

**Aufklärung von Bräunungsstrukturen und physiologischen Wirkungen von
Rooibostee mittels *in vitro* und *in vivo* Experimenten**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

DOCTOR RERUM NATURALIUM

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II – Chemie, Physik und Mathematik
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Diplom-Lebensmittelchemikerin

Theres Heinrich

geb. am 09. November 1982 in Halle (Saale)

1. Gutachter: Prof. Dr. Marcus A. Glomb
2. Gutachter: Prof. Dr. Sascha Rohn

Halle (Saale), 20. September 2013

Abstract

Theres Heinrich

Aufklärung von Bräunungsstrukturen und physiologischen Wirkungen von Rooibostee mittels *in vitro* und *in vivo* Experimenten

In der vorliegenden Arbeit wurde der nicht-enzymatische oxidative Abbau von Aspalathin untersucht. Die Degradation dieses Dihydrochalcon von Grünem Rooibostee führte zur Bildung der charakteristischen rotbraunen Farbe von fermentiertem Rooibos. Chromatographische Analysen von Aspalathin-Modellinkubationen zeigten verschiedene diskrete Signale. Die Isolierung mittels MLCCC und präparativer HPLC führte zu authentischem Material, das mit Hilfe von NMR- und MS-Experimenten strukturell aufgeklärt wurde. Erstmals konnten drei farblose Aspalathin-Dimere, die über oxidative Kupplung gebildet werden, als Intermediate der Bräunungsreaktion identifiziert werden. Zudem gelang der Nachweis der Bildung von Dihydrokaffeensäure als Fragment von Aspalathin, die wiederum zu weiteren Folgeprodukten von Aspalathin führte. Weitaus bedeutender war jedoch die erstmalige Isolation und Strukturaufklärung zweier farbiger Dibenzofurane, (*S*)- und (*R*)-3-(7,9-Dihydroxy-2,3-dioxo-6- β -D-glucopyranosyl-3,4-dihydrodibenzo[*b,d*]furan-4a(2*H*)-yl)-propionsäure), sowie deren mechanistischer Vorläuferstrukturen. Die Farbverdünnungsanalyse offenbarte diese Verbindungen als Schlüsselchromophore der inkubierten Aspalathin-Lösungen. Nach Derivatisierung zu den entsprechenden Chinoxalinen konnten die Strukturen ebenfalls im fermentierten Rooibostee detektiert werden.

Enzymkinetische Studien zeigten Inhibitorwirkungen für alle drei getesteten Polyphenole (Aspalathin, (+)-Catechin, Isoquercitrin) mit unkompetitiver Inhibierung von α -Glucosidase und α -Amylase sowie mit kompetitiver Hemmung von Saccharase. Aspalathin erwies sich als stärkster Inhibitor von α -Amylase und zeigte eine Hemmwirkung auf α -Glucosidase. (+)-Catechin hemmte besonders α -Glucosidase und Saccharase. Isoquercitrin zeigte ebenfalls eine leichte Inhibierung der Verdauungsenzyme. Die reversible Hemmung der Enzyme deutet auf eine nicht-kovalente Inhibierung hin. Die *in vitro*-Ergebnisse wurden durch *in vivo*-Untersuchungen an Ratten bestätigt. Aspalathin unterdrückte dabei am effektivsten die Blutglucoseantwort durch Inhibierung der Verdauungsenzyme *in vivo*. (+)-Catechin und Isoquercitrin übten eine leichte Reduktion und damit einen deutlich geringeren inhibitorischen Effekt als Aspalathin aus. Die Resultate der *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zeigten ein eindeutiges inhibitorisches Potenzial der polyphenolischen Strukturen von unfermentiertem Rooibostee auf die Enzyme des menschlichen Verdauungstraktes. Vor allem Aspalathin könnte zur Kontrolle der Hyperglycämie beitragen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen

Krafczyk, N., **Heinrich, T.**, Porzel, A., Glomb, M. A.

Oxidation of the Dihydrochalcone Aspalathin leads to Dimerization

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2009**, 57 (15), 6838-6843

Heinrich, T., Willenberg, I., Glomb, M. A.

Chemistry of Color Formation during Rooibos Fermentation

Journal of Agricultural and Food Chemistry, **2012**, 60 (20), 5221-5228

Tagungsvorträge

Heinrich, T., Glomb, M. A.

Auftreten von Flavonoid-Dimeren bei der Rooibos-Fermentation

19. Arbeitstagung der Regionalverbände Nord, Nord-Ost, Süd-Ost der

Lebensmittelchemischen Gesellschaft der GDCh, 02.-03.04.2009, Berlin

(Abstract in: *Lebensmittelchemie* **2009**, 63 (6), 158)

Heinrich, T., Glomb, M. A.

Untersuchungen zur Farbbildung bei der Rooibostee-Fermentation

Außerordentliches Treffen des Bundesverbandes der Deutschen Süßwarenindustrie e.V.,

09.06.2010, Halle (Saale).

Heinrich, T., Glomb, M. A.

Identifizierung von Bräunungsstrukturen im fermentierten Rooibostee

40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 12.-14.09.2011, Halle (Saale)

(Abstract: *Kurzreferateband* Gesellschaft Deutscher Chemiker, 40. Deutscher

Lebensmittelchemikertag **2011**, D 13, 45)

Posterbeiträge

Heinrich, T., Krafczyk, N., Glomb, M. A.

Untersuchungen zur Bildung von Bräunungsstrukturen im Rooibostee

37. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 08.-10.09.2008, Kaiserslautern

(Abstract: *Lebensmittelchemie* **2009**, 63 (2), 37)

Heinrich, T., Glomb, M. A.

Dimere als potentielle Vorläufer von Bräunungsstrukturen des Rooibostees

38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14.-16.09.2009, Berlin

(Abstract: *Lebensmittelchemie* **2010**, 64 (2), 27)

Wippermann, H., **Heinrich, T.**, Glomb, M. A.

Enzyminhibierung durch Polyphenole des Rooibos-Tees

38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 14.-16.09.2009, Berlin

(Abstract: *Lebensmittelchemie* **2010**, 64 (2), 26)

Heinrich, T., Willenberg, I., Glomb, M. A.

Untersuchungen zur Farbbildung bei der Rooibostee-Fermentation

39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 20.-22.09.2010, Stuttgart-Hohenheim

Heinrich, T., Kober, A., Glomb, M. A.

Untersuchungen zum Abbau von Aspalathin

40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 12.-14.09.2011, Halle (Saale)

(Abstract: *Kurzreferateband* Gesellschaft Deutscher Chemiker, 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag **2011**, SE 01, 113)

Heinrich, T., Liehr, K., Glomb, M. A.

In vivo-Testung von Rooibostee-Inhaltsstoffen als potentielle Inhibitoren von α -Glucosidasen

40. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 12.-14.09.2011, Halle (Saale)

(Abstract: *Kurzreferateband* Gesellschaft Deutscher Chemiker, 40. Deutscher Lebensmittelchemikertag **2011**, PL 01, 237)

Weitere Publikationen (Diese stehen nicht in Zusammenhang mit der Promotion.)

Abb, M., **Heinrich, T.**, Sorkau, E., Lorenz, W.

Phthalates in house dust

Environment International, **2009**, 35 (6), 965-970

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Marcus Glomb für die Überlassung dieses sehr interessanten Themas. Ihre stete Unterstützung und Betreuung sowie Ihre wertvollen wissenschaftlichen Anregungen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Sascha Rohn für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Müller, Frau Nicole Blum sowie Frau Kristin Müller des Institutes für Agrar- und Ernährungswissenschaften bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit und Unterstützung bei der Durchführung der tierexperimentellen Studien.

Zudem möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. Dieter Ströhl und Herrn Michael Kovermann für die Aufnahme der NMR-Spektren danken. Den Mitarbeitern des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie Frau Dr. Andrea Porzel, Herrn Dr. Jürgen Schmidt sowie Herrn Dr. Stephan Schmidt sei ebenfalls für die Aufnahme der NMR-Spektren, CD-Spektren, HR-MS-Spektren sowie für die Durchführung der UPLC-TOF-MS-Messungen gedankt.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Arbeitskreises Lebensmittelchemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Unsere Kochabende werden mir in guter Erinnerung bleiben. Insbesondere danke ich Herrn Dr. Martin Schubert und Herrn Christian Henning für die vielen hilfreichen Diskussionen und Anregungen.

Nicht zu vergessen sind meine ehemaligen Diplomandinnen Frau Kristin Liehr, Frau Helga Wippermann, Frau Ina Willenberg, Frau Stephanie Moritz, Frau Ariane Kober sowie Frau Franziska Hausmann. Vielen Dank für eure fleißigen Beiträge zu dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich meinen lieben Eltern und Geschwistern für die grenzenlose Unterstützung. Euer Verständnis und eure Motivation waren stets die treibende Kraft für mich. Ein aufrichtiger Dank gilt ebenso meinen Freunden Anne und Mono. Ohne eure stete Ermutigung und ohne euren Glauben an mich wäre diese Arbeit nie entstanden. Schließlich und keineswegs zuletzt möchte ich meinem Freund Lars ganz herzlich danken. Deine Geduld und deine moralische Unterstützung waren immer mein Kompass. Danke, dass du bei mir bist.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Teil	4
2.1	Polyphenole	4
2.1.1	Phenolcarbonsäuren	5
2.1.2	Flavonoide.....	8
2.2	<i>Camellia sinensis</i>	12
2.3	<i>Aspalathus linearis</i>	17
2.4	Farbverdünnungsanalyse	22
2.5	Circular-Dichroismus-Spektroskopie	23
2.6	Enzyme	24
2.6.1	Enzymkinetik	25
2.6.1.1	Michaelis-Menten-Gleichung	26
2.6.1.2	Geschwindigkeits-Konzentrations-Diagramm	26
2.6.1.3	Lineweaver-Burk-Darstellung.....	27
2.6.2	Inhibierung	28
2.6.2.1	Kompetitive Hemmung.....	29
2.6.2.2	Nicht-kompetitive Hemmung.....	30
2.6.2.3	Unkompetitive Hemmung.....	31
2.6.2.4	Partiell kompetitive Hemmung	31
2.6.2.5	Inhibitorkonstante.....	32
2.6.3	Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels	34
2.7	Diabetes mellitus	37
2.7.1	Typen	37
2.7.2	Diagnostik	38
2.7.3	Behandlung	39
3	Ergebnisse und Diskussion	41
3.1	Untersuchungen zum Abbau des Rooibostee-Dihydrochalcon Aspalathin	41
3.1.1	Dimere als farblose Intermediate der Aspalathin-Inkubation	41
3.1.1.1	Zeit-Umsatz-Kurven der farblosen Intermediate 1, 2, 4 und 5.....	42
3.1.1.2	Strukturaufklärung der Verbindungen 1 und 2.....	43
3.1.1.3	Postulierter Bildungsweg der Dimere 1 und 2	44
3.1.1.4	Strukturaufklärung der Verbindungen 4 und 5.....	45
3.1.1.5	Postulierter Bildungsweg der Dimere 4 und 5	46
3.1.2	Dihydrokaffeensäure als farbloses Intermediat des Aspalathin-Abbaus	48
3.1.2.1	Identifizierung von Dihydrokaffeensäure als Abbauprodukt	48

3.1.2.2	Aspalathin-Dihydrokaffeensäure-Addukte als Folgeprodukte	49
3.1.2.3	Postulierter Bildungsweg der Aspalathin-Dihydrokaffeensäure-Addukte 7, 8	50
3.1.3	Identifizierung farbiger Strukturen bei der Aspalathin-Inkubation.....	51
3.1.3.1	Strukturaufklärung der farbigen Strukturen 11 und 12.....	52
3.1.3.2	Postulierter Bildungsmechanismus der Strukturen 11 und 12.....	53
3.1.3.3	Zeit-Umsatz-Kurven der Dibenzofurane sowie ihrer Precursor-Strukturen	55
3.1.3.4	Anwendung der Farbverdünnungsanalyse auf die Dibenzofurane 11 und 12	56
3.2	Untersuchung der Enzyminhibierung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>.....	58
3.2.1	Enzyminhibierung durch Rooibostee-Polyphenole <i>in vitro</i>	58
3.2.1.1	Enzymassay α -Glucosidase.....	58
3.2.1.2	Enzymassay α -Amylase.....	61
3.2.1.3	Enzymassay Saccharase.....	63
3.2.2	Enzyminhibierung durch Rooibostee-Polyphenole <i>in vivo</i>	65
3.2.2.1	Postprandiale Blutglucoseantwort der Saccharose-Versuchsreihe	65
3.2.2.2	Postprandiale Blutglucoseantwort der Stärke-Versuchsreihe	67
3.2.2.3	Enzymassay Saccharase.....	69
3.2.2.4	Enzymassay α -Amylase.....	71
3.2.3	Mechanismus der Enzyminhibierung durch Polyphenole.....	72
3.2.3.1	Struktur-Aktivitäts-Wechselwirkungsbeziehungen der α -Glucosidase	72
3.2.3.2	Struktur-Aktivitäts-Wechselwirkungsbeziehungen der α -Amylase	74
3.2.3.3	Struktur-Aktivitäts-Wechselwirkungsbeziehungen der Saccharase	74
3.2.4	Vergleich der Inhibierung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	75
4	Zusammenfassung.....	76
5	Experimenteller Teil	79
5.1	Chemikalien.....	79
5.2	Geräte.....	81
5.3	Aspalathin-Inkubationen	82
5.3.1	Laufmittel und Lösungen.....	82
5.3.2	Aspalathin Isolierung.....	83
5.3.2.1	Extraktion	83
5.3.2.2	Aufarbeitung an der Kieselgelsäule	84
5.3.2.3	Aufreinigung mittels RP18-Säulenchromatographie.....	84
5.3.3	Aspalathin-Inkubationen und deren chromatographische Auswertung	84
5.3.3.1	Inkubationen bei verschiedenen pH-Werten.....	84
5.3.3.2	Absorptionsscan Aspalathin-Inkubation.....	85
5.3.3.3	Untersuchung der Aspalathin-Inkubationen mittels analytischer HPLC	85
5.3.3.4	Untersuchung der Aspalathin-Inkubationen mittels LC-MS/MS	86
5.3.3.5	Aufnahme von Zeit-Umsatz-Kurven.....	88
5.3.3.6	Reinkubation der Dimere	88

5.3.3.7	Untersuchung der Aspalathin-Inkubationen mittels GC-MS	89
5.3.4	Strukturisolierung	89
5.3.4.1	Fraktionierung mittels Multilayer Countercurrent Chromatographie	90
5.3.4.2	Isolierung mittels präparativer HPLC	90
5.3.5	Strukturaufklärung	91
5.3.5.1	Bestimmung der hochauflösenden Masse (HR-MS, UPLC-TOF-MS).....	91
5.3.5.2	Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie (NMR)	92
5.3.5.3	Circular Dichroism Spektroskopie (CD)	92
5.3.5.4	Isomerisierungsexperimente	92
5.3.6	Farbverdünnungsanalyse	92
5.3.7	Fermentierter Rooibostee	93
5.4	Enzymassays <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	94
5.4.1	Enzymassays <i>in vitro</i>	94
5.4.1.1	α -Glucosidase-Assay	94
5.4.1.2	α -Amylase-Assay	95
5.4.1.3	Saccharase-Assay	95
5.4.1.4	Kinetische Studien	96
5.4.2	Enzymassays <i>in vivo</i>	96
5.4.2.1	Versuchstiere und deren Haltung	96
5.4.2.2	Versuchsablauf	97
5.4.2.3	Messung der postprandialen Blutglucoseantwort	98
5.4.2.4	Messung des Einflusses auf die Enzymaktivität	98
5.4.2.5	Saccharase-Assay – <i>in vivo</i>	99
5.4.2.6	α -Amylase-Assay – <i>in vivo</i>	100
5.4.2.7	Bestimmung des Proteingehaltes	101
5.4.2.8	Statistische Auswertung.....	101
6	Literaturverzeichnis	102
7	Abbildungsverzeichnis	110
8	Tabellenverzeichnis	115
9	Abkürzungsverzeichnis	117
10	Anhang.....	120
11	Lebenslauf	152
12	Eigenständigkeitserklärung	153

1 Einleitung

Rooibostee (*Aspalathus linearis*) zählt zu den Kräuter- und Früchtetees. Die Abwesenheit von Koffein sowie der geringe Gehalt an Gerbstoffen sind für die gute Verträglichkeit des Tees verantwortlich. In Verbindung mit dem leicht süßlichen Geschmack und den antioxidativen Eigenschaften hat sich Rooibos zu einem beliebten Getränk entwickelt. Der weltweite Absatz von unaromatisiertem Rooibostee stieg von 2000 t im Jahr 2002 auf bereits 2797 t im Jahr 2008 an. Damit trägt Rooibos mit 8 % zum Gesamtverzehr von Kräuter- und Früchtetee bei [1].

Die antioxidative Kapazität des Getränkes beruht auf dem hohen Polyphenolanteil. Das Hauptflavonoid des unfermentierten Tees ist das ausschließlich in Rooibos vorkommende C-glycosidische Dihydrochalcon Aspalathin [2]. Während der Fermentation des Tees wird Aspalathin um 98 % abgebaut und es kommt zur Bildung höhermolekularer Bräunungsstrukturen, die für die charakteristische rotbraune Farbe des fermentierten Rooibostees verantwortlich sind. Studien belegten, dass die Bildung dieser Bräunungsstrukturen auf den Abbau des Aspalathins zurückzuführen ist. Detaillierte Bildungsmechanismen oder gebildete farbige Strukturen wurden bislang allerdings noch nicht beschrieben. Die Untersuchungen von Krafczyk *et al.* ergaben, dass der oxidative Aspalathin-Abbau im Gegensatz zu den Prozessen beim Schwarzen Tee (*Camellia sinensis*) unter nicht-enzymatischen Bedingungen abläuft [3].

Die Bildung der Bräunungsstrukturen des Schwarzen Tees wird durch die Polyphenoloxidase-katalysierte Oxidation der Catechine des Grünen Tees initiiert [4]. Der bestimmende Schritt für die weiteren Reaktionen stellt dabei die Bildung der *o*-Chinone dar, die durch das Redoxpotenzial der Catechine, die relativen Konzentrationen sowie das oxidative Reaktionsumfeld beeinflusst wird [5]. Nachfolgende oxidative Polymerisierungsreaktionen führen zur Bildung von Bisflavanolen, Theaflavinen, Thearubigenen und weiteren Oligomeren [6].

Die Änderung der Farbgebung beim Rooibostee ist hingegen fast ausschließlich auf nicht-enzymatische Reaktionsmechanismen zurückzuführen. In der Literatur ist bisher ein Abbauweg des Aspalathins beschrieben. So wird die Verbindung zunächst zum *o*-Chinon oxidiert und über die Bildung von Eriodictyol-glucoopyranosiden von Isoorientin in Orientin umgewandelt [7, 8]. Mit Absorptionsmaxima bei 280 nm und 350 nm stellen diese Strukturen jedoch keine farbigen Verbindungen dar.

Ziel dieser Arbeit soll es sein, die Chemie der Farbbildung während der Rooibostee-Fermentation aufzuklären. Dabei sollen diskrete farbige Verbindungen aus Aspalathin-Modellinkubationen sowie aus fermentiertem Tee isoliert und strukturell aufgeklärt

werden. Durch die Anwendung der Farbverdünnungsanalyse soll der Beitrag der Zielstrukturen zur Gesamtfarbe beschrieben werden [9, 10].

Ein weiterer Teilaspekt der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit den gesundheitsfördernden Eigenschaften, die dem Grünen Rooibos aufgrund seines hohen Polyphenolanteils zugeschrieben werden. Studien belegten sowohl eine antimutagene [11, 12] als auch eine antioxidative Wirkung der Teeinhaltsstoffe [13, 14]. Neben einem chemopräventiven Potenzial wird auch über Eigenschaften berichtet, nervöse Anspannungen zu lindern und Verdauungsstörungen zu beruhigen [13, 15]. Kawano *et al.* konnten zudem erstmals hypoglycämische Effekte des Aspalathins nachweisen. Die *in vivo*-Untersuchungen zeigten unter anderem, dass Aspalathin einen suppressiven Effekt auf den Anstieg des Blutglukosespiegels bei Typ 2-Diabetes-Mäusen Modell db/db ausübte und dadurch zu einer verbesserten Glucosetoleranz führte [16].

Diabetes mellitus ist die am häufigsten vorkommende Stoffwechselstörung mit weitreichenden Folgen auf den Metabolismus von Kohlenhydraten, Fetten und Eiweißen. Die Krankheit ist im Allgemeinen durch einen erhöhten Blutzuckerspiegel gekennzeichnet. Dieser kann entweder auf eine gestörte Insulinsekretion des Pankreas (Typ 1-Diabetes), auf eine verminderte Insulinwirkung (Typ 2-Diabetes) oder auf beides zurückgeführt werden [17, 18]. Typ 2-Diabetes stellt mit 90-95 % aller Diabetes-Erkrankungen die am häufigsten auftretende Form dar [19]. Weltweit lag die Anzahl der Betroffenen bei 171 Millionen im Jahr 2000. Schätzungen gehen von einer Zunahme der Erkrankungen bis auf 366 Millionen im Jahr 2030 aus [20]. Ausschlaggebend für diese Entwicklung sind neben der genetischen Disposition vor allem die Faktoren Übergewicht, falsche Ernährung, mangelnde körperliche Aktivität sowie ein höheres Lebensalter [18].

Die Insulinresistenz führt beim Typ 2-Diabetes zu einer postprandialen Hyperglycämie. Verantwortlich für den schnellen Anstieg des Blutzuckerspiegels ist zum Einen die durch α -Amylase katalysierte hydrolytische Spaltung der Stärke und zum Anderen die α -Glucosidase vermittelte Glucoseaufnahme über den Dünndarm [21]. Daher zielt eine mögliche Behandlungstherapie des Typ 2-Diabetes (neben Diät und Bewegung) auf eine Inhibierung der genannten Kohlenhydrat-hydrolysierenden Enzyme des Verdauungstraktes. Ziel ist die verzögerte Absorption von Glucose und Absenkung der postprandialen Hyperglycämie [22].

Bei der Behandlung des Typ 2-Diabetes kommen bereits verschiedene synthetische α -Glucosidase-Inhibitoren wie Acarbose, Miglitol und Voglibose als orale Antidiabetika zur Anwendung. Ihnen gemein ist eine größere Affinität zu den Enzymen als die Kohlenhydrate [21, 23]. Allerdings leiden die mit diesen oralen Antidiabetika behandelten Patienten unter chronischen Nebenwirkungen wie Flatulenz, Übelkeit und Diarrhö [24].

Daher wurde in den letzten Jahren der Fokus vermehrt auf das antihyperglycämische Potenzial nicht-synthetischer Strukturen gelegt, um effektive α -Glucosidase-Inhibitoren aus natürlichen Quellen gewinnen zu können. Besondere Bedeutung fällt dabei den pflanzlichen Flavonoiden zu, wobei vor allem das Augenmerk auf den Tee-Polyphenolen liegt, seitdem deren inhibitorische Fähigkeiten durch Hara *et al.* *in vivo* und *in vitro* untersucht wurde [25]. Die Studien wiesen Catechine und Theaflavine als die Strukturen mit dem höchsten inhibitorischen Potenzial auf die Schlüsselenzyme α -Amylase, α -Glucosidase und Saccharase des menschlichen Verdauungstraktes aus [26, 27].

Matsumoto und Igarashi berichten zudem von einer signifikanten Reduktion der Blutglucose durch Tee-Polyphenole in Ratten, denen Stärke bzw. Saccharose verabreicht wurden [28, 29]. Erste Untersuchungen, die Auskunft über die strukturellen Eigenschaften für die inhibitorische Aktivität geben, wurden von Matsui durchgeführt [27].

Aufgrund der Inhibitorwirkung der Tee-Polyphenole sowie den erstmals durch Kawano erbrachten Hinweis auf antihyperglycämische Eigenschaften des Aspalathins, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit *in vitro*- und *in vivo*-Studien durchgeführt, die einen direkten Einfluss des C-glycosidischen Dihydrochalcones auf die Verdauungsenzyme betrachten. Zusätzlich wurden Minorkomponenten des Grünen Rooibos, das O-glycosidische Flavonol Isoquercitrin und (+)-Catechin als Vertreter der Flavan-3-ole, auf deren Inhibitorwirkung untersucht, um Hinweise auf Struktur-Aktivitäts-Wechselwirkungsbeziehungen zu erhalten.

2 Theoretischer Teil

2.1 Polyphenole

Polyphenole stellen einen wichtigen Bestandteil aller Pflanzen und Früchte dar. Als Produkte des Sekundärstoffwechsels der Pflanzen werden sie den Sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zugeordnet. Polyphenole sind durch mindestens einen aromatischen Ring charakterisiert, der mit einer oder mehreren Hydroxylgruppen substituiert ist. Bisher wurden mehr als 8000 phenolische Strukturen identifiziert [30]. In ihrer Funktion als Wachstumsregulatoren, Farb- und Aromastoffe spielen die Polyphenole eine essenzielle Rolle für die Pflanzenphysiologie. Zudem werden sie von den Pflanzen gebildet, um diese vor Schädlingen (Erhöhung der Adstringenz), Krankheiten (als Phytoalexine) und UV-Strahlung zu schützen. Ihre antioxidativen Eigenschaften bewahren die Pflanze zusätzlich vor oxidativem Stress [31]. Als besonders polyphenolhaltige Quellen sind Obst und Gemüse, Tee, Kakao und Wein zu nennen [32]. Dabei kann das polyphenolische Profil der Pflanze innerhalb verschiedener Arten der gleichen Spezies variieren [31].

Phenolische Verbindungen fungieren als Substrat der Polyphenoloxidasen (PPO). Diese Enzyme sind in Pflanzen weit verbreitet. Aufgrund ihrer Bifunktionalität spielen sie eine Rolle sowohl bei der Bildung von *o*-Diphenolen aus Monophenolen als auch bei der Oxidation der *o*-Diphenole zu *o*-Chinonen (Abb. 1) [33].

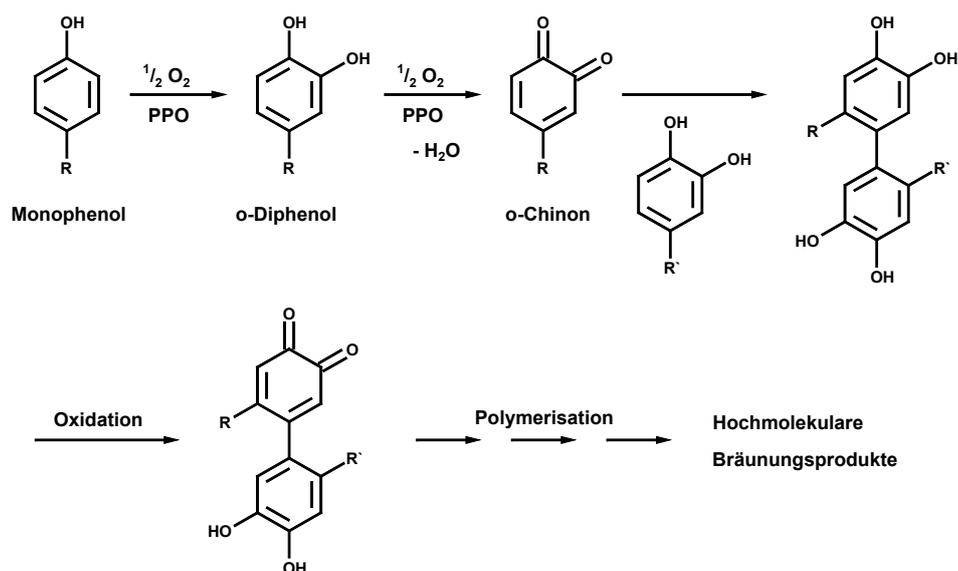


Abb. 1: Oxidative Veränderungen phenolischer Verbindungen katalysiert durch Polyphenoloxidasen (PPO) [33]

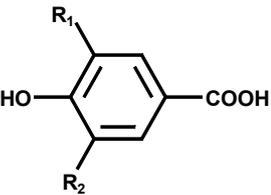
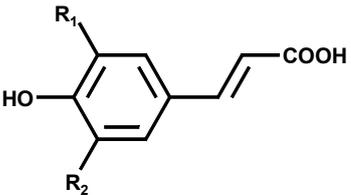
Die *o*-Chinone bilden im weiteren Verlauf durch Polymerisation hochmolekulare Bräunungsprodukte und nehmen daher eine zentrale Stellung bei der enzymatischen Bräunung, wie sie z. B. für Tee und Obst beschrieben ist, ein. Derartige oxidative Prozesse können beim Verarbeitungsprozess der entsprechenden pflanzlichen Lebensmittel und bzw. oder während ihrer Lagerung stattfinden [33].

Abhängig von ihrer chemischen Struktur werden die Polyphenole in verschiedene Klassen eingeteilt. Bei den am weitest verbreiteten Polyphenolklassen handelt es sich um die Phenolcarbonsäuren und um die mehr als 5000 Verbindungen umfassende Klasse der Flavonoide [31].

2.1.1 Phenolcarbonsäuren

Phenolcarbonsäuren stellen eine Unterklasse der Polyphenole dar, die durch eine zusätzliche Carboxyl-Funktionalität gekennzeichnet ist. Sie umfasst die Verbindungen der Hydroxybenzoesäuren und Hydroxyzimtsäuren. Oftmals werden in der Literatur auch die Aldehyd-Analoga (z. B. Vanillin) den Phenolcarbonsäuren zugeordnet [34]. Die Phenolcarbonsäuren werden anhand ihres chemischen Grundgerüsts unterschieden. Während bei den Hydroxybenzoesäurederivaten ein C₆-C₁-Körper vorliegt, weisen die Hydroxyzimtsäurederivate ein C₆-C₃-Grundgerüst auf [31]. Tab. 1 stellt die wichtigsten Vertreter der Phenolcarbonsäuren übersichtlich dar.

Tab. 1: Vertreter der Phenolcarbonsäuren [35]

	R ₁	R ₂
Hydroxybenzoesäure-Derivate		
	Gallussäure	OH
	Protocatechussäure	OH
	Syringasäure	OCH ₃
	Vanillinsäure	OCH ₃
Hydroxyzimtsäure-Derivate		
	<i>p</i> -Coumarsäure	H
	Ferulasäure	H
	Sinapinsäure	OCH ₃
	Kaffeesäure	H

Im Pflanzengewebe liegen die Hydroxyzimtsäurederivate aufgrund des biochemischen Syntheseweges vorherrschend in *trans*-Form vor. Die Einstrahlung von UV-Licht kann jedoch eine Isomerisierung zur *cis*-Form begünstigen [33].

Im Allgemeinen sind Phenolcarbonsäuren selten als freie Säuren in den Pflanzen vorhanden. Vielmehr ist der Großteil der Verbindungen durch Ester-, Ether- oder Acetal-Bindungen mit anderen Pflanzeninhaltsstoffen verbunden. Dabei kann es sich um i) Struktur bildende Komponenten (z. B. Cellulose, Proteine, Lignin), ii) größere Polyphenole (z. B. Flavonoide), iii) kleinere organische Moleküle (z. B. Glucose, Chinasäure) oder iv) andere Naturprodukte (z. B. Terpene) handeln. Allerdings liegt niemals eine Glycosylierung an den phenolischen Hydroxylgruppen des B-Rings vor [33, 36].

Die Synthese der Hydroxybenzoesäure- und Hydroxyzimtsäurederivate erfolgt aus der aromatischen Aminosäure Phenylalanin, die zuvor aus der Chorisminsäure, dem Endprodukt des Shikimisäureweges gebildet wird. Der Ablauf des Shikimisäureweges ist in Abb. 2 dargestellt. Die Chorisminsäure entsteht durch enzymatische Synthese aus den dem Kohlenhydratstoffwechsel entstammenden Vorstufen Phosphoenolpyruvat und Erythrose-4-phosphat. Die Bildung erfolgt dabei über die Zwischenstufe der 3-Dehydroshikimisäure, die anschließend zur Shikimisäure reduziert wird. Über eine weitere Kaskade enzymkatalysierter Schritte entsteht die Chorisminsäure, aus der schließlich im Rahmen des Arogenat-Weges über Prephenat Phenylalanin hervorgeht [34, 37].

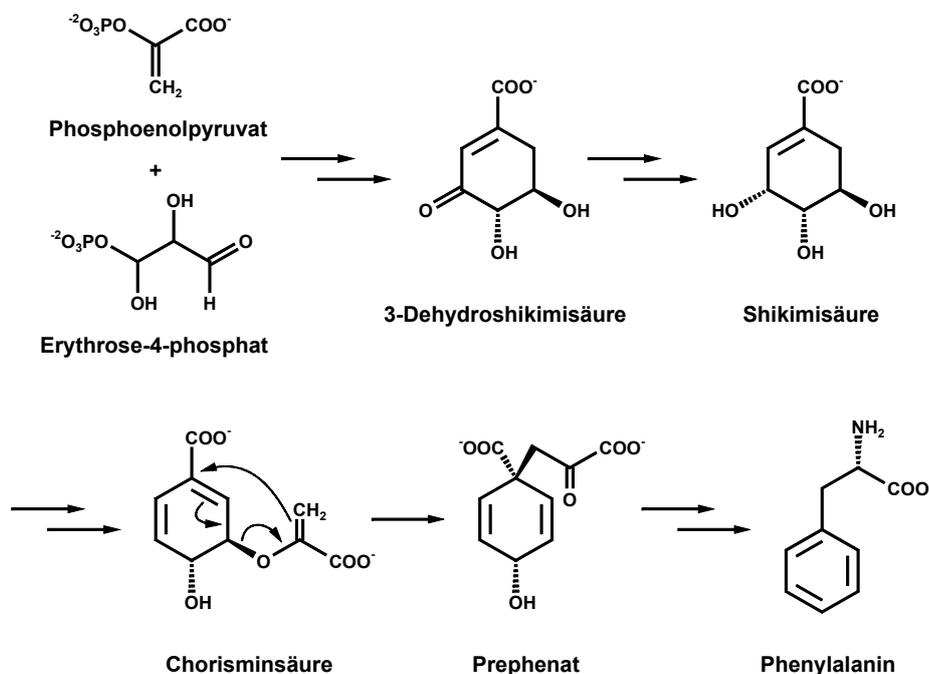


Abb. 2: Biosyntheseweg von Phenylalanin innerhalb des Shikimisäureweges [34]

Innerhalb des Phenylpropanoidweges werden nun aus Phenylalanin die Phenolcarbonsäuren gebildet (Abb. 3). Nach der Abspaltung von Ammoniak durch Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) wird *trans*-Zimtsäure gebildet. Durch die Hydroxylierung mit Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) an Position 4 entsteht *p*-Coumarsäure, aus der durch weitere Hydroxylierungen und Methylierungen u. a. die Hydroxyzimtsäurederivate Kaffeesäure, Ferulasäure und Sinapinsäure hervorgehen. In einem parallel ablaufenden Reaktionsweg werden durch die Abspaltung eines C₂-Fragmentes aus der *trans*-Zimtsäure die Benzoessäuren gebildet. Dies erfolgt ähnlich der β -Oxidation von Fettsäuren und setzt eine Aktivierung der Zimtsäure mit Coenzym A (CoA) voraus. Folgende Hydroxylierungen und Methylierungen führen auch hier zu den entsprechenden Hydroxybenzoessäurederivaten [34, 37].

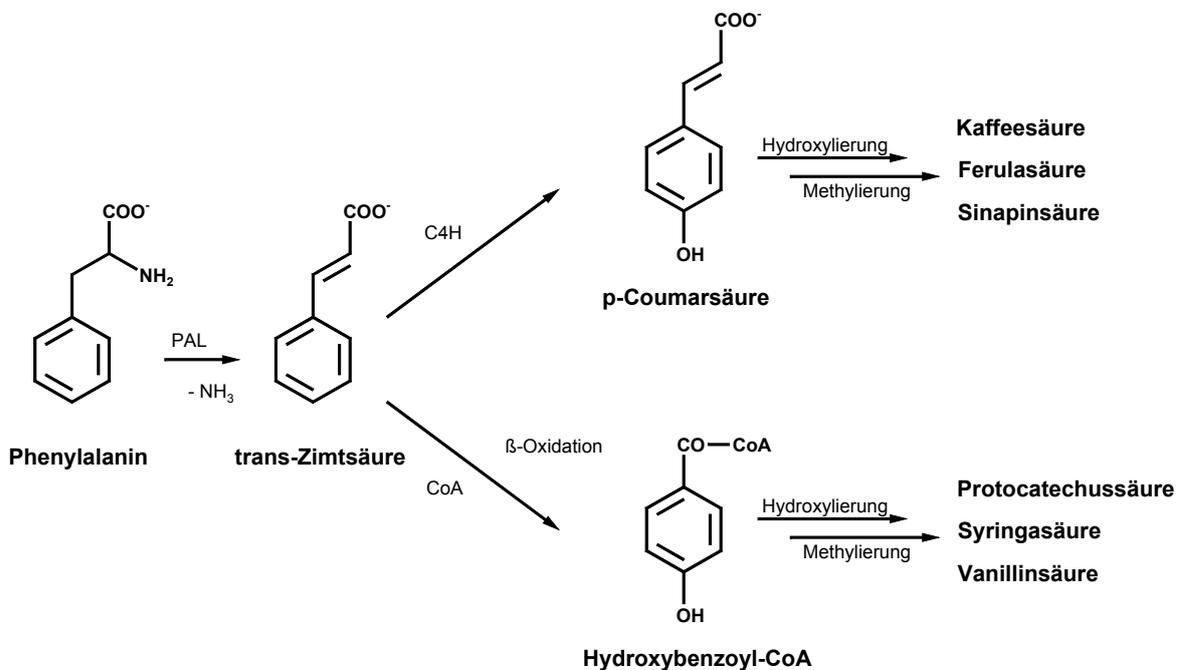


Abb. 3: Biosyntheseweg von Hydroxybenzoensäure- und Hydroxyzimtsäurederivaten innerhalb des Phenylpropanoidweges [34]

2.1.2 Flavonoide

Flavonoide stellen die größte Unterklasse der Polyphenole dar. Die chemische Struktur der Flavonoide leitet sich vom 2-Phenylchroman, dem C₆-C₃-C₆-Flavan-Grundkörper, ab (Abb. 4). Dieser besteht aus 15 Kohlenstoffatomen mit zwei aromatischen Ringen (A- und B-Ring), die über drei Kohlenstoffatome miteinander verbunden sind (heterozyklischer C-Ring) [30].

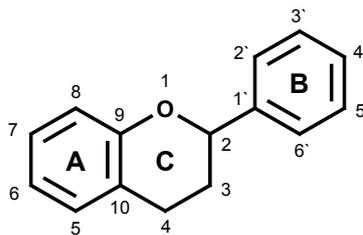


Abb. 4: Flavonoid-Grundgerüst [30]

In Abhängigkeit vom Oxidationsgrad des C-Rings werden die Flavonoide in sechs Hauptgruppen untergliedert: Flavonole, Flavone, Flavanole, Anthocyanidine, Flavanone und Isoflavone (Abb. 5) [32]. Die farbigen Anthocyanidine unterscheiden sich aufgrund einer positiven Ladung am C-Ring (Flavyliumkation) von den anderen Flavonoiden [38].

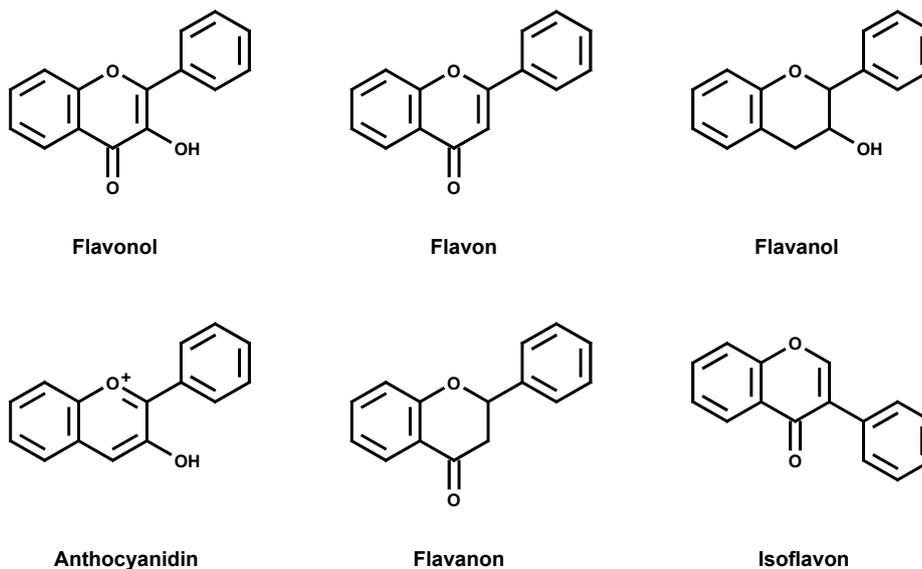


Abb. 5: Grundstrukturen der sechs Flavonoid-Hauptgruppen [30]

Neben den sechs Hauptgruppen gibt es weitere Flavonoid-Gruppen, die jedoch im Vergleich eine wesentlich geringere Anzahl an Vertretern aufweisen: Dihydroflavonole, Flavandiole, Coumarine und Aurone. Als biosynthetische Vorläufer werden die Chalcon- und Dihydrochalcon-Strukturen ebenfalls den Flavonoiden zugeordnet (Abb. 6) [32].

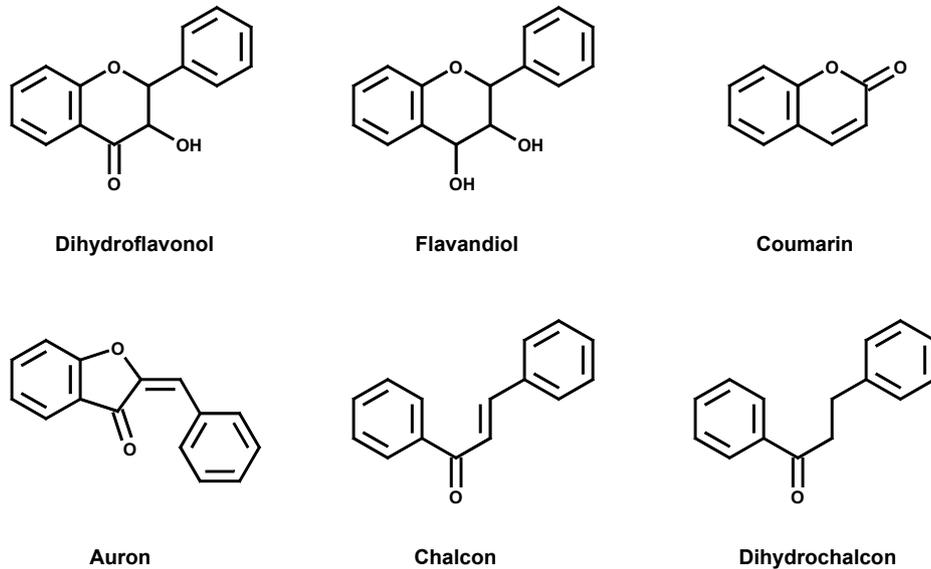


Abb. 6: Grundstrukturen weiterer Flavonoid-Gruppen [30]

Flavonoide liegen in Pflanzen vorrangig glycosyliert vor. Am häufigsten an das Aglykon gebunden sind D-Glucose, L-Rhamnose, D-Galactose und L-Arabinose [39]. Neben der zumeist O-glycosidischen Bindung ist aber auch eine C-glycosidische Bindung des Zuckers möglich [31]. Die bevorzugten Bindungsstellen sind dabei die Positionen C-3 (nur bei Flavonolen) und C-7 [36]. Gemeinsam mit den Hydroxylgruppen bestimmen die gebundenen Zuckerreste die Wasserlöslichkeit der Verbindungen [30].

Die Biosynthese der Flavonoide erfolgt im Cytosol der Pflanze innerhalb des Phenylpropanoidweges, aus dem neben den Flavonoiden weitere Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, wie z. B. Phenolcarbonsäuren (s. Tab. 1, S. 5), Lignine und Stilbene hervorgehen. Abb. 7 stellt den Teil des Phenylpropanoidweges dar, der die Biosynthese der wichtigsten Flavonoide enthält. Die Schlüsselsubstanzen stellen dabei zum einen Phenylalanin dar, welches aus dem Shikimisäure- und Arogenat-Weg hervorgegangen ist, zum anderen Malonyl-CoA, das aus dem Tricarbonsäurezyklus stammt.

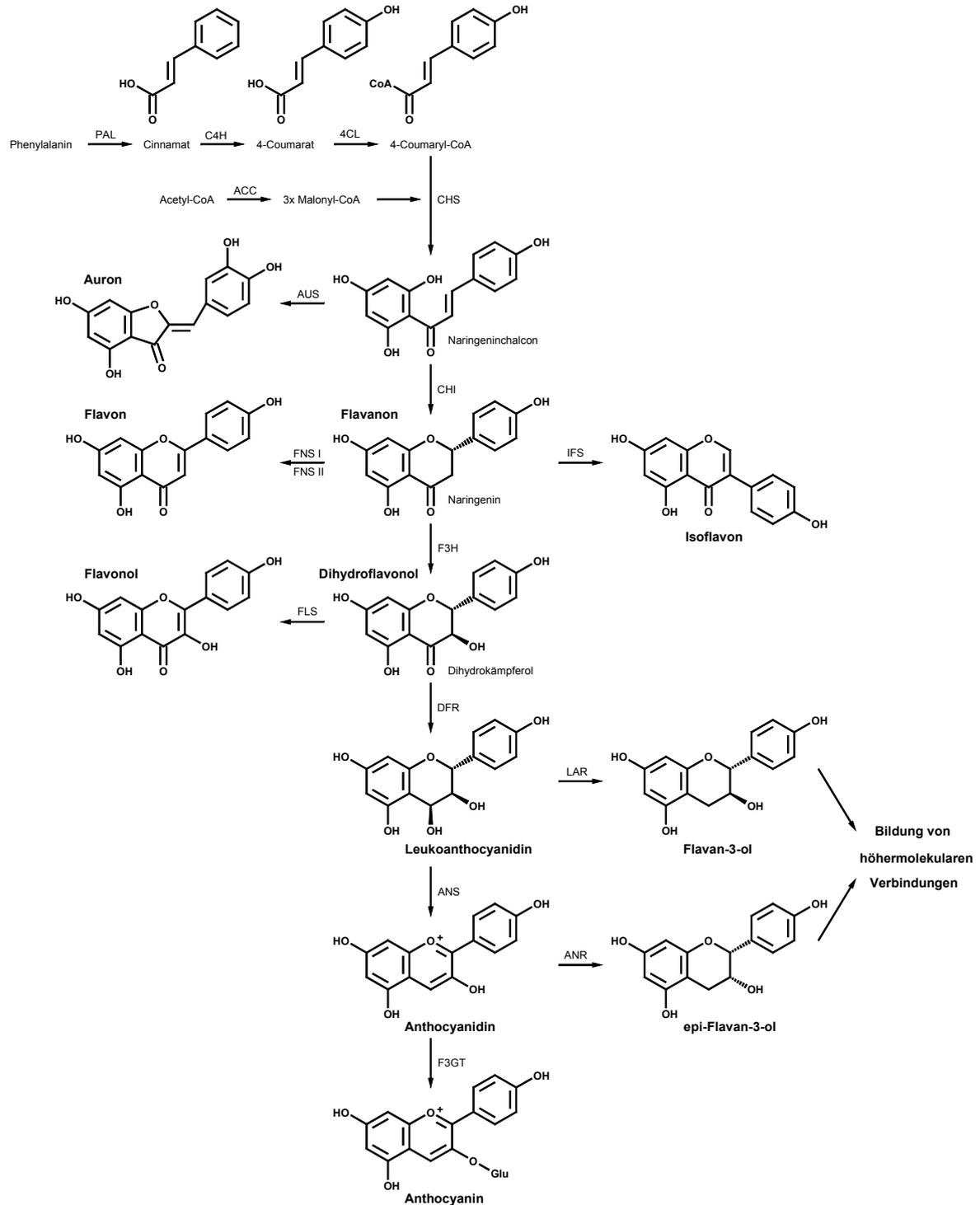


Abb. 7: Biosyntheseweg von Flavonoiden innerhalb des Phenylpropanoidweges [37, 40]

Die aus dem Phenylalanin gebildete 4-Coumarsäure wird über die 4-Coumarsäure-CoA-Ligase (4CL) an Coenzym A gebunden und reagiert durch eine von der Chalcon-Synthase (ChS) katalysierte Reaktion mit drei Molekülen Malonyl-CoA zum Naringeninchalcon. Dieses stellt das C₆-C₃-C₆-Grundgerüst dar, von dem sich die Flavonoide ableiten. Nach Ringschluss durch die Chalcon-Isomerase (CHI) entsteht Naringenin. Dieses Flavanon

fungiert nun wiederum als Vorstufe für Flavone (Flavon-Synthase I und II, FNSI, FNSII), Isoflavone (Isoflavon-Synthase, IFS), Dihydroflavonole (Flavanon-3- β -Hydroxylase, F3H), Flavonole (Flavonol-Synthase, FLS), Leucoanthocyanidine (Dihydroflavonol 4-Reduktase, DFR) und Anthocyanidine (Anthocyanidin-Synthase, ANS). Über Reduktasen können die Leucoanthocyanidine (Leucoanthocyanidin-Reduktase, LAR) und Anthocyanidine (Anthocyanidin-Reduktase, ANR) enzymatisch zu Flavan-3-olen bzw. *epi*-Flavan-3-olen abgebaut werden. Diese Strukturen sind die Vorstufen für höhermolekulare Flavonoide. Über Transferasen werden in der fortgeschrittenen Phase der Biosynthese die Zuckermoleküle gebunden. So können Flavonoidglycoside z. B durch das Enzym Flavonoid-3-glycosyltransferase (F3GT) gebildet werden [37, 40].

Flavonoide besitzen die Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) einzufangen und reaktionsträge, stabile Radikale zu bilden. Diese reagieren in der Folge nicht weiter und es kommt dadurch zu einem Abbruch der Reaktionskaskade. Dieses Potenzial als natürliche Radikalfänger verleiht den polyphenolischen Strukturen eine Vielzahl gesundheitsfördernder Eigenschaften. So konnten in Studien antioxidative, anticancerogene, antimikrobielle, antiallergische, immunstärkende, entzündungshemmende und gefäß-erweiternde Wirkungen nachgewiesen werden [36].

2.2 *Camellia sinensis*

Der immergrüne Teestrauch *Camellia sinensis* gehört botanisch zu der Familie der Teestrauchgewächse (*Theaceae*) und wird in Asien, Afrika und Südamerika angebaut. Die Kultivierung der Teepflanze erfolgt als *Camellia sinensis* var. *sinensis* und *Camellia sinensis* var. *assamica*. Diese Varietäten unterscheiden sich in der Blattgröße, wobei var. *assamica* die größeren Blätter besitzt [6]. Das koffeinhaltige Getränk wird prinzipiell in drei verschiedenen Herstellungsarten als Grüner Tee (unfermentiert), Oolong-Tee (halbfermentiert) und Schwarzer Tee (fermentiert) angeboten [41]. Bei der Fermentation kommt es im Rahmen von oxidativen Prozessen zur enzymatischen Bräunung der in den frischen Teeblättern enthaltenen Catechine (Flavan-3-ole) und dadurch zur Bildung der charakteristischen dunklen Farbe sowie Aromastoffe des Schwarzen Tees. Durch Dämpfen der frisch geernteten Teeblätter kann die blatteigene Polyphenoloxidase (PPO) jedoch inaktiviert und der Fermentationsprozess verhindert werden [42].

Frische Teeblätter zeichnen sich durch einen sehr hohen Gehalt an polyphenolischen Verbindungen aus (10 – 25 % der Trockensubstanz). Dabei bilden Flavanole mit 80 % den Hauptanteil der Polyphenolfraktion. Die vier wichtigsten Vertreter sind (-)-Epicatechin, (-)-Epicatechingallat, (-)-Epigallocatechin und (-)-Epigallocatechingallat (Abb. 8). Die restlichen 20 % der Polyphenolfraktion setzen sich aus Proanthocyanidinen, phenolischen Säuren, Flavonolen und Flavonen zusammen [42].

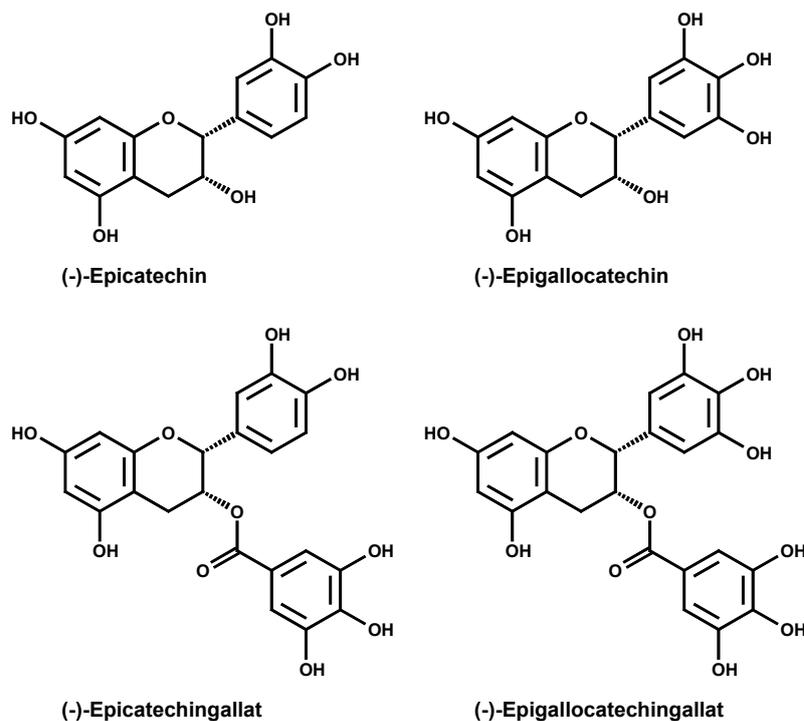


Abb. 8: Strukturen der wichtigsten Catechine in frischen Teeblättern [46]

Aufgrund der Fermentation ist der Catechingehalt eines Aufgusses von Schwarzem Tee (3 bis 10 % der extrahierten Feststoffe) wesentlich geringer als bei Grünem Tee (30 bis 42 % der extrahierten Feststoffe). Der erste Reaktionsschritt bei der Fermentation ist dabei stets die enzymatische Oxidation der Catechine zum *o*-Chinon (Abb. 9) [6].

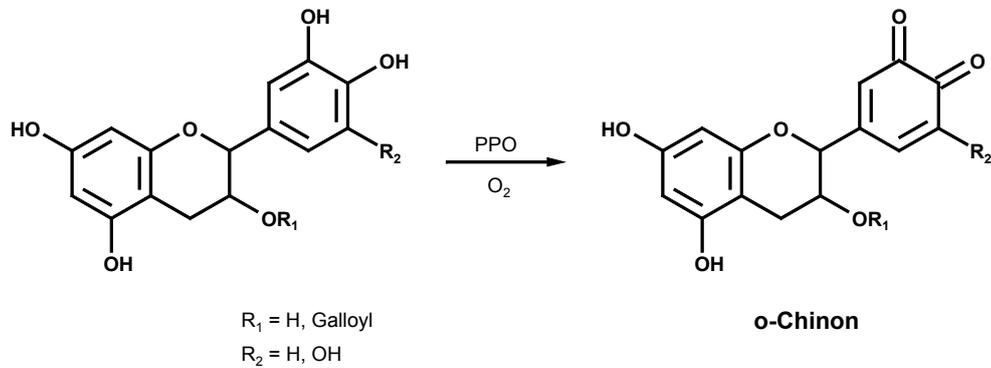


Abb. 9: Enzymatische Oxidation der Catechine zum *o*-Chinon durch PPO [6]

Durch oxidative Kupplung zwischen Epigallocatechinen und Epigallocatechingallaten werden farblose Bisflavanole, auch Theasinensine genannt, gebildet. Abhängig vom Reaktionspartner entstehen die Theasinensine A, B und C (Abb. 10) [43].

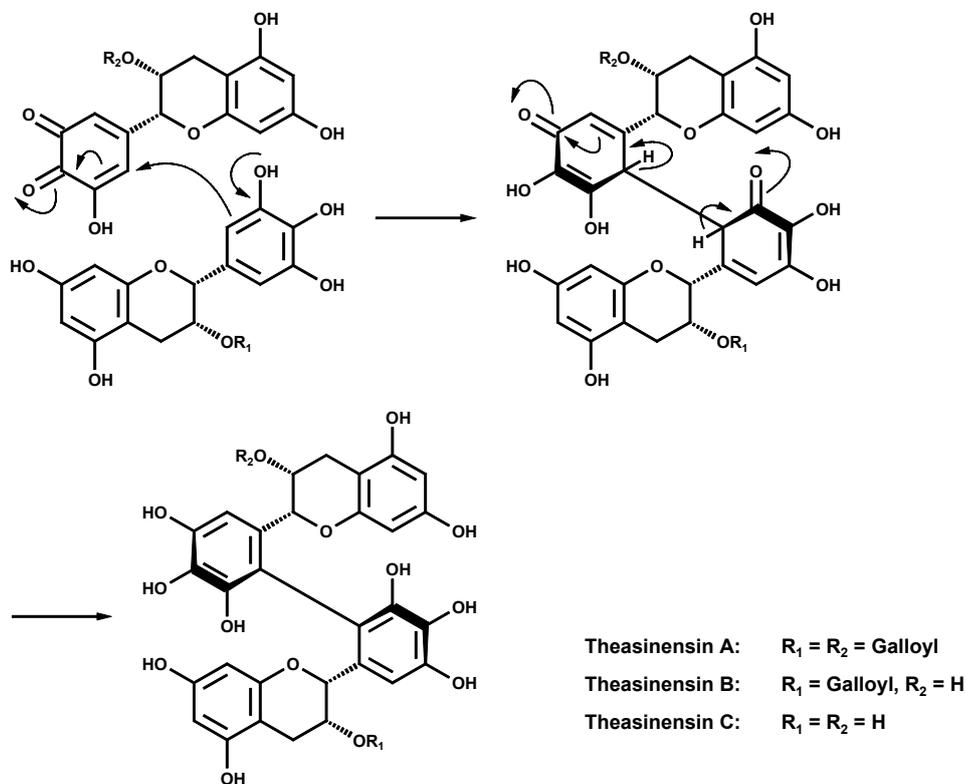


Abb. 10: Bildung der Theasinensine A, B und C [43]

Darüber hinaus sind die Atropisomere von Theasinensin A und C sowie die Theasinen-sine D und E bekannt. Aus Epicatechingallat und Epigallocatechingallat entsteht Theasinensin F und dessen Atropisomer Theasinensin G. Oolongtheanin ist ein weiterer Vertreter der Bisflavanole [43]. Während der Fermentation werden Bisflavanole nur in geringen Ausbeuten gebildet und unterliegen weiteren Umwandlungen [6].

Ein weiterer Reaktionsweg der *o*-Chinone führt zur Bildung von Theaflavinen. Dabei handelt es sich um gelb-orange Pigmente mit Benzotropolonstruktur. Die in Abb. 11 dargestellten Theaflavine, Theaflavinmonogallate und Theaflavindigallate sind die am häufigsten vorkommenden Theaflavine und im Schwarzen Tee in Konzentrationen von 0,3 bis 2 % enthalten (Abb. 11) [41].

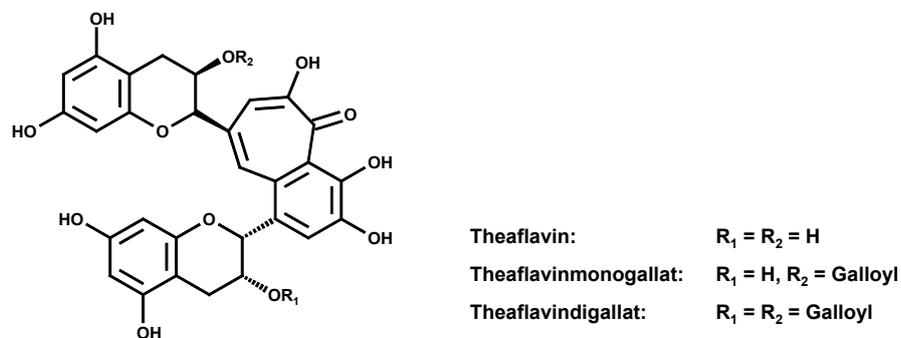


Abb. 11: Strukturen der Theaflavine [41]

Die Bildung der Theaflavine erfolgt aus Epigallocatechin und Epicatechin bzw. deren Gallaten. Zunächst kommt es zu einer oxidativen Kupplung zwischen dem B-Ring des Epigallocatechins und dem B-Ring des Epicatechin-Chinons. Nach Rearomatisierung des ehemaligen Epicatechins und einer weiteren Oxidation führt ein zweiter nucleophiler Angriff zur Bildung eines instabilen Bicyclo[3.2.1]octan-Intermediates. Anschließend entsteht durch 1,3-Dicarbonylspaltung eine Säurefunktion. Nach Oxidation der Hydroxylgruppen am 7-Ring steht die Säurefunktion mittels Vinylogie in β -Position zur Carbonylgruppe. Die anschließende β -Eliminierung resultiert in der Bildung des Theaflavins (Abb. 12) [42, 44].

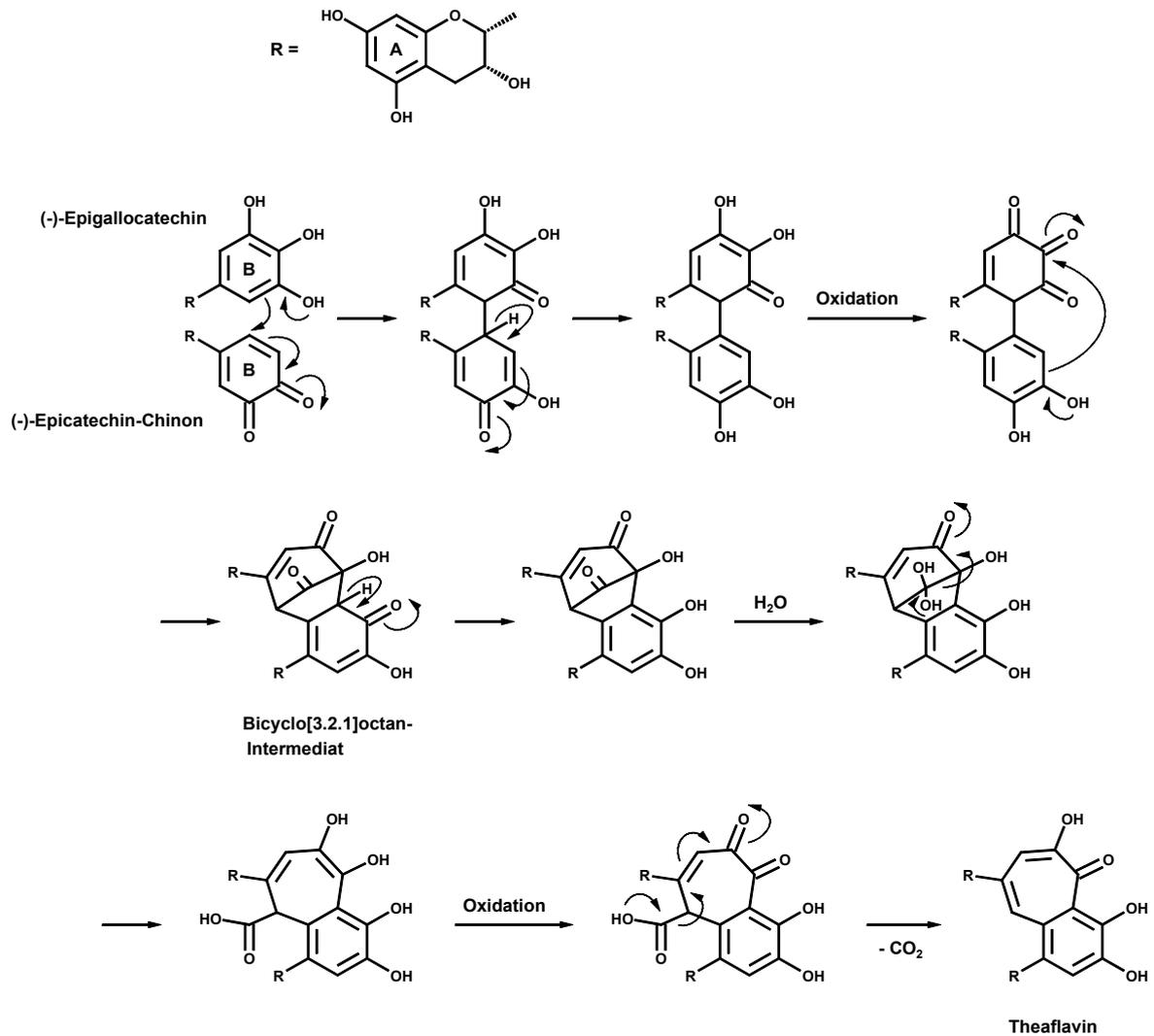


Abb. 12: Bildung der Theaflavine [44]

Auch die Theaflavine werden im folgenden Verlauf der Fermentation weiteren Oxidations-schritten unterzogen. Es entstehen z. B. die gelben Pigmente Bistheaflavin A, Bistheaflavin B, Dehydrotheaflavin und Theanaphthochinon [45].

Epitheflavinsäure und Epitheflavingallat sind ebenfalls leuchtend rote Benzotropolon-säurederivate und werden aus Epicatechin bzw. Epicatechingallat und Gallussäure gebildet (Abb. 13). Epitheflavinsäuren sind hochreaktiv und werden in der Literatur als Precursor der Thearubigene angegeben. Daher sind sie nur in Spuren im Schwarzen Tee vorhanden [46].

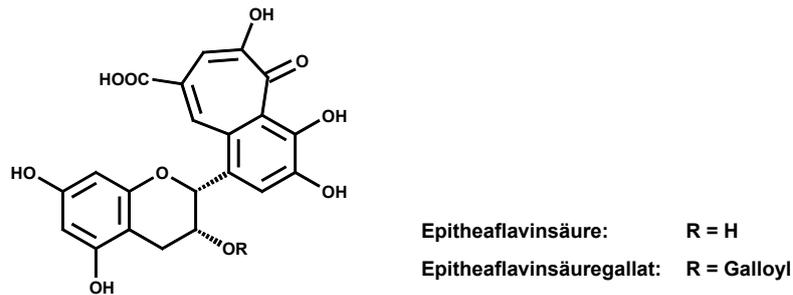


Abb. 13: Strukturen der Epitheaflavinsäuren [46]

Abgesehen von den Theaflavinen werden bei der Fermentation weitere Verbindungen gebildet, die zu der charakteristischen rötlich-braunen Farbe des Schwarzen Tees beitragen. Diese werden unter dem Begriff Thearubigene zusammengefasst. Es handelt sich dabei um wasserlösliche, saure Verbindungen mit einem Molekulargewicht von 700 bis 40000 Da. Über die chemischen Strukturen dieser heterogenen Gruppe ist bislang wenig bekannt. Es wird vermutet, dass die Thearubigene hauptsächlich aus Epigallocatechinen und Epigallocatechingallaten gebildet werden. Darüber hinaus wird angenommen, dass auch Theasinensine, Theaflavine und andere Benzotropolonstrukturen zu Thearubigenen abgebaut werden [41].

2.3 *Aspalathus linearis*

Aspalathus linearis wird botanisch der Familie der Hülsenfrüchtler (*Fabaceae* oder *Leguminosae*) zugeordnet. Der niedrig wachsende Strauch mit langen, dünnen Trieben und nadelförmigen Blättern ist in den Cedarbergen Südafrikas beheimatet. Die getrockneten Blätter und Triebspitzen werden zur Herstellung von Rooibostee verwendet. Die Gattung *Aspalathus* umfasst ca. 200 Arten, die ausschließlich in Südafrika vorkommen und als weitere Gemeinsamkeit das Dihydrochalcon Aspalathin als wertgebenden Inhaltsstoff besitzen. Jedoch ist lediglich die Art *linearis* als genießbar zu bezeichnen. Rooibostee, der alternativ auch als Rotbuschtee, Buschmanntee, Koopmans-Tee oder gar Massaitee geführt wird, ist im Handel aromatisiert oder pur sowohl in fermentierter als auch unfermentierter Form erhältlich [15].

Das koffeinfreie Lebensmittel besitzt einen hohen Ascorbinsäure-Anteil (15,7 mg/100 g) und weist zudem einen hohen Gehalt an Mineralstoffen und Spurenelementen auf (0,33 % Fe; 0,99 % Al; 0,20 % Ca; 0,33 % Mg; 0,56 % K; 0,012 % Mn). Das Fluoridvorkommen des Tees ist ausreichend, um anticariogene Wirkungen auszuüben. Weiterhin zeigt der Rooibostee einen niedrigen Tanningehalt (4,4 % als Gallussäure) auf. Aufgrund des geringen Vorkommens dieser Gerbstoffe, von denen bisher nur Procyanidin B3 nachgewiesen werden konnte, wird die Resorption des Eisens im menschlichen Organismus nicht wie beim Konsum von *Camellia sinensis* herabgesetzt [47]. Die hochwertigen Inhaltsstoffe des Rooibostees bedingen eine Vielzahl von gesundheitsfördernden Eigenschaften wie Appetitanregung, Beruhigung von Verdauungsstörungen, Verringerung von Nervenanspannungen sowie Förderung von Tiefschlaf [15, 48].

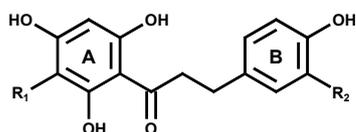
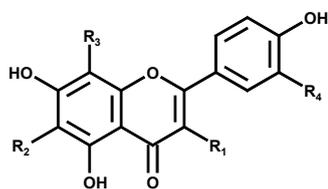
Rooibostee zeichnet sich außerdem durch das Vorkommen und den hohen Gehalt zahlreicher Flavonoide aus (28 % der Trockenmasse) [13]. Als Besonderheit ist hier vor allem der hohe Gehalt an C-glycosidisch gebundenen Zuckern am Aglycon zu nennen. Neben dem Dihydrochalcon Nothofagin, welches außer in *Aspalathus linearis* bisher nur in dem Kernholz der Scheinbuche (*Nothofagus fusca*) identifiziert wurde [49], ist hier vor allem das Dihydrochalcon Aspalathin als das hauptmonomere Flavonoid des unfermentierten Rooibostees zu erwähnen, welches beinahe 85 % des Gesamtpolyphenolgehalts ausmacht (49,9 mg/g wässriger Extrakt) [50-52].

Erste Untersuchungen der polyphenolischen Inhaltsstoffe von *Aspalathus linearis* wurden von Koeppen *et al.* im Jahre 1962 durchgeführt. Mit Hilfe der Papierchromatographie, Massenspektrometrie, IR- und UV-Spektroskopie konnten die Flavonoide Orientin, Isoorientin, Isoquercitrin und Rutin identifiziert werden [53]. Weiterführende Studien resultierten in der Veröffentlichung von NMR-Daten für Orientin, Isoorientin und

Aspalathin [54, 55]. Zudem traf Koeppen *et al.* erstmals Aussagen über das Abbauverhalten des Aspalathins [2]. In der Folge gelang der Nachweis der Aglycone Quercetin und Luteolin [56]. Zahlreiche weitere Polyphenole (Chrysoeriol, Vitexin, Isovitexin), Hydroxybenzoesäuren (*p*-Hydroxybenzoesäure, Protocatechussäure, Vanillinsäure) sowie Hydroxyzimtsäuren (*p*-Coumarsäure, Ferulasäure, Kaffeesäure) wurden durch Rabe *et al.* aufgeklärt [57]. Ferreira *et al.* und Marais *et al.* ermittelten die phenolischen Verbindungen Nothofagin, (+)-Catechin, Syringasäure sowie die (*S*)- und (*R*)-Eriodictyol-6-*C*- β -D-glucopyranoside als weitere Inhaltsstoffe des Rooibostees [8, 58]. Tab. 2 gibt einen Überblick über die wichtigsten im Rooibostee vorkommenden Flavonoide und Dihydrochalcone [61].

Tab. 2: Chemische Strukturen der Flavonoide und Dihydrochalcone des Rooibostees [61]

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Flavonoide				
<i>Aglycone</i>				
Luteolin	H	H	H	OH
Chrysoeriol	H	H	H	OCH ₃
Quercetin	OH	H	H	OH
<i>O-Glycoside</i>				
Isoquercitrin	OGlu	H	H	OH
Hyperosid	OGal	H	H	OH
Rutin	ORut	H	H	OH
<i>C-Glycoside</i>				
Orientin	H	H	Glu	OH
Isoorientin	H	Glu	H	OH
Vitexin	H	H	Glu	H
Isovitexin	H	Glu	H	H
Dihydrochalcone				
Aspalathin	Glu	OH		
Nothofagin	Glu	H		



Krafczyk *et al.* isolierte die phenolischen Strukturen des Rooibostees erstmals mit Hilfe der Multilayer Countercurrent Chromatographie (MLCCC) und veröffentlichte eine umfassende Übersicht über alle bisher bekannten im Rooibostee vorkommenden phenolischen Verbindungen. Zudem konnten die Substanzen (*S*)- und (*R*)-Eriodictyol-8-*C*-

β -D-glucopyranosid, Hyperosid, Chlorogensäure, Gallussäure, 3,5-Dihydroxybenzoesäure, Gentisinsäure, Salicylsäure und Sinapinsäure erstmalig hinsichtlich ihrer Struktur aufgeklärt werden [7]. Neben den phenolischen Strukturen wurde auch eine Vielzahl von Aromakomponenten und anderen flüchtigen Verbindungen mittels GC-MS charakterisiert. Diese umfassen u. a. die Stoffklassen der Ketone, Aldehyde, Alkohole, Ester, Phenole und Lactone [59, 60].

Auch das zahlreiche Vorhandensein der polyphenolischen Strukturen trägt zu den gesundheitsfördernden Eigenschaften des Rooibostees bei. So konnten in vergangenen Arbeiten bereits antimutagene Wirkungen der Teeinhaltsstoffe belegt werden [11, 12]. Ebenso wurden in Studien einer Vielzahl der enthaltenen Flavonoide mehrfach antioxidative Wirkungen bestätigt [13, 14, 62, 63]. Neben dem Hauptflavonoid des unfermentierten Rooibostees Aspalathin zeigten auch Quercetin, Isoquercitrin, Rutin und Luteolin eine starke oxidative Hemmwirkung im Vergleich mit α -Tocopherol (siehe Tab. 3) [61].

Tab. 3: Antioxidative Aktivität von Aspalathin und einigen Flavonoiden im Vergleich mit α -Tocopherol (Abbau des α,α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH)-Radikals) [61]

Verbindung	Oxidative Hemmung [%]
Quercetin	93
Aspalathin	92
Isoquercitrin	92
Rutin	91
Luteolin	91
α -Tocopherol	75
Vitexin	7

Während des Fermentationsprozesses werden die antioxidativ wirkenden Polyphenole des Rooibostees durch Sauerstoffeinfluss oxidativ abgebaut. In Tab. 4 sind die Gehalte einiger ausgewählter Flavonoide in unfermentiertem und fermentiertem Rooibos gegenübergestellt [61]. Isoorientin, Orientin und Rutin werden in geringem Umfang abgebaut. Rutin wird dabei teilweise in sein Aglycon Quercetin umgewandelt. Den ausgeprägtesten Abbau aller Flavonoide erfährt allerdings Aspalathin, dessen Gehalt im Laufe des Fermentationsprozesses um fast 98 % abnimmt [13].

Da der fermentierte Rooibostee somit nur noch geringe Mengen des Antioxidans Aspalathin enthält, ist dessen antioxidative Aktivität um die Hälfte niedriger als bei der unfermentierten Variante. Daher ist der unfermentierte grüne Rooibos aus dieser Sicht dem fermentierten Tee vorzuziehen [50].

Tab. 4: Gehalte an Aspalathin und ausgewählten Flavonoiden im wässrigen Extrakt (mg/g löslicher Trockensubstanz) [61]

Verbindung	unfermentiert	fermentiert
Aspalathin	49,9	1,2
Isoorientin	3,6	0,8
Orientin	2,3	1,0
Rutin	1,7	1,3
Isoquercitrin + Hyperosid	0,3	0,4
Quercetin	0,04	0,1

Neben der Veränderung der Polyphenolzusammensetzung kommt es während der Fermentation ebenso zu einer Farbänderung, die in der charakteristischen rotbraunen Farbe des fermentierten Rooibostees mündet. Studien belegten, dass diese Änderung der Farbgebung insbesondere durch die Folgereaktionen des Dihydrochalcones Aspalathin verursacht wird. Der Abbau von Aspalathin verläuft unter aeroben und nicht-enzymatischen Bedingungen und resultiert in der Bildung von Bräunungsprodukten, deren Absorptionsmaximum bei 450 nm liegt [3].

Modellinkubationen zeigten, dass ausgehend vom Aspalathin das Flavon Orientin gebildet wird (s. Abb. 14). Dabei wird das Dihydrochalcon zunächst zum *o*-Chinon oxidiert. Nach der Umlagerung des B-Rings zum Chinonmethid erfolgt ein nucleophiler Angriff der Hydroxylfunktion C-2 (I) oder C-6 (II) an das Chinonmethid und es entstehen 6-C- bzw. 8-C-glycosidisch gebundene Eriodictyole. Diese können über das Chinonmethid ineinander überführt werden. Dabei liegt das Gleichgewicht auf der Seite der (*S*)- und (*R*)-Eriodictyol-6-C- β -D-glucoopyranoside, die durch eine weitere Oxidation in Isoorientin umgewandelt werden. Nach der Öffnung zur Vinylesterstruktur, Bindungsrotation sowie Recyclisierung im Rahmen der Wessely-Moser-Umlagerung entsteht Orientin [7].

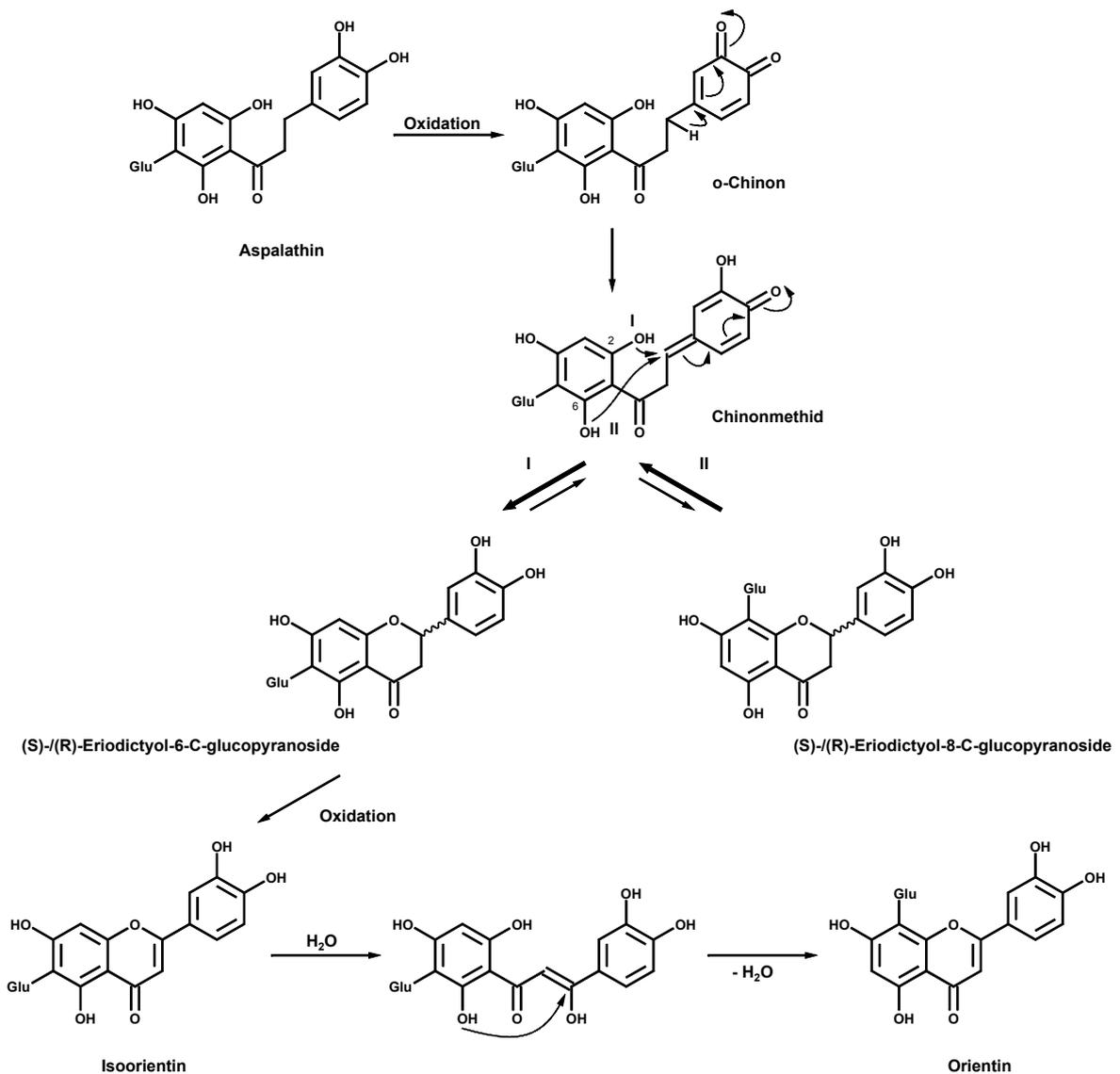


Abb. 14: Oxidativer Abbau von Aspalathin zu Orientin über Flavanon-C-glycoside und Isoorientin [7]

Allerdings handelt es sich bei diesen Folgeverbindungen des Aspalathins durchgehend um farblose Strukturen, deren Absorptionsmaxima zwischen 280 und 350 nm liegen. Orientin und Isoorientin stellen somit lediglich Intermediate dar, die im weiteren Verlauf der Fermentation zu braunen Verbindungen abgebaut werden [7].

2.4 Farbverdünnungsanalyse

Bei der Farbverdünnungsanalyse („Farbaktivitätskonzept“) handelt es sich um eine Kombination instrumentell-analytischer und visuell-sensorischer Techniken zur Bestimmung des relativen Farbbeitrages einzelner farbiger Verbindungen auf den Gesamteindruck einer Lösung, die sich aus mehreren farbigen Komponenten zusammensetzt. Dabei werden Farbintensität und Konzentration der Einzelverbindung in der Gesamtlösung berücksichtigt. Das Farbaktivitätskonzept verwendet Größen wie den Farbschwellenwert, den Farbaktivitätswert, den Farbverdünnungsfaktor und den prozentualen Farbverteilungswert [10, 64].

Der Farbschwellenwert einer Verbindung ist als die Konzentration definiert, die gerade noch als farbig erkannt wird. Zur Ermittlung wird eine Lösung bekannter Konzentration so lange verdünnt bis durch Testpersonen kein Farbunterschied mehr zwischen der Probe und zwei Wasserproben festzustellen ist (Triangeltest). Der Farbaktivitätswert (CAV_x) ist definiert als das Verhältnis aus der Konzentration der Verbindung zu deren Farbschwellenwert (1) und beschreibt somit das Potenzial eines Farbstoffes, Anteil an der Gesamtfarbe zu besitzen. Weist eine farbige Verbindung einen Farbaktivitätswert $CAV_x \geq 1$, so trägt die Verbindung zur Gesamtfarbe bei [64].

$$CAV_x = \frac{\text{Konzentration}_x [\mu\text{g/kg}]}{\text{Farbschwellenwert}_x [\mu\text{g/kg}]} \quad (1)$$

Für die Bestimmung des prozentualen Beitrags einer einzelnen Verbindung zur Gesamtfarbe einer Lösung ist zusätzlich die Ermittlung des Farbverdünnungsfaktors der Gesamtlösung (CD_{total}), der mit 100 % Farbaktivität definiert wird, notwendig. Dieser wird festgelegt, indem die Gesamtlösung so stark verdünnt wird bis Testpersonen gerade noch einen Unterschied zwischen der Probe und zwei Wasserproben erkennen können [65]. Der prozentuale Anteil einer Verbindung an der Gesamtfarbe wird wie folgt berechnet (2):

$$\text{Farbanteil}_x [\%] = \frac{CAV_x}{CD_{\text{total}}} \cdot 100 \quad (2)$$

Sollte die Konzentration einer Lösung nicht bekannt sein, kann der prozentuale Farbanteil auch ohne Bestimmung des Farbaktivitätswertes ermittelt werden. In diesem Fall wird die Gesamtlösung, z. B. mittels analytischer HPLC, fraktioniert. Erfolgt die Bestimmung des

CD_{total} -Wertes aus einer Lösung, die dieselbe Menge der zur Fraktionierung verwendeten Lösung enthält und die auf das gleiche Volumen, in der die einzelne Verbindung nach der Fraktionierung vorliegt, verdünnt wurde, kann der Farbanteil wie folgt berechnet werden (3):

$$\text{Farbanteil}_x [\%] = \frac{CD_x}{CD_{total}} \cdot 100 \quad (3)$$

Da bei dem Farbaktivitätskonzept das Zusammenspiel der einzelnen farbigen Komponenten nicht berücksichtigt wird, handelt es sich bei den Ergebnissen lediglich um eine Näherung [10, 64].

2.5 Circular-Dichroismus-Spektroskopie

Der Circular-Dichroismus (CD) ist ein optisches Phänomen, das direkt mit der räumlichen Struktur von Molekülen verknüpft ist. Er resultiert aus dem unterschiedlichen Absorptionsverhalten optisch aktiver chiraler Verbindungen für links- und rechtspolarisiertes Licht [66]. Mit Hilfe der Bestimmung des Circular-Dichroismus lassen sich detaillierte Aussagen über die Konformation von Verbindungen treffen. Dabei wird der Auswertung der Cotton-Effekte besondere Bedeutung beigemessen. Diese beschreiben die charakteristischen Änderungen des Circular-Dichroismus und werden als positiv (steigende Elliptizität) bzw. negativ (sinkende Elliptizität) bezeichnet [67]. Enantiomere Moleküle zeigen unterschiedliche Absorptionskoeffizienten für links- und rechtspolarisiertes Licht. Sie besitzen entgegengesetzte Cotton-Effekte [66].

2.6 Enzyme

Eine Vielzahl der Reaktionen in lebenden Systemen läuft mit Hilfe von Katalysatoren ab. Diese Biokatalysatoren sind spezifische Proteine, die Enzyme genannt werden. Durch sie wird der Stoffwechsel der Zellen, Gewebe und Organe komplexer Organismen in vielfältiger Weise gesteuert und koordiniert. Die wesentlichen Funktionseigenschaften eines Enzyms sind das Erkennen seines entsprechenden Substrates (Substratspezifität), die Katalyse und die Regulierbarkeit der katalytischen Aktivität. Das aktive Zentrum ist dabei für die katalytische Wirksamkeit verantwortlich. In dieser höhlen- oder spaltenförmigen Einbuchtung befinden sich mehrere Aminosäuren mit freien hochreaktiven chemischen Gruppen in einer spezifischen räumlichen Anordnung. Das Substrat wird aufgrund seiner sterischen und elektronischen Eigenschaften selektiv erkannt. Zunächst reagiert das Enzym mit dem Substrat zu einem Übergangszustand, welcher als Enzym-Substrat-Komplex (ES-Komplex) bezeichnet wird. Durch eine substratinduzierte Konformationsänderung des Enzyms und somit auch des aktiven Zentrums erfolgt die weitere Umwandlung des Substrates [68]. Dadurch wird die Aktivierungsenergie für die Reaktion herabgesetzt (Abb. 15). Das entstandene Produkt löst sich anschließend von dem Enzymmolekül. Das Enzym selber geht unverändert aus der Reaktion hervor. Mit Hilfe dieser katalytischen Wirkungen kann die Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einem Faktor von 10^{17} im Vergleich zur nicht-katalysierten Reaktion erhöht werden [69, 70].

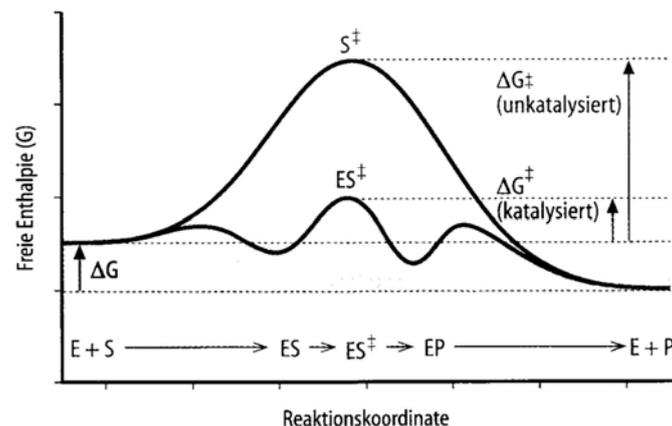


Abb. 15: Schema der Enzymkatalyse [69]

Aufgrund der hohen Substratspezifität der Enzyme ist eine Vielzahl an Biokatalysatoren notwendig, um die ebenso große Anzahl an biochemischen Reaktionen zu katalysieren. Die meisten klassischen Enzyme werden benannt, in dem man die Endung *-ase* an den Namen ihrer Substrate oder an einen Begriff, der die katalysierte Reaktion beschreibt, anhängt. Nach der jeweils zu katalysierenden Reaktion werden die Enzyme durch die IUPAC und die IUB in sechs Gruppen unterschieden (s. Tab. 5) [69].

Tab. 5: Einteilung der Enzyme [69]

Enzymklasse	Katalysierte Reaktion	Beispiele
Oxidoreduktasen	Oxidations- und Reduktionsreaktionen (Elektronentransfer)	Alkoholdehydrogenase
Transferasen	Übertragung von Gruppen zwischen Molekülen	Pyruvatkinase
Hydrolasen	Hydrolytische Reaktionen	α -Amylase
Lyasen	Eliminierungs- und Additionsreaktionen	Pektinase
Isomerasen	Intramolekulare Umlagerungsreaktionen	Hydroperoxidisomerase
Ligasen	Kovalente Verknüpfung von Molekülen	DNA-Ligase

In Ergänzung zu ihrem systematischen Namen werden die Enzyme mit einer EC-Nummer (engl. *Enzyme Commission*), die sich aus einem vierstelligen Zahlencode zusammensetzt, klassifiziert. Dabei ordnet die erste Ziffer das jeweilige Enzym einer der sechs Hauptklassen zu. Die folgenden beiden Zahlen beziehen sich auf chemische Einzelheiten der katalysierten Reaktion. Die vierte Ziffer dient der fortlaufenden Nummerierung [69].

2.6.1 Enzymkinetik

Die Enzymkinetik beschreibt die Geschwindigkeitsgesetze, mit der enzymatisch katalysierte Reaktionen ablaufen. Die Fähigkeit eines Enzyms, als biologischer Katalysator chemische Reaktionen zu beschleunigen, wird dabei als Enzymaktivität bezeichnet. Die Enzymaktivität wird nicht nur durch das Substrat beeinflusst, sondern auch durch äußere Bedingungen, wie z. B. Temperatur, pH-Wert und Lösungsmittel, bestimmt [71].

Die Maßeinheit der Enzymaktivität ist Unit (U). Eine Unit ist definiert als die Enzymmenge, die den Umsatz von einem Mikromol Substrat in einer Minute katalysiert. Zudem wird häufig die spezifische Aktivität eines Enzyms definiert. Diese gibt an, wie viel Mikromol Substrat durch ein Milligramm Enzym pro Minute umgesetzt wird (U/mg) [68].

2.6.1.1 Michaelis-Menten-Gleichung

1913 entwickelten Leonor Michaelis und Maud Leonora Menten eine einfache Theorie zur Erklärung der Abhängigkeit der Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion von der Substratkonzentration. Die Theorie beruht auf der Annahme, dass sich im Laufe der Reaktion zunächst ein Enzym-Substrat-Komplex (ES) bildet und dessen Umwandlung in das Produkt (P) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (Abb. 16) [72].



Abb. 16: Reaktionsschema einer enzymkatalysierten Reaktion (E = Enzym, S = Substrat, P = Produkt) [72]

Darauf aufbauend stellten sie eine Gleichung auf, die die Berechnung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms (v_{\max}) sowie dessen Affinität zum Substrat (K_m) ermöglicht (4).

$$v_0 = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (4)$$

Die Konstante K_m wird als Michaelis-Menten-Konstante bezeichnet. Sie trägt die Maßeinheit einer Konzentration und gibt diejenige Substratkonzentration an, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. K_m stellt ein Maß für die Substrataffinität des Enzyms dar. Ein Enzym mit hoher Affinität zum Substrat besitzt eine niedrige Michaelis-Menten-Konstante und umgekehrt [72]

2.6.1.2 Geschwindigkeits-Konzentrations-Diagramm

Da der Zerfall des ES-Komplexes in das Enzym und Produkt langsamer als die Bindung des Substrates an das Enzym erfolgt, liegt bei einer bestimmten Substratkonzentration nur der ES-Komplex vor. Dies hat zur Folge, dass kein freies Enzym mehr vorhanden und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) erreicht ist. Dieser typische Verlauf einer enzymkatalysierten Reaktion wird in einem Geschwindigkeits-Konzentrations-Diagramm (v-S-Diagramm) widergespiegelt und entspricht dem Ast einer Hyperbel, aus welchem v_{\max} und K_m ablesbar sind (s. Abb. 17) [72].

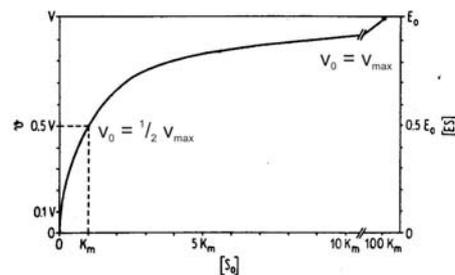


Abb. 17: Geschwindigkeits-Konzentrations-Diagramm [68]

2.6.1.3 Lineweaver-Burk-Darstellung

Eine rechnerische und damit exaktere Bestimmung von v_{\max} und K_m erfolgt über die reziproke Form der Michaelis-Menten-Gleichung (5) [72].

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (5)$$

Die Auftragung der reziproken Geschwindigkeit gegen die reziproke Substratkonzentration wird als Lineweaver-Burk-Darstellung bezeichnet und liefert eine Gerade mit dem Anstieg K_m/v_{\max} , die die Abszisse bei $-1/K_m$ und die Ordinate bei $1/v_{\max}$ schneidet (Abb. 18).

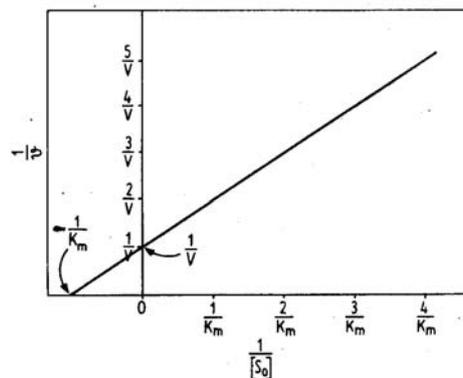


Abb. 18: Lineweaver-Burk-Diagramm [68]

Ein Vorteil dieser Auftragung im Gegensatz zu einer Vielzahl in der Literatur beschriebener Linearisierungsverfahren besteht darin, dass v_{\max} und K_m auch dann bestimmt werden können, wenn keine Messungen im Substratsättigungsbereich vorliegen. Zudem

erlaubt diese Methode die Überprüfung der hyperbolen v/S -Charakteristik, da nicht-hyperbole v/S -Charakteristiken zu Abweichungen von der Geraden im Lineweaver-Burk-Diagramm führen. Ein Nachteil der doppelt reziproken Auftragung ist, dass die Wichtung der experimentellen Werte erschwert wird. So wird Messwerten, die bei sehr niedrigen Substratkonzentrationen erhalten werden, bei der linearen Regression ein stärkerer Einfluss zugeteilt [68].

2.6.2 Inhibierung

Bei den meisten Enzymen handelt es sich um allosterische Enzyme, die mehr als ein Zentrum zur Molekülbindung besitzen und demnach nicht nur die Bindung von Substraten, sondern auch von Effektoren möglich ist. Effektoren sind Liganden, deren Gegenwart die katalytische Aktivität eines Enzyms beeinflussen kann. Die Bindung dieser Liganden kann sowohl im aktiven Zentrum als auch im allosterischen Zentrum erfolgen. Letzteres hat eine Konformationsänderung des Enzyms zur Folge. Effektoren, die positiv auf die Enzymaktivität wirken, werden als Aktivatoren bezeichnet. Negativ wirkende Effektoren hingegen verringern die Enzymaktivität und werden Inhibitoren genannt [68].

Die Wirkung von Inhibitoren kann auf der Verhinderung der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes oder auf der Hemmung der eigentlichen chemischen Reaktion beruhen, die zur Bildung des enzymatischen Produktes führt. Abhängig von der Art der Reaktion des Inhibitors mit dem Enzym werden zwei Hemmarten unterschieden. Bei der irreversiblen Enzymhemmung blockiert der Inhibitor durch eine kovalente Bindung an die Substratbindungsstelle unwiderruflich das aktive Zentrum des Enzyms. Dadurch kommt es zu einer dauerhaften Abnahme der aktiven Enzymmoleküle und der damit verbundenen Reaktionsgeschwindigkeit. Im Gegensatz dazu ist die reversible Enzymhemmung durch eine Dissoziation des Enzym-Inhibitor-Komplexes charakterisiert. Durch eine Änderung der äußeren Einflüsse kann das Enzym vom Inhibitor befreit werden. Die meisten biologisch relevanten Inhibitoren führen zu einer reversiblen Hemmung von Enzymen. Reversible Inhibitoren binden über die gleichen Typen nicht-kovalenter Wechselwirkungen an Enzyme wie Substrate und Produkte. Die wichtigsten Typen der reversiblen Inhibierung sind die kompetitive, die nicht-kompetitive, die unkompetitive und die partiell-kompetitive Hemmung [72].

2.6.2.1 Kompetitive Hemmung

Die kompetitive Hemmung ist dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Struktur des Hemmstoffs eine Ähnlichkeit mit der des Substrates aufweist und der Inhibitor reversibel mit dem Enzym zum Enzym-Inhibitor-Komplex (EI) reagiert, ohne dabei selbst umgesetzt zu werden. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Substrat und Inhibitor konkurrieren beide um die gleiche Bindungsstelle am Enzym. Ein bereits an das Enzym gebundenes Substratmolekül verhindert die Assoziation eines Inhibitormoleküls und umgekehrt (Abb. 19). Durch die Bildung des EI-Komplexes wird das Enzym dem normalen Reaktionsweg für die Lebensdauer des EI-Komplexes entzogen und somit die Bildung des ES-Komplexes unterdrückt. Die Bedingung für diesen Hemmtyp ist aber auch erfüllt, wenn der Inhibitor nicht direkt im aktiven Zentrum bindet, sondern im Bereich dessen und dadurch die Substratbindung sterisch einschränkt [72].

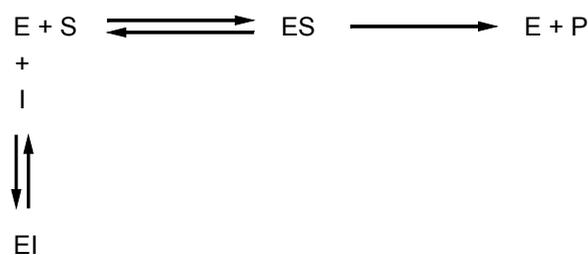


Abb. 19: Reaktionsschema der kompetitiven Hemmung [71]

Die Bestimmung des Inhibierungstyps kann leicht mit Hilfe der doppelt reziproken Darstellung im Lineweaver-Burk-Diagramm erfolgen (Abb. 20). Bei der kompetitiven Hemmung schneiden sich die verschiedenen Kurvenlinien der unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen in einem Punkt auf der vertikalen $1/v_0$ -Achse [71].

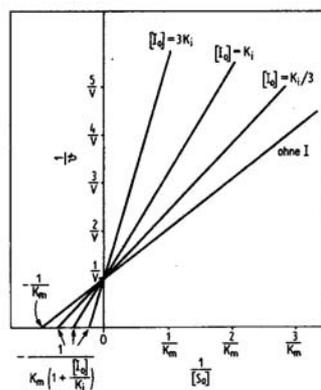


Abb. 20: Lineweaver-Burk-Diagramm in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen eines kompetitiven Inhibitors [68]

2.6.2.2 Nicht-kompetitive Hemmung

Im Gegensatz zur kompetitiven Hemmung wird bei der nicht-kompetitiven Hemmung die Substratbindung durch die Bindung eines Inhibitors an das Enzym nicht beeinflusst. Die Ursache hierfür liegt in der strukturellen Unterschiedlichkeit von nicht-kompetitivem Inhibitor und Substrat. Da Hemmstoff und Substrat mit verschiedenen Bindungsstellen des Enzyms interagieren, ist sowohl die Bildung eines EI-Komplexes als auch eines Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes (ESI) möglich. Der entstandene ESI-Komplex führt allerdings nicht zu einem Zerfall in das Reaktionsprodukt (Abb. 21) [72].

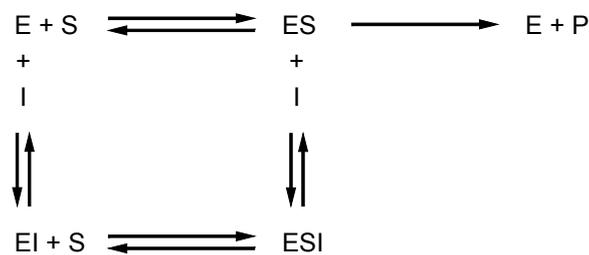


Abb. 21: Reaktionsschema der nicht-kompetitiven Hemmung [71]

Im Lineweaver-Burk-Diagramm befindet sich der Schnittpunkt der Kurvenlinien der unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen auf der horizontalen $1/S$ -Achse (Abb. 22) [71].

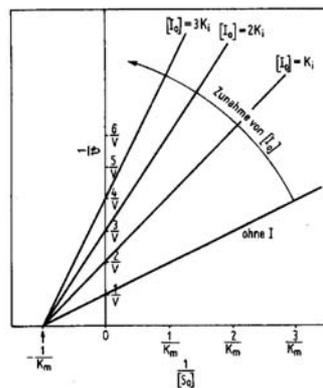


Abb. 22: Lineweaver-Burk-Diagramm in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen eines nicht-kompetitiven Inhibitors [68]

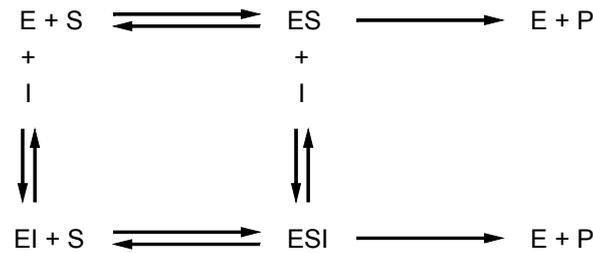


Abb. 25: Reaktionsschema der partiell kompetitiven Hemmung [71]

2.6.2.5 Inhibitorkonstante

Für die Bestimmung der Inhibitorkonstanten ist die Auftragung nach Dixon die Methode der Wahl. Während bei der Lineweaver-Burk-Darstellung lediglich eine Inhibitorkonzentration bei verschiedenen Substratkonzentrationen aufgetragen wird, erfolgt im Dixon-Diagramm die Abbildung unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen bei nur einer Substratkonzentration. Im Gegensatz zu anderen Diagrammen ist hier die direkte Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom Inhibitor dargestellt [73].

Nachfolgend sind die Dixon-Diagramme der drei wichtigsten Inhibierungstypen exemplarisch angeführt (Abb. 26).

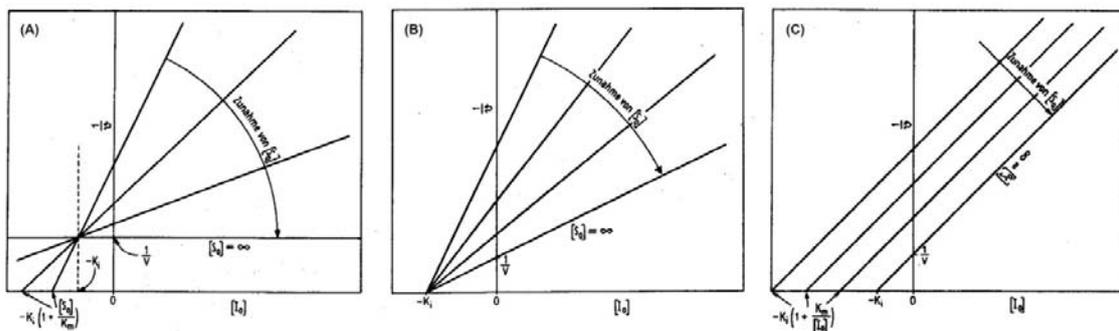


Abb. 26: Dixon-Diagramme für einen kompetitiven (A), nicht-kompetitiven (B) und unkompetitiven (C) Inhibitor in Gegenwart unterschiedlicher Substratkonzentrationen [68]

Aus dem jeweiligen Dixon-Diagramm lassen sich Gleichungen zur Berechnung der Inhibitorkonstanten K_i ableiten (6-8) [73]. Diese sind im Folgenden tabellarisch aufgelistet (s. Tab. 6).

Tab. 6: Gleichungen zur Berechnung der K_i (abgeleitet aus den Dixon-Diagrammen) [73]

Inhibierungstyp	Gleichung zur Berechnung der Inhibitorkonstanten K_i	
Kompetitive Hemmung	$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{\max} \cdot [S] \cdot K_i} \cdot I + \frac{1 + K_m}{v_{\max} \cdot [S]}$	(6)
Nicht-Kompetitive Hemmung	$\frac{1}{v_0} = \frac{1 + K_m}{v_{\max} \cdot [S] \cdot K_i} \cdot I + \frac{1 + \frac{K_m}{[S]}}{v_{\max}}$	(7)
Unkompetitive Hemmung	$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{\max} \cdot K_i} \cdot I + \frac{1 + \frac{K_m}{[S]}}{v_{\max}}$	(8)

Für die Berechnung der Inhibitorkonstanten ist zunächst der Wert der Michaelis-Menten-Konstante (K_m) aus den Lineweaver-Burk-Diagrammen abzulesen. Durch Umstellen des Ordinatenabschnittes und des Anstieges sind die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) und die Inhibitorkonstante (K_i) berechenbar.

2.6.3 Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels

In den westlichen Industrieländern werden täglich durchschnittlich 300 - 400 g Kohlenhydrate konsumiert. Dabei macht das Polysaccharid Stärke mit ca. 60 % den größten Anteil der Nahrungskohlenhydrate aus. Die beiden Disaccharide Saccharose und Lactose tragen mit 30 bzw. 10 % bei. Zudem werden geringe Mengen der Monosaccharide Glucose und Fructose verzehrt [74].

Kohlenhydrate können vom menschlichen Organismus nur in Form von Monosacchariden absorbiert werden. Daher muss die hochmolekulare Stärke in kleinere Bruchstücke zerlegt werden. Dieser Abbau beginnt bereits in der Mundhöhle durch die mechanische und enzymatische Zerkleinerung der Nahrung.

Die zur Gruppe der α -Glucosidasen gehörende **α -Amylase** (1,4- α -D-Glucan-glucohydrolase; EC 3.2.1.1) des Speichels und Pankreassekrets spaltet die α -1,4-Bindung im Innern des Stärkemoleküls (Endohydrolase). Es entstehen zunächst größere Oligosaccharide aus 6-7 Glucose-Einheiten. Bei längerer Einwirkung werden diese zu Maltose und Isomaltose als Endprodukte der Amylase-Spaltung abgebaut (Abb. 27) [70, 74].

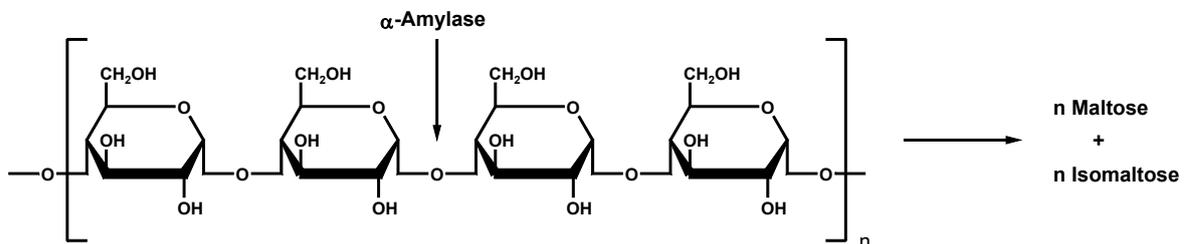


Abb. 27: Spaltung der α -1,4-glycosidischen Bindung von Stärke durch α -Amylase [70]

Auf diese Weise kann die Speichelamylase bis zu 50 % der Stärke spalten. Im Magen pausiert die Kohlenhydratverdauung aufgrund der Inaktivierung der α -Amylase durch die Magensäure. Der weitere Abbau erfolgt durch Disaccharidasen, die in der Bürstensaummembran der Mucosazellen des Dünndarms lokalisiert sind. Die Disaccharidasen sind am höchsten im Jejunum konzentriert, geringer im Duodenum und Ileum. Das Enzym **α -Glucosidase** (α -D-Glucosid-glucohydrolase; EC 3.2.1.20, auch Maltase genannt) spielt hier eine zentrale Rolle, da es als Exohydrolase in der Lage ist, 1,4-verknüpfte α -D-Glucose-Einheiten, wie sie bei der Maltose vorkommen, terminal abzuspalten. Die Spaltung der α -1,6-Bindungen der Isomaltose erfolgt durch die **Isomaltase** (Oligosaccharid- α -1,6-glucohydrolase; EC 3.2.1.10) [74].

Die ebenfalls in der Bürstensaummembran lokalisierte Disaccharidase **Saccharase** (β -D-Fructofuranosid-fructohydrolase; EC 3.2.1.26, auch Invertase genannt) katalysiert die Hydrolyse von Saccharose in α -D-Glucose und β -D-Fructose (Abb. 28).

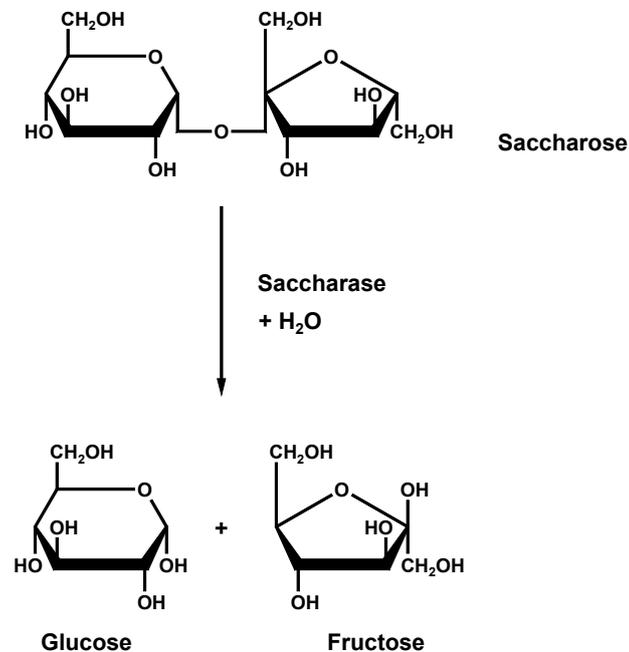


Abb. 28: Hydrolyse von Saccharose durch Saccharase [74]

Das Verdauungsenzym **Lactase** (Lactose-galactohydrolase; EC 3.2.1.108) spaltet das Disaccharid Lactose in dessen Monosaccharid-Einheiten D-Glucose und D-Galactose.

Die Endprodukte der hydrolytischen Spaltung der Kohlenhydrate im Rahmen der intraluminalen Verdauung sind somit die Monosaccharide D-Glucose, D-Galactose und D-Fructose. Im weiteren Verlauf werden diese schließlich durch verschiedene Transporter aufgenommen und in die Enterozyten absorbiert [74].

In der Literatur sind zwei Mechanismen der enzymkatalysierten Hydrolyse O-glycosidischer Verbindungen beschrieben. Bei dem „bewahrenden“ Mechanismus A („retaining“) weist das Hydrolyseprodukt die gleiche Stereochemie wie das Substrat auf ($\alpha \rightarrow \alpha$, $\beta \rightarrow \beta$), während bei Mechanismus B („invertierend“) die hydrolytische Spaltung des Substrats zu einem Produkt führt, das eine gegensätzliche Stereochemie aufweist ($\alpha \rightarrow \beta$, $\beta \rightarrow \alpha$) (s. Abb. 29) [75].

Bei den Enzymen α -Glucosidase, α -Amylase sowie Saccharase handelt es sich um O-glycosidische Hydrolasen, die dem Mechanismus A zugeordnet werden [76]. Die enzymatische Hydrolyse läuft nach dem Prinzip einer sauren Hydrolyse ab, die zwei

Carboxylreste als Protonendonator (AH) und Nucleophil (B^-) benötigt. Dabei handelt es sich zumeist um Glutamat- (AH; Glu) und Aspartat- (B^- ; Asp) Reste, die in einer Vielzahl untersuchter Glycosylhydrolasen als katalytisch wirksame Aminosäuren im aktiven Zentrum identifiziert wurden.

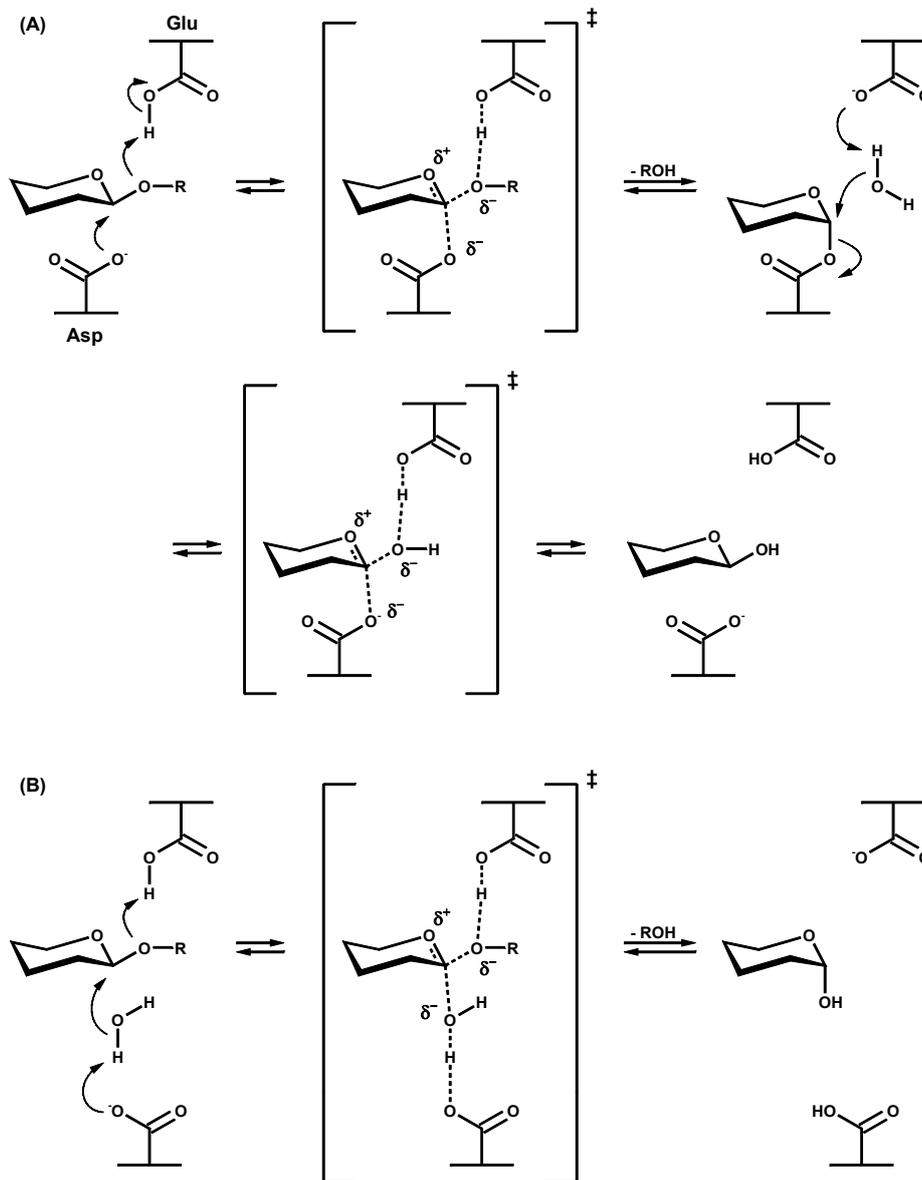


Abb. 29: Mechanismen der enzymkatalysierten Hydrolyse glycosidischer Verbindungen: (A) „retaining“, (B) „inverting“ [75]

In einem ersten Reaktionsschritt wird das Sauerstoffatom am anomeren Zentrum des Glycosids durch Glutaminsäure protoniert, während das anomere Kohlenstoffatom der Saccharideinheit durch einen Aspartat-Rest nucleophil angegriffen wird. Es bildet sich ein kovalent verknüpftes Intermediat in einem Oxocarbenium-Ion ähnlichen Übergangszustand. In den meisten O-glycosidischen Hydrolasen fungiert ein zweiter Aspartat-Rest

als Stabilisierer des Übergangszustandes [77]. Anschließend diffundiert das Restmolekül aus dem aktiven Zentrum des Enzyms und wird durch ein Wassermolekül ersetzt. Die deprotonierte Glutaminsäure aktiviert nun als Base A^- das Wassermolekül, welches im Gegenzug den anomeren Kohlenstoff des Zuckerrestes angreift. Über einen zweiten Oxocarbenium-Ion ähnlichen Übergangszustand wird die Enzym-Glycosid-Verbindung gespalten und das glycosidische Produkt geht mit der gleichen Konfiguration wie das ursprüngliche Substrat aus der Reaktion hervor [78, 79].

2.7 Diabetes mellitus

Unter dem Begriff „Diabetes mellitus“ werden verschiedene Regulationsstörungen des Kohlenhydratstoffwechsels zusammengefasst, die durch eine andauernde Hyperglycämie charakterisiert sind. Die Zuckerkrankheit stellt die häufigste chronische Erkrankung in allen Lebensaltern dar und ist mit Funktionsstörungen und -einschränkungen sowie Langzeitschäden verschiedener Organe, insbesondere der Augen, Nieren und Nerven verbunden. Kardiovaskuläre Komplikationen (Herzinfarkt, Schlaganfall, Durchblutungsstörungen der Beine) sind weitere mögliche Folgen eines Diabetes mellitus [18, 80].

2.7.1 Typen

Im Jahr 1980 führte die WHO die Einteilung des Diabetes mellitus in zwei Hauptklassen ein: IDDM („insulin-dependent diabetes mellitus“) und NIDDM („non-insulin-dependent diabetes mellitus“). Da sich diese Einteilung jedoch nur auf die Behandlung der Patienten und nicht auf die pathophysiologischen Mechanismen bezieht, wurde im Jahr 1997 von der Amerikanischen Diabetes-Gesellschaft (ADA) eine neue Definition und Klassifikation des Diabetes mellitus vorgeschlagen. Diese wurde auch im Wesentlichen von der WHO und Deutschen Diabetes-Gesellschaft angenommen [81]. Seitdem werden verschiedene Formen des Diabetes mellitus unterschieden. Die beiden wichtigsten Formen sind der Typ 1- und Typ 2-Diabetes. Daneben gibt es viele seltene, zahlenmäßig unbedeutendere Diabetesformen [80].

Diabetes mellitus Typ 1 ist durch einen absoluten Insulinmangel definiert, hervorgerufen durch eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas. Die Destruktion der β -Zellen kann immunvermittelt oder idiopathisch sein. Der Insulinmangel führt zu einem Insulinmangelsyndrom, das durch Polyurie, Polydipsie, Keto(azido)se und Gewichtsverlust gekennzeichnet ist.

Typ 1-Diabetes tritt zumeist im Kindesalter auf, eine Manifestation im späteren Lebensalter ist jedoch auch möglich [18, 82].

Typ 2-Diabetes stellt die häufigste Form des Diabetes mellitus in Deutschland dar. Die Ursachen für die Entstehung des Typ 2-Diabetes beruhen auf einer gestörten Insulinsekretion sowie auf einer Insulinresistenz. Es besteht hierbei jedoch keine autoimmune Zerstörung der β -Zellen. Für die Entwicklung des Typ 2-Diabetes spielt die genetische Disposition eine entscheidende pathophysiologische Rolle. Umweltfaktoren (Übergewicht, falsche Ernährung, mangelnde Bewegung, höheres Lebensalter) haben nur eine modulierende Funktion und bestimmen den Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs. Diabetes mellitus Typ 2 ist häufig an das metabolische Syndrom (Adipositas, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie) gekoppelt. Typ 2-Diabetes-Patienten benötigen oft keine Insulintherapie, sondern können mit Diät, Bewegungsaktivierung und oralen Antidiabetika gut behandelt werden [18, 82].

2.7.2 Diagnostik

Die Diagnose von Diabetes mellitus erfolgt über die Messung von mehrfach erhöhten Gelegenheits- oder Nüchternblutglucosewerten im Vollblut. Die Vollblutglucose beschreibt den Bezug der Glucose auf das Gesamtblut. Tab. 7 zeigt Empfehlungen für die kritischen Konzentrationen der Vollblutglucose im Rahmen des oralen Glucosetoleranztestes (OGTT) zur Diagnose des Diabetes mellitus, die auf den Vorschlägen der ADA und WHO beruhen. Neben der Diagnose dienen die Blutglucosewerte ebenfalls zur Beschreibung des Ausmaßes der Hyperglycämie bzw. des Stadiums der Erkrankung [18].

Tab. 7: Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus beim OGTT [18]

	Vollblutglucose
„Abnorme Nüchternglucose“ (Impaired Fasting Glucose, IFG)	≥ 100 mg/dl ($> 5,6$ mmol/l)
Nüchtern Diabetes	≥ 110 mg/dl ($> 6,1$ mmol/l)
„Gestörte Glucosetoleranz“, 2h-Wert (Impaired Glucose Tolerance, IGT)	≥ 140 mg/dl ($\geq 7,8$ mmol/l)
Diabetes, 2h-Wert	≥ 200 mg/dl ($> 11,1$ mmol/l)

Typ 1-Diabetes ist in der Regel durch die klassischen Symptome eines Insulinmangel-syndroms charakterisiert. Die Manifestation dieses Typs wird häufig von körperlicher Belastung, wie einem banalen Infekt, begleitet. Die Diagnostik des Typ 2-Diabetes ist dagegen häufig ein Zufallsbefund, da dieser über Jahre hinweg asymptomatisch, zumeist im Rahmen des metabolischen Syndroms, verläuft. Vielfach wird Typ 2-Diabetes anhand von mikroangiopathischen (z. B. Erkrankungen des peripheren Nervensystems oder der Augen) oder makroangiopathischen Komplikationen (z. B. Herzinfarkt oder Schlaganfall) diagnostiziert. Tab. 8 zeigt eine vergleichende Darstellung über die wichtigsten differentialdiagnostischen Kriterien für die Diagnose von Typ 1- und Typ 2-Diabetes [18].

Tab. 8: Klinische Charakteristika für Typ 1- und Typ 2-Diabetes (Auswahl) [18]

	Typ-1-Diabetes	Typ-2-Diabetes
Manifestationsalter	meist Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene	meist mittleres und höheres Erwachsenenalter
Auftreten/Beginn	akut bis subakut	meist schleichend
Symptome	Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust, Müdigkeit	häufig keine Beschwerden
Körpergewicht	meist normalgewichtig	meist übergewichtig
Insulinsekretion	vermindert bis fehlend	subnormal bis hoch, qualitativ immer gestört
Insulinresistenz	keine (oder nur gering)	oft ausgeprägt
Familiäre Häufung	gering	typisch
Insulintherapie	erforderlich	meist erst nach jahrelangem Verlauf der Erkrankung mit Nachlassen der Insulinsekretion

2.7.3 Behandlung

Das Ziel der Diabetes-Therapie ist die Einstellung einer idealen Blutglucosekonzentration, um die Entstehung Diabetes-spezifischer Spät komplikationen zu vermeiden und damit die Lebensprognose der von Nicht-Diabetikern anzugleichen. Typ 1-Diabetes, bei dem ein absoluter Insulinmangel besteht, muss unverzüglich mit Insulin substituiert werden, da sonst eine lebensbedrohliche Keto(azido)se droht. Patienten mit Typ 2-Diabetes hingegen, bei denen eine Insulinresistenz besteht, sollten zunächst diätetisch behandelt werden. Anzustreben sind eine Gewichtsreduktion und eine Steigerung der körperlichen Aktivität. Lässt sich hierdurch der Blutzucker nicht normalisieren, werden orale

Antidiabetika zur Verbesserung der Insulinempfindlichkeit oder zur Steigerung der Insulinsekretion gegeben. Tab. 9 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten eingesetzten oralen Antidiabetika [82]. Der Vorteil oraler Antidiabetika liegt in der einfacheren Handhabung als Insulin. Jedoch ist der Einsatz einiger dieser Medikamente durch unerwünschte Nebenwirkungen bestimmt. So haben zum Beispiel Sulfonylharnstoff-Derivate ein beachtliches Hypoglycämierisiko. Im Gegensatz dazu üben α -Glucosidase-Inhibitoren keine unerwünschten systemischen Wirkungen aus, führen jedoch häufig zu gastrointestinalen Nebenwirkungen [83].

Tab. 9: Orale Antidiabetika [82]

	Wirkung	eingesetzte Stoffe	Nebenwirkungen
α-Glucosidase-Inhibitoren	Hemmung der Enzyme des Dünndarms → verlangsamer Abbau von Di- und Polysacchariden	Acarbose, Miglitol	Flatulenz, Diarrhoe (dosisabhängig)
Biguanide	Erniedrigung der hepatischen Glucoseproduktion, Erhöhung der Glucoseaufnahme und Insulinwirkung in peripheren Geweben	Metformin	Diarrhoe, Übelkeit, Lactatacidose
Sulfonylharnstoffe	Sensibilisierung der β -Zellen der Langerhans-Inseln → Erhöhung von Insulinfreisetzung	Glibenclamid, Gliquidon, Gliclazid u. a.	Hypoglycämie
Glitazone	unbekannt → Insulinwirkung nimmt zu	Troglitazon, Pioglitazon, Rosiglitazon	Ödeme, Herzinsuffizienz, Gewichtszunahme

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchungen zum Abbau des Rooibostee-Dihydrochalcones Aspalathin

3.1.1 Dimere als farblose Intermediate der Aspalathin-Inkubation

Der oxidative, nicht-enzymatische Abbau des Dihydrochalcones Aspalathin stellt die Hauptursache für die Farbänderung während der Rooibostee-Fermentation dar [3]. Für eine detailliertere Betrachtung des Reaktionsverhaltens wurden Modellinkubationen mit Aspalathin **3** ($t_R = 38,9$ min) durchgeführt. Während dieser Untersuchungen konnten verschiedene diskrete Signale als reaktive farblose Intermediate der Bräunung beobachtet werden. Abb. 30 zeigt ein HPLC-DAD-Chromatogramm einer aeroben Aspalathin-Inkubation nach 4 h.

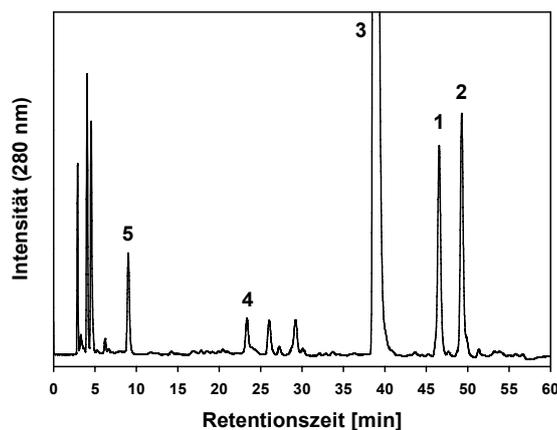


Abb. 30: HPLC-Chromatogramm (Methode A) einer 4 h-Inkubation von Aspalathin **3**

Nach der Auftrennung an der analytischen HPLC-DAD wurden die Signale jeweils massenspektrometrisch detektiert. Für alle vier Substanzen **1**, **2**, **4** und **5** konnten dabei identische Absorptionsmaxima ($\lambda_{max} = 280$ nm) identifiziert werden. Zudem weisen die Strukturen **1+2** sowie **4+5** dieselben Molekülpeaks auf (m/z 925,5 $[M+Na]^+$ bzw. m/z 923,5 $[M+Na]^+$, s. Anhang, S. 120f.), die mittels hochauflösender Massenspektrometrie für alle Verbindungen bis auf Struktur **4** bestätigt wurden (s. Tab. 10; s. Anhang, S. 121). Die ermittelten Molekülmassen lassen Dimere des Aspalathins ($M_{Aspalathin} = 452$ Da) hinter diesen Signalen vermuten, die aus einer einfachen bzw. zweifachen Oxidation resultieren.

Tab. 10: Ermittelte Molekülmassen m/z für die Signale **1**, **2**, **4** und **5** – LC-MS/MS und HR-MS

Signal	Retentionszeit t_R	Absorptionsmaxima λ_{max}	LC-MS/MS	HR-MS
1	46,6 min	280 nm	m/z 925,5 [M+Na] ⁺	m/z 925,2374 [M+Na] ⁺ ; m/z 925,2373 [M+Na] ⁺ berechnet für C ₄₂ H ₄₆ O ₂₂ Na
2	49,3 min	280 nm	m/z 925,5 [M+Na] ⁺	m/z 925,2380 [M+Na] ⁺ ; m/z 925,2373 [M+Na] ⁺ berechnet für C ₄₂ H ₄₆ O ₂₂ Na
4	23,3 min	280 nm	m/z 923,5 [M+Na] ⁺	.*
5	9,0 min	280 nm	m/z 923,5 [M+Na] ⁺	m/z 923,2225 [M+Na] ⁺ ; m/z 923,2216 [M+Na] ⁺ berechnet für C ₄₂ H ₄₄ O ₂₂ Na

* Eine Isolierung für HR-MS-Experimente war nicht möglich.

3.1.1.1 Zeit-Umsatz-Kurven der farblosen Intermediate **1**, **2**, **4** und **5**

In Abb. 31 sind die Zeit-Umsatz-Kurven von Aspalathin **3** sowie der Verbindungen **1**, **2**, **4** und **5** im Vergleich zum Anstieg der Bräunung dargestellt.

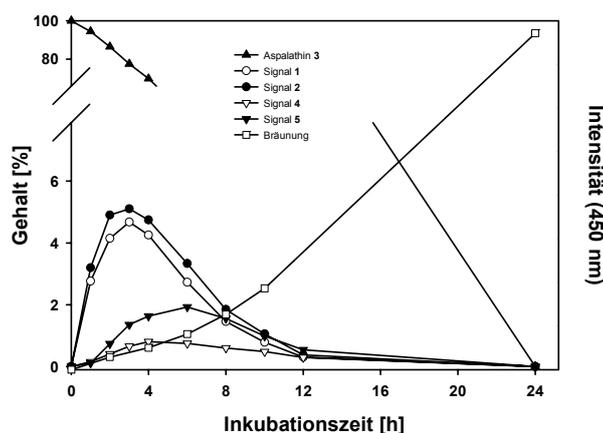


Abb. 31: Abbau von Aspalathin **3** zu den Verbindungen **1**, **2**, **4** und **5** und Bräunung (Die Gehalte der Folgeprodukte wurden prozentual auf die Ausgangskonzentration von **3** umgerechnet.)

Während Aspalathin **3** im Laufe der Inkubation kontinuierlich abgebaut wird, erreichen die Verbindungen **1** und **2** ihr Konzentrationsmaximum nach 3 h (4,7 % (**1**) und 5,1 % (**2**)). Die Struktur **5** weist ihr Maximum nach 6 h mit einer niedrigeren maximalen Konzentration von nur 2 % auf. Aufgrund der geringen Umsatzrate von **4** (max. 0,8 % nach 4 h) in Kombination mit der hohen Reaktivität war eine Isolierung der Verbindung für HR-MS-Messungen sowie eine weitere Strukturaufklärung nicht möglich. Nach einer Inkubationsdauer von 24 h sind die Verbindungen vollständig zu braunen Endprodukten mit den charakteristischen Absorptionsmaxima bei 450 nm abgebaut.

3.1.1.2 Strukturaufklärung der Verbindungen 1 und 2

In Anlehnung an die bekannte Flavonoidchemie kann eine oxidations-induzierte Dimerisierung durch folgende Bindungsreaktionen ablaufen: i) B → B'-Ring, ii) B → A'-Ring und iii) Chinonmethid → B'/A'-Ring. Zur Identifizierung und Verifizierung der Dimerstrukturen wurde Aspalathin für 3 h inkubiert und die Verbindungen **1** und **2** mittels Multilayer Countercurrent Chromatography (MLCCC) und präparativer HPLC isoliert. Die vollständige Strukturaufklärung der authentischen Verbindungen erfolgte mit Hilfe von 1D und 2D homonuklearen ^1H - und heteronuklearen $^1\text{H}^{13}\text{C}$ -Experimenten. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten beider Substanzen sowie die chemischen Verschiebungen sind im Anhang dargestellt (s. Anhang, Tab. 38, S. 122f.). Die erhaltenen NMR-Daten ermittelten die Bildung zweier Dimere (Abb. 32).

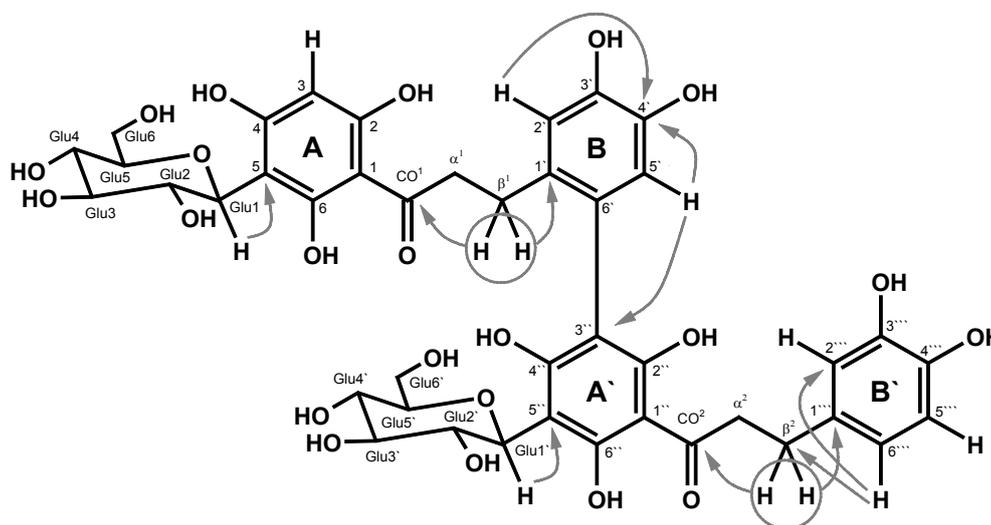


Abb. 32: Struktur der Dimere **1** und **2** mit ausgewählten HMBC-Korrelationen

Die Protonensignale eines Drei-Spin-Systems (B'-Ring) und das Singulett eines aromatischen Protons (A-Ring) spiegeln sowohl in der chemischen Verschiebung als auch in der Signalaufspaltung die Literaturwerte von Aspalathin wider [7]. Es erscheinen nur zwei weitere aromatische ^1H -Signale H-2' (1: δ 6,81 ppm; 2: δ 6,80 ppm) und H-5' (1: δ 6,55 ppm; 2: δ 6,54 ppm), die aufgrund ihrer gemeinsamen HMBC-Korrelationen zu C-3' und C-4' zum B-Ring gehören. Das Vorhandensein der ^3J -HMBC-Korrelation zwischen H-5' und C-3'' beweist die vorgeschlagene dimere Struktur. Die beiden Aspalathin-Moleküle sind demnach über eine Biarylachse zwischen C-6' des B-Rings des einen Moleküls und C-3'' des A'-Rings des zweiten Moleküls miteinander verknüpft (s. Anhang, S. 124f.).

Die Ergebnisse wurden durch HPLC-ESI-MS²-Experimente bestätigt. Diese belegten einen Abgang von 452 Masseinheiten korrespondierend zu einem Aspalathin-Molekül, wie es für eine dimere Struktur zu erwarten ist. Der Verlust des B⁻-Rings mit den α - und β -Positionen ($m/z = 137$) sowie des A-Rings mit Glucose-Einheit ($m/z = 288$) stellen weitere Indizien dar. Das Fragment $m/z = 579$ entspricht dem Verlust zweier Glucose-Reste (324 Masseinheiten). Zudem wurden typische Fragmentierungsmuster für Glycosylflavonoide $[M+H-90]^+$, $[M+H-120]^+$ und $[M+H-150]^+$ detektiert, die im Einklang mit Kazuno *et al.* stehen (s. Anhang, Abb. 75, S. 125) [84].

Im Hinblick auf diese Resultate lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den Dimeren **1** und **2** um Atropisomere handelt. Circular-Dichroismus-Experimente zeigten tatsächlich entgegengesetzte Cotton-Effekte der beiden Verbindungen (Abb. 33).

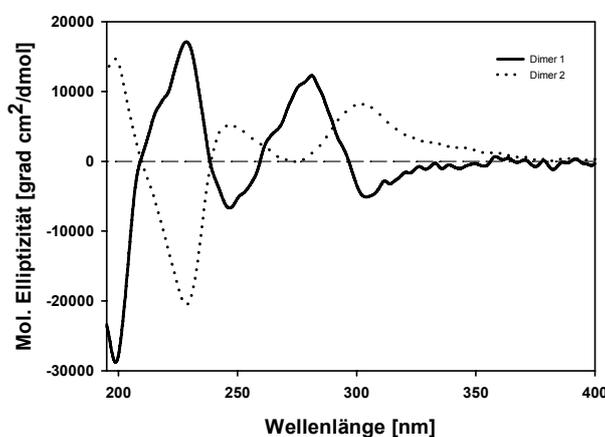


Abb. 33: Circular-Dichroismus-Spektren der Dimere **1** und **2**

Das Vorliegen der Atropisomerie beruht auf der eingeschränkten freien Drehbarkeit um die Biarylachse C-6`C-3`` aufgrund der drei *ortho*-ständigen Substituenten sowie des voluminösen Glucose-Rests. Isomerisierungsexperimente, die bei erhöhten Temperaturen durchgeführt wurden, zeigten, dass Dimer **1** in Dimer **2** überführt werden kann. Die Umwandlung resultiert in demselben Gleichgewichtsverhältnis, das beim oxidativen Abbau von Aspalathin ermittelt wurde (s. Anhang, Abb. 76, S. 126).

3.1.1.3 Postulierter Bildungsweg der Dimere **1** und **2**

Abb. 34 stellt einen plausiblen Mechanismus für die Bildung der Aspalathin-Dimere via oxidativer Kupplung dar. Dabei kommt es zunächst zur Oxidation des Aspalathins zum *o*-Chinon, welches im Anschluss vom A-Ring eines weiteren Aspalathin-Moleküls nucleophil angegriffen wird. Es entstehen zwei Atropisomere **1** und **2**, die bei höheren Temperaturen ineinander überführbar sind.

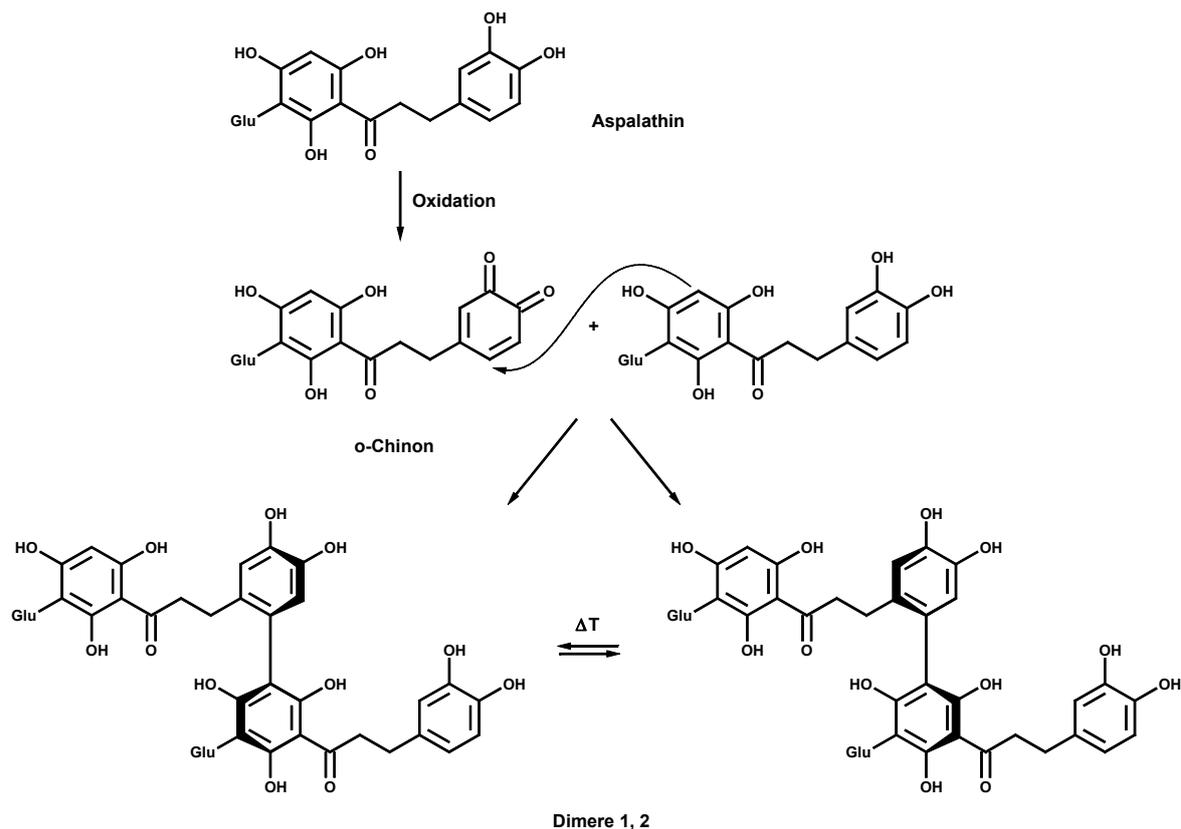


Abb. 34: Postulierter Bildungsweg der Dimere 1 und 2

3.1.1.4 Strukturaufklärung der Verbindungen 4 und 5

Im Gegensatz zur Struktur **4**, konnte die Verbindung **5** erfolgreich aus einer 6-stündigen Aspalathin-Inkubation mittels MLCCC und präparativer HPLC isoliert werden. Ein- und mehrdimensionale NMR-Experimente führten zur eindeutigen Strukturaufklärung des authentischen Materials (Abb. 35). Im Anhang sind die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten sowie die chemischen Verschiebungen tabellarisch aufgelistet (s. Anhang, Tab. 39, S. 127).

Im Vergleich zu den NMR-Literaturdaten von Aspalathin [7] konnten nur zwei aromatische Protonensignale (jeweils ein Singulett) detektiert werden. Aufgrund der Korrelationen zu C-3'/C-3'''' und C-4'/C-4'''' wurden beide Singulett dem B/B''-Ring zugeordnet. Als Folge der fehlenden Protonenmultiplizität sind die beiden Protonen *para*-ständig zueinander, d. h. an Position 2'/2'''' (δ 6,83 ppm) und 5'/5'''' (δ 6,54 ppm). Die ^3J -HMBC-Korrelationen zwischen C-3 und H-2'''' sowie H-5'''' (ebenso C-3'' zu H-2' und H-5') beweisen zweifelsfrei die dimere Struktur der Verbindung (s. Anhang, S. 128). Das Molekulargewicht von 900 Da stimmt mit den zweifach verknüpften A- und B-Ringen zwei verschiedener Aspalathin-Moleküle überein.

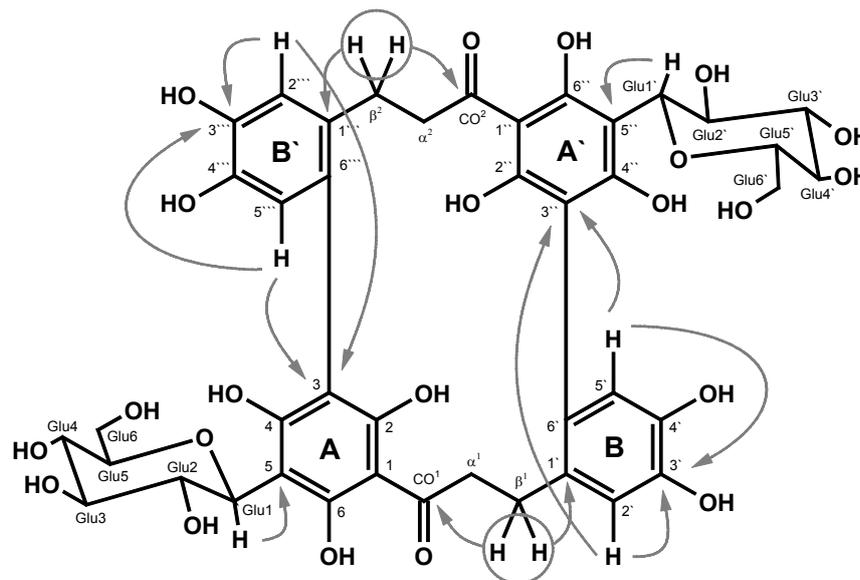


Abb. 35: Struktur des Dimers **5** mit ausgewählten HMBC-Korrelationen

3.1.1.5 Postulierter Bildungsweg der Dimere **4** und **5**

Aufgrund der Struktur des Dimers **5** lag die Vermutung nahe, dass die Atropisomere **1** und **2** als Precursor-Strukturen für die Bildung von Dimer **5** fungieren. Durch eine zweite Oxidation des noch intakten B-Rings kann es zu einem weiteren nucleophilen Angriff kommen, der zur Bildung des Dimers **5** führt. In Abb. 36 ist der Bildungsmechanismus postuliert (Bildungsweg A). Zur Bestätigung dieser Vermutung wurden die Atropisomere **1** und **2** separat inkubiert und resultierten tatsächlich in der Bildung von Dimer **5** (s. Anhang, Abb. 79, S. 129). Überdies konnte **5** in diesen Inkubationen in höheren Konzentrationen und zu signifikant verkürzten Inkubationszeiten (< 1 h) als in reinen Aspalathin-Inkubationen nachgewiesen werden.

Wenngleich die Struktur **4** nicht isoliert werden konnte, soll an dieser Stelle dennoch ein möglicher Bildungsmechanismus postuliert werden (Abb. 36, Bildungsweg B). Das Molekulargewicht von 900 Da deutet auch hier eine Dimerisierung über eine 2-Schritt-Oxidation an. Das *o*-Chinon wird durch den B-Ring eines zweiten Aspalathin-Moleküls nucleophil angegriffen. Nach der Rearomatisierung und Oxidation des zweiten B-Rings lagert sich das Dimer zu einem Chinonmethid um [8]. Ein zweiter nucleophiler Angriff führt dann zum mutmaßlichen Dimer **4**, welches über ein Fünf-Ring-System stabilisiert ist.

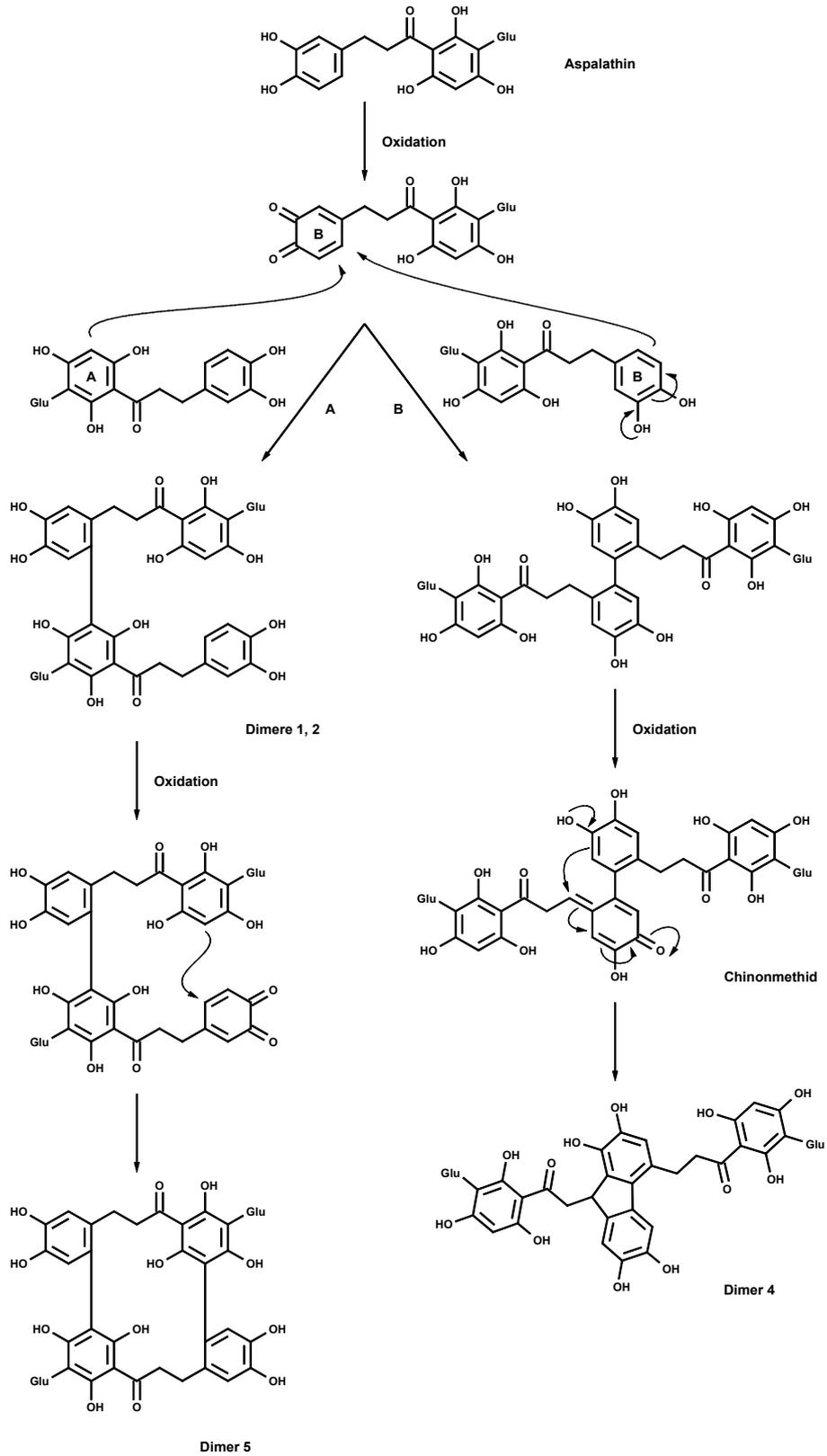


Abb. 36: Postulierter Bildungsmechanismus der Dimere 4 und 5

3.1.2 Dihydrokaffeesäure als farbloses Intermediat des Aspalathin-Abbaus

3.1.2.1 Identifizierung von Dihydrokaffeesäure als Abbauprodukt

Ein weiterer Abbauweg des Aspalathins konnte durch gaschromatographische Untersuchungen aufgeklärt werden. In den aeroben Aspalathin-Inkubationen wurde ein diskretes Signal **6** identifiziert, dessen Bildung bei basischen pH-Werten begünstigt abläuft (Abb. 37). Die Verbindung liegt bei pH 10,8 nach 2 h Inkubationszeit in maximaler Ausbeute vor, wird jedoch im weiteren Inkubationsverlauf wieder abgebaut.

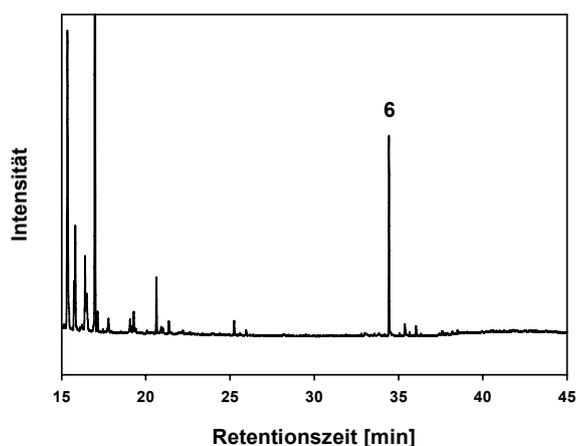


Abb. 37: GC-Chromatogramm einer 2 h-Inkubation von Aspalathin bei pH 10,8

Die Auswertung des Massenspektrums (Molekülpeak m/z 398) sowie der Vergleich mit einer authentischen Referenz identifizierte Signal **6** ($t_R = 34,4$ min) als 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure, Trivialname: Dihydrokaffeesäure (s. Anhang, Abb. 80, S. 129).

Die Bildung der Dihydrokaffeesäure **6** ist über eine hydrolytische Spaltung des Aspalathins denkbar. Als Nebenprodukt der Hydrolyse entsteht Phloroglucinol (Abb. 38).

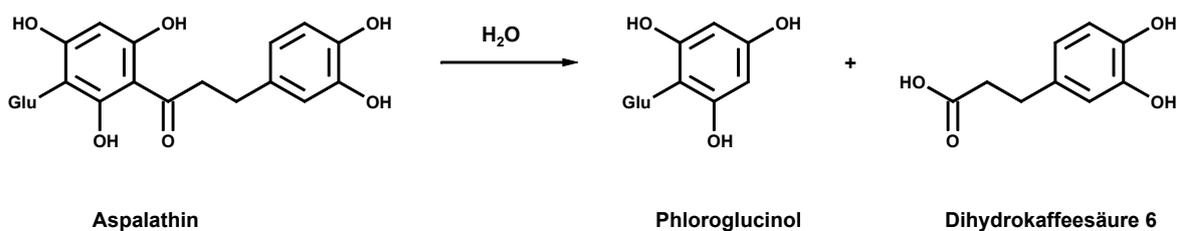


Abb. 38: Postulierter Bildungsweg der Dihydrokaffeesäure **6**

3.1.2.2 Aspalathin-Dihydrokaffeensäure-Addukte als Folgeprodukte

LC-MS-Untersuchungen zeigten, dass die entstehende Dihydrokaffeensäure **6** im weiteren Inkubationsverlauf Folgeprodukte **7** und **8** mit Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\max} = 280$ nm bildet. Mit Hilfe der massenspektrometrischen Detektion konnten nach 7 h Inkubationsdauer zwei identische Signale **7+8** mit demselben Molekülpeak m/z 633 $[M+H]^+$ identifiziert werden (Abb. 39).

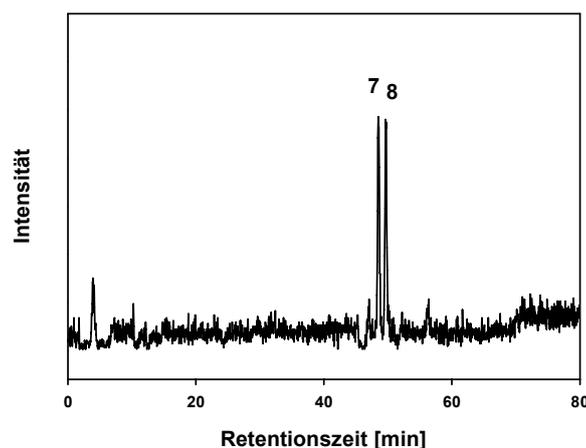


Abb. 39: XIC (Extracted Ion Chromatogram) einer 7 h-Inkubation von Aspalathin bei pH 8,5
(**7**: $t_R = 48,1$ min; **8**: $t_R = 49,2$ min)

Durch Auswertung der zugehörigen MS^2 -Spektren konnten zusätzlich Zuckerfragmentierungen eines C-glycosidischen Dihydrochalcones sowie die Abspaltung eines Aspalathin-Moleküls nachgewiesen werden (s. Anhang, Abb. 81, S. 130) [84]. Daher handelt es sich bei den beiden Verbindungen **7** und **8** sehr wahrscheinlich um Aspalathin-Dihydrokaffeensäure-Addukte (Abb. 40).

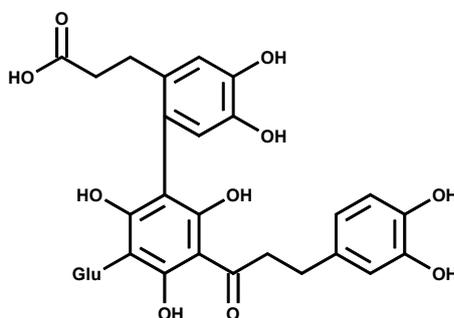


Abb. 40: Strukturvorschlag der Aspalathin-Dihydrokaffeensäure-Addukte **7** und **8**

Die Verbindungen konnten in Modellinkubationen, in denen Aspalathin und Dihydrokaffeesäure als Ausgangsverbindungen vorlagen, bestätigt werden. Zudem waren beide Addukte bereits nach 1 h in der Inkubationslösung nachweisbar.

3.1.2.3 Postulierter Bildungsweg der Aspalathin-Dihydrokaffeesäure-Addukte 7, 8

Die Bildung der Aspalathin-Dihydrokaffeesäure-Addukte **7** und **8** ist über einen Mechanismus der oxidativen Kupplung analog der Dimerbildung (vgl. 3.1.1.3) denkbar. Ausgangspunkt der Reaktion ist die Oxidation der Dihydrokaffeesäure **6** zum entsprechenden *o*-Chinon. Dieses wird in der Folge vom A-Ring des Aspalathin-Moleküls nucleophil angegriffen und resultiert in der Bildung zweier Atropisomere im Verhältnis 95:5 (Abb. 41). Das Vorliegen der Stereoisomerie ist wie bereits bei den Dimeren **1** und **2** auf die eingeschränkte freie Drehbarkeit um die Biarylachse zurückzuführen.

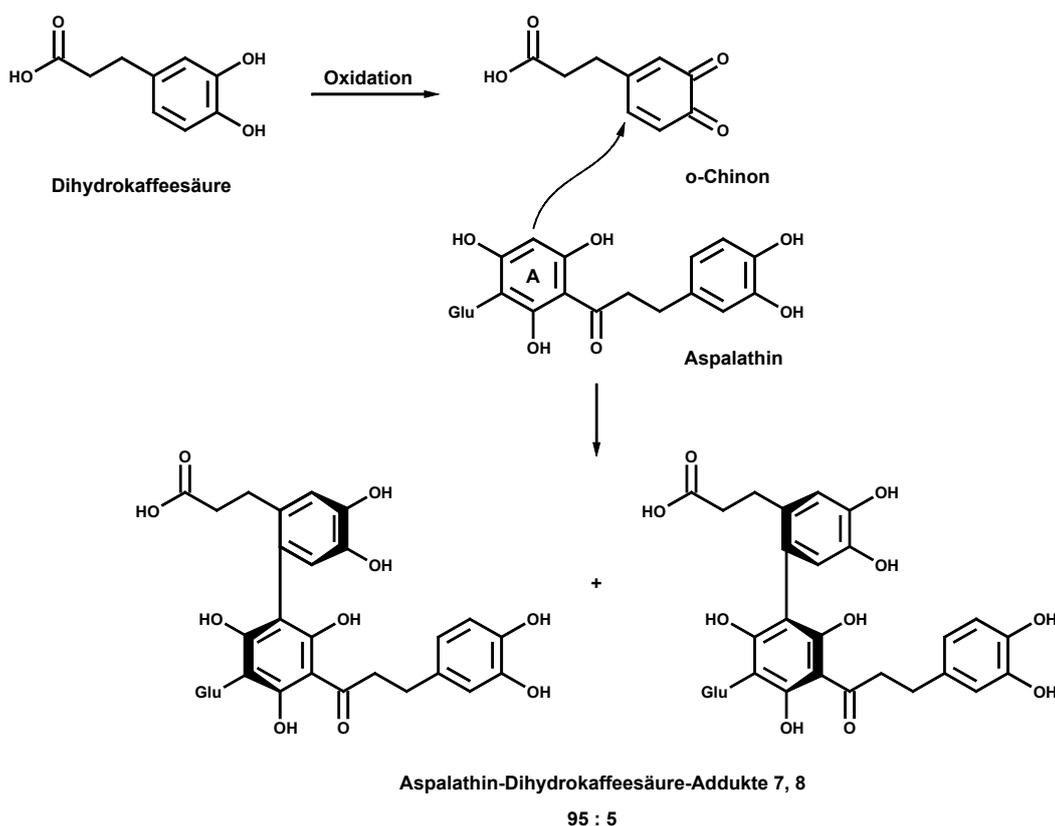


Abb. 41: Postulierter Bildungsmechanismus der Aspalathin-Dihydrokaffeesäure-Addukte **7** und **8**

Da die beiden Strukturen im fermentierten Rooibostee nicht nachgewiesen werden konnten, handelt es sich bei den Aspalathin-Dihydrokaffeesäure-Addukten ebenfalls um reaktive Intermediate des Aspalathin-Abbaus.

3.1.3 Identifizierung farbiger Strukturen bei der Aspalathin-Inkubation

Parallel zur Bildung der beschriebenen farblosen Intermediate und zum Abbau des Aspalathins entstehen weitere Strukturen **9**, **10**, **11** und **12** mit eindeutigen UV- und VIS-Absorptionsmaxima (Abb. 42).

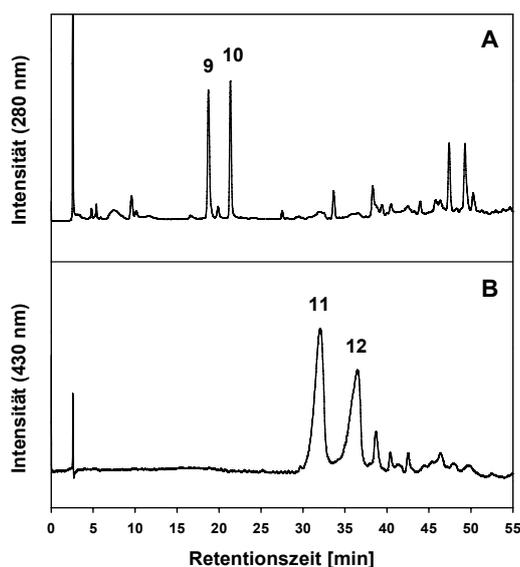


Abb. 42: HPLC-Chromatogramm (Methode C) einer Aspalathin-Inkubation nach 12 h (A; $\lambda = 280$ nm) bzw. 24 h (B; $\lambda = 430$ nm)

Die hochauflösende Massenspektrometrie ergab für **9+10** sowie für **11+12** zwei Verbindungspaare mit identischen Molekülmassen (Tab. 11; s. Anhang, S. 130ff.). Darüber hinaus zeigten HPLC-MS²-Experimente ein übereinstimmendes Fragmentierungsmuster für das Verbindungspaar **11+12** und verdichtete damit die Vermutung des Vorliegens isomerer Strukturen (s. Anhang, Abb. 86, S. 132).

Tab. 11: Ermittelte Molekülmassen m/z für Signale **9**, **10**, **11** und **12** – LC-MS/MS und HR-MS

Signal	Retentionszeit t_R	Absorptionsmaxima λ_{max}	LC-MS/MS	HR-MS
9	18,7 min	280 nm	m/z 469,3 [M+H] ⁺	m/z 469,1341 [M+H] ⁺ *; m/z 469,1341 [M+H] ⁺ berechnet für C ₂₁ H ₂₅ O ₁₂
10	21,6 min	280 nm	m/z 469,3 [M+H] ⁺	m/z 469,1340 [M+H] ⁺ *; m/z 469,1341 [M+H] ⁺ berechnet für C ₂₁ H ₂₅ O ₁₂
11	32,1 min	430 nm	m/z 467,1 [M+H] ⁺	m/z 465,1033 [M-H] ⁻ ; m/z 465,1028 [M-H] ⁻ berechnet für C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂
12	36,5 min	430 nm	m/z 467,1 [M+H] ⁺	m/z 465,1032 [M-H] ⁻ ; m/z 465,1028 [M-H] ⁻ berechnet für C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂

* Die Bestimmung erfolgte über UPLC-TOF-MS.

3.1.3.1 Strukturaufklärung der farbigen Strukturen 11 und 12

Bei dem Versuch, die nativen Verbindungen **9**, **10**, **11** und **12** für die Strukturaufklärung zu isolieren, bauten sich die Verbindungen während der Aufarbeitung ab. Dennoch gelang es, die Verbindungen **11** und **12** durch Reaktion mit *o*-Phenylendiamin (OPD) in ihre korrespondierenden Chinoxaline **13** und **14** zu überführen und damit zu stabilisieren (Abb. 43, s. Anhang, Abb. 87, S. 133).

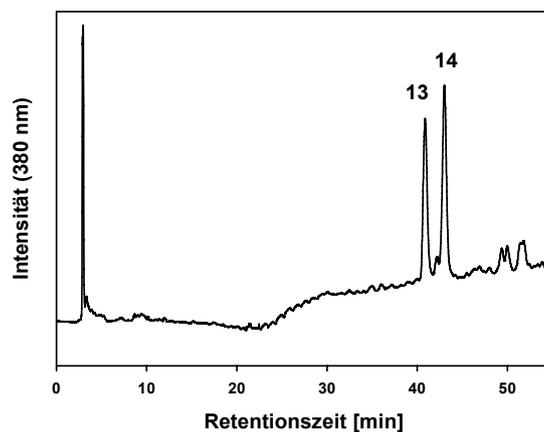


Abb. 43: HPLC-Chromatogramm (Methode A) einer Aspalathin-Inkubation mit OPD
(**13**: $t_R = 40,9$ min; **14**: $t_R = 43,0$ min)

Die Strukturen der isolierten Chinoxaline konnten mittels HR-MS (**13**: m/z 539,1660 $[M+H]^+$, **14**: m/z 539,1661 $[M+H]^+$; m/z 539,1660 $[M+H]^+$ berechnet für $C_{27}H_{27}N_2O_{10}$, s. Anhang, Abb. 88, S. 133) sowie unter Anwendung von 1D und 2D homonuklearen 1H - und heteronuklearen $^1H^{13}C$ -Experimenten aufgeklärt werden (s. Anhang, Tab. 40, S. 134).

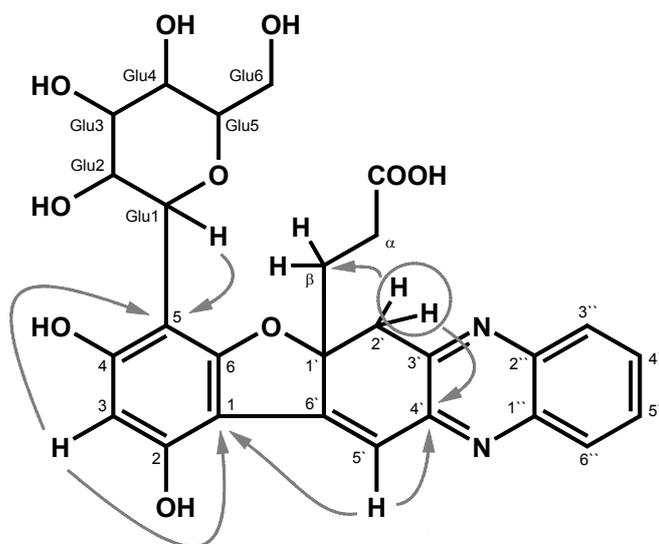


Abb. 44: Struktur der Chinoxaline **13** und **14** mit ausgewählten HMBC-Korrelationen

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten waren für **13** und **14** nahezu identisch. Vier aromatische Protonensignale entsprechen den für Chinoxalin-Strukturen charakteristischen chemischen Verschiebungen und Signalaufspaltungen [85]. Zudem wurden zwei aromatische Protonensingulets bestimmt. Durch den Vergleich mit in der Literatur für Aspalathin angegebene NMR-Daten konnte eines der beiden Singulets als H-3 (δ 6,12 ppm) dem ehemaligen A-Ring zugeordnet werden [7]. Das zweite Singulett bei einer chemischen Verschiebung von δ 7,96 ppm muss an H-5` positioniert sein, da es eine ^3J -HMBC-Korrelation zu C-1 aufweist und damit zweifelsfrei die Verbindung zwischen A- und B-Ring über ein O-heterozyklisches Fünf-Ring-System belegt. Weiterhin konnten in den ^1H -Spektren drei Methylengruppen neben der Gruppe des Zuckerrests identifiziert werden. Die beiden Methylengruppen bei δ 3,10 ppm und δ 2,53 ppm zeigten vicinale Protonen auf und wurden mit Hilfe des 2D- ^1H -COSY-Spektrums als α und β erkannt. Die dritte Methylengruppe bei δ 3,47 ppm weist unter anderem eine ^3J -HMBC-Korrelation zu C- β auf und muss als H-2` unwiderlegbar dem ehemaligen B-Ring zugeordnet werden. Die fehlende Protonenmultiplizität von H-5` unterstreicht die Anordnung dieser Methylengruppe in *para*-Position (s. Anhang, S. 135f.).

Zusätzlich zu der Auswertung der Chinoxalin-NMR-Daten wurde die Verknüpfung des Zuckerrests an Position C-5 durch HPLC-MS²-Experimente der nativen Bräunungsstrukturen **11** und **12** bestätigt. Li *et al.* beschreiben einen reproduzierbaren Unterschied zwischen 6-C- und 8-C-Glycosylflavonoiden, indem die Verhältnisse der Signalintensitäten aus den Massenspektren bei verschiedenen Kollisionsenergien miteinander verglichen werden [86]. Diese Unterscheidung wurde durch Kazuno *et al.* bestätigt und betrifft hauptsächlich die Intensitätsverhältnisse der Fragmente $[\text{M}+\text{H}-150]^+$ / $[\text{M}+\text{H}-120]^+$ bei 30 eV und $[\text{M}+\text{H}-120]^+$ bei 15/30 eV [84]. Dementsprechend wiesen die Experimente der Strukturen **11** und **12** typische Verhältnisse von 8-C-Glycosylflavonoiden (beide Verhältnisse < 1) auf (Verhältnisse für **11**: 0,34 und 0,13; für **12**: 0,70 und 0,35) und belegten damit die Zuordnung des Zuckerrests an C-5.

3.1.3.2 Postulierter Bildungsmechanismus der Strukturen **11** und **12**

Basierend auf der Strukturaufklärung sowie unter Berücksichtigung des bisher bekannten oxidativen Abbaus des Aspalathins, wird folgender Bildungsmechanismus der Bräunungsstrukturen **11** und **12** postuliert (Abb. 45).

Zunächst wird Aspalathin zu seinem *o*-Chinon oxidiert. In einer intramolekularen Michaelartigen Addition greift C-1 des A-Rings C-6` des B-Rings nucleophil an und es kommt zur Bildung eines neuen Spiro-Sechs-Ring-Systems. Nach der Rearomatisierung des B-Rings erfolgt unter Wasseraddition eine über das Prinzip der Vinylogie verlängerte

1,3-Dicarbonylsplaltung. Aus dieser resultieren zwei hoch reaktive Intermediate **9** und **10** mit Biphenylstruktur und Propionsäure-Substituenten, deren Nachweis über UPLC-TOF-MS gelang (siehe 3.1.3). Interessanterweise wird während dieses Schrittes kein chirales Zentrum generiert. Beide Strukturen weisen noch ein individuelles, voneinander verschiedenes chromatographisches Verhalten auf. Eine denkbare Erklärung dafür ist, dass die eingeschränkte freie Drehbarkeit aufgrund der drei Substituenten in *ortho*-Position zur Biarylachse C-1C-6' sowie der voluminöse Glucose-Rest Atropisomerie hervorrufen [3].

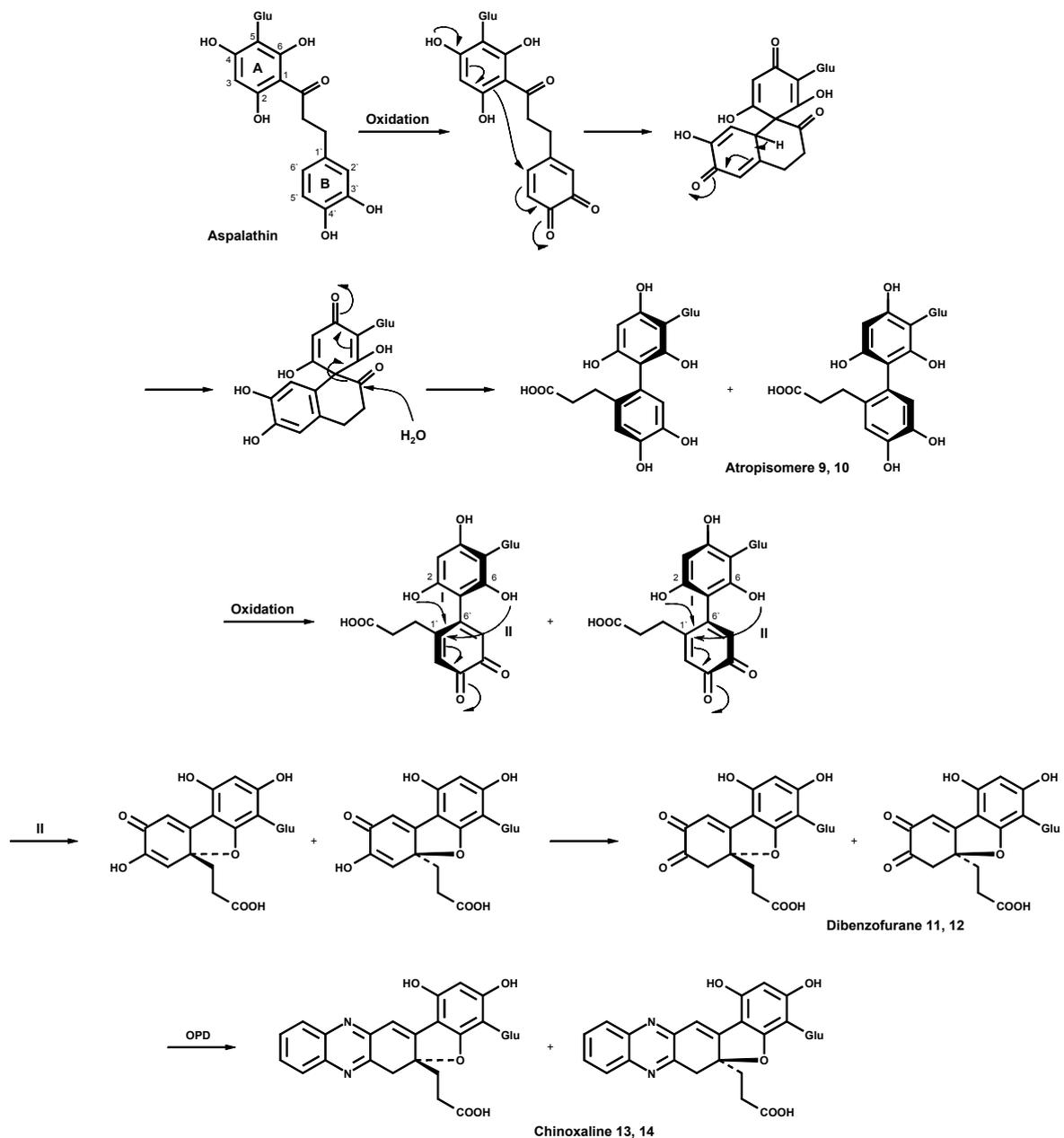


Abb. 45: Postulierter Bildungsmechanismus der farbigen Dibenzofurane **11** und **12**

Im Anschluss an eine weitere Oxidation des ehemaligen B-Rings kommt es zu einem intramolekularen Ringschluss. Dieser kann theoretisch durch einen nucleophilen Angriff der Hydroxylfunktion C-2 (I) oder C-6 (II) an Position C-1' erfolgen. Keto-Enol-Tautomerie führt dann zu zwei Paaren farbiger Diastereomere mit einem Dibenzofuran-Grundgerüst. Die Stabilisierung durch Reaktion mit OPD führte jedoch lediglich zu einem Paar Chinoxalinen **13** und **14**. Die Strukturaufklärung zeigte, dass der nucleophile Angriff ausschließlich über OH-6 an C-1' (II) zur Bildung der identifizierten farbigen Strukturen **11** und **12**, (*S*)- und (*R*)-3-(7,9-Dihydroxy-2,3-dioxo-6- β -D-glucopyranosyl-3,4-dihydrodibenzo-[*b,d*]furan-4a(2*H*)-yl)-propionsäure), führt.

Untersuchungen zur Bildung von Matlalin aus Coatlin B, einem Dihydrochalcon des mexikanischen Heilbaumes *Eysenhardtia polystachya*, unterstützen den postulierten Bildungsweg. Dieser wird durch spontane Oxidation des Dihydrochalcon Coatlin B, welches über einen B-Ring mit Catechol-Rest verfügt, initiiert [87]. Interessanterweise beschreiben Le Guernevé *et al.* ein ähnliches Dibenzofuran-Chromophor aus dem Abbau des in Äpfeln vorkommenden Phloridzins [88]. Im Gegensatz zu Aspalathin handelt es sich bei Phloridzin um ein O-glycosidisches Dihydrochalcon und besitzt vor allem lediglich eine Hydroxylgruppe am B-Ring. In diesem Fall kann der Bräunungsprozess nur in Gegenwart einer Polyphenoloxidase initiiert werden, um 3-OH-Phloridzin zu erhalten. Dies belegt wiederum die einzigartige Wichtigkeit der nicht-enzymatischen Oxidation des Aspalathins während der Rooibostee-Fermentation.

3.1.3.3 Zeit-Umsatz-Kurven der Dibenzofurane sowie ihrer Precursor-Strukturen

Abb. 46 stellt die Zeit-Umsatz-Kurven der farbigen Dibenzofurane **11** und **12** in Relation zur Bildung der Atropisomere **9** und **10** während des Abbaus von Aspalathin **3** dar.

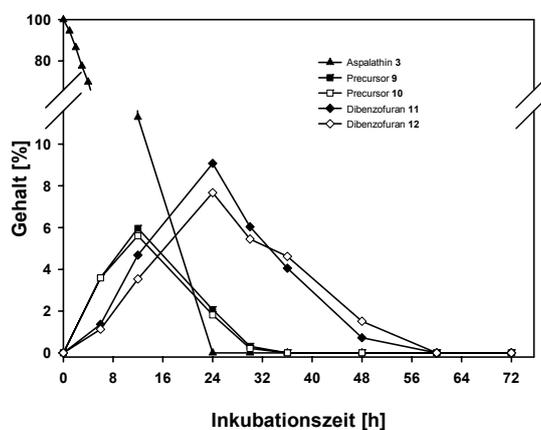


Abb. 46: Bildung der Precursor- **9**, **10** und Dibenzofuran-Strukturen **11**, **12** aus Aspalathin **3** (Die Gehalte der Folgeprodukte wurden prozentual auf die Ausgangskonzentration von **3** umgerechnet.)

Da weder eine Isolierung noch Stabilisierung von **9** und **10** möglich war, wurden die Flächen dieser beiden Verbindungen auf Grundlage des Extinktionskoeffizienten von Aspalathin geschätzt. Die beiden Precursorstrukturen erreichten ihre maximale Konzentration nach 12 h Inkubationszeit in dem Verhältnis 58:42 für Atropisomer **9:10** und waren nach 36 h wieder vollkommen abgebaut. Die farbigen Strukturen wiesen hingegen ihr Konzentrationsmaximum nach 24 h im Verhältnis 53:47 für das Dibenzofuran **11:12** auf. Der Verlauf dieser Bildungen ist ein weiteres Indiz für den postulierten Bildungsweg, da die Precursor ihr Maximum zeitlich vor den farbigen Strukturen erreichten. Allerdings handelte es sich bei den Dibenzofuranen **11** und **12** mit ihrem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 430 nm ebenso um reaktive Intermediate. Nach einer Inkubationsdauer von 60 h waren auch diese Verbindungen vollständig abgebaut und die Farbe der Modellinkubationslösung wechselte von gelb zu dunkel orange. Sehr wahrscheinlich führt der Abbau der Dibenzofurane zu der Entstehung höhermolekularer tannin-ähnlicher Strukturen während der letzten Stufen der Aspalathin-Oxidation. So konnten keine weiteren diskreten Signale farbiger Verbindungen in der HPLC-DAD detektiert werden.

3.1.3.4 Anwendung der Farbverdünnungsanalyse auf die Dibenzofurane **11** und **12**

Zur Bestimmung des Beitrages der Dibenzofurane **11** und **12** zur Gesamtfarbe der Aspalathin-Inkubationslösung wurde eine Farbverdünnungsanalyse durchgeführt (Abb. 47).

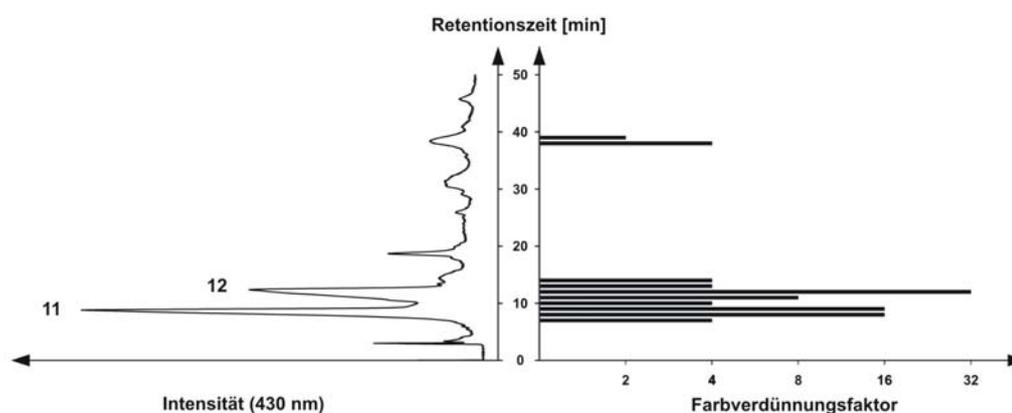


Abb. 47: HPLC-Chromatogramm (Methode A; links) und Farbverdünnungsanalyse-Chromatogramm (rechts) einer 24 h Aspalathin-Inkubation

Die Farbverdünnungsfaktoren der beiden Verbindungen wurden zum Zeitpunkt ihrer höchsten Konzentration (24 h) analysiert und betragen 15 bzw. 18 % der Gesamtfarbe (CD_{total} -Faktor: 256). Wie aufgrund der Reaktivität der Verbindungen **11** und **12** erwartet, konnten diese nicht in Aufgüssen von fermentiertem Rooibostee in ihrer nativen Form identifiziert werden. Aufgüsse, die mit OPD versetzt wurden, wiesen jedoch eindeutig Spuren der Chinoxaline **13** und **14** auf. Die stabilen Derivate wurden in HPLC-DAD- sowie HPLC-MS-Chromatogrammen detektiert (s. Anhang, Abb. 93, S. 137) und waren in Massenspektren und Retentionszeit mit dem aus den Aspalathin-Ansätzen isolierten authentischen Material identisch.

3.2 Untersuchung der Enzyminhibierung *in vitro* und *in vivo*

3.2.1 Enzyminhibierung durch Rooibostee-Polyphenole *in vitro*

3.2.1.1 Enzymassay α -Glucosidase

Die Bestimmung der α -Glucosidase-Aktivität (EC 3.2.1.20) erfolgte durch eine direkte kinetische Methode unter der Verwendung von *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid als Substrat. Bei der enzymkatalysierten Hydrolyse des Substrats werden α -Glucose und der Farbstoff *p*-Nitrophenol freigesetzt, welches photometrisch bei einer Wellenlänge von 400 nm vermessen werden kann (Abb. 48; Kalibrierung s. Anhang, Abb. 94, S. 137) [89].

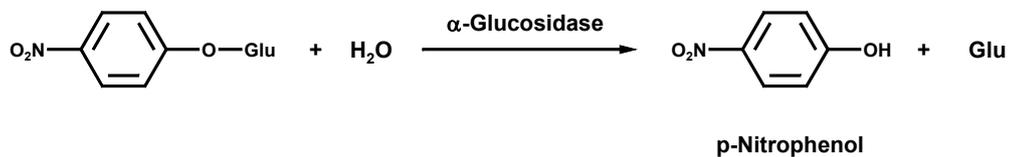


Abb. 48: Reaktion der α -Glucosidase mit *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid [84]

Die verwendete Methode bietet eine Vielzahl an Vorteilen gegenüber anderen Aktivitäts-Bestimmungsmethoden. Die bedeutendste Eigenschaft liegt in der direkten Verfolgbarkeit des Anstiegs der Absorption durch das freigesetzte gelbe *p*-Nitrophenol während der Hydrolyse, welches zudem keinen Einfluss auf die Reaktion ausübt [90]. Außerdem ist die Durchführung im Gegensatz zu anderen Bestimmungen simpler gestaltet, da die Anwesenheit weiterer Enzyme für die Hydrolyse nicht erforderlich ist. Die Versuche wurden bei einem pH-Wert von 6,8 durchgeführt, welcher in der Literatur für eine optimale Enzymaktivität beschrieben wird und zudem einer Artefaktbildung des Substrats entgegenwirkt [91].

Unter Verwendung der doppelt-reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk ($1/S$ versus $1/v_0$) wurden die Michaelis-Menten Konstante $K_m = 0,1526$ mM sowie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{max} = 0,1311$ mM/min bestimmt (vgl. Abb. 51).

Im Anschluss wurden die Polyphenole Aspalathin, (+)-Catechin und Isoquercitrin auf ihre Inhibitoraktivität untersucht (Abb. 49). Die phenolischen Verbindungen wurden für alle Versuche in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, da der Zusatz von Methanol zu höheren Enzymaktivitäten führte. Die finale DMSO-Konzentration wurde jedoch ebenfalls auf 1 % verdünnt. Höhere DMSO-Konzentrationen unterdrückten die Inhibitoraktivität der Polyphenole [92].

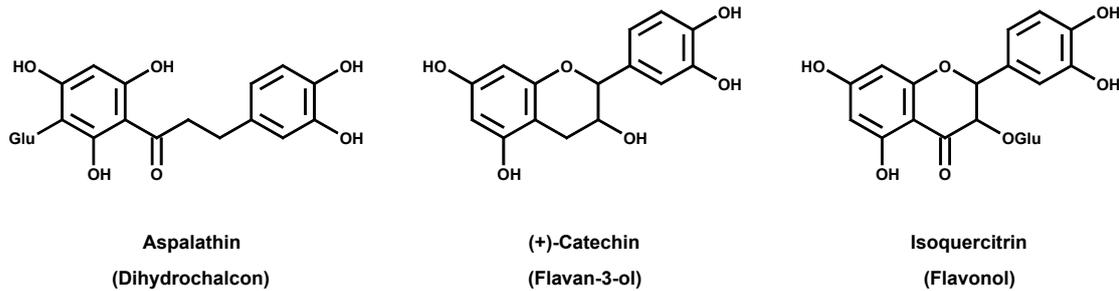


Abb. 49: Übersicht über die in den Enzymassays eingesetzten polyphenolischen Verbindungen

Abb. 50 zeigt das Geschwindigkeits-Konzentrations-Diagramm (S versus v_0) für (+)-Catechin (Aspalathin und Isoquercitrin s. Anhang, S. 138). In Abwesenheit der Inhibitoren ist bei steigenden Substratkonzentrationen eine zunehmende Freisetzung von p -Nitrophenol ersichtlich. Die Maximalgeschwindigkeit der Enzymaktivität v_{\max} wurde bei der Substratkonzentration $[S] = 1,5$ mM erreicht.

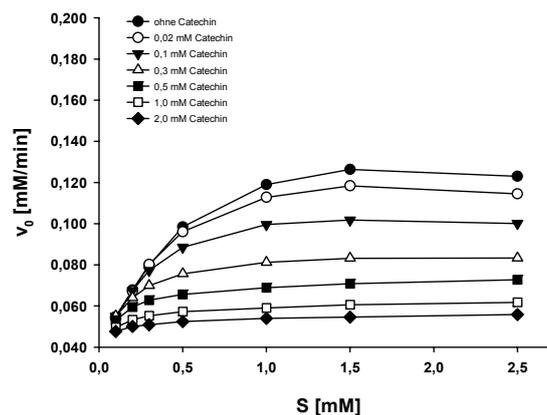


Abb. 50: v - S -Diagramm für die Reaktion α -Glucosidase mit p -Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid in der Gegenwart verschiedener (+)-Catechin-Konzentrationen

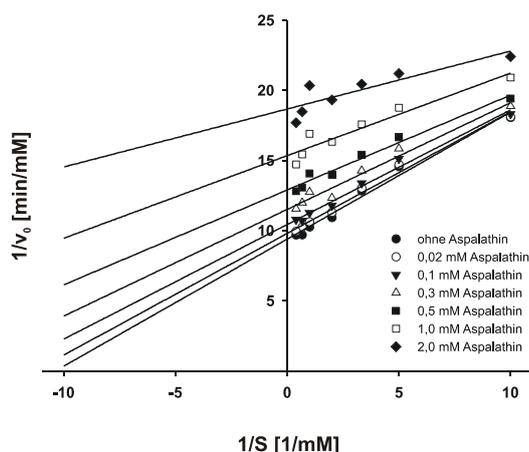
Die Anwesenheit aller Polyphenole zeigte eine starke reversible inhibitorische Wirkung auf die Enzymaktivität. Mit steigenden Inhibitorkonzentrationen war ein Abflachen der Kurven zu verzeichnen und deutete auf eine verzögerte Produktbildung hin.

Unter den untersuchten Polyphenolen zeigte (+)-Catechin die größte Inhibitorwirkung mit einem IC_{50} -Wert von 0,4912 mM. Bereits eine Inhibitorkonzentration von 0,1 mM inhibierte die α -Glucosidase um 25 %. Die Konzentrationen von Aspalathin und Isoquercitrin, die eine Inhibierung des Enzyms um 50 % bewirkten, betragen 0,7794 mM für Aspalathin bzw. 1,0249 mM für Isoquercitrin. Sie wiesen damit eine 1,6 bzw. 2,1fach schwächere Inhibitoraktivität als (+)-Catechin auf (s. Tab. 12).

Tab. 12: Ermittelte IC_{50} -Werte [mM] und Inhibitorkonstanten K_i [mM] der *in vitro* Enzymassays

Inhibitor	α -Glucosidase		α -Amylase		Saccharase	
	IC_{50}	K_i	IC_{50}	K_i	IC_{50}	K_i
Aspalathin	0,7794	1,9317	0,4815	3,3108	51,3231	25,6472
(+)-Catechin	0,4912	2,6936	1,4833	5,8354	17,2857	10,3133
Isoquercitrin	1,0249	3,7399	1,5840	3,5050	28,3209	22,9428

Die kinetischen Studien wurden anhand der Lineweaver-Burk-Darstellung durchgeführt und ergaben für alle untersuchten polyphenolischen Verbindungen eine unkompetitive Inhibition als Inhibitionstyp. Abb. 51 zeigt den typischen Kurvenverlauf der unkompetitiven Hemmung am Beispiel des Aspalathins ((+)-Catechin und Isoquercitrin s. Anhang, S. 139). Die doppelt-reziproke Darstellung ($1/S$ versus $1/v_0$) weist parallele Linien auf, die die senkrechte $1/v_0$ -Achse abhängig von der Inhibitorkonzentration an verschiedenen Punkten schneiden.

**Abb. 51:** Lineweaver-Burk-Diagramm der unkompetitiven Hemmung von α -Glucosidase durch Aspalathin

Zur Bestimmung der Inhibitorkonstanten K_i wurde die Dixon-Auftragung ($1/v_0$ versus I) angewandt und zeigte für alle drei Polyphenole ebenfalls weitestgehend zueinander parallel verlaufende Linien. Dieser Kurvenverlauf im Dixon-Diagramm lieferte einen zusätzlichen Hinweis auf die unkompetitive Hemmung (Abb. 52; Aspalathin und Isoquercitrin s. Anhang, S. 140).

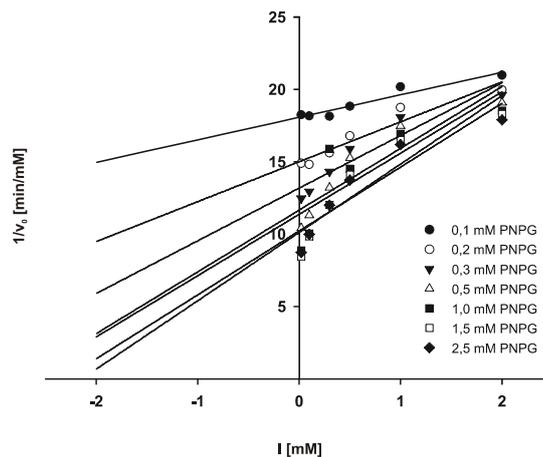


Abb. 52: Dixon-Diagramm der Umsetzung von *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (PNPG) durch α -Glucosidase in Gegenwart verschiedener (+)-Catechin-Konzentrationen

Die Inhibitorkonstanten der einzelnen Verbindungen sind in Tab. 12 (S. 60) aufgeführt. Die ermittelten K_i -Werte lagen deutlich höher als der K_m -Wert. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Gleichgewicht auf Seiten des ES-Komplexes liegt, da die Bindung des Enzyms zum Substrat (geringer K_m -Wert) stärker als zu den Polyphenolen (hohe K_i -Werte) ist. Unter den Inhibitoren wies Aspalathin die stärkste Bindung zur α -Glucosidase auf (12,7fach höher als K_m) im Vergleich zu (+)-Catechin (17,7fach) und Isoquercitrin (24,5fach).

3.2.1.2 Enzymassay α -Amylase

Die Analyse der α -Amylase-Aktivität (EC 3.2.1.1) erfolgte analog der Bestimmung der α -Glucosidase-Aktivität unter der Verwendung von *p*-Nitrophenyl- α -D-maltosid als Substrat [93]. Die enzymkatalysierte hydrolytische Spaltung dieser Verbindung führte zur Freisetzung des Chromophors *p*-Nitrophenol ($\lambda_{\max} = 400$ nm), sodass die Vorteile dieser direkten kinetischen Bestimmung, wie unter 3.2.1.1 beschrieben, ebenso beim α -Amylase-Aktivitäts-Assay zum Tragen kamen (Abb. 53).

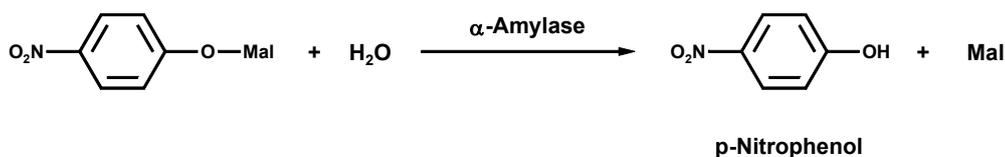


Abb. 53: Reaktion der α -Amylase mit *p*-Nitrophenyl- α -D-maltosid [93]

Die Auswertung der doppelt-reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk ergab die Michaelis-Menten Konstante $K_m = 0,3502 \text{ mM}$ und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max} = 0,0991 \text{ mM/min}$ bei der Substratkonzentration $[S] = 7,5 \text{ mM}$ (s. Anhang, Abb. 101, S. 141).

Der Zusatz der Polyphenole zeigte für alle Verbindungen eine starke reversible Hemmung der α -Amylase-Aktivität, wobei sich Aspalathin mit einem IC_{50} -Wert von $0,4815 \text{ mM}$ als effektivster Inhibitor zeigte (s. Tab. 12, S. 60). Im Gegensatz dazu waren für eine Reduzierung der Enzymaktivität um 50 % die dreifache Menge an (+)-Catechin ($1,4833 \text{ mM}$) und Isoquercitrin ($1,5840 \text{ mM}$) nötig. Die Auswertung der Lineweaver-Burk-Darstellung zeigte einen parallelen Verlauf der Linien zueinander auf und beweist den unkompetitiven Inhibierungstyp aller drei zugesetzter polyphenolischer Strukturen (s. Anhang, Abb. 102, S. 141).

Der ermittelte Inhibierungstyp wurde durch die Dixon-Auftragung bestätigt (Abb. 54).

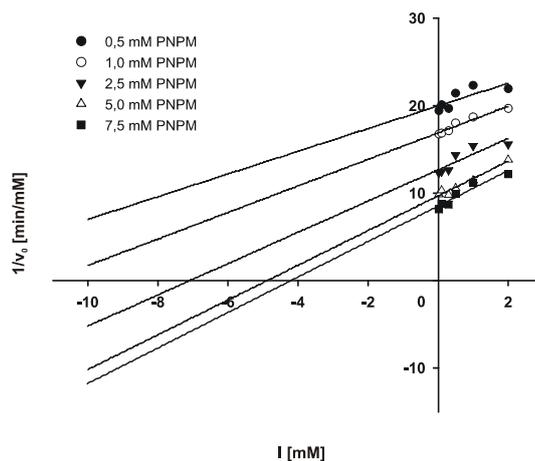


Abb. 54: Dixon-Diagramm der Umsetzung von *p*-Nitrophenyl- α -D-maltosid (PNPM) durch α -Amylase in Gegenwart verschiedener (+)-Catechin-Konzentrationen

Die berechneten K_i -Werte lagen stets höher als der Wert der Michaelis-Menten-Konstante und deuten analog dem α -Glucosidase-Assay auf eine Gleichgewichtsverschiebung zugunsten des ES-Komplexes hin (s. Tab. 12, S. 60). Aspalathin wies dabei den geringsten K_i -Wert und damit die stärkste Bindung zum ES-Komplex unter den Polyphenolen auf (9,5fach höher als K_m), dicht gefolgt von Isoquercitrin, dessen K_i das 10fache des K_m -Werts betrug. (+)-Catechin wies die schwächste Bindung zum Enzym auf (16,6fach).

3.2.1.3 Enzymassay Saccharase

Die Bestimmung der Saccharase-Aktivität (EC 3.2.1.26) und deren Beeinflussung durch die Anwesenheit der Polyphenole gestaltete sich schwierig, da die Hydrolyseprodukte Glucose und Fructose des Substrats Saccharose nicht direkt bestimmt werden können. In der Literatur sind eine Vielzahl an Nachweis- und Bestimmungsmethoden der Saccharase-Aktivität beschrieben. So wird der Nachweis über die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH) [94] oder via Glucose Oxidase geführt [95]. Diese Methoden sind jedoch nicht nur kostenintensiv, sondern erfordern den Einsatz weiterer Enzyme, die zu einer Kaskade von Reaktionen führen und dadurch die direkte Verfolgbarkeit des Polyphenol-Einflusses auf die Saccharase-Aktivität erschweren. Zudem kann eine inhibitorische Wirkung auf die zusätzlichen Enzyme nicht ausgeschlossen werden.

Weitere Analysenmethoden wie die Somogyi-Nelson-Methode [96, 97], deren Modifikation durch Hatanaka *et al.* [98], sowie die Reaktion mit Dinitrosalicylsäure (DNS)-Reagenz [26, 28] konnten ebenfalls keine Anwendung finden, da Aspalathin aufgrund seiner starken Reduktionswirkung direkt mit dem jeweiligen Assay-Reagenz reagierte.

Die Bestimmung der Saccharase-Aktivität musste demnach unter Ausschluss zusätzlicher Enzyme sowie redoxanfälliger Assay-Reagenzien erfolgen. Aus diesen Gründen wurde der gaschromatographische Nachweis des während der enzymatischen Hydrolyse freigesetzten Monosaccharids D-Fructose (vgl. 2.6.3, S. 34) gewählt. Zur Detektion wurde die Oximierung mit Hydroxylamin und die anschließende Silylierung als Methode der Wahl herangezogen (Abb. 55) [99].

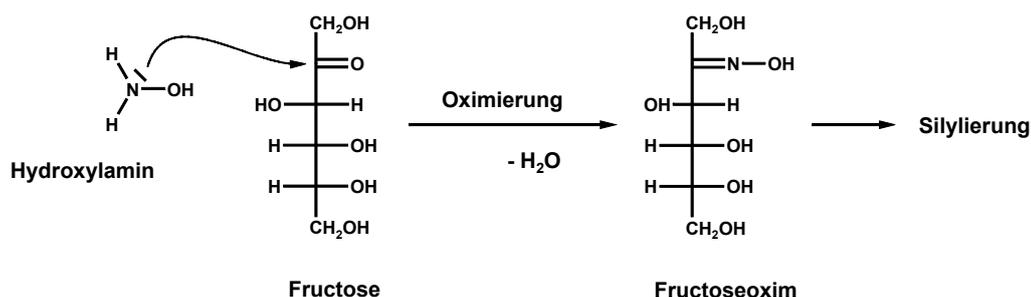


Abb. 55: Oximierung der während der Hydrolyse freigesetzten D-Fructose [99]

Unter Zuhilfenahme der Lineweaver-Burk-Auftragung wurden die Michaelis-Menten-Konstante $K_m = 44,6611 \text{ mM}$ und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max} = 0,5488 \text{ mM/min}$ bei $[S] = 100 \text{ mM}$ bestimmt.

In den Geschwindigkeits-Konzentrations-Diagrammen (S versus v_0) konnten reversible inhibitorische Fähigkeiten der untersuchten Polyphenole auf die Saccharase-Aktivität festgestellt werden (s. Anhang, Abb. 103, S. 142). Die Anwesenheit der Polyphenole

führte zu einer verminderten Freisetzung von Fructose, wobei sich (+)-Catechin mit einem IC_{50} -Wert von 17,2857 mM (s. Tab. 12, S. 60) als stärkster Inhibitor herausstellte. Isoquercitrin und vor allem Aspalathin zeigten im Gegensatz dazu eine schwächere Inhibitorwirkung (1,6 bzw. 3,0fach höherer IC_{50} -Wert).

Die doppelt-reziproke Darstellung zeigte für alle drei Polyphenole identische Kurvenverläufe, deren Linien sich typisch für einen kompetitiven Inhibierungstyp in einem Punkt auf der vertikalen $1/v_0$ -Achse schneiden (Abb. 56).

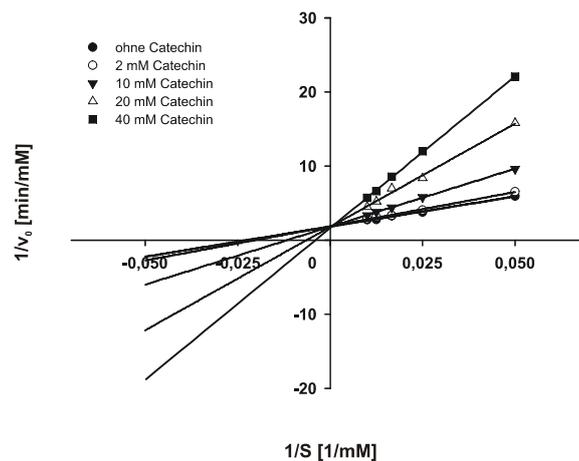


Abb. 56: Lineweaver-Burk-Diagramm der kompetitiven Hemmung von Saccharase durch (+)-Catechin

Die Kurven in der Dixon-Auftragung zeigten einen Schnittpunkt in einem einzigen Punkt links der vertikalen $1/v_0$ -Achse (Abb. 57). Dieser Verlauf unterstreicht die Erkenntnisse aus der Lineweaver-Burk-Auftragung, da dieser ebenfalls auf eine kompetitive Hemmung deutete.

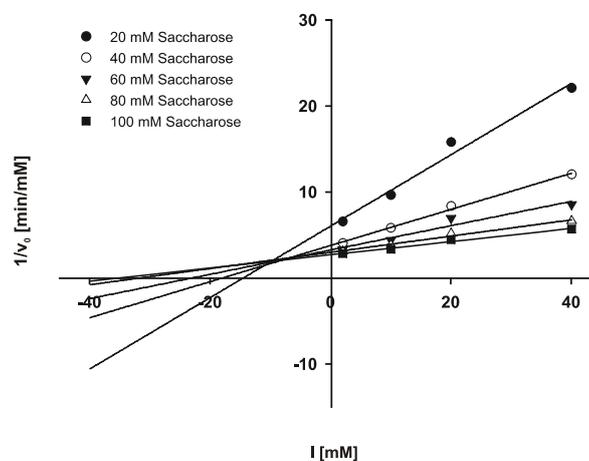


Abb. 57: Dixon-Diagramm der Umsetzung von Saccharose durch Saccharase in Gegenwart verschiedener (+)-Catechin-Konzentrationen

Für alle drei untersuchten Polyphenole lagen die K_i -Werte unter dem K_m -Wert (s. Tab. 12, S. 60) und bewiesen damit eine stärkere Bindung zum Enzym als das in direkter Konkurrenz um die Bindungsstelle stehende Substrat. Die Affinität des Enzyms zu den Polyphenolen war 1,7fach (Aspalathin $K_i = 25,6472$ mM) bis zu 4,3fach ((+)-Catechin $K_i = 10,3133$ mM) stärker als zur Saccharose.

3.2.2 Enzyminhibierung durch Rooibostee-Polyphenole *in vivo*

3.2.2.1 Postprandiale Blutglucoseantwort der Saccharose-Versuchsreihe

Die postprandiale Blutglucoseantwort beschreibt die Glucosekonzentration im Blut nach der Nahrungsaufnahme und kann indirekt Rückschlüsse auf die Enzymaktivitäten im Dünndarm geben. Daher wurde eine potenzielle Hemmwirkung der polyphenolischen Verbindungen auf die Saccharaseaktivität der Ratten zunächst indirekt über die Messung der postprandialen Blutglucoseantwort nach der Verabreichung von Saccharose untersucht (Abb. 58; s. Anhang, Tab. 44, S. 144f.).

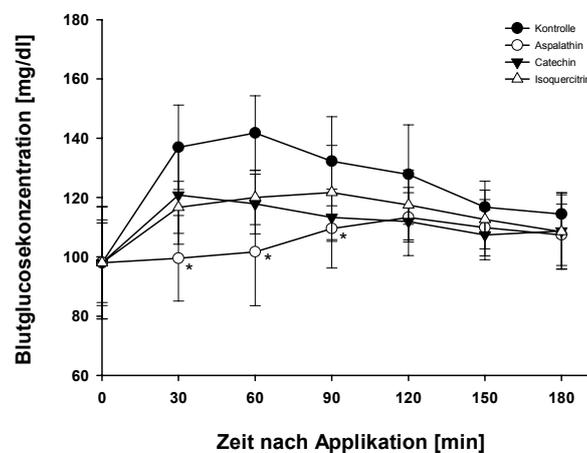


Abb. 58: Einfluss der Polyphenole auf die postprandiale Blutglucoseantwort nach der Verabreichung von Saccharose (Die Signifikanz des Unterschiedes zur Kontroll-Gruppe ist gekennzeichnet als * $P < 0,001$.)

Der Kurvenverlauf der Kontrollgruppe war gekennzeichnet durch einen schnellen und steilen Anstieg der Blutglucosekonzentration innerhalb der ersten 60 Minuten von $98,0 \pm 14,4$ mg/dl auf $141,7 \pm 12,6$ mg/dl. Anschließend sinkt der Blutglucosespiegel wieder ab, fällt jedoch innerhalb der 180 min nicht unter den Anfangswert zurück. Dieser Ablauf entspricht den Erwartungen einer typischen Blutglucoseantwort nach Applikation von Saccharose [100].

Die Zugabe von 10 % Aspalathin unterdrückte signifikant den Anstieg des Blutglucose-spiegels und erzielte mit nur $113,3 \pm 8,3$ mg/dl den geringsten Anstieg der gesamten Versuchsreihe. Die extrem abgeflacht verlaufende Blutglucosekurve deutet auf eine starke Inhibierung der Saccharase durch Aspalathin hin. Der Zusatz von (+)-Catechin übte einen geringeren Einfluss auf die Blutglucosekonzentration aus, erreichte jedoch bereits nach 30 min ihr Maximum ($120,8 \pm 16,6$ mg/dl) und fiel nach 60 min auf ein Plateau bei 110 mg/dl ab. Isoquercitrin zeigte einen stark verlangsamten Anstieg der Blutglucosekonzentration bis 90 min auf $121,7 \pm 15,9$ mg/dl ohne den Anfangswert nach 180 min zu erreichen. Die Kurvenverläufe der zugesetzten Polyphenole sind kennzeichnend für eine verzögerte Resorption der Saccharose.

Der statistische Vergleich der Blutglucosekonzentrationen nach 30 min, 60 min und 90 min belegt einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und Aspalathin-Gruppe ($P < 0,001$). Zudem ist bei 30 min und 60 min sogar ein signifikanter Unterschied der Aspalathin-Gruppe zur (+)-Catechin-Gruppe ($P < 0,001$) sowie bei 30 min, 60 min und 90 min zur Isoquercitrin-Gruppe ($P < 0,001$) zu verzeichnen.

In Abb. 59 sind die Flächen unter den Blutglucosekurven (IAUC) dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die IAUC der Saccharose-Kontrollgruppe zu allen Zeitpunkten den größten IAUC-Wert besaß (s. Anhang, Tab. 46, S. 148).

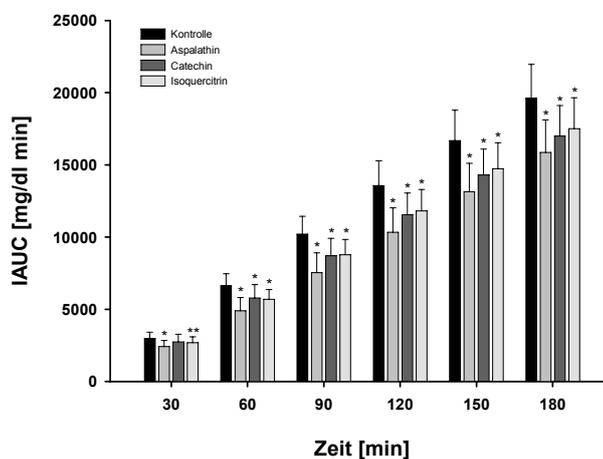


Abb. 59: Einfluss der Polyphenole auf die Flächen unter den Blutglucoseantwortkurven (IAUC) nach der Applikation von Saccharose (Die Signifikanz des Unterschiedes zur Kontroll-Gruppe ist gekennzeichnet als * $P < 0,001$, ** $P < 0,05$.)

Die Aspalathin-Gruppe hingegen wies im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zu jeder Zeit eine signifikante Reduktion der Flächen unter den Blutglucosekurven auf ($P < 0,001$) und zeigte im Vergleich zu den anderen Versuchsreihen die geringsten Flächen auf. Nach 120 min lag eine Reduktion der Fläche von 24 % gegenüber der Kontrollgruppe vor. Für

Untersuchungen dieser Art wird häufig die IAUC nach 120 Minuten als Vergleichspunkt herangezogen. Auch die (+)-Catechin- (15 %) und Isoquercitrin-Gruppen (13 %) zeigten deutliche Unterschiede zur Kontrollgruppe, aber in deutlich geringerem Ausmaß als die Aspalathin-Gruppe. Tab. 13 stellt die Reduktion der Flächen unter den Blutglucoseantwortkurven der Testgruppen in % bezogen auf 100 % Saccharose-Kontrolle zu allen Zeitpunkten sowie deren Mittelwert dar.

Tab. 13: Reduktion der Flächen unter den Blutglucoseantwortkurven in % bezogen auf 100 % Saccharose-Kontrolle

	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	Ø
Aspalathin	19	26	26	24	21	19	23
(+)-Catechin	8	13	15	15	14	13	13
Isoquercitrin	10	14	14	13	12	11	12

3.2.2.2 Postprandiale Blutglucoseantwort der Stärke-Versuchsreihe

Der Einfluss der Polyphenole auf die postprandiale Blutglucoseantwort nach der Verabreichung von Stärke wurde ebenfalls bestimmt (s. Anhang, Tab. 45, S. 146f.).

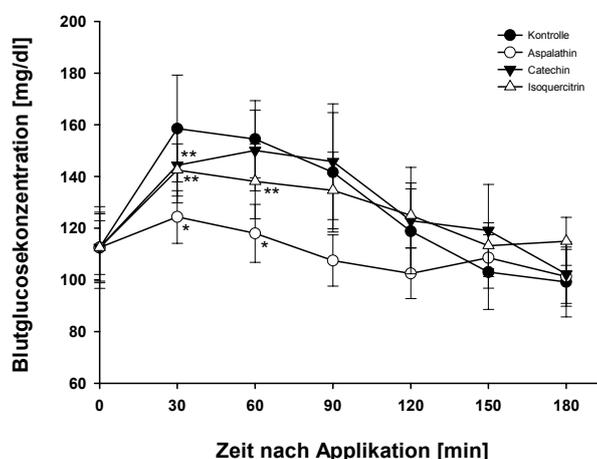


Abb. 60: Einfluss der Polyphenole auf die postprandiale Blutglucoseantwort nach der Verabreichung von Stärke (Die Signifikanz des Unterschiedes zur Kontroll-Gruppe ist gekennzeichnet als * $P < 0,001$, ** $P < 0,05$.)

Wie in Abb. 60 ersichtlich unterliegt der Kurvenverlauf der Kontrollgruppe innerhalb der ersten 30 Minuten einem sehr schnellen und steilen Anstieg der Blutglucosekonzentration von $112,5 \pm 15,8$ mg/dl auf $158,6 \pm 20,7$ mg/dl. Im weiteren Verlauf der Messungen fällt der Blutglucosespiegel infolge der Insulinsekretion unter den Nüchternblutglucosewert auf $99,2 \pm 13,5$ mg/dl zurück.

Die Supplementierung von Aspalathin führte wie bereits bei der Saccharose-Versuchsreihe zu einer ausgesprochen stark abgeflachten Blutglucosekurve mit einem Anstieg der Blutglucosekonzentration von $112,5 \pm 13,7$ mg/dl auf lediglich $124,3 \pm 10,2$ mg/dl in den ersten 30 Minuten. Dieser Wert stellte das niedrigste Blutglucosemaximum der gesamten Stärke-Versuchsreihe dar. Nach dieser leichten Erhöhung fiel die Blutglucosekonzentration sofort auf das Anfangsniveau zurück und erreichte ein Plateau bei 100 mg/dl. Der kaum zu verzeichnende Anstieg der Blutglucosekurve deutet auf eine deutlich verzögerte Spaltung der Stärke und somit stark verlangsamter Freisetzung der Einfachzucker durch Aspalathin hin. Auch der Zusatz von (+)-Catechin (Maximum bei 60 min: $150,0 \pm 15,6$ mg/dl) und Isoquercitrin (Maximum bei 30 min: $142,5 \pm 10,1$ mg/dl) deutete auf eine verzögerte Stärke-Resorption hin, wenngleich die Suppression des Blutglucoseanstiegs geringer als bei Aspalathin ausfällt.

Die statistische Untersuchung der Blutglucosekonzentrationen zeigte für die Aspalathin-Gruppe signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe zu den Zeitpunkten 30 min, 60 min ($P < 0,001$) und 90 min ($P < 0,05$). Die Blutglucoseantwort für Isoquercitrin lag bei 30 min und 60 min ebenfalls signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe ($P < 0,05$). Sogar (+)-Catechin übte eine signifikante Reduktion auf den postprandialen Blutglucosespiegel bei 30 min im Vergleich zur Kontrollgruppe aus ($P < 0,05$).

Die Auftragung der Flächen unter den Blutglucosekurven aller Testgruppen des Stärkeversuchs zu den unterschiedlichen Zeitpunkten bestätigt, dass die IAUC der Kontrollgruppe nach Applikation der Schlundlösungen zu allen Zeitpunkten den größten Wert besaß (Abb. 61, s. Anhang, Tab. 47, S. 148).

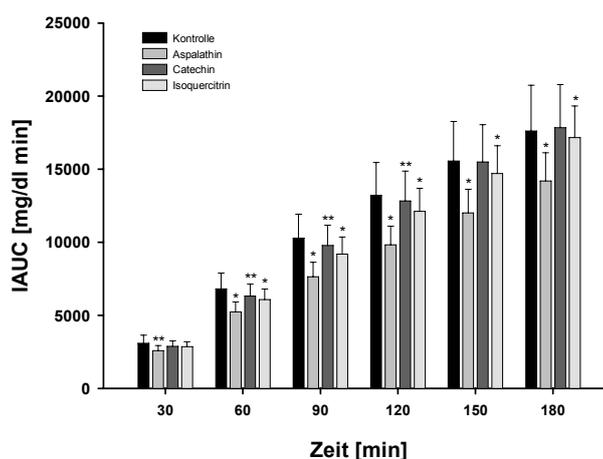


Abb. 61: Einfluss der Polyphenole auf die Flächen unter den Blutglucoseantwortkurven (IAUC) nach der Applikation von Stärke (Die Signifikanz des Unterschiedes zur Kontroll-Gruppe ist gekennzeichnet als * $P < 0,001$, ** $P < 0,01$.)

Die Aspalathin-Gruppe hingegen zeigte mit einer Reduktion der Fläche um 26 % bei 120 Minuten die mit Abstand geringsten Flächenwerte auf (Tab. 14).

Auch die (+)-Catechin- und Isoquercitrin-Gruppen konnten die Flächen unter der Blutglucoseantwortkurve reduzieren, allerdings fiel der Unterschied zur Kontrollgruppe mit 3 bzw. 8 % wesentlich geringer aus.

Tab. 14: Reduktion der Flächen unter den Blutglucoseantwortkurven in % bezogen auf 100 % Stärke-Kontrolle

	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min	Ø
Aspalathin	17	23	26	26	23	20	23
(+)-Catechin	7	7	5	3	1	(-1)	4
Isoquercitrin	8	11	11	8	5	3	8

3.2.2.3 Enzymassay Saccharase

Für die Untersuchung der Saccharase-Aktivität wurde die Nachweisreaktion mit 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS) verwendet. Dabei werden die bei der hydrolytischen Spaltung der Saccharose (Sac) entstandenen Einfachzucker Glucose (Glu) und Fructose (Fru) mit DNS-Reagenz (orange-gelb) quantitativ bestimmt, indem die reduzierenden Zucker eine der beiden Nitrogruppen des Reagenzes reduzieren und dabei selbst zur entsprechenden D-Gluconsäure oxidiert werden. Die Messung der Extinktion des reduzierten Reagenzes (rot) erfolgt photometrisch bei 540 nm (Abb. 62) [26].

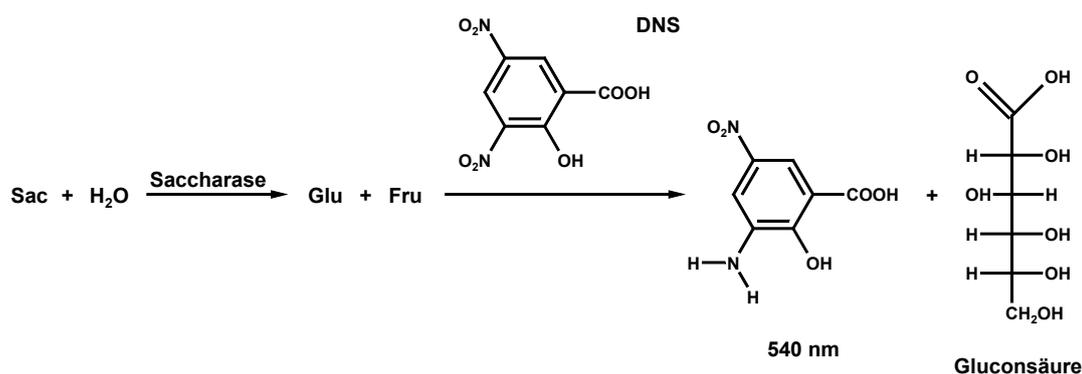


Abb. 62: Nachweisreaktion von Saccharase mit DNS-Reagenz [26]

Mit Hilfe der Methode nach Bradford wurde das Gesamtprotein der jeweiligen Proben bestimmt, um die erhaltenen Messwerte einheitlich auf den Proteingehalt beziehen zu können. Die Proteinbestimmung nach Bradford ist eine der am häufigsten verwendeten

colorimetrischen Methoden zur Konzentrationsbestimmung von löslichen Proteinen. Durch eine Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine in saurer Lösung wird eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm hervorgerufen. Die Farbreaktion ist abhängig vom Gehalt an aromatischen und basischen Aminosäuren, so dass unterschiedliche Proteine zu leicht abweichenden Ergebnissen führen können [101, 102].

Die Versuchstiere wurden 60 Minuten nach Verabreichung der Schlundlösungen dekapitiert, der Dünndarm von proximal nach distal in fünf Segmente unterteilt und die Saccharase-Aktivität entsprechend o.g. Methode bestimmt (Kalibrierungen s. Anhang, S. 148f.). Die Wahl des Tötungszeitpunktes erfolgte zum einen basierend auf Literaturangaben [28] und zum anderen aufgrund der vorherigen Studienergebnisse (vgl. 3.2.2.1), die verdeutlichten, dass zu diesem Zeitpunkt das Maximum der Blutglucosekonzentration erreicht und demnach die höchste Saccharase-Aktivität zu erwarten ist. In Abb. 63 sind die ermittelten Enzymaktivitäten der einzelnen Dünndarmsegmente schematisch dargestellt (s. Anhang, Tab. 48, S. 149f.).

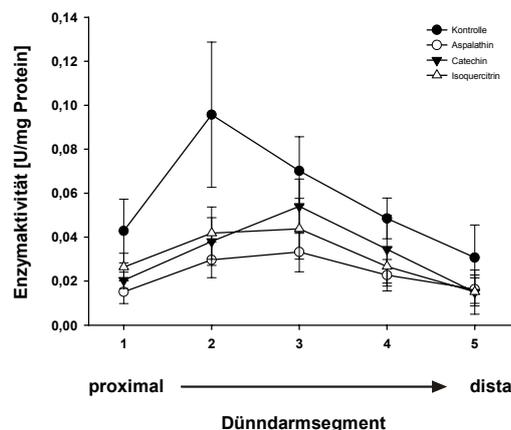


Abb. 63: Auswirkung der Polyphenole auf die Saccharaseaktivität entlang der Dünndarmsegmente

Die Kontrollgruppe wies die mit Abstand höchsten Enzymaktivitäten auf, deren Maximalwert $0,096 \pm 0,033$ U/mg sich im proximalen zweiten Segment (Bereich des Jejunums) befand. Die Aktivität nahm zum distalen Ende hin ab. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe entsprechen den auf Literaturrecherche basierenden Erwartungen [103].

Die Verabreichung der Polyphenole zeigte deutliche Einflüsse auf die Saccharase-Aktivität innerhalb eines jeden Segmentes. Für alle Inhibitoren wurden geringere Werte in den Segmenten ermittelt und das Maximum der Enzymaktivität erst im dritten Dünndarm-Abschnitt erreicht. Aspalathin stellte sich wiederum als stärkster Inhibitor heraus, indem die maximale Enzymaktivität in der Aspalathin-Gruppe nur ein Drittel der Kontrollgruppe

betrug ($0,033 \pm 0,009$ U/mg). Isoquercitrin senkte die Saccharase-Aktivität um die Hälfte ($0,044 \pm 0,014$ U/mg) und auch (+)-Catechin bewirkte eine verringerte Enzymaktivität ($0,054 \pm 0,012$ U/mg). Die Ergebnisse der direkten Aktivitätsbestimmung der Saccharase bei Zugabe der Inhibitoren bestätigen somit die Resultate der Messung der postprandialen Blutglucoseantwort. In beiden Testreihen erwies sich Aspalathin als stärkster Inhibitor der Enzymaktivität. (+)-Catechin und Isoquercitrin übten eine schwächere, aber immer noch deutliche Hemmwirkung aus.

3.2.2.4 Enzymassay α -Amylase

Die Bestimmung der α -Amylase-Aktivität erfolgte über eine modifizierte Willstätter-Schudel-Methode [104]. Dabei werden die aus dem Abbau der Stärke freigesetzten reduzierenden Einfachzucker mit Iod in alkalischer Lösung bestimmt (Abb. 64).

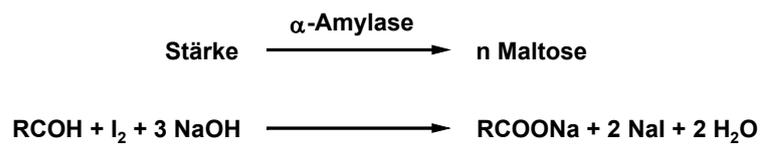


Abb. 64: Nachweisreaktionen des α -Amylase-Assays [104]

Die Fähigkeit des Hypiodits zur Oxidation von Aldosen macht eine iodometrische Bestimmung möglich. So wird der reduzierend wirkende Einfachzucker zu seiner D-Gluconsäure oxidiert. Der Iodüberschuss wird mit einer Natriumthiosulfatlösung zurücktitriert.

Zur Ermittlung der α -Amylase-Aktivität im Dünndarm wurden die Versuchstiere 30 Minuten nach Applikation der Schlundlösungen dekapitiert, das Enzym aus dem Dünndarmchymus extrahiert und die Aktivität mit Hilfe der o.g. Methode bestimmt. Der Zeitpunkt der Tötung wurde anhand der Untersuchungsergebnisse der postprandialen Blutglucoseantwort gewählt (vgl. 3.2.2.2). Die Blutglucosekonzentration der Kontrollgruppe erreichte bei 30 Minuten ihr Maximum und indizierte daher die höchste α -Amylase-Aktivität zu diesem Zeitpunkt. Unterstützt wurde diese Entscheidung durch recherchierte Literaturangaben, die ebenfalls einen Tötungszeitpunkt von 30 Minuten nach Applikation der Schlundlösungen beschreiben [28, 105].

Das Balkendiagramm in Abb. 65 zeigt eine α -Amylase-Aktivität der Kontrollgruppe von $5,8 \pm 1,2$ U/mg. Im Gegensatz zum nachgewiesenen verminderten postprandialen Blutglucoseanstieg konnten keine inhibitorischen Einflüsse der Polyphenole bei der direkten Aktivitätsbestimmung festgestellt werden (s. Anhang, Tab. 49, S. 151).

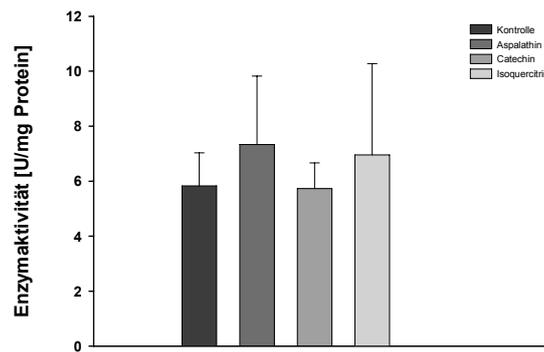


Abb. 65: Auswirkung der Polyphenole auf die α -Amylaseaktivität in den Dünndarmsegmenten

Die (+)-Catechin-Versuchsreihe ergab mit $5,7 \pm 0,9$ U/mg eine vergleichbare Enzymaktivität zur Kontrollgruppe, wohingegen Aspalathin ($7,3 \pm 2,5$ U/mg) und Isoquercitrin ($7,0 \pm 3,3$ U/mg) eine scheinbar erhöhte α -Amylase-Aktivität bewirken. Die Ergebnisse dieser Studie sind zudem bezüglich der hohen Standardabweichungen von bis zu 3,3 U/mg als kritisch zu betrachten.

Die anschließende Ursachenforschung führte zu einer Vielzahl an Gründen, um dieses unerwartete Ergebnis zu erklären. So kann zum einen der Tötungszeitpunkt trotz gründlicher Literaturrecherche zu früh gewählt worden sein und die mögliche Suppression der Enzymaktivität zu einem späteren Zeitpunkt stattgefunden haben. Zum anderen kann die Stärkezusammensetzung in Bezug auf das Verhältnis von Amylose zu Amylopektin im Vergleich zum vorherigen Versuch ein anderes gewesen sein und somit die Verdauung und Resorption beeinflusst haben [90]. Ebenso können der Retrogradationsgrad der Stärke sowie das Ausmaß der Hydratisierung einen Einfluss auf die Resorption ausüben.

3.2.3 Mechanismus der Enzyminhibierung durch Polyphenole

3.2.3.1 Struktur-Aktivitäts-Wechselwirkungsbeziehungen der α -Glucosidase

α -Glucosidase aus *Saccharomyces cerevisiae* besitzt in ihrem aktiven Zentrum Asp214 und Glu276 als Nucleophil bzw. Protonendonator. Zudem fungiert Asp349 als Stabilisierer der Übergangszustände.

Die kinetischen Studien allerdings ergaben, dass alle drei untersuchten Polyphenole einen unkompetitiven Inhibierungstyp aufweisen und somit das Enzym nicht direkt am aktiven Zentrum angreifen, sondern eine Bindung zum Enzym-Substrat-Komplex eingehen. Deutlich wird dieser Umstand bei Betrachtung des entsprechenden Geschwindigkeits-Konzentrations-Diagrammes (s. Abb. 50, S. 59). Dieses weist einen langsamen Anstieg der Hyperbeln bei niedrigen Substratkonzentrationen auf, da der

Enzym-Substrat-Komplex zunächst gebildet werden muss. Zudem wurde für die polyphenolischen Strukturen eine reversible Inhibierung der α -Glucosidase identifiziert und gibt daher Hinweise auf einen nicht-kovalenten Mechanismus. Dieser hemmt die Enzymaktivität durch die Bildung von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen nicht im aktiven Zentrum liegenden Aminosäuren des Enzyms und Funktionalitäten des Inhibitors [106]. Lo Piparo *et al.* unterstützen diese These und beschreiben vielmehr Hydroxylfunktionen, die für die inhibitorische Wirkung von Flavonoiden entscheidend sind (Abb. 66) [107].

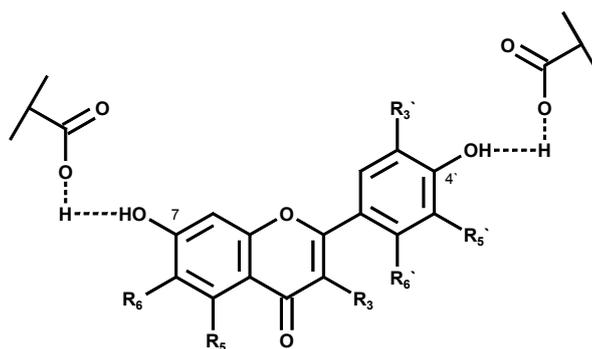


Abb. 66: Bevorzugte Hydroxylfunktionen der Polyphenole für die Interaktion mit den Aminosäureseitenketten der α -Amylase [107]

Im Besonderen sind laut Lo Piparo die OH-Gruppen an Position C7 des A-Rings sowie an Position C4' des B-Rings für die Bildung der Wasserstoff-Brückenbindungen verantwortlich. Die dadurch hervorgerufene Konfigurationsänderung des Enzyms führt zu dessen Inhibierung. Weitere OH-Gruppen können ebenso Wasserstoff-Brückenbindungen ausbilden, sind jedoch von niedrigerer Bedeutung für die Inhibitorwirkung [107].

Sowohl Aspalathin, (+)-Catechin als auch Isoquercitrin weisen OH-Funktionen an den Positionen C7 und C4' auf. Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeit ist laut der o.g. Theorie eine vergleichbare Inhibitorwirkung zu erwarten. In der Literatur jedoch werden den Aglykonen der Flavonole aufgrund ihrer 2,3-Doppelbindung und CO-Gruppe an C4 die stärkste Inhibitorwirkung zugeschrieben [89]. Die Versuche zeigten allerdings, dass das Aglycon (+)-Catechin die mit Abstand stärkste Hemmwirkung unter den Polyphenolen besitzt. Das Flavonol-Glycosid Isoquercitrin und Aspalathin hemmten das Enzym hingegen nur schwach. Die geringe Hemmwirkung könnte demnach in dem Zuckerrest begründet liegen, der durch eine sterische Behinderung die Bildung der Wasserstoff-Brückenbindungen unterbindet.

Schlussendlich muss festgestellt werden, dass für eine abschließende Aussage zu den Struktur-Aktivitäts-Wechselwirkungsbeziehungen zu wenige Untersuchungsdaten innerhalb dieser Studie vorliegen.

3.2.3.2 Struktur-Aktivitäts-Wechselwirkungsbeziehungen der α -Amylase

α -Amylase aus dem Schweinepankreas enthält im aktiven Zentrum die für die hydrolytische Wirksamkeit entscheidenden Aminosäurereste Asp212 und Glu248 sowie Asp315 als Stabilisierer des Übergangszustandes.

In den kinetischen Studien zeigten alle drei untersuchten Polyphenole eine reversible unkompetitive Hemmung der α -Amylase und lassen daher den Schluss zu, dass der ablaufende Inhibierungsmechanismus analog dem bei der α -Glucosidase ist. (+)-Catechin zeigte in Übereinstimmung mit der Literatur, die die Hemmwirkung verschiedener Catechine und Theaflavine untersuchte, die geringste inhibitorische Fähigkeit auf die α -Amylase [25]. Bestätigt wurde dies durch den hohen K_i -Wert, der eine schwache Affinität zum Enzym ausdrückte. Entgegen der bisherigen Studien, die Isoquercitrin auch bei der α -Amylase eine hohe Inhibitorwirkung zuschreiben, konnte in den Untersuchungen nur eine schwache Hemmwirkung nachgewiesen werden [89]. Aspalathin inhibierte die α -Amylase-Aktivität in starkem Maße und lässt daher einen besonderen Einfluss der Dihydrochalcon-Struktur bei der Inhibierung vermuten.

3.2.3.3 Struktur-Aktivitäts-Wechselwirkungsbeziehungen der Saccharase

Die hydrolytische Wirkung der Saccharase aus *Saccharomyces cerevisiae* beruht auf den Aminosäureresten Asp42 und Glu223 des aktiven Zentrums im Zusammenspiel mit Asp171 als substratbindende Aminosäure.

Die Polyphenole Aspalathin, (+)-Catechin und Isoquercitrin übten eine kompetitive Hemmung auf die Saccharase aus. Bei diesem Inhibierungstyp konkurriert der Inhibitor mit dem Substrat um die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms. Eine gleichzeitige Bindung beider Moleküle ist nicht möglich. In den meisten Fällen besitzen der Inhibitor und das Substrat ähnliche strukturelle Eigenschaften. Allerdings kann eine strukturelle Analogie zwischen dem Substrat Saccharose und den Polyphenolen ausgeschlossen werden, da das Enzym für die katalytische Wirksamkeit einen terminalen β -D-Fructofuranosyl-Rest verlangt [108]. Daher scheinen die Zuckerreste des Aspalathins und Isoquercitrins keinen Einfluss bei der Inhibierung auszuüben. Aufgründessen liegt die Vermutung nahe, dass der Bindungsmechanismus der Inhibitoren ein anderer als bei der Substratbindung sein muss. Da die Inhibierung der Saccharase-Aktivität durch die Polyphenole wiederum reversibel abläuft, ist auch hier die Bildung von Wasserstoff-Brückenbindungen zwischen den OH-Funktionen der Inhibitoren und den katalytischen Aminosäureresten am wahrscheinlichsten. Als Folge verhindern diese nicht-kovalenten Verknüpfungen die Bindung des Substrates und somit die hydrolytische Wirksamkeit des

Enzyms. Alle drei Inhibitoren zeigten eine größere Affinität zum Enzym als das Substrat ($K_i < K_m$).

3.2.4 Vergleich der Inhibierung *in vitro* und *in vivo*

Die Inhibitorwirkung der Polyphenole auf die α -Glucosidase-Aktivität wurde ausschließlich *in vitro* untersucht, so dass eine Übertragung und Einschätzung der Hemmwirkungen *in vivo* nicht vorgenommen werden kann. Ein direkter Vergleich der *in vitro*-/ *in vivo*-Untersuchungen ist nur für die α -Amylase und Saccharase möglich.

Unter den eingesetzten Polyphenolen zeigte Aspalathin *in vitro* sowie bei der Bestimmung der postprandialen Blutglucoseantwort den stärksten suppressiven Effekt auf die α -Amylase-Aktivität. Diese Ergebnisse widerlegen Literaturangaben, die Aspalathin die Fähigkeit, α -Amylase zu inhibieren, absprechen [16]. Mit den vorliegenden Untersuchungen ist die Inhibitorwirkung von Aspalathin auf die α -Amylase eindeutig belegt, auch wenn die direkte Aktivitätsbestimmung *in vivo* aus verschiedenen Gründen ohne Ergebnis verlief. (+)-Catechin und Isoquercitrin wiesen *in vitro* und *in vivo* ebenfalls eine Hemmwirkung auf die α -Amylase-Aktivität auf, die im Vergleich zu Aspalathin jedoch schwächer ausfiel.

Die *in vitro* Untersuchungen des Einflusses der Polyphenole auf die Saccharase-Aktivität stellten (+)-Catechin und Isoquercitrin als stärkste Inhibitoren heraus, während Aspalathin eine schwache Hemmwirkung auszeichnete. Im Gegensatz dazu zeigte Aspalathin in den *in vivo* Studien die stärkste Hemmwirkung unter den Polyphenolen. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz kann die unterschiedliche Herkunft der Saccharase liefern. So wurde eine Saccharase Spezies aus der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) für die *in vitro* Studien mit der Saccharase aus dem Dünndarm der Ratte verglichen. Für eine mögliche Humananwendung sind dementsprechend die *in vivo* Ergebnisse, bei denen sich Aspalathin als stärkster Inhibitor herausstellte, zu bewerten.

Zur Einschätzung der vorliegenden Resultate ist ebenfalls das Vorkommen der untersuchten Polyphenole im Grünen Rooibostee von Bedeutung. So zeigen (+)-Catechin und Isoquercitrin durchaus potenzielle inhibitorische Eigenschaften auf die Enzymaktivitäten des Kohlenhydratstoffwechsels. Dennoch fällt Aspalathin aufgrund des hohen Vorkommens (50 mg/kg) eine Schlüsselrolle bei den Betrachtungen der antihyperglycämischen Eigenschaften zu.

4 Zusammenfassung

Rooibostee wird als unfermentierte oder fermentierte Variante konsumiert. Neben dem Unterschied in Zusammensetzung und Gehalt der Polyphenole ist vor allem die Farbgebung zwischen den beiden Varianten auffällig. Während der Fermentation verändert sich die Farbe des Pflanzenmaterials von grün nach rotbraun. Hauptverantwortlich für den Farbwechsel ist das Dihydrochalcon Aspalathin, dessen nicht-enzymatischer oxidativer Abbau zur Bildung der Bräunungsstrukturen führt. Diskrete Strukturen wurden bislang allerdings noch nicht beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, die die Bildungsmechanismen und Strukturen der farbigen Verbindungen aufklären sollten. Dazu wurde authentisches Aspalathin inkubiert und mittels HPLC-DAD untersucht. In den Modellansätzen konnten reaktive farblose Intermediate als diskrete Signale detektiert werden. Diese wurden mit Hilfe der Multilayer Countercurrent Chromatographie sowie präparativer HPLC isoliert. Die abschließende Aufklärung mit 1D- und 2D-Kernresonanzspektroskopie (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC) und hochauflösender Massenspektrometrie bestätigte die drei Verbindungen erstmals als Aspalathin-Dimere, die über eine einfache bzw. zweifache Oxidation miteinander verknüpft sind. Ein plausibler Reaktionsmechanismus zur Bildung der Strukturen wurde in der vorliegenden Arbeit postuliert. So erklärt sich die Bildung der Aspalathin-Dimere über den Mechanismus der oxidativen Kupplung, der auch bei der enzymatischen Bräunung von Schwarzem Tee eine bedeutende Rolle spielt. Der Nachweis der Bildung des zweifach oxidierten Dimers aus den jeweils einfach oxidierten Atropisomeren wurde experimentell erbracht.

Ein weiterer Abbauweg von Aspalathin, der sich aus den Modellinkubationen erschloss, stellte die Bildung von 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure (trivial: Dihydrokaffeesäure) durch hydrolytische Spaltung der Ausgangsverbindung dar. Im weiteren Inkubationsverlauf bildete Dihydrokaffeesäure wiederum über den Mechanismus der oxidativen Kupplung Folgeverbindungen mit Aspalathin aus. Da diese bisher nicht im fermentierten Rooibostee nachgewiesen werden konnten, handelt es sich vermutlich um Intermediate des Aspalathin-Abbaus.

In den Aspalathin-Modellinkubationen wurden zudem erstmalig zwei diskrete Signale mit einem Absorptionsmaximum bei 430 nm detektiert. Die Isolierung mittels MLCCC und präparativer HPLC aus dem Inkubationsansatz führte zu authentischem Material. Die anschließende hochauflösende Massenspektrometrie lieferte für beide Verbindungen identische Massen und ließ daher die Vermutung zu, dass es sich bei den Zielstrukturen

um isomere Verbindungen handelt. Aufgrund der Instabilität der isolierten Verbindungen wurden diese für die finale Strukturaufklärung durch Reaktion mit OPD in ihre entsprechenden Chinoxaline überführt. Die NMR-Experimente identifizierten die beiden farbigen Strukturen als niedermolekulare Verbindungen mit einem Dibenzofuran-Grundgerüst, deren Name gemäß IUPAC (*S*)- und (*R*)-3-(7,9-Di-hydroxy-2,3-dioxo-6- β -D-glucopyranosyl-3,4-dihydrodibenzo[*b,d*]furan-4a(2*H*)-yl)-propionsäure) lautet. Zwei weitere farblose Strukturen konnten in den Inkubationen als deren unmittelbare mechanistische Vorläuferstrukturen aufgeklärt werden und untermauerten den postulierten Bildungsmechanismus. Zur Einschätzung des Beitrags der beiden farbigen Verbindungen zur Gesamtfarbe wurde das Konzept der Farbverdünnungsanalyse angewendet. Die Analyse zeigte, dass die Dibenzofurane bei Konzentrationsmaximum mit 15 bzw. 18 % zur Gesamtfarbe beitragen und belegte die Verbindungen damit als Schlüsselchromophore der Aspalathin-Modellinkubationen. Auch wenn die beiden farbigen Verbindungen im weiteren Inkubationsverlauf zu unbekannt stabilere tannin-ähnlichen Strukturen abgebaut werden, wird ihre mechanistische Bedeutung für die Farbbildung durch den Nachweis ihrer Chinoxaline in handelsüblichem fermentierten Rooibostee unterstrichen. Damit ist es mit vorliegender Arbeit erstmals gelungen, farbige Verbindungen aus fermentiertem Rooibostee sowie den zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus zu identifizieren. Die Bildung der Dibenzofurane durch den nicht-enzymatischen oxidativen Abbau des Aspalathins liefert einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Bildung weiterer, höhermolekularer Bräunungsstrukturen während der Rooibostee-Fermentation.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zudem ein Fokus auf die Inhibitorwirkungen polyphenolischer Inhaltsstoffe des unfermentierten Rooibostees (Aspalathin, (+)-Catechin, Isoquercitrin) auf die Enzymaktivität von α -Glucosidase, α -Amylase und Saccharase *in vitro* gelegt. Für Polyphenole des Schwarzen Tees wurden bereits vergleichbare Wirkungen auf die Schlüsselenzyme des menschlichen Verdauungstraktes *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen.

Die kinetischen Studien zeigten für alle Polyphenole Inhibitorfunktion mit einem unkompetitiven Inhibierungstyp bei α -Glucosidase und α -Amylase sowie einer kompetitiven Hemmung der Saccharase. Aspalathin demonstrierte unter den polyphenolischen Strukturen die stärkste Hemmwirkung gegenüber der α -Amylase, aber auch Inhibitorfähigkeit bei der α -Glucosidase. (+)-Catechin stellte sich als das Polyphenol mit der stärksten Hemmwirkung gegenüber der α -Glucosidase und Saccharase heraus. Auch Isoquercitrin wies eine schwache Inhibierung der Verdauungsenzyme auf. Die

Inhibierungsart der Polyphenole war stets reversibel und deutete daher auf eine nicht-kovalente Inhibierung hin.

Anschließend wurden die Polyphenole auf ihre Hemmwirkung in Rattenversuchsreihen *in vivo* getestet. Dazu wurde der direkte Einfluss auf die Enzymaktivitäten der α -Amylase und Saccharase des Dünndarms untersucht. Eine indirekte Bestimmung erfolgte zudem über die Messung der postprandialen Blutglucoseantworten nach Verabreichung der Schlundlösungen. Aspalathin unterdrückte am effektivsten den Anstieg der Blutglucosekurven sowie die Saccharase-Aktivität in der direkten Bestimmung. (+)-Catechin und Isoquercitrin verursachten eine leichte Suppression der Blutglucoseantwortkurven und zeigten schwache inhibitorische Fähigkeiten auf die Saccharase-Aktivität. Die Aussagekraft der Resultate der direkten α -Amylase-Aktivitätsbestimmung ist als fragwürdig anzusehen.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen ein bedeutendes antihyperglycämisches Potenzial der polyphenolischen Verbindungen des unfermentierten Rooibostees und deren mögliche Verwendung als natürliche Alternative für synthetische Inhibitoren. Vor allem Aspalathin könnte als führende Substanz zu der Entwicklung antidiabetischer Therapeutika beitragen, um Nebenwirkungen (Blähungen, Diarrhoe), die z. B. bei Acarbose, Miglitol oder Voglibose auftreten, zu vermeiden. Die verzögerte Resorption sowie Absorption der Kohlenhydrate führt schlussendlich zu einer Unterdrückung des Anstiegs des postprandialen Blutglucosespiegels und einer Kontrolle der Hyperglycämie. Durch den Verzehr von Grünem Rooibostee kann demnach das Risiko, an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken, minimiert sowie der Blutglucosespiegel bei Diabetikern verbessert werden. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse eröffnen damit neue Möglichkeiten zur Entwicklung funktionaler Lebensmittel im Zusammenhang mit Kohlenhydratstoffwechselstörungen.

5 Experimenteller Teil

5.1 Chemikalien

Acros Organics (Beerse, Belgien):

- Heptafluorbuttersäure (HFBA)

Chemotrade (Leipzig, Deutschland):

- Deuteriertes Methanol
- Deuteriertes Wasser

DMK Chemikalien (Laucha, Deutschland):

- Ethanol

Fluka (Taufkirchen, Deutschland):

- N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid (mit 5 % Trimethylchlorosilan)
- Maleinsäure
- *p*-Nitrophenol
- *o*-Phenylendiamin (OPD)
- Schwefelsäure

Grüssing (Filsum, Deutschland):

- Natriumchlorid
- Natriumhydroxid

Merck (Darmstadt, Deutschland):

- Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA)
- Dikaliumhydrogenphosphat Trihydrat
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat
- Kaliumdihydrogenphosphat
- Natriumacetat
- Natriumcarbonat
- Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat
- Natriumhydrogenphosphat Dihydrat
- *o*-Phosphorsäure

Roth (Karlsruhe, Deutschland):

- Aceton

- BSA (Rinderserum-Albumin)
- *n*-Butanol
- Diethylether
- Ethylacetat
- D-(-)-Fructose
- *n*-Hexan
- Isoquercitrin
- Kaliumhydroxid
- Kieselgel 60 für die Säulenchromatographie (0,06 – 0,20 mm)
- Natriumthiosulfat

Serva (Heidelberg, Deutschland):

- Coomassie Brilliant-Blau G-250

Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland):

- α -Amylase, α -Glucosidase, Saccharase
- Acetonitril
- (+)-Catechinhydrat
- 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-propionsäure
- 3,5-Dinitrosalicylsäure
- D-(+)-Glucose
- Hydroxylaminhydrochlorid
- Iod
- Kaliumiodid
- Kalium-Natrium-Tartrat Tetrahydrat
- D-(+)-Maltose Monohydrat
- Methanol
- *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid
- *p*-Nitrophenyl- α -D-maltosid
- Pyridin
- Saccharose
- Salzsäure
- Stärke (löslich)
- Triethylamin
- Xylit

VWR (Darmstadt, Deutschland):

- Ameisensäure

5.2 Geräte

<i>RP18-Säulenchromatographie</i>	Waters Associates Chromatography Pump model 6000 A Millipore Waters 490 E Detector Shimadzu C-R5A Writer Ultrorac7000 LKB Fraction Collector
<i>HPLC-UV:</i>	Jasco PU 2089 Plus Intelligent HPLC Pump Jasco AS 2055 Plus Intelligent Sampler Jasco UV 2075 Plus UV-Detector
<i>HPLC-DAD:</i>	Jasco PU 2080 Plus Intelligent HPLC Pump Jasco LG 2080-04 Quarternary Gradient Unit Jasco DG 2080-54 4-Line-Degasser Jasco AS 2055 Plus Intelligent Sampler Jasco MD 2015 Plus Multiwavelength Detector Jasco Jetstream II Column Oven Advantec CHF122SB Fraction Collector
<i>HPLC-MS/MS:</i>	Applied Biosystems Linear Ion Trap Quadrupole LC/MS/MS Mass Spectrometer 4000 Q Trap Jasco PU 2080 Plus Intelligent HPLC Pump Jasco LG 2080-04 Quarternary Gradient Unit Jasco DG 2080-54 4-Line-Degasser Jasco AS 2055 Plus Intelligent Sampler Jasco MD 2015 Plus Multiwavelength Detector Jasco Jetstream II Column Oven
<i>GC-MS:</i>	Thermo Electron Corporation, Finnigan Trace GC Ultra mit Trace DSQ (Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen)
<i>MLCCC:</i>	Ito Multi-layer Separator-extractor Modell #1 Waters Associates Chromatography Pump model 6000 A Bausch & Lomb Spectronic 21 Zeiss Spektralphotometer PM2D Servogor 220 Writer Ultrorac7000 LKB Fraction Collector
<i>Präparative HPLC:</i>	TECHLAB GmbH Gradient Unit Besta HD 2-200 Pump Waters Associates Model U6K Injector Jasco UV 2075 Plus UV-Detector Servogor 220 Writer Ultrorac7000 LKB Fraction Collector

Sonstige Geräte:

Blutglucose-Messgerät:	Accu-Chek® Aviva (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland)
CD-Spektrometer:	Jasco J-815 CD Spectrometer
Gefriertrocknungsanlage:	Benchtop SLC, VirTis
Hochauflösendes MS:	Bruker Apex III FT-ICR
Inkubatorschüttler:	Incubator Shaker G 24, New Brunswick, Scientific
Mikrotiterplatten-Reader:	TECAN infinite M 200
NMR-Spektrometer:	Bruker Avance III 800
Photometer	Jasco UV/VIS-V-530 Spektrophotometer
Reinstwasseranlage:	Seralpur PRO 90 CN, Seral
Rotationsverdampfer:	Laborota 4000-efficient, Heidolph
UPLC-TOF-MS:	Waters Acquity UPLC System Bruker micrOTOF Mass Spectrometer
Vakuumkonzentrator:	Savant Refrigerated Vapor Trap RVT 400

5.3 Aspalathin-Inkubationen**5.3.1 Laufmittel und Lösungen****Tab. 15:** Verwendete Laufmittel

Laufmittel	Herstellung
Laufmittel A	Ethylacetat/Methanol 9:1 (v/v)
Laufmittel B	<i>n</i> -Hexan/Diethylether/Aceton 25:40:35 (v/v/v)
Laufmittel C	100 % bidest. H ₂ O + 0,8 ml Ameisensäure / l
Laufmittel D	30 % bidest. H ₂ O + 70 % Methanol + 0,8 ml Ameisensäure / l
Laufmittel E	100 % bidest. H ₂ O + 0,6 ml HFBA / l
Laufmittel F	30 % bidest. H ₂ O + 70 % Methanol + 0,6 ml HFBA / l
Laufmittel G	100 % bidest. H ₂ O mit 0,1 % Ameisensäure
Laufmittel H	100 % Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure
Laufmittel MLCCC	bidest. H ₂ O/Ethylacetat/ <i>n</i> -Butanol 4:3:1 (v/v/v)

Tab. 16: Verwendete Lösungen für die Aspalathin-Inkubationen

Lösungen	Herstellung
0,2 M Phosphat-Puffer pH 7,4	37,52 g Dikaliumhydrogenphosphat Trihydrat 4,84 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1000 ml bidest. H ₂ O pH-Einstellung mit 1 N KOH oder 3 N o-H ₃ PO ₄
0,1 M Phosphat-Puffer pH 7,4	18,76 g Dikaliumhydrogenphosphat Trihydrat 2,42 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1000 ml bidest. H ₂ O pH-Einstellung mit 1 N KOH oder 3 N o-H ₃ PO ₄
Soda-Salzsäure-Puffer nach Kolthoff [109] pH 10,8	A: 1,0599 g Natriumcarbonat ad 100 ml bidest. H ₂ O B: 0,1 M Salzsäure 50 ml A und 8,8 ml B ad 100 ml bidest. H ₂ O
Phosphatpuffer nach Sørensen [109] pH 8,5	A: 0,9078 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 100 ml bidest. H ₂ O B: 1,1876 g Dinatriumhydrogenphosphat ad 100 ml bidest. H ₂ O 96,9 ml B mit 3,1 ml A auffüllen
1 N Salzsäure + 1 mM DTPA	7,3 mg DTPA ad 18 ml bidest. H ₂ O und 2 ml 37 %ige Salzsäure
2 N Salzsäure + 1 mM DTPA	7,3 mg DTPA ad 16 ml bidest. H ₂ O und 4 ml 37 %ige Salzsäure
1 N Kaliumhydroxid-Lösung	2,8 g Kaliumhydroxid ad 50 ml bidest. H ₂ O
3 N o-Phosphorsäure-Lösung	4,89 g o-Phosphorsäure ad 50 ml bidest. H ₂ O

5.3.2 Aspalathin Isolierung

5.3.2.1 Extraktion

Der unfermentierte Rooibostee aus dem Biedouw Valley in Süd-Afrika wurde von der Mount Everest Tea Company GmbH (Elmshorn, Deutschland) bezogen.

100 g unfermentierter Rooibostee wurden mit 1 l Aceton-Wasser-Gemisch (7:3, v/v) versetzt und 30 Minuten unter Argon-Atmosphäre gerührt. Nach 24-stündiger Kaltextraktion bei 5 °C erfolgte das Absieben des Teesatzes. Die erhaltene Extraktionslösung wurde am Rotationsverdampfer vom Aceton befreit und anschließend einer mehrstufigen Flüssig-Flüssig-Extraktion unterzogen. Dabei wurde die wässrige Phase je zweimal mit 200 ml Diethylether, Ethylacetat und *n*-Butanol extrahiert. Die Ethylacetat- und *n*-Butanolextrakte wurden separat aufgefangen und zur Trockene eingengt. Der Diethyletherextrakt wurde verworfen.

5.3.2.2 Aufarbeitung an der Kieselgelsäule

Zur Fraktionierung wurde eine Kieselgelsäule (Länge: 40 cm, Außendurchmesser: 3,0 cm, Füllhöhe: 13 cm) genutzt. Der Rückstand aus 5.3.2.1 wurde in 15 ml Laufmittel A (s. Tab. 15, S. 82) gelöst und bei 3500 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde am Rotationsverdampfer auf 3 ml eingengt und auf die mit einem Säulenvolumen (100 ml) Laufmittel B vorkonditionierte Kieselgelsäule gegeben. Im Anschluss an den Waschschrift mit erneut einem Säulenvolumen Laufmittel B erfolgte die Elution mit 350 ml Laufmittel A. Die Fließgeschwindigkeit betrug 5 ml/min. Die ersten 20 Fraktionen wurden verworfen. Die Fraktionen 21-70 wurden vereinigt und bis zur Trockene eingengt.

5.3.2.3 Aufreinigung mittels RP18-Säulenchromatographie

Der erhaltene Rückstand aus 5.3.2.2 wurde in 3 ml Laufmittel C/D 73:27 (v/v) gelöst. Nach einer Spritzenfiltration wurde die gelöste Probe auf die Säule (Merck Lobar 310-25 LiChroprep RP-18, 40-63 μ m) gegeben. Mittels Fraktionssammler wurden die einzelnen Aspalathin-Fractionen aufgefangen. Nach dem Abrotieren des Laufmittels am Rotationsverdampfer wurde das erhaltene Aspalathin gefriergetrocknet und als reine, farblose Substanz lichtgeschützt eingefroren.

Tab. 17: Messbedingungen RP18-Säulenchromatographie

Parameter	Messbedingungen
Fließgeschwindigkeit	5 ml/min
Laufbedingung	isokratisch
Probenvolumen	3 ml
Fraktionssammlergeschwindigkeit	3,5 min
Detektion	280 nm

5.3.3 Aspalathin-Inkubationen und deren chromatographische Auswertung

5.3.3.1 Inkubationen bei verschiedenen pH-Werten

- Für die Untersuchung des Reaktionsverhaltens von Aspalathin wurden 2,03 mg der Verbindung (4,5 mM) in 1 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und 4 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

- Zur Ermittlung der Abbauprodukte via GC-MS wurden 90,4 mg Aspalathin (10 mM) in jeweils 20 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4), Phosphatpuffer nach Sørensen (pH 8,5) [109] sowie Soda-Salzsäure-Puffer nach Kolthoff (pH 10,8) [109] für 20 h bei 37 °C inkubiert.
- Für die LC-MS/MS-Untersuchungen auf Folgeprodukte der Dihydrokaffeesäure wurden 2,03 mg Aspalathin (4,5 mM) in 1 ml Phosphatpuffer nach Sørensen (pH 8,5) für die Dauer von 7 h bei 37 °C inkubiert.
- In einer Modellinkubation zur Bildung der Aspalathin-Dihydrokaffeesäure-Addukte wurden 4,52 mg Aspalathin (10 mM) mit 1,82 mg Dihydrokaffeesäure in 1 ml Phosphatpuffer nach Sørensen (pH 8,5) für 10 h bei 37 °C inkubiert.
- Zur Untersuchung der Bildung der farbigen Strukturen wurden 2,03 mg Aspalathin (4,5 mM) in 1 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und über die Inkubationsdauer von 24 h bei 37 °C geschüttelt.

5.3.3.2 Absorptionsscan Aspalathin-Inkubation

Als Maß für die Bräunung wurde 1 ml einer 4,5 mM Aspalathin-Lösung unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Zu Beginn der Reaktion sowie in gewissen Zeitabständen bis 24 h wurden dem Inkubationsansatz jeweils 100 µl entnommen. Diese wurden mit 900 µl bidest. H₂O verdünnt. 200 µl dieser Verdünnungen wurden zur Absorptionsmessung im Mikrotiterplatten-Reader eingesetzt.

5.3.3.3 Untersuchung der Aspalathin-Inkubationen mittels analytischer HPLC

Die Untersuchung der Verbindungen **1-5**, **13** und **14** via analytischer HPLC erfolgten auf der Säule Vydac CRT, #218TP54, 250 x 4,0 mm, RP18, 5 µm, Hesperia, CA. Tab. 18 gibt die verwendeten Parameter dieser Bestimmungen wieder (Methode A).

Tab. 18: Messbedingungen der analytischen HPLC – Methode A

Parameter	Messbedingungen
Fließgeschwindigkeit	1 ml/min
Laufbedingung	Gradient: <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;"> $\xrightarrow{30 \text{ min}}$ $\xrightarrow{40 \text{ min}}$ $\xrightarrow{2 \text{ min}}$ $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ </div> <div> 90:10 (E/F) 70:30 (E/F) 35:65 (E/F) 0:100 (E/F, 8 min) 90:10 (E/F, 15 min) </div> </div>
Probenvolumen	20 µl
Detektion	280 nm, 380 nm

Die analytische HPLC-Bestimmung der Folgeprodukte der Dihydrokaffeensäure **7** und **8** sowie der Aspalathin-Dihydrokaffeensäure-Inkubation fand auf der Säule Knauer, Eurospher 100-5 C18, 250 x 4,6 mm, Berlin, Deutschland, statt. Die Parameter der Methode B zur Analyse der genannten Inkubationen sind in Tab. 19 dargestellt.

Tab. 19: Messbedingungen der analytischen HPLC – Methode B

Parameter	Messbedingungen
Fließgeschwindigkeit	1 ml/min
Laufbedingung	Gradient:
	65 min → 98:2 (E/F)
	2 min → 20:80 (E/F)
	5 min → 0:100 (E/F, 13 min)
5 min → 98:2 (E/F, 15 min)	
Probenvolumen	100 µl
Detektion	280 nm

Die chromatographische Ermittlung der Verbindungen **9**, **10**, **11** und **12** via analytischer HPLC wurde ebenfalls auf der oben erwähnten Knauer Säule durchgeführt. Als Methode C kamen die in Tab. 20 aufgeführten Parameter zur Anwendung.

Tab. 20: Messbedingungen der analytischen HPLC – Methode C

Parameter	Messbedingungen
Fließgeschwindigkeit	1 ml/min
Laufbedingung	Gradient:
	55 min → 98:2 (C/D, 10 min)
	2 min → 35:65 (C/D)
	15 min → 0:100 (C/D, 13 min)
15 min → 98:2 (C/D, 15 min)	
Probenvolumen	20 µl
Detektion	280 nm, 430 nm bzw. 450 nm

5.3.3.4 Untersuchung der Aspalathin-Inkubationen mittels LC-MS/MS

Zur Untersuchung der Strukturen **1**, **2**, **4** und **5** wurde die für 4 h inkubierte Aspalathin-Lösung (5.3.3.1) einem Q1-Scan unterzogen. Zudem wurden Zerfallsspektren des $[M+H]^+$ -Adduktes der gesuchten Verbindungen bei verschiedenen Kollisionsenergien generiert.

Tab. 21: Messbedingungen LC-MS/MS – Verbindungen **1, 2, 4** und **5** (Methode A)

Parameter	Messbedingungen	
Probenvolumen	50 µl	
Detektion	280 nm	
Scan Typ	Q1 MS (Q1)	Product Ion (MS ²) Product of <i>m/z</i> 903
Ionisation	ESI positiv	ESI positiv
Ion Source	Turbo Spray	Turbo Spray
Curtain Gas	40 psi	40 psi
Ion Spray Voltage	4000 V	4000 V
Temperature	550 °C	550 °C
Ion Source Gas 1	60 kPa	60 kPa
Ion Source Gas 2	60 kPa	60 kPa
Declustering Potential	40 V	40 V
Entrance Potential	10 V	10 V
Collision Energy	-	15 eV, 30 eV, 45 eV

Die 7-stündige Aspalathin-Inkubation im Phosphatpuffer nach Sørensen (5.3.3.1) wurde einem Q1 MS-Scan sowie einem Product Ion-Scan unterworfen. Die analytische Trennung erfolgte mit Hilfe der Knauer Säule (Methode B).

Tab. 22: Messbedingungen LC-MS/MS – Dihydrokaffeesäure-Folgeprodukte **7** und **8** (Methode B)

Parameter	Messbedingungen	
Probenvolumen	50 µl	
Detektion	280 nm	
Scan Typ	Q1 MS (Q1)	Product Ion (MS ²) Product of <i>m/z</i> 633
Ionisation	ESI positiv	ESI positiv
Ion Source	Turbo Spray	Turbo Spray
Curtain Gas	40 psi	40 psi
Ion Spray Voltage	5500 V	5500 V
Temperature	550 °C	550 °C
Ion Source Gas 1	50 kPa	50 kPa
Ion Source Gas 2	60 kPa	60 kPa
Declustering Potential	80 V	80 V
Entrance Potential	10 V	10 V
Collision Energy	-	15 eV, 30 eV, 45 eV

Zur Charakterisierung der entstehenden Verbindungen **9**, **10**, **11** und **12** wurde die 24-stündige Aspalathin-Lösung (5.3.3.1) mittels LC-MS/MS untersucht. Neben der Aufnahme der Q1-Scans wurden die Zerfallsspektren der $[M+H]^+$ -Addukte der Verbindungen **11** und **12** bei verschiedenen Kollisionsenergien aufgenommen.

Tab. 23: Messbedingungen LC-MS/MS – Verbindungen **9**, **10**, **11** und **12** (Methode C)

Parameter	Messbedingungen	
Probenvolumen	50 μ l	
Detektion	280 nm bzw. 430 nm	
Scan Typ	Q1 MS (Q1)	Product Ion (MS^2) Product of m/z 467
Ionisation	ESI positiv	ESI positiv
Ion Source	Turbo Spray	Turbo Spray
Curtain Gas	40 psi	40 psi
Ion Spray Voltage	4500 V	4500 V
Temperature	550 $^{\circ}$ C	550 $^{\circ}$ C
Ion Source Gas 1	50 kPa	50 kPa
Ion Source Gas 2	60 kPa	60 kPa
Declustering Potential	40 V	40 V
Entrance Potential	10 V	10 V
Collision Energy	-	15 eV, 30 eV

5.3.3.5 Aufnahme von Zeit-Umsatz-Kurven

Für die Aufnahme der Zeit-Umsatz-Kurven der Verbindungen **1-5** wurden 12,20 mg Aspalathin (4,5 mM) in 6 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 37 $^{\circ}$ C unter Schütteln inkubiert. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 200 μ l aus dem Inkubationsansatz entnommen und mit 100 μ l 1 N Salzsäure (+ 1 mM DTPA) versetzt. Diese Lösungen wurden mittels analytischer HPLC (Methode A) vermessen.

Zur Ermittlung der Zeit-Umsatz-Kurven der Verbindungen **9-12** wurden ebenfalls 12,20 mg Aspalathin (4,5 mM) wie oben beschrieben inkubiert. Die entnommenen Aliquote von 200 μ l wurden ebenfalls mit 100 μ l 1 N Salzsäure (+ 1 mM DTPA) versetzt und über HPLC-DAD (Methode C) analysiert.

5.3.3.6 Reinkubation der Dimere

Zur Bestätigung der Bildung des Dimers **5** aus den Dimeren **1** und **2** wurden diese separat inkubiert. Dazu wurden jeweils 1 mg der isolierten Substanzen (0,7 mM) mit 1,6 ml 0,2 M

Phosphatpuffer (pH 7,4) versetzt und bei 37 °C geschüttelt. Der Abbau der Dimere sowie die Bildung von Dimer **5** wurden über die Zeit durch Entnahme von jeweils 150 µl Inkubationslösung, die mit 50 µl 1 N Salzsäure (+ 1 mM DTPA) abgestoppt wurde, mittels analytischer HPLC verfolgt (Methode A).

5.3.3.7 Untersuchung der Aspalathin-Inkubationen mittels GC-MS

Aus den jeweiligen Aspalathin-Inkubationen (10 mM) bei pH 7,4, 8,5 und 10,8 (5.3.3.1) wurden stündlich 1 ml Aliquote entnommen und unter Argon abgeblasen. Anschließend wurde mit 100 µl Triethylamin und 100 µL N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid (mit 5 % Trimethylchlorosilan) für 1 h bei Raumtemperatur derivatisiert. Die silylierte Lösung wurde direkt gaschromatographisch analysiert.

Tab. 24: Messbedingungen GC-MS – Aspalathin-Inkubationen

Parameter	Messbedingungen
Trennsäule	DB-5ms (J & W Scientific, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 60 m x 0,32 mm, 0,1 µm Filmdicke
Injektionsvolumen	2 µl
Injektor	220 °C, split: 1:10
Fluss	constant flow, 10 ml/min
Transfer Line	250 °C
Trärgas	Helium 5.0
Temperaturprogramm	Start: 40 °C (0 min) Ramp 1: 5 °C/min → 200 °C (0 min) Ramp 2: 10 °C/min → 270 °C (10 min)
MS-Modus	EI (70 ev), Full Scan <i>m/z</i> 50 - 850

5.3.4 Strukturisolierung

Für die präparative Isolierung der Strukturen **1**, **2** und **5** wurden 30 mg Aspalathin (22 mM) in 3 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und im Schüttelinkubator bei 37 °C für 3 h (**1** und **2**) bzw. 6 h (**5**) aerob inkubiert. Die Reaktion wurde jeweils mit 1 ml 1 N Salzsäure (+ 1 mM DTPA) abgestoppt.

Zur Isolierung der Strukturen **11** und **12** wurden 35 mg Aspalathin (4,5 mM) unter denselben Bedingungen in 17,2 ml 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) für 24 h inkubiert. Der Abbruch der Reaktion wurde durch Zugabe von 2,8 ml 2 N Salzsäure (+ 1 mM DTPA) ausgelöst.

5.3.4.1 Fraktionierung mittels Multilayer Countercurrent Chromatographie

Die Trennsäule der MLCCC (W. Hahn GmbH & Co. KG, NW-PTFE Isolierschlauch, Ø 1,9 x 0,3 mm) wurde vollständig mit stationärer Phase gefüllt. Anschließend wurde die mobile Phase unter Rotation aufgegeben. Die inkubierten Proben (5.3.4) wurden in der stationären Phase gelöst und nach dem Durchbruch der mobilen Phase in das System injiziert. Die eluierende wässrige Phase wurde mit einem Fraktionssammler aufgefangen.

Tab. 25: Messbedingungen MLCCC

Parameter	Messbedingungen
Fließgeschwindigkeit	2 ml/min
Rotationsgeschwindigkeit	782 U/min
Probenvolumen	10 ml
Rotationsrichtung	Head to Tail (Rechtslauf)
Fraktionssammlergeschwindigkeit	8 min
Detektion	280 nm bzw. 380 nm
Papierlauf	3 cm/h

Die so erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt, zur Trockene einrotiert und zur weiteren Isolierung mittels präparativer HPLC eingesetzt.

Vor dem nächsten Arbeitsschritt musste jedoch aufgrund der Instabilität der Dibenzofurane **11** und **12** deren Derivatisierung in die entsprechenden Chinoxaline **13** und **14** erfolgen. Dafür wurden 50 mg MLCCC-Extrakt mit 5,4 mg OPD (50 mM) in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und für die Dauer von 5 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert.

5.3.4.2 Isolierung mittels präparativer HPLC

Die einrotierten Proben der MLCCC wurden mit 2 ml Laufmittel E/F 90:10 (v/v) gelöst. Die Inkubationslösung der Chinoxaline wurde mit dem Laufmittel auf ein Volumen von 2 ml verdünnt. Die chromatographische Trennung erfolgte auf der präparativen HPLC-Säule Vydac CRT, #218TP1022,250 x 23 mm, RP18, 10 µm, Hesperia, CA. Nach der Injektion der Probe wurde das Eluat fraktioniert aufgefangen. Nach der Vereinigung und dem Abrotieren des Laufmittels wurden die isolierten Verbindungen nach erneuter Wasserzugabe lyophilisiert.

Tab. 26: Messbedingungen präparative HPLC

Parameter	Messbedingungen
Fließgeschwindigkeit	8 ml/min
Laufbedingung	isokratisch
Probenvolumen	1,8 ml
Fraktionssammlergeschwindigkeit	1 min
Detektion	280 nm bzw. 380 nm
Papierlauf	12 cm/h

5.3.5 Strukturaufklärung

5.3.5.1 Bestimmung der hochauflösenden Masse (HR-MS, UPLC-TOF-MS)

Für die Bestimmung der hochauflösenden Masse der isolierten Verbindungen **1**, **2**, **5**, **11**, **12**, **13** und **14** wurden diese in Methanol gelöst. Die Injektion in das Massenspektrometer erfolgte über ein Spritzensystem mit einer Flussrate von 120 µl/h. Das Trägergas war Stickstoff.

Zur Ermittlung der hochauflösenden Masse der hoch reaktiven Intermediate **9** und **10** wurde die UPLC-TOF-MS genutzt. Dazu wurde Aspalathin (4,5 mM) in bidest. H₂O gelöst und für 10 h bei 37 °C inkubiert. Die Trennung erfolgte auf einer Acquity HSS-T3 C18 Säule (100 x 1 mm, 1,7 µm, Waters, Milfors, MA). Das Laufmittel setzte sich aus den Laufmitteln G und H zusammen.

Tab. 27: Messbedingungen UPLC-TOF-MS

Parameter	Messbedingungen
Fließgeschwindigkeit	150 µl/min
Laufbedingung	Gradient: $\xrightarrow{15 \text{ min}}$ 95:5 (G/H, 1 min) $\xrightarrow{0,01 \text{ min}}$ 5:95 (G/H, 2 min) $\xrightarrow{0,01 \text{ min}}$ 95:5 (G/H, 1,99 min)
Ionisation	ESI positiv, m/z 100 - 1000
Aquisition time	0,3 s (centroid mode)
Capillary Voltage	5000 V
Desolvation temperature	190 °C
Desolvation gas flow	360 l/h

5.3.5.2 Nuclear Magnetic Resonance Spektroskopie (NMR)

Die isolierten Verbindungen wurden in CD₃OD gelöst und mittels 1D und 2D homonuklearen ¹H- und heteronuklearen ¹H¹³C-Experimenten bei Raumtemperatur strukturell aufgeklärt. Das Spektrometer arbeitete bei 800 MHz für ¹H-Spektren bzw. bei 200 MHz für ¹³C-Aufnahmen. Für eine eindeutige Aussage und Absicherung der Strukturen wurden die NMR-Daten von ¹H-, ¹³C-, H,H-COSY-, HSQC- sowie HMBC-Spektren ausgewertet.

5.3.5.3 Circular Dichroism Spektroskopie (CD)

Die CD-Spektren wurden im Bereich 195 – 400 nm in Küvetten mit einer Schichtdicke von 0,1 cm aufgenommen. Für die CD-Experimente wurden die Verbindungen **1** und **2** mit Methanol auf die Konzentrationen 0,0643 mM (**1**) und 0,2571 mM (**2**) verdünnt.

Tab. 28: Messbedingungen CD-Spektroskopie

Parameter	Messbedingungen
Temperatur	20 °C
Response	0,5 s
Scanning speed	50 nm/min
Data acquisition interval	0,2 nm
Number of accumulations	10
Bandwidth	1 nm

5.3.5.4 Isomerisierungsexperimente

Dimer **1** wurde in bidest. H₂O gelöst und stufenweise von 30 °C auf 90 °C erwärmt. Nach dem Abrotieren des Lösungsmittels wurde das erhaltene Material mittels NMR und analytischer HPLC (Methode A) untersucht.

5.3.6 Farbverdünnungsanalyse

Zur Bestimmung des Einflusses der Verbindungen **11** und **12** auf die Gesamtfarbe wurde Aspalathin (4,5 mM) in 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 330 µl 1 N Salzsäure (+ 1 mM DTPA) wurde die Reaktion nach 24 h unterbrochen.

Ein Aliquot (50 µl) der inkubierten Lösung wurde anschließend mittels analytischer HPLC (Methode A) aufgetrennt und 100 Fraktionen à 1 ml gesammelt. Die Detektion erfolgte bei 430 nm.

Von den farbigen Fraktionen wurde eine exponentielle Verdünnungsreihe hergestellt. Die Fraktionen wurden soweit verdünnt bis Testpersonen keinen Farbunterschied zwischen der Probe und zwei Blindwerten (bidest. H₂O) mehr erkennen konnten (Triangeltest).

- Hergestellte Verdünnungen: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128

Zur Ermittlung des Farbverdünnungsfaktors der Inkubationslösung wurden 50 µl dieser Lösung auf 1 ml verdünnt. Der Ansatz wurde anschließend ebenfalls solange verdünnt bis kein Farbunterschied mehr zu erkennen war.

- Hergestellte Verdünnungen: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512

5.3.7 Fermentierter Rooibostee

Der fermentierte Rooibostee aus dem Biedouw Valley in Süd-Afrika wurde ebenfalls von der Mount Everest Tea Company GmbH (Elmshorn, Deutschland) bezogen.

Zur Überprüfung des fermentierten Tees auf das Vorhandensein der Aspalathin-Dihydrokaffeesäure-Addukte **7** und **8** wurden 20 g des fermentierten Tees mit 100 ml kochendem bidest. H₂O extrahiert, der wässrige Extrakt gefriergetrocknet und mittels analytischer HPLC untersucht (Methode B).

Eine weitere Aufarbeitung des Tees diente zum Nachweis der farbigen Dibenzofuran-Strukturen **11** und **12** im fermentierten Rooibostee. Dazu wurden 10 g des fermentierten Tees mit 100 ml kochendem Reinstwasser extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit einem Überschuss OPD für 5 h bei 37 °C aerob inkubiert.

5.4 Enzymassays *in vitro* und *in vivo*

5.4.1 Enzymassays *in vitro*

5.4.1.1 α -Glucosidase-Assay

Tab. 29 stellt die Herkunfts- und Kenndaten der verwendeten Enzyme sowie die den jeweiligen Enzymen entsprechenden Substrate dar.

Tab. 29: Herkunfts- und Kenndaten der verwendeten Enzyme sowie deren Substrate

	α -Glucosidase	α -Amylase	Saccharase
Organismus	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Porcine pancreas	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Angegebene Aktivität	≥ 10 U/mg	≥ 10 U/mg	≥ 300 U/mg
Substrat	<i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid	<i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-maltosid	Saccharose

α -Glucosidase und dessen Substrat *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid wurden in Natriumacetat-Puffer gelöst (Tab. 30). Das Enzym wurde auf eine Konzentration von 0,05 mg/ml eingestellt. Die Inhibitoren Aspalathin, (+)-Catechin und Isoquercitrin wurden in DMSO gelöst und mit Natriumacetat-Puffer soweit verdünnt bis die Endkonzentration des DMSO in der Lösung maximal 1 % betrug. Während der Versuchsreihe wurden sämtliche Lösungen auf Eis gelagert.

Tab. 30: Verwendete Lösungspuffer der Enzymassays

Lösungspuffer/-mittel	Herstellung
50 mM Natriumacetat-Puffer pH 6,8	2,05 g wasserfreies Natriumacetat ad 500 ml bidest. H ₂ O pH-Einstellung mit 3 N <i>o</i> -Phosphorsäure
PBS-Puffer / Saline-Puffer 50 mM mit 0,75 M Salzkonzentration pH 6,8	0,375 g Natriumdihydrogenphosphat 1,8 g Dinatriumhydrogenphosphat 10,96 g Natriumchlorid ad 250 ml bidest. H ₂ O pH-Einstellung mit 3 N <i>o</i> -Phosphorsäure
0,2 M Phosphat-Puffer pH 6,8	37,52 g Dikaliumhydrogenphosphat Trihydrat 4,84 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1000 ml bidest. H ₂ O pH-Einstellung mit 1 N KOH oder 3 N <i>o</i> -H ₃ PO ₄

Zur Erstellung der *p*-Nitrophenol-Kalibrierkurve wurde eine 5 mM *p*-Nitrophenol-Stamm-lösung hergestellt und mit Natriumacetat-Puffer entsprechend verdünnt (s. Anhang, Abb. 94, S. 137).

In Tab. 31 sind die Parameter des α -Glucosidase-Assays zusammengefasst. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Readers, in dem die Mikrotiterplatte über einen Zeitraum von 20 min bei 37 °C inkubiert wurde. Nach jeder Minute wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 400 nm erfasst.

Tab. 31: Parameter der *in vitro* Assay-Bestimmungen

	α -Glucosidase	α -Amylase	Saccharase
Ansatzvolumen	0,2 ml	0,2 ml	5,0 ml
Substrat-Stammlösung	5 mM	20 mM	200 mM
Substratkonzentrationen	0,1 – 2,5 mM	0,25 – 7,5 mM	20 – 100 mM
Enzymkonzentration	0,05 mg/ml	200 mg/ml	0,025 mg/ml
Inhibitorkonzentrationen	0,02 – 2,0 mM	0,02 – 2,0 mM	2 – 40 mM
Interner Standard	-	-	100 mM Xylit
aufgefüllt mit	Natriumacetat-Puffer	PBS-Puffer	Phosphat-Puffer
Art der Bestimmung	photometrisch via Mikrotiterplattenreader	photometrisch via Mikrotiterplattenreader	gaschromatographisch nach Oximierung und Derivatisierung

5.4.1.2 α -Amylase-Assay

Das Enzym α -Amylase (Tab. 29, S. 94) sowie das Substrat *p*-Nitrophenyl- α -D-maltosid wurden in PBS-Puffer gelöst. Die eingestellte Enzymkonzentration betrug 200 mg/ml. Die Inhibitoren wurden wie unter 5.4.1.1 angegeben gelöst und mit PBS-Puffer entsprechend verdünnt. Die Bestimmung der α -Amylaseaktivität erfolgte analog zum α -Glucosidase-Assay photometrisch bei 400 nm mittels Mikrotiterplatten-Reader.

5.4.1.3 Saccharase-Assay

Das Enzym Saccharase, das Substrat Saccharose, der interne Standard Xylit sowie die Inhibitoren (nach vorherigem Lösen in DMSO) wurden mit Phosphatpuffer (s. Tab. 30, S. 94) auf ihre entsprechenden Konzentrationen eingestellt. Die jeweiligen Ansätze (Tab. 31) wurden 20 min bei 37 °C inkubiert. In einem Intervall von zwei Minuten wurden Aliquote abgenommen und unter Argon-Atmosphäre getrocknet. Die Rückstände wurden mit 100 μ l Oximierungsreagenz (215 mM Hydroxylaminhydrochlorid in Pyridin) versetzt und 4 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Derivatisierung mit 50 μ l N,O-

bis(trimethylsilyl)acetamid (mit 5 % Trimethylchlorosilan) für 3 h bei Raumtemperatur. Die Bestimmung erfolgte gaschromatographisch (Tab. 32). Die Quantifizierung erfolgte durch die Bildung der Peakflächenverhältnisse der im SIM-Modus erhaltenen Peakflächen für Fructose und Xylit.

Tab. 32: Messbedingungen GC-MS – Saccharase-Assay

Parameter	Messbedingungen
Trennsäule	DB-5ms (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke
Injektionsvolumen	1 µl
Injektor	220 °C, split: 1:20
Fluss	constant flow, 28 cm/s (1 ml/min)
Transfer Line	250 °C
Trärgas	Helium 5.0
Temperaturprogramm	Start: 200 °C (0 min) Ramp 1: 3 °C/min → 215 °C (0 min) Ramp 2: 40 °C/min → 270 °C (5 min)
MS-Modus	EI (70 eV), SIM-Mode <i>m/z</i> 217 als Quantifier für Fructose und Xylit

5.4.1.4 Kinetische Studien

Zur Ermittlung der Michaelis-Menten Konstante K_m sowie der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} wurde die doppelt-reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk herangezogen. Die Inhibitorkonstante K_i und der Hemmungstyp wurden mit Hilfe der Auftragung nach Dixon bestimmt. Der IC_{50} -Wert ist definiert als die Konzentration des Enzyminhibitors, welche unter den gegebenen Assay-Bedingungen benötigt wird, um 50 % der Enzymaktivität zu inhibieren.

5.4.2 Enzymassays *in vivo*

5.4.2.1 Versuchstiere und deren Haltung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 80 acht Wochen alte männliche Wistar-Ratten der Firma Harlan Laboratories GmbH (Eystrup, Deutschland) mit einem Anfangsgewicht von 223,0 bis 252,5 g. Die Tiere wurden einzeln in Stahlgitter-Käfigen mit Böden auf Einstreu in einem klimatisierten Raum (21 °C) bei konstanter Luftfeuchtigkeit (37 %) und einem simuliertem Tag-Nacht-Zyklus (Hellphase: 6 - 18 Uhr) gehalten. Bis zum Versuchsbeginn standen den Tieren Futter (Altromin® 1320, Altromin Spezialfutter

GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland; Zusammensetzung s. Anhang, S. 143) und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

Der Tierversuch wurde von der Tierschutzbeauftragten der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg sowie vom Ethikkomitee des Landesverwaltungsamtes Sachsen-Anhalt, Halle (Saale), Referat Verbraucherschutz und Veterinärangelegenheiten, genehmigt. Während der gesamten Tierstudie wurden die Empfehlungen zur „Tiergerechten Haltung von Laborratten“ der Gesellschaft für Versuchstierkunde der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Deutschland) (GV-Solas) eingehalten [110].

5.4.2.2 Versuchsablauf

Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn über einen Zeitraum von zwei Wochen an ihre Umgebung und an den Menschen gewöhnt. Zur Ausführung des Tierversuchs wurden die Ratten in zwei Hauptgruppen (Saccharose und Stärke) zu jeweils 40 Tieren unterteilt. Jede Hauptgruppe wurde erneut in vier Teilgruppen zu je zehn Tieren gegliedert. Den Mitgliedern jeder Teilgruppe wurde entweder Aspalathin, (+)-Catechin oder Isoquercitrin verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt jeweils keinen Zusatz der Testsubstanzen (Tab. 33).

Tab. 33: Versuchsdesign *in vivo*-Versuch

Gruppe		Saccharose				Stärke			
Anzahl Tiere		40				40			
Untergruppe*		K	A	C	I	K	A	C	I
Anzahl Tiere		10	10	10	10	10	10	10	10

* K Kontrolle
 C (+)-Catechin
 A Aspalathin
 I Isoquercitrin

Die Verabreichung der Lösungen erfolgte oral per Schlundsonde. In Tab. 34 sind die verwendeten Schlundlösungen des Tierversuchs zusammengefasst. Die Polyphenole wurden kurz vor Verabreichung in der Saccharose- bzw. Stärke-Lösung gelöst. Den Tieren wurde ein Volumen von 10 ml/kg Körpergewicht appliziert [111].

Tab. 34: Verwendete Schlundlösungen

Schlundlösungen	Herstellung
Saccharose-Lösung (400 mg/ml)	40 g Saccharose ad 100 ml bidest. H ₂ O
Stärke-Lösung (400 mg/ml)	40 g lösliche Stärke Verrühren mit ca. 50 ml bidest. H ₂ O Einrühren der Mischung in 50 ml kochendes bidest. H ₂ O nochmaliges Aufkochen
Testsubstanz-Lösung (Zusatz von 10 % Testsubstanz)	40 mg des Polyphenols (Aspalathin, Isoquercitrin, (+)-Catechin) ad 1 ml Saccharose- bzw. Stärkel-Lösung

5.4.2.3 Messung der postprandialen Blutglucoseantwort

Nachdem die Tiere über einen Zeitraum von 12 h gefastet wurden, erfolgte entsprechend ihrem Körpergewicht die Verabreichung der Saccharose- bzw. Stärke-Lösung, jeweils mit Zusatz der Testsubstanzen sowie ohne Zusatz für die Kontrollgruppe. Die Blutglucosekonzentration wurde mit Hilfe eines Blutglucosemessgerätes unmittelbar vor der Verabreichung (0 min) sowie in periodischen Zeitabständen nach der Applikation (30, 60, 90, 120, 150 und 180 min) enzymatisch bestimmt. Dabei erfolgte die Blutentnahme (1 Tropfen = 3 µl) aus der Schwanzspitze nach Resektion von ca. 2-3 mm. Das Blut wurde durch leichtes Massieren und Ausstreifen des Schwanzes zur Spitze hin, unter Verwendung einer gleitenden Vaselinecreme, entnommen und direkt zur Messung eingesetzt. Die Messung erfolgte zweifach.

Zur Auswertung der Daten und zum Vergleich der postprandialen Blutglucoseantworten innerhalb der Teilgruppen wurden die erhaltenen Blutglucosewerte (mg/dl) in einem Diagramm gegen die Zeit (min) aufgetragen. Weiterhin wurden mit Hilfe des Trapezmodells die Flächen unter den Kurven nach 30, 60, 90, 120, 150 und 180 Minuten berechnet und als „incremental area under the curve“ (IAUC) angegeben.

5.4.2.4 Messung des Einflusses auf die Enzymaktivität

Nach einer einwöchigen Pause wurden erneut allen 80 genücherten Versuchstieren die Lösungen mit und ohne Testsubstanzen geschlundet (siehe 5.4.2.2). 30 Minuten nach der Stärke-Verabreichung bzw. 60 Minuten nach der Saccharose-Applikation wurden die Tiere nach Betäubung unter Kohlenstoffdioxidatmosphäre getötet. Nach der Dekapitation erfolgte das Absetzen des Magen-Darm-Traktes und schließlich die Entnahme des Dünndarms. Aus dem Inhalt (Stärke-Versuchsreihe) und der Mucosa (Saccharose-

Versuchsreihe) des Dünndarms wurden die Enzyme α -Amylase und Saccharase extrahiert und deren Aktivität bestimmt.

5.4.2.5 Saccharase-Assay – *in vivo*

Die Bestimmung der Saccharaseaktivität erfolgte aus der Mucosa des Dünndarms. Dazu wurde der entnommene Dünndarm in fünf äquidistante Segmente (vom Magen abwärts) unterteilt. Die Teilstücke wurden solange mit PBS-Puffer gespült bis sie vollständig entleert waren. Der Chymus wurde verworfen. Die feucht und kühl gehaltenen Abschnitte des Dünndarms wurden mit Hilfe einer Pinzette und Schere längs aufgeschnitten und die Mucosa mittels eines Objektträgers abgeschabt.

Tab. 35: Verwendete Lösungen für den Saccharase-Assay

Lösungen	Herstellung
10 mM PBS-Puffer pH 7,0	0,3 g Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat 8,76 g Natriumchlorid ad 1000 ml bidest. H ₂ O pH-Einstellung mit 1 N KOH oder 3 N o-H ₃ PO ₄
10 mM Phosphat-Puffer pH 7,0	1,876 g Dikaliumhydrogenphosphat Trihydrat 0,242 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1000 ml bidest. H ₂ O pH-Einstellung mit 1 N KOH oder 3 N o-H ₃ PO ₄
0,4 M Saccharose-Lösung (Substratlösung)	13,692 g Saccharose ad 100 ml bidest. H ₂ O
3,5-Dinitrosalicylat-Reagenz (Nachweisreagenz)	500 mg 3,5-Dinitrosalicylsäure einwiegen mit 10 ml 2 M Natriumhydroxid-Lösung lösen Zugabe von 25 ml 60 %ige Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung ad 50 ml bidest. H ₂ O 3 Tage abgedunkelt rühren
2 M Natriumhydroxid-Lösung	8 g NaOH ad 100 ml bidest. H ₂ O
Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung (60 %)	30 g Kalium-Natrium-Tartrat ad 50 ml bidest. H ₂ O
0,01 M Invertzuckerlösung (Kalibrierlösung)	90 mg Glucose 90 mg Fructose ad 100 ml 10 mM Phosphat-Puffer

Die Proben wurden 1:4 mit Phosphat-Puffer versetzt, mittels Ultra-Turrax homogenisiert und für 10 min bei 4 °C und 8000 rpm zentrifugiert. 100 μ l des Überstandes wurden zu 100 μ l Saccharose-Lösung pipettiert und 10 min bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 200 μ l DNS-Reagenz zugegeben und das Reaktionsgemisch für 5 min

bei 900 rpm und 99 °C im Thermomixer erhitzt. Nach der Zugabe von Phosphat-Puffer auf ein Endvolumen von 2,4 ml erfolgte die photometrische Vermessung der Extinktionen bei 540 nm.

Für die Kalibrierkurve wurden aus der Invertzucker-Stammlösung geeignete Volumina entnommen und mit 200 µl DNS-Reagenz versetzt. Die weitere Vorgehensweise erfolgte identisch den Proben (s. Anhang, Abb. 105, S. 149). Für jede Probe sowie Kalibrierlösung wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

5.4.2.6 α -Amylase-Assay – *in vivo*

Die Aktivität der α -Amylase wurde aus dem Dünndarmchymus bestimmt. Dazu wurde der Inhalt des entnommenen Dünndarms vorsichtig mit Daumen und Zeigefinger in ein Zentrifugen-Röhrchen ausgestreift. Das Ausstreifen wurde so oft wiederholt, bis der Dünndarm vollständig entleert war. Im Anschluss erfolgte das Zentrifugieren des Dünndarmchymus in einer Ultrahochgeschwindigkeitszentrifuge für 45 Minuten bei 4 °C und 15000 rpm. Die Enzymaktivität wurde über eine modifizierte Willstätter-Schudel-Methode bestimmt [104].

Tab. 36: Verwendete Lösungen für den α -Amylase-Assay

Lösungen	Herstellung
0,1 M Phosphat-Puffer pH 6,9	18,76 g Dikaliumhydrogenphosphat Trihydrat 2,42 g Kaliumdihydrogenphosphat ad 1000 ml bidest. H ₂ O pH-Einstellung mit 1 N KOH oder 3 N o-H ₃ PO ₄
Stärkelösung (4 %) (Substratlösung)	4 g lösliche Stärke Verrühren mit ca. 20 ml bidest. H ₂ O Einrühren der Mischung in 80 ml kochendes bidest. H ₂ O nochmaliges Aufkochen
0,1 N Iod-Kaliumiodid-Lösung (Lugolsche Lösung)	2,5 g Kaliumiodid mit ca. 4 ml bidest. H ₂ O lösen Zugabe von 1,28 g Iod und Mischen bis Iod gelöst vorliegt ad 100 ml bidest. H ₂ O
0,1 N Natriumhydroxid-Lösung	4 g NaOH ad 1000 ml bidest. H ₂ O
2 N Schwefelsäure	5,552 ml konz. H ₂ SO ₄ ad 100 ml bidest. H ₂ O
0,02 N Natriumthiosulfat-Lösung	0,5 g Natriumthiosulfat ad 100 ml bidest. H ₂ O

1 ml der Probe wurde mit 1 ml des Phosphat-Puffers und 2 ml der 4 %igen Stärkelösung versetzt. Nach der Inkubation dieses Reaktionsgemisches für fünf Minuten bei 37 °C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 3 ml Lugolsche Lösung und 5 ml Natriumhydroxid-Lösung gestoppt. Nach 15 min unter Lichtausschluss wurde 1 ml Schwefelsäure zum Reaktionsansatz pipettiert. Das überschüssige Iod wurde mit Natriumthiosulfat-Lösung zurücktitriert. Es wurde ebenfalls ein Blindwert angesetzt, der ohne Zusatz der Enzymlösung bestimmt wurde. Jede Bestimmung wurde dreifach angesetzt. Alle Enzymlösungen wurden während des Versuchs auf Eis gelagert.

5.4.2.7 Bestimmung des Proteingehaltes

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die Methode nach Bradford verwendet [101].

Tab. 37: Verwendete Lösungen zur Proteinbestimmung

Lösungen	Herstellung
BSA-Stammlösung (Kalibrierlösung)	10 mg BSA ad 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 6,9)
Bradford-Reagenz (Nachweisreagenz)	5 mg Coomassie Brilliant-Blau G-250 in 2,5 ml Ethanol lösen Zugabe von 5 ml o-Phosphorsäure (85 %) ad 50 ml bidest. H ₂ O und filtrieren (frisch herstellen)

Für die Kalibrierkurve wurden aus der BSA-Stammlösung geeignete Verdünnungsstufen angefertigt. Die Kalibrierlösungen wurden mit 0,1 M Phosphatpuffer (Tab. 37) verdünnt. Es wurde je 1 ml der verdünnten Kalibrierlösungen mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Nach zwei Minuten wurde die Extinktion bei 595 nm vermessen (s. Anhang, Abb. 104, S. 148).

Die aufgearbeiteten Proben aus 5.4.2.5 und 5.4.2.6 wurden 1:1000 mit 0,1 M Phosphatpuffer verdünnt und der Proteingehalt wie oben beschrieben bestimmt. Für jede Probe sowie Kalibrierlösung wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

5.4.2.8 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Zur Analyse der Messdaten wurden die einfaktorielle ANOVA sowie der Ausreißertest nach Nalimov angewendet. Mit Hilfe des Tukey-Tests wurde das Auftreten signifikanter Unterschiede zwischen den Mittelwerten untersucht. Eine statistische Signifikanz war gegeben wenn $P < 0,05$.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Wirtschaftsvereinigung Kräuter- und Fruchtee e.V., Marktreport: Kräuter und Fruchteees mit Absatzplus in 2008, Online im Internet: URL: <http://www.wkf.de/article/articleview/350/1/6/> (Stand: 30.12.2012).
- [2] Koeppen, B. H., Roux, D. G. C-Glycosylflavonoids - The chemistry of aspalathin. *Biochem. J.* **1966**, *99*, 604-609.
- [3] Krafczyk, N., Heinrich, T., Porzel, A., Glomb, M. A. Oxidation of the dihydrochalcone aspalathin leads to dimerization. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6838-6843.
- [4] Bailey, R. G., Nursten, H. E., McDowell, I. The chemical oxidation of catechins and other phenolics: A study of the formation of black tea pigments. *J. Sci. Food Agric.* **1993**, *63*, 455-464.
- [5] Graham, H. N. The polyphenols of tea – Biochemistry and significance – A review. *Bulletin de Liaison – Groupe Polyphenols* **1992**, *16*, 32-43.
- [6] Graham, H. N. Green tea composition, consumption, and polyphenols chemistry. *Prev. Med.* **1992**, *21*, 334-350.
- [7] Krafczyk, N., Glomb, M. A. Characterization of phenolic compounds in rooibos tea. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3368-3376.
- [8] Marais, C., van Rensburg, W. J., Ferreira, D., Steenkamp, J. A. (S)- and (R)-Eriodictyol-6-C- β -D-glucopyranoside, novel keys to the fermentation of rooibos (*Aspalathus linearis*). *Phytochemistry* **2000**, *55*, 43-49.
- [9] Hofmann, T. Characterization of the most intense coloured compounds from Maillard reactions of pentoses by application of colour dilution analysis. *Carbohydr. Res.* **1998**, *313*, 203-213.
- [10] Degenhardt, A., Hofmann, S., Knapp, H. Winterhalter, P. Preparative isolation of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and application of the color activity concept to red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5812-5818.
- [11] Marnewick, J. L., Gelderblom, W. C. A., Joubert, E. An investigation on the antimutagenic properties of South African herbal teas. *Mutation Research* **2000**, *471*, 157-166.
- [12] Snijman, P. W., Swanevelder, S., Joubert, E., Green, I. R., Gelderblom, W. C. A. The antimutagenic activity of the major flavonoids of rooibos (*Aspalathus linearis*): Some dose-response effects on mutagen activation-flavonoid interactions. *Mutation Research* **2007**, *631*, 111-123.
- [13] McKay, D. L., Blumberg, J. B. A review of the bioactivity of South African herbal teas: Rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia intermedia*). *Phytotherapy Research* **2007**, *21*, 1-16.

- [14] Von Gadow, A., Joubert, E., Hansmann, C. F. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry* **1997**, *60* (1), 73-77.
- [15] Morton, J. F. Rooibos tea, *Aspalathus linearis*, a caffeineless, low-tannin beverage. *Economic Botany* **1983**, *37* (2), 164-173.
- [16] Kawano, A., Nakamura, H., Hata, S., Minakawa, M. *et al.* Hypoglycemic effect of aspalathin, a rooibos tea component from *Aspalathus linearis*, in type 2 diabetic model db/db mice. *Phytomedicine* **2009**, *16* (5), 437-443.
- [17] Li, W. L., Zheng, H. C., Bukuru, J., De Kimpe, N. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology* **2004**, *92*, 1-21.
- [18] Kerner, W., Fuchs, C., Redaelli, M., Böhm, B. O. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Deutsche Evidenzbasierte Diabetesleitlinie der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG)* **2001**.
- [19] Moller, D. E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* **2001**, *414*, 821-827.
- [20] Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. Global prevalence of diabetes – Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **2004**, *27*, 1047-1053.
- [21] Deshpande, M. C., Venkateswarlu, V., Babu, R. K., Trivedi, R. K. Design and evaluation of oral bioadhesive controlled release formulations of miglitol, intended for prolonged inhibition of intestinal α -glucosidases and enhancement of plasma glucagon like peptide-1 levels. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *380*, 16-24.
- [22] Kumar, S., Narwal, S., Kumar, V., Prakash, O. α -Glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Phcog. Rev.* **2011**, *5* (9), 19-29.
- [23] Chiasson, J.-L., Josse, R. G., Gomis, R., Hanefeld, M. *et al.* Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *The Lancet* **2002**, *359*, 2072-2077.
- [24] Hanefeld, M. The role of acarbose in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Diabetes Complications* **1998**, *12* (4), 228-237.
- [25] Hara, Y., Honda, M. The inhibition of α -amylase by tea polyphenols. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54* (8), 1939-1945.
- [26] Honda, M., Hara, Y. Inhibition of rat small intestinal sucrase and α -glucosidase activities by tea polyphenols. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, *57* (1), 123-124.
- [27] Matsui, T., Tanaka, T., Tamura, S., Toshima, A. *et al.* α -Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 99-105.
- [28] Matsumoto, N., Ishigaki, F., Ishigaki, A., Iwashina, H., Hara, Y. Reduction of blood glucose levels by tea catechin. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, *57* (4), 525-527.

- [29] Igarashi, K., Honma, K., Yoshinari, O., Nanjo, F., Hara, Y. Effects of dietary catechins on glucose tolerance, blood pressure and oxidative status in Goto-Kakizaki rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2007**, *53*, 496-500.
- [30] Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1001-1043.
- [31] Bravo, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* **1998**, *56* (11), 317-333.
- [32] Ross, J. A., Kasum, C. M. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 19-34.
- [33] Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* **1999**, *66*, 401-436.
- [34] Robbins, R. J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2866-2887.
- [35] Watzl, B., Rechkemmer, G. Phenolsäuren. *Ernährungs-Umschau* **2001**, *48* (10), 413-416.
- [36] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* **1996**, *20* (7), 933-956.
- [37] Davies, K. M., Schwinn, K. E. Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis. *Flavonoids – Chemistry, biochemistry and application*, 1. Auflage, **2005**, Andersen, O. M., Markham, K. R. CRC Press, Taylor and Francis group, Broken, USA.
- [38] Watzl, B., Briviba, K., Rechkemmer, G. Anthocyane. *Ernährungs-Umschau* **2002**, *49* (4), 148-150.
- [39] Cook, N. C., Samman, S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry* **1996**, *7*, 66-76.
- [40] Koes, R. E., Quattrocchio, F., Mol, J. N. M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: Function and evolution. *BioEssays* **1994**, *16* (2), 123-132.
- [41] Haslam, E. Thoughts on thearubigins. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 61-73.
- [42] Matsuo, Y., Tanaka, T., Kouno, I. A new mechanism for oxidation of epigallocatechin and production of benzotropolone pigments. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 4774-4783.
- [43] Hashimoto, F., Nonaka, G., Nishioka, I. Tannins and related compounds. LXIX. – Isolation and structure elucidation of B,B'-linked bisflavanoids, theasinensins D-G and oolongtheanin from oolong tea. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36* (5), 1676-1684.
- [44] Matsuo, Y., Tanaka, T., Kouno, I. Production mechanism of proepitheafagallin, a precursor of benzotropolone-type black tea pigment, derived from epigallocatechin via a bicycle[3.2.1]octane-type intermediate. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50*, 1348-1351.

- [45] Tanaka, T., Kouno, I. Oxidation of tea catechins: Chemical structures and reaction mechanism. *Food Sci. Technol. Res.* **2003**, 9 (2), 128-133.
- [46] Berkowitz, J. E., Coggon, P., Sanderson, G. W. Formation of epigallocatechin gallate and its transformation to thearubigin during tea fermentation. *Phytochemistry* **1971**, 10, 2271-2278.
- [47] Joubert, E., Gelderblom, W. C. A., Louw, A., De Beer, D. South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia* spp. and *Athrixia phylicoides* – A review. *Journal of Ethnopharmacology* **2008**, 119, 376-412.
- [48] Bechthold, A. Kräuter- und Früchtetee – Trendgetränk mit Heilwirkung? *Ernährungslehre und –praxis, Ernährungs-Umschau* **2005**, B46-B48.
- [49] Hillis, W. E., Inoue, T. The polyphenols of *Nothofagus* species – II. The heartwood of *Nothofagus fusca*. *Phytochemistry* **1967**, 6, 59-67.
- [50] Bramati, L., Aquilano, F., Pietta, P. Unfermented rooibos tea: Quantitative characterization of flavonoids by HPLC-UV and determination of the total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 7472-7474.
- [51] Baranska, M., Schulz, H., Joubert, E., Manley, M. In situ flavonoid analysis by FT-Raman spectroscopy: Identification, distribution, and quantification of aspalathin in green rooibos (*Aspalathus linearis*). *Anal. Chem.* **2006**, 78, 7716-7721.
- [52] Joubert, E. HPLC quantification of the dihydrochalcones, aspalathin and nothofagin in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by processing. *Food Chemistry* **1996**, 55 (4), 403-411.
- [53] Koeppen, B. H., Smit, C. J. B., Roux, D. G. The flavone C-glycosides and flavonol O-glycosides of *Aspalathus acuminatus* (rooibos tea). *Biochem. J.* **1962**, 83, 507-511.
- [54] Koeppen, B. H., Roux, D. G. C-Glycosylflavonoids – The chemistry of orientin and iso-orientin. *Biochem. J.* **1965**, 97, 444-448.
- [55] Koeppen, B. H., Roux, D. G. Aspalathin: A novel C-glycosylflavonoid from *Aspalathus linearis*. *Tetrahedron Letters* **1965**, 39, 3497-3503.
- [56] Snyckers, F. O., Salemi, G. Studies of the South African medicinal plants (Isolation and identification of quercetin and luteolin). *J. of the South African Chem. Inst.* **1974**, 27, 5-7.
- [57] Rabe, C., Steenkamp, J. A., Joubert, E., Burger, J. F. W., Ferreira, D. Phenolic metabolites from rooibos tea (*Aspalathus linearis*). *Phytochemistry* **1994**, 35 (6), 1559-1565.
- [58] Ferreira, D., Marais, C., Steenkamp, J. A., Joubert, E. Rooibos tea as a likely Health Food Supplement. In *Processing of Recent Developments of Technologies and Fundamental Foods for Health*. Korean Society of Food Science and Technology **1995**, 73-78.
- [59] Habu, T., Flath, R. A., Mon, T. R., Morton, J. F. Volatile components of rooibos tea (*Aspalathus linearis*). *J. Agric. Food Chem.* **1985**, 33, 249-254.

- [60] Kawakami, M., Kobayashi, A., Kator, K. Volatile constituents of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by extraction process. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 633-636.
- [61] Schmandke, H. Antioxidantien in Rooibostee: Dihydrochalkone und Flavonoide. *Ernährungs-Umschau* **2005**, *52* (1), 18-20.
- [62] Krafczyk, N., Woyand, F., Glomb, M. A. Structure-antioxidant relationship of flavonoids from fermented rooibos. *Mol. Nutr. Food Res.* **2009**, *53*, 635-642.
- [63] Snijman, P. W., Joubert, E., Ferreira, D., Li, X.-C. *et al.* Antioxidant activity of the dihydrochalcones aspalathin and nothofagin and their corresponding flavones in relation to other rooibos (*Aspalathus linearis*) flavonoids, epigallocatechin gallate, and trolox. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6678-6684.
- [64] Hofmann, T. Studies on the influence of the solvent on the contribution of single Maillard reaction products to the total color of browned pentose/alanine solutions – A quantitative correlation using the color activity concept. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3912-3917.
- [65] Frank, O., Hofmann, T. Characterization of key chromophores formed by nonenzymatic browning of hexoses and L-alanine by using the color activity concept. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 6303-6311.
- [66] Schmidt, W. Optische Spektroskopie – Eine Einführung. 2. Auflage, **2000**, WILEY-VCH Verlag GmbH.
- [67] Ranjbar, B., Gill, P. Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses – A review. *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 101-120.
- [68] Schellenberger, A., Fischer, G., Hübner, G., Ulbrich, R. Enzymkatalyse – Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme. 1. Auflage, **1989**, VEB Gustav Fischer Verlag Jena.
- [69] Löffler, G., Petrides, P. E., Heinrich, P. C. Biochemie und Pathobiochemie. 8., völlig neu bearbeitete Auflage, **2007**, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- [70] Doenecke, D., Koolman, J., Fuchs, G., Gerok, W. Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. 15., komplett überarbeitete und neugestaltete Auflage, **2005**, Georg Thieme Verlag KG.
- [71] Taylor, K. B. Enzyme Kinetics and Mechanisms. 1. Auflage, **2002**, Kluwer Academic Publishers.
- [72] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. Biochemie. 5. Auflage, **2003**, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- [73] Bisswanger, H. Enzymkinetik – Theorie und Methoden. 3., neu bearbeitete Auflage, **2000**, WILEY-VCH Verlag GmbH.
- [74] Schmidt, R. F., Lang, F. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 30., neu bearbeitete und aktualisierte Auflage, **2007**, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- [75] Koshland, D. E. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **1953**, *28*, 416-436.

- [76] Davies, G., Henrissat, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* **1995**, *3*, 853-859.
- [77] Matthews, B. W., Remington, S. J. The three dimensional structure of the lysozyme from bacteriophage T4. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1974**, *71* (10), 4178-4182.
- [78] Heightman, T. D., Vasella, A. T. Neue Erkenntnisse über Hemmung, Struktur und Mechanismus konfigurationserhaltender Glycosidasen. *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 794-815.
- [79] Zechel, D. L., Withers, S. G. Glycosidase mechanisms: Anatomy of a finely tuned catalyt. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 11-18.
- [80] Hauner, H. Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2010. diabetesDE, **2010**, Kirchheim + Co GmbH.
- [81] WHO Consultation: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional Report of a WHO Consultation. WHO/NCD/NCS/99.2. **1999**, 1-59.
- [82] Wehling, M. Klinische Pharmakologie. 2. Auflage, **2011**, Georg Thieme Verlag KG.
- [83] Haupt, A., Häring, H.-U., Matthaei, S. Nationale Versorgungsleitlinien – Neue Aspekte zur Therapie des Typ 2 Diabetes mellitus. *MMW-Fortschr. Med.* **2003**, *145* (26), 609-614.
- [84] Kazuno, S., Yanagida, M., Shindo, N., Murayama, K. Mass spectrometric identification and quantification of glycosyl flavonoids, including dihydrochalcones with neutral loss scan mode. *Analytical Biochemistry* **2005**, *347*, 182-192.
- [85] Bravo, A., Herrera, J. C., Scherer, E., Ju-Nam, Y. Formation of α -dicarbonyl compounds in beer during storage of Pilsner. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4134-4144.
- [86] Li, Q. M., Van den Heuvel, H., Dillen, L., Claeys, M. Differentiation of 6-C- and 8-C-glycosidic flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry* **1992**, *21*, 213-221.
- [87] Acuna, A. U., Amat-Guerri, F., Morcillo, P., Liras, M., Rodriguez, B. Structure and formation of the fluorescent compound of *Lignum nephriticum*. *Organic Letters* **2009**, *11* (14), 3020-3023.
- [88] Le Guernevé, C., Sanoner, P., Drilleau, J.-F., Guyot, S. New compounds obtained by enzymatic oxidation of phloridzin. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 6673-6677.
- [89] Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K., Matsuoka, T. Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by flavonoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2006**, *52*, 149-153.
- [90] Jansen, A. P., Wydeveld, P. G. A. B. α -(*p*-Nitrophenyl)maltoside as a substrate for the assay of amylase. *Nature* **1958**, *182*, 525-526.
- [91] Berthelot, K., Delmotte, F. M. Purification and characterization of an α -glucosidase from *Rhizobium* sp. (*Robinia pseudoacacia* L.) strain USDA 4280. *Applied and Environmental Microbiology* **1999**, *65* (7), 2907-2911.

- [92] Mantani, N., Imanishi, N., Kawamata, H., Terasawa, K., Ochiai, H. Inhibitory effect of (+)-catechin on the growth of Influenza A/PR/8 virus in MDCK cells. *Planta Med.* **2001**, *67*, 240-243.
- [93] Gillard, B. K., Markman, H. C., Feig, S. A. Direct spectrophotometric determination of α -amylase activity in saliva, with *p*-nitrophenyl α -maltoside as substrate. *Clin. Chem.* **1977**, *23* (12), 2279-2282.
- [94] Huang, Y. H., Picha, D. H., Johnson, C. E. An alternative method for enzymatic assay of plant invertases. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3158-3161.
- [95] Messer, M., Dahlqvist, A. A one-step ultramicro method for the assay of intestinal disaccharidases. *Analytical Biochemistry* **1966**, *14*, 376-392.
- [96] Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **1944**, *153*, 375-380.
- [97] Somogyi, M. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **1952**, *195*, 19-23.
- [98] Hatanaka, C., Kobara, Y. Determination of glucose by a modification of Somogyi-Nelson method. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44* (12), 2943-2949.
- [99] Becker, H. G. O., Berger, W., Domschke, G., Fanghänel, E. *et al.* Organikum – Organisch-chemisches Grundpraktikum. 21., neu bearbeitete und erweiterte Auflage, **2001**, WILEY-VCH Verlag GmbH.
- [100] Jo, S.-H., Ha, K.-S., Moon, K.-S., Lee, O.-H. *et al.* *In vitro* and *in vivo* anti-hyperglycemic effects of Omija (*Schizandra chinensis*) fruit. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 1359-1370.
- [101] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248-254.
- [102] Pierce, J., Suelter, C. H. An evaluation of the Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination. *Analytical Biochemistry* **1977**, *81*, 478-480.
- [103] Lee, M.-F., Russell, R. M., Montgomery, R. K., Krasinski, S. D. Total intestinal lactase and sucrase activities are reduced in aged rats. *J. Nutr.* **1997**, *127*, 1382-1387.
- [104] Willstätter, R., Schudel, G. Bestimmung von Traubenzucker mit Hypojodit. *Bericht Deutscher Chemischer Gesellschaft* **1918**, *51*, 780-781.
- [105] Xie, G., He, R.-R., Feng, X., Yan, T. *et al.* The hypoglycemic effects of *Camellia assamica* var. *kucha* extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74* (2), 405-407.
- [106] Rempel, B. P., Withers, S. G. Covalent inhibitors of glycosidases and their applications in biochemistry and biology. *Glycobiology* **2008**, *18* (8), 570-586.
- [107] Lo Piparo, E., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G. *et al.* Flavonoids for controlling starch digestion: Structural requirements for inhibiting human α -amylase. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3555-3561.

-
- [108] Gontijo, N. F., Melo, M. N., Riani, E. B., Almeida-Silva, S., Mares-Guia, M. L. Glycosidases in *Leishmania* and their importance for *Leishmania* in phlebotomine sandflies with special reference to purification and characterization of a sucrase. *Experimental Parasitology* **1996**, *83*, 117-124.
- [109] Kaltofen, R., Opitz, R., Schumann, K., Ziemann, J. Tabellenbuch Chemie. 13., durchgesehene Auflage, **1998**, Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt am Main.
- [110] Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung, Tiergerechte Haltung von Laborratten. *Gesellschaft für Versuchstierkunde* **2004**.
- [111] Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz, Empfohlene Volumina für die Applikation von Substanzen bei Versuchstieren. *Gesellschaft für Versuchstierkunde* **2010**.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Oxidative Veränderungen phenolischer Verbindungen katalysiert durch Polyphenoloxidasen (PPO)	4
Abb. 2:	Biosyntheseweg von Phenylalanin innerhalb des Shikimisäureweges	6
Abb. 3:	Biosyntheseweg von Hydroxybenzoesäure- und Hydroxyzimtsäurederivaten innerhalb des Phenylpropanoidweges.....	7
Abb. 4:	Flavonoid-Grundgerüst.....	8
Abb. 5:	Grundstrukturen der sechs Flavonoid-Hauptgruppen	8
Abb. 6:	Grundstrukturen weiterer Flavonoid-Gruppen	9
Abb. 7:	Biosyntheseweg von Flavonoiden innerhalb des Phenylpropanoidweges	10
Abb. 8:	Strukturen der wichtigsten Catechine in frischen Teeblättern	12
Abb. 9:	Enzymatische Oxidation der Catechine zum α -Chinon durch PPO.....	13
Abb. 10:	Bildung der Theasinensine A, B und C.....	13
Abb. 11:	Strukturen der Theaflavine	14
Abb. 12:	Bildung der Theaflavine.....	15
Abb. 13:	Strukturen der Epitheaflavinsäuren	16
Abb. 14:	Oxidativer Abbau von Aspalathin zu Orientin über Flavanon-C-glycoside und Isoorientin	21
Abb. 15:	Schema der Enzymkatalyse	24
Abb. 16:	Reaktionsschema einer enzymkatalysierten Reaktion	26
Abb. 17:	Geschwindigkeits-Konzentrations-Diagramm.....	27
Abb. 18:	Lineweaver-Burk-Diagramm.....	27
Abb. 19:	Reaktionsschema der kompetitiven Hemmung	29
Abb. 20:	Lineweaver-Burk-Diagramm in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen eines kompetitiven Inhibitors	29
Abb. 21:	Reaktionsschema der nicht-kompetitiven Hemmung	30
Abb. 22:	Lineweaver-Burk-Diagramm in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen eines nicht-kompetitiven Inhibitors	30
Abb. 23:	Reaktionsschema der unkompetitiven Hemmung	31
Abb. 24:	Lineweaver-Burk-Diagramm in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen eines unkompetitiven Inhibitors	31
Abb. 25:	Reaktionsschema der partiell kompetitiven Hemmung	32
Abb. 26:	Dixon-Diagramme für einen kompetitiven, nicht-kompetitiven und unkompetitiven Inhibitor in Gegenwart unterschiedlicher Substratkonzentrationen.....	32
Abb. 27:	Spaltung der α -1,4-glycosidischen Bindung von Stärke durch α -Amylase	34

Abb. 28: Hydrolyse von Saccharose durch Saccharase.....	35
Abb. 29: Mechanismen der enzymkatalysierten Hydrolyse glycosidischer Verbindungen	36
Abb. 30: HPLC-Chromatogramm einer 4 h-Inkubation von Aspalathin	41
Abb. 31: Abbau von Aspalathin zu den Verbindungen 1, 2, 4 und 5 und Bräunung.....	42
Abb. 32: Struktur der Dimere 1 und 2 mit ausgewählten HMBC-Korrelationen.....	43
Abb. 33: Circular-Dichroismus-Spektren der Dimere 1 und 2.....	44
Abb. 34: Postulierter Bildungsweg der Dimere 1 und 2.....	45
Abb. 35: Struktur des Dimers 5 mit ausgewählten HMBC-Korrelationen.....	46
Abb. 36: Postulierter Bildungsmechanismus der Dimere 4 und 5.....	47
Abb. 37: GC-Chromatogramm einer 2 h-Inkubation von Aspalathin.....	48
Abb. 38: Postulierter Bildungsweg der Dihydrokaffeesäure.....	48
Abb. 39: XIC einer 7 h-Inkubation von Aspalathin	49
Abb. 40: Strukturvorschlag der Aspalathin-Dihydrokaffeesäure-Addukte 7 und 8.....	49
Abb. 41: Postulierter Bildungsmechanismus der Aspalathin-Dihydrokaffeesäure- Addukte 7 und 8	50
Abb. 42: HPLC-Chromatogramm einer Aspalathin-Inkubation nach 12 h bzw. 24 h.....	51
Abb. 43: HPLC-Chromatogramm einer Aspalathin-Inkubation mit OPD.....	52
Abb. 44: Struktur der Chinoxaline 13 und 14 mit ausgewählten HMBC-Korrelationen....	52
Abb. 45: Postulierter Bildungsmechanismus der farbigen Dibenzofurane 11 und 12.....	54
Abb. 46: Bildung der Precursor- 9, 10 und Dibenzofuran-Strukturen 11, 12 aus Aspalathin.....	55
Abb. 47: HPLC-Chromatogramm und Farbverdünnungsanalyse-Chromatogramm einer 24 h Aspalathin-Inkubation	56
Abb. 48: Reaktion der α -Glucosidase mit <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid.....	58
Abb. 49: Übersicht über die in den Enzymassays eingesetzten polyphenolischen Verbindungen	59
Abb. 50: v-S-Diagramm für die Reaktion α -Glucosidase mit <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-gluco- pyranosid in der Gegenwart verschiedener (+)-Catechin-Konzentrationen	59
Abb. 51: Lineweaver-Burk-Diagramm der unkompetitiven Hemmung von α -Gluco- sidase durch Aspalathin	60
Abb. 52: Dixon-Diagramm der Umsetzung von <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid durch α -Glucosidase in Gegenwart verschiedener (+)-Catechin-Konzentrationen	61
Abb. 53: Reaktion der α -Amylase mit <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-maltosid.....	61
Abb. 54: Dixon-Diagramm der Umsetzung von <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-maltosid durch α -Amylase in Gegenwart verschiedener (+)-Catechin-Konzentrationen	62

Abb. 55: Oximierung der während der Hydrolyse freigesetzten D-Fructose	63
Abb. 56: Lineweaver-Burk-Diagramm der kompetitiven Hemmung von Saccharase durch (+)-Catechin.....	64
Abb. 57: Dixon-Diagramm der Umsetzung von Saccharose durch Saccharase in Gegenwart verschiedener (+)-Catechin-Konzentrationen	64
Abb. 58: Einfluss der Polyphenole auf die postprandiale Blutglucoseantwort nach der Verabreichung von Saccharose	65
Abb. 59: Einfluss der Polyphenole auf die Flächen unter den Blutglucoseantwortkurven (IAUC) nach der Applikation von Saccharose	66
Abb. 60: Einfluss der Polyphenole auf die postprandiale Blutglucoseantwort nach der Verabreichung von Stärke.....	67
Abb. 61: Einfluss der Polyphenole auf die Flächen unter den Blutglucoseantwortkurven (IAUC) nach der Applikation von Stärke	68
Abb. 62: Nachweisreaktion von Saccharase mit DNS-Reagenz	69
Abb. 63: Auswirkung der Polyphenole auf die Saccharaseaktivität entlang der Dünndarmsegmente	70
Abb. 64: Nachweisreaktionen des α -Amylase-Assays	71
Abb. 65: Auswirkung der Polyphenole auf die α -Amylaseaktivität in den Dünndarmsegmenten	72
Abb. 66: Bevorzugte Hydroxylfunktionen der Polyphenole für die Interaktion mit den Aminosäureseitenketten der α -Amylase	73
Abb. 67: Q1-Spektrum von Dimer 1	120
Abb. 68: Q1-Spektrum von Dimer 4.....	120
Abb. 69: Q1-Spektrum von Dimer 5.....	121
Abb. 70: HR-MS-Spektren von Dimer 1 und Dimer 2 sowie deren mögliche berechnete Summenformeln	121
Abb. 71: HR-MS-Spektrum von Dimer 5 und dessen mögliche berechnete Summenformeln	121
Abb. 72: ^1H -Spektrum Dimer 1 (Ausschnitt)	124
Abb. 73: HMBC-Spektrum Dimer 1 (Ausschnitt).....	124
Abb. 74: HMBC-Spektrum Dimer 1 (Ausschnitt).....	125
Abb. 75: MS^2 -Spektrum und zugeordnete Fragmentierungen von Dimer 1.....	125
Abb. 76: Isomerisierungsexperiment: Umwandlung von Dimer 1 in Dimer 2.....	126
Abb. 77: HMBC-Spektrum Dimer 5 (Ausschnitt).....	128
Abb. 78: HMBC-Spektrum Dimer 5 (Ausschnitt).....	128
Abb. 79: HPLC-Chromatogramme einer 6 h-Inkubation von Aspalathin sowie einer 1 h-Reinkubation der Dimere 1 und 2.....	129

Abb. 80: Massenspektrum und zugeordnete Fragmentierungen von Dihydrokaffeensäure.....	129
Abb. 81: MS ² -Spektrum und zugeordnete Fragmentierungen von Aspalathin-Dihydrokaffeensäure-Addukt 7	130
Abb. 82: Q1-Spektrum von Precursor 9	130
Abb. 83: Q1-Spektrum von Dibenzofuran 11	131
Abb. 84: UPLC-Chromatogramm-Ausschnitt und TOF-MS-Spektren von Precursor 9 und 10	131
Abb. 85: HR-MS-Spektren von Dibenzofuran 11 und Dibenzofuran 12 sowie deren mögliche berechnete Summenformeln.....	132
Abb. 86: MS ² -Spektrum und zugeordnete Fragmentierungen von Dibenzofuran 11	132
Abb. 87: Q1-Spektrum von Chinoxalin 13.....	133
Abb. 88: HR-MS-Spektren von Chinoxalin 13 und Chinoxalin 14 sowie deren mögliche berechnete Summenformeln.....	133
Abb. 89: ¹ H-Spektrum Chinoxalin 13 (Ausschnitt)	135
Abb. 90: HMBC-Spektrum Chinoxalin 13 (Ausschnitt).....	135
Abb. 91: ¹ H-COSY-Spektrum Chinoxalin 13 (Ausschnitt).....	136
Abb. 92: HMBC-Spektrum Chinoxalin 13 (Ausschnitt).....	136
Abb. 93: TIC einer Inkubation von fermentiertem Rooibostee mit OPD	137
Abb. 94: Kalibrierung <i>p</i> -Nitrophenol.....	137
Abb. 95: v-S-Diagramm für die Reaktion von α -Glucosidase mit <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid in der Gegenwart verschiedener Aspalathin-Konzentrationen.....	138
Abb. 96: v-S-Diagramm für die Reaktion von α -Glucosidase mit <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid in der Gegenwart verschiedener Isoquercitrin-Konzentrationen.....	138
Abb. 97: Lineweaver-Burk-Diagramm der unkompetitiven Hemmung von α -Glucosidase durch (+)-Catechin	139
Abb. 98: Lineweaver-Burk-Diagramm der unkompetitiven Hemmung von α -Glucosidase durch Isoquercitrin.....	139
Abb. 99: Dixon-Diagramm der Umsetzung <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid durch α -Glucosidase in Gegenwart verschiedener Aspalathin-Konzentrationen	140
Abb. 100: Dixon-Diagramm der Umsetzung <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid durch α -Glucosidase in Gegenwart verschiedener Isoquercitrin-Konzentrationen ...	140
Abb. 101: v-S-Diagramm für die Reaktion von α -Amylase mit <i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-maltosid in der Gegenwart verschiedener Aspalathin-Konzentrationen.....	141
Abb. 102: Lineweaver-Burk-Diagramm der unkompetitiven Hemmung von α -Amylase durch Aspalathin	141

Abb. 103: v-S-Diagramm für die Reaktion von Saccharase mit Saccharose in der Gegenwart verschiedener (+)-Catechin-Konzentrationen	142
Abb. 104: Kalibrierung Bradford-Assay	148
Abb. 105: Kalibrierung Saccharase-Assay	149

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Vertreter der Phenolcarbonsäuren	5
Tab. 2:	Chemische Strukturen der Flavonoide und Dihydrochalcone des Rooibostees.....	18
Tab. 3:	Antioxidative Aktivität von Aspalathin und einigen Flavonoiden im Vergleich mit α -Tocopherol	19
Tab. 4:	Gehalte an Aspalathin und ausgewählten Flavonoiden im wässrigen Extrakt ..	20
Tab. 5:	Einteilung der Enzyme.....	25
Tab. 6:	Gleichungen zur Berechnung der K_i	33
Tab. 7:	Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus beim OGTT.....	38
Tab. 8:	Klinische Charakteristika für Typ 1- und Typ 2-Diabetes (Auswahl)	39
Tab. 9:	Orale Antidiabetika	40
Tab. 10:	Ermittelte Molekülmassen m/z für die Signale 1, 2, 4 und 5	42
Tab. 11:	Ermittelte Molekülmassen m/z für Signale 9, 10, 11 und 12	51
Tab. 12:	Ermittelte IC_{50} -Werte und Inhibitorkonstanten K_i der <i>in vitro</i> Enzymassays	60
Tab. 13:	Reduktion der Flächen unter den Blutglucoseantwortkurven in % bezogen auf 100 % Saccharose-Kontrolle	67
Tab. 14:	Reduktion der Flächen unter den Blutglucoseantwortkurven in % bezogen auf 100 % Stärke-Kontrolle.....	69
Tab. 15:	Verwendete Laufmittel.....	82
Tab. 16:	Verwendete Lösungen für die Aspalathin-Inkubationen	83
Tab. 17:	Messbedingungen RP18-Säulenchromatographie.....	84
Tab. 18:	Messbedingungen der analytischen HPLC – Methode A.....	85
Tab. 19:	Messbedingungen der analytischen HPLC – Methode B	86
Tab. 20:	Messbedingungen der analytischen HPLC – Methode C.....	86
Tab. 21:	Messbedingungen LC-MS/MS – Verbindungen 1, 2, 4 und 5	87
Tab. 22:	Messbedingungen LC-MS/MS – Dihydrokaffeesäure-Folgeprodukte 7 und 8 ..	87
Tab. 23:	Messbedingungen LC-MS/MS – Verbindungen 9, 10, 11 und 12	88
Tab. 24:	Messbedingungen GC-MS – Aspalathin-Inkubationen.....	89
Tab. 25:	Messbedingungen MLCCC	90
Tab. 26:	Messbedingungen präparative HPLC.....	91
Tab. 27:	Messbedingungen UPLC-TOF-MS.....	91
Tab. 28:	Messbedingungen CD-Spektroskopie	92
Tab. 29:	Herkunfts- und Kenndaten der verwendeten Enzyme sowie deren Substrate ..	94
Tab. 30:	Verwendete Lösungspuffer der Enzymassays	94

Tab. 31: Parameter der <i>in vitro</i> Assay-Bestimmungen	95
Tab. 32: Messbedingungen GC-MS – Saccharase-Assay	96
Tab. 33: Versuchsdesign <i>in vivo</i> -Versuch	97
Tab. 34: Verwendete Schlundlösungen.....	98
Tab. 35: Verwendete Lösungen für den Saccharase-Assay	99
Tab. 36: Verwendete Lösungen für den α -Amylase-Assay	100
Tab. 37: Verwendete Lösungen zur Proteinbestimmung.....	101
Tab. 38: ^1H - und ^{13}C -NMR spektroskopische Daten der Dimere 1 und 2 sowie ausgewählte HMBC-Korrelationen beider Dimere.....	122
Tab. 39: ^1H - und ^{13}C -NMR spektroskopische Daten des Dimers 5 sowie ausgewählte HMBC-Korrelationen der Verbindung.....	127
Tab. 40: ^1H - und ^{13}C -NMR spektroskopische Daten der Chinoxaline 13 und 14 sowie ausgewählte HMBC-Korrelationen beider Substanzen	134
Tab. 41: Futterzusammensetzung Altromin [®]	143
Tab. 42: Vitamine des Futters.....	143
Tab. 43: Aminosäuren des Futters	143
Tab. 44: Postprandiale Blutglucosekonzentrationen Saccharose	144
Tab. 45: Postprandiale Blutglucosekonzentrationen Stärke	146
Tab. 46: Flächen unter den Blutglucoseantwortkurven der Saccharose-Gruppe	148
Tab. 47: Flächen unter den Blutglucoseantwortkurven der Stärke-Gruppe.....	148
Tab. 48: Saccharaseaktivitäten	149
Tab. 49: α -Amylaseaktivitäten	151

9 Abkürzungsverzeichnis

4CL	4-Coumarsäure-CoA-Ligase
Abb.	Abbildung
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
ADA	Amerikanische Diabetes-Gesellschaft
ANOVA	Analysis of Variance
ANR	Anthocyanidin-Reduktase
ANS	Anthocyanidin-Synthase
Asp	Asparaginsäure; Aspartat
AUS	Aureusidin-Synthase
bidest.	bidestilliert
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
ca.	circa
CAV	Farbaktivitätswert
CD	Circular Dichroismus
CD _{total}	Farbverdünnungsfaktor der Gesamtlösung
CHI	Chalcon-Isomerase
CHS	Chalcon-Synthase
CoA	Coenzym A
COSY	Correlated Spectroscopy
δ	Chemische Verschiebung
d	Duplett
DAD	Diodenarray-Detektor
dd	Duplett von Duplett
ddd	Duplett von Duplett von Duplett
DFR	Dihydroflavonol-4-Reduktase
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Dinitrosalicylsäure
DPPH	α,α -Diphenyl- β -picrylhydrazyl
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
E	Enzym
EC-Nummer	Enzyme Classification Number
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ESI ¹	Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex
ESI ²	Elektrospray-Ionisation

F3GT	Flavonoid-3-glycosyltransferase
F3H	Flavanon-3- β -hydroxylase
FLS	Flavonol-Synthase
FNS	Flavon-Synthase
Fru	D-(-)-Fructose
GC-MS	Gaschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer
Glu ¹	D-(+)-Glucose
Glu ²	Glutaminsäure; Glutamat
GV-Solas	Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science
HFBA	Heptafluorbuttersäure
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
I	Inhibitor
IAUC	Incremental area under the curve
IC	Inhibitorkonzentration
IDDM	Insulin-dependent diabetes mellitus
IFS	Isoflavon-Synthase
IR	Infrarot
IUB	International Union of Biochemistry
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
J	Kopplungskonstante
K _i	Inhibitorkonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
LAR	Leucoanthocyanidin-Reduktase
LC-MS	Flüssigkeitschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer
m	Multiplett
M	Molekulargewicht
MLCCC	Multilayer Countercurrent Chromatography
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NIDDM	Non-insulin-dependent diabetes mellitus
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
o. g.	oben genannt
OGTT	Oraler Glucosetoleranztest
OPD	<i>o</i> -Phenylendiamin
P	Produkt
PAL	Phenyl-Ammonium-Lyase
PBS	Phosphate buffered saline

PNPG	<i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid
PNPM	<i>p</i> -Nitrophenyl- α -D-maltosid
PPO	Polyphenoloxidase
RP	Reversed Phase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Singulett
S	Substrat
Sac	Saccharose
SIM	Selected Ion Monitoring
t	Triplett
Tab.	Tabelle
TIC	Total Ion Chromatogram
TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometer
t_R	Retentionszeit
u. a.	unter anderem
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolett
v	Volumenanteil
v_0	Anfangsgeschwindigkeit
v_{max}	Maximalgeschwindigkeit
vgl.	Vergleich
VIS	Visible
WHO	World Health Organization
XIC	Extracted Ion Chromatogram
z. B.	zum Beispiel

10 Anhang

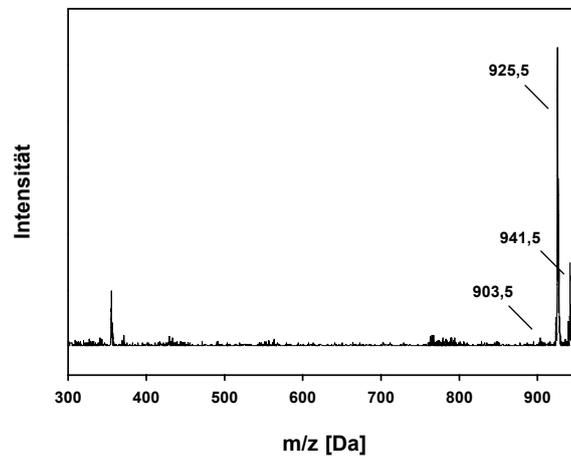


Abb. 67: Q1-Spektrum von Dimer 1
(Q1-Spektrum von Dimer 2 war identisch zu Dimer 1)

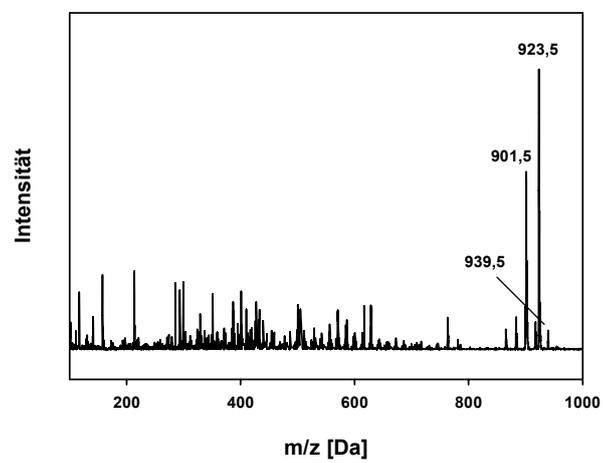


Abb. 68: Q1-Spektrum von Dimer 4

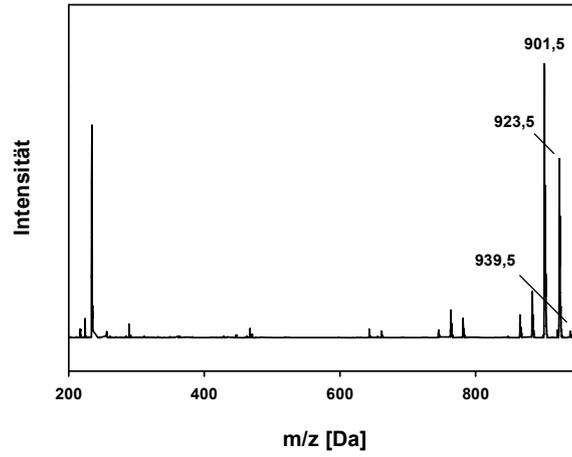


Abb. 69: Q1-Spektrum von Dimer 5

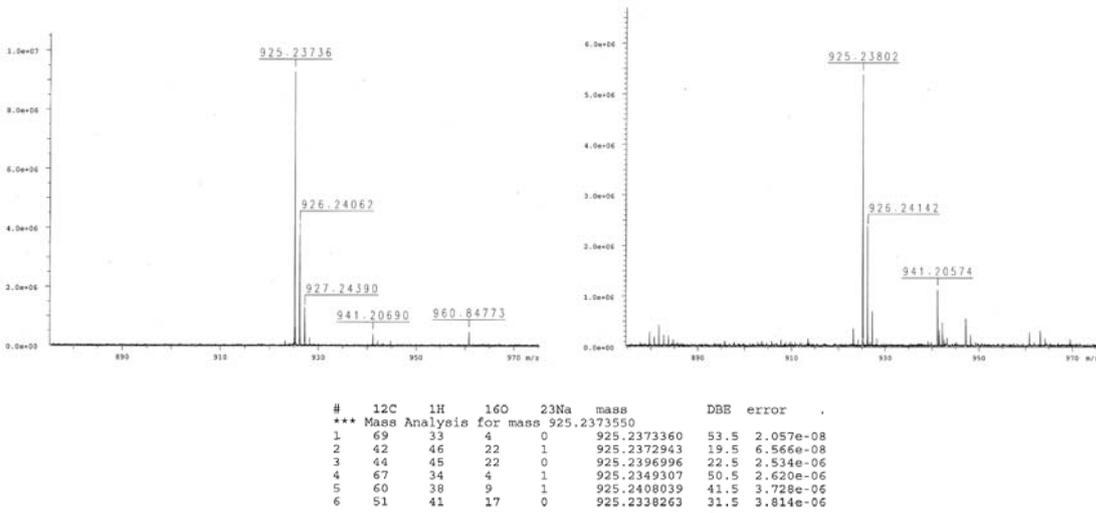


Abb. 70: HR-MS-Spektren von Dimer 1 (links) und Dimer 2 (rechts) sowie deren mögliche berechnete Summenformeln (unten)

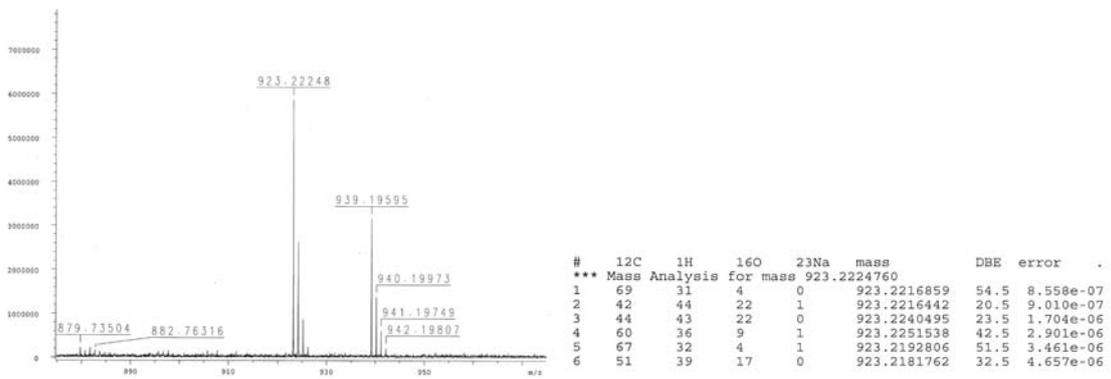


Abb. 71: HR-MS-Spektrum von Dimer 5 und dessen mögliche berechnete Summenformeln

Tab. 38: ^1H - (800 MHz) und ^{13}C - (200 MHz) NMR spektroskopische Daten der Dimere **1** und **2** (in CD_3OD)^a sowie ausgewählte HMBC-Korrelationen beider Dimere

Dimer 1			Dimer 2	
C/H	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]
1	-	105,8 ^b	-	105,7
2	-	163,9	-	164,0
3	5,88 (s, 1H)	95,9	5,88	95,9
4	-	164,9	-	164,9
5	-	104,1 ^c	-	104,1 ^d
6	-	165,7	-	165,7
CO¹	-	207,0	-	207,1
α^1	3,19 (m, 2H)	46,1	3,14 (ddd, 1H, $^2J = 16,4$ Hz, $^3J = 9,2$ Hz, $^3J = 6,1$ Hz) 3,23 (ddd, 1H, $^2J = 16,4$ Hz, $^3J = 9,2$ Hz, $^3J = 6,1$ Hz)	46,1
β^1	2,61 (ddd, 1H, $^2J = 14,2$ Hz, $^3J = 8,4$ Hz, $^3J = 6,9$ Hz) 2,69 (ddd, 1H, $^2J = 14,2$ Hz, $^3J = 8,4$ Hz, $^3J = 6,9$ Hz)	29,2	2,60 (ddd, 1H, $^2J = 14,1$ Hz, $^3J = 9,2$ Hz, $^3J = 6,1$ Hz) 2,68 (ddd, 1H, $^2J = 14,1$ Hz, $^3J = 9,2$ Hz, $^3J = 6,1$ Hz)	29,1

Fortsetzung nächste Seite

Dimer 1			Dimer 2	
C/H	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	$\delta^1\text{H}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]
1`	-	135,7	-	135,6
2`	6,81 (s, 1H)	117,7	6,80 (s, 1H)	117,8
3`	-	146,7	-	146,7
4`	-	144,9	-	144,9
5`	6,55 (s, 1H)	120,1	6,54 (s, 1H)	120,2
6`	-	122,8	-	122,7
Glu1	4,80 (d, 1H, $^3J = 9,9$ Hz)	76,0	4,79 (d, 1H, $^3J = 9,9$ Hz)	76,0
Glu2	3,93 (dd, 1H, $^3J = 9,9$ Hz, $^3J = 8,7$ Hz)	73,2	3,94 (dd, 1H, $^3J = 9,9$ Hz, $^3J = 8,8$ Hz)	73,1
Glu3	3,43 (m, 1H)	80,0	3,42 (m, 1H)	80,0
Glu4	3,45 (m, 1H)	71,5	3,43 (m, 1H)	71,5
Glu5	3,36 (ddd, 1H, $^3J = 9,5$ Hz, $^3J = 5,0$ Hz, $^3J = 2,2$ Hz)	82,5	3,35 (ddd, 1H, $^3J = 9,2$ Hz, $^3J = 5,1$ Hz, $^3J = 2,4$ Hz)	82,5
Glu6	3,73 (dd, 1H, $^2J = 12,3$ Hz, $^3J = 5,0$ Hz)	62,5	3,72 (dd, 1H, $^2J = 12,2$ Hz, $^3J = 5,1$ Hz)	62,6
	3,83 (dd, 1H, $^2J = 12,3$ Hz, $^3J = 2,2$ Hz)		3,82 (dd, 1H, $^2J = 12,2$ Hz, $^3J = 2,4$ Hz)	
1``	-	105,5 ^b	-	105,5
2``	-	161,3	-	161,3
3``	-	109,5	-	109,6
4``	-	161,5	-	161,5
5``	-	104,2 ^c	-	104,1 ^d
6``	-	163,1	-	163,1
CO ²	-	207,2	-	207,3
α^2	3,31 (m, 2H) ^e	47,7	3,31 (m, 2H) ^e	47,7
β^2	2,80 (t, 2H, $^3J = 7,7$ Hz)	31,6	2,79 (t, 2H, $^3J = 7,7$ Hz)	31,6
1'''	-	134,7	-	134,7
2'''	6,65 (d, 1H, $^4J = 1,9$ Hz)	116,6	6,65 (d, 1H, $^4J = 2,0$ Hz)	116,6
3'''	-	146,0	-	146,0
4'''	-	144,3	-	144,3
5'''	6,63 (d, 1H, $^3J = 8,1$ Hz)	116,3	6,63 (d, 1H, $^3J = 8,0$ Hz)	116,3
6'''	6,52 (dd, 1H, $^3J = 8,1$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz)	120,7	6,51 (dd, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz)	20,7
Glu1'	4,96 (d, 1H, $^3J = 9,9$ Hz)	76,9	4,96 (d, 1H, $^3J = 9,9$ Hz)	77,0
Glu2'	3,75 (dd, 1H, $^3J = 9,9$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz)	74,1	3,76 (dd, 1H, $^3J = 9,9$ Hz, $^3J = 9,1$ Hz)	74,1
Glu3'	3,49 (m, 1H)	79,6	3,48 (m, 1H)	79,5
Glu4'	3,49 (m, 1H)	71,2	3,48 (m, 1H)	71,3
Glu5'	3,44 (m, 1H)	82,6	3,43 (m, 1H)	82,7
Glu6'	3,77 (dd, 1H, $^2J = 12,2$ Hz, $^3J = 4,7$ Hz)	62,1	3,78 (dd, 1H, $^2J = 12,1$ Hz, $^3J = 4,8$ Hz)	62,2
	3,88 (dd, 1H, $^2J = 12,2$ Hz, $^3J = 2,3$ Hz)		3,88 (dd, 1H, $^2J = 12,2$ Hz, $^3J = 2,2$ Hz)	

^a δ , chemische Verschiebung; J , Kopplungskonstante; H-/C-Zuordnungen wurden durch HMBC-, HSQC- und ¹³C-DEPT-Experimente verifiziert.

^{b, c, d} Die Zuordnungen können ausgetauscht werden.

^e Das Signal wurde durch das Lösungsmittel überlagert.

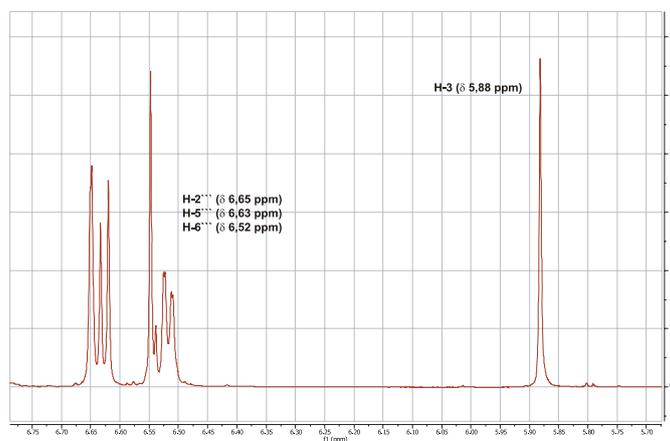


Abb. 72: ^1H -Spektrum Dimer **1** (Ausschnitt, in CD_3OD): Drei-Spin-System des B'-Rings und H-3 des A-Rings (^1H -Spektrum Dimer **2** identisch)

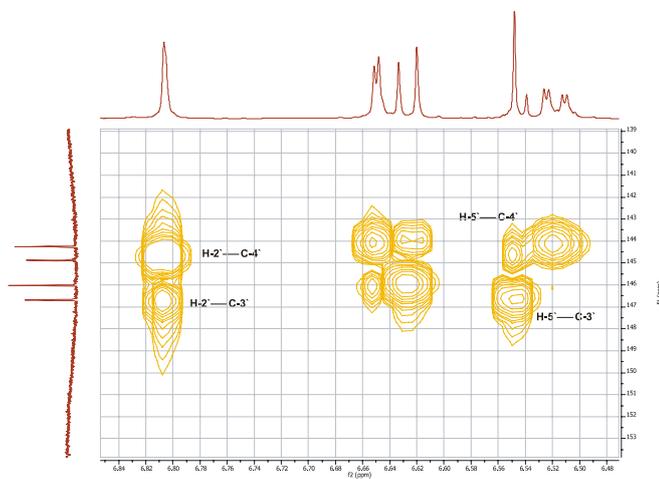


Abb. 73: HMBC-Spektrum Dimer **1** (Ausschnitt, in CD_3OD): Korrelationen von H-2' und H-5' zu C-3' und C-4' (HMBC-Spektrum Dimer **2** identisch)

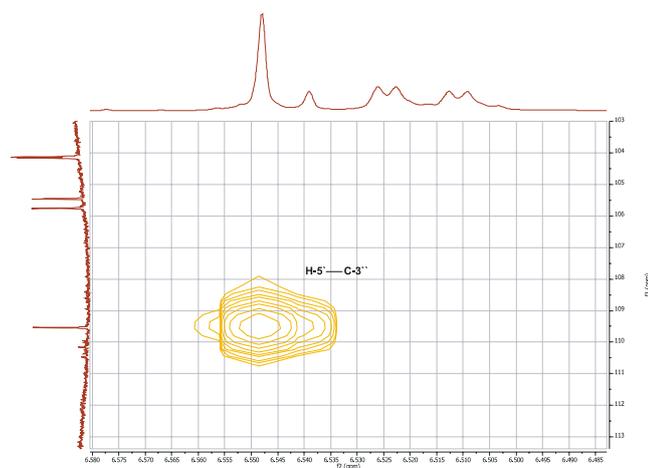


Abb. 74: HMBC-Spektrum Dimer 1 (Ausschnitt, in CD₃OD): Korrelation von H-5' zu C-3'' (HMBC-Spektrum Dimer 2 identisch)

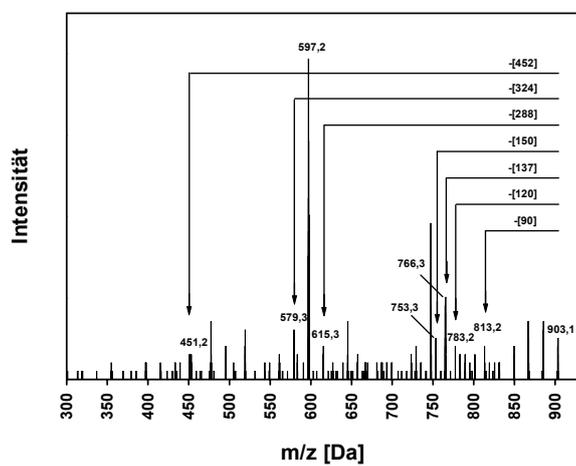


Abb. 75: MS²-Spektrum und zugeordnete Fragmentierungen von Dimer 1 (MS²-Spektrum von Dimer 2 war identisch zu Dimer 1)

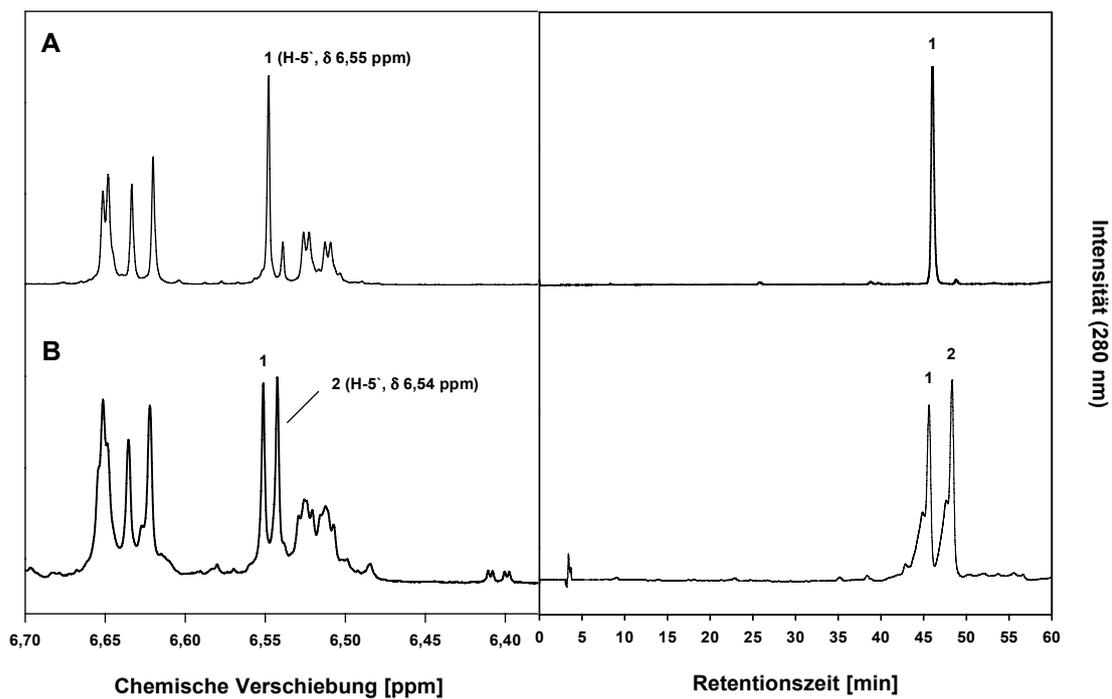
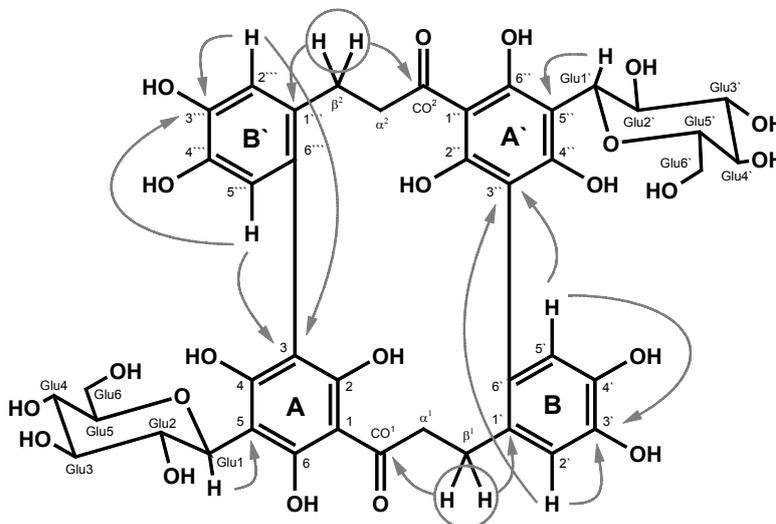


Abb. 76: Isomerisierungsexperiment: Umwandlung von Dimer 1 (A: vorher) in Dimer 2 (B: nachher) (links: ^1H -Spektren, rechts: HPLC-Chromatogramme)

Tab. 39: ^1H - (800 MHz) und ^{13}C - (200 MHz) NMR spektroskopische Daten des Dimers **5** (in CD_3OD)^a sowie ausgewählte HMBC-Korrelationen der Verbindung

Dimer 5



C/H	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]
1/1''	-	105,3
2/2''	-	159,6
3/3''	-	109,1
4/4''	-	161,9
5/5''	-	104,2
6/6''	-	163,9
CO ¹ /CO ²	-	207,2
α^1/α^2	2,81 (ddd ^b , 2H, ² J = 16,6 Hz, ³ J = 12,3 Hz, ³ J = 5,3 Hz) 3,56 (ddd ^b , 2H, ² J = 16,6 Hz, ³ J = 12,3 Hz, ³ J = 3,6 Hz)	45,4
β^1/β^2	2,36 (ddd ^b , 2H, ² J = 13,8 Hz, ³ J = 12,3 Hz, ³ J = 3,6 Hz) 2,66 (ddd ^b , 2H, ² J = 13,8 Hz, ³ J = 12,3 Hz, ³ J = 5,3 Hz)	30,3
1'''/1''''	-	135,8
2'''/2''''	6,83 (s, 2H)	117,6
3'''/3''''	-	147,1
4'''/4''''	-	145,2
5'''/5''''	6,54 (s, 2H)	120,3
6'''/6''''	-	121,9
Glu1/Glu1'	4,89 (d, 2H, ³ J = 10,3 Hz)	76,3
Glu2/Glu2'	3,74 (m, 2H)	73,6
Glu3/Glu3'	3,43 (m, 2H)	79,7
Glu4/Glu4'	3,41 (m, 2H)	71,2
Glu5/Glu5'	3,38 (m, 2H)	82,6
Glu6/Glu6'	3,71 (dd ^b , 2H, ² J = 12,0 Hz, ³ J = 4,4 Hz) 3,84 (dd, 2H, ² J = 12,0 Hz, ³ J = 1,8 Hz)	62,2

^a δ , chemische Verschiebung; J , Kopplungskonstante; H-/C-Zuordnungen wurden durch HMBC-, HSQC- und ^{13}C -DEPT-Experimente verifiziert.

^b Das Signal wurde überlagert.

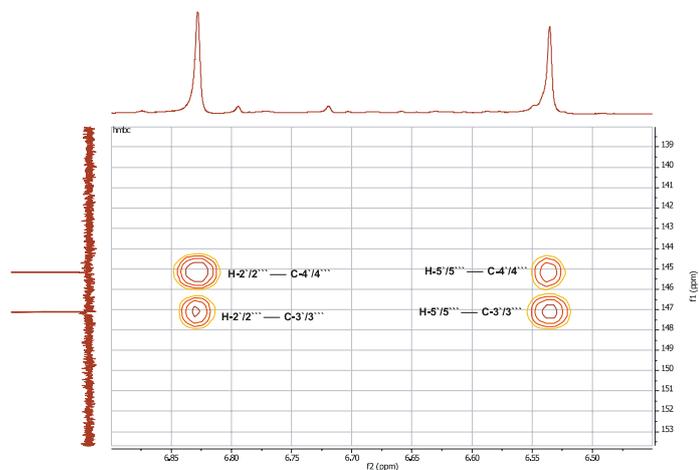


Abb. 77: HMBC-Spektrum Dimer **5** (Ausschnitt, in CD₃OD): Korrelationen von H-2'/2'' und H-5'/5'' zu C-3'/3'' und C-4'/4''

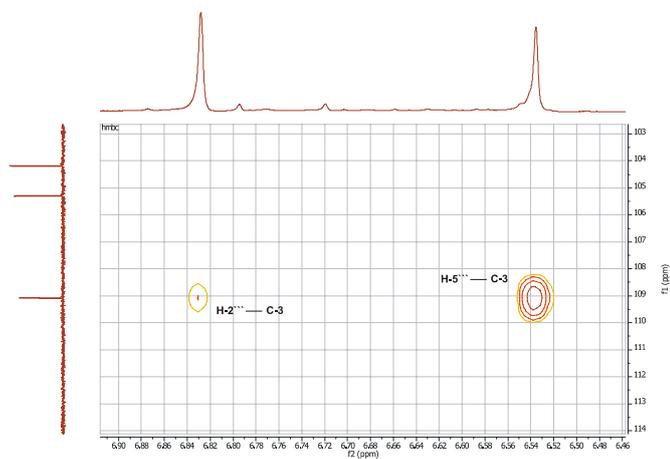


Abb. 78: HMBC-Spektrum Dimer **5** (Ausschnitt, in CD₃OD): Korrelation von H-2'' und H-5'' zu C-3 (Korrelation von H-2' und H-5' zu C-3'' identisch)

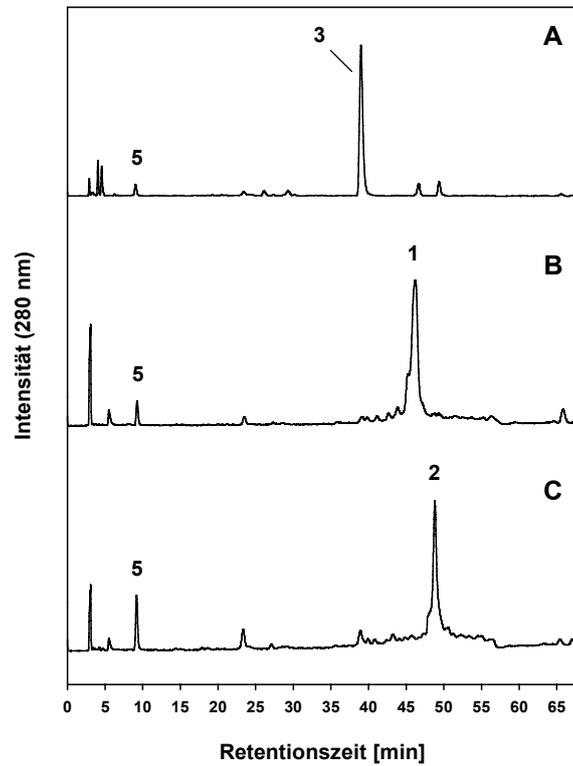


Abb. 79: HPLC-Chromatogramme einer 6 h-Inkubation von Aspalathin **3** (A) sowie einer 1 h-Reinkubation der Dimere **1** (B) und **2** (C)

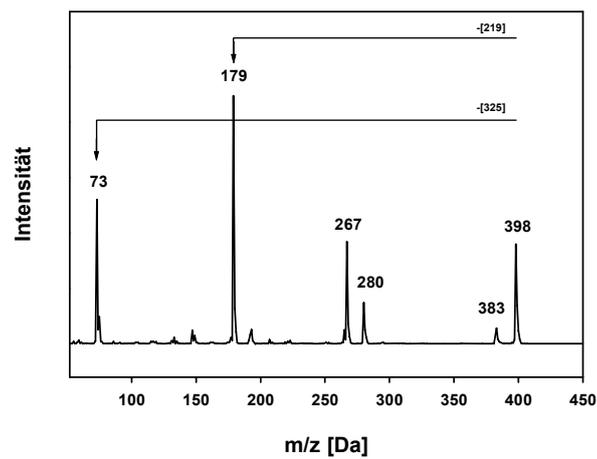


Abb. 80: Massenspektrum und zugeordnete Fragmentierungen von Dihydrokaffeesäure **6**

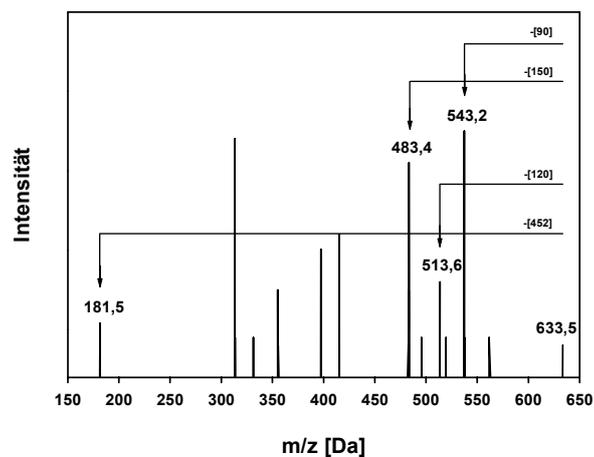


Abb. 81: MS²-Spektrum und zugeordnete Fragmentierungen von Aspalathin-Dihydrokaffeesäure-Addukt **7** (MS²-Spektrum von -Dihydrokaffeesäure-Addukt **8** war identisch zu Addukt **7**)

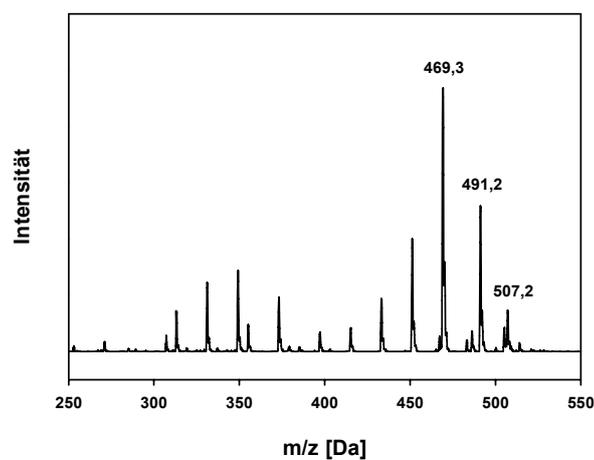


Abb. 82: Q1-Spektrum von Precursor **9**
(Q1-Spektrum von Precursor **10** war identisch zu Precursor **9**)

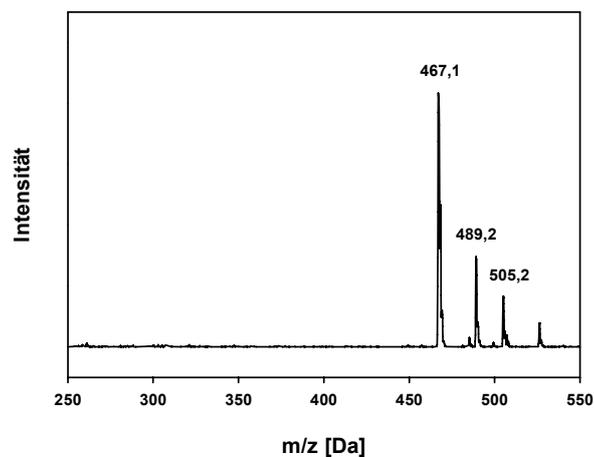


Abb. 83: Q1-Spektrum von Dibenzofuran **11**
(Q1-Spektrum von Dibenzofuran **12** war identisch zu Dibenzofuran **11**)

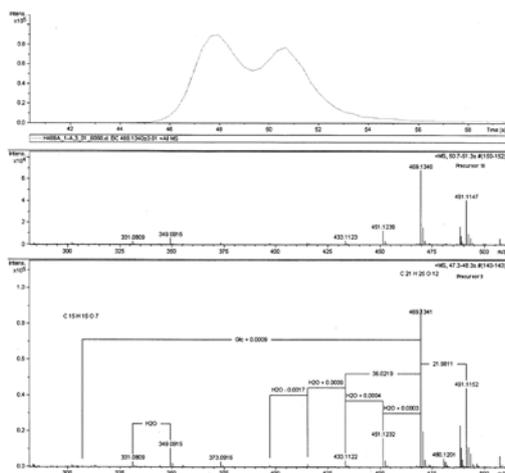


Abb. 84: UPLC-Chromatogramm-Ausschnitt (oben) und TOF-MS-Spektren von Precursor **9** (unten) und **10** (Mitte)

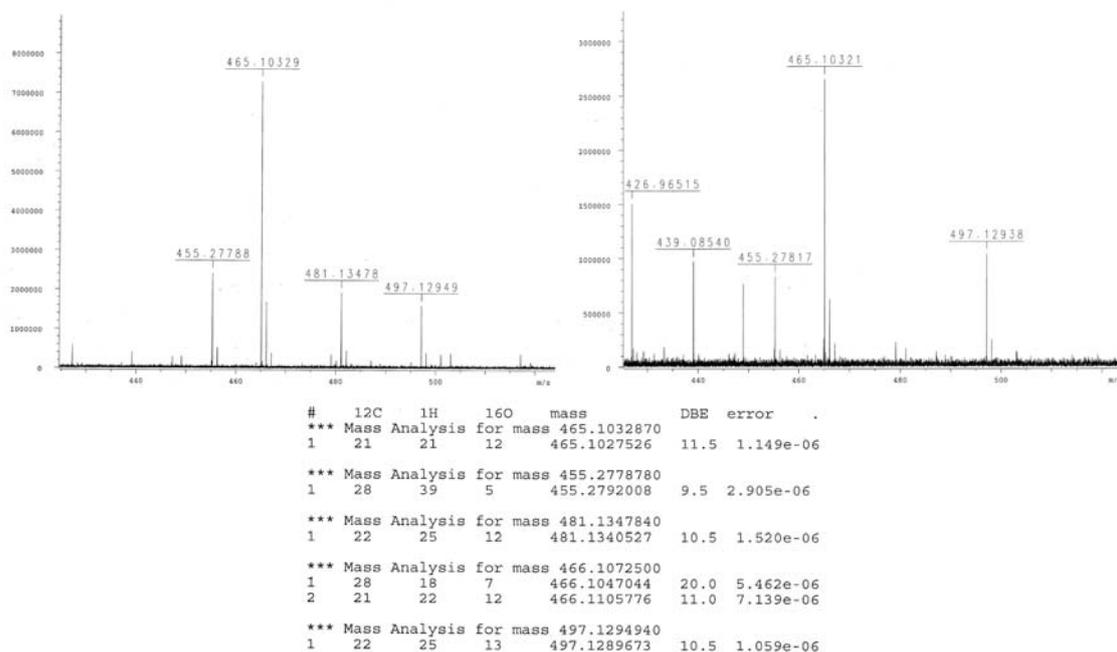


Abb. 85: HR-MS-Spektren von Dibenzofuran **11** (links) und Dibenzofuran **12** (rechts) sowie deren mögliche berechnete Summenformeln (unten)

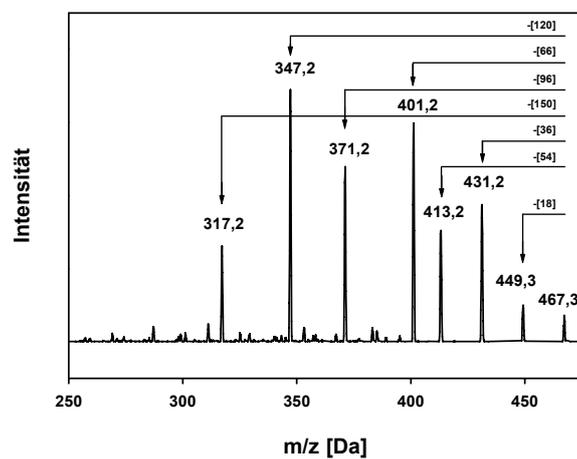


Abb. 86: MS²-Spektrum und zugeordnete Fragmentierungen von Dibenzofuran **11** (MS²-Spektrum von Dibenzofuran **12** war identisch zu Dibenzofuran **11**)

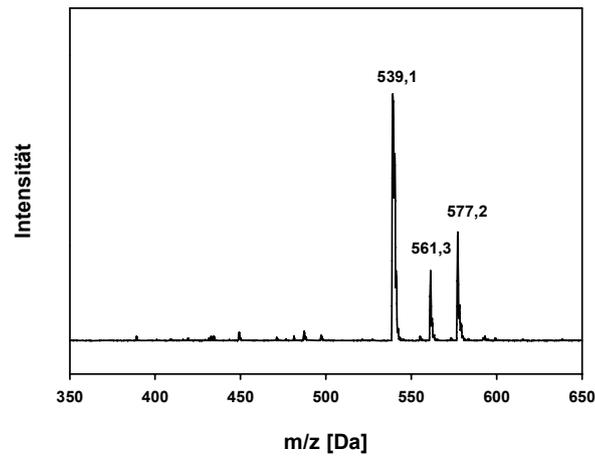


Abb. 87: Q1-Spektrum von Chinoxalin **13**
(Q1-Spektrum von Chinoxalin **14** war identisch zu Chinoxalin **13**)

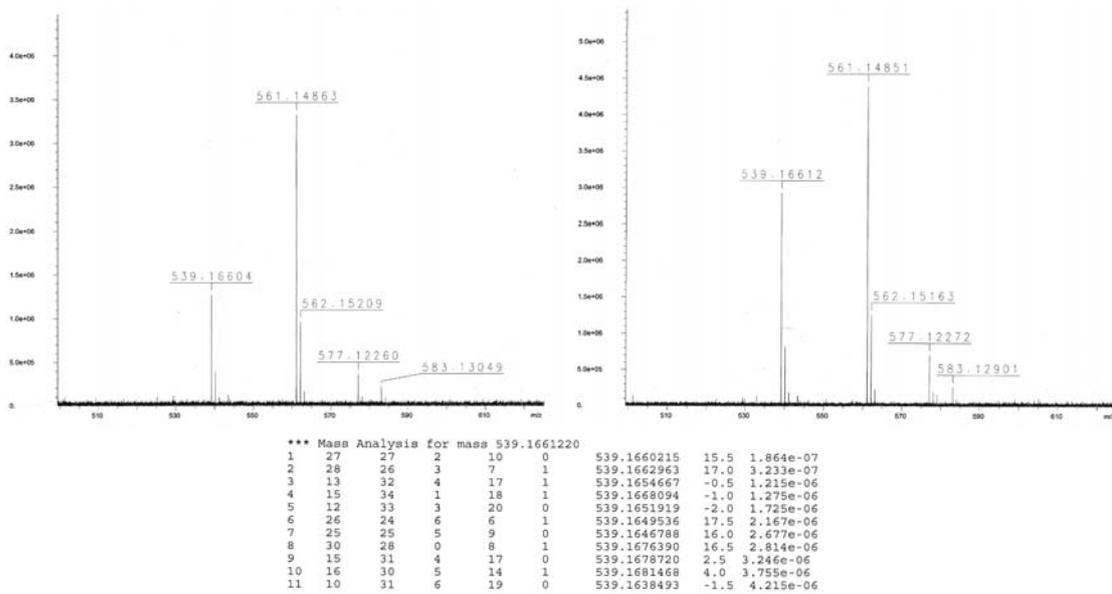


Abb. 88: HR-MS-Spektren von Chinoxalin **13** (links) und Chinoxalin **14** (rechts) sowie deren mögliche berechnete Summenformeln (unten)

Tab. 40: ^1H - (800 MHz) und ^{13}C - (200 MHz) NMR spektroskopische Daten der Chinoxaline **13** und **14** (in CD_3OD)^a sowie ausgewählte HMBC-Korrelationen beider Substanzen

Chinoxalin 13		Chinoxalin 14		
C/H	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]
1	-	108,8	-	109,0
2	-	155,9	-	155,7
3	6,12 (s, 1H)	96,6	6,12 (s, 1H)	96,6
4	-	157,9	-	158,0
5	-	104,7	-	104,7
6	-	156,3	-	156,5
COOH	-	170,3	-	170,1
α	3,07; 3,11; m, 1H	35,2	3,08; 3,11; m, 1H	35,3
β	2,52; 2,54; m, 1H	23,3	2,53; 2,55; m, 1H	23,3
1'	-	127,2	-	127,2
2'	3,47; 3,48; m, 1H	66,8	3,47; 3,49; m, 1H	66,9
3'	-	142,2	-	142,2
4'	-	144,4	-	144,4
5'	7,96 (s, 1H)	131,9	7,96 (s, 1H)	131,9
6'	-	149,8	-	149,9
1''	-	143,8	-	144,2
2''	-	143,6	-	143,6
3''	8,11 (m, 1H)	127,4	8,10 (m, 1H)	127,2
4''	8,22 (m, 1H)	129,8	8,22 (m, 1H)	129,9
5''	8,20 (m, 1H)	129,8	8,21 (m, 1H)	129,9
6''	7,89 (m, 1H)	131,4	7,89 (m, 1H)	131,4
Glu1	4,93 (d, 1H, $^3J = 9,8$ Hz)	77,4	4,92 (d, 1H, $^3J = 9,8$ Hz)	77,5
Glu2	3,79 (m, 1H)	74,6	3,79 (m, 1H)	74,1
Glu3	3,49 (m, 1H)	79,5	3,48 (m, 1H)	79,7
Glu4	3,48 (m, 1H)	71,2	3,48 (m, 1H)	71,7
Glu5	3,38 (m, 1H)	82,4	3,41 (m, 1H)	82,5
Glu6	3,74 (dd, 1H, $^2J = 12,1$ Hz, $^3J = 4,8$ Hz)	62,1	3,74 (dd, 1H, $^2J = 12,1$ Hz, $^3J = 4,7$ Hz)	62,1
	3,84 (dd, 1H, $^2J = 12,1$ Hz, $^3J = 2,2$ Hz)		3,85 (dd, 1H, $^2J = 12,1$ Hz, $^3J = 2,2$ Hz)	

^a δ , chemische Verschiebung; J , Kopplungskonstante; H-/C-Zuordnungen wurden durch HMBC-, HSQC- und ^{13}C -DEPT-Experimente verifiziert.

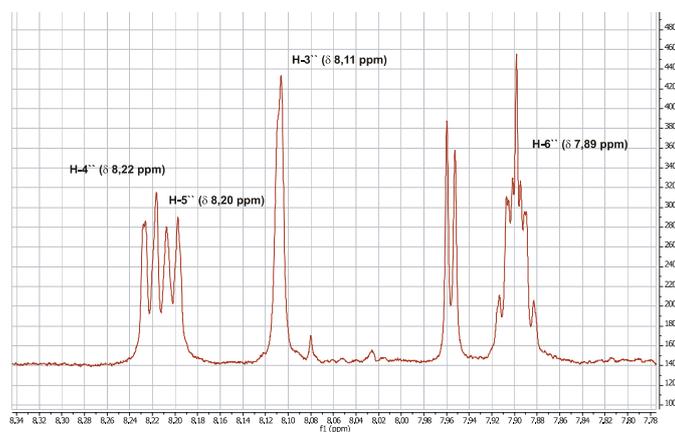


Abb. 89: ^1H -Spektrum Chinoxalin **13** (Ausschnitt, in CD_3OD): Charakteristische chemische Verschiebungen und Signalaufspaltungen für Chinoxalin.-Strukturen (^1H -Spektrum Chinoxalin **14** identisch)

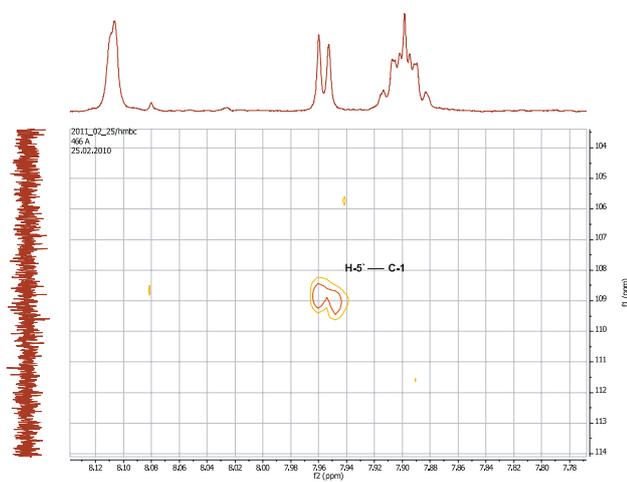


Abb. 90: HMBC-Spektrum Chinoxalin **13** (Ausschnitt, in CD_3OD): Korrelation von H-5'' zu C-1 (HMBC-Spektrum Chinoxalin **14** identisch)

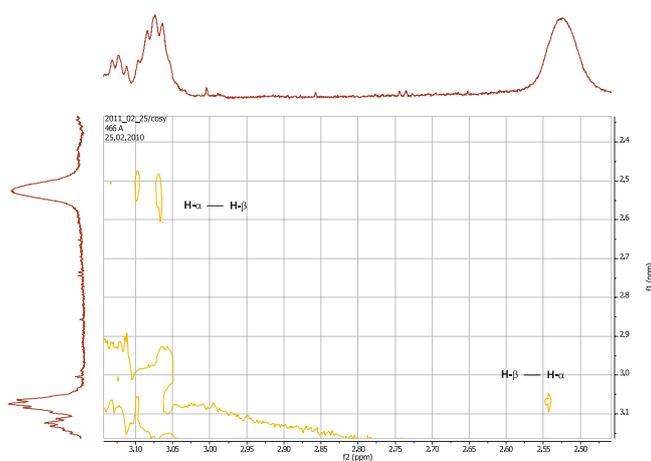


Abb. 91: ¹H-COSY-Spektrum Chinoxalin **13** (Ausschnitt, in CD₃OD): Korrelation von H-α zu H-β und umgekehrt (¹H-COSY-Spektrum Chinoxalin **14** identisch)

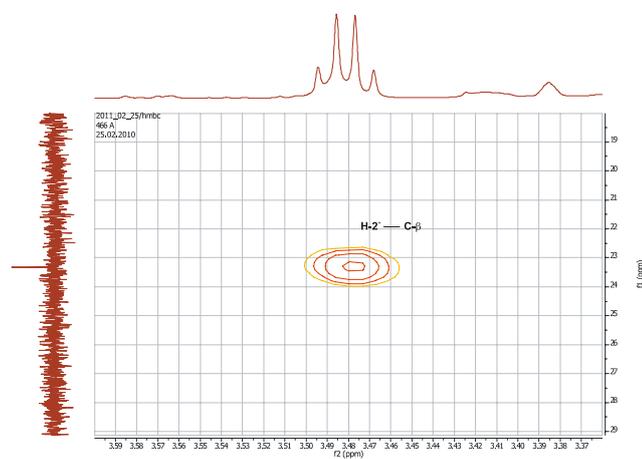


Abb. 92: HMBC-Spektrum Chinoxalin **13** (Ausschnitt, in CD₃OD): Korrelation von H-2' zu C-β (HMBC-Spektrum Chinoxalin **14** identisch)

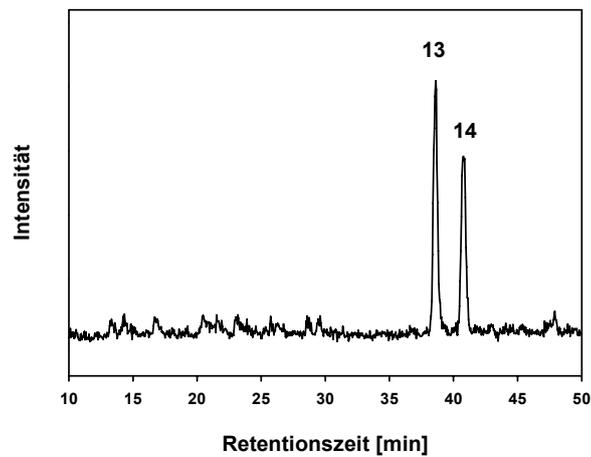


Abb. 93: TIC (Total Ion Chromatogram) einer Inkubation von fermentiertem Rooibostee mit OPD

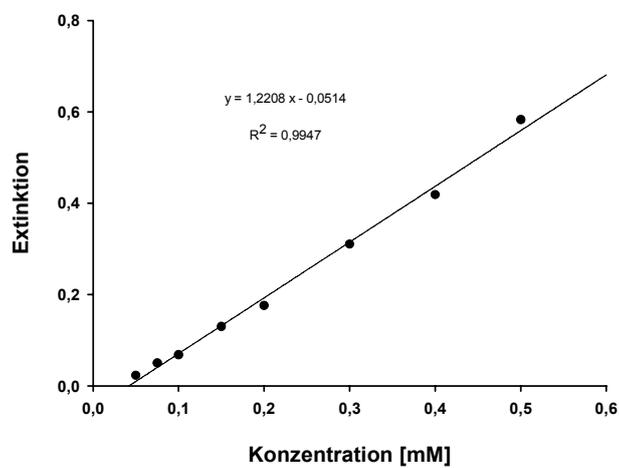


Abb. 94: Kalibrierung *p*-Nitrophenol

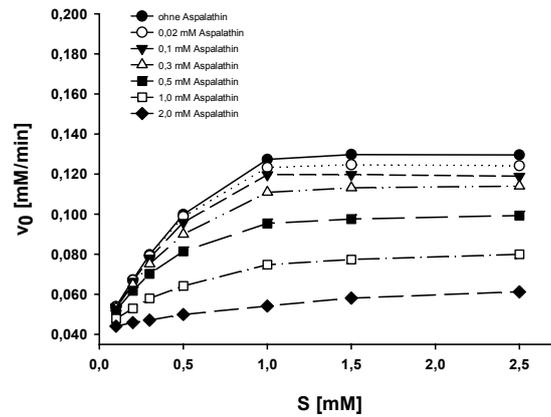


Abb. 95: v - S -Diagramm für die Reaktion von α -Glucosidase mit p -Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid in der Gegenwart verschiedener Aspalathin-Konzentrationen

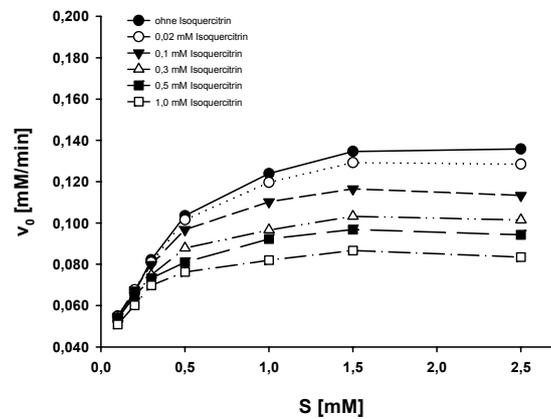


Abb. 96: v - S -Diagramm für die Reaktion von α -Glucosidase mit p -Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid in der Gegenwart verschiedener Isoquercitrin-Konzentrationen

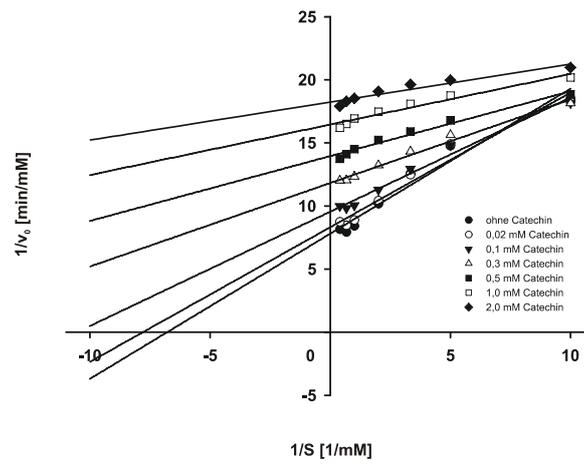


Abb. 97: Lineweaver-Burk-Diagramm der unkompetitiven Hemmung von α -Glucosidase durch (+)-Catechin

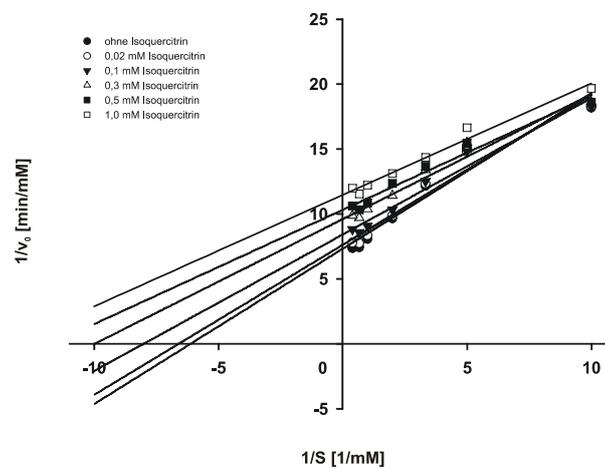


Abb. 98: Lineweaver-Burk-Diagramm der unkompetitiven Hemmung von α -Glucosidase durch Isoquercitrin

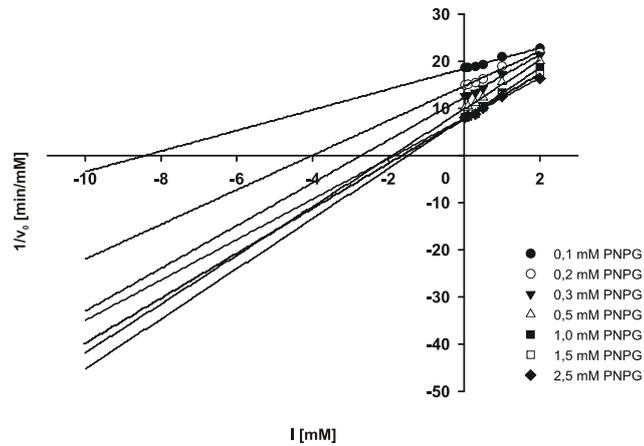


Abb. 99: Dixon-Diagramm der Umsetzung *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (PNPG) durch α -Glucosidase in Gegenwart verschiedener Aspalathin-Konzentrationen

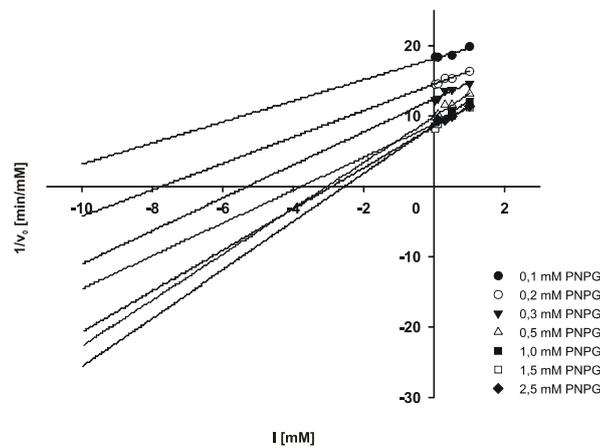


Abb. 100: Dixon-Diagramm der Umsetzung *p*-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (PNPG) durch α -Glucosidase in Gegenwart verschiedener Isoquercitrin-Konzentrationen

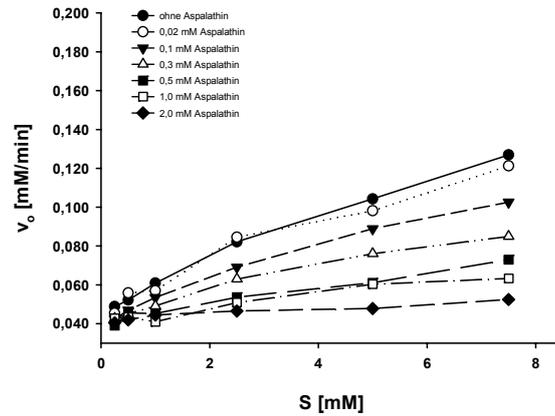


Abb. 101: v - S -Diagramm für die Reaktion von α -Amylase mit p -Nitrophenyl- α -D-maltosid in der Gegenwart verschiedener Aspalathin-Konzentrationen

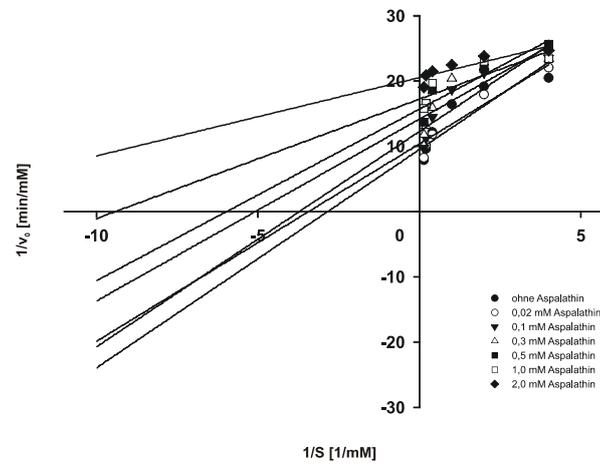


Abb. 102: Lineweaver-Burk-Diagramm der unkompetitiven Hemmung von α -Amylase durch Aspalathin

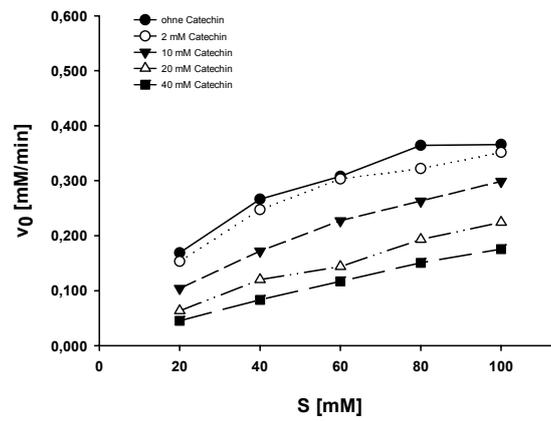


Abb. 103: v - S -Diagramm für die Reaktion von Saccharase mit Saccharose in der Gegenwart verschiedener (+)-Catechin-Konzentrationen

Tab. 41: Futterzusammensetzung Altromin®

Nährstoffe	[%]
Trockenmasse	89,0
Rohprotein	19,0
Rohfett	4,0
Rohfaser	6,0
Rohasche	7,5
Mineralien	[%]
Kalium	1,0
Calcium	0,9
Phosphor	0,7
Magnesium	0,3
Natrium	0,2
Spurenelemente	mg/kg
Eisen	165
Mangan	75
Zink	70
Kupfer	13
Iod	1,5
Selen	0,6
Cobalt	0,3

Tab. 42: Vitamine des Futters

Vitamine	Konzentration/kg	Vitamine	Konzentration/kg
Vitamin A	15.000 IU	Vitamin K3	3 mg
Vitamin D3	600 IU	Vitamin E	75 mg
Vitamin B1	18 mg	Folsäure	2 mg
Vitamin B2	12 mg	Biotin	60 µg
Vitamin B6	9 mg	Nikotinsäure	36 mg
Vitamin B12	24 µg	Pantothensäure	21 mg
Vitamin C	36 mg	Cholinchlorid	600 mg

Tab. 43: Aminosäuren des Futters

Aminosäuren	[%]	Aminosäuren	[%]
Alanin	0,9	Methionin+Cystin	0,6
Arginin	1,2	Phenylalanin	0,8
Asparaginsäure	1,8	Phenylalanin+Tyrosin	1,4
Glutaminsäure	3,8	Prolin	1,2
Glycin	0,9	Serin	0,9
Histidin	0,4	Threonin	0,7
Isoleucin	0,8	Tryptophan	0,2
Leucin	1,4	Valin	0,9
Lysin	0,9		

Tab. 44: Postprandiale Blutglucosekonzentrationen Saccharose ((...) Ausreißer, * Tier ausgefallen)*Saccharose Kontrolle*

Tier Nr.	Gewicht [g]	0 min [mg/dl]	30 min [mg/dl]	60 min [mg/dl]	90 min [mg/dl]	120 min [mg/dl]	150 min [mg/dl]	180 min [mg/dl]
1	276,6	94,6	118,0	(110,8)	118,0	118,0	107,2	109,0
2	286,0	94,6	145,9	161,3	147,7	156,8	127,9	119,8
3	273,3	94,6	151,4	127,0	118,9	121,6	111,7	109,0
4	289,4	89,2	115,3	132,4	151,4	137,8	127,9	118,0
5	282,3	70,3	135,1	151,4	111,7	153,2	(140,5)	120,7
6	286,6	116,2	133,3	140,5	131,5	116,2	127,0	(132,4)
7	258,6	96,4	130,6	130,6	126,1	103,6	109,0	106,3
8	283,6	114,4	130,6	130,6	125,2	123,4	110,8	114,4
9	270,0	111,7	153,2	145,0	136,9	118,9	109,9	106,3
10	270,1	(150,5)	155,9	156,8	155,0	127,9	118,9	126,1
unteres Quartil		93,2	130,6	130,6	118,9	118,0	109,7	108,3
Minimum		70,3	115,3	127,0	111,7	103,6	107,2	106,3
arithm. Mittel		98,0	136,9	141,7	132,3	127,7	116,7	114,4
Median		94,6	134,2	140,5	128,8	122,5	111,7	114,4
Maximum		116,2	155,9	161,3	155,0	156,8	127,9	126,1
oberes Quartil		112,4	151,4	152,7	147,8	137,8	127,3	120,0
Standardabweichung		14,5	14,3	12,6	15,0	16,8	8,8	7,1

Saccharose + Aspalathin

Tier Nr.	Gewicht [g]	Zusatz [mg]	0 min [mg/dl]	30 min [mg/dl]	60 min [mg/dl]	90 min [mg/dl]	120 min [mg/dl]	150 min [mg/dl]	180 min [mg/dl]
11	285,7	114,3	86,5	103,6	97,3	94,6	109,0	111,7	99,1
12	274,0	109,6	105,4	98,2	96,4	95,5	100,0	110,8	105,4
13	274,8	109,9	102,7	94,6	98,2	(69,4)	108,1	104,5	*
14	274,7	109,9	91,9	91,0	80,2	90,1	106,3	103,6	98,2
15	300	120,0	(127,9)	(145,0)	(141,4)	123,4	125,2	123,4	118,0
16	275,4	110,2	107,2	80,2	78,4	100,0	100,0	98,2	100,0
17	303,1	121,2	114,4	107,2	100,9	115,3	110,8	90,1	102,7
18	292,5	117,0	78,4	123,4	135,1	121,6	119,8	110,8	122,5
19	281,0	112,4	82,0	76,6	81,1	94,6	(89,2)	101,8	97,3
20	275,7	110,3	80,2	87,4	114,4	117,1	107,2	(82,0)	90,1
unteres Quartil			81,5	85,6	80,9	94,6	104,7	100,9	98,0
Minimum			78,4	76,6	78,4	90,1	100,0	90,1	90,1
arithm. Mittel			94,3	95,8	98,0	105,8	109,6	106,1	103,7
Median			91,9	94,6	97,3	100,0	108,1	104,5	100,0
Maximum			114,4	123,4	135,1	123,4	125,2	123,4	122,5
oberes Quartil			105,9	104,5	104,3	118,2	113,1	111,0	108,6
Standardabweichung			13,4	14,4	18,2	13,3	8,3	9,5	10,3

Saccharose + Catechin

Tier Nr.	Gewicht [g]	Zusatz [mg]	0 min [mg/dl]	30 min [mg/dl]	60 min [mg/dl]	90 min [mg/dl]	120 min [mg/dl]	150 min [mg/dl]	180 min [mg/dl]
21	290,0	116,0	94,6	130,6	141,4	126,1	121,6	115,3	*
22	282,1	112,8	143,2	152,3	144,1	136,9	134,2	120,7	127,9
23	270,1	108,0	129,7	127,0	151,4	113,5	147,7	140,5	139,6
24	289,0	115,6	83,8	125,2	126,1	127,0	118,0	125,2	110,8
25	298,2	119,3	100,0	127,0	124,3	130,6	136,9	126,1	141,4
26	281,2	112,5	118,0	145,0	137,8	140,5	135,1	131,5	139,6
27	265,6	106,2	(64,9)	109,9	127,0	(109,9)	115,3	(98,2)	105,4
28	255,1	102,0	124,3	150,5	136,9	135,1	129,7	117,1	118,0
29	267,7	107,1	116,2	145,0	119,8	127,0	112,6	115,3	125,2
30	280,5	112,2	125,2	165,8	139,6	136,0	137,8	127,9	123,4
unteres Quartil			98,7	127,0	126,1	126,8	118,0	116,7	116,2
Minimum			83,8	109,9	119,8	113,5	112,6	115,3	105,4
arithm. Mittel			115,0	137,8	134,9	130,3	128,9	124,4	125,7
Median			118,0	137,8	137,4	130,6	132,0	125,2	125,2
Maximum			143,2	165,8	151,4	140,5	147,7	140,5	141,4
oberes Quartil			126,4	150,5	141,4	136,3	136,9	128,8	139,6
Standardabweichung			18,8	16,6	10,1	8,1	11,5	8,4	12,9

Saccharose + Isoquercitrin

Tier Nr.	Gewicht [g]	Zusatz [mg]	0 min [mg/dl]	30 min [mg/dl]	60 min [mg/dl]	90 min [mg/dl]	120 min [mg/dl]	150 min [mg/dl]	180 min [mg/dl]
31	305,0	122,0	101,8	124,3	127,0	151,4	127,0	120,7	107,2
32	282,9	113,2	95,5	121,6	118,0	124,3	136,0	135,1	126,1
33	313,9	125,6	88,3	122,5	(102,7)	*	*	*	*
34	300,6	120,2	112,6	125,2	126,1	127,0	120,7	114,4	109,9
35	287,0	114,8	127,9	131,5	132,4	136,0	134,2	117,1	103,6
36	317,0	126,8	89,2	127,9	121,6	118,9	143,2	118,9	124,3
37	293,2	117,3	137,8	121,6	136,9	161,3	147,7	141,4	144,1
38	324,3	129,7	90,1	130,6	135,1	132,4	121,6	112,6	117,1
39	310,6	124,2	123,4	(165,8)	143,2	109,9	114,4	127,0	127,9
40	289,3	115,7	129,7	149,6	144,1	138,7	117,1	130,6	120,7
unteres Quartil			90,1	122,3	125,0	123,0	119,8	116,4	109,2
Minimum			88,3	121,6	118,0	109,9	114,4	112,6	103,6
arithm. Mittel			109,6	128,3	131,6	133,3	129,1	124,2	120,1
Median			107,2	125,2	132,4	132,4	127,0	120,7	120,7
Maximum			137,8	149,6	144,1	161,3	147,7	141,4	144,1
oberes Quartil			127,9	130,9	138,5	141,9	137,8	131,8	126,6
Standardabweichung			19,0	8,8	9,1	15,9	11,8	9,9	12,5

Tab. 45: Postprandiale Blutglucosekonzentrationen Stärke ((...) Ausreißer, * Tier ausgefallen)*Stärke Kontrolle*

Tier Nr.	Gewicht [g]	0 min [mg/dl]	30 min [mg/dl]	60 min [mg/dl]	90 min [mg/dl]	120 min [mg/dl]	150 min [mg/dl]	180 min [mg/dl]
41	281,5	118,9	167,6	175,7	119,8	102,7	95,5	86,5
42	275,9	90,1	(108,1)	146,8	174,8	132,4	116,2	103,6
43	273,8	95,5	159,5	140,5	118,9	119,8	99,1	101,8
44	263,6	133,3	197,3	160,4	178,4	(167,6)	(146,8)	123,4
45	272,8	133,3	183,8	175,7	155,9	134,2	127,0	109,0
46	268,7	106,3	137,8	129,7	127,9	109,9	77,5	85,6
47	262,5	95,5	150,5	155,9	118,9	90,1	93,7	79,3
48	284,5	125,2	147,7	151,4	154,1	142,3	99,1	*
49	295,1	118,9	139,6	164,0	143,2	119,8	107,2	102,7
50	282,0	108,1	143,2	144,1	124,3	118,0	111,7	100,9
unteres Quartil		95,5	142,3	144,1	119,8	108,1	95,0	86,3
Minimum		90,1	137,8	129,7	118,9	90,1	77,5	79,3
arithm. Mittel		112,5	158,6	154,4	141,6	118,8	103,0	99,2
Median		113,5	150,5	153,6	135,6	119,8	99,1	101,8
Maximum		133,3	197,3	175,7	178,4	142,3	127,0	123,4
oberes Quartil		125,2	171,6	164,0	155,9	132,9	112,8	105,0
Standardabweichung		15,8	20,7	14,9	23,1	16,4	14,5	13,5

Stärke + Aspalathin

Tier Nr.	Gewicht [g]	Zusatz [mg]	0 min [mg/dl]	30 min [mg/dl]	60 min [mg/dl]	90 min [mg/dl]	120 min [mg/dl]	150 min [mg/dl]	180 min [mg/dl]
51	272,8	109,1	104,5	130,6	107,2	101,8	87,4	99,1	77,5
52	276,2	110,5	91,9	116,2	121,6	111,7	100,9	99,1	93,7
53	268,3	107,3	124,3	132,4	116,2	109,9	107,2	118,0	107,2
54	261,0	104,4	89,2	115,3	97,3	88,3	84,7	84,7	77,5
55	281,9	112,8	(138,7)	(170,3)	128,8	108,1	108,1	108,1	107,2
56	255,4	102,2	108,1	117,1	101,8	97,3	100,0	103,6	97,3
57	267,1	106,8	93,7	101,8	91,9	91,0	85,6	86,5	87,4
58	282,4	113,0	127,9	117,1	109,0	91,0	96,4	96,4	97,3
59	270,0	108,0	100,9	112,6	111,7	97,4	80,2	91,9	91,0
60	279,8	111,9	100,9	104,5	115,3	109,9	95,5	118,9	98,2
unteres Quartil			93,2	110,6	101,8	90,1	85,6	91,9	87,4
Minimum			89,2	101,8	91,9	87,4	80,2	84,7	77,5
arithm. Mittel			104,6	116,4	110,1	99,6	94,6	100,6	93,4
Median			100,9	116,2	110,4	99,6	95,9	99,1	95,5
Maximum			127,9	132,4	128,3	111,7	108,1	118,9	107,2
oberes Quartil			112,2	120,5	116,2	109,9	100,9	108,1	98,2
Standardabweichung			13,7	10,2	11,2	9,9	9,7	11,8	10,5

Stärke + Catechin

Tier Nr.	Gewicht [g]	Zusatz [mg]	0 min [mg/dl]	30 min [mg/dl]	60 min [mg/dl]	90 min [mg/dl]	120 min [mg/dl]	150 min [mg/dl]	180 min [mg/dl]
61	266,0	106,4	94,6	141,4	163,9	166,7	136,9	124,3	108,1
62	268,8	107,5	96,4	140,5	134,2	115,3	93,7	94,6	85,6
63	283,3	113,3	102,7	132,4	147,7	159,5	114,4	105,4	106,3
64	268,3	107,3	125,2	(189,2)	167,6	168,5	147,7	124,3	100,0
65	286,0	114,4	103,6	118,0	145,9	154,9	138,7	126,1	77,5
66	263,2	105,3	118,0	143,2	125,2	125,2	85,6	74,8	88,3
67	284,4	113,8	97,3	141,4	152,3	109,0	98,2	100,0	88,3
68	279,6	111,8	111,7	147,7	131,5	145,9	124,3	161,5	116,2
69	294,2	117,7	(142,3)	161,3	145,9	119,8	115,3	109,0	101,8
70	270,8	108,3	104,5	114,4	120,7	127,0	109,0	98,2	85,6
unteres Quartil			97,1	128,8	131,5	119,8	98,2	99,6	85,6
Minimum			94,6	114,4	120,7	109,0	85,6	(74,8)	77,5
arithm. Mittel			106,0	137,8	143,5	139,2	116,4	108,8	95,8
Median			103,6	141,4	145,9	136,5	114,9	107,2	94,1
Maximum			125,2	161,3	167,6	168,5	147,7	131,5	116,2
oberes Quartil			113,3	144,4	152,3	159,5	136,9	124,8	106,3
Standardabweichung			10,4	14,5	15,6	22,4	20,6	14,0	12,4

Stärke + Isoquercitrin

Tier Nr.	Gewicht [g]	Zusatz [mg]	0 min [mg/dl]	30 min [mg/dl]	60 min [mg/dl]	90 min [mg/dl]	120 min [mg/dl]	150 min [mg/dl]	180 min [mg/dl]
71	293,0	117,2	114,4	147,7	118,9	106,3	107,2	103,6	111,7
72	271,1	108,4	89,2	133,3	149,6	112,6	106,3	112,6	(85,6)
73	262,8	105,1	117,1	151,4	132,4	132,4	139,6	109,9	110,8
74	284,5	113,8	117,1	132,4	122,5	115,3	104,5	109,0	109,0
75	281,4	112,6	120,7	124,3	131,5	133,3	124,3	122,5	119,8
76	279,8	111,9	99,1	126,1	151,4	121,6	109,9	101,8	101,8
77	288,4	115,4	120,7	141,4	117,1	132,4	125,2	91,0	100,9
78	301,4	120,6	109,9	127,9	119,8	144,1	132,4	114,4	106,3
79	291,0	116,4	94,6	150,5	151,4	151,4	130,6	(132,4)	127,0
80	307,1	122,8	88,3	136,0	(177,5)	142,3	115,3	105,4	98,2
unteres Quartil			94,6	127,9	119,6	115,3	107,2	103,2	101,6
Minimum			88,3	124,3	117,1	106,3	104,5	91,0	98,2
arithm. Mittel			107,1	137,1	132,7	129,2	119,6	107,8	109,5
Median			112,2	134,7	131,5	132,4	119,8	109,0	109,0
Maximum			120,7	151,4	151,4	151,4	139,6	122,5	127,0
oberes Quartil			117,1	147,7	150,0	142,3	130,6	113,1	113,7
Standardabweichung			13,0	10,1	14,5	14,8	12,5	8,9	9,3

Tab. 46: Flächen unter den Blutglucoseantwortkurven der Saccharose-Gruppe [mg/dl min]

	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Kontrolle	2984 ± 431	6624 ± 833	10194 ± 1247	13554 ± 1724	16681 ± 2108	19608 ± 2347
Aspalathin	2423 ± 418	4901 ± 907	7529 ± 1380	10331 ± 1704	13138 ± 1972	15857 ± 2269
Catechin	2742 ± 531	5782 ± 931	8710 ± 1203	11548 ± 1498	14298 ± 1795	16999 ± 2115
Isoquercitrin	2680 ± 417	5691 ± 685	8776 ± 1061	11824 ± 1476	14735 ± 1802	17511 ± 2137

Tab. 47: Flächen unter den Blutglucoseantwortkurven der Stärke-Gruppe [mg/dl min]

	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Kontrolle	3091 ± 548	6810 ± 1082	10274 ± 1652	13205 ± 2244	15557 ± 2707	17614 ± 3127
Aspalathin	2577 ± 358	5237 ± 678	7643 ± 994	9817 ± 1289	12007 ± 1612	14180 ± 1946
Catechin	2878 ± 373	6318 ± 824	9778 ± 1394	12832 ± 2039	15487 ± 2559	17832 ± 2955
Isoquercitrin	2850 ± 347	6084 ± 716	9200 ± 1156	12117 ± 1566	14714 ± 1887	17160 ± 2160

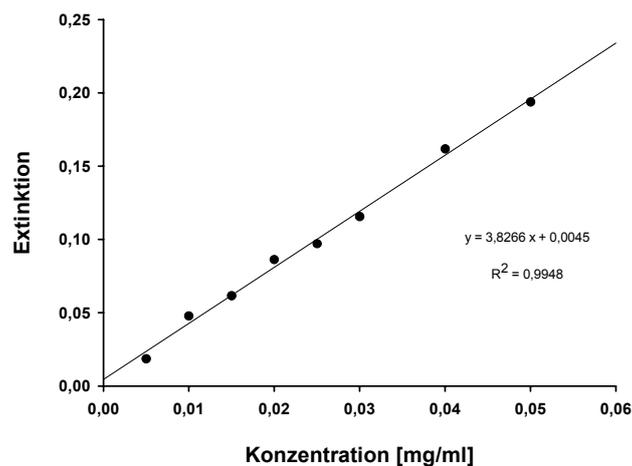


Abb. 104: Kalibrierung Bradford-Assay

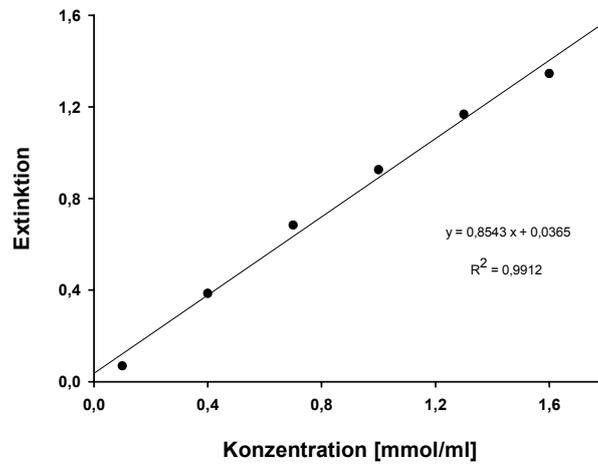


Abb. 105: Kalibrierung Saccharase-Assay

Tab. 48: Saccharaseaktivitäten [U/mg Protein] ((...) Ausreißer, * Tier ausgefallen)

Kontrolle

Tier Nr.	Gewicht [g]	1. Segment	2. Segment	3. Segment	4. Segment	5. Segment
1	326,6	0,033	0,107	0,052	0,051	0,025
2	331,4	0,063	0,155	0,085	(0,084)	0,033
3	322,3	0,067	(0,215)	(0,127)	0,055	0,017
4	338,9	(0,082)	0,108	0,084	0,049	0,064
5	338,1	0,051	0,094	0,095	0,044	0,017
6	321,1	0,036	0,088	0,078	0,056	0,038
7	300,0	0,037	0,116	0,058	0,058	0,033
8	336,1	0,025	0,045	0,060	0,027	0,017
9	318,0	0,031	0,053	0,066	0,049	0,032
10	315,3	0,043	0,094	0,054	0,048	(0,068)
Mittelwert		0,043	0,096	0,070	0,049	0,031
Standardabweichung		0,015	0,033	0,016	0,009	0,015

Aspalathin

Tier Nr.	Gewicht [g]	1. Segment	2. Segment	3. Segment	4. Segment	5. Segment
11	337,5	0,023	0,037	0,041	0,032	0,018
12	323,9	0,017	0,042	(0,057)	0,034	0,031
13	318,8	0,012	0,028	0,029	0,021	0,017
14	322,2	0,014	0,027	0,045	0,022	0,012
15	320,7	0,012	0,021	0,033	0,017	0,018
16	322,4	0,011	0,024	0,020	0,011	0,014
17	363,3	0,019	0,037	0,026	0,027	0,009
18	344,5	0,006	0,018	0,031	0,026	0,017
19	347,7	0,022	(0,058)	0,046	0,022	(0,0333)
20	320,7	0,013	0,034	0,029	0,016	0,012
Mittelwert		0,015	0,030	0,033	0,023	0,016
Standardabweichung		0,005	0,008	0,009	0,007	0,006

Catechin

Tier Nr.	Gewicht [g]	1. Segment	2. Segment	3. Segment	4. Segment	5. Segment
21	340,0	(0,040)	0,039	0,065	0,059	0,035
22	319,2	0,020	0,056	0,051	0,058	0,012
23	307,7	0,021	0,027	0,058	0,023	0,013
24	329,3	0,029	0,049	0,059	0,040	0,008
25	352,9	0,019	0,034	0,068	0,024	0,005
26	328,6	0,018	0,032	0,051	0,031	0,026
27	306,1	0,023	0,037	0,065	0,042	(0,044)
28	300,4	0,021	0,026	(0,024)	0,013	0,006
29	316,4	0,019	0,052	0,040	0,034	0,020
30	342,8	0,015	0,028	0,031	0,023	0,010
Mittelwert		0,020	0,038	0,054	0,035	0,015
Standardabweichung		0,004	0,011	0,012	0,015	0,010

Isoquercitrin

Tier Nr.	Gewicht [g]	1. Segment	2. Segment	3. Segment	4. Segment	5. Segment
31	333,1	0,027	0,041	0,065	0,026	0,013
32	309,7	0,021	0,043	0,034	0,023	0,006
33	344,8	0,028	0,042	0,041	0,024	0,015
34	329,3	0,021	0,031	0,040	0,027	0,020
35	315,7	0,023	0,032	0,033	0,024	0,009
36	344,7	0,022	0,034	0,033	0,021	0,022
37	311,9	0,024	0,032	0,030	0,014	0,006
38	359,5	(0,049)	0,058	0,059	0,044	0,021
39	352,0	0,032	0,064	0,062	0,038	0,021
40	311,8	0,040	(0,071)	(0,107)	(0,132)	0,019
Mittelwert		0,026	0,042	0,044	0,027	0,015
Standardabweichung		0,006	0,012	0,014	0,009	0,006

Tab. 49: α -Amylaseaktivitäten (...) Ausreißer, * Tier ausgefallen)*Kontrolle*

Tier Nr.	Gewicht [g]	Aktivität [U/mg Protein]
41	329,5	5,0
42	323,4	3,5
43	312,5	4,9
44	295,5	5,5
45	317,2	6,6
46	307,0	6,5
47	293,5	(9,4)
48	324,5	7,2
49	339,8	6,9
50	321,5	6,3
Mittelwert		5,8
Standardabweichung		1,2

Aspalathin

Tier Nr.	Gewicht [g]	Aktivität [U/mg Protein]
51	315,0	6,6
52	310,6	7,6
53	307,3	8,3
54	303,2	3,1
55	319,4	7,2
56	290,8	8,0
57	305,8	9,5
58	331,3	4,4
59	313,1	(15,2)
60	322,8	11,4
Mittelwert		7,3
Standardabweichung		2,5

Catechin

Tier Nr.	Gewicht [g]	Aktivität [U/mg Protein]
61	309,6	*
62	300,3	6,6
63	323,2	4,8
64	308,2	4,8
65	324,1	5,0
66	293,5	(9,9)
67	326,3	6,7
68	330,9	6,0
69	348,3	5,0
70	325,0	7,0
Mittelwert		5,7
Standardabweichung		0,9

Isoquercitrin

Tier Nr.	Gewicht [g]	Aktivität [U/mg Protein]
71	315,9	(15,3)
72	292,5	14,3
73	285,3	4,6
74	312,8	5,6
75	300,8	7,9
76	313,8	5,4
77	315,4	4,7
78	321,5	10,1
79	317,7	4,9
80	342,5	5,1
Mittelwert		7,0
Standardabweichung		3,3

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Theres Heinrich

geboren am 09. November 1982 in Halle (Saale)

ledig

Beruflicher Werdegang

seit 03/12 Projektmanagerin Abteilung ONC-QP bei der ONCOTEC Pharma
Produktion GmbH in Dessau-Roßlau

10/07 – 10/11 Wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotion an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg, Institut für Chemie – Lebensmittel-
chemie und Umweltchemie; Betreuung durch Prof. Dr. M. A. Glomb

Studium

10/02 – 04/07 Studium der Lebensmittelchemie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemikerin
Diplomarbeit: „Entwicklung einer schnellen LC/MS/MS-Methode zur
Bestimmung von Phthalaten in Hausstaub“

Schule

14.06.2002 Abitur am Landesgymnasium „Latina August Hermann Francke“,
Halle (Saale)

12 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst wurde. Andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden nicht verwendet. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Datum, Unterschrift