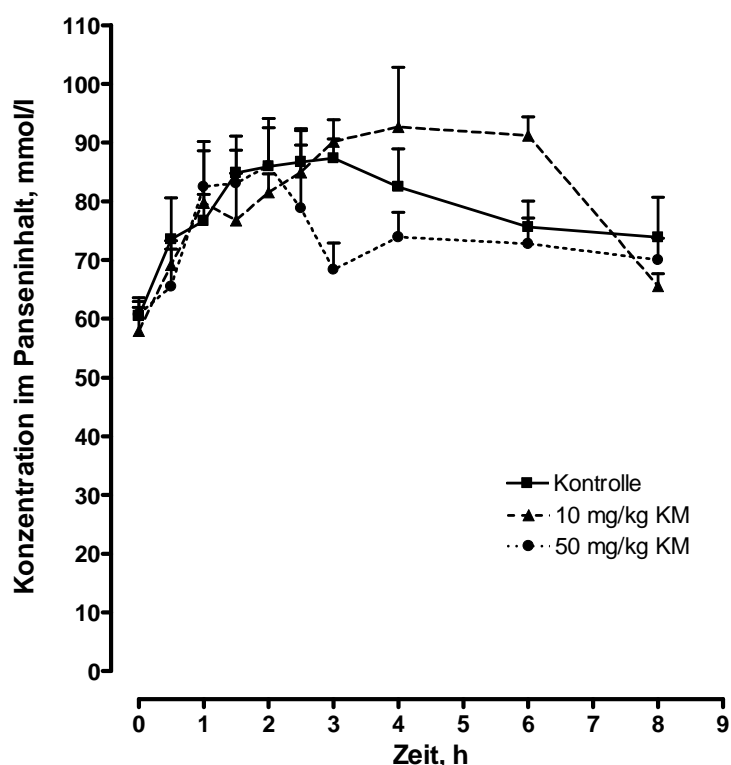


Abbildung 11: Konzentrations-Zeitverläufe der Gesamtfettsäuren (GFS) im Panseninhalt nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Quercetin-Aglycon. Mittelwerte + SEM, n = 5.

Tabelle 5: Parameter zur Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der ruminalen Konzentration der Gesamtfettsäuren (GFS) nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Quercetin-Aglycon.

| | Kontrolle | 10 mg/kg KM | 50 mg/kg KM |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| c_{\max} , ¹ mmol/l | 93,3 ± 4,9 ^a | 102,1 ± 6,2 ^a | 89,6 ± 8,0 ^a |
| t_{\max} , ² h | 2,8 ± 0,4 ^a | 3,6 ± 0,8 ^a | 3,1 ± 1,2 ^a |
| AUC_{Total} , ³ mmol/l × h | 633,2 ± 33,2 ^a | 665,1 ± 34,6 ^a | 590,8 ± 33,2 ^a |

^{1, 2, 3} Mittelwerte ± SEM, n = 5. Mittelwerte in einer Zeile ohne einen gemeinsamen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander, $P \leq 0,05$.

¹ c_{\max} , maximale Konzentration der GFS

² t_{\max} , Zeit zwischen Applikation der Testsubstanz und Erreichen von c_{\max}

³ AUC_{Total} , Area Under the Curve = Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve von 0 bis 8 h für die GFS

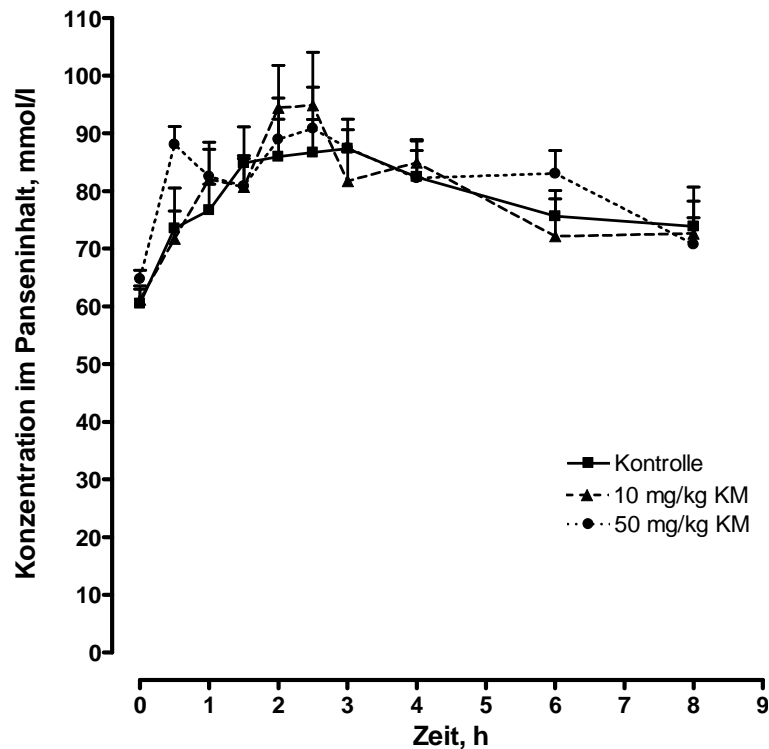


Abbildung 12: Konzentrations-Zeitverläufe der Gesamtfettsäuren (GFS) im Panseninhalt nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Rutin. Mittelwerte + SEM, n = 5.

Tabelle 6: Parameter zur Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der ruminalen Konzentration der Gesamtfettsäuren (GFS) nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Rutin.

| | Kontrolle | 10 mg/kg KM | 50 mg/kg KM |
|--|--------------------|--------------------|--------------------|
| c_{\max}^1 , mmol/l | $93,3 \pm 4,9^a$ | $98,8 \pm 8,3^a$ | $99,4 \pm 4,4^a$ |
| t_{\max}^2 , h | $2,8 \pm 0,4^a$ | $2,6 \pm 0,4^a$ | $2,9 \pm 0,8^a$ |
| AUC_{Total}^3 , mmol/l \times h | $633,2 \pm 33,2^a$ | $632,7 \pm 27,3^a$ | $657,6 \pm 22,8^a$ |

^{1, 2, 3} Mittelwerte \pm SEM, n = 5. Mittelwerte in einer Zeile ohne einen gemeinsamen Buchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander, $P \leq 0,05$.

¹ c_{\max} , maximale Konzentration der GFS

² t_{\max} , Zeit zwischen Applikation der Testsubstanz und Erreichen von c_{\max}

³ AUC_{Total} , Area Under the Curve = Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve von 0 bis 8 h für die GFS

Neben der Konzentration der GFS wurden auch die prozentualen Anteile der einzelnen KKFS (Acetat, Propionat und Butyrat) an den GFS berechnet. Unter allen Bedingungen entfiel der Hauptanteil dabei auf Acetat (66-72 %), gefolgt von Propionat (15-20 %) und Butyrat (9-11 %), wohingegen die KKFS Isobutyrat, Valeriat und Isovaleriat mit $3,0 \pm 0,03$ % nur einen

geringen Anteil ausmachten (Abb. 13 und 14). Das Fettsäuremuster unterschied sich dabei zwischen den verschiedenen Behandlungen nicht signifikant.

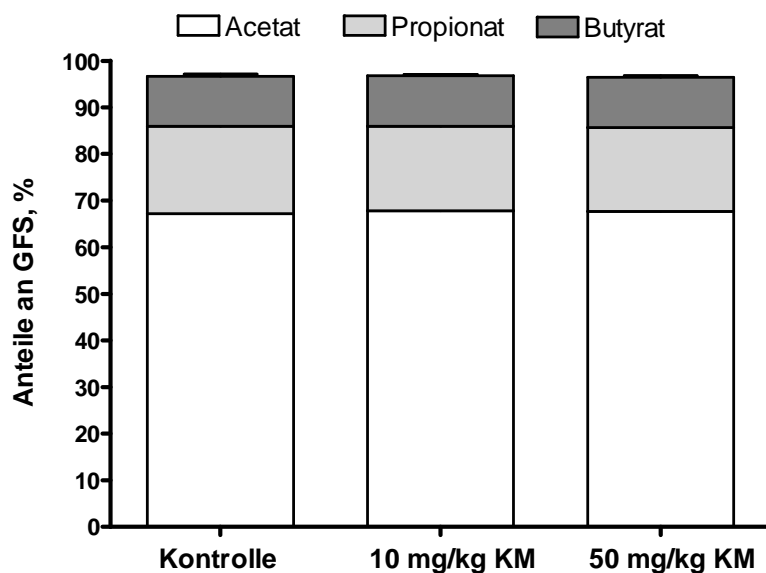


Abbildung 13: Anteile von Acetat, Propionat und Butyrat an der Konzentration der Gesamtfettsäuren (GFS) 2 h nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Quercetin-Aglycon. Mittelwerte + SEM, n = 5.

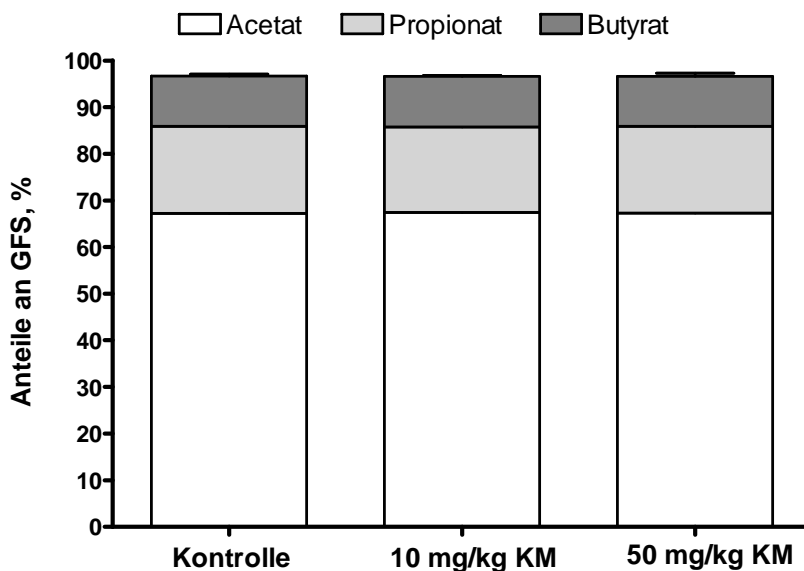


Abbildung 14: Anteile von Acetat, Propionat und Butyrat an der Konzentration der Gesamtfettsäuren (GFS) 2 h nach intraruminaler Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalenten/kg Körpermasse (KM) als Rutin. Mittelwerte + SEM, n = 5.

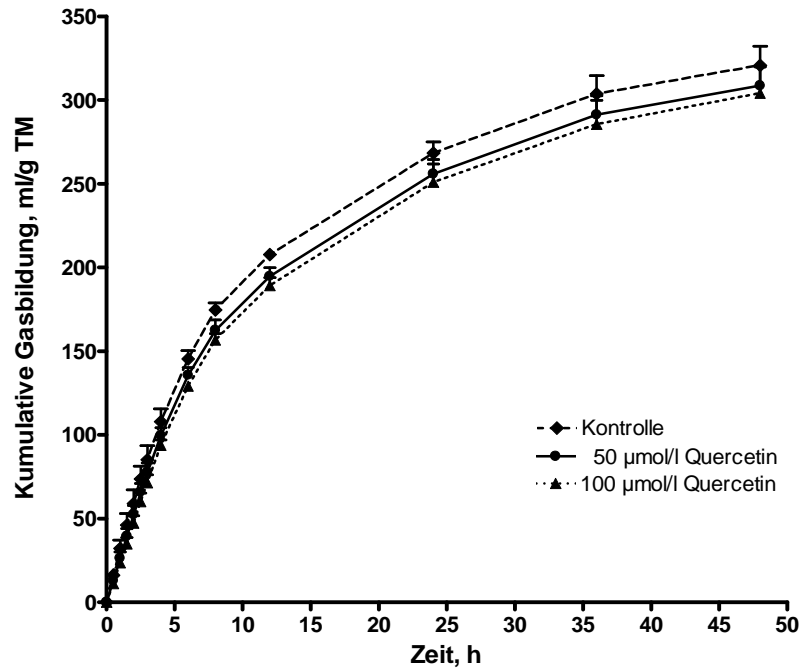
4.2. Ergebnisse der *in vitro*-Versuche

4.2.1. Einfluss von Quercetin auf die Gasbildung

In den Abbildungen 15 (a, b) sowie 16 (a, b) sind die Zeitverläufe der kumulativen Gasbildung bis zu einer Inkubationszeit von 48 h für die beiden verwendeten Substrate (MLF, Heu) ohne Zusatz von Quercetin (Kontrolle, 0 $\mu\text{mol/l}$) sowie mit Zusatz von 50 bzw. 100 μmol Quercetinäquivalenten/l als Quercetin-Aglycon (a) bzw. Rutin (b) dargestellt. Die Angaben zur Anzahl der Beobachtungen beziehen sich auf die Anzahl der durchgeführten Durchgänge ($n = 4$ mit MLF, $n = 3$ mit Heu), wobei die jeweils pro Durchgang angesetzten Doppelbestimmungen gemittelt wurden.

Sowohl in den Versuchen mit MLF als auch mit Heu zeigte sich ein kurvenlinearer Verlauf der kumulativen Gasbildung mit einer klaren Tendenz zur Plateaubildung, wobei die jeweiligen Werte mit MLF zu jedem Zeitpunkt deutlich über denjenigen mit Heu als Substrat lagen (Abb. 15 a, b und 16 a, b). Während sich bei der Verwendung von MLF als Substrat kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konditionen ergab, zeigte sich mit Heu als Substrat nach Zusatz von 50 bzw. 100 μmol Quercetinäquivalenten/l in Form des Aglycons ab 24 bzw. 8 h verglichen mit der Kontrolle eine signifikant geringere kumulative Gasbildung (Abb. 16 a).

a



b

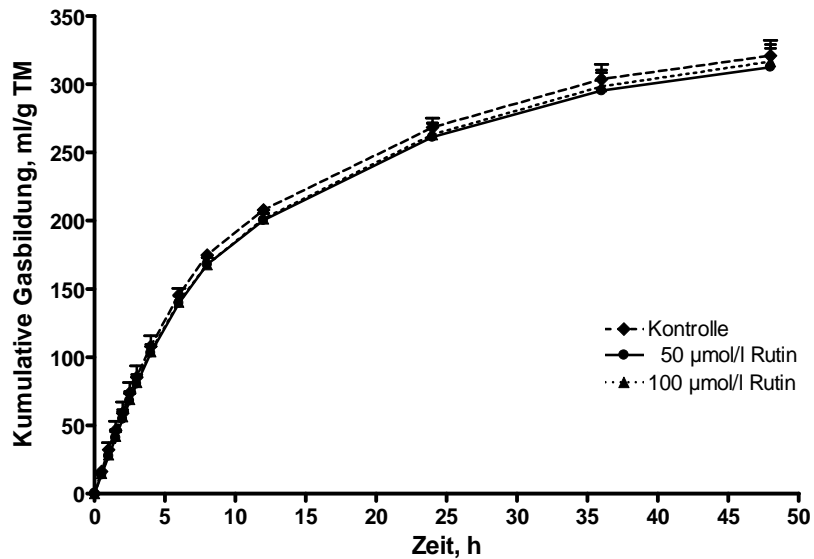


Abbildung 15: Zeitverlauf der kumulativen Gasbildung ohne (Kontrolle) bzw. mit Zusatz von 50 bzw. 100 µmol Quercetinäquivalenten/l als Quercetin-Aglycon (a) bzw. Rutin (b) mit Milchleistungsfutter als Substrat. Mittelwerte + SEM, n = 4.

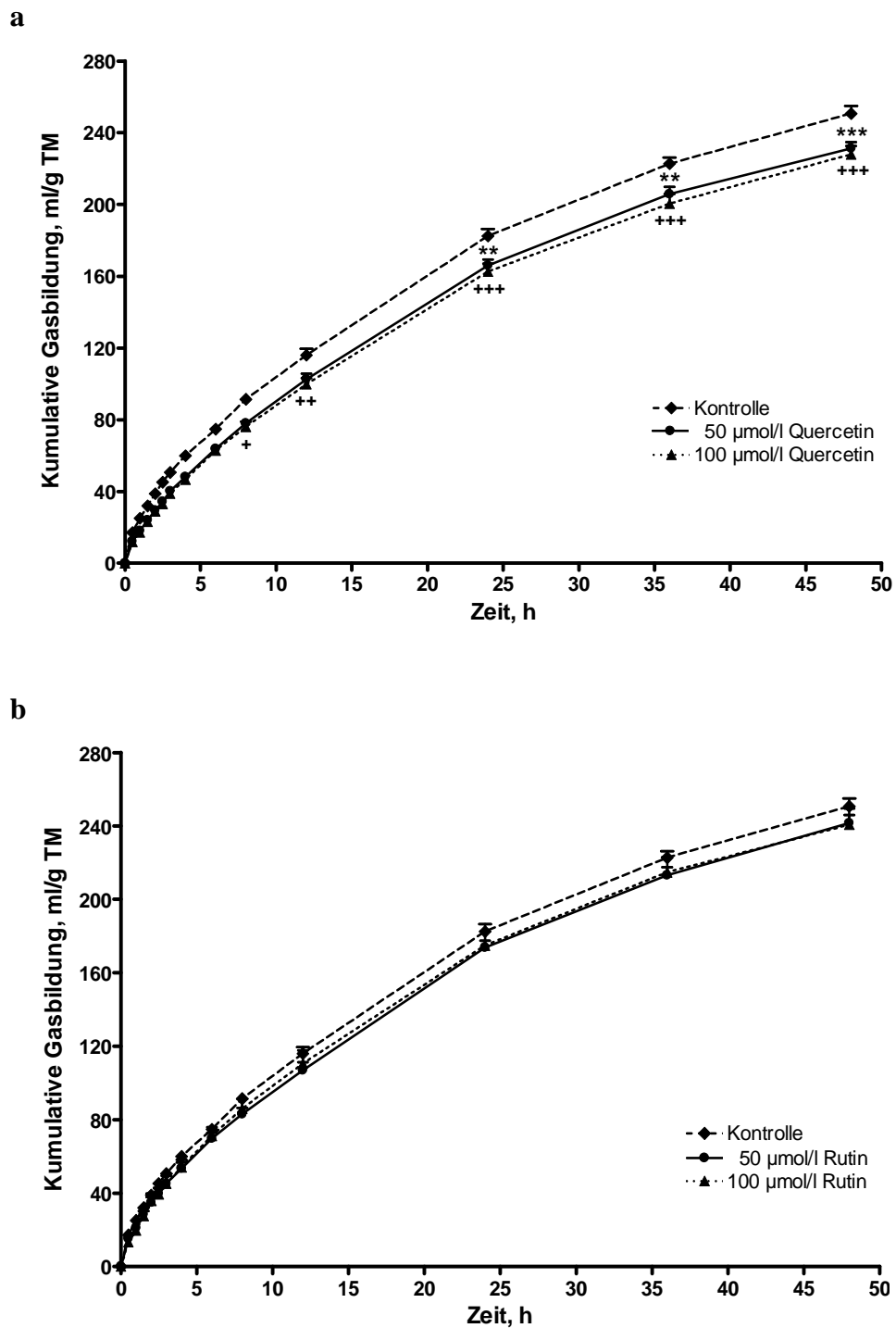


Abbildung 16: Zeitverlauf der kumulativen Gasbildung ohne (Kontrolle) bzw. mit Zusatz von 50 bzw. 100 µmol Quercetinäquivalenten/l als Quercetin-Aglycon (a) bzw. Rutin (b) mit Heu als Substrat. Mittelwerte + SEM, n = 3. Signifikante Unterschiede verglichen mit der Kontrolle sind mit * (50 µmol/l) bzw. + (100 µmol/l) dargestellt, wobei gilt *+ (p < 0,05), **/+ (p < 0,01) und ***/+++ (p < 0,001).

4.2.2. Ruminaler Abbau von Quercetin

In Abbildung 17 sind die Konzentrations-Zeitverläufe von Quercetin sowie der detektierten Abbauprodukte Phloroglucinol, 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure und 4-Methylcatechol nach Inkubation in Gegenwart von 100 μmol Quercetinäquivalenten/l (Zugabe als Quercetin-Aglycon) dargestellt. Bis zum Zeitpunkt von 8 h war ein rascher exponentieller Abfall der Quercetinkonzentration zu beobachten, wobei die Quercetinkonzentration nach 24 h im Bereich der Nachweisgrenze lag. In den Durchgängen ohne Zusatz von Quercetin lagen die Quercetinkonzentrationen über den gesamten Zeitraum im Bereich bzw. unterhalb der Nachweisgrenze (Daten nicht gezeigt). In den Ansätzen, die mit inaktiviertem Pansensaft mit Zusatz von Quercetin durchgeführt wurden, sank die Quercetinkonzentration (initial 100 $\mu\text{mol/l}$) innerhalb der ersten 8 h ab, blieb dann aber im Bereich von 65-80 $\mu\text{mol/l}$ relativ konstant. Dieser Konzentrationsabfall ist auf eine spontane Dekomposition von Quercetin unter den Versuchsbedingungen zurückzuführen [120] und wurde auch schon von Cermak et al. [45] im COSITEC-Modell beobachtet. Bezüglich der untersuchten potenziellen Abbauprodukte von Quercetin zeigte sich, dass die Konzentrationen von Phloroglucinol und 4-Methylcatechol in den Kontrolldurchgängen über die gesamte Inkubationszeit von 24 h zwischen 3-9 bzw. 0,03–0,21 $\mu\text{mol/l}$ lagen. Die Konzentration von 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure lag dagegen über den gesamten Zeitraum unterhalb der Nachweisgrenze. Im Vergleich dazu wurden nach Zusatz von 100 $\mu\text{mol/l}$ Quercetin-Aglycon für 4-Methylcatechol und 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure deutlich höhere Konzentrationen im Inkubationsmedium gemessen. Der Konzentrationsanstieg der 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure verlief relativ steil und erreichte nach 2,5 h ein Maximum von $34,3 \pm 5,5$ $\mu\text{mol/l}$. Innerhalb der darauffolgenden 5,5 h fiel die Konzentration unter die Nachweisgrenze. Die Konzentration von 4-Methylcatechol stieg innerhalb von 8 h bis auf ein Maximum von $11,2 \pm 4,7$ $\mu\text{mol/l}$ und fiel bis zum Zeitpunkt der letzten Messung (24 h) auf eine Konzentration von $3,3 \pm 2,0$ $\mu\text{mol/l}$. Die Phloroglucinolkonzentration zeigte hingegen auch mit Quercetinzusatz keinen deutlichen Anstieg (Maximum $16,2 \pm 2,4$ $\mu\text{mol/l}$) verglichen mit der Kontrolle, so dass es sich hierbei vermutlich nicht oder zumindest nicht ausschließlich um einen spezifischen beim Abbau von Quercetin entstehenden Metabolit handelt.

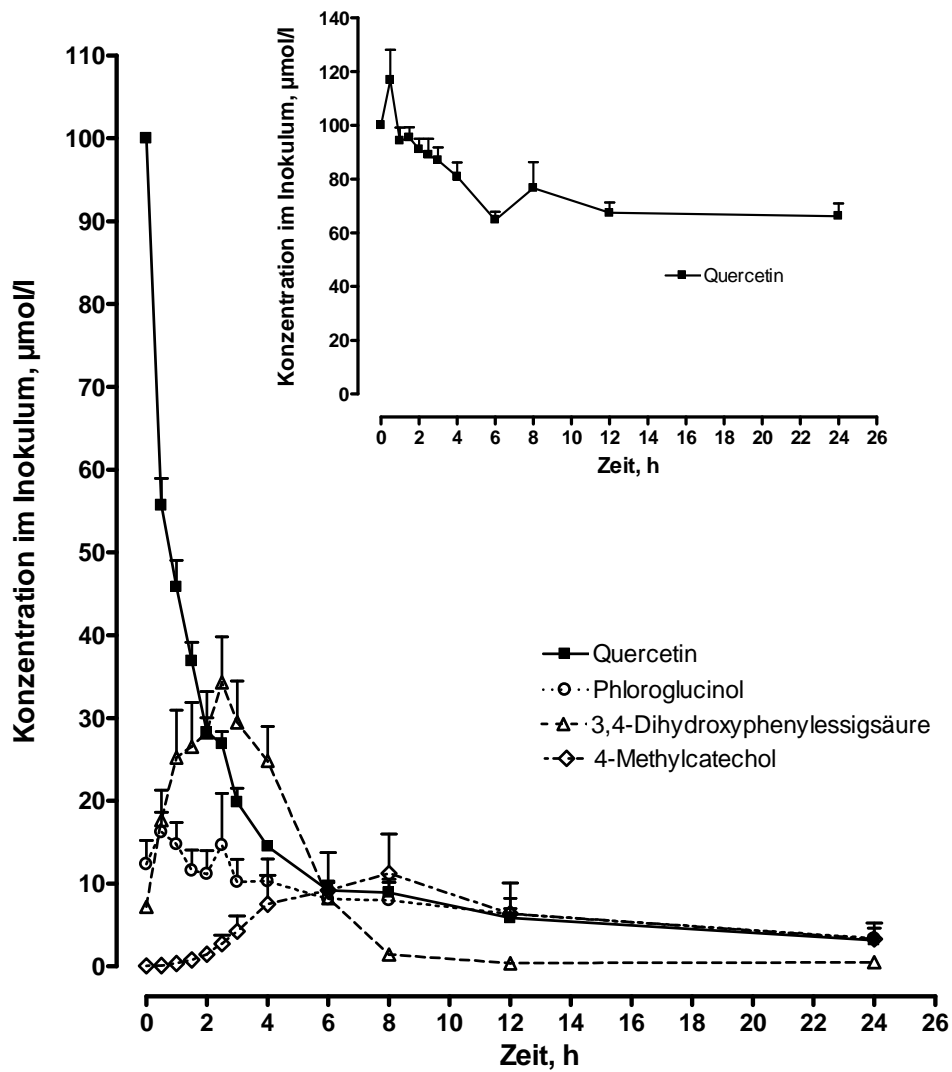


Abbildung 17: Zeitverlauf der Konzentration von Quercetin, Phloroglucinol, 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid und 4-Methylcatechol im Inokulum (initiale Quercetinkonzentration: 100 µmol/l). Mittelwerte + SEM, n = 8. **Inset:** Zeitverlauf der Quercetinkonzentration bei Verwendung von inaktiviertem Pansensaft (initiale Quercetinkonzentration: 100 µmol/l). Mittelwerte + SEM, n = 4.

5. Diskussion

Quercetin, ein sekundärer Pflanzenmetabolit, ist eine in der pflanzlichen Nahrung von Mensch und Tier weit verbreitete polyphenolische Verbindung. Aufgrund seiner Vielzahl an gesundheitsfördernden Effekten bei Mensch und Tier war es bereits Gegenstand zahlreicher Studien bei monogastrischen Spezies (Mensch und Ratte). Neben antiinflammatorischen, antioxidativen und antimikrobiellen Fähigkeiten, besitzt es auch einen Einfluss auf die Expression vieler Gene und die Aktivität zahlreicher Schlüsselenzyme des Stoffwechsels [23]. Aufgrund der Symbiose zwischen Wirtstier und den in den Vormägen angesiedelten Mikroorganismen spielen antimikrobielle Effekte im GIT und die damit möglicherweise einhergehende Beeinflussung von Fermentationsprozessen bei Wiederkäuern eine zentrale Rolle und müssen neben den möglicherweise auftretenden postabsorptiven systemischen Wirkungen bei einer Gesamtbewertung einer Quercetinsupplementierung bei dieser Spezies berücksichtigt werden. Des Weiteren gilt, dass systemische Effekte von Quercetin entscheidend davon anhängen, ob die Substanz in ausreichendem Maße bioverfügbar ist. In der vorliegenden Studie wurde Quercetin im Hinblick auf einen möglichen Einsatz als gesundheitsförderndes Supplement bei der Milchkuh untersucht. Dabei wurde sowohl der ruminale Abbau von Quercetin als auch dessen Bioverfügbarkeit bestimmt. Basierend auf dem Kenntnis antimikrobieller Wirkungen von Quercetin wurde es auch hinsichtlich seines Einflusses auf verschiedene Fermentationsparameter im Pansen untersucht.

Ruminaler Abbau von Quercetin

Anhand der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro*-Experimente zum ruminalem Abbau von Quercetin konnte ein schneller sowie umfangreicher mikrobieller Abbau von Quercetin durch ruminale Mikroorganismen gezeigt werden, der zumindest teilweise mit den Ergebnissen früherer Studien zum mikrobiellen Abbau von Quercetin in ruminalem und fäkalem Inokula übereinstimmt [83;124;132;135]. Im Hinblick auf die Abbaurate von Quercetin gibt es allerdings unterschiedliche Befunde [79;123;124;132;137]. So erfolgte der Großteil des Quercetinabbaus sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch in der Studie von Labib et al. [124] zwar übereinstimmend innerhalb von 8-10 h, jedoch ist der Kurvenverlauf bei Labib et al. [124] beim Vergleich der ersten 2-4 h des Abbaus deutlich flacher. Eine Begründung für den unterschiedlichen Verlauf könnte die zehnfach höhere

initiale Quercetinkonzentration in der Studie von Labib et al. [124] sein. So stellten Rechner et al. [125] anhand von *in vitro*-Versuchen mit verschiedenen Flavonoidglycosiden fest, dass die Abbauraten von der Konzentration der jeweiligen Verbindung abhängig sind (Rate sinkt mit steigender Konzentration). Weitere Unterschiede zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und vorherigen Studien betreffen den Umfang des Abbaus von Quercetin. So war Quercetin in der vorliegenden Arbeit nach 24 h zwar zum größten Teil, jedoch nicht vollständig abgebaut, während einige Studien von einem vollständigen Quercetinabbau innerhalb von 24 h oder früher berichten [124;132;135;137]. In der Arbeit von Schoefer et al. [137] beispielsweise wurde Quercetin (500 µmol/l) innerhalb von 6 h durch *Clostridium orbiscindens*, in der Studie von Braune et al. [132] (100 µmol/l) sogar bereits innerhalb von 60 min durch *Eubacterium ramulus* vollständig abgebaut. Da neben den beiden genannten fäkalen insgesamt nur einige ruminale und fäkale Bakterienarten tatsächlich zum Abbau von Quercetin befähigt sind (s. Kapitel 2.3.3.), spielt folglich auch der Anteil Quercetinabbauender Bakterien und somit die jeweilige Zusammensetzung der mikrobiellen Flora eine Rolle für den Quercetinabbau. Dies konnten Aura et al. [122] und Rechner et al. [125] anhand der Inkubation von Flavonoiden mit unterschiedlichen Inokula bestätigen.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen verschiedener Studien [79;82;122-124;127;128;132] konnten auch in den eigenen Untersuchungen die aus dem Abbau von Quercetin resultierenden Verbindungen 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure und 4-Methylcatechol identifiziert werden. Phloroglucinol, ein in mehreren Studien beim Abbau von Quercetin und dessen Glycosiden detektierter Metabolit des A-Rings (s. Abbildung 18) [79;124;127;128;131;136], konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht eindeutig als Metabolit aus dem Quercetinabbau spezifiziert werden, da dessen Konzentration ohne Zusatz von Quercetin (Kontrolle) über den gesamten Zeitverlauf nur knapp unter derjenigen mit Quercetinzusatz lag. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass Phloroglucinol zumindest in einigen Studien „nur“ als Zwischenprodukt des Quercetinabbaus auftauchte, das relativ zügig weiter zu Acetat, Butyrat und CO₂ abgebaut wurde [124;131;134;137;138]. Die Ergebnisse von Krumholz et al. [129] lassen nur vermuten, dass die beim ruminalen Abbau von Quercetin durch *Eubacterium oxidoreducens* neben 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure detektierten Metabolite Acetat, Butyrat und CO₂ aus dem Abbau von Phloroglucinol stammen.

In Übereinstimmung mit eigenen Befunden ging das Verschwinden von Quercetin mit einem synchronen Anstieg der Konzentration von 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure als Abbauprodukt

des B-Rings von Quercetin einher [124;125;132]. Diese zeitliche Übereinstimmung wurde auch in den Untersuchungen von Justesen et al. [123] und Labib et al. [124] grundsätzlich beschrieben. Analog dem im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit langsameren Rückgang der Quercetinkonzentration bei Labib et al. [124] erfolgte allerdings auch der Konzentrationsanstieg von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure langsamer. Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Labib et al. [124] ging die Bildung von 4-Methylcatechol auch in der vorliegenden Arbeit mit einem Rückgang der Konzentration von 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure einher. Analog den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deuten auch diejenigen von Labib et al. [124] darauf hin, dass es sich beim 4-Methylcatechol um einen sekundären Metaboliten handelt, der durch Decarboxylierung aus 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure entsteht (s. Abbildung 18).

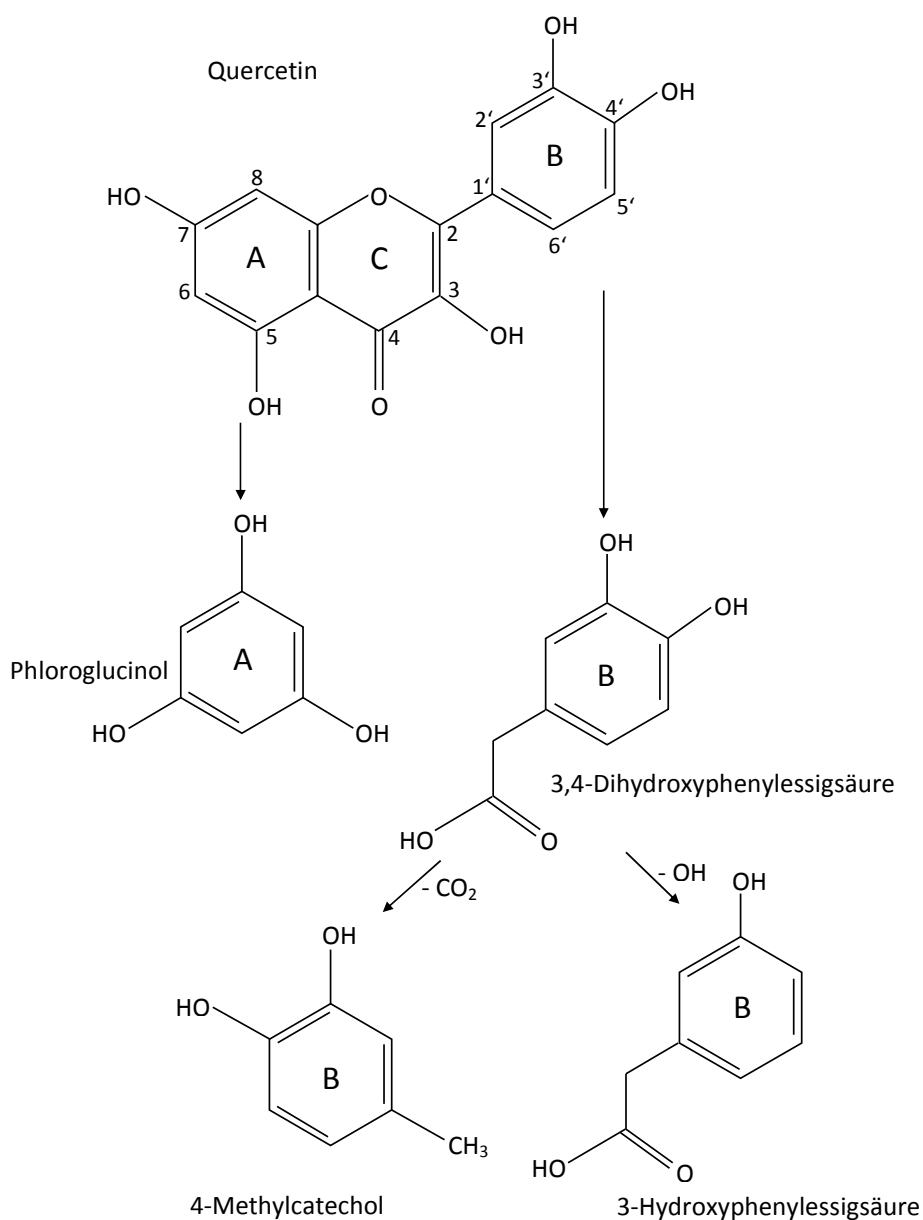


Abbildung 18: Möglicher Abbauweg von Quercetin

In den Studien von Aura et al. [122] und Rechner et al. [125] wurde nach Freisetzung von Quercetin aus Rutin durch Dehydroxylierung der 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid die einfach-hydroxylierte phenolische Verbindung 3-Hydroxyphenylacetic acid detektiert (s. Abbildung 18). Diese Verbindung wurde neben den beiden genannten Studien auch von Justesen et al. [123] beim Abbau von Quercetin nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde die 3-

Hydroxyphenyllessigsäure ebenfalls identifiziert, wurde aber aufgrund von methodischen Problemen in der Bestimmung in der endgültigen Auswertung nicht berücksichtigt.

Bioverfügbarkeit von Quercetin

Der Vergleich der Plasmaflavonolkonzentrationen in den Proben, die mit bzw. ohne β -Glucuronidase/-Sulfatase behandelt wurden zeigte, dass Quercetin und seine methylierten Derivate Isorhamnetin und Tamarixetin sowie Kämpferol nach i.r. Applikation überwiegend als Konjugate im Plasma vorliegen, wie dies auch für die bisher untersuchten monogastrischen Spezies bekannt ist [58;61;85;95;96]. Auch beim Rind konnten Lundh et al. [154] nach oraler Aufnahme isoflavonhaltiger Silage zeigen, dass konjugierte Isoflavonmetabolite mehr als 90 % der im Plasma zirkulierenden Formen ausmachten. Die niedrigen Plasmakonzentrationen des nicht-konjugierten Quercetins und seiner Metabolite in der vorliegenden Arbeit deuten auf eine umfangreiche Glucuronidierung und Sulfatierung im Zuge des Phase-II-Metabolismus hin, die beim Schwein und der Ratte nachgewiesenermaßen überwiegend in der intestinalen Mucosa stattfindet [58;73]. Beim Wiederkäuer hingegen kann der Ort der Metabolisierung noch nicht eindeutig lokalisiert werden, wie im Verlauf dieser Diskussion noch erläutert werden soll.

Die nach Rutinapplikation im Blut auftretenden maximalen Quercetinkonzentrationen sowie die Konzentrationen der aus der Metabolisierung von Quercetin resultierenden Metabolite mit intakter Flavonolstruktur (Isorhamnetin, Tamarixetin, Kämpferol) unter Einbeziehung der glucuronidierten und sulfatierten Formen (= Gesamtflavonole) waren um das Zehnfache höher als nach Applikation des Aglycons. Dieses Ergebnis steht im klaren Gegensatz zu den Ergebnissen bei monogastrischen Spezies. So war die Bioverfügbarkeit nach Applikation von Rutin dort in der Regel deutlich geringer als nach Applikation äquimolarer Mengen des Aglycons [58;80;98]. Ähnliche Ergebnisse ergab im Übrigen auch die intraduodenale Applikation von Quercetin bzw. Rutin bei Kühen [155]. In diesem Zusammenhang haben Studien bei monogastrischen Spezies gezeigt, dass Quercetin aus Rutin nicht vor Erreichen des Dickdarms freigesetzt werden kann, da im Dünndarm die dafür notwendige Enzymausstattung nicht vorhanden ist [58;77;78]. Demnach führt die orale Rutinapplikation im Vergleich zur Applikation des Aglycons bei monogastrischen Spezies zu einem verzögerten Auftauchen von Quercetin und seiner Metabolite im Plasma und aufgrund des im Dickdarm stattfindenden umfangreichen mikrobiellen Abbaus und damit geringer Absorption

zu deutlich niedrigeren Plasmawerten [58;80;85;106]. Das im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführte *in vitro*-Experiment sowie vorherige Studien zum mikrobiellen Abbau von Quercetin in ruminalen und fäkalen Inokula haben einen umfangreichen Abbau des Quercetin-Aglycons im Pansen gezeigt [83;124;132;135] und könnten eine Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit detektierten niedrigen Plasmakonzentrationen von Quercetin und seiner Metabolite nach Applikation des Aglycons sowie für die niedrige systemische Verfügbarkeit von Quercetin (0,1 %) nach i.r. Applikation des Aglycons liefern. Im Vergleich dazu lag die Bioverfügbarkeit bei monogastrischen Spezies (Hund, Schwein, Ratte) nach oraler Applikation äquivalenter Dosen des Aglycons bei 4 [85], 17 [95] bzw. 59 % [96]. Unabhängig von der Spezies ist nach Applikation von Rutin die Abspaltung des Zuckerrestes durch mikrobielle Rhamnosidasen Voraussetzung, zum einen für den weiteren mikrobiellen Abbau, zum anderen für die Absorption des Aglycons [58;77-79]. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit nach Rutinapplikation deutlich höheren Plasmakonzentrationen von Quercetin und seiner Metabolite mit intakter Flavonolstruktur im Vergleich zur Applikation des Aglycons scheint die Bindung an den Zuckerrest das im Rutin enthaltene Quercetin bis zu dessen Freisetzung vor dem Abbau zu schützen. Basierend auf der Tatsache, dass sowohl die maximalen Plasmakonzentrationen als auch die Bioverfügbarkeit der Flavonole nach Rutinapplikation höher waren, wurde das Quercetin aus Rutin aus noch unbekanntem Gründen jedoch auch nach der Freisetzung nicht in dem Maße mikrobiell abgebaut wie es nach Applikation des Aglycons der Fall war.

Trotz der im Vergleich zu monogastrischen Spezies wesentlich geringeren absoluten Bioverfügbarkeit von Quercetin und seiner Metabolite mit intakter Flavonolstruktur (Isorhamnetin, Tamarixetin, Kämpferol) nach Quercetin- bzw. Rutinapplikation sind die maximalen Plasmakonzentrationen nach Rutinapplikation durchaus mit denjenigen vergleichbar, die nach Applikation äquimolarer Mengen des Aglycons bei monogastrischen Spezies beschrieben sind [95]. Allerdings lässt der, verglichen mit monogastrischen Spezies [58;96;97], wesentlich früher und schneller stattfindende Abfall der Plasmakonzentrationen nach Erreichen der Maxima eine raschere Gewebeverteilung und/oder Eliminierung der Flavonole beim Wiederkäuer vermuten. Das bereits nach 30 und 45 min auch im Vergleich zu Befunden bei monogastrischen Spezies frühzeitige Auftreten maximaler Plasmakonzentrationen nach Quercetin- bzw. Rutinapplikation lässt des Weiteren auf eine schnelle Absorption schließen. So treten bei monogastrischen Spezies wie dem Schwein und

dem Menschen maximale Plasmakonzentrationen der Flavonole nach Applikation des Aglycons erst nach 2-4 h auf [58;95;97]. Nach Applikation von Rutin wurden bei Schweinen bzw. Menschen maximale Plasmakonzentrationen sogar erst nach 4-7,5 h und damit deutlich später erreicht [58;106]. Während, wie bereits mehrfach erwähnt, das Quercetin-Aglycon bei monogastrischen Spezies überwiegend bereits im Dünndarm absorbiert wird [58-60;62], findet die Absorption des Quercetins aus Rutin erst im Dickdarm statt [77-79]. Im Hinblick auf das nach Quercetin- bzw. Rutinapplikation frühzeitige Auftauchen maximaler Flavonol-Plasmakonzentrationen in der vorliegenden Arbeit fanden Lundh et al. [154] nach Applikation isoflavonhaltiger Silage an Rinder innerhalb von 1 h nach oraler Applikation ebenfalls maximale Konzentrationen der Metabolite Formonnetin, Daidzein und Equol im Plasma, wobei sie vermuten, dass die Absorption bereits im Pansen stattgefunden hat. Diese Vermutung wird dadurch untermauert, dass auch die t_{\max} -Werte nach intraduodener Applikation von Quercetin bzw. Rutin an Kühe denjenigen bei monogastrischen Spezies entsprechen und somit speziesspezifische Unterschiede ausgeschlossen werden können [155]. Im Fall einer Absorption im Pansen dürften die Konjugationsreaktion (s.o.) dann nicht wie bei monogastrischen Spezies in der Darmmucosa, sondern in der Leber erfolgt sein. Die Fragen hinsichtlich Absorptions- und Metabolisierungsort können anhand der vorliegenden Arbeit jedoch nicht abschließend beantwortet werden und bedürfen somit weiterer Untersuchungen.

Sowohl nach i.r. Applikation von Quercetin (Aglycon bzw. Rutin) als auch nach i.v. Applikation des Quercetin-Aglycons stellte Quercetin den Hauptteil der im Plasma nachweisbaren Verbindungen mit intakter Flavonolstruktur. Nach i.r. Applikation war Kämpferol nach Quercetin der häufigste Metabolit, gefolgt von Isorhamnetin und Tamarixetin. Anteilig an den Gesamtflavonolen und berechnet anhand der jeweiligen Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve (AUC) machten diese Metabolite, z.B. nach der i.r. Applikation von Rutin (50 mg Quercetinäquivalente/kg KM), 7,33 (Kämpferol), 1,6 (Isorhamnetin) bzw. 0,69 % (Tamarixetin) aus. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denjenigen von Ader et al. [95] nach oraler Applikation des Quercetin-Aglycons an Schweine, bei denen Isorhamnetin zweithäufigster Metabolit, gefolgt von Tamarixetin und Kämpferol war und beim Menschen, wo auf Quercetin als Hauptform, Isorhamnetin und Tamarixetin, jedoch kein Kämpferol folgten [97]. Die Befunde der vorliegenden Arbeit zur i.v. Applikation des Quercetin-Aglycons weisen nach Quercetin Isorhamnetin als zweithäufigsten Metabolit aus, gefolgt von Tamarixetin und Kämpferol und entsprechen somit den Befunden von Ader

et al. [95] nach i.v. Applikation des Aglycons beim Schwein. Während die Methylierung des absorbierten Quercetins unter Bildung von Isorhamnetin und Tamarixetin sowohl nach i.r. (bei Absorption in den Vormägen) als auch nach i.v. Applikation vermutlich in der Leber unter Beteiligung der COMT stattgefunden hat [93;94], gibt es bezüglich der Umwandlung von Quercetin zu Kämpferol, das ebenfalls im Plasma detektiert wurde noch keine abschließenden Erkenntnisse. So wurde Kämpferol in den Studien von Ader et al. [95] und Cermak et al. [58] nach oraler Applikation von Quercetin und Rutin zwar detektiert, sein Auftauchen wurde allerdings auf eine Verunreinigung der in diesen Versuchen eingesetzten β -Glucuronidase/-Sulfatase-Präparation zurückgeführt. Eine solche Verunreinigung kann bei den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit jedoch ausgeschlossen werden. Demnach könnte das in unseren Versuchen nach Applikation von Quercetin bzw. Rutin detektierte Kämpferol durch mikrobielle Dehydroxylierung an Position C-3' im Pansen entstanden sein [156;157]. Da Kämpferol, im Gegensatz zu Ergebnissen beim Schwein [95], nach i.r. Quercetin- bzw. Rutinapplikation der quantitativ zweithäufigste Metabolit nach Quercetin war, kann eine in großem Umfang stattfindende mikrobielle Dehydroxylierung von Quercetin in den Vormägen vermutet werden. Das Auftauchen von Kämpferol im Plasma nach i.v. Applikation bedarf dagegen einer anderen Erklärung. Eine Rezirkulierung von Quercetin in die Vormägen und damit die Möglichkeit einer mikrobiellen Dehydroxylierung von Quercetin, scheint aufgrund der bereits nach 5-10 min nach Applikation auftretenden maximalen Plasmakonzentrationen von Kämpferol unwahrscheinlich. Somit käme nur noch die Dehydroxylierung von Quercetin in der Leber in Frage. Einen möglichen Hinweis darauf, dass eine Dehydroxylierung von Quercetin grundsätzlich in der Leber stattgefunden haben könnte, liefern Saulter et al. [158]. Diese Autoren detektierten zwei hepatische Cytochrom-b₅-Oxidoreductasen, die in der Lage sind, das Antibiotikum Furamidin zu dehydroxylieren [158]. Auch wenn bis jetzt bei keiner Spezies eine Dehydroxylierung von Quercetin in der Leber beschrieben wurde, wäre dies eine Erklärung für die Entstehung von Kämpferol nach i.v. Applikation. Da Kämpferol in den *in vitro*-Versuchen zum ruminalen Abbau von Quercetin nicht in nennenswerten Konzentrationen detektiert wurde, könnte dessen Entstehung in der Leber auch nach i.r. Applikation in Betracht gezogen werden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann dieser Punkt nicht eindeutig geklärt werden, so dass diesbezüglich noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden müssten. Reinboth et al. [85] detektierten beim Hund nach oraler sowie

i.v. Quercetinapplikation ebenfalls Kämpferol im Plasma, gehen in ihrer Studie allerdings nicht weiter auf dessen Herkunft ein.

Einfluss von Quercetin auf Fermentationsprozesse

In Übereinstimmung mit bisher zum Einfluss von Quercetin auf verschiedene ruminale Fermentationsparameter publizierte Untersuchungen [18;22;36-39;45] konnten auch anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro*- und *in vivo*-Versuche nur geringe bzw. keine Effekte von Quercetin auf die untersuchten Parameter festgestellt werden. So führten die im Rahmen der *in vivo*-Versuche durchgeführten i.r. Quercetin- und Rutinapplikationen zu keiner Veränderung der Konzentration an KKFS und des Fettsäuremusters. Da bisher keine vergleichbaren Ergebnisse diese Parameter betreffend aus anderen *in vivo*-Studien vorliegen, ist ein direkter Vergleich mit anderen Befunden nicht möglich. Da jedoch sowohl nach i.r. Quercetin- als auch Rutinapplikation die maximalen Plasmakonzentrationen der Flavonole sehr früh auftraten, könnte der ausgebliebene Effekt von Quercetin bzw. Rutin auf die ruminale Fermentation neben dem raschen ruminalen Abbau von Quercetin auch durch eine zügige Absorption des nicht-abgebauten Quercetins erklärt werden.

Im Gegensatz zu den *in vivo*-Befunden konnten *in vitro*-Effekte von Quercetin auf die Fermentation der organischen Substanz festgestellt werden. So wurde die Gasbildung durch Zusatz von Quercetin bei der Inkubation mit Heu als Substrat signifikant gehemmt. Bei der Inkubation von Quercetin mit MLF sowie bei den Inkubationen von Rutin mit Heu bzw. MLF traten hingegen keine Effekte auf. Der mit Quercetin und Heu im HFT erfasste leichte Rückgang der Gasbildung wurde erstmalig nach 8 bzw. 24 h (100 bzw. 50 μmol Quercetinäquivalente/l) detektiert. Basierend auf den Befunden der vorliegenden Arbeit sowie den bisherigen Erkenntnissen zum ruminalen bzw. fäkalen Abbau von Quercetin war die Quercetinkonzentration zu diesem Zeitpunkt bereits deutlich reduziert (s. ruminaler Abbau von Quercetin). Obwohl noch nicht geklärt ist, in welchen Konzentrationsbereichen es zu einem Einfluss durch Quercetin kommt, könnte die Vermutung angestellt werden, dass die Reduktion der Gasbildung nicht durch das Quercetin direkt verursacht wurde, sondern dass die aus dem mikrobiellen Quercetinabbau entstehenden Metabolite ein gewisses Wirkungspotential besitzen. Stack et al. [159;160] berichten in diesem Zusammenhang von einer Stimulation des Wachstums des cellulolytischen Bakteriums *Ruminococcus albus* 8 und einer daraus resultierenden Steigerung des Celluloseabbaus durch Phenyllessigsäure in

Kombination mit Phenylpropionsäure. Phenyllessigsäure wird im Pansen zur Synthese von Phenylalanin verwendet und dann in mikrobielles Protein eingebaut [159-161]. Ein Rückgang der Gasbildung, wie er unter Einfluss eines antimikrobiellen Agens wie Quercetin vermutet und anhand der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, würde allerdings eher für eine Hemmung von Abbauprozessen sprechen. Eine solche Hemmung des Abbaus von NDF und ADF sowie einen Rückgang der Gasbildung (sowohl CO₂ als auch CH₄ betreffend) bei gleichzeitig erhöhter Produktion von Propionat und H₂ zeigten Broudiscou et al. [22;38] für das Isoquercitrin-haltige Pflanzenextrakt *Equisetum arvense* bei Inkubation mit einer Mischration aus Heu und Kraftfutter. Bei Inkubationen, die ausschließlich mit Heu als Substrat durchgeführt wurden zeigten Broudiscou et al. [37] hingegen sowohl für *Equisetum arvense* als auch für Isoquercitrin als Reinsubstanz eine Stimulation von Abbauprozessen mit erhöhter Produktion von Acetat und Propionat, während die Gasbildung in den Versuchen nicht beeinflusst wurde. Beim Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit denjenigen aus den Versuchen mit Pflanzenextrakten muss bedacht werden, dass die Wirkung der Pflanzenextrakte aufgrund ihrer variablen und damit nicht klar definierten Zusammensetzung (Konzentration der darin enthaltenen Polyphenole) nicht auf eine Substanz direkt zurückgeführt werden kann und somit Vergleiche mit Reinsubstanzen nicht ohne Vorbehalte möglich sind (s. Kapitel 2.2.2.). Allerdings stellten Lourenço et al. [39] und Leiber et al. [18] auch bei der Verwendung von Quercetin bzw. Rutin als Reinsubstanzen eine Erhöhung der Konzentration von KKFS fest, was ebenfalls nicht für eine Hemmung der mikrobiellen Prozesse im Pansen spricht. Leiber et al. [18], die analog zu der vorliegenden Arbeit ebenfalls nur Heu als Substrat verwendeten und zusammen mit Rutin inkubierten, fanden des Weiteren heraus, dass Rutin (5 bzw. 500 µmol Quercetinäquivalente/l) eine Stimulation der Gasbildung bewirkte. Diese, so stellte sich heraus, führte nicht zu einer absoluten, sondern lediglich zu einer relativen Reduktion der Methanbildung. Leiber et al. [18] vermuten daher, dass Rutin eventuell als Substrat für die nicht-methanogenen Bakterien diene, so dass der Rückgang der Methanbildung einen Anstieg der CO₂-Produktion bewirkte [18]. Bei der Inkubation von Heu mit Buchweizen, der für seinen hohen Rutingehalt bekannt ist (s. Kapitel 2.2.1.) in der gleichen Studie kam es hingegen zu einer Senkung der Konzentration der KKFS und einem Rückgang der Gasbildung, wobei nicht nur das Verhältnis CH₄ zu CO₂ enger wurde, sondern auch die CH₄-Bildung insgesamt erniedrigt war [18]. Ob der in der vorliegenden Arbeit gemessene Rückgang der Gasbildung nur auf die Reduktion der Methanbildung

zurückzuführen ist oder auch die Bildung von CO₂ betrifft, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht gesagt werden und bedarf somit noch weiterer Untersuchungen.

Auch die praktische Relevanz der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfassten Reduktion der Gasbildung bedarf noch weiterer, vorzugsweise *in vivo* durchgeführter Untersuchungen. Dabei sollten auch Kühe aus unterschiedlichen Leistungsniveaus und -richtungen mit einbezogen werden. Des Weiteren ist zu beachten, dass der Rückgang der Gasbildung in unserer Studie nur bei der Inkubation von Quercetin mit Heu als Substrat auftrat. Dies würde in der Praxis die Aufnahme grundfutterbetonter Rationen mit hohem Heuanteil voraussetzen, was höchstens bei extensiven Produktionsformen (Mutterkuhhaltung), nicht jedoch bei Hochleistungskühen eine Rolle spielen dürfte.

Bezüglich der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche kommt den Ergebnissen der *in vivo*-Versuche eine größere Bedeutung als den *in vitro*-Versuchen zu, da trotz der im Vergleich zu den *in vitro*-Studien deutlich höheren eingesetzten Konzentrationen an Quercetin bzw. Rutin kein Effekt auftrat.

Synopsis und Ausblick

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Bioverfügbarkeitsstudien haben gezeigt, dass Quercetin, appliziert in Form des Glucorhamnosids Rutin, für den Wiederkäuer deutlich besser verfügbar ist als nach Applikation des Quercetin-Aglycons, wobei eine befriedigende Erklärung dafür noch nicht gegeben werden kann. Diese Ergebnisse stehen im klaren Gegensatz zu entsprechenden Befunden bei monogastrischen Spezies wie Schwein, Mensch, Ratte und Hund [58;80;85;106]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei monogastrischen Spezies liegen die Flavonole im Plasma auch beim Wiederkäuer überwiegend in konjugierter Form vor, wobei Quercetin sowohl nach i.r. als auch nach i.v. Applikation die Hauptform im Plasma darstellt. Dieses Ergebnis stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen bei monogastrischen Spezies überein, abgesehen von der Ratte, bei der konjugiertes Isorhamnetin der Hauptmetabolit im Plasma ist [98;99]. Im Hinblick auf die niedrige absolute Bioverfügbarkeit von Quercetin kommt die Frage auf, ob biologische Effekte von Quercetin beim Wiederkäuer erwartet werden können. Diesbezüglich ist zu betonen, dass biologische Effekte nicht zwingend von der Höhe der absoluten Bioverfügbarkeit, sondern von der im Plasma bzw. dem Zielgewebe vorliegenden Konzentration abhängen. So lagen die nach i.r. Applikation von Rutin gemessenen maximalen

Plasmakonzentrationen in Bereichen, die mit denjenigen bei monogastrischen Spezies nach oraler Applikation äquimolarer Mengen des Aglycons vergleichbar sind [95]. Bezüglich der Befunde beim Rind ist des Weiteren zu klären, was mit den systemisch verfügbaren Flavonolen nach der schnellen Eliminierung aus dem Blut geschieht und welche Wirkungen das im Plasma überwiegend in Form von Konjugaten vorliegende Quercetin hat. Diese Fragen können anhand der hier generierten Ergebnisse nicht beantwortet werden, sondern müssen in weiteren Experimenten mit dem Fokus auf Gewebeanalysen und im Folgenden biologische Effekte von Quercetin und seiner Metabolite beim Wiederkäuer evaluiert werden. In diesem Zusammenhang sollte berücksichtigt werden, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Versuchstiere verwendeten, nicht-laktierenden Kühe sich hinsichtlich der Futteraufnahme und Passagezeiten sowie auch im Hinblick auf Metabolisierungsprozesse, Absorption und Bioverfügbarkeit von Quercetin deutlich von Hochleistungskühen unterscheiden können. Somit sollten die im Zuge der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde als erster Anhaltspunkt für die Bioverfügbarkeit von Quercetin beim Wiederkäuer angesehen werden.

Die Ergebnisse zum Einfluss von Quercetin auf Fermentationsprozesse haben die bisherigen Erkenntnisse früherer Studien zumindest teilweise bestätigt. Demzufolge ergab sich, abgesehen von einem leichten Rückgang der Gasbildung bei Inkubation von Heu mit Quercetinzusatz, kein Effekt durch Quercetin auf die Fermentation. Basierend auf diesen sowie den bisherigen Kenntnissen zur Wirkung von Quercetin ist daher zu klären, ob die Gesamtgasproduktion gehemmt wurde oder ob die Hemmung nur die Methanbildung betraf. Trifft letzteres zu könnte eine Supplementierung von Quercetin bei der Kuh mit dem Ziel erfolgen, die Effizienz der Futterenergie zu steigern und so auch die Umweltbelastung durch CH₄ zu senken [162;163]. Unter Praxisbedingungen wäre der Einsatz von Quercetin als Supplement beim Wiederkäuer also nur dann sinnvoll, wenn mögliche, im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersuchte bzw. nachgewiesene „gesundheitsfördernde“ Effekte nicht mit deutlichen negativen Effekten auf die Fermentation in den Vormägen einhergehen. Diesbezüglich wäre die Durchführung weiterer Versuche sinnvoll, in denen der Einfluss von Quercetin auf die Bildung von CO₂ und CH₄ differenziert betrachtet werden sollte.

Die Tatsache, dass Quercetin natürlicherweise überwiegend in Form von Glycosiden vorkommt und die Applikation des Glucorhamnosids Rutin zu einer höheren Bioverfügbarkeit gegenüber dem Quercetin-Aglycon, *in vitro* und *in vivo* jedoch nicht zu einer negativen

Beeinflussung der Fermentation geführt hat, spricht allerdings für einen unbenklichen Einsatz dieser Substanz *in vivo*.

6. Zusammenfassung

Die Bioverfügbarkeit des Flavonols Quercetin wurde bei monogastrischen Spezies aufgrund seiner zahlreichen postabsorptiven gesundheitsfördernden Effekte umfangreich untersucht, wohingegen beim Wiederkäuer keine diesbezüglichen Kenntnisse vorliegen. Es kann jedoch vermutet werden, dass auch beim Wiederkäuer bei ausreichender systemischer Verfügbarkeit von Quercetin ähnliche Wirkungen auftreten. Allerdings könnten aufgrund von bakteriziden bzw. bakteriostatischen Wirkungen von Quercetin Fermentationsprozesse in den Vormägen auch negativ beeinflusst werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die relative Bioverfügbarkeit von Quercetin sowie dessen Einfluss auf die ruminale Konzentration kurzkettiger Fettsäuren (KKFS) und deren molares Verhältnis an pansenfistulierten, nicht-laktierenden Kühen (n = 4 bzw. 5) nach intraruminaler (i.r.) Applikation von Quercetin in Form des Aglycons bzw. seines Glucorhamnosids Rutin (0, 10 bzw. 50 mg Quercetinäquivalente/kg Körpermasse (KM)) zu bestimmen. Zur Berechnung der absoluten Bioverfügbarkeit wurden des Weiteren 0,8 mg Quercetinäquivalente/kg KM intravenös appliziert (n = 2). Zusätzlich wurde *in vitro* (Hohenheimer Futterwerttest = HFT) der ruminale Abbau von Quercetin (100 µmol/l) sowie dessen Einfluss (0, 50 bzw. 100 µmol Quercetinäquivalente/l als Aglycon bzw. Rutin) auf die ruminale Gasbildung bei Verwendung von Milchleistungsfutter und/oder Heu als Substrate untersucht.

Sowohl nach i.r. Applikation des Aglycons als auch von Rutin konnten im Plasma Quercetin und seine Metabolite mit intakter Flavonolstruktur (Kämpferol und die methylierten Derivate Isorhamnetin und Tamarixetin) überwiegend in konjugierter Form (Glucuronide/Sulfate) nachgewiesen werden, wobei konjugiertes Quercetin dominierte. Allerdings war die relative Bioverfügbarkeit von Quercetin (Summe aus konjugiertem und nicht-konjugiertem Quercetin, Kämpferol, Isorhamnetin und Tamarixetin = Gesamtflavonole) nach i.r. Rutinapplikation um das ca. Achtfache höher als nach Applikation des Aglycons. Die absoluten Bioverfügbarkeiten nach Applikation des Aglycons bzw. von Rutin betragen 0,1 bzw. 0,5 %. Diese Befunde stehen im Widerspruch zu publizierten Daten bei monogastrischen Spezies, bei denen die Bioverfügbarkeit von Quercetin nach Applikation des Aglycons wesentlich höher als nach Rutinapplikation ist. Trotz der niedrigen absoluten Bioverfügbarkeit sind die nach i.r. Rutinapplikation gemessenen maximalen Plasmakonzentrationen der

Gesamtflavonole bei der Kuh durchaus mit denjenigen vergleichbar, die nach oraler Applikation des Aglycons bei monogastrischen Spezies auftreten.

Nach i.r. Applikation des Aglycons bzw. von Rutin wurde weder die Gesamtkonzentration noch das molare Verhältnis der KKFS im Pansen beeinflusst, wohingegen *in vitro* der Zusatz des Aglycons, nicht aber von Rutin, die Gasbildung signifikant reduzierte (8-9 % nach 48 h). Dieser Effekt trat allerdings nur bei Verwendung von Heu als Substrat auf. Im HFT konnte ferner ein schneller und umfangreicher mikrobieller Abbau von Quercetin gezeigt werden, der mit der Bildung zweier Metabolite (3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, 4-Methylcatechol) einherging.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen klar, dass bei der Kuh im Unterschied zu monogastrischen Spezies Quercetin aus Rutin wesentlich besser als nach Applikation des Aglycons systemisch verfügbar ist, wobei die Gründe für diesen Befund noch unklar sind. Des Weiteren kann gefolgert werden, dass die ruminale Fermentation zumindest bei den hier eingesetzten Konzentrationen durch Rutin nicht beeinflusst wird und daher eine Applikation von Rutin auch nicht mit negativen Effekten auf die Verdaulichkeit der organischen Substanz einhergehen dürfte. Obwohl anhand der vorliegenden Untersuchungen keine Aussage über mögliche postabsorptive Effekte von Quercetin gemacht werden können, scheinen trotz der niedrigen absoluten Bioverfügbarkeit von Quercetin auch beim Wiederkäuer aufgrund der mit Befunden von monogastrischen Spezies nach Applikation des Aglycons durchaus vergleichbaren maximalen Plasmakonzentrationen nach Rutinapplikation postabsorptive Effekte möglich.

7. Summary

The bioavailability of the flavonol quercetin has been intensively investigated in monogastric species due to its numerous postabsorptive effects on health, whereas knowledge about bioavailability in ruminants does not exist. It can be assumed, however, that in case of sufficient systemic availability of quercetin, similar effects in ruminants are likely. It has to be kept in mind, however, that due to the antimicrobial effects of flavonols, fermentation processes in the forestomachs might be negatively influenced. Therefore, the aim of the present study was to determine the relative bioavailability of quercetin and its influence on ruminal concentrations of short chain fatty acids (SCFA) and their molar ratio in rumen-fistulated, non-lactating cows (n = 4 or 5, respectively) after intraruminal (i.r.) application of quercetin as aglycone or its glucorhamnoside rutin (0, 10 or 50 mg quercetin equivalents/kg body weight (BW)). For calculation of absolute bioavailability, 0.8 mg quercetin equivalents/kg BW were applied intravenously (n = 2). Additionally, ruminal degradation of quercetin (100 $\mu\text{mol/L}$) and its influence (0, 50 or 100 μmol quercetin equivalents/L, respectively, either applied as aglycone or as rutin) on ruminal gas production using concentrate and/or hay as substrates were investigated *in vitro* (Hohenheim Gas Test = HGT). After application of both forms, the aglycone as well as rutin, quercetin and its metabolites with intact flavonol structure (kaempferol and its methylated derivatives isorhamnetin and tamarixetin) could be detected in plasma mainly as conjugates (glucuronides/sulfates), whereby quercetin was the main form. However, relative bioavailability of quercetin (sum of conjugated and non-conjugated quercetin, kaempferol, isorhamnetin and tamarixetin = total flavonols) after i.r. rutin application was about eightfold higher than after application of the aglycone. Absolute bioavailabilities after application of the aglycone and rutin, respectively, were 0.1 and 0.5 %, respectively. These findings are in contrast to results obtained in monogastric species, where bioavailability of quercetin after application of the aglycone is considerably higher than after rutin application. Despite the low absolute bioavailability, maximal plasma concentrations of total flavonols in cows after i.r. rutin application are comparable to findings obtained in monogastric species after oral application of the aglycone. After i.r. application of the aglycone or rutin, respectively, neither total concentration nor the molar ratio of SCFA in the rumen fluid were influenced, whereas *in vitro* gas production was significantly reduced (8-9 % at 48 h) by the addition of quercetin, but not of rutin. This effect

of the quercetin aglycone, however, was only present using hay as a substrate. In the HGT quercetin was rapidly and extensively degraded, whereby the disappearance of quercetin was accompanied by the simultaneous appearance of two metabolites (3,4-dihydroxyphenylacetic acid, 4-methylcatechol).

The present results clearly demonstrate that in contrast to findings in monogastric species, quercetin from rutin as compared to quercetin aglycone is much better systemically available in cows, whereby the reasons therefor are still unknown. Furthermore it can be concluded from the results of the present study, that ruminal fermentation is not substantially influenced by rutin, at least at concentrations used in the present study; thus, rutin application might not be accompanied by negative effects on the ruminal digestibility of organic substance. Although conclusions about possible postabsorptive effects of quercetin cannot be deduced from the present results, postabsorptive effects appear to be feasible despite low absolute bioavailability, because maximal plasma concentrations after rutin application in cows are comparable to findings in monogastric species after application of the aglycone.

8. Literaturverzeichnis

1. Beecher GR (2003) Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutrition* 133: 3248S-3254S
2. Scalbert A, Williamson G (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition* 130: 2073S-2085S
3. Aherne SA, O'Brien NM (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18: 75-81
4. Kühnau J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics* 24: 117-191
5. Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504
6. Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56: 317-333
7. Ross JA, Kasum CM (2002) Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition* 22: 19-34
8. Shirley BW (1996) Flavonoid biosynthesis: new functions for an old pathway. *Trends in Plant Science* 1: 377-382
9. Williamson G, Day AJ, Plumb GW, Couteau D (2000) Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates. *Biochemical Society Transactions* 28: 16-22
10. Smith GJ, Thomsen SJ, Markham KR, Andary C, Cardon D (2000) The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 136: 87-91
11. Ewald C, Fjelkner-Modig S, Johansson K, Sjöholm I, Akesson B (1999) Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. *Food Chemistry* 64: 231-235
12. DuPont MS, Mondin Z, Williamson G, Price KR (2000) Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3957-3964
13. Besle JM, Viala D, Martin B, Pradel P, Meunier B, Berdagué JL, Fraisse D, Lamaison JL, Coulon JB (2010) Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *Journal of Dairy Science* 93: 2846-2856

14. Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81: 230S-242S
15. USDA (2011) USDA database for the flavonoid content of selected foods-Release 3. http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/12354500/Data/Flav/Flav_R03.pdf. Stand: November 2012
16. Kälber T, Meier JS, Kreuzer M, Leiber F (2011) Flowering catch crops used as forage plants for dairy cows: influence on fatty acids and tocopherols in milk. *Journal of Dairy Science* 94: 1477-1489
17. Amelchanka SL, Kreuzer M, Leiber F (2010) Utility of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) as feed: Effects of forage and grain on *in vitro* ruminal fermentation and performance of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 155: 111-121
18. Leiber F, Kunz C, Kreuzer M (2012) Influence of different morphological parts of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and its major secondary metabolite rutin on rumen fermentation *in vitro*. *Czech Journal of Animal Science* 57: 10-18
19. Greathead H (2003) Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society* 62: 279-290
20. Jouany J-P (2006) Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Animal Reproduction Science* 96: 250-264
21. Patra AK, Saxena J (2010) A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71: 1198-1222
22. Broudiscou L-P, Papon Y, Broudiscou AF (2000) Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology* 87: 263-277
23. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52: 673-751
24. Erlund I (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research* 24: 851-874
25. Agullo G, Gamet-Payraastre L, Manenti S, Viala C, Rémésy C, Chap H, Payraastre B (1997) Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochemical Pharmacology* 53: 1649-1657

26. Gamet-Payrastre L, Manenti S, Gratacap MP, Tulliez J, Chap H, Payrastre B (1999) Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. *General Pharmacology* 32: 279-286
27. Ko WC, Shih CM, Lai YH, Chen JH, Huang HL (2004) Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology* 68: 2087-2094
28. Bernard FX, Sable S, Cameron B, Provost J, Desnottes JF, Crouzet J, Blanche F (1997) Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 992-998
29. Ohemeng KA, Schwender CF, Fu KP, Barrett JF (1993) DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 3: 225-230
30. Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer T, Jerala R (2003) Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306: 530-536
31. Zhai S, Dai R, Friedman FK, Vestal RE (1998) Comparative inhibition of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 by flavonoids. *Drug Metabolism and Disposition* 26: 989-992
32. Bai HW, Zhu BT (2008) Strong activation of cyclooxygenase I and II catalytic activity by dietary bioflavonoids. *Journal of Lipid Research* 49: 2557-2570
33. Bai HW, Zhu BT (2010) Myricetin and quercetin are naturally occurring co-substrates of cyclooxygenases *in vivo*. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 82: 45-50
34. Gnoni GV, Paglialonga G, Siculella L (2009) Quercetin inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat-liver cells. *European Journal of Clinical Investigation* 39: 761-768
35. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK (1999) Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 20: 1945-1952
36. Bodas R, López S, Fernández M, García-González R, Rodríguez AB, Wallace RJ, González JS (2008) *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 145: 245-258
37. Broudiscou L-P, Lassalas B (2000) Effects of *Lavandula officinalis* and *Equisetum arvense* dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen microorganisms in batch culture. *Reproduction Nutrition Development* 40: 431-440

38. Broudiscou L-P, Papon Y, Broudiscou AF (2002) Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial biomass in a dual outflow fermenter. *Animal Feed Science and Technology* 101: 183-189
39. Lourenço M, Cardozo PW, Calsamiglia S, Fievez V (2008) Effects of saponins, quercetin, eugenol, and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continuous culture fermenters. *Journal of Animal Science* 86: 3045-3053
40. Kirchgeßner M, Roth FX, Schwarz FJ, Stangl GI (2008) *Tierernährung*. 12. Aufl. DLG-Verlags-GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
41. Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P (2000) Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology* 56: 3-12
42. Arima H, Ashida H, Danno G (2002) Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66: 1009-1014
43. Cushnie TPT, Hamilton VES, Chapman DG, Taylor PW, Lamb AJ (2007) Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1562-1567
44. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC (1997) Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiology Research* 152: 239-246
45. Cermak R, Breves G, Lüpke M, Wolfram S (2005) *In vitro* degradation of the flavonol quercetin and of quercetin glycosides in the porcine hindgut. *Archives of Animal Nutrition* 60: 1-10
46. Martens H, Breves G (2010) Physiologische Grenzen der Hochleistungskuh. S. 648-652. In: Engerhardt W, Breves G (eds) *Physiologie der Haustiere*. 3. Aufl. Enke Verlag, Stuttgart
47. Kehrli ME, Neill JD, Burvenich C, Goff JP, Lippolis JD, Reinhardt TA, Nonnecke BJ (2006) Energy and protein effects on the immune system. S. 455-471. In: Sejrsen K, Hvelplund T, Nielsen MO (eds) *Ruminant Physiology. Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Niederlande
48. van Knegsel ATM, van den Brand H, Dijkstra J, Kemp B (2007) Effects of dietary energy source on energy balance, metabolites and reproduction variables in dairy cows in early lactation. *Theriogenology* 68: S274-S280

49. Ingvarstsen KL (2006) Feeding- and management-related diseases in the transition cow: physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology* 126: 175-213
50. van Knegsel ATM, van den Brand H, Dijkstra J, Tamminga S, Kemp B (2005) Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. *Reproduction Nutrition Development* 45: 665-688
51. Vernon RG (2005) Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *Journal of Dairy Research* 72: 460-469
52. Kim JH, Kang MJ, Choi HN, Jeong SM, Lee YM, Kim JI (2011) Quercetin attenuates fasting and postprandial hyperglycemia in animal models of diabetes mellitus. *Nutrition Research and Practice* 5: 107-111
53. Rivera L, Moron R, Sanchez M, Zarzuelo A, Galisteo M (2008) Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity* 16: 2081-2087
54. Youl E, Bardy G, Magous R, Cros G, Sejalon F, Virsolvy A, Richard S, Quignard JF, Gross R, Petit P, Bataille D, Oiry C (2010) Quercetin potentiates insulin secretion and protects INS-1 pancreatic b-cells against oxidative damage via the ERK1/2 pathway. *British Journal of Pharmacology* 161: 799-814
55. Hasselblatt A (1992) Glucosestoffwechsel; Insuline; oral wirksame, blutzuckersenkende Arzneimittel-Therapie des Diabetes mellitus. S. 512-527. In: Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (eds) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, Deutschland/Österreich/Schweiz
56. Gasparin FRS, Salgueiro-Pagadigorria CL, Bracht L, Ishii-Iwamoto EL, Bracht A, Constantin J (2003) Action of quercetin on glycogen catabolism in the rat liver. *Xenobiotica* 33: 587-602
57. Gasparin FRS, Spitzner FL, Ishii-Iwamoto EL, Bracht A, Constantin J (2003) Actions of quercetin on gluconeogenesis and glycolysis in rat liver. *Xenobiotica* 33: 903-911
58. Cermak R, Landgraf S, Wolfram S (2003) The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. *The Journal of Nutrition* 133: 2802-2807
59. Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Démigné C, Rémésy C (1999) Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 277: G120-G126

60. Crespy V, Morand C, Besson C, Cotelle N, Vézin H, Démigné C, Rémésy C (2003) The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 284: G980-G988
61. Graefe EU, Wittig J, Mueller S, Riethling AK, Uehleke B, Drewelow B, Pforte H, Jacobasch G, Derendorf H, Veit M (2001) Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *The Journal of Clinical Pharmacology* 41: 492-499
62. Hollman PC, de Vries JH, van Leeuwen SD, Mengelers MJ, Katan MB (1995) Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition* 62: 1276-1282
63. Crespy V, Morand C, Besson C, Manach C, Démigné C, Rémésy C (2002) Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 618-621
64. Piskula MK, Yamakoshi J, Iwai Y (1999) Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Letters* 447: 287-291
65. Wolfram 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. *The Journal of Nutrition* 132: 630-635
66. Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJC, Morgan MRA, Williamson G (1998) Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver β -glucosidase activity. *FEBS Letters* 436: 71-75
67. Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MRA, Williamson G (2000) Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters* 468: 166-170
68. Day AJ, Gee JM, DuPont MS, Johnson IT, 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. *Biochemical Pharmacology* 65: 1199-1206
69. Ioku K, Pongpiriyadacha Y, Konishi Y, Takei Y, Nakatani N, Terao J (1998) β -glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62: 1428-1431
70. Mellor JD, Layne DS (1971) Steroid β -D-glucosidase activity in rabbit tissues. *Journal of Biological Chemistry* 246: 4377-4380
71. Ader P, Blöck M, Pietzsch S, Wolfram S (2001) Interaction of quercetin glucosides with the intestinal sodium/glucose co-transporter (SGLT-1). *Cancer Letters* 162: 175-180

72. Gee JM, DuPont MS, Rhodes MJC, Johnson IT (1998) Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biology and Medicine* 25: 19-25
73. Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT (2000) Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *The Journal of Nutrition* 130: 2765-2771
74. Lambert N, Kroon PA, Faulds CB, Plumb GW, McLauchlan WR, Day AJ, Williamson G (1999) Purification of cytosolic β -glucosidase from pig liver and its reactivity towards flavonoid glycosides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1435: 110-116
75. Arts ICW, Sesink AL, Faasen-Peters M, Hollman PC (2004) The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *British Journal of Nutrition* 91: 841-847
76. Hollman PCH, Bijlsman MNCP, van Gameren Y, Cnossen EPJ, de Vries JHM, Katan MB (1999) The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research* 31: 569-573
77. Bokkenheuser VD, Shackleton CH, Winter J (1987) Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochemical Journal* 248: 953-956
78. Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ (1998) Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Archives of Pharmacal Research* 21: 17-23
79. Hein EM, Rose K, van't Slot G, Friedrich AW, Humpf HU (2008) Deconjugation and degradation of flavonol glycosides by pig cecal microbiota characterized by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 2281-2290
80. Morand C, Manach C, Crespy V, Rémésy C (2000) Quercetin-3-O-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radical Research* 33: 667-676
81. 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. *The Journal of Nutrition* 131: 2109-2114
82. Blaut M, Schoefer L, Braune A (2003) Transformation of flavonoids by intestinal microorganisms. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 73: 79-87
83. Lin YT, Hsiu SL, Hou YC, Chen HY, Chao PD (2003) Degradation of flavonoid aglycones by rabbit, rat and human fecal flora. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26: 747-751

84. Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MRA, Williamson G (2001) Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radical Research* 35: 941-952
85. Reinboth M, Wolffram S, Abraham G, Ungemach FR, Cermak R (2010) Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. *British Journal of Nutrition* 104: 198-203
86. Walle T, Otake Y, Walle UK, Wilson FA (2000) Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *The Journal of Nutrition* 130: 2658-2661
87. Wittig J, Herderich M, Graefe EU, Veit M (2001) Identification of quercetin glucuronides in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 753: 237-243
88. Nielsen SE, Breinholt V, Justesen U, Cornett C, Dragstedt LO (1998) *In vitro* biotransformation of flavonoids by rat liver microsomes. *Xenobiotics* 28: 389-401
89. Otake Y, Hsieh F, Walle T (2002) Glucuronidation versus oxidation of the flavonoid galangin by human liver microsomes and hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 30: 576-581
90. Piskula MK, Terao J (1998) Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *The Journal of Nutrition* 128: 1172-1178
91. Sfakianos J, Coward L, Kirk M, Barnes S (1997) Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *The Journal of Nutrition* 127: 1260-1268
92. Tamura HO, Taniguchi K, Hayashi E, Hiyoshi Y, Nagai F (2001) Expression profiling of sulfotransferases in human cell lines derived from extra-hepatic tissues. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 24: 1258-1262
93. Tilgmann C, Ulmanen I (1996) Purification methods of mammalian catechol-O-methyltransferases. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 684: 147-161
94. Zhu BT, Ezell EL, Liehr JG (1994) Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry* 269: 292-299
95. Ader P, Wessmann A, Wolffram S (2000) Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radical Biology & Medicine* 28: 1056-1067
96. Chen X, Yin OQP, Zuo Z, Chow MSS (2005) Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharmaceutical Research* 22: 892-901

97. Egert S, Wolfram S, Bosy-Westphal A, Boesch-Saadatmandi C, Wagner AE, Frank J, Rimbach G, Mueller MJ (2008) Daily quercetin supplementation dose-dependently increases plasma quercetin concentrations in healthy humans. *The Journal of Nutrition* 138: 1615-1621
98. Manach C, Morand C, Démigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C (1997) Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Letters* 409: 12-16
99. Morand C, Crespy V, Manach C, Besson C, Démigné C, Rémésy C (1998) Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 275: R212-R219
100. Day AJ, Bao Y, Morgan MRA, Williamson G (2000) Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biology and Medicine* 29: 1234-1243
101. Duenas M, Surco-Laos F, González-Manzano S, González-Paramás A, Santos-Buelga C (2011) Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *European Food Research and Technology* 232: 103-111
102. Janisch KM, Williamson G, Needs P, Plumb GW (2004) Properties of quercetin conjugates: modulation of LDL oxidation and binding to human serum albumin. *Free Radical Research* 38: 877-884
103. Justino GC, Santos MR, Canário S, Borges C, Florêncio MH, Mira L (2004) Plasma quercetin metabolites: structure-antioxidant activity relationships. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 432: 109-121
104. Manach C, Morand C, Crespy V, Démigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C (1998) Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Letters* 426: 331-336
105. Spencer JPE, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srai SK, Rice-Evans C (1999) The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Letters* 458: 224-230
106. Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Mäenpää J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A (2000) Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology* 56: 545-553
107. Tamura M, Nakagawa H, Tsushida T, Hirayama K, Itoh K (2007) Effect of pectin enhancement on plasma quercetin and fecal flora in rutin-supplemented mice. *Journal of Food Science* 72: S648-S651
108. Azuma K, Ippoushi K, Ito H, Higashio H, Terao J (2002) Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1706-1712

109. Lesser S, Cermak R, Wolffram S (2004) Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *The Journal of Nutrition* 134: 1508-1511
110. Bieger J, Cermak R, Blank R, de Boer VCJ, Hollman PCH, Kamphues J, Wolffram S (2008) Tissue distribution of quercetin in pigs after long-term dietary supplementation. *The Journal of Nutrition* 138: 1417-1420
111. De Boer VC, Dihal AA, van der Woude H, Arts ICW, Wolffram S, Alink GM, Rietjens IM, Keijer J, Hollman PC (2005) Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *The Journal of Nutrition* 135: 1718-1725
112. Graf BA, Ameho C, Dolnikowski GG, Milbury PE, Chen CY, Blumberg JB (2006) Rat gastrointestinal tissues metabolize quercetin. *The Journal of Nutrition* 136: 39-44
113. Manach C, Texier O, Morand C, Crespy V, Régéat F, Démigné C, Rémésy C (1999) Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radical Biology and Medicine* 27: 1259-1266
114. Bolli A, Marino M, Rimbach G, Fanali G, Fasano M, Ascenzi P (2010) Flavonoid binding to human serum albumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 398: 444-449
115. Boulton DW, Walle UK, Walle T (1998) Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 50: 243-249
116. Papadopoulou A, Green RJ, Frazier RA (2004) Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 158-163
117. Matsukawa N, Matsumoto M, Hara H (2009) High biliary excretion levels of quercetin metabolites after administration of a quercetin glycoside in conscious bile duct cannulated rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73: 1863-1865
118. Mullen W, Edwards CA, Crozier A (2006) Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *British Journal of Nutrition* 96: 107-116
119. Walle T, Walle UK, Halushka PV (2001) Carbon dioxide is the major metabolite of quercetin in humans. *The Journal of Nutrition* 131: 2648-2652
120. Moon YJ, Wang L, DiCenzo R, Morris ME (2008) Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 29: 205-217
121. Ueno I, Nakano N, Hirono I (1983) Metabolic fate of [14C] quercetin in the ACI rat. *Japanese Journal of Experimental Medicine* 53: 41-50

122. Aura AM, O'Leary KA, Williamson G, Ojala M, Bailey M, Puupponen-Pimiä R, Nuutila AM, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K (2002) Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1725-1730
123. Justesen U, Arrigoni E, Larsen BR, Amado R (2000) Degradation of flavonoid glycosides and aglycones during *in vitro* fermentation with human faecal flora. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 33: 424-430
124. Labib S, Erb A, Kraus M, Wickert T, Richling E (2004) The pig caecum model: a suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids. *Molecular Nutrition & Food Research* 48: 326-332
125. Rechner AR, Smith MA, Kuhnle G, Gibson GR, Debnam ES, Srai SK, Moore KP, Rice-Evans CA (2004) Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine* 36: 212-225
126. Schneider H, Blaut M (2000) Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. *Archives of Microbiology* 173: 71-75
127. Cheng K-J, Jones GA, Simpson FJ, Bryant MP (1969) Isolation and identification of rumen bacteria capable of anaerobic rutin degradation. *Canadian Journal of Microbiology* 15: 1365-1371
128. Krishnamurty HG, Cheng K-J, Jones GA, Simpson FJ, Watkin JE (1970) Identification of products produced by the anaerobic degradation of rutin and related flavonoids by *Butyrivibrio* sp. C3. *Canadian Journal of Microbiology* 16: 759-767
129. Krumholz LR, Bryant MP (1986) *Eubacterium oxidoreducens* sp. nov. requiring H₂ or formate to degrade gallate, pyrogallol, phloroglucinol and quercetin. *Archives of Microbiology* 144: 8-14
130. MacDonald IA, Bussard RG, Hutchison DM, Holdeman LV (1984) Rutin-induced beta-glucosidase activity in *Streptococcus faecium* VGH-1 and *Streptococcus* sp. strain FRP-17 isolated from human feces: formation of the mutagen, quercetin, from rutin. *Applied Environmental Microbiology* 47: 350-355
131. Schneider H, Schwiertz A, Collins MD, Blaut M (1999) Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Archives of Microbiology* 171: 81-91
132. Braune A, Gutschow M, Engst W, Blaut M (2001) Degradation of quercetin and luteolin by *Eubacterium ramulus*. *Applied Environmental Microbiology* 67: 5558-5567
133. Kim DH, Han SB, Bae EA, Han M (1996) Intestinal bacterial metabolism of rutin and its relation to mutagenesis. *Archives of Pharmacal Research* 19: 41-45

134. Tsai CG, Gates DM, Ingledew WM, Jones GA (1976) Products of anaerobic phloroglucinol degradation by *Coprococcus* sp. Pe15. Canadian Journal of Microbiology 22: 159-164
135. Winter J, Moore LH, Dowell VRJr, Bokkenheuser VD (1989) C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. Applied Environmental Microbiology 55: 1203-1208
136. Winter J, Popoff MR, Grimont P, Bokkenheuser VD (1991) *Clostridium orbiscindens* sp. nov., a human intestinal bacterium capable of cleaving the flavonoid C-ring. International Journal of Systematic Bacteriology 41: 355-357
137. Schoefer L, Mohan R, Schwiertz A, Braune A, Blaut M (2003) Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. Applied Environmental Microbiology 69: 5849-5854
138. Simpson FJ, Jones GA, Wolin EA (1969) Anaerobic degradation of some bioflavonoids by microflora of the rumen. Canadian Journal of Microbiology 15: 972-974
139. Booth AN, Murray CW, Jones FT, DeEds F (1956) The metabolic fate of rutin and quercetin in the animal body. Journal of Biological Chemistry 223: 251-257
140. Booth AN, Williams RT (1963) Dehydroxylation of caffeic acid by rat and rabbit caecal contents and sheep rumen liquor. Nature 198: 684-685
141. Tsai CG, Jones GA (1975) Isolation and identification of rumen bacteria capable of anaerobic phloroglucinol degradation. Canadian Journal of Microbiology 21: 794-801
142. Patel TR, Jure KG, Jones GA (1981) Catabolism of phloroglucinol by the rumen anaerobe Coprococcus. Applied Environmental Microbiology 42: 1010-1017
143. Baba S, Furuta T, Horie M, Nakagawa H (1981) Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVI: determination of urinary metabolites of rutin in humans. Journal of Pharmaceutical Sciences 70: 780-782
144. Baba S, Furuta T, Fujioka M, Goromaru T (1983) Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVII: urinary metabolites of rutin in rats and the role of intestinal microflora in the metabolism of rutin. Journal of Pharmaceutical Sciences 72: 1155-1158
145. Gross M, Pfeiffer M, Martini M, Campbell D, Slavin J, Potter J (1996) The quantitation of metabolites of quercetin flavonols in human urine. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 5: 711-720
146. Nakagawa Y, Shetlar MR, Wender SH (1965) Urinary products from quercetin in neomycin-treated rats. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 97: 233-241

147. Olthof MR, Hollman PCH, Buijsman MNCP, van Amelsvoort JMM, Katan MB (2003) Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *The Journal of Nutrition* 133: 1806-1814
148. Konishi Y (2005) Transepithelial transport of microbial metabolites of quercetin in intestinal caco-2 cell monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 601-607
149. Naumann C, Bassler R (1997) Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Methodenbuch Band III. VDLUFA Verlag, Darmstadt, Deutschland
150. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597
151. Pfeifer S, P Pfliegel, H-H Borchert (1995) Pharmakokinetische Analyse. S. 135 in *Biopharmazie: Pharmakokinetik–Bioverfügbarkeit–Biotransformation*. 3. Aufl. Ullstein/Mosby GmbH & Co. KG, Berlin/Wiesbaden, Deutschland
152. Zijlstra JB, Beukema J, Wolthers BG, Byrne BM, Groen A, Dankert J (1977) Pretreatment methods prior to gaschromatographic analysis of volatile fatty acids from faecal samples. *Clinica Chimica Acta* 78: 243-250
153. Menke KH, Steingass H (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Health Research Reviews* 28: 7-55
154. Lundh TJH, Pettersson HI, Martinsson KA (1990) Comparative levels of free and conjugated plant estrogens in blood plasma of sheep and cattle fed estrogenic silage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 1530-1534
155. Gohlke, A, CJ Ingelmann, G Nürnberg, S Wolffram, CC Metges (2011) Bioavailability of duodenal administered flavonoids and acute effects on milk yield in high-yielding German-Holstein cows: Preliminary results. 3. COST Feed for Health Conference Copenhagen, Denmark.
<http://www.feedforhealth.org/default.asp?ZNT=S0T1O856>. Stand: November 2012
156. Das S, Rosazza JPN (2006) Microbial and enzymatic transformations of flavonoids. *Journal of Natural Products* 69: 499-508
157. Heider J, Fuchs G (1997) Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *European Journal of Biochemistry* 243: 577-596
158. Saulter JY, Kurian JR, Trepanier LA, Tidwell RR, Bridges AS, Boykin DW, Stephens CE, Anbazhagan M, Hall JE (2005) Unusual dehydroxylation of antimicrobial amidoxime prodrugs by cytochrome b5 and NADH cytochrome b5 reductase. *Drug Metabolism and Disposition* 33: 1886-1893

159. Stack RJ, Hungate RE, Opsahl WP (1983) Phenylacetic acid stimulation of cellulose digestion by *Ruminococcus albus* 8. *Applied Environmental Microbiology* 46: 539-544
160. Stack RJ, Cotta MA (1986) Effect of 3-phenylpropanoic acid on growth of and cellulose utilization by cellulolytic ruminal bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 52: 209-210
161. Allison MJ (1969) Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science* 29: 797-807
162. Garcia-González R, López S, Fernández M, González JS (2006) Effects of the addition of some medicinal plants on methane production in a rumen simulating fermenter (RUSITEC). *International Congress Series* 1293: 172-175
163. Moss AR, Jouany J-P, Newbold J (2000) Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie* 49: 231-253

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei:

Herrn Prof. Dr. Siegfried Wolfram für die Überlassung der Promotionsarbeit und die immerwährende Unterstützung, Betreuung und Zeit für Diskussionen im Zuge der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dr. Silvia Wein für die Hilfe bei der Versuchsplanung und –durchführung und die damit einhergehende medizinische Versorgung der Tiere sowie für die Unterstützung bei der Auswertung und Diskussion der Ergebnisse.

Herrn Dr. Ralf Blank für die Hilfe bei der Versuchsplanung und –durchführung sowie Auswertung und Diskussion der Ergebnisse.

Dem technischen Personal, insbesondere Petra Schulz und Maike Gosse, für die Einweisung in die HPLC-Analytik, die tatkräftige Unterstützung bei den Versuchen sowie die Aufarbeitung und Analytik der zahlreich angefallenen Proben. Des Weiteren Anne Westphal und Wiebke Kühl für ihre bereitwillige Unterstützung bei den Versuchen sowie die Hilfe bei der Aufarbeitung der Proben. Monika Paschke-Beese und Annette Hollmann für die Analytik der Futtermittelproben.

Allen Doktorandinnen und HiWis, die mir bei der Versuchsdurchführung geholfen haben.

Meiner Familie, die mich in meinem Vorhaben immer unterstützt hat, und insbesondere meinen Eltern, ohne die ich mein Studium so nicht hätte durchführen können.

Torben, für seine immerwährende Unterstützung und hilfreichen Worte jederzeit.

Lebenslauf

Laura Marie Berger, geboren am 11. Mai 1984 in Eckernförde, Schleswig-Holstein
Staatangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung

- 1995 - 2004 Kieler Gelehrtenschule, altsprachliches Gymnasium
Abschluss: Abitur
- 08 - 12/2001 Auslandsaufenthalt mit Besuch des Lycée Saint-François-Xavier
in Vannes, Frankreich

Hochschulstudium

- 10/2004 - 10/2007 Studium der Agrarwissenschaften an der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel
Abschluss: Bachelor of Science
- 10/2007 - 03/2008 Studium der Agrarwissenschaften an der Georg-August-
Universität Göttingen
- 04/2008 - 10/2009 Studium der Agrarwissenschaften an der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel
Abschluss: Master of Science

Berufliche Tätigkeit

- 11/2009 – 2/2013 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Tierernährung
und Stoffwechselphysiologie der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel
- 29/01/2013 Promotion im Fach Agrarwissenschaften an der Agrar- und
Ernährungswissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-
Universität zu Kiel

Praktika

- 08 - 09/2005 Praktikum auf einem landwirtschaftlichen Gemischtbetrieb
(Milchvieh, Bullenmast, Schweinmast, Ackerbau) in Ausacker,
Schleswig-Holstein
- 08 - 10/2006 Praktikum auf einem landwirtschaftlichen Milchviehbetrieb mit
Kälbermast in Hvolsvöllur, Island
- 08 - 09/2008 Praktikum in der Redaktion der Top Agrar im Ressort Rind,
Hiltrup (Münster), Nordrhein-Westfalen