

Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität anthocyanreicher Heidelbeerextrakte in verkapselter und unverkapselter Form im Menschen

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern

zur Verleihung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte Dissertation.

D386

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin Dolores Müller

Wissenschaftliche Aussprache: 23.10.2017

Promotionskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Werner Thiel
Erstgutachterin:	Prof. Dr. Elke Richling
Zweitgutachterin:	Prof. Dr. Melanie Esselen

Kaiserslautern 2017

Für meine Familie

And the stars look very different today.

(David Bowie)*

Der experimentelle Teil der Arbeit entstand zwischen Mai 2011 und August 2014 in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Elke Richling im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Technischen Universität Kaiserslautern.

Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung.....	X
Summary	XIII
1. Einleitung.....	1
1.1 Ursachen chronischer Erkrankungen.....	1
1.2 Prävention chronischer Erkrankungen durch sekundäre Pflanzen inhaltsstoffe	2
1.3 Vorkommen von Anthocyanen in Wildheidelbeeren (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.).....	5
1.4 Wirksamkeit von Anthocyanen aus Heidelbeeren im Zusammenhang mit Ursachen chronischer Erkrankungen.....	7
1.5 Bioverfügbarkeit, Metabolismus und Abbau von Anthocyanen	10
1.6 Biologische Wirksamkeit von Anthocyanabbauprodukten	15
1.7 Möglichkeiten zur Modulation der Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität von Anthocyanen.....	17
2. Zielsetzung.....	19
3. Humane Interventionsstudie.....	23
3.1 Konzept der Pilotstudie Teil I: Verzehr von unverkapselten HBE von Probanden ohne Kolon und Probanden mit Kolon.....	23
3.2 Konzept der Pilotstudie Teil II: Verzehr von verkapselten Extrakten (MPK, CPK) von Probanden ohne Kolon und Probanden mit Kolon.....	24
3.3 Spezifikation des Heidelbeerextraktes und der verwendeten Kapsel systeme	25
3.3.1 Heidelbeerextrakt (HBE).....	26
3.3.2 Molkeproteinkapseln (MPK).....	28
3.3.3 Citruspektinkapseln (CPK).....	28
3.4 Studiendesign und Durchführung.....	29
3.5 Bioimpedanzdaten der Studienprobanden.....	31
3.6 Bestimmung der Passagezeiten von Nahrungsmittelinhaltstoffen.....	33
3.7 Mikrobiota der Ileostomaprobanden.....	34
4. Ergebnisse und Publikationen	36
4.1 Bioverfügbarkeit von Heidelbeeranthocyanen (Teil I).....	37
4.1.1 Einleitung	38
4.1.2 Zielsetzung der Studie.....	38
4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	38
4.1.4 Fazit.....	39

4.1.5	Veröffentlichtes Manuskript.....	40
4.2	Bioverfügbarkeit von verkapselten Heidelbeeranthocyanen (Teil II).....	53
4.2.1	Einleitung.....	54
4.2.2	Zielsetzung der Studie.....	54
4.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	55
4.2.4	Fazit.....	55
4.2.5	Veröffentlichtes Manuskript.....	57
4.3	Biologische Aktivität von unverkapselten und verkapselten Heidelbeer anthocyanen (Teil III).....	65
4.3.1	Bestimmung des GSH Status im Vollblut der Probanden.....	66
4.3.2	Bestimmung der DNA-Strangbrüche mittels Comet-Assay im Vollblut der Probanden.....	68
4.3.3	Veröffentlichte Ergebnisse in Zusammenarbeit mit der Partnerforschungsstelle Prof. Doris Marko, Wien.....	74
4.4	Methode zur Bestimmung von Kreatinin aus Urin mittels quantitativer ¹ H - NMR Spektroskopie (Teil IV).....	91
4.4.1	Einleitung.....	92
4.4.2	Zielsetzung der Studie.....	92
4.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	92
4.4.4	Fazit.....	92
4.4.5	Manuskript zur geplanten Veröffentlichung.....	94
5.	Diskussion.....	106
5.1	Bioverfügbarkeit von Anthocyanen.....	106
5.1.1	Bildung von Anthocyanabbauprodukten <i>in vivo</i>	107
5.1.2	Verfügbarkeit von verzehrten Anthocyanen und Bildung von Abbauprodukten im Dünndarm.....	109
5.1.3	Verfügbarkeit von Anthocyanabbauprodukten in der Blutzirkulation und deren Urinausscheidung.....	110
5.1.4	Rolle des Dünndarms bei der Absorption von Anthocyanen und Abbauprodukten.....	111
5.2	Beeinflussung der Bioverfügbarkeit durch Verkapselung.....	113
5.3	Biologische Aktivität von Anthocyanen (verkapselt versus nicht verkapselt).....	116
5.4	Fazit.....	119
6.	Material & Methoden.....	121
6.1	Geräte & Materialien.....	121
6.2	Methoden.....	125
6.2.1	Bestimmung der Transitzeit.....	125

6.2.2	Bestimmung der Mikrobiota.....	125
6.2.3	Glutathion-Bestimmung.....	125
6.2.4	Comet-Assay	127
6.2.5	Analytik von Anthocyanen.....	129
6.2.5.1	Identifizierung von Anthocyanen und Metaboliten (Glucuronide)	129
6.2.5.2	Quantifizierung von Anthocyanen mittels HPLC-UV/VIS und HPLC-DAD	136
6.2.5.3	Quantifizierung von Anthocyanen mittels HPLC-ESI _{pos} -MS/MS.....	138
6.2.6	Analytik von Anthocyanabbauprodukten.....	141
6.2.6.1	Identifizierung von Abbauprodukten	141
6.2.6.2	Quantifizierung von Abbauprodukten mittels HPLC-DAD	143
6.2.6.3	Quantifizierung von Abbauprodukten mittels HPLC-ESI _{neg} -MS/MS	145
6.2.7	Extraktionsmethoden zur Probenvorbereitung.....	150
6.2.7.1	Extraktion der Kapselsysteme	150
6.2.7.2	Extraktion der Dünndarmflüssigkeiten.....	150
6.2.7.3	Festphasenextraktion von Anthocyanen und Abbauprodukten aus Urin.....	154
6.2.7.4	Festphasenextraktion von Anthocyanen und Abbauprodukten aus Plasma	159
6.2.8	Herstellung der Kapseln	163
6.2.8.1	Molkenproteinkapseln (MPK).....	163
6.2.8.2	Citruspektinkapseln (CPK).....	164
7.	Literatur	166
8.	Anhang.....	181
	Danksagung	204
	Akademischer Lebenslauf.....	206
	Eidesstattliche Erklärung	208

Veröffentlichungen

Publikationen

Mueller D., Kelm H., Ullrich S., Noll A., Richling E. (2018) ¹H-NMR based method to quantify creatinine in urine samples from human intervention studies. *Journal of Pharmaceutical Analysis* (eingereicht).

Mueller D., Jung K., Winter M., Rogoll D., Kulozik U., Schwarz K., Richling E. (2018) Encapsulated anthocyanins from bilberries - Effects on bioavailability and intestinal accessibility in humans. *Food Chemistry* 248, 217-224.

Mueller D., Jung K., Winter M., Rogoll D., Melcher R., Richling E. (2017) Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries. *Food Chemistry* 231, 275-286.

Kropat C., **Mueller D.**, Boettler U., Zimmermann K., Heiss E., Dirsch V., Rogoll D., Melcher R., Richling E., Marko D. (2013) Modulation of Nrf2-dependent gene transcription by bilberry anthocyanins in vivo? *Molecular Nutrition and Food Research* 57,545-550.

Mueller D., Schantz M., und Richling E. (2013) Antioxidative Wirksamkeit von unverkapselten bzw. verkapselten Anthocyanen aus Wildheidelbeerextrakt (*Vaccinium myrtillus* L.) *Lebensmittelchemie* 67, 17-56, S. 28.

Mueller D., Triebel S., Rudakovski O., Richling E. (2013) Influence of triterpenoids in apple peel on inflammatory gene expression associated with inflammatory bowel disease (IBD). *Food Chemistry* 139, 339-346.

Chen W., **Mueller D.**, Richling E., Wink M. (2013) Anthocyanin-rich purple wheat prolongs the life span of *Caenorhabditis elegans* by activating the DAF-16/FOXO transcription factor. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 61, 3047-3053.

Mueller D., Schantz M., Richling E. (2012) HPLC analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) and corresponding juices. *Journal of Food Science* 77, C340-345.

Posterpräsentationen & Vorträge

Richling, E. (Referentin) and **Mueller, D.** (Autorin). Encapsulation modulates the bioavailability of anthocyanins and their degradation products. 8th World Congress on Polyphenols Applications 2014, Lissabon, Portugal.

Richling E., Schantz M., Triebel S., Baum M., Mohn C., Triu H-L., **Mueller D.** Does encapsulation modulate the biological activity and bioavailability of anthocyanins? 6th International Conference on Polyphenols and Health 2013, Buenos Aires, Argentinien.

Mueller D., Jung K., Rogoll D., Melcher R., Kulozik U., Schwarz K., Richling E. Encapsulated versus nonencapsulated bilberry anthocyanins – an in vivo study. 3th Luxembourgish Nutrition Conference (Nulux) 2013, Luxemburg.

Mueller, D., Jung, K., , Rogoll, D., Melcher, R., Kulozik, U., Schwarz, K., Richling, E. Welchen Einfluss hat die Verkapselung von Anthocyanen auf die intestinale Verfügbarkeit? 42. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2013, Braunschweig.

Richling, E., **Mueller, D.**, Schantz, M., Oidtmann, J., Mäder, K. Gastrointestinal release of anthocyanins and antioxidative effects of an encapsulated bilberry extract (*Vaccinium myrtillus* L.). 50. Wissenschaftlicher Kongress der DGE 2013, Bonn.

Mueller, D., Schantz, M., Richling, E. Antioxidative Kapazität (in vitro und in vivo) von unverkapselten bzw. verkapselten Anthocyanen aus Wildheidelbeerextrakt (*Vaccinium myrtillus* L.).41. Deutscher Lebensmittelchemikertag 2012, Münster.

Mueller, D., Triebel, S., Richling, E. Influence of terpenoid constituents from apple on inflammatory gene expression. 2th Luxembourgish Nutrition Conference (NULUX) 2011, Mondorf-les-Bains, Luxemburg.

Mueller, D., Richling, E., Hoensch, H. P. Intestinal tumor cells inflammatory products are inhibited by tea flavonoids. 5th Mildred Scheel Cancer Conference 2011, Bonn.

Mueller, D., Weidel, E., Schantz, M., Richling, E. Anthocyanin contents of commercially available red berry juices. 5th International Conference on Polyphenols and Health (ICPH) 2011, Sitges, Spanien.

Mueller D., Richling E. Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität von Heidelbeeranthocyanen (AiF 17039 N) bei BGS-Professoren-Treff 2011, DIL Quakenbrück.

Schantz M., **Mueller, D.**, Richling, E. Bestimmung der Anthocyangehalte frischer Heidelbeeren und Heidelbeersäften mittels HPLC-UV/VIS. 39. Deutschen Lebensmittelchemikertag 2010, Stuttgart.

Auszeichnungen

Best oral presentation:

Richling, E. (Referentin) and **Mueller, D.** (Autorin). Encapsulation modulates the bioavailability of anthocyanins and their degradation products. 8th World Congress on Polyphenols Applications 2014, Lissabon, Portugal.

Posterpreis:

Mueller D., Jung K., Rogoll D., Melcher R., Kulozik U., Schwarz K., Richling E. Encapsulated versus nonencapsulated bilberry anthocyanins – an in vivo study. 3th Luxembourgish Nutrition Conference (Nulux) 2013, Luxemburg.

Naunyn-Schmiedeberg-Preis für klinische Pharmakologie - Posterpreis:

Hoensch, H. (Referent), **Mueller, D.** (Autorin), Richling, E. Down-regulation of inducible inflammatory genes of colon cancer cells by dietary tea-flavonoids. 78. Jahrestagung der DGPT 2012, Dresden.

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ARE	ARE Element (<i>engl. antioxidant response element</i>)
Ara	Arabinose
BE	Heidelbeereextrakt (<i>engl. bilberry extract</i>)
BMI	Body Mass Index
bidest.	Bidestilliert
CAT	Katalase
COMT	Catechol-O-methyltransferase
CPC	Citruspektinkapseln (<i>engl. citrus-pectin capsules</i>)
CPK	Citruspektinkapseln
Cy	Cyanidin
DAD	Diodenarraydetektor
Del	Delphinidin
DNA	Desoxyribinukleinsäure
FG	Frischgewicht
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykolase
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (<i>engl. European Food Safety Authority</i>)
ESI	Electrospray-Ionisierung
GA	Gallussäure
Gal	Galactose
GIT	Gastrointestinaltrakt
Glc	Glukose
Gluc	Glucuronid
GLUT	Glukosetransporter
Gly	Glycosid
GSH	Gluthation
GSR	Gluthationreduktase
GPx	Gluthationperoxidase
HBA	4-Hydroxybenzoesäure
HBAL	4-Hydroxybenzaldehyd
HBE	Heidelbeereextrakt
HCOOH	Ameisensäure
HDL	<i>engl. High Density Lipoprotein</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

IS	Interner Standard
LDL	<i>engl.</i> Low Density Lipoprotein
LOD	Nachweisgrenze (<i>engl. Limit of detection</i>)
LOQ	Bestimmungsgrenze (<i>engl. Limit of quantification</i>)
LPH	Laktase-Phloridzin Hydrolase
MGA	3-O-Methylgallussäure
Mal	Malvidin
MeOH	Methanol
MDA	Malondialdehyd
MPK	Molkeproteinkapseln
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandemmassenspektrometer
<i>m/z</i>	Masse/Ladungsverhältnis
MW	Mittelwert
n.q.	nicht quantifizierbar
Nrf2	Transkriptionsfaktor (<i>engl. nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>)
8-OHdG	8-Hydroxy-2-deoxyguanosine
PCA	Protocatechusäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pel	Pelargonidin
Peo	Peonidin
Pet	Petunidin
PGAL	Phloroglucinolaldehyd
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>engl. reactive oxygen species</i>)
RP	Umkehrphase (<i>engl. reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl. rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SA	Syringasäure
SD	Standardabweichung (<i>engl. standard deviation</i>)
SOD	Superoxiddismutase
SGLT	Natrium abhängiger Glukosetransporter (<i>engl. sodium-depend glucose transporter</i>)
SPE	Festphasenextraktion (<i>engl. solid phase extraction</i>)
SULT	Sulfotransferase
UGT	Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase
UV	Ultraviolett

VA	Vanilinsäure
VIS	Visueller Bereich (Lichtspektrum)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>engl. World Health Organization</i>)
WPC	Molkeproteinkapseln (<i>eng. whey protein capsules</i>)

Zusammenfassung

In der Bevölkerung steigt mit zunehmendem Alter die Inzidenz chronischer Erkrankungen. Eine häufig diskutierte Ursache chronischer Erkrankungen ist oxidativer Stress. Dieser entsteht im Körper, wenn es zu einem Ungleichgewicht zwischen der Bildung und Inaktivierung von sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommt. Diesem Ungleichgewicht können endogene Faktoren (z.B. körpereigenes Glutathion (GSH)) und exogene Antioxidantien (z.B. Flavonoide) entgegenwirken. Epidemiologische Daten zeigen, dass eine Ernährung mit einem hohen Anteil an Flavonoiden präventive Eigenschaften zeigt und mit einem inversen Effekt bezüglich des Risikos chronischer Krankheiten korreliert. Beerenfrüchte (vor allem Wildheidelbeeren) stellen eine wichtige Quelle an diesen Flavonoiden dar. Für die Wildheidelbeere werden neben anderen Polyphenolen hauptsächlich die Anthocyane für deren Wirkung verantwortlich gemacht. Vor allem antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften von Anthocyanen werden derzeit diskutiert. Der Nachteil von Anthocyanen im Vergleich zu anderen Polyphenolen resultiert allerdings aus deren geringen Bioverfügbarkeit. In vielen Studien lag die Bioverfügbarkeit von verzehrten Anthocyanen im Urin meist unter 1%. Ein Grund für die geringe Aufnahme von Anthocyanen ist deren limitierende Stabilität. Im Darm, welcher als Hauptresorptionsort für Anthocyane gilt, liegt ein Milieu von pH 6-8 vor. Unter diesen pH-Bedingungen sind die Strukturen der Anthocyane nur begrenzt stabil. Daraus begründete sich in der Vergangenheit unter anderem das Forschungsziel, Anthocyane aus Heidelbeerextrakt (HBE) mit Hilfe verschiedener Verkapselungstechniken während der Darmpassage zu stabilisieren und gezielt am Wirkort freizusetzen (DFG/AiF-Cluster 1, 2008-2011). Die effektivsten Verkapselungstechniken basierten dabei auf Molkenprotein- und Pektinbasis. *In vitro* konnten durch die Verkapselung im Vergleich zum unverkapselten Extrakt höhere Anthocyankonzentrationen im (simulierten) Dünndarmmilieu erreicht werden. Außerdem zeigte sich *in vitro* keine Verringerung der biologischen Aktivität (ROS, DNA-Strangbrüche, GSH) durch die Verkapselung.

Ziel war es, die bisherigen *in vitro* Ergebnisse zur biologischen Aktivität des HBE (unverkapselt und verkapselt) und der Bioverfügbarkeit der Anthocyane aus dem HBE bzw. Kapselmaterial auf die *in vivo* Situation zu übertragen und zu verifizieren. Die zentralen Fragen waren, in welchem Ausmaß Anthocyane aus HBE, die Bioaktivität beeinflussen können, unverändert in den Dickdarm gelangen, welche Rolle Prozesse der Dickdarmmikrobiota spielen und inwieweit dies durch Stabilisierungs-(Verkapselungs-)Techniken moduliert werden kann. Der Lösungsweg für diese Fragestellungen wurde durch eine humane Pilotstudie an Probanden realisiert. Welchen Einfluss der Darm bezüglich der Bioaktivität und Bioverfügbarkeit von HBE besitzt, kann anhand von Probanden mit intaktem

Gastrointestinaltrakt (GIT) nur limitierend erfasst werden. Aus diesem Grund wurde die Studie zum einen mit Probanden, die ein Stoma am terminalen Ileum besitzen und zum anderen analog mit Kontrollprobanden mit intaktem Kolon durchgeführt. Die Pilotstudie wurde 2011 am Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt und unterteilte sich in zwei Abschnitte. Dabei erfolgte während Teil I die Verabreichung von Heidelbeerextrakt (HBE) und während Teil II die Verabreichung von HBE-beladenen Molkeproteinkapseln (hergestellt durch U. Kulozik, TU München) und HBE-beladenen Citruspektinkapseln (hergestellt durch K. Schwarz, Univ. Kiel), jeweils mit äquimolaren Anthocyankonzentrationen. Durchgeführt wurde die Pilotstudie mit Probanden mit intaktem Gastrointestinaltrakt (mit Kolon) und Ileostomaprobanden (ohne Kolon). Während der Studie wurden von allen Probanden Blut- und Urinproben und von den Ileostomieprobanden zusätzlich Ileostomabeutel gesammelt. Durch den Vergleich der beiden Probandengruppen konnte somit erfasst werden, welchen Einfluss der Dickdarm auf die Bioverfügbarkeit und biologische Aktivität besitzt und inwieweit im Dickdarm gebildete Metabolite für biologische Wirkungen verantwortlich sind.

Nach Heidelbeerextraktverzehr ergaben sich bei Probanden mit intaktem GIT im Vergleich zu Ileostomaprobanden höhere Gehalte an Anthocyanen (Urin 44% und Plasma 79%) und Abbauprodukten (Urin 75% und Plasma 100%). Durch Molkeproteinverkapselung (MPK) und Citruspektinverkapselung (CPK) wurden im Vergleich zum HBE die Gehalte in Dünndarmflüssigkeiten, Urin und Plasma der Probanden moduliert. Die Ausscheidungsmengen über den Urin zeigen, dass die Molkeproteinverkapselung die systemische Konzentration und die Kurzzeitbioverfügbarkeit der Anthocyane erhöhen kann. Nach Citruspektinverkapselung erfolgte eine Modulation und Stabilisierung der intestinalen Anthocyankonzentrationen lokalisiert am Ende des Dünndarms. Die Erfassung der DNA-Schäden zeigte eine tendenzielle Abnahme der DNA-Strangbrüche in den Blutzellen beider Probandengruppen während der Studie nach unverkapseltem HBE-Verzehr. Die stärksten Effekte der Reduzierung oxidativer DNA-Schäden (mit FPG-Behandlung) wurden nach Verzehr des citruspektinverkapselten Extraktes (CPK) in beiden Probandengruppen detektiert. Nach MPK-Verzehr konnten hingegen nur geringe Effekte beobachtet werden. Der GSH-Status der Probanden wurde innerhalb der Studie nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Verkapselung von Anthocyanen deren Bioverfügbarkeit im Vergleich zu nichtverkapselten Anthocyanen modulieren kann, wobei die Bioverfügbarkeit der Anthocyane im Allgemeinen während dieser Studie sehr gering war. Weiterhin wurden Effekte zur antioxidativen Wirksamkeit der verwendeten Extraktssysteme beobachtet. Der Dünndarmmetabolit Phloroglucinolaldehyd wurde als potentielle Wirkkomponente identifiziert (Forschungsstelle II, Wien). Die vorliegenden Ergebnisse werden anhand der Betrachtung der DNA-Schädigung und der ermittelten Plasmakonzentrationen

aber nicht vollständig erklärt. Weitere Anthocyanmetabolite, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, können für die Wirkung des Extraktes verantwortlich sein.

Summary

The incidence of chronic diseases increases with advancing age of the population. A commonly discussed cause of chronic diseases is oxidative stress, which occurs in the body when there is an imbalance between the formation and inactivation of so-called reactive oxygen species (ROS). Endogenous factors (e.g. endogenous glutathione (GSH)) and exogenous antioxidants (e.g. flavonoids) may counteract this imbalance. Epidemiological data suggests that a diet, rich in flavonoids indicates preventive properties and correlates with an inverse effect in respect to the risk of chronic diseases. Berries (especially bilberries) are an important source of these flavonoids. They contain besides other polyphenols high amounts of anthocyanins, which might be responsible for the positive effects of bilberries. Presently, the most discussed properties of anthocyanins include antioxidative and anti-inflammatory properties. However a disadvantage of anthocyanins in contrast to other polyphenols is their low bioavailability. In many studies, the bioavailability of anthocyanins after consumption was usually less than 1%, measured in urine. A reason for the low absorption capacity of anthocyanins might be their limited stability in the gastrointestinal tract. The intestine, comprising a pH milieu of pH 6-8, is regarded as the main site of absorption for anthocyanins. However, under these pH conditions, the stability of the anthocyanins is limited. In previous studies, we focused on stabilizing anthocyanins from bilberry extract (BE) during the intestinal passage by the use of various encapsulation techniques and to trigger a controlled release at the site of action *in vitro* (DFG / AiF cluster 1, 2008-2011). The most effective encapsulation techniques based on whey protein and pectin basis. The encapsulation of bilberry extract increased the amounts of anthocyanins in the (simulated) small intestinal milieu in comparison to non-encapsulated extract. Furthermore, there was no reduction in the level of biological activity (ROS, DNA strand breaks, GSH) by encapsulation.

The objective of our research project was the transfer and confirmation of previous *in vitro* results into the *in vivo* level of the biological activity and bioavailability of anthocyanins from the BE (non-encapsulated and encapsulated). The central questions were how anthocyanins from bilberry extract may affect the biological activity, passing unchanged into the large intestine, which role play fermentative processes of colonic microbiota and how stabilization (encapsulation) techniques might modulate these parameters. The approach of this research project was realized by a human pilot study with human volunteers. The influence of the large intestine on the bioactivity and bioavailability of BE can be addressed by the use of volunteers with healthy gastrointestinal tract, but the data is limited. Furthermore, the study was performed with ileostomy volunteers, who have a terminated artificial small bowel outlet (without the colon, and the effluents from the small intestine can be collected for further

analysis) and with control subjects, with an intact colon. The pilot study was performed at the University Hospital of Wuerzburg in 2011. It was divided into two parts: During the part I of the study, bilberry extract (BE) was administered, while in the part II there was the administration of BE-loaded whey protein capsules (provided by U. Kulozik, TU Munich) and the administration of BE-loaded citrus pectin capsules (provided by K. Schwarz, Univ. of Kiel) each in equimolar anthocyanin amounts. The study was performed with volunteers with an intact gastrointestinal tract and subjects who had an ileostomy outlet (stoma). During the study, blood and urine samples were collected from all subjects; additionally the ileostomy effluents from ileostomy volunteers were collected. The comparison of the two groups of subjects provides data on the influence of the colon on the bioavailability and the biological activity of BE and to what extent colonic metabolites could be responsible for the biological activities.

According to bilberry extract consumption, higher contents of anthocyanins (urine 44% and plasma 79%) and degradation products (urine 75% and plasma 100%) were found in healthy volunteers compared to ileostomist. The contents in small intestinal fluid, urine and plasma of the subjects were modulated by whey protein encapsulation (WPC) and citrus pectin encapsulation (CPC) in comparison to BE. The selected whey protein encapsulation of anthocyanins has increased the short-term systemic bioavailability. After citrus pectin encapsulation the intestinal concentrations of anthocyanins localized in the small intestine were modulated and stabilized. Detection of the DNA damage showed a tendency-specific decrease in the DNA strand breaks in the blood cells of both volunteer groups during the study after unencapsulated BE consumption. The most potent effects of the reduction of oxidative DNA damage (with FPG treatment) were detected after consumption of the citrus pectin-encapsulated extract (CPC) in both groups of subjects. The GSH status of subjects was not influenced within the study.

The bioavailability of the anthocyanins under study was generally low, but the results of this study indicate that the encapsulation of anthocyanins modulates the bioavailability compared to non-encapsulated anthocyanins from bilberry extract. Furthermore, effects on the antioxidative activity of the used extract systems were observed. Phloroglucinolaldehyde, a metabolite of the small intestine was identified as a potential active component (Forschungsstelle II, Wien), but does not completely explain the obtained results on the basis of the analysis of DNA damage and the determined plasma concentrations. Further metabolites of anthocyanins, which have not been investigated in this work, can be responsible for the effect of the extract.

1. Einleitung

1.1 Ursachen chronischer Erkrankungen

Die Wissenschaft beschäftigt sich schon seit einigen Jahren mit ernährungsspezifischen Effekten im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen. Dabei wurde in vielen Studien die Beziehung von Inhaltsstoffen in Nahrungsmitteln und deren potentielle Wirkung auf den menschlichen Organismus untersucht (Hooper et al., 2008; Knekt et al., 2002; Muraki et al., 2013).

Daten des statistischen Bundesamtes in Deutschland zeigen ebenso wie Statistiken der Weltgesundheitsorganisation (WHO), dass die häufigsten Todesursachen nicht ansteckender chronischer Erkrankungen des vergangenen Jahrzehntes auf kardiovaskuläre Erkrankungen, Lungenerkrankungen und Tumorerkrankungen zurückzuführen sind (Statistisches Bundesamt Destatis-Datenbank, 2017). Aufgrund der vermehrten Rate an Neuerkrankungen, adressieren viele wissenschaftliche Studien neben der Ursachenforschung oder Entwicklung spezifischer Arzneimittel auch Methoden zur ernährungsspezifischen Prävention (Krems et al., 2006). Hierzu dienen z.B. nationale Verzehrstudien, die u.a. das Ernährungsverhalten und Körpergewichtangaben von Personen erheben. Diese Studien dienen als Grundlage für die Bewertung gesundheitlicher Risiken im Zusammenhang mit dem Verzehr von Lebensmitteln (Krems et al., 2006). Eine häufig diskutierte Ursache chronischer Erkrankungen ist oxidativer Stress (Waris & Ahsan, 2006). Dieser kann durch verschiedene Ursachen, z.B. Alkylierungsreagenzien, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), UV-Licht, Radio- und Chemotherapie induziert werden (Zhou & Elledge, 2000). Unter oxidativem Stress wird das Ungleichgewicht zwischen der Bildung und Inaktivierung von ROS verstanden (Halliwell & Gutteridge, 2008) und kann zu Schädigungen von Biomolekülen wie der DNA, Proteinen und Lipiden führen (Hollman et al., 2011). Die Oxidation von Nukleinsäuren kann DNA-Strangbrüche erzeugen, wodurch Mutationen entstehen können. Zellspezifische Mechanismen wie den Zellzyklus, apoptotische und transkriptionelle Vorgänge werden dadurch beeinflusst, die zur Entstehung von Inflammationen und Tumoren führen können (Abbildung 1) (Zhou & Elledge, 2000). Die Oxidation von Proteinen kann zu funktionellen Störungen führen, da die Funktion von Enzymen und Strukturproteinen beeinträchtigt sein kann. So kann z.B. bei Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder Diabetes mellitus eine erhöhte Proteinoxidation nachgewiesen werden (Stadtman & Levine, 2000). Die Oxidation von Lipiden kann einen negativen Einfluss auf die Fluidität von Membranen zur Folge haben. Als Ursache für die meisten kardiovaskulären Erkrankungen wird Atherosklerose beschrieben (Palmefors et al. 2014). Hierbei können durch oxidiertes Cholesterin (hauptsächlich dem LDL = engl. Low

Density Lipoprotein) sogenannte Plaques entstehen, welche das arterielle Lumen nachteilig behindern (Hollman et al., 2011).

Diesen negativen Eigenschaften, ausgelöst durch oxidativen Stress, können körpereigene oder körperfremde Mechanismen entgegen wirken. Endogene Faktoren, wie z.B. körpereigenes Glutathion (GSH) und exogene Faktoren, wie z.B. Antioxidantien, können die Bildung von oxidativem Stress verringern (Valko et al., 2007). Auch kann die Zelle durch Mechanismen der DNA-Reparatur Schäden der DNA beseitigen, bevor sich Mutationen manifestieren (Yan et al. 2014).

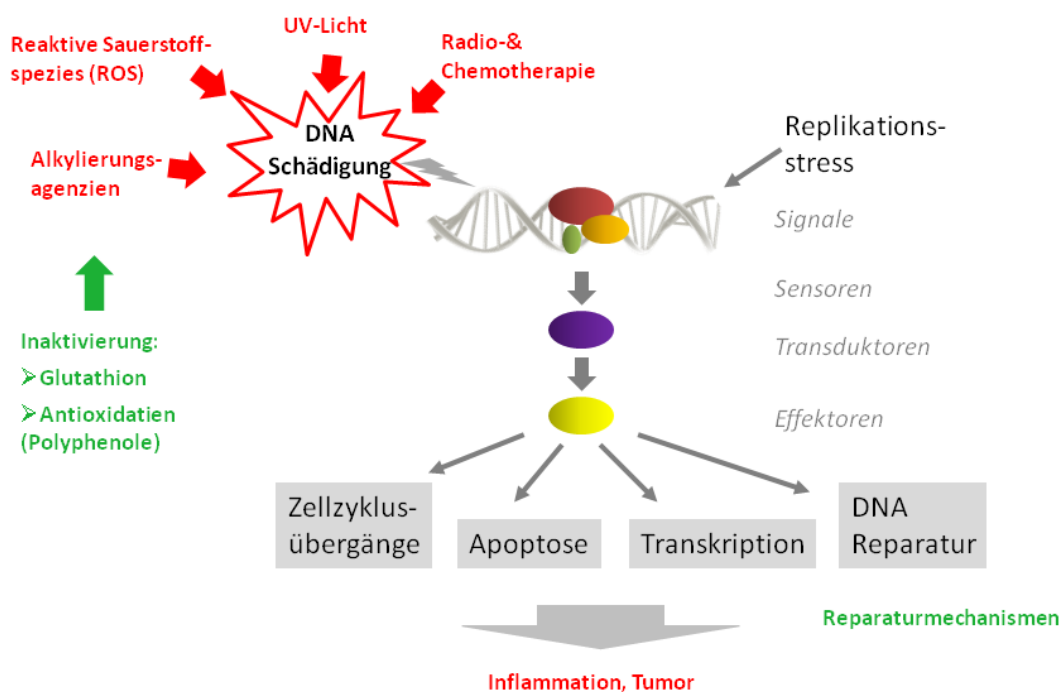


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Auswirkung von DNA-Schädigungen, ausgelöst durch oxidativen Stress auf intrazelluläre Prozesse (modifiziert nach Zhou & Elledge 2000).

1.2 Prävention chronischer Erkrankungen durch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Der mögliche Einfluss exogener Stoffe auf die Inzidenz chronischer Erkrankungen, deren Entstehung im Zusammenhang mit oxidativem Stress steht, kann anhand verschiedener Studien aufgezeigt werden. So zeigten z.B. epidemiologische Studien inverse Effekte bezüglich des Risikos bei der Entstehung chronischer Erkrankungen und dem Verzehr bestimmter Lebensmittel (Hooper et al., 2008; Knekt et al., 2002; Muraki et al., 2013). Zu den

aktiven Inhaltsstoffen in Lebensmitteln werden vor allem die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe gezählt. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe finden sich in allen pflanzlichen Organismen und werden von diesen produziert, um Wechselwirkungen mit ihrer Umwelt zu regulieren. Neben Geschmack, Geruch, Aussehen und Farbe der Pflanze fungieren sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe auch als Schutz gegenüber Fraßfeinden, Viren und Bakterien und werden oft mit einer positiven biologischen Wirkung assoziiert (Bennett & Wallsgrove, 1994). Über den Lebensmittelbereich hinausgehend werden pflanzliche Inhaltsstoffe aufgrund ihrer vielfältigen pharmakologischen Eigenschaften zur Phytopharmakaherstellung genutzt. So beruhen schätzungsweise 40% aller Arzneimittel aktiv auf der Wirkweise von Naturstoffen (Gershenzon & Kreis, 1999).

Polyphenole stellen eine Gruppe sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe dar und zählen zu den wichtigsten ihrer Art. Bezogen auf die gesamte Biomasse sind sie nach den Zuckern die zweithäufigste Gruppe aller organischen Verbindungen (Kuhnert, 2013). Als Polyphenole bezeichnet man Verbindungen mit phenolischen Einheiten, die mehr als zwei Phenolringe tragen (Quideau et al. 2011). Polyphenole werden in verschiedene Untergruppen eingeteilt und zählen zu den in der Natur vorkommenden phenolischen Antioxidantien (Abbildung 2).

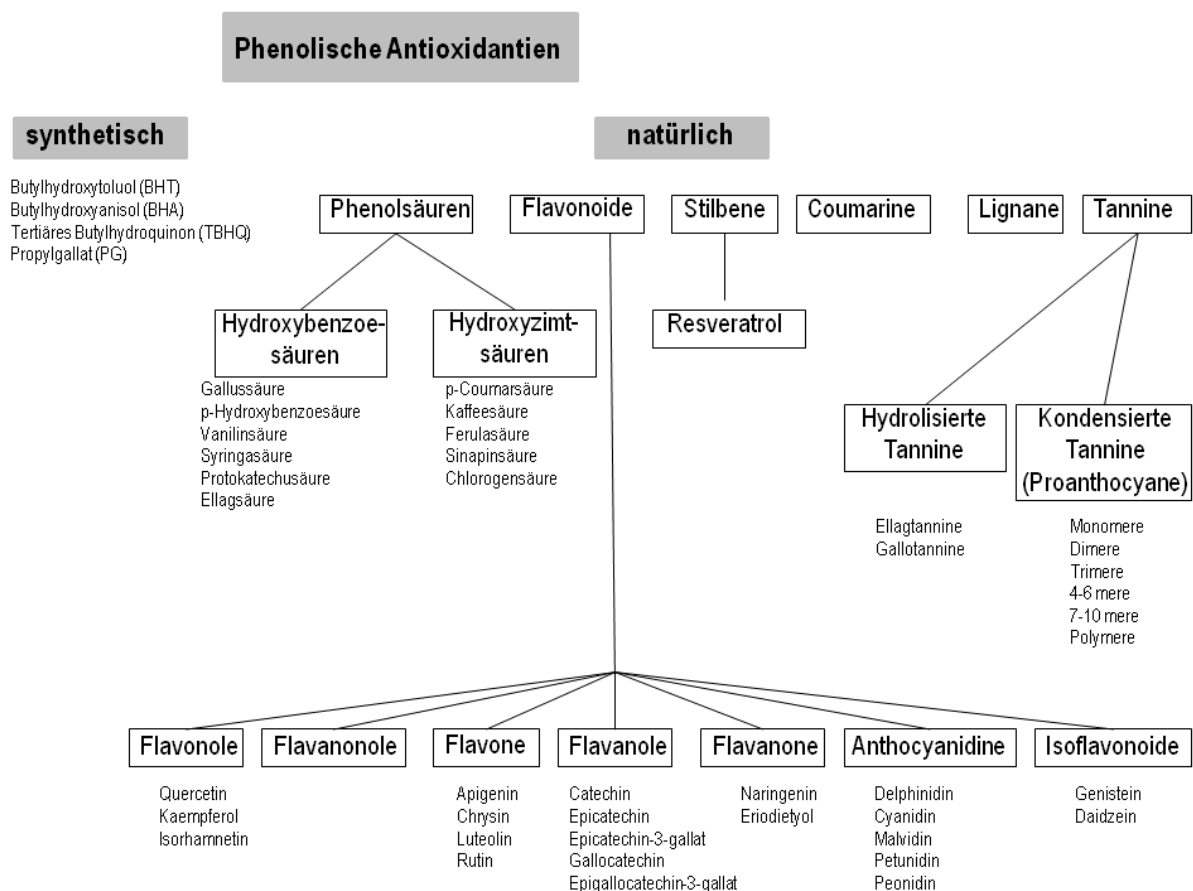


Abbildung 2: Überblick über synthetische und natürlich vorkommende, antioxidativ wirkende phenolische Verbindungsklassen (modifiziert nach Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Neben Phenolsäuren, Stilbenen, Coumarinen, Lignanen und Tanninen werden auch die Gruppe der Flavonoide mit antioxidativen Eigenschaften assoziiert (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Diese zeichnen sich durch ein Flavangrundgerüst aus, welches aus einem Benzopyran, an dem ein Benzolring kondensiert ist, aufgebaut ist (Quideau et al., 2011).

Knekt et al. untersuchten in einer epidemiologischen Kohortenstudie die Modulation des Risikos von chronischen Erkrankungen im Zusammenhang mit einer flavonoidreichen Ernährungsweise (Knekt et al., 2002). Über ein Jahr wurden Ernährungsdaten von über 10.000 finnischen Frauen und Männern gesammelt. Die Daten zeigten, dass eine Ernährung mit einer hohen Flavonoidexposition eine mögliche Verringerung des Risikos von Lungentumoren, Asthma, Diabetes Mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen zur Folge hat (Knekt et al., 2002).

In der Metaanalyse von Hooper et al. wurde der Zusammenhang des Verzehrs von verschiedenen Klassen an Flavonoiden (Anthocyanen, Flavonolen und Flavanonen) und flavonoidreichen Lebensmitteln untersucht und auf deren epidemiologische Evidenz analysiert (Hooper et al., 2008). Über 130 Studien wurden mechanistisch und statistisch auf die Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen verglichen. Vor allem die Biomarker wie Lipoproteine (LDL, HDL: High Density Lipoprotein), Blutdruck und Relaxation der Gefäßwände wurden quantitativ ausgewertet. Auch hier kristallisierte sich ein präventiver Effekt bezüglich des regelmäßigen Verzehrs von Flavonoiden heraus. So konnte ein positiver Einfluss der Flavonoidaufnahme auf den diastolischen Blutdruck gezeigt werden (Hooper et al., 2008).

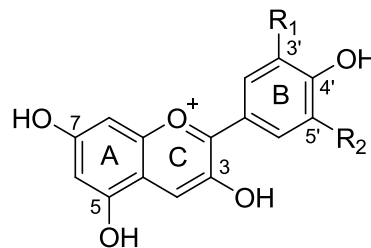
Vor allem Beerenfrüchte stechen aus verschiedenen epidemiologischen Studien hervor. Muaki et al. wiesen innerhalb drei verschiedener Kohortenstudien die stärksten präventiven Effekte bezüglich der Inzidenz an Diabetes Typ II zu erkranken für Heidelbeeren nach. Neben Heidelbeeren wurden weitere Früchte der täglichen Ernährung wie z.B. Trauben, Rosinen, Erdbeeren, Äpfel, Birnen, Bananen, sowie Citrusfrüchte und verschiedene Kernobstsorten betrachtet (Muraki et al., 2013).

Epidemiologische Studien sind ein wichtiges Instrument der Wissenschaft, um Lebensmittel und deren mögliche positive Inhaltstoffe zu ermitteln und bilden somit eine interessante Basis für systematische Studien. Jedoch stößt die Aussagekraft epidemiologischer Daten allerdings auch oftmals an ihre Grenzen. Es sollte nicht nur die eigentliche Ernährungsweise sondern der gesamte Lebensstil der untersuchten Kohorten betrachtet werden. Außerdem kann oft keine Aussage über Dosis-Wirkungseffekte und notwendige Aufnahmedauer gemacht werden. Weiterhin ist auch unklar, welche klinisch relevanten Endpunkte betrachtet werden müssen (Hooper et al., 2008; Knekt et al., 2002).

1.3 Vorkommen von Anthocyanen in Wildheidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.)

Heidelbeeren, vor allem Wildheidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.) enthalten als aktive Substanzen vor allem die flavonoidartigen Anthocyane (Müller et al. 2012), welche bislang insbesondere für deren biologische Wirkung verantwortlich gemacht werden (Atalay et al., 2003; Bermúdez-Soto & Tomás-Barberán, 2004; Kahkonen & Heinonen, 2003; Kay & Holub, 2002; Miller et al., 1996; Rice-Evans & Miller, 1996; Schantz, 2011; Schantz et al., 2010; Triebel et al., 2012). Anthocyane werden in einer Vielzahl von Pflanzen gebildet (Jaakola et al., 2002; Pascual-Teresa & Sanchez-Ballesta, 2008) und sind als natürliche Farbstoffe für die Blau- bis Rotfärbung zahlreicher Früchte, Blüten und Gemüsesorten verantwortlich (Mazza & Miniati, 1993). Cyanidin, Delphinidin, Petunidin, Peonidin, Pelargonidin und Malvidin sind die sechs häufigsten vorkommenden Anthocyanidine (Tabelle 1).

Tabelle 1: Substitutionsmuster der sechs häufigsten vorkommenden Anthocyanidine.



Substitutionsmuster

Anthocyanidin	R ₁	R ₂
Pelargonidin	H	H
Cyanidin	OH	H
Delphinidin	OH	OH
Peonidin	OCH ₃	H
Petunidin	OCH ₃	OH
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃

Als Anthocyanidin (= Aglykon) wird das Molekül ohne Zuckerkomponente bezeichnet. Die Grundstruktur besteht aus drei Ringen, welche durch die Buchstaben A, B und C in der Nomenklatur unterschieden werden. Typisch ist, dass der C-Ring als Flavylium-Kation

vorliegt (Tabelle 1). Die verschiedenen Anthocyanidine unterscheiden sich durch unterschiedliche Reste der Substitution am B-Ring voneinander. Dabei handelt es sich um Wasserstoff, Hydroxy- oder Methoxygruppen. Die in Pflanzen am häufigsten vorkommenden Strukturen sind die Anthocyane, welche durch Glucosilierung der Anthocyanidine an 3- oder 3', 5'- Position mit Glukose, Galaktose, Arabinose, Rhamnose oder Xylose charakterisiert sind (glucosilierte Anthocyanidine = Anthocyane) (Clifford, 2000).

Die folgenden 15 Anthocyane sind in Heidelbeeren enthalten und variieren in fünf verschiedenen Aglyka (Cyanidin, Delphinidin, Malvidin, Peonidin und Petunidin) und drei verschiedenen Zuckerkomponenten (Galaktose, Glukose, Arabinose) (Tabelle 2).

Tabelle 2: Auflistung der 15 wichtigsten vorkommenden Anthocyane in Heidelbeeren.

Anthocyan	Aglykon	Zuckerrest
Cyanidin-3-O-glukosid	Cyanidin	Glukose
Cyanidin-3-O-galaktosid	Cyanidin	Galaktose
Cyanidin-3-O-arabinosid	Cyanidin	Arabinose
Delphinidin-3-O-glukosid	Delphinidin	Glukose
Delphinidin-3-O-galactosid	Delphinidin	Galaktose
Delphinidin-3-O-arabinosid	Delphinidin	Arabinose
Malvidin-3-O-glukosid	Malvidin	Glukose
Malvidin-3-O-galaktosid	Malvidin	Galaktose
Malvidin-3-O-arabinosid	Malvidin	Arabinose
Peonidin-3-O-glukosid	Peonidin	Glukose
Peonidin-3-O-galaktosid	Peonidin	Galaktose
Peonidin-3-O-arabinosid	Peonidin	Arabinose
Petunidin-3-O-glukosid	Petunidin	Glukose
Petunidin-3-O-galaktosid	Petunidin	Galaktose

Heidelbeeren (*Vaccinium*) gehören zur Gattung der Heidegewächse (*Ericaceae*) und können in zwei Klassen eingeteilt werden, die sogenannten Wildheidelbeeren und Kulturheidelbeeren. Vor allem die europäische Wildheidelbeere (*Vaccinium myrtillus* L.) ist mit ca. 1000 mg/100g Frischgewicht reich an Anthocyanen (Mueller et al., 2012). Neben anderen Früchten wie z.B. Preiselbeeren, schwarzen Johannisbeeren oder blauen Weintrauben (Tabelle 3) weisen vor allem Wildheidelbeeren (*Vaccinium myrtillus* L.) hohe Anthocyanengehalte in

frischen Früchten und Säften auf (Mueller et al., 2012). Auch das breite Spektrum an verschiedenen Anthocyanen (siehe Tabelle 2) zeichnet die Heidelbeere als eine der wichtigsten Quellen von Anthocyanen aus (Latti et al., 2008; Müller et al., 2012; Prior et al., 2001).

Tabelle 3: Überblick der Anthocyanengehalte verschiedener Früchte.

Frucht	Spezies	Frischgewicht [mg/100g]	Literatur
Preiselbeere	<i>Vaccinium vitis-idea</i> L.	68	(Kähkönen et al., 2003)
Schwarze Johannisbeere	<i>Ribes nigrum</i>	476	(Wu et al., 2006a)
Blaue Weintraube	<i>Vitis vinifera</i>	73	(Kallithraka et al., 2005)
Heidelbeeren	<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	1017	(Mueller et al., 2012)
	<i>Vaccinium corymbosum</i> L.	438	

1.4 Wirksamkeit von Anthocyanen aus Heidelbeeren im Zusammenhang mit Ursachen chronischer Erkrankungen

Anthocyane werden mit verschiedenen biologischen Wirkungen assoziiert. Verschiedene Studien zeigen deren Antitumoraktivität, antiinflammatorische Aktivität, neuroprotektive Aktivität, Prävention im Zusammenhang kardiovaskulärer Erkrankungen und antidiabetische Aktivität (Khoo et al., 2017; Li et al., 2017). Anthocyane aus Heidelbeeren zeigen in verschiedenen systematischen Studien vor allem antioxidative (Del Bo et al., 2015; Schantz et al., 2011; Spormann et al., 2008; Wu et al., 2004) und antiinflammatorische Eigenschaften (He & Giusti, 2010; Montrose et al., 2011; Triebel et al., 2012). Die antioxidative Wirkung von Anthocyanen ist auf ihre chemische Struktur zurückzuführen. Aufgrund ihres Elektronenmangels (Flavyliumkation) sind sie gegenüber ROS sehr reaktiv (Galvano et al., 2004) und fungieren als Radikalfänger, was durch die Catecholstruktur (*ortho*-Dihydroxysubstitution) am B-Ring begünstigt wird (Terao, 2009).

Schantz et al. konnten die antioxidative Wirkung eines anthocyanreichen Heidelbeerextraktes (HBE) *in vitro* an verschiedenen Darmzellen (Caco-2, HT-29) zeigen (Schantz et

al., 2011). Die signifikante Verringerung von ROS sowie induzierter DNA-Schäden konnte nach der Applikation von HBE in einem Konzentrationsbereich von 5-50 g/ml beobachtet werden. Ebenso wurde in dieser Studie die Konzentration des endogen antioxidativ wirkenden tripeptidischen Glutathions (GSH) erfasst. Die Inkubation von 50 und 500 g/ml HBE führte *in vitro* zu einer Erhöhung des GSH-Status (Schantz et al., 2011). In einer Folgestudie von Juadjur et al. wurde dieser Heidelberextrakt fraktioniert und die einzelnen Fraktionen auf die bei Schantz et al. beschriebenen Biomarker untersucht (Juadjur et al., 2015; Schantz et al., 2011). Es zeigte sich, dass die Reduktion von DNA-Schäden auf den gesamten Extrakt (in seiner originalen Form) und auf die Fraktion aus Phenolcarbonsäuren zurückzuführen war. Der GSH-Status wurde durch den gesamten Heidelbeerextrakt, der Phenolcarbonsäurefraktion und der Polymerfraktion geringfügig erhöht. Die Fraktion aus Anthocyanen zeigte hier keine Effekte (Juadjur et al., 2015). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass nicht nur die eigentlichen Anthocyane für die positive Wirkung von Heidelbeeren verantwortlich sind, sondern auch enthaltene Phenolcarbonsäuren und Polymere.

Die biologische Aktivität von Heidelbeeren wird auch durch verschiedene *in vivo* Daten untermauert (siehe Tabelle 4) (Alvarez-Suarez et al., 2014; Johnson et al., 2015; Kardum et al., 2014; Kuntz et al., 2014; Pandir & Kara, 2014; Spormann et al., 2008; Tulipani et al., 2014; Weisel et al., 2006). Pandir & Kara untersuchten an Ratten die Effekte von Heidelbeeren (*Vaccinium myrtillus L.*) auf Cisplatin-induzierten oxidativen Stress (Pandir & Kara, 2014). Sie zeigten, dass die intraperitoneale Applikation mit Heidelbeeren eine Verringerung von DNA-Schäden, eine Verringerung von Malondialdehyd (MDA, Marker für oxidative Lipidschädigung) und erhöhte Aktivitäten endogener Enzyme wie Superoxiddismutase (SOD), Katalase (CAT) und Glutathionperoxidase (GPx) im Vergleich zur unbehandelten Gruppe zur Folge hatten (Pandir & Kara, 2014). In einer Humanstudie von Weisel et al. konsumierten gesunde Probanden einen roten Mehrfruchtsaft über vier Wochen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die Probanden durch den Verzehr des anthocyanreichen Saftes verringerte oxidative DNA-Schäden im Blut sowie einen signifikanten Anstieg des GSH-Status (Weisel et al., 2006). Vergleichbare Ergebnisse konnten auch an einer Gruppe von Hämodialysepatienten gezeigt werden. Spormann et al. detektierte an dieser Gruppe von Probanden nach vierwöchigem Verzehr eines Fruchtsaftes ebenso eine Verringerung von DNA-Schäden und eine Erhöhung des GSH-Status (Spormann et al., 2008). Eine weitere Humanstudie von Kuntz et al. untersuchte das antioxidative und antiinflammatorische Potential eines anthocyanreichen Fruchtsaftes (Kuntz et al., 2014). Dabei zeigte sich unter anderem, dass die Aktivität der im Plasma vorkommenden Enzyme, Superoxiddismutase und Katalase durch den Verzehr des Fruchtsaftes im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant anstieg und die Konzentration von

Malondialdehyd im Plasma und Urin der Probanden verringert wurde (Kuntz et al., 2014). Eine Auswahl weitere Studien ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: *Ausgewählte Studien zur Wirksamkeit anthocyanreicher Früchte, Extrakte und Säfte auf ausgesuchte Biomarker für oxidativen Stress. (↑ Erhöhung, ↓ Verringerung, SOD: Superoxiddismutase, GPx: Gluthationperoxidase, GSH: Glutathion, MDA: Malondialdehyd, 8-OHdG: 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine) modifiziert nach Del Bo et al., 2015.*

Anthocyan- quelle	Konzentration	Studie	Biomarker	Literatur
Heidelbeerextrakt	5-500 g/ml	<i>in vitro</i> (HT-29, Caco-2)	DNA-Schäden↓ ROS↓ GSH↑	Schantz et al., 2011
Heidelbeeren	200 mg/kg KG Heidelbeeren (10 Tage)	<i>in vivo</i> (Ratte)	MDA↓, SOD↑ CAT↑, GPx↑	Pandir & Kara, 2014
Anthocyanreicher Fruchtsaft	700 ml/d (28 Tage)	<i>in vivo</i> (Mensch)	MDA↓, GSH↑ DNA-Schäden↓	Weisel et al., 2006
Anthocyanreicher Fruchtsaft	200 ml/d (28 Tage)	<i>in vivo</i> (Mensch)	MDA↓, GSH↑ DNA-Schäden↓	Spormann et al., 2010
Saft aus getrockneten Heidelbeeren	22 g getrocknete Heidelbeeren/ 240 ml Wasser (4-8 Wochen)	<i>in vivo</i> (Mensch)	SDO↑	Johnson et al., 2015
Erdbeeren	500g Früchte/d (2-4 Wochen)	<i>in vivo</i> (Mensch)	DNA-Schäden↑	Tulipani et al., 2014
Anthocyanreicher Fruchtsaft	330 ml/d (2 Wochen)	<i>in vivo</i> (Mensch)	SOD↑, CAT↑ MDA↓	Kuntz et al., 2014
Aroniasaft	100 ml/d (3 Monate)	<i>in vivo</i> (Mensch)	SOD↑, GPx↑ MDA↓	Kardum et al., 2014
Erdbeeren	500g Früchte/d (30 Tage)	<i>in vivo</i> (Mensch)	8-OHdG↓ MDA↓	Alvarez-Suarez et al., 2014

1.5 Bioverfügbarkeit, Metabolismus und Abbau von Anthocyanen

Unter dem Begriff Bioverfügbarkeit versteht man den Anteil einer Dosis, der nach Applikation einer Substanz in den Organismus übergeht, bzw. der Anteil der unverändert ins Blut gelangt. Die Bioverfügbarkeit bezeichnet das Verhältnis zwischen der dem Organismus zugeführten und der resorbierten Menge eines Stoffes (Roempp, 2017). Nach intravenöser Gabe liegt die Bioverfügbarkeit bei 100%, da die gesamte Dosis im Blut zur Verfügung steht. Zur Beurteilung der Bioverfügbarkeit wird eine Plasmakonzentration-Zeit-Kurve erstellt, deren Fläche unter der Kurve (AUC engl. area under curve) die Gesamtexposition des Körpers gegenüber dem Wirkstoff aufzeigt (Naidu et al., 2008). Die Orale Bioverfügbarkeit wird nach oraler Gabe einer Substanz mittels Bateman-Funktion der Plasmakonzentration-Zeit-Kurve dargestellt (Garrett, 1994), wobei die AUC meist geringer im Vergleich zur intravenösen Gabe ist. Durch orale Gabe gelangt die Substanz nicht sofort in den Blutkreislauf, sondern muss erst durch den Magen-Darm-Trakt resorbiert werden. Der Vergleich der Bioverfügbarkeit nach intravenöser Gabe mit der oralen Bioverfügbarkeit stellt die absolute Bioverfügbarkeit dar (Naidu et al., 2008). Im Folgenden wird von der Bioverfügbarkeit von Anthocyanen im Sinne deren oralen Bioverfügbarkeit gesprochen. Die prozentualen Angaben der Bioverfügbarkeit beziehen sich auf die verzehrte Ausgangsmenge an Anthocyanen. Von einer absoluten Bioverfügbarkeit kann im Folgenden nicht gesprochen werden, da in den beschriebenen Studien keine intravenöse Injektion der Anthocyane möglich war. Neben Plasmagehalten wird in vielen Studien mit Anthocyanen auch deren Urinausscheidung in Zusammenhang mit der Bioverfügbarkeit betrachtet (Felgines et al., 2003; Felgines et al., 2005; Gonzalez-Barrio, Borges et al., 2010; Wiczowski et al., 2010). Anthocyane, welche über die Niere im Urin ausgeschieden werden, müssen zuvor den systemischen Kreislauf erreicht haben. Allerdings kann die Bioverfügbarkeit per Definition nicht über die Elimination des Urins erfolgen, da die Niere nicht der einzige Eliminationsweg dieser Verbindungen darstellt (Czank et al., 2013). Weiterhin können in der Niere die Ausgangsverbindungen durch den Metabolismus strukturell verändert werden (Vanzo et al., 2011).

Die in vielen Studien ermittelten positiven Eigenschaften von Anthocyanen steht deren limitierende Stabilität im alkalischen Bereich und deren geringe Bioverfügbarkeit entgegen (Fernandes et al., 2015; Pascual-Teresa & Sanchez-Ballesta, 2008). Unter physiologischen Bedingungen herrschen in den verschiedenen Bereichen des Gastrointestinaltraktes erhebliche pH-Unterschiede. So erfahren die Anthocyane während der Passage vom Magen in den Dünndarm einen Anstieg von pH 2 auf pH 6-8, wodurch die Deglykosilierung begünstigt und das Gleichgewicht der Anthocyane in Richtung der ringoffenen, weniger stabilen Chalkone verschoben wird (Pascual-Teresa & Sanchez-Ballesta, 2008). Dies hat

eine geringe Bioverfügbarkeit der Anthocyane zur Folge, wodurch diese nur zu einem limitierenden Anteil unverändert ins Blut gelangen (Cooke et al., 2006; Felgines et al., 2005; Gonzalez-Barrio et al., 2010; Hollands et al., 2008). Tabelle 5 bietet einen Überblick ausgewählter Studien zur Bioverfügbarkeit von Anthocyanen aus verschiedenen Früchten und Säften (Czank et al., 2013; Felgines et al., 2003; Felgines et al., 2005; Kalt et al., 2014; Kay et al., 2005; Mazza, Kay et al., 2002; Milbury et al., 2010; Nurmi et al., 2009; Ohnishi et al., 2006; Vitaglione et al., 2007; Wiczkowski et al., 2010; Wu et al., 2002).

Tabelle 5: *Ausgewählte Humanstudien zur Wiederfindung von Anthocyanen in Urin, gesammelt in verschiedenen Zeitintervallen (modifiziert nach Fernandes et al., 2015).*

Anthocyan- quelle	Verzehrte Anthocyane [mg]	Ausscheidung Urin [%] (Zeitintervall)	C_{max} [nmol/l]	t_{max} [h]	Literatur
Heidelbeersaft	216	0,08 (24 h)	-	-	Kalt et al., 2014
¹³ C ₅ -Cy-3-glc	500	5,37 (48 h)	5970	10,3	Czank et al., 2013
Preiselbeeren	95	0,79 (3 h)	4,64	3	Milbury et al., 2010
Aroniasaft	56	0,25 (24 h)	62,9	2	Wiczkowski et al., 2010
Heidelbeeren/ Lingonbeeren	650	- (48h)	138	1,5	Nurmi et al., 2009
Blutorangesaft	71	1,2 (24 h)	1,9	0,5	Vitaglione et al., 2007
Preiselbeeren	651	5,0 (24 h)	-	-	Ohnishi et al., 2006
Aronia	721	0,15 (24 h)	96,1	2,8	Kay et al., 2005
Brombeere	431	0,16 (24 h)	-	-	Felgines et al., 2005
Erdbeere	77	1,9 (24 h)	-	-	Felgines et al., 2003
Heidelbeere	1200	0,003 (4 h)	29,2	4,0	Mazza et al., 2002
Heidelbeere	690	0,0004 (6 h)	-	-	Wu et al., 2002

Die Wirksamkeit von Substanzen im Organismus wird vor allem durch deren pharmakokinetischen Eigenschaften (Bioverfügbarkeit, Stoffwechsel, Ausscheidung) beeinflusst. Anthocyane, die den systemischen Kreislauf erreichen, werden nicht nur intakt in den verschiedenen Kompartimenten detektiert, sondern können auch metabolisiert bzw. abgebaut werden (Aura et al., 2005) (Abbildung 3). Anthocyane, die über die Mukosa entlang der Magen-Darm-Passage aufgenommen werden, können über das Blut in die Leber oder Niere gelangen und in diesen Kompartimenten metabolisiert werden (Sakakibara et al., 2009). Neben Sulfatierung und Methylierung findet dort hauptsächlich die Glucuronidierung statt (Fleischhut et al., 2006; Kay et al., 2006). Literaturdaten zeigen, dass im Urin neben intakten Anthocyanen vor allem Anthocyanoglucuronide und methylierte Metabolite ausgeschieden wurden (Czank et al., 2013), wobei sulfatierte Anthocyane nur in vereinzelt Studien detektiert wurden (Felgines et al., 2003). Als Hauptabsorptionsort wird der Dünndarm diskutiert (He & Giusti, 2010). Intakte Anthocyane werden aufgrund ihrer Polarität eher nicht passiv über den Dünndarm aufgenommen, sondern benötigen einen spezifischen Transporter. Studien zeigen, dass Anthocyane mittels Natrium-abhängigen Glukosetransporter (SGLT 1) durch die basolaterale Membran ins Blut transportiert werden können (He & Giusti, 2010; Kay, 2006; Müllleder et al., 2002). Alternativ kann auch eine enzymatische Abspaltung des Zuckerrestes unter Freisetzung der unpolaren Spezies erfolgen, welche aufgrund ihrer Hydrophobie durch die basolaterale Membran passiv ohne aktiven Transport diffundieren kann (Kay, 2006).

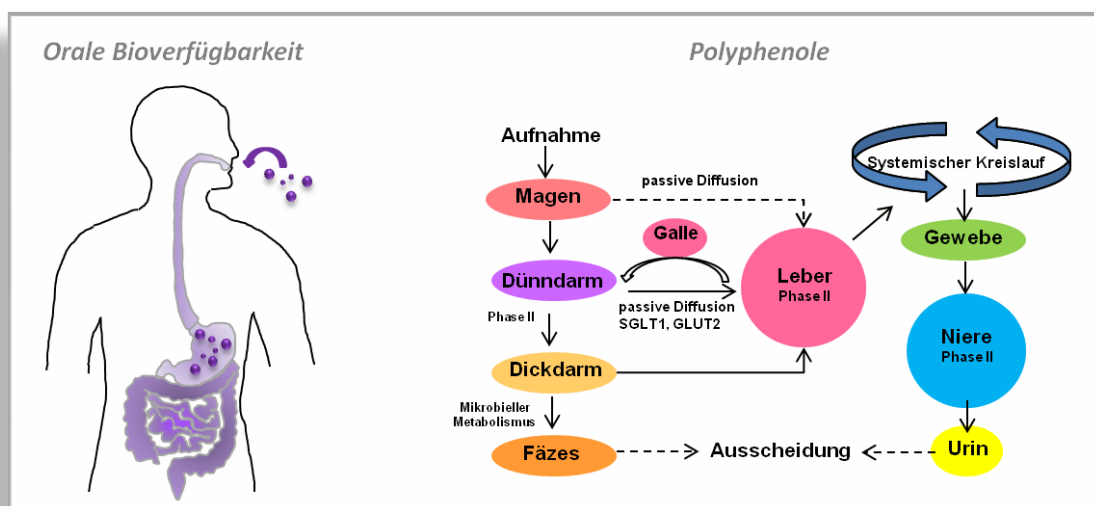


Abbildung 3: Bioverfügbarkeit und Verteilung von Anthocyanen im Organismus (SGLT1: Natrium-abhängiger Glukose Transporter, GLUT2: Glukosetransporter II).

Der Abbau von Anthocyanen erfolgt meist durch die Mikrobiota im Darm (Keppler & Humpf, 2005). Denkbar ist auch, dass intakt ins Blut aufgenommene Anthocyane durch die pH-Bedingungen (pH 7,4) in den A- und B-Ring gespalten werden, aus denen unter anderem Phloroglucinolaldehyd (A-Ring) und die Anthocyanidin-spezifischen Phenolsäuren (B-Ring) entstehen (Felgines et al., 2010; Kay, 2006; Nurmi et al., 2009) (Abbildung 4). In den meisten Studien wird ein großer Anteil der verzehrten Anthocyane nicht resorbiert und in intakter oder abgebauter Form über Fäzes ausgeschieden (He et al., 2005; McGhie & Walton, 2007).

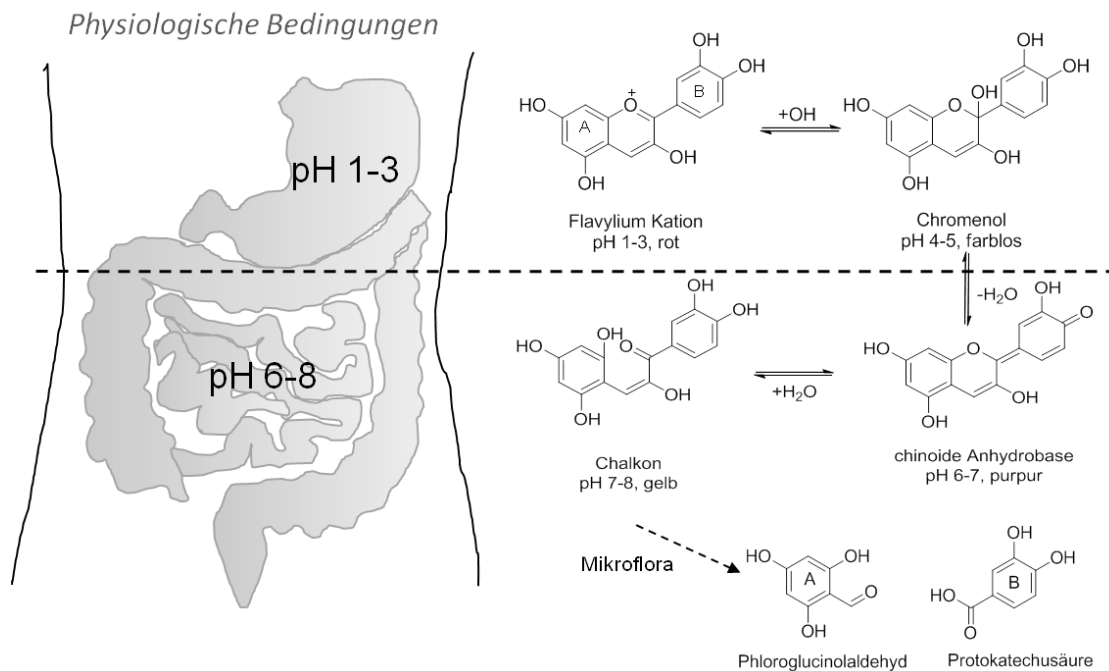


Abbildung 4: Abbau von Anthocyanidinen unter physiologischen pH-Bedingungen (modifiziert nach Mc Gieh et al., 2007, Kay, 2006).

Weitere Faktoren, die Einfluss auf die systemische Verfügbarkeit haben könnten, sind zum einen die physikalischen Faktoren der Molekülgröße, Polarität, die Matrix in der die Substanz vorliegt, Dosierung, Bestandteile, die durch die tägliche Nahrung bereits im GIT vorliegen, sowie inter-individuelle Unterschiede wie Geschlecht, Mikrobiotazusammensetzung, Passagezeit und mögliche Polymorphismen (Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002). Einige Studien zeigten in der Vergangenheit eine geringe Bioverfügbarkeit von <1% der aufgenommenen intakten Anthocyane im Urin von Probanden (Felgines et al., 2005; Gonzalez-Barrio et al., 2010; Hollands et al., 2008). Einher gehen Plasmakonzentrationen meist unterhalb der Bestimmungsgrenzen (Gonzalez-Barrio et al., 2010). Diese Ergebnisse begründen sich analog zu den oben genannten Einflussfaktoren dadurch, dass die meisten Studien ausschließlich die intakten Anthocyane und deren Phase II Metaboliten (Methylierung, Glucuronidierung, Sulfatierung) detektieren. Somit ergibt sich für Anthocyane

meist eine geringere Bioverfügbarkeit im Vergleich zu anderen Strukturen der Flavonoid-Familie (Manach et al., 2005). Obwohl die limitierende Stabilität von Anthocyanen bekannt ist, gibt es nur wenige aktuelle Studien, die die Vielzahl an möglichen Abbauprodukten identifiziert und quantifiziert haben und diese zur Kalkulation der gesamten Bioverfügbarkeit mit berücksichtigen. Eine Studie von Czank et al. betrachtet hierbei den komplexen Abbau von einem einzelnen Anthocyan *in vivo*. Nach der Aufnahme von ^{13}C -markiertem Cy-3-glc konnten bis zu 49 Metabolite und Abbauprodukte mit ^{13}C -Markierung, resultierend aus dem Ausgangsanthocyan, im Menschen detektiert werden (Czank et al., 2013). Die relative Bioverfügbarkeit des intakten Anthocyans einschließlich dessen Metaboliten und Abbauprodukten beträgt in dieser Studie ca. 12% und zeigt, wie vielfältig Anthocyane und deren Metabolite im systemischen Kreislauf vorliegen können (Czank et al., 2013). Diese Daten zeigen, dass je nach Art der Methodik und Betrachtung der Anthocyane und deren Vielzahl an Metaboliten ähnlich hohe Bioverfügbarkeiten im Vergleich zu anderen Gruppen von Polyphenolen (Manach et al., 2005) erreicht werden können. Die meisten bisherigen Studien zeigen dies allerdings nicht, da die Erfassung der komplexen Anthocyanmetabolite eine hohe methodische und analytische Herausforderung bedeutet. Um ein einzelnes Anthocyan und dessen Metabolismuswege *in vivo* verfolgen zu können, ist eine Isotopenmarkierung des Moleküls unabdingbar. Die Generierung dieser isotopenmarkierten Standards mit ausreichender Reinheit ist sehr schwierig, wodurch nur wenige solcher humanen Studien zur Erarbeitung zuverlässiger Ergebnisse existieren.

Anhand der aktuellen Datenlage stellt sich die Frage, in wie weit die Bioverfügbarkeit der Anthocyane bisher meist nur durch Analyse der Hauptstrukturen unvollständig erfasst wurde und welchen Einfluss die Vielzahl an möglichen Abbauprodukten auf die aktive Wirkung haben. Je komplexer das Anthocyanprofil im Nahrungsmittel (oder des daraus hergestellten Extrakts), desto unterschiedlicher und vielfältiger kann sich das Spektrum der gebildeten Metaboliten und Abbauprodukte darstellen. Neben Phase II Metaboliten, den bekannten Abbauprodukten Phenolcarbonsäuren (resultierend aus dem B-Ring) und Phloroglucinolaldehyd sind auch weitere Phenolderivate wie Phenylalkohole, Phenylaldehyde, Phenyl-essigsäuren und Phenylpropionsäuren beschrieben (Cooke et al., 2006; Czank et al., 2013; Felgines et al., 2010; Fleschhut et al., 2006; Mueller et al., 2017; Nurmi et al., 2009; Stalmach et al., Crozier, 2012). Weitere Metabolite dieser Grundstrukturen sind ebenso denkbar wie Anthocyanpolymere oder Chalkonstrukturen, die je nach Bedingungen gebildet werden können (Mueller et al., 2017). Der komplexe Metabolismus und Abbau der Anthocyane gibt somit Anlass nicht nur die intakten Verbindungen nach Verzehr von Anthocyanen in humanen Matrices zu untersuchen, sondern auch die veränderten Strukturen, die durch im Körper vorkommende enzymatische Reaktionen (z.B. Methylierung,

Glucuronidierung, hydrolytische Spaltung) oder nichtenzymatische Reaktionen (z.B. Ringöffnung durch pH-Veränderungen) entstehen können.

1.6 Biologische Wirksamkeit von Anthocyanabbauprodukten

Wie bereits in Kapitel 1.4 beschrieben zeigte die Studie von Juadjur et al., dass die antioxidative Wirkung des eingesetzten Heidelbeerextraktes vor allem auf die Phenolcarbonsäuren zurückzuführen war (Juadjur et al., 2015). In dieser Fraktion konnten 20 Verbindungen wie Quercetin, Myricetin, *p*-Coumarsäure, Phloroglucinolaldehyd, Kaffeesäure, Protocatechusäure, 5-Hydroxyvanillinsäure, Quercetin-rhamnosid, Quercetin-arabinosid, Gallussäure, Epicatechin, Catechin, Coumarsäure-Derivate, Quercetin-Glucuronid, Quercetin-galactosid, Chlorogensäure, Myricetin-glucosid, Myricetin-galactosid und Coumaroyl-iriodid identifiziert werden. Verschiedene Studien zeigen weitere Hinweise, dass neben Anthocyanen auch deren Metabolite und Abbauprodukte für die biologische Wirkung verantwortlich sein können (Cassidy, 2017; Kay et al., 2017; Khoo et al., 2017; Li et al., 2017). Die Datenlage für Anthocyanabbauprodukte und Metabolite ist jedoch limitiert (Kay et al., 2017). Zur Beurteilung der Effekte von Anthocyanabbauprodukten auf die biologische Wirkung können derzeit nur bisherige Studien, welche Verbindungen wie Ferulasäure, Vanillinsäure, Protocatechusäure und Hippursäure betrachteten, herangezogen werden (Kay et al., 2017). Diese Verbindungen werden vor allem mit antiatheriosklerotischen, antidiabetischen, antiinflammatorischen und antikancerogenen Eigenschaften assoziiert (Kakkar & Bais, 2014; Krga et al., 2016; Ou & Kwok, 2004).

Pfeiffer et al. zeigten z.B. die inhibierende Wirkung von Protocatechusäure auf die Entstehung von Tumoren der Speiseröhre bei Ratten (Peiffer et al., 2014). Die Studie von Forester et al. demonstriert, dass Anthocyanmetabolite wie Gallussäure, 3-O-Methylgallussäure und 2,4,6-Trihydroxybenzaldehyd (Phloroglucinolaldehyd) die Viabilität und Apoptose in Caco-2 Zellen beeinflussen (Forester et al., 2014). Auch Kern et al. zeigte eine signifikante Abnahme der Proliferation von HT-29-Zellen nach Inkubation mit Gallussäure (Kern et al., 2007). Warner et al. untersuchten die Effekte verschiedener Anthocyanmetaboliten auf das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül VCAM-1. Dabei wurden die stärksten inhibierenden Effekte für Protocatechusäure beschrieben (Warner et al., 2016).

Verschiedenen Studien zeigen, dass vor allem Getreide reich an Phenolsäuren wie z.B. Ferulasäure, Kaffeesäure, Vanillinsäure, *p*-Coumarsäure, Syringasäure, Protocatechusäure und Gallussäure sind (Álvarez et al., 2006; Masisi et al., 2016; Zhao et al., 2006). Humanstudien, welche die antioxidative Wirkung von verschiedenen Getreidearten untersuchten, können somit als erste Hinweise für die antioxidative Wirkung von Anthocyanabbauprodukten dienen (Tabelle 6). Hierbei ist allerdings zu beachten, dass in verschiedenen

Getreidearten noch weitere aktive Komponenten enthalten sind, und die Matrix sich von anthocyanreichen Früchten und Extrakten unterscheidet. Ein weiterer Nachteil ist, dass die meisten Studien die Wirkkomponenten im Einzelnen nicht identifizieren sondern einen Gesamtphenolgehalt bestimmen (Álvarez et al., 2006; Hsieh et al., 2005; Qingming et al., 2010; Surendiran et al., 2013; Zhang et al., 2009).

Tabelle 6: *Ausgewählte in vivo Studien zur Wirksamkeit phenolreicher Getreidesorten auf ausgewählte Biomarker für oxidativen Stress. (↑ Erhöhung, ↓ Verringerung, SOD: Superoxid-dismutase, GPx: Gluthationperoxidase, GSH: Glutathion, MDA: Malondialdehyd, modifiziert nach Masisi et al., 2016.)*

Phenol- quelle	potentielle bioactive Verbindungen	Studie	Biomarker	Literatur
Hirse	Phenole	<i>in vivo</i> (Maus)	SOD↑ GPx↑ MDA↓	Qingming et al., 2010
Wilder Reis	Phenole	<i>in vivo</i> (Maus)	SOD↑ CAT↑	Surendrian et al., 2013
Roggen	Ferulasäure	<i>in vivo</i> (Ratte)	8-OHdG↓	Hsieh et al., 2005
Weizen	Phenole	<i>in vivo</i> (Maus)	GSH↑ CAT↑ MDA↓	Alvarez et. al., 2006
Weizen	Phenole	<i>in vivo</i> (Ratte)	SOD↑ MDA↓	Zhang et al., 2009

Welche Verbindungen hauptsächlich für die biologische Aktivität von anthocyanreichen Früchten verantwortlich sind, kann derzeit nicht beantwortet werden. Hierzu sind weitere Studien notwendig, die die Effekte von Anthocyanen, deren Metaboliten und Abbauprodukten gegenüberstellen.

1.7 Möglichkeiten zur Modulation der Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität von Anthocyanen

Neben dem möglichen Einfluss gebildeter Abbauprodukte auf die biologische Wirkung von Anthocyanen stellt sich die Frage, inwieweit die Verfügbarkeit der intakten Anthocyane beeinflusst werden kann. Vor allem die Stabilität scheint in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle zu spielen. Verschiedene Verkapselungstechniken bieten die Möglichkeit die Stabilität von Substanzen zu erhöhen. Vor allem im pharmazeutischen Bereich finden diese Techniken ihre Anwendung (Orlu-Gul et al., 2014). Unter Verkapselung versteht man grundsätzlich die kontinuierliche Umhüllung von Substanzen mit Polymermaterialien (wie z.B. Cellulose, Kohlenhydrate, Proteine) (Jyothi et al., 2012). Verschiedene Faktoren können durch solch eine Verkapselung beeinflusst werden. Zu diesen Faktoren zählen Techniken, die z.B. zur Maskierung von unangenehmem Geruch und Geschmack von Substanzen, Schutz vor äußeren Einflüssen (z.B. Sauerstoff, UV-Licht, Feuchtigkeit), Verminderung der Flüchtigkeit von Substanzen, Verringerung der Reizung des Gastrointestinaltraktes, verzögerte Freisetzung oder Beeinflussung des Absorptionsorts dienen (Bansode et al., 2010; Betz & Kulozik, 2011; Tiwari et al., 2012). Auch für den Lebensmittelbereich sind solche Techniken etabliert (Desai & Jin Park, 2005b). So zeigte Desai & Park z.B. eine Verkapselung von Vitamin C mit dem Polysaccharid Chitosan (Desai & Park, 2005a). Vitamin C wird in vielen Lebensmitteln als Konservierungs- und Antioxidationsmittel eingesetzt. Die Ascorbinsäure ist dabei sehr instabil gegenüber Sauerstoff, Feuchtigkeit, Hitze und UV-Licht und wird schnell in inaktive Komponenten umgewandelt (Burdurlu et al., 2006). Eine Verkapselung von Vitamin C mit Chitosan durch Sprühtrocknung kann den Abbaueffekten entgegenwirken und die Stabilität von Vitamin C verlängern, wodurch dessen Einsatzspektrum in der Lebensmittelindustrie verbessert wird (Desai & Jin Park, 2005b).

Die Verkapselung von anthocyanreichen Extrakten kann ein definiertes Mikroumfeld für Anthocyane schaffen. Vor allem der pH-Wert kann durch eine Verkapselung reguliert werden und eine Stabilisierung der Anthocyane bewirken. Auch die gezielte Freisetzung am potentiellen Wirkort (Darm), kann möglicherweise die systemische Bioverfügbarkeit positiv beeinflussen (Betz et al., 2010). Wenige *in vitro* Studien existieren, die den Einfluss der Verkapselung auf die Stabilität und biologische Aktivität von Anthocyanen betrachten (Oehme et al., 2011; Oidtmann et al., 2012; Schantz et al., 2014). Oidtmann et al. untersuchten die Stabilität von verkapselten und unverkapselten Anthocyanen eines Heidelbeerextraktes und zeigten, dass die Verkapselung einen frühzeitigen Abbau der Anthocyane im Dünndarm verhindert. Die Verkapselung basierte auf verschiedenen Materialien zur Umhüllung, wie Pektin-Amid, Schellack und Molkeprotein. Die Konzentration der Anthocyane konnte bis zu 30% im untersuchten simulierten Dünndarmkompartiment durch die Ver-

kapselung erhöht werden. Eine vorzeitige Freisetzung entlang der simulierten Magenpassage konnte nicht verhindert werden (Oidtmann et al., 2012).

Bisher existieren keine *in vivo* Daten, die den Einfluss der Verkapselung von Anthocyanen auf deren systemischen Verfügbarkeit, Stabilität und Metabolismus und deren biologische Aktivität untersuchten. Da *in vitro* Studien auf Modellen basieren und diese nicht die Gesamtheit eines Organismus abbilden können, erfordert es Humanstudien, die die Ergebnisse aus *in vitro* Studien unterstützen und in den physiologischen Zusammenhang stellen.

2. Zielsetzung

Ein zentrales Ziel dieser Dissertation war es, auf der Basis einer humanen Pilotstudie Ansatzpunkte zu erarbeiten, inwieweit ausgewählte Verkapselungstechniken die Stabilität von Heidelbeerextraktinhaltsstoffen am Beispiel der Anthocyane im Verdauungstrakt modulieren und die Bioaktivität und die Bioverfügbarkeit beeinflusst werden kann. Als Basis dieser Humanstudie dienten die Erkenntnisse und die sowohl *in vitro* und *ex vivo* ermittelten Ergebnisse des durchgeführten Vorgängerprojektes.



Abbildung 5: Beteiligung der Forschungsstelle Kaiserslautern am AiF Projekt 15614 N "Verkapselung von Heidelbeer-Anthocyanen" und dem resultierenden Folgeprojekt AiF 170739 N "Bioverfügbarkeit von Heidelbeeranthocyanen".

Im Rahmen eines DFG/AiF-Cluster-Verbundprojekts mit dem Titel „Bioaktive Inhaltsstoffe aus mikrostrukturierten Multikapselsystemen“ (2008-2011) lag der Schwerpunkt auf der Entwicklung neuer Verkapselungstechniken, wobei der verfahrenstechnische Aspekt im Vordergrund stand. Die Forschungsstellen Kaiserslautern und Wien lieferten dabei in ihrem Teilprojekt „Biologische Wirksamkeit von Blaubeer-Anthocyanen im Vergleich zu mikro-/nano-verkapselten Anthocyan-Präparaten: Modulation von intestinaler Verfügbarkeit, Fermentation, antioxidativer Wirksamkeit und Wirkungen auf die DNA-Integrität“ (2008-2011, AiF 15614 N) eine erste Charakterisierung der biologischen Aktivität des Heidelbeerextraktes und entsprechender verkapselter Präparationen. Die biologische Charakterisierung fand dabei ausschließlich in *in-vitro*-Modellsystemen statt (Schantz et al., 2011). Die Untersuchungen wurden an Darmzellkulturen durchgeführt. Das Modell der Darmzelle wurde gewählt, da der Darm eines der ersten Zielgewebe für über die Nahrung aufgenommene

Stoffe darstellt und hohe lokale Anthocyankonzentrationen erreicht werden können. Diese Studien erfassten die Wirksamkeit des verkapselten Heidelbeerextraktes *in vitro* auf zellulärer Ebene und schlossen damit systemische Wirkungen auf den Organismus nicht ein. Des Weiteren wurden im Rahmen dieses Projektes erste *in vitro*-Untersuchungen zur Frage durchgeführt, welchen Einfluss intestinale Prozesse (Magen, Dick- und Dünndarm) auf die Stabilität der Anthocyane in Heidelbeerextrakten mit und ohne Verkapselung besitzen. Diese Untersuchungen wurden in gastromimetischen Modellen *in vitro* und *ex vivo* durchgeführt (Magen- und Dünndarmsimulation und Inkubation mit Ileostomabeutelinhalt).

Nach Abschluss dieses Clusterprojektes blieb jedoch die Frage offen, inwieweit die *in vitro* beobachtete Veränderung der Stabilität anthocyanreicher Heidelbeerextrakte durch Verkapselung auf den menschlichen Organismus übertragbar ist. Des Weiteren wurde nicht beantwortet, ob durch die Verkapselungen die biologische Wirkqualität des Heidelbeerextraktes im Menschen verändert wird. An diese Fragen knüpfte diese Dissertation an. Kern dieser Arbeit war eine kontrollierte Interventionsstudie mit Ileostomieprobanden und gesunden Probanden, die sowohl den unverkapselten Heidelbeerextrakt als auch extraktbeladene Kapselsysteme (auf Basis von Molkeprotein bzw. Citruspektin) verzehren. Diese Dissertation entstand im Rahmen des IGF-Vorhaben AiF 17039 N der Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. ((FEI) AiF Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn), und wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages finanziert. Verschiedene Forschungsstellen waren in Kooperation an der Bearbeitung für dieses Projekt beteiligt (Abbildung 6).

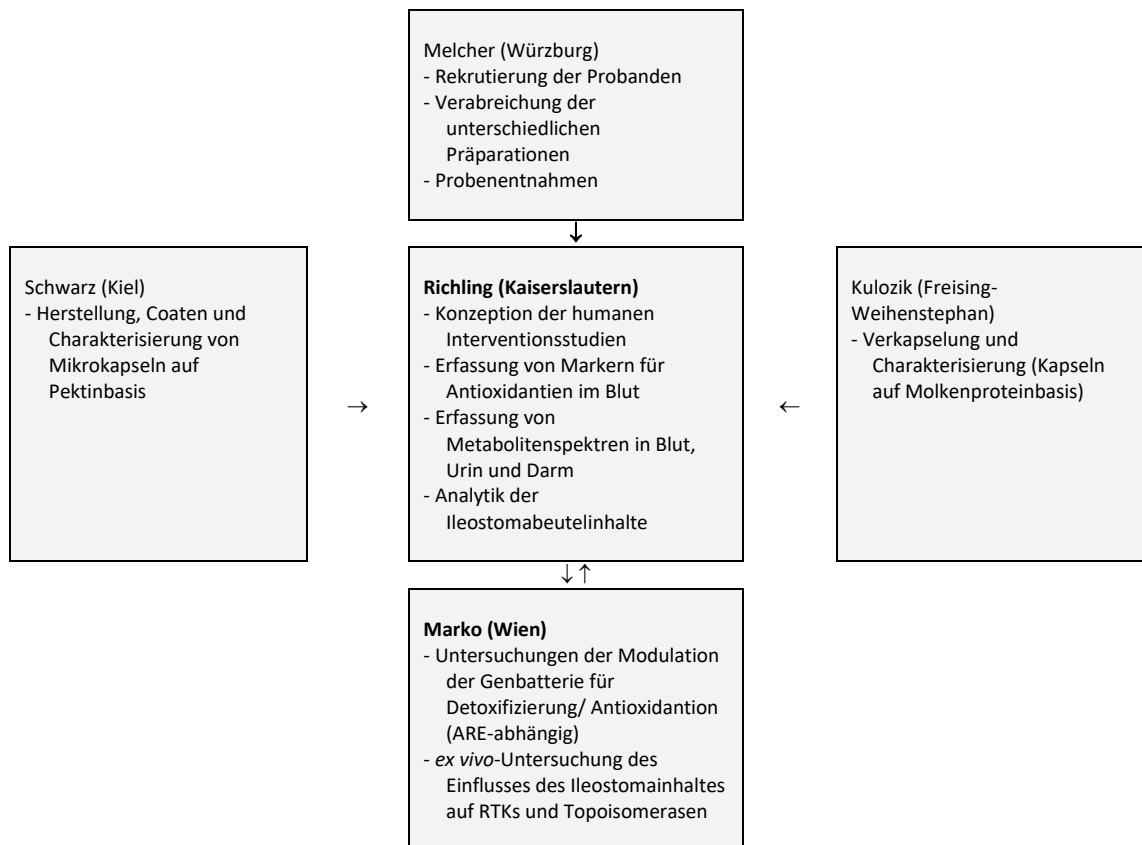


Abbildung 6: Konzeption des Projektes AiF 17039 N - Interaktionen der Forschungsstellen und Leistungen Dritter. Die in der Studie verzehrten Kapseln wurden von der Arbeitsgruppe Schwarz (Kiel) und der Arbeitsgruppe Kulozik (Weihenstephan) hergestellt.

Die Rekrutierung der Probanden und die Durchführung der Interventionsstudie wurden am Universitätsklinikum Würzburg (Arbeitsgruppe Melcher) in Kooperation mit den Forschungsstellen Kaiserslautern und Wien durchgeführt. Der in der Studie eingesetzte Heidelbeerextrakt (HBE) stammt von der Firma Symrise (Holzminden, Deutschland). Die verwendeten Molkenproteinkapseln wurden von der Arbeitsgruppe Kulozik (TU München, D) und die Citruspektinkapseln von der Arbeitsgruppe Schwarz (Univ. Kiel, D) hergestellt. Die Probenverarbeitung, Analytik (HPLC-DAD, HPLC-MS/MS) und Erfassung der Biomarker wurden je nach Kompetenzbereich von den beiden Forschungsstellen Kaiserslautern und Wien bearbeitet.

Folgende Ziele sollten im Rahmen dieser Arbeit von der Forschungsstelle Kaiserslautern erarbeitet werden:

Die Bioverfügbarkeit des unverkapselten HBE sollte anhand der Pilotstudie Teil I erfasst werden. Hierbei sollten die Konzentrationen von verzehrten Anthocyanen in Urin- und Plasmaproben der Probanden mittels HPLC-DAD und HPLC-MS/MS bestimmt werden. Weiterhin sollte ein Screening gebildeter Metabolite und Abbauprodukte mittels HPLC-MS/MS erfolgen. Ebenso sollten die Konzentrationen von Anthocyanen und Abbauprodukten in den Dünndarmausflüssen von Ileostomaprobanden untersucht werden, um Rückschlüsse auf die intestinale Verfügbarkeit der Anthocyane des verzehrten Heidelbeerextraktes zu ziehen.

In Teil II der Pilotstudie sollte der Einfluss der eingesetzten Verkapselungstechniken auf den Heidelbeerextrakt untersucht werden. Hierzu sollten die im Teil I der Studie ermittelten Anthocyane und Abbauprodukten analog in den Urin-, Plasma- und Ileostomaproben der Probanden nach Verzehr der verkapselten Extrakte ermittelt werden. Durch den Vergleich mit den Daten des unverkapselten HBE sollten dadurch die möglichen Effekte der Verkapselung von Anthocyanen auf deren Stabilität, Abbau, intestinale und systemische Verfügbarkeit aufgezeigt werden.

In Teil III der Arbeit sollte die biologische Aktivität sowohl des unverkapselten HBE wie auch der verkapselten Extrakte vergleichend untersucht werden. Als Biomarker zur Beurteilung der Wirksamkeit sollten der Glutathion-Status und die oxidative DNA-Schädigung mittels Comet Assay im Blut der Proben im Rahmen der Pilotstudie Teil I sowie Teil II ermittelt werden. Die Daten sollen zum einen die potentielle Wirksamkeit des reinen Heidelbeerextraktes aufzeigen und zum anderen den Einfluss der verschiedenen Verkapselungstechniken auf dessen Aktivität.

3. Humane Interventionsstudie

3.1 Konzept der Pilotstudie Teil I: Verzehr von unverkapselten HBE von Probanden ohne Kolon und Probanden mit Kolon

Welche Bioverfügbarkeit und antioxidative Wirkung Anthocyane und deren Abbauprodukte nach heutigem Stand der Wissenschaft nach dem Verzehr anthocyanreicher Extrakte im Menschen aufweisen, ist eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit. Ein Lösungsweg für diese Fragestellung wurde durch Teil I der hier beschriebenen Humanstudie beantwortet. Die Humanstudie wurde am Universitätsklinikum Würzburg im Jahr 2011 anhand zweier Probanden Gruppen durchgeführt. Der Ethikantrag (Nr. 32/10) zur Durchführung der Studie erfolgte ebenso durch die Universität Würzburg. Zum einen wurden gesunde Probanden mit intaktem Gastrointestinaltrakt (mit Kolon) gewählt und zum anderen Ileostomaprobanden mit einem künstlichen Dünndarmausgang (ohne Kolon) (Abbildung 7).

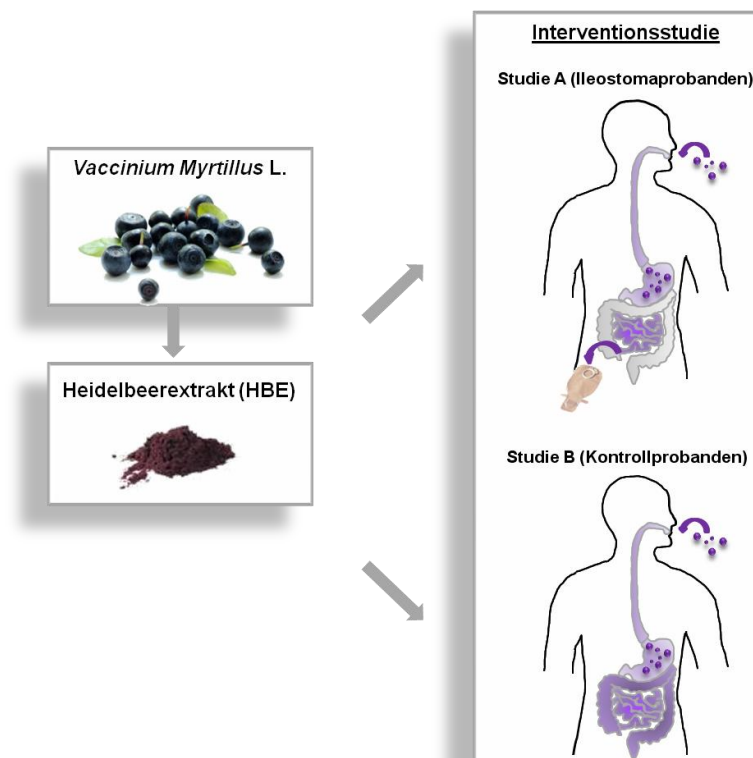


Abbildung 7: Prinzip der Interventionsstudie Teil I - Verabreichung von Heidelbeerextrakt (HBE) an Ileostomaprobanden ohne Kolon (Studie A) Probanden mit Kolon (Studie B).

Die intestinale Verfügbarkeit und der Einfluss des Darms auf die Bioverfügbarkeit und biologische Aktivität kann anhand Probanden mit intaktem GIT nur limitiert erfasst werden.

Aus diesem Grund bedienen wir uns dem Modell der Ileostomaprobanden, bei welchen durch die nichtinvasive Untersuchung der Dünndarmausflüsse während der Studie Rückschlüsse auf die intestinalen Konzentrationen von Anthocyanen und Abbauprodukten möglich sind. In der Pilotstudie Teil I erfolgte zunächst für alle Probanden eine Washout-Phase mit anschließendem Verzehr von unverkapseltem HBE (siehe Abbildung 13, Studiendesign). Die Spezifikation des eingesetzten Extraktes ist in Kapitel 3.3 beschrieben.

3.2 Konzept der Pilotstudie Teil II: Verzehr von verkapselten Extrakten (MPK, CPK) von Probanden ohne Kolon und Probanden mit Kolon

Eine weitere zentrale Frage der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung möglicher Effekte von verschiedenen Verkapselungstechniken auf die Bioverfügbarkeit und biologische Aktivität eines Heidelbeerextraktes. Hierzu wurde analog zu Teil I die Pilotstudie Teil II sowohl an gesunden Probanden wie auch Ileostomaprobanden mit verkapselten Heidelbeerextrakten durchgeführt (siehe Abbildung 13, Studiendesign).

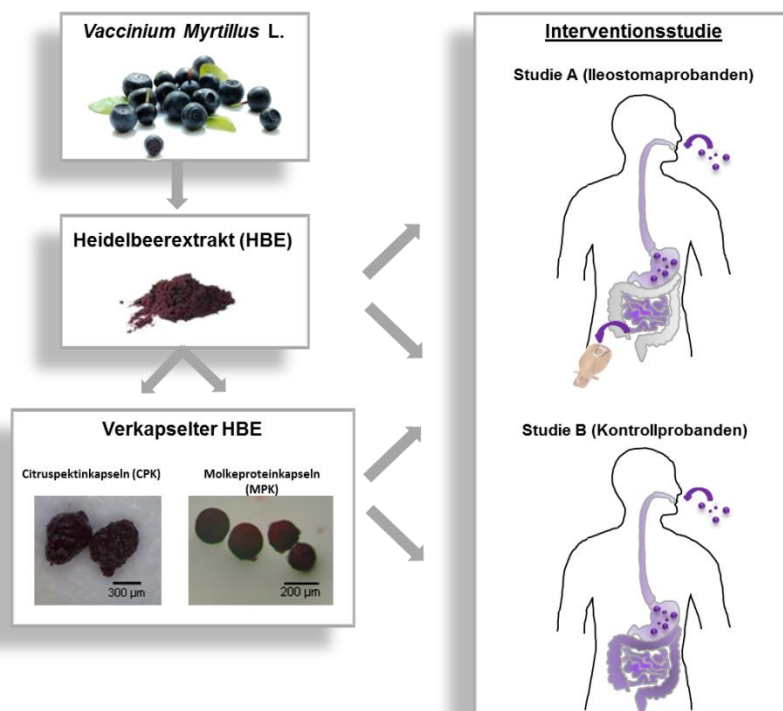


Abbildung 8: Prinzip der Interventionsstudien – Teil I: Verabreichung von Heidelbeerextrakt (HBE), Teil II: Verabreichung von Molkeproteinkapseln (MPK) und Citruspektinkapseln (CPK) an Ileostomaprobanden ohne Kolon (Studie A) und Kontrollprobanden mit Kolon (Studie B).

Während der Studie wurden den Probanden zwei unterschiedliche Kapselarten verabreicht. Zum einen wurde der Heidelbeerextrakt auf Basis von Molkeprotein (MPK) und zum andern auf Basis von Citruspektin (CPK) verkapselt (Abbildung 8). Die Spezifikationen der eingesetzten Kapseln sind in Kapitel 3.3 näher beschrieben.

Durch einen Vergleich der beiden Studien (Teil I und Teil II) konnte erfasst werden, welchen Einfluss der Dickdarm auf Metabolismus, Aufnahmekinetik und biologische (antioxidative responsive element (ARE)-aktivierende) Wirkungen hatte und inwieweit im Dickdarm gebildete Metaboliten für biologische Wirkungen verantwortlich waren. Ebenso konnte der Einfluss der Verkapselung der Anthocyane untersucht werden (Abbildung 9). Die verwendeten HBE-Präparate wurden so verabreicht, dass äquimolare Anthocyanmengen (jeweils 2,4 g Anthocyane) verzehrt wurden und die Ergebnisse bezüglich der Verfügbarkeit und biologischen Wirkung direkt miteinander verglichen werden konnten.



Abbildung 9: Konzept des Forschungsprojektes zum Vergleich der unterschiedlichen Probanden (mit und ohne Kolon) und der unterschiedlichen Extrakte (unverkapselter und verkapselter HBE).

3.3 Spezifikation des Heidelbeerextraktes und der verwendeten Kapselsysteme

In der Interventionsstudie wurden die im Folgenden beschriebenen extraktbeladenen Kapselsysteme im Vergleich mit dem unverkapselten Heidelbeerextrakt am Menschen untersucht.

3.3.1 Heidelbeerextrakt (HBE)

Der in der Studie eingesetzte Heidelbeerextrakt (HBE) stammt von der Firma Symrise (Holz-
minden, Deutschland, Produkt-Nr. 399916, Charge 29). Es handelt sich um einen
dunkelvioletten Extrakt aus Heidelbeertrester, der mittels Ethanolextraktion gewonnen und
anschließend über eine Festphasenextraktion aufgereinigt wurde. Der Anthocyangehalt des
eingesetzten Extraktes betrug laut Herstellerinformationen 25,5 % und wurde über die fünf
Leitverbindungen (Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Malvidin und Peonidin) charakterisiert.
15 verschiedene Anthocyane (3-O-Glykoside), kombiniert aus fünf Anthocyanidinen
(Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Malvidin und Peonidin) sowie drei Zuckerresten (Glucose,
Galactose und Arabinose) konnten in den Extrakten mittels HPLC-DAD nachgewiesen
werden. Weiterhin enthalten waren die bioaktiven Verbindungen Quercetin, Chlorogensäure
und in Spuren freie Anthocyanidine. Eigene analytische Untersuchungen des Heidelbeer-
extraktes sind im Folgenden dargestellt (Mueller et al. 2012, Mueller et al. 2017).

Bestimmung der Anthocyangehalte des unverkapselten HBE

Die Konzentrationen von 15 für die Heidelbeere spezifische Anthocyane (Delphinidin,
Cyanidin, Petunidin, Malvidin und Peonidin mit den Zuckerresten Glucose, Galactose und
Arabinose) wurden bestimmt. Als interner Standard diente Delphinidin-3,5-diglukosid
(Delphin), welches gewöhnlich nicht in der Wildheidelbeere vorkommt (Abbildung 10).

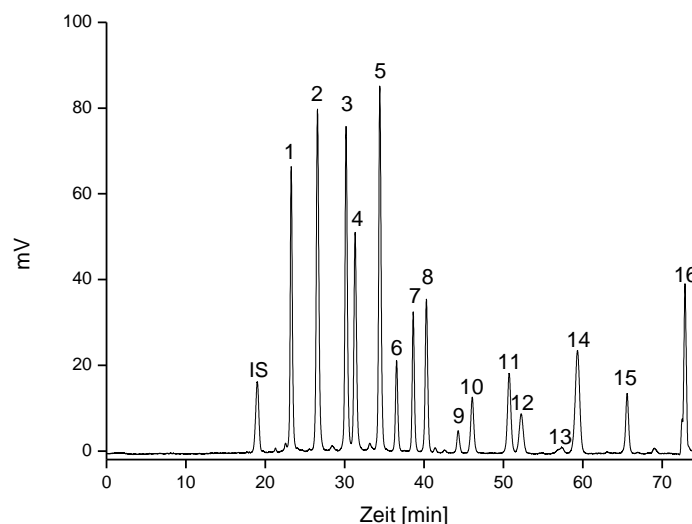


Abbildung 10: HPLC-UV/VIS-Chromatogramm des HBE (500 µg/ml; 520 nm). Delphinidin-3,5-O-
diglukosid (IS: Interner Standard)), Del-3-O-gal (1), Del-3-O-glc (2), Cy-3-O-gal (3),
Del-3-O-ara (4), Cy-3-O-glc (5), Pet-3-O-gal (6), Cy-3-O-ara (7), Pet-3-O-glc (8), Peo-
3-O-gal (9), Pet-3-O-ara (10), Peo-3-O-glc (11), Mal-3-O-gal (12), Peo-3-O-ara (13),
Mal-3-O-glc (14), Mal-3-O-ara (15), Aglyka (16) (Methode siehe Kapitel 6).

Die Kalibrierung der im Extrakt enthaltenen Anthocyanidinglukoside erfolgte als Cyanidin-3-O-glukosid Äquivalente und ist im Kapitel 6 näher beschrieben. Für den Extrakt wurde ein Gesamtanthocyangehalt von 24% ermittelt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammensetzung und Konzentrationen der einzelnen Anthocyane in mg, die in 1 g HBE enthalten sind (n=3).

Anthocyan	Quantifizierung als Cy-3-glc [mg Anthocyane/1 g HBE]
Del-3-gal	25 ± 1
Del-3-glc	37 ± 2
Cy-3-gal	32 ± 1
Del-3-ara	23 ± 1
Cy-3-glc	36 ± 1
Pet-3-gal	7 ± 0,4
Cy-3-ara	11 ± 1
Pet-3-glc	15 ± 1
Peo-3-gal	2 ± 0,2
Pet-3-ara	6 ± 0,4
Peo-3-glc	10 ± 0,4
Mal-3-gal	5 ± 0,1
Peo-3-ara	1 ± 0,1
Mal-3-glc	18 ± 1,1
Mal-3-ara	6 ± 0,4
Gesamtgehalt	236 ± 11

Die prozentualen Anteile der Anthocyane im Heidelbeerextrakt charakterisieren dessen Profil. 15 Anthocyane sind in unterschiedlicher Verteilung im Extrakt enthalten, wobei Delphinidin-3-O-glukosid (15,6%), Cyanidin-3-O-glukosid (15,3%) und Cyanidin-3-O-galaktosid (13,6%) neben Delphinidin-3-O-galaktosid, Delphinidin-3-O-arabinsid und Malvidin-3-O-glucosid die Hauptkomponenten darstellen (Abbildung 11). Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein (Hosseinlan & Beta, 2007; Nyman & Kumpulainen, 2001). Die Gehalte freier Anthocyanidine, Procyanidine und Chlorogensäuren wurden in der Studie von Juadjur et al. quantifiziert (Juadjur & Winterhalter, 2012).

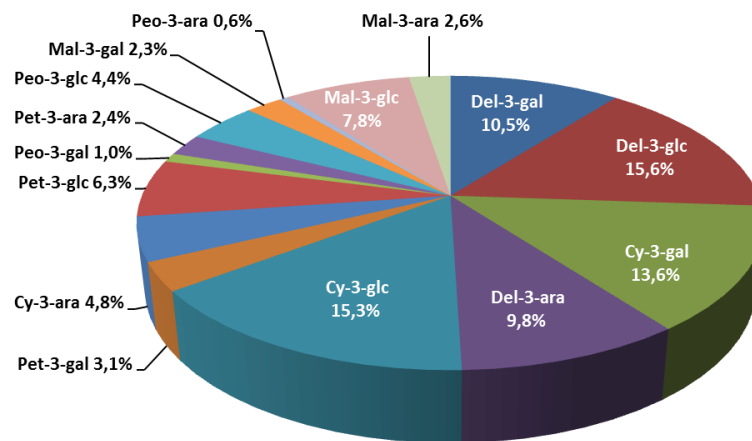


Abbildung 11: Zusammensetzung der im HBE enthaltenen Anthocyane, angegeben in %.

3.3.2 Molkeproteinkapseln (MPK)

Die von AG Kulozik (TU München) hergestellten MPK wurden analog dem HBE mittels HPLC-UV/Vis (siehe Methode, Kapitel 3.3.1 und Mueller et al., 2017) auf ihre Anthocyangehalte untersucht. Die Probenaufbereitung erfolgte mittels Extraktionsmethode A (siehe Kapitel 6 und Mueller et al., 2018). Ein Vergleich des Anthocyangehalts in den Kapseln zu den im reinen unverarbeiteten HBE enthaltenen Konzentrationen an Anthocyanen gab Rückschlüsse auf die HBE-Konzentration in den Kapseln. Es konnte in den Kapseln ein Extraktanteil von 7% nachgewiesen werden. Damit ergaben sich für 144 g MPK gleiche Mengen an Anthocyanen, die mit 10 g reinem HBE aufgenommen werden können (Tabelle 8). Die Herstellung der Kapseln wird in Kapitel 6 und von Mueller et al., 2018 im Detail beschrieben.

3.3.3 Citruspektinkapseln (CPK)

Auch die Analyse der CPK erfolgte analog dem HBE (siehe Methode, Kapitel 3.3.1 und Mueller et al. 2017) und die Probenvorbereitung wurde zuvor mittels Extraktionsmethode B (siehe Kapitel 6 und Mueller et al., 2018) durchgeführt. In den Citruspektinkapseln konnten 34% HBE nachgewiesen werden. Durch den Verzehr von 30 mg Citruspektinkapseln konnten die Probanden vergleichbare Anthocyanmengen, wie in 10 g unverkapseltem HBE enthalten sind, aufnehmen (Tabelle 8). Die Herstellung der Kapseln wird in Kapitel 6 und von Mueller et al., 2018 im Detail beschrieben.

Tabelle 8: HBE-Anteil [%] von Kapselsystem MPK + CPK, äquivalente Kapselmenge die dem Anthocyangehalt von 10 g reinem Extrakt entspricht (n=5).

	Basis	Herstellung	HBE-Anteil [%]	10 g reiner HBE → Kapseln [g]
MPK	Molkeprotein	AG Kulozik	7 ± 1	144 ± 8
CPK	Citruspektin	AB Schwarz	34 ± 5	30 ± 5

3.4 Studiendesign und Durchführung

Die Interventionsstudien Teil I und Teil II wurden im Zeitraum von Juli bis Oktober 2011 von der Forschungsstelle Kaiserslautern mit fünf Ileostomieprobanden und fünf Probanden mit intaktem GIT am Universitätsklinikum Würzburg, Gastroenterologie, durchgeführt (Rekrutierung und Behandlung der Probanden erfolgte durch Uniklinikum Würzburg). Die Studienteilnehmerinnen durchliefen nacheinander insgesamt drei Studientage (siehe Tabelle 9) während dessen der unverkapselte HBE (10 g) sowie der verkapselte Extrakt als MPK (144 g) bzw. CPK (30 g) jeweils einmalig verabreicht wurde (Abbildung 12).

Tabelle 9: Zeitpunkte der Studienphasen Teil I (HBE) und Teil II (MPK, CPK) für Probanden mit und ohne Kolon.

	Teil I (HBE)	Teil II (MPK)	Teil II (CPK)
Probanden ohne Kolon	04.06.2011	25.06.2011	08.10.2011
Probanden mit Kolon	01.06.2011	22.06.2011	05.10.2011

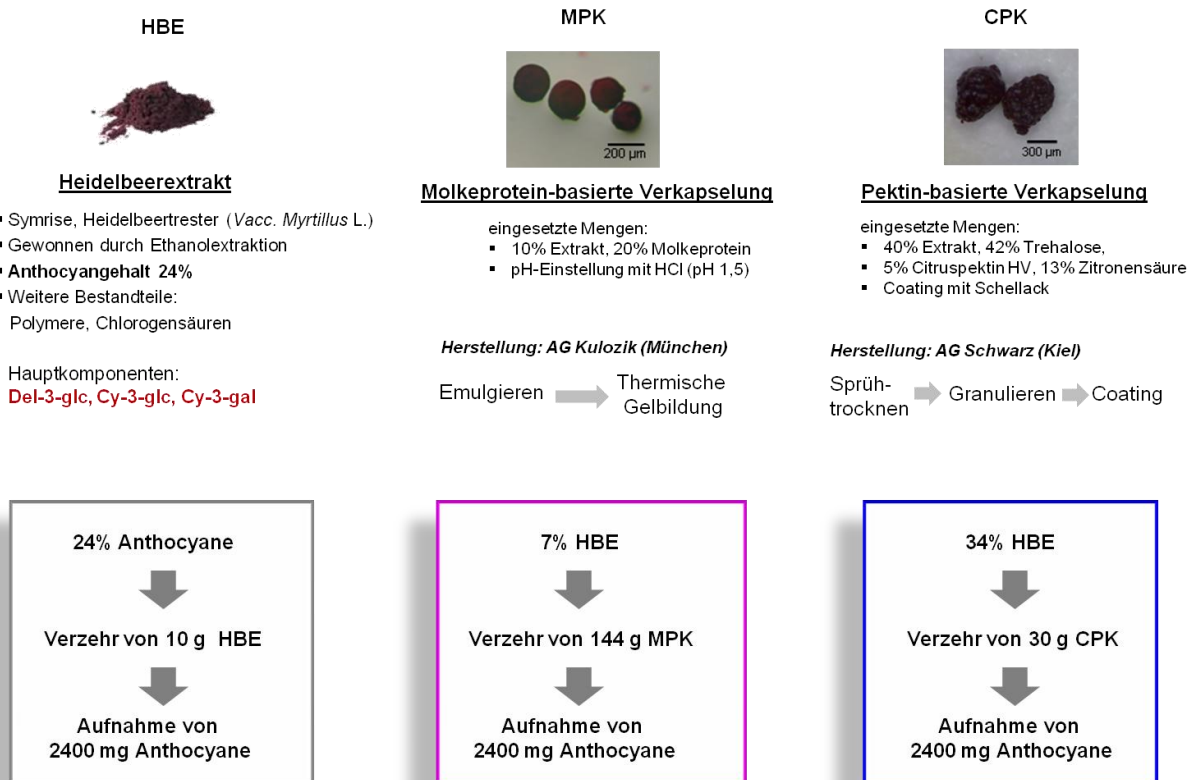


Abbildung 12: Überblick der verschiedenen Heidelbeereextrakte. In allen drei Phasen der Studie wurden äquimolare Mengen an Anthocyanen (2,4 g) verzehrt (siehe Kapitel 3.3).

Vor den jeweiligen Anthocyan-Extrakten (Extrakt oder Kapseln) erfolgte eine 48-stündige Washout-Phase, während der die Probanden eine polyphenolarme Diät (kein Verzehr von Obst und Gemüse, Frucht- und Gemüsesäfte, Rotwein, Bier, Grüntee, Schokolade und Vitaminpräparate) einhielten (Abbildung 13). Während des Verzehrs von MPK in Studie Teil II wurde den Probanden die Zugabe von Süßstoff (auf Basis von Aspartam und Acesulfam-K) ermöglicht, um der starken Astringenz beim Verzehr der Molkeproteinkapseln entgegen zu wirken. Von allen Probanden wurden an den jeweiligen Studientagen Blut- (5 Probenahmezeitpunkte; 0, 1, 2, 4, 8 h) und Urinproben (5 Probennahmeintervalle; 24-0 h vor Probenverzehr, 0-2 h, 2-4 h, 4-8 h, 8-24 h) gesammelt, um eine Gesamtbilanzierung (Bioverfügbarkeit) und Ausscheidungskinetik zu ermitteln. Die Ileostomaausflüsse von Probanden der Studie A wurden nach Gabe des jeweiligen Präparates über einen Zeitraum von 8 h (sechs Probennahmezeitpunkte; 0, 1, 2, 4, 6 und 8 h) gesammelt. Aus den Blutproben wurden weiterhin jeweils von der Forschungsstelle Kaiserslautern der Glutathion-Status und die oxidativen DNA-Schäden ermittelt und von der Forschungsstelle Wien die Induktion der Expression von Nrf2-regulierten Phase II Enzymen. Die Länge der Intervalle zwischen der Verabreichung der unterschiedlichen Zubereitungen betrug aufgrund der

langwierigen Rekrutierung der Ileostomieprobanden zwischen den einzelnen Studientagen zwei bzw. zehn Wochen (Abbildung 13).

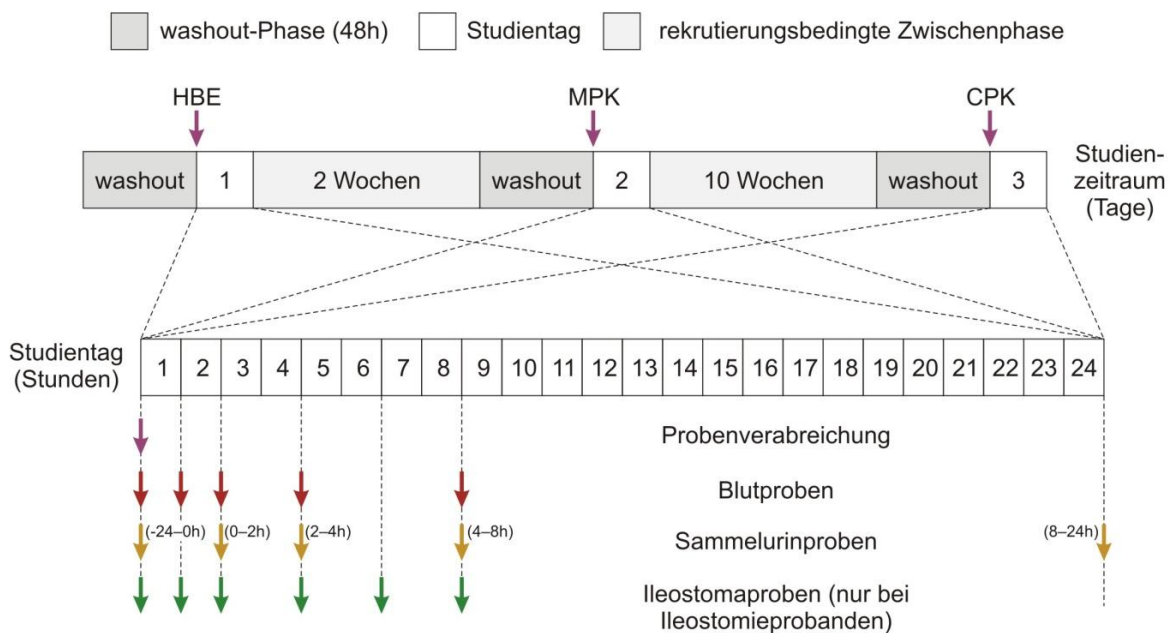


Abbildung 13: Studiendesign der Pilotstudie Teil I und Teil II für Probanden mit intaktem GIT und Ileostomieprobanden.

3.5 Bioimpedanzdaten der Studienprobanden

Für alle Probanden wurde am ersten Studientag nach der Washout-Phase von der Forschungsstelle Kaiserslautern eine Bioimpedanzmessung durchgeführt. Hierbei wurden folgende Parameter bestimmt:

- Gewicht
- Körperfettanteil (FM)
- Gesamtkörperwasser (TBW)
- Fettfreie Masse (FFM)
- Kalorien-Grundumsatz

Diese sind in der folgenden Tabelle zusammen gefasst:

Tabelle 10: *Alter, Größe, Gewicht und Körperzusammensetzung der Probanden (Ileo: Ileostomieprobanden; Ges: gesunde Probanden, BMI: Body Mass Index, TBW: Gesamtkörperwasser, FFM: fettfreie Masse, BCM: Körperzellmasse, FM: Körperfettmasse).*

Proband	Alter [a]	Geschlecht [w/m]	Größe [cm]	Gewicht [kg]	BMI [kg/m ²]	TBW [%]	FFM [%]	BCM [%]	FM [%]	Grundumsatz [kcal]
Pilotstudie A										
Ileo_1	43	w	163	70,4	26,5	45,6	62,0	47,0	38,0	1350
Ileo_2	50	w	156	73,6	30,2	46,6	64,0	53,0	36,0	1480
Ileo_3	44	w	167	84,2	30,2	44,7	61,0	45,0	39,0	1420
Ileo_4	39	w	175	91,5	29,9	44,0	60,0	47,0	40,0	1500
Ileo_5	29	w	158	51,1	20,5	52,8	72,0	47,0	28,0	1250
Pilotstudie B										
Ges_1	34	w	171	66,2	22,6	52,7	72,0	53,0	28,0	1480
Ges_2	42	w	170	69,5	24,1	47,6	65,0	53,0	35,0	1440
Ges_3	33	w	178	70,4	22,2	48,4	66,0	51,0	34,0	1440
Ges_4	24	w	162	54,2	20,7	56,5	77,0	48,0	23,0	1340
Ges_5	30	w	172	73,1	24,7	50,9	70,0	51,0	30,0	1500

Insgesamt nahmen an der Pilotstudie fünf weibliche Probandinnen teil, die an Morbus Crohn erkrankt sind und einen künstlichen Dünndarmausgang (Ileostoma) besitzen. Sie waren im Alter von 41 ± 7 Jahren und hatten einen BMI von 27 ± 4 kg/m². Fünf gesunde weibliche Probanden (ohne künstlichen Darmausgang) im Alter von 33 ± 7 Jahren und einem BMI von 23 ± 2 kg/m² nahmen ebenso an der Pilotstudie teil. Das Gesamtkörperwasser (TBW) beträgt im Idealfall bis zu 2/3 des Körpergewichtes. Der TBW-Wert lag bei den Ileostomieprobanden bei $47 \pm 4\%$ und bei den Probanden mit Kolon bei $51 \pm 4\%$. Die fettfreie Masse (FFM) schließt das Knochenskelett, 73% der Körperflüssigkeiten, die Gesamtheit der Körperzellen ein und das Körperfett aus. Ein gesunder körperlicher Zustand setzt einen FFM-Wert von 70-88% voraus. Die FFM-Werte für die Ileostomieprobanden lagen bei $64 \pm 5\%$ und für die Probanden mit Kolon bei $70 \pm 5\%$. Die Körperzellmasse (BCM) ist die „aktive“ Komponente im menschlichen Körper, die für alle Stoffwechselforgänge wie Sauerstoffaustausch, Kaliumversorgung des Gewebes, Glukoseoxidation verantwortlich ist. Die Struktur- und Funktionsproteine des Körpers sind vollständig Teil der Körperzellmasse. Daher stellt die Körperzellmasse die entscheidende Größe dar, aus der die physiologische Situation der

Messperson, sein Ernährungszustand abzulesen ist. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der FFM und liegen idealerweise bei 50%. Die in der Studie ermittelten BCM-Werte lagen bei den Ileostomieprobanden bei $48 \pm 3\%$ und bei den Probanden mit Kolon bei $51 \pm 2\%$. Die Körperfettmasse (FM) beträgt im Idealfall bei Frauen zwischen 18-26% und setzt sich aus dem Speicherfett und dem essentiellen Fett, zum Schutz der inneren Organe, zusammen. Die FM-Werte lagen bei den Ileostomieprobanden bei $36 \pm 5\%$ und bei den Probanden mit Kolon bei $30 \pm 5\%$ (Piccoli et al., 1994; Talluri & Maggia, 1995). Der Grundumsatz ist die Energiemenge, die der Körper im nüchternen Zustand bei völliger Ruhe und Raumtemperatur benötigt, um seinen Grundstoffwechsel und seine Körpertemperatur aufrecht zu erhalten (Kleiber, 1947). Der Grundumsatz an Kilokalorien lag bei den Ileostomieprobanden bei 1400 ± 102 kcal und bei den Probanden mit Kolon bei 1440 ± 62 kcal (Tabelle 10). Für Frauen wird in der Literatur grundsätzlich ein geringerer Grundumsatz mit 1534 ± 314 (n=121) im Vergleich zu Männern mit 1785 ± 352 (n=114) beschrieben (Ferraro et al., 1992) und zeigt, dass die in dieser Pilotstudie beschriebenen einen Grundumsatz im Normalbereich aufweisen.

3.6 Bestimmung der Passagezeiten von Nahrungsmittelinhaltsstoffen

Nach Aufnahme von Nahrungsmitteln durchlaufen die darin enthaltenen Inhaltsstoffe verschiedene Kompartimente im Gastrointestinaltrakt (Mund-Magen-Dünndarm-Dickdarm). Je nach Art der aufgenommenen Nahrung und des jeweiligen Individuums können sich die Passagezeiten unterscheiden. Bei Menschen mit intaktem Gastrointestinaltrakt wird der Nahrungsbrei im Magen zerkleinert und homogenisiert und kann bis zu 1-6 h in diesem Kompartiment verweilen (Verdauung von Stärke und Proteinen). Danach gelangt der Verdauungsbrei in den Dünndarm (Duodenum-Jejunum-Ileum). Hier werden die bereits gespaltenen Nahrungsbestandteile noch weiter zerlegt (Oligosaccharide-Zucker; Peptide-Aminosäuren) und die Lipide verdaut. Die Verweildauer beträgt ca. 2-5 h bis der Dickdarm (Kolon) erreicht wird. Im Dickdarm wird dem Verdauungsbrei das Wasser entzogen und über das Rektum als Fäzes ausgeschieden. Die Verweildauer im Kolon kann je nach Individuum zwischen 5-70 h dauern (Mutschler et al., 2007). Ileostomaprobanden (Probanden mit künstlichem Dünndarmausgang) fehlt der Dickdarm und damit ein großer Teil der Darmpassage. Hier wird der Nahrungsbrei am Ende des Dünndarms ausgeschieden und wird in Ileostoma-beuteln gesammelt. Damit verkürzt sich die Darmpassagezeit im Gegensatz zu gesunden Probanden, was für die Aufnahme und Ausscheidung von Stoffen (Anthocyanen) während der Verzehrsstudie im laufenden Projekt eine Rolle spielt.

Zur Bestimmung der individuellen Dünndarmpassagezeiten von Nahrungsinhaltsstoffen der einzelnen Ileostomaprobanden (Ileo1-5) wurde von allen Probanden vor Studienbeginn

330 ml Heidelbeersaft getrunken und die Passagezeiten durch die Färbung der Ileostoma-inhalte bestimmt. Die Daten sind für die einzelnen Probanden in Tabelle 11 zusammengefasst und die Dünndarmpassagezeiten liegen im Durchschnitt zwischen 45-60 min, wobei Proband Ileo4 eine kürzere Passagezeit von 15 min aufwies.

Tabelle 11: Dünndarmpassagezeiten von Nahrungsinhaltstoffen (Anthocyanen) für Ileostomaprobanden (Ileo1-5) nach Gabe des Heidelbeersaftes.

Proband	Ileo1	Ileo2	Ileo3	Ileo4	Ileo5
Transitzeit [min]	45	45	45-60	15	45

Parallel dazu wurde von den gesunden Probanden (Ges1-5) der Heidelbeersaft (330 ml) zur Bestimmung der Darmpassagezeit getrunken. Hierbei zeigte sich, dass bei allen Probanden maximal nach 24 h eine Färbung der Fäzes vorlag.

3.7 Mikrobiota der Ileostomaprobanden

Es zeigte sich, dass es individuelle Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung der Dünndarmausflüsse der einzelnen Probanden gab, wobei die Mehrheit der untersuchten Bakterien im Toleranzbereich lag.

Der pH-Wert der Ausflüsse variierte bei allen Probanden mit Stoma zwischen pH 6 und pH 7,5 (Tabelle 12) vergleichbar mit der Literatur, welche im Dünndarm, je nach Lokalisation, ein pH-Bereich zwischen 5,9-7,6 beschreibt (Fallingborg, 1999; Falungborg et al., 1994). Bei Probanden mit gesundem Gastrointestinaltrakt liegt der pH-Wert im Kolon, laut Literatur zwischen 5,7-6,8 (Kahle et al., 2006). Im terminalen Abschnitt des Dünndarms (Ileum) beträgt die Bakterienanzahl 10^6 - 10^9 ml/Chymus, wobei hauptsächlich die beiden Spezies *Enterococcus* und *Lactobacillus* vorhanden sind (Mutschler et al., 2007). Beim Übergang von Ileum zum Dickdarm steigt die Bakterienzahl sprunghaft an und beträgt 10^{11} - 10^{12} /ml Chymus, wobei die Mehrzahl dieser Bakterien zu den Familien *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *E. coli*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Ruminococcus* und *Roseburia* gehören (Fallingborg, 1999; Mutschler et al., 2007).

Tabelle 12: Ergebnisse der Mikrobiotauntersuchungen [KbE/g] der Ileostomabeutelinhalte (Ileo1 bis Ileo5).

	Ileo_1	Ileo_2	Ileo_3	Ileo_4	Ileo_5
aerob					
E. coli	$8 \cdot 10^7$	$<10^4$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^8$
E. coli-Varianten	$<10^4$	/	$<10^4$	$<10^4$	/
E. coli-Variante Lakt-neg.	/	/	/	/	$3 \cdot 10^6$
E.coli-Variante haem.	/	$1 \cdot 10^8$	/	/	$8 \cdot 10^5$
Klebsiella sp.	$3 \cdot 10^7$	/	$2 \cdot 10^4$	/	/
Enterobacteriaceae	/	$<10^4$	/	$<10^4$	$<10^4$
Enterococcus sp.	$6 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^7$
Andere Aerobe	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$
anerob					
Bacteroides sp.	$1 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^2$	$3 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^6$
Clostridium sp.	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$
Bifidobacterium sp.	$6 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$
Lactobacillus sp.	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5$
Andere Aerobe	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$	$<10^6$
Pilze					
Candida sp.	$<10^2$	$<10^2$	$4 \cdot 10^2$	$<10^2$	$1 \cdot 10^3$
Geotrichum sp.	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
Andere Pilze	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$	$<10^2$
pH-Wert	7,5	7,5	7,5	6,0	7,0

4. Ergebnisse und Publikationen

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der vorliegenden kumulativen Arbeit sind in vier unterschiedliche Teile gegliedert.

Teil I dieses Kapitels beschreibt die Studiendurchführung mit beiden Probandengruppen und dem Verzehr des unverkapselten Heidelbeerextraktes (Interventionsstudie Teil I). Die Ergebnisse zur Bioverfügbarkeit der Heidelbeeranthocyane und Abbauprodukte sind in der Publikation Mueller et al., 2017 näher erläutert.

Teil II der Ergebnisse und Publikationen schließt an dieses Thema an und beschreibt die Studiendurchführung mit beiden Probandengruppen und dem Verzehr der verkapselten Heidelbeerextrakte (Interventionsstudie Teil II). Die Auswertung der Bioverfügbarkeit von verkapselten Heidelbeeranthocyanen und der Einfluss der Verkapselung auf die Stabilität, den Abbau und die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen werden in der Publikation Mueller et al., 2018 im Detail ausgeführt.

Teil III dieses Kapitels beschreibt sowohl im Bezug zur Interventionsstudie Teil I und Teil II die Biologische Aktivität von unverkapselten und verkapselten Heidelbeeranthocyanen. Die Erfassung der Biomarker im Blut der Probanden (nach HBE-, MPK- und CPK-Verzehr) wurden in Kooperation mit der Forschungsstelle II (Prof. Marko, Universität Wien) durchgeführt. Die Ergebnisse der Forschungsstelle I (Prof. Richling, Technische Universität Kaiserslautern) zum Glutathionsstaus und das Ausmaß der DNA-Schäden im Blut der Probanden sind in Kapitel 4.3.1 und 4.3.2 näher erläutert. Kapitel 4.3.3 beschreibt anhand des veröffentlichten Manuskriptes Kropat et al., 2013 die Modulation Nrf2 abhängiger Gene im Blut der Probanden (Forschungsstelle II) und nimmt Bezug auf die Ergebnisse zur Modulation des Glutathionstatus und der DNA-Schäden, welche anhand der durchgeführten Studien ermittelt werden konnten.

Teil IV der Ergebnisse und Publikationen beschreibt ein zur Veröffentlichung geplantes Manuskript von Mueller et al. zur Bestimmung von Kreatinin aus Urin. Im Laufe der Studie stellte sich heraus, dass zur Normierung der Urinproben der Probanden die geplante photometrische Bestimmung von Kreatinin für die vorliegenden Proben nicht verwendet werden konnte. Dies führte zu einer erfolgreichen Etablierung einer alternativen Methode zur Bestimmung von Kreatinin mittels quantitativer ¹H-NMR Spektroskopie.

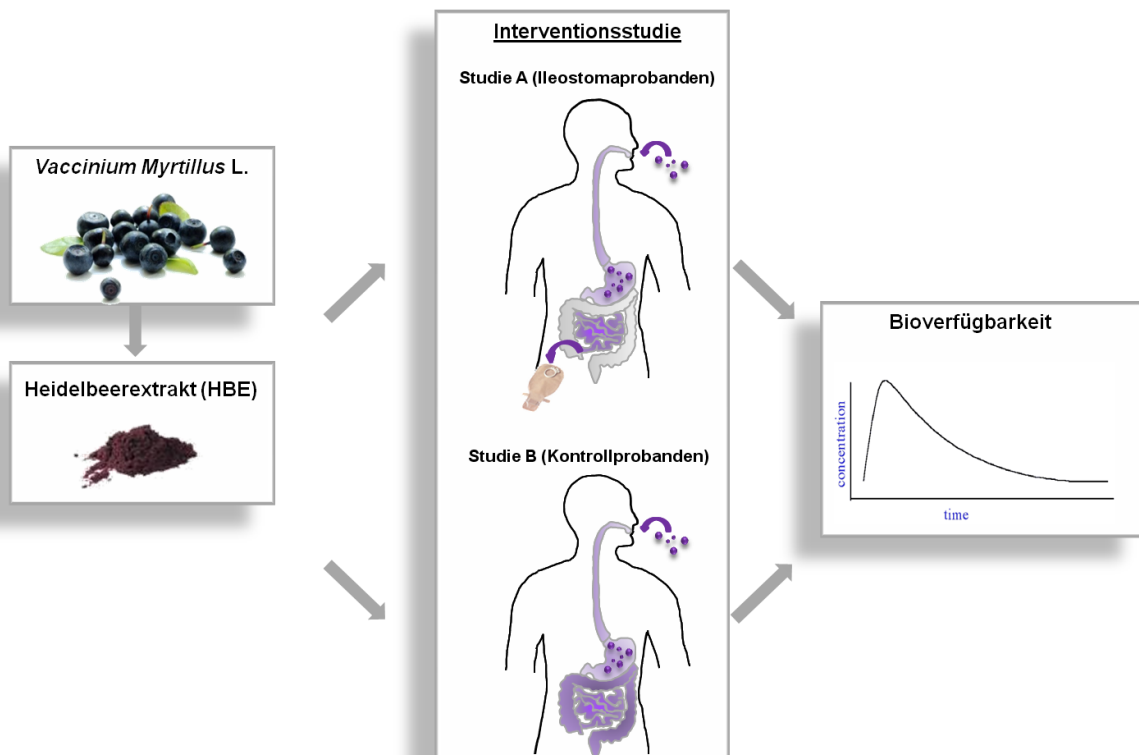
4.1 Bioverfügbarkeit von Heidelbeeranthocyanen (Teil I)

Konzept zur Veröffentlichung:

"Humanstudie zur Untersuchung der intestinalen Verfügbarkeit und Bioverfügbarkeit von Heidelbeeranthocyanen"

'Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries'

Dolores Mueller¹, Kathrin Jung¹, Manuel Winter¹, Dorothee Rogoll², Ralph Melcher² and Elke Richling^{1,*} (2017) Food Chemistry 231, 275-286.



4.1.1 Einleitung

Die Mehrzahl bisher bekannter Bioverfügbarkeitsstudien von Anthocyanen beschränkt sich vor allem auf Anthocyane als Hauptstrukturen und deren Phase II Metaboliten (Felgines et al., 2003; Kay et al., 2004). Trotz der bekannten Instabilität von Anthocyanen gibt es derzeit nur wenige Studien, die auch die Vielzahl an möglichen Abbauprodukten zur Ermittlung der Gesamtbioverfügbarkeit mitberücksichtigen (Czank et al., 2013; Ferrars et al., 2014). Vor allem der Abbau von Anthocyanen zu Phloroglucinolaldehyd und Phenolcarbonsäuren durch fermentative Prozesse unter mikrobieller Darmumgebung ist schon seit einigen Jahren bekannt (Keppler & Humpf, 2005). Aktuelle Studien zeigen noch viel deutlicher, wie komplex der Abbau von Anthocyanen *in vivo* ist (Czank et al., 2013; Ferrars et al., 2014). Aus einem speziellen Anthocyan (Cy-3-glc) wurden *in vivo* 49 Metabolite und Abbauprodukte erfasst. Durch die Berücksichtigung dieser Strukturen konnte eine relative Bioverfügbarkeit von 12% ermittelt werden (Czank et al., 2013). Neben Phenolsäuren und Phenylaldehyden wurden auch Phenylalkohole, Phenylessigsäuren und Phenylpropionsäuren identifiziert (Fernandes et al., 2014; Ferrars et al., 2014). Auch weitere Strukturen, die durch intermolekulare Interaktionen von Anthocyanen untereinander oder mit anderen Molekülen stattfinden können sind denkbar, wobei deren Bioverfügbarkeit und Bedeutung auf die biologische Wirkung im Menschen noch nicht ausreichend geklärt ist. Weitere Humanstudien sind notwendig, um die bisherigen Ergebnisse und das *in vivo* Verhalten von Anthocyanen zu klären.

4.1.2 Zielsetzung der Studie

In unserer Studie sollen nach dem Verzehr eines Heidelbeerextrakt (vielfältige Anthocyanquelle) die Gehalte von Anthocyanen und ausgewählten Abbauprodukten in Plasma-, Urin- und Dünndarmflüssigkeiten ermittelt werden, um die intestinale und systemische Bioverfügbarkeit der Anthocyane zu erfassen. Die Studie wurde an Probanden mit intaktem GIT und Ileostomaprobanden durchgeführt. Letztere stellen den vorhandenen künstlichen Dünndarmausgang ein gutes Modell dar, um die Verfügbarkeit von Substanzen im Darm ohne zusätzliche invasive Methode zu untersuchen.

4.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Analyse der Ileostomaflüssigkeiten zeigte, dass 30% der verzehrten Anthocyane über 8 h während der Passage durch den oberen Gastrointestinaltrakt stabil blieben. Abbauprodukte wurden nur zu 20% gebildet, hauptsächlich wurden intakte Anthocyane im Dünndarmmilieu der Ileostomaprobanden gefunden. Nach Heidelbeerextraktverzehr konnten höhere Gehalte von Abbauprodukten im Vergleich zu Anthocyanen im Plasma beider Probandengruppen detektiert werden. Der Vergleich der Bioverfügbarkeit von Anthocyanen in gesunden Probanden zu Ileo-

stomaprobanden zeigt im Urin um 44% und im Plasma um 79% höhere Gehalte. Auch die Abbauprodukte liegen im Urin um 75% und Plasma um 100% höher beim Vorhandensein eines intakten Gastrointestinaltraktes (gesunde Probanden) (Abbildung 14).

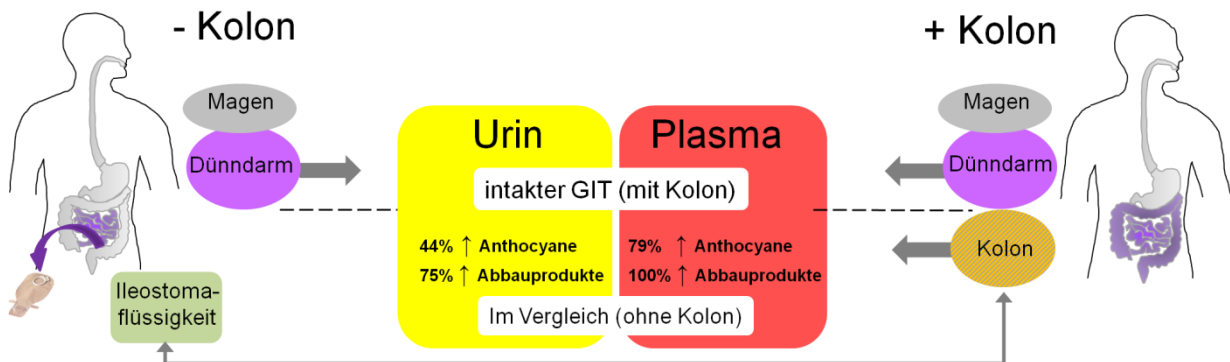


Abbildung 14: Zusammenfassung der zentralen Ergebnisse aus Teil I der Studie: Bestimmung der Konzentrationen von Anthocyanen und Abbauprodukten in Urin- und Plasmaproben von Probanden mit Kolon und Urin-, Plasma- und Ileostomaflüssigkeiten von Probanden mit Stoma (ohne Kolon). Die prozentualen Angaben (Urin, Plasma) zeigen die Erhöhung der Gehalte der gesunden Probanden im Vergleich zu den Ileostomaprobanden.

4.1.4 Fazit

Der innovative Aspekt dieser Studie ist der direkte Vergleich der Bioverfügbarkeit von gesunden Probanden und Ileostomaprobanden, wodurch der Einfluss des Dünndarms aufgezeigt werden konnte. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Kolon ein signifikanter Resorptionsort für Anthocyane als auch deren Abbauprodukte darstellt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Abbauprodukte im Plasma und Urin auf das 20 bzw. 38-fache im Verhältnis zu den resorbierten intakten Anthocyanen *in vivo* anstiegen. Somit verdeutlicht diese Studie die Relevanz der resorbierten Abbauprodukte auf die Gesamtbioverfügbarkeit von Anthocyanen.

4.1.5 Veröffentlichtes Manuskript

Food Chemistry 231 (2017) 275–286



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries

Dolores Mueller^a, Kathrin Jung^a, Manuel Winter^a, Dorothee Rogoll^b, Ralph Melcher^b, Elke Richling^{a,*}^a Department of Food Chemistry and Toxicology, University of Kaiserslautern, Erwin-Schroedinger-Strasse 52, D-67663 Kaiserslautern, Germany^b Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Wuerzburg, Oberduerrbacher Strasse 6, D-97080 Wuerzburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2016

Received in revised form 22 March 2017

Accepted 22 March 2017

Available online 24 March 2017

Chemical compounds studied in this article:

Anthocyanins (PubChem CID: 145858)

Gallic acid (PubChem CID: 370)

4-Hydroxybenzoic acid (PubChem CID: 135)

4-Hydroxybenzaldehyde (PubChem CID: 126)

3-O-Methylgallic acid (PubChem CID: 19829)

Protocatechuic acid (PubChem CID: 72)

Phloroglucinolaldehyde (PubChem CID: 68099)

Vanillic acid (PubChem CID: 8468)

Syringic acid (PubChem CID: 10742)

Keywords:

Anthocyanins

Bioavailability

Metabolism

Degradation

Small intestine

Vaccinium myrtillus L.

ABSTRACT

We investigated the importance of the large intestine on the bioavailability of anthocyanins from bilberries in humans with/without a colon. Low bioavailability of anthocyanins in plasma and urine was observed in the frame of this study. Anthocyanins reached the circulation mainly as glucuronides. Analysis of ileal effluents (at end of small intestine) demonstrated that 30% of ingested anthocyanins were stable during 8 h passage through the upper intestine. Only 20% degradants were formed and mostly intact anthocyanins were absorbed from the small intestine. Higher amounts of degradants than anthocyanins reached the circulation after bilberry extract consumption in both groups of subjects. Comparison of the bioavailability of anthocyanins in healthy subjects versus ileostomists revealed substantially higher amounts of anthocyanins and degradants in the plasma/urine of subjects with an intact gut. The results suggested that the colon is a significant site for absorption of bioactive components such as anthocyanins and their degradation products.

© 2017 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Most previous studies investigating the bioavailability of anthocyanins focused on their respective parent structure and phase II metabolites (such as methylated, glucuronated and sulfated forms)

Abbreviations: Ara, Arabinoside; BE, Bilberry extract; Cy, Cyanidin; Del, Delphinidin; Del-3,5-diglc, Delphinidin-3,5-diglucoside; GA, Gallic acid; Gal, Galactose; Glc, Glucose; Gluc, Glucuronide; HBA, 4-Hydroxybenzoic acid; HBAL, 4-Hydroxybenzaldehyde; IS, Internal standard; Iso-FA-d₃, Isoferulic acid d₃; Mal, Malvidin; MGA, 3-O-Methylgallic acid; PCA, Protocatechuic acid; PGAL, Phloroglucinol aldehyde; Peo, Peonidin; Pet, Petunidin; VA, Vanillic acid; SA, Syringic acid.

* Corresponding author.

E-mail address: richling@chemie.uni-kl.de (E. Richling).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.130>

0308-8146/© 2017 The Authors. Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

(Felgines et al., 2003; Kay, Mazza, Holub, & Wang, 2004). Despite the known limited stability of anthocyanins, only a few studies have measured the different degradation products and their respective metabolites potentially formed *in vivo* and attempted to estimate the total bioavailability of anthocyanins (Czank et al., 2013; Ferrars et al., 2014). *In vitro* fermentation studies have demonstrated a degradation pathway of anthocyanins to phloroglucinol aldehyde (from the A-ring) and phenolic acids (from the B-ring) (Keppler & Humpf, 2005) depending on the pattern of substitution of the parent anthocyanin. Recent studies have revealed the complexity of the degradation *in vivo* (Czank et al., 2013; Ferrars et al., 2014). Czank et al. reported that after ingestion of single ¹³C-labeled cyanidin-3-glycoside, up to 49 metabolites

276

D. Mueller et al./Food Chemistry 231 (2017) 275–286

and degradation products could be detected *in vivo* associated with the ingested parent anthocyanin due to the stable isotope labeling. The relative bioavailability of the metabolites and degradants was estimated as 12% (Czank et al., 2013).

Fig. 1 shows the possible metabolism and degradation pathways of anthocyanins under physiological conditions. Beside phenolic acids and phenylaldehydes, other degradants, such as phenylalcohols, phenylacetic acids and phenylpropenoic acids, have been identified (Fernandes, Faria, Calhau, de Freitas, & Mateus, 2014; Ferrars, Cassidy, Curtis, & Kay, 2014). Depending on the constitution and polarity of these compounds, they may also be present systemically as metabolites.

Phenolic acids have mainly been detected as glucuronides, sulfates or methylated forms (Felgines et al., 2003; Kay et al., 2004). The glycine conjugated hippuric acid was shown to be the major metabolite in urine over several days (Czank et al., 2013; Ferrars et al., 2014). To date, few studies have investigated intermolecular interactions of anthocyanins with themselves and other molecules (e.g., polyphenols, phenolic acids, proteins, etc.) or their complex-forming properties *in vivo* (Cavalcanti, Santos, & Meireles, 2011; Eiro & Heinonen, 2002; He, Xu, Zeng, Qin, & Chen, 2016; Ribnicky et al., 2014; Soares, Mateus, & De Freitas, 2007; Tang, Zuo, & Shu, 2014). Thus, the role of these *in vitro* confirmed characteristics on the human bioavailability and biological effectiveness is still unclear. Thus, prospective investigations are essential to identify the importance of dietary anthocyanin intake and their effects and distribution in humans (Czank et al., 2012; Rodriguez-Mateos, Feliciano, Cifuentes-Gomez, & Spencer, 2016; Williamson & Clifford, 2010) especially given their previously underestimated bioavailability. More studies on the bioavailability, site of absorp-

tion and metabolism of anthocyanins in humans are useful to clarify previous results (Fernandes, Faria, de Freitas, Calhau, & Mateus, 2015; Kay, Pereira-Caro, Ludwig, Clifford, & Crozier, 2017).

Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) contain 15 anthocyanins which differ in functional groups of the aglyca and the binding sugar. So, bilberry extract represents a broad spectrum of anthocyanins compared to other fruits and extracts (Müller, Schantz, & Richling, 2012). For this reason our pilot interventions were designed to elucidate the amounts of bilberry anthocyanins reaching the human intestine and circulation. Thus, the studies were performed on volunteers with or without a colon. Ileostomists (with a terminated artificial small bowel outlet) represent an adequate model to demonstrate how anthocyanins reach the small intestine. Information obtained from analyzing ileostomy effluents at the end of the small intestine can be used to identify compounds available to the colon, and therefore possible candidates for colonic absorption in healthy subjects with an intact colon. Following anthocyanin intake, their effluents were collected in bags at the end of the small intestine and analyzed after simple preparation to determine the amounts of anthocyanins and degradation products present. This non-invasive method allows direct comparison of data for healthy subjects and ileostomists to investigate the bioavailability of anthocyanins and formation of degradation products. We employed two groups of volunteers using the same intervention design. Each subject was administered one bolus of 10 g anthocyanin rich bilberry extract (BE) and blood and urine samples were collected within 8 and 24 h and ileostomy fluid within 8 h. The samples were analyzed for their content of intact anthocyanins and glucuronides and specific degradation products (e.g., phenolic acids, phenylaldehydes) to identify any differences or similarities

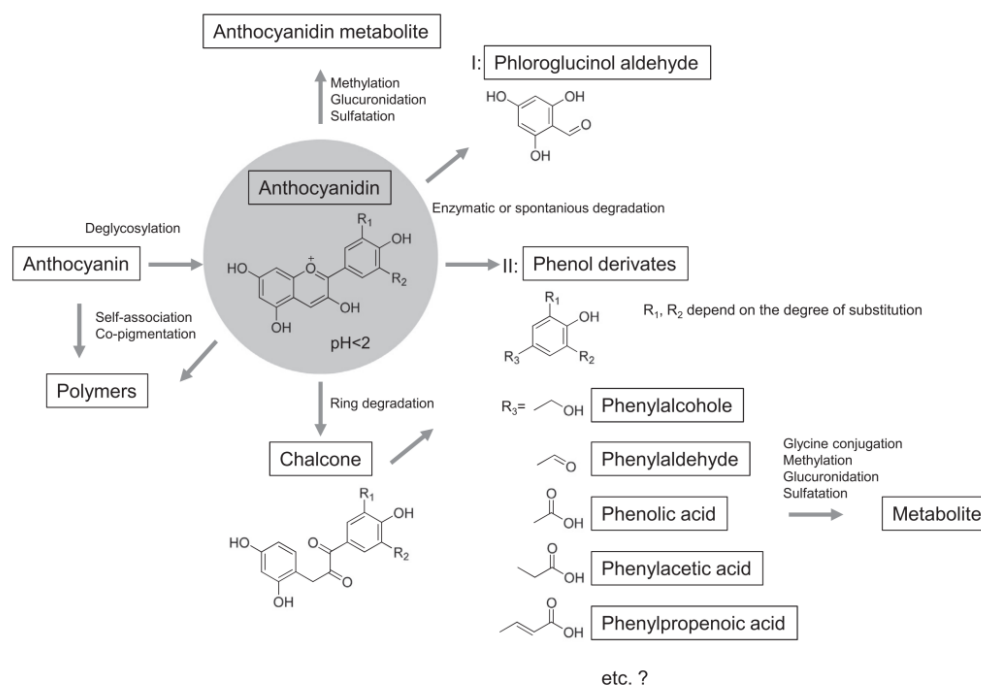


Fig. 1. Potential pathways of anthocyanin metabolism and degradation under physiological conditions.

in their accessibility and bioavailability. However, not all anthocyanin degradation products were recorded owing to the complex mixture of anthocyanins in the BE (15 different compounds ingested). The spectrum of metabolites generated from each anthocyanin may be multifarious, as reported by Czank et al. (2013). Thus, only a few specific metabolites were selected to investigate the role that the small intestine and colon play in the absorption kinetics of consumed bilberry anthocyanins.

2. Materials and methods

2.1. Study design

Details of this human pilot study were first described in Kropat et al. relating to an investigation of physiological effects in the blood cells of subjects (Kropat et al., 2013). Specific details relating to the pharmacokinetic analyses are given below. After approval from the ethics commission of the University of Wuerzburg (No. 32/10), the study was carried out with two groups of subjects. Group A were ileostomists ($N = 5$ females, $BMI = 27 \pm 3$, age = 41 ± 8). Owing to Crohn's disease, these volunteers had been fitted with an artificial gut outlet at the end of their small intestine (stoma of the terminal ileum). The volunteers of group B were healthy subjects with an intact gut ($N = 5$ females, $BMI = 23 \pm 3$, age = 33 ± 7). The time axis of the study is shown in Fig. 2. Prior to ingestion of the bolus of anthocyanin rich BE, a wash out phase was employed of 48 h on an anthocyanin- and polyphenol-free diet, whereby foods such as red fruits, vegetables, chocolate and coffee were omitted. Samples of urine ($-24-0$ h), blood (0 h, immediately before extract consumption), and additionally for group A, ileostomy fluid ($-12-0$ h), were collected to check for background and compliance. After the wash out period, each subject consumed a single portion of 10 g BE stirred into 150 g of low fat yogurt (3.4% cow milk protein, 1.5% fat, 5.0% carbohydrates), corresponding to 4.95 mmol anthocyanins (2.4 g). The following samples were collected for both groups (A and B) after extract consumption: total volume of urine at four time intervals (0–2 h, 2–4 h, 4–8 h, 8–24 h) and about 27 ml of blood drawn from vena brachialis at four time points (1 h, 2 h, 4 h, 8 h). In addition, the total volume of ileostomy fluid collected from participants of group A was measured at five time intervals (0–1 h, 1–2 h, 2–4 h, 4–6 h, 6–8 h). For further details, see the section entitled "Sample preparation" below. During the 24 h of intervention (after BE consumption), all subjects received the same diet. After 1 h, a breakfast was

provided of white bread and artificial honey. At lunch time (after 5 h), the volunteers received white bread with cheese and ham, and after 9 h, they were provided with wheat pasta with carbonara sauce. It is known that the stability and absorption of anthocyanins can be influenced by food ingredients (e.g. whey proteins, sugar) (He et al., 2016; Schantz et al., 2014; Williamson, 2013). Besides these effects, the volunteers got the bolus of anthocyanins in combination with yogurt (without extra sugar) to make the intake of astringent BE as pleasant as possible.

2.2. Chemicals, standards and bilberry extract

The BE (Symrise GmbH & Co. KG, Holzminden, Germany, pr. No. 399916, batch 29) was produced from bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) pomace via ethanolic and subsequent concentration of polyphenols by column chromatography. The BE consisted of $24 \pm 1\%$ of 15 different anthocyanins based on the five aglyca delphinidin (del), cyanidin (cy), petunidin (pet), malvidin (mal) and peonidin (peo) and the three sugar residues glucose (glc), galactose (gal), and arabinose (ara) in the 3-O position. The anthocyanin profile is shown in Fig. 5A. Further components, such as quercetin glycosides, phenolic acids, tannins, carbohydrates, fibers and traces of free anthocyanidins, may also be present (Jujudjur & Winterhalter, 2012). The degradation products under this study (GA, PCA, HBA, HBAL, MGA, PGA, SA, VA) were 0.4% in the ingested BE.

All standards had at least a purity of 95%. Anthocyanin standards were obtained from three sources: cy-3-glc, delphinidin-3,5-O-diglucoopyranoside (del-3,5-diglc, internal standard, IS) and cy were purchased from Extrasynthese (Genay Cedex, France); cy-3-gal, cy-3-ara, peo-3-glc, peo-3-gal, peo-3-ara, del-3-glc, pet-3-glc, and mal-3-glc were purchased from Polyphenols (Sandes, Norway); del-3-gal, del-3-ara, pet-3-gal, pet-3-ara, mal-3-gal, and mal-3-ara were kindly provided by Peter Schreier and Michael Kraus (University of Wuerzburg, Germany). The possible degradation products 4-hydroxybenzoic acid (HBA), gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid, GA) and syringic acid (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid, SA) were obtained from VWR International (Radnor, Pennsylvania, USA); protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid, PCA), vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, VA) and phloroglucinol aldehyde (2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, PGA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA); 3-O-methylgallic acid (3,4-dihydroxy-5-methoxybenzoic acid, MGA) was purchased from Abcr GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany); and the internal standard isoferulic acid- d_3 (3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid- d_3 ,

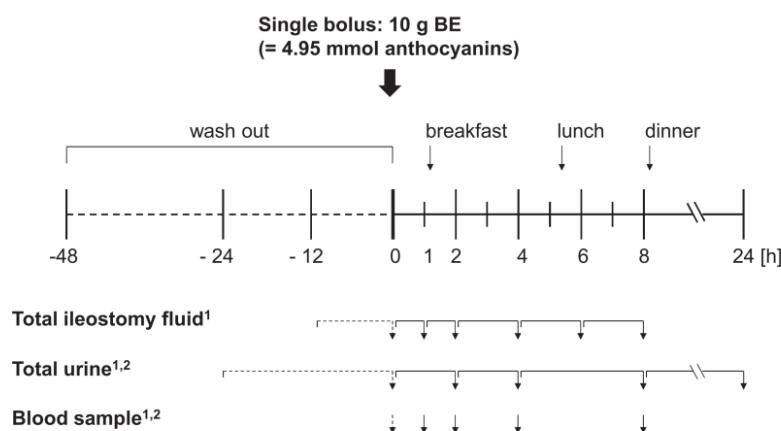


Fig. 2. Time axis and sample collection (¹ileostomists without colon, ²healthy subjects with colon) of the human intervention trial.

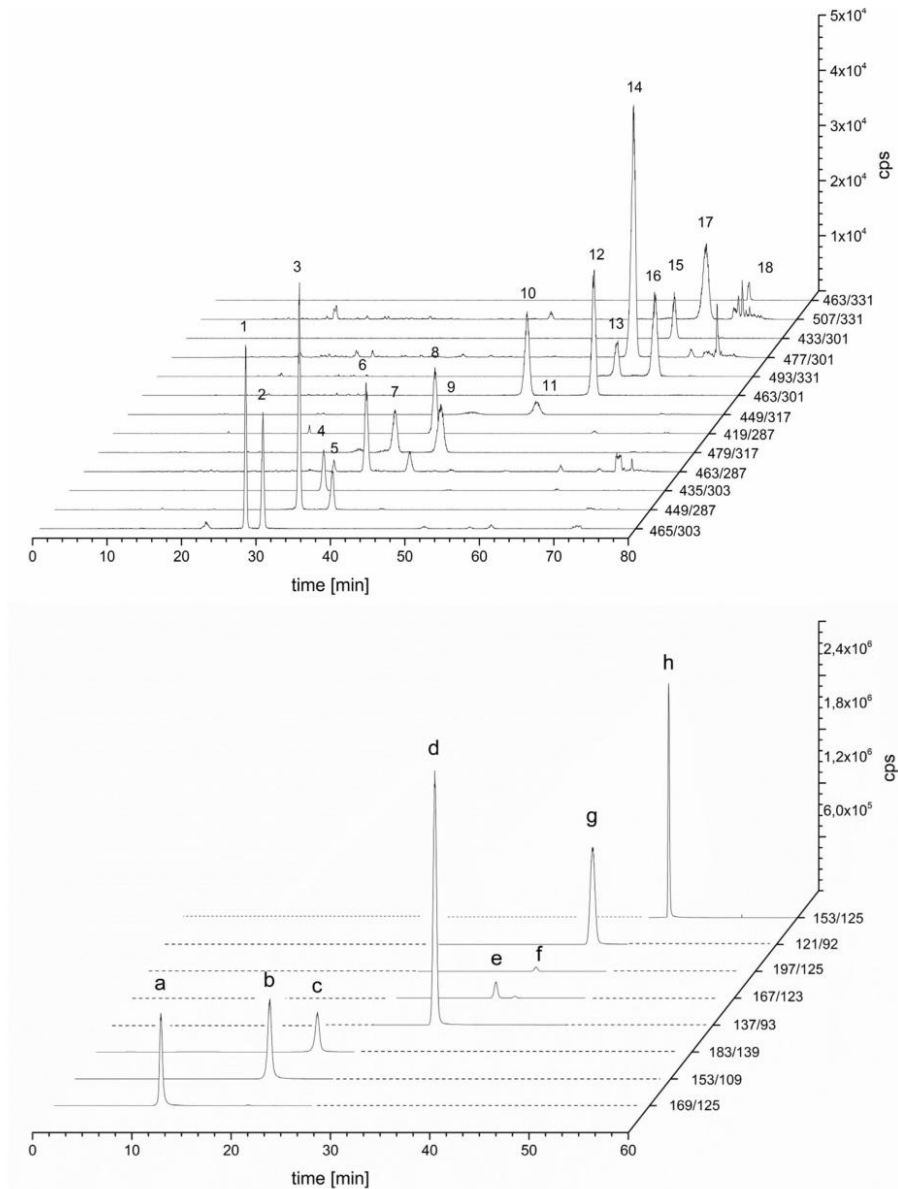


Fig. 3. Representative HPLC chromatogram with MRM transitions of analyzed anthocyanins and degradation products. 1: Del-gal, 2: Del-glc, 3: Cy-gal, 4: Del-ara, 5: Cy-glc, 6: Cy-glug, 7: Pet-gal, 8: Cy-ara, 9: Pet-glc, 10: Peo-gal, 11: Pet-ara, 12: Peo-glc, 13: Mal-gal, 14: Peo-glug, 15: Peo-ara, 16: Mal-glc, 17: Mal-glug, 18: Mal-ara, a: GA, b: PCA, c: MGA, d: HBA, e: VA, f: SA, g: HBAL, h: PGAL.

iso-FA-d₃) was from Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canada). HPLC solvents were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) and VWR International (Radnor, Pennsylvania, USA).

2.3. Sample storage

The blood samples were centrifuged at 4000 rcf and 4 °C for 10 min. Afterwards, the plasma was separated and the pH adjusted to pH 3 with formic acid (50% (v/v)): To 1 ml of plasma, 24 µl of for-

mic acid was added. Immediately after, the samples were frozen with liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis. Before the urine sampling started, the urine containers were prepared with 2–10 ml of hydrochloric acid (1 M) depending on the collection interval to ensure rapid acidic stabilization of the anthocyanins. After collection, all urine samples were adjusted to pH 2.5, then dispensed into aliquots and stored at -80 °C prior to analysis. The ileostomy effluents of group A were collected in standardized bags, immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -20 °C.

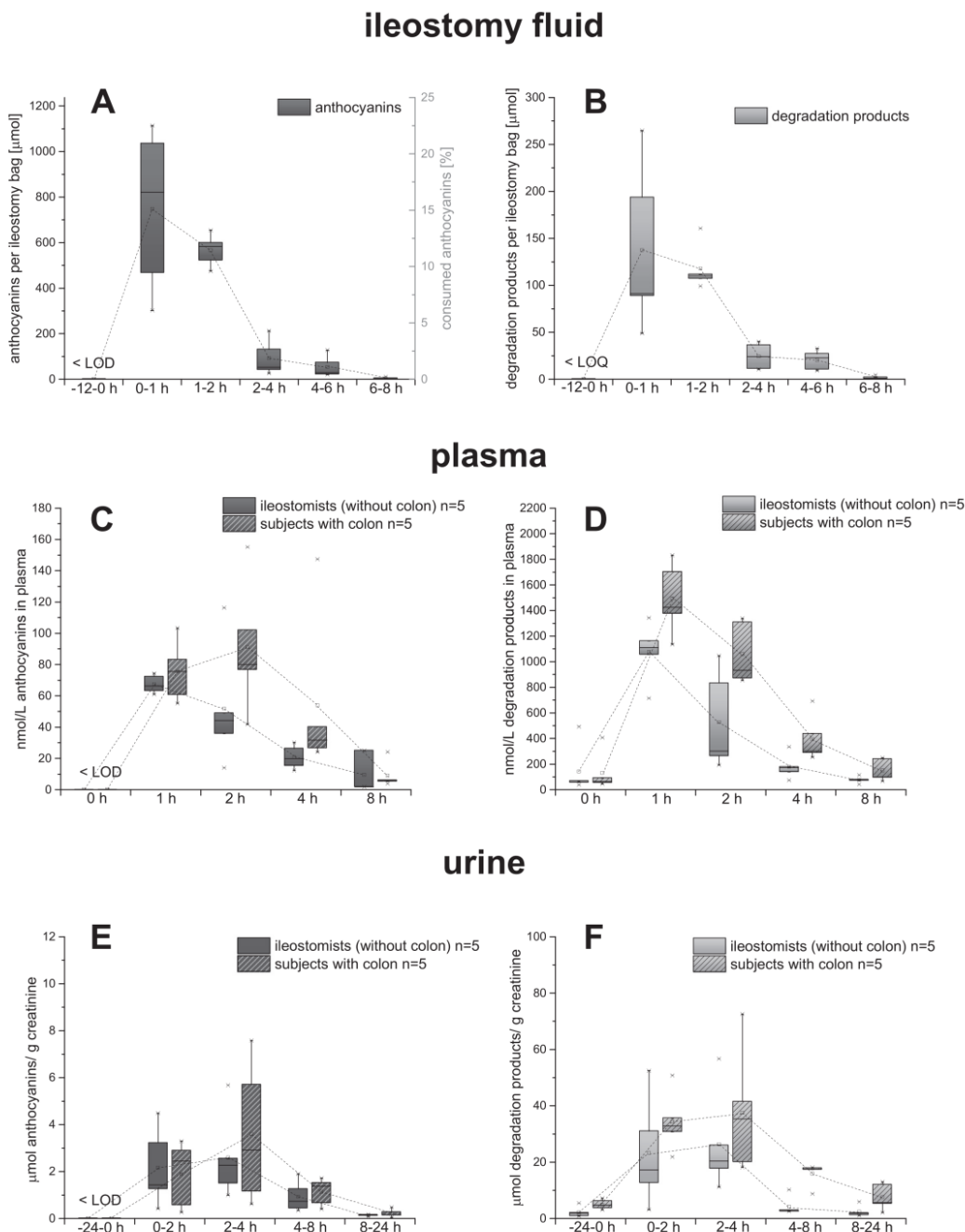


Fig. 4. Kinetics of anthocyanins and degradation products in ileostomy fluid (A, B), plasma (C, D) and urine (E, F) of ileostomists and healthy subjects after BE consumption.

2.4. Sample preparation

Ileostomy fluid was lyophilized to dryness (90 h, -54 °C, 0.47 mbar) and then homogenized. For anthocyanin analysis, the ileostomy samples were extracted with solvent A (87% acetonitrile/3% water/10% formic acid (v/v/v)) using an ultra turrax (60 s, 20.000 rcf) and centrifuged (20 min, 4500g, 25 °C). For further anal-

yses, the supernatants were used. For degradant analysis, ileostomy fluid samples were extracted with 90% water/10% formic acid (v/v) for 2 h with a thermomix (23 °C, 1400 rpm). The suspensions obtained were centrifuged (1 h, 4 °C, 20.000 rcf) and the supernatants were diluted 1:1 with ice cold ethanol, mixed, and cooled at -80 °C at least for 1 h to precipitate the proteins. This was followed by a second centrifugation, supernatants were

280

D. Mueller et al./Food Chemistry 231 (2017) 275–286

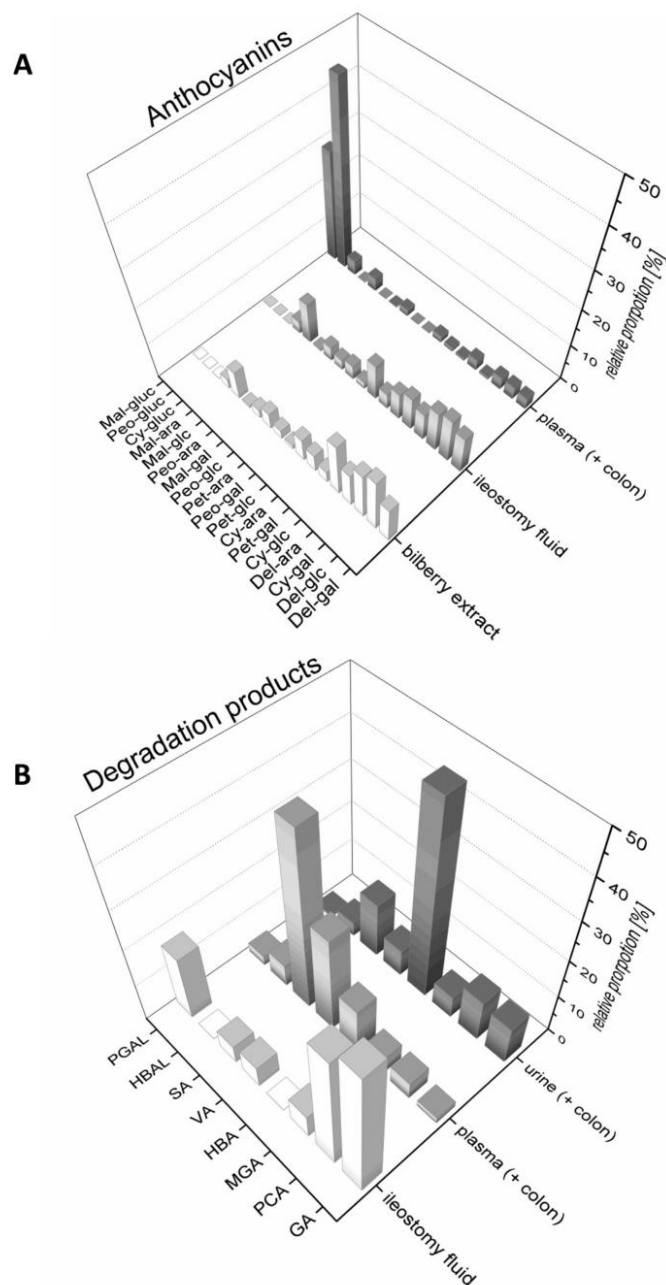


Fig. 5. Profiles of anthocyanins and glucuronides in BE, ileostomy fluid and plasma samples of healthy subjects (A), profiles of degradation products in ileostomy fluid, plasma and urine of healthy subjects (B).

evaporated and the residues were redissolved in 90% water/10% formic acid prior to analysis. Urine was purified and concentrated via solid phase extraction (SPE method 1) using a reversed phase Strata C18 U (500 mg/3 ml) from Phenomenex (Aschaffenburg, Germany). First the solid phase was conditioned with 4 ml methanol (100%), equilibrated with 4 ml of water/formic acid (95%/5%, v/v) and then loaded with urine (6 ml for the samples at –12–

0 h, 0–2, 2–4, 4–8 h and 9 ml for the samples at 8–24 h). The following elution step was carried out with 4 ml water/formic acid (95%/5%, v/v). Each eluate was dried in a vacuum centrifuge and the pellet redissolved in 300 μ l 87% acetonitrile/3% water/10% formic acid (v/v/v).

This solid phase extraction method without a washing step (see SPE method 1) was insufficient for the plasma samples. Plasma

contains a lot of proteins that can influence the analysis. Consequently, it was necessary to develop an alternative extraction method to provide adequate recoveries and sufficient purification. Using a washing step during SPE method 1, the recovery of the low molecular weight phenolic acids and aldehydes was low. The interaction between the polar solvent (water) and the phenolic acids/aldehydes seemed to be stronger than the interaction with the solid phase. Hence, we developed a method employing two combined sorbent materials to ensure adequate recovery of anthocyanins and phenolic acids/aldehydes in the same step. We overlaid two different sorbent materials. The lower sorbent was Strata X material (60 mg), a reversed phase of styrol divinylbenzol chains with γ -lactam moieties. The upper sorbent was the Strata C18 U sorbent (200 mg), which consists of C18 hydrocarbon chains. The first step of SPE method 2 was conditioning using 4 ml methanol (100%, v) followed by equilibration with 4 ml water/formic acid (95%/5%, v/v). The next step was loading with 4 ml of the plasma sample (diluted 1:1 with water/formic acid (95%/5%, v/v)) followed by a washing step with 2 ml water/formic acid (95%/5%, v/v). The sample loading step (with 4 ml plasma/water) and washing step (2 ml water/formic acid) were then repeated. The samples were eluted with 3 ml methanol/formic acid (95%/5%, v/v). This protocol was carried out in parallel to the preparation of urine samples (see above).

The sample preparation of urine and ileostomy fluid was performed in triplicate, whereas single plasma samples were analyzed owing to limited collection volumes. Prior to HPLC-analysis internal standards were added to all samples: 10 $\mu\text{g/ml}$ del-3,5-diglc for HPLC-DAD and 0.1 $\mu\text{g/ml}$ del-3,5-diglc for HPLC-MS/MS, and 0.2 $\mu\text{g/ml}$ iso-FA-d₃ for HPLC-MS/MS analysis, respectively. The recovery from ileostomy fluid was 95 \pm 7% for anthocyanins and 95 \pm 10% for degradants. The recovery using SPE method 1 was 102 \pm 6% from water (pH 2.5) and 89 \pm 25% from an anthocyanin free urine matrix for anthocyanins, and 102 \pm 4% from water (pH 2.5), and 106 \pm 5% from the urine matrix for degradation products. SPE method 2 yielded an anthocyanin recovery values of 95 \pm 7% from water (pH 2.5) and 91 \pm 15% from plasma, and degradant values of 95 \pm 10% from water (pH 2.5), and 84 \pm 15% from plasma.

2.5. Qualitative and quantitative analysis of anthocyanins and degradation products

Standard references were used for optimization of the HPLC instrument (Agilent 1200), which was coupled with a tandem mass spectrometer system equipped with an ESI interface (API 3200, ABSciex). The identification of analytes in plasma, urine and ileal fluids was based on comparison of the chromatographic retention times and MS² fragmentation with ≥ 3 parent-daughter ion-fragmentation transitions to the reference data. Glucuronides and sulfates were verified by neutral loss scan (cleavage of a glucuronyl group with a loss of 176 amu and cleavage of a sulfate group with a loss of 80 amu) and MS² fragmentation compared with published data (Ferrars et al., 2014). The detected analytes in the different types of matrix, i.e., plasma, urine and ileal fluid, are shown in Fig. 3.

Anthocyanins in BE, ileal fluids, and urine samples were quantified by a previously described HPLC-DAD method (Kropat et al., 2013; Müller et al., 2012). For their quantification in plasma, a HPLC-ESI-MS/MS instrument operating in the multi reaction monitoring mode (MRM) was used. HPLC chromatographic separation was carried out with a Luna C18 (u) column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) at 23 °C, with a flow rate of 0.5 ml/min and an injection volume of 20 μl . The mobile phase consisted of water/ acetonitrile/formic acid (92%/3%/5%; v/v/v) solvent A and water/ acetonitrile/formic acid (45%/50%/5%, v/v/v) solvent B. The gradient comprised 0–20 min, 2–14% B; 20–40 min, 14% B; 40–50 min, 14–

15% B; 50–55 min, 15–19% B; 55–65 min, 19–20% B; linear step to 99% B for 5 min; and return to initial condition of 2% B for 10 min. The ESI-MS instrument-parameters were carried out in positive mode: curtain gas, 30 psi; ion spray, 5000 V; temperature, 450 °C; gas 1, 50 psi; gas 2, 40 psi. The substance-specific parameters of individual compounds and transitions are listed in Table 1S – see supplementary data. Semi-quantification was performed with external calibration of cy-3-glc in polyphenol-free plasma (every 25 measurements) and the internal standard del-3,5-diglc. Calibration curves ranged from 0.002 to 2 $\mu\text{mol/L}$ with linearity coefficient of 0.999 R^2 and a limit of quantification (LOQ) of 0.002 $\mu\text{mol/L}$.

Degradation products in plasma, urine, and ileal fluids were quantified after extraction using HPLC-ESI-MS/MS in the negative MRM mode. Separations of phenolic acids and aldehydes were performed using the same column as reported before. The mobile phase was pumped at a flow rate of 0.5 ml/min and contained 0.5% aqueous acetic acid (A) and 100% acetonitrile (B). The injection volume was 20 μl and the following gradient protocol was used: 0 min, 10% B; 15 min, 10% B; 25 min, 15% B; 35 min, 15% B; 40 min, 35% B; 52 min, 35% B; 52.1 min, 90% B; 55 min, 90% B; 55.1 min, 10% B; and 60 min, 10% B. To enhance the selectivity of the individual mass traces, the method was divided into three separate time periods: the instrument-specific parameters during Period 1 (0–26 min) were set to 30 psi curtain gas, –4500 V ion spray, 700 °C temperature, 60 psi gas 1 and 40 psi gas 2, whereas during Period 2 (26–44 min) and Period 3 (44–59 min), they were changed to 25 psi curtain gas, –4000 ion spray, 50 psi gas1 and 70 psi gas 2. The substance-specific parameters are listed in Table 1S – see supplementary data. The references and internal standard (iso-FA-d₃) were added to samples of polyphenol-free ileal fluid, urine and plasma to generate individual calibration curves and compensate for suppression of ionization by the matrix. Calibration curves ranged between 0.003 $\mu\text{mol/L}$ to 6 $\mu\text{mol/L}$ ($R^2 \geq 0.99$) and the LOQ was 0.003–0.190 $\mu\text{mol/L}$ depending on the analytes.

2.6. Determination of intestinal passage time

To determine how fast food components (anthocyanins) were excreted, the volunteers under study drank 330 ml of conventional bilberry juice. For the group of ileostomists, the individual intestinal passage time was defined as the time of coloring of ileostomy fluid, whereas for the subjects with intact gastrointestinal passage, the coloring of feces was monitored and documented.

2.7. Statistical analysis and calculations

Due to the low number of subjects in this study, no significant testing was meaningful. This study is a pilot intervention and gives hints and motivation to design more powerful intervention studies. Pharmacokinetic parameters (see Table 1), such as the area under the curve (AUC) of plasma analytes, were determined by integration of the concentration curves between 0 to 8 h using the linear trapezoidal rule. The time point where maximum of plasma concentration (C_{max}) was reached was defined as T_{max} . The plasma concentrations of anthocyanins and degradants were expressed as a Bateman function, which is representative of oral ingestion. Elimination started at T_{max} and followed first order kinetics for an approximate one compartment system. For calculation of the half life, $T_{1/2}$, we plotted the natural logarithm (ln) of the concentration against time and fitted the data to a linear equation to calculate the elimination rate constant from the slope: $T_{1/2}$ was then calculated from the slope using a quotient of ln (2). All parameters must be considered with appropriate insecurities corresponding to the low number of subjects.

Table 1
Pharmacokinetic parameters (AUC, C_{max} , T_{max} , $T_{1/2}$) of most abundant anthocyanins and specific degradants in plasma of ileostomists (–colon) and healthy subjects (+colon) after intake of bilberry extract.

	Plasma (– colon)			
	AUC _{0–sh} [(nmol/L)·h]	C_{max} [nmol/L]	T_{max} [h]	$T_{1/2}$ [h]
Anthocyanins				
Mal-gluc	49 ± 28	13 ± 3	1.4 ± 0.5	2.2 ± 0.9
Peo-gluc	100 ± 66	31 ± 13	1.4 ± 0.5	2.2 ± 2.0
Degradants				
GA	36 ± 20	13 ± 4	1.2 ± 0.5	2.3 ± 1.0
MGA	76 ± 35	40 ± 10	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.2
PCA	91 ± 32	40 ± 9	1.0 ± 0.0	1.4 ± 0.3
PGAL	128 ± 73	35 ± 16	1.8 ± 1.3	3.8 ± 2.7
SA	1057 ± 376	541 ± 101	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.2
VA	498 ± 132	252 ± 39	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3
	Plasma (+ colon)			
	AUC _{0–sh} [(nmol/L)·h]	C_{max} [nmol/L]	T_{max} [h]	$T_{1/2}$ [h]
Anthocyanins				
Mal-gluc	109 ± 55	27 ± 11	1.4 ± 0.5	2.0 ± 0.4
Peo-gluc	194 ± 120	43 ± 21	2.2 ± 1.1	1.8 ± 0.2
Degradants				
GA	81 ± 47	25 ± 12	1.4 ± 0.5	4.0 ± 4.8
MGA	194 ± 39	79 ± 25	1.0 ± 0.0	1.2 ± 0.4
PCA	206 ± 93	81 ± 32	1.0 ± 0.0	1.5 ± 0.3
PGAL	144 ± 52	29 ± 8	2.4 ± 0.9	6.1 ± 2.3
SA	2008 ± 522	777 ± 182	1.0 ± 0.0	1.4 ± 0.2
VA	1182 ± 387	379 ± 111	1.2 ± 0.5	1.8 ± 0.3

3. Results

3.1. Anthocyanins and degradation products in ileostomy fluid

We investigated the time it took for food components to reach the small intestine and their subsequent elimination. The intestinal transit times of ileostomists were estimated to be between 15–60 min after juice intake. The maximal coloring of feces of subjects with an intact gut was observed by themselves within 24 h.

Fig. 4 shows the amounts of total anthocyanins (Fig. 4A) and total degradation products per ileostomy bag (Fig. 4B) at selected times.

The majority of ingested anthocyanins were excreted between 0 and 2 h, i.e., 0 to 1 h: 748.3 ± 353.3 μmol anthocyanins; 1–2 h: 566.8 ± 69.7 μmol anthocyanins per ileostomy bag, corresponding to $15.1 \pm 7.1\%$ and $11.5 \pm 1.5\%$ of consumed anthocyanins from BE, respectively. Between 2–4 h and 4–6 h, only $1.9 \pm 1.6\%$ (92.6 ± 78.3 μmol) and $1.1 \pm 0.9\%$ (54.3 ± 46.5 μmol), respectively, of ingested anthocyanins were excreted via ileostomy fluid. After 8 h, no excretion of anthocyanins was detected for most subjects except two participants, for which 1–4 μmol anthocyanins were detected in the effluents. Over the entire 8 hours, the total amounts of anthocyanins analyzed in ileostomy fluid was 1465.0 ± 308.4 μmol , which corresponds to total intestinal excretion via the small intestine in ileostomists of $29.6 \pm 6.2\%$ of initial bilberry anthocyanins.

The rate of occurrence of intestinal degradation products was similar to the kinetics of anthocyanins, although the inter-individual concentrations varied significantly. Again, maximum concentrations were achieved at 0–1 h (137.5 ± 89.1 μmol per bag) and 1–2 h (117.8 ± 24.4 μmol per bag), but the amounts were 20% lower compared to those of anthocyanins. After 2–4 h and 4–6 h, the intestinal amount of degradation products decreased to 24.4 ± 13.7 μmol and 20.4 ± 10.3 μmol , respectively, around 3 to 4 times lower than the anthocyanin concentration at the same times. At around 8 h after BE consumption, the intestinal concentration of degradation products was as low as 1.5 ± 1.9 μmol . The total amount of degradation products in the small intestine quantified over 8 h of excretion was 301.6 ± 79.1 μmol , corresponding

to only a fifth of the analyzed total anthocyanins in this effluent compartment.

3.2. Concentrations of anthocyanins and their degradation products in the blood circulation

Fig. 4C and D show the time-dependent concentration of consumed anthocyanins reaching the human blood circulation in their intact and conjugated form (mainly glucuronides, see Fig. 5A) and as degraded products, namely GA, PCA, MGA, HBA, VA, SA, HBA, PGAL.

The maximum concentration of anthocyanins in the plasma of ileostomists was reached 1 h after ingestion of the BE and corresponded to 67.4 ± 5.8 nmol/L. At later time points, the anthocyanin concentration decreased continuously to 51.9 ± 38.4 nmol/L after 2 h, 20.8 ± 7.5 nmol/L after 4 h and 9.6 ± 13.4 nmol/L after 8 h. In contrast, the kinetics of anthocyanins in the plasma of subjects with a colon followed a different trend. After 1 h, the amount of plasma anthocyanins was 75.6 ± 19.1 nmol/L and the maximum concentration was obtained after 2 h of 91.2 ± 41.8 nmol/L anthocyanins. After 4 h and 8 h, the concentration was only 54.0 ± 52.5 and 9.1 ± 8.5 nmol/L, respectively.

Fig. 4D shows base line amounts of degradants were present at the first time point (0 h), just prior the BE bolus intake. The amounts reached 143.3 ± 195.9 nmol/L for ileostomists and 132.2 ± 154.9 nmol/L for the subjects with a colon. After 1 h, the concentration of degradation products increased to a maximum of 1077.1 ± 229.4 nmol/L for ileostomists and 1494.8 ± 275.7 nmol/L for 'healthy' subjects. With increasing time, the amount of degradation products in plasma then declined: after 2, 4 and 8 h, the concentrations were 527.9 ± 385.7 nmol/L, 179.6 ± 96.3 nmol/L and 77.3 ± 26.2 nmol/L in the plasma of ileostomists and 1061.6 ± 241.7 nmol/L, 395.0 ± 180.1 nmol/L and 150.5 ± 86.8 nmol/L in the plasma of healthy subjects, respectively.

3.3. Elimination of anthocyanins and degradation products via urine

Fig. 4E and F present the urinary elimination kinetics of anthocyanins and degradation products. In the urine samples of ileosto-

mists, the main excretion of anthocyanins occurred between 0–2 h ($2.2 \pm 1.7 \mu\text{mol/g creatinine}$) and 2–4 h ($2.6 \pm 1.8 \mu\text{mol/g creatinine}$). Between 4–8 h after BE consumption, the mean concentration was $0.9 \pm 0.6 \mu\text{mol/g creatinine}$, compared to $0.1 \pm 0.1 \mu\text{mol/g creatinine}$ between 8–24 h. For 0–2 h, the concentration of anthocyanins in the urine of healthy subjects was $1.9 \pm 1.4 \mu\text{mol/g creatinine}$. After 2–4 h, a maximum was reached of $3.6 \pm 3.0 \mu\text{mol anthocyanins per g creatinine}$. However, high inter-individual differences were observed. After 4–8 h, the anthocyanin concentration in urine decreased to $1.1 \pm 0.6 \mu\text{mol/g creatinine}$, and after 8–24 h, to $0.2 \pm 0.2 \mu\text{mol/g creatinine}$.

Similar to the plasma findings, the results of the degradation products in urine showed a baseline concentration of analytes prior BE intake. During the polyphenol-free diet prior to BE consumption (between –24–0 h), the subjects with and without colon excreted $5.0 \pm 1.7 \mu\text{mol/g creatinine}$ and $2.2 \pm 1.9 \mu\text{mol/g creatinine}$, respectively. After intake at 0–2 h and 2–4 h, the concentration of anthocyanins in urine of ileostomists increased to $23.3 \pm 19.1 \mu\text{mol/g creatinine}$ and $26.4 \pm 17.7 \mu\text{mol/g creatinine}$, respectively. After 4–8 h, the urine contained $4.2 \pm 3.4 \mu\text{mol/g creatinine}$, and after 8–24 h, only $2.4 \pm 2.0 \mu\text{mol degradation products per g creatinine}$ were excreted. After 0–2 h and 2–4 h in the urine of subjects with a colon, $34.4 \pm 10.5 \mu\text{mol/g creatinine}$ and $37.5 \pm 21.9 \mu\text{mol/g creatinine}$ of degradants were detected, respectively. The urinary contents of degradation products between 4–8 h and 8–24 h amounted to $16.0 \pm 4.0 \mu\text{mol/g creatinine}$ and $7.6 \pm 4.7 \mu\text{mol/g creatinine}$, respectively, comparable to the baseline concentrations of –24–0 h urine just before BE intake.

3.4. Analyte profile and main metabolites

The main anthocyanins (see Fig. 5A) in the BE were Del-3-glc (15.6%), Cy-3-glc (15.3%), Cy-3-gal (13.6%), Del-3-gal (10.5%), Del-3-ara (9.8%) and Mal-3-glc (7.8%), similar to the profile of fresh bilberry fruits or juices (Müller et al., 2012). At first glance, the distribution of anthocyanins after BE consumption at the end of the small intestine was comparable to the initial anthocyanin profile of the BE. However, profile shifts were observed in the ileostomy fluid, i.e., decreased percentage of Cy-3-glc (9.2%) and increased percentages of Mal-3-glc (11.1%), Pet-3-glc (10.0%) and Pet-3-gal (7.4%). Metabolized anthocyanins (such as glucuronides or sulfates) were not found in these intestinal effluents. In contrast, absorbed anthocyanins reached the human circulation essentially as glucuronides. The major anthocyanins detected in the plasma samples were Peo-gluc (46.2%) and Mal-gluc (28.3%). Other analytes, such as Del-3-gal, Del-3-glc, Cy-3-gal, Cy-3-glc, Mal-3-glc and Cy-glc, contributed 2.9–3.8% of the total. Most anthocyanin-arabinosides were not detectable in the plasma and made a negligible contribution to the overall profile. Anthocyanin sulfates and anthocyanin-glycoside-glucuronides could not be identified in the study.

The formation pattern of monocyclic degradation products from consumed anthocyanins is illustrated in Fig. 5B. Major degradants in the ileostomy fluid (over 8 h) were GA (35.4%), PCA (31.3%) and PGAL (16.7%). These phenolic acids (GA, PCA) originate from the B-ring of delphinidin and cyanidin glycosides, the main anthocyanins in the BE. Although PGAL results from the A-ring, and could therefore be associated to each parent anthocyanin (independent of B-ring substitution), it was only found to be the third most abundant metabolite in intestinal excretion. Other polyphenols or other phenolics of the initial BE (see 2.2) may cause the different ratio from GA and PCA to PGAL. MGA, VA and SA, which correspond to petunidin, peonidin and malvidin, respectively, were minor degradants in the ileostomy fluid, representing 4.7–6.3% of the total. HBA and HBAL could not be detected in the ileostomy fluid. The profile of degradation products in the ileostomy fluid dif-

fered from the pattern of degradants in the small intestine. The main compounds in the plasma (AUC 0–8 h) of healthy subjects were SA (45.0%) and VA (24.6%). This correlated with the detected presence of the glucuronides malvidin and peonidin (Fig. 5A), which possess an equivalent B-ring to the afore-mentioned degradants. HBA (11.7%) and HBAL (5.7%) were identified in the plasma samples after anthocyanin consumption but could not be considered specific due to their presence in baseline plasma samples (first blood sample 0 h, prior to BE intake, after two days of wash out). The plasma profile also included PCA and MGA at 4.5% and PGAL and GA at 2.4% and 1.6%, respectively.

The mainly excreted degradation product in urine (healthy participants) was HBA with 48.7%. However, it could not be considered a specific marker of anthocyanin intake because substantial amounts were found in the baseline urine samples (–24–0 h urine, collected during the wash out period, Fig. 4F), analogous to the plasma data. Both HBAL (3.5% over 24 h intervention) and VA (6.8% over 24 h intervention) were also present in the baseline urine but were absent from baseline plasma. Beside these degradants, others deemed more specific of anthocyanin exposure were the excretion of SA (14.1%), PCA (10.9%) and GA (9.9%) in urine after BE consumption. The lowest components in urine were MGA (5.7%) and PGAL (0.4%). Further metabolites of these degradation products (such as glucuronides and sulfates) were identified by LC-MS/MS neutral loss detection (mass loss of 176 and 80 amu). These results and previous data from the literature (Ferrars et al., 2014) confirm the presence of VA-glucuronides and PCA-glucuronides in plasma and urine. However, the glucuronides could not be quantified in the present study owing to a lack of suitable standard references. Few standards were offered for purchase but most had to be synthesized by ourselves in chemical or enzymatic ways (Heleno, Martins, Queiroz, & Ferreira, 2015; Stachulski & Meng, 2013). In addition, the urine samples were analyzed for their occurrence of ferulic acid, coumaric acid, and hippuric acid. MS data was not quantified but showed high peak areas in urine after anthocyanin exposure as well in baseline urine without any intake of polyphenols.

The plasma profiles of anthocyanins, metabolites and degradation products demonstrate the variety of analytes reaching the human circulation after anthocyanin exposure to BE. Table 1 summarizes the kinetic characteristics (AUC, C_{max} , T_{max} , $T_{1/2}$) of the main anthocyanins (such as Mal-gluc and Peo-gluc) and degradants (such as GA, MGA, PCA, PGAL, SA and VA) in plasma. In this table, data from the plasma of ileostomists (without colon, Table 1, top) are compared with those of healthy subjects (with colon, Table 1, bottom). As shown in Fig. 4, higher amounts of anthocyanins and their degradation products were obtained in the presence of a healthy gut, a trend also reflected in the individual values of AUC and C_{max} in Table 1. The results of T_{max} were similar for both groups of subjects. The largest difference was for Peo-gluc, which showed T_{max} of 2.2 ± 1.1 h for subjects with a colon compared to T_{max} of 1.4 ± 0.5 h for subjects without a colon. High inter-individual variation was observed for T_{max} of PGAL, i.e., 2.4 ± 0.9 h for subjects with a colon and 1.8 ± 1.3 h for subjects without a colon. The half-life $T_{1/2}$ indicates the time required for the concentration to drop to 50% of C_{max} and allows conclusions regarding the elimination rate to be drawn. The value of $T_{1/2}$ for anthocyanin glucuronides was 2.2 h and 1.8–2.0 h in plasma for subjects without a colon and with a colon, respectively. MGA, PCA, SA and VA were more rapidly eliminated via plasma with a range of $T_{1/2}$ from 1.0–1.4 h (without colon) and 1.2–1.8 h (with colon). Both GA and PGAL showed relatively long residence times in plasma with high inter-individual differences: $T_{1/2}$ of GA in plasma was 2.3 h (without colon) and 4.0 h (with colon), and the highest $T_{1/2}$ values were calculated for PGAL of 3.8 h (without colon) and 6.1 h (with colon).

4. Discussion

4.1. Availability of consumed anthocyanins and formation of degradation products in the small intestine

Owing to the small number of subjects ($n = 5$) in each group and high inter-individual differences, significance tests were not particularly meaningful. Hence, this study represents a pilot study and the inter-individual differences could be improved by recruiting a larger number of volunteers. The results suggested that anthocyanins might reach the small intestine within 1 h and were at least partially stable at intestinal pH. Our results and others have shown, that the amount of anthocyanins along the intestinal gut passage corresponds to on average 30–50% of the ingested anthocyanins (Kraus et al., 2010; Wu, Pittman, & Prior, 2006), but the availability in plasma is very low. This raises the question - what happened to the missing 50–70% after intake? Under an acidic pH, anthocyanins have been shown to be very stable inside the stomach (Schantz et al., 2014). By entering the intestine, there is an abrupt change in pH, which might adversely affect the stability of anthocyanins. Fig. 1 shows the reported diversity of structural modifications of anthocyanins under physiological conditions (Czank et al., 2013; Ferrars et al., 2014; Ferrars et al., 2014; Kalt, Liu, McDonald, Vinqvist-Tymchuk, & Fillmore, 2014; Keppler & Humpf, 2005). In the past, phenolic acids and phloroglucinol aldehyde were principally identified as intestinal degradation products (Keppler & Humpf, 2005). To check the whereabouts of the anthocyanins, we investigated for the first time the presence of phenolic acids and aldehydes in ileostomy fluid after BE consumption. After reaching the blood circulation, Phase II metabolites were expected to reenter the intestine via enterohepatic circulation into the ileostomy fluid. In our ileal samples, glucuronated or sulfated forms of anthocyanins or degradants were not detected, in good agreement with other studies (Kahle et al., 2006). The kinetics of degradation products in ileostomy fluid were comparable to the kinetics of anthocyanins. The total amounts of degradants over 8 h corresponded to only one fifth of the anthocyanins. This fact corresponding with the low bioavailability indicates that anthocyanins must exist in other structures along the gastrointestinal passage. The extent to which aglyca and chalcones exist in the intestine has not been described to date. The detection of unstable aglyca and chalcones poses a considerable analytical challenge (Kalt et al., 2014). The manner, by which these structures react with other molecules *in vivo* and the effects of co-pigmentation or association with other molecules of the chyme, matrix or tissue remain unknown. Anthocyanins and their aglyca may form co-pigments (Eiro & Heinonen, 2002) and complexes (Cavalcanti et al., 2011) in aqueous solution, but whether this holds significance *in vivo* has so far not been examined. Further associations of anthocyanins or chalcones with other molecules are conceivable. Initial evidence suggests that binding is possible between anthocyanins and plasma proteins. For instance, measurement of the intrinsic fluorescence intensity of protein tryptophan residues demonstrated the binding affinity of Mal-glc to bovine serum albumin (Soares et al., 2007). However, the nature of binding has not yet been investigated.

4.2. Bioavailability of anthocyanin associated structures in the human circulation after BE consumption and its urinary elimination in the presence of an intact gut

Anthocyanins are absorbed rapidly after ingestion (maximum after 2 h). The bioavailability of anthocyanins in plasma (over 8 h after BE intake) was low, corresponding to only 0.02% (calculated for a total plasma volume of 2–3 L) of ingested anthocyanins. In urine samples, $0.03 \pm 0.02\%$ of ingested anthocyanins over the

entire 24 h were found. The major anthocyanins (see Fig. 5A) in the plasma and urine samples were the glucuronated forms of malvidin (28%) and peonidin (46%). The minor compounds were 0.2–4% of the profile and the glucuronated forms of delphinidin and petunidin could not be detected. Although delphinidin, cyanidin and petunidin were in higher amounts in the initial extract, they showed minor concentrations in plasma. A reason of this could be effects of dehydroxylation and methylation in the organism. This trend is in good agreement with previous studies (Cooke et al., 2006; Fernandes et al., 2014; Pojer, Mattivi, Johnson, & Stockley, 2013).

Current research has shown that the formation of degradation products and metabolites occurs in significant quantities in blood and urine after anthocyanin intake (Czank et al., 2013; Ferrars et al., 2014). This fact is of great importance for the total bioavailability of anthocyanins and their benefits in humans, especially phenolic acids, which are thought responsible for the main effects (Lu, Nie, Belton, Tang, & Zhao, 2006; Nile & Park, 2014; Peiffer et al., 2014; Russell & Duthie, 2011). Our data demonstrate that the formation of degradants is very fast. Rapid appearance in the circulation (within 0–1 h) was accompanied by rapid urinary elimination (within 0–4 h). The major degradants in plasma, i.e., SA and VA (originating from the major anthocyanins in plasma, malvidin and peonidin), were also identified in previous studies after bilberry consumption (Nurmi et al., 2009). The kinetic characteristics of PGAL were different from those of the phenolic acids because of the extended long half-life ($T_{1/2}$, 6.1 h). It was also the third most abundant metabolite in the small intestine after BE consumption (Fig. 5B) and can theoretically result from any anthocyanin, irrespective of their B-ring. PGAL was not observed as a major metabolite in urine or plasma samples. It is conceivable that other structures result from the A-ring or PGAL continues to react *in vivo*. First tests show certain binding properties between these degradation products with bovine serum albumin (data not shown). Further effects with endogen structures or different ways of degradation are possible. The complex mixture of anthocyanin metabolites generated may be the main reason for the potentially beneficial effects in humans. The formation of many different metabolites with different functionalities may cause synergistic effects *in vivo*. For this case further investigations are needed. Our results revealed that the plasma level of degradation products was up to 20 times higher than that of anthocyanins. In urine, the ratio of degradants to anthocyanins was as high as 38:1. This is consistent with other results (Czank et al., 2013). However, our study did not consider all the possible metabolites formed. A further limitation of our study was the timeframes. Even 8 h after BE consumption, there was still a plasma level of degradation products. This was consistent with the urine results: several degradants were still present after 24 h and elimination seemed not complete at this time point. We found a baseline plasma level of HBA and HBAL prior to BE intake and comparable results for urine baseline, with high amounts of HBA and moderate concentrations of HBAL and VA. Additionally, hippuric acid was identified between –24–0 h in urine but was not further quantified because of its non specificity. Sources for these metabolites could be other polyphenols or grain products, which contain, e.g., ferulic acid and *p*-coumaric acid (Mattila, Pihlavan, & Hellström, 2005). Endogenous formation of vanillic acid has also been described in the literature (Rosen & Goodall, 1962). In the literature, there is already evidence that anthocyanin associated metabolites remain up to 48 h in urine. Czank and coworkers found that after ^{13}C -3-glc ingestion, high concentrations of the glycine conjugated hippuric acid were present in the urine of subjects after 48 h (Czank et al., 2013). Almost all phenolic compounds can be metabolized to hippuric acid. Thus, hippuric acid can only be used as a metabolite specific for anthocyanin exposure if, and only if, the parent anthocyanin was labeled

prior to ingestion. Human studies with many initial anthocyanins (BE contains 15 several anthocyanins) may implicate multiple metabolites. Carrying out these studies with fruit, juices or extracts as a source of anthocyanins (unlabeled) may complicate unambiguous assignment to the parent compounds. Nevertheless, such investigations mimic the actual route of exposure through the daily diet and include potential synergy effects with other polyphenols or matrix constituents.

4.3. Role of the small and large intestine in the resorption of consumed anthocyanins

The bowel plays an important role in the bioavailability of anthocyanins. This was demonstrated by the results for subjects with an intact healthy gut compared to ileostomists with an interrupted intestinal passage lacking a colon. The amounts of anthocyanins in the plasma and urine of healthy subjects was 79% and 44% higher, respectively, than in the plasma and urine of ileostomists. This indicates considerably higher bioavailability in the presence of an intact upper gut. Previous studies have assumed that anthocyanins could reach the circulation via the stomach (Passamonti, Vrhovsek, Vanzo, & Mattivi, 2003), despite the fact that at pH 1–2, they exist as polar flavylium cation, which impedes their passive diffusion through the mucosa. These studies suggested that anthocyanins may interact with bilitranslocase to transport these compounds from the lumen into the epithelial layers of the gastric mucosa (Passamonti, Vrhovsek, & Mattivi, 2002). Fernandes and coworkers demonstrated transport of anthocyanins through adenocarcinoma stomach cells (MKN-28), which could cause their absorption by facilitated diffusion (Fernandes, de Freitas, Reis, & Mateus, 2012). More investigations are useful because the mechanism and the identity of the transporter involved in the absorption of anthocyanins at the gastric level are still unknown (Fernandes et al., 2012).

As the ileostomists in the present study were found to absorb some anthocyanins, the stomach could still be a potential site of absorption. However, much more important for uptake seems to be the upper small intestine, mainly the jejunum as the main site of absorption (Matuschek, Hendriks, McGhie, & Reynolds, 2006; McGhie & Walton, 2007; Talavéra et al., 2004). The small intestine was present in both the ileostomists and healthy subjects, but the anthocyanins collected in the ileostomy bags would not be available for absorption in the intestine of ileostomists. This might explain the higher absorption in the healthy subjects. Furthermore, the lower gut in subjects with a colon may serve as another site of uptake. The rapid attainment of plasma anthocyanins (maximum 2 h) implicates the small intestine as the main site of absorption via active transporters or passive diffusion following deglycosylation (Kay, 2006).

Even more striking are the results of the degradation products. 100% more degradants reached the plasma of subjects with healthy gut and 75% more degradants were excreted via urine. Firstly, more degradation products might reach the circulation via the intact gut. Secondly, absorbed anthocyanins in the plasma may directly form degradation products in the circulation at pH 7.4. However, the importance of the enterohepatic circulation or influence of transit time was not investigated here.

In conclusion, after oral intake of BE, anthocyanins were absorbed rapidly and the human bioavailability of initial anthocyanins was very low (0.02% plasma/0.03% urine). Anthocyanins, which form structures based on the flavylium cation, reached the circulation mainly as glucuronides, especially of the malvidin and peonidin type. In contrast, anthocyanin-associated monocyclic degradation products were formed to a greater extent after BE consumption. Our study revealed that the plasma level of several selected degradants was up to 20 times higher in plasma and 38

times higher in urine compared to the parent anthocyanins. Other results have also demonstrated that the estimated total bioavailability is increased substantially when degradation products are considered in the calculation (Czank et al., 2013; Ferrars et al., 2014).

The microbiota in the small intestine may be different in healthy and ileostomy subjects. Nevertheless, ileostomists represent a simple, noninvasive model to demonstrate how food ingredients reach the small intestine and are therefore available for colonic absorption in healthy subjects. We detected about 30% of ingested anthocyanins in ileostomy fluid and, these concentrations remained relatively stable over 8 h during upper intestinal passage. The fate of the remaining 70% is difficult to identify, but some indication is provided by the analysis of formed degradation products reaching the gut. At first time, we investigated the amounts of specific degradants present in ileostomy fluid. GA, PCA and PGAL were the main degradants in the small intestine. However, in the circulation, SA and VA were predominant. PGAL had the highest half live in plasma, and therefore remained longest in the human circulation. The intestinal concentration of degradation products was just a fifth of that of the anthocyanins. While these results provide useful insights, further studies are essential to understand the complexity and whereabouts of anthocyanins during human gut passage.

The innovative aspect of the study reported here was the direct comparison of healthy subjects and ileostomists regarding the bioavailability of anthocyanins and influence of the small intestine. We found higher bioavailability of anthocyanins in the presence of an intact gut which confirms the gut as a potential site of action.

Funding sources

Funding was provided for the IGF project AiF 17039N of 'Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI)', Godesberger Allee 142–148, 53175 Bonn, through the program entitled 'Programm zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages'.

Acknowledgement

The authors would like to thank the 'Projektbegleitender Ausschuß, PbA', the volunteers of the study and the project partner Univ. Prof. D. Marko (University of Vienna, Austria).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.130>.

References

- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Reviews International*, 44, 499–509.
- Cooke, D. N., Thomasset, S., Boocock, D. J., Schwarz, M., Winterhalter, P., Steward, W. P., ... Marczyllo, T. H. (2006). Development of analyses by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography/tandem mass spectrometry of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins in human plasma and urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7009–7013.
- Czank, C., Cassidy, A., Zhang, Q., Morrison, D. J., Preston, T., Kroon, P. A., ... Kay, C. D. (2013). Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: A ¹³C-tracer study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(5), 995–1003.
- Czank, C., De Ferrars, R., Amin, H., Kroon, P., Zhang, Q., Kalowole, K., ... Kay, C. (2012). The impact of human metabolism on the bioactivity of anthocyanins. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(OCE2), E181.

Eiro, M. J., & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7461–7466.

Felgines, C., Talavera, S., Gonthier, M. P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J. L., & Rémesy, C. (2003). Strawberry Anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *The Journal of Nutrition*, 133(5), 1296–1301.

Fernandes, I., de Freitas, V., Reis, C., & Mateus, N. (2012). A new approach on the gastric absorption of anthocyanins. *Food & Function*, 3(5), 508–516.

Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, 7, 54–66.

Fernandes, I., Faria, A., de Freitas, V., Calhau, C., & Mateus, N. (2015). Multiple-approach studies to assess anthocyanin bioavailability. *Phytochemistry Reviews*, 14(6), 899–919.

Ferrars, R., Czank, C., Zhang, Q., Botting, N., Kroon, P., Cassidy, A., & Kay, C. (2014). The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. *British Journal of Pharmacology*, 171(13), 3268–3282.

Ferrars, R. M., Cassidy, A., Curtis, P., & Kay, C. D. (2014). Phenolic metabolites of anthocyanins following a dietary intervention study in post-menopausal women. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58(3), 490–502.

He, Z., Xu, M., Zeng, M., Qin, F., & Chen, J. (2016). Interactions of milk α - and β -casein with malvidin-3-O-glucoside and their effects on the stability of grape skin anthocyanin extracts. *Food Chemistry*, 199, 314–322.

Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., & Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173, 501–513.

Juadjur, A., & Winterhalter, P. (2012). Development of a novel adsorptive membrane chromatographic method for the fractionation of polyphenols from bilberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2427–2433.

Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., Ackermann, M., Ridder, F., & Richling, E. (2006). Studies on apple and blueberry fruit constituents: Do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(4–5), 418–423.

Kalt, W., Liu, Y., McDonald, J. E., Vinqvist-Tymchuk, M. R., & Fillmore, S. A. (2014). Anthocyanin metabolites are abundant and persistent in human urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 3926–3934.

Kay, C. D. (2006). Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutrition Research Reviews*, 19(01), 137–146.

Kay, C. D., Mazza, G., Holub, B. J., & Wang, J. (2004). Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *British Journal of Nutrition*, 91(6), 933–942.

Kay, C. D., Pereira-Caro, G., Ludwig, I. A., Clifford, M. N., & Crozier, A. (2017). Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: A review of recent evidence. *Annual Review of Food Science and Technology*. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025636>.

Keppler, K., & Humpf, H.-U. (2005). Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(17), 5195–5205.

Kraus, M., Kahle, K., Ridder, F., Schantz, M., Scheppach, W., Schreier, P., & Richling, E. (2010). Colonic availability of bilberry anthocyanins in humans. *ACS Symposium Series: Flavor and health benefits of small fruits*, American Chemical Society, 1035(10), 159–176.

Kropat, C., Mueller, D., Boettler, U., Zimmermann, K., Heiss, E. H., Dirsch, V. M., ... Marko, D. (2013). Modulation of Nrf2-dependent gene transcription by bilberry anthocyanins in vivo. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(3), 545–550.

Lu, Z., Nie, G., Belton, P. S., Tang, H., & Zhao, B. (2006). Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. *Neurochemistry International*, 48(4), 263–274.

Mattila, P., Pihlaja, J.-M., & Hellström, J. (2005). Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8290–8295.

Matuschek, M. C., Hendriks, W. H., McGhie, T. K., & Reynolds, G. W. (2006). The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(1), 31–36.

McGhie, T. K., & Walton, M. C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), 702–713.

Müller, D., Schantz, M., & Richling, E. (2012). High performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and corresponding juices. *Journal of Food Science*, 77(4), C340–C345.

Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134–144.

Nurmi, T., Mursu, J., Heinonen, M., Nurmi, A., Hiltunen, R., & Voutilainen, S. (2009). Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2274–2281.

Passamonti, S., Vrhovsek, U., & Mattivi, F. (2002). The interaction of anthocyanins with biltranslocase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(3), 631–636.

Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*, 544(1), 210–213.

Peiffer, D. S., Zimmerman, N. P., Wang, L.-S., Ransom, B. W., Carmella, S. G., Kuo, C.-T., ... Huang, Y.-W. (2014). Chemoprevention of esophageal cancer with black raspberries, their component anthocyanins, and a major anthocyanin metabolite, protocatechuic acid. *Cancer Prevention Research*, 7(6), 574–584.

Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., & Stockley, C. S. (2013). The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), 483–508.

Ribnicky, D. M., Roopchand, D. E., Oren, A., Grace, M., Poulev, A., Lila, M. A., ... Raskin, I. (2014). Effects of a high fat meal matrix and protein complexation on the bioaccessibility of blueberry anthocyanins using the TNO gastrointestinal model (TIM-1). *Food Chemistry*, 142, 349–357.

Rodriguez-Mateos, A., Feliciano, R. P., Cifuentes-Gomez, T., & Spencer, J. P. (2016). Bioavailability of wild blueberry (poly) phenols at different levels of intake. *Journal of Berry Research*, 6(2), 137–148.

Rosen, L., & Goodall, M. (1962). Identification of vanillic acid as a gatabolite of noradrenaline metabolism in the human. *Experimental Biology and Medicine*, 110(4), 767–769.

Russell, W., & Duthie, G. (2011). Plant secondary metabolites and gut health: The case for phenolic acids. *Proceedings of the Nutrition Society*, 70(03), 389–396.

Schantz, M., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., ... Richling, E. (2014). Triggered gastrointestinal release of anthocyanins from bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.). *Acta Horticulturae*.

Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. (2007). Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary α -amylase (HSA) by fluorescence quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6726–6735.

Stachulski, A. V., & Meng, X. (2013). Glucuronides from metabolites to medicines: A survey of the in vivo generation, chemical synthesis and properties of glucuronides. *Natural Product Reports*, 30(6), 806–848.

Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Manach, C., Lamaison, J.-L., & Rémesy, C. (2004). Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *The Journal of Nutrition*, 134(9), 2275–2279.

Tang, L., Zuo, H., & Shu, L. (2014). Comparison of the interaction between three anthocyanins and human serum albumins by spectroscopy. *Journal of Luminescence*, 153, 54–63.

Williamson, G. (2013). Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(1), 48–57.

Williamson, G., & Clifford, M. N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*, 104(53), S48–S66.

Wu, X., Pittman, H. E., 3rd, & Prior, R. L. (2006). Fate of anthocyanins and antioxidant capacity in contents of the gastrointestinal tract of weanling pigs following black raspberry consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(2), 583–589.

Supplementary Table 1 S

Table 1S

Retention times [min], HPLC-MS/MS (MRM) ion transitions [*m/z*] and substance-specific parameters (DP: declustering potential, EP: entrance potential, CEP: cell entrance potential, CE: collision energy, CXP: cell exit potential [V]) of anthocyanins and degradation products.

Analyte	Abbreviation	Retention time [min]	MRM ion transition (<i>m/z</i>)	DP [V]	EP [V]	CEP [V]	CE [V]	CXP [V]
Anthocyanins								
Delphinidin-3,5-diglucoiside	Del-di-glc; IS(1)	22.3	627/303	76.0	9.0	29.0	49.0	26.0
Delphinidin-3-galactoside	Del-gal	27.6	465/303	66.0	9.0	20.0	31.0	26.0
Delphinidin-3-glucoiside	Del-glc	29.9	465/303	66.0	9.0	20.0	31.0	26.0
Cyanidin-3-galactoside	Cy-gal	32.9	449/287	66.0	7.0	20.0	31.0	26.0
Delphinidin-3-arabinoside	Del-ara	34.2	435/303	61.0	7.0	20.0	31.0	26.0
Cyanidin-3-glucoiside	Cy-glc	37.3	449/287	66.0	7.0	20.0	31.0	26.0
Cyanidin-gluconuride	Cy-glucon	37.9	463/287	71.0	8.0	23.0	31.0	28.0
Petunidin-3-galactoside	Pet-gal	39.8	479/317	71.0	8.0	20.0	31.0	28.0
Cyanidin-3-arabinoside	Cy-ara	43.2	419/287	66.0	10.0	20.0	33.0	24.0
Petunidin-3-glucoiside	Pet-glc	46.0	479/317	71.0	8.0	20.0	31.0	28.0
Peonidin-3-galactoside	Peo-gal	51.7	463/301	66.0	10.0	22.0	29.0	26.0
Petunidin-3-arabinoside	Pet-ara	54.9	449/317	71.0	8.0	23.0	31.0	28.0
Peonidin-3-glucoiside	Peo-glc	60.6	463/301	66.0	10.0	22.0	29.0	26.0
Malvidin-3-galactoside	Mal-gal	61.8	493/331	71.0	10.0	22.0	31.0	28.0
Peonidin-gluconuride	Peo-glucon	61.9	477/301	66.0	10.0	24.0	29.0	26.0
Peonidin-3-arabinoside	Peo-ara	65.5	433/301	71.0	5.0	22.0	29.0	26.0
Malvidin-3-glucoiside	Mal-glc	66.9	493/331	71.0	10.0	22.0	31.0	28.0
Malvidin-gluconuride	Mal-glucon	67.8	507/331	66.0	10.0	25.0	29.0	26.0
Malvidin-3-arabinoside	Mal-ara	71.6	463/331	66.0	10.0	23.0	29.0	26.0
Degradation products								
Gallic acid	GA	11.0	169/125	-35.0	-5.0	-120	-22.0	0.0
Protocatechuic acid	PCA	21.2	153/109	-35.0	-4.0	-10.0	-22.0	-2.0
Methylgallic acid	MGA	24.5	183/139	-40.0	-8.5	-10.0	-24.0	-2.0
Hydroxybenzoic acid	HBA	33.3	137/93	-30.0	-4.0	-12.0	-24.0	0.0
Vanillic Acid	VA	37.5	167/123	-45.0	-5.5	-12.0	-16.0	-2.0
Syringic Acid	SA	40.0	197/125	-40.0	-9.5	-20.0	-18.0	-4.0
Hydroxybenzaldehyde	HBAL	42.0	121/92	-45.0	-5.0	-14.0	-32.0	0.0
Phloroglucinol aldehyde	PGAL	47.2	153/125	-40.0	-3.5	-12.0	-24.0	0.0
Iso-ferulic acid d3	IsoFA; IS(2)	51.0	196/134	-30.0	-10.5	-14.0	-24.0	-2.0

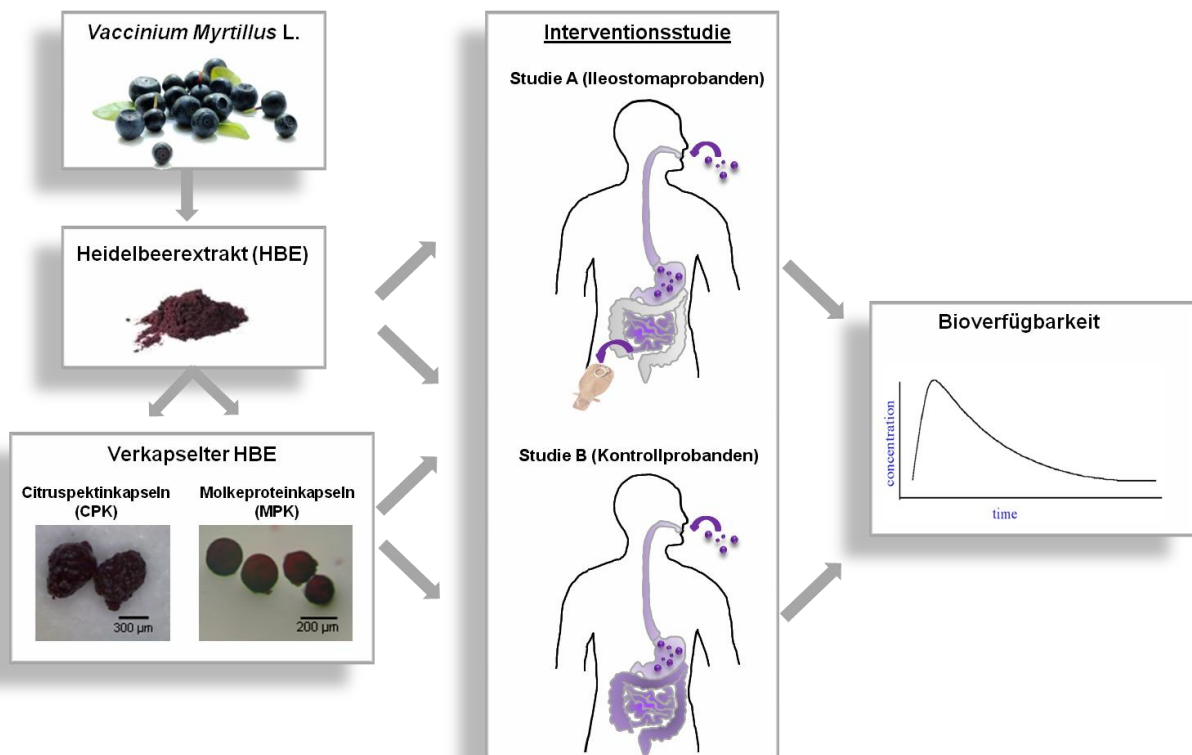
4.2 Bioverfügbarkeit von verkapselten Heidelbeeranthocyanen (Teil II)

Konzept zur Veröffentlichung:

"Verkapselte Heidelbeeranthocyane - Effekte auf die Bioverfügbarkeit und intestinale Verfügbarkeit im Menschen"

'Encapsulated anthocyanins from bilberries - Effects on bioavailability and intestinal accessibility in humans'

Dolores Mueller¹, Kathrin Jung¹, Manuel Winter¹, Dorothee Rogoll², Ralph Melcher², Ulrich Kulozik³, Karin Schwarz⁴ and Elke Richling^{1,*} (2018) Food Chemistry 248, 217-224



4.2.1 Einleitung

Heidelbeeren stellen eine bedeutende Quelle an Anthocyanen in der täglichen Ernährung dar (Clifford, 2000; Juadur & Winterhalter, 2012) und zeigen in verschiedenen Studien Hinweise auf ein präventives Gesundheitspotential (Schantz et al., 2011; Triebel et al., 2012; Wallace et al., 2016). Die Wirkung dieser Gruppe der Flavonoide wird durch deren pharmakokinetische Eigenschaften beeinflusst. Anthocyane sind nur begrenzt stabil, sehr polar und zeigen in ihrer Ausgangsstruktur nur eine geringe Bioverfügbarkeit. Somit stellt sich die Frage, wie man deren physikalischen Eigenschaften und Stabilität während der Gastrointestinalpassage beeinflussen kann, um deren Aufnahme und systemischen Verfügbarkeit zu modifizieren. Verkapselungstechniken stellen hierbei ein wichtiges Werkzeug zur Stabilisierung von Inhaltsstoffen aus Lebensmitteln dar (Gibbs, 1999; Fang & Bhandari, 2010; Madene et al., 2006). Verschiedene *in vitro* Studien zur Verkapselung von Anthocyanen, die erfolgreich die Stabilisierungseffekte der Verkapselung auf Anthocyane zeigen, ohne deren biologische Aktivität zu beeinträchtigen, sind bekannt (Baum et al., 2014; Oehme et al., 2011; Oidtmann et al., 2012; Schantz et al., 2011; Schantz et al., 2014). Bisher existieren keine Daten, ob diese Effekte zur Stabilisierung auch unter realen physiologischen Bedingungen möglich sind.

4.2.2 Zielsetzung der Studie

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung des Einflusses verschiedener Verkapselungstechniken auf die pharmakokinetischen Eigenschaften von Anthocyanen *in vivo* im Vergleich zu unverkapselten Anthocyanen. Die Vorgängerstudie Teil I (Bioverfügbarkeit von Heidelbeeranthocyanen, Mueller et al. 2017 a) zeigte, wie relevant die gebildeten Abbauprodukte für die Erfassung der realen Bioverfügbarkeit waren. Somit adressierten wir in der Pilotstudie Teil II, inwieweit die Verkapselung einen Einfluss auf die Bildung der Abbauprodukte und Bioverfügbarkeit der Anthocyane und Abbauprodukte darstellt. Während der Studie verzehrten die Probanden jeweils Molkeprotein-verkapselten Heidelbeerextrakt (deutsch: MPK, englisch: WPC) und Citruspektin-verkapselten Heidelbeerextrakt mit zusätzlichem Schellacküberzug (deutsch: CPK, englisch: CPC). Untersucht wurden analog dem Studiendesign der Pilotstudie Teil I Plasma und Urinproben beider Probandengruppen und zusätzlich die Ileostomaflüssigkeiten der Ileostomaprobanden.

4.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse zeigen, dass die Verkapselung von Anthocyanen durch Molkeproteine die Kurzzeit-Bioverfügbarkeit von Anthocyanen im Menschen erhöhte. So wurden nach MPK-Verzehr (im Vergleich zum unverkapselten HBE) vermehrt Anthocyane (etwa 108%) und Abbauprodukte (etwa 48%) über den Urin der Probanden mit intaktem GIT ausgeschieden (Abbildung 15). Die Verkapselung der Anthocyane durch Citruspektin und Schellack zeigt eine Erhöhung der intestinalen Verfügbarkeit im Dünndarm (Anthocyane um 24% erhöht, Abbauprodukte um 13% erhöht) und begünstigt das Auftreten des Metaboliten Phloroglucinolaldehyd im Plasma der gesunden Probanden (mit Kolon).

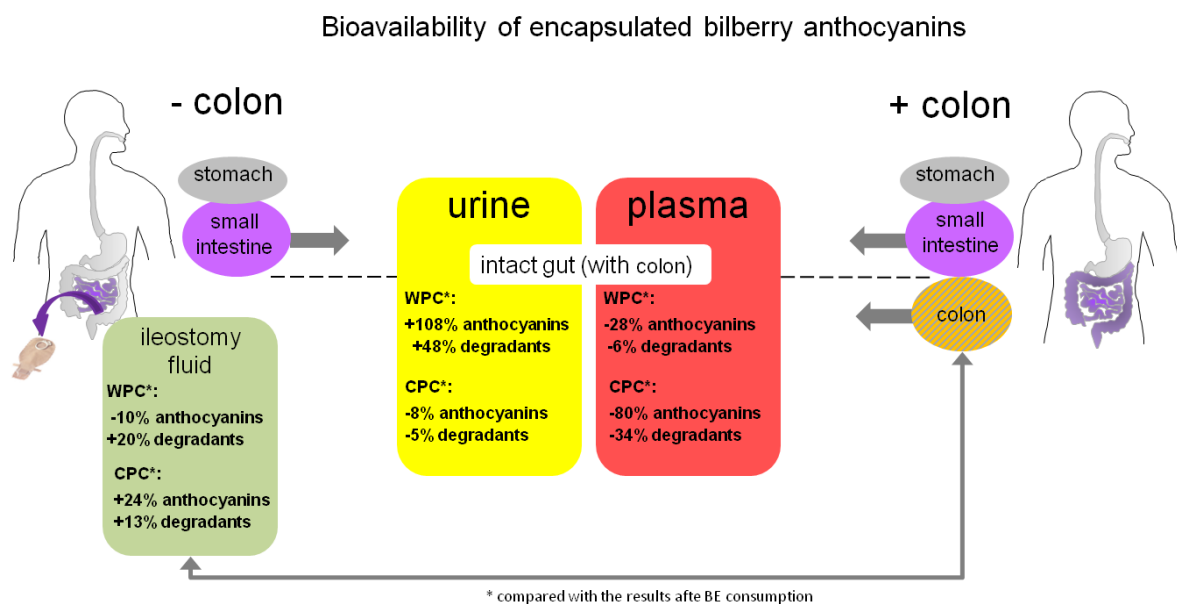


Abbildung 15: Zusammenfassung der zentralen Ergebnisse aus Teil II der Studie. Bestimmung der Konzentrationen von Anthocyanen und Abbauprodukten in Urin- und Plasmaproben von Probanden mit Kolon und Urin-, Plasma- und Ileostomaflüssigkeiten von Probanden mit Stoma (ohne Kolon) nach MPK (WPC)- und CPK (CPC)-Verzehr. Die prozentualen Angaben zeigen die Veränderung der Gehalte im Vergleich zu den Ergebnissen nach Verzehr des unverkapselten Extraktes (siehe Teil I).

4.2.4 Fazit

Da eine Vielzahl an Metaboliten und Abbauprodukten denkbar sind die im Rahmen dieser Studie aber nicht untersucht werden konnten bleibt offen, welche Effekte der Verkapselung auf die Bioverfügbarkeit noch möglich sein könnten. Obwohl die Bioverfügbarkeit der Anthocyane durch die Verkapselung nicht übermäßig stark beeinflusst wurde, sind doch

gewisse Effekte erkennbar. Dies ist möglicherweise auf die große Menge an verzehrten Anthocyanen zurückzuführen, wodurch die Systeme zur Absorption übersättigt sein könnten. Anhand der Ergebnisse der Studie stellt sich die Frage, wie wichtig eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit der intakten Anthocyane überhaupt für den menschlichen Organismus ist und ob sie eine Relevanz für eine stärkere Wirksamkeit mit sich bringen würde. Vielmehr könnte ein neuer Ansatz diskutiert werden, in dem der Fokus verstärkt auf dem komplexen Abbau der Anthocyane liegt. So könnten die hohen Absorptionsraten der Abbauprodukte darauf hindeuten, dass nicht die Anthocyane selbst sondern deren Abbauprodukte für die physiologischen Effekte verantwortlich sind.

4.2.5 Veröffentlichtes Manuskript

Food Chemistry 248 (2018) 217–224



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem



Encapsulation of anthocyanins from bilberries – Effects on bioavailability and intestinal accessibility in humans



Dolores Mueller^a, Kathrin Jung^a, Manuel Winter^a, Dorothee Rogoll^b, Ralph Melcher^b, Ulrich Kulozik^c, Karin Schwarz^d, Elke Richling^{a,*}

^a Department of Chemistry, Division of Food Chemistry and Toxicology, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schroedinger-Strasse 52, D-67663 Kaiserslautern, Germany

^b Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Wuerzburg, Oberduerbacher Strasse 6, D-97080 Wuerzburg, Germany

^c Chair for Food and Bioprocess Engineering, Technical University of Munich, Weihenstephaner Berg 1, D-85354 Freising, Germany

^d Department of Food Technology, Institute of Human Nutrition and Food Science, University of Kiel, Heinrich-Hecht-Platz 10, D-24118 Kiel, Germany

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:
 Anthocyanins (PubChem CID: 145858)
 Gallic acid (PubChem CID: 370)
 4-Hydroxybenzoic acid (PubChem CID: 135)
 4-Hydroxybenzaldehyde (PubChem CID: 126)
 3-O-Methylgallic acid (PubChem CID: 19829)
 Protocatechuic acid (PubChem CID: 72)
 Phloroglucinol aldehyde (PubChem CID: 68099)
 Vanillic acid (PubChem CID: 8468)
 Syringic acid (PubChem CID: 10742)

Keywords:
 Anthocyanins
 Encapsulation
 Human intervention
 Bioavailability
 Phloroglucinol aldehyde

ABSTRACT

Anthocyanins are flavonoids that have been suggested to provide beneficial health effects. The biological activity of anthocyanins is influenced by their pharmacokinetic properties, but anthocyanins are associated with limited bioavailability in humans. In the presented study, we investigated how the encapsulation of bilberry extract (BE), a source of anthocyanins, with either whey protein or citrus pectin influences the bioavailability and intestinal accessibility of anthocyanins in humans. We performed an intervention study that analyzed anthocyanins and their degradation products in the urine, plasma, and ileal effluent of healthy volunteers and ileostomists (subjects without an intact colon). We were able to show, that whey protein encapsulation modulated short-term bioavailability and that citrus pectin encapsulation increased intestinal accessibility during passage through the small intestine and modulated the formation of the degradation product phloroglucinol aldehyde (PGAL) in human plasma.

1. Introduction

Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) are an important source of anthocyanins in the diet, and are also rich in other phytochemicals such as procyanidins, phenolic acids and flavonoids (Clifford, 2000; Juadpur & Winterhalter, 2012). Various studies have presented strong evidence for the preventive health potential of anthocyanins, which are red/blue pigments found in fruits and flowers (Schantz, Baum, & Richling, 2011; Triebel, Trieu, & Richling, 2012; Wallace, Slavin, & Frankenfeld, 2016). The pharmacokinetic properties of these flavonoids (bioavailability, metabolism, excretion) affect their biological activity. However, intact anthocyanins are associated with limited bioavailability (Fang, 2014; Gonzalez-Barrio, Borges, Mullen, & Crozier, 2010; Kraus et al., 2010).

The high polarity of anthocyanin structures may underlie their low *in vivo* absorption efficiency. The low bioavailability may also stem from the instability caused by pH changes and microbial degradation during gastrointestinal (GIT) passage (Aura et al., 2005; Keppler & Humpf, 2005; Pina, Oliveira, & de Freitas, 2015). Therefore, it would be important to study how the stability and physical properties of anthocyanins are affected by GIT passage, and how these changes influence the bioaccessibility and bioavailability of this group of antioxidants.

Encapsulation can be a viable approach for stabilizing active food ingredients (Fang & Bhandari, 2010; Gibbs, Kermasha, Alli, & Mulligan, 1999; Madene, Jacquot, Scher, & Desobry, 2006). Several studies on the *in vitro* effects of anthocyanin encapsulation are available (Fang & Bhandari, 2010; Flores et al., 2015; Munin & Edwards-Lévy, 2011;

Abbreviations: Ara, arabinoside; BE, bilberry extract; CPC, citrus pectin encapsulated BE; Cy, cyanidin; Del, delphinidin; GA, gallic acid; Gal, galactose; Glc, glucose; Gluc, glucuronide; HBA, 4-hydroxybenzoic acid; HBAL, 4-hydroxybenzaldehyde; IS, internal standard; Mal, malvidin; MGA, 3-O-methylgallic acid; PCA, protocatechuic acid; PGAL, phloroglucinol aldehyde; Peo, peonidin; Pet, petunidin; SA, syringic acid; VA, vanillic acid; WPC, whey protein encapsulated BE

* Corresponding author.

E-mail address: richling@chemie.uni-kl.de (E. Richling).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.058>

Received 4 August 2017; Received in revised form 14 December 2017; Accepted 15 December 2017

Available online 16 December 2017

0308-8146/© 2017 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

D. Mueller et al.

Food Chemistry 248 (2018) 217–224

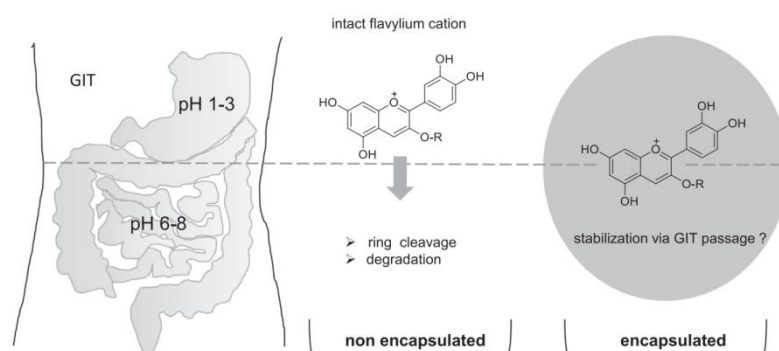


Fig. 1. Overview of which anthocyanins are present at physiological GIT pH in the non-encapsulated and encapsulated forms of bilberry extract.

Oehme, Valotis, Krammer, Zimmermann, & Schreier, 2011; Schantz et al., 2014). Furthermore, our previous research has already demonstrated successful stabilization of anthocyanins with conserved biological activity (Baum et al., 2014; Schantz et al., 2011, 2014). However, as of yet, no studies have assessed how anthocyanin encapsulation affects chemical stability, intestinal accessibility, and bioavailability in humans. The current intervention study evaluated whether encapsulated and non-encapsulated anthocyanins differ in terms of *in vivo* pharmacokinetics (Fig. 1).

The degradation of anthocyanins in humans follows different pathways (Mueller et al., 2017). Recent studies on the bioavailability and biological effectiveness of anthocyanins have demonstrated the importance of their metabolites and degradation products (Czank et al., 2013; Faria, Fernandes, Mateus, & Calhau, 2013; Fernandes, Faria, de Freitas, Calhau, & Mateus, 2015; Ferrars et al., 2014; Kalt, Liu, McDonald, Vinqvist-Tymchuk, & Fillmore, 2014; Kay, Pereira-Caro, Ludwig, Clifford, & Crozier, 2017). Our previous study indicated that the plasma concentration of degradation products can be up to 20 times higher than the corresponding concentration of anthocyanins (Mueller et al., 2017). Thus, the *in vivo*-formed metabolites and degradation products have to be considered when the 'real bioavailability' of anthocyanins is determined.

In light of this, the current study also aims to address what effect the encapsulation of anthocyanins has on their *in vivo* degradation. The presented human intervention study was integrated into a previously published study by Mueller et al. (2017). In the previous study, which represents part one, volunteers received non-encapsulated anthocyanin-rich bilberry extract (BE). The research reported in this article represents part two, during which volunteers ingested bilberry extract that was encapsulated with either citrus pectin or whey protein. The intestinal accessibility and bioavailability were then measured and compared with data from volunteers who had ingested non-encapsulated bilberry extract (Mueller et al., 2017) (see Fig. 2). These studies included both ileostomists (group A, without a colon) and volunteers with a colon (group B) to provide detailed information about the intestinal absorption of anthocyanins when the results for encapsulated and non-encapsulated forms were compared. Part I of the study included a single bolus of BE (corresponding to 4.95 mmol anthocyanins). During part II of the study, each subject received equimolar concentrations of anthocyanins encapsulated with either whey protein (WCP) or citrus pectin (CPC).

The contents of intact anthocyanins, selected glucuronides and degradation products (e.g. phenolic acids and phenylaldehydes) in intestinal effluent, plasma and urine samples were then determined to demonstrate how encapsulation affects the pharmacokinetics of anthocyanins.

2. Material and methods

2.1. Study design

Details of this human pilot study are described in detail by Mueller et al. (2017). There were two groups of subjects. Group A included ileostomists ($N = 5$ females, $BMI = 27 \pm 4$, $age = 41 \pm 8$) and group B included healthy subjects who had an intact gut ($N = 5$ females, $BMI = 23 \pm 3$, $age = 33 \pm 7$). The intervention consisted of two parts. The initiation of each part was preceded by a wash-out period of 48 h with a polyphenol-free diet. The two parts were also separated by a period of at least two weeks. The subjects received equimolar amounts of anthocyanins (a total of 10 g), either in the form of a single bolus of non-encapsulated BE (10 g) (for details, see Mueller et al. (2017)), a single bolus of BE encapsulated with whey protein (WPC, 144 g), or a single bolus of BE encapsulated with citrus pectin (CPC, 30 g) (see Fig. 2). All of the study participants received an identical diet, described in detail by Mueller et al. (2017), throughout the study period. The sample collection of ileostomy fluids, blood and urine was analogous to what was described in Mueller et al. (2017). At the end of the study period, group A, parts I & II, included five subjects and group B, parts I & part II with CPC intake, included five subjects while part II with WPC intake included four subjects. Unfortunately, one volunteer quit the study due to illness. The results of study part I and study part II are comparable because they were performed with the identical study design. Sample preparation was also done using the analogue methods.

2.2. Chemicals, bilberry extract and stabilization systems (capsules)

The qualities of standards used for quantification and chemicals used in experiments were analogous to those reported in Mueller et al. (2017). The BE (Symrise GmbH & Co. KG, Holzminden, Germany, pr. no. 399916, batch 29) was produced from bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and included $24 \pm 1\%$ of 15 different anthocyanins (for details and anthocyanin profile, see Mueller et al. (2017)).

2.2.1. Encapsulation with whey proteins (WPC)

The whey protein capsules (WPC) were produced by the group of Prof. Dr. U. Kulozik (Technische Universität Muenchen, Germany). A 30% whey protein solution was prepared from WPI BiPro® Protein Isolate (94% (w/w)) (Davisco Foods International Inc., Le Seur, MN, USA) and distilled water, after which BE powder was slowly added and allowed to dissolve. The pH was adjusted to 1.5 with aqueous hydrochloric acid (Merck, Darmstadt, Germany), and the final concentrations of whey protein and BE in the final solution were 20% and 10%,

D. Mueller et al.

Food Chemistry 248 (2018) 217–224

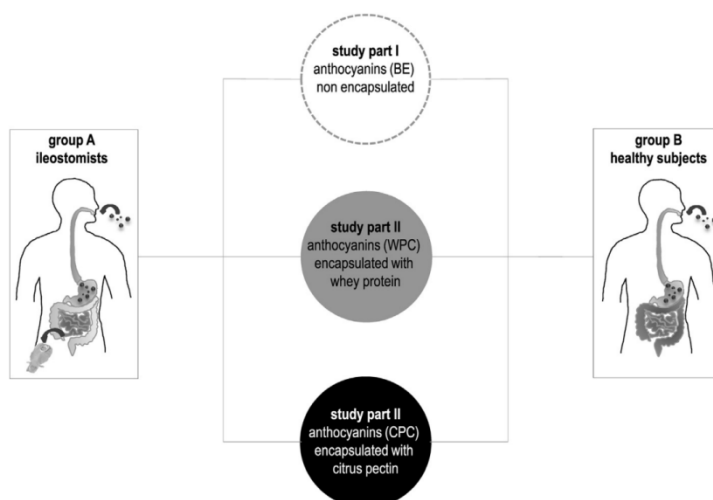


Fig. 2. The intervention study was performed three times with a group of ileostomists (A) and healthy subjects with an intact gut (B) who were given either non-encapsulated anthocyanins (study part I), anthocyanins encapsulated with whey protein or anthocyanins encapsulated with citrus pectin (study part II).

respectively. The solution was then centrifuged (5000g, 2 min) to remove any insoluble components. Microencapsulation was performed by emulsification and thermal gelation. An emulsion of BE/whey protein solution and sunflower oil was prepared by heating the solution to 50 °C while slowly stirring. Within six minutes, the emulsion was heated to 80 °C and maintained at this temperature for 10 min to denature proteins and form gel-like capsules. The suspension was cooled to 20 °C and oil residues were separated by centrifugation (1000g, 2 min). The mean capsule diameter was 200 µm (Oidtmann et al., 2012). An HPLC analysis of the whey protein encapsulated BE, described in Section 2.4, revealed an anthocyanin content of 7%.

2.2.2. Encapsulation with citrus pectin (CPC)

The citrus pectin capsules (CPC) were produced by the group of Prof. Dr. K. Schwarz (University of Kiel, Germany) (Berg, Bretz, Hubbermann, & Schwarz, 2012). BE (40%) was mixed with trehalose (42%), highly esterified citrus pectin, with 71% degree of esterification (5%, Herbstreith & Fox KG, Neuenbuerg, Germany) and citric acid (13%, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) and dissolved in water. The solution was spray-dried, and the resulting microcapsules were granulated with ethanolic shellac solution (10%, shellac: SSB57 Pharma, Stoever GmbH & Co. KG, Bremen, Germany). The granules were then coated in a fluidized bed process, with an application quantity of 25 g of shellac per 100 g of granulate. Following drying, the coated product was classified as having a target particle size of 250–500 µm. An HPLC analysis (see Section 2.4) of the citrus pectin encapsulated BE revealed an anthocyanin content of 34%.

2.3. Sample storage

The storage conditions of ileostomy fluid, plasma, and urine samples were analogous to those described by Mueller et al. (2017).

2.4. Sample preparation and analysis

The sample preparation procedure is described in detail by Mueller et al. (2017). Ileostomy fluids were lyophilized, after which samples were extracted for analysis. Urine and plasma samples were extracted with a solid phase extraction method (see Mueller et al. (2017)). The WPC and CPC capsules were extracted to determine the anthocyanin content in the two encapsulated forms of BE: Whey protein

encapsulated BE (WPC) was extracted with solvent A (87% acetonitrile/3% water/10% formic acid (v/v/v)) using an ultra turrax (60 s, 20,000 rcf), and was then centrifuged (20 min, 4500g, 25 °C). Citrus pectin encapsulated BE (CPC) was extracted with solvent A using a stirrer (20 h, 25 °C, light protected), and was then centrifuged (20 min, 4500g, 25 °C). The quantification of anthocyanins, along with their degradation products and glucuronides of interest, in the extracted samples was performed using the HPLC-DAD and HPLC-MS/MS methods described by Mueller et al. (2017).

2.5. Statistical analysis and calculations

The results were not analyzed for statistical significance because of the low number of subjects in this intervention study. The area under the curve (AUC) of plasma analytes was determined by integration of the concentration curves between 0 and 8 h using the linear trapezoidal rule (Kaplan, Jack, Cotler, & Alexander, 1973).

3. Results

This section presents the results from parts I and II of the intervention study, which included a non-encapsulated form and two encapsulated forms of BE, respectively. The anthocyanins identified in the ileostomy fluid, urine, and plasma following the ingestion of non-encapsulated BE are shown in Fig. 3A (Mueller et al., 2017). Fig. 3B shows the degradation products that were identified in ileostomy fluid, urine, and plasma of volunteers who had received non-encapsulated BE. Within eight hours of BE consumption, 1547 ± 309 µmol of anthocyanins and 302 ± 79 µmol of degradation products were found in ileostomy fluids (N = 5). The concentrations of anthocyanins and degradation products in ileal effluent (N = 5) within the same time period (0–8 h) after the consumption of anthocyanins stabilized with whey protein (WPC) were 1390 ± 586 µmol and 361 ± 154 µmol, respectively. Eight hours after the intake of BE encapsulated with citrus pectin (CPC), 1916 ± 210 µmol of anthocyanins and 342 ± 33 µmol of degradation products were recovered from ileal fluids (N = 5). The total amounts of anthocyanins and degradation products that were excreted in the urine of healthy subjects (with intact colon) and ileostomists (without colon) within 24 h are shown in Fig. 3. After the intake of non-encapsulated BE, 0.9 ± 0.5 µmol of anthocyanins and 11.6 ± 5.6 µmol of degradation products were excreted via urine in

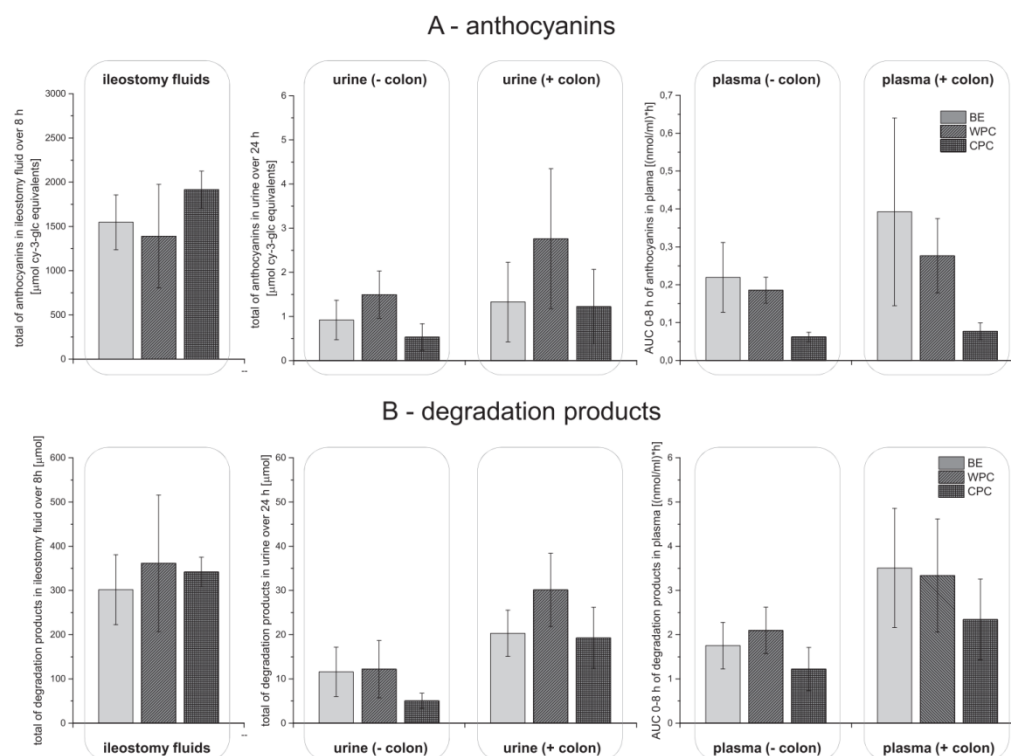


Fig. 3. The anthocyanins (A) and degradation products (B) that were identified during study parts I (BE) and II (N = 4–5) from ileostomy effluents (over 8 h), urine samples (over 24 h), and plasma samples (shown as AUC from 0 to 8 h).

ileostomists (N = 5), and $1.3 \pm 0.9 \mu\text{mol}$ of anthocyanins and $20.3 \pm 5.2 \mu\text{mol}$ of degradation products were excreted via urine in healthy volunteers (N = 5). When BE was encapsulated with WPC, the urine samples of ileostomists (N = 5) showed $1.5 \pm 0.5 \mu\text{mol}$ and $12.2 \pm 6.5 \mu\text{mol}$ of anthocyanins and degradation products, respectively, while the urine samples of healthy volunteers (N = 4) showed $2.8 \pm 2.0 \mu\text{mol}$ and $30.1 \pm 8.3 \mu\text{mol}$ of anthocyanins and degradation products, respectively. Following the ingestion of BE encapsulated with CPC, the urine samples of ileostomists (N = 5) showed $0.5 \pm 0.3 \mu\text{mol}$ of anthocyanins and $5.0 \pm 1.7 \mu\text{mol}$ of degradation products while the urine samples of healthy patients (N = 5) showed $1.2 \pm 0.8 \mu\text{mol}$ of anthocyanins and $19.3 \pm 6.9 \mu\text{mol}$ of degradation products. The AUC (between 0 and 8 h) indicates the concentration of anthocyanins and specific degradation products in the plasma. Following non-encapsulated BE intake, the AUCs for anthocyanins and degradation products were $0.22 \pm 0.09 \text{ nmol/ml}\cdot\text{h}$ and $1.8 \pm 0.5 \text{ nmol/ml}\cdot\text{h}$, respectively, in ileostomists (N = 5), while the corresponding AUCs for healthy subjects (N = 5) were $0.39 \pm 0.25 \text{ nmol/ml}\cdot\text{h}$ and $3.5 \pm 1.3 \text{ nmol/ml}\cdot\text{h}$, respectively. After the ingestion of BE encapsulated with WPC, the AUCs for anthocyanins and degradation products were $0.18 \pm 0.03 \text{ nmol/ml}\cdot\text{h}$ and $2.1 \pm 0.5 \text{ nmol/ml}\cdot\text{h}$, respectively, in ileostomists (N = 5), while the corresponding AUCs for healthy subjects (N = 4) were $0.28 \pm 0.10 \text{ nmol/ml}\cdot\text{h}$ and $3.3 \pm 1.3 \text{ nmol/ml}\cdot\text{h}$, respectively. The AUCs for anthocyanins and degradation products following the ingestion of BE encapsulated with CPC were $0.06 \pm 0.01 \text{ nmol/ml}\cdot\text{h}$ and $1.2 \pm 0.5 \text{ nmol/ml}\cdot\text{h}$, respectively, in ileostomists (N = 5), and $0.08 \pm 0.02 \text{ nmol/ml}\cdot\text{h}$ and $2.3 \pm 0.9 \text{ nmol/ml}\cdot\text{h}$, respectively, in healthy subjects (N = 5).

In Fig. 4, the results from study part II are overlaid onto the data reported by Mueller et al. (2017). This figure shows how the amounts of anthocyanins and degradation products in the ileal effluent (Fig. 4A and B), plasma (Fig. 4C and D), and urine (Fig. 4E and F) of ileostomists and healthy subjects change over time. The maximum anthocyanin concentration in ileostomy fluids was detected 0–1 h after non-encapsulated BE intake, both 0–1 h and 1–2 h after intake of BE encapsulated with WPC and 1–2 h after intake of BE encapsulated with CPC (Fig. 4A). The amount of degradation products in the three samples showed a similar pattern. The maximum amount of degradation products was observed 0–1 h after non-encapsulated BE intake, both 0–1 h and 1–2 h after intake of BE encapsulated with WPC, and 1–2 h after intake of BE encapsulated with CPC (Fig. 4B). The maximum concentration of anthocyanins in plasma was reached 2 h after ingestion of non-encapsulated BE and BE encapsulated with WPC, but already 1 h after intake of BE encapsulated with CPC, after which the concentration stayed constant until 2 h (Fig. 4C). For all three forms of BE, the maximum plasma level of degradation products was observed after 1 h (Fig. 4D), whereas the maximum concentrations of anthocyanins (Fig. 4E) and degradation products in urinary excretions occurred 2–4 h after ingestion (Fig. 4E and F).

Fig. 5 illustrates which metabolites were identified in plasma samples after the ingestion of encapsulated and non-encapsulated anthocyanins in relation to findings by Mueller et al. (2017). The figure presents patterns of anthocyanin-glucuronides such as Mal-gluc and Peo-gluc, phenolic acids such as GA, PCA, MGA, SA, VA, and phenylaldehydes such as PGAL. It can be noted that the profiles of Mal-gluc and Peo-gluc changed with different forms of BE. The ingestion of pure

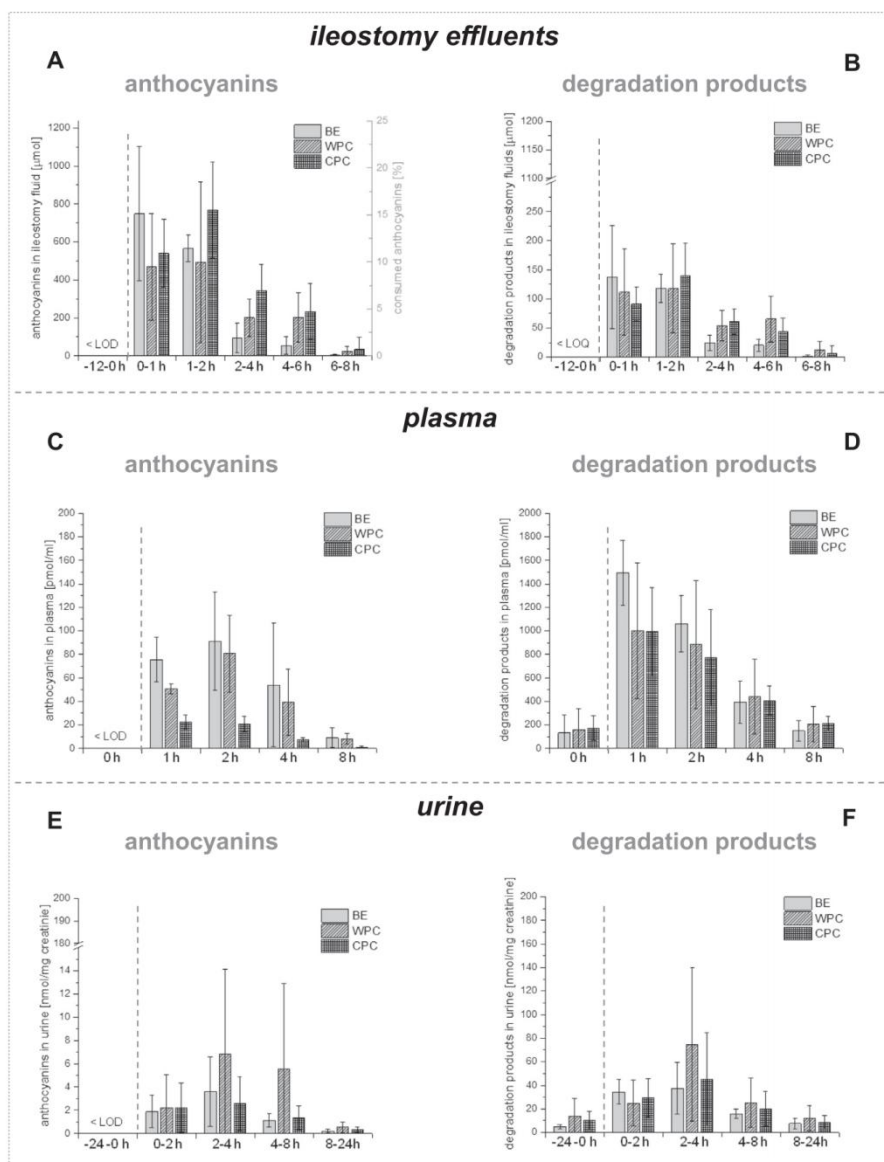


Fig. 4. The average amounts of total anthocyanins and degradation products in ileostomy fluid (A, B) of ileostomists (N = 5) and plasma (C, D) and urine (E, F) of healthy subjects (N = 4–5) after the consumption of non-encapsulated (BE; part I) and encapsulated anthocyanins (WPC, CPC; part II).

BE showed the highest amounts of Mal-gluc and Peo-gluc in plasma samples. The intake of BE encapsulated with whey protein (WPC) showed similar profiles for Mal-gluc and Peo-gluc, but with lower concentrations. In contrast, the intake of BE encapsulated with CPC was followed by very low Mal-gluc concentrations in the plasma samples. The most prominent glucuronide in the plasma sample was Peo-gluc, but the concentration after ingestion of BE encapsulated with CPC was far lower than what was observed after the ingestion of non-encapsulated BE or BE encapsulated with WPC. The plasma profiles of phenolic acids

had a similar trend for each form of BE. The concentrations decreased more or less in the following rank: SA > VA > PCA = MGA > GA. The BE forms differed based on the temporal occurrences of certain metabolites in the plasma samples. For example, MGA and SA concentrations were lower after the ingestion of BE encapsulated with CPC than after the ingestion of non-encapsulated BE or BE encapsulated with WPC. The highest PGAL concentration was observed after intake of BE encapsulated with CPC.

4. Discussion

The study addressed two main topics: how does anthocyanin encapsulation modulate absorption and bioavailability in comparison to the ingestion of pure berry extract; and how does passage through the gastrointestinal tract modulate the biological effect exerted by anthocyanins? By including ileostomists (subjects without an intact colon) and collecting ileal effluents, we created a model that can adequately

demonstrate how ingested compounds – in our case anthocyanins (encapsulated versus non-encapsulated) – reach the large intestine (Mueller et al., 2017). The results of intervention study part I, during which volunteers consumed pure BE, have been published in detail (Mueller et al., 2017). The findings presented in this article demonstrate how two encapsulated forms of BE (encapsulation with whey protein or citrus pectin) differ from pure BE in terms of anthocyanin bioavailability and metabolism. Generally, the absorption and elimination of

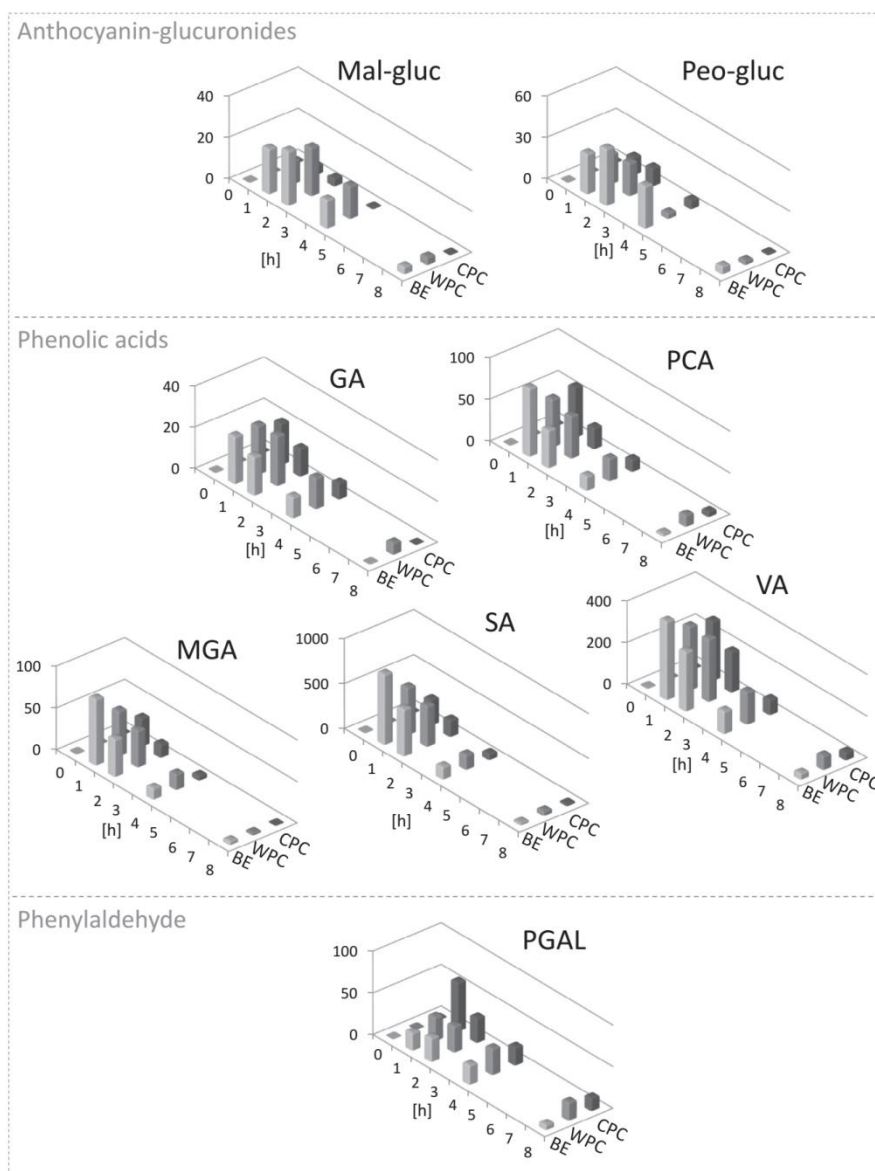


Fig. 5. Kinetic profiles of anthocyanin-glucuronides (Mal-gluc, Peo-gluc), phenolic acids (GA, PCA, MGA, SA, VA) and phloroglucinaldehyde (PGAL) in the plasma samples of healthy subjects with an intact gut during study parts I (N = 5) and II (N = 4–5) in nmol/L (BE: part I; WPC, CPC: part II).

both anthocyanins and degradation products was higher in the group of healthy subjects than in the ileostomists, regardless of the formulation (BE, WPC, or CPC). Passage through the small and large intestine strongly influences the bioavailability of anthocyanins independent of whether or not they are encapsulated. Various studies have presented details of how the intestine is a site of anthocyanin absorption (Matuschek, Hendriks, McGhie, & Reynolds, 2006; McGhie & Walton, 2007; Mueller et al., 2017; Talavéra et al., 2004).

4.1. Pharmacokinetic effects of whey protein encapsulation (WPC) on anthocyanins and their degradation products

Whey protein stabilization decreased the total anthocyanin content (over 8 h) in the ileal effluents by 10% when compared to pure BE (Fig. 3A). The two formulations varied greatly in terms of degradation products that were identified in the ileal effluent. The degradation product content in the ileal fluid samples was about 20% higher after subjects ingested BE encapsulated with WPC rather than pure, non-encapsulated BE (Fig. 3B). Although there were high inter-individual differences, the results demonstrate that whey protein encapsulation had almost no effect (only by trend) on the stabilization of anthocyanins during intestinal passage, and increased the rate of degradation when compared to what was observed for non-encapsulated BE.

The concentration of a compound in the plasma and urine is a good representation of how much of the compound is being absorbed and what amount will reach systemic circulation. After the ingestion of anthocyanin encapsulated with WPC, 28% less anthocyanins and 6% less degradation products were detected in the plasma of healthy subjects. The profile of the identified metabolites is shown in Fig. 5. On the other hand, WPC encapsulation led to the elimination of 108% more anthocyanins and 48% more degradation products via urine than had been observed after pure BE intake. Each of the recovered degradation products showed a higher concentration in samples from subjects who ingested BE encapsulated with WPC rather than non-encapsulated BE. A specific trend was not apparent (data not shown). The differences between the results from plasma and urine samples could stem from different sampling periods. The plasma concentrations only demonstrate concentrations at certain time points (0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h). The calculation of the area under curve (AUC) shows a certain trend, but concentrations at specific times between two sampling points remain unknown. In contrast, a certain volume of urine was collected from the subjects during each sampling period (–24 to 0 h, 0–2 h, 2–4 h, 4–8 h, 8–24 h). Therefore, the urine samples demonstrate the total amount of a compound over a certain time period (see Fig. 3).

In summary, these results show that whey protein encapsulation, when compared with non-encapsulated anthocyanins, leads to higher concentrations of anthocyanins and their degradation products in the urine. Whey protein encapsulation might increase systemic concentrations and short-term bioavailability. Several studies have provided evidence that whey proteins exert a stabilizing effect on anthocyanins (Schantz et al., 2014; Viljanen, Kylli, Hubbermann, Schwarz, & Heinonen, 2005). However, our results showed that whey protein capsules did not stabilize anthocyanins at the bowel milieu, and absorption via the stomach could be a reason for the high urinary levels of anthocyanins and their degradation products. Several studies have demonstrated that whey proteins prolong the duration of stomach passage (Buraczewski, Porter, Rolls, & Zebrowska, 1971; Stanstrup, Schou, Holmer-Jensen, Hermansen, & Dragsted, 2014). It is possible that the release of anthocyanins from the capsules may have been delayed by the presence of whey proteins, a mechanism that has been reported before (Schantz et al., 2014). The temporal shift in the maximum concentrations of anthocyanins and their degradation products supports this theory. Absorption increases with the time that anthocyanins are stable and available at a specific compartment for absorption.

4.2. Pharmacokinetic effects of citrus pectin encapsulation (CPC) on anthocyanins and their degradation products

The investigation of ileal effluents revealed that citrus pectin encapsulation seems to stabilize anthocyanins during intestinal passage. About 24% more anthocyanins were recovered in the ileostomy effluents when subjects ingested CPC-encapsulated rather than pure BE (Fig. 3A). The shellac coating of these capsules may have well delayed the release of anthocyanins. Shellac is resistant against the low pH environment of the stomach (Farag & Leopold, 2011). This allows anthocyanins encapsulated with CPC to enter the intestine unaffected. The concentrations of degradation products were in line with this theory and on average, 13% higher when subjects ingested BE encapsulated with CPC rather than pure BE (Fig. 3B). This could be due to the stabilization of anthocyanin in the stomach, which is followed by intestinal transit and increased degradation. The time-dependent collection of ileal effluent following ingestion of BE encapsulated with citrus pectin demonstrated substantial temporal shifts in the maximum concentrations of anthocyanins and their degradation products when compared to the concentrations observed after ingestion of pure BE (Fig. 4A and B). The levels of anthocyanins and their degradation products were lower in the plasma samples of subjects who had ingested anthocyanins encapsulated with CPC than those who had ingested anthocyanin in the non-encapsulated form. The concentrations in the urine differ slightly. The concentrations of anthocyanins in the plasma and urine samples were 80% and 8% lower, respectively, in healthy subjects who had ingested BE encapsulated with CPC rather than pure BE. The amounts of degradation products were also lower in the plasma and urine samples of healthy subjects (34% and 5%, respectively) when BE encapsulated with CPC was ingested instead of pure BE. Hence, citrus pectin encapsulation might increase intestinal concentrations of anthocyanins, but will not trigger the absorption and therefore, not improve bioavailability. The results regarding PGAL concentrations revealed an interesting exception (Fig. 5). Every analyzed metabolite (anthocyanin-glucuronides, phenolic acids) was present at lower concentrations in all three tested samples (ileal effluent, plasma, urine) when the ingestion of BE encapsulated with CPC was compared to the ingestion of non-encapsulated BE. The only exception was PGAL, which showed a higher plasma level in subjects with an intact colon who had consumed BE encapsulated with CPC rather than non-encapsulated BE. This trend was reversed in the group of ileostomists (data not shown). This may be explained by the absence of a large intestine, which would otherwise provide microbiota that cleave anthocyanins to anthocyanidins and further degradation products (Keppler & Humpf, 2005). Further prospective studies are necessary to verify these results. The metabolite profile of the urine sample from healthy subjects did show the same trend as that of plasma. In the urine samples, the concentrations of most metabolites were lower when BE encapsulated with CPC was ingested than when pure BE was ingested. The subjects who had ingested CPC-encapsulated BE and non-encapsulated BE did not differ in urinary PGAL concentrations. The formulations did differ in terms of SA concentrations, as the ingestion of CPC-encapsulated BE resulted in slight higher SA concentrations than the ingestion of pure BE.

4.3. Conclusion

This study is limited by the low number of subjects and the incompleteness of the detected metabolites and degradation products. Previous research has reported that many different metabolites, namely cy-3-glu, form after anthocyanin intake (Czank et al., 2013; Kay et al., 2017). Even though encapsulation did not strongly influence the total bioavailability of anthocyanins, a closer examination reveals certain modulatory effects. The large dose of anthocyanin ingested by the subjects (2.4 g) may be one reason that the effects were not more pronounced, as this could have saturated the enzymatic and absorption systems.

D. Mueller et al.

Food Chemistry 248 (2018) 217–224

The presented results raise the question of whether it is important to increase the bioavailability of intact anthocyanins, or if it would be more useful to focus on degradation products, which demonstrated higher absorption rates and could therefore be responsible for the physiological effects of anthocyanins. These aspects do not yet have answers. Intervention studies have shown that the intake of anthocyanins induces the antioxidative defense mechanism via Nrf2 and protects DNA from oxidative damage (Kropat et al., 2013). We recently showed that the consumption of anthocyanin-rich fruit juice over eight weeks reduces DNA damage in the white blood cells of volunteers within the first hours of intervention as well as throughout the whole eight-week study period (unpublished data). Hence, the intake of anthocyanin-rich foods exerts protective effects, but the identities of the active antioxidative compounds remain at the speculative stage.

Funding sources

Funding was provided for the IGF project AIF 17039N of 'Forschungsvereinigung Forschungskreis der Ernährungsindustrie e. V. (FEI)', Godesberger Allee 142-148, 53175 Bonn, through the program entitled 'Programm zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages'.

Acknowledgements

The authors would like to thank the 'Projektbegleitender Ausschuss, Pba', the volunteers of the study and the project partners, as well as Univ. Prof. D. Marko (University of Vienna), who supported the project.

References

Aura, A. M., Martin-Lopez, P., O'Leary, K. A., Williamson, G., Oksman-Caldentey, K. M., Poutanen, K., & Santos-Buelga, C. (2005). In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European Journal of Nutrition*, 44(3), 133–142.

Baum, M., Schantz, M., Leick, S., Berg, S., Betz, M., Frank, K., ... Schuchmann, H. (2014). Is the antioxidative effectiveness of a bilberry extract influenced by encapsulation? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(11), 2301–2307.

Berg, S., Bretz, M., Hubbermann, E. M., & Schwarz, K. (2012). Influence of different pectins on powder characteristics of microencapsulated anthocyanins and their impact on drug retention of shellac coated granulate. *Journal of Food Engineering*, 108(1), 158–165.

Buraczewski, S., Porter, J., Rolls, B., & Zebrowska, T. (1971). The course of digestion of different food proteins in the rat. *British Journal of Nutrition*, 25(2), 299–306.

Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins – Nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063–1072.

Czank, C., Cassidy, A., Zhang, Q., Morrison, D. J., Preston, T., Kroon, P. A., ... Kay, C. D. (2013). Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: A 13C-tracer study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 97(5), 995–1003.

Fang, J. (2014). Bioavailability of anthocyanins. *Drug Metabolism Reviews*, 46(4), 508–520.

Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523.

Farag, Y., & Leopold, C. S. (2011). Development of shellac-coated sustained release pellet formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(4), 400–405.

Faria, A., Fernandes, I., Mateus, N., & Calhau, C. (2013). Bioavailability of anthocyanins. *Natural products*(pp. 2465–2487). Springer.

Fernandes, I., Faria, A., de Freitas, V., Calhau, C., & Mateus, N. (2015). Multiple-approach studies to assess anthocyanin bioavailability. *Phytochemistry Reviews*, 14(6), 899–919.

Ferrars, R., Czank, C., Zhang, Q., Botting, N., Kroon, P., Cassidy, A., & Kay, C. (2014). The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. *British Journal of Pharmacology*, 171(13), 3268–3282.

Flores, G., del Castillo, M. L. R., Costabile, A., Klee, A., Guergoletto, K. B., & Gibson, G. R. (2015). In vitro fermentation of anthocyanins encapsulated with cyclodextrins: Release, metabolism and influence on gut microbiota growth. *Journal of Functional*

Foods, 16, 50–57.

Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213–224.

Gonzalez-Barrio, R., Borges, G., Mullen, W., & Crozier, A. (2010). Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3933–3939.

Juadjur, A., & Winterhalter, P. (2012). Development of a novel adsorptive membrane chromatographic method for the fractionation of polyphenols from bilberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2427–2433.

Kalt, W., Liu, Y., McDonald, J. E., Vinqvist-Tymchuk, M. R., & Fillmore, S. A. (2014). Anthocyanin metabolites are abundant and persistent in human urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 3926–3934.

Kaplan, S., Jack, M., Cotler, S., & Alexander, K. (1973). Utilization of area under the curve to elucidate the disposition of an extensively biotransformed drug. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 1(3), 201–216.

Kay, C. D., Pereira-Caro, G., Ludwig, I. A., Clifford, M. N., & Crozier, A. (2017). Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: A review of recent evidence. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 155–180.

Keppler, K., & Humpf, H.-U. (2005). Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(17), 5195–5205.

Kraus, M., Kahle, K., Ridder, F., Schantz, M., Scheppach, W., Schreier, P., & Richling, E. (2010). Colonic availability of bilberry anthocyanins in humans. *ACS Symposium Series: Flavor and Health Benefits of Small Fruits, American Chemical Society*, 1035(10), 159–176.

Kropat, C., Mueller, D., Boettler, U., Zimmermann, K., Heiss, E. H., Dirsch, V. M., ... Marko, D. (2013). Modulation of Nrf2-dependent gene transcription by bilberry anthocyanins in vivo. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(3), 545–550.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(1), 1–21.

Matuschek, M. C., Hendriks, W. H., McGhie, T. K., & Reynolds, G. W. (2006). The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(1), 31–36.

McGhie, T. K., & Walton, M. C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(6), 702–713.

Mueller, D., Jung, K., Winter, M., Rogoll, D., Melcher, R., & Richling, E. (2017). Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries. *Food Chemistry*, 231, 275–286.

Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds: A review. *Pharmaceutics*, 3(4), 793–829.

Oehme, A., Valotis, A., Krammer, G., Zimmermann, I., & Schreier, P. (2011). Preparation and characterization of shellac-coated anthocyanin pectin beads as dietary colonic delivery system. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, 1–11.

Oidtmann, J., Schantz, M., Mader, K., Baum, M., Berg, S., Betz, M., ... Richling, E. (2012). Preparation and comparative release characteristics of three anthocyanin encapsulation systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(3), 844–851.

Pina, F., Oliveira, J., & de Freitas, V. (2015). Anthocyanins and derivatives are more than flavylum cations. *Tetrahedron*, 71(20), 3107–3114.

Schantz, M., Baum, M., & Richling, E. (2011). Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in vitro. *Journal of Berry Research*, 383 92–92.

Schantz, M., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., ... Richling, E. (2014). Triggered gastrointestinal release of anthocyanins from bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.). *Acta Horticulturae (ISSN 0567-7572) peer reviewed series, Proceedings International Society for Horticultural Science*, pp. 381–385.

Stanstrup, J., Schou, S. S., Holmer-Jensen, J., Hermansen, K., & Dragsted, L. O. (2014). Whey protein delays gastric emptying and suppresses plasma fatty acids and their metabolites compared to casein, gluten, and fish protein. *Journal of Proteome Research*, 13(5), 2396–2408.

Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Manach, C., Lamaison, J.-L., & Rémy, C. (2004). Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *Journal of Nutrition*, 134(9), 2275–2279.

Triebel, S., Trieu, H. L., & Richling, E. (2012). Modulation of inflammatory gene expression by a bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract and single anthocyanins considering their limited stability under cell culture conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8902–8910.

Viljanen, K., Kylli, P., Hubbermann, E.-M., Schwarz, K., & Heinonen, M. (2005). Anthocyanin antioxidant activity and partition behavior in whey protein emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2022–2027.

Wallace, T. C., Slavin, M., & Frankenfeld, C. L. (2016). Systematic review of anthocyanins and markers of cardiovascular disease. *Nutrients*, 8(1), 32.

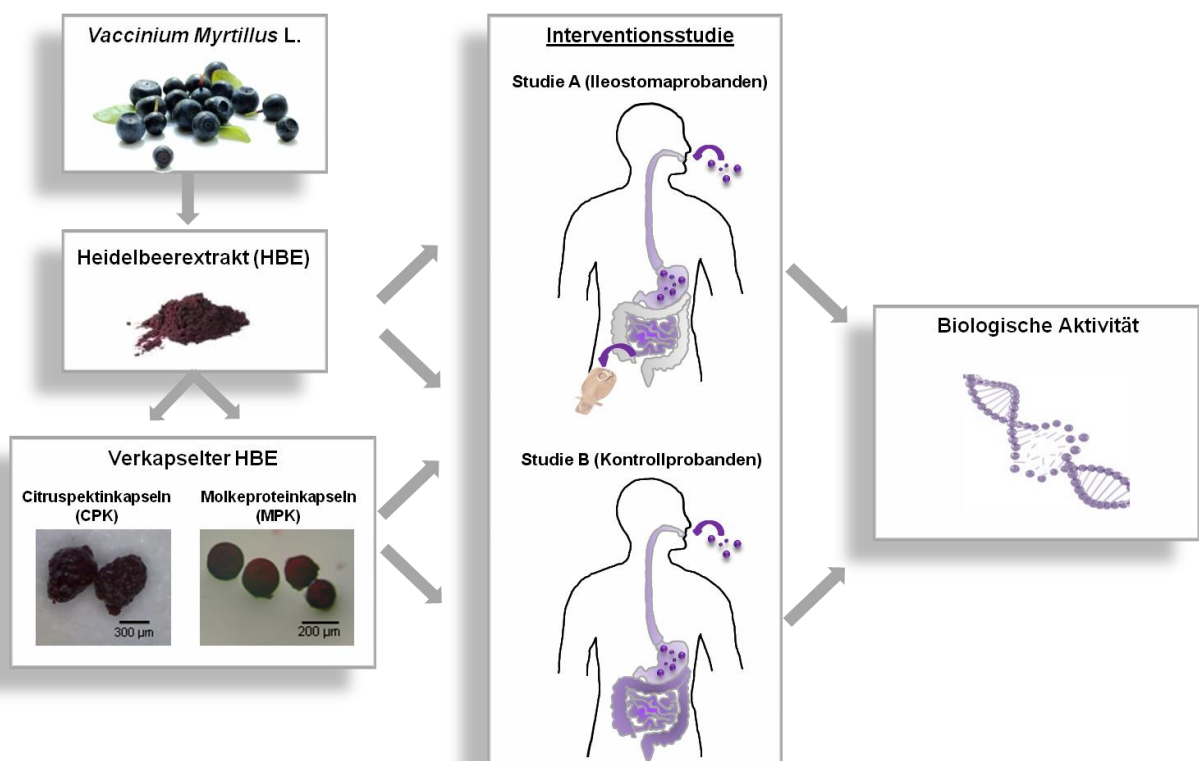
4.3 Biologische Aktivität von unverkapselten und verkapselten Heidelbeeranthocyanen (Teil III)

Konzept der Studie:

4.3.1 Bestimmung des Glutathion-Status

4.3.2 Bestimmung der DNA-Schäden

4.3.3 Modulation Nrf2 abhängiger Gene (Forschungsstelle II)



Im Folgenden wurde die biologische Aktivität sowohl des unverkapselten HBE wie auch der verkapselten Extrakte untersucht. Als Biomarker zur Beurteilung der antioxidativen Wirksamkeit wurden von Forschungsstelle I (Kaiserslautern) der Glutathion-Status und die oxidative DNA-Schädigung mittels Comet Assay im Blut der Proben im Rahmen der Pilotstudie Teil I sowie Teil II ermittelt werden. Die Daten sollen zum einen die potentielle Wirksamkeit des reinen Heidelbeerextraktes aufzeigen und zum anderen den Einfluss der verschiedenen Verkapselungstechniken auf dessen Aktivität. Weiterhin wurden von Forschungsstelle II (Wien) u.a. die Induktion der Expression Nrf2-abhängiger Gene im Zusammenhang mit der Regulierung des AREs (antioxidative response element) untersucht.

4.3.1 Bestimmung des GSH Status im Vollblut der Probanden

Als Marker für den Redoxstatus (GSH-Status) dient der Quotient aus reduziertem GSH (= tGSH – 2x GSSG) und tGSH. Durch Differenzbildung kann der GSH-Anteil und der GSH-Status (Quotient GSH/tGSH) berechnet werden (Halliwell & Gutteridge, 2008; Valko et al., 2006).

Die Bestimmung des GSH-Status aus Vollblut der Probanden wurde mittels der in Kapitel 6 beschriebenen Methode durchgeführt. In Abbildung 16 ist der GSH-Status der Probanden mit Kolon (Gesund1-5) während der verschiedenen Studienphasen dargestellt. Innerhalb 8 Stunden nach Verzehr des Heidelbeerextraktes, unabhängig ob in unverkapselter Form (HBE) oder verkapselter Form (MPK bzw. CPK) gab es keine erheblichen Veränderungen des GSH-Status im Vergleich zur Kontrolle (Zeitpunkt 0 Stunden; vor Extraktverzehr).

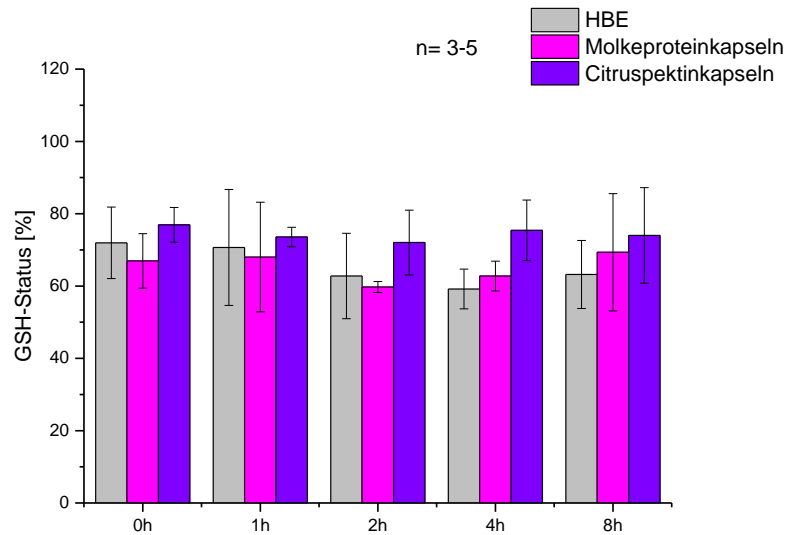


Abbildung 16: Glutathion (GSH)-Status [%] von Probanden mit Kolon (Gesund 1-5) nach HBE-, MPK, und CPK-Verzehr (n=3-5) über 8 h.

In Abbildung 17 ist der GSH-Status der Probanden ohne Kolon (Ileo1-5) während der verschiedenen Studienphasen dargestellt. Auch hier zeigen sich, unabhängig der verzehrten Extrakte, kaum Veränderungen des GSH-Status. Nach Anthocyanaufnahme durch MPK- bzw. CPK-Verzehr stieg der GSH-Status der Probanden innerhalb einer Stunde an (nicht signifikant), wobei es innerhalb der 8 gemessenen Stunden zu keiner weiteren Veränderung mehr kam (Studie Teil II). Vor bzw. nach Anthocyanaufnahme gab es keinen Unterschied des GSH-Status nach HBE-Verzehr (Studie Teil II).

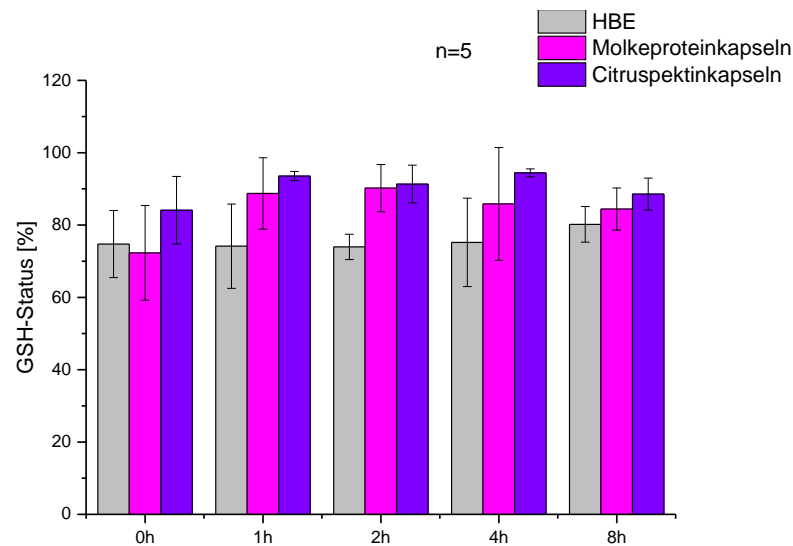


Abbildung 17: Glutathion (GSH)-Status von Probanden ohne Kolon (Ileo1-5) [%] nach HBE-, MPK-, und CPK-Verzehr (n=5) über 8 h

Im Allgemeinen zeigt sich, dass die Anthocyanaufnahme (unverkapselt und verkapselt) während der durchgeführten Studie keinen erheblichen Einfluss auf den GSH-Status im Blut der Probanden ausübte. Es kristallisiert sich heraus, dass dieser Marker nicht für ein Kurzzeit-Screening geeignet war und eher in längeren Studienphasen durch Anthocyane moduliert und beeinflusst werden könnte (Weisel et al., 2006).

4.3.2 Bestimmung der DNA-Strangbrüche mittels Comet-Assay im Vollblut der Probanden

Zur Erfassung oxidativer DNA-Schäden kann die alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay) herangezogen werden (Apel & Hirt, 2004; Halliwell, 2008). Um eine Aussage über das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden zu erhalten, wurden die Zellen nach der Lyse mit dem Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) behandelt. Bei FPG handelt es sich um ein bifunktionelles Enzym das aus *E.coli* isoliert wird. Durch seine Glykosylaseaktivität ist es in der Lage, DNA-Modifikationen (oxidierte Basen wie 8-Oxo-Guanin, sowie deren ringgeöffnete Imidazole) zu erkennen und herauszuschneiden, wobei Lücken verbleiben. Durch die AP-Lyaseaktivität des Enzyms kann die Entfernung des Deoxyribosephosphats erfolgen, woraus ein Strangbruch resultiert (Laval, 1996) und vermehrt Strangbrüche detektiert werden können. Die Differenz aus Strangbrüchen mit und

ohne Enzymbehandlung wird als spezifisch oxidative DNA-Schädigung interpretiert (Collins, 2000).

Das Ausmaß der DNA-Basisstrangbrüche (ohne FPG-Enzymbehandlung) und der gesamten DNA-Strangbrüche (mit FPG-Enzymbehandlung) in Blutzellen der Probanden wurde mittels Comet-Assay (siehe Details zur Methode in Kapitel 6) erfasst und ist im Folgenden für die verschiedenen Extrakte (HBE: grau, MPK: pink, CPK: violett) dargestellt. Um eine Aussage über das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden zu erhalten, wurden die Zellen mit einem Reparaturenzym, dem Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) behandelt.

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der DNA-Schäden in weißen Blutzellen der ersten Studienphase nach dem Verzehr von 10 g HBE. Bei den Ileostomieprobanden erfolgte eine tendenzielle Abnahme der gesamten DNA-Strangbrüche (mit FPG-Behandlung) nach 4 h, bei den Kontrollprobanden war diese Tendenz schon nach 2 h sichtbar (sowohl mit und ohne FPG). Nach 8 h wurde bei beiden Gruppen das Ausgangsniveau der DNA-Schäden wieder erreicht.

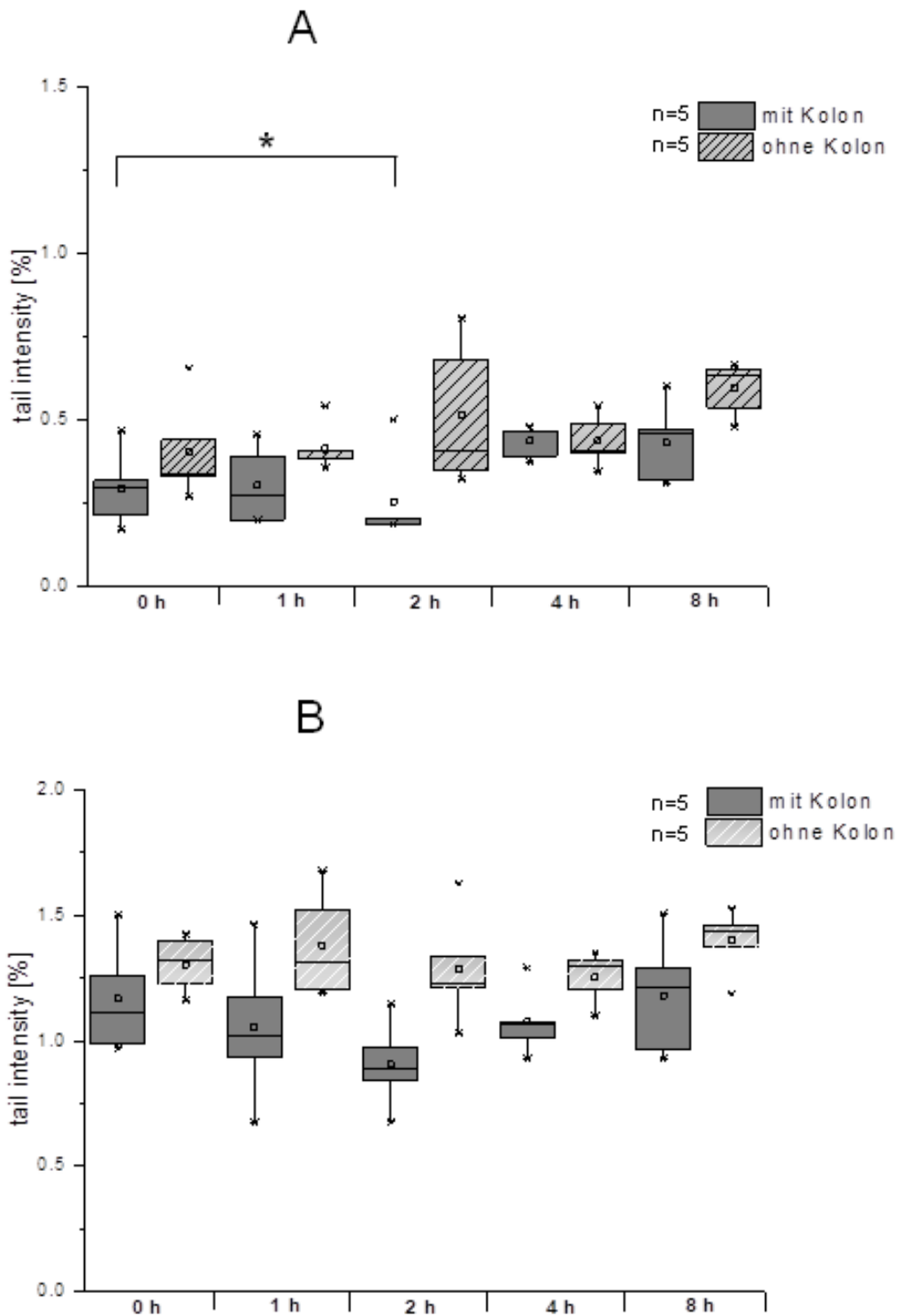


Abbildung 18: Modulation von DNA-Strangbrüchen A (ohne FPG-Behandlung) und B (mit FPG-Behandlung) nach Verzehr des unverkapselten HBE für Ileostomieprobanden ohne Kolon n=5 und für Kontrollprobanden mit Kolon n=5; Normalverteilung nach Anderson Darling, Signifikanz nach Student's t-test * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

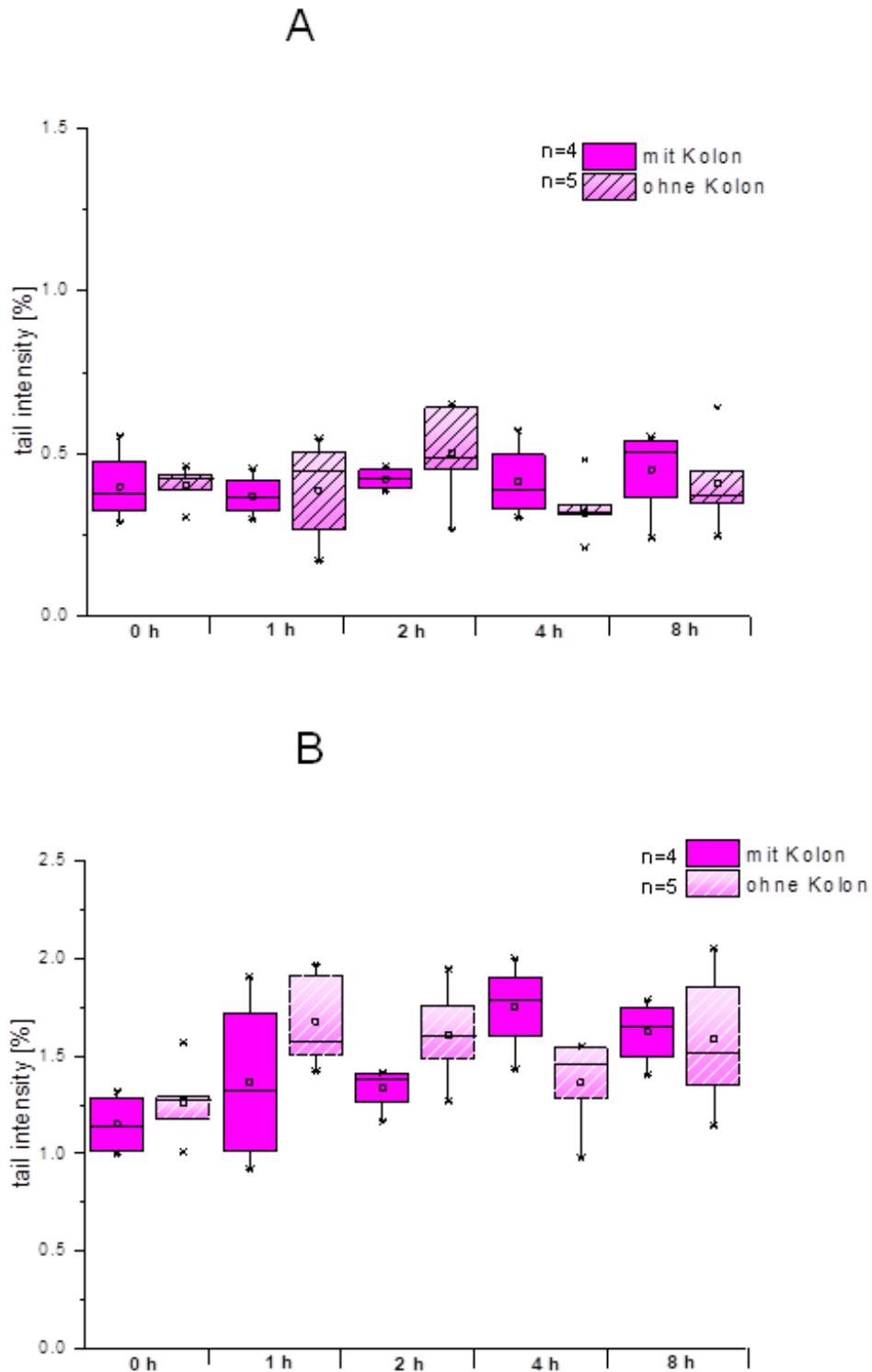


Abbildung 19: Modulation von DNA-Strangbrüchen A (ohne FPG-Behandlung) und B (mit FPG-Behandlung) nach Verzehr der Molkeproteinkapseln (MPK) für Ileostomieprobanden ohne Kolon $n=5$ und für Kontrollprobanden mit Kolon $n=4$; Normalverteilung nach Anderson Darling, Signifikanz nach Student's t -test * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Die Ergebnisse der DNA-Strangbrüche in Blutzellen der Probanden der zweiten Studienphase nach Verzehr von 144 g MPK sind in Abbildung 19 dargestellt. Nach Verzehr der MPK zeigte sich bei den Ileostomieprobanden nach 1 h und bei den Kontrollprobanden nach 4 h einen Anstieg der direkten und oxidativen DNA-Schäden in den Blutzellen (mit FPG), wobei nach 8 h bei beiden Gruppen das Ausgangsniveau der Schäden fast wieder erreicht wurde. Bei Blutzellen der Ileostomieprobanden erfolgte nach 4 h für die Behandlung ohne bzw. mit FPG eine deutliche Reduzierung der Schäden im Vergleich zu den 2 h-Werten.

Die Diagramme in Abbildung 20 zeigen die Ergebnisse der DNA-Strangbrüche in Blutzellen von Probanden mit und ohne Kolon nach Verzehr von 30 g CPK. Eine signifikante Abnahme der DNA-Schäden wurde nach Verzehr der CPK erreicht. In der Gruppe der Ileostomieprobanden trat nach 4 h eine signifikante Reduzierung der DNA-Schäden auf. Die Ergebnisse ohne und mit FPG-Behandlung (Erfassung oxidativer Schäden) korrelieren und zeigten zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Abnahme der DNA-Schäden in Blutzellen im Vergleich zum Basislevel bei 0 h. In den Blutzellen der Probanden mit intaktem GIT wurde dieses Minimum erst nach 8 h erreicht (mit FPG-Behandlung).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Untersuchung auf DNA-Strangbrüche (Comet-Assay), dass nach HBE-Verzehr (unverkapselt) und CPK-Verzehr die stärksten Effekte in beiden Probandengruppen zu beobachten waren. Diese Daten bezüglich der biologischen Wirkung korrelieren nicht eindeutig mit den Ergebnissen der Bioverfügbarkeitsuntersuchungen. Die größten Mengen an Anthocyanen wurden unabhängig vom verzehrten Extrakt (unverkapselt bzw. verkapselt) von den Probanden mit intaktem Gastrointestinaltrakt (mit Kolon) aufgenommen. Nach MPK-Verzehr konnten in beiden Probandengruppen (mit und ohne Kolon) mehr Anthocyane den systemischen Kreislauf erreichen, im Vergleich zum unverkapselten HBE. Allerdings konnte in dieser Phase im Blut beider Probandengruppen, im Zeitfenster von 8 Stunden, keine Verringerung der DNA-Strangbrüche beobachtet werden.

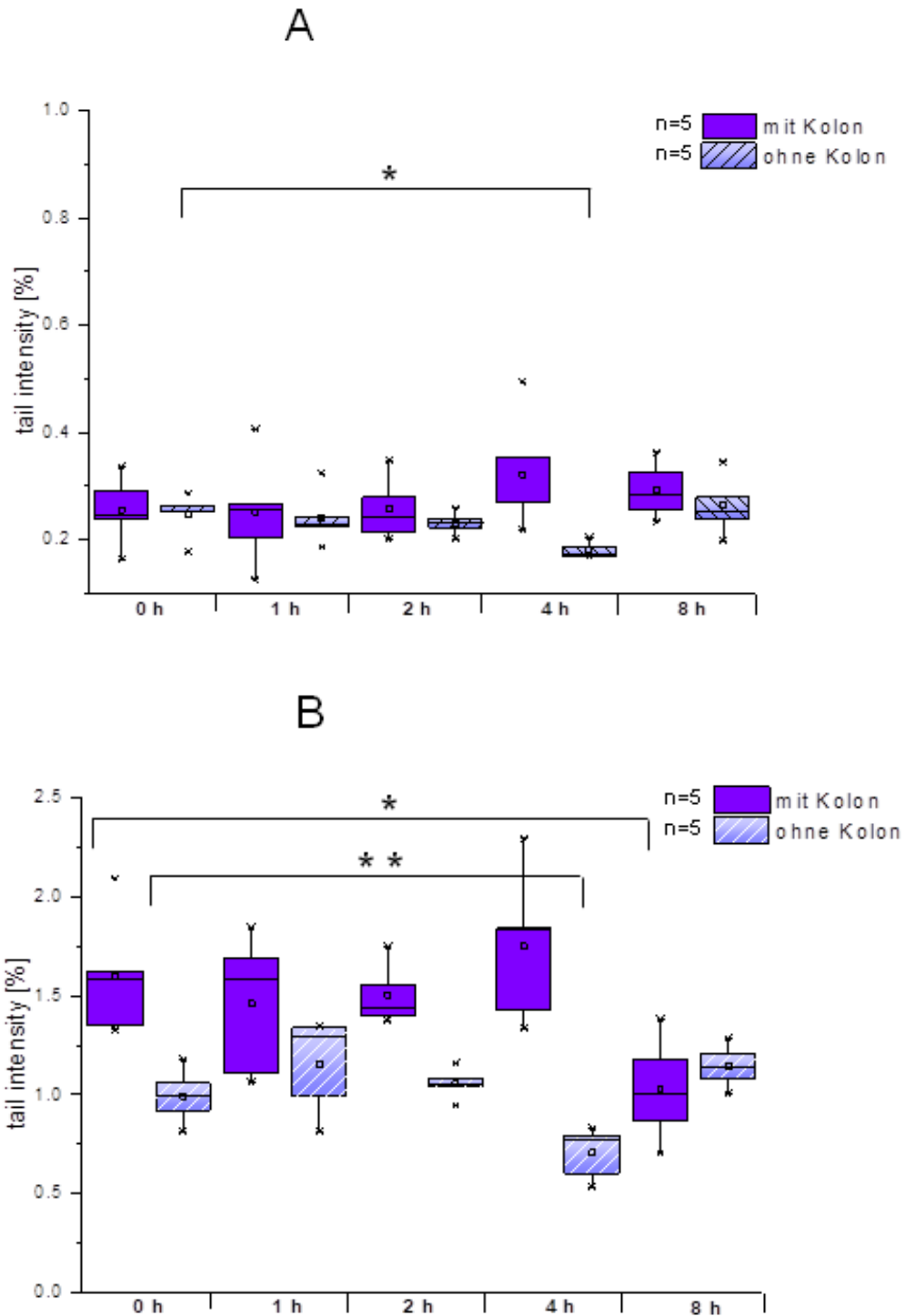


Abbildung 20: Modulation von DNA-Strangbrüchen A (ohne FPG-Behandlung) und B (mit FPG-Behandlung) nach Verzehr der Citruspektinkapseln (CPK) für Ileostomieprobanden ohne Kolon n=5 und für Kontrollprobanden mit Kolon n=5; Normalverteilung nach Anderson Darling, Signifikanz nach Student's t-test *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,001.

4.3.3 Veröffentlichte Ergebnisse in Zusammenarbeit mit der Partnerforschungsstelle Prof. Doris Marko, Wien

"Modulation Nrf2 abhängiger Gentranskription durch Heidelbeeranthocyane in vivo - Vermittelt durch das intestinale Abbauprodukt Phloroglucinolaldehyd"

'Modulation of Nrf2-Dependent Gene Transcription by Bilberry Anthocyanins in vivo – Mediated by the Intestinal Degradation Product Phloroglucinol Aldehyde'

Christopher Kropat¹, Dolores Mueller², Ute Boettler¹, Kristin Zimmermann³, Elke H. Heiss³, Verena M. Dirsch³, Dorothee Rogoll⁴, Ralph Melcher⁴, Elke Richling², Doris Marko¹ (2013) *Molecular Nutrition and Food Chemistry* 57, 545-550

4.3.3.1 Einleitung

In verschiedenen Humanstudien wurde gezeigt, dass anthocyanreiche Präparate in der Lage sind Marker von oxidativem Stress zu reduzieren (Esselen et al., 2012; Spormann et al., 2008; Weisel et al., 2006). Da die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen und deren Plasmakonzentrationen niedrig sind, ist das direkte Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies durch Anthocyane *in vivo* eher unwahrscheinlich. Ein anderer Ansatz ist die Induktion der antioxidativen Abwehr durch Aktivierung von Nrf2-regulierten Phase-II-Enzymen. Enzyme wie z.B. Glutathion-S-transferasen (GST), UDP-Glucuronyltransferasen (UGT), NAD(P)H-Chinonoxidoreduktase-1 (NQO1), γ -Glutamylcysteinyligase (γ GCL) oder die Hämoxygenase-1 (HO1) werden durch 'antioxidative response elements (AREs)' reguliert. Unter basalen Bedingungen ist Nrf2 an das aktinverankerte Protein Keap1 im Cytosol gebunden. Bei der Stimulation, die durch oxidativen Stress oder Induktoren vermittelt wird, translatiert Nrf2 in den Zellkern und bindet an ARE, was zu einer Transkriptionsmodulation von Phase-II-Enzymen führt. Viele der bekannten Nrf2-Induktoren sind Elektrophile, die mit den Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste von Keap1 reagieren können und die Freisetzung von Nrf2 bewirken (Dinkova-Kostova et al., 2002).

4.3.3.2 Ziel der Studie

In der Studie sollte die Rolle der Anthocyane bei der Induktion der Expression von Phase II Enzymen gezeigt werden (Hwang et al., 2011; Milbury et al., 2007). Analog dem Studiendesign aus Teil I wurde die kurzzeitige Wirkung des unverkapselten HBE auf die Modulation der Nrf2-abhängigen Gentranskription und DNA-Schädigung in den Blutzellen beider Probandengruppen (mit und ohne Kolon) untersucht. Die Anthocyangehalte der Ileostomaflüssigkeiten wurden quantifiziert, um Rückschlüsse auf die Passagezeit der Anthocyane entlang des Gastrointestinaltraktes zu ziehen.

4.3.3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der Gruppe der Probanden ohne Stoma zeigte sich 1-8 h nach dem Verzehr von HBE eine signifikante Erhöhung der NQO1-Transkripte (engl.: NAD(P)H quinone oxireductase), wohingegen die Transkription von HO-1 (Hämoxygenase 1) und Nrf2 signifikant verringert war. Die NQO1- und HO-1- Transkription blieb in der Gruppe der Ileostomaprobanden unverändert, während die Expression der Nrf2-Transkription in den Blutproben beider Gruppen gehemmt wurde. Eine Abnahme der oxidativen DNA-Schädigung wurde nur in der Gruppe der Probanden mit Kolon 2 h nach HBE-Verzehr beobachtet. *In-vitro*-Studien mit einem Reporter-Gen-Ansatz an CHO-Zellen und quantitativer Polymerasekettenreaktion an HT29-Zellen zeigten, dass vermutlich nicht die intakten Anthocyane die aktivierenden Bestandteile sind, sondern der intestinale Metabolit Phloroglucinolaldehyd (PGA), der durch die Mikrobiota im Darm gebildet wird. Auch weitere Metabolite könnten für die Aktivität eine Rolle spielen.

4.3.3.4 Fazit

Die Studie zeigt, dass der Verzehr von Heidelbeerektrakt die Nrf2-abhängige Genexpression in Blutzellen modulierte, was auf eine systemische Aktivität hinweist. Diese Wirkung beschränkte sich vor allem auf die Probanden mit Kolon. So scheinen die Prozesse im Kolon einen Einfluss auf die Bioaktivität der Anthocyane auszuüben. Dies untermauern auch die Nrf2-aktivierenden Eigenschaften des intestinalen Abbauproduktes Phloroglucinolaldehyd.

4.3.3.5 Veröffentlichtes Manuskript

Mol. Nutr. Food Res. 2013, 57, 545–550

DOI 10.1002/mnfr.201200504

545

FOOD & FUNCTION

Modulation of Nrf2-dependent gene transcription by bilberry anthocyanins in vivo

Christopher Kropat¹, Dolores Mueller², Ute Boettler¹, Kristin Zimmermann³, Elke H. Heiss³, Verena M. Dirsch³, Dorothee Rogoll⁴, Ralph Melcher⁴, Elke Richling² and Doris Marko¹

¹ Department of Food Chemistry and Toxicology, University of Vienna, Vienna, Austria

² Department of Chemistry, University of Kaiserslautern, Kaiserslautern, Germany

³ Department of Pharmacognosy, University of Vienna, Vienna, Austria

⁴ Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Wuerzburg, Wuerzburg, Germany

In a human pilot intervention study (healthy + ileostomy probands), the questions were addressed whether in vivo consumption of an anthocyanin-rich bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) pomace extract (BE) affects (i) the transcription of Nrf2-dependent genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), indicative for systemic effects, and (ii) the level of oxidative DNA damage in these cells. In healthy test subjects transcripts of NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) were significantly elevated throughout the observation period (1–8 h), whereas transcription of heme oxygenase 1 (HO-1) and Nrf2 was significantly decreased. NQO1 and HO-1 transcription remained unchanged in the ileostomy probands, whereas Nrf2-transcription was suppressed in both groups. Decrease in oxidative DNA damage was observed 2 h after BE consumption again only in healthy subjects. In vitro studies using a reporter gene approach (CHO) and qPCR (HT29) indicate that not the intact anthocyanins/anthocyanidins are the activating constituents but the intestinal degradation product phloroglucinol aldehyde (PGA). Taken together, consumption of anthocyanin-rich BE was found to modulate Nrf2-dependent gene expression in PBMCs indicative for systemic activity. Limitation of the effect to healthy test subjects suggests a role of colonic processes for bioactivity, supported by the results on Nrf2-activating properties of the intestinal anthocyanin degradation product PGA.

Received: July 31, 2012
Revised: October 29, 2012
Accepted: November 13, 2012

Keywords:

Anthocyanin / Antioxidant response element / Bilberry pomace extract / Nrf2 activation / Phloroglucinol aldehyde



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

In several human intervention studies, anthocyanin-rich preparations have been shown to reduce oxidative stress markers [1, 2]. Since anthocyanin bio-availability and hence, plasma concentrations are quite low, direct scavenging of

reactive oxygen species by anthocyanins in vivo is rather unlikely. A different approach is the induction of the antioxidant defense by activating Nrf2-regulated phase-II-enzymes. These enzymes are regulated by antioxidant response elements (AREs), located in the 5'-flanking region of their promoter. Under basal conditions Nrf2 is bound to the actin-anchored protein Keap1 in the cytosol. Upon stimulation, mediated by oxidative stress or inducers, Nrf2 translocates into the nucleus, where it binds to ARE consensus sequences, resulting in transcriptional modulation of phase-II-enzymes. Many known Nrf2-inducers are electrophiles, capable of reacting with sulfhydryl groups of the cysteine residues of Keap1, leading to liberation of Nrf2 [3].

Reports indicate a role for anthocyanins as inducers of phase-II-enzyme expression [4–8]. In a pilot human intervention study (Fig. 1A), we investigated the short-term effect of

Correspondence: Professor Doris Marko, Department of Food Chemistry and Toxicology, University of Vienna, A-1090 Vienna, Währingerstr. 38, Austria

E-mail: doris.marko@univie.ac.at

Fax: +43-14277-70899

Abbreviations: ARE, antioxidant responsive element; BE, bilberry pomace extract; CG, control group; GA, gallic acid; HO-1, heme oxygenase 1; IG, ileostomy group; NQO1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PCA, protocatechuic acid; PGA, phloroglucinol aldehyde; SA, syringic acid

546

C. Kropat et al.

Mol. Nutr. Food Res. 2013, 57, 545–550

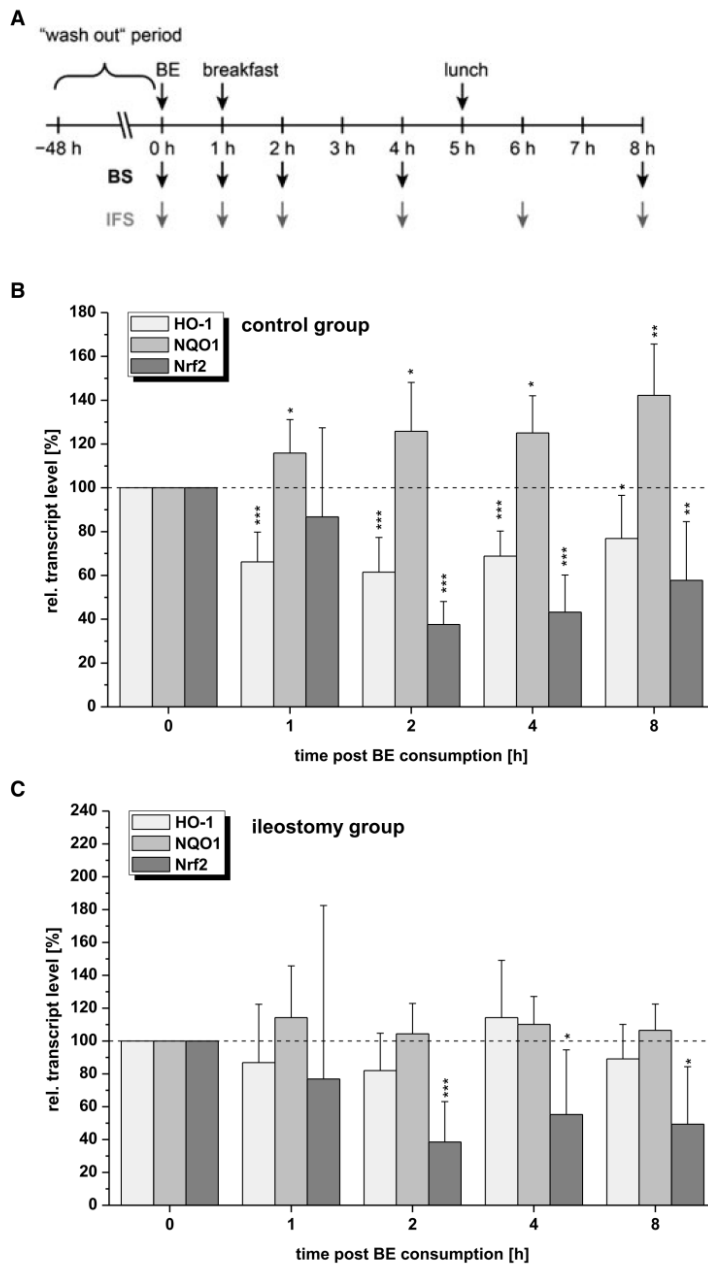


Figure 1. (A) Schedule of the pilot human intervention trial. (B and C) Nrf2-dependent gene transcription in PBMC of five healthy females (B) and five female ileostomy probands (C) after single administration of 10 g BE, determined by *q*-PCR analysis. Values are means \pm SD; normalized to GAPDH transcription and presented as relative transcription of baseline = 100%; significant differences from baseline were calculated using Student's *t*-test (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001). BE, bilberry pomace extract; BS, blood samples; IFL, ileostomy fluid samples

a bilberry pomace extract (BE) on the modulation of Nrf2-dependent gene transcription, and DNA damage in PBMCs of healthy volunteers (five females, control group, CG) and a group of ileostomy probands (five females, ileostomy group,

IG), lacking a colon. Anthocyanin content of the ileostomy effluents was determined to monitor transit time (details see Supporting Information). The probands received a single dose of 10 g BE corresponding to a total of 2.5 g anthocyanins.

Human intervention studies and subsequent amendments were approved by the local Ethics Commission of the University of Wuerzburg (no. 32/10). Three ileostomy probands excreted the maximum amount of anthocyanins already within the first hour; the two residual probands exhibited the highest excretion between 1 and 2 h. The present study demonstrate that the majority of recovered anthocyanins passed the stomach and small intestine already within 1–2 h, hence are expected to reach the colon also in healthy subjects within that time frame. In average, $30 \pm 6\%$ of ingested anthocyanins were excreted into ileostomy fluid. As expected, a large amount of anthocyanins was degraded during passage of the upper gastrointestinal tract (GIT) [9].

The effect of BE consumption on Nrf2-dependent gene transcription in PBMC was determined by *q*-PCR. In CG, the transcript level of NQO1 was significantly increased already 1 h post ingestion (Fig. 1B). Within the following 8 h, the NQO1 transcript level slightly raised to a maximum of $142 \pm 23\%$ (T/C). In contrast, HO-1 transcription was significantly decreased already 1 h post consumption. At $t = 2$ h, this level displayed a minimum of $61 \pm 16\%$ (T/C). In contrast, NQO1 and HO-1 levels were not significantly modulated in IG (Fig. 1C). Of note, in both groups (Fig. 1B and C), transcript levels of Nrf2 were significantly suppressed to a minimum of $38 \pm 10\%$ (T/C) in CG and $39 \pm 25\%$ (T/C) in IG after 2 h.

NQO1 is a widely distributed enzyme, catalyzing the reduction of potential redoxcyclers such as quinones, thus associated with chemo-preventive properties [10]. HO-1 catalyzes the rate-limiting step in the oxidative degradation of heme but is also associated with a list of diseases, such as Alzheimer's disease or tumor growth. Hence the correct balance of HO-1 expression seems to be crucial [11]. Nrf2 possesses ARE-like sequences in its promoter region [12]. Even though, enhanced Nrf2-expression in normal cells is assumed as a protective mechanism, Nrf2-overexpression appears to play a role in resistance to cancer chemotherapeutics [13]. Further studies are needed to clarify whether the observed down-regulation of Nrf2 is a transient effect followed by a subsequent compensating induction at later time points or whether indeed extract concentrations were reached resulting in the suppression of the Nrf2/ARE-system, thus compromising defense systems in the long-term perspective.

To investigate, whether the modulation of phase-II-enzyme transcription affects the level of DNA damage in PBMC, the Comet assay was applied (Fig. 2A and B). Basic and total levels (basic + formamidopyrimidine DNA glycosylase-sensitive sites) of DNA damage were low for both groups with a tendency toward higher values for IG. However, total damage was 3–4 fold higher than basic damage, indicating the presence of oxidative stress. In the PBMCs of CG, basic and total DNA damage were diminished 2 h post consumption of BE (significantly for total damage). Four to eight hours after consumption, baseline damage was restored for basic as well as total DNA damage in PBMC of CG. In contrast, in the investigated time window, no significant effect on DNA integrity was observed for IG. Along with the reduced

oxidative DNA damage after 2 h, transcription of NQO1 was increased in the healthy subjects (Fig. 1B), thus probably contributing to the suppression of oxidative stress. However, whereas NQO1 transcription remained induced until the end of the trial, oxidative DNA damage returned to the base level after 4–8 h, indicating that both processes do not necessarily depend on each other. This finding indicates the protective effects of anthocyanins or other fruit constituents from a single dose to be transient. Measurement of glutathione in the plasma samples showed no increase throughout the study; neither in healthy nor in ileostomy probands (data not shown) indicating that the time span might be too short for pronounced effects on this biomarker.

In order to identify active compounds responsible for the activity of the BE in vivo, a screening of potentially relevant constituents and degradation products was performed in vitro using a Nrf2 luciferase reporter gene assay. CHO cells were treated with BE, cyanidin-3-O-glucoside (cy-3-glc)—one of the predominant anthocyanins in the BE—the respective aglycon cyanidin (cy), as well as the anthocyanin degradation products phloroglucinol aldehyde (PGA), protocatechuic acid (PCA), syringic acid (SA), vanillic acid (VA), gallic acid (GA), 4-hydroxybenzoic acid (4HBA), and benzoic acid (BA). The synthetic Nrf2-inductor CDDO-imidazolide [14] was used as a positive control. To prevent artifacts by polyphenol-mediated H₂O₂ formation in cell culture, medium incubation was performed in the presence of catalase (100 U/mL) [15]. Neither BE nor the single compounds cy-3-glc or cy induced ARE promoter activity. The phenolic acids arising from anthocyanidin degradation were inactive, whereas PGA, the metabolite formed by intestinal microorganisms, significantly increased ARE-promoter activity up to $129 \pm 16\%$ (T/C) (Fig. 3A; data not shown for cy, syringic acid, GA, VA, 4HBA and BA).

To support the observations on Nrf2-activation, effects on the transcription of Nrf2-dependent genes were investigated in HT29 colon carcinoma cells, a cell line well characterized with respect to Nrf2/ARE-signaling [16]. BE, cy-3-glc and PCA had no activating effect on the transcription of the tested genes, whereas PGA did significantly increase the transcript levels of HO-1 and Nrf2 (Fig. 3B).

Earlier reports on Nrf2 activating potency of anthocyanins [5, 7] appear not to be directly comparable to the present results due to the fact that experimental artifacts to be expected from the formation of H₂O₂ in the cell culture medium have been prevented in the present study by the addition of catalase. Under these experimental conditions only PGA ($\geq 200 \mu\text{M}$) was capable to induce Nrf2 activation and modulate the transcription of Nrf2-regulated genes. However NQO1-transcription was not affected in HT29 cells (Fig. 3B). This transcript pattern differs from the human intervention study, reported above. Although it has to be considered that transcription patterns are cell-type specific and transcription response in PBMCs in vivo might therefore substantially vary from that obtained in colon carcinoma cells in vitro. Anyhow it is salient, that solely PGA, the colonic degradation product of all anthocyanins, is active in both in vitro assays, making it

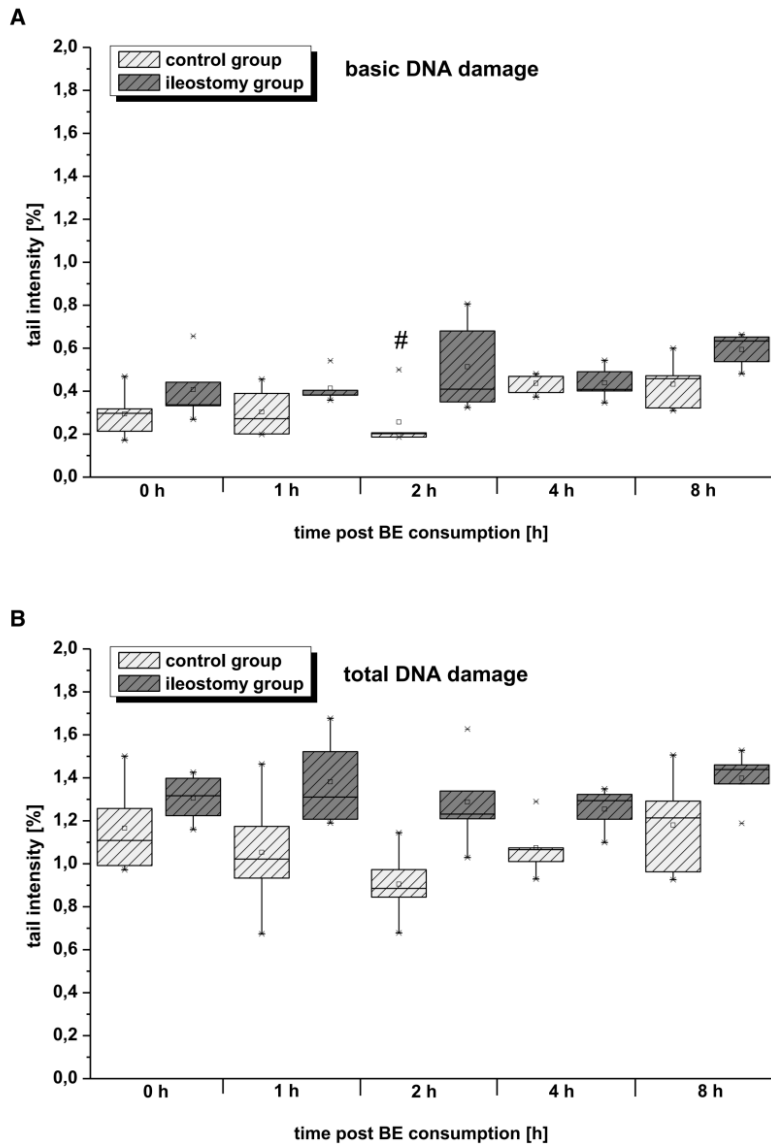


Figure 2. Modification of (A) basic and (B) total DNA damage in PBMC of five healthy females (CG) and five female ileostomy probands (IG) after consumption of 10 g BE, determined by single cell electrophoresis (comet assay). The DNA repair enzyme formamidopyrimidine-DNA glycolase was used to detect the potential oxidative DNA damage. Normal distribution (Anderson Darling) and significances (Student's t-test) : # $p < 0.05$.

conceivable that the in vivo effects are due to intestinal PGA formation.

PGA and phenolic acid formation in pig caecum inoculum, that is close to human intestinal content, was reported as 5–10% of the initial anthocyanin concentration, depending on B-ring substitution and glycosylation pattern [17]. Assuming that PGA plasma concentrations is equal to amounts of PCA found after anthocyanin ingestion [18], we would expect levels that are lower by magnitudes compared to the con-

centrations used in here performed in vitro assays. It has to be considered, that peak concentrations of anthocyanins and hence PGA formation might be locally higher due to a bolus-like distribution throughout the colon. This implies that PGA concentrations used in the in vitro assays herein may indeed occur in the GIT. Since HO-1 and NQO1 transcription and furthermore reduction of oxidative DNA damage was solely modulated in CG, it might be speculated that the presence of an active colon is crucial for the Nrf2/ARE-modulating effects

Mol. Nutr. Food Res. 2013, 57, 545–550

549

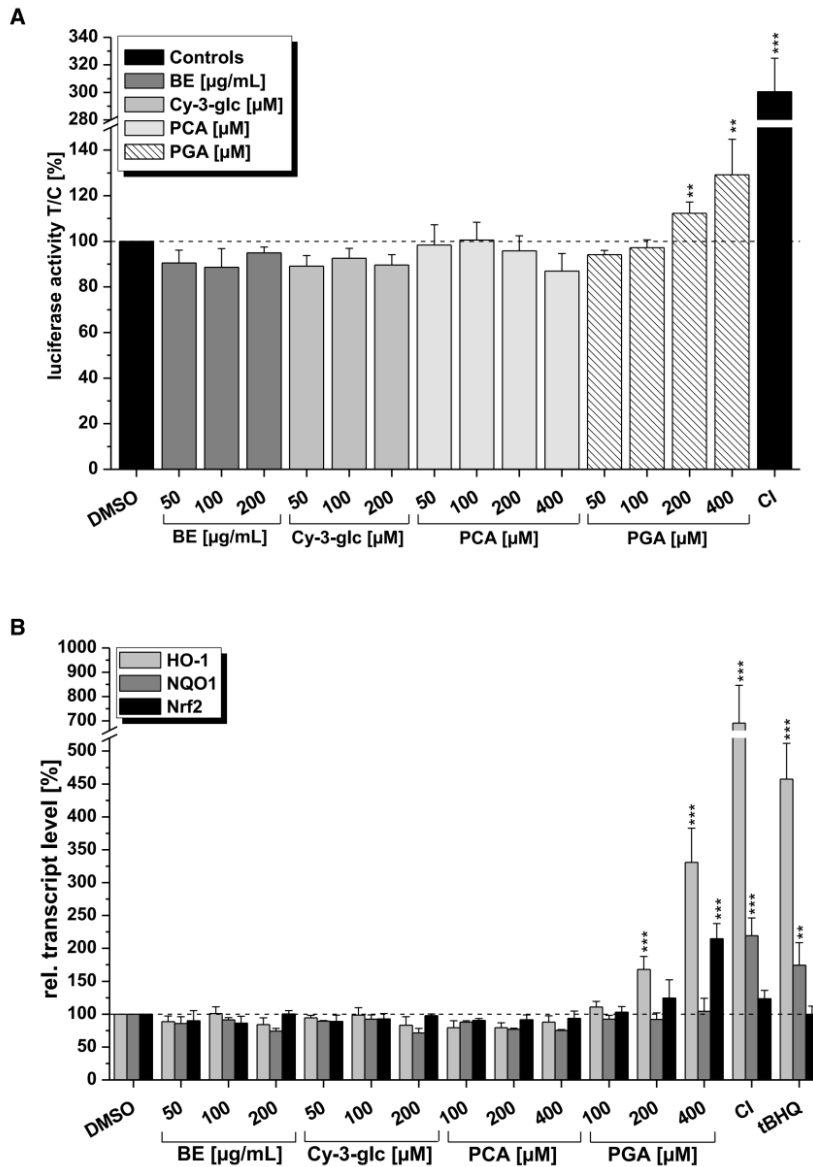


Figure 3. Effect of BE, cy-3-glc, PCA and PGA after 20 h on (A) ARE-driven luciferase expression in CHO cells. Values are means \pm SD of at least four independent experiments normalized on GFP luminescence. (B) Modification of phase-II-enzyme transcription in HT29 cells. Values are means \pm SD; normalized to β -actin transcription and presented as relative transcription of solvent control (1% DMSO). In both assays significant differences from solvent control were calculated using Student's t-test (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

of BE. In contrast, regulation of Nrf2-expression seems to be independent of colonic processes and hence are likely to result from native BE constituents *via* an alternative pathway. This seems even more reasonable, since ARE-like regions of Nrf2 are known to be weak and the Nrf2-promoter bears further regulating elements, such as several XRE-like elements, representing preferred binding site of the Ah-receptor [12, 19].

Inductors of the Nrf2/Keap1-pathway mostly act as electrophiles by reacting with sulfhydryl groups of cysteine

residues of the Nrf2-repressor Keap1. Modification of these thiol-groups results in a conformational change of Keap1 and simultaneous release of Nrf2, which subsequently translocates into the nucleus, inducing transcription of phase-II-enzymes. Due to its aldehyde group, PGA is presumably capable to react with sulfhydryl groups. Based on its reactivity toward thiol groups of macromolecules and e.g. glutathione, reliable PGA quantification in plasma is not achievable at present.

550 C. Kropat et al.

Mol. Nutr. Food Res. 2013, 57, 545–550

Taken together, the results indicate that the activation of Nrf2/ARE-dependent gene expression plays a role for the antioxidant properties of anthocyanin-rich preparations in vivo. Notably, the activation of this pathway appears not to result from the native anthocyanins. PGA, the aldehyde formed from anthocyanins by the colonic microflora, was identified as an activator of the Nrf2/ARE-pathway, suggesting a crucial role of digestive processes in the colon for the bioactivity of anthocyanins. Of note, during the 8 h of post consumption monitoring a substantial decrease of Nrf2 transcription was observed, raising the question on long-term effects, whether this decrease is simply transient or might lead to subsequent decreased activity of Nrf2/ARE-dependent defense systems at later time points which would imply potentially undesired effects.

This study is supported by the German Ministry of Economics and Technology (via AiF) and the FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn, Germany), Project AiF17039N (Kaiserlautern, Germany and Vienna, Austria). Partly supported by the Austrian Science Fund (FWF, P23317) and the University of Vienna (Initiative Group BioProMotion).

The authors declared no conflict of interest.

References

[1] Thomasset, S., Teller, N., Cai, H., Marko, D. et al., Do anthocyanins and anthocyanidins, cancer chemopreventive pigments in the diet, merit development as potential drugs? *Cancer Chemoth. Pharm.* 2009, 64, 201–211.

[2] Sies, H., Hollman, P. C., Grune, T., Stahl, W. et al., Protection by flavanol-rich foods against vascular dysfunction and oxidative damage: 27th Hohenheim Consensus Conference. *Adv. Nutr.* 2012, 3, 217–221.

[3] Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K. et al., Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99, 11908–11913.

[4] Milbury, P. E., Graf, B., Curran-Celentano, J. M., Blumberg, J. B., Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells. *Invest. Ophth. Vis. Sci.* 2007, 48, 2343–2349.

[5] Hwang, Y. P., Choi, J. H., Choi, J. M., Chung, Y. C., Jeong, H. G., Protective mechanisms of anthocyanins from purple sweet potato against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity. *Food Chem. Toxicol.* 2011, 49, 2081–2089.

[6] Hwang, Y. P., Choi, J. H., Yun, H. J., Han, E. H. et al., Anthocyanins from purple sweet potato attenuate dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats by inducing Nrf2-mediated antioxidant enzymes and reducing COX-2 and iNOS expression. *Food Chem. Toxicol.* 2011, 49, 93–99.

[7] Shih, P. H., Yeh, C. T., Yen, G. C., Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 9427–9435.

[8] Thoppil, R. J., Bhatia, D., Barnes, K. F., Haznagy-Radnai, E. et al., Black currant anthocyanins abrogate oxidative stress through Nrf2-mediated antioxidant mechanisms in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Curr. Cancer Drug Targets* 2012, 12, 1244–1257.

[9] Fleschhut, J., Kratzer, F., Reckemmer, G., Kulling, S. E., Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur. J. Nutr.* 2006, 45, 7–18.

[10] Zhang, Y., Tang, L., Discovery and development of sulforaphane as a cancer chemopreventive phytochemical. *Acta Pharmacol. Sin.* 2007, 28, 1343–1354.

[11] Otterbein, L. E., Choi, A. M. K., Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am. J. Physiol.* 2000, 279, L1029–L1037.

[12] Kwak, M. K., Itoh, K., Yamamoto, M., Kensler, T. W., Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol. Cell Biol.* 2002, 22, 2883–2892.

[13] Homma, S., Ishii, Y., Morishima, Y., Yamadori, T. et al., Nrf2 enhances cell proliferation and resistance to anticancer drugs in human lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15, 3423–3432.

[14] Dinkova-Kostova, A. T., Liby, K. T., Stephenson, K. K., Holtzclaw, W. D. et al., Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, 102, 4584–4589.

[15] Kern, M., Fridrich, D., Reichert, J., Skrbek, S. et al., Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 1163–1172.

[16] Boettler, U., Sommerfeld, K., Volz, N., Pahlke, G. et al., Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression. *J. Nutr. Biochem.* 2011, 22, 426–440.

[17] Keppler, K., Humpf, H. U., Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 5195–5205.

[18] Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F. et al., Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *J. Nutr.* 2007, 137, 2043–2048.

[19] Miao, W. M., Hu, L. G., Scrivens, P. J., Batist, G., Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway – Direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 20340–20348.

Supplementary Material:

Material and Methods

Bilberry Pomace Extract (BE). Dry BE (Symrise GmbH & Co. KG, Holzminden, Germany, pr. no. 399916, batch 29) was gained from European wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) pomace by ethanolic extraction and subsequent concentration of polyphenols by column chromatography. The BE consisted of 24 ± 1 % anthocyanins (quantified as cyanidin-3-O-glucoside (cy-3-glc)). 15 single anthocyanins based on the five aglycons delphinidin (del), cyanidin (cy), petunidin (pt), malvidin (mv) and peonidin (peo) (Figure 1 supplement) and the three sugar residues glucose, galactose and arabinose in 3-O position. Further components were quercetin glycosides, phenolic acids, tannins, carbohydrates, fibers and traces of free anthocyanidins. Basic characterization of the BE's constituents was performed by Symrise (Holzminden, Germany). The BE was stored dry and dark at -24 °C.

Chemicals. All chemicals and solvents were of analytical grade or complied with the standards needed for cell culture experiments. Anthocyanin standards were obtained from three sources: cy-3-glc, delphinidin-2,5-O-diglucopyranoside (internal standard, IS) and cy were purchased from Extrasynthese (Genay Cedex, France); cy-3-gal, cy-3-ara, peo-3-glc, peo-3-gal, peo-3-ara, del-3-glc, pet-3-glc, and mal-3-glc were from Polyphenols (Sandes, Norway); del-3-gal, del-3-ara, pet-3-gal, pet-3-ara, mal-3-gal, and mal-3-ara were kindly provided by Michael Kraus (University of Wuerzburg, Germany). Protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid, PCA), phloroglucinol aldehyde (2,4,6-trihydroxybenzaldehyde, PGA), syringic acid (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid, SA), gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid, GA), *tert*-butylhydroquinone (*t*-BHQ), reduced/oxidized glutathione, glutathione reductase (GSR), 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and 5-sulfosalicylic acid (SSA) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Germany). NADPH was purchased from Fluka (Deisenhofen, Germany). HT29 cells were purchased from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), penicillin/streptomycin, trypsin and FCS (Fetal Calf Serum) were purchased from Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Cell culture flasks, petri dishes, centrifuge and microcentrifuge tubes were purchased from Sarstedt (Nuembrecht, Germany). Catalase was purchased from Carl Roth (Karlsruhe, Germany). Agarose, low and normal melting, was obtained from Bio Rad GmbH (Munich, Germany). The formamidopyrimidine-DNA-glycosylase (FPG) enzyme was provided by A.R. Collins (University of Oslo, Norway). All other chemicals and solvents used for analytical

purposes were of analytical grade. CDDO-imidazolide (CI) was kindly provided by M. Sporn (Dartmouth Medical School, Hanover, NH).

Human Intervention Study.

Subjects: Blood and urine samples were collected from five healthy female subjects (24 – 42 years old) at defined time points. Ileostomy effluents, blood and urine samples were provided by five healthy female subjects (29 – 50 years old) who had undergone colectomy with terminal ileostomy 7 – 12 years prior to the study (all suffered from Crohn's disease without involvement of the ileum). All volunteers were medically normal. None of them had taken antibiotics during preceding 4 weeks. Human intervention studies and subsequent amendments were approved by the local Ethics Commission of the University of Wuerzburg (no. 32/10). The ten volunteers gave their informed consent to participate in the study and agreed to avoid all foods that contain polyphenols 48 h before the study started.

Study design: After an overnight fasting period, all volunteers ingested 10 g BE stirred in 150 g yoghurt (1.5 % fat) directly before consumption. Subjects were allowed to drink water at desire. At 1 h post BE ingestion subjects were allowed to ingest one roll with artificial honey for breakfast. A light meal which did not contain polyphenols was served 4 h after BE intake.

Sample Collection. Venous blood samples were collected by trained personnel directly before ingestion (t = 0 h, baseline) and 1, 2, 4 and 8 h after BE intake in EDTA coated tubes and stored at 37 °C until processing.. Ileostomy fluid bags were collected directly before BE consumption (t = 0 h, baseline) and 1, 2, 4, 6 and 8 h after intake. The bags were immediately shock-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until further proceeding.

Ileostomy Fluid Preparation. Frozen ileostomy fluids were lyophilized (80 – 95 h) using a Christ Alpha 1-4 LSC (Osterode, Germany). The dry powder was carefully homogenized and three aliquots (30 mg) of each sample (n = 3) were extracted with 4 mL extraction solvent (87 %vol acetonitrile, 3 %vol water, 10 %vol formic acid) with an Ultraturrax (60 s, 20.000 × g). After extraction, samples were centrifuged (20 min, 25 °C, 4500 × g). Supernatants (being further diluted in solvent A if necessary) were mixed with internal standard and analyzed by HPLC-UV/Vis (see section HPLC-analysis). For recovery determination of sample preparation, a bilberry extract (Symrise GmbH & Co. KG, Holzminden, Germany) was added to a polyphenol-free ileostomy fluid, homogenized, frozen in liquid nitrogen, lyophilized and processed as described above. Mean recovery of anthocyanins was $101 \pm 5 \%$ (n = 3).

Quantification of Anthocyanins in BE and Ileostomy Fluids. Characterization and quantification of the anthocyanins present in the prepared ileostomy fluids was carried out chromatographically by reference method [1, 2] using a Jasco HPLC-UV system equipped

with a Jasco PU-2080 intelligent HPLC pump, a Jasco LG-2080-02 ternary gradient unit, a Jasco UV-2075 plus intelligent UV/VIS detector, a Jasco DG-2080-53 3-line-degaser and an AS-2055 plus intelligent sampler (Jasco, Gross-Umstadt, Germany). A Phenomenex Luna 3 μ C18 (2) 100 Å 250 x 4.60 mm column (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) equipped with a security guard column was used to separate the 15 anthocyanins. Solvent A contained 87 %vol acetonitrile, 3 %vol water and 10 %vol formic acid; solvent B contained 50 %vol acetonitrile, 40 %vol water and 10 %vol formic acid. The flow rate was 0.5 mL/min throughout, the detection wavelength was 520 nm, and the injection volume was 20 μ L at room temperature and an elution gradient consisting of 2 – 14 % B (0 – 20 min), 14 % B held (20 – 40 min), 14 – 15 % B (40 – 50 min), rising to 19 % B (50 – 55 min), then to 20 % B (55 – 65 min), and finally washing and reequilibration with 2 % B (65 – 75 min).

Identification and quantification of the anthocyanins was performed by comparing the retention times of the experimental samples with those of 15 authentic standards and with previously published data [3]. In addition, they were quantified as cy-3-glc equivalents. For quantification, pure cy-3-glc was dissolved in solvent A at concentrations ranging from 0.26 to 64 μ g/mL, and 10 μ g/mL of internal standard (IS, delphinidin-2,5-O-diglucopyranoside) was added. For calibration, the ratio of the area of the peak of anthocyanin to that of the IS was plotted against the ratio of the concentration of anthocyanin to the IS concentration. The linearity of calibration line was acceptable ($R > 0.999$). Limits of quantification (LOQ) and limits of detection (LOD) were defined as concentrations yielding signal-to-noise (S/N) ratios of 10:1 at 0.3 mg/L and 3:1 at 0.1 mg/L, respectively [4]. Coefficients of variation of repeated measurements were $< 6\%$ from run to run.

Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). PBMCs were isolated from blood samples by density centrifugation applying ready-to-use Ficoll solution (Histopaque®-1119, Sigma-Adrich, Steinheim, Germany). Therefore, 7 mL of the freshly collected human blood were layered on 7 mL Ficoll solution. Centrifugation was performed for 25 min at 400 x g without break. PBMC were isolated from the interphase between blood plasma and Ficoll solution. Cells were washed twice in 6 mL RPMI-1640 medium (37 °C) supplemented with 10 %vol FCS and finally washed in 1 mL PBS (4 °C). Centrifugation steps during washing were performed each at 250 x g for 10 min. PBMCs were stored in RNAlater buffer (Qiagen, Hilden, Germany) at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Q-PCR-Analysis of Nrf2-Dependent Gene Transcription in PBMC. Total RNA extraction from PBMC was performed using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's handbook. cDNA was synthesized from 500 ng total RNA by reverse transcription (QuantiTect® RT Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Q-PCR analysis was performed using 2.5 ng cDNA in the QuantiTect® SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). QuantiTect® Primer Assays (Qiagen, Hilden, Germany) were used targeting

following genes: β -actin (Hs_ACTB_1_SG, QT00095431), GAPDH (Hs_GAPDH_2_SG, QT01192646), HO-1 (Hs_HMOX1_1_SG, QT00092645), NQO1 (Hs_NQO1_1_SG, QT00050281) and Nrf2 (Hs_NFE2L2_1_SG, QT00027384). Primer concentrations were used according to the manufacturer's guidelines of the QuantiTect® SYBR Green handbook. qPCR conditions were according to the manufacturer's guidelines. Reactions were performed in duplicate. Transcript levels were quantified using the $\Delta\Delta C_q$ method with GAPDH as reference gene, normalized on the baseline (t = 0 h) = 100 %. No-template-controls (NTCs) were carried on a regular base and were steadily negative. PCR efficiencies for all primer assays used were tested and found to be in the range between 90 and 110 %.

Single Cell Electrophoresis (Comet Assay). Alkaline single cell gel electrophoresis (Comet assay) was performed according to [5-7]. Two aliquots of blood samples (6 μ L) of each proband at each time point were mixed with low-melting agarose (65 μ L), distributed onto agarose-coated microscope slide (two slides per proband and time point), pre-coated with a layer of normal-melting agarose (two gels per slide), cover-slipped and kept at 4 °C for solidification. After removing the cover glass, slides were immersed in a lysis solution overnight at 4 °C. After cell lysis, slides were washed three times (for 5 min) in enzyme buffer, drained and covered with 50 μ L of either enzyme buffer (one slide) or formamidopyrimidine-DNA-glycosylase (FPG enzyme, two slides) to differentiate between basic and total (basic + FPG-sensitive) DNA damage. The gels were sealed thereafter with a cover glass and incubated for 30 min at 37 °C. After DNA unwinding (pH 13.5, 20 min, 4 °C) horizontal gel electrophoresis (Bio-Rad Sub Cell GT, Munich, Germany) was carried out at 4 °C for 20 min (25 V, 300 mA, 0.89 V/cm) using a 300 power supply (Bio-Rad). The slides were washed three times with neutralization buffer (0.4 M, 5 min, pH 7.5) and stored for fixation 30 min in ethanol. For further evaluation stained with ethidium bromide (40 mL per gel, with a concentration of 10 μ g/mL) and examined microscopically with a Zeiss Axioskop 20 (Zeiss, Jena, Germany), equipped with a filter set 15 (excitation: BP 546/12; emission: LP 590). Slides were analyzed by computerized image analysis (Comet IV, Perceptive Instruments, Suffolk, UK), scoring 2 \times 50 images per slide (two gels per slide). DNA migration was expressed as mean tail intensity (TI %). Data are presented as basic DNA damage without FPG treatment and total DNA damage (basic strand breaks and DNA oxidation damage) with FPG treatment.

Glutathione Measurement (GSH). Total glutathione (tGSH), the sum of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were measured in whole blood by photometric determination of 5-thio-2-nitrobenzoate [7]. Fresh blood samples (0.1 mL) were added to 10 % 5-sulfosalicylic acid (SSA 0.4 mL) for protein precipitation, followed by shock-freezing and storage in liquid nitrogen until analysis. To measure GSH, samples were thawed, centrifuged (12000 \times g) and 10 μ L supernatants (final dilution: 1:50 in 5 % SSA) were added

to 190 μL of fresh reaction mix (containing 20 mM NADPH (4 μL), 6 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (20 μL) 50 U/mL glutathione reductase (2 μL) and phosphate buffer (164 μL)). The 5-thio-2-nitrobenzoate formation rate of samples and GSH standards (0 – 160 μM) were monitored in a microplate reader (MWGt, Sirius HT injector, 412 nm, MWG Biotech, Ebersberg, Germany) after 10 min. To measure GSSG, 250 μL supernatants (final dilution: 1:25 in 5 % SSA) and standards (0 – 40 μM) were reacted with 50 % triethanolamine (50 μL) and vinylpyridine (10 μL) for 1 h in a thermo mixer at 26 °C. Aliquots of 20 μL were assayed as described for tGSH determination. Each determination of tGSH and GSSG was performed in triplicate.

Cell Culture. Human colon carcinoma cells (HT29) and Chinese hamster ovary cells (CHO) were cultivated in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; 4500 mg/L glucose; 4.0 mM L-glutamine; without sodium pyruvate) supplemented with 10 %vol FCS and 1 %vol penicillin/streptomycin for not more than 15 passages. Cultivation and incubation of both cell lines were carried out in humidified incubators (37 °C, 5 % CO₂). Cells were regularly examined and found to be negative for mycoplasma contamination.

Determination of Gene Transcription *in vitro*. 600.000 HT29 cells were seeded in 5 cm petri dishes in 5 mL DMEM (supplemented with 10 %vol FCS and 1 %vol penicillin/streptomycin) and allowed to grow for 48 h. The initial culture medium was replaced by 5 mL DMEM containing the test compounds, CI (100 nM) or *t*-BHQ (200 μM) as positive controls, respectively, in presence of catalase (100 U/mL). After 20 h of substance incubation cells were rinsed with phosphate buffer. Total RNA isolation and q-PCR analysis of Nrf2-dependent gene transcription was performed as described above. Q-PCR reactions were performed in triplicate with an experiment repetition of 2 (cy-3-glc, PCA) or 4 (BE, PGA), respectively. Transcript levels of the tested genes were calculated using the $\Delta\Delta\text{C}_q$ -method with β -actin as reference gene, normalized on the solvent control (1 % DMSO) = 100 %.

Luciferase Reporter Gene Assay. For this, CHO cells stably transfected with an expression vector for the *Photinus pyralis* luciferase driven by the ARE of murine GSTA1 gene (pGL4.22[*luc2CP*/Puro] (Promega, Madison, WI)) and carrying an expression vector for enhanced green fluorescent protein (pEGF-N1; ClonTech, Mountain View, CA) as internal control were used.

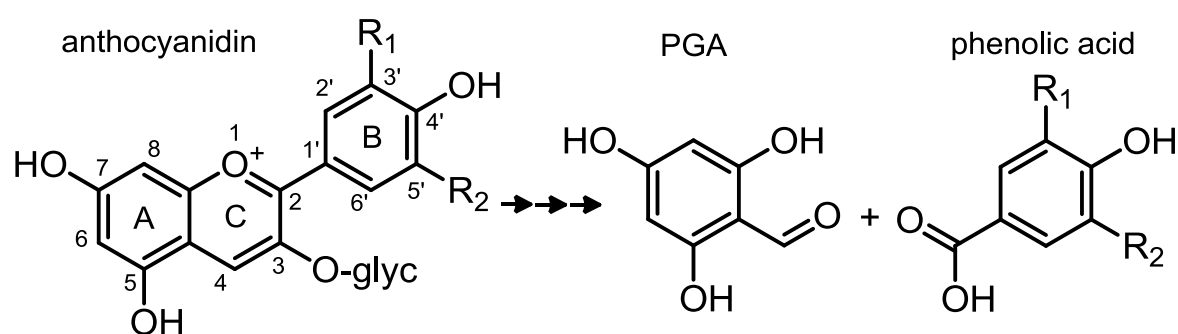
60.000 CHO/ARE-Luc cells in 100 μL DMEM (supplemented with 10 %vol FCS and 1 %vol penicillin/streptomycin) were seeded per well of a 96 well plate and allowed to attach for 4 h at 37 °C. Cells were then incubated with the test compounds and CI (100 nM) as a positive control [8] in presence of catalase (100 U/mL). After 20 h of incubation, incubation medium was removed and cells were rinsed twice with phosphate buffer. Cells then were frozen at -80 °C for at least 1 h. Subsequently 50 μL lysis buffer (no. E3971, Promega, Madison, WI) were added to each well and cells were disrupted by vigorous shaking for 10 min. 40 μL of

lysates were transferred into a black 96-well plate. Assessment of the luciferase activity was then performed with a TECAN GeniosPro plate reader using autoinjection for the tricine-ATP –buffer (5 mM ATP in 20 mM Tricin) and luciferin solution (1 mM luciferin in 20 mM tricine). Luminescence signals were recorded from each well, normalized to the EGFP-derived fluorescence (to account for differences in cell number) and related to the solvent control (1 % DMSO). Each test extract/compound was tested in quadruplicate in a minimum of three independent experiments.

Data Analysis. Students' *t*-test (two tailed) was used to confirm significant differences to either baseline or solvent control.

Figures

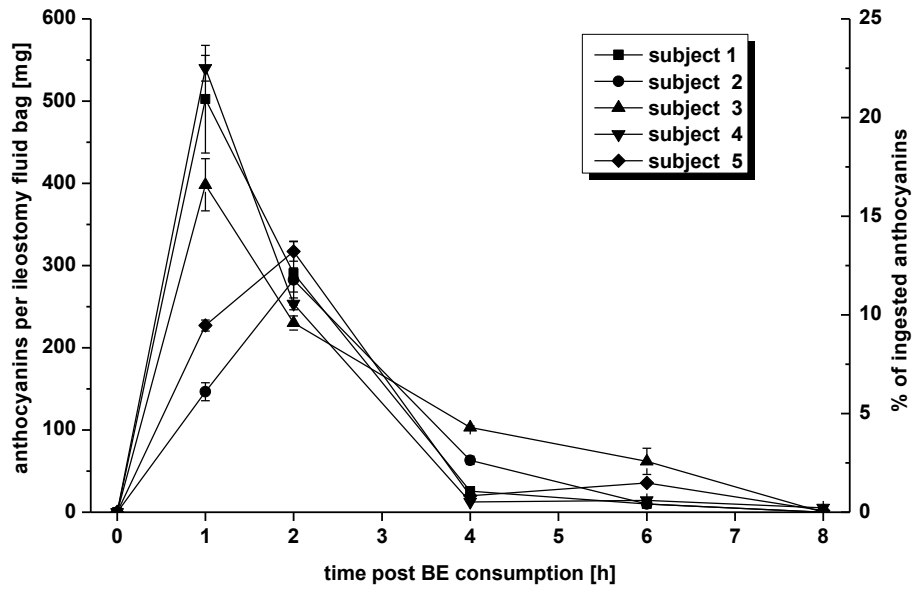
Figure 1



anthocyanidin	phenolic acid	substituent	
		-R ₁	-R ₂
delphinidin	gallic acid (GA)	-OH	-OH
cyanidin	protocatechuic acid (PCA)	-OH	-H
petunidin	3-O-methylgallic acid	-OH	-OMe
malvidin	syringic acid (SA)	-OMe	-OMe
peonidin	vanillic acid	-OMe	-H

Chemical structure and intestinal degradation of anthocyanidin glycosides (= anthocyanins) present in bilberry pomace extract (BE). Bilberry anthocyanidins are either linked to glucose, galactose or arabinose in 3-O position, respectively. PGA: Phloroglucinol aldehyde [9-11].

Figure 2



Ileostomy fluid anthocyanin quantities after consumption of 10 g bilberry pomace extract (BE). Anthocyanin time courses of the five individual ileostomy probands were quantified by HPLC-UV/VIS analysis as cy-3-glc equivalents. Values are means \pm SD of three determinations.

References

- [1] Muller, D., Schantz, M., Richling, E., High Performance Liquid Chromatography Analysis of Anthocyanins in Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and Corresponding Juices. *J Food Sci* 2012, 77, C340-345.
- [2] Oidtmann, J., Schantz, M., Mader, K., Baum, M., *et al.*, Preparation and Comparative Release Characteristics of Three Anthocyanin Encapsulation Systems. *J Agr Food Chem* 2012, 60, 844-851.
- [3] Kraus, M., Kahle, K., Ridder, F., Schantz, M., *et al.*, Colonic Availability of Bilberry Anthocyanins in Humans. *Acs Sym Ser* 2010, 1035, 159-176.
- [4] MacDougall, D., Crummett, W., Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry. *Anal Chem* 1980, 52, 2242-2249.
- [5] Singh, N. P., Mccoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., A Simple Technique for Quantitation of Low-Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp Cell Res* 1988, 175, 184-191.
- [6] Collins, A. R., Dusinska, M., Gedik, C. M., Stetina, R., Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Environ Health Persp* 1996, 104, 465-469.
- [7] Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., *et al.*, An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnol J* 2006, 1, 388-397.
- [8] Dinkova-Kostova, A. T., Liby, K. T., Stephenson, K. K., Holtzclaw, W. D., *et al.*, Extremely potent triterpenoid inducers of the phase 2 response: Correlations of protection against oxidant and inflammatory stress. *P Natl Acad Sci USA* 2005, 102, 4584-4589.
- [9] Seeram, N. P., Bourquin, L. D., Nair, M. G., Degradation products of cyanidin glycosides from tart cherries and their bioactivities. *J Agr Food Chem* 2001, 49, 4924-4929. 25
- [10] Keppler, K., Humpf, H. U., Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorgan Med Chem* 2005, 13, 5195-5205.

[11] Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., Kulling, S. E., Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr* 2006, 45, 7-18.

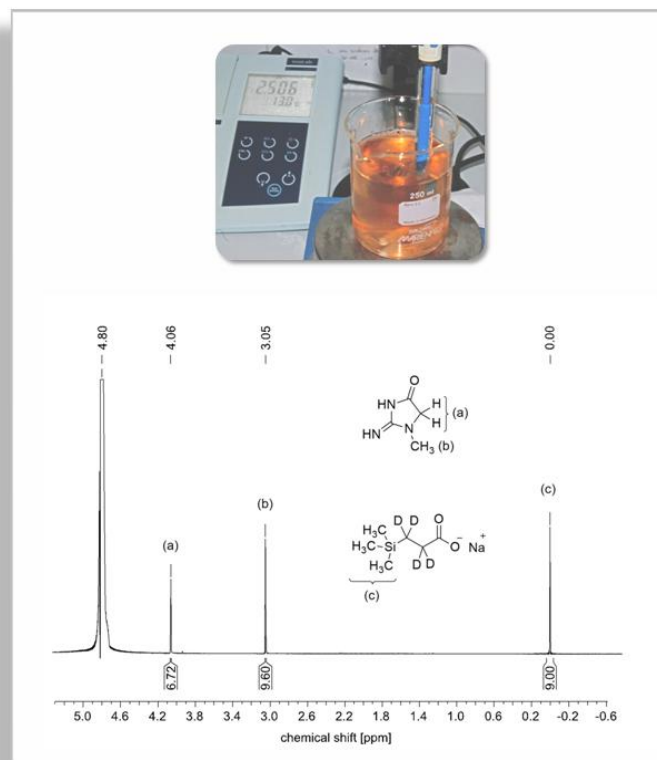
4.4 Methode zur Bestimmung von Kreatinin aus Urin mittels quantitativer ^1H - NMR Spektroskopie (Teil IV)

Konzept zur geplanten Veröffentlichung:

^1H -NMR basierte Methode zur Quantifizierung von Kreatinin in Urinproben von humanen Interventionsstudien'

^1H -NMR based method to quantify creatinine in urine samples from human intervention studies'

Dolores Mueller, Harald Kelm, Sebastian Ullrich, Angelika Noll, Elke Richling
(eingereicht)



4.4.1 Einleitung

In verschiedenen Interventionsstudien werden Urinproben zur Untersuchung bestimmter Biomarker gesammelt. Ein Problem der Ausscheidung von Wirksubstanzen über den Urin stellt deren Abhängigkeit zur ausgeschiedenen Urinmenge dar. Kreatinin ist ein Indikator der glomerulären Filtrationsrate der Niere (Syal et al., 2013) und dessen Ausscheidung korreliert mit der Muskelmasse von Probanden und ist unter normalen Bedingungen konstant. Kreatinin eignet sich somit zur Normierung der Urinausscheidung verschiedener Substanzen (Arndt, 2009). Eine weitverbreitete Methode zur Kreatininbestimmung ist die photometrische Methode nach Jaffé (Jaffe, 1886). Nachteile dieser Methode (Quantifizierung über Meidenheimer complex) können Interferenzen mit Urinmetaboliten wie z.B. Bilirubin, Glukose, Aceton und Anthocyanen darstellen. Somit sind zur Untersuchung von Urinproben, die solche Metabolite enthalten alternativen Methoden zur Kreatininbestimmung notwendig.

4.4.2 Zielsetzung der Studie

Nach Verzehr eines anthocyanreichen HBE wurden im Rahmen der Studie Teil I und Teil II Urinproben von Probanden gesammelt und auf einen pH von 2,5 eingestellt. Der Verzehr von Anthocyanen bewirkte eine Rotfärbung des Urins. Eine photometrische Bestimmung von Kreatinin nach Jaffé war aufgrund Interferenzen nicht möglich. Daher wurde es zum Ziel dieser Studie (Teil IV) eine einfache Methode zur Kreatininbestimmung mittels quantitativer $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie zur Untersuchung anthocyanhaltiger Urinproben zu etablieren.

4.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Konzentrationen von Kreatinin der Urinproben wurden durch Zugabe eines internen Standard (TSP: d_4 -Natriumtrimethylsilylpropionat) mittels $^1\text{H-NMR}$ Spektroskopie quantifiziert. Kreatinin zeigt zwei spezifische Signale bei einer chemischen Verschiebung von 3 ppm (CH_3^-) und 4 ppm. Es stellte sich heraus, dass das Signal bei einer chemischen Verschiebung von 3 ppm besser zur Quantifizierung im Gegensatz zum Signal bei 4 ppm geeignet war. Der Vergleich der Kreatininbestimmung von Urinproben (frei von Anthocyanen) mittels $^1\text{H-NMR}$ und der photometrischen Bestimmung nach Jaffé zeigte lediglich eine Abweichung beider Methoden von $4 \pm 2\%$.

4.4.4 Fazit

Die Studie liefert eine Methode zur Bestimmung von Kreatinin für anthocyanreiche Urinproben über die $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie. Ein Vorteil dieser Methode ist die vereinfachte

Probenvorbereitung und Durchführung der Messung. Weiterhin wird die ermittelte Kreatininkonzentration nicht durch mögliche Interferenzen etwaiger Störkomponenten des Urins im Vergleich zur photometrischen Bestimmung beeinträchtigt.

4.4.5 Manuskript zur geplanten Veröffentlichung

¹H-NMR based method to quantify creatinine in urine samples from human intervention studies

Dolores Mueller¹, Harald Kelm², Sebastian Ullrich¹, Angelika Noll¹, Elke Richling ^{1*}

¹Department of Chemistry, Division of Food Chemistry and Toxicology, University of Kaiserslautern, Erwin-Schroedinger-Str. 52, D-67663 Kaiserslautern, Germany

²Department of Chemistry, Division of Inorganic Chemistry, University of Kaiserslautern, Erwin-Schroedinger-Str. 52, D-67663 Kaiserslautern, Germany

Corresponding author

* Prof. Dr. Elke Richling

Tel +49 631 205 4061; Fax +49 631 205 3085;

E-Mail: richling@chemie.uni-kl.de;

Keywords: creatinine, ¹H-NMR, urine, human interventions, anthocyanins

Summary

To overcome problems arising from the coloration of urine samples and the limitations of the picric acid method when determining creatinine in urine, we have established an alternative method using $^1\text{H-NMR}$. The method is practically straightforward, provides good recoveries, and has a similar precision to the standard procedure based on the Jaffé reaction for urine samples without interfering components.

Introduction

Many intervention studies involve collecting urine samples and analyzing their contents of selected biomarkers. However, the measured concentrations of excreted pharmaceuticals and other analytes can vary due to variation in urinary volumes. This problem can be overcome by simultaneously determining the samples' contents of creatinine and normalizing the levels of the other analytes against that of creatinine [1]. The level of creatinine in the urine is an indicator of the glomerular filtration rate and kidney function [2], and its excretion correlates with the volunteers' muscle mass, which is usually constant. If the amount of creatinine released per day is known, urine samples collected at different intervals can be normalized based on their creatinine contents, concentrations, and volume [3]. The first method for quantifying creatinine was reported by Jaffé in 1886 [4]. In 1914, Otto Folin reported a colorimetric method for quantifying the creatinine content of a urine sample by treating it with alkaline picrate to form an orange-colored Meisenheimer complex [5]. Over the last 130 years, this method has been widely used to determine creatinine in urine, plasma, and serum samples. More recently, kits using 96-well plates have been developed, making it possible to quickly and easily determine creatinine levels in multiple samples simultaneously. Unfortunately, because this method relies on photometric determination of the Meisenheimer complex at 490-530 nm, it is subject to interference caused by various compounds including urinary metabolites [2,6-8]. For example, certain antibiotics and biomolecules such as bilirubin, glucose and acetone reportedly interfere with the Jaffé method [9], leading to false positive results. In addition, the method is not applicable to some colored urine samples. Such samples may be produced by individuals who have recently ingested and excreted colored food components that absorb in the same range as the Meisenheimer complex, such as anthocyanins from red-colored fruits and vegetables [10]. An alternative way of determining the creatinine content of such samples is to use LC-MS. We have developed a reliable HPLC-MS/MS method using an isotopically labeled standard for this purpose [11], but these analyses are costly to perform. Therefore, we sought to develop a fast and less expensive $^1\text{H-NMR}$ method for quantitative determination of creatinine in urine samples.

Materials & Methods

Chemicals

Deuterium oxide (99,96 atom % deuterium), 3-trimethylsilyl propionic acid-2,2,3,3-d₄ (TSP, deuteration degree $\geq 98\%$), reference creatinine (anhydrous, purity $\geq 98\%$), picric acid (purity $\geq 98\%$), and sodium chloride were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany).

¹H-NMR measurements of creatinine

Stored urine samples (-80 °C) were thawed in a water bath at 37 °C (Köttermann, Uetze, Germany). The reference TSP was weighed on a high precision scale (XP6U Mettler Toledo, Germany) and then dissolved in deuterium oxide to produce a standard solution ($c = 0.5\text{ mg/ml TSP}$; 75.3 mg TSP in 150.6 ml D₂O). A 1.5 ml vial (Eppendorf, Hamburg, Germany) was charged with 400 μl urine and 400 μl of the TSP standard solution, which were mixed thoroughly and stored at 4 °C. The mixed solution was then transferred to an NMR tube and stored at 4 °C prior to analysis.

The samples were analyzed in duplicate by ¹H NMR at 600 MHz (Avance, Bruker, Karlsruhe, Germany). A water suppression technique was used because of the samples' high water content.

The acquired spectra were evaluated using the Bruker Topspin software package. First, the chemical shift of TSP was set to 0 ppm. Then, the creatinine signal at 3 ppm was used for quantification by comparing the integral of the 3 ppm creatinine peak to that of the TSP peak. Specifically, the concentration of TSP ($M = 172.27\text{ g/mol}$) was known to be 0.5 mg/ml, which corresponds to a molar concentration of 2.9024 $\mu\text{mol/ml}$. The equivalent mass concentration of creatinine ($M = 113.2\text{ g/mol}$) is 0.3284 mg/ml. However, TSP contains 9 hydrogen atoms whereas creatinine has 3, so the mass concentration of creatinine in the sample is equal to the three times the product of 0.3284 mg/ml and the ratio of the creatinine signal integral to the TSP integral.

Photometric quantification

The spectrophotometric determination of creatinine is based on the formation of a colored complex via the Jaffé reaction (Folin, 1914; Jaffe, 1886). Urine samples (without any of the previously mentioned interfering substances) were diluted 1:4 with bidistilled water. Then, 1000 μl of picric acid solution (9.0 g NaCl, 1.31 g picric acid in 1 l water) was added to 400 μl of diluted urine and mixed in a cuvette. To start the reaction, 400 μl of sodium hydroxide solution (1 molar) was added. The absorption of the Meisenheimer complex was measured at 510 nm using a UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu, Duisburg, Germany). The sample's extinction was measured after 10 and 60 seconds, and the difference between the two values was calculated and used for creatinine determination. Urine samples were analyzed in duplicate, and the range of the calibration curve was 30 to 1100 μM creatinine ($R^2=0,99$).

Validation of the $^1\text{H-NMR}$ -method

To check the linearity of the quantification method, creatinine solutions in deuterium oxide were prepared at three concentrations (0.5, 1.0 and 1.5 mg/ml), mixed with TSP (0.5 mg/ml), and analyzed by $^1\text{H-NMR}$. The recovery of the measurements was $105 \pm 2\%$ and a linear regression yielded an R^2 value of 1. Furthermore, the recovery of creatinine in the urine samples was determined by the addition of a creatinine standard. First, the endogenous urine content was measured, and found to be 0.14 mg/ml. Then, exogenous creatinine (at a final concentration of 0.5 mg/ml) was added to the urine sample, and its creatinine concentration was measured again, yielding a value of 0.65 mg/ml, which was 102% of the expected concentration. Finally, the precision of the quantitative $^1\text{H-NMR}$ method was compared to that of the Jaffé reaction by using both methods to determine the creatinine contents of 10 different urine samples in duplicate. The average deviation between the two methods was $4 \pm 2\%$ (see Table 1).

Results

Because creatinine is a major constituent of urine and produces two characteristic NMR signals, the method presented here is a good alternative to existing methods for quantitating creatinine in urine samples. Figure 1 shows the ^1H -NMR spectrum of the creatinine standard in deuterium oxide (A) and the spectrum of a urine sample (B). The creatinine peaks in the 600 MHz ^1H -NMR spectra of the urine samples were assigned unambiguously by comparison to the spectra of the standard. The quantification of creatinine in urine samples by ^1H -NMR requires the addition of an internal standard to the studied sample. This standard should be chemically stable under the assay conditions, not present in urine naturally, and have a chemical shift that is not disturbed by other compounds present in urine. The standard used in this work, i.e. the sodium salt of d_4 -trimethylsilyl propionic acid (3-trimethylsilyl propionic acid-2,2,3,3- d_4 , TSP), satisfies all these criteria. The chemical shift of the trimethylsilyl group protons of TSP was arbitrarily set to 0 ppm (see figure 2), and defined quantities of the standard were added to each urine sample to be analyzed. Creatinine gave rise to two NMR signals, one at 3 ppm (CH_3 -) and another at 4 ppm (see Figure 2). By comparing the integral of the 3 ppm signal to that of the TSP trimethylsilyl group, it was possible to calculate the creatinine content of the samples with some differences in signal intensity. Recovery experiments using defined amounts of creatinine (0.5 to 1.5 mg/ml) and 0.5 mg/ml TSP gave recovery rates of $105 \pm 2\%$ for the signal at 3 ppm and $110 \pm 1\%$ for the signal at 4 ppm (see figure 3). The greater recovery for the 4 ppm signal may be due to complications caused by the water signal at 5-4.6 ppm. Consequently, the 3 ppm signal was used preferentially for quantification. The method was validated by analyzing one solution containing only urine and TSP, and another containing TSP and creatinine. A satisfactory recovery of 102 % was achieved in these experiments. The results of the ^1H -NMR method were comparable with the standard Jaffé method. The deviation between the two methods was only $4 \pm 2\%$.

Discussion

To date, the picric acid assay has been the preferred method for quantifying creatinine in urine samples from human intervention studies because it is a convenient and easily performed colorimetric method. Unfortunately, it is not applicable to samples that are colored red because of compounds such as anthocyanins and their metabolites, which absorb in the same wavelength as the Meisenheimer complex formed in the assay. Therefore, the $^1\text{H-NMR}$ method presented in this work was developed to quantify creatinine in urine samples from a human intervention study involving the ingestion of an anthocyanin-rich bilberry extract (Mueller et al., 2017). The method has the advantage of being easy to perform and requiring almost no sample preparation.

Acknowledgement

We want to thank Prof. Hans-Joerg Krueger for supporting us with his knowledge and with his NMR apparatus.

References:

- [1] M.F. Boeniger, L.K. Lowry, J. Rosenberg, Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 54 (1993) 615-627.
- [2] K. Syal, D. Banerjee, A. Srinivasan, Creatinine estimation and interference, *Indian J. Clin. Biochem.* 28 (2013) 210.
- [3] T. Arndt, Urine-creatinine concentration as a marker of urine dilution: reflections using a cohort of 45,000 samples, *Forensic Sci. Int.* 186 (2009) 48-51.
- [4] M. Jaffe, Methods determining creatinine. *Physiol. Chem.* 10 (1886) 39-40.
- [5] O. Folin, On the determination of creatinine and creatine in urine, *J. Biol. Chem.* 17 (1914) 469-473.
- [6] S. Durham, A. Bignell, R. Wise, Interference of cefoxitin in the creatinine estimation and its clinical relevance, *J. Clin. Pathol.* 32 (1979) 1148-1151.
- [7] M. Hyncek, R. Berardi, R. Johnson, Interference of cephalosporins and cefoxitin with serum creatinine determination, *Am. J. Health-Sys. Pharm.* 38 (1981) 1348-1352.
- [8] M. Kroll, L. Nealon, M. Vogel, R. Elin, How certain drugs interfere negatively with the Jaffé reaction for creatinine, *Clin. Chem.* 31 (1985) 306-308.
- [9] P.H. Lolekha, S. Jaruthunyaluck, P. Srisawasdi, Deproteinization of serum: another best approach to eliminate all forms of bilirubin interference on serum creatinine by the kinetic Jaffe reaction, *J. Clin. Lab. Anal.* 15 (2001) 116-121.
- [10] D. Mueller, K. Jung, M. Winter, D. Rogoll, R. Melcher, E. Richling, Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries, *Food Chem.* 231 (2017) 275-286.
- [11] N. Watzek, M. Baum, F. Berger, O. Doroshenko, J. Feld, U. Fuhr, D. Tomalik-Scharte, G. Eisenbrand, E. Richling, Dietary exposure to acrolein may largely exceed that to acrylamide: monitoring of mercapturic acids in human urine after consumption of potato crisps, *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (2012) 1825-1837.

Figures

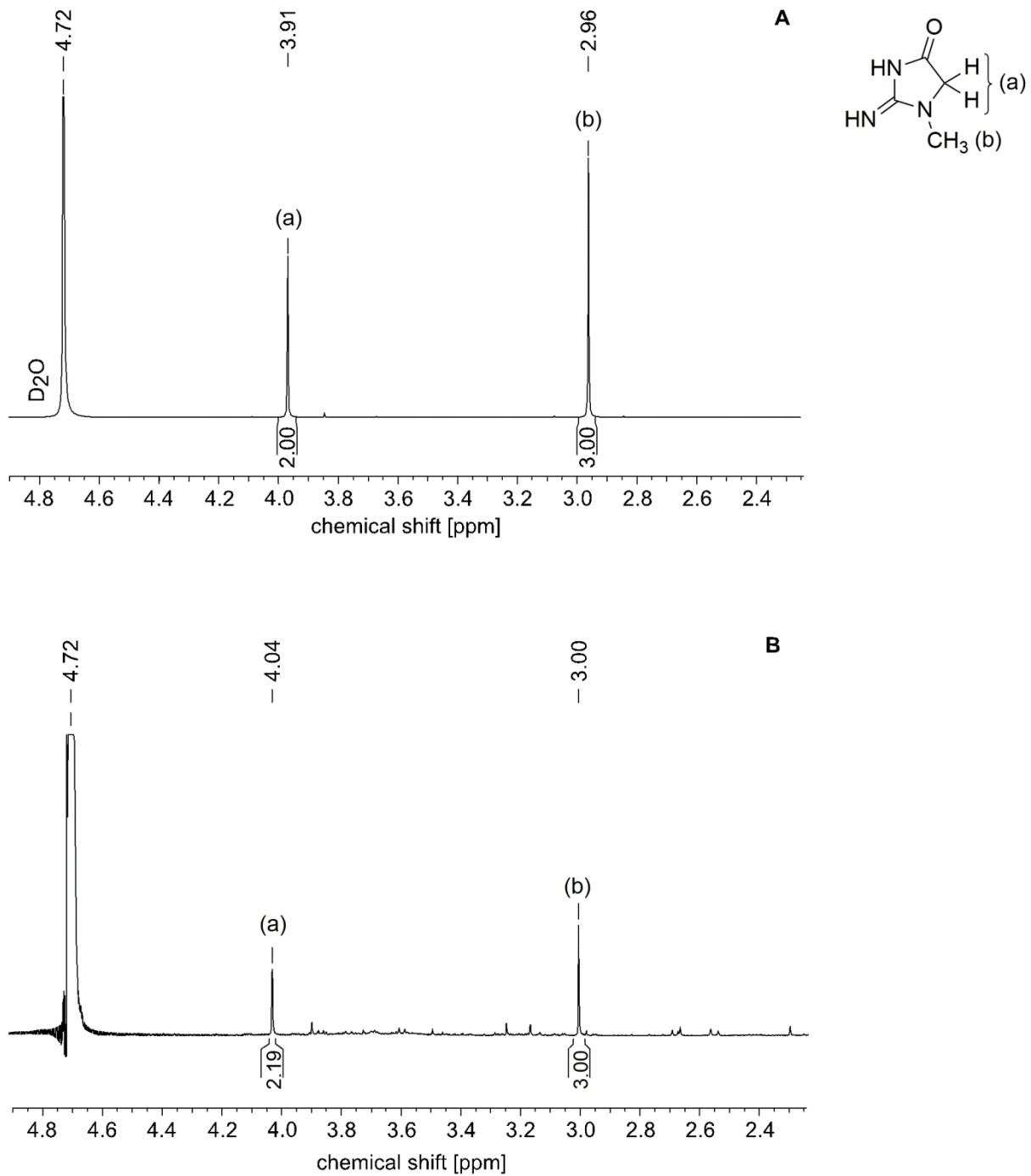


Figure 1:

A: ¹H-NMR spectrum of creatinine in deuterium oxide (1 mg/ml) and **B:** ¹H-NMR spectrum of urine sample at 600 MHz with water suppression.

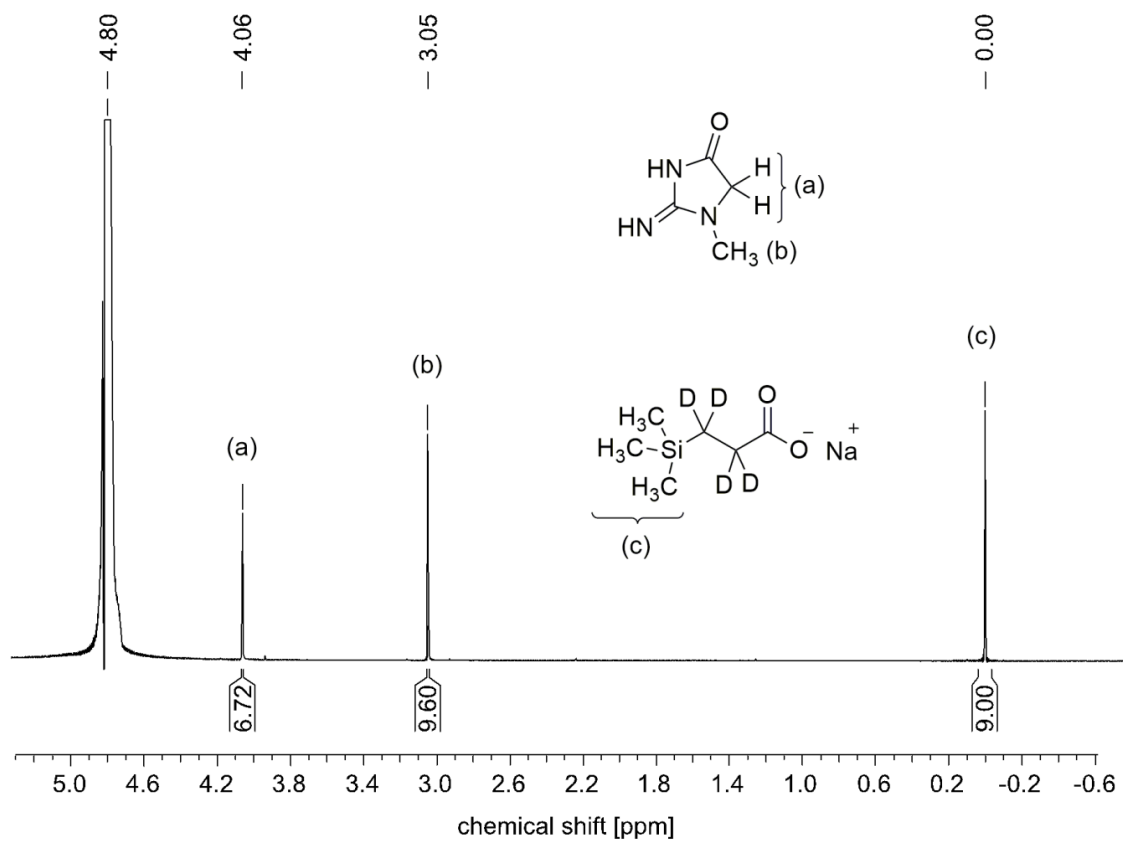


Figure 2:

¹H-NMR spectrum of urine (600 MHz, water suppression) with added standard TSP (0 ppm) for quantification of creatinine concentration.

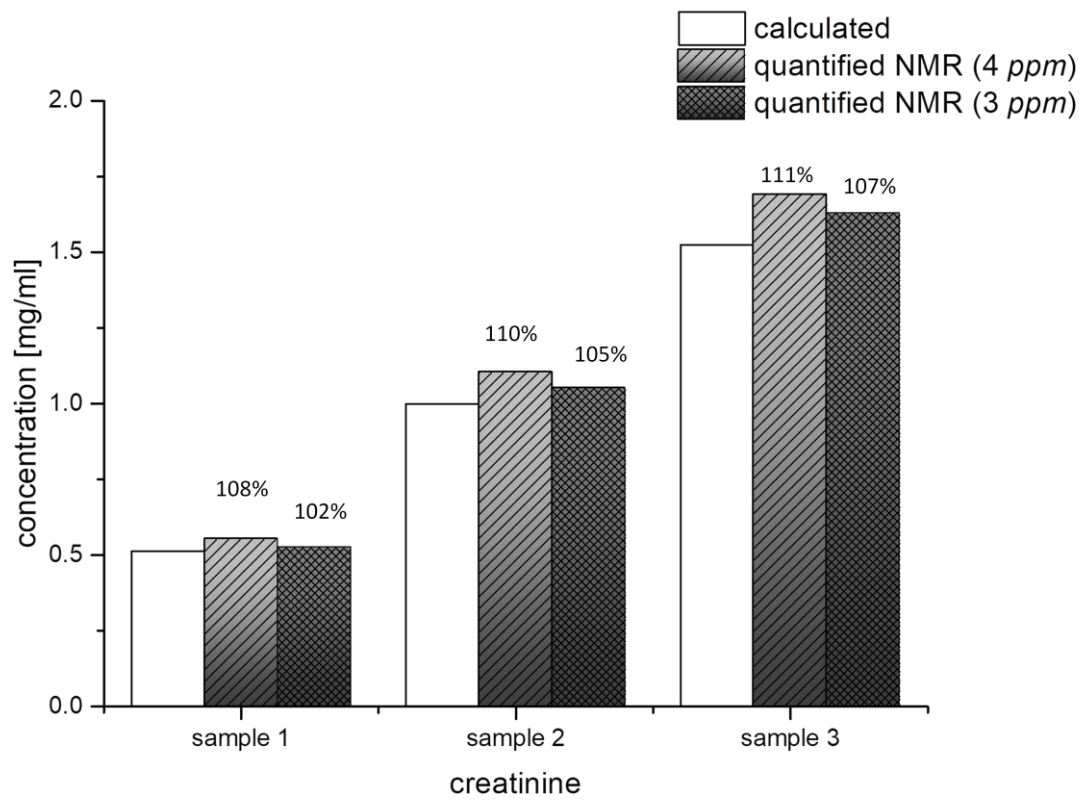


Figure 3:

Quantification of creatinine in urine samples (0.5, 1.0, 1.5 mg/ml) depending on proton signaling at 3 ppm and 4 ppm.

Table 1:

Determination of creatinine amounts in urine samples with quantitative $^1\text{H-NMR}$ and Jaffé reaction.

sample	$^1\text{H-NMR}$ creatinine [mg/ml]	Jaffé creatinine [mg/ml]	SD
1	0.15	0.15	/
2	0.30	0.31	0.01
3	0.32	0.30	0.02
4	0.33	0.32	0.01
5	0.35	0.37	0.02
6	0.44	0.44	/
7	0.87	0.92	0.05
8	1.31	1.35	0.04
9	1.38	1.44	0.06
10	1.69	1.78	0.09

5. Diskussion

5.1 Bioverfügbarkeit von Anthocyanen

Betrachtet man die Elimination intakter Anthocyane über den Urin in Humanstudien, so liegt in den meisten Untersuchungen die Konzentrationen unter 1% bezogen auf die Ausgangsmenge an Anthocyanen (Tabelle 5, 13) (Felgines et al., 2003; Felgines et al., 2005; Fernandes et al., 2015; Gonzalez-Barrio et al., 2010; Mueller et al., 2017; Wiczowski et al., 2010). Die geringe Bioverfügbarkeit von Anthocyanen begründet sich teilweise durch die Polarität der Flavylumkationstruktur und eine limitierende pH Stabilität, die eine Resorption der Anthocyane im Vergleich zu anderen Polyphenolen erschwert (Manach et al., 2005).

Zur Beurteilung der Bioverfügbarkeit von Anthocyanen im Menschen eignet sich vor allem die prozentuale Angabe der im Plasma detektierten Gehalte und über den Urin eliminierten Konzentrationen bezogen auf die verzehrte Menge an Ausgangsanthocyane. In vielen Studien werden allerdings nur absolute Werte angegeben (Del Bo et al., 2010; Milbury et al., 2010), wodurch ein Vergleich verschiedener Studien untereinander erschwert wird. Aufgrund der bekannten geringen Bioverfügbarkeit (Felgines et al., 2003; Felgines et al., 2005; Gonzalez-Barrio et al., 2010; Wiczowski et al., 2010) wurde in der aktuell vorliegenden Studie eine etwa 5-40-fach erhöhte Konzentration *ab initio* an Gesamtanthocyanen gewählt, um den oft beschriebenen Problemen der absoluten Gehalte unterhalb der Quantifizierungs- und Detektionsgrenze der analytischen Methode entgegen zu wirken.

Tabelle 13: Übersicht ausgewählter Bioverfügbarkeitsstudien mit Anthocyanen.

Anthocyanquelle	Verzehrte Anthocyane	Ausscheidung (Urin)	Anzahl Probanden	Literatur
Erdbeere (<i>Fragaria</i>)	78 mg	1,8 %	N = 6	<i>Felgines et al., 2003</i>
Brombeere (<i>Rubus</i>)	431 mg	0,16 %	N = 5	<i>Felgines et al., 2005</i>
Himbeere (<i>Rubus Idaeus</i>)	92 mg	< 0,1%	N = 10	<i>González-Barrio et al., 2010</i>
Aroniasaft (<i>Aronia Melanocarpa</i>)	56 mg	0,25 %	N = 13	<i>Wiczowski et al., 2010</i>
Heidelbeere (<i>Vaccinium Myrtillus</i>)	2400 mg	0,03 %	N = 5	<i>Mueller et al., 2017</i>

Die Bioverfügbarkeit der Anthocyane, ermittelt in den Urinproben über 24 Stunden (gesunde Probanden mit Kolon), liegt bei $0,03 \pm 0,02\%$ und ist sehr gering. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch die untersuchten Plasmaproben. Hier zeigt sich eine Verfügbarkeit an Antho-

cyanen von 0,02%. Diese wurde über 8 Stunden nach HBE-Aufnahme bezogen auf ein Gesamtvolumen von 2-3 Liter Plasma ermittelt. Als Hauptkomponenten sind sowohl in den Urin- wie auch Plasmaproben die glucuronierten Formen von Malvidin (28%) und Peonidin (46%) identifiziert worden. Obwohl die glykosilierten Aglyka Delphinidin, Cyanidin und Petunidin in höheren Mengen im Anfangsextrakt vorlagen, wiesen diese geringere Konzentrationen nach deren Verzehr im Plasma auf. Eine Erklärung für diesen Trend können Metabolismusreaktionen wie verstärkte Dehydroxylierung und Methylierung im Organismus sein (Cooke et al., 2006; Fernandes et al., 2014; Pojer et al., 2013). Weiterhin zeigen Studien, dass die Resorption von Anthocyanen von der Polarität der Aglyka (Felgines et al., 2003; Felgines et al., 2005) und der gebundenen Zuckerkomponente (Mülleider et al., 2002) beeinflusst wird. So zeigte Felgines et al. eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit für aufgenommenes Pel-3-glc (1,8%) im Vergleich zu stärker polarem Cy-3-glc (Bioverfügbarkeit 0,16%) (Felgines et al., 2003; Felgines et al., 2005). Dies begründet, warum die polaren Anthocyane des Ausgangsextraktes im Plasma weniger zu finden sind, als die lipophileren Strukturen.

5.1.1 Bildung von Anthocyanabbauprodukten *in vivo*

Die Untersuchungen von Czank et al. zeigten exemplarisch, wie vielfältig der Abbau und Metabolismus von Anthocyanen *in vivo* erfolgen kann (Czank et al., 2013). Werden diese zusätzlichen Metabolite mit geeigneten analytischen Methoden erfasst und zur Berechnung der Bioverfügbarkeit berücksichtigt, zeigt sich eine relative Bioverfügbarkeit anthocyan-assoziierten Strukturen von bis zu 12%. Dies verdeutlicht das Ausmaß *in vivo* gebildeter und resorbierter Abbauprodukte im Vergleich zu resorbierten intakten Anthocyanen (Kay et al., 2017; Lila et al., 2016). Neben Phase II Metaboliten, den bekannten Phenolcarbonsäuren und Phloroglucinolaldehyd sind auch weitere Phenolderivate wie Phenylalkohole, Phenylaldehyde, Phenylelessigsäuren und Phenylpropionsäuren beschrieben, die wiederum weiteren Metabolismusreaktionen unterliegen können (Czank et al., 2013; Czank et al., 2012; Mueller et al., 2017; Nurmi et al., 2009). Diese Metaboliten werden *in vivo* aus verschiedenen Strukturen gebildet und können nicht immer eindeutig auf Anthocyane zurückgeführt werden. Die Phenylpropionsäuren wie z.B. Ferulasäure und *p*-Cumarsäure können durch andere Polyphenolquellen oder Getreideprodukte resultieren (Mattila et al., 2005). Auch Hippursäure (Glycin-konjugierte Benzoesäure), die bei Czank et al. als Hauptabbauprodukt der Anthocyane beschrieben wird, kann aus einer Vielzahl von phenolischen Verbindungen gebildet werden (Czank et al., 2013). Somit eignen sich die meisten Metaboliten und Abbauprodukte für die spezifische Exposition von Anthocyanen nur, wenn die Ausgangsanthocyane eine bestimmte Isotopenmarkierung tragen. Nur dadurch sind eindeutige Rückschlüsse zur Herkunft der gebildeten Abbauprodukte möglich.

Da im Rahmen dieser Arbeit keine isotoopenmarkierten Einzelsubstanzen vorlagen, sondern ein Heidelbeerextrakt als komplexe Anthocyanquelle ausgewählt wurde, erfolgte die Auswahl der untersuchten Abbauprodukte (Phenolcarbonsäuren und Phenylaldehyde) bezüglich bestmöglicher Anthocyanpezifität und bis dato bekannter Verbindungen (Cooke et al., 2006; Felignes et al., 2010; Fleschhut et al., 2006; Nurmi et al., 2009; Stalmach et al., 2012) (Abbildung 21).

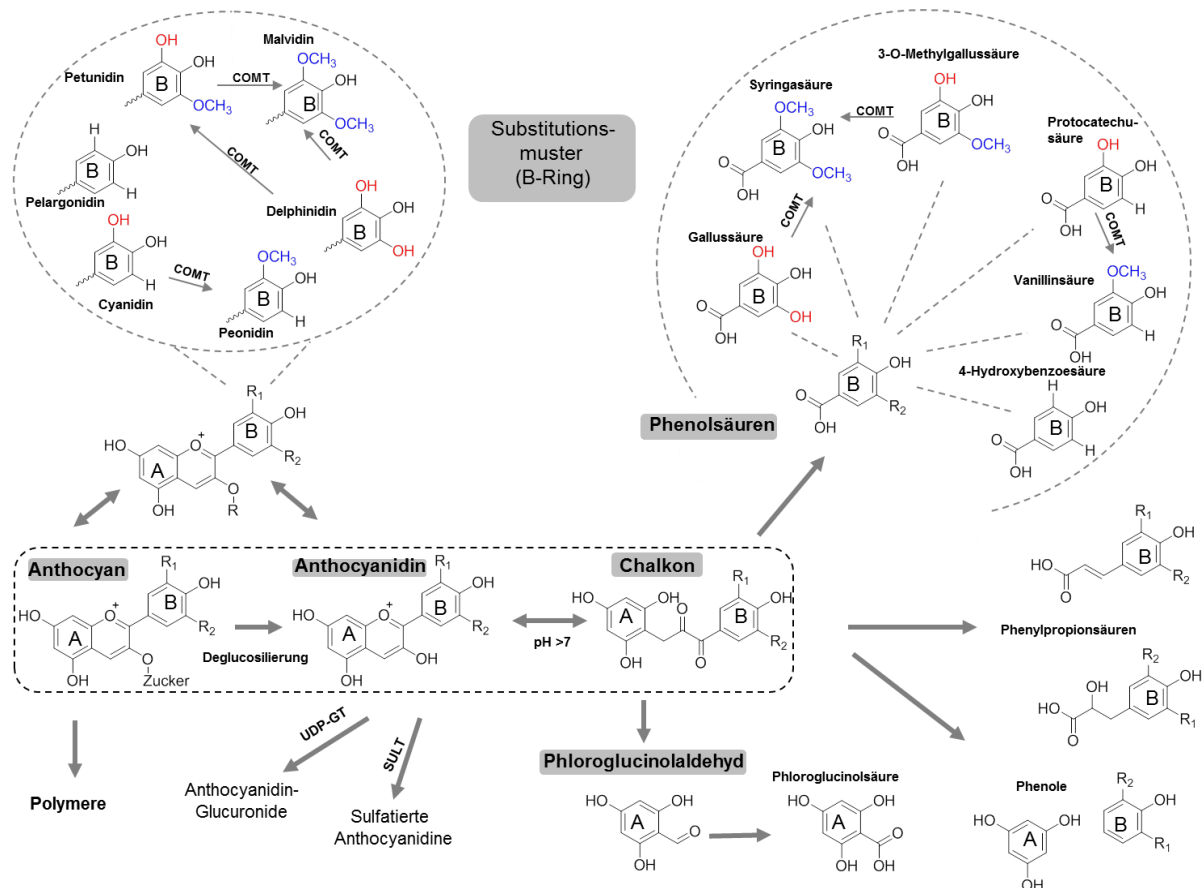


Abbildung 21: Überblick des literaturbekannten Metabolismus und Abbaus von Anthocyanen aus Heidelbeere (modifiziert nach Cooke et al. 2006, Felignes et al. 2010, Fleschhut et al. 2006, Nurmi et al. 2009, Stalmach 2012) (UDP-GT: Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase, SULT: Sulfotransferase, COMT: Catechol-O-methyltransferase).

5.1.2 Verfügbarkeit von verzehrten Anthocyanen und Bildung von Abbauprodukten im Dünndarm

Anthocyane erreichten innerhalb 1 h nach HBE-Verzehr den Dünndarm und sind in diesem pH Milieu (pH 6-8) bedingt stabil. Entlang der Magen-Darmpassage sind zwischen 30-50% der verzehrten Anthocyane zu finden (Kraus et al., 2010; Mueller et al., 2017; Wu et al., 2006b). Da die geringe Bioverfügbarkeit bekannt war, stellte sich die Frage, was mit den fehlenden 50-70% nach der Einnahme erfolgt. Im Magen bei einer sauren pH-Umgebung erwiesen sich Anthocyane als sehr stabil (Schantz et al., 2014). Der Eintritt in den Darm führt zu einer abrupten pH-Änderung, was die Stabilität von Anthocyanen nachteilig beeinflussen kann (Kay, 2006; McGhie & Walton, 2007). In welchen Mengen Anthocyane im Dünndarm abgebaut werden, ist bislang nicht bekannt. Diese Analyse kann einen Aufschluss geben, wie die zuvor verzehrten intakten Anthocyane entlang der Darmpassage ihrem Abbau unterliegen. Um den Verbleib der Anthocyane zu überprüfen, untersuchten wir erstmals die Anwesenheit von Phenolcarbonsäuren und Phenolaldehyde in Ileostomaflüssigkeit nach HBE-Konsum.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Gesamtmengen an Abbauprodukten über 8 Stunden nur einem Fünftel der Ausgangsanthocyane entsprachen. Anthocyane werden im Dünndarm also teilweise in den A- und B-Ring gespalten. Die untersuchten Metabolite klären aber nicht den vollständigen Verbleib der Anthocyane. Anthocyane müssen entlang der gastrointestinalen Passage in verschiedenen Strukturen vorliegen. Neben weiteren bekannten Abbauprodukten, die bereits in Plasma- und Urinproben nachgewiesen werden konnten (Czank et al., 2013), wären auch die deglycosilierten Anthocyanidine und Chalkone möglich. Das Ausmaß über deren Existenz im Darm wurde bisher nicht beschrieben, da der Nachweis von Chalkonen und Anthocyanidinen aufgrund ihrer chemischen Instabilität beträchtliche analytische Herausforderungen darstellt (Kalt et al., 2014). Die Art und Weise, mit der diese Verbindungen *in vivo* mit anderen Molekülen reagieren und die Effekte der Co-Pigmentierung oder Assoziation mit anderen Molekülen des Darminhaltes, der Matrix oder des Gewebes, bleiben ebenso unbeantwortet. Anthocyane und ihre Aglyka können in wässriger Lösung Co-Pigmente (Eiro & Heinonen, 2002) kovalente Komplexe z.B. mit anderen Polyphenolen und Metallkomplexe (Cavalcanti, Santos, & Meireles, 2011) bilden, wobei die Bedeutung *in vivo* nicht bekannt ist. Dass Anthocyane und Abbauprodukte mit Plasmaproteinen assoziieren können, zeigt eine bisherige Studie (Soares et al., 2007) und erste eigene Ergebnisse im Rahmen der Diplomarbeiten von Ruenz (Ruenz, 2013) und Denzer (Denzer, 2014). So konnte die Bestimmung der intrinsischen Fluoreszenzintensität von Protein-Tryptophan-Resten die Bindungsaffinität von Anthocyanen und deren Abbau-

produkten zu humanem Serumalbumin nachweisen (Diplomarbeit Meike Ruenz, Diplomarbeit Stefanie Denzer).

5.1.3 Verfügbarkeit von Anthocyanabbauprodukten in der Blutzirkulation und deren Urinausscheidung

Die gegenwärtige Forschung zeigt, dass Abbauprodukte und Metabolite in signifikanten Mengen in Blut und Urin nach Aufnahme von Anthocyanen auftreten und eine wichtige Bedeutung für die Beurteilung der gesamten Bioverfügbarkeit darstellt (Czank et al., 2013; Ferrars et al., 2014; Kay et al., 2017; Lila et al., 2016). Unsere Ergebnisse zeigen, dass Abbauprodukte im Verhältnis zu Anthocyanen im Plasma bis zu 20-mal und im Urin bis zu 38-mal höher vorliegen und die bisherigen Ergebnisse von Czank et al. damit bekräftigt (Czank et al., 2013). Die Bildung von Abbauprodukten findet sehr schnell statt. Die maximalen Konzentrationen (t_{max}) traten im Plasma bereits innerhalb der ersten Stunde nach HBE-Verzehr auf, gefolgt von einer schnellen Eliminierung über den Urin mit maximalen Werten zwischen 0 bis 4 Stunden. Syringasäure und Vanilinsäure, die Hauptmetabolite im Plasma, wurden bereits in früheren Studien identifiziert (Nurmi et al., 2009) und korrelieren in ihrer Substitution am B-Ring mit den Hauptanthocyanen im Plasma (Mal-gluc, Peo-gluc). Die Bildung von Vanilinsäure ist allerdings nicht auf Anthocyane begrenzt, da auch eine endogene Bildung unabhängig von Anthocyanen beschrieben wurde (Rosen & Goodall, 1962). HBA und HBAL eignen sich nicht zur Ermittlung der Bioverfügbarkeit von Anthocyanen, da diese Verbindungen bereits während der Washout-Phase in Urin- und Plasmaproben detektiert wurden und ihren Ursprung aus weiteren Nahrungsbestandteilen haben könnten (Mattila et al., 2005). Phloroglucinolaldehyd konnte nicht als Hauptmetabolit detektiert werden, obwohl dieser schematisch aus jedem Ausgangsanthocyan unabhängig von deren B-Ring gebildet werden kann. PGAL könnte sich weiter abgebaut haben oder mit endogenen Strukturen assoziieren und gebunden vorliegen. Im Gegensatz zu den Phenolsäuren zeigte sich, dass der Aldehyd (PGAL) eine verlängerte Halbwertszeit aufwies ($T_{1/2} = 6,1$ h).

Das gewählte Zeitfenster in unserer Studie (8 h bzw. 24 h), bildet nicht die gesamte Verfügbarkeit und Ausscheidung der gewählten Analyte ab. Nach 8 Stunden konnten noch Abbauprodukte im Plasma detektiert werden. Ebenso zeigte sich in den Urinproben, dass die Eliminierung einiger Abbauprodukte nach 24 Stunden noch nicht vollständig abgeschlossen war. So kann die meist unspezifische Hippursäure bis zu 48 Stunden nach Anthocyanverzehr im Urin von Probanden detektiert werden (Czank et al., 2013).

5.1.4 Rolle des Dünndarms bei der Absorption von Anthocyanen und Abbau- produkten

Der Darm spielt eine wichtige Rolle bei der Resorption und Bioverfügbarkeit von Anthocyanen. So wird der Dünndarm, vor allem das Jejunum, als wichtiger Resorptionsort beschrieben (He & Giusti, 2010; Matuschek et al., 2006; Talavéra et al., 2004). Die Aufnahme in die Darmepithelzelle kann durch einen spezifischen Rezeptor (SGLT1) als Glukosid erfolgen und weiter ins Blut gelangen, oder in der Darmepithelzelle durch die β -Glukosidase deglykosiliert werden. Die dann vorliegenden Anthocyanidine, die auch zuvor durch die extrazelluläre Hydrolase (LPH) an der Bürstensaumenbran aus den Anthocyanen gebildet werden und passiv ins Darmepithel diffundieren, unterliegen weiter dem dortigen Phase II Metabolismus und werden meist als glukuronierte Formen ins Blut aufgenommen (Kay, 2006; Walle, 2004) (Abbildung 22).

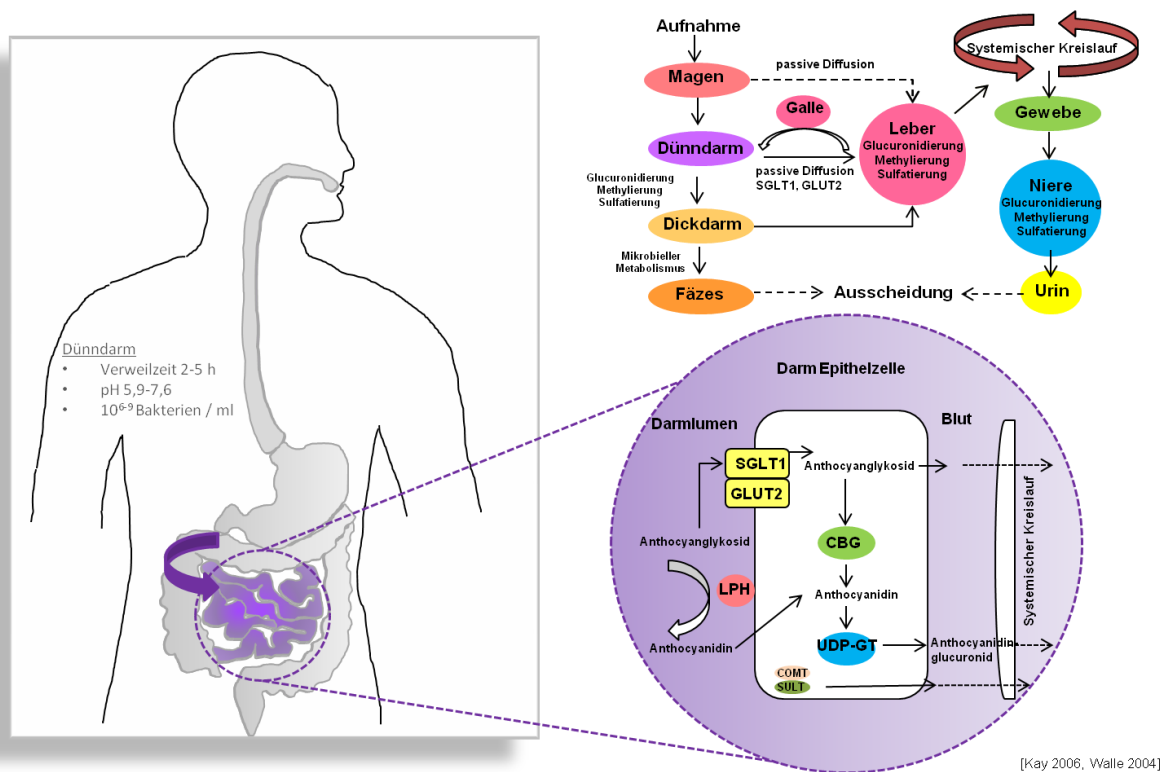


Abbildung 22: Resorptionsmechanismus von Anthocyanen im Dünndarm. SGLT: Natrium-abhängiger Glukosetransporter, LPH: Laktase-Phloridzin Hydrolase, CBG: Zytoplasmatische β -Glukosidase, UDP-GT: UDP-Glycuronosyltransferase, COMT: Catechol-O-methyltransferase, SULT: Sulfotransferase (modifiziert nach Kay, 2006; Walle, 2004).

Wie relevant das Kolon und die weitere Darmpassage für die Bioverfügbarkeit von Anthocyanen und deren Abbauprodukten ist, zeigt der Vergleich gesunder Probanden mit einem intakten GIT zu Ileostomaprobanden mit einem terminalen Dünndarmausgang (Abbildung 23).

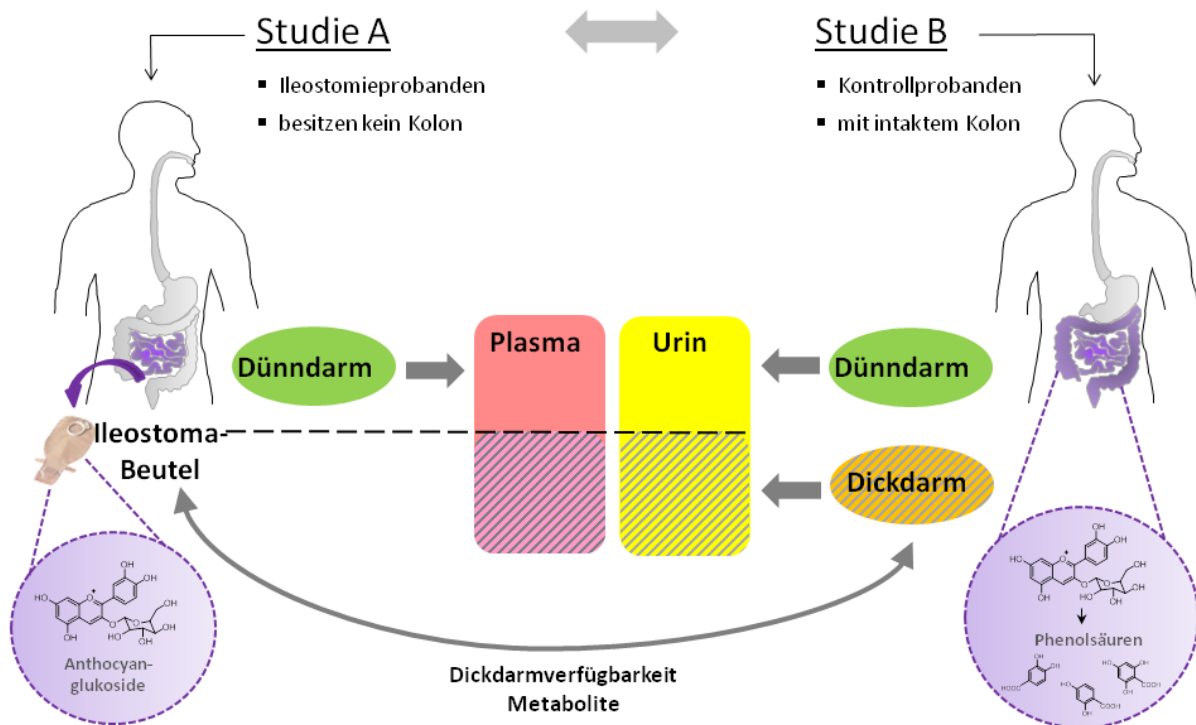


Abbildung 23: Schema zum Vergleich der beiden Probandengruppen (mit und ohne Kolon). Untersucht wurden die Konzentrationen an Anthocyanen (Anthocyanglykoside) und Abbauprodukten (Phenolsäuren) in Urin, Plasma beider Gruppen und zusätzlich in Dünndarmausflüssen der Ileostomaprobanden zur Erfassung der intestinalen und systemischen Verfügbarkeit.

Die Mengen an Anthocyanen im Plasma und Urin von gesunden Probanden waren 79% bzw. 44% höher als im Plasma und Urin der Ileostomaprobanden. Dies zeigt eine deutlich höhere Resorption in Gegenwart eines intakten Dünndarms, sowie vorhandenem Kolon. Da Ileostomieprobanden, die ein endständiges Stoma haben der Dünndarm vorhanden ist, nehmen diese geringe Mengen an Anthocyanen in ihren systemischen Kreislauf auf. Auch kann die Resorption bereits oberhalb der Darmpassage im Magen erfolgen (Passamonti et al., 2003). Eine passive Diffusion durch die Magenschleimhaut gestaltet sich durch das Vorliegen der Anthocyane als Flavylumkation im sauren Milieu des Magens eher schwierig. Studien zeigen aber, dass Anthocyane mit Bilitranslokase im Magen interagieren können, um in die Epithelschicht der Magenschleimhaut transportiert zu werden (Passamonti et al., 2002)

oder durch einen bisher noch nicht spezifizierten Transporter durch erleichterte Diffusion aufgenommen werden (Fernandes et al., 2012).

Die rasche Aufnahme der Anthocyane in die systemische Zirkulation der Probanden mit intaktem GIT (Maximum bei 2 h) weist darauf hin, dass der Dünndarm für die Resorption von Anthocyanen relevant ist. Dieser Trend zeigt sich noch deutlicher bei den Abbauprodukten der Anthocyane. Die Konzentrationen lagen im Plasma und Urin von gesunden Probanden etwa 100% bzw. 75% höher als im Plasma und Urin der Ileostomaprobanden. So können auch hier über die intakte Darmmukosa mehr Abbauprodukte systemisch resorbiert worden sein.

5.2 Beeinflussung der Bioverfügbarkeit durch Verkapselung

Die bisher beschriebenen Ergebnisse zum unverkapselten HBE bilden die Grundlage für die Beurteilung des Einflusses der verschiedenen Kapseltechniken auf die Bioverfügbarkeit im Menschen. Die Untersuchung der Anthocyangehalte im Dünndarminhalt ergaben 10% niedrigere Konzentrationen und gleichzeitig 20% höhere Gehalte an Abbauprodukten aufgrund der **Molkeproteinverkapselung** im Vergleich zum unverkapselten HBE (siehe Tabelle 14, Abbildung 24). Obwohl es zwischen den Probanden große interindividuelle Unterschiede gab, zeigen die Ergebnisse im Trend keine Stabilisierung der Anthocyane durch Molkeproteinverkapselung während der Dünndarmpassage, sondern einen tendenziell verstärkten Abbau. Im Plasma der Probanden ohne Stoma wurden 28% geringere Konzentrationen an Anthocyane und 6% geringere Konzentrationen an Abbauprodukten im Vergleich zum unverkapselten Extrakt detektiert. Im Urin der Probanden (mit Kolon) wurden allerdings durch die Molkeproteinverkapselung 108% mehr Anthocyane und 48% mehr Abbauprodukte detektiert (Tabelle 14, Abbildung 24, Probanden mit Kolon). Unterschiedliche Probenzeitpunkte der Messungen könnte Ursache für die Diskrepanz zwischen Urin- und Plasmaergebnissen sein. Die analysierten Plasmakonzentrationen zeigen genau die Konzentrationen zu einem bestimmten Zeitpunkt (0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h). Zwar ermittelt die Berechnung der Area under the curve (AUC) einen gewissen Trend über den gesamten Zeitraum, doch Konzentrationen, die zwischen zwei Zeitpunkten liegen, können nicht erfasst werden. Dahingegen wurden die Konzentrationen im Urin der Probanden über einen bestimmten Zeitraum ermittelt (-24-0 h, 0-2 h, 2-4 h, 4-8 h, 8-24 h) und konnten anhand der dokumentierten Urinvolumina innerhalb der gesamten 24 h während der Studie möglichst genau ermittelt werden. Die Ausscheidungsmengen über den Urin zeigen, dass die Molkeproteinverkapselung die systemische Konzentration und die Kurzzeitbioverfügbarkeit der Anthocyane erhöhen kann. Verschiedene Studien zeigen die Stabilisierungseffekte von Molkeproteinen auf Anthocyane (Schantz et al., 2014; Viljanen et al., 2005). Da unsere Ergebnisse allerdings keine stabilisierenden Effekte der Molkeproteinkapseln auf Antho-

cyane im Darmmilieu zeigten, könnte die zusätzliche Absorption über den Magen ein Grund für die erhöhte Wiederfindung im Urin sein.

Bisherige Untersuchungen zeigen grundsätzlich eine zeitliche Verzögerung der Resorption von Substanzen während der Magenpassage in Gegenwart von Molkenproteinen (Stanstrup et al., 2014). Somit könnte auch die Freisetzung der Anthocyane sowohl im Magen als auch entlang des Dünndarms verzögert sein. Unsere Ergebnisse unterstreichen diese Erkenntnisse unabhängig absoluter Konzentrationen, aber aufgrund tendenzieller zeitlicher Verschiebungen der ermittelten maximalen Konzentration von Anthocyanen und Abbauprodukten im Dünndarminhalt, Urin und Plasma nach Verzehr von Anthocyanen verkapselt auf Basis von Molkeproteinen.

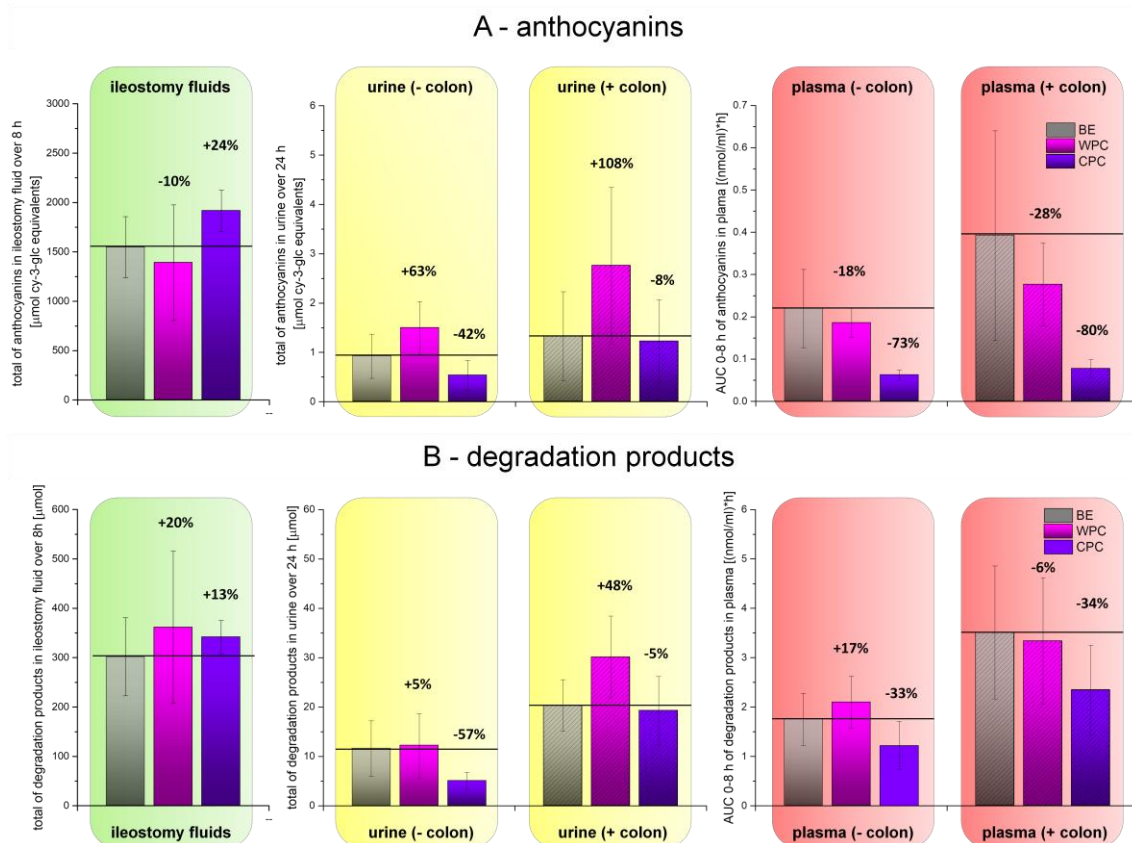


Abbildung 24: Ermittelte Anthocyanengehalte (A) und Abbauproduktegehalte (B) in Dünndarmflüssigkeiten (Probanden mit Stoma, in μmol über 8 h), Urin (μmol über 24 h) und Plasma (AUC (nmol/ml)*h von 0 bis 8 h) für Probanden mit Kolon (N = 4-5) und Probanden ohne Kolon (N = 5) nach HBE- (BE), MPK- (WPC) und CPK- (CPC)Verzehr.

Tabelle 14: Prozentuale Angaben der Gehalte von Anthocyanen und Abbauprodukten in Dünndarmflüssigkeiten (Probanden ohne Kolon), Urin und Plasma (Probanden mit Kolon) nach MPK- (Molkeproteinverkapselung) und CPK- (Citruspektinverkapselung)- Verzehr (Studie Teil II). Die Angaben zeigen die Veränderung der Gehalte im Vergleich zu den Ergebnissen nach Verzehr des unverkapselten Extraktes (Teil I).

	MPK-Verzehr			CPK-Verzehr		
	Ileo	Urin	Plasma	Ileo	Urin	Plasma
Anthocyane	-10%	+108%	-28%	+24%	-8%	-80%
Abbauprodukte	+20%	+48%	-6%	+13%	-5%	-34%

Durch die **Citruspektinverkapselung** können andere Effekte auf die Verfügbarkeit der Anthocyane beschrieben werden. Die Citruspektinverkapselung scheint die Anthocyane entlang der Magen-Darmpassage zu stabilisieren. Insgesamt erreichten 24% mehr Anthocyane intakt das Ende des Dünndarms im Vergleich zum nicht verkapselten Extrakt (Tabelle 14, Abbildung 24, Probanden mit Kolon). Die zusätzliche Schellackbeschichtung der Kapseln könnte die Freisetzung von Anthocyanen verzögert haben. Da Schellack gegenüber dem niedrigen physiologischen pH-Wert im Magen stabil ist und sich erst im Darmmilieu auflöst (Farag & Leopold, 2011), könnte eine frühzeitige Resorption im Magen verhindert worden sein. Citruspektinverkapselte Anthocyane können so ihren Hauptresorptionsort, den Dünndarm, ungehindert erreichen. Auch die Abbauprodukte zeigen diesen Trend und konnten mit etwa 13% höheren Gehalten (im Vergleich zu Anthocyanen) am Ende des Dünndarms detektiert werden (Tabelle 14, Abbildung 24). Die kinetischen Daten von citruspektinverkapselten Anthocyanen weisen auf zeitliche Verschiebungen der maximalen Konzentrationen in Dünndarminhalt, Urin und Plasma hin (Mueller et al. 2018). Nach unseren bisherigen Daten, die zeigen wie wichtig der Dünndarm für die Bioverfügbarkeit der Anthocyane ist, ist zu erwarten, dass die höheren Konzentrationen, erzeugt durch die Citruspektinverkapselung, gleichzeitig eine höhere Bioverfügbarkeit der Anthocyane zur Folge hätten. Betrachtet man die Plasma- und Urinkonzentrationen, ergeben sich allerdings inverse Effekte. Die Plasmakonzentrationen der Anthocyane und Abbauprodukte lagen insgesamt etwa 80% bzw. 34% niedriger im Vergleich zum unverkapselten Extrakt (Tabelle 14, Abbildung 24, Probanden mit Kolon). Auch wurden 8% geringere Mengen an Anthocyanen und 5% geringere Mengen an Abbauprodukten (nach Citruspektinverkapselung) über den Urin ausgeschieden (Tabelle 14, Abbildung 24, Probanden mit Kolon). Insgesamt betrachtet konnte die Citruspektinverkapselung die Anthocyankonzentration im Darm erhöhen, aber offensichtlich nicht deren systemische Bioverfügbarkeit. Denkbar als Grund ist die Wechsel-

wirkung und Assoziation von Anthocyanen und Abbauprodukten mit Bestandteilen der Citruspektinkapseln. Diese "Konglomerate" könnten die Resorption von Anthocyanen vermindern. Auch die zur Verkapselung notwendige Zuckerkomponente (Trehalose) gelangt über selbe Transporter wie Anthocyane ins Darmepithel, wodurch es zur Konkurrenz der Resorptionsmöglichkeiten kommen könnte (Ho et al., 2017).

Eine interessante Ausnahme zeigen allerdings die Ergebnisse von PGAL. Die meisten Metaboliten wiesen nach CPK-Verzehr niedrigere Plasma- und Uringehalte auf. PGAL hingegen zeigte im Vergleich zum unverkapselten HBE den höchsten Plasmaspiegel der gesunden Probanden. Dieser Trend zeigt sich nicht in der Gruppe der Probanden mit Stoma. Deren unterbrochene Darmpassage und verminderte mikrobiotische Darmaktivität könnte Ursache für die verminderte Bildung von PGAL sein (siehe Ergebnisse Teil III, Kropat et al. 2013).

5.3 Biologische Aktivität von Anthocyanen (verkapselt versus nicht verkapselt)

Da oxidativer Stress im Zusammenhang mit der Inzidenz chronischer Erkrankungen steht, wurden im vorliegenden Forschungsprojekt Biomarker zur Erfassung der antioxidative Wirkung von Anthocyanen untersucht. Forschungsstelle I (Prof. Richling, Technische Universität Kaiserslautern) untersuchte im Verlauf der Studie den GSH-Status der Probanden und das Ausmaß oxidativer und nicht-oxidativer DNA-Schäden im Vollblut. Forschungsstelle II (Prof. Marko, Universität Wien) untersuchte unter anderem die antioxidative Wirkung anhand der Transkription von Phase-II-Enzymen in den Lymphozyten der Studienprobanden.

Der **Glutathionspiegel** im Menschen variiert sehr stark, wobei insbesondere in der Leber, Niere und im Blut sehr hohe Konzentrationen im mM-Bereich vorliegen. Bisherige Studien zeigten im zeitlichen Verlauf mehrerer Wochen einen Anstieg des GSH-Status in Probanden nach Verzehr anthocyanreicher Fruchtsäfte (Spormann et al., 2008; Weisel et al., 2006). Dies bedeutet, dass der Verzehr von Anthocyanen über einen längeren Zeitraum eine antioxidative Wirkung im Menschen zeigt. In wie weit sich dieser Marker in einer Kurzzeitbetrachtung nach Verzehr von Anthocyanen verhält, war bislang nicht bekannt und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Im Allgemeinen zeigt sich, dass die Anthocyanaufnahme (unverkapselt und verkapselt) während der durchgeführten Studie keinen erheblichen Einfluss auf den GSH-Status im Blut der Probanden ausübte. Es zeigte sich, dass dieser Marker für ein Kurzzeit-Screening nicht geeignet war und eher in längeren Studienphasen durch Anthocyane moduliert und beeinflusst wird. Ursache hierfür kann die

zuvor stattfindende erforderliche Induktion der Transkription und Proteinsynthese sein, die erst nach mehrere Stunden abgeschlossen sein kann (Weisel et al., 2006).

Schädigungen der DNA zeigen sich meist als Einzel- und Doppelstrangbrüche, Purin-, Pyrimidin-, Desoxyribose-Modifikationen und DNA-Cross-Links. Ein Hydroxylradikal kann z.B. mit der DNA-Base Guanin zu 8-Hydroxyguanin reagieren, welches als Biomarker für oxidativen Stress dient. Zur Erfassung **oxidativer DNA-Schäden** kann die alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay) herangezogen werden (Apel & Hirt, 2004; Halliwell, 2008). Die EFSA (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit) beschreibt sehr aufwendige Methoden zur Erfassung von Wirkungsnachweisen mittels Humanstudien im Zusammenhang mit der EU Health-Claims-Verordnung (EG Nr. 1924/2006). Gerade der Comet-Assay als Methode zur Bestimmung von DNA-Schäden wird von der EFSA generell als validierter Parameter akzeptiert (EFSA, 2012). Um eine Aussage über das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden zu erhalten, wurden die Zellen nach der Lyse mit dem Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) behandelt, wodurch oxidierte Stellen erkannt werden und verstärkt Strangbrüche detektiert werden können (Collins, 2000).

Anthocyane zeigten bereits in *in vitro*- und Humanstudien (Kapitel 1, Tabelle 4) positive Effekte im Zusammenhang mit der Verminderung von DNA-Schäden (Del Bo et al., 2015; Schantz et al., 2011; Spormann et al., 2008; Weisel et al., 2006). Auch in dieser Arbeit können die potentiellen Effekte der Anthocyane nachgewiesen werden. Sowohl mit als auch ohne Enzymbehandlung erfolgt eine tendenzielle Abnahme der DNA-Strangbrüche in den Blutzellen beider Probandengruppen während der Studie nach unverkapseltem HBE-Verzehr. Die stärksten Effekte der Reduzierung oxidativer DNA-Schäden (mit FPG-Behandlung) wurden nach Verzehr des citruspektinverkapselten Extraktes (CPK) in beiden Probandengruppen detektiert (Abbildung 25). Nach MPK-Verzehr können hingegen nur geringe Effekte beobachtet werden. Eine Korrelation der Ergebnisse der biologischen Aktivität und der bisherigen Ergebnissen zur Bioverfügbarkeit ist nicht eindeutig. Ob das Kapselmaterial selbst einen Effekt hat, kann anhand der vorliegenden Studie nicht ausgeschlossen werden, da keine Untersuchungen mit HBE-freiem Kapselmaterial an den Probanden durchgeführt wurden. Obwohl bei allen verzehrten Extrakten die höchsten Konzentrationen von Anthocyanen und Abbauprodukten immer in der Gruppe der Probanden ohne Stoma detektiert wurden, konnten für diese Gruppe keine stärkeren Effekte der ausgewählten Biomarker (GSH, DNA-Schäden) erfasst werden. Da sich im Gegensatz zu HBE und CPK die geringsten Mengen an Anthocyanen im Dünndarm nach MPK-Verzehr befanden und hier auch der geringste Effekt auf die Verringerung der DNA-Schäden beobachtet wurde, kann die in vielen Studien diskutierte Bedeutung des Kolons als Wirkort

für Anthocyane postuliert werden (Kalt et al., 2014; Lila et al., 2016; Williamson & Clifford, 2010). Weitere Untersuchungen zur genauen Wirkweise von Anthocyanen und deren vielfältigen Metabolisierungsprodukten sind notwendig, um dieser These nachzugehen.

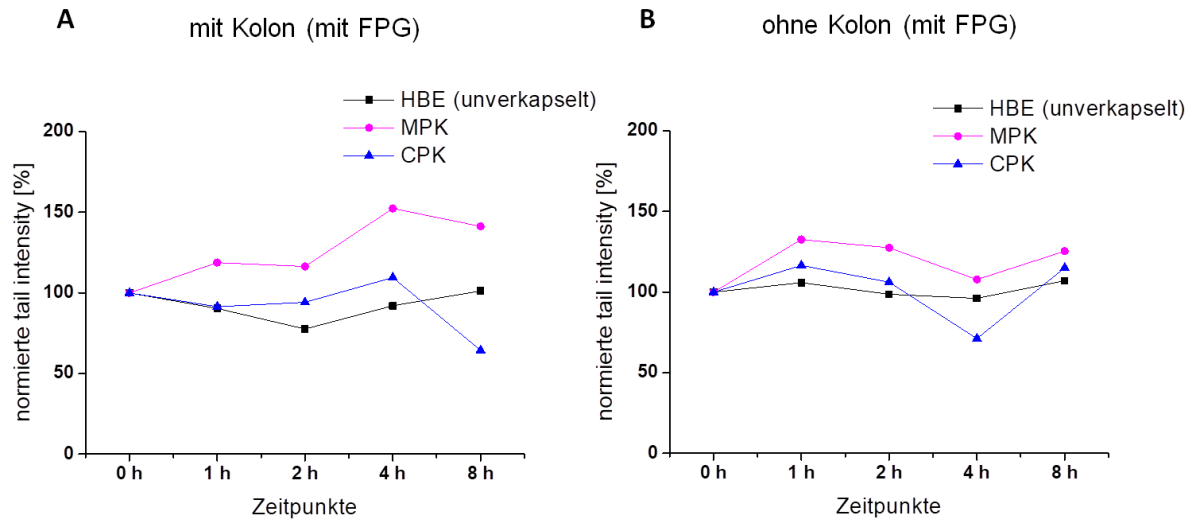


Abbildung 25: Modulation von oxidativen DNA-Schäden (nach FPG-Behandlung) nach HBE-, MPK-, CPK-Verzehr, A: Probanden mit Kolon, B: Probanden ohne Kolon. Die Ergebnisse wurden auf einen Anfangswert ($t_0 = 100\%$) normiert, um die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Extrakte (verkapselt und unverkapselt) besser zu verdeutlichen.

Welche Rolle der Darm spielt, zeigen auch die Ergebnisse von Forschungsstelle II. Die beobachtete Modulation von **Nrf2/ARE-regulierten Genen** legt den Schluss nahe, dass im Hinblick auf die gesundheitsfördernde Wirkung von Heidelbeerinhaltsstoffen nicht unbedingt eine direkte antioxidative Wirkung im Vordergrund steht, sondern chemopräventive Schlüsselenzyme in ihrer Expression beeinflusst werden (Kropat et al., 2013). Im Hinblick auf die verantwortliche bioaktive Komponente gelang es der Arbeitsgruppe um Prof. Marko zu zeigen, dass unter *in vitro* Bedingungen Phloroglucinolaldehyd eine aktivierende Wirkung zeigte, welcher vor allem im systemischen Kreislauf der gesunden Probanden nach CPK-Verzehr zu detektieren war. Strukturell ist das sehr gut begründbar, da eine Reihe von α -, β -ungesättigten Aldehyden als Aktivatoren des Nrf2/ARE-Systems beschrieben sind (Reddy et al., 2008). Dies belegt die Bedeutung eines intakten Kolons für die Bioaktivität des anthocyanreichen Extrakts, was dadurch unterstützt wird, dass die verstärkte Transkription Nrf2/ARE-regulierter Gene auf Probanden mit gesundem Kolon begrenzt war.

5.4 Fazit

Bei der im Rahmen dieses AiF-geförderten Projektes durchgeführten Studie handelt es sich um eine humane Interventionsstudie mit einer geringen Anzahl an Probanden pro Gruppe ($n = 5$). Die untersuchten Daten zur Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität der verzehrten Heidelbeerextrakte zeigen interindividuelle Unterschiede der Probanden im Rahmen der Pilotstudie, was durch eine erhöhte Anzahl an Probanden in künftigen Studien verbessert werden könnte. Ileostomaprobanden zeigen aufgrund ihres individuellen Krankheitsbildes die stärksten Unterschiede. Sie stellen trotzdem ein gutes nicht-invasives Modell dar, um zu untersuchen wie Substanzen den Dickdarm erreichen und dadurch Rückschlüsse auf die Kolonabsorption in gesunden Probanden zu ziehen. In der Studie wurde als Anthocyanquelle ein Heidelbeerextrakt mit einem komplexen Anthocyanprofil verwendet, um möglichst die Aufnahme von Anthocyanen durch die tägliche Ernährung zu imitieren. Heidelbeeren und deren Extrakte enthalten weitere Polyphenole und Matrixbestandteile, die mit Anthocyanen synergistische Effekte *in vivo* erzeugen könnten. Genau dies kann für manche Fragestellungen aber auch von Nachteil sein, da untersuchte Effekte nicht immer eindeutig genau einer Substanzklasse zugeordnet werden können. Somit ist es wichtig, verschiedene Fragestellungen durch verschiedene wissenschaftliche Studien beantworten zu können. So lässt z.B. der Einsatz von Einzelsubstanzen in Untersuchungen eindeutige Rückschlüsse auf deren Wirkung und Bioverfügbarkeit zu, synergistische Effekte mit anderen Lebensmittelbestandteilen können aber beispielsweise nicht abgebildet werden. Dies zeigt die Notwendigkeit der Verwendung von Extrakten in verschiedenen Studien, die die Aufnahme von Substanzen aus dem Lebensmittel besser verdeutlichen.

Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Darm generell einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der verzehrten Heidelbeerextrakte besitzt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Anthocyane entlang der Gastrointestinalpassage zu Phenolcarbonsäuren und Phloroglucinolaldehyd abgebaut werden und in substanziellen Mengen den systemischen Kreislauf erreichen. Durch die gewählte Molkepreoteinverkapselung von Anthocyanen konnte die kurzzeitige systemische Bioverfügbarkeit erhöht werden. Eine Modulation und Stabilisierung der intestinalen Anthocyankonzentrationen lokalisiert am Ende des Dünndarms, erfolgte nach Citruspektinverkapselung. Weiterhin wurden Effekte zur antioxidativen Wirksamkeit der verwendeten Extraktssysteme beobachtet. Der Dünndarmmetabolit Phloroglucinolaldehyd wurde als potentielle Wirkkomponente identifiziert, erklärt auf Basis der erhaltenen Bioverfügbarkeitsdaten die vorliegenden Ergebnisse zur biologischen Wirkung aber nicht vollständig. Weitere Anthocyanmetabolite, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, könnten für die Wirkung des Extraktes mitverantwortlich sein. Der komplexe Abbau von Anthocyanen und die Vielfalt entstehender Metaboliten, könnte durch

deren mögliche synergistische Effekte der Schlüssel für die potente Wirksamkeit der Anthocyane *in vivo* sein und sollten in fortführenden Studien genauer betrachtet werden.

6. Material & Methoden

6.1 Geräte & Materialien

Gerät	Hersteller
Biofreezer	Urilab 800, Angelantoni Industrie, Massa Martana, Italien
Gefriertrocknung Alpha 1-4 LSC	Christ, Osterode am Harz, Deutschland
Feinwaage XP6U Comparator	Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA
Feinwaage (210 S, 410 S, CP 44S)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzphotometer LS50	Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA

HPLC-UV/Vis

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| • UV/Vis Detektor: UV 2075 Intelligent UV/ Vis Detektor | Jasco, Groß-Umstadt Deutschland |
| • Entgaser: DG 2080-53 3-Line Degasser | Jasco, Groß-Umstadt Deutschland |
| • Injektor: AS 2055 Plus Intelligent Sampler | Jasco, Groß-Umstadt Deutschland |
| • Pumpe: PU 2080 Plus Intelligent HPLC Pump | Jasco, Groß-Umstadt Deutschland |
| • Säule: Luna C18, 3 µm, 100 Å, 250 mm x 4,6 mm Phenomenex | Phenomenex, Torrance, Kalifornien, USA |
| • Software: JASCO ChromPass Chromatography Data System Version: 1.8.6.1. | Jasco, Groß-Umstadt Deutschland |

HPLC DAD System

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| • DAD Detektor: MD 2010 Plus | Jasco, Groß-Umstadt Deutschland |
| • Injektor: AS 2057 Plus | Jasco, Groß-Umstadt Deutschland |
| • Netbox: LC-Net II/ ADC | Jasco, Groß-Umstadt Deutschland |
| • Entgaser: DG-2080-53 | Jasco, Groß-Umstadt Deutschland |
| • Pumpe: PU 2080 Plus | Jasco, Groß-Umstadt Deutschland |
| • Säule: Luna C18, 3 µm, 100 Å, 250 mm x 4,6 mm Phenomenex | Phenomenex, Torrance, Kalifornien, USA |
| • Software: JASCO ChromPass Chromatography Data System Version: 1.9.302.1124 | Jasco, Groß-Umstadt Deutschland |

HPLC-MS/MS

- Pumpe: Agilent 1200 G1312B Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA
- Auto Sampler: Agilent 1200 G1367C Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA
- Colum Oven: Agilent 1200 G1367C Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA
- Säule: Luna C18, 3 µm, 100 Å, 250 mm x 4,6 mm Phenomenex Phenomenex, Torrance, Kalifornien, USA
- Massenspektrometer: API 3200 AB SCIEX, Darmstadt, Deutschland

Kühl-/Gefrierkombination (4°C/-20°C)

Liebherr, Bulle, Schweiz

Mikroskop (Fluoreszenz)

Zeiss, Oberkochen, Deutschland

NMR

Bruker, Billerica, Massachusetts, USA

pH-Meter

Hanna Instruments, Vöhringen, Deutschland

SPE Apparatur

Supelco Visiprep TM, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Ultraschallbad Sonorex Super RK102P

Bandelin electronic, Berlin, Deutschland

Ultrazentrifuge

Optima TL Ultrazentrifuge, Beckmann, Krefeld, Deutschland

Vakuumzentrifuge

Univapo15OH, Uniquip, Planegg, Deutschland

Vakuumzentrifuge

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Vortex Genius 3

IKA®, Staufen, Deutschland

Zentrifugen

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Herareus Biofuge A, Hanau, Deutschland

Heraeus Multifuge 1 L-R, Hanau, Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Acetonitril ($\geq 99,8$ %)	J. T. Baker, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Agarose (LMA)	Bio Rad, München, Deutschland
Agarose (NMA)	Bio Rad, München, Deutschland
Ameisensäure (≥ 99 %)	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
3-O-Methylgallussäure (≥ 97 %)	ABCR GmbH, Karlsruhe, Deutschland
4-Hydroxybenzoesäure (≥ 99 %)	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Cyanidin-3-O-glucosid (≥ 95 %)	Extrasynthese, Genay Cedex, Frankreich
Delphinidin-3,5-diglycosid (≥ 95 %)	Extrasynthese, Genay Cedex, Frankreich
Deuteriumoxid (99,96% Deuterium)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
D ₄ -Natrium-(Trimethylsilyl)propionat (≥ 98 %)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Essigsäure	J. T. Baker, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase	Prof. Collins, University Oslo, Norwegen
Gallussäure (≥ 99 %)	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Glutathion, reduzierte Form (GSH)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Gluthationreduktase (GSR)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
iso-Ferulasäure (d ₃)	Toronto Research Chemicals, North York, Kanada
Isopropanol	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kreatinin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Methanol	Fisher Chemicals, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
NADPH	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Phloroglucinolaldehyde ($\geq 97\%$)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Protocatechusäure ($\geq 97\%$)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Salzsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Syringasäure ($\geq 98\%$)	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat (SSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Triethanolamin (TEA)	Fluka, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Vanillinsäure ($\geq 97\%$)	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
2-Vinylpyridin	Fluka, Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

6.2 Methoden

6.2.1 Bestimmung der Transitzeit

Zur Bestimmung der individuellen Dünndarmpassagezeiten von Nahrungsinhaltsstoffen der einzelnen Ileostomaprobanden (Ileo1-5) wurde von allen Probanden vor Studienbeginn 330 ml Heidelbeersaft (Muttersaft, Alnavit, Bickenbach, Deutschland) getrunken und die Passagezeiten durch die Färbung der Ileostomainhalte bestimmt. Parallel dazu wurde der Heidelbeersaft (330 ml) zur Bestimmung der Darmpassagezeit von den gesunden Probanden (Ges1-5) getrunken. Dokumentiert wurde die Zeit, nach der eine Färbung der Fäzes eintrat.

6.2.2 Bestimmung der Mikrobiota

Die Ileostomabeutelinhalte der fünf Probanden wurden zur Ermittlung der Mikrobiotazusammensetzung an ein Untersuchungslabor (Labor L+S AG, Bad Bocklet-Großenbrach, D) geschickt. Die Ergebnisse der einzelnen Probanden sind in Kapitel 3, Tabelle 12 im Detail beschrieben.

6.2.3 Glutathion-Bestimmung

Der Glutathiongehalt des Blutes der Probanden wurde mit einer nach Gallagher *et al.* modifizierten Methode bestimmt (Gallagher, Kavanagh, & Eaton, 1994). Hierbei wurde über GSR in einer NADPH-abhängigen Reaktion GSH zu oxidiertem GSSG und 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) kontinuierlich zu 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB) reduziert (Abbildung 26). Die Bildung von TNB kann über die Extinktion bei 412 nm zeitlich verfolgt werden. Die Geschwindigkeit der TNB-Bildung, also die Extinktionszunahme in einer bestimmten Zeit, ist proportional zur tGSH-Konzentration (Gesamtglutathion-Konzentration), da alle übrigen Reaktionspartner (NADPH, GSR, DTNB) in einem deutlichen Überschuss vorhanden sind. Die Berechnung der tGSH-Konzentration erfolgte durch Vergleich mit entsprechenden Standardlösungen. Zur Messung von GSSG wurde GSH mit dem Nukleophil 2-Vinylpyridin kovalent gebunden und anschließend die oben beschriebene Messung durchgeführt.

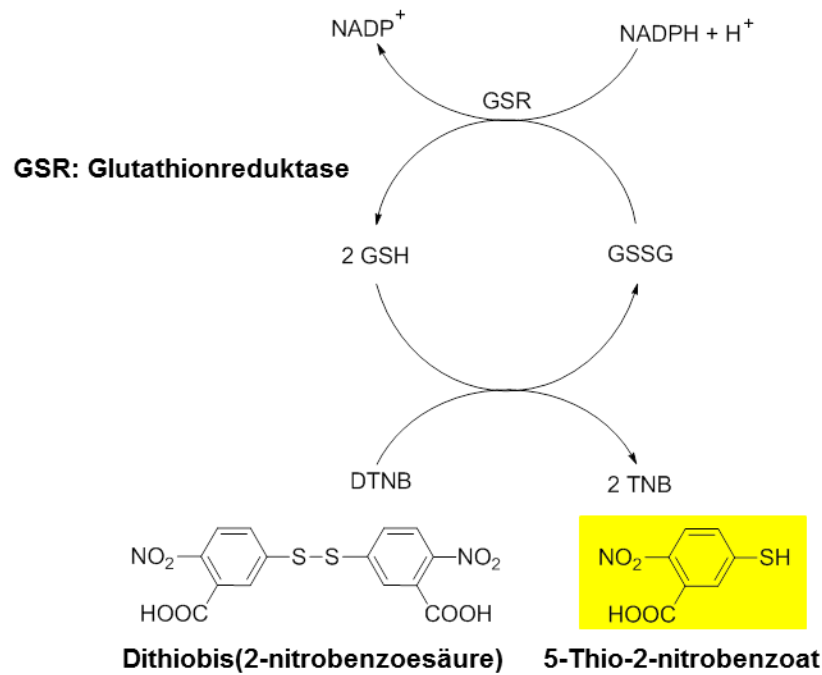


Abbildung 26: Darstellung der Farbreaktion von Glutathion (GSH) und 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoensäure) (DTNB), GSR: Glutathionreduktase.

Zunächst wurde das Vollblut der Proben mit 10% SSA zur Proteinfällung und Lyse der Zellen versetzt und bis zur weiteren Analyse in flüssigem Stickstoff gelagert (siehe Abbildung 27). Nach dem Auftauen wurden die Proben zentrifugiert und die Überstände sowohl für die tGSH- wie auch die GSSG-Messung mit 5% SSA verdünnt. Zur tGSH-Messung wurde eine Reaktionsmischung aus Puffer, DTNB, NADPH und GSR hergestellt.

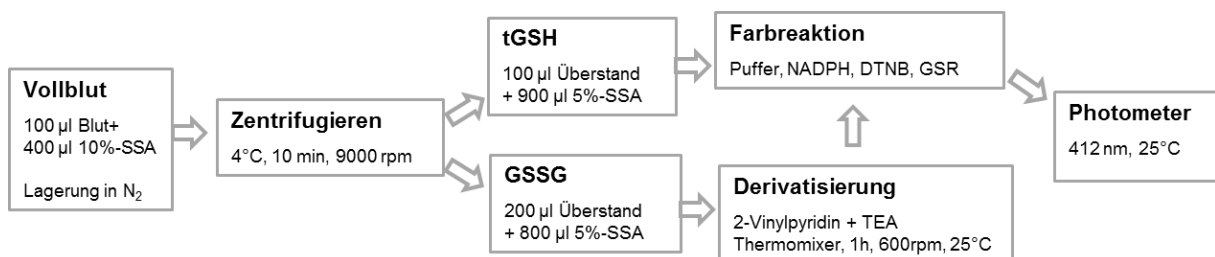


Abbildung 27: Fließschema zur Durchführung der Glutathion- und GSSG-Bestimmungen. (SSA: 5-Sulfosalicylsäure-Dihydrat, N₂: flüssiger Stickstoff, tGSH: Gesamtglutathion, GSSG: oxidiertes GSH, NADPH: Nicotinamadenindinukleotidphosphat, DTNB: 5,5'- Dithiobis-(2-nitrobenzoensäure), TEA: Triethanolamin).

Anschließend konnte durch die Farbreaktion die Absorption bei 412 nm photometrisch bestimmt werden. Zur GSSG-Messung war eine Derivatisierung von GSH zu GSSG notwendig. Hierzu wurde die verdünnte Probe mit 2-Vinylpyridin und Triethanolamin (50%) versetzt und für 1 h bei 25°C und 600 rpm im Thermomix inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung (Abbildung 26) (Gallagher et al., 1994).

Als Marker für den Redoxstatus (GSH-Status) wurde der Quotient aus reduziertem GSH (= tGSH – 2x GSSG) und tGSH ermittelt. Durch Differenzbildung wurde der GSH Anteil und der GSH-Status (Quotient GSH/tGSH) berechnet.

6.2.4 Comet-Assay

Zur Durchführung des Comet Assay (siehe Abbildung 28) wurden Objektträger mit NMA (normal melting agarose) vorbereitet, das Vollblut der Probanden mit LMA (low melting agarose) vermischt und auf die Objektträger aufgetragen. Anschließend wurden die Blutzellen für 1 h lysiert, wobei die Zellmembran aufgelöst wurde. Anschließend wurde in einer Elektrophoresekammer unter alkalischen Bedingungen ($\text{pH} \geq 13$) die DNA denaturiert (entwunden), eine Elektrophorese durchgeführt, die Objektträger neutralisiert und die DNA mit Ethidiumbromid eingefärbt. An einem Fluoreszenzmikroskop wurden die Durchmesser der Zellkerne (2 x 50 Kerne pro Objektträger und Blutprobe) mit Hilfe einer Digitalkamera computergestützt ausgewertet. Die DNA ungeschädigter Zellkerne erscheint als runder Punkt, geschädigte DNA bildet charakteristische Formen, die Kometen ähneln (siehe Abbildung 29). Als Maß für die DNA Strangbrüche wurde die Fluoreszenzintensität im Schweif (Maß für den prozentualen Anteil an DNA im Kometen-Schweif, „tail intensity“, TI%) verwendet.

Um eine Aussage über das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden zu erhalten, wurden die Zellen nach der Lyse mit dem Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) behandelt. Bei FPG handelt es sich um ein bifunktionelles Enzym das aus *E.coli* isoliert wird. Durch seine Glykosylaseaktivität ist es in der Lage, DNA-Modifikationen (oxidierte Basen wie 8-Oxo-Guanin, sowie deren ringgeöffnete Imidazole) zu erkennen und herauszuschneiden, wobei Lücken verbleiben. Durch die AP-Lyaseaktivität des Enzyms kann nun die Entfernung des Deoxyribosephosphats erfolgen, woraus ein Strangbruch resultiert (Laval, 1996) und zu einer Verstärkung der Schweifintensität führt. Die Differenz aus Strangbrüchen mit und ohne Enzymbehandlung wird als spezifisch oxidative DNA-Schäden interpretiert (Collins, 2000). Die Durchführung des Comet Assay anhand der Blutproben der Probanden ist in Kropat et al. beschrieben (Kropat et al. 2013).

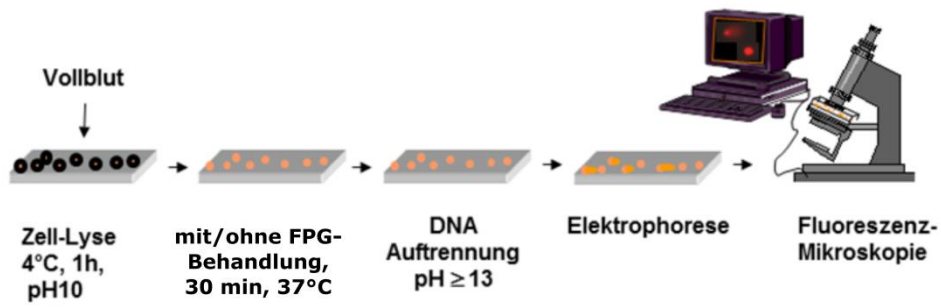


Abbildung 28: Schematische Darstellung zur Durchführung des Comet Assay mit Vollblutproben (FPG: Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase).



Abbildung 29: Darstellung unterschiedlich stark geschädigter Zellen (Kometen); links: keine Schädigung, rechts: starke Schädigung (Kometenschweif).

6.2.5 Analytik von Anthocyanen

6.2.5.1 Identifizierung von Anthocyanen und Metaboliten (Glucuronide)

Die Identifizierung von Anthocyanen aus dem HBE erfolgte anhand der Spezifikation des Herstellers (siehe Kapitel 3), des Vergleichs der Retentionszeiten (Mueller et al. 2012) und UV/VIS-Spektren von Referenzsubstanzen mittels HPLC-DAD (Methode siehe Kapitel 6.2.5.2). Die Absorptionsmaxima der Anthocyane liegen, wie in Abbildung 30 gezeigt, zwischen 520 und 560 nm. Der Nachweis erfolgte am HPLC-DAD System bei einer Wellenlänge von 540 nm.

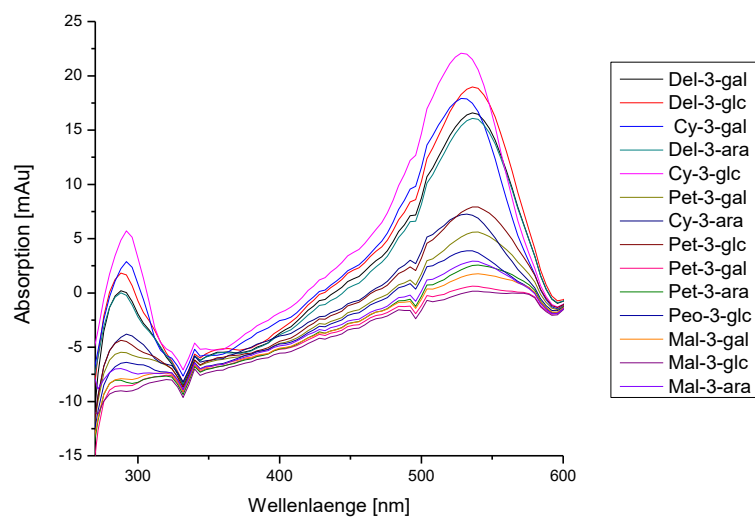


Abbildung 30: UV/VIS-Spektren der einzelnen Anthocyane aus Heidelbeerektakt (analysiert mittels HPLC-DAD).

Identifizierung von Anthocyanidin-glycosiden in Urin, Plasma und Dünndarminhalt der Probanden

Die Identifizierung von Anthocyanidin-glycosiden erfolgte mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Methode, welche bei Mueller et al. im Detail beschrieben ist (Mueller et al., 2017). Die MRM-Übergänge charakteristischer Fragmente der Anthocyanidin-glycoside sind in Abbildung 31 für eine representative Urinprobe der Interventionsstudie dargestellt. Gezeigt ist hier die Urinprobe des Probanden 4 (mit Kolon) zum Zeitpunkt 0-2 h nach MPK-Verzehr, der Interventionsstudie Teil II. Nach erfolgter Festphasenextraktion (Methode siehe Kapitel 6.2.7.2) wurde die Urinprobe mittels HPLC-MS/MS analysiert.

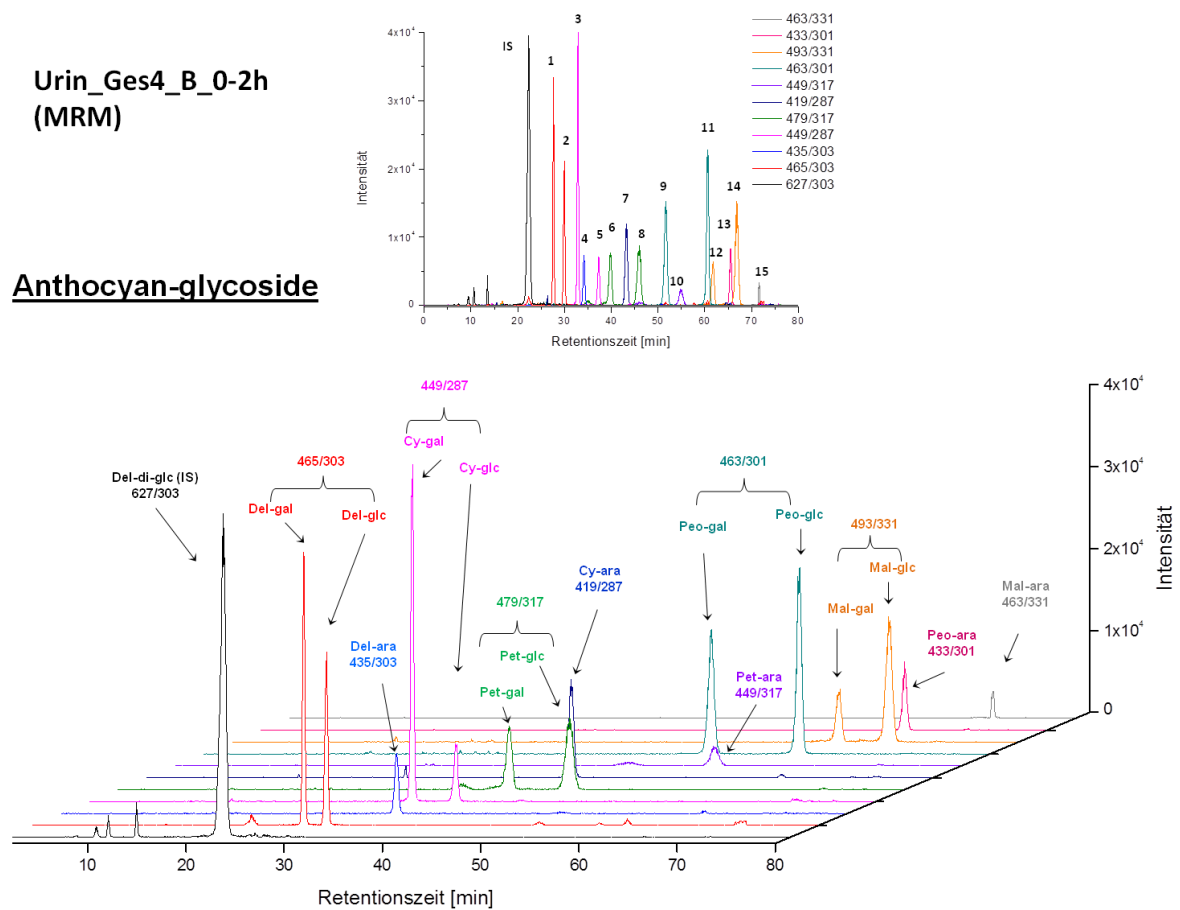


Abbildung 31: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogram mit MRM-Übergängen einer Urinprobe (15 Anthocyane: Del-gal, Del-glc, Cy-gal, Del-ara, Cy-glc, Pet-gal, Cy-ara, Pet-glc, Peo-gal, Pet-ara, Peo-glc, 13: Mal-gal, Peo-ara, Mal-glc, Mal-ara).

Identifizierung Anthocyanidin-glucuroniden in Urin, Plasma und Dünndarm-inhalten

Ebenso erfolgte die Identifizierung von Anthocyanidin-glucuroniden mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Methode, welche bei Mueller et al. im Detail beschrieben ist (Mueller et al., 2017). Die MRM-Übergänge charakteristischer Fragmente der Anthocyanidin-glucuronide sind in Abbildung 32 für eine representative Urinprobe der Interventionsstudie dargestellt.

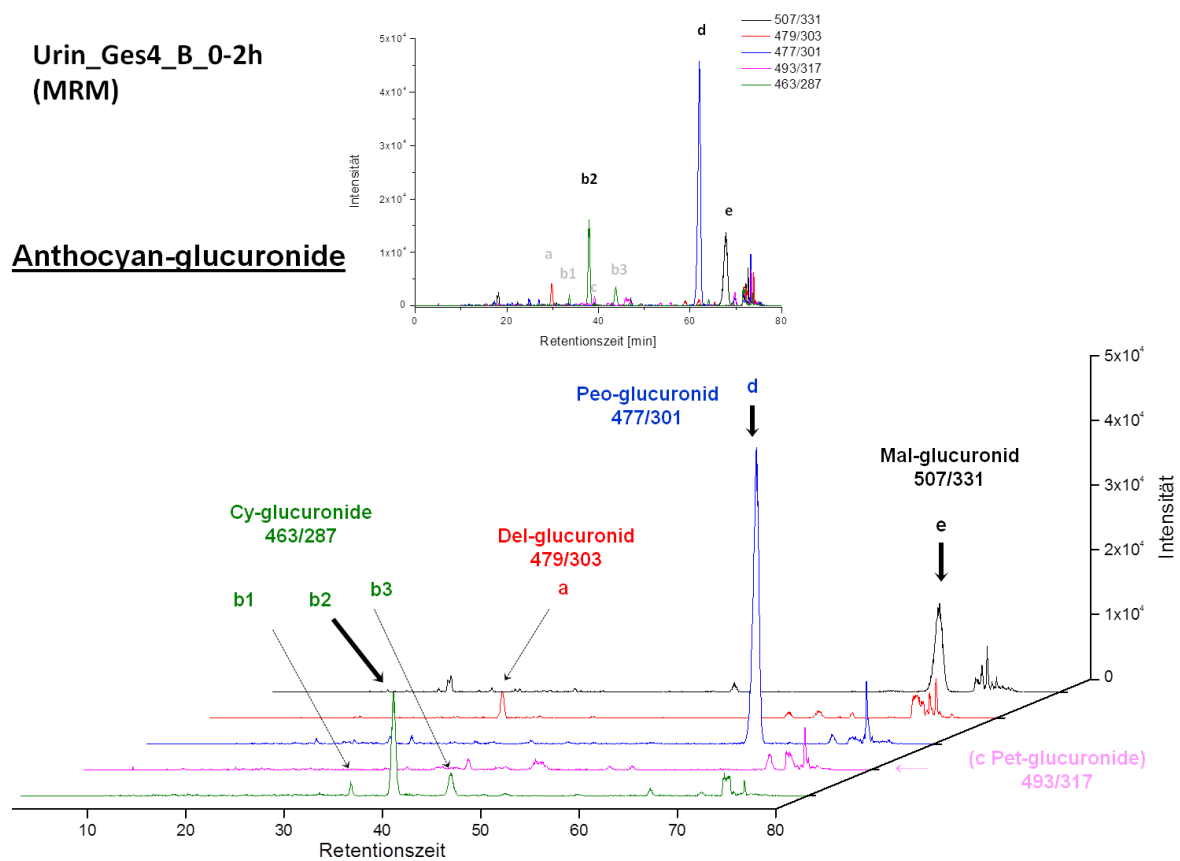


Abbildung 32: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogram mit MRM-Übergängen einer Urinprobe (Anthocyanidin-glucuronide: Cy-glucuro: Cyanidin-glucuronid, Del-glucuro: Delphinidin-glucuronid, Peo-glucuro: Peonidin-glucuronid, Mal-glucuro: Malvidin-glucuronid).

Zur besseren Absicherung der analytischen Daten wurde die Urinprobe zusätzlich im Neutral-loss-Verfahren analysiert, um zusätzliche Hinweise der *in vivo* erfolgten Glucuronidierung der Anthocyane zu erhalten (Mueller et al., 2017). Der Neutral-loss-Scann erfolgte für einen Verlust von 176 amu, welcher die Spaltung der Glucuron-Gruppe zeigt

(Abbildung 33). Die erhaltenen Daten konnten auch auf die Plasmaproben übertragen werden.

Folgende Substanz-spezifischen Parameter neben der bei Mueller et al. beschriebenen HPLC-MS/MS-Methode (Mueller et al., 2017) wurden eingestellt: DP -35 V (declustering potential), EP -7 V (entrance potential), CEP -12 V (cell entrance potential), CE -22 V (collision energy), CXP 0 V (cell exit potential).

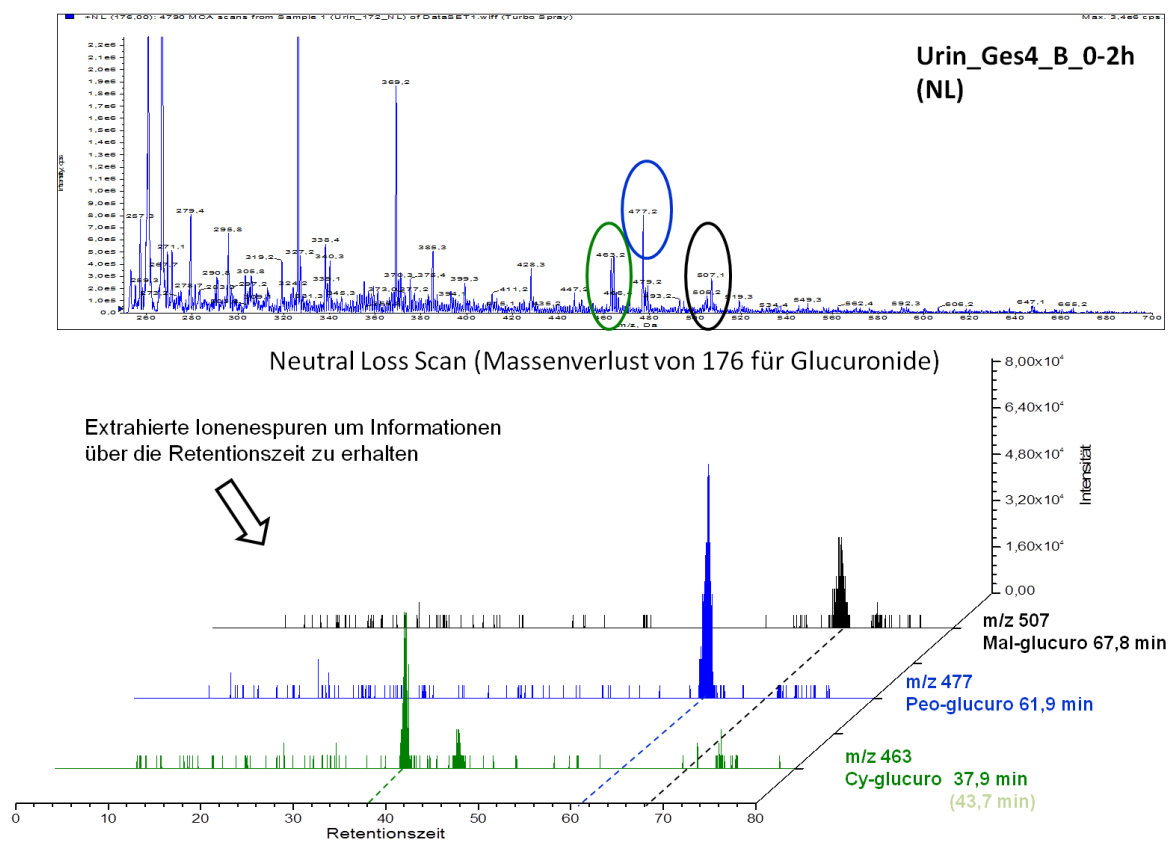


Abbildung 33: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramm des Neutral-Loss Scans (-176 amu, Verlust der Glucuronsäure) zur Identifizierung der Glucuronide im Urin der Studienprobanden (Cy-glucuro: Cyanidin-glucuronid, Peo-glucuro: Peonidin-glucuronid, Mal-glucuro: Malvidin-glucuronid).

Screening nach Anthocyanin-glycosiden-glucuroniden

Der Urin der Probanden wurde auch mittels HPLC-MS/MS (Methode siehe Mueller et al., 2017) auf Anthocyan-glycoside-glucuronide untersucht. Abbildung 34 zeigt, dass die Intensitäten der entsprechenden Übergänge nur sehr schwach waren. Aufgrund fehlender Referenzsubstanzen konnte die Methode nicht weiter optimiert werden. Glucuronidierte Anthocyanin-glykoside wurde somit nicht weiter in den Studienproben untersucht.

Urin_Ges4_B_0-2h
(MRM)

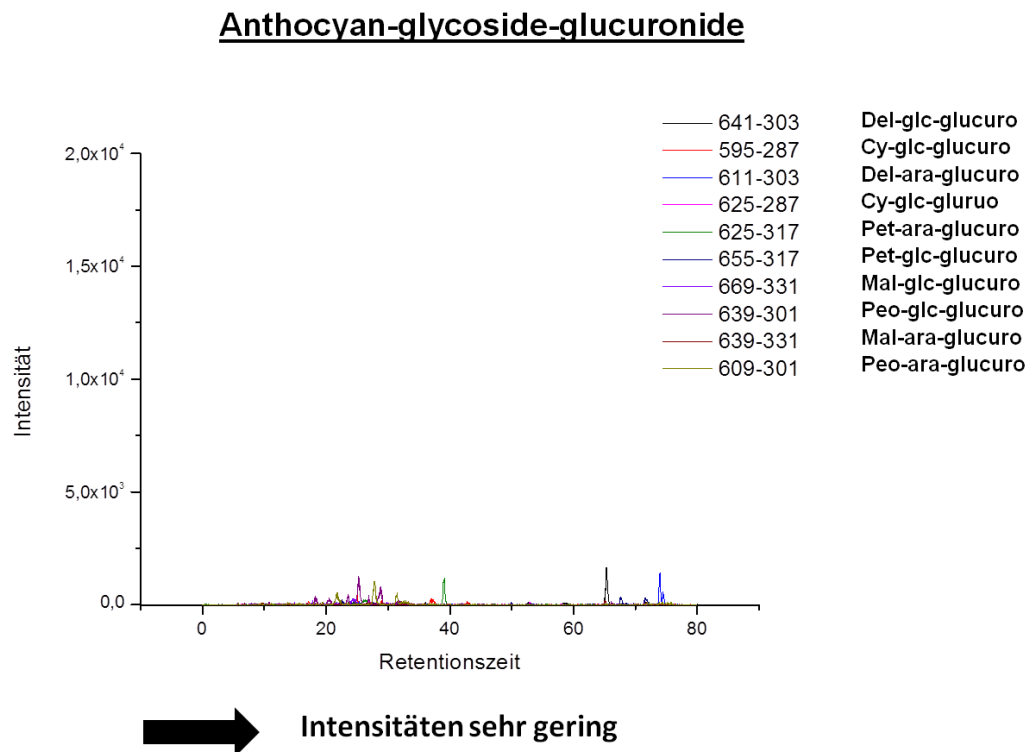
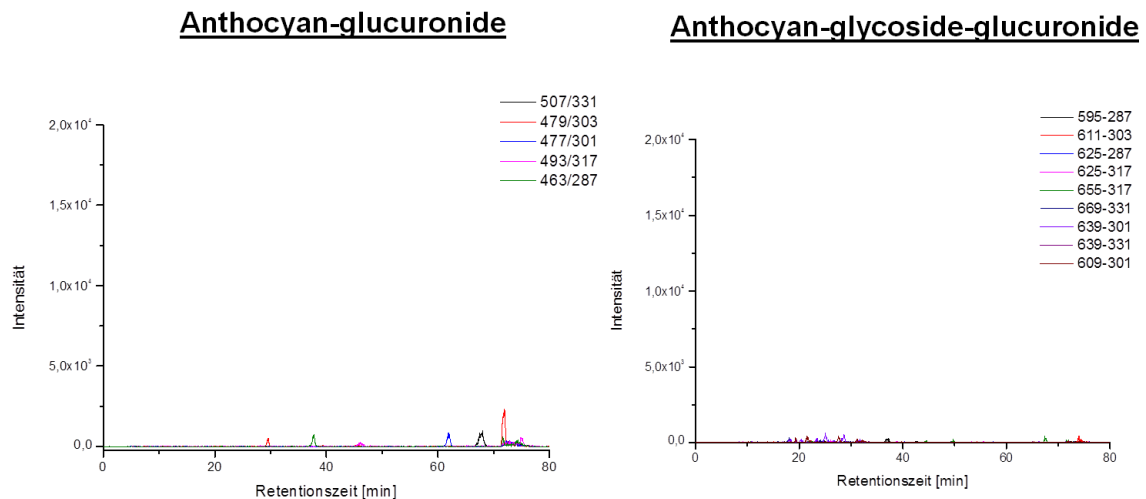


Abbildung 34: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogram mit MRM-Übergängen einer Urinprobe (mögliche Anthocyanin-glycoside-glucuronide: Del-glc-glucuro: Delphinidin-glucosid-glucuronid, Cy-glc-glucuro: Cyanidin-glucosid-glucuronid, Del-ara-glucuro: Delphinidin-arabinosid-glucuronid, Cy-glc-glucuro: Cyanidin-glucosid-glucuronid, Pet-ara-glucuro: Petunidin-arabinosid-glucuronid, Pet-glc-glucuro: Petunidin-glucosid-glucuronid, Mal-glc-glucuro: Malvidin-glucosid-glucuronid, Peo-glc-glucuro: Peonidin-glucosid-glucuronid, Mal-ara-glucuro: Malvidin-arabinosid-glucuronid, Peo-ara-glucuro: Peonidin-arabinosid-glucuronid).

Das Screening nach Anthocyanin-glycosiden und Anthocyanin-glycosiden-glucuroniden in Ileostomaflüssigkeiten zeigte nur sehr geringe Intensitäten (siehe Abbildung 35). Diese Ergebnisse wurden ausführlich im Teil I der vorliegenden Arbeit diskutiert (Mueller et al., 2017).

Ileo5_A_0-1h
(MRM)



➡ Sehr geringe Intensitäten für Glucuronide im Ileobeutel

Abbildung 35: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogram mit MRM-Übergängen im Dünndarminhalt (mögliche Anthocyanin-glycoside-glucuronide: Cy-glc-glucuro: Cyanidin-glucosid-glucuronid (m/z 595/287), Del-ara-glucuro: Delphinidin-arabinosid-glucuronid (m/z 611/303), Cy-glc-glucuro: Cyanidin-glucosid-glucuronid (m/z 625/287), Pet-ara-glucuro: Petunidin-arabinosid-glucuronid (m/z 625/317), Pet-glc-glucuro: Petunidin-glucosid-glucuronid (m/z 655/317), Mal-glc-glucuro: Malvidin-glucosid-glucuronid (m/z 669/331), Peo-glc-glucuro: Peonidin-glucosid-glucuronid (m/z 639/301), Mal-ara-glucuro: Malvidin-arabinosid-glucuronid (m/z 639/331), Peo-ara-glucuro: Peonidin-arabinosid-glucuronid (m/z 609/301), Anthocyanidin-glucuronide: Cy-glucuro: Cyanidin-glucuronid (m/z 463/287), Del-glucuro: Delphinidin-glucuronid (m/z 479/303), Peo-glucuro: Peonidin-glucuronid (m/z 477/301), Mal-glucuro: Malvidin-glucuronid (m/z 507/331).

Der Vergleich der Anthocyane und Metabolite im Urin und Ileostomaflüssigkeiten der Probanden zeigt, dass glucuronidierte Formen der Anthocyanidine nur im Urin und nicht in den Dünndarminhalten detektiert wurden (Abbildung 36). Anthocyanidin-glycoside-glucuronide konnten weder in Urin, Plasma und Ileostomaflüssigkeiten während der Studie detektiert werden. Die Ergebnisse sind ausführlich im Teil I der vorliegenden Arbeit diskutiert (Mueller et al., 2017).

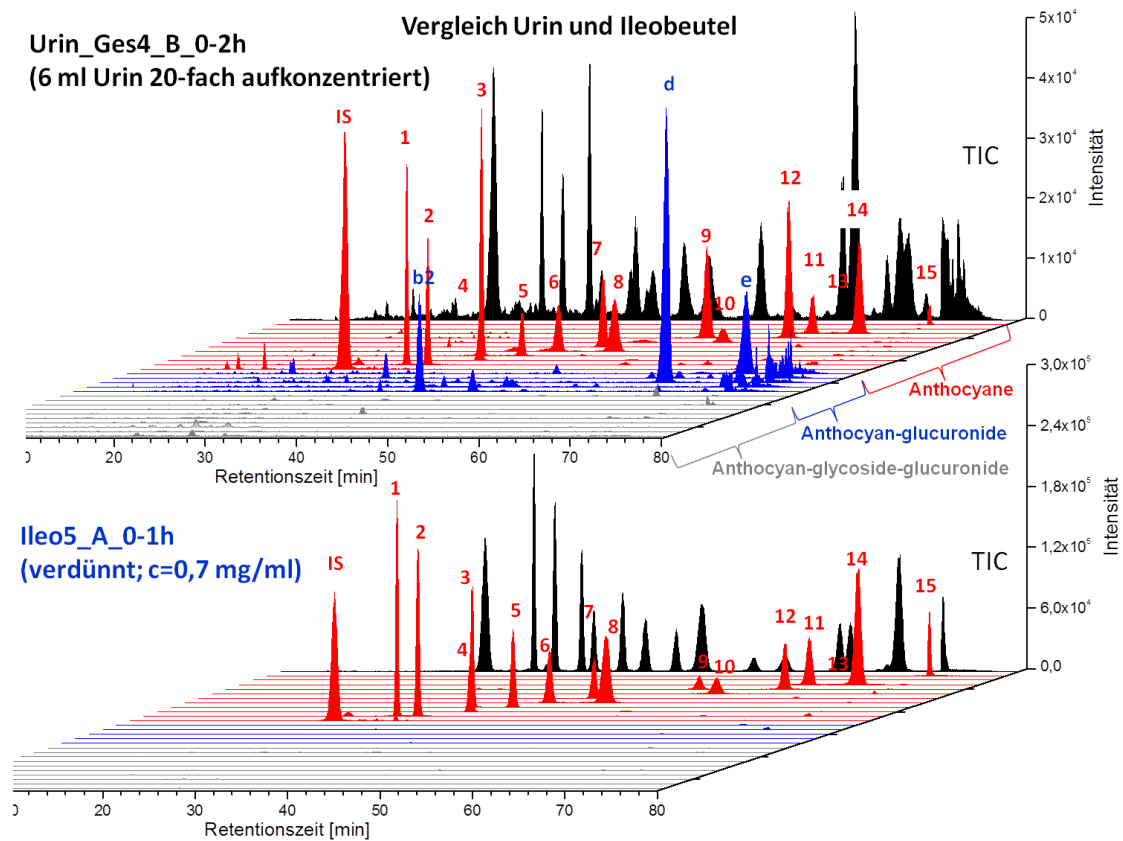


Abbildung 36: Vergleich der HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramme von Urin 20-fach nach SPE aufkonzentriert und Ileostomaflüssigkeit (verdünnt, C= 0,7mg/ml). MRM-Übergänge der Anthocyane, Anthocyan-glucuronide und Anthocyan-glycoside-glucuronide in der TIC-Ansicht (TIC= total ion current).

6.2.5.2 Quantifizierung von Anthocyanen mittels HPLC-UV/VIS und HPLC-DAD

Zur Bestimmung des Anthocyanengehaltes des verwendeten HBE, der Urin und Ileostomaproben der Studie wurde eine HPLC-UV/VIS- Methode verwendet, welche bereits von Schantz und Mueller et al. erfolgreich etabliert wurde (Schantz, 2011; Mueller et al., 2012). Die Konzentrationen von 15 für die Heidelbeere spezifische Anthocyane (Delphinidin, Cyanidin, Petunidin, Malvidin und Peonidin mit den Zuckerresten Glucose, Galactose und Arabinose) wurden bestimmt. Als interner Standard diente Delphinidin-3,5-diglucosid (Delphin), welches von natur aus nicht in der Wildheidelbeere vorkommt. Die Kalibrierung der im Extrakt enthaltenen Anthocyanidin-glukoside erfolgte als Cyanidin-3-O-glucosid Äquivalente. Für den Extrakt wurde ein Gesamtanthocyanengehalt von 24% ermittelt. Die Angaben des Herstellers zum untersuchten Extrakt sind in Kapitel 3 näher erläutert. Im Laufe des Projektes wurde ein DAD-Detektor gegen den bisherigen UV/VIS-Detektor ausgetauscht. Die Methode musste bezüglich des Gradientenverlaufs nicht verändert werden. Das Absorptionsmaximum der Minorkomponenten lag beim DAD-Detektor im Gegensatz zum UV/VIS-Detektor bei 540 nm. Eine neue Kalibrierung mit Cy-3-glc wurde in diesem Wellenlängenbereich durchgeführt. Für beide Systeme (HPLC-UV/VIS und HPLC-DAD) wurden Kalibriergeraden im Bereich von 0,2 bis 2 µmol/ml mit der Zugabe des internen Standards Delphinidin-2,5-diglucosid aufgenommen. Die Linearitätskoeffizienten lagen bei $R^2 = 0,999$ und einem LOQ von 0,002 µmol/L.

HPLC-UV/Vis-System 1:

- Entgaser: DG-2080-53 3-Line Degasser, Jasco
- Pumpe: PU-2080 Intelligent HPLC-Pump, Jasco
- Autosampler: AS-2055/2057 Intelligent Autosampler
- Injektor: AS-2055 Plus intelligent Sampler
- Detektor: UV-2075 Plus Intelligent UV/Vis Detektor. Jasco
- Software: ChromPass Chromatography Data System, Jasco

HPLC-UV/Vis-System 2:

- Entgaser: DG-2080-53 3-Line Degasser, Jasco
- Pumpe: PU-2080 Intelligent HPLC-Pump, Jasco
- Autosampler: AS-2055/2057 Intelligent Autosampler, Jasco
- Injektor: AS-2055 Plus intelligent Sampler, Jasco

- Detektor: DAD-Detektor, MD 2010 Plus, Jasco
- Software: ChromPass Chromatography Data System, Jasco

Allgemeine Parameter:

- Säule: Luna 3 µm C18 (2) 100Å (250 x 4.60 mm), Phenomenex
- Wellenlänge: 520 nm (UV-Detektor), 540 nm (DAD-Detektor)
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Fließmittel A: H₂O/ACN/HCOOH (87/3/10)
- Fließmittel B: H₂O/ACN/HCOOH (40/50/10)

Gradientenverlauf:

Zeit [min]	Fließmittel B[%]	Fluss [ml/min]
0	2	0,5
20	14	0,5
25	14	0,5
33	14	0,3
40	14	0,3
50	15	0,5
55	19	0,5
65	20	0,5
65.1	99	0,5
70	99	0,5
70.1	2	0,5
75	2	0,5

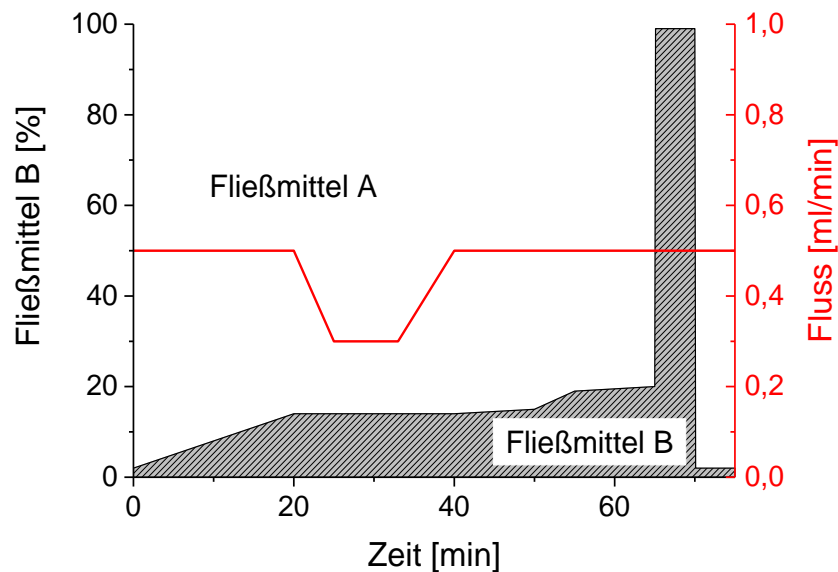


Abbildung 37: Graphische Darstellung des HPLC-Gradientenverlaufs und der Flussrate.

6.2.5.3 Quantifizierung von Anthocyanen mittels HPLC-ESI_{pos}-MS/MS

Die Quantifizierung der Anthocyane im Plasma der Probanden erfolgte nach Aufkonzentration durch Festphasenextraktion (Methode siehe Kapitel 6.2.7.3) aufgrund der gering zu erwartenden Konzentrationen mittels HPLC-ESI-MS/MS im positiven MRM-Modus (multi reaction mode). Die verwendete Methode ist im Teil I der vorliegenden Arbeit ebenso beschrieben (Mueller et al., 2017).

Allgemeine Parameter der HPLC- ESI_{neg}-MS/MS-Methode:

- Säule: Luna 3 µm C18 (2) 100Å (250 x 4.60 mm, Phenomenex)
- Massenspektrometer API 3200: MRM-Modus
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Fließmittel A: Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (92/3/5 v/v)
- Fließmittel B: Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (45/50/5 v/v)
- Flow: 0,5 ml/min

Tabelle 15: Gradientenverlauf der verwendeten HPLC-Methode

Zeit [min]	Fließmittel B[%]
0	2
20	14
40	14
50	15
55	19
65	20
65,1	99
70	99
70,1	2
80	2

Gerätespezifische Parameter:

- (CUR) Curtain Gas: 30,00
- (IS) IonSpray Voltage: 5000 V
- (TEM) Temperature: 450 C°
- (GS1) Gas 1: 50 psi
- (GS2) Gas 2: 40 psi

Substanzspezifische Parameter:

Tabelle 16: Masse-Ladungsverhältnisse [m/z] der Prekursor- und ausgewählte Fragmentionen, Optimierte substanzspezifische Parameter für IS: Interner Standard, Del-gal: Delphinidin-3-galaktosid, Del-glc: Delphinidin-3-glukosid, Cy-gal: Cyanidin-3-galaktosid, Del-ara: Delphinidin-3-arabinosid, Cy-glc: Cyanidin-3-glukosid, Cy-gluc: Cyanidin-3-glucuronid, Pet-gal: Petunidin-3-galaktosid, Cy-ara: Cyanidin-3-arabinosid, Pet-glc: Petunidin-3-glukosid (DP: Declustering Potential; EP: Entrance Potential; CE: Collision Energy; CEP: Cell Entrance Potential; CXP: Cell Exit Potential) und Retentionszeiten.

	IS	Del-gal	Del-glc	Cy-gal	Del-ara	Cy-glc	Cy-gluc	Pet-gal	Cy-ara	Pet-glc
Prekursorion [m/z]	627	465	465	449	435	449	463	479	419	479
Fragmention [m/z]	303	303	303	287	303	287	287	317	287	317
DP [V]	76,0	66,0	66,0	66,0	61,0	66,0	71,0	71,0	66,0	71,0
EP [V]	9,0	9,0	9,0	7,0	7,0	7,0	8,0	8,0	10,0	8,0
CEP [V]	29,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	23,0	20,0	20,0	20,0
CE [V]	49,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	33,0	31,0
CXP [V]	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0	26,0	28,0	28,0	24,0	28,0
Retentionszeit [min]	22,3	27,6	29,9	32,9	34,2	37,3	37,9	39,8	43,2	46,0

Tabelle 17: Masse-Ladungsverhältnisse [m/z] der Prekursor- und ausgewählte Fragmentionen, Optimierte substanzspezifische Parameter für Peo-gal: Peonidin-3-galaktosid, Pet-ara: Petunidin-3-arabinsid, Peo-glc: Peonidin-3-glukosid, Mal-gal: Malvidin-3-galaktosid, Peo-glc: Peonidin-glucuronid, Peo-ara: Peonidin-3-arabinsid, Mal-glc: Malvidin-3-glukosid, Mal-glc: Malvidin-glucuronid, Mal-ara: Malvidin-3-arabinsid glukosid (DP: Declustering Potential; EP: Entrance Potential; CE: Collision Energy; CEP: Cell Entrance Potential; CXP: Cell Exit Potential) und Retentionszeiten.

	Peo-gal	Pet-ara	Peo-glc	Mal-gal	Peo-glc	Peo-ara	Mal-glc	Mal-glc	Mal-ara
Prekursorion [m/z]	463	449	463	493	477	433	493	507	463
Fragmention [m/z]	301	317	301	331	301	301	331	331	331
DP [V]	66,0	71,0	66,0	71,0	66,0	71,0	71,0	66,0	66,0
EP [V]	10,0	8,0	10,0	10,0	10,0	5,0	10,0	10,0	10,0
CEP [V]	22,0	23,0	22,0	22,0	24,0	22,0	22,0	25,0	23,0
CE [V]	29,0	31,0	29,0	31,0	29,0	29,0	31,0	29,0	29,0
CXP [V]	26,0	28,0	26,0	28,0	26,0	26,0	28,0	26,0	26,0
Retentionszeit [min]	51,7	54,9	60,6	61,8	61,9	65,5	66,9	67,8	71,6

Die Kalibriergeraden aller Analyten in Plasma wurden im Bereich zwischen 0,002 bis 2 $\mu\text{mol/l}$ aufgenommen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 lag bei mindestens 0,999. Die Bestimmungsgrenze (LOQ) der Analyten lag bei 0,0002 $\mu\text{mol/l}$ bei einem Signal zu Rausch Verhältnis von 6.

6.2.6 Analytik von Anthocyanabbauprodukten

6.2.6.1 Identifizierung von Abbauprodukten

Die Identifizierung von Anthocyanabbauprodukten erfolgte mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Methode, welche bei Mueller et al. im Detail beschrieben ist (Mueller et al., 2017). Nach erfolgter Extraktion wurden Urin, Plasma und Ileostomaflüssigkeiten mittels HPLC-MS/MS analysiert. Die Identifizierung ausgewählter Abbauprodukte wie Phenolcarbonsäuren Gallussäure (GA, 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure), Protocatechusäure (PCA, 3,4-Dihydroxybenzoe-

säure), 3-O-Methylgallussäure (MAG, 4,5-Dihydroxy-3-methoxybenzoesäure), 4-Hydroxybenzoesäure (HBA), Vanillinsäure (VA, 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure) und Syringasäure (SA, 3,5-Dimethoxy-4-hydroxybenzoesäure) und Phloroglucinolaldehyd (PGA) sowie 4-Hydroxybenzaldehyd (HBAL) erfolgte mittels Referenzsubstanzen. Zunächst erfolgte ein Q1 Scan der Referenzsubstanz (Standard). Daraus konnte die Massenspur des Moleküls extrahiert werden. Das Produktionenspektrum des Standards zu einer bestimmten Retentionszeit wurde betrachtet. Durch den Vergleich der Referenzspektren mit den vorhandenen Fragmenten mit den Spektren der Urin, Plasma und Ileostomaproben der Probanden war eine Identifizierung der Abbauprodukte in den Studienproben möglich. Abbildung 38 zeigt schematisch die Identifizierung mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS. Im Anhang (Kapitel 7, Abbildungen 59-70) sind die referenzspezifischen Chromatogramme, Produktionenspektren, Q1-Scans und Chromatogramme zu den spezifischen MRM-Übergänge für die untersuchten Abbauprodukte im Einzelnen (beispielhaft für eine representative Urinprobe) dargestellt.

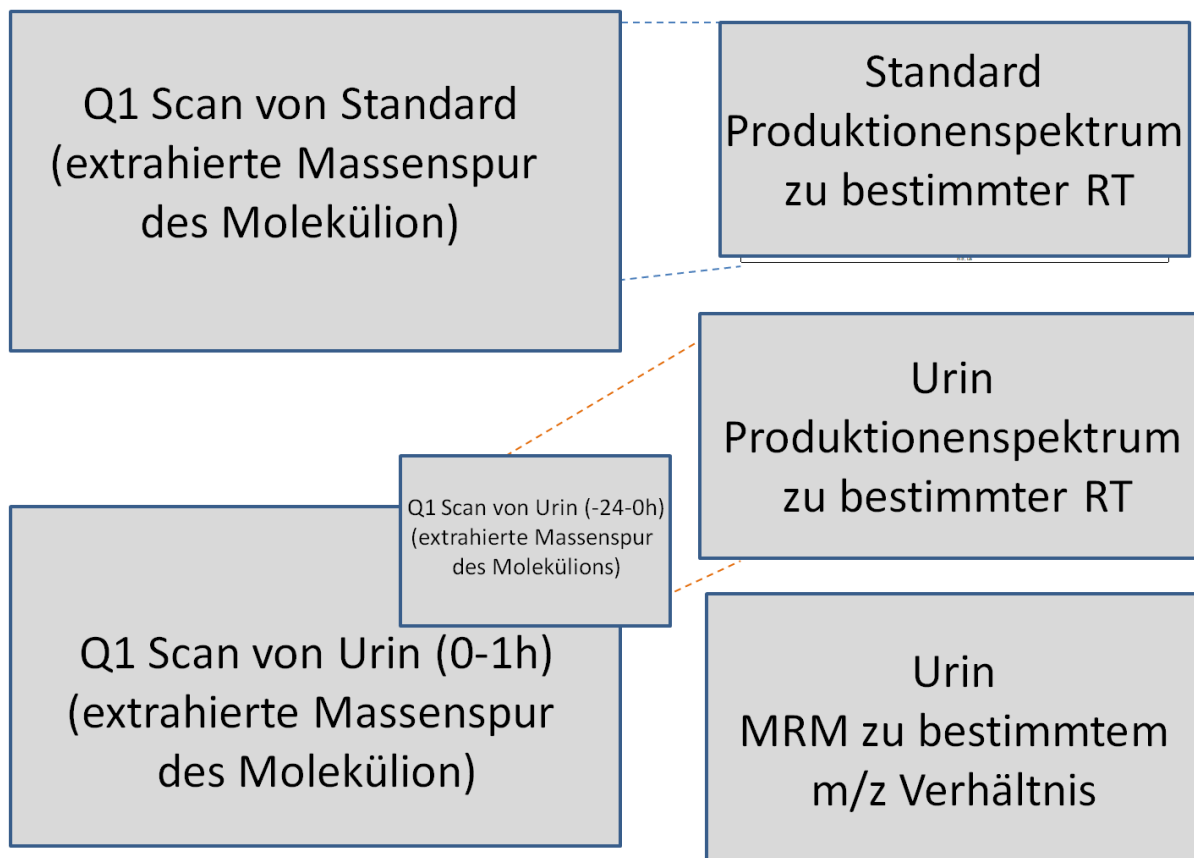


Abbildung 38: Schema zur Identifizierung der Abbauprodukte in Urin, Plasma, Ileostomaproben der Probanden mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS und geeigneten Referenzsubstanzen.

6.2.6.2 Quantifizierung von Abbauprodukten mittels HPLC-DAD

Da Anthocyane unter physiologischen Bedingungen (pH-Wert) instabil sind und schnell abgebaut werden können (Woodward et al., 2009), ist es wichtig die Studienproben auf Anthocyanabbauprodukte zu untersuchen. Da die Anthocyanabbauprodukte im Gegensatz zu den Anthocyanen auch bei geringeren Ameisensäurekonzentrationen stabil sind, wurde eine HPLC-DAD Methode mit geringer Säurekonzentration (0,1% Ameisensäure) etabliert. Als interner Standard wurde 3,4,5 Trimethylphenylelessigsäure verwendet. Im Folgenden sind der HPLC-Gradient und die Fließmittelzusammensetzung dargestellt, welche zu einer erfolgreichen Trennung der repräsentativen Standards führte.

Allgemeine Parameter:

- Säule: Luna 3 µm C18 (2) 100Å (250 x 4.60 mm), Phenomenex
- Wellenlänge 280
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Fließmittel A: Wasser/Ameisensäure (99,9/0,1, v/v)
- Fließmittel B: Acetonitril
- Flow: 0,5 ml/min

Gradientenverlauf:

Zeit [min]	Fließmittel B[%]
0	10
15	10
25	15
35	15
40	35
50	35
50,1	10
55	10

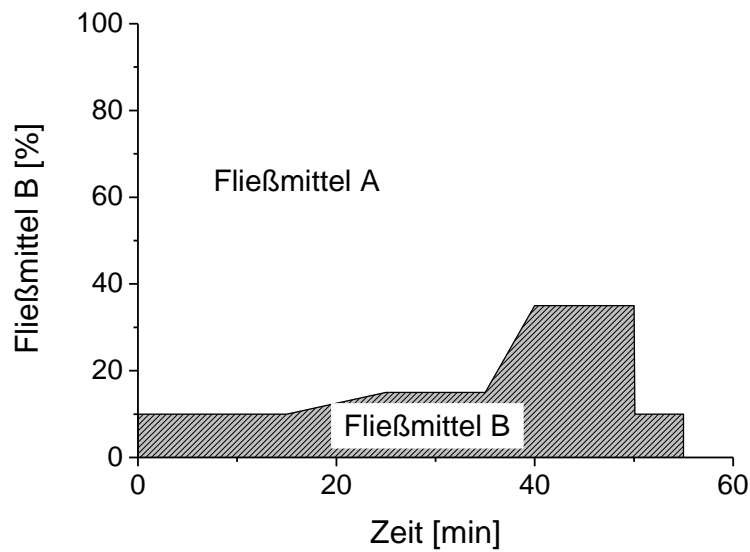


Abbildung 39: Graphische Darstellung des HPLC-Gradientenverlaufs

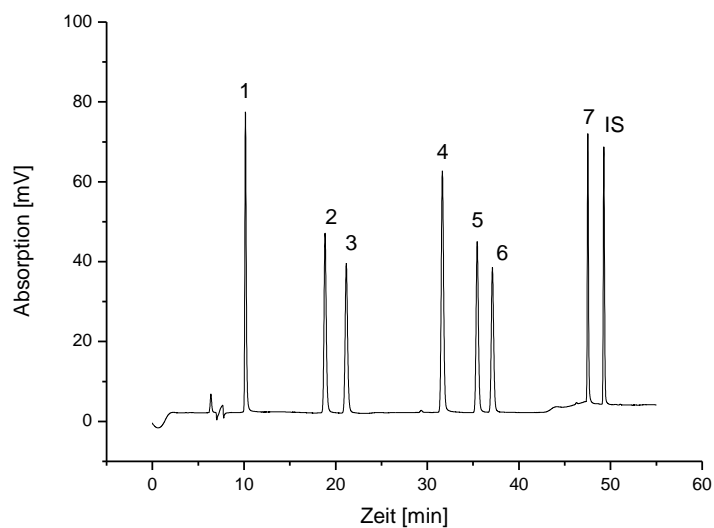


Abbildung 40: HPLC-UV/VIS-Chromatogramm der Anthocyanabbauprodukte (10 µg/ml + 100 µg/ml IS; 280 nm), Gallussäure (1), Protocatechusäure (2), 3-O-Methylgallussäure (3), 4-Hydroxybenzoesäure (4), Vanillinsäure (5), Syringasäure (6), Phloroglucinolaldehyd- (7), 3,4,5 Trimethylphenylelessigsäure (IS: Interner Standard) verwendete Säule: Luna 3 µm C18 (2) 100Å (250 x 4.60 mm, Phenomenex).

Zur Überprüfung der Stabilität der Standards und der Genauigkeit der HPLC-Methode wurden die Varianzen von Messung zu Messung (n=5) und von Tag zu Tag (n=5) ermittelt. Es zeigt sich, dass die Varianzen von Messung zu Messungen zwischen 0-0,5% und von Tag zu Tag zwischen 0,01-3,1% lagen (Tabelle 18).

Tabelle 18: Standardabweichungen und Varianzen der einzelnen Abbauprodukte und des verwendeten internen Standards (Trimethylphenylelessigsäure) von Messung zu Messung (n=5) und Tag zu Tag (n=5).

Substanz	SD [%]	Varianz [%]	SD [%]	Varianz [%]
	Messung zu Messung (n=5)		Tag zu Tag (n=5)	
Gallussäure	0,49	0,03	4,67	3,07
Protocatechusäure	0,22	0,01	0,54	0,04
3-O-Methylgallussäure	0,23	0,01	0,36	0,01
4-Hydroxybenzoesäure	0,25	0,01	0,42	0,03
Vanillinsäure	0,17	0,00	0,32	0,01
Syringasäure	0,14	0,00	0,23	0,01
Phloroglucinolaldehyd	2,19	0,52	4,38	2,17
Trimethylphenylelessigsäure (IS)	0,13	0,00	0,63	0,04

6.2.6.3 Quantifizierung von Abbauprodukten mittels HPLC-ESI_{neg}-MS/MS

Da die Anthocyanabbauprodukte im Gegensatz zu den Anthocyanen (Absorptionsmaximum 520-540 nm) bei einem Wellenlängenbereich von 270-300 nm absorbieren, ist es schwierig mit einem Diodenarray-Detektor diese Analyte in humanen Proben zu quantifizieren. Urin, Plasma und Ileostomaflüssigkeit enthalten Komponenten, die auch in diesem Wellenlängenbereich absorbieren und mit den gewünschten Analyten coeluieren können. Dies führt zu Absorptionsinterferenzen, die nicht mehr eindeutig einer Struktur zugeordnet werden können. Aus diesem Grund wurde eine UV-unabhängige Detektions- und Quantifizierungsmethode mittels HPLC-MS/MS entwickelt. Bei der entwickelten Methode handelt es sich um eine MRM-Methode (Multiple Reaction Monitoring). Hierbei kann sehr selektiv das Prekursorion mit seinem intensivsten Fragmention quantifiziert werden. Die Methode wurde in drei verschiedene Zeitperioden unterteilt, um die Selektivität der einzelnen Massenspuren zusätzlich zu verbessern (Abbildung 44). Die Methode ist im Teil I der vorliegenden Arbeit bereits im Detail beschrieben (Mueller et al., 2017).

Allgemeine Parameter der HPLC- ESI_{neg}-MS/MS-Methode:

- Säule: Luna 3 µm C18 (2) 100Å (250 x 4.60 mm, Phenomenex)
- Massenspektrometer API 3200: MRM-Modus (negativ)
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Fließmittel A: Wasser/Essigsäure (99,5/0,5, v/v)
- Fließmittel B: Acetonitril
- Flow: 0,5 ml/min

Tabelle 19: Gradientenverlauf der verwendeten HPLC-Methode.

Zeit [min]	Fließmittel B[%]	Periode
0	10	1
15	10	1
25	15	1
35	15	2
40	35	2
44	35	2
52	35	3
52,1	90	3
55	90	3
55,1	10	3
60	10	3

Gerätespezifische Parameter - Periode 1:

- (CUR) Curtain Gas: 30,00 psi
- (IS) IonSpray Voltage: -4500,00 V
- (TEM) Temperature: 700,00 C°
- (GS1) Gas 1: 60,00 psi
- (GS2) Gas 2: 40,00 psi

Gerätespezifische Parameter - Periode 2/3:

- (CUR) Curtain Gas: 25,00 psi
- (IS) IonSpray Voltage: -4000,00 V
- (TEM) Temperature: 700,00 C°
- (GS1) Gas 1: 50,00 psi
- (GS2) Gas 2: 70,00 psi

Substanzspezifische Parameter:

Tabelle 20: Masse-Ladungsverhältnisse [m/z] der Prekursor- und ausgewählte Fragmentionen, Optimierte substanzspezifische Parameter für GA: Gallussäure, PCA: Protocatechusäure, MGA: Methylgallussäure, HBA: 4-Hydroxybenzoesäure, VA: Vanillinsäure, SA: Syringasäure, HBAL: Hydroxybenzaldehyd, PGA: Phloroglucinolaldehyd (DP: De-clustering Potential; EP: Entrance Potential; CE: Collision Energy; CEP: Cell Entrance Potential; CXP: Cell Exit Potential) und Retentionszeiten.

	GA	PCA	MGA	HBA	VA	SA	HBAL	PGA	IS
Prekursorion [m/z]	169	153	183	137	167	197	121	153	196
Fragmention [m/z]	125	109	139	93	123	125	92	125	134
DP [V]	-35,0	-35,0	-40,0	-30,0	-45,0	-40,0	-45,0	-40,0	-30,0
EP [V]	-5,0	-4,0	-8,5	-4,0	-5,5	-9,5	-5,0	-3,5	-10,5
CEP [V]	-12,0	-10,0	-10,0	-12,0	-12,0	-20,0	-14,0	-12,0	-14,0
CE [V]	-22,0	-22,0	-24,0	-24,0	-16,0	-18,0	-32,0	-24,0	-24,0
CXP [V]	0,0	-2,0	-2,0	0,0	-2,0	-4,0	0,0	0,0	-2,0
Periode	1	1	1	2	2	2	2	3	3
Retentionszeit [min]	11,0	21,2	24,5	33,3	37,5	40,0	42,0	47,2	51,0

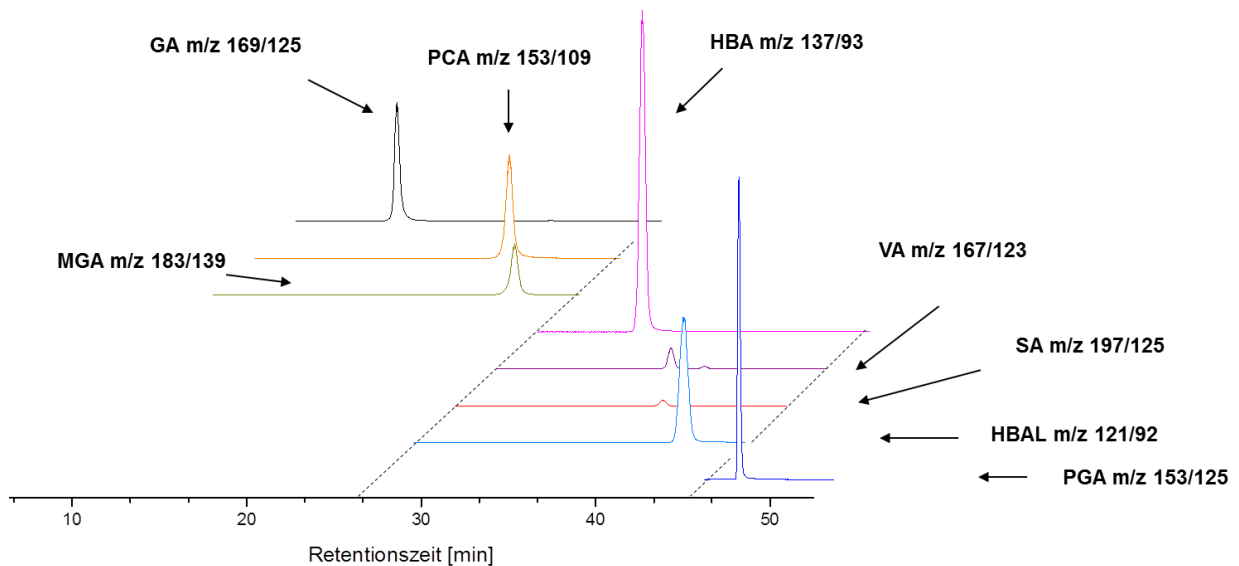


Abbildung 41: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogram mit Massenübergängen von GA: Gallussäure m/z 169/125 (schwarz), PCA: Protocatechusäure m/z 153/109 (gelb), MGA: Methylgallussäure m/z 183/139 (grün), HBA: Hydroxybenzoesäure m/z 137/93 (pink), VA: Vanilinsäure m/z 167/123 (violett), SA: syringasäure m/z 197/125 (rot), HBAL: Hydroxybenzaldehyd m/z 121/92 (hellblau), PGA: Phloroglucinolaldehyd m/z 153/125 (dunkelblau), Standardlösung 1 µg/ml gemessen im MRM-Modus.

Die Kalibriergeraden aller Analyten in Humanurin, Plasma und Ileofluid wurden im Bereich von 0,003 bis 6 µmol/l aufgenommen und das Bestimmtheitsmaß lag bei R² von mindestens 0,99. Die Bestimmungsgrenzen der Analyten lagen je nach m/z Verhältnis zwischen 0,003 und 0,190 µmol/L bei einem Signal zu Rausch Verhältnis von 6.

6.2.7 Extraktionsmethoden zur Probenvorbereitung

6.2.7.1 Extraktion der Kapselsysteme

Die Extraktion der Kapseln (MPK und CPK) zur Analyse der Anthocyangehalte erfolgte anhand zweier verschiedener Methoden (siehe Abbildung 42).

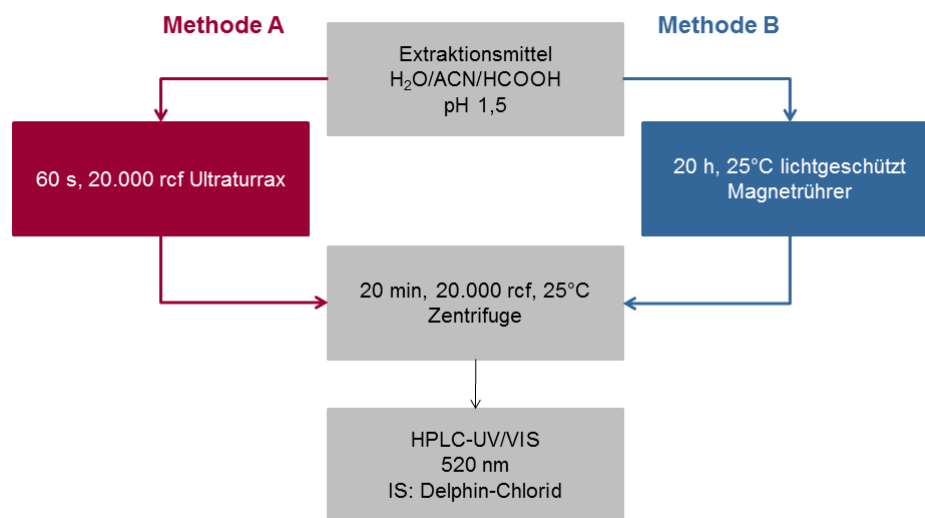


Abbildung 42: Vergleichende Darstellung der Probenaufarbeitungsschritte zur Quantifizierung der Anthocyankonzentrationen in den Kapselsystemen (Methode A: MPK und Methode B: CPK) (siehe Mueller et al. 2018).

Mittels Ultraturrax wurden die Molkeproteinkapseln aufgeschlossen. Für die Citruspektinkapseln erfolgte der Aufschluss mittels Rühren über Nacht, damit es nicht zu einem Verklumpen der Schellackschicht führt (Mueller et al., 2018). Anschließend wurden die Anthocyane in den Proben mittels HPLC-UV/VIS (siehe Methode Kapitel 6) identifiziert.

6.2.7.2 Extraktion der Dünndarmflüssigkeiten

Da Anthocyane an Proteine binden können und um die Vollständigkeit der Extraktion zu überprüfen, wurden die Extraktions- bzw. Wiederfindungsraten der einzelnen Anthocyane ermittelt. Dem Inhalt eines Ileostomabeutels (–12 bis 0 h Beutel) wurde eine definierte HBE-Menge zugesetzt, die Probe homogenisiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und

gefriergetrocknet. Anschließend wurde das Homogenisat extrahiert und nach einem Zentrifugationsschritt mittels HPLC-UV/VIS analysiert (Abbildung 43).



Abbildung 43: Methodenentwicklung zur Isolierung von Anthocyanen aus Ileostomabeutelininhalt.

Die **Wiederfindungen** lagen im Bereich der systemischen Abweichung der Extraktions- und Messmethode. Die im Vergleich zu den anderen Anthocyanen geringe Wiederfindung für Peonidin-3-O-arabinosid ist auf dessen niedrigen Gehalt im Extrakt nahe der Quantifizierungsgrenze zurückzuführen.

Tabelle 21: Wiederfindung der Anthocyane des HBE (12,5 mg/ml) aus Ileostomabeutelinhalt nach Probenaufarbeitung (n=3).

Anthocyan	Wiederfindung [%]	Standardabweichung [%]
1 Del-3-gal	94	4
2 Del-3-glc	101	8
3 Cy-3-gal	102	9
4 Del-3-ara	106	8
5 Cy-3-glc	110	13
6 Pet-3-gal	107	13
7 Cy-3-ara	107	11
8 Pet-3-glc	85	7
9 Peo-3-gal	101	7
10 Pet-3-ara	100	11
11 Peo-3-glc	104	9
12 Mal-3-gal	106	9
13 Peo-3-ara	64	4
14 Mal-3-glc	105	8
15 Mal-3-ara	101	17

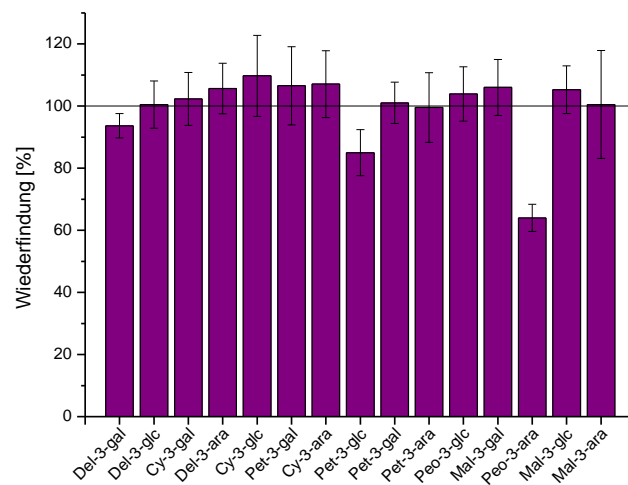


Abbildung 44: Graphische Darstellung der Extraktions-/ bzw. Wiederfindungsraten einzelner Anthocyane aus Ileostomabeutelinhalt. 100% entsprechen 12,5 µg/ml HBE (Del-3-gal: Delphinidin-3-galaktosid, Del-3-glc: Delphinidin-3-glukosid, Cy-3-gal: Cyanidin-3-galaktosid, Del-3-ara: Delphinidin-3-arabinosid, Cy-3-glc: Cyanidin-3-glukosid, Pet-3-gal: Petunidin-3-galaktosid, Cy-3-ara: Cyanidin-3-arabinosid, Pet-3-glc: Petunidin-3-glukosid, Peo-3-gal: Peonidin-3-galaktosid, Pet-3-ara: Petunidin-3-arabinosid, Peo-3-glc: Peonidin-3-glukosid, Mal-3-gal: Malvidin-3-galaktosid, Peo-3-ara: Petunidin-3-arabinosid, Mal-3-glc: Malvidin-3-glukosid, Mal-3-ara: Malvinidin-3-arabinosid).

Die Ileostomabeutelinhalte der Interventionsstudie Teil I (Verzehr von HBE) und Teil II (Verzehr von MPK) wurden mittels Ultraturax und einem Gemisch aus Wasser/Acetonitril/Ameisensäure (87/3/10) extrahiert (Extraktion A) und anschließend mittels HPLC-UV/VIS analysiert (Methode siehe Kapitel 6.2.5.2). Für diese Extraktion lagen die Wiederfindungen bei 101 ± 5 % (Abbildung 45). Die Methode unter Verwendung des Ultraturax konnte bei den Proben aus der Interventionsstudie Teil II (Verzehr von CPK) nicht angewendet werden. Diese Proben enthielten Schellack, welcher durch zu starken mechanischen Aufschluss verklebte und die Anthocyane binden könnte, was zu einer unvollständigen Wiederfindung führen kann. Aus diesem Grund wurden die Ileostomabeutelinhalte nach Citruspektinkapselverzehr mittels Extraktionsverfahren B extrahiert und anschließend mittels HPLC-UV/VIS analysiert (Methode siehe Kapitel 6.2.5.2). Für diese Methode lagen die Wiederfindungen der einzelnen Anthocyane bei 95 ± 7 % (Abbildung 45).

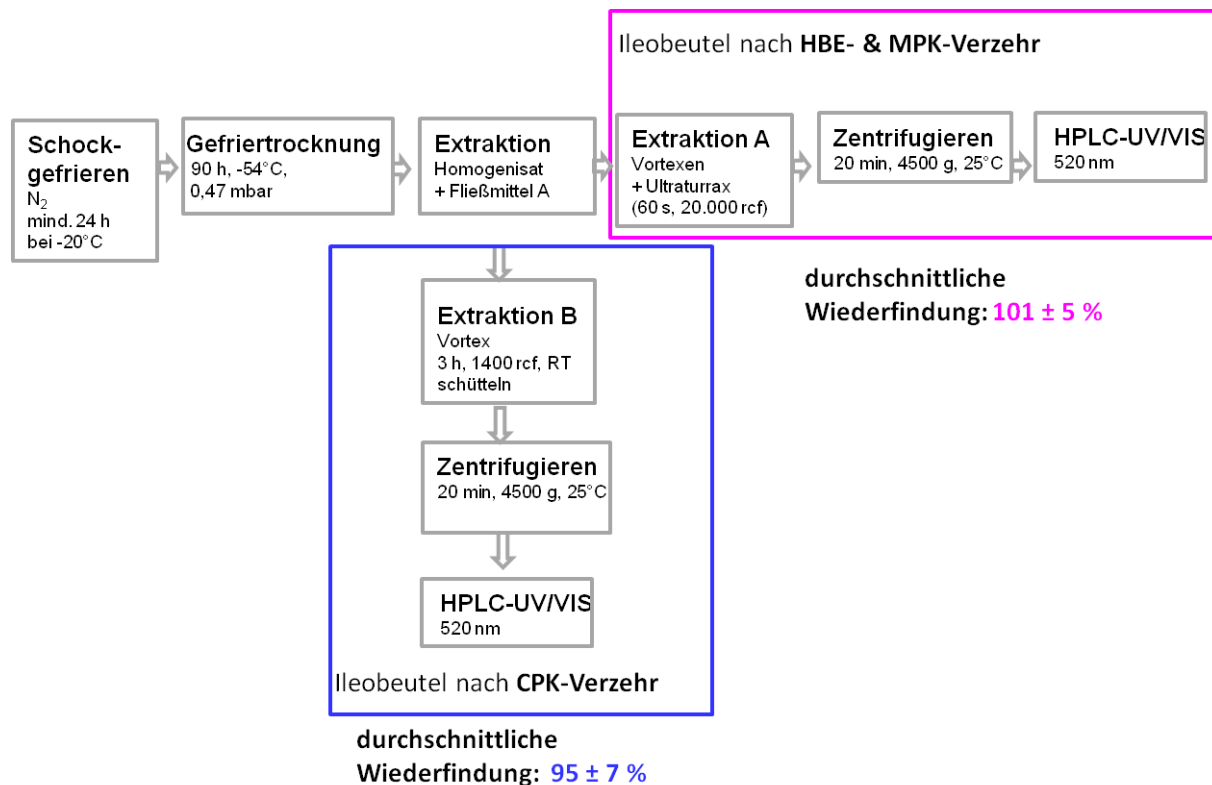


Abbildung 45: Extraktionsverfahren zur Bestimmung von Anthocyanen aus Ileostomabeutelinhalt: Extraktion A: nach HBE- und MPK-Verzehr, Extraktion B: nach CPK-Verzehr.

6.2.7.3 Festphasenextraktion von Anthocyanen und Abbauprodukten aus Urin

Der Urin von Probanden nach Verzehr von Heidelbeerextrakt konnte nicht direkt zur Analyse der Anthocyane eingesetzt werden. Aus bisherigen Studien war bekannt, dass nur ein geringer Anteil an Anthocyanen (ca. 1-2%) über den Urin ausgeschieden wurde (Felgines et al., 2003; Hollands et al., 2008). Die im Urin enthaltenen Anthocyankonzentrationen lagen dadurch meist unter der Quantifizierungsgrenze. Eine Möglichkeit zur Aufkonzentration der Analyten bietet die Festphasenextraktion. Hierbei wird die Probe auf ein Sorbensmaterial (Festphase) aufgegeben, wobei die gewünschten Analyten mit dem Sorbens wechselwirken und adsorbieren. Danach können die Analyte mit einem geeigneten Lösungsmittel (gute Wechselwirkung zwischen Lösungsmittel und Analyt), eluiert werden. Mittels Vakuumzentrifugation kann das Lösungsmittel entfernt werden, wodurch eine Anreicherung der Probe möglich ist. Nach der Zentrifugation kann das Konzentrat in wenig Lösungsmittel, welches sich für die weitere Analyse eignet, aufgenommen werden.

Für die Humanproben (Urin, Plasma) im laufenden Projekt war es wichtig, neben Anthocyanen auch deren Metabolite und Abbauprodukte mittels Festphasenextraktion (SPE) zu erfassen. Im Folgenden ist die Durchführung der Festphasenextraktion für die Urinproben

der Probanden dargestellt. Man wählte ein geeignetes Festphasenmaterial, welches vor der Beladung mit der Probe konditioniert und equilibriert wurde. Danach wurde die Probe eluiert, aufkonzentriert und die Analyte mittels HPLC-DAD analysiert.

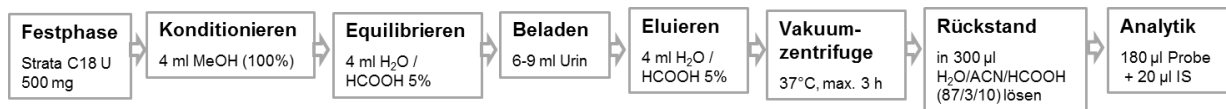


Abbildung 46: Fließschema zur Durchführung der Aufreinigung und Anreicherung von Anthocyanen und Metaboliten aus Humanurin mittels Festphasenextraktion.

Wiederfindung der Anthocyane nach Festphasenextraktion

Um die Wiederfindungen der Anthocyane nach SPE und das am besten geeignete Sorbensmaterial zu ermitteln, wurden zunächst einige Tests im Lösungsmittel (humane Matrix wurde hier noch nicht verwendet) durchgeführt (siehe Methode in Abbildung 46). Anthocyanreicher Heidelbeerextrakt wurde in Wasser (mit HCl auf pH 2,5 angesäuert) gelöst (Konzentration: 20 µg/ml, entsprach den im Urin zu erwartenden Konzentrationen) und auf verschiedene Festphasensäulen gegeben. Getestet wurden Strata C18 E 200 mg (Phenomenex), Strata X 100 mg (Phenomenex) und Strata C18 U 500 mg (Phenomenex). Bei den Strata C18-Säulen handelt es sich um Reversed Phase (RP) Materialien mit unpolaren Octadecylsilyl-Gruppen, die durch Silanisierung an das Kieselgelgerüst gebunden sind. Der Unterschied der Bezeichnung E und U beschreibt die vorhandene Polarität des Materials. E bedeutet „endcapped“, wobei sterisch weniger zugängliche Hydroxygruppen durch einen weiteren Silanisierungsschritt durch Anlagerung unpolarer Ketten (-CH₃) modifiziert werden. Im Gegensatz dazu bezeichnet U „unendcapped“; hier sind noch freie Hydroxygruppen vorhanden, die mit Analyten wechselwirken können (z.B. Ausbildung von Wasserstoffbrücken). Die Strata X ist eine Reversed Phase mit polymeren Seitenketten. Es handelt sich hierbei um unpolare Ketten, die eine andere sterische Ausrichtung als die C18-Materialien aufweisen, was auch zu Unterschieden in den Van-der Waals-Wechselwirkungen mit den Analyten führen können. In Abbildung 50 sind die Wiederfindungen der 15 Anthocyane aus dem eingesetzten Wildheidelbeerextrakt nach SPE dargestellt.

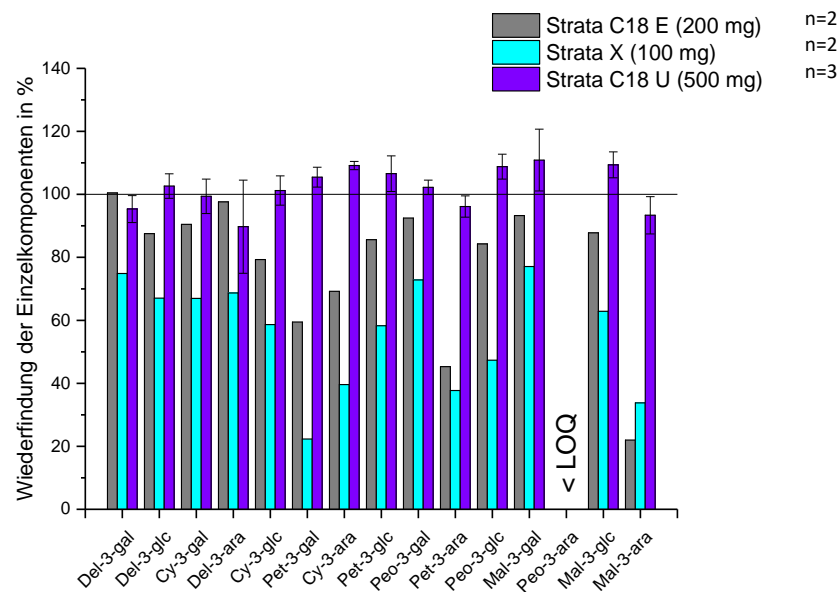


Abbildung 47: Vergleich der Wiederfindung der Anthocyane aus Wild Heidelbeerextrakt nach Durchführung verschiedener Festphasenmethoden ($n = 2-3$), 100% entsprechen 20 $\mu\text{g/ml}$ HBE (Del-3-gal: Delphinidin-3-galaktosid, Del-3-glc: Delphinidin-3-glukosid, Cy-3-gal: Cyanidin-3-galaktosid, Del-3-ara: Delphinidin-3-arabinosid, Cy-3-glc: Cyanidin-3-glukosid, Pet-3-gal: Petunidin-3-galaktosid, Cy-3-ara: Cyanidin-3-arabinosid, Pet-3-glc: Petunidin-3-glukosid, Peo-3-gal: Peonidin-3-galaktosid, Pet-3-ara: Petunidin-3-arabinosid, Peo-3-glc: Peonidin-3-glukosid, Mal-3-gal: Malvidin-3-galaktosid, Peo-3-ara: Petunidin-3-arabinosid, Mal-3-glc: Malvidin-3-glukosid, Mal-3-ara: Malvinidin-3-arabinosid; LOQ: Limit of quantification).

Für die Strata X ergaben sich mit durchschnittlich 54% die geringsten Wiederfindungen für die Anthocyane. Mit der Strata C18 E konnten bessere Wiederfindungen erreicht werden (durchschnittlich 75%), wobei das beste Ergebnis mit den Strata C18 U Säulen, mit einer durchschnittlichen Wiederfindung von 100%, am erfolgreichsten war. Mit diesem Material sollen künftig alle Urinproben aufkonzentriert werden, da es sich für die Anreicherung von Anthocyanen am besten eignet. Die Wiederfindung von Peonidin-3-O-arabinosid konnte bei allen drei getesteten Materialien nicht bestimmt werden, da es nur in sehr geringen Konzentrationen im verwendeten Heidelbeerextrakt vorkommt und die Peaks nach der SPE unter der Bestimmungsgrenze lagen. Die Durchführung der Methode ist bei Mueller et al. beschrieben (Mueller et al., 2017).

Wiederfindung der Anthocyane in Humanurin nach SPE

Bei der Etablierung einer SPE-Methode ist es wichtig die Matrixeffekte der Probe zu berücksichtigen. Urin enthält neben reinem Lösungsmittel Elektrolyte, Harnsäure, Kreatinin und weitere renale Ausscheidungsprodukte, die Einfluss auf die zu untersuchenden Analyte ausüben können. Diese Matrixeffekte kann man durch Wiederfindungsexperimente in humanem Urin untersuchen. Hierzu wurden von drei verschiedenen Probanden ‚polyphenolfreie‘ Urine (nach der Washout -Phase) mit HCl auf pH 2,5 angesäuert und mit Heidelbeerextrakt in bekannter Konzentration (20 µg/ml) versetzt. Die SPE wurde durchgeführt (Abbildung 46) und die Wiederfindungen wurden mittels HPLC-DAD bestimmt. In Abbildung 48 sind die Wiederfindungen nach Festphasenextraktion der Anthocyane in reinem Wasser den Wiederfindungen nach Festphasenextraktion in humanem Urin gegenübergestellt. Es ist zu erkennen, dass die Wiederfindungen vieler Anthocyane nach Festphasenextraktion in der Matrix etwas geringer ausfielen im Vergleich zur Festphasenextraktion im reinen Lösungsmittel. Die größeren Wiederfindungen für Petunidin-3-O-galactosid und Peonidin-3-O-galactosid im Vergleich zu den anderen Anthocyanen kommen möglicherweise durch Überlagerungseffekte mit Bestandteilen des Urins selbst zustande. Die Wiederfindung von Peonidin-3-O-arabinosid konnte nicht bestimmt werden, da es nur in sehr geringen Konzentrationen im verwendeten Heidelbeerextrakt vorkommt und die Peaks nach der SPE unter der Bestimmungsgrenze lagen. Im Durchschnitt lagen die Wiederfindungen der Anthocyane nach Festphasenextraktion im Urin bei 82% und somit wurde für die weitere Analytik der Urinproben der Studie diese SPE-Methode für die weitere Analytik verwendet. Mit der gewählten Festphasenextraktion konnte nun eine 20-fache Anreicherung von Anthocyanen aus humanen Urinproben erfolgen.

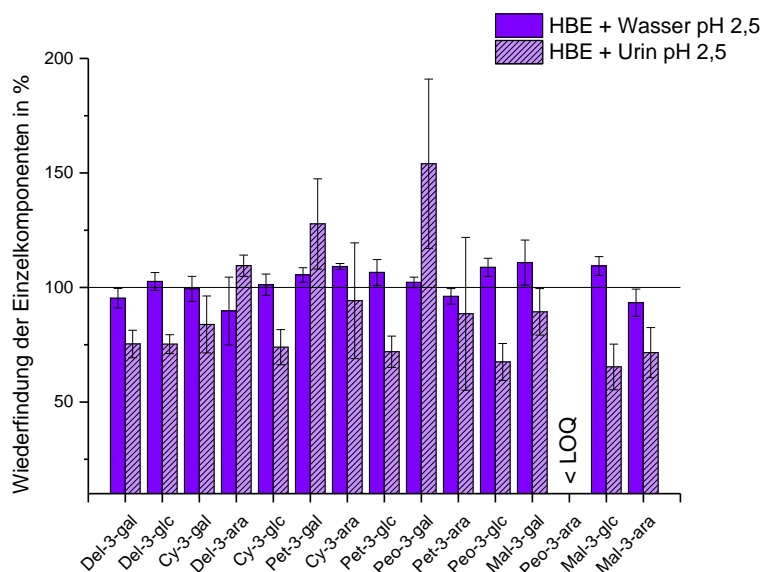


Abbildung 48: Vergleich der Wiederfindungen der Anthocyane in Wasser und Urin nach SPE, Strata C18 U 500 mg ($n=3$), 100% entsprechen 20 $\mu\text{g/ml}$ HBE (Del-3-gal: Delphinidin-3-galaktosid, Del-3-glc: Delphinidin-3-glukosid, Cy-3-gal: Cyanidin-3-galaktosid, Del-3-ara: Delphinidin-3-arabinosid, Cy-3-glc: Cyanidin-3-glukosid, Pet-3-gal: Petunidin-3-galaktosid, Cy-3-ara: Cyanidin-3-arabinosid, Pet-3-glc: Petunidin-3-glukosid, Peo-3-gal: Peonidin-3-galaktosid, Pet-3-ara: Petunidin-3-arabinosid, Peo-3-glc: Peonidin-3-glukosid, Mal-3-gal: Malvidin-3-galaktosid, Peo-3-ara: Petunidin-3-arabinosid, Mal-3-glc: Malvidin-3-glukosid, Mal-3-ara: Malvinidin-3-arabinosid; LOQ: Limit of quantification).

Wiederfindung der Anthocyanabbauprodukte in Urin nach SPE

Die Erfassung der Wiederfindungen der Anthocyanabbauprodukte, Gallussäure (GA), Protocatechusäure (PCA), 3-O-Methylgallussäure (MAG), 4-Hydroxybenzoesäure (HBA), Vanillinsäure (VA), Syringasäure (SA) und Phloroglucinolaldehyd (PGA) nach Festphasenextraktion, wurde analog zu der verwendeten Methode für die Isolierung der Anthocyanen mit der Strata C18 U (500 mg) durchgeführt. Die Anthocyanabbauprodukte wurden in bekannter Konzentration (Endkonzentration: 5 $\mu\text{g/ml}$) zu Wasser (pH 2,5) und ‚polyphenolfreiem‘ Urin (pH 2,5) gegeben und die SPE wurde wie in Abbildung 49 beschrieben durchgeführt. Die Wiederfindungen nach Applikation aus reinem Wasser (pH 2,5) lagen im Durchschnitt bei 102% und nach Applikation aus Urin bei 106%.

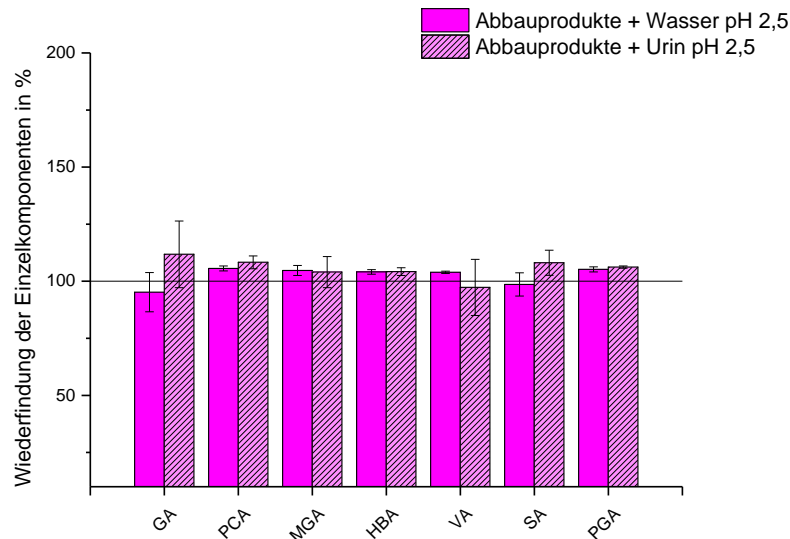


Abbildung 49: Vergleich der Wiederfindung von Phenolcarbonsäuren + Phloroglucinolaldehyd nach Festphasenextraktion aus Wasser bzw. Urin, Strata C18 U 500 mg (n=3). 100% entsprechen 5 µg/ml Abbauprodukte (GA: Gallussäure, PCA: Protocatechusäure, MGA: Methylgallussäure, HBA: 4-Hydroxy-Benzoesäure, VA: Vanilinsäure, SA: Syringasäure, PGA: Phloroglucinolaldehyd).

6.2.7.4 Festphasenextraktion von Anthocyanen und Abbauprodukten aus Plasma

Bei der Optimierung der Probenenaufarbeitung des Urins stellte sich heraus, dass die Strata-C18-U Kartusche (Phenomenex, Aschaffenburg) für eine Aufkonzentration von Anthocyanen und deren Abbauprodukten geeignet war. Diese Methode war allerdings nicht zwangsläufig für die Plasmaproben übertragbar. Im Plasma sind im Gegensatz zum Urin vermehrt Proteine enthalten, die die Analytik stören können. Um die Plasmaproben der Studie so aufzureinigen, dass möglichst viele Proteine und Salze eliminiert werden, war ein zusätzlicher Waschschrift während der SPE-Durchführung notwendig. Dies führte allerdings zu einer geringeren Wiederfindung, vor allem bei den getesteten Anthocyanabbauprodukten (die Wiederfindungen der Anthocyane lagen bei 95%, die der Anthocyanabbauprodukten unter 50%, getestet ohne Matrix). Nach vielen Testungen mit verschiedenen Sorbensmaterialien stellte sich heraus, dass mit den konventionellen SPE-Methoden eine geeignete Wiederfindung der Anthocyane und ihrer Abbauprodukte nicht ausreichend möglich war. Aufgrund der unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften der Phenolsäuren und der Anthocyane, konnten nur ausreichende Wiederfindungen mit unterschiedlichen Sorbens-

materialen für die verschiedenen Substanzklassen erzielt werden. Daraus ergab sich im Laufe des Projektzeitraumes die Idee, zwei unterschiedliche Sorbensmaterialien, zum einen das Strata X Material (Reversed Phase von Styroldivinylbenzol-Ketten mit δ -Lactam Resten, gut geeignet für Bindung von Phenolsäuren) und zum anderen das Strata C18-U Material von Phenomenex (unendcapped Reversed Phase mit C-18 Kohlenwasserstoffketten, gut geeignet für Anthocyane) in einer SPE-Kartusche übereinander zu schichten.

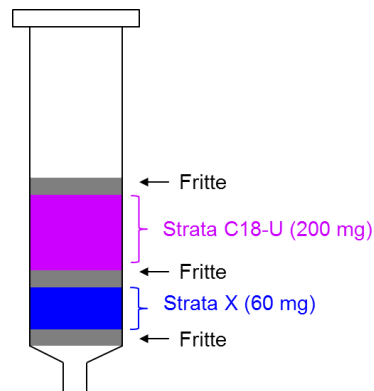


Abbildung 50: Selbstbeschichtete SPE-Kartusche mit zwei unterschiedlichen Sorbensmaterialien (Strata C18-U, Strata X, beide Phenomenex) zur Erfassung der Anthocyane und dessen Abbauprodukte aus Plasmaproben. Eine Strata X (60 mg/3 ml) Kartusche wurde zusätzlich mit 200 mg Strata C18-U Material beschichtet.

Der Vorteil dieser Kartuschenkombination (mit zwei verschiedenen Materialien) war, dass sowohl die unpolarenen größeren Anthocyane und die polarenen kleineren Phenolsäuren gut gebunden und aufkonzentriert werden konnten. Durch die Überschichtung des Strata X-Materials mit dem C18-U Material binden zunächst beim Beladen der Probelösung (Plasma) alle Anthocyane und Phenolsäuren am oberen C-18-U Material. Bei einem zusätzlichen Waschschriff mit Wasser (Unterschied zur Urin SPE-Methode), um die Proteine in der Probe zu entfernen, wechselwirken die polarenen Phenolsäuren mit dem Wasser und lösen sich vom C18-U Sorbens ab. Wenn kein weiteres Sorbens, mit dem die Phenolsäuren wechselwirken können, in der Kartusche vorhanden ist, werden die Phenolsäuren zu einem großen Teil schon durch das Waschen eluiert und stehen dadurch der eigentlichen Analytik nicht mehr zu Verfügung. Durch das Aufbringen des zusätzlichen Strata X-Materials werden die Phenolsäuren beim Waschen gebunden und konnten im folgenden Schriff der Extraktion gleichzeitig mit den Anthocyanen eluiert werden. Der Vorteil dieser Durchführung liegt darin, die Probe waschen zu können, um Störkomponenten wie Proteine und Salze zu eliminieren

und gleichzeitig keine Verluste von polaren Phenolsäuren zu erhalten. Die genaue Durchführung der SPE für die Plasmaproben ist in Abbildung 51 dargestellt.

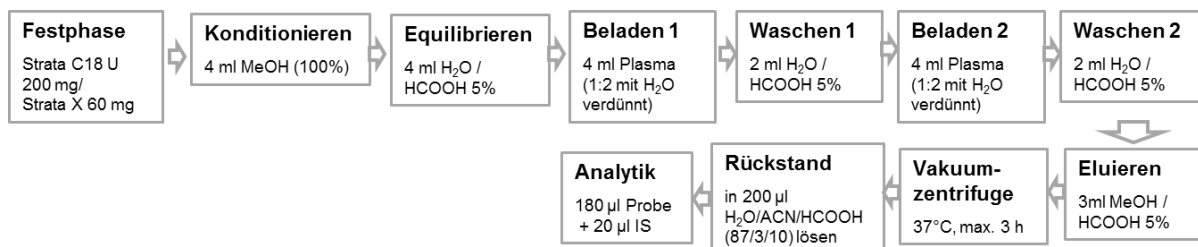


Abbildung 51: Durchführung der Festphasenextraktion zur gleichzeitigen Aufkonzentration von Anthocyanen und deren Abbauprodukten in Plasma.

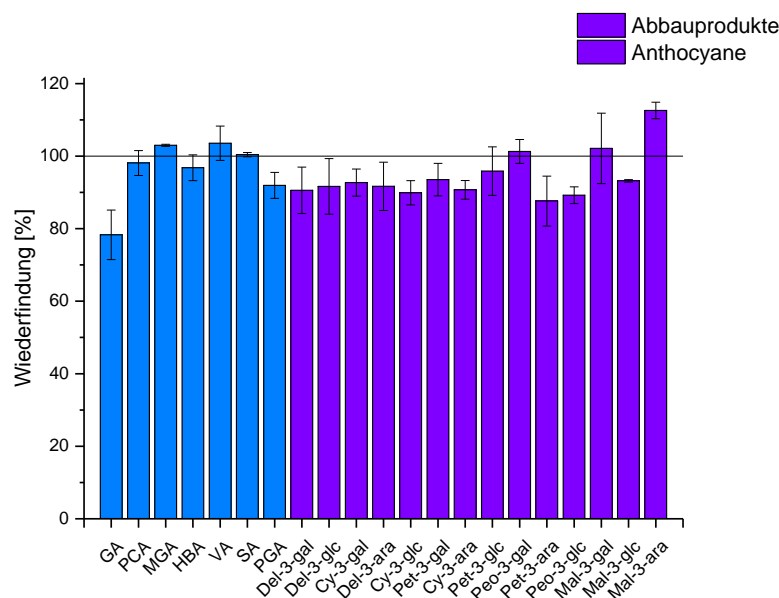


Abbildung 52: Wiederfindungen der Anthocyane und Phenolsäuren nach SPE (in Wasser gelöst, pH 2,5). 100% entsprechen für die Anthocyane 20 µg/ml HBE und 5 µg/ml Abbauprodukte. (GA: Gallussäure, PCA: Protocatechusäure, MGA: Methylgallussäure, HBA: 4-Hydroxy-Benzoessäure, VA: Vanilinsäure, SA: Syringasäure, PGA: Phloroglucinolaldehyd, Del-3-gal: Delphinidin-3-galaktosid, Del-3-glc: Delphinidin-3-glukosid, Cy-3-gal: Cyanidin-3-galaktosid, Del-3-ara: Delphinidin-3-arabinosid, Cy-3-glc: Cyanidin-3-glukosid, Pet-3-gal: Petunidin-3-galaktosid, Cy-3-ara: Cyanidin-3-arabinosid, Pet-3-glc: Petunidin-3-glukosid, Peo-3-gal: Peonidin-3-galaktosid, Pet-3-ara: Petunidin-3-arabinosid, Peo-3-glc: Peonidin-3-glukosid, Mal-3-gal: Malvidin-3-galaktosid, Peo-3-ara: Petunidin-3-arabinosid, Mal-3-glc: Malvidin-3-glukosid, Mal-3-ara: Malvinidin-3-arabinosid).

Die Wiederfindungen in angesäuertes Wasser (pH 2,5) lagen sowohl für die Anthocyane bei $95 \pm 7\%$ und für die Phenolsäuren und Phloroglucinolaldehyd bei $96 \pm 9\%$ (siehe Abbildung 52).

Für die Anthocyane lag die durchschnittliche Wiederfindung im Plasma bei $91 \pm 15\%$, wobei für Mal-3-ara nur $55 \pm 11\%$ nach SPE im Vergleich zur Ausgangskonzentration vor Zugabe zum Plasma detektiert werden konnte (Abbildung 53). Die durchschnittlichen Wiederfindungen der Anthocyanabbauprodukte lagen bei $84 \pm 15\%$ nach Substanzaddition zu polyphenolfreiem Plasma (Abbildung 53).

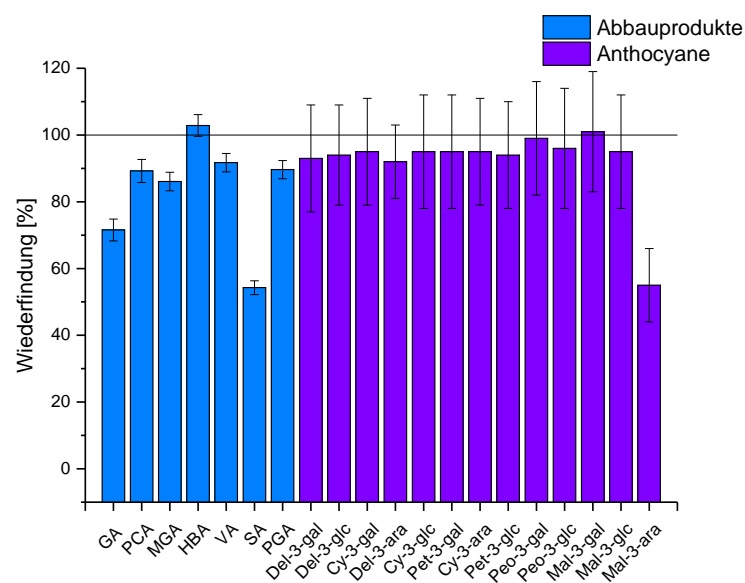


Abbildung 53: Wiederfindungen der Anthocyane und Phenolsäuren nach SPE aus Plasma. 100% entsprechen für die Anthocyane $20 \mu\text{g/ml}$ HBE und $5 \mu\text{g/ml}$ Abbauprodukte. (GA: Gallussäure, PCA: Protocatechusäure, MGA: Methylgallussäure, HBA: 4-Hydroxybenzoesäure, VA: Vanilinsäure, SA: Syringasäure, PGA: Phloroglucinolaldehyd Del-3-gal: Delphinidin-3-galaktosid, Del-3-glc: Delphinidin-3-glukosid, Cy-3-gal: Cyanidin-3-galaktosid, Del-3-ara: Delphinidin-3-arabinosid, Cy-3-glc: Cyanidin-3-glukosid, Pet-3-gal: Petunidin-3-galaktosid, Cy-3-ara: Cyanidin-3-arabinosid, Pet-3-glc: Petunidin-3-glukosid, Peo-3-gal: Peonidin-3-galaktosid, Pet-3-ara: Petunidin-3-arabinosid, Peo-3-glc: Peonidin-3-glukosid, Mal-3-gal: Malvidin-3-galaktosid, Peo-3-ara: Petunidin-3-arabinosid, Mal-3-glc: Malvidin-3-glukosid, Mal-3-ara: Malvidin-3-arabinosid)

Auffallend sind die geringen Wiederfindungen für Gallussäure ($71 \pm 3\%$) und Syringasäure ($54 \pm 2\%$). Der Grund hierfür könnten Bindungen zwischen den Anthocyanen und Abbauverbindungen mit den Plasmaproteinen sein. Zu diesen Wechselwirkungen existieren derzeit nur wenige Daten. Wiese et al. konnten jedoch eine Bindung von Cy-3-glc an

Proteine nachweisen und eine Bindung von Gallussäure konnte von Zhang et al. belegt werden (Wiese, Gartner, Rawel, Winterhalter, & Kulling, 2009; Y. Zhang, Dong, Li, & Chen, 2008). Diese Wechselwirkungen zwischen Anthocyanabbauprodukten und Proteinen könnte der Grund für die geringe Wiederfindung aus Plasmamatrix sein. Die Verringerung der Wiederfindung ist bei Anthocyanen jedoch kaum zu erkennen (nur bei Mal-3-ara). Diese unterschiedliche Abnahme der Wiederfindung von Anthocyanen und ihren Abbauprodukten im reinen Lösungsmittel zur Probenmatrix könnte evtl. dadurch erklärt werden, dass auch Anthocyane an die Plasmaproteine binden, jedoch diese Bindungen durch eine stärkere Wechselwirkung mit dem SPE-Kartuschenmaterial aufgehoben werden.

6.2.8 Herstellung der Kapseln

6.2.8.1 Molkenproteinkapseln (MPK)

Die verwendeten Molkenproteinkapseln (MPK) wurden von der Arbeitsgruppe Kulozik (TU München, D) hergestellt (Abbildung 54). In eine 30 %ige Molkeproteinlösung, hergestellt aus WPI BiPro[®] Proteinisolat (94% (w/w)) von Davigo Foods International Inc. (Le Sueur, MN, USA) und destilliertem Wasser, wurde langsam HBE-Pulver zugegeben und gelöst. Mit verdünnter HCl (Merck, Darmstadt, D) wurde ein pH-Wert von 1,5 eingestellt und auf eine Endkonzentration von 20% Molkeprotein und ca. 10% HBE verdünnt. Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert (5000 g, 2 min), um die nichtlöslichen Bestandteile abzutrennen. Die Mikroverkapselung wurde durch Emulgieren und thermische Gelbildung durchgeführt. Dabei wurde durch Erhitzen bei 50 °C und langsamen Rühren eine Emulsion aus HBE-/Molkenproteinlösung und Sonnenblumenöl hergestellt. Anschließend wurde die hergestellte Emulsion in 6 min auf 80 °C erhitzt und für weitere 10 min bei 80 °C erhitzt, wodurch die Proteine denaturierten und gelartige Kapseln bildeten. Danach wurde die Suspension auf 20 °C gekühlt und der Ölrückstand durch Zentrifugation (1000 g, 2 min) abgetrennt (siehe Abbildung 54). Der mittlere Kapseldurchmesser betrug 200 µm (Betz & Kulozik, 2011). Die Analyse des HBE-Gehaltes, Endkonzentrationen in den Kapseln, wurde bereits in Kapitel 3 dargestellt (siehe auch Mueller et al., 2017, Mueller et al., 2018).

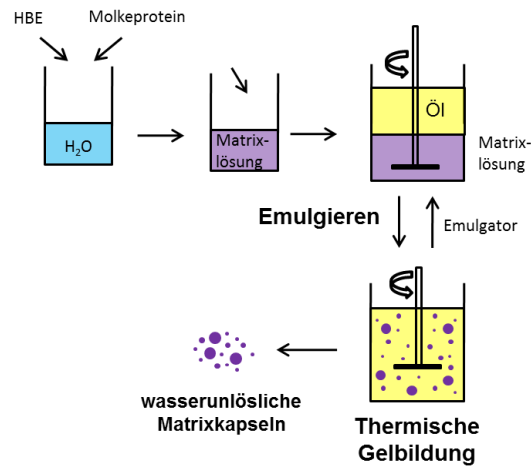


Abbildung 54: Schematische Darstellung der Verkapselung des HBE (Heidelbeerextrakt) mit Molkeprotein (Abbildung von Michael Betz zur Verfügung gestellt, TU München).

6.2.8.2 Citruspektinkapseln (CPK)

Die Citruspektinkapseln wurden von der Arbeitsgruppe Schwarz (Kiel, D) zur Verfügung gestellt (Berg et al., 2012). Zunächst wurde 40% HBE mit 42% Trehalose, 5% hochverestertem Citruspektin (Herbstreith Fox KG, Neuenbürg, D) und 13% Zitronensäure (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D) vermischt und in Wasser gelöst (Abbildung 55). Anschließend wurde die Lösung sprühgetrocknet und die erhaltenen Mikrokapseln mit ethanolischer Schellacklösung (10%) (Schellak: SSB57 Pharma, Stoeber GmbH & Co. KG, Bremen, D) granuliert. Die fertigen Granulate wurden in einem Wirbelschichtverfahren gecoatet, mit einer Einsatzmenge von 25 g Schellack pro 100 g Granulat (siehe Abbildung 58). Nach einer Nachtrocknung wurde das gecoatete Produkt auf eine Zielpartikelgröße von 250-500 µm klassifiziert. Die Endkonzentration an HBE in den Kapseln ist in Kapitel 3 beschrieben (siehe auch Mueller et al., 2017, Mueller et al., 2018).

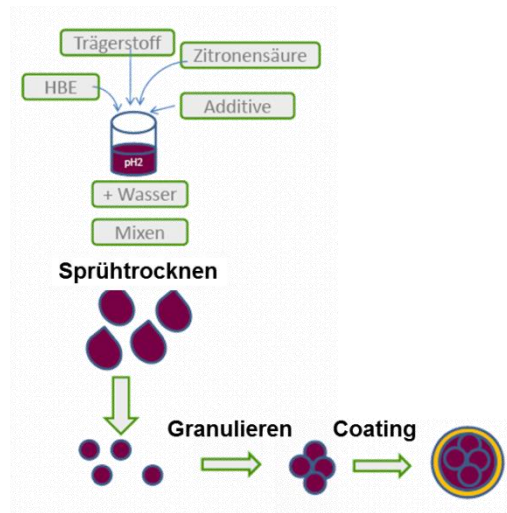


Abbildung 55: Schematische Darstellung der Verkapselung des HBE (Heidelbeerextrakt) mit Citruspektin und Schellak (Abbildung zur Verfügung gestellt von Sonja Berg, Uni Kiel).

7. Literatur

- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Tulipani, S., Casoli, T., Di Stefano, G., González-Paramás, A. M., et al. (2014). One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(3), 289-294.
- Álvarez, P., Alvarado, C., Mathieu, F., Jiménez, L., & De la Fuente, M. (2006). Diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several functions and the redox state of mouse leucocytes. *European Journal of Nutrition*, 45(8), 428-438.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
- Atalay, M., Gordillo, G., Roy, S., Rovin, B., Bagchi, D., Bagchi, M., et al. (2003). Anti-angiogenic property of edible berry in a model of hemangioma. *FEBS Letters*, 544(1-3), 252-257.
- Aura, A. M., Martin-Lopez, P., O'Leary, K. A., Williamson, G., Oksman-Caldentey, K. M., Poutanen, K., et al. (2005). In vitro metabolism of anthocyanins by human gut microflora. *European Journal of Nutrition*, 44(3), 133-142.
- Bansode, S. S., Banarjee, S. K., Gaikwad, D. D., Jadhav, S. L., & Thorat, R. M. (2010). Microencapsulation: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 1(2), 38-43.
- Baum, M., Schantz, M., Leick, S., Berg, S., Betz, M., Frank, K., et al. (2014). Is the antioxidative effectiveness of a bilberry extract influenced by encapsulation? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(11), 2301-2307.
- Bennett, R. N., & Wallsgrave, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127(4), 617-633.
- Berg, S., Bretz, M., Hubbermann, E. M., & Schwarz, K. (2012). Influence of different pectins on powder characteristics of microencapsulated anthocyanins and their impact on drug retention of shellac coated granulate. *Journal of Food Engineering*, 108, 158-165.
- Bermúdez-Soto, M. J., & Tomás-Barberán, F. A. (2004). Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices. *European Food Research and Technology*, 219(2), 133-141.
- Betz, M., & Kulozik, U. (2011). Whey protein gels for the entrapment of bioactive anthocyanins from bilberry extract. *International Dairy Journal*, 21(9), 703-710.

- Betz, M., Tolkach, A., & Kulozik, U. (2010). Acidic whey protein gels for encyapsulation of bioactive plant compounds. *5th International Symposium on Food rheology and structure*, 188-191.
- Burdurlu, H. S., Koca, N., & Karadeniz, F. (2006). Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage. *Journal of Food Engineering*, 74(2), 211-216.
- Cassidy, A. (2017). Berry anthocyanin intake and cardiovascular health. *Molecular Aspects of Medicine*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2017.005.002>.
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Research International*, 44, 499-509.
- Clifford, M. N. (2000). Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1063-1072.
- Collins, A. R. (2000). Measurement of oxidative DNA damage using the comet assay. *Measuring in vivo Oxidative Damage: A Practical Approach*, John Wiley & Sons, 83-94.
- Cooke, D., Schwarz, M., Boocock, D., Winterhalter, P., Steward, W. P., Gescher, A. J., et al. (2006). Effect of cyanidin-3-glucoside and an anthocyanin mixture from bilberry on adenoma development in the Apc(Min) mouse model of intestinal carcinogenesis - Relationship with tissue anthocyanin levels. *International Journal of Cancer*, 119(9), 2213-2220.
- Cooke, D. N., Thomasset, S., Boocock, D. J., Schwarz, M., Winterhalter, P., Steward, W. P., et al. (2006). Development of analyses by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography/tandem mass spectrometry of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins in human plasma and urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7009-7013.
- Czank, C., Cassidy, A., Zhang, Q., Morrison, D. J., Preston, T., Kroon, P. A., et al. (2013). Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a (13)C-tracer study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(5), 995-1003.
- Czank, C., De Ferrars, R., Amin, H., Kroon, P., Zhang, Q., Kalowole, K., et al. (2012). The impact of human metabolism on the bioactivity of anthocyanins. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(OCE2), E181.
- Del Bo, C., Ciappellano, S., Klimis-Zacas, D., Martini, D., Gardana, C., Riso, P., et al. (2010). Anthocyanin absorption, metabolism, and distribution from a wild blueberry-enriched diet (*Vaccinium angustifolium*) is affected by diet duration in the sprague-dawley rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2491-2497.
- Del Bo, C., Martini, D., Porrini, M., Klimis-Zacas, D., & Riso, P. (2015). Berries and oxidative stress markers: an overview of human intervention studies. *Food & Function*, 6(9), 2890-2917.

- Denzer, S. (2014). Modelstudien zur Bindung von Anthocyanen an Humanes Serumalbumin, *Diplomarbeit*, TU Kaiserslautern.
- Desai, K., & Park, H. (2005a). Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 22(2), 179-192.
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005b). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394.
- Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., et al. (2002). Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), 11908-11913.
- EFSA. (2012). Minimum Criteria for the acceptance of in vivo alkaline Comet Assay Reports. *EFSA Journal*, 10(11), 2977.
- Eiro, M. J., & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7461-7466.
- Esselen, M., Barth, S. W., Winkler, S., Baechler, S., Briviba, K., Watzl, B., et al. (2012). Anthocyanins suppress the cleavable complex formation by irinotecan and diminish its DNA-strand-breaking activity in the colon of Wistar rats. *Carcinogenesis*, 34(4), 835-840.
- F. Gibbs, S. K., Inteaz Alli, Catherine N. Mulligan, Bernard. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213-224.
- Fallingborg, J. (1999). Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish Medical Bulletin* (46), 183-196.
- Falungborg, J., Christensen, L., Jacobsen, B., Ingeman-Nielsen, M., Rasmussen, H., Abildgaard, K., et al. (1994). Effect of olsalazine and mesalazine on intraluminal pH of the duodenum and proximal jejunum in healthy humans. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 29(6), 498-500.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510-523.
- Farag, Y., & Leopold, C. S. (2011). Development of shellac-coated sustained release pellet formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(4), 400-405.
- Felgines, C., Krisa, S., Mauray, A., Besson, C., Lamaison, J. L., Scalbert, A., et al. (2010). Radiolabelled cyanidin 3-O-glucoside is poorly absorbed in the mouse. *British Journal of Nutrition*, 103(12), 1738-1745.

- Felgines, C., Talavera, S., Gonthier, M. P., Texier, O., Scalbert, A., Lamaison, J. L., et al. (2003). Strawberry Anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. *Journal of Nutrition*, 133(5), 1296-1301.
- Felgines, C., Talavera, S., Texier, O., Gil-Izquierdo, A., Lamaison, J. L., & Remesy, C. (2005). Blackberry anthocyanins are mainly recovered from urine as methylated and glucuronidated conjugates in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7721-7727.
- Fernandes, I., de Freitas, V., Reis, C., & Mateus, N. (2012). A new approach on the gastric absorption of anthocyanins. *Food & Function*, 3(5), 508-516.
- Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, 7, 54-66.
- Fernandes, I., Faria, A., de Freitas, V., Calhau, C., & Mateus, N. (2015). Multiple-approach studies to assess anthocyanin bioavailability. *Phytochemistry Reviews*, 14(6), 899-919.
- Ferraro, R., Lillioja, S., Fontvieille, A.-M., Rising, R., Bogardus, C., & Ravussin, E. (1992). Lower sedentary metabolic rate in women compared with men. *Journal of Clinical Investigation*, 90(3), 780.
- Ferrars, R., Czank, C., Zhang, Q., Botting, N., Kroon, P., Cassidy, A., et al. (2014). The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. *British Journal of Pharmacology*, 171(13), 3268-3282.
- Fleschhut, J., Kratzer, F., Rechkemmer, G., & Kulling, S. E. (2006). Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*, 45(1), 7-18.
- Forester, S. C., Choy, Y. Y., Waterhouse, A. L., & Oteiza, P. I. (2014). The anthocyanin metabolites gallic acid, 3-O-methylgallic acid, and 2, 4, 6-trihydroxybenzaldehyde decrease human colon cancer cell viability by regulating pro-oncogenic signals. *Molecular Carcinogenesis*, 53(6), 432-439.
- Gallagher, E. P., Kavanagh, T. J., & Eaton, D. I. (1994). Glutathione, oxidized glutathione, and mixed disulfides in biological samples. *Methods in Toxicology*, 1b, 349-366.
- Galvano, F., La Fauci, L., Lazzarino, G., Fogliano, V., Ritieni, A., Ciappellano, S., et al. (2004). Cyanidins: metabolism and biological properties. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(1), 2-11.
- Garrett, E. R. (1994). The Bateman function revisited: a critical reevaluation of the quantitative expressions to characterize concentrations in the one compartment body model as a function of time with first-order invasion and first-order elimination. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, 22(2), 103-128.

- Gershenzon, J., & Kreis, W. (1999). Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glycosides and steroid saponins. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, 2, 222-299.
- Gonzalez-Barrio, R., Borges, G., Mullen, W., & Crozier, A. (2010). Bioavailability of anthocyanins and ellagitannins following consumption of raspberries by healthy humans and subjects with an ileostomy. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 58(7), 3933-3939.
- Halliwell, B. (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of biochemistry and biophysics*, 476(2), 107-112.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2008). Free radicals in biology and medicine. *Oxford university press, England*, 4. Auflage, 850.
- He, & Giusti, M. M. (2010). Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 163-186.
- He, J., Magnuson, B. A., & Giusti, M. M. (2005). Analysis of anthocyanins in rat intestinal contents - Impact of anthocyanin chemical structure on fecal excretion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2859-2866.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Ho, G. T. T., Kase, E. T., Wangensteen, H., & Barsett, H. (2017). Phenolic Elderberry Extracts, Anthocyanins, Procyanidins, and Metabolites Influence Glucose and Fatty Acid Uptake in Human Skeletal Muscle Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(13), 2677-2685.
- Hollands, W., Brett, G. M., Dainty, J. R., Teucher, B., & Kroon, P. A. (2008). Urinary excretion of strawberry anthocyanins is dose dependent for physiological oral doses of fresh fruit. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(10), 1097-1105.
- Hollman, P. C., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., et al. (2011). The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *The Journal of Nutrition*, 141(5), 989S-1009S.
- Hooper, L., Kroon, P. A., Rimm, E. B., Cohn, J. S., Harvey, I., Le Cornu, K. A., et al. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(1), 38-50.
- Hosseini, F. S., & Beta, T. (2007). Saskatoon and wild blueberries have higher anthocyanin contents than other Manitoba berries. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10832-10838.

- Hsieh, R. H., Lien, L. M., Lin, S. H., Chen, C. W., Cheng, H. J., & Cheng, H. H. (2005). Alleviation of Oxidative Damage in Multiple Tissues in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes by Rice Bran Oil Supplementation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1042(1), 365-371.
- Hwang, Y. P., Choi, J. H., Choi, J. M., Chung, Y. C., & Jeong, H. G. (2011). Protective mechanisms of anthocyanins from purple sweet potato against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2081-2089.
- Jaakola, L., Maatta, K., Pirttila, A. M., Torronen, R., Karenlampi, S., & Hohtola, A. (2002). Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiology*, 130(2), 729-739.
- Johnson, S. A., Figueroa, A., Navaei, N., Wong, A., Kalfon, R., Ormsbee, L. T., et al. (2015). Daily blueberry consumption improves blood pressure and arterial stiffness in postmenopausal women with pre-and stage 1-hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 115(3), 369-377.
- Juadjur, A., Mohn, C., Schantz, M., Baum, M., Winterhalter, P., & Richling, E. (2015). Fractionation of an anthocyanin-rich bilberry extract and in vitro antioxidative activity testing. *Food Chemistry*, 167, 418-424.
- Juadjur, A., & Winterhalter, P. (2012). Development of a novel adsorptive membrane chromatographic method for the fractionation of polyphenols from bilberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2427-2433.
- Jyothi, S., Seethadevi, A., Prabha, K. S., Muthuprasanna, P., & Pavitra, P. (2012). Microencapsulation: a review. *International Journal of Pharmacy and Biological Science*, 3, 509-531.
- Kähkönen, M. P., Heinämäki, J., Ollilainen, V., & Heinonen, M. (2003). Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(14), 1403-1411.
- Kahkonen, M. P., & Heinonen, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 628-633.
- Kahle, K., Kraus, M., Scheppach, W., Ackermann, M., Ridder, F., & Richling, E. (2006). Studies on apple and blueberry fruit constituents: do the polyphenols reach the colon after ingestion? *Molecular Nutrition and Food Research*, 50(4-5), 418-423.
- Kakkar, S., & Bais, S. (2014). A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *ISRN Pharmacology*, 2014.

- Kallithraka, S., Mohdaly, A. A.-A., Makris, D. P., & Kefalas, P. (2005). Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(5), 375-386.
- Kalt, W., Liu, Y., McDonald, J. E., Vinqvist-Tymchuk, M. R., & Fillmore, S. A. (2014). Anthocyanin metabolites are abundant and persistent in human urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 3926-3934.
- Kardum, N., Takić, M., Šavikin, K., Zec, M., Zdunić, G., Spasić, S., et al. (2014). Effects of polyphenol-rich chokeberry juice on cellular antioxidant enzymes and membrane lipid status in healthy women. *Journal of Functional Foods*, 9, 89-97.
- Kay, C. D. (2006). Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. *Nutrition Research Reviews*, 19(1), 137-146.
- Kay, C. D., & Holub, B. J. (2002). The effect of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) consumption on postprandial serum antioxidant status in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 88(4), 389-398.
- Kay, C. D., Mazza, G., & Holub, B. J. (2005). Anthocyanins exist in the circulation primarily as metabolites in adult men. *Journal of Nutrition*, 135(11), 2582-2588.
- Kay, C. D., Mazza, G., Holub, B. J., & Wang, J. (2004). Anthocyanin metabolites in human urine and serum. *British Journal of Nutrition*, 91(6), 933-942.
- Kay, C. D., Pereira-Caro, G., Ludwig, I. A., Clifford, M. N., & Crozier, A. (2017). Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: a review of recent evidence. *Annual Review of Food Science and Technology*, 8, 155-180.
- Keppler, K., & Humpf, H.-U. (2005). Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(17), 5195-5205.
- Kern, M., Fridrich, D., Reichert, J., Skrbek, S., Nussler, A., Hofem, S., et al. (2007). Limited stability in cell culture medium and hydrogen peroxide formation affect the growth inhibitory properties of delphinidin and its degradation product gallic acid. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51(9), 1163-1172.
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779.
- Kleiber, M. (1947). Body size and metabolic rate. *Physiological Reviews*, 27(4), 511-541.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., et al. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(3), 560-568.

- Kraus, M., Kahle, K., Ridder, F., Schantz, M., Scheppach, W., Schreier, P., et al. (2010). Colonic availability of bilberry anthocyanins in humans. *ACS symposium series: Flavor and health benefits of small fruits, American Chemical Society, 1035(10)*, 159-176.
- Krems, C., Bauch, A., Götz, A., Heuer, T., Hild, A., Möseneder, J., et al. (2006). Methoden der nationalen Verzehrsstudie II. *Ernährungs-Umschau, 53(2)*, 44-50.
- Krga, I., Monfoulet, L.-E., Konic-Ristic, A., Mercier, S., Glibetic, M., Morand, C., et al. (2016). Anthocyanins and their gut metabolites reduce the adhesion of monocyte to TNF α -activated endothelial cells at physiologically relevant concentrations. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 599*, 51-59.
- Kropat, C., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., Boettler, U., et al. (2013). Effect of microformulation on the bioactivity of an anthocyanin-rich bilberry pomace extract (*Vaccinium myrtillus* L.) in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(20)*, 4873-4881.
- Kuhnert, N. (2013). Polyphenole: Vielseitige Pflanzeninhaltsstoffe. *Chemie in unserer Zeit, 47(2)*, 80-91.
- Kuntz, S., Kunz, C., Herrmann, J., Borsch, C. H., Abel, G., Fröhling, B., et al. (2014). Anthocyanins from fruit juices improve the antioxidant status of healthy young female volunteers without affecting anti-inflammatory parameters: results from the randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over ANTHONIA (ANTHOCyanins in Nutrition Investigation Alliance) study. *British Journal of Nutrition, 112(6)*, 925-936.
- Latti, A. K., Riihinen, K. R., & Kainulainen, P. S. (2008). Analysis of anthocyanin variation in wild populations of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(1)*, 190-196.
- Laval, J. (1996). Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathologie und Biologie, 44(1)*, 14-24.
- Li, D., Wang, P., Luo, Y., Zhao, M., & Chen, F. (2017). Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(8)*, 1729-1741.
- Lila, M. A., Burton-Freeman, B., Grace, M., & Kalt, W. (2016). Unraveling anthocyanin bioavailability for human health. *Annual Review of Food Science and Technology, 7*, 375-393.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release—a review. *International Journal of Food Science & Technology, 41(1)*, 1-21.

- 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*(1), 230S-242S.
- Masisi, K., Beta, T., & Moghadasian, M. H. (2016). Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on in vitro and in vivo studies. *Food Chemistry*, *196*, 90-97.
- Mattila, P., Pihlava, J.-m., & Hellström, J. (2005). Contents of phenolic acids, alkyl- and alkenylresorcinols, and avenanthramides in commercial grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(21), 8290-8295.
- Matuschek, M. C., Hendriks, W. H., McGhie, T. K., & Reynolds, G. W. (2006). The jejunum is the main site of absorption for anthocyanins in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *17*(1), 31-36.
- Mazza, G., Kay, C. D., Cottrell, T., & Holub, B. J. (2002). Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(26), 7731-7737.
- Mazza, G., & Miniati, E. (1993). Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. 1st. Florida, Fla: CRC Press, Florida.
- McGhie, T. K., & Walton, M. C. (2007). The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. *Molecular Nutrition and Food Research*, *51*(6), 702-713.
- Milbury, P. E., Graf, B., Curran-Celentano, J. M., & Blumberg, J. B. (2007). Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) anthocyanins modulate heme oxygenase-1 and glutathione S-transferase-pi expression in ARPE-19 cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *48*(5), 2343-2349.
- Milbury, P. E., Vita, J. A., & Blumberg, J. B. (2010). Anthocyanins are bioavailable in humans following an acute dose of cranberry juice. *The Journal of Nutrition*, *140*(6), 1099-1104.
- Miller, N. J., Castelluccio, C., Tijburg, L., & Rice-Evans, C. (1996). The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters--radical scavengers or metal chelators? *FEBS Letters*, *392*(1), 40-44.
- Montrose, D. C., Horelik, N. A., Madigan, J. P., Stoner, G. D., Wang, L. S., Bruno, R. S., et al. (2011). Anti-inflammatory effects of freeze-dried black raspberry powder in ulcerative colitis. *Carcinogenesis*, *32*(3), 343-350.
- Mueller, D., Jung, K., Winter, M., Rogoll, D., Melcher, R., & Richling, E. (2017). Human intervention study to investigate the intestinal accessibility and bioavailability of anthocyanins from bilberries. *Food Chemistry*, *231*, 275-286.

- Mueller, D., Jung, K., Winter, M., Rogoll, D., Melcher, R., Kulozik, U., Schwarz, K. & Richling, E. (2018). Encapsulated anthocyanins from berries - Effects on bioavailability and intestinal accessibility in humans. *Food Chemistry*, 248, 217-224.
- Mueller, D., Schantz, M., & Richling, E. (2012). High performance liquid chromatography analysis of anthocyanins in bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and corresponding juices. *Journal of Food Science*, 77(4), C340-C345.
- Mülleder, U., Murkovic, M., & Pfannhauser, W. (2002). Urinary excretion of cyanidin glycosides. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 53(1), 61-66.
- Muraki, I., Imamura, F., Manson, J. E., Hu, F. B., Willett, W. C., van Dam, R. M., et al. (2013). Fruit consumption and risk of type 2 diabetes: results from three prospective longitudinal cohort studies. *British Medical Journal*, 347, f5001.
- Mutschler, E., Schaible, H.-G., & Vaupel, P. (2007). Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen *Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft* 6., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage(38), 839.
- Naidu, R., Semple, K. T., Megharaj, M., Juhasz, A., Bolan, N., Gupta, S., et al. (2008). Bioavailability: definition, assessment and implications for risk assessment. *Developments in Soil Science*, 32, 39-51.
- Nurmi, T., Mursu, J., Heinonen, M., Nurmi, A., Hiltunen, R., & Voutilainen, S. (2009). Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2274-2281.
- Nyman, N. A., & Kumpulainen, J. T. (2001). Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4183-4187.
- Oehme, A., Valotis, A., Krammer, G., Zimmermann, I., & Schreier, P. (2011). Preparation and characterization of shellac-coated anthocyanin pectin beads as dietary colonic delivery system. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, 1-11.
- Ohnishi, R., Ito, H., Kasajima, N., Kaneda, M., Kariyama, R., Kumon, H., et al. (2006). Urinary excretion of anthocyanins in humans after cranberry juice ingestion. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(7), 1681-1687.
- Oidtmann, J., Schantz, M., Mader, K., Baum, M., Berg, S., Betz, M., et al. (2012). Preparation and comparative release characteristics of three anthocyanin encapsulation systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(3), 844-851.
- Orlu-Gul, M., Topcu, A. A., Shams, T., Mahalingam, S., & Edirisinghe, M. (2014). Novel encapsulation systems and processes for overcoming the challenges of polypharmacy. *Current Opinion in Pharmacology*, 18, 28-34.

- Ou, S., & Kwok, K. C. (2004). Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261-1269.
- Palmefors, H., DuttaRoy, S., Rundqvist, B., & Börjesson, M. (2014). The effect of physical activity or exercise on key biomarkers in atherosclerosis—a systematic review. *Atherosclerosis*, 235(1), 150-161.
- Pandir, D., & Kara, O. (2014). Chemopreventive effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against cisplatin-induced oxidative stress and DNA damage as shown by the comet assay in peripheral blood of rats. *Biologia*, 69(6), 811-816.
- Pascual-Teresa, S., & Sanchez-Ballesta, M. T. (2008). Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*, 7, 281-299.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., & Mattivi, F. (2002). The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(3), 631-636.
- Passamonti, S., Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Mattivi, F. (2003). The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*, 544(1-3), 210-213.
- Peiffer, D. S., Zimmerman, N. P., Wang, L.-S., Ransom, B. W., Carmella, S. G., Kuo, C.-T., et al. (2014). Chemoprevention of esophageal cancer with black raspberries, their component anthocyanins, and a major anthocyanin metabolite, protocatechuic acid. *Cancer Prevention Research*, 7(6), 574-584.
- Piccoli, A., Rossi, B., Pillon, L., & Bucciante, G. (1994). A new method for monitoring body fluid variation by bioimpedance analysis: the RXc graph. *Kidney International*, 46(2), 534-539.
- Pojer, E., Mattivi, F., Johnson, D., & Stockley, C. S. (2013). The case for anthocyanin consumption to promote human health: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(5), 483-508.
- Prior, R. L., Lazarus, S. A., Cao, G. H., Muccitelli, H., & Hammerstone, J. F. (2001). Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1270-1276.
- Prior, R. L., & Wu, X. L. (2006). Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, 40(10), 1014-1028.
- Qingming, Y., Xianhui, P., Weibao, K., Hong, Y., Yidan, S., Li, Z., et al. (2010). Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress in vitro and in vivo. *Food Chemistry*, 118(1), 84-89.

- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621.
- Reddy, N., Kleeberger, S., Bream, J., Fallon, P., Kensler, T., Yamamoto, M., et al. (2008). Genetic disruption of the Nrf2 compromises cell-cycle progression by impairing GSH-induced redox signaling. *Oncogene*, 27(44), 5821-5832.
- Rice-Evans, C. A., & Miller, N. J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochemical Society Transactions*, 24(3), 790-795.
- Roempp, (2007), <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-02-01612> (abgerufen am 09.09.2017)
- Rosen, L., & Goodall, M. (1962). Identification of Vanillic Acid as a Gatabolite of Noradrenaline Metabolism in the Human. *Experimental Biology and Medicine*, 110(4), 767-769.
- Ruenz, M. (2013). Modellstudien zur Bindung von Anthocyanabbauprodukten an humanes Serumalbumin. *Diplomarbeit*, TU Kaiserslautern.
- Sakakibara, H., Ogawa, T., Koyanagi, A., Kobayashi, S., Goda, T., Kumazawa, S., et al. (2009). Distribution and excretion of bilberry anthocyanins [corrected] in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7681-7686.
- Schantz, M. (2011). Biologische Wirksamkeit eines Heidelbeerextrakts (HBE) (*Vaccinium myrtillus* L.) im Vergleich zu verkapselten Präparaten: Antioxidative Wirksamkeit und Modulation der intestinalen Verfügbarkeit der Anthocyane. *Dissertation, Kaiserslautern*.
- Schantz, M., Baum, M., & Richling, E. (2011). Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in vitro. *Journal of Berry Research*, 383, 92-92.
- Schantz, M., Berg, S., Betz, M., Kulozik, U., Leick, S., Rehage, H., et al. (2014). Triggered gastrointestinal release of anthocyanins from bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.). *Acta Horticulturae*.
- Schantz, M., Mohn, C., Baum, M., & Richling, E. (2010). Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in the human colon tumor cell lines Caco-2 and HT-29. *Journal of Berry Research*, 1(1), 25-33.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.
- Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. (2007). Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary α -amylase (HSA) by fluorescence quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6726-6735.

- Spormann, T. M., Albert, F. W., Rath, T., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J. P., et al. (2008). Anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative cell damage in an intervention study with patients on hemodialysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 17(12), 3372-3380.
- Stadtman, E. R., & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 191-208.
- Stalmach, A., Edwards, C. A., Wightman, J. D., & Crozier, A. (2012). Gastrointestinal stability and bioavailability of (poly) phenolic compounds following ingestion of Concord grape juice by humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(3), 497-509.
- Stalmach, A., Edwards, C. A., Wightman, J. D., & Crozier, A. (2012). Gastrointestinal stability and bioavailability of (poly)phenolic compounds following ingestion of Concord grape juice by humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(3), 497-509.
- Stanstrup, J., Schou, S. S., Holmer-Jensen, J., Hermansen, K., & Dragsted, L. O. (2014). Whey protein delays gastric emptying and suppresses plasma fatty acids and their metabolites compared to casein, gluten, and fish protein. *Journal of Proteome Research*, 13(5), 2396-2408.
- Statistisches Bundesamt (Destatis), 2017: "Häufigste Todesursachen 2015" <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html> (abgerufen am 21.08.2017)
- Surendiran, G., Goh, C., Le, K., Zhao, Z., Askarian, F., Othman, R., et al. (2013). Wild rice (*Zizania palustris* L.) prevents atherogenesis in LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis*, 230(2), 284-292.
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Manach, C., Lamaison, J.-L., et al. (2004). Anthocyanins are efficiently absorbed from the small intestine in rats. *The Journal of Nutrition*, 134(9), 2275-2279.
- Talluri, A., & Maggia, G. (1995). Bioimpedance analysis (BIA) in hemodialysis: Technical aspects. *18 International Journal of Artificial Organs*, 687-692.
- Terao, J. (2009). Dietary flavonoids as antioxidants. In *Food Factors for Health Promotion* (Vol. 61, pp. 87-94): Karger Publishers.
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., et al. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2(1), 2.
- Triebel, S., Trieu, H. L., & Richling, E. (2012). Modulation of inflammatory gene expression by a bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) extract and single anthocyanins considering their limited stability under cell culture conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 8902-8910.

- Tulipani, S., Armeni, T., Giampieri, F., Alvarez-Suarez, J. M., Gonzalez-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., et al. (2014). Strawberry intake increases blood fluid, erythrocyte and mononuclear cell defenses against oxidative challenge. *Food Chemistry*, *156*, 87-93.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *39*(1), 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological Interactions*, *160*(1), 1-40.
- Vanzo, A., Vrhovsek, U., Tramer, F., Mattivi, F., & Passamonti, S. (2011). Exceptionally fast uptake and metabolism of cyanidin 3-glucoside by rat kidneys and liver. *Journal of Natural Products*, *74*(5), 1049-1054.
- Viljanen, K., Kylli, P., Hubbermann, E. M., Schwarz, K., & Heinonen, M. (2005). Anthocyanin antioxidant activity and partition behavior in whey protein emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 2022-2027.
- Vitaglione, P., Donnarumma, G., Napolitano, A., Galvano, F., Gallo, A., Scalfi, L., et al. (2007). Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. *The Journal of Nutrition*, *137*(9), 2043-2048.
- Wallace, T. C., Slavin, M., & Frankenfeld, C. L. (2016). Systematic review of anthocyanins and markers of cardiovascular disease. *Nutrients*, *8*(1), 32.
- Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, *36*(7), 829-837.
- Waris, G., & Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*, *5*(1), 14.
- Warner, E. F., Zhang, Q., Raheem, K. S., O'Hagan, D., O'Connell, M. A., & Kay, C. D. (2016). Common phenolic metabolites of flavonoids, but not their unmetabolized precursors, reduce the secretion of vascular cellular adhesion molecules by human endothelial cells. *The Journal of Nutrition*, *146*(3), 465-473.
- Weisel, T., Baum, M., Eisenbrand, G., Dietrich, H., Will, F., Stockis, J. P., et al. (2006). An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnology Journal*, *1*(4), 388-397.
- Wiczowski, W., Romaszko, E., & Piskula, M. K. (2010). Bioavailability of cyanidin glycosides from natural chokeberry (*Aronia melanocarpa*) juice with dietary-relevant dose of anthocyanins in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(23), 12130-12136.

- Wiese, S., Gartner, S., Rawel, H. M., Winterhalter, P., & Kulling, S. E. (2009). Protein interactions with cyanidin-3-glucoside and its influence on alpha-amylase activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(1), 33-40.
- Williamson, G., & Clifford, M. N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *The British Journal of Nutrition*, 104 Suppl 3, S48-66.
- Woodward, G., Kroon, P., Cassidy, A., & Kay, C. (2009). Anthocyanin stability and recovery: Implications for the analysis of clinical and experimental samples. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 57(12), 5271-5278.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2006a). Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 54(11), 4069-4075.
- Wu, X., Pittman, H. E., 3rd, & Prior, R. L. (2006b). Fate of anthocyanins and antioxidant capacity in contents of the gastrointestinal tract of weanling pigs following black raspberry consumption. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 54(2), 583-589.
- Wu, X., Cao, G., & Prior, R. L. (2002). Absorption and metabolism of anthocyanins in elderly women after consumption of elderberry or blueberry. *The Journal of Nutrition*, 132(7), 1865-1871.
- Wu, X. L., Gu, L. W., Prior, R. L., & McKay, S. (2004). Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7846-7856.
- Yan, S., Sorrell, M., & Berman, Z. (2014). Functional interplay between ATM/ATR-mediated DNA damage response and DNA repair pathways in oxidative stress. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(20), 3951-3967.
- Zhang, H., Cao, P., Agellon, L. B., & Zhai, C.-K. (2009). Wild rice (*Zizania latifolia* (Griseb) Turcz) improves the serum lipid profile and antioxidant status of rats fed with a high fat/cholesterol diet. *British Journal of Nutrition*, 102(12), 1723-1727.
- Zhang, Y., Dong, L., Li, J., & Chen, X. (2008). Studies on the interaction of gallic acid with human serum albumin in membrane mimetic environments. *Talanta*, 76(2), 246-253.
- Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., et al. (2006). Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7277-7286.
- Zhou, B.-B. S., & Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408(6811), 433-439.

8. Anhang

Gesamtvolumen Urinproben

Tabelle 22: Volumen des gesammelten Urins (Ileo 1-5, Studienphase A, HBE-Verzehr).

Intervention A	ILEO1				ILEO2				ILEO3			
Urin	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH
Zeitpunkt												
-24 – 0	700	23	723	2,5	2100	33	2133	2,5	1100	40	1140	2,5
0 – 2	320	5,5	325,5	2,5	520	6,7	526,7	2,5	400	9	409	2,5
2 – 4	380	3,8	383,8	2,5	680	5,3	685,3	2,5	420	5,5	425,5	2,5
4 – 8	130	5,5	135,5	2,5	190	2,5	192,5	2,5	380	9	389	2,5
8 – 24	740	15	755	2,5	1200	17,8	1217,8	2,5	550	20	570	2,5

Inter-vention A	ILEO4				ILEO5			
Urin	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH
Zeitpunkt								
-24 – 0	1650	62	1712	2,5	1230	42	1272	2,5
0 – 2	1100	11	1111	2,5	730	9,5	739,5	2,5
2 – 4	210	1	211	2,5	1100	8,4	1108	2,5
4 – 8	440	11	451	2,5	560	7,5	567,5	2,5
8 – 24	620	24	644	2,5	1400	26	1426	2,5

Tabelle 23: Volumen des gesammelten Urins (Ileo1-5, Studienphase B, MPK-Verzehr).

Intervention B	ILEO1				ILEO2				ILEO3			
	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH
Zeitpunkt												
-24 – 0	970	21	991	2,5	2500	38	2538	2,5	660	29	689	2,5
0 – 2	110	4,5	114,5	2,5	960	8	968	2,5	410	6,5	416,5	2,5
2 – 4	150	3	153	2,5	710	6,5	716,5	2,5	60	3,7	63,7	2,5
4 – 8	230	8,1	238,1	2,5	150	6,3	156,3	2,5	200	9,3	209,3	2,5
8 – 24	450	13,3	463,3	2,5	710	16,8	726,8	2,5	530	17,6	547,6	2,5

Inter-vention B	ILEO4				ILEO5			
	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH
Zeitpunkt								
-24 – 0	1050	39	1089	2,5	1100	32	1132	2,5
0 – 2	140	5	145	2,5	360	7	367	2,5
2 – 4	300	3,3	303,3	2,5	430	4,5	434,5	2,5
4 – 8	240	7,5	247,5	2,5	500	8,5	508,5	2,5
8 – 24	330	5,5	335,5	2,5	1300	15	1415	2,5

Tabelle 24: Volumen des gesammelten Urins (Ileo1-5, Studienphase C, CPK-Verzehr).

Intervention C	ILEO1				ILEO2				ILEO3			
	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH
Zeitpunkt												
-24 – 0	810	24,4	834,4	2,5	3100	45	3145	2,5	940	33,1	977,1	2,5
0 – 2	110	3,2	113,2	2,5	195	4,8	199,8	2,5	150	5,2	155,2	2,5
2 – 4	305	3,0	308	2,5	460	4,6	464,6	2,5	455	4,8	449,8	2,5
4 – 8	160	6	166	2,5	155	6,5	161,5	2,5	160	7,5	167,5	2,5
8 – 24	510	7	517	2,5	970	15	985	2,5	760	22	782	2,5

Inter-vention C	ILEO4				ILEO5			
	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH
Zeitpunkt								
-24 – 0	1150	52	1202	2,5	1450	54,8	1504,8	2,5
0 – 2	80	3,4	83,4	2,5	760	7,6	767,6	2,5
2 – 4	75	2,8	77,8	2,5	575	6,1	581,1	2,5
4 – 8	150	11,7	161,7	2,5	205	11,5	216,5	2,5
8 – 24	200	5	205	2,5	930	16,7	946,7	2,5

Tabelle 25: Volumen des gesammelten Urins (Gesund 1-5, Studienphase A, HBE-Verzehr).

Intervention A	Gesund1				Gesund 2				Gesund 3			
	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH
Zeitpunkt												
-24 – 0	2050	54	2104	2,5	2500	47	2547	2,5	1500	36	1536	2,5
0 – 2	610	8,7	618,7	2,5	200	6,5	206,5	2,5	70	3,6	73,6	2,5
2 – 4	510	5,5	515,5	2,5	350	2,5	352,5	2,5	175	3,1	179,1	2,5
4 – 8	560	9	569	2,5	600	10	610	2,5	310	9,5	319,5	2,5
8 – 24	1100	25	1125	2,5	1500	19	1519	2,5	1900	29,5	1929,5	2,5

Inter-vention A	Gesund 4				Gesund 5			
	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH
Zeitpunkt								
-24 – 0	2450	50	2500	2,5	1680	46	1726	2,5
0 – 2	210	3,9	213,9	2,5	540	6	546	2,5
2 – 4	460	5,6	465,6	2,5	730	6,4	736,4	2,5
4 – 8	440	8,5	448,5	2,5	910	10,5	920,5	2,5
8 – 24	1600	18	1618	2,5	1200	22,6	1222,6	2,5

Tabelle 26: Volumen des gesammelten Urins (Gesund 1-5 Studienphase B, MPK-Verzehr).

Intervention B	Gesund 1				Gesund 2				Gesund 3			
	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH
Zeitpunkt												
-24 – 0				2,5	2100	42	2142	2,5	2300	34	2334	2,5
0 – 2				2,5	125	5	129	2,5	90	4	94	2,5
2 – 4				2,5	460	4,5	464,5	2,5	76	2,7	78,7	2,5
4 – 8				2,5	540	9	549	2,5	520	8	528	2,5
8 – 24				2,5	1700	15	1715	2,5	1700	18,5	1718,5	2,5

Inter-vention B	Gesund 4				Gesund 5			
	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH
Zeitpunkt								
-24 – 0	1850	37	1887	2,5	1700	38	1738	2,5
0 – 2	175	5	180	2,5	750	7,5	757,5	2,5
2 – 4	750	5	755	2,5	810	7	817	2,5
4 – 8	540	7,5	547,5	2,5	640	10,5	650,5	2,5
8 – 24	1400	13	1413	2,5	1200	18	1218	2,5

Tabelle 27: Volumen des gesammelten Urins Gesund 1-5 Studienphase C, CPK-Verzehr).

Intervention C	Gesund 1				Gesund 2				Gesund 3			
	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH
Zeitpunkt												
-24 – 0	2500	47,5	2547,5	2,5	2850	36	2886	2,5	2790	30	2820	2,5
0 – 2	610	17,5	627,5	2,5	170	5,5	175,5	2,5	75	2,8	77,8	2,5
2 – 4	500	5,5	505,5	2,5	215	3,2	218,2	2,5	400	2,8	402,8	2,5
4 – 8	725	9,0	734	2,5	635	9	644	2,5	420	7,0	427	2,5
8 – 24	1120	22,0	1142	2,5	1880	19	1899	2,5	1890	16,5	1906,5	2,5

Inter-vention C	Gesund 4				Gesund 5			
	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH	Vol. (ml)	HCl- (ml)	Vol. ges. (ml)	pH
Zeitpunkt								
-24 – 0	2400	47	2447	2,5	1600	27,5	1627,5	2,5
0 – 2	165	3,9	168,9	2,5	180	6,0	186	2,5
2 – 4	750	5,2	755,2	2,5	785	6,5	791,5	2,5
4 – 8	595	5,8	600,8	2,5	605	13,2	618,2	2,5
8 – 24	1450	13,5	1463,5	2,5	1050	23	1073	2,5

Kreatininwerte aller Probanden

mg/ml (n =2)

Tabelle 28: gesunde Probanden mit Kolon (Ges), Phase A: HBE-Verzehr, Phase B: MPK-Verzehr, Phase C: CPK-Verzehr.

Phase A

	Ges 1 Kreatinin [mg/ml]	Ges 2 Kreatinin [mg/ml]	Ges 3 Kreatinin [mg/ml]	Ges 4 Kreatinin [mg/ml]	Ges 5 Kreatinin [mg/ml]
-24-0	0,29	0,68	1,23	0,52	1,12
0-2	0,33	0,90	2,69	0,43	0,34
2-4	0,34	0,30	0,79	0,29	0,17
4-8	0,30	0,40	0,70	0,51	0,41
8-24	0,62	0,57	0,53	0,36	0,95

Phase B

	Ges 1 Kreatinin [mg/ml]	Ges 2 Kreatinin [mg/ml]	Ges 3 Kreatinin [mg/ml]	Ges 4 Kreatinin [mg/ml]	Ges 5 Kreatinin [mg/ml]
-24-0	/	0,60	0,66	0,61	0,24
0-2	/	1,06	2,71	1,08	0,54
2-4	/	0,14	1,95	0,14	0,20
4-8	/	0,22	0,26	0,44	0,56
8-24	/	0,14	0,44	0,61	0,95

Phase C

	Ges 1 Kreatinin [mg/ml]	Ges 2 Kreatinin [mg/ml]	Ges 3 Kreatinin [mg/ml]	Ges 4 Kreatinin [mg/ml]	Ges 5 Kreatinin [mg/ml]
-24-0	0,64	0,55	0,59	0,57	0,37
0-2	0,36	1,05	1,96	1,00	1,14
2-4	0,28	0,37	0,59	0,12	0,21
4-8	0,36	0,45	0,43	0,25	0,35
8-24	0,89	0,24	0,24	0,50	0,84

Tabelle 29: Ileostomaprobanden ohne Kolon (Ileo), Phase A: HBE-Verzehr, Phase B: MPK-Verzehr, Phase C: CPK-Verzehr.

Phase A

	Ileo 1 Kreatinin [mg/ml]	Ileo 2 Kreatinin [mg/ml]	Ileo 3 Kreatinin [mg/ml]	Ileo 4 Kreatinin [mg/ml]	Ileo 5 Kreatinin [mg/ml]
-24-0	1,26	0,74	1,50	1,07	1,05
0-2	0,55	0,43	0,80	0,12	0,25
2-4	0,21	0,18	0,31	0,11	0,11
4-8	1,74	1,33	0,69	0,77	0,33
8-24	0,76	0,53	1,91	1,37	0,46

Phase B

	Ileo 1 Kreatinin [mg/ml]	Ileo 2 Kreatinin [mg/ml]	Ileo 3 Kreatinin [mg/ml]	Ileo 4 Kreatinin [mg/ml]	Ileo 5 Kreatinin [mg/ml]
-24-0	0,48	0,44	2,13	1,93	0,73
0-2	1,94	0,17	0,70	1,91	0,45
2-4	1,02	0,16	2,06	0,44	0,18
4-8	0,59	1,10	1,49	1,29	0,37
8-24	1,34	0,98	1,64	1,46	0,34

Phase C

	Ileo 1 Kreatinin [mg/ml]	Ileo 2 Kreatinin [mg/ml]	Ileo 3 Kreatinin [mg/ml]	Ileo 4 Kreatinin [mg/ml]	Ileo 5 Kreatinin [mg/ml]
-24-0	1,51	0,37	1,68	1,91	0,76
0-2	1,53	0,54	1,39	1,85	0,27
2-4	0,24	0,19	0,29	1,78	0,14
4-8	1,96	1,67	1,92	2,13	0,77
8-24	0,64	0,59	1,07	1,80	0,63

Frisch- und Trockengewichte der Ileostomabeutelinhalte

Tabelle 30: Frischgewichte (FG) in g der einzelnen Ileostomaproben vor Gefriertrocknung und Trockengewichte (TG) in g der einzelnen Ileostomaproben nach Gefriertrocknung aus Studienphase 1 (Verzehr von 10 g Heidelbeerextrakt).

Proband	Ileo1		Ileo2		Ileo3		Ileo4		Ileo5	
	FG [g]	TG [g]	FG [g]	TG [g]	FG [g]	TG [g]	FG [g]	TG [g]	FG [g]	TG [g]
-12-0	258,0	20,9	149,7	16,3	137,3	7,9	265,8	20,9	168,7	14,3
0-1	230,0	13,2	51,4	3,3	209,2	10,2	441,4	20,1	176,3	10,1
1-2	164,8	7,6	123,9	7,5	150,9	7,3	243,5	9,0	225,1	11,8
2-4	56,4	8,2	54,1	7,2	78,6	41,4	26,5	2,0	23,0	2,7
4-6	83,7	6,6	72,0	7,5	154,0	10,4	117,7	9,6	64,3	9,9
6-8	74,6	11,9	64,6	9,1	45,0	4,5	178,2	21,7	38,4	5,4

Tabelle 31: Frischgewichte (FG) in g der einzelnen Ileostomaproben vor Gefriertrocknung und Trockengewichte (TG) in g der einzelnen Ileostomaproben nach Gefriertrocknung aus Studienphase 2 (Verzehr von 144 g Heidelbeerextrakt verkapselt mit Molkeprotein).

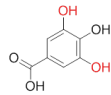
Proband	Ileo1		Ileo2		Ileo3		Ileo4		Ileo5	
	FG [g]	TG [g]	FG [g]	TG [g]	FG [g]	TG [g]	FG [g]	TG [g]	FG [g]	TG [g]
-12-0	39,5	3,1	175,6	4,6	16,3	0,9	252,0	17,3	86,0	8,9
0-1	139,3	11,6	153,1	7,0	227,0	14,9	368,7	40,6	63,4	7,2
1-2	136,3	13,2	81,0	6,7	59,2	4,4	228,4	18,7	120,8	13,2
2-4	109,4	12,2	69,9	8,1	54,1	6,3	12,4	1,6	187,0	8,6
4-6	121,9	15,8	336,7	56,6	106,6	16,0	164,8	25,9	119,7	8,6
6-8	55,6	8,1	38,5	7,3	39,2	5,7	157,6	22,7	46,0	7,6

Tabelle 32: *Frischgewichte (FG) in g der einzelnen Ileostomaproben vor Gefriertrocknung und Trockengewichte (TG) in g der einzelnen Ileostomaproben nach Gefriertrocknung aus Studienphase 3 (Verzehr von 30 g Heidelbeerextrakt verkapselt mit Citruspektin).*

Proband	Ileo1		Ileo2		Ileo3		Ileo4		Ileo5	
	FG [g]	TG [g]	FG [g]	TG [g]	FG [g]	TG [g]	FG [g]	TG [g]	FG [g]	TG [g]
-12-0	13,3	1,6	27,2	2,8	28,0	1,3	90,2	17,3	33,3	2,2
0-1	113,5	10,5	41,8	5,3	126,2	11,6	90,5	7,1	47,8	6,8
1-2	139,5	10,3	94,5	11,3	125,5	9,2	271,7	17,8	85,4	7,5
2-4	80,1	10,6	68,3	10,8	25,3	3,6	141,0	11,6	31,6	5,4
4-6	294,5	22,4	149,3	13,7	164,1	16,9	357,4	26,5	59,0	9,6
6-8	180,2	22,8	125,9	15,1	58,5	8,0	200,2	23,0	86,5	13,7

Identifizierung der Anthocyanabbauprodukte

MS² Gallussäure



MW 170

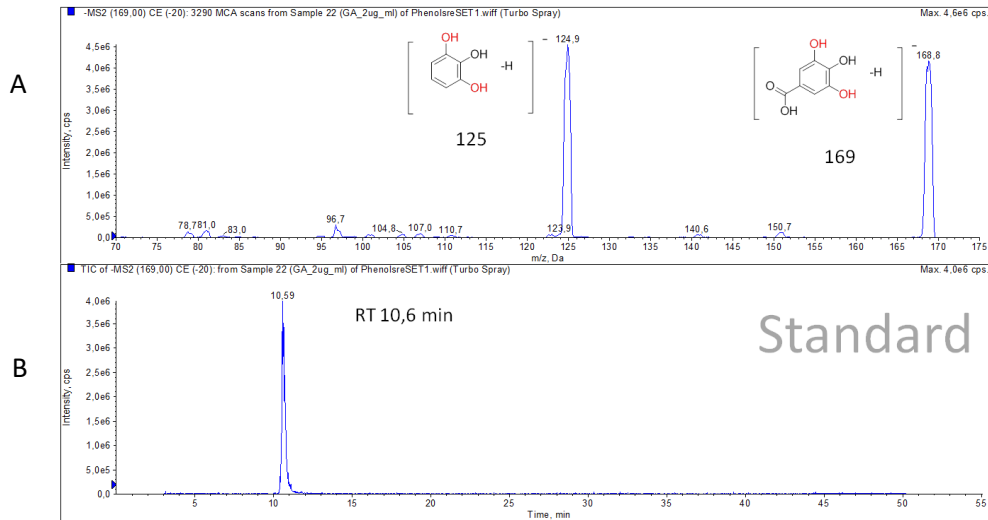


Abbildung 56: B: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramm der Referenzsubstanz Gallussäure (Retentionszeit RT=10,6 min) und A: dazugehöriges Produktionenspektrum MS² bei m/z 169,00. Endkonzentration Gallussäure: 2 µg/ml.

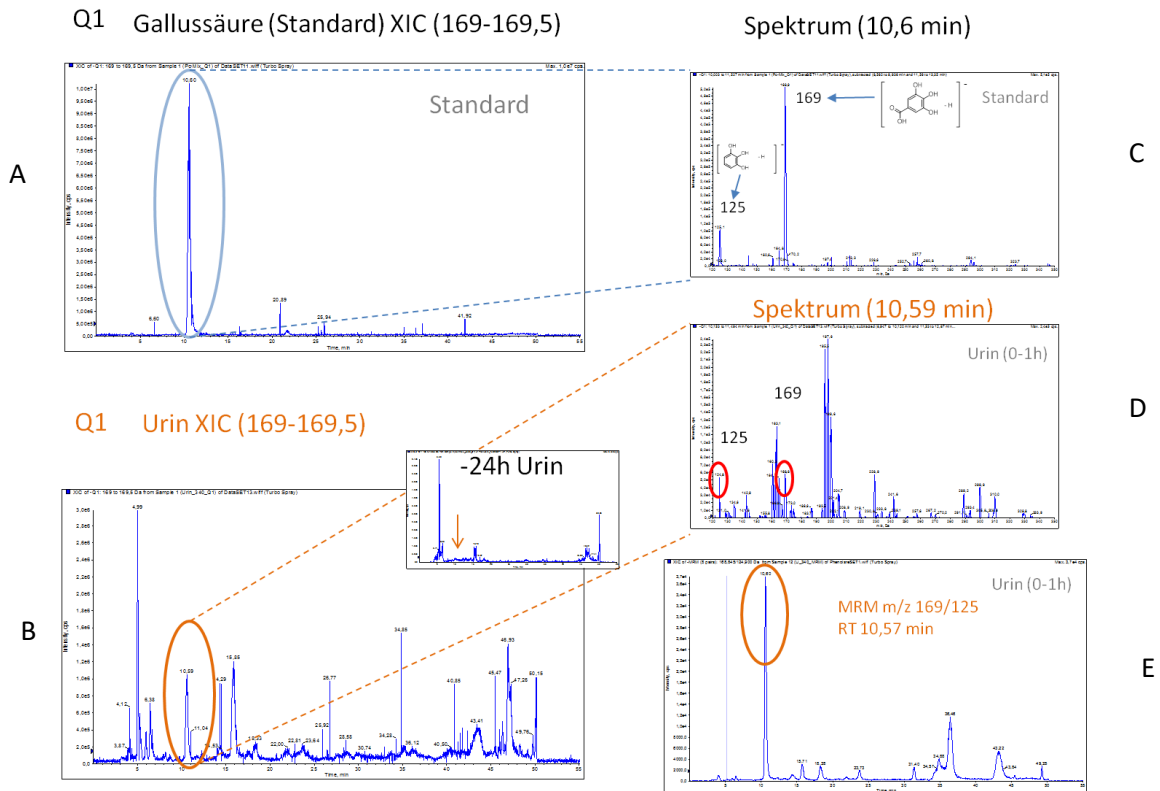


Abbildung 57: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramme bei m/z 169-169,5 von A: Gallussäurestandard und B: Humanurin (0-1 h, -24 h) und dazugehörige Produktionspektren C: Gallussäure bei 10,6 min und D: Humanurin (0-1 h) bei 10,59 min. E: MRM-Übergang von m/z von 169/125 bei 10,57 min im Humanurin (0-1 h).

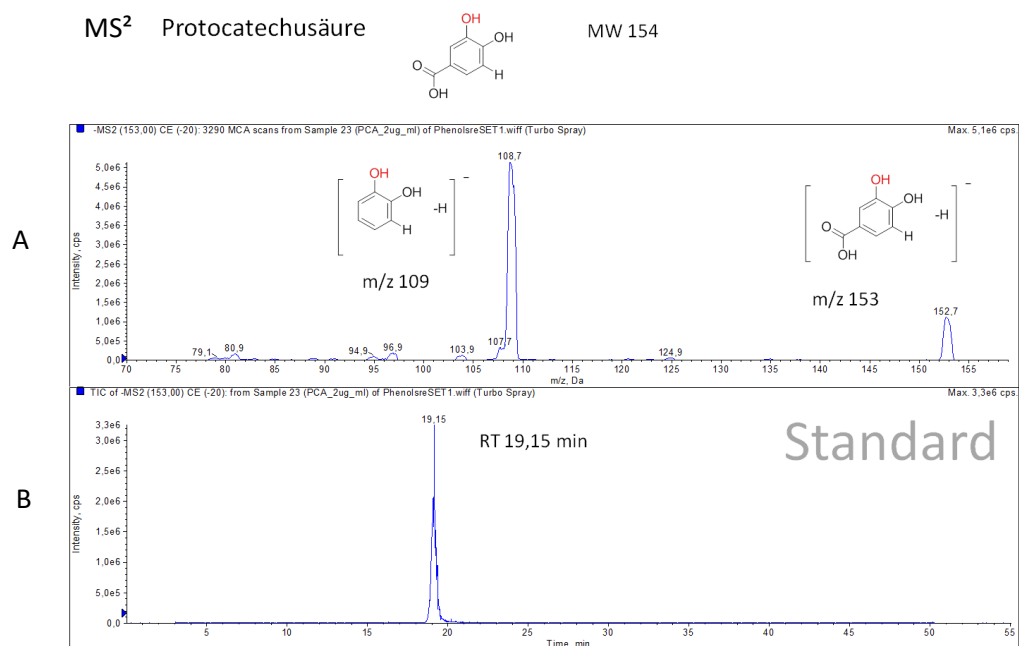


Abbildung 58: B: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramm der Referenzsubstanz Protocatechusäure (Retentionszeit RT=19,15 min) und A: dazugehöriges Produktionenspektrum MS² bei m/z 153,00. Endkonzentration Protocatechusäure: 2 µg/ml.

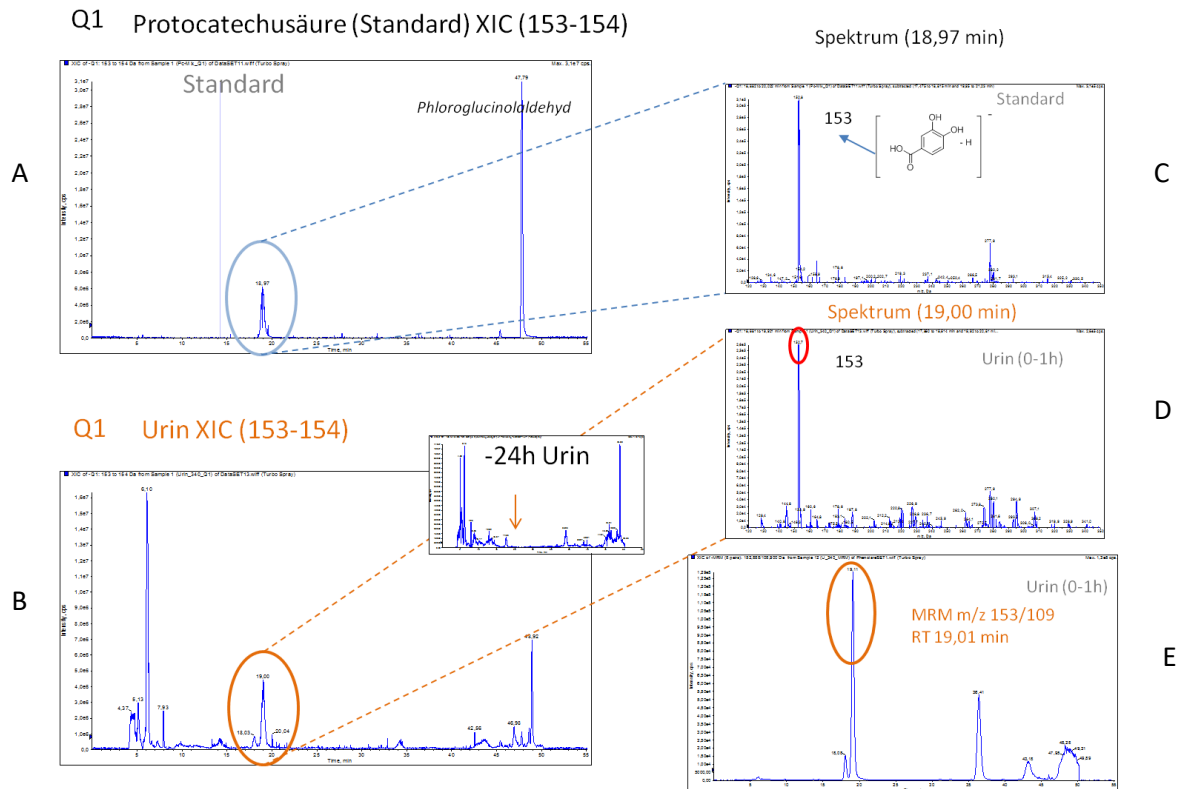


Abbildung 59: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramme bei m/z 153-154 von A: Protocatechusäurestandard und B: Humanurin (0-1 h, -24 h) und dazugehörige Produktionenspektren C: Protocatechusäure bei 18,97 min und D: Humanurin (0-1 h) bei 19,00 min. E: MRM-Übergang von m/z von 153/109 bei 19,01 min im Humanurin (0-1 h).

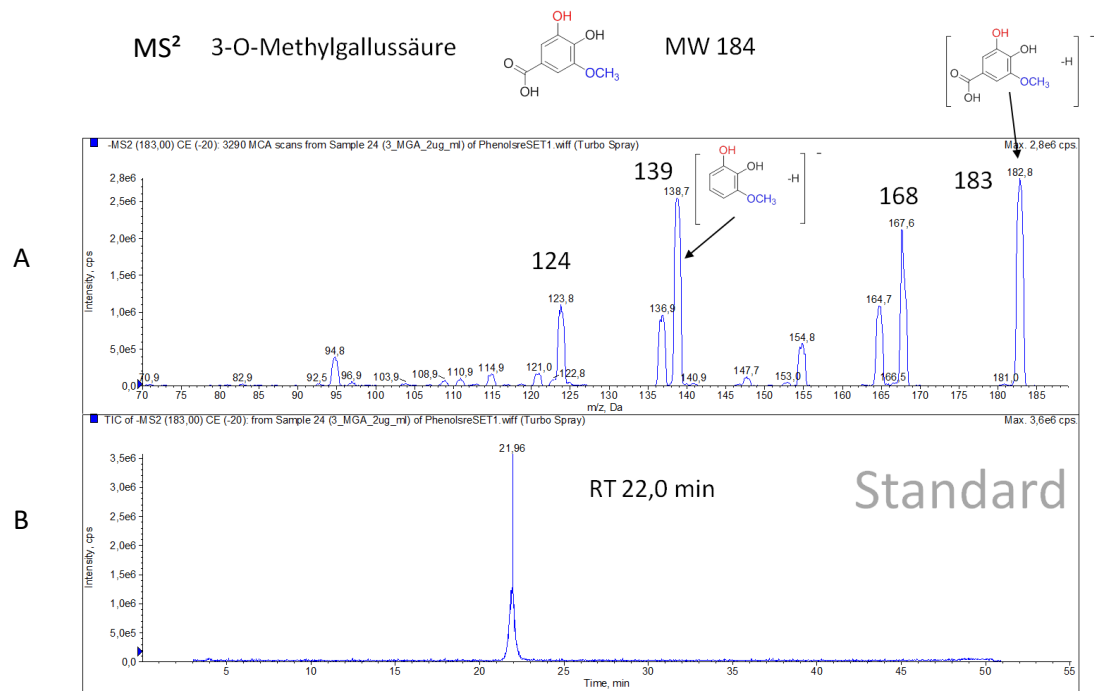


Abbildung 60: *B: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramm der Referenzsubstanz 3-O-Methylgallussäure (Retentionszeit RT=22,0 min) und A: dazugehöriges Produktionenspektrum MS² bei m/z 184,00. Endkonzentration 3-O-Methylgallussäure: 2 µg/ml.*

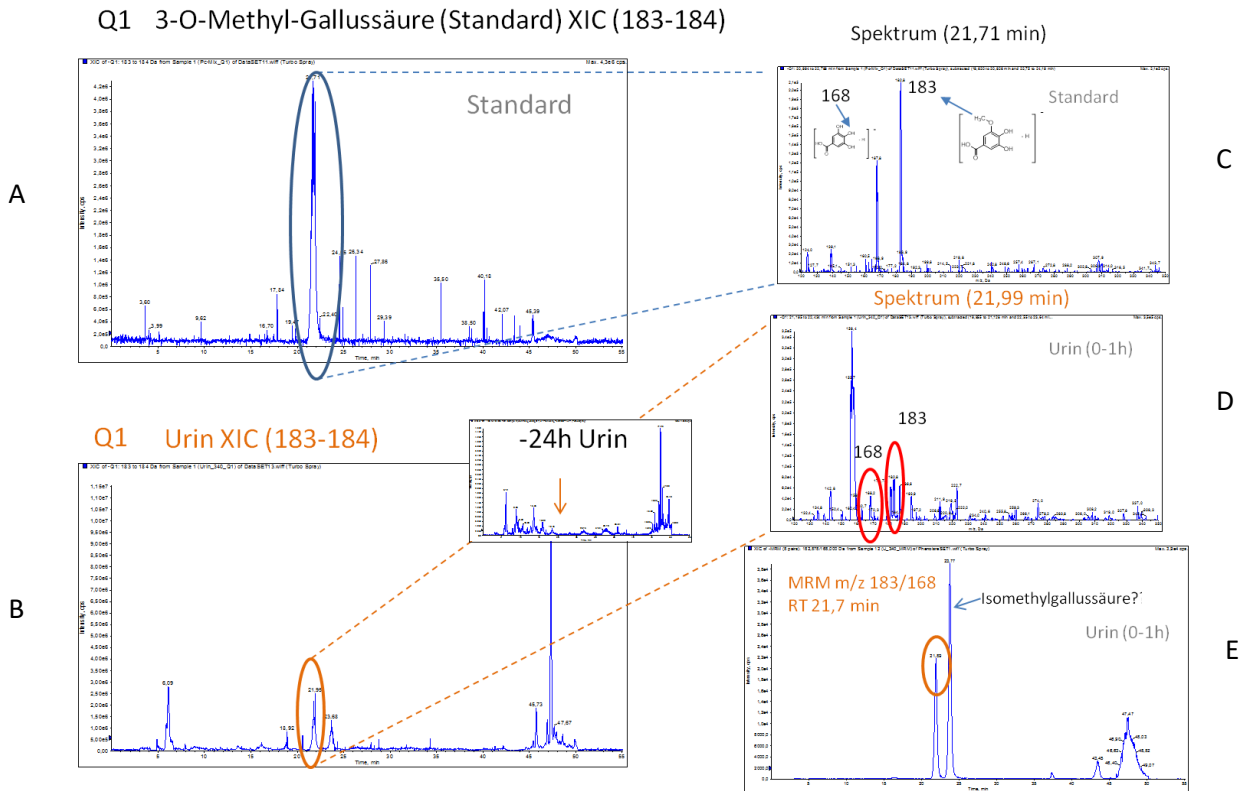


Abbildung 61: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramme bei m/z 183-184 von A: 3-O-Methylgallussäurestandard und B: Humanurin (0-1 h, -24 h) und dazugehörige Produktionspektren C: 3-O-Methylgallussäure bei 21,71 min und D: Humanurin (0-1 h) bei 21,99 min. E: MRM-Übergang von m/z von 183/168 bei 21,70 min im Humanurin (0-1 h).

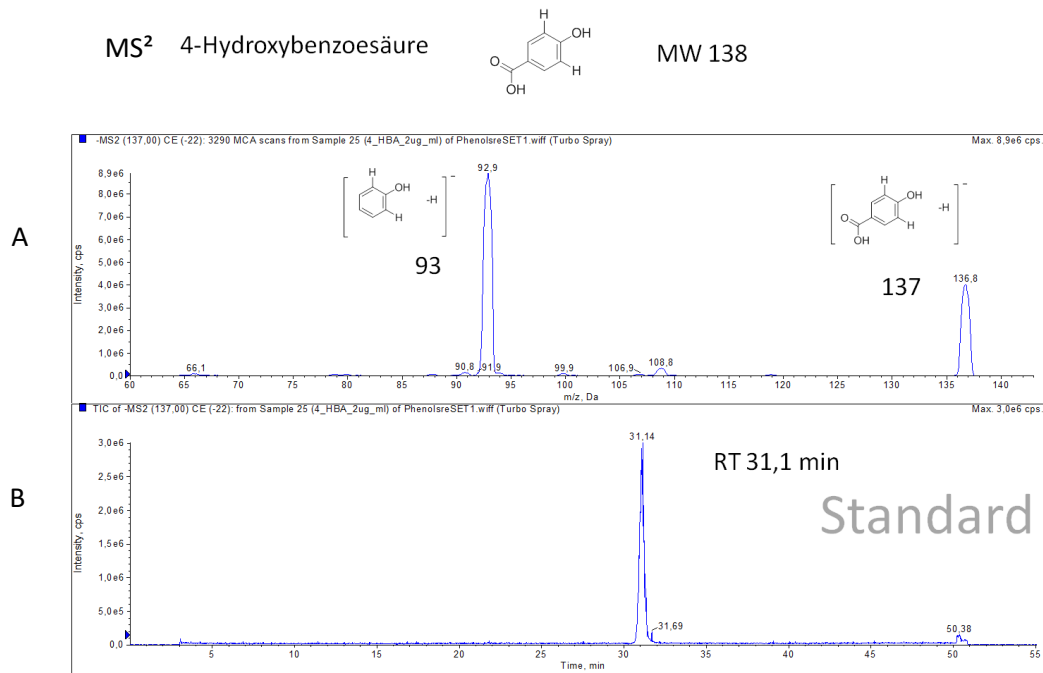
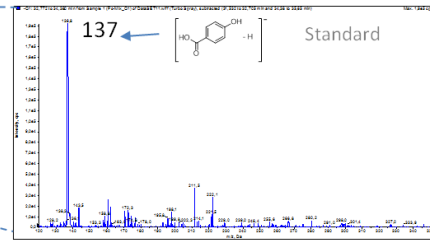
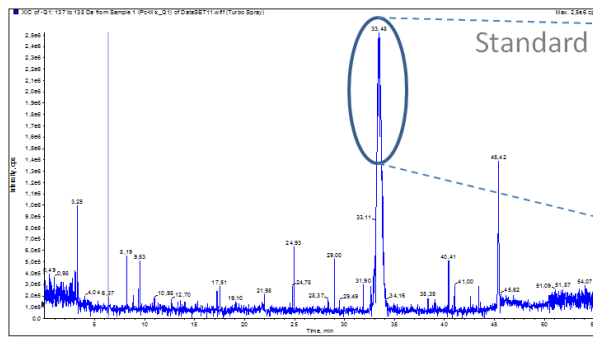


Abbildung 62: *B: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramm der Referenzsubstanz 4-Hydroxybenzoesäure (Retentionszeit RT=31,10 min) und A: dazugehöriges Produktionenspektrum MS² bei m/z 138,00 Endkonzentration 4-Hydroxybenzoesäure: 2 µg/ml.*

Q1 4-Hydroxybenzoesäure (Standard) XIC (137-138)

Spektrum (33,48 min)

A

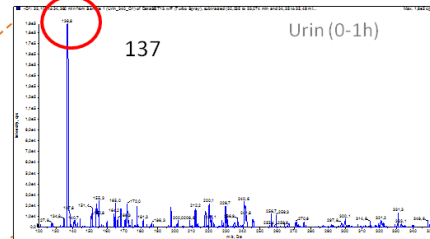
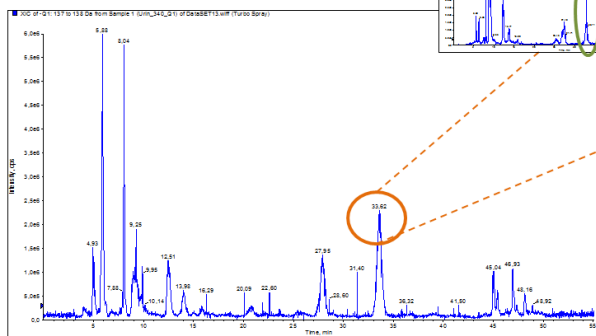


C

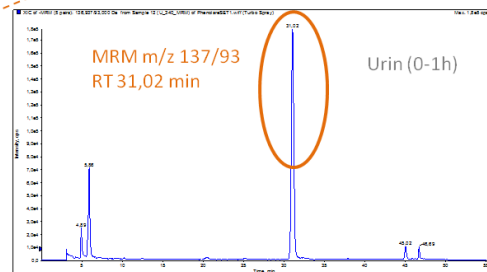
Q1 Urin XIC (137-138)

Spektrum (33,5 min)

B



D



E

Abbildung 63:

HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramme bei m/z 137-138 von A: Hydroxybenzoesäure und B: Humanurin (0-1 h, -24 h) und dazugehörige Produktionenspektren C: 4-Hydroxybenzoesäure bei 33,48 min und D: Humanurin (0-1 h) bei 33,50 min. E: MRM-Übergang von m/z von 137/93 bei 31,02 min im Humanurin (0-1 h).

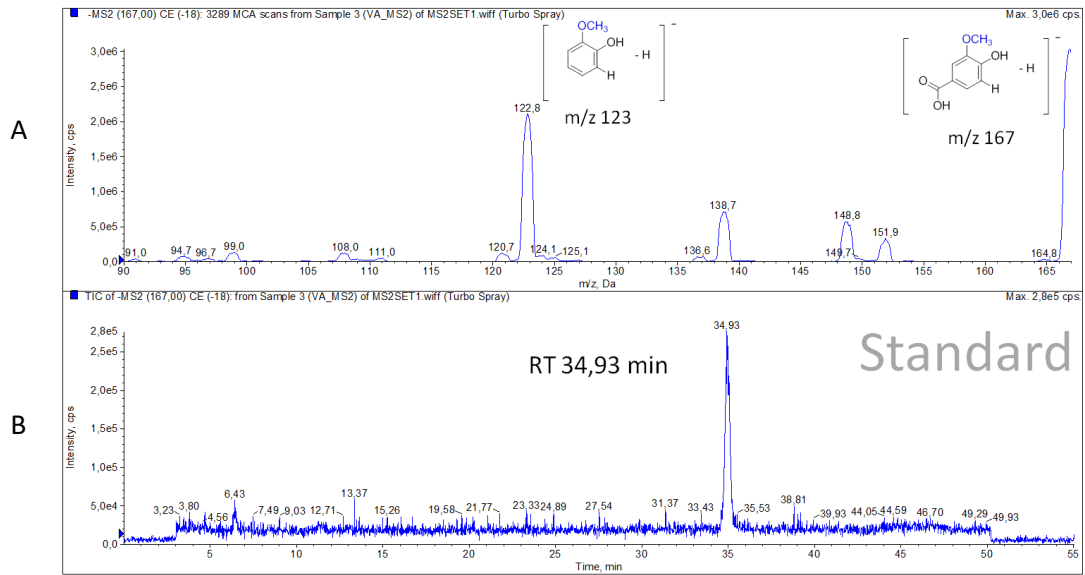
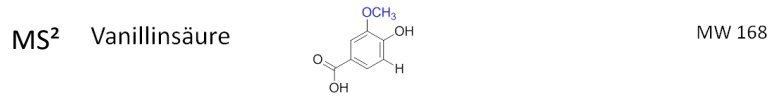
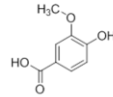
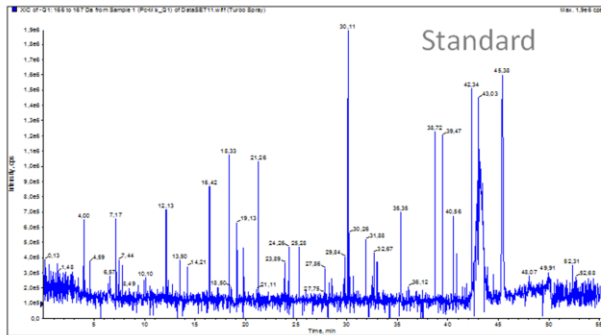


Abbildung 64: *B: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramm der Referenzsubstanz Vanillinsäure (Retentionszeit RT=34,93 min) und A: dazugehöriges Produktionspektrum MS² bei m/z 168,00 Endkonzentration Vanillinsäure: 2 µg/ml.*

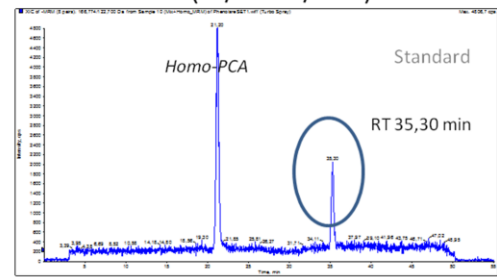
Q1 Vanillinsäure (Standard) XIC (167-168)



A



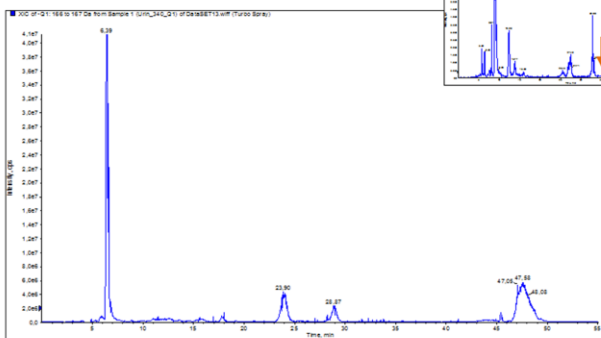
MRM (m/z 167/123)



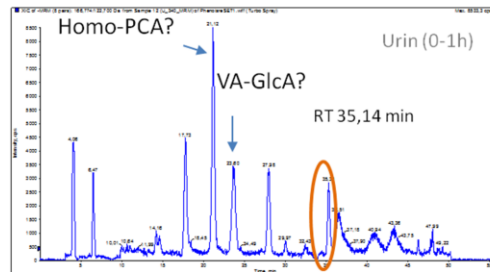
C

Q1 Urin XIC (167-168)

B



MRM (m/z 167/123)



D

Abbildung 65: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramme bei m/z 167-168 von A: Vanillinsäure und B: Humanurin (0-1 h, -24 h) und MRM-Übergänge von m/z 167/123 von C: Vanillinsäure bei 35,30 min und D: von Humanurin (0-1 h) bei 35,14 min.

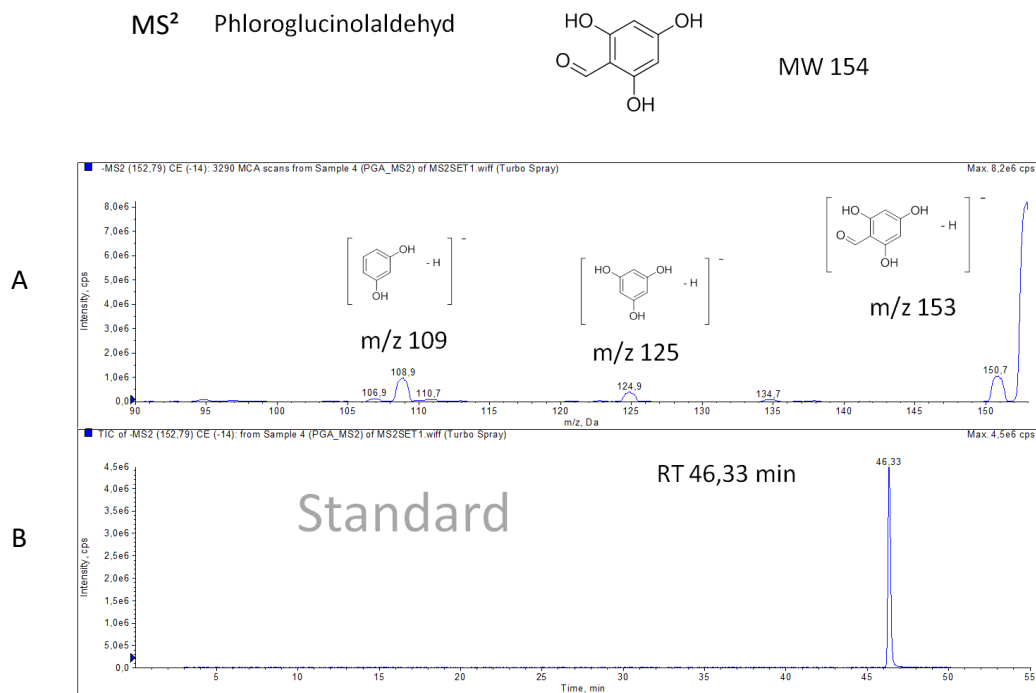


Abbildung 66: *B: HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramm der Referenzsubstanz Phloroglucinolaldehyd (Retentionszeit RT=46,33 min) und A: dazugehöriges Produktionenspektrum MS² bei m/z 154,00 Endkonzentration Phloroglucinolaldehyd: 2 µg/ml.*

Q1 Phloroglucinolaldehyd (Standard) XIC (153-154)

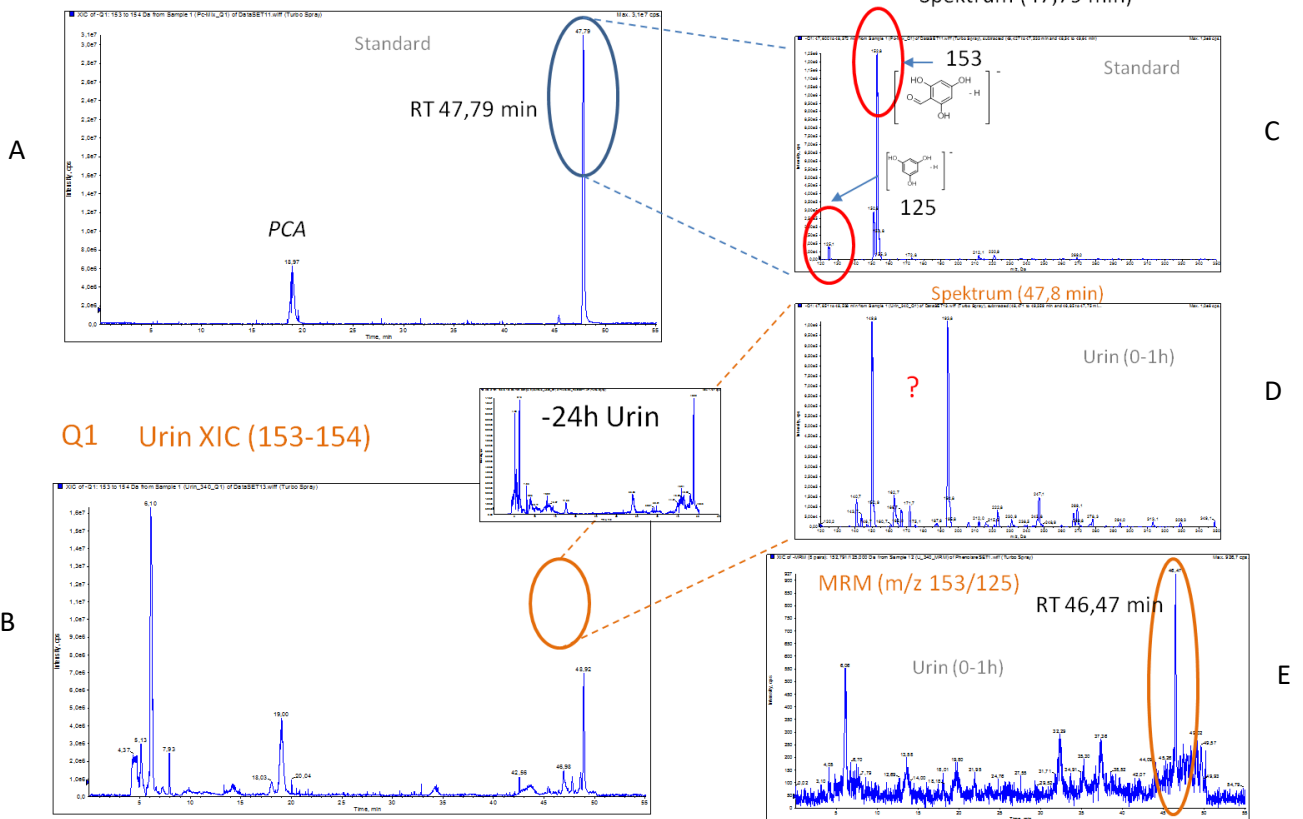


Abbildung 67:

HPLC-ESI_{neg}-MS/MS-Chromatogramme bei m/z 153-154 von A Phloroglucinolaldehyd und B: Humanurin (0-1 h, -24 h) und dazugehörige Produktionenspektren C: Phloroglucinolaldehyd bei 47,79 min und D: Humanurin (0-1 h) bei 47,80 min. E: MRM-Übergang von m/z von 153/125 bei 46,47 min im Humanurin (0-1 h).

Kalibriergeraden

Standard	Kalibriergerade	Genauigkeit R²	Matrix
Gallussäure	$Y = 0,0053x + 0,0143$	0,9996	Ileostomafluid
Hydroxybenzoesäure	$Y = 0,0239x + 0,0922$	0,9994	Ileostomafluid
Hydroxybenzaldehyd	$Y = 0,0258x + 0,1661$	0,9987	Ileostomafluid
Methylgallussäure	$Y = 0,0038x + 0,077$	0,9995	Ileostomafluid
Protocatechusäure	$Y = 0,0082x + 0,1331$	0,9996	Ileostomafluid
Phloroglucinolaldehyd	$Y = 0,0164x + 0,2803$	0,9963	Ileostomafluid
Syringasäure	$Y = 0,0015x + 0,0129$	0,9990	Ileostomafluid
Vanillinsäure	$Y = 0,0023x + 0,0104$	0,9991	Ileostomafluid
Gallussäure	$Y = 0,0067x + 0,0073$	0,9996	Plasma
Protocatechusäure	$Y = 0,0074x + 0,014$	0,9996	Plasma
Methylgallussäure	$Y = 0,0034x - 0,0023$	0,9996	Plasma
Hydroxybenzoesäure	$Y = 0,0242x - 0,0379$	0,9998	Plasma
Vanillinsäure	$Y = 0,0028x + 0,0161$	0,9997	Plasma
Syringasäure	$Y = 0,0011x - 0,0017$	0,9996	Plasma
Hydroxybenzaldehyd	$Y = 0,0282x + 0,1357$	0,9998	Plasma
Phloroglucinolaldehyd	$Y = 0,0161x + 0,1353$	0,9981	Plasma
Cyanidin-3-glc	$Y = 0,0144x - 0,0164$	0,9992	Plasma
Gallussäure	$Y = 0,0447x + 0,0529$	0,9990	Urin
Protocatechusäure	$Y = 0,0395x + 0,3315$	0,9995	Urin
Methylgallussäure	$Y = 0,0135x - 0,0657$	0,9993	Urin
Hydroxybenzaldehyd	$Y = 0,0519x + 0,0072$	0,9988	Urin
Phloroglucinolaldehyd	$Y = 0,0645x + 0,6513$	0,9953	Urin
Vanillinsäure	$Y = 0,0008x + 0,0004$	0,9974	Urin
Syringasäure	$Y = 0,0014x + 0,2017$	0,9919	Urin
Hydroxybenzoesäure	$Y = 0,0287x - 0,0231$	0,9999	Urin

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Frau Prof. Elke Richling für die Überlassung des interessanten Themas, das entgegengebrachte Vertrauen und der Förderung meiner wissenschaftlichen Entwicklung. Frau Prof. Melanie Esselen danke ich mich für die Übernahme der Zweitkorrektur und die anregenden Gespräche. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Thiel für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Bedanken möchte ich mich vor allem bei dem Programm zur Förderung der Industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) und dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (via AiF), dem Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) für die Förderung des Forschungsvorhabens (AiF 10739 N). In diesem Zusammenhang möchte mich bei allen Projektpartnern, dem projektbegleitenden Ausschuss und den teilnehmenden Probanden bedanken, ohne die die Durchführung des Projektes nicht möglich gewesen wäre:

- Dr. Tamara Bakuradze, Dr. Markus Schantz und Sylvia Schmidt (Technische Universität Kaiserslautern)
- Prof. Doris Marko und Dr. Christopher Kropat (Universität Wien)
- Dr. Ralph Melcher und Dr. Dorothee Rogoll (Universitätsklinikum Würzburg)
- Prof. Karin Schwarz und Dr. Sonja Berg (Universität Kiel)
- Prof. Ulrich Kulozik und Dr. Michael Betz (Technische Universität München)
- Prof. Hans-Ulrich Endreß (Herbstreith & FOX KG, Neuenburg)
- Prof. Hans-Jörg Krüger und Dr. Harald Kelm (Technische Universität Kaiserslautern)

Weiterhin danke ich meinen Kolleginnen der Arbeitsgruppe Tamara, Gina, Teresa, Steffi, Denise, Meike, Ingrid und Sylvia für die gemeinsame Zeit und die schöne Zusammenarbeit. Ein großer Dank geht auch an meine Diplomanden Meike, Kathrin, Stefanie und Forschungspraktikanten Manuel, Sebastian, Valentin, Angelika und Olga. Für das Korrekturlesen der Arbeit danke ich Irina, Maïke, Ramona und Tobias.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Freunden und besonders meiner Familie und Tobias, die mich auch in schwierigen Zeiten immer unterstützt haben.

Das wichtigste im Leben sind die Personen, die einen begleiten.

Akademischer Lebenslauf

Promotion

05/2011 bis 08/2014

Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elke Richling, TU Kaiserslautern

„Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit und biologischen Aktivität von anthocyanreichen Heidelbeerextrakten in verkapselter und unverkapselter Form im Menschen (AiF 17039 N)“

Diplomarbeit

05/2010 bis 03/2011

Arbeitsgruppe Prof. Dr. E. Richling, TU Kaiserslautern

„Untersuchung des antiinflammatorischen Potentials pentacyclischer Triterpene aus Apfel mittels quantitativer Realtime-PCR“

Studium der Diplomchemie

10/2005 bis 03/2011

Studium der Diplom-Chemie, TU Kaiserslautern, seit 2009 Vertiefungsstudium im Bereich Life Science in Chemistry, Lebensmittelchemie & Toxikologie

Abitur

08/1996 bis 06/2005

Illtal-Gymnasium, Illingen

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und die für die Arbeit genutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Kaiserslautern, den