UNTERSUCHUNGEN ZUM POLYPHENOLSPEKTRUM UND ZUR ANTIOXIDATIVEN AKTIVITÄT VON TEE UND ZU WECHSELWIRKUNGEN VON TEEPOLYPHENOLEN MIT EISEN

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl. oec. troph. Karin Schlesier

geboren am 28.09.1971 in Saarbrücken

Jena Dezember 2002

Gutachter

1. Prof. Dr. Roland Bitsch
2. Prof. Dr. Gerhard Jahreis
3. Prof. Dr. Ulrich H. Engelhardt

eingereicht am:	05.12.2002
Mündliche Prüfung:	25.02.2003
Verteidigung:	24.03.2003

Meinen Eltern

„Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,
das Erforderliche erforscht zu haben,
und das Unerforschliche ruhig zu verehren."

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Tabellenverzeichnis		IV
Abbildungsverzeichnis		VIII
Abkürzungsverzeichnis		XI
1 Einleitung und Zielsetzung		**1**
2 Literaturübersicht		**4**
2.1	Polyphenole	4
2.1.1	Einteilung der Polyphenole	4
2.1.2	Vorkommen der Polyphenole	6
2.1.3	Einteilung der Teepolyphenole	6
2.1.4	Herstellung von Tee	8
2.2	Aufnahme der Polyphenole	9
2.3	Metabolismus der Polyphenole	10
2.4	Epidemiologische Befunde zu Polyphenolen	12
2.5	Physiologische Wirkungen der Polyphenole	14
2.6	Experimentelle Methoden	18
2.6.1	Analyse der Polyphenole	18
2.6.2	Antioxidative Aktivität der Polyphenole	19
2.7	Wechselwirkungen von Polyphenolen und anderen Lebensmittelinhaltsstoffen mit Eisen	23
2.8	Charakterisierung verschiedener vegetarischer Ernährungsformen	26
2.9	Eisenstatus	28
2.9.1	Parameter des Eisenstatus	28
2.9.2	Eisenstatus von Mischköstlern und Personen verschiedener vegetarischer Ernährungsformen	29
2.9.3	Eisenstatus von vulnerablen Bevölkerungsgruppen	31
3 Material und Methoden		**33**
3.1	Untersuchungen in Tee	33
3.1.1	Herstellung der Tee-Extrakte	33
3.1.2	Isokratische HPLC-Methode zur Bestimmung der Catechine in Tee	33
3.1.3	Gradienten-HPLC-Methode zur Bestimmung der Catechine und Phenolcarbonsäuren in Tee	35
3.2	In vitro-Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen	38
3.2.1	Prinzip der Untersuchungen	38
3.2.2	Prinzip der Ultrafiltration	39
3.3	Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen unter physiologischen Bedingungen	39
3.4	Bestimmung der antioxidativen Aktivität und deren Bewertung	41
4 Ergebnisse		**43**
4.1	Untersuchungen zu Teepolyphenolen	43
4.1.1	Einfluss von Herkunft und Sorte	43
4.1.2	Einfluss von Temperatur und Anzahl der Extraktionsvorgänge	45

4.1.3 Anteil der Catechine am antioxidativen Potenzial 49
4.1.4 Tee aus einer Rohware - Grün- und Schwarztee 52
4.1.5 Tee aus einer Rohware - Grün-, Oolong- und Schwarztee 56
4.2 In vitro-Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen 62
4.2.1 Ergebnisse zu Versuchsreihe I 63
4.2.2 Ergebnisse zu Versuchsreihe II 64
4.2.2.1 Ergebnisse mit China Gunpowder 65
4.2.2.2 Ergebnisse mit Ceylon Pekoe 66
4.2.3 Ergebnisse zu Versuchsreihe III 67
4.2.3.1 Ansätze mit Pre-Säuglingsnahrung und Ceylon Pekoe 68
4.2.3.2 Ansätze mit Milchbreipulver und Ceylon Pekoe 69
4.3 Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen unter physiologischen Bedingungen 70
4.3.1 Charakterisierung der Tees 70
4.3.2 Analyse des Eisenstatus und des antioxidativen Status 70
4.3.2.1 Eisenstatus und antioxidativer Status nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung 71
4.3.2.2 Eisenstatus und antioxidativer Status im Verlauf der Studie 76
4.4 Bestimmung der antioxidativen Aktivität und deren Bewertung 85
5 Diskussion 90
5.1 Untersuchungen zu Teepolyphenolen 90
5.1.1 Einfluss von Herkunft, Sorte, Temperatur und Anzahl der Extraktionsvorgänge 90
5.1.2 Tee aus einer Rohware - Grün- und Schwarztee 93
5.1.3 Tee aus einer Rohware - Grün-, Oolong- und Schwarztee 96
5.1.4 Anteil der Catechine am antioxidativen Potenzial 99
5.2 In vitro-Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen 102
5.2.1 Einsatz der Standardsubstanzen 102
5.2.2 Einsatz von Tee-Extrakten und Eisensalz 103
5.2.3 Einsatz von Säuglingsnahrungen 105
5.3 Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen unter physiologischen Bedingungen 109
5.3.1 Eisenstatus und antioxidativer Status nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung 109
5.3.2 Eisenstatus und antioxidativer Status im Verlauf der Studie 111
5.4 Bestimmung der antioxidativen Aktivität und deren Bewertung 115
6 Zusammenfassung 121
7 Schlussfolgerung 124
8 Arbeitsvorschriften 125
8.1 Photometrische Bestimmungsmethoden 125
8.1.1 Bestimmung der Gesamtphenolgehalte 125

8.1.2 Bestimmung der Vitamin C-Gehalte in Getränken und Plasma 126
8.1.3 Bestimmung der antioxidativen Aktivität 126
8.1.3.1 TEAC I-Test 126
8.1.3.2 TEAC II-Test 127
8.1.3.3 TEAC III-Test 128
8.1.3.4 TRAP-Test 129
8.1.3.5 DPPH-Test 130
8.1.3.6 DMPD-Test 130
8.1.3.7 FRAP-Test 131
8.1.3.8 PCL-Test 131
8.1.4 Bestimmung von Eisen 132
8.2 HPLC-Methoden 133
8.2.1 Isokratische HPLC-Methode zur Bestimmung der Catechine in Tee 133
8.2.2 Gradienten-HPLC-Methode zur Bestimmung der Catechine und Phenolcarbonsäuren in Tee 134
8.3 In vitro-Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen 135
8.4 Bestimmungsmethoden zur Beurteilung von Eisenstatus, Superoxiddismutase und Glutathion 137
8.4.1 Bestimmung des Hämatokrits 137
8.4.2 Bestimmung des Hämoglobins 137
8.4.3 Bestimmung des Ferritins 137
8.4.4 Bestimmung des Transferrins 137
8.4.5 Bestimmung des Freien Eisens 137
8.4.6 Bestimmung der Freien Eisenbindungskapazität 138
8.4.7 Bestimmung der Superoxiddismutase 139
8.4.8 Bestimmung des Glutathions 140
8.5 Statistische Analyse 141
9 Literaturverzeichnis 142
Anhang 157

Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 2.1:	Einige wichtige Hydroxybenzoesäurederivate mit ihren chemischen Bezeichnungen	5
Tabelle 2.2:	Einige wichtige Hydroxyzimtsäurederivate mit ihren chemischen Bezeichnungen	5
Tabelle 2.3:	Zusammensetzung der frischen Teeblätter und von Teeaufgüssen des grünen, des Oolong- und des schwarzen Tees, Angaben in % der Trockenmasse	9
Tabelle 2.4:	Hauptgruppen der vegetarischen Ernährungsweisen	26
Tabelle 3.1:	Retentionszeiten [min] der untersuchten Catechine bei Verwendung einer mobilen Phase aus Methanol und Wasser (72+28, v/v) mit pH 2,7	33
Tabelle 3.2:	Nachweisgrenzen [µmol/l] und Bestimmungsgrenzen [µmol/l] der untersuchten Catechine	34
Tabelle 3.3:	Retentionszeiten [min] der untersuchten Catechine und Phenolcarbonsäuren bei Verwendung eines Gradientenprogramms	36
Tabelle 3.4:	Nachweisgrenzen [µmol/l] und Bestimmungsgrenzen [µmol/l] der untersuchten Phenolcarbonsäuren	37
Tabelle 3.5:	Alter [a] und Body-Mass-Index (BMI) [kg/m^2] (jeweils $\bar{x}$, min. - max.) der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform und dem Teekonsum während der Studie	41
Tabelle 3.6:	Konzentrationen c [mmol/l] der Stammlösungen der 4 Antioxidantien	42
Tabelle 4.1:	Untersuchte Teeproben mit Sorten- und Herkunftsbezeichnung	44
Tabelle 4.2:	Gesamtphenolgehalte (GAE) [mg/l] und TEAC-Werte [mmol/l] von grünem, Oolong- und schwarzem Tee-Extrakt, jeweils $\bar{x}$ und min. - max.	44
Tabelle 4.3:	Gesamtphenolgehalte (GAE) [mg/l] und TEAC-Werte [mmol/l] ($\bar{x} \pm$ s) der vier untersuchten Grüntees für jeweils fünf Aufgüsse	46
Tabelle 4.4:	Gehalte der Catechine [µmol/l] ($\bar{x} \pm$ s) in dem 1. - 5. Aufguss des China Chun Mee	47
Tabelle 4.5:	Gehalte der Catechine [µmol/l] ($\bar{x} \pm$ s) in dem 1. - 5. Aufguss des Ceylon Pekoe	48
Tabelle 4.6:	Gehalte der Catechine [µmol/l] ($\bar{x} \pm$ s) in den grünen Tee-Extrakten	49
Tabelle 4.7:	TEAC-Werte [mmol/l] der Catechine in den grünen Tee-Extrakten und prozentualer Anteil an dem antioxidativen Potenzial der Tee-Extrakte	51
Tabelle 4.8:	Kalkulierte TEAC-Werte [mmol/l] der Catechine für die grünen Tee-Extrakte, gemessene TEAC-Werte [mmol/l] der Catechinmischungen und der Tee-Extrakte	51
Tabelle 4.9:	Gehalte der Gallussäure und der Catechine [µmol/l] ($\bar{x} \pm$ s) in den grünen und schwarzen Tee-Extrakten beim Aufbrühen mit siedendem Wasser	54
Tabelle 4.10:	Gesamtphenolgehalte (GAE) [mg/l], TEAC-Werte [mmol/l] und FRAP-Werte [µmol/l Fe^{2+}] ($\bar{x} \pm$ s) der Darjeeling-Tee-Extrakte beim Aufbrühen mit siedendem Wasser	56

Tabelle 4.11: Gesamtphenolgehalte (GAE) [mg/l], TEAC-Werte [mmol/l] und FRAP-Werte [µmol/l Fe^{2+}] ($\bar{x}$ ± s) der Tee-Extrakte aus China beim Aufbrühen mit siedendem Wasser 57

Tabelle 4.12: Gehalte der Gallussäure und der Catechine [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) in den grünen, dem Oolong- und den schwarzen Darjeeling-Tee-Extrakten beim Aufbrühen mit siedendem Wasser 57

Tabelle 4.13: Gehalte der Gallussäure und der Catechine [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) in dem grünen, den Oolong- und den schwarzen Tee-Extrakten aus China beim Aufbrühen mit siedendem Wasser 59

Tabelle 4.14: TEAC-Werte [mmol/l] der Catechine in den grünen, Oolong- und schwarzen Tee-Extrakten (Darjeeling und China) und prozentualer Anteil an dem antioxidativen Potenzial der Tee-Extrakte 60

Tabelle 4.15: Kalkulierte TEAC-Werte [mmol/l] der Catechine für die grünen, Oolong- und schwarzen Tee-Extrakte (Darjeeling und China), gemessene TEAC-Werte [mmol/l] der Catechinmischungen und der Tee-Extrakte 61

Tabelle 4.16: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte (GAE) [mmol/l], TEAC-Werte [mmol/l] und Gehalt an Catechin [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Catechin und Fe(II) in einem molaren Verhältnis von 3,4 : 1 (n = 5) 63

Tabelle 4.17: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte (GAE) [mmol/l], TEAC-Werte [mmol/l] und Gehalt an Catechin [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Catechin und Fe(III) in einem molaren Verhältnis von 4 : 1 (n = 5) 64

Tabelle 4.18: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte [mmol/l] und TEAC-Werte [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus China Gunpowder-Tee-Extrakt und Eisen(II)-chlorid (n = 5) 65

Tabelle 4.19: Konzentrationen der Catechine [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus China Gunpowder-Tee-Extrakt und Eisen(II)-chlorid (n = 5) 65

Tabelle 4.20: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte [mmol/l] und TEAC-Werte [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und Eisen(III)-chlorid (n = 5) 66

Tabelle 4.21: Konzentrationen der Catechine [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und Eisen(III)-chlorid (n = 5) 66

Tabelle 4.22: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte [mmol/l] und TEAC-Werte [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und Eisen(II)-chlorid (n = 5) 67

Tabelle 4.23: Konzentrationen der Catechine [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und Eisen(II)-chlorid (n = 5) 67

Tabelle 4.24: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte (GAE) [mmol/l] und TEAC-Werte [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Pre-Säuglingsnahrung und Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt (n = 5) 68

Tabelle 4.25: Konzentrationen der Catechine [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Pre-Säuglingsnahrung und Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt (n = 5) 68

Tabelle 4.26: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte (GAE) [mmol/l] und TEAC-Werte [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Milchbreipulver und Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt (n = 5) 69

Tabelle 4.27: Konzentrationen der Catechine [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Milchbreipulver und Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt (n = 5) 69

Tabelle 4.28: Referenzbereiche der Parameter des Eisenstatus für Frauen (w) und Männer (m) 71

Tabelle 4.29: Eisenstatusparameter Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hkt) im Vollblut, Ferritin, Transferrin, Freies Eisen und Freie Eisenbindungskapazität (EBK) im Plasma ($\bar{x}$, min. - max.) der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten Teil der Interventionsstudie 72

Tabelle 4.30: Eisenstatusparameter Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hkt) im Vollblut, Ferritin, Transferrin, Freies Eisen und Freie Eisenbindungskapazität (EBK) im Plasma ($\bar{x}$, min. - max.) der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung im zweiten Teil der Interventionsstudie 73

Tabelle 4.31: FRAP-Werte [µmol/l Fe^{2+}] ($\bar{x}$ ± s) der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach der ersten Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten und zweiten Teil der Interventionsstudie 76

Tabelle 4.32: Ferritingehalte [µg/l], Freie Eisenbindungskapazität [µmol/l] und Freie Eisenkonzentrationen [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) der Vegetarierinnen nach Konsum von schwarzem Tee bzw. Verzicht auf Tee 79

Tabelle 4.33 Ferritingehalte [µg/l], Freie Eisenbindungskapazität [µmol/l] und Freie Eisenkonzentrationen [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) der Vegetarierinnen nach Konsum von grünem Tee bzw. Verzicht auf Tee 80

Tabelle 4.34: Freie Eisenkonzentrationen [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) der Probandinnen und Probanden nach Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee 82

Tabelle 4.35: Hämoglobinkonzentrationen (HB) [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) der Probandinnen und Probanden im Verlauf der Studie, unterteilt nach der Kostform 83

Tabelle 4.36 Ascorbinsäurekonzentrationen im Plasma [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) der Probandinnen und Probanden im Verlauf der Studie, unterteilt nach der Kostform 83

Tabelle 4.37: TEAC-Werte [mmol/l] der vier Antioxidantien Trolox, Gallussäure, Harnsäure und Ascorbinsäure 86

Tabelle 4.38: Ascorbinsäuregehalte [mg/l], Anteil der Ascorbinsäuregehalte an dem Gesamtphenolgehalt [mg/l] und Gesamtphenolgehalte (GAE) [mg/l] der Getränke und die um die Ascorbinsäure korrigierten Gesamtphenolgehalte (GAE) [mg/l] 88

Tabelle 4.39: Antioxidative Aktivität als TEAC [mmol/l], und Anteil der Ascorbinsäure daran als $TEAC_{Ascorbinsäure}$ [mmol/l] in den Getränken im TEAC II-, TEAC III-Test (hydrophil und lipophil), DPPH-Test und DMPD-Test 89

Tabelle 8.1: Pipettierschema beim PCL-Test 132

Tabelle 8.2: Gradientenprogramm zur Analyse von Catechinen und Phenolcarbonsäuren 135
Tabelle 8.3: Zusammensetzung laut Rezeptur der Pre-Säuglingsnahrung und des Milchbreis 136
Tabelle A 1: Gehalte der Catechine [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) in den 1. - 5. Aufgüssen des China Gunpowder 157
Tabelle A 2: Gehalte der Catechine [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) in den 1. - 5. Aufgüssen des Japan Bancha 157
Tabelle A 3: Ferritingehalte [µg/l], Freie Eisenbindungskapazität [µmol/l] und Freie Eisenkonzentrationen [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) der Vegetarier nach Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee bzw. Verzicht auf Tee 159

Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abbildung 2.1:	Grundstruktur der Flavonoide	4
Abbildung 2.2:	Strukturformel der Gallussäure	6
Abbildung 2.3:	Strukturformel der Chlorogensäure	6
Abbildung 2.4:	Grundstruktur der Catechine	7
Abbildung 2.5:	Grundstruktur der Flavonole	7
Abbildung 2.6:	Grundstruktur der Theaflavine	8
Abbildung 2.7:	Grundstruktur der Thearubigene	8
Abbildung 2.8:	Mögliche Absorptionswege von Quercetinglycosiden in den Dünndarm	11
Abbildung 2.9:	Angriffspunkte von Polyphenolen bei der Kanzerogenese	15
Abbildung 3.1:	Kalibriergeraden der einzelnen Catechine	34
Abbildung 3.2:	HPLC-Chromatogramm einer Standardmischung der fünf untersuchten Catechine	35
Abbildung 3.3:	Kalibriergeraden der Hydroxyzimtsäurederivate	36
Abbildung 3.4:	Kalibriergeraden der Hydroxybenzoesäurederivate	37
Abbildung 3.5:	HPLC-Chromatogramm einer Standardmischung	38
Abbildung 3.7:	Cross over-Design der Studie „Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen unter physiologischen Bedingungen“	40
Abbildung 4.1:	Korrelation zwischen Gesamtphenolgehalten (GAE) und TEAC-Werten	45
Abbildung 4.2:	Veränderungen der relativen Gehalte der Catechine des Ceylon Pekoe bezogen auf den 1. Aufguss beim Aufbrühen mit siedendem Wasser	48
Abbildung 4.3:	Veränderungen der relativen Gehalte der Catechine des Ceylon Pekoe bezogen auf den 1. Aufguss bei einer Aufbrühtemperatur von 80 °C	49
Abbildung 4.4:	Kalibriergeraden der Catechinstandardsubstanzen in dem TEAC I-Test	50
Abbildung 4.5:	Gesamtphenolgehalte [mg/l] und TEAC-Werte [mmol/l] der grünen und schwarzen Tee-Extrakte beim Aufbrühen mit siedendem und mit auf 80 °C abgekühltem Wasser	53
Abbildung 4.6:	Relative Veränderungen [%] der Gallussäure und Catechine in Schwarztees bezogen auf den Grüntee	54
Abbildung 4.7:	Relative Veränderungen [%] der Gallussäure und Catechine in Oolong-Tee (OT) und Schwarztee first flush (ST ff) und second flush (ST sf) bezogen auf den Grüntee (GT) von Darjeeling	58
Abbildung 4.8:	Relative Veränderungen [%] der Gallussäure und Catechine in Oolong-Tee Nr. 1 (OT Nr. 1) und Nr. 2 (OT Nr. 2) und Schwarztee Nr. 1 (ST Nr. 1) und Nr. 2 (ST Nr. 2) bezogen auf den Grüntee (GT) aus China	59
Abbildung 4.9:	GSH- [µmol/mmol Hb] und SOD- [U/µmol Hb] Gehalte der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten Teil der Interventionsstudie	74

Abbildung 4.10: GSH- [µmol/mmol Hb] und SOD- [U/µmol Hb] Gehalte der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im zweiten Teil der Interventionsstudie 74
Abbildung 4.11: Vitamin C-Gehalte im Plasma [µmol/l] der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten Teil der Interventionsstudie 75
Abbildung 4.12: Vitamin C-Gehalte im Plasma [µmol/l] der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung im zweiten Teil der Interventionsstudie 75
Abbildung 4.13: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Mischköstler nach Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee im Laufe der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung 77
Abbildung 4.14: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Mischköstler bei Verzicht auf grünen bzw. schwarzen Tee im Laufe der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung 77
Abbildung 4.15: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Mischköstlerinnen nach Konsum von schwarzem Tee im Laufe der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung 78
Abbildung 4.16: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Mischköstlerinnen bei Verzicht auf schwarzen Tee im Laufe der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung 78
Abbildung 4.17: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Mischköstlerinnen nach Konsum von grünem Tee im Laufe der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung 80
Abbildung 4.18: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Vegetarierinnen nach Konsum von grünem Tee im Laufe der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung 80
Abbildung 4.19: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Frauen mit Ferritin-Ausgangswerten unter 25 µg/l zu Beginn der Studie nach Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee 81
Abbildung 4.20: Transferringehalte [g/l] im Plasma der Frauen mit Ferritin-Ausgangswerten unter 25 µg/l zu Beginn der Studie nach Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee 81
Abbildung 4.21: FRAP-Werte [µmol/l Fe^{2+}] der Probandinnen und Probanden unterteilt nach ihrer Kostform nach Konsum von grünem Tee im Verlauf der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung 84
Abbildung 4.22: FRAP-Werte [µmol/l Fe^{2+}] der Probandinnen und Probanden unterteilt nach ihrer Kostform nach Konsum von schwarzem Tee im Verlauf der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung 85
Abbildung 4.23: Antioxidative Aktivität der Harnsäure bei verschiedenen Konzentrationen in dem DPPH-, TEAC II-, TEAC III-Test (hydrophil und lipophil) 87
Abbildung 5.1: Reaktionen der Polyphenole bei der Herstellung von schwarzem Tee 94

Abbildung 8.1: Schematische Darstellung des Extinktionsverlaufs des Blindwertes (BLW) und der Substanz beim TEAC I-Test 127
Abbildung 8.2: Schematische Darstellung des Fluoreszenzverlaufs des Blindwertes (BLW) und der Substanz beim TRAP-Test 129
Abbildung 8.3: Schematische Darstellung des Extinktionsverlaufs des Blindwertes (BLW) und der Substanz beim DPPH-Test 130
Abbildung 8.4: Verlauf des Blindwertes (BLW) und der Substanz beim PCL-Test 132
Abbildung A 1: HPLC-Chromatogramm des grünen Darjeeling A bei einer Aufbrühtemperatur von 100 °C 158
Abbildung A 2: HPLC-Chromatogramm des schwarzen Darjeeling A bei einer Aufbrühtemperatur von 100 °C 158
Abbildung A 3: Aufbau der verwendeten AMICON-Rührzelle 159

Abkürzungsverzeichnis

a	Alter
A_0	Anfangsextinktion
ABAP	2,2'-Azo-bis(2-amidinopropan)-hydrochlorid
ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
AOM	Azoxymethan
ACW	Antioxidative Kapazität wasserlöslicher Substanzen
AUC	Area under the plasma concentration-time curve
BAECs	bovine aortic endothelial cells
BLW	Blindwert
BMI	Body-Mass-Index
BOP	Broken Orange Pekoe
BP	Broken Pekoe
bzw.	beziehungsweise
C	(+)-Catechin
c	Konzentration
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-propan-1-sulfonsäure
CH	Chinon
Chl	Chlorogensäure
CTC	Crushing Tearing Curling
d	day/Tag
DMBA	7,12-Dimethylbenz(a)antracen
DMPD	N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin
DNP	2,4-Dinitrophenylhydrazin
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil
E	Extinktion
EBK	Freie Eisenbindungskapazität
EC	(-)-Epicatechin
ECG	(-)-Epicatechingallat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N‘,N‘-tetraessigsäure
EGC	(-)-Epigallocatechin
EGCG	(-)-Epigallocatechingallat
ENNG	N-Ethyl-N’-nitro-N-nitro-guanidin
FBOP	Flowery Broken Orange Pekoe
Fe^{2+}/Fe(II)	zweiwertiges Eisen
Fe^{3+}/Fe(III)	dreiwertiges Eisen
$FeCl_3$	Eisen(III)-chlorid
$FeCl_2$	Eisen(II)-chlorid
ff	first flush
FL	Flammenatomabsorptionsspektrometer
FTGFOP	Fine Tippy Golden Flowery Orange Pekoe
FOP	Flowery Orange Pekoe
FOSHU	Foods for specified health use
FRAP	Ferric reducing ability of plasma

FS	Ferulasäure
GAE	Gallussäureäquivalente
GC	Gallocatechine
GES	Gentisinsäure
GFBOP	Golden Flowery Broken Orange Pekoe
GFOP	Golden Flowery Orange Pekoe
β-G	cytosolische β-Glucosidase
GS	Gallussäure
GSH	Glutathion
GT	Grüntee
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HDL	High-density-lipoprotein
Hkt	Hämatokrit
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
$HO^{\bullet}$	Hydroxylradikale
KäG	Kämpferolglycosid
KS	Kaffeesäure
LDL	Low-density-lipoprotein
LPH	Lactase-Phlorizin-Hydrolase
m	männlich
min	Minuten
MK	Mischköstler/innen
MKGT	Mischköstler/innen Konsum von grünem Tee
MKST	Miscköstler/innen Konsum von schwarzem Tee
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
MROD	Methoxyresorufin *O*-Demethylase-Test
MS	Massenspektrometrie
MyG	Myricetinglycosid
Na^{+}	Natrium
NH_2OH * HCl	Hydroxylammoniumchlorid
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
n.n.	nicht nachweisbar
OFCTC	Orange Flowery Crushing Tearing Curling
OP	Orange Pekoe
ORAC	Oxygen-radical absorbing capacity
OT	Oolong-Tee
p	Signifikanz
P	Pekoe
PCL	Photochemolumineszens
pCS	p-Cumarsäure
PCS	Protocatechusäure
pHB	p-Hydroxybenzoesäure
pHBME	p-Hydroxybenzoesäuremethylester
QuG	Quercetinglycosid
RP	Reverse-phase

s	Standardabweichung
s.	siehe
sec	Sekunden
sf	second flush
SFTGFOP	Special Fine Tippy Golden Flowery Orange Pekoe
SGLT 1	Sodium dependent glucose transporter 1/ natriumabhängiger Glucosetransporter
SOD	Superoxiddismutase
SPS	Sinapinsäure
SYG	Syringasäure
$O_2^{\bullet-}$	Superoxidradikal
TCA	Trichloressigsäure
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TF	Transferrin
TGFBOP	Tippy Golden Flowery Broken Orange Pekoe
TGFOP	Tippy Golden Flowery Orange Pekoe
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TPTZ	2,4,6-Tripyridyl-s-triazin
TR	Thearubigene
TRAP	Total radical-trapping antioxidant parameter
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure
U	Units
u. a.	unter anderem
UDPGT	Uridindiphospho-D-Glucoseglucuronosyltransferase
U/min	Umdrehungen pro Minute
v. a.	vor allem
VCEAC	Vitamin C equivalent antioxidant capacity
VERA	Verbundstudie Ernährungserhebung und Risikofaktorenanalytik
VGGT	Vegetarier/innen Konsum von grünem Tee
VGST	Vegetarier/innen Konsum von schwarzem Tee
VS	Vanillinsäure
w	weiblich
$\bar{x}$	Mittelwert
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung und Zielsetzung

Tee ist aufgrund seines guten Aromas und seiner gesundheitsfördernden Effekte weltweit ein sehr beliebtes Getränk. Tee erfreut sich auch in Deutschland großer Beliebtheit und der Pro-Kopf-Verbrauch liegt 1999 mit 0,25 kg auf hohem Niveau [DEUTSCHER TEEVERBAND 2000]. Epidemiologische Studien belegen einen Zusammenhang zwischen dem reichlichem Verzehr von Obst und Gemüse und dem verringerten Auftreten bestimmter degenerativer Erkrankungen, wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs. Diese Wirkung wird den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zugesprochen, die in pflanzlichen Lebensmitteln weit verbreitet sind und als effektive Antioxidantien angesehen werden [TIJBURG et al. 1997]. Eine Untergruppe der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe bilden die Polyphenole, die im grünen, Oolong- und schwarzen Tee enthalten sind [BALENTINE et al. 1997].

In der *Zutphen Elderly Study* [HERTOG et al. 1993], einer longitudinalen Studie, wurden Männer im Alter von 40 - 59 Jahren während eines Zeitraums von 1960 bis 1990 in Zutphen in den Niederlanden hinsichtlich ihrer Aufnahme an Flavonoiden beobachtet. Die Hauptquellen an Flavonoiden waren schwarzer Tee gefolgt von Zwiebeln und Äpfeln. Die Höhe der Flavonoidaufnahme zeigte eine signifikante inverse Beziehung zu der Sterblichkeit an Herz-Kreislauferkrankungen. Hingegen konnte kein Einfluss auf das Gesamtkrebsrisiko sowie auf das Risiko für Tumore des Gastrointestinaltraktes und des Respirationstraktes nachgewiesen werden. Der Zusammenhang zwischen einem hohen Teekonsum und einer niedrigeren Sterblichkeit an koronaren Herzerkrankungen wurde in der in Wales durchgeführten *Caerphilly Study* nicht bestätigt. Die Ursache liegt vermutlich in der Angewohnheit, Tee mit Milch zu trinken [HERTOG et al. 1997]. In der *Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer* war das Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, für Teekonsumenten und Nichtteekonsumenten vergleichbar. Die präventive Wirkung von schwarzem Tee in Hinblick auf Magen-, Darm-, Lungen- und Brustkrebs konnte nicht bestätigt werden [GOLDBOHM et al. 1996].

Die *Seven Countries Study* beschrieb die Beziehung zwischen der Aufnahme von antioxidativen Flavonoiden und der niedrigeren Sterblichkeit an koronaren Herzerkrankungen in verschiedenen Ländern. Die hohe Zufuhr an Flavonoiden schützt die LDL-Fraktion vor Lipidperoxidation. Das Auftreten von Darm- und Lungenkrebs wurde nicht beeinflusst [HERTOG et al. 1995]. Deutlich wurde ebenfalls der Zusammenhang zwischen dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen beim Menschen und der hohen Zufuhr an sekundären Pflanzenstoffen in Frankreich, wo trotz einer hohen Aufnahme an gesättigten Fettsäuren und Cholesterin die Mortalitätsrate an Herz-Kreislauf-Erkrankungen überraschend niedriger liegt

als in Ländern mit geringerer Aufnahme, wie etwa den USA. Dieser Zusammenhang ist unter dem Begriff Französisches Paradoxon bekannt [RENAUD und DE LORGERIL 1992].

Polyphenole zeichnen sich durch sehr vielfältige physiologische Wirkungen wie z. B. antikanzerogene, antimikrobielle, antioxidative, antithrombotische, immunmodulierende, entzündungshemmende, blutdruck- und blutglucosebeeinflussende Wirkungen aus [DREOSTI 1996, YANG et al. 2001, MUKHTAR und AHMAD 2000]. Die Polyphenole greifen in die verschiedenen Phasen der Kanzerogenese ein [CARAGAY 1992], was vor allem in Tierversuchen gezeigt wurde [GEE und JOHNSON 2001].

Die antioxidative Wirkung von Polyphenolen und Lebensmittelextrakten wird mittels verschiedener in vitro-Verfahren ermittelt. Die bekannteste und sehr oft angewandte Methode ist der TEAC I-Test (TEAC = Trolox equivalent antioxidant activity). Dieser Test beruht auf der Oxidation einer Azoverbindung zu einer grün-blauen photometrisch messbaren Verbindung [MILLER et al. 1993]. Antioxidantien verzögern die Bildung dieser Substanz um eine bestimmte Zeit, die sogenannte Lagphase, die ein Maß für das antioxidative Potenzial der untersuchten Substanz ist. Mit dem TEAC I-Test kann die antioxidative Wirkung von wasserlöslichen Verbindungen untersucht werden. Andere, später entwickelte, Versionen des TEAC-Tests bestimmen die antioxidative Wirkung im Lipidsystem [MILLER et al. 1996, RE et al. 1999]. Der FRAP-Test (FRAP = Ferric reducing ability of plasma) nutzt die Fähigkeit von Plasma bzw. Lebensmittelextrakten dreiwertiges Eisen zu reduzieren, wobei ein photometrisch messbarer Eisen(II)-Komplex gebildet wird [BENZIE und STRAIN 1996]. Der TRAP-Test (TRAP = Total radical trapping antioxidant parameter) bedient sich der fluoreszierenden Eigenschaft eines Proteins, die durch einen temperaturabhängigen Radikalbildner zerstört wird. Antioxidantien verzögern die Fluoreszenzabnahme für eine gewisse Zeit.

Eisenmangel ist der meist verbreiteste Mikronährstoffmangel in der Welt [WHO 1992]. Ursachen für ein Eisendefizit sind zum einen der Mangel an eisenreichen Nahrungsmitteln sowie die geringe Bioverfügbarkeit des Eisens, vor allem des Nicht-Hämeisens [HALLBERG 2001]. Im Rahmen einer Meta-Analyse wurde in Europa bei 1 % der erwachsenen Männer und 14 % der erwachsenen Frauen Anämie festgestellt im Gegensatz zu Afrika, wo 27 % der Männer und 48 % der Frauen Anämie aufwiesen [MARX 1997].

Verschiedene in vitro-Studien [MINIHANE et al. 1993] und Studien an Ratten [RECORD et al. 1996] untersuchten die Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen, wobei die Ergebnisse sehr widersprüchlich sind und nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar. So stellten RECORD et al. [1996] bei Ratten keinen Einfluss von grünem bzw.

schwarzem Tee auf die Eisenaufnahme aus der Nahrung fest. In der in vitro-Untersuchung von MINIHANE et al. [1993] wurde die Verfügbarkeit des in der Säuglingsnahrung enthaltenen Eisen durch den Zusatz von Tanninsäure verschlechtert. Die Aufnahme von Eisen wird nicht nur durch Tee sondern auch durch andere Lebensmittelinhaltsstoffe wie Phytate, Calcium, Ascorbinsäure beeinflusst [ZIJP et al. 2000]. In vivo-Studien zeigten eine Behinderung der Eisenaufnahme aus der Nahrung bzw. aus Eisensalzen durch den Konsum von polyphenolhaltigen Getränken wie z. B. Tee, Kaffee, Wein und Kakao [DISLER et al. 1975a, HURRELL et al. 1999, COOK et al. 1995].

Zu den vulnerablen Bevölkerungsgruppen zählt BITSCH [1996] vor allem menstruierende Frauen, Schwangere, Stillende, Säuglinge nach dem Abstillen, Jugendliche im Wachstumsalter, Blutspender, Leistungssportler und Vegetarier. Eine adäquate Eisenversorgung ist für die Entwicklung von Säuglingen, Kindern und schwangeren Frauen essenziell [HALLBERG 2002]. BALL und BARTLETT [1999] stellten bei Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen in Australien eine vergleichbare Aufnahme an Nahrungseisen fest. Die Vegetarierinnen hatten niedrigere Ferritinspiegel als die Mischköstlerinnen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse und quantitative Bestimmung von Polyphenolen in Grün-, Oolong- und Schwarztee und der Einfluss von verschiedenen Extraktionsbedingungen auf diese Gehalte und die antioxidative Aktivität der Tee-Extrakte. Des weiteren wurde der Anteil der einzelnen polyphenolischen Verbindungen an dem protektiven Potenzial der Tee-Extrakte ermittelt. Die Wechselwirkungen von Teepolyphenolen und Eisen wurden anhand von in vitro-Untersuchungen und einer Humanstudie mit Mischköstlern und Vegetariern geprüft. Mit Hilfe von Standardsubstanzen und Getränken wurden mehrere in vitro-Tests zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität verglichen und bewertet.

2 Literaturübersicht

2.1 Polyphenole

2.1.1 Einteilung der Polyphenole

Polyphenole, früher auch unter den Begriffen „Tannine“ bzw. „Gerbstoffe“ bekannt, bilden eine Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe. Sekundäre Pflanzenstoffe werden als Abwehrstoffe gegen Schädlinge und Krankheiten, als Wachstumsregulatoren und als Farbstoffe von der Pflanze synthetisiert [BITSCH 1999]. Bisher sind etwa 30000 sekundäre Pflanzenstoffe bekannt, von denen ungefähr 5000 - 10000 in der Nahrung vorkommen. Die Polyphenole werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: Flavonoide und Phenolcarbonsäuren. Die Flavonoide lassen sich in folgende Gruppen unterteilen:

- Anthocyane
- Flavanole (Catechine)
- Flavanone
- Flavone
- Flavonole
- Isoflavonoide
- Dihydroflavonole
- Chalkone

Die de novo-Synthese der Flavonoide umfasst die Schritte der Umwandlung von Glucose in Phenylalanin über den Shikimisäureweg und die Bildung von Zimtsäure oder Cumarinsäure. Die 4-Cumarsäure reagiert mit 3 Molekülen Malonyl-CoA zum 4,2',4',6'-Tetrahydroxychalkon, das bereits das C-15-Grundgerüst der Flavonoide aufweist und mehrere phenolische OH-Gruppen trägt. Seine Zyklisierung führt zu den Flavonoiden, deren Grundstruktur, das 2-Phenyl-benzpyran, in Abbildung 2.1 dargestellt wird [BÖHM et al. 1998].

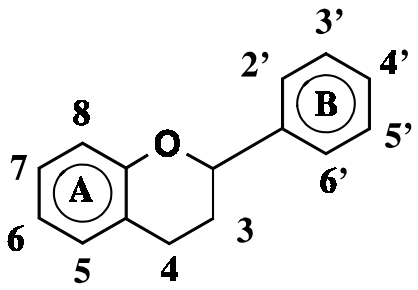


Abbildung 2.1: Grundstruktur der Flavonoide

Die Grundstruktur der Flavonoide setzt sich aus einem C_6-C_3-C_6-Ringsystem zusammen, d. h. zwei aromatische Ringsysteme A und B sind über einen heterozyklischen Sauerstoffring verbunden [BRAVO 1998]. Die große Vielfalt der Flavonoide beruht auf den Modifizierungen des Grundgerüstes. Durch Substitution von Hydroxyl- und Methoxylgruppen in den Benzolringen A und B oder durch Verknüpfung der Hydroxylgruppen mit einem Zucker bzw. Phosphat oder durch Variationen am Pyranring können die Flavanole, Flavone, Catechine, Flavanone, Anthocyanidine und Isoflavonoide gebildet werden [SCALBERT und WILLIAMSON 2000]. Die Flavanole (Catechine) und die Flavonole werden im Abschnitt 2.1.3 näher erläutert.

Die Phenolcarbonsäuren werden in die Hydroxybenzoesäure- und Hydroxyzimtsäurederivate unterteilt. Die folgenden Tabellen zeigen einige wichtige, in den eigenen Untersuchungen verwendete, Phenolcarbonsäuren der zwei genannten Gruppen.

Tabelle 2.1: Einige wichtige Hydroxybenzoesäurederivate mit ihren chemischen Bezeichnungen

Derivat	Abkürzung	Chemische Bezeichnung
Gallussäure	GS	3,4,5-Trihydroxybenzoesäure
Protocatechusäure	PCS	3,4-Dihydroxybenzoesäure
Gentisinsäure	GES	2,5-Dihydroxybenzoesäure
p-Hydroxybenzoesäure	PHB	4-Hydroxybenzoesäure
Vanillinsäure	VS	4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure
Syringasäure	SYG	4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure

Tabelle 2.2: Einige wichtige Hydroxyzimtsäurederivate mit ihren chemischen Bezeichnungen

Derivat	Abkürzung	Chemische Bezeichnung
Kaffeesäure	KS	3,4-Dihydroxyzimtsäure
p-Cumarsäure	pCS	4-Hydroxyzimtsäure
Chlorogensäure	Chl	5-Caffeoyl-Chinasäure
Ferulasäure	FS	4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure
Sinapinsäure	SPS	3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure

Die folgenden Strukturformeln zeigen die Struktur der Gallussäure als Vertreter der Hydroxybenzoesäuren und die der Chlorogensäure als Vertreter der Hydroxyzimtsäuren.

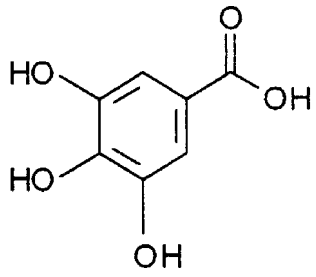


Abbildung 2.2: Strukturformel der Gallussäure

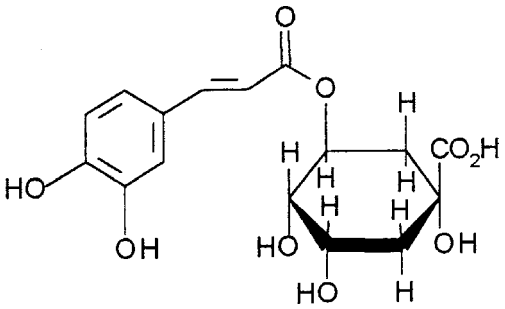


Abbildung 2.3: Strukturformel der Chlorogensäure

2.1.2 Vorkommen der Polyphenole

Der Gehalt und das Spektrum der phenolischen Verbindungen in einer Pflanze sind nicht nur sortenabhängig, sondern werden auch durch Anbau- und Vegetationsbedingungen sowie Reifegrad beeinflusst. Innerhalb der Frucht ist eine inhomogene Verteilung der phenolischen Verbindungen zu beobachten, wobei besonders hohe Konzentrationen in den äußeren Schichten der Pflanzenteile anzutreffen sind. Dort schützen sie aufgrund ihrer Radikalfängereigenschaften das darunter liegende Gewebe [BITSCH 1999, ROBARDS et al. 1999].

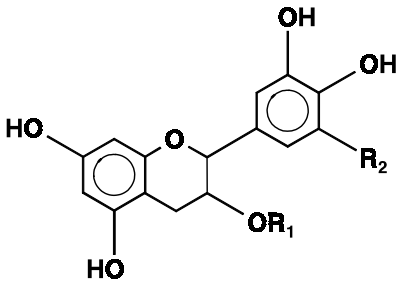
Gallussäure kommt hauptsächlich in holzigen Pflanzen vor, und zwar in löslicher Form gebunden an Glucose, als hydrolysierbares Gallotannin oder als Chinasäureester [HARBORNE 1980]. Theogallin, ein Chinasäureester der Gallussäure, macht 1 % der Trockensubstanz in Teeblättern aus [HERRMANN 1984].

Chlorogensäure ist der am weitesten verbreitete Hydroxyzimtsäureester in Früchten [BITSCH 1999]. In Äpfeln wurden Gehalte von 30 - 60 mg/kg Chlorogensäure nachgewiesen [BURDA et al. 1990]. Hohe Mengen sind auch in Gemüse wie Auberginen, Kartoffeln und Möhren (22 - 632 mg/kg) sowie in Tee und Kaffeebohnen (190 mg in einer Tasse gebrühtem Kaffee) enthalten [HERRMANN 1991, CLINTON 1985].

2.1.3 Einteilung der Teepolyphenole

Tee ist aufgrund seines guten Aromas und seiner gesundheitsfördernden Effekte weltweit ein sehr beliebtes Getränk. Seit über 3000 Jahren wird Tee im südlichen China und im übrigen Ostasien in Hausgärten von Kleinbauern angepflanzt. Vor etwa 150 Jahren erlangte Tee eine weltweite Verbreitung und wird heute in Asien, Afrika, Amerika und Australien angepflanzt. Der Pro-Kopf-Verbrauch lag 1999 in Großbritannien bei 2,46 kg, in Irland bei 3,23 kg und in Deutschland bei 0,25 kg, wobei der Anteil von Grüntee bei 18 % liegt [DEUTSCHER TEE-VERBAND 2000].

Bezogen auf das Trockengewicht enthalten frische Teeblätter mehr als 35 % Polyphenole. Vor allem Catechine (Flavanole) finden sich in frischen Teeblättern. Zu den Hauptcatechinen in Grüntee zählen (-)-Epicatechin, (-)-Epicatechingallat, (-)-Epigallocatechin und (-)-Epigallocatechingallat. Die Catechine sind durch Hydroxylgruppen am B-Ring und eine Hydroxylgruppe in meta-Stellung am A-Ring charakterisiert (A- und B-Ring s. Abbildung 2.1) [BALENTINE et al. 1997]. Die folgende Strukturformel zeigt das Grundgerüst der Catechine.

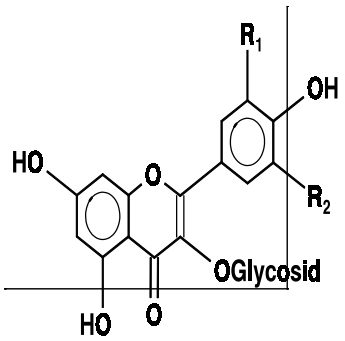


	Abkürzung	R_1	R_2
Catechin und Epicatechin	C und EC	H	H
Epicatechingallat	ECG	Gallat	H
Epigallocatechin	EGC	H	OH
Epigallocatechingallat	EGCG	Gallat	OH

Abbildung 2.4: Grundstruktur der Catechine
[modifiziert nach BALENTINE et al. 1997]

Gallocatechine sind Verbindungen, bei denen der B-Ring mit drei Hydroxylgruppen substituiert ist. Verbindungen, deren Hydroxylgruppe des Pyranringes mit Gallussäure verestert ist, werden als Catechingallate bezeichnet [GRAHAM 1992].

Flavonole wie z. B. Quercetin, Kämpferol, Myricetin und deren Glycoside sind charakterisiert durch einen 4-Oxo-3-hydroxyring, der den A- und B-Ring miteinander verbindet. Diese Verbindungen machen ungefähr 3 % bezogen auf das Trockengewicht der Teeblätter aus [BALENTINE et al. 1997]. Abbildung 2.5 zeigt die Strukturformel der Flavonole.



	Abkürzung	R_1	R_2
Kämpferolglycosid	KäG	H	H
Quercetinglycosid	QuG	OH	H
Myricetinglycosid	MyG	OH	OH

Abbildung 2.5: Grundstruktur der Flavonole
[modifiziert nach TIJBURG et al. 1997]

Die im schwarzen Tee enthaltenen Theaflavine und Thearubigene werden in den folgenden Strukturformeln dargestellt.

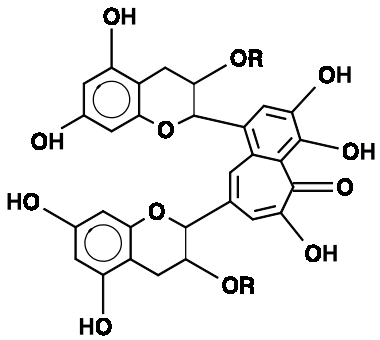


Abbildung 2.6: Grundstruktur der Theaflavine
[modifiziert nach TIJBURG et al. 1997]

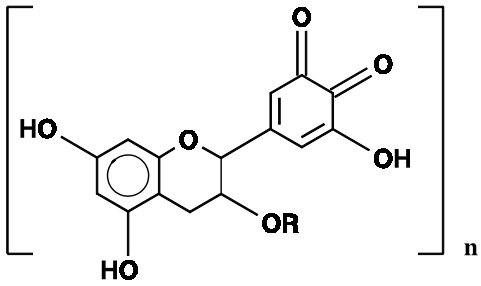


Abbildung 2.7: Grundstruktur der Thearubigene
[modifiziert nach TIJBURG et al. 1997]

Der Gesamttheaflavingehalt in schwarzem Tee liegt bei 2 % bezogen auf die Trockenmasse der Teeblätter. Dabei existieren 4 Haupttheaflavine, die sich in dem Gehalt und der Position der Gallatgruppen unterscheiden: Theaflavin, Theaflavin-3-gallat, Theaflavin-3'-gallat und Theaflavin-3,3'digallat [BALENTINE et al. 1997]. Die Thearubigene sind für die rot-braune Färbung des schwarzen Teegetränks verantwortlich.

2.1.4 Herstellung von Tee

Aus der Teepflanze Camellia sinensis werden drei verschiedene Arten Tee hergestellt: Der unfermentierte Grüntee, der halbfermentierte Oolong-Tee und der fermentierte Schwarztee. Der Unterschied liegt in der sogenannten Fermentation[1], einer Umsetzung durch blatteigene Enzyme.

Bei der Herstellung von Grüntee werden die Enzyme durch das Dämpfen der Teeblätter inaktiviert. Die Inhaltsstoffe bleiben somit intakt. Anschließend werden die Teeblätter gerollt und getrocknet. Der Teeaufguss des grünen Tees zeichnet sich durch seine sehr helle Farbe und seinen bitteren Geschmack aus. Die Catechine tragen zu der Bitterkeit und Adstringenz des Teeaufgusses des grünen Tees bei.

Die Herstellung des Oolong-Tees ist gekennzeichnet durch ein kurzes Welken der Teeblätter, gefolgt von dem Rollen und einer anschließenden Fermentation. Diese Fermentation wird durch Rösten gestoppt und die Teeblätter werden getrocknet.

Bei der Herstellung von schwarzem Tee wird durch das Welken und Rollen der Teeblätter die Aktivität der Polyphenoloxidasen gesteigert. Während der Fermentation finden Kondensations- und Polymerisationsreaktionen statt, bei denen Catechine und Catechinderivate als Sub-

[1] Die Fermentation ist definitionsgemäß ein Prozess der Herstellung oder Umwandlung bestimmter Produkte mit Hilfe von Mikroorganismen.

strate dienen und enzymatisch zu Theaflavinen und Thearubigenen oxidiert werden. Die Teeblätter werden dazu bei 35 - 40 °C fünf bis sieben Zentimeter hoch aufgeschichtet. Die Theaflavine verleihen dem Teeaufguss seine orange Färbung, die Thearubigene die rotbräunliche Farbe und den adstringierenden Geschmack. Das CTC-Verfahren (C = Crushing, T = Tearing, C = Curling) ist durch eine verkürzte Fermentationsdauer gekennzeichnet, dadurch wird die Verarbeitung billiger und schneller. Das Ergebnis ist ein gleichmäßig geschnittenes Teeblatt [GRAHAM 1992, BOKUCHAVA und SKOBELEVA 1969].

Die folgende Tabelle erläutert die Zusammensetzung von frischen Teeblättern und von Teeaufgüssen von grünem, Oolong- und schwarzem Tee.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der frischen Teeblätter und von Teeaufgüssen des grünen, des Oolong- und des schwarzen Tees, Angaben in % der Trockenmasse
[[1]BALENTINE et al. 1997, [2]ENGELHARDT 1995]

	Frische Blätter	Grüner Tee, Aufguss	Oolong-Tee, Aufguss	Schwarzer Tee, Aufguss
Koffein	4[1]	3 - 6[1]	2,3 - 2,8[2]	3 - 6[1]
Catechine	30[1]	30 - 42[1]	1,4 - 5,7[2]	3 - 10[1]
Theaflavine	0[1]	0[1]	*	2 - 6[1]
Flavonole	2[1]	2[1]	*	1[1]
Andere Polyphenole	3[1]	6[1]	*	23[1]
Theanin/ Aminosäuren	4[1]	je 3[1]	*	je 3[1]
Peptide/ Proteine	15[1]	6[1]	*	6[1]
Zucker/ andere Kohlenhydrate	7[1]	7/4[1]	*	7/4[1]
Mineralstoffe	*	5 - 8[1]	*	5 - 8[1]

* keine Daten

2.2 Aufnahme der Polyphenole

Die tägliche Aufnahme von Flavonolen in der alten Bundesrepublik wurde basierend auf den Daten aus der Nationalen Verzehrsstudie auf 11,5 mg/d geschätzt. Die sekundären Pflanzenstoffe stammen vorwiegend aus Obst und Gemüse, aber auch aus Tee und Rotwein [BÖHM et al. 1998]. In den Niederlanden [HERTOG et al. 1993] liegt die tägliche Aufnahme von Flavonoiden bei ~23 mg und in Dänemark bei ~26 mg [JUSTESEN et al. 1997]. Diese Studien berücksichtigen nur eine kleine Gruppe der Flavonoide. Zu dem heutigen Zeitpunkt existiert keine abgesicherte wissenschaftliche Basis, weder für Zufuhrempfehlungen noch für Zufuhrbeschränkungen der Polyphenole in den Referenzwerten für die Nährstoffzufuhr [DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG et al. 2000]. Die präventive Wirkung der sekundären Pflanzenstoffe bei der Entstehung von degenerativen Erkrankungen ist unbestritten. Deswegen empfehlen der World Cancer Research Fund und das American Institute for

Cancer Research täglich 7 % der Gesamtenergie in Form von Gemüse und Obst aufzunehmen [World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research 1997]. Dies entspricht bei einer Energieaufnahme von 2000 kcal 400 g Gemüse und Obst. Diese Empfehlung des World Cancer Research spiegelt sich in der „5 am Tag“ Kampagne der Deutschen Gesellschaft für Ernährung wieder. Der tägliche Verzehr von mindestens 5 Portionen Obst und Gemüse, d. h. 250 - 300 g Obst und 400 g Gemüse, wirkt u. a. vorbeugend gegen Herz-Kreislauferkrankungen, Diabetes und vor allem Krebserkrankungen.

2.3 Metabolismus der Polyphenole

Aufnahme und Metabolisierung der polyphenolischen Verbindungen finden je nach ihrer chemischen Struktur unterschiedlich statt. Die frei vorliegenden Phenolcarbonsäuren können direkt im Intestinum aufgenommen werden [BRAVO 1998].

Innerhalb der Gruppe der Flavonoide ist die Aufnahme und der Metabolismus von Quercetin am meisten untersucht. Für Quercetin wurde eine Absorption im Ileum nachgewiesen. Die Absorption von Quercetinglycosid und -rutinosid zeigten HOLLMAN et al. [1995] bei Ileostomiepatienten.

GEE et al. [2000] beschreiben die Interaktion von Quercetin-3-glycosid mit dem natriumabhängigen Glucosetransporter SGLT 1 (= sodium-dependent glucose transporter). Quercetin-3-glycosid behindert auf der einen Seite den intestinalen Transport von D-Galaktose in die Mukosa. Auf der anderen Seite wird das Ausströmen von radioaktiv markierter D-Galaktose aus der Mukosa in Anwesenheit von Quercetin-3-glycosid beschleunigt. In der Abbildung 2.8 werden die von GEE et al. [2000] beschriebenen Transportmöglichkeiten von Quercetinglycosiden in die Epithelzelle veranschaulicht.

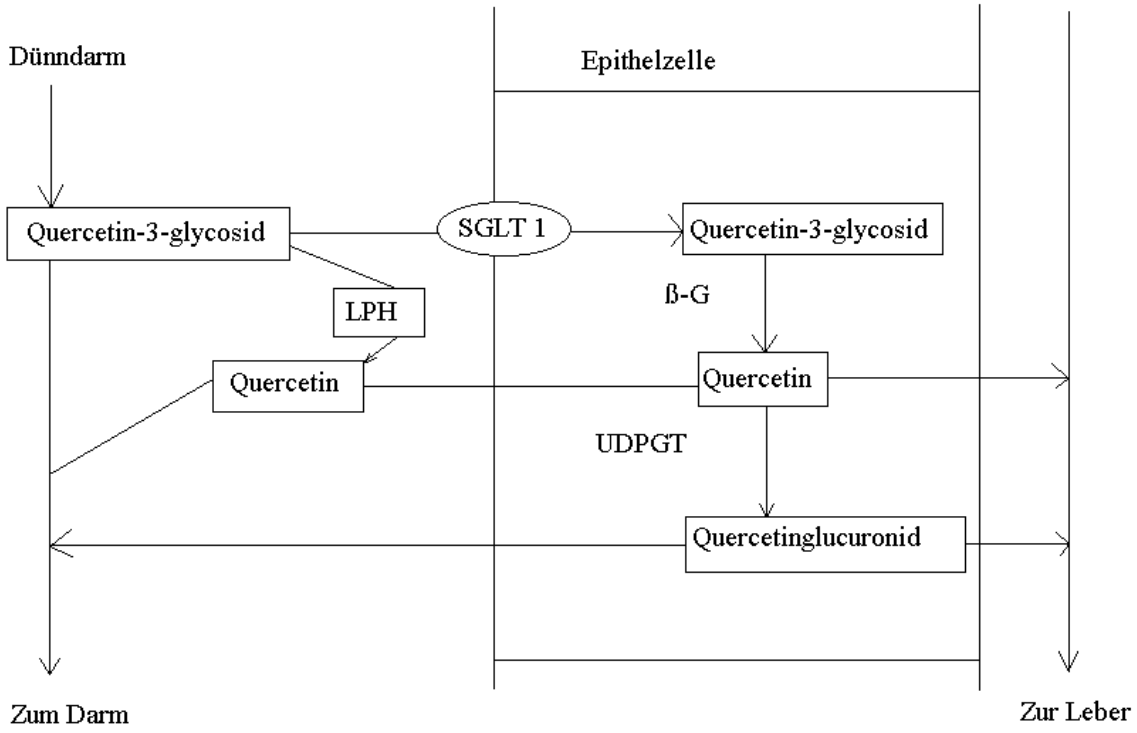


Abbildung 2.8: Mögliche Absorptionswege von Quercetinglycosiden in den Dünndarm
[modifiziert nach GEE et al. 2000] (SGLT 1 = sodium-dependent glucose transporter = natriumabhängiger Glucosetransporter, LPH = Lactase-Phlorizin-Hydrolase, ß-G = cytosolische ß-Glucosidase, UDPGT = Uridin-diphospho-D-Glucoseglucuronosyltransferase)

Zum einen werden Quercetinglycoside mittels SGLT 1 in die Epithelzelle transportiert und dort mit einer cytosolischen ß-Glucosidase in das Aglykon umgewandelt. Dieses Aglykon wird entweder zur Leber transportiert oder mit Hilfe einer Transferase in Quercetinglucuronid überführt. Zum anderen werden Quercetinglycoside mittels der Lactase-Phlorizin-Hydrolase zum Aglykon hydrolisiert, das durch passive Diffusion in die Epithelzelle gelangt.

KOBAYASHI et al. [2000] zeigten eine Behinderung der natriumabhängigen Glucoseaufnahme mittels SGLT 1 durch Epicatechingallat und Epigallocatechingallat und machten die Galloylgruppen von Epicatechingallat und Epigallocatechingallat für diese Wirkung verantwortlich. Sie sehen deswegen einen möglichen Einsatz von Catechinen in der Reduktion eines pathologischen Blutglucosespiegels bei Diabetes mellitus.

Daten zur Bioverfügbarkeit von Catechinen sind bis jetzt noch sehr begrenzt. WARDEN et al. [2001] untersuchten die Aufnahme von Catechinen beim Menschen nach Konsum von jeweils 4 Teeportionen à 250 ml schwarzem Tee im Zweistunden-Abstand (0, 2, 4, 6 h), was einer Gesamtcatechinaufnahme von 400 mg entsprach. Die Autoren stellten eine signifikante Erhöhung der Plasmakonzentrationen von Epigallocatechin, Epicatechin und Epigallocatechingallat innerhalb eines Zeitraumes von 5 - 8 Stunden nach Beginn der Intervention im

Vergleich zur Konzentration im Nüchternplasma fest. Epigallocatechin und Epicatechin wiesen eine signifikant höhere Ausscheidung im Urin im Vergleich zum Nüchternurin auf. Insgesamt wurden ~0,16 % der konsumierten Gesamtcatechinaufnahme im Plasma wiedergefunden, 1,1 % im Urin und 0,42 % im Faezes.

SHAHRZAD et al. [2001] verglichen die Verfügbarkeit von Gallussäure aus einem schwarzen Teegetränk und Gallussäuretabletten. Die Autoren sahen keinen Unterschied in der Verfügbarkeit von Gallussäure nach Konsum von Schwarztee bzw. nach Einnahme von Gallussäuretabletten. Die $AUC_{(0\text{-}12h)}$ (AUC = Area under the plasma concentration-time curve) für Gallussäure lag für beide Applikationen bei 1,06 ± 0,26 µmol*h/l. Gallussäure und 4-O-Methylgallussäure erreichten ihr Maximum nach 1,27 ± 0,20 h bzw. nach 1,51 ± 0,31 h infolge der Einnahme von Gallussäuretabletten.

Auch HODGSON et al. [2000] nannten 4-O-Methylgallussäure als den Hauptmetabolit von Gallussäure nach Konsum von schwarzem Tee.

Zwei Stunden nach Konsum von 300 ml Grüntee (~400 mg Catechin) erreichten Epigallocatechingallat und Epicatechingallat im Plasma ihr Maximum. Im Urin wurden die Metabolite 4-Hydroxybenzoesäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 3-Methoxy-4-hydroxyhippursäure und 3-Methoxy-4-hydroxybenzoesäure (Vanillinsäure) mittels elektrochemischer Detektion nachgewiesen [PIETTA et al. 1998].

H-NMR- und HPLC-Analyse von Urin veranschaulichten, dass der Konsum von schwarzem Tee (6 - 10 Tassen/d) mit einem signifikanten Anstieg von Hippursäure im Vergleich zur Kontrolle assoziiert war [CLIFFORD et al. 2000].

LI et al. [2001] identifizierten neben Monoglucuroniden und Monosulfaten von (-)-Epigallocatechin und (-)-Epicatechin auch O-methylierte Epigallocatechin-O-Glucuronide und -O-sulfate und O-methyliertes Epicatechin-O-sulfat in menschlichem Urin. Des weiteren beschrieben die Autoren Ringspaltungen, bei denen Trihydroxyphenylvalerolactone und Dihydroxyvalerolactone entstanden. LEE et al. [2002] beschrieben ebenso diese Valerolactone nach Konsum von grünem Tee und sahen in diesen den möglichen Einsatz als Biomarker nach Teekonsum an.

2.4 Epidemiologische Befunde zu Polyphenolen

Epidemiologische Studien belegen einen Zusammenhang zwischen dem reichlichen Verzehr von Obst und Gemüse und dem verringerten Auftreten degenerativer Erkrankungen wie Herz-

Kreislauferkrankungen und Krebs. Diese Wirkung wird den sekundären Pflanzenstoffen zugesprochen [TIJBURG et al. 1997].

Die *Zutphen Elderly Study* [HERTOG et al. 1993], eine longitudinale Studie, wurde in Zutphen in den Niederlanden mit Männern im Alter von 40 - 59 Jahren während eines Zeitraums von 1960 bis 1990 durchgeführt. Die Hauptquellen an Flavonoiden waren schwarzer Tee (61 %), Zwiebeln (13 %) und Äpfel (10 %). Die Höhe der Flavonoidaufnahme (25,9 - 26,6 mg/d) zeigte eine signifikante inverse Beziehung zu der Sterblichkeit an Herz-Kreislauferkrankungen. Hingegen konnte kein Einfluss auf das Gesamtkrebsrisiko sowie auf das Risiko für Tumore des Gastrointestinaltraktes und des Respirationstraktes nachgewiesen werden.

Der Zusammenhang zwischen Teekonsum und koronaren Herzerkrankungen konnte in der *Caerphilly Study* nicht bestätigt werden. Diese Studie wurde in Wales durchgeführt, und HERTOG et al. [1997] führten das Ergebnis auf die Gewohnheit zurück, Tee mit Milch zu trinken. Ein Beweis für diese Begründung steht noch aus.

In der *Onset Study*, einer prospektiven Kohortenstudie, [MUKAMAL et al. 2002] wurde während eines Zeitraums von 1989 bis 1994 bei Männern und Frauen der Einflusss des Teekonsums auf die Sterblichkeit nach einem Herzinfarkt untersucht. Die Studienteilnehmer wurden nach ihrem Teekonsum befragt. Die Autoren stellten eine verringerte Sterblichkeit bei denjenigen fest, die in dem Jahr vor dem Herzinfarkt mindestens 14 Tassen Tee pro Woche konsumierten.

In der *Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer* wurde an 58279 Männern und 62573 Frauen der Zusammenhang zwischen Teekonsum und dem Risiko für Magen-, Darm-, Lungen- und Brustkrebs untersucht. Das Risiko an Darmkrebs zu erkranken, war für Teekonsumenten und Nichtteekonsumenten vergleichbar [GOLDBOHM et al. 1996]. Die präventive Wirkung von schwarzem Tee konnte für die vier Krebsarten nicht bestätigt werden.

Die *Seven Countries Study* [HERTOG et al. 1995] hingegen bestätigte die Beziehung zwischen der Aufnahme von antioxidativen Flavonoiden und der niedrigeren Sterblichkeit an koronaren Herzerkrankungen in verschiedenen Ländern. Die hohe Zufuhr an Flavonoiden schützt die LDL-Fraktion vor Lipidperoxidation [FRANKEL et al. 1993]. Das Auftreten von Darm- und Lungenkrebs wurde nicht beeinflusst [HERTOG et al. 1995].

BLOT et al. [1997] stellten in einer Übersichtsarbeit epidemiologische Studien, Kohortenstudien sowie Fall-Kontroll-Studien über das Krebsrisiko bei Konsumenten von schwarzem Tee vor. Bei einem internationalen Vergleich zeigt der unterschiedliche Teekonsum keinen Unter-

schied im Auftreten verschiedener Krebsarten. Iren und Briten haben trotz ihres hohen Teekonsums keine verringerte Krebsmortalität.

GAO et al. [1994] beschreiben den Zusammenhang zwischen Teekonsumenten, die ihren Tee bei niedrigen Temperaturen aufgebrüht haben, und dem verringerten Risiko für Speiseröhrenkrebs. Die Ergebnisse früherer Studien, die ein erhöhtes Auftreten von Speiseröhrenkrebs bei Konsum von Tee feststellten, sind auf die zu hohen Aufbrühtemperaturen zurückzuführen [BLOT et al. 1997].

Verschiedene Fall-Kontrollstudien wiesen keinen signifikanten Einfluss zwischen Teekonsum und dem Auftreten von Mund und Speisenröhrenkrebs nach [ROGERS et al. 1995, BUNDGAARD et al. 1995].

Der Begriff „Mediterrane Ernährung“ ist im Rahmen der *Seven Country Study* entstanden. Die Bevölkerung der mediterranen Region zeigte deutlich niedrigere Prävalenz für kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs, was v. a. durch die mediterrane Ernährung begründet wird [HERTOG et al. 1995, RENAUD und DE LORGERIL 1992]. Überraschend ist, dass wesentliche Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie erhöhtes Serumcholesterin, Hypertonie, hoher Body-Mass-Index oder Rauchen bei den Franzosen nicht seltener vorkommen als in anderen untersuchten Populationen [BÖHM 2000a]. RENAUD et al. [1998] empfehlen einen moderaten Weinkonsum zu den Hauptmahlzeiten im Rahmen einer abwechslungsreichen Kost.

2.5 Physiologische Wirkungen der Polyphenole

Die physiologischen Wirkungen der Polyphenole sind sehr vielfältig. Die Polyphenole zeichnen sich u. a. durch antikanzerogene, antimikrobielle, antioxidative, antithrombotische, immunmodulierende, entzündungshemmende, blutdruck- und blutglucosebeeinflussende Wirkungen aus [GEE und JOHNSON 2001, DREOSTI 1996, LANDAU und YANG 1997, TREVISANATO und KIM 2000, YANG et al. 2001, MUKHTAR und AHMAD 2000, MCKAY und BLUMBERG 2002].

Der Mechanismus der Kanzerogenese und Antikanzerogenese ist ein komplexer Vorgang, der in die drei Hauptphasen der Initiation (Auslösung), der Promotion (Förderung) und der Progression (Tumorwachstum und/oder Metastasenbildung) unterteilt wird [CARAGAY 1992, DEPEINT et al. 2002]. Die folgende Abbildung veranschaulicht die Angriffspunkte von Polyphenolen bei der Kanzerogenese.

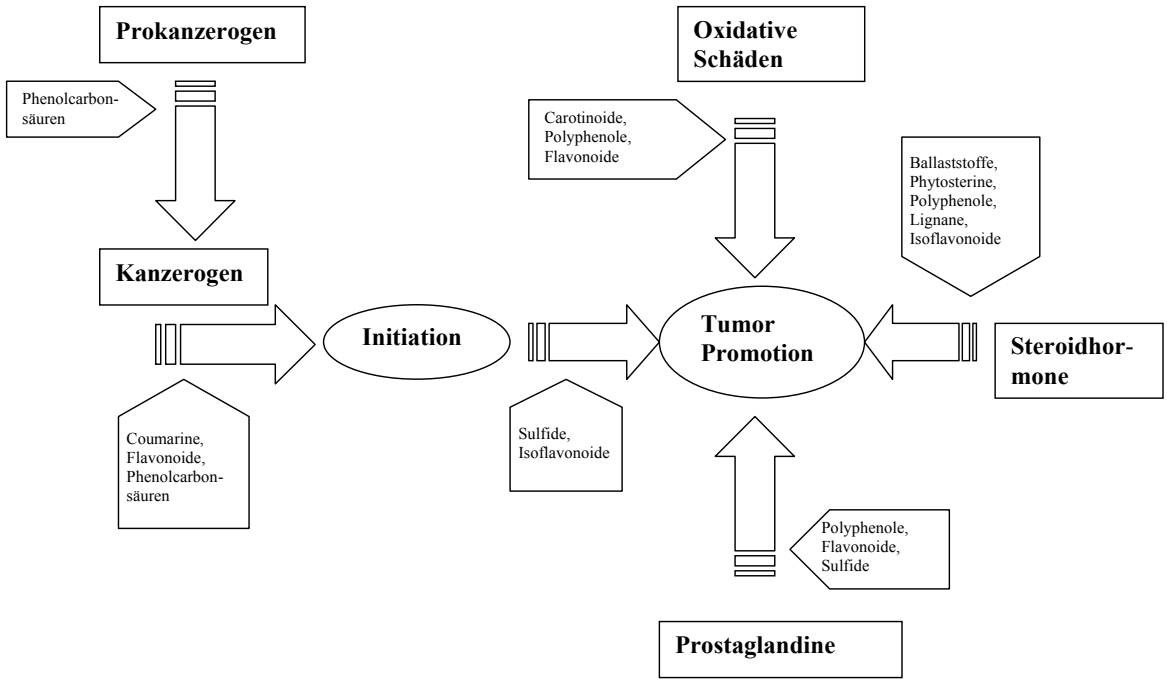


Abbildung 2.9: Angriffspunkte von Polyphenolen bei der Kanzerogenese
[modifiziert nach CARAGAY 1992]

Die Phenolcarbonsäuren greifen mit ihren Hydroxylgruppen sowohl in die Initiation als auch in die Promotion der Kanzerogenese ein. Sie hemmen die Phase-I-Enzyme, treten mit dem aktivierten Kanzerogen oder mit der DNS in Wechselwirkung. Ferner induzieren Phenolcarbonsäuren die Phase-II-Enzyme, die das Kanzerogen in eine inaktive Form überführen. Die Flavonoide können zusätzlich die Induktion der Apoptose bewirken, die Zellproliferation hemmen und das Immunsystem modulieren. Außerdem beruht die antikanzerogene Wirkung der Phenolcarbonsäuren und der Flavonoide auf ihrer antioxidativen Fähigkeit.

YAMANE et al. [1996] analysierten die Effekte von Epigallocatechingallat und Grüntee-Extrakt in 3 Modellen der gastrointestinalen Karzinogenese: N-Ethyl-N'-nitro-N-nitro-guanidin (ENNG)-induzierte duodenale Karzinogenese in der Maus, N-Methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidin (MNNG)-induzierte Karzinogenese in der Magendrüse der Ratte und Azoxymethan (AOM)-induzierte Darmkanzerogenese in der Ratte. Die Autoren beobachteten signifikante protektive Effekte von Epigallocatechingallat und Grüntee-Extrakt in den 3 beschriebenen Modellen.

Epigallocatechingallat behindert das Wachstum von neuen Blutzellen bei Mäusen [CAO und CAO 1999]. Die orale Gabe von grünem Teegetränk behinderte die Entstehung der Retinopathie bei an Diabetes mellitus erkrankten Mäusen [CAO et al. 2002].

Chlorogensäure, Kaffeesäure und Ferulasäure inhibieren den Arachidonsäuremetabolismus und haben gleichzeitig eine hemmende Wirkung auf den Tumorpromotor 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA). Die Applikation von TPA auf die Mäusehaut stimulierte die Freisetzung und den Metabolismus von Arachidonsäure und erhöhte die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Phenolcarbonsäuren können somit als Inhibitoren der Promotionsphase der Karzinogenese eingestuft werden [HUANG et al. 1988].

CORDER et al. [2001] zeigten in Rinderendothelzellen (BAECs = bovine aortic endothelial cells) die Unterdrückung der Entstehung von Endothelin-1 durch Rotwein. Endothelin-1 ist ein starker vasokonstriktorischer Biomarker für die Entstehung von vaskulären Erkrankungen und Arteriosklerose. Die Wirkung von rotem Traubensaft war deutlich schwächer. Die Autoren schlussfolgerten, dass ein moderater Rotweinkonsum die Inzidenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen verringern kann.

WENZEL et al. [2000] beschrieben Flavon als einen starken und selektiven Inhibitor der Proliferation in HT-29-Zellen (menschliche Darmkrebszellen). Flavon verhindert die Proliferation von HT-29-Zellen in einer konzentrationsabhängigen Weise und ist vergleichbar in seiner Wirkung mit Camptothecin, einem klassischen Antitumormittel.

POOL-ZOBEL et al. [2000] analysierten die in vivo-Fähigkeit von Isoflavonoiden, oxidative Schäden in HT-29-Zellen zu behindern. Mit Hilfe des COMET-Assay wurden die DNS-Schäden gemessen. Weder Genistein noch Daidzein reduzierten die endogen gebildeten oxidierten DNS-Basen in den menschlichen Darmzellen. Somit schützten diese Isoflavonoide nicht vor der mit Wasserstoffperoxid induzierten Gentoxizität. Auch Anthocyankonzentrate von Holunder und Aronia zeigten keinen Schutz vor der Bildung oxidierter Purinbasen in HT-29-Zellen. Isoflavonoide und Anthocyane zeigten jedoch in vitro antioxidative Wirksamkeit [POOL-ZOBEL et al. 1999].

SANO et al. [1999] untersuchten die antiallergischen Wirkungen von aus Oolong-Tee isolierten Catechinderivaten an Mäusen. Die an der Gallatfunktion O-methylierten Formen bewirkten eine stärkere antiallergische Wirkung als Epigallocatechingallat.

SERAFINI et al. [1996] analysierten in vitro und in vivo die antioxidative Wirkung von Grün- und Schwarztee. Der Grüntee-Extrakt zeichnete sich in vitro durch eine signifikant höhere antioxidative Wirksamkeit verglichen mit dem Schwarztee aus, wobei der Zusatz von Milch dieses in vitro Ergebnis nicht veränderte. In vivo stieg bei Probanden nach Konsum von 300 ml grünem oder schwarzem Tee die antioxidative Aktivität des Plasma nach 30 min (Grüntee) bzw. 50 min (Schwarztee). Die AUC-Werte waren für beide Teesorten vergleichbar

und signifikant höher als bei der Kontrollgruppe nach Konsum von 300 ml Wasser. Durch Zusatz von Milch waren die AUC-Werte für Grün- und Schwarztee signifikant niedriger als die AUC-Werte für Grün- und Schwarztee ohne Milchzusatz. Die Autoren begründeten die Diskrepanz zwischen dem in vitro- und dem in vivo-Ergebnis mit der Bindung der Tee-Inhaltsstoffe an die Proteine der Milch. Diese Komplexe beeinflussen die antioxidative Wirksamkeit nicht, aber die Hydrolyse dieser Komplexe im Magen war nicht mehr möglich.

Der Konsum von schwarzem Tee beeinflusste die postprandiale Plättchenaggregation beim Menschen nicht [HODGSON et al. 2002].

TOKUNAGA et al. [2002] beschreiben eine signifikante Beziehung zwischen dem täglichen Konsum von bis zu 10 Tassen grünem Tee und niedrigeren Serumcholesterinspiegeln von Männern und Frauen. Das HDL-Cholesterin und die Triglyceride wurden durch den Teekonsum nicht beeinflusst.

Die Antithiaminwirksamkeit der Polyphenole wurde zum ersten Mal an Weidetieren beobachtet, deren Futter große Mengen an Farnkräutern enthielt. Ursache klinischen Thiaminmangels bei Menschen ärmerer Bevölkerungsschichten Südostasiens ist u. a. das Kauen der anregenden, stark gerbstoffhaltigen Betelnuss bei gleichzeitiger thiaminarmer Ernährung [MCGREADY et al. 2001]. Der Grund für diesen Antithiamineffekt der Polyphenole liegt entweder in der Bildung von schwer resorbierbaren Thiamin-Gerbsäure-Addukten oder in der oxidativen Spaltung des Thiamins [BITSCH 1999, RUNGRUANGSAK et al. 1977].

Die Bedeutung der sekundären Pflanzenstoffe in der Lebensmittelindustrie ist laut dem Ernährungsbericht 2000 in den letzten Jahren aufgrund ihrer gesundheitsfördernden Eigenschaften gestiegen, wobei Daten zum Einfluss der Verarbeitung auf die Gehalte an sekundären Pflanzenstoffen noch begrenzt vorhanden sind [DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR ERNÄHRUNG 2000].

In den letzten Jahren stehen zunehmend die *Funktionellen Lebensmittel* im Interesse der Lebensmittelindustrie. Der Begriff *Funktionelle Lebensmittel* stammt ursprünglich aus Japan. Dort wurde Mitte der 80er Jahre des vergangenen Jahrhunderts ein funktionelles Lebensmittel als ein Lebensmittel definiert, das der Stärkung spezifischer Körperfunktionen dient und dessen Qualität in mehr als nur dem bloßen Nährwert besteht. Diese Lebensmittel tragen in Japan nach der Regelung der FOSHU (Foods for specified health use) ein Gütesiegel. In Europa gibt es bis jetzt kein Gütesiegel für funktionelle Lebensmittel [PASCAL 1996, KUHNERT 2002]. Charakterisiert sind die funktionellen Lebensmittel dadurch, dass sie über ihre Ernährungs-

oder Genussfunktion einen gesundheitlichen Zusatznutzen aufweisen. Deswegen spricht man auch von Lebensmitteln mit gesundheitlichem Zweitnutzen. Davon abzugrenzen sind die Nahrungsergänzungsmittel. Sie sind konzentrierte Quellen bestimmter Nährstoffe, angeboten in dosierter Form und bestimmt zur Ergänzung der normalen Ernährung um diese Nährstoffe [SCHROETER 2001]. Seid 1999 gibt es einen Konsens in der Europäischen Union zur Definition von funktionellen Lebensmitteln [DIPLOCK et al. 1999]. Die wissenschaftlichen Ziele der funktionellen Lebensmittel sind im Bereich des Gastrointestinaltrakts (Pro- und Präbiotika), des antioxidativen Status und des Metabolismus von Hauptnährstoffen zu sehen [ROBERFROID 2000].

Ein bekanntes Beispiel für ein funktionelles Lebensmittel ist eine Margarine, die mit Phytosterinen angereichert ist. Die cholesterinsenkende Wirkung der Phytosterine (β-Sitosterin, Campesterin und Stigmasterin) beruht auf der Behinderung der Aufnahme des Cholesterins. Diese Margarine dient Hypercholesterinämiepatienten zur Senkung erhöhter Cholesterinspiegel [WESTSTRATE und MEIJER 1998].

Der Konsum eines polyphenolreichen trüben Brettacher Apfelsaftes bewirkte eine Erhöhung der antioxidativen Aktivität im Plasma. Die Autoren zählen diesen Saft zu den funktionellen Lebensmitteln, da er einen gesundheitlichen Zusatznutzen nach der Definition der Europäischen Union aufweist [BITSCH et al. 2001, DIPLOCK et al. 1999].

2.6 Experimentelle Methoden

2.6.1 Analyse der Polyphenole

Polyphenole wurden bis in die 70er Jahre mittels Papierchromatographie analysiert [MOSEL und HERRMANN 1974]. Ende der 70er Jahre wurde die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) für die quantitative Bestimmung von Flavonoiden eingesetzt [WULF und NAGEL 1976].

MERKEN und BEECHER [2000] fassten die chromatographischen Bedingungen zur Analyse von Flavonoiden zusammen. Als HPLC-Säulen werden hauptsächlich Reverse-phase (RP)-Säulen mit einer Länge von 100 - 300 mm und mit einem Durchmesser von ~4,6 mm eingesetzt. Die stationäre Phase ist meistens eine C18-Phase. Die mobile Phase besteht aus 2 Bestandteilen, einer wässrigen angesäuerten Lösung und einem weniger polaren organischen Lösungsmittel wie z. B. Methanol oder Acetonitril. Die Flavonoide werden hauptsächlich mit UV-Detektion analysiert, aber auch mit Fluoreszenz-Detektion, Diodenarray-Detektion und mit elektrochemischer Detektion.

Für die Analyse von Catechinen in Tee wird der aufgebrühte Tee-Extrakt direkt zur HPLC-Analyse eingesetzt [DALLUGE et al. 1998]. Zur quantitativen Bestimmung der Catechine und Phenolcarbonsäuren in Obst und Gemüse muss eine Extraktion mittels Methanol [ARTS und HOLLMAN 1998] bzw. mit Ethylacetat [SHAHRZAD und BITSCH 1996] durchgeführt werden. SHAHRZAD und BITSCH [1996] entwickelten eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Phenolcarbonsäuren in Säften mit einer mobilen Phase aus Wasser, Ethylacetat und Essigsäure. Die Säfte wurden vor der Analyse mit Ethylacetat extrahiert. HÄKKINEN et al. [1998] untersuchten verschiedene mobile Phasen zur quantitativen Bestimmung von Flavonoiden und Phenolcarbonsäuren in Beeren. Die Detektion erfolgte mit UV- und Diodenarray-Detektor. MAIANI et al. [1997] veröffentlichten eine HPLC-Methode mit UV-Detektion zur Analyse von Polyphenolen in Plasma nach Konsum von grünem Tee. Die mobile Phase bestand aus einem Gradientensystem aus Methanol und angesäuertem Wasser. Das Plasma wurde mit Methanol und Ethylacetat extrahiert. DALLUGE et al. [1997] entwickelten eine Methode bestehend aus einer Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS-Methode) zur Detektion von Catechinen in Tee-Extrakt und Plasma.

2.6.2 Antioxidative Aktivität der Polyphenole

Vor allem in den letzten zehn Jahren sind viele in vitro-Tests sowohl zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Lebensmitteln, Getränken sowie von biologischen Flüssigkeiten als auch von Einzelsubstanzen entwickelt worden [BÖHM 2000b]. Ein Antioxidans ist eine Substanz, die im Vergleich zu einem oxidierbaren Substrat in niedriger Konzentration vorhanden ist und die dessen Oxidation signifikant verzögert oder verhindert [HALLIWELL 1990]. Ein freies Radikal ist eine Substanz, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen enthält [HALLIWELL et al. 1995].

Die bekannteste und sehr oft angewandte Methode ist der TEAC I-Test (TEAC = Trolox equivalent antioxidant activity). Dieser Test beruht auf der Oxidation von ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenz-thiazolin-6-sulfonsäure)), einem Peroxidase-Substrat, mittels Wasserstoffperoxid und Metmyoglobin zu dem grün-blauen Radikalkation $ABTS^{\bullet+}$. Trolox®((S)-(-)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure), ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat, dient als Standardsubstanz. Trolox bzw. Antioxidantien in Tee verzögern die Bildung des Radikalkations $ABTS^{\bullet+}$ um eine bestimmte Zeit, die sogenannte Lagphase (s. Abbildung 8.1). Diese Lagphase ist ein Maß für das antioxidative Potenzial der untersuchten Substanz [MILLER et al. 1993]. Einige Antioxidantien sind in der Lage, die Bildung freier Radikale zu verhindern, wohingegen andere Antioxidantien bereits gebildete Radikale abfangen können. Manche Antioxidantien zeigen beide Reaktionen (z. B. Quercetin). Somit ist es in dieser Ver-

sion des TEAC-Tests nicht möglich, zwischen diesen beiden Reaktionswegen zu differenzieren [STRUBE et al. 1997]. Der TEAC I-Test wird u. a. zur Analyse des antioxidativen Potenzials von Plasma [MILLER et al. 1993] und von Fruchtsäften [MILLER et al. 1995] eingesetzt.

Eine Abwandlung dieses TEAC-Testes wurde von MILLER et al. [1996] entwickelt (TEAC II-Test). Das Radikalkation $ABTS^{\bullet+}$ wird mittels Mangandioxid gebildet, und nach Zugabe von Antioxidantien wird die Abnahme der Extinktion gemessen. Diese Version wurde ursprünglich für lipidlösliche Antioxidantien wie z. B. Carotinoide entwickelt, aber es können auch wasserlösliche Antioxidantien analysiert werden. Aufgrund des vorgebildeten Radikals wird in dem TEAC II-Test die radikalabfangende Wirkung von Antioxidantien gemessen.

Die dritte Version des TEAC-Testes (TEAC III-Test) ist sowohl für wasserlösliche als auch für lipidlösliche Antioxidantien geeignet. Auch hier wird wie bei dem TEAC II-Test das Radikalkation $ABTS^{\bullet+}$ vor der Zugabe der Antioxidantien gebildet, in diesem Fall mit Kaliumpersulfat. Durch die unterschiedliche Wahl des Lösungsmittels ist diese Version sowohl für wasserlösliche Antioxidantien als auch für lipidlösliche Antioxidantien einzusetzen [RE et al. 1999].

Der FRAP-Test (FRAP = Ferric reducing ability of plasma) von BENZIE und STRAIN [1996] wurde zur Bestimmung der „antioxidativen Power" von Plasma entwickelt. Hier wird die reduzierende Eigenschaft des Plasmas gegenüber Eisen(III)-Ionen ausgenutzt, indem ein photometrisch messbarer Eisen(II)-tripyridyltriazin-Komplex gebildet wird. Trotz der ursprünglichen Definition des FRAP-Tests (Ferric reducing ability of plasma) wird er mittlerweile auch für Lebensmittelextrakte eingesetzt und deswegen als ferric reducing/antioxidant power assay bezeichnet [BENZIE und SZETO 1999].

Der DPPH-Test (DPPH = 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) ist wie der TEAC III-Test sowohl für lipidlösliche als auch für wasserlösliche Antioxidantien einsetzbar [BRAND-WILLIAMS et al. 1995]. Vergleichbar mit dem TEAC II- und III-Test wird in dem DPPH-Test die Abnahme der Extinktion des freien Radikals gemessen (s. Abbildung 8.3). Das protektive Potenzial von pflanzlichen Ölen [ESPIN et al. 2000] und von Tee [VON GADOW et al. 1997] wurde u. a. anhand dieses Testes analysiert.

Das Prinzip des DMPD-Testes (DMPD = N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin) beruht auf der Reduktion des Radikalkations $DMPD^{\bullet+}$. Dieses Radikal wird mit Hilfe von Eisenionen gebildet. Das vorgebildete Radikalkation wird durch die Zugabe von Antioxidantien reduziert, was durch die Abnahme der Extinktion angezeigt wird [FOGLIANO et al. 1999]. Die Autoren

untersuchten die antioxidative Aktivität von Weinen mittels des DMPD-Testes. LEONARDI et al. [2000] untersuchten die hydrophile antioxidative Aktivität von Tomaten mit dem DMPD-Test.

Der TRAP-Test (TRAP = total radical-trapping antioxidant parameter) ist ein weiterer für Lebensmittelextrakte und Plasmaproben oft angewandter fluorimetrischer Test. Als fluoreszierende Substanz wird das Protein R-Phycoerythrin eingesetzt. Die Azoverbindung ABAP (2,2'-Azo-bis(2-amidinopropan)-hydrochlorid) bildet temperaturabhängig (37 °C) eine konstante Menge an Peroxylradikalen, die die Fluoreszenz des R-Phycoerythrins zerstören. Antioxidativ wirksame Substanzen verzögern die Abnahme der Fluoreszenz um eine bestimmte Zeit, die sogenannte Lagphase (s. Abbildung 8.2). Der TRAP-Wert gibt die molare Menge an Radikalen an, die von einem Liter Testlösung abgefangen werden [GHISELLI et al. 1995, GHISELLI et al. 2000].

Der ORAC-Test (ORAC = oxygen-radical absorbing capacity) nutzt zur Messung der antioxidativen Aktivität von Lebensmitteln die Fluoreszenz des Proteins B-Phycoerythrin [CAO et al. 1993]. Die antioxidative Aktivität des untersuchten Materials wird mit einer „Area under the curve"- (AUC) Technik ermittelt, um sowohl die Verhinderung der Radikalentstehung durch Antioxidantien als auch die Dauer dieser Verhinderung einzubeziehen. Dieser Test wurde u. a. zur Analyse des protektiven Potenzials von Früchten eingesetzt [WANG et al. 1996].

Eine neue Version des ORAC-Test wurde von OU et al. [2001] entwickelt, die Fluorescein als fluoreszierende Substanz einsetzen. Die Autoren sehen in der Substanz B-Phycoerythrin einige Nachteile, wie z. B. die Photoinstabilität und die unspezifischen Wechselwirkungen mit Polyphenolen durch Proteinbindung. Die Reaktion von Fluorescein mit Radikalen beruht auf einem Transfer von Wasserstoffatomen. OU et al. [2001] ermittelten höhere mit Fluorescein analysierte ORAC-Werte für Kaffeesäure und Catechin, verglichen mit ORAC-Werten, die mit Phycoerythrin gemessen wurden.

Eine auf Photochemolumineszens beruhende Messung der antioxidativen Aktivität wurde von POPOV und LEWIN [1999] entwickelt. In der PCL-Methode wurde die photochemische Bildung freier Radikale (hauptsächlich Superoxidradikal $O_2^{\bullet-}$) und der sensible photochemische Nachweis mittels Photochemolumineszens in dem Gerät Photochem® (Analytik Jena AG, Jena) kombiniert. Die Reaktion[2] wird mittels eines optischen Photosensibilisators (z. B. Luminol) angeregt (s. Abbildung 8.4). Das protektive Potenzial sowohl von wasserlöslichen als

[2] $S + h\nu + O_2 \rightarrow [S^*O_2] \rightarrow S^{\bullet+} + O_2^{\bullet-}$

auch von fettlöslichen Lebensmittelextrakten kann mit dem PCL-Test ermittelt werden [ROHE 2001].

Die LDL-Oxidation wird auch als ein ex-vivo Verfahren bezeichnet, da das Testsystem dem menschlichen Organismus entstammt und die LDL-Oxidation als ein wesentlicher Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen angesehen wird. Zunächst wird die LDL-Fraktion (Low Density Lipoproteins) aus dem Blutplasma mittels Ultrazentrifugation isoliert. In einer durch Kupferchlorid gestarteten Radikal-Kettenreaktion entstehen aus isolierten Doppelbindungen von Fettsäuren der Lipoproteinfraktion photometrisch messbare konjugierte Doppelbindungen (Diene). Zunächst ist eine durch LDL-eigene Antioxidantien verursachte Lagphase zu beachten. Dem Testsystem zugesetzte antioxidativ wirksame Substanzen führen zu einer Lagphasenverlängerung. Der LDL-Oxidations-Test wird in Humanstudien dazu verwendet, Änderungen der Oxidierbarkeit der LDL-Fraktion nach Konsum von Antioxidantienreichen Lebensmitteln zu verfolgen [ESTERBAUER et al. 1989].

Der Thiobarbitursäure-Test ist eine Methode zur Erfassung der Lipidperoxidation. Malondialdehyd wird im Verlauf der Lipidperoxidation gebildet und reagiert mit Thiobarbitursäure unter Bildung eines rosafarbenen Produkts mit einem Absorptionsmaximum bei 532 nm. Bei diesem Test können auch Alkanale und Proteine mit der Thiobarbitursäure reagieren. JARDINE et al. [2002] untersuchten die Thiobarbitursäurereaktion mit einer LC-MS-Methode. ZEYUAN et al. [1998a] untersuchten die antioxidative Aktivität von grünem und schwarzem Tee in Rattenblut. Rotwein zeigte antioxidative Aktivität in humanen Erythrozyten [TEDESCO et al. 2000].

RICE-EVANS et al. [1996] beschreiben den Zusammenhang zwischen der antioxidativen Wirksamkeit und der Struktur der Polyphenole. In dem TEAC I-Test zeichnet sich Quercetin (s. Abbildung 2.5) durch eine zweifach höhere antioxidative Wirksamkeit gegenüber Catechin (s. Abbildung 2.4) aus, trotz identischer Zahl an Hydroxylgruppen. Die Autoren führten diesen Effekt auf die Doppelbindung in dem 4-Oxo-3-hydroxyring zurück. Die antioxidative Wirkung der Catechine im TEAC I-Test zeigt folgende Reihenfolge: Epicatechingallat ≅ Epigallocatechingallat > Epigallocatechin > Gallussäure > Epicatechin ≅ Catechin. Da bei allen Catechinen der heterozyklische Ring gesättigt ist, stammt die antioxidative Wirksamkeit von der Anzahl der Hydroxylgruppen. Aufgrund der Veresterung mit Gallussäure (s. Abbildung 2.2) ist die antioxidative Aktivität von Epicatechingallat und Epigallocatechingallat am stärksten. Gallussäure besitzt mit ihren 3 Hydroxylgruppen den höchsten TEAC-Wert verglichen mit anderen Hydroxybenzoesäurederivaten (z. B. Protocatechusäure).

Nach WISEMAN et al. [1997] zeichnen sich die Theaflavine (s. Abbildung 2.6) des schwarzen Tees durch antioxidative Wirksamkeit aus, wobei Theaflavin-3-3'-digallat den höchsten TEAC-Wert aufweist, gefolgt von Theaflavin-3'-monogallat, Theaflavin-3-monogallat und Theaflavin. Die doppelte Anzahl an Gallatgruppen bewirkt eine Verdoppelung der antioxidativen Wirkung.

2.7 Wechselwirkungen von Polyphenolen und anderen Lebensmittelinhaltsstoffen mit Eisen

Zur Wechselwirkung von Eisen mit anderen Lebensmittelinhaltsstoffen gibt es zahlreiche in vitro-Studien, Untersuchungen an Ratten und in vivo-Studien. Die Absorption von Eisen kann sowohl gehemmt als auch gefördert werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen an Ratten bezüglich der Absorption von Nicht-Hämeisen [RECORD et al. 1996] sind nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar, da bei Ratten Inhibitoren und Aktivatoren geringere Wirkungen zeigen als beim Menschen [BITSCH 1998].

DISLER et al. [1975a] beschrieben die Behinderung der Eisenaufnahme bei gleichzeitigem Teekonsum beim Menschen. HURRELL et al. [1999] zeigten ebenfalls die Behinderung der Aufnahme von Nicht-Hämeisen durch Konsum polyphenolhaltiger Getränke, wie z. B. Pfefferminztee, Lindenblütentee, schwarzer Tee, Kaffee und Kakao. Die Autoren ermittelten die Eisenabsorption mittels radioaktiv markiertem Eisen [COOK et al. 1974].

In einer Humanstudie mit 122 gesunden Kindern zeigten diejenigen, die Tee konsumierten, signifikant niedrigere Hämoglobinwerte und häufigeres Auftreten von hypochromer, mikrozytärer Anämie als die Nicht-Teetrinker. Dabei lag die Eisenversorgung beider Gruppen unter den Empfehlungen, da die Nahrung vorwiegend aus Milch und pflanzlichen Lebensmitteln bestand [MERHAV et al. 1985].

Polyphenole mit Pyrogallol-, Catechol-, Galloyl- oder 3-Hydroxy-4-carbonylgruppen besitzen die Eigenschaft, mit dreiwertigem Eisen Komplexe zu bilden. Diese Wirkungsweise beruht auf dem nukleophilen Charakter des aromatischen Ringes der Polyphenole [MORAN et al. 1997, HALLBERG und HULTHEN 2000]. Charakteristisch für die Komplexe ist die blauschwarze Färbung [JOVANOVIC et al. 1998]. Komplexe zwischen den Polyphenolen und Eisen sind sehr stabil und haben ein Molekulargewicht zwischen 1500 - 5000 Dalton. Die Komplexbildung resultiert in einer eingeschränkten Absorption des Eisens.

Verschiedene Studien wiesen eine pH-Abhängigkeit (ab pH = 5,5) für die Ausbildung eines stabilen octahedralen Komplexes zwischen den Eisenionen und Polyphenolen nach. Je alkali-

scher der pH-Wert, desto größer werden die Komplexe aufgrund der Liganden. Des weiteren wurden Variationen der molaren Verhältnisse in Abhängigkeit vom pH-Wert erkannt. Das molare Verhältnis zwischen Eisen und Polyphenolen von 1 : 1 liegt bei einem pH von 2,0 vor, was dem pH-Wert des Magens entspricht. Dieses Verhältnis verschiebt sich zugunsten der Polyphenole bei einem pH von 7,0 auf 3 : 1. Dies entspricht dem pH-Wert des Gastrointestinaltraktes [DISLER et al. 1975b, JOVANOVIC et al. 1998].

MATUSCHEK et al. [2001] untersuchten in vitro den Einfluss einer Enzymbehandlung mit Phytase bzw. Polyphenoloxidase (Tyrosinase) auf die Verfügbarkeit von Eisen aus Sorghum und Hirse und auf die Gehalte an Phytaten und Polyphenolen in diesen Nahrungsmitteln. Der Phytatgehalt nahm nach der Phytasebehandlung ab, wobei durch das Kochen und das Einweichen des Sorghums und durch die gleichzeitige Enzyminkubation die Abnahme des Phytatgehalts verstärkt wurde. Das Keimen des Sorghums und die Enzymbehandlung bewirkten einen fast völligen Abbau des Phytats und folglich eine bessere Verfügbarkeit des Eisens. Die Tyrosinaseinkubation bewirkte einen Abbau der Catechol- und der Resorcinolgruppen in Sorghum und Hirse und erhöhte die Verfügbarkeit von Eisen.

Die Aufnahme von Nicht-Hämeisen wurde bei indischen Frauen nach Verzehr von Broccolibrei durch Zugabe von Natriumphytat bzw. Tanninen verschlechtert [GILLOOLY et al. 1983].

Kaffee behinderte die Nicht-Hämeisenaufnahme aus einem mit Eisensulfat angereichertem Brötchen um 61 %. Der inhibierende Effekt des Kaffees wurde zum größten Teil seinem Gehalt an Galloylgruppen zugeschrieben [BRUNE et al. 1989].

HALLBERG et al. [1992] untersuchten den Effekt von Calcium auf die Nicht-Hämeisenabsorption und zeigten eine starke dosisabhängige Beziehung zwischen dem Gehalt an Calcium in einem Nahrungsmittel und der Reduktion der Eisenabsorption. Die Hemmung der Eisenabsorption hatte ihr Maximum bei 300 - 600 mg Calcium. Doch Calcium inhibierte nicht nur die Aufnahme des Nicht-Hämeisens sondern auch die des Hämeisens [HALLBERG et al. 1991]. Im Gegensatz zu den anderen Lebensmittelinhaltsstoffen, wie Polyphenole, Phytate usw. ist Calcium der einzige Faktor, der sowohl die Häm- als auch die Nicht-Hämeisenaufnahme beeinflusst [ZIJP et al. 2000, HALLBERG 2001].

FARKAS und HARDING LE RICHE [1987] beschrieben die Möglichkeit der Komplexbildung zwischen Milchprotein (Casein) und den Tanninen des Tees. Demzufolge beeinflussen die Tannine die Verfügbarkeit von Nicht-Hämeisen nach Milchzusatz nicht. CHRISTIAN und

SESHADRI [1989] zeigten ebenfalls, dass der Zusatz von Milch die inhibierende Wirkung von Tee auf die Nicht-Hämeisenaufnahme bei Konsum einer Standardmahlzeit aufhebt.

Die Steigerung der Bioverfügbarkeit von Nicht-Hämeisen durch Hämeisen erforschten SWAIN et al. [2002] an Caco-2 Zellen, die sich durch mit den Enterozyten vergleichbare morphologische und biochemische Eigenschaften auszeichnen. Das durch die intestinale Verdauung des Rinderfilets entstandene Histidin steigerte die Verfügbarkeit des Nicht-Hämeisens.

GLAHN et al. [1999] beschreiben mit Hilfe von Untersuchungen an Caco-2 Zellen das optimale Verhältnis zwischen Ascorbinsäure und Eisen in einem Reisgericht. Bei dem molaren Verhältnis von Ascorbinsäure zu Eisen von 1,6 : 1 stellten die Autoren die stärkste Ferritinbildung in den Caco-2 Zellen fest. Die im Apfelsaft enthaltene Ascorbinsäure bewirkte keine verbesserte Aufnahme von Eisen (Verhältnis Ascorbinsäure : Eisen = 1,2 : 1). Dies wurde auf die im Apfelsaft enthaltenen Polyphenole zurückgeführt, die mit Eisen Komplexe bilden.

HALLBERG et al. [1986] verglichen in einer Humanstudie die Wirkung der Ascorbinsäure hinsichtlich der Förderung der Nicht-Hämeisenaufnahme anhand ascorbinsäurereicher Lebensmittel und synthetischer Ascorbinsäure. Sowohl ascorbinsäurereiche Lebensmittel wie z. B. Orangensaft, Blumenkohl und frischer Salat als auch synthetische Ascorbinsäure verbesserten die Nicht-Hämeisenaufnahme. Der Konsum von Orangensaft bewirkte eine Verbesserung der Nicht-Hämeisenabsorption bei gleichzeitigem Trinken von Kaffee bzw. Tee.

COOK und REDDY [2001] untersuchten den Einfluss der Ascorbinsäure auf die Nicht-Hämeisenaufnahme im Rahmen einer Tageskost, bei der zu jeder Mahlzeit ein Weizenbrötchen mit radioaktivmarkiertem Eisen konsumiert wurde. Die Förderung der Nicht-Hämeisenaufnahme durch die Ascorbinsäure war innerhalb der Tageskost nicht so effektiv wie bei einer einzelnen Mahlzeit [HALLBERG et al. 1986].

SIEGENBERG et al. [1991] untersuchten den Einfluss der Ascorbinsäure auf die Nicht-Hämeisenaufnahme bei gleichzeitigem Konsum von Polyphenolen und Phytaten. 199 indische Hausfrauen verzehrten phytatfreie und phytathaltige Maiskleie. Bei einem Zusatz von 22 mg bzw. 34 mg bzw. 58 mg Phytatphosphat wurde die Eisenaufnahme deutlich behindert. Die Zugabe von Ascorbinsäure zu den phytathaltigen Maiskleien bewirkte eine deutliche Verbesserung der Eisenaufnahme. 30 mg Ascorbinsäure verhinderten die Verminderung der Eisenaufnahme bei 58 mg Phytatphosphat. Ein vergleichbares Ergebnis zeigten die Autoren für Ascorbinsäure und Tannine. Auch hier überwiegt die Förderung der Eisenaufnahme durch Ascorbinsäure gegenüber der Hemmung der Aufnahme durch Tannine.

2.8 Charakterisierung verschiedener vegetarischer Ernährungsformen

Die Begriffe „Vegetarier“, „vegetarisch“ und „Vegetarismus“ leiten sich vom lateinischen „vegetare“ (= wachsen, leben) ab. Somit ist „Vegetarismus“ im ursprünglichen Sinne eine „lebende“ Form des Seins und der Ernährung, in der neben pflanzlichen Lebensmitteln nur solche Produkte tierischen Ursprungs verzehrt werden, die von lebenden Tieren stammen. In diesem Sinne hatte Pythagoras, der Begründer des klassischen Vegetarismus, die Kostform benannt [BITSCH et al. 1994, HAHN und LEITZMANN 2000]. Die folgende Tabelle zeigt die Hauptgruppen der vegetarischen Ernährungsweisen.

Tabelle 2.4: Hauptgruppen der vegetarischen Ernährungsweisen
[THE BRITISH NUTRITION FOUNDATION 1995, DONOVAN und GIBSON 1996, VAN DUSSELDORP et al. 1999, FRASER 1999, CHANARIN et al. 1985, LEBLANC et al. 2000, HUNG et al. 2002]

Hauptgruppen der vegetarischen Ernährung	Lebensmittelauswahl
Halb-Vegetarier	Verzicht auf rotes Fleisch bzw. weniger als einmal im Monat gelegentlicher Konsum von Geflügel und Fisch, Konsum von pflanzlichen Lebensmitteln
Lakto-Ovo-Vegetarier	Verzicht auf alle Fleischarten und Fleischprodukte, Geflügel, Fisch und daraus hergestellten Lebensmitteln (z. B. Gelatine) Konsum von Milch, Milchprodukten und Eiern und pflanzlichen Lebensmitteln
Ovo-Vegetarier	Verzicht auf alle Fleischarten und Fleischprodukte, Geflügel, Fisch, Milch und Milchprodukte Konsum von Eiern und pflanzlichen Lebensmitteln
Lakto-Vegetarier	Verzicht auf alle Fleischarten und Fleischprodukte, Geflügel, Fisch und Eier Konsum von Milch und Milchprodukten und pflanzlichen Lebensmitteln
Veganer	Verzicht auf alle tierischen Produkte Konsum von pflanzlichen Lebensmitteln
Makrobioten[3]	Verzicht auf alle tierischen Produkte Konsum von pflanzlichen Lebensmitteln, gelegentlicher Verzehr von Fisch
Sieben-Tage-Adventisten	Verzicht auf Rauchen und Alkohol Nicht-vegetarische, semi-vegetarische, vegetarische und vegane Ernährungsweise
Hindus	Form des Lakto-Vegetarismus Verzicht auf Kaffee, Tee und Alkohol, Verzicht auf alle Fleischarten, Käse, Eier Konsum von Milch und Joghurt und pflanzlichen Lebensmitteln
Buddhisten	Vegane und laktovegetarische Ernährungsweise Verzicht auf alle Fleischarten Konsum von Reis und Soja und pflanzlichen Lebensmitteln sowie Milch bei Laktovegetariern

Vor allem ethisch-religiöse und gesundheitliche Motive neben moralischen, persönlichen und ökonomischen Motiven bewegen Menschen zum Vegetarismus [SANDERS 1999]. Die religiös geprägte Ablehnung des Tötens und die Beschäftigung mit dem Verhältnis von Mensch und Tier führt zu der Hinwendung zum Vegetarismus. So ist eine der ältesten Religionen, der

[3] Der makrobiotischen Ernährungs- und Lebensweise liegt die Vorstellung zugrunde, dass die beiden Elemente Yin und Yang, um ein Gleichgewicht und einen positiven Zustand zu erreichen, immer in einem ausgewogenen Verhältnis vorhanden sein müssen (50-60 % Samen, 20-30 % Gemüse, 10-20 % Seealgen).

Hinduismus, ein sehr konsequenter Vertreter der vegetarischen Lebensweise. Der Buddhismus gehört ebenfalls zu den strikten Formen des Vegetarismus.

Die Zahl der in Deutschland lebenden Vegetarier schätzen HAHN und LEITZMANN [2000] auf etwa drei Millionen. In Großbritannien sind sowohl der absolute (~3,5 Millionen Menschen) als auch der relative Anteil (7 % der Bevölkerung) der Vegetarier in Europa am höchsten.

In der *Oxford Vegetarian Study* war die Inzidenz für ischämische Herzerkrankung bei Vegetariern verglichen mit den Mischköstlern um 24 % reduziert und bei Veganern um 57 %. Vegetarier zeichneten sich durch einen niedrigeren Body-Mass-Index als Mischköstler aus. Die Mortalitätsrate für Kolonkrebs war für Vegetarier und Nicht-Vegetarier vergleichbar [KEY et al. 1999a, APPLEBY et al. 1999].

KEY et al. [1999b] diskutierten die Ergebnisse 5 prospektiver Studien bezüglich der Mortalität von Vegetariern und Nicht-Vegetariern: Die *Adventist Mortality Study*, die *Health Food Shoppers Study*, die *Heidelberg Studie*, die *Oxford Vegetarian Study* und die *Adventist Health Study*. Die Beziehung zwischen Vegetarismus und niedriger Mortalität von ischämischen Herzerkrankungen war für Todesfälle im jüngeren Alter stärker als im älteren Alter. Die Prävalenz für Bluthochdruck und Diabetes mellitus war in 4 der genannten Studien (außer der *Health Food Shoppers Study*[4]) niedriger für Vegetarier als für Nicht-Vegetarier. In den Studien wurde keine Beziehung zwischen Vegetarismus und einer verringerten Inzidenz für Krebserkrankungen festgestellt.

In der Giessener *Wholesome Nutrition Study* zeigten Lakto-Ovo-Vegetarier und Wenig-Fleischesser (< 300 g Fleisch/Woche und < 100 g Fleischwaren/Woche) höhere HDL-Plasma-Werte als die Kontrollgruppe, die eine ausgewogene Mischkost konsumierte. Unterschiede der Gehalte an Gesamtcholesterin und an LDL-Cholesterin wurden nicht beschrieben [HOFFMANN et al. 2001].

Der Body-Mass-Index und der Blutdruck waren bei Taiwanesischen Vegetariern[5] niedriger als bei Mischköstlern [LU et al. 2000]. Allerdings zeigten diese Taiwanesischen Vegetarier erhöhte Plasmaspiegel von Homocystein, ein Risikofaktor der Arteriosklerose, verglichen mit den Mischköstlern [HUNG et al. 2002].

[4] Die Informationen zu Bluthochdruck und Diabetes waren nicht verfügbar.
[5] Kein oder wenig Konsum von Milchprodukten, hauptsächlicher Konsum von Reis, Gemüse, Früchten und beachtliche Mengen an Soja

SEBEKOVA et al. [2001] beschrieben erhöhte Konzentrationen an glycosilierten Endprodukten im Plasma von Vegetariern verglichen mit den Mischköstlern. Die Autoren führten dieses Ergebnis auf den höheren Fructosekonsum der Vegetarier zurück, da Fructose in der Produktion der glycosilierten Endprodukte effektiver ist als Glucose.

Nach SCHUBERT und LEUPOLD [2001] sind Veganer von Mangelerscheinungen betroffen wie z. B. Amenorrhoe, Fruchtbarkeitsstörungen, Anämie usw. Die Autoren sehen die Vorteile einer vegetarischen Ernährung besonders in der geringeren Aufnahme an Fett, dem günstigeren Fettsäurenspektrum sowie in der guten Versorgung mit Ballaststoffen und mit den Vitaminen A, C, E und Folsäure.

2.9 Eisenstatus

2.9.1 Parameter des Eisenstatus

Zur Beurteilung der Eisenversorgung des Menschen ist immer die Bestimmung mehrerer Messgrößen des Eisenstatus erforderlich. Hämoglobin und Hämatokrit sowie das Freie Eisen im Plasma und die Freie Eisenbindungskapazität als auch das Speichereisen (Ferritin) und das Transporteisen (Transferrin) dienen zur Beurteilung des Eisenstatus [HESEKER 1997, THE BRITISH NUTRITION FOUNDATION 1995].

Nach der WHO [1992] ist Eisenmangel einer der wichtigsten Mikronährstoffmangel der Welt. Dabei werden je nach Schweregrad 3 verschiedene Stufen des Eisenmangels unterschieden.

Der *prälatente Eisenmangel bzw. Speichereisenmangel* ist durch die langsame Abnahme der Eisenspeicher gekennzeichnet. Diese Stadium ist schwer diagnostizierbar, da die Ferritinkonzentration im Serum und die Hämoglobinkonzentration im Vollblut noch im Normalbereich liegt.

Der *latente Eisenmangel bzw. Transporteisenmangel* ist durch depletierte Eisenspeicher, eine Beeinträchtigung des Transporteisens, erniedrigte Freie Eisenwerte und durch eine erhöhte Eisenbindungskapazität gekennzeichnet.

Manifester Eisenmangel liegt vor, wenn das Depoteisen, die Serumeisenkonzentration und die Hämoglobinkonzentration erniedrigt sind. Menschen mit Eisenmangel sind oft blass, schnell müde und leiden unter Appetitlosigkeit. Weitere Charakteristika für Eisenmangel sind Mundwinkelrisse, Glossitis, Ösophagitis und spröde Haut [HESEKER 1997].

In einer Zusammenstellung der bisher durchgeführten longitudinalen Studien zeigten GRANTHAM-MCGREGOR und ANI [2001], dass Kinder mit Anämie in früher Kindheit

Probleme in ihrer kognitiven und physischen Entwicklung aufweisen. Eine ausreichende Versorgung in der Kindheit ist aufgrund des Eisenbedarfs des Gehirns im Wachstum von großer Bedeutung, da schwerer Eisenmangel das Wachstum verzögert.

Das Krankheitsbild der *Hämochromatose* ist eine durch erhöhte Eisenresorption, Eisenablagerung in Geweben und Organen und zirrhotischen Umbau von Leber und Pankreas charakterisierte chronische Eisenspeicherungskrankheit unbekannter Ätiologie. Der *Hämosiderose* liegt eine vermehrte Eisenspeicherung ohne gleichzeitige Gewebeschädigung zugrunde [HESEKER 1997].

Bei einer Eisenübersättigung kann die Bildung freier Hydroxylradikale ($HO^{\bullet}$) durch Fenton-Reaktion[6] bzw. metallionen-katalysierte Haber-Weiß-Reaktion[7] verstärkt werden. Dies wiederum bringt eine Steigerung des oxidativen Stresses mit sich. Erkrankungen wie Grauer Star, Arteriosklerose oder maligne Tumoren werden durch Radikale begünstigt bzw. ausgelöst [SILVER 1993].

Im Rahmen der Rotterdam-Studie [KLIPSTEIN-GROBUSCH et al. 1999] wurde die Beziehung zwischen einem erhöhten Serumferritinspiegel und einem erhöhten Herzinfarktrisiko untersucht. Die Autoren stellten fest, dass in Anwesenheit anderer Risikofaktoren wie z. B. Rauchen und Diabetes mellitus erhöhte Serumferritinspiegel ebenfalls ungünstig das Herzinfarktrisiko beeinflussen. SALONEN et al. [1992] stellten ebenfalls ein erhöhtes Herzinfarktrisiko bei erhöhten Serumferritinspiegeln fest.

2.9.2 Eisenstatus von Mischköstlern und Personen verschiedener vegetarischer Ernährungsformen

Bei Verwendung von Ferritin im Serum als Bewertungskriterium für den Eisenstatus wurden in der VERA-Studie (VERA = Verbundstudie Ernährungserhebung und Risikofaktorenanalytik) bei weniger als 10 % der Frauen und etwa 3 % der Männer depletierte Eisenspeicher (Ferritin < 12 µg/l) festgestellt. Eine gesicherte Beziehung zwischen dem analytisch erfassbaren Eisen im Lebensmittel und den Messgrößen des Eisenstoffwechsel wurde nicht nachgewiesen. Somit ist die Bioverfügbarkeit des Nahrungseisens wichtiger als die zugeführte Menge [KOHLMEIER et al. 1995]. Die Bioverfügbarkeit des tierischen Hämeisens ist besser als die des pflanzlichen Nicht-Hämeisens [HESEKER 1997].

[6] Fenton-Reaktion: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow HO^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}$

[7] Haber-Weiß-Reaktion: $O_2^{\bullet} + H_2O_2 \rightarrow HO^{\bullet} + OH^- + O_2$

Nach der AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION [1997] sind gut durchgeführte vegane und lakto-ovo-vegetarische Ernährungsweisen für alle Lebensabschnitte geeignet mit der Einschränkung, dass bei veganen Kindern auf eine adäquate Vitamin B_{12}-Zufuhr in Form von Supplementen und auf eine angemessene Vitamin D-Zufuhr bei unzureichender Sonnenexposition zu achten ist. BITSCH et al. [1994] sehen bei veganer Kost die Gefahr von Mangelerscheinungen. Für Personen mit erhöhtem Nährstoffbedarf ist die vegane Kost nicht geeignet.

In der Giessener Vollwert-Ernährungs-Studie wurde die Nährstoffaufnahme von Vollwertköstlerinnen (Vegetarierinnen und Nicht-Vegetarierinnen) und Mischköstlerinnen ermittelt. Die Eisenaufnahme war bei den Vegetarierinnen und Nicht-Vegetarierinnen, die die Vollwertkost praktizierten, höher als bei den Mischköstlern und über den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung. Der Eisenstatus der Probanden wurde nicht erhoben [AALDERINK et al. 1994].

BALL und BARTLETT [1999] beschreiben bei Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen in Australien vergleichbare Aufnahme an Nahrungseisen, die mit Hilfe eines Lebensmitteltagebuches ermittelt wurde. Die Vegetarierinnen zeigten niedrigere Ferritinspiegel als die Mischköstlerinnen. Depletierte Ferritinspiegel unter 12 µg/l hatten sowohl 18 % der Vegetarierinnen als auch 13 % der Mischköstlerinnen.

Der Ernährungsstatus von jungen Veganern und Veganerinnen und jungen Mischköstlern und Mischköstlerinnen wurde mit der Diet-History-Methode und mit der doppelt markierten Wassermethode in Schweden erfasst. Die Prävalenz zu niedrigem Eisenstatus war für die Mischköstler und Veganer vergleichbar [LARSSON und JOHANSSON 2002].

HUANG et al. [1999] ermittelten vergleichbare Hämoglobinkonzentrationen für Vegetarier und Nicht-Vegetarier beiderlei Geschlechts, wobei die Männer höhere Hämoglobinwerte aufwiesen als die Frauen. Die Nicht-Vegetarierinnen zeigten höhere Ferritinplasmaspiegel verglichen mit den Vegetarierinnen.

Trotz der höheren Aufnahme an pflanzlichem Eisen zeigten Veganer signifikant niedrigere Ferritinspiegel verglichen mit den Nicht-Vegetariern, was auf die niedrigere Bioverfügbarkeit des pflanzlichen Eisens im Gegensatz zu dem Hämeisen zurückzuführen ist. Sowohl Veganerinnen als auch Mischköstler wiesen einen niedrigen Eisenstatus auf [HADDAD et al. 1999].

In Thailand wurde der Eisenstatus von 132 Lakto-Vegetariern, 25 Ovo-Vegetariern und 22 Lakto-Ovo-Vegetariern mit dem von Mischköstlern verglichen. Alle Vegetarier zeigten

signifikant niedrigere Hämoglobinkonzentrationen, Hämatokritwerte und Ferritinspiegel verglichen mit den Mischköstlern, wobei die Dauer der praktizierten vegetarischen Lebensweise nicht entscheidend war [PONGSTAPORN und BUNYARATAVEJ 1999].

Makrobioten zeigen eine erhöhte Inzidenz für Eisenmangelanämie aufgrund des hohen Verzehrs von Vollkornreis als Hauptlebensmittel [SANDERS 1999].

In China untersuchten SHAW et al. [1995] den Eisenstatus von Buddhisten und Nicht-Vegetariern. Die Studienteilnehmer zeigten keinen Unterschied in der Eisenaufnahme. Die männlichen Buddhisten zeigten niedrigere Ferritinspiegel und erhöhte Transferrinkonzentration verglichen mit den männlichen Nicht-Vegetariern. Fünf Buddhistinnen wiesen Anämie auf, 9 zeigten depletierte Eisenspeicher und 15 Buddhistinnen wiesen eine erhöhte totale Eisenbindungskapazität auf. Die Eisenkonzentration im Plasma und die Transferrinsättigung war bei den Nicht-Vegetarierinnen im Normbereich.

Hindus hatten eine unzureichende Aufnahme an Nahrungsenergie, Protein, Eisen, Vitamin B_{12} und Folsäure. Megaloblastische Anämie ist ein bekanntes Problem bei Hindus [MATTHEWS und WOOD 1984]. CHANARIN et al. [1985] beschreiben Eisenmangel in Verbindung mit Cobalaminmangel bei Hindus.

Nach GRAIG [1994] sind vegetarische Lebensformen mit einem gesunden Ernährungsstatus kompatibel. Eine vegetarische Ernährung mit Vitamin C-reichem Obst und Gemüse bewirkt eine Verbesserung der Bioverfügbarkeit des pflanzlichen Eisens.

2.9.3 Eisenstatus von vulnerablen Bevölkerungsgruppen

Im Rahmen einer Meta-Analyse wurde in Europa bei 1 % der erwachsenen Männer und 14 % der erwachsenen Frauen Anämie festgestellt im Gegensatz zu Afrika, wo 27 % der Männer und 48 % der Frauen Anämie aufwiesen [MARX 1997].

HAMBRÆUS [1999] schlägt die Anreicherung der Lebensmittel mit Eisen in Entwicklungsländern und die Medikamentation mit Eisen in industralisierten Ländern als Lösung des Mikronährstoffmangels vor.

Eine adäquate Eisenversorgung ist für die Entwicklung von Säuglingen, Kindern und schwangeren Frauen essenziell. Die Gefahr einer Eisenüberversorgung ist aufgrund der strengen homöostatischen Kontrolle der Eisenabsorption unwahrscheinlich [HALLBERG 2002].

Zu den vulnerablen Bevölkerungsgruppen gehören laut VERA-Studie Frauen im Alter von 18 bis 24 Jahren, die noch nie hormonelle Kontrazeptiva eingenommen haben. Hingegen war

bei Studienteilnehmern mit hohem Alkoholkonsum, Übergewicht oder höherem Alter (> 50 Jahre) ein Eisenmangel relativ selten [KOHLMEIER et al. 1995].

BITSCH [1996] zählt vor allem menstruierende Frauen, Schwangere, Stillende, Säuglinge nach dem Abstillen, Jugendliche im Wachstumsalter, Blutspender und Leistungssportler zu den vulnerablen Bevölkerungsgruppen.

Der Eisenstatus von 203 menstruierenden Frauen wurde in Brasilien überprüft. 2,9 % der Frauen wiesen Anämie auf, 13,3 % hatten eine Transferrinsättigung unter 16 % und 20,7 % der Frauen hatten Serumferritinspiegel unter 12 µg/l. Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva beeinflusste die Parameter des Eisenstatus außer Ferritin positiv [SOUSTRE et al. 1986].

SANDERS und REDDY [1994] beschreiben verkürzte Schwangerschaften um 4 - 5 Tage bei Hindus und dadurch bedingt niedrigeres Geburtsgewicht, Kopfumfang und Größe bei den Säuglingen. Die Serumferritinkonzentrationen bei vegetarischen Frauen im gebärfähigen Alter sind niedrig. Die Autoren sehen darin die Gefahr des Eisenmangels bei deren Säuglingen.

Die hohe Kohlenhydrataufnahme zur Optimierung der Glykogenspeicher bei Sportlern bedingt eine halb- bzw. vegetarische Ernährung. Dadurch besteht gerade bei Athletinnen die Gefahr eines schlechten Eisenstatus [NIEMAN 1999].

LEUNG et al. [2001b] untersuchten den Ernährungszustand von 51 chinesischen lakto-ovo-vegetarischen Kindern im Alter von 4 - 14 Jahren, die sich mindestens schon 2 Jahre vegetarisch ernährten. 40 % der untersuchten Kinder waren Vegetarier seit der Geburt. Die Prävalenz für Anämie lag bei 8,5 % und die für Eisenmangel bei 4,3 %. Die Autoren führten dieses Ergebnis auf die hohe Zufuhr Vitamin C-reicher Früchte und auf die Benutzung von Eisenpfannen zur Zubereitung des Essens zurück.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungen in Tee

3.1.1 Herstellung der Tee-Extrakte

Zur Herstellung der Tee-Extrakte wurden 1,3 g Tee mit 100 ml siedendem destilliertem bzw. auf 80 °C abgekühltem destilliertem Wasser 3 min aufgebrüht [LIEBERT et al. 1999, SCHLESIER et al. 1999]. Diese Extrakte wurden mit destilliertem Wasser verdünnt und direkt zur Analyse von Gesamtphenolen nach Folin-Ciocalteu [SINGLETON und ROSSI 1965], antioxidativer Aktivität [MILLER et al. 1993, BENZIE und STRAIN 1996] und zur flüssigchromatographischen Bestimmung von Catechinen eingesetzt. Zur Untersuchung des Einflusses der Aufbrühtemperatur und der Anzahl der Extraktionsvorgänge wurden 1,3 g Tee mit 100 ml siedendem destilliertem bzw. auf 80 °C abgekühltem destilliertem Wasser 3 min aufgebrüht. Dieser Vorgang wurde mit denselben Teeblättern 5 mal wiederholt. Die Lagerung der Tee-Extrakte erfolgte bis zur Analyse bei -30 °C.

3.1.2 Isokratische HPLC-Methode zur Bestimmung der Catechine in Tee

Die für diese Untersuchungen verwendeten Geräte sind in den Arbeitsvorschriften (s. 8.2.1) zu finden. Zur Bestimmung der Catechine in Lebensmitteln wurde die Methode von NAKAGAWA und MIYAZAWA [1997] modifiziert. Die Veränderung des Wasser-Methanol-Verhältnisses (72+28, v/v) ermöglichte die Trennung der einzelnen Catechine Epigallocatechin, Catechin, Epigallocatechingallat, Epicatechin und Epicatechingallat innerhalb eines Zeitraumes von weniger als 15 min (detaillierte Bedingungen s. 8.2.1). Die folgende Tabelle zeigt die Retentionszeiten der untersuchten Catechine bei den genannten chromatographischen Bedingungen.

Tabelle 3.1: Retentionszeiten [min] der untersuchten Catechine bei Verwendung einer mobilen Phase aus Methanol und Wasser (72+28, v/v) mit pH 2,7

Catechine	Retentionszeit [min]
Epigallocatechin (EGC)	3,69
Catechin (C)	4,04
Epigallocatechingallat (EGCG)	5,69
Epicatechin (EC)	6,67
Epicatechingallat (ECG)	11,90

In der folgenden Abbildung 3.1 werden die Kalibriergeraden der einzelnen Catechinstandards dargestellt.

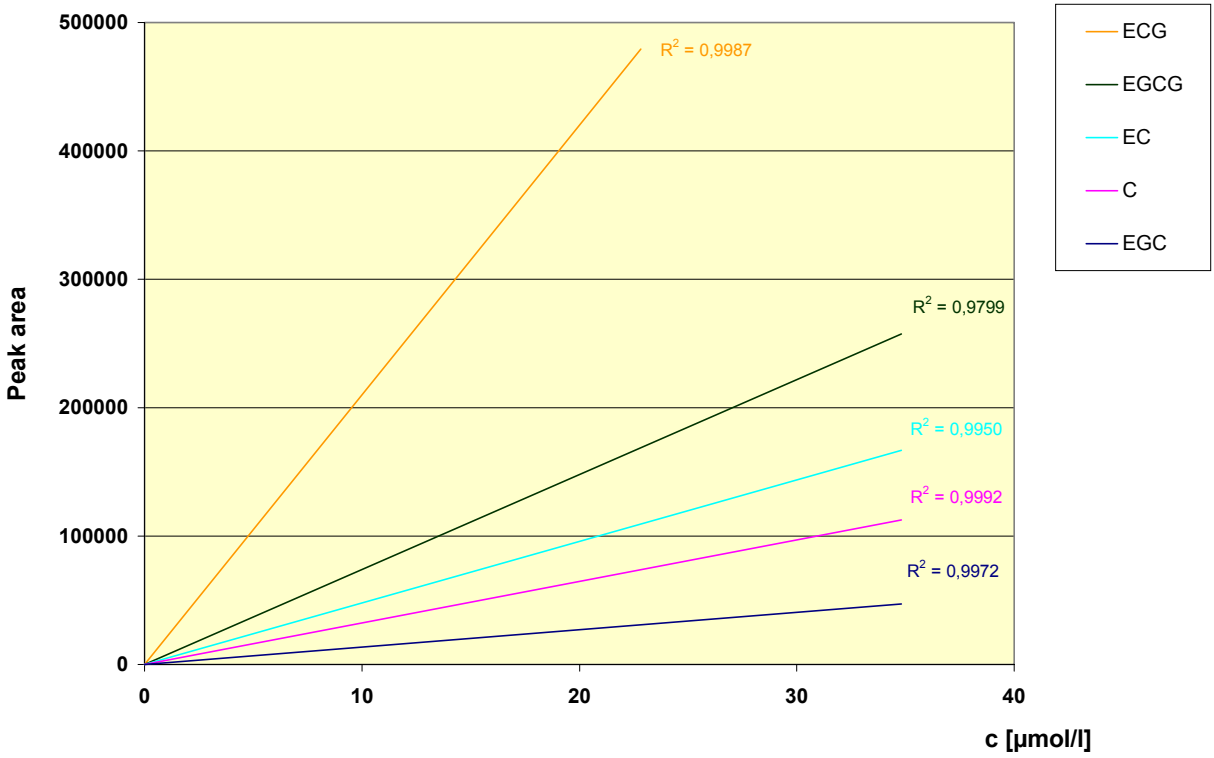


Abbildung 3.1: Kalibriergeraden der einzelnen Catechine
Epicatechingallat (ECG), Epigallocatechingallat (EGCG), Epicatechin (EC), Catechin (C) und Epigallocatechin (EGC)

Basierend auf diesen Daten wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt. Die Nachweisgrenze entspricht dem Signal des Dreifachen des Basislinienrauschens, die Bestimmungsgrenze dem Zehnfachen des Basislinienrauschens [MILLER und MILLER 1993, KROMIDAS et al. 1995]. Tabelle 3.2 zeigt die Nachweisgrenzen und Bestimmungsgrenzen der untersuchten Catechine.

Tabelle 3.2: Nachweisgrenzen [µmol/l] und Bestimmungsgrenzen [µmol/l] der untersuchten Catechine

Catechine	**Nachweisgrenze [µmol/l]**	**Bestimmungsgrenze [µmol/l]**
Epigallocatechin (EGC)	0,828	2,762
Catechin (C)	0,264	0,881
Epigallocatechingallat (EGCG)	0,138	0,461
Epicatechin (EC)	0,252	0,839
Epicatechingallat (ECG)	0,046	0,154

In der Abbildung 3.2 ist ein Standard-Chromatogramm der fünf untersuchten Catechine dargestellt.

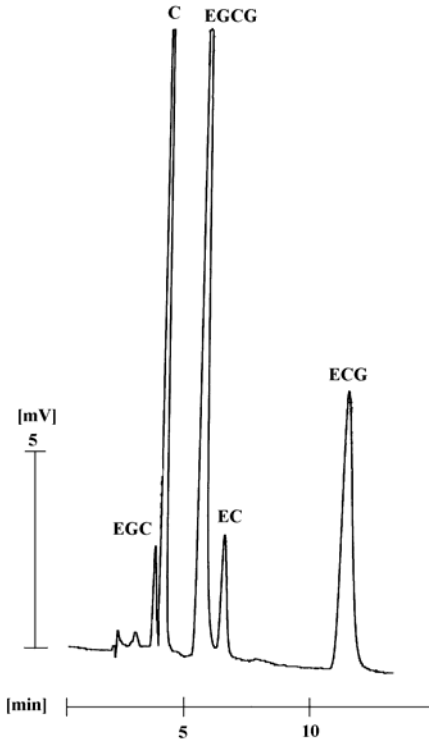


Abbildung 3.2: HPLC-Chromatogramm einer Standardmischung der fünf untersuchten Catechine
EGC = Epigallocatechin, **C** = Catechin, **EGCG** = Epigallocatechingallat, **EC** = Epicatechin, **ECG** = Epicatechingallat

3.1.3 Gradienten-HPLC-Methode zur Bestimmung der Catechine und Phenolcarbonsäuren in Tee

Zur Detektion der Phenolcarbonsäuren und Catechine in einer HPLC-Analyse wurde die isokratische Methode (s. 3.1.2) zur quantitativen Bestimmung der Catechine in Tee modifiziert. Mit einer Gradientenmethode war die Analyse der Phenolcarbonsäuren und Catechine in Tee-Extrakten innerhalb 51 min möglich [SCHLESIER et al. 2001a] (detaillierte Bedingungen s. 8.2.2). Als innerer Standard (IS) diente p-Hydroxybenzoesäuremethylester. Somit war die quantitative Bestimmung der Gallussäure in Tee möglich. Diese HPLC-Methode kann auch für die Analyse der Extrakte anderer pflanzlicher Lebensmittel, wie z. B. Obst- und Gemüse-Extrakte eingesetzt werden [SCHLESIER et al. 2001b]. Die folgende Tabelle zeigt die untersuchten Phenolcarbonsäuren und Catechine mit den dazugehörigen Retentionszeiten.

Tabelle 3.3: Retentionszeiten [min] der untersuchten Catechine und Phenolcarbonsäuren bei Verwendung eines Gradientenprogramms

Standard	Retentionszeit [min]
Gallussäure (GS)	3,85
Protocatechusäure (PCS)	6,72
Epigallocatechin (EGC)	8,99
Catechin (C)	9,68
Gentisinsäure (GES)	9,97
p-Hydroxybenzoesäure (pHB)	11,72
Chlorogensäure (Chl)	12,54
Vanillinsäure (VS)	15,54
Kaffeesäure (KS)	17,08
Epigallocatechingallat (EGCG)	18,53
Syringasäure (SGS)	19,73
Epicatechin (EC)	22,47
p-Cumarsäure (pCS)	31,48
Ferulasäure (FS)	36,55
Epicatechingallat (ECG)	37,51
Sinapinsäure (SPS)	39,04
p-Hydroxybenzoesäuremethylester (pHBME)	41,07

In den folgenden Abbildungen werden die Kalibriergeraden der einzelnen Hydroxyzimtsäure-derivate und der Hydroxybenzoesäurederivate dargestellt.

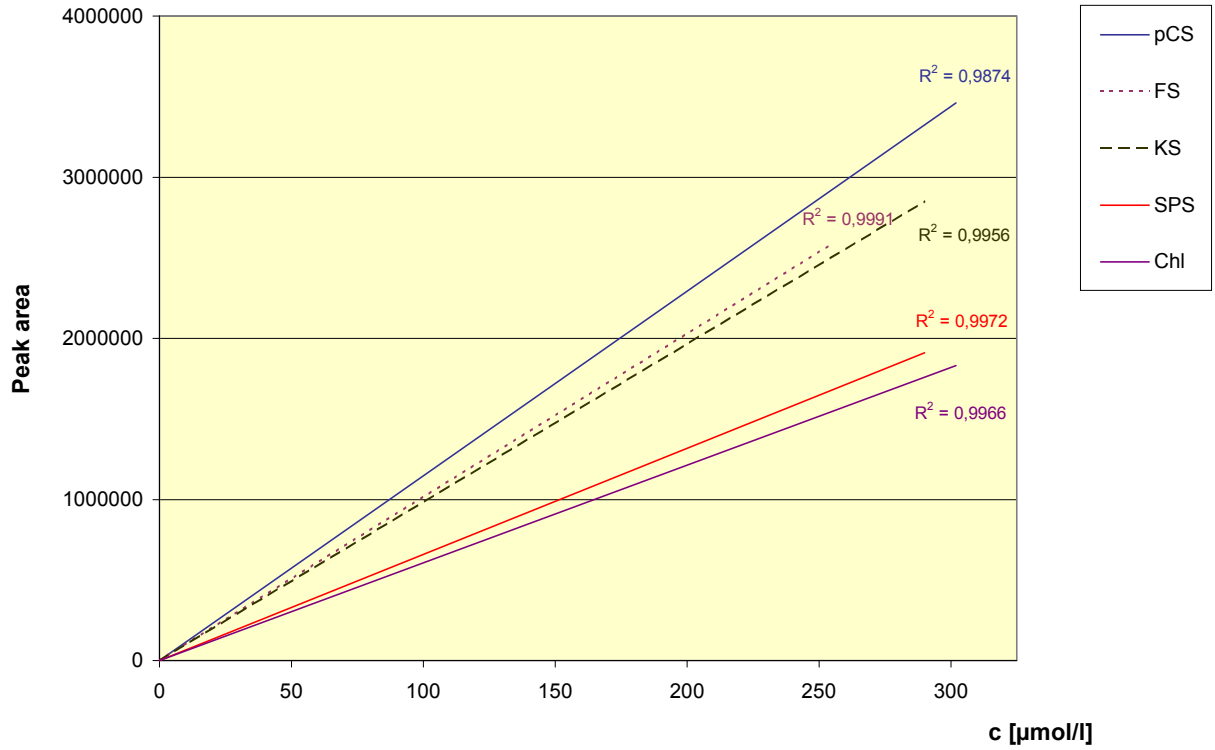


Abbildung 3.3: Kalibriergeraden der Hydroxyzimtsäurederivate
p-Cumarsäure (pCS), Ferulasäure (FS), Kaffeesäure (KS), Sinapinsäure (SPS) und Chlorogensäure (Chl)

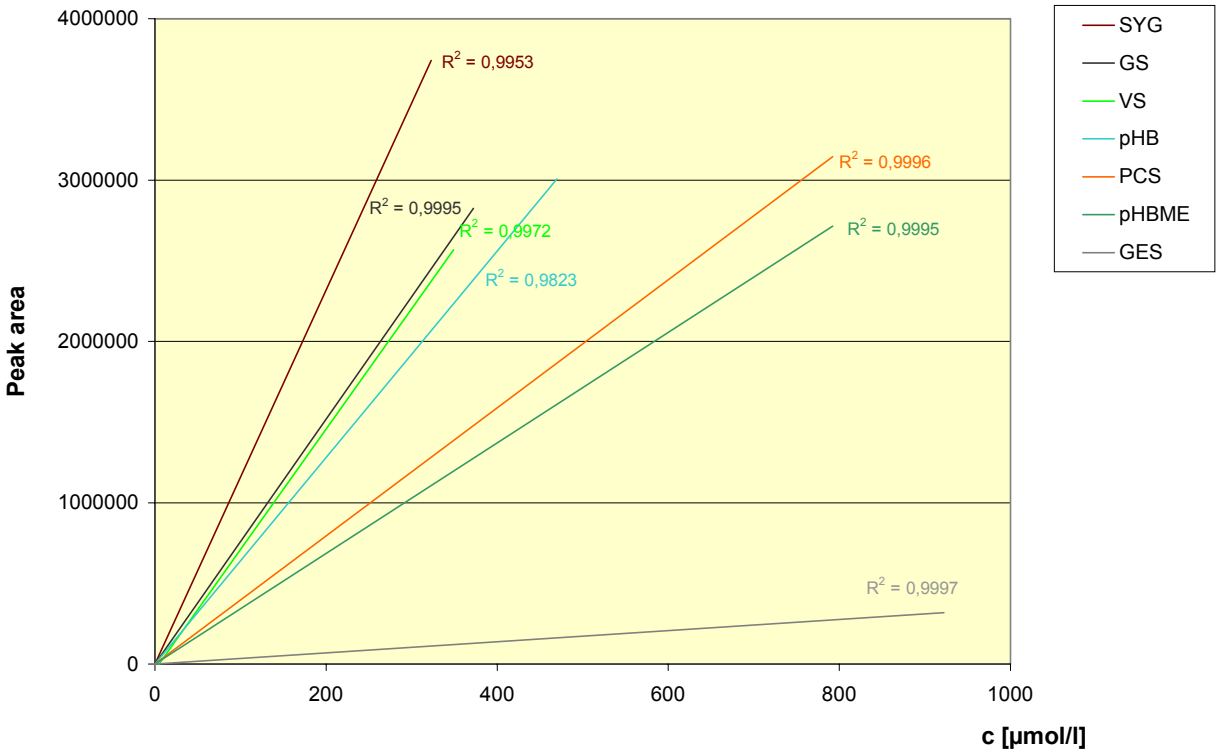


Abbildung 3.4: Kalibriergeraden der Hydroxybenzoesäurederivate
Syringasäure (SYG), Gallussäure (GS), Vanillinsäure (VS), p-Hydroxybenzoesäure (pHB), Protocatechusäure (PCS), p-Hydroxybenzoesäuremethylester (pHBME) und Gentisinsäure (GES)

Basierend auf diesen Daten wurden Nachweis- und Bestimmungsgrenze ermittelt. Die Nachweisgrenze entspricht dem Signal des Dreifachen des Basislinienrauschens, die Bestimmungsgrenze dem Zehnfachen des Basislinienrauschens [MILLER und MILLER 1993, KROMIDAS et al. 1995]. Tabelle 3.4 zeigt die Nachweisgrenzen und die Bestimmungsgrenzen der untersuchten Phenolcarbonsäuren.

Tabelle 3.4: Nachweisgrenzen [µmol/l] und Bestimmungsgrenzen [µmol/l] der untersuchten Phenolcarbonsäuren

Phenolcarbonsäuren	**Nachweisgrenze [µmol/l]**	**Bestimmungsgrenze [µmol/l]**
Gallussäure (GS)	0,122	0,408
Protocatechusäure (PCS)	0,233	0,777
Gentisinsäure (GES)	4,012	13,373
p-Hydroxybenzoesäure (pHB)	0,258	1,112
Chlorogensäure (Chl)	0,115	0,384
Vanillinsäure (VS)	0,154	0,513
Kaffeesäure (KS)	0,097	0,324
Syringasäure (SGS)	0,107	0,359
p-Cumarsäure (pCS)	0,073	0,254
Ferulasäure (FS)	0,096	0,322
Sinapinsäure (SPS)	0,153	0,509
p-Hydroxybenzoesäuremethylester (pHBME)	0,296	0,988

Die folgende Abbildung zeigt das HPLC-Chromatogramm einer Standardmischung der Phenolcarbonsäuren und Catechine.

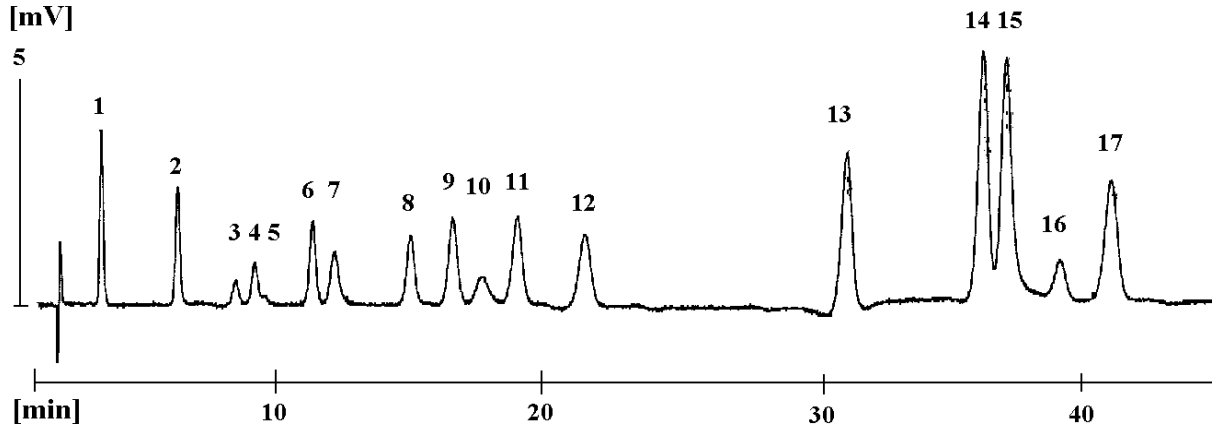


Abbildung 3.5: HPLC-Chromatogramm einer Standardmischung
1 = Gallussäure, **2** = Protocatechusäure, **3** = Epigallocatechin, **4** = Catechin, **5** = Gentisinsäure, **6** = p-Hydroxybenzoesäure, **7** = Chlorogensäure, **8** = Vanillinsäure, **9** = Kaffeesäure, **10** = Epigallocatechingallat, **11** = Syringasäure, **12** = Epicatechin, **13** = p-Cumarsäure, **14** = Ferulasäure, **15** = Epicatechingallat, **16** = Sinapinsäure, **17** = p-Hydroxybenzoesäuremethylester (pHBME)

Diese HPLC-Methode wurde für die Untersuchungen „Tee aus einer Rohware - Grün- und Schwarztee“ (s. 4.1.4) und „Tee aus einer Rohware - Grün-, Oolong- und Schwarztee“ (s. 4.1.5) eingesetzt.

3.2 In vitro-Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen

3.2.1 Prinzip der Untersuchungen

Das Prinzip der Untersuchungen beruhte auf der in vitro simulierten Verdauung von Lebensmittelproben mit Hilfe von Ultrafiltration [MILLER et al. 1981, MINIHANE et al. 1993]. Unter standardisierten Bedingungen (Temperatur: 37 °C, pH-Wert: 7,4) wurden Eisensalze ($FeCl_2$ und $FeCl_3$) oder Formulakost[8] (Säuglingsnahrung) mit Teepolyphenolen in unterschiedlichen Konzentrationen sowie Tee-Extrakten (Ceylon Pekoe und China Gunpowder) für eine Stunde im Wasserbad (37 °C) inkubiert und anschließend unter Stickstoff (3,9 bar) dialysiert. Nach der Ultrafiltrationsdialyse wurden in der Ausgangslösung, in der Inkubationslösung und in dem Eluat Eisen [MATISSEK et al. 1989], antioxidative Aktivität [MILLER et al. 1993], Gesamtphenole [SINGLETON und ROSSI 1965] und Catechine (s. 3.1.2 und 3.1.3, s. 8.2.1 und 8.2.2) quantifiziert. Die Untersuchungen zu den Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen umfassten drei Versuchsreihen:

[8] Die Rezepturen der Formulakost sind in den Arbeitsvorschriften (s. 8.3) dargestellt.

- Versuchsreihe I: Catechin[9] wurde in Phosphatpuffer gelöst und mit $FeCl_2$ oder $FeCl_3$ versetzt.
- Versuchsreihe II: Tee-Extrakt (Ceylon Pekoe und Gunpowder) wurde mit $FeCl_2$ oder $FeCl_3$ versetzt.
- Versuchsreihe III: Tee-Extrakt (Ceylon Pekoe) wurde mit Säuglingsnahrung Milasan (pre) oder Milasan Milchbrei (ab 4. Monat) versetzt.

Bei allen Ansätzen wurde vor der einstündigen Inkubation im Wasserbad (37 °C) der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die anschließende Dialyse unter Stickstoff dauerte je nach Versuchsansatz zwischen 1 h bis 2,5 h.

3.2.2 Prinzip der Ultrafiltration

Ultrafiltration stellt einen kontinuierlichen, molekularen, druckabhängigen Trennprozess dar. Gelöste Bestandteile eines Stoffgemisches werden nach Molekülgröße, Form und Ladung durch semipermeable Membranen getrennt. Bei der Ultrafiltrationsdialyse ist die Durchtrittsrate der gelösten Stoffe aus der Probenlösung in das Dialysat (Eluat) proportional zu ihrer Konzentration. Als Eluat wird die Flüssigkeit bezeichnet, die nicht durch die Membran zurückgehalten wird. Der Aufbau der AMICON-Rührzelle ist im Anhang zu finden.

3.3 Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen unter physiologischen Bedingungen

Die Humanstudie sollte in vivo die Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen untersuchen. An der Humanstudie nahmen 34 Probanden teil, 20 Mischköstler und 14 Vegetarier. Die Mischkost ist durch den Konsum aller Lebensmittelgruppen gekennzeichnet. Die Vegetarier ernährten sich nach einer lakto-ovo-vegetabilen Kostform, die durch einen Verzicht auf Fleisch, Wurstwaren und Fisch und Fischwaren gekennzeichnet ist. Eier, Milch- und Milchprodukte waren erlaubt. Die Humanstudie wurde in einem cross over-Design durchgeführt, das in folgender Abbildung dargestellt wird.

[9] Aus finanziellen Gründen wurde Catechin als Standard in der Versuchsreihe I eingesetzt. Auf die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen den anderen Catechinen des Tees (Epigallocatechin, Epigallocatechingallat, Epicatechin und Epicatechingallat) und Eisen wurde verzichtet.

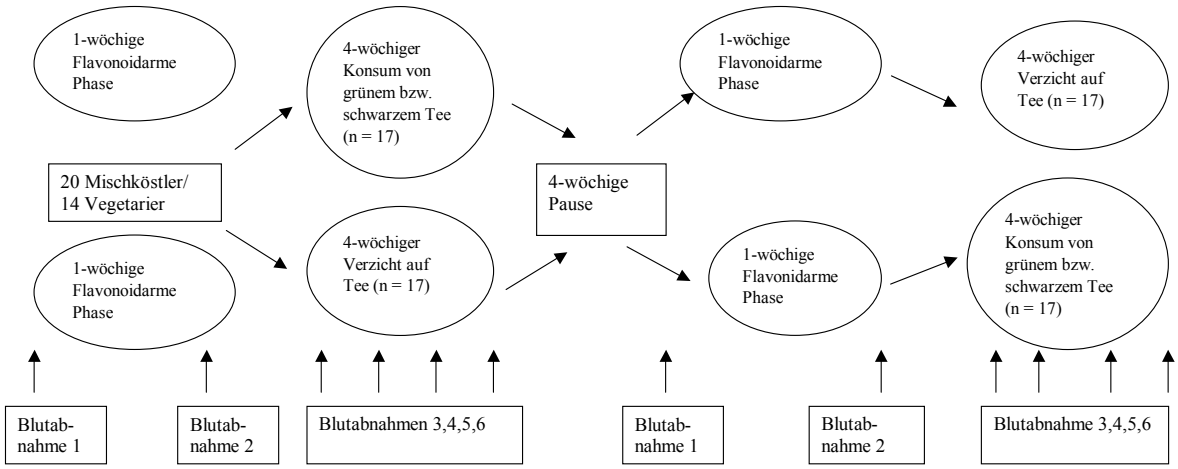


Abbildung 3.7: Cross over-Design der Studie „Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen unter physiologischen Bedingungen"

Die Studie war in zwei Teile (je 5 Wochen) untergliedert. Zu Beginn der Studie ernährten sich die Probanden flavonoidarm, v. a. flavanolhaltige Lebensmittel, (Verzicht auf schwarzen und grünen Tee, kakaohaltige Lebensmittel, Kaffee, weiße und rote Trauben, Weiß- und Rotwein, Säfte aller Art), und ab der zweiten Woche konsumierten die Probanden 8 - 10 Tassen (1 Liter/d) grünen oder schwarzen Tee zu den Mahlzeiten. Die Kontrollgruppe verzichtete in diesen vier Wochen auf das Trinken von Tee. Die Aufteilung der Gruppen ermöglicht den Vergleich zwischen schwarzem und grünem Tee und zwischen Vegetariern und Mischköstlern.

Außerdem sollten die Probanden während der 4-wöchigen Tee-Phase keinen zusätzlichen schwarzen bzw. grünen Tee außer dem ausgegebenen Tee konsumieren. Der Zusatz von Milch, Zucker und Zitrone zu dem Teegetränk war nicht erlaubt. In den Blutproben der sechs Probennahmezeitpunkte wurde die antioxidative Aktivität sowohl mit dem FRAP-Test als auch mit der Bestimmung der Superoxiddismutase und des Glutathions ermittelt. Der Eisenstatus wurde anhand folgender Parameter ermittelt: Hämoglobin, Hämatokrit, Transferrin, Ferritin, Freies Eisen und Freie Eisenbindungskapazität. Tabelle 3.5 zeigt die Charakterisierung der Probanden hinsichtlich Alter und Body-Mass-Index.

Tabelle 3.5: Alter [a] und Body-Mass-Index (BMI) [kg/m^2] (jeweils $\bar{x}$, min. - max.) der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform und dem Teekonsum während der Studie

	Mischköstler/innen (n = 20)				**Vegetarier/innen (n = 14)**			
	Grüner Tee (n = 10)		**Schwarzer Tee (n = 10)**		**Grüner Tee (n = 8)**		**Schwarzer Tee (n = 6)**	
	w (n = 8)	m (n = 2)	w (n = 7)	m (n = 3)	w (n = 6)	m (n = 2)	w (n = 4)	m (n = 2)
Alter [a]	22,8 21,0 - 29,0	21,5 21,0 - 22,0	21,7 20,0 - 23,0	24,3 21,0 - 26,0	21,8 19,0 - 25,0	23,0 23,0 - 23,0	26,3 21,0 - 33,0	30,5 29,0 - 32,0
BMI [kg/m^2]	20,4 18,4 - 22,0	23,6 19,9 - 27,2	20,1 17,6 - 24,2	22,6 21,0 - 23,4	20,3 17,8 - 22,1	20,5 19,7 - 21,3	20,9 16,5 - 24,9	20,3 19,6 - 20,9

Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren folgende Erkrankungen: Allergien, Magen-Darm-Erkrankungen, Leber- oder Nierenerkrankungen. Außerdem war die Einnahme von Vitamin- und Mineralstoffsupplementen verboten. Die Einnahme von Eisentabletten war ebenfalls untersagt. Schwangere und stillende Frauen waren ausgeschlossen. An der Studie nahmen auch 5 Raucher teil, 1 Vegetarier und 4 Mischköstler. 80 % der Mischköstlerinnen und 70 % der Vegetarierinnen nahmen orale Kontrazeptiva während der Humanstudie. Die Probanden wurden ausführlich mündlich und schriftlich über die Studie unterrichtet und darüber informiert, dass sie jederzeit, ohne Angabe von Gründen, die Teilnahme an der Studie abbrechen können, ohne dass ihnen daraus Nachteile entstehen. Die Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis. Der Prüfplan wurde der örtlichen Ethikkommission vorgelegt.

3.4 Bestimmung der antioxidativen Aktivität und deren Bewertung

Um den Beitrag antioxidativer Verbindungen unterschiedlicher Struktur an dem Summenparameter antioxidative Aktivität zu ermitteln, wurde die Wirksamkeit von vier, im folgenden dargestellten, Einzelverbindungen in sechs verschiedenen in vitro-Tests überprüft: Trolox, ein wasserlösliches Vitamin E-Analog, Ascorbinsäure als ein weit verbreitetes Vitamin in Obst und Gemüse, Gallussäure als Vertreter der Polyphenole und Harnsäure als Antioxidans im menschlichen Plasma. Die Wirkungen dieser Einzelverbindungen wurden mit Hilfe des TEAC I-Test [MILLER et al. 1993], TEAC II-Test [MILLER et al. 1996] und TEAC III-Test [RE et al. 1999], TRAP-Test [GHISELLI et al. 1995], DPPH-Test [BRAND-WILLIAMS et al. 1995], DPMD-Test [FOGLIANO et al. 1999], FRAP-Test [BENZIE und STRAIN 1996] und PCL-Test [POPOV und LEWIN 1999] analysiert. Die folgende Tabelle zeigt die Konzentrationen der Stammlösungen der untersuchten Einzelsubstanzen.

Tabelle 3.6: Konzentrationen c [mmol/l] der Stammlösungen der vier Antioxidantien

Antioxidans	**c [mmol/l]**	
Ascorbinsäure	5,68	
Gallussäure	0,568 oder	1,116
Harnsäure	6,100 oder	9,130
Trolox	2,5	

Die ausführlichen Arbeitsvorschriften zu den jeweiligen Testverfahren sind in den Arbeitsvorschriften (s. 8.1.1-8.1.3.8) zu finden. Des weiteren wurden Getränke, wie z. B. Johannisbeersaft und -nektar, Apfelsaft, Tomatensaft und grüne und schwarze Tee-Extrakte mit den genannten Tests analysiert. Die Gesamtphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu [SINGLETON und ROSSI 1965] sowie die Ascorbinsäuregehalte [SPEITLING et al. 1992] wurden zusätzlich zur Beurteilung des protektiven Potenzials bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zu Teepolyphenolen

4.1.1 Einfluss von Herkunft und Sorte

Anhand der Gesamtphenolgehalte und der antioxidativen Aktivität wurde der Einfluss von Herkunft und Herstellungsverfahren auf die protektiv wirksamen Tee-Inhaltsstoffe geprüft. Für die Untersuchungen standen grüner Tee (n = 4), Oolong-Tee (n = 2) und schwarzer Tee (n = 14) aus dem lokalen Handel zur Verfügung. Die Teesorten unterschieden sich in ihren Provenienzen und Blattgraden. Im folgenden werden die gebräuchlichsten Abkürzungen für Blatt-Tees und Broken-Tees zusammengefasst:

Blatt-Tee

- SFTGFOP: Special Fine Tippy Golden Flowery Orange Pekoe
- FTGFOP: Fine Tippy Golden Flowery Orange Pekoe
- TGFOP: Tippy Golden Flowery Orange Pekoe
- GFOP: Golden Flowery Orange Pekoe
- FOP: Flowery Orange Pekoe
- OP: Orange Pekoe
- P: Pekoe

Broken-Tee (Blattstücke)

- TGFBOP: Tippy Golden Flowery Broken Orange Pekoe
- GFBOP: Golden Flowery Broken Orange Pekoe
- FBOP: Flowery Broken Orange Pekoe
- BOP: Broken Orange Pekoe
- BP: Broken Pekoe

Die folgende Tabelle zeigt die untersuchten Teeproben mit Sorten- und Handelsbezeichnung.

Tabelle 4.1: Untersuchte Teeproben mit Sorten- und Herkunftsbezeichnung

Proben-Nr.	Sorte	Herkunftsbezeichnung
Grüner Tee		
10a	China Chun Mee	China
10b	China Gunpowder	China
11	Japan Bancha	Japan
12	Ceylon Pekoe	Sri Lanka
Oolong-Tee		
13	China Kwai Flower	China
14	Formosa Oolong	Taiwan
Schwarzer Tee		
1a	Assam BOP	Indien
1b	Assam CTC	Indien
2a	Ceylon OP Medium	Sri Lanka
2b	Ceylon BOP UVA Highlands	Sri Lanka
3a	Darjeeling FOP second flush blend	Indien
3b	Darjeeling GFOP second flush Margaret's Hope	Indien
4	China Golden Yunnan	China
5	Ostfriesische Teestunde	Indien, Sumatra, Sri Lanka
6	English Breakfast Tee	Indien
7	Kenya FP „Kibwari"	Kenia
8a	Nilgiri FBOP High Grown Parkside	Indien
8b	Golden Nepal TGFOP second flush Kanyam	Indien
9a	Persische Mischung	China, Sri Lanka
9b	Grusinische Teemischung	Indien, China, Sri Lanka

Die Teeproben wurden nach dem beschriebenen Extraktionsverfahren (s. 3.1.1) aufgebrüht, und die Gesamtphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu und die antioxidative Aktivität der Tee-Extrakte analysiert. Tabelle 4.2 verdeutlicht die Schwankungsbreite von Gesamtphenolgehalt und TEAC-Wert der drei Teesorten, angegeben sind jeweils Mittelwert und min. - max.:

Tabelle 4.2: Gesamtphenolgehalte (GAE) [mg/l] und TEAC-Werte [mmol/l] von grünem, Oolong- und schwarzem Tee-Extrakt, jeweils $\bar{x}$ und min. - max.

	Grüner Tee	Oolong-Tee	Schwarzer Tee
GAE	588 ^{A}	259 ^{B}	570 ^{A}
[mg/l]	395 - 707	179 - 259	351 - 770
TEAC	3,10 ^{A}	1,43 ^{B}	2,60 ^{A}
[mmol/l]	1,97 - 4,82	1,40 - 1,46	1,51 - 3,53

$\bar{x}$ (= Mittelwerte) mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben in Zeilen sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA und anschließendem Tukey-HSD-Test

Grüner Tee und schwarzer Tee unterschieden sich weder in dem Gesamtphenolgehalt noch in der antioxidativen Aktivität signifikant ($p > 0,05$). Oolong-Tee enthielt hingegen signifikant weniger phenolische Verbindungen und hatte auch eine signifikant niedrigere antioxdative Aktivität gegenüber grünen und schwarzen Tee ($p < 0,05$). Sowohl grüner als auch schwarzer

Tee stellen eine gute Quelle für die antioxidativ wirksamen Substanzen dar. Abbildung 4.1 zeigt die Korrelation zwischen beiden Parametern für alle untersuchten Tees.

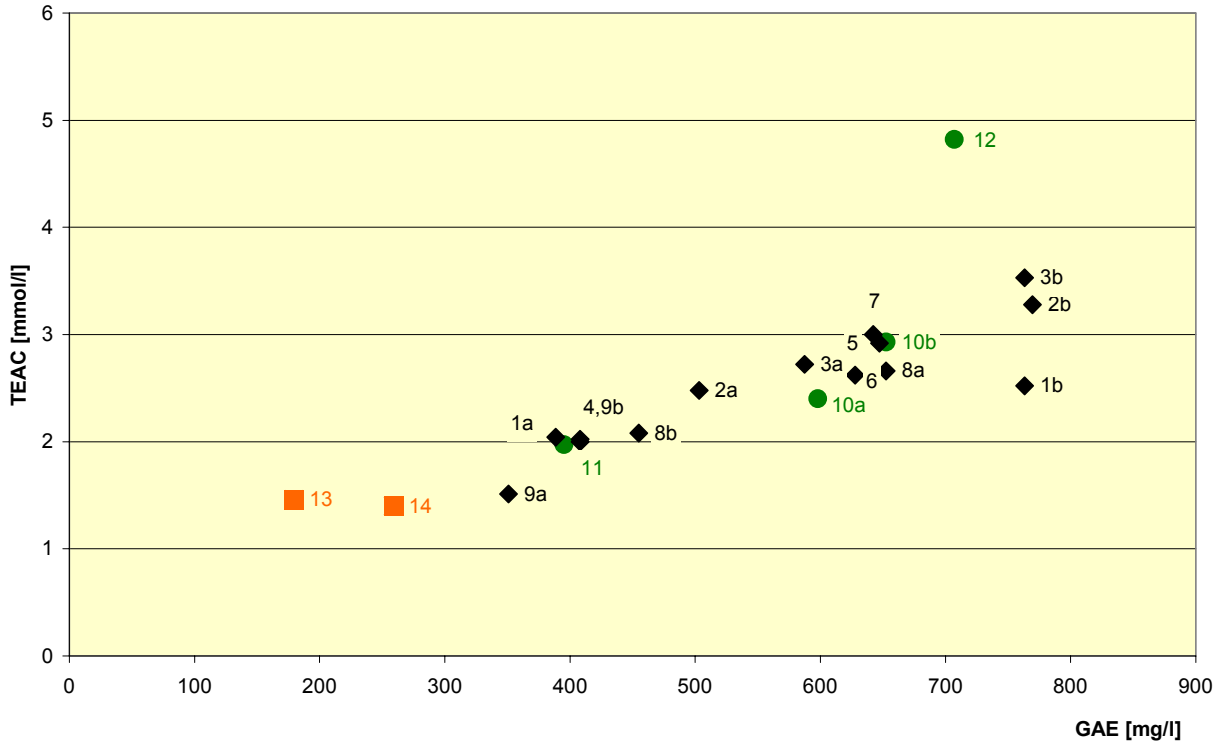


Abbildung 4.1: Korrelation zwischen Gesamtphenolgehalten (GAE) und TEAC-Werten (grüner Tee = grüne Kreise, Oolong-Tee = braune Rechtecke, schwarzer Tee = schwarze Rauten)

Die Korrelation für die 20 Teeproben lag bei r = 0,8190. Der grüne Tee (12) mit dem höchsten Gesamtphenolgehalt und der stärksten antioxidativen Aktivität stammte aus Indien (Ceylon), hergestellt aus einem gut verarbeiteten Blatt, der grüne Tee (11) mit den niedrigsten Werten stammte aus Japan, dessen Teeblätter etwas größer waren. Einer der schwarzen Tees (2b) mit hohem Gesamtphenolgehalt und hoher antioxidativer Aktivität stammte aus Sri Lanka (Ceylon) mit der Sortierung Broken Orange Pekoe (BOP), dieser Tee enthielt also vor allem junge Blätter, jedoch nur wenig Knospen. Der Assam CTC (1b) zeichnete sich durch höhere Gesamtphenolgehalte und antioxidative Aktivität verglichen mit dem Assam BOP aus. Ein wichtiges Kriterium für hohe Gesamtphenolgehalte und antioxidative Aktivität ist die Größe des Teeblattes. Aus einem feinem Teeblatt, wie z. B. dem des Assam CTC, werden mehr phenolische Inhaltsstoffe extrahiert verglichen mit dem Assam mit der Sortierung BOP (1a).

4.1.2 Einfluss von Temperatur und Anzahl der Extraktionsvorgänge

Die genannten grünen Teeproben (s. Tabelle 4.1) wurden extrahiert, indem jeweils 1,3 g Tee mit 100 ml siedendem destilliertem bzw. auf 80 °C abgekühltem destilliertem Wasser auf-

gebrüht und jeweils fünfmal mit denselben Teeblättern für 3 min aufgegossen wurden. Folglich konnten der Einfluss der Aufbrühtemperatur und die Anzahl an Extraktionsvorgängen auf die protektiven Tee-Inhaltsstoffe geprüft werden. Die Mehrfachextraktion und die niedrige Aufbrühtemperatur sind Parameter eines üblichen Aufbrühverfahrens für Grüntees, um bittere Tee-Aufgüsse zu vermeiden. Die folgende Tabelle zeigt Gesamtphenolgehalte (GAE) und antioxidative Aktivität (TEAC) der 1. - 5. Aufgüsse der Teeproben bei den beiden Aufbrühtemperaturen.

Tabelle 4.3: Gesamtphenolgehalte (GAE) [mg/l] und TEAC-Werte [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) der vier untersuchten Grüntees für jeweils fünf Aufgüsse

		China Chun Mee	**China Gunpowder**	**Japan Bancha**	**Ceylon Pekoe**
Siedendes Wasser					
GAE	**1. Aufguss**	512 ± 3	388 ± 17	372 ± 0	645 ± 4
TEAC	**1. Aufguss**	4,26 ± 0,02	3,15 ± 0,03	2,72 ± 0,00	6,12 ± 0,01
GAE	**2. Aufguss**	432 ± 6	271 ± 2	325 ± 15	478 ± 14
TEAC	**2. Aufguss**	3,30 ± 0,00	1,82 ± 0,02	1,99 ± 0,01	3,06 ± 0,01
GAE	**3. Aufguss**	242 ± 4	188 ± 4	168 ± 6	310 ± 39
TEAC	**3. Aufguss**	2,30 ± 0,00	1,47 ± 0,00	1,06 ± 0,01	2,68 ± 0,01
		171 ± 1	116 ± 1	113 ± 0	221 ± 0
TEAC	**4. Aufguss**	1,64 ± 0,00	0,53 ± 0,05	0,54 ± 0,01	1,55 ± 0,02
GAE	**5. Aufguss**	121 ± 1	94 ± 1	75 ± 1	145 ± 8
TEAC	**5. Aufguss**	0,61 ± 0,01	0,41 ± 0,00	0,34 ± 0,01	1,22 ± 0,02
		China Chun Mee	**China Gunpowder**	**Japan Bancha**	**Ceylon Pekoe**
80 °C-Wasser					
GAE	**1. Aufguss**	408 ± 45	445 ± 4	366 ± 0	467 ± 3
TEAC	**1. Aufguss**	2,51 ± 0,01	2,39 ± 0,00	2,33 ± 0,02	3,33 ± 0,01
GAE	**2. Aufguss**	396 ± 24	349 ± 6	359 ± 2	429 ± 11
TEAC	**2. Aufguss**	2,18 ± 0,01	1,52 ± 0,02	2,04 ± 0,01	2,58 ± 0,01
GAE	**3. Aufguss**	238 ± 0	377 ± 8	170 ± 2	401 ± 3
TEAC	**3. Aufguss**	1,83 ± 0,01	1,27 ± 0,02	0,87 ± 0,01	1,78 ± 0,01
GAE	**4. Aufguss**	157 ± 4	252 ± 1	107 ± 7	231 ± 3
TEAC	**4. Aufguss**	0,80 ± 0,01	0,74 ± 0,01	0,52 ± 0,02	1,74 ± 0,01
GAE	**5. Aufguss**	97 ± 0	96 ± 1	78 ± 0	183 ± 9
TEAC	**5. Aufguss**	0,51 ± 0,01	0,50 ± 0,00	0,35 ± 0,01	1,45 ± 0,01

Der Einfluss der Aufbrühtemperatur war je nach Herkunft des grünen Tees unterschiedlich. Der Gesamtphenolgehalt und die antioxidative Aktivität nahmen mit zunehmender Zahl der Extraktionsvorgänge ab. Beim Ceylon Pekoe und beim China Chun Mee bewirkte die höhere Aufbrühtemperatur eine vermehrte Extraktion der phenolischen Inhaltsstoffe gegenüber der Aufbrühtemperatur von 80 °C. Dennoch hatten der 4. Aufguss des China Chun Mee und der 4. und 5. Aufguss des Ceylon Pekoe bei der Aufbrühtemperatur von 100 °C noch vergleichbar hohe antioxidative Aktivität und Gesamtphenolgehalte wie die Oolong-Tee-Extrakte

(s. Tabelle 4.2). Andererseits waren die Gesamtphenolgehalte und TEAC-Werte der fünf Aufgüsse des Japan Banchas bei beiden Aufbrühtemperaturen vergleichbar. Die Aufbrühtemperatur von 80 °C bewirkte beim China Gunpowder eine vermehrte Extraktion der phenolischen Verbindungen. Trotz der fünfmaligen Extraktion von identischen Teeblätter waren in allen Teeaufgüssen der vier untersuchten grünen Tees Gesamtphenole und TEAC-Werte bestimmbar. Diese Werte lagen teilweise in einem analogen Bereich wie die des Oolong-Tee-Extrakts, bei dem die Teeblätter nur einmal aufgebrüht wurden.

Die Gehalte der Catechine Epigallocatechin, Catechin, Epigallocatechingallat, Epicatechin und Epicatechingallat wurden in allen grünen Teesorten flüssigchromatographisch (s. 3.1.2 bzw. 8.2.1) ermittelt. Die folgende Tabelle zeigt die Gehalte der Catechine des grünen China Chun Mee für die zwei Aufbrühtemperaturen.

Tabelle 4.4: Gehalte der Catechine [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) in dem 1. - 5. Aufguss des China Chun Mee

Catechine [µmol/l]	**China Chun Mee Siedendes Wasser**									
	1. Aufguss		**2. Aufguss**		**3. Aufguss**		**4. Aufguss**		**5. Aufguss**	
EGC	1606,92 ±	95,11	766,49 ±	16,97	140,55 ±	3,69	75,33 ±	1,27	34,69 ±	1,96
C	245,35 ±	37,63	52,97 ±	4,27	26,85 ±	2,42	17,38 ±	1,27	9,30 ±	1,62
EGCG	1787,46 ±	64,64	517,87 ±	65,45	17,96 ±	3,19	7,35 ±	0,46	6,04 ±	1,38
EC	1234,25 ±	75,72	652,81 ±	55,98	101,48 ±	4,26	57,30 ±	3,73	31,99 ±	2,94
ECG	599,41 ±	49,86	216,94 ±	24,70	99,90 ±	5,77	61,05 ±	3,44	36,16 ±	1,66
Catechine [µmol/l]	**China Chun Mee 80 °C-Wasser**									
	1. Aufguss		**2. Aufguss**		**3. Aufguss**		**4. Aufguss**		**5. Aufguss**	
EGC	1341,09 ±	75,90	566,07 ±	37,05	202,01 ±	16,74	87,01 ±	13,61	24,00 ±	1,85
C	147,57 ±	2,54	59,17 ±	6,81	27,18 ±	5,19	18,94 ±	1,88	14,20 ±	0,69
EGCG	1280,85 ±	66,14	374,06 ±	36,59	15,34 ±	1,39	7,10 ±	1,73	3,59 ±	1,62
EC	1029,22 ±	39,94	418,30 ±	49,52	203,89 ±	4,43	52,81 ±	0,81	22,25 ±	2,32
ECG	546,69 ±	78,72	144,14 ±	1,15	76,80 ±	4,04	62,19 ±	4,83	22,45 ±	5,66

EGC = Epigallocatechin, C = Catechin, EGCG = Epigallocatechingallat, EC = Epicatechin, ECG = Epicatechingallat

In allen Aufgüssen des China Chun Mees wurden die Catechine nachgewiesen. Die Gehalte von Catechinen nahmen von Aufguss zu Aufguss ab. Die folgende Tabelle zeigt die Gehalte der Catechine in dem 1. - 5. Aufguss des Ceylon Pekoe bei den zwei verschiedenen Aufbrühtemperaturen.

Tabelle 4.5: Gehalte der Catechine [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) in dem 1. - 5. Aufguss des Ceylon Pekoe

Catechine [µmol/l]	**Ceylon Pekoe Siedendes Wasser**				
	1. Aufguss	**2. Aufguss**	**3. Aufguss**	**4. Aufguss**	**5. Aufguss**
EGC	1960,82 ± 0,00	1039,18 ± 42,44	442,46 ± 27,33	213,73 ± 8,49	183,37 ± 29,71
C	359,81 ± 0,00	279,55 ± 44,78	52,71 ± 0,00	16,88 ± 0,00	9,85 ± 0,00
EGCG	1396,29 ± 56,77	766,05 ± 85,15	356,11 ± 22,71	168,34 ± 31,22	96,91 ± 19,87
EC	1847,81 ± 44,78	875,50 ± 44,78	442,47 ± 0,00	185,45 ± 17,91	86,34 ± 35,83
ECG	603,98 ± 29,39	392,41 ± 0,00	146,21 ± 11,75	112,71 ± 14,69	69,79 ± 2,94
Catechine [µmol/l]	**Ceylon Pekoe 80 °C-Wasser**				
	1. Aufguss	**2. Aufguss**	**3. Aufguss**	**4. Aufguss**	**5. Aufguss**
EGC	1345,90 ± 42,44	926,79 ± 91,36	360,27 ± 0,00	192,02 ± 42,44	126,73 ± 0,00
C	278,51 ± 44,78	191,36 ± 44,78	41,42 ± 0,00	27,39 ± 0,00	9,30 ± 0,00
EGCG	1159,88 ± 56,77	785,66 ± 28,38	311,46 ± 28,38	182,42 ± 28,38	93,96 ± 0,00
EC	1446,92 ± 89,57	729,10 ± 44,78	267,41 ± 0,00	153,75 ± 0,00	107,69 ± 0,00
ECG	465,42 ± 29,39	298,00 ± 29,39	142,38 ± 29,39	95,41 ± 0,00	73,66 ± 0,00

In allen Aufgüssen des Ceylon Pekoe wurden die Catechine nachgewiesen. Die folgenden zwei Abbildungen zeigen die relativen Veränderungen der Catechine bezogen auf den ersten Aufguss des Ceylon Pekoe bei den zwei verschiedenen Aufbrühtemperaturen.

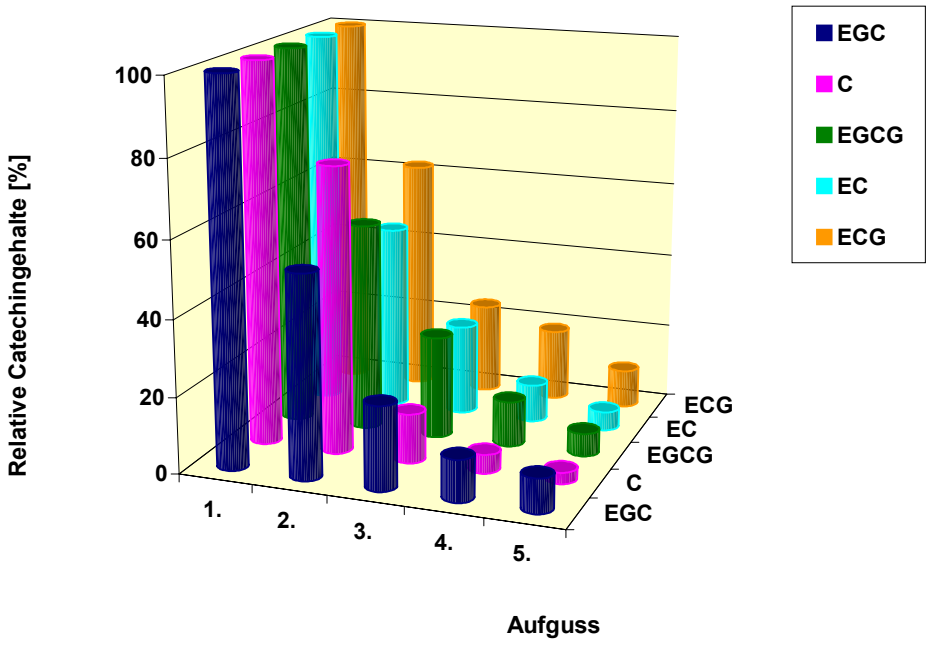


Abbildung 4.2: Veränderungen der relativen Gehalte der Catechine des Ceylon Pekoe bezogen auf den 1. Aufguss beim Aufbrühen mit siedendem Wasser

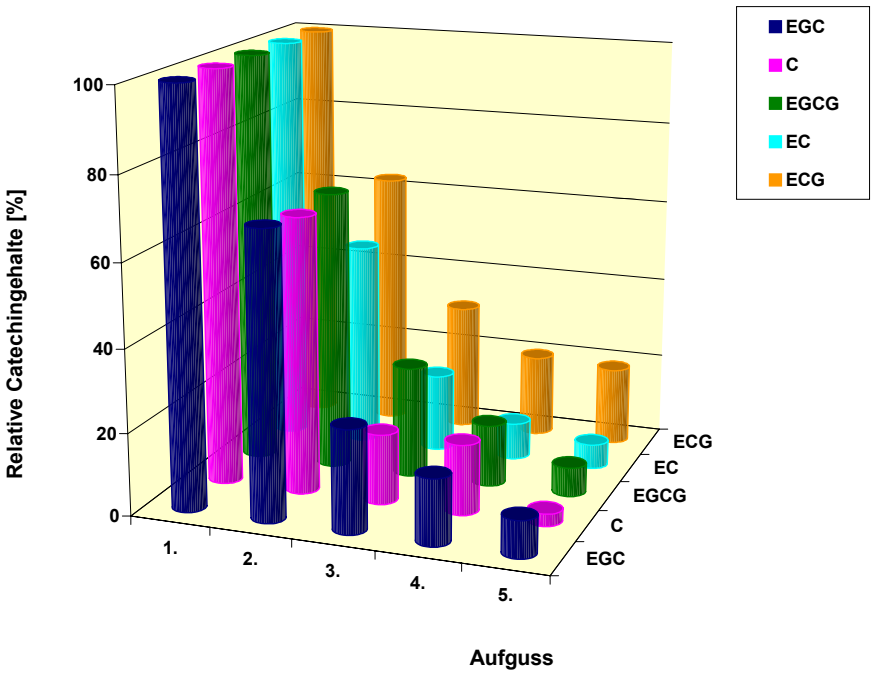


Abbildung 4.3: Veränderungen der relativen Gehalte der Catechine des Ceylon Pekoe bezogen auf den 1. Aufguss bei einer Aufbrühtemperatur von 80 °C

61 % der Catechine wurden in dem 2. Aufguss verglichen mit dem 1. Aufguss bei beiden Aufbrühtemperaturen nachgewiesen. Im 3. Aufguss wurden 22 % der Catechine, im 4. Aufguss 13 % der Catechine und 7 % der Catechine im 5. Aufguss bezogen auf den ersten Aufguss quantitativ bestimmt. Die Tabellen zu den Gehalten der Catechine von Japan Bancha und China Gunpowder sind im Anhang zu finden.

4.1.3 Anteil der Catechine am antioxidativen Potenzial

Für die Untersuchungen stand grüner Tee (n = 4) aus dem lokalen Handel zur Verfügung (s. Tabelle 4.1). Die Gehalte der Catechine Epicatechin, Catechin, Epicatechingallat, Epigallocatechin und Epigallocatechingallat in den grünen Tee-Extrakten wurden flüssigchromatographisch mittels der bereits beschriebenen Methode ermittelt (s. 3.1.2 bzw. 8.2.1) und sind in Tabelle 4.6 aufgeführt.

Tabelle 4.6: Gehalte der Catechine [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) in den grünen Tee-Extrakten

Catechine [µmol/l]	China Chun Mee	China Gunpowder	Japan Bancha	Ceylon Pekoe
EGC	1909,89 ± 42,44	1103,49 ± 42,22	1782,57 ± 169,77	1909,89 ± 84,88
C	268,70 ± 44,78	223,91 ± 44,78	89,57 ± 22,39	358,26 ± 44,78
EGCG	1417,98 ± 28,36	652,27 ± 56,72	652,27 ± 28,36	1446,30 ± 113,44
EC	1567,40 ± 89,57	1074,79 ± 89,57	1701,75 ± 179,13	1880,90 ± 134,35
ECG	440,78 ± 29,39	235,98 ± 0,00	235,08 ± 0,00	587,70 ± 0,00
∑ Catechine	5604,74	3289,54	4461,23	6183,07

Quantitativ dominierten die Catechine Epigallocatechin, Epigallocatechingallat und Epicatechin in allen vier Teesorten. Catechin war nur in geringen Mengen in den grünen Tees enthalten. Die höchsten Gehalte an Gesamtcatechinen enthielten Ceylon Pekoe und China Chun Mee. Die niedrigsten Gehalte an Catechinen wurden im China Gunpowder nachgewiesen. Insgesamt machten die Catechine etwa 15 % bezogen auf die Trockenmasse aus.

Die antioxidative Aktivität der grünen Tees und der einzelnen Catechin-Standardsubstanzen wurde mittels des TEAC I-Tests ermittelt. Der Tee mit der höchsten antioxidativen Aktivität war der Ceylon Pekoe, der mit dem niedrigsten TEAC-Wert, also dem niedrigsten protektiven Potenzial, der China Gunpowder (s. Tabelle 4.8).

Aus den TEAC-Werten der einzelnen Catechine wurde über deren Gehalte in den Teesorten ihr Anteil am antioxidativen Potenzial der Tee-Extrakte berechnet. In der folgenden Abbildung werden die Kalibriergeraden der einzelnen Catechinstandardsubstanzen dargestellt, mit deren Hilfe eine Kalkulation des TEAC-Wertes für die Tee-Extrakte möglich war.

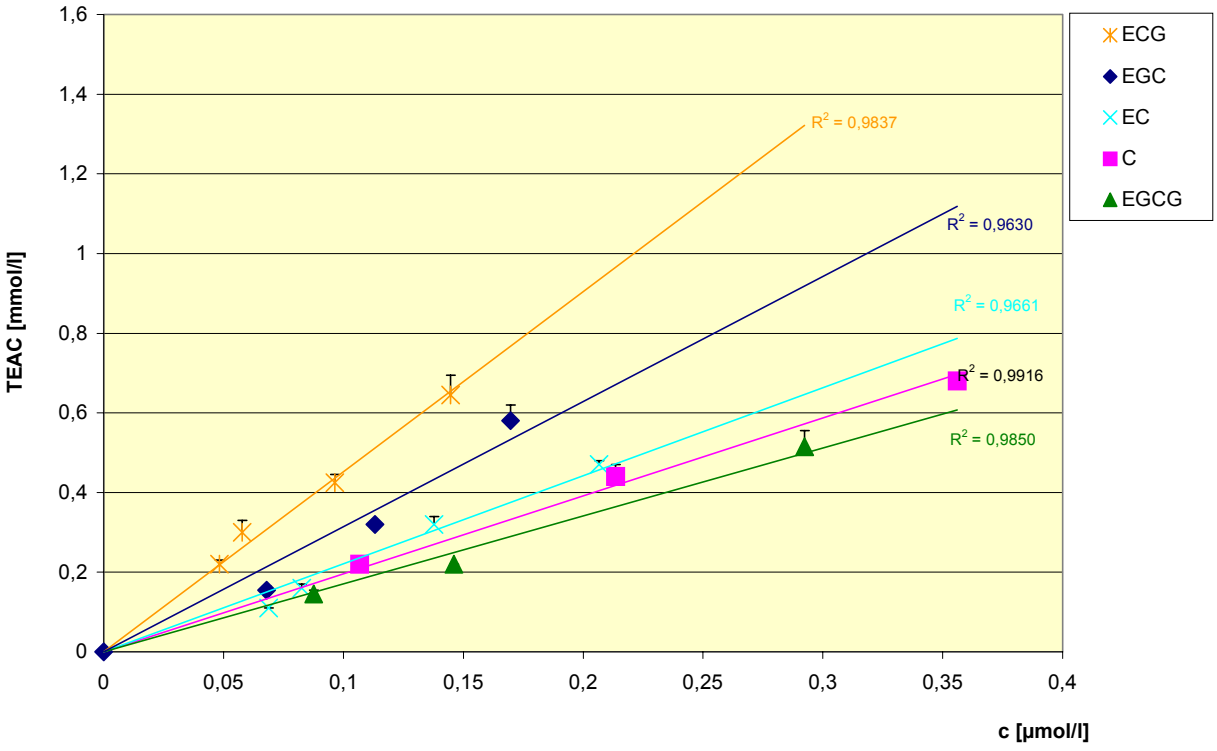


Abbildung 4.4: Kalibriergeraden der Catechinstandardsubstanzen in dem TEAC I-Test

Epigallocatechin und Epicatechingallat zeigten die stärkste antioxidative Wirksamkeit in dem TEAC I-Test. Die antioxidative Wirkung von Epigallocatechingallat und Catechin lag in einem vergleichbaren niedrigeren Bereich. Tabelle 4.7 zeigt die mittels dieser Kalibriergeraden (s. Abbildung 4.4) errechneten TEAC-Werte der einzelnen Catechine und ihren prozentualen Anteil an dem antioxidativen Potenzial der Tee-Extrakte.

Tabelle 4.7: TEAC-Werte [mmol/l] der Catechine in den grünen Tee-Extrakten und prozentualer Anteil an dem antioxidativen Potenzial der Tee-Extrakte

	TEAC-Wert [mmol/l], *prozentualer Anteil [%]* und kalkulierter Gesamt-TEAC-Wert (= Summe)										
	EGC		**C**		**EGCG**		**EC**		**ECG**		**Summe**
China Chun Mee	8,02	*(47,0)*	0,49	*(2,9)*	2,60	*(15,2)*	4,10	*(24,0)*	1,85	*(10,8)*	17,1
China Gunpowder	4,63	*(46,1)*	0,41	*(4,1)*	1,20	*(12,0)*	2,81	*(28,0)*	0,99	*(9,9)*	10,0
Japan Bancha	7,48	*(52,4)*	0,16	*(1,1)*	1,20	*(8,4)*	4,45	*(31,2)*	0,99	*(6,9)*	14,3
Ceylon Pekoe	8,02	*(42,9)*	0,66	*(3,5)*	2,65	*(13,9)*	4,91	*(26,2)*	2,47	*(13,2)*	18,7

Cirka 43 - 52 % der antioxidativen Aktivität der Catechine sind auf Epigallocatechin zurückzuführen, bedingt zum einem durch die hohe Epigallocatechinkonzentrationen im Tee-Extrakt und zum anderen durch dessen starke Wirksamkeit in dem TEAC I-Test. Epicatechin, ebenfalls in hohen Konzentrationen in den Tee-Extrakten enthalten, trug mit ~20 - 30 % zur antioxidativen Aktivität der Tee-Extrakte bei. Epigallocatechingallat leistete aufgrund der niedrigen Wirksamkeit in dem TEAC I-Test nur einen Anteil von ~12 % an dem antioxidativen Potenzial der grünen Tee-Extrakte. Den höchsten kalkulierten TEAC-Wert hatte die rechnerisch ermittelte Summe der Catechine des Ceylon Pekoe, gefolgt von der des China Chun Mee. Der errechnete TEAC-Wert des China Gunpowder ergab die niedrigste antioxidative Wirksamkeit.

Anhand der mit HPLC ermittelten Catechinkonzentrationen der grünen Tee-Extrakte (s. Tabelle 4.6) wurden Catechinmischungen hergestellt, deren TEAC-Werte analytisch ermittelt wurden. Somit war der Vergleich zwischen den gemessenen TEAC-Werten der Catechinmischungen und den kalkulierten TEAC-Werten der Catechine (s. Tabelle 4.7) möglich. Die kalkulierten Summen der TEAC-Werte der Catechine für die vier Tee-Extrakte und die analysierten TEAC-Werte der Catechinmischungen werden in Tabelle 4.8 den TEAC-Werten der Tee-Extrakte gegenübergestellt.

Tabelle 4.8: Kalkulierte TEAC-Werte [mmol/l] der Catechine für die grünen Tee-Extrakte, gemessene TEAC-Werte [mmol/l] der Catechinmischungen und der Tee-Extrakte

	TEAC-Wert [mmol/l]			
	China Chun Mee	**China Gunpowder**	**Japan Bancha**	**Ceylon Pekoe**
Kalkuliert	17,1	10,0	14,3	18,7
Catechinmischung	15,1	12,4	16,6	20,1
Tee-Extrakt	2,5	1,4	1,7	3,3

Die kalkulierten Werte waren vergleichbar mit den TEAC-Werten der entsprechend den HPLC-Ergebnissen zusammengesetzten Catechinmischungen. Sie waren aber deutlich höher als die gemessenen TEAC-Werte der Tee-Extrakte. Die antioxidative Aktivitäten der Tee-Extrakte betrugen 10 - 20 % der jeweils kalkulierten TEAC-Werte.

FRANKEL et al. [1997] zeigten im Lipidsystem ebenfalls niedrigere antioxidative Aktivität von grünen Tee-Extrakten verglichen mit vergleichbaren Catechinlösungen. Die Autoren führten dieses Ergebnis auf antagonistische Wechselwirkungen zwischen Teecatechinen und anderen Tee-Inhaltsstoffen zurück, die sie nicht genauer spezifizierten.

4.1.4 Tee aus einer Rohware - Grün- und Schwarztee

Zur Untersuchung des Einflusses des Herstellungsverfahrens von Grün- und Schwarztee auf die Parameter Gesamtphenolgehalt, antioxidative Aktivität, Gehalte an Gallussäure und Catechinen standen diese Teesorten zur Verfügung.

- Muster A: grüner und schwarzer Darjeeling (S) TGFOP 1 (A grün und A schwarz)
- Muster B: grüner und schwarzer Darjeeling SFTGFOP (B grün und B schwarz)
- Muster C: grüner und schwarzer Assam OFCTC bzw. fine TGFOP (C grün und C schwarz)

Zur Herstellung der genannten Teesorten wurde in den jeweiligen Teegärten innerhalb einer Produktionswoche von Schwarztee- auf Grünteeproduktion umgestellt. Die in dieser Studie verwendeten Teeblätter stammen jeweils aus dieser einen Woche. Dadurch sind die Unterschiede zwischen Grün- und Schwarztee direkt auf den Herstellungsprozess zurückzuführen. Üblicherweise ist jeder Teegarten auf die Produktion von Grün- oder Schwarztee spezialisiert. Die Tee-Extrakte wurden jeweils mit siedendem destilliertem Wasser bzw. auf 80 °C abgekühltem destilliertem Wasser aufgebrüht. Die folgende Abbildung zeigt die Gesamtphenolgehalte und die antioxidative Aktivität der grünen und schwarzen Tee-Extrakte bei beiden Aufbrühtemperaturen.

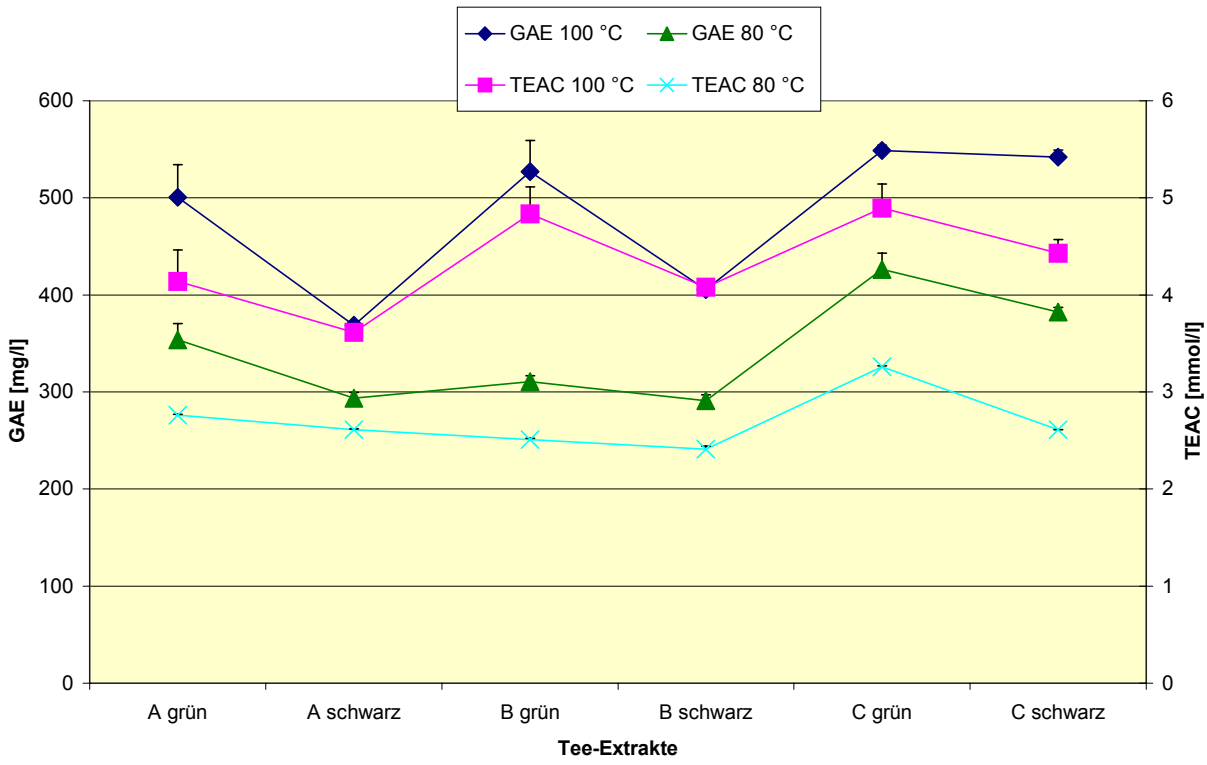


Abbildung 4.5: Gesamtphenolgehalte (GAE) [mg/l] und TEAC-Werte [mmol/l] der grünen und schwarzen Tee-Extrakte beim Aufbrühen mit siedendem und mit auf 80 °C abgekühltem Wasser

Beim Aufbrühen mit siedendem Wasser zeichneten sich die grünen Darjeelings durch höhere Gesamtphenolgehalte als die entsprechenden schwarzen Darjeelings aus. Hohe Anteile an Gesamtphenolen enthielten der grüne Assam (548 ± 6 mg/l) und der schwarze Assam (542 ± 7 mg/l), sowie der grüne Darjeeling B (527 ± 32 mg/l) und der grüne Darjeeling A (501 ± 34 mg/l). Im schwarzen Darjeeling A (369 ± 5 mg/l) war der Gesamtphenolgehalt niedrig. Der grüne und schwarze Assam und der grüne Darjeeling B zeigten hohe antioxidative Aktivität. Die schwarzen Darjeelings hatten niedrige antioxidative Aktivitäten. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Teesorten waren bei der Aufbrühtemperatur von 80 °C nicht mehr so deutlich zu erkennen. Die Korrelationen zwischen den beiden Parametern waren bei den zwei Aufbrühtemperaturen mit $r = 0{,}8486$ (100 °C) und $r = 0{,}8747$ (80 °C) vergleichbar. Auch in diesen Untersuchungen bewirkte die höhere Aufbrühtemperatur höhere Gesamtphenolgehalte und antioxidative Aktivität verglichen mit der niedrigeren Aufbrühtemperatur. Die gute Korrelation zeigt den großen Anteil der polyphenolischen Verbindungen am antioxidativen Potenzial der Tee-Extrakte.

Die grünen und schwarzen Tee-Extrakte wurden flüssigchromatographisch auf ihre Gehalte an Gallussäure und Catechinen mit bereits beschriebenen Methoden analysiert (s. 3.1.3

bzw. 8.2.2). Die folgende Tabelle zeigt die Gehalte an Gallussäure und Catechinen der grünen und schwarzen Tee-Extrakte, die mit siedendem Wasser aufgebrüht wurden.

Tabelle 4.9: Gehalte der Gallussäure und der Catechine [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) in den grünen und schwarzen Tee-Extrakten beim Aufbrühen mit siedendem Wasser

c [µmol/l]	A grün	A schwarz	B grün	B schwarz	C grün	C schwarz
GS	67,02 ± 13,68	117,75 ± 10,02	85,75 ± 11,58	118,11 ± 14,61	85,14 ± 7,28	131,95 ± 11,24
EGC	182,50 ± 34,74	36,08 ± 3,00	110,35 ± 25,82	38,20 ± 0,00	183,92 ± 23,38	n. n.
C	47,77 ± 6,84	24,63 ± 3,17	47,77 ± 2,59	26,87 ± 0,00	59,71 ± 2,19	46,28 ± 2,59
EGCG	404,95 ± 55,79	200,11 ± 26,09	389,81 ± 83,93	237,01 ± 34,12	266,81 ± 22,17	17,03 ± 0,00
EC	76,13 ± 0,00	33,59 ± 3,17	70,16 ± 9,32	29,11 ± 3,17	92,55 ± 14,40	n. n.
ECG	53,87 ± 3,39	36,73 ± 2,08	59,75 ± 12,23	49,95 ± 4,16	67,59 ± 2,94	7,35 ± 2,08

GS = Gallussäure, n. n. = nicht nachweisbar

Die Gehalte der Catechine nahmen von Grüntee zum Schwarztee in Folge der Fermentation ab. Die deutlichste Abnahme war bei dem schwarzen Assam zu sehen, der mit dem CTC-Verfahrens hergestellt wurde. Gallussäure war in höheren Konzentrationen in den Schwarztees enthalten, was auch durch den Abbau der Gallatgruppen der Catechine im Verlauf des Fermentationsprozesses bedingt war. Abbildung 4.6 zeigt die relativen Veränderungen der Gallussäure und Catechine in den Schwarztees bezogen auf den jeweiligen Grüntee.

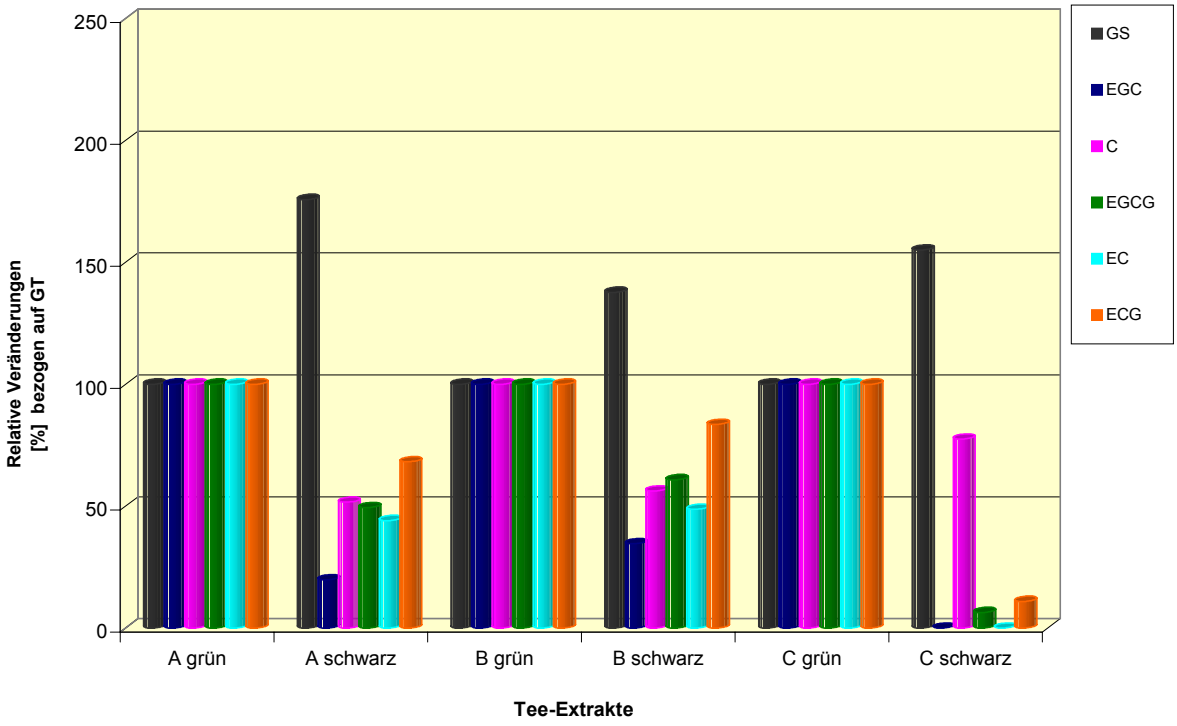


Abbildung 4.6: Relative Veränderungen [%] der Gallussäure und Catechine in Schwarztees bezogen auf den jeweiligen Grüntee

Der grüne Darjeeling A enthielt die höchsten Gehalte an Catechinen. 45 % dieser Catechine waren noch in dem entsprechenden schwarzen Darjeeling enthalten. Hingegen waren bei dem schwarzen Darjeeling B noch 60 % der Catechine des grünen Darjeeling B nachzuweisen. Das CTC-Verfahren bei dem schwarzen Assam bewirkte einen fast vollständigen Umbau der Catechine, nur noch 10 % der detektierten Catechine des grünen Assam (Tee-Extrakt C) wurden im schwarzen quantitativ bestimmt. Alle Catechine (Epigallocatechin, Catechin, Epigallocatechingallat, Epicatechin und Epicatechingallat) wurden in den grünen Darjeelings, in dem grünem Assam und in den schwarzen Darjeelings nachgewiesen. Bei dem Tee-Extrakt des schwarzen Assams konnten Epigallocatechin und Epicatechin nicht mehr nachgewiesen werden. In den grünen Tee-Extrakten dominierte Epigallocatechingallat, gefolgt von Epigallocatechin. Die Catechine der grünen Darjeelings wurden unterschiedlich durch die Fermentation beeinflusst. Cirka 50 % von Epigallocatechin, Catechin, Epigallocatechingallat und Epicatechin wurden bei der Herstellung von Darjeeling-Schwarztee zu Theaflavinen oxidiert. Andererseits wurden 70 % von Epicatechingallat der Tee-Extrakte der grünen Darjeelings in den entsprechenden schwarzen detektiert. Aufgrund des CTC-Verfahrens bei dem schwarzen Assam wurden Epigallocatechin und Epicatechin vollständig zu Theaflavinen oxidiert, ~80 % von Catechin im grünen Tee-Extrakt des Assams wurden in dem entsprechendem schwarzen nachgewiesen. Dennoch hatte der schwarze Assam vergleichbare Gesamtphenolgehalte und antioxidative Aktivität wie der grüne Assam und der grüne Darjeeling. Dies ist auf die durch die Fermentation entstandenen Theaflavine zurückzuführen, die ebenfalls antioxidative Wirksamkeit besitzen. Gallussäure wurde in allen grünen und schwarzen Tee-Extrakten nachgewiesen. Der schwarze Assam enthielt die höchsten Gehalte an Gallussäure verglichen mit den anderen Tee-Extrakten. Gallussäure reagiert ebenso wie die Theaflavine in dem TEAC-Test und in dem Test zur Bestimmung der Gesamtphenole. Beim Aufbrühen mit siedendem Wasser wurden mehr Catechine detektiert. Die Gesamtgehalte der Catechine der grünen Darjeelings und des grünen Assams lagen niedriger als die Gesamtgehalte der Catechine der grünen Tees Ceylon Pekoe, China Gunpowder, China Chun Mee und Japan Bancha (s. 4.1.2 bzw. 4.1.3).

Die Spannbreite an Gehalten der Catechine in grünem Tee liegt laut ENGELHARDT [1999] zwischen 5 - 20 % und im schwarzen Tee bei 1 - 10 %. Catechine werden sowohl im grünem als auch in schwarzem Tee nachgewiesen, sie liegen im Durchschnitt in höheren Konzentrationen in grünem Tee vor [KUHR 1993].

4.1.5 Tee aus einer Rohware - Grün-, Oolong- und Schwarztee

Zur Untersuchung des Einflusses des Herstellungsverfahren von Grün, Oolong- und Schwarztee auf die Parameter Gesamtphenolgehalt, antioxidative Aktivität, mit dem TEAC I- und FRAP-Test ermittelt, und Gehalte an Gallussäure und Catechinen standen folgende Teesorten aus zwei verschiedenen Provenienzen zur Verfügung.

- Bio Darjeeling Grün Blatt (GT)
- Bio Darjeeling Oolong (OT)
- Bio Darjeeling Schwarz Blatt first flush (ST ff)
- Bio Darjeeling Schwarz Blatt second flush (ST sf)

- China Grün Chun Mee (GT)
- China Oolong Nr. 1 (OT Nr. 1)
- China Oolong Nr. 2 (OT Nr. 2)
- China Schwarz Blatt Nr. 1 (ST Nr. 1)
- China Schwarz Blatt Nr. 2 (ST Nr. 2)

Die folgende Tabelle zeigt die Gesamtphenolgehalte, TEAC-Werte und FRAP-Werte der Darjeelings-Tee-Extrakte beim Aufbrühen mit siedendem Wasser.

Tabelle 4.10: Gesamtphenolgehalte (GAE) [mg/l], TEAC-Werte [mmol/l] und FRAP-Werte [µmol/l Fe^{2+}] ($\bar{x}$ ± s) der Darjeeling-Tee-Extrakte beim Aufbrühen mit siedendem Wasser

	Darjeeling			
	GT	**OT**	**ST ff**	**ST sf**
GAE [mg/l]	464 ± 51	287 ± 39	276 ± 25	508 ± 12
TEAC [mmol/l]	3,35 ± 0,26	1,18 ± 0,18	1,60 ± 0,21	3,20 ± 0,00
FRAP [µmol/l Fe^{2+}]	17515 ± 2267	10391 ± 768	13467 ± 183	18526 ± 728

Grüntee und Schwarztee second flush hatten vergleichbare Gesamtphenolgehalte, TEAC-Werte und FRAP-Werte. Der Oolong-Tee-Extrakt hatte den niedrigsten TEAC- und FRAP-Wert. Die Korrelation zwischen Gesamtphenolgehalten und TEAC-Werten lag bei r = 0,9598, zwischen Gesamtphenolgehalten und FRAP-Werten bei r = 0,9279 und zwischen TEAC- und FRAP-Werten bei r = 0,9691. Die guten Korrelationen zeigen den Beitrag der phenolischen Verbindungen an der antioxidativen Aktivität. Tabelle 4.11 zeigt die Gesamtphenolgehalte, TEAC-Werte und FRAP-Werte der Tee-Extrakte aus China beim Aufbrühen mit siedendem Wasser.

Tabelle 4.11: Gesamtphenolgehalte (GAE) [mg/l], TEAC-Werte [mmol/l] und FRAP-Werte [µmol/l Fe^{2+}] ($\bar{x}$ ± s) der Tee-Extrakte aus China beim Aufbrühen mit siedendem Wasser

	China				
	GT	**OT Nr. 1**	**OT Nr. 2**	**ST Nr. 1**	**ST Nr. 2**
GAE [mg/l]	510 ± 9	101 ± 10	71 ± 0	188 ± 15	308 ± 14
TEAC [mmol/l]	3,74 ± 0,01	0,44 ± 0,03	0,45 ± 0,03	1,69 ± 0,00	1,01 ± 0,09
FRAP [µmol/l Fe^{2+}]	17827 ± 1737	6960 ± 154	6210 ± 53	11667 ± 349	12391 ± 1537

Der grüne Tee-Extrakt hatte die höchsten Gesamtphenolgehalte, TEAC- und FRAP-Werte verglichen mit den anderen Tee-Extrakten. Die beiden Oolong-Tee-Extrakte zeichneten sich durch niedrige Gesamtphenolgehalte, TEAC-Werte und FRAP-Werte aus. Die Korrelation zwischen Gesamtphenolgehalten und TEAC-Werten lag bei r = 0,9036, zwischen Gesamtphenolgehalten und FRAP-Werten bei r = 0,9745 und zwischen TEAC- und FRAP-Werten bei r = 0,9337. Die folgende Tabelle zeigt die flüssigchromatographisch ermittelten Gehalte an Gallussäure und Catechinen der Darjeeling-Tee-Extrakte beim Aufbrühen mit siedendem Wasser.

Tabelle 4.12: Gehalte der Gallussäure und der Catechine [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) in dem grünen, dem Oolong- und den schwarzen Darjeeling-Tee-Extrakten beim Aufbrühen mit siedendem Wasser

	Darjeeling			
c [µmol/l]	**GT**	**OT**	**ST ff**	**ST sf**
GS	46,23 ± 8,64	102,27 ± 41,52	93,16 ± 5,71	115,07 ± 22,29
EGC	129,92 ± 15,70	41,52 ± 9,93	96,63 ± 4,67	101,51 ± 2,97
C	53,29 ± 11,64	14,99 ± 0,11	49,26 ± 4,93	25,28 ± 0,00
EGCG	150,60 ± 24,05	66,56 ± 12,94	25,69 ± 6,51	22,37 ± 3,12
EC	84,49 ± 8,63	41,93 ± 1,20	46,61 ± 2,03	55,64 ± 3,13
ECG	71,49 ± 1,76	51,79 ± 1,96	35,17 ± 1,30	75,93 ± 1,98

Der grüne und der Oolong-Tee-Extrakt und die schwarzen Tee-Extrakte unterschieden sich in ihren Gehalten an Gallussäure und Catechinen. Epigallocatechingallat und Epigallocatechin waren die Hauptcatechine in Grüntee. Gallussäure war nur in geringen Mengen in dem grünen Tee-Extrakt enthalten verglichen mit dem Oolong- und den schwarzen Tee-Extrakten. Der Oolong-Tee enthielt die geringsten Mengen an Catechinen aber vergleichbare Gallussäuregehalte wie die beiden schwarzen Tee-Extrakte. Abbildung 4.7 zeigt die relativen Veränderungen [%] der Gallussäure und Catechine in Oolong-Tee und Schwarztee first flush und second flush bezogen auf den Grüntee von Darjeeling.

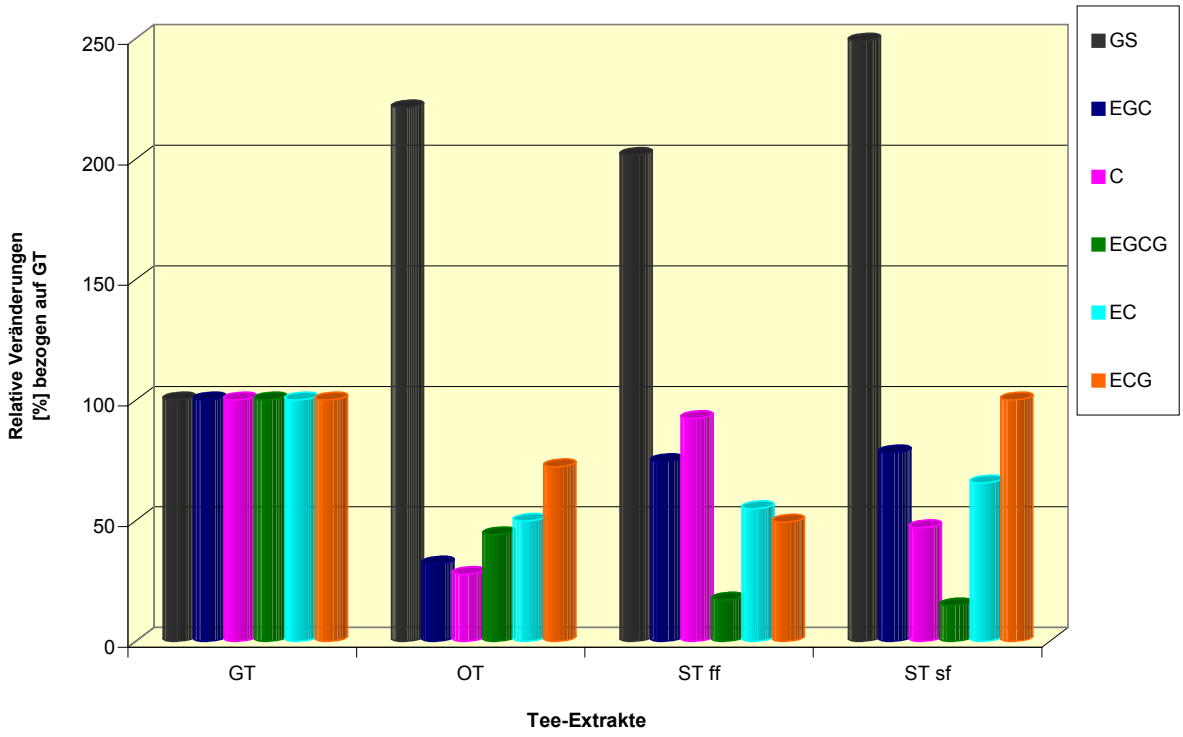


Abbildung 4.7: Relative Veränderungen [%] der Gallussäure und der Catechine in Oolong-Tee (OT) und Schwarztee first flush (ST ff) und second flush (ST sf) bezogen auf den Grüntee (GT) von Darjeeling

Die Gehalte an Gallussäure nahmen in Folge der Fermentation aufgrund des Abbaus der Gallatgruppen der Catechine im Oolong-Tee und in beiden Schwarztees zu. Etwa 45 % der Catechine des Grüntees wurden im Oolong-Tee nachgewiesen und in den beiden Schwarztees wurden ungefähr 60 % der Catechine des Grüntees flüssigchromatographisch nachgewiesen. Alle fünf Catechine waren in dem Oolong-Tee und in beiden Schwarztees zu bestimmen. Der Schwarztee second flush enthielt vergleichbare Konzentrationen an Epicatechingallat wie der Grüntee. Epigallocatechingallat wurde durch die Fermentation zu den Schwarztees am stärksten oxidiert, demgegenüber wurden 70 % von Epigallocatechin des grünen Tee-Extrakts in den Schwarztees nachgewiesen. Das Aufbrühen mit auf 80 °C abgekühltem destilliertem Wasser bewirkte eine verringerte Extraktion der phenolischen Verbindungen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4.13 zeigt die Gehalte an Gallussäure und Catechinen in dem grünen, den Oolong- und den schwarzen Tee-Extrakten aus China beim Aufbrühen mit siedendem Wasser.

Tabelle 4.13: Gehalte der Gallussäure und der Catechine [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) in dem grünen, den Oolong- und den schwarzen Tee-Extrakten aus China beim Aufbrühen mit siedendem Wasser

	China									
c [µmol/l]	**GT**		**OT Nr. 1**		**OT Nr. 2**		**ST Nr. 1**		**ST Nr. 2**	
GS	57,99 ±	11,31	13,15 ±	1,27	10,05 ±	1,14	106,15 ±	27,63	133,55 ±	20,07
EGC	243,41 ±	3,82	13,04 ±	2,49	65,09 ±	6,03	64,13 ±	4,67	64,55 ±	6,07
C	30,14 ±	3,79	4,93±	0,90	22,84 ±	5,82	30,90 ±	2,69	31,35 ±	3,13
EGCG	333,11 ±	2,55	16,93 ±	0,51	20,88 ±	0,67	20,66 ±	0,26	22,00 ±	1,31
EC	111,50 ±	2,90	24,71 ±	0,08	79,00 ±	16,14	n. n.		81,95 ±	3,13
ECG	72,29 ±	3,65	8,64 ±	0,17	27,74 ±	0,33	8,49 ±	1,70	6,71 ±	0,55

Die grünen, Oolong- und schwarzen Tee-Extrakte unterschieden sich in ihren Gehalten an Gallussäure und Catechinen. Der Gehalt an Gallussäure war in den beiden Schwarztees höher als in den beiden Oolong-Tees und in dem Grüntee aufgrund des Abbaus der Gallatgruppen der Catechine im Verlauf der Fermentation. Die Oolong-Tees enthielten niedrigere Mengen an Gallussäure als der Grüntee. Die Hauptcatechine im Grüntee waren Epigallocatechin, Epigallocatechingallat und Epicatechin. In dem Schwarztee Nr. 1 konnte Epicatechin nicht mehr nachgewiesen werden. Die folgende Abbildung zeigt die relativen Veränderungen von Gallussäure und Catechinen in den Oolong-Tees und den Schwarztees bezogen auf den Grüntee.

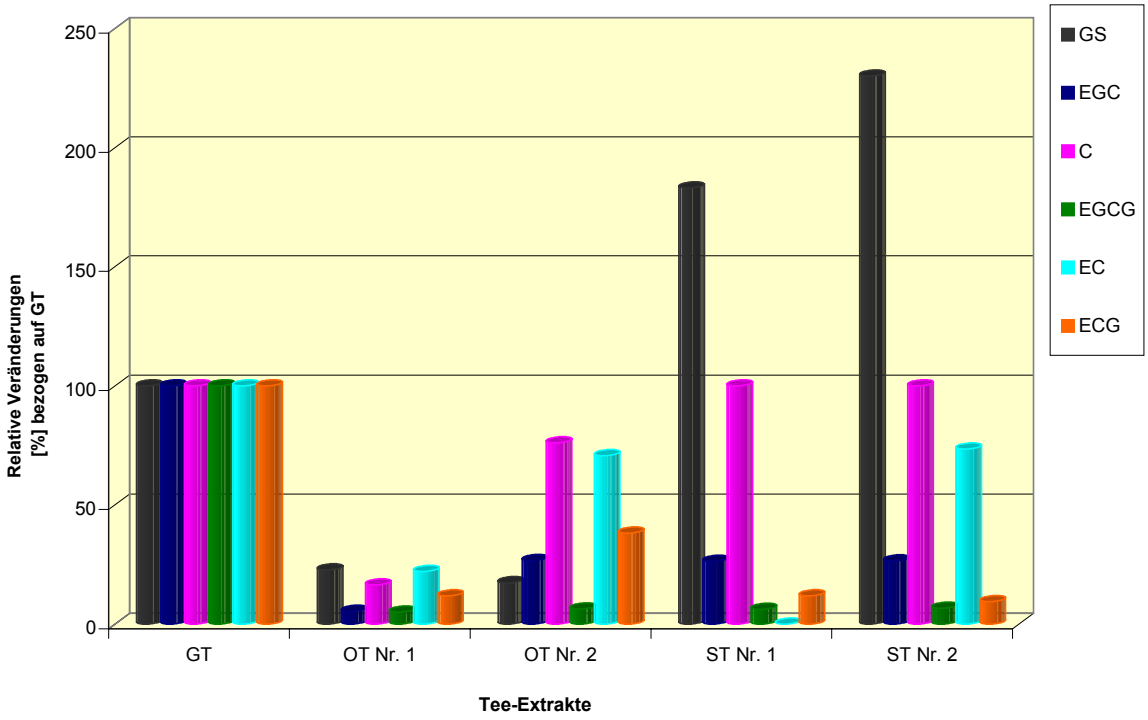


Abbildung 4.8: Relative Veränderungen [%] der Gallussäure und der Catechine in Oolong-Tee Nr. 1 (OT Nr. 1) und Nr. 2 (OT Nr. 2) und Schwarztee Nr. 1 (ST Nr. 1) und Nr. 2 (ST Nr. 2) bezogen auf den Grüntee (GT) aus China

Nur 12 % der Catechine wurden in dem Oolong-Tee Nr. 1 nachgewiesen. 28,8 % der Catechine wurden in dem Schwarztee Nr. 1 quantitativ bestimmt. In dem Oolong-Tee Nr. 2 und in dem Schwarztee Nr. 2 wurden cirka 44 % der Catechine nachgewiesen. Dennoch zeigte der Schwarztee Nr. 2 deutlich höhere Gesamtphenolgehalte, TEAC-Werte und FRAP-Werte verglichen mit dem Oolong-Tee Nr. 2 (s. Tabelle 4.11), was auf die durch die vollständige Fermentation zu Schwarztee entstandenen Theaflavine zurückzuführen ist. Das Aufbrühen mit auf 80 °C abgekühltem Wasser bewirkte eine schwächere Extraktion der phenolischen Verbindungen (Daten nicht gezeigt).

Wie bereits im Kapitel 4.1.3 für 4 grüne Teesorten dargestellt, wurde in den hier analysierten grünen, Oolong- und schwarzen Tee-Extrakten der Anteil der einzelnen Catechine am antioxidativen Potenzial der Tee-Extrakte berechnet.

Tabelle 4.14 zeigt die mit Hilfe der Kalibriergeraden der Catechine im TEAC I-Test (s. Abbildung 4.4) ermittelten TEAC-Werte der einzelnen Catechine und den prozentualen Anteil der Catechine an dem antioxidativen Potenzial der Tee-Extrakte.

Tabelle 4.14: TEAC-Werte [mmol/l] der Catechine in den grünen, Oolong- und schwarzen Tee-Extrakten (Darjeeling und China) und prozentualer Anteil an dem antioxidativen Potenzial der Tee-Extrakte

	TEAC-Wert [mmol/l], *prozentualer Anteil [%]* und kalkulierter Gesamt-TEAC-Wert (= Summe)										
	Darjeeling										
	EGC		**C**		**EGCG**		**EC**		**ECG**		**Summe**
GT	0,41	*31,9*	0,11	*8,8*	0,25	*19,8*	0,18	*13,9*	0,33	*25,6*	1,28
OT	0,11	*18,7*	0,04	*7,0*	0,11	*18,6*	0,08	*13,5*	0,24	*42,3*	0,57
ST ff	0,29	*42,7*	0,11	*15,3*	0,03	*4,9*	0,09	*12,7*	0,17	*24,3*	0,69
ST sf	0,31	*36,4*	0,06	*7,0*	0,03	*3,3*	0,11	*12,8*	0,35	*40,6*	0,85
	China										
	EGC		**C**		**EGCG**		**EC**		**ECG**		**Summe**
GT	0,79	*39,5*	0,07	*3,4*	0,57	*28,6*	0,24	*12,0*	0,33	*16,5*	2,01
OT Nr. 1	0,01	*7,0*	0,02	*15,1*	0,02	*13,6*	0,04	*26,7*	0,05	*37,5*	0,33
OT Nr. 2	0,19	*33,0*	0,05	*9,7*	0,03	*4,5*	0,16	*29,0*	0,14	*23,8*	0,50
ST Nr. 1	0,18	*55,8*	0,07	*21,4*	0,03	*7,6*		n.n.	0,05	*15,7*	0,13
ST Nr. 2	0,18	*72,7*	0,07	*14,3*	0,03	*5,5*	0,17	*34,5*	0,04	*8,5*	0,57

Der Anteil von Epigallocatechin an der antioxidativen Aktivität lag in den zwei grünen Teeproben bei ~35,7 %, bei den vier grünen Tee-Extrakten (s. 4.1.3) belief er sich auf ~47 %. Demgegenüber zeigten Epigallocatechingallat (~24,2 %) und Epicatechingallat (~21,1 %) einen höheren Anteil an dem protektiven Potenzial in diesen grünen Teeproben als in den vorher erläuterten. Der Beitrag von Catechin lag für alle grünen Tee-Extrakte in einem vergleichbaren Rahmen. Epicatechin trug mit ~13,0 % zu der antioxidativen Aktivität bei. Der

Anteil der Catechine an dem protektiven Potenzial von Oolong- und schwarzen Tee-Extrakten variierte in Abhängigkeit von der Sorte, der Qualitätsstufe und der Provenienz. Der Anteil von Epigallocatechin lag bei den genannten Teeproben am höchsten, teilweise vergleichbar zu den 4 grünen Teeproben. Der Beitrag von Epigallocatechingallat war in den Oolong- und schwarzen Teeproben im Vergleich zu den entsprechenden grünen Tees niedriger.

Analog zu den Catechinkonzentrationen der grünen, Oolong- und schwarzen Tee-Extrakte (s. Tabelle 4.12 und 4.13) wurden Catechinmischungen hergestellt und deren antioxidative Aktivität in dem TEAC I-Test ermittelt. Dadurch war die Gegenüberstellung der analysierten TEAC-Werte der Catechinmischungen und der kalkulierten TEAC-Werte der Catechine (s. Tabelle 4.14) durchführbar. Die errechneten Summen der TEAC-Werte der Catechine für diese Tee-Extrakte und die TEAC-Werte der gemessenen Catechinmischungen werden in Tabelle 4.15 mit den TEAC-Werten der Tee-Extrakte verglichen.

Tabelle 4.15: Kalkulierte TEAC-Werte [mmol/l] der Catechine für die grünen, Oolong- und schwarzen Tee-Extrakte (Darjeeling und China), gemessene TEAC-Werte [mmol/l] der Catechinmischungen und der Tee-Extrakte

TEAC-Wert [mmol/l]					
	Darjeeling				
	GT	**OT**	**ST ff**	**ST sf**	
Kalkuliert	1,28	0,57	0,69	0,85	
Catechinmischung	0,99	0,34	0,39	0,33	
Tee-Extrakt	3,35	1,18	1,60	3,20	
	China				
	GT	**OT Nr. 1**	**OT Nr. 2**	**ST Nr. 1**	**ST Nr. 2**
Kalkuliert	2,01	0,33	0,50	0,13	0,57
Catechinmischung	1,50	0,11	0,32	0,12	0,57
Tee-Extrakt	3,74	0,45	0,45	1,01	1,69

Die TEAC-Werte der grünen, des Darjeeling-Oolong- und der schwarzen Tee-Extrakte waren höher als die TEAC-Werte der Catechinmischungen und die kalkulierten TEAC-Werte. Ausnahmen bildeten die Oolong-Tee-Extrakte aus China, deren antioxidative Aktivitäten hauptsächlich auf die Catechine zurückzuführen sind, da die kalkulierten und die TEAC-Werte des Tee-Extrakts vergleichbar waren. Der Anteil der Catechine an dem protektiven Potenzial betrug bei den grünen Tees ~46 %.

Der verbleibende Teil der antioxidativen Aktivität könnte auf lipidlösliche nicht-polyphenolische Fraktionen des grünen Tees zurückgeführt werden, die ebenfalls antioxidative Wirksamkeit aufweisen [HIGASHI-OKAI et al. 2000, OKAI und HIGASHI-OKAI 1997]. Die kalkulierten TEAC-Werte und die analysierten TEAC-Werte der Mischungen lagen in

einem vergleichbaren Bereich, was bereits von RECORD und LANE [2001] beschrieben wurde. Die Autoren zeigten ebenfalls höhere antioxidative Aktivität von grünen und schwarzen Tee-Extrakten verglichen mit der kalkulierten antioxidativen Aktivität von Polyphenolmischungen.

Der Beitrag der Catechine an dem antioxidativen Potenzial des Darjeeling-Oolong-Tees liegt bei ungefähr der Hälfte der antioxidativen Aktivität. Die andere Hälfte der antioxidativen Aktivität ist auf die durch die Fermentation entstandenen Kondensationsprodukte zurückzuführen, die auch antioxidative Wirksamkeit zeigen. Hingegen liegt der Anteil der Catechine an dem protektiven Potenzial der schwarzen Tee-Extrakte (Darjeeling und China) bei ~32 %. Der restliche Teil der antioxidativen Aktivität ist auf die durch die Fermentation entstandenen Theaflavine zurückzuführen, die ebenfalls antioxidative Wirksamkeit zeigen [LEUNG et al. 2001a].

Die hier vorgestellten Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den bisher vorgestellten Ergebnissen (vgl. 4.1.3), bei denen die TEAC-Werte der Catechinmischungen und die kalkulierten TEAC-Werte höher waren als die TEAC-Werte der Tee-Extrakte. In der Literatur wurden bisher beide Varianten publiziert. FRANKEL et al. [1997] beschrieben höhere antioxidative Aktivität von Catechinmischungen als von grünen Tee-Extrakten im Lipidsystem, demgegenüber zeigten RECORD und LANE [2001] stärkeres protektives Potenzial von grünen und schwarzen Tee-Extrakten verglichen mit kalkulierten Polyphenolmischungen.

4.2 In vitro-Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden in der Versuchsreihe I zuerst Standardsubstanzen (Catechin und Eisen(II)- bzw. Eisen(III)-chlorid) verwendet, um in einem einfachen Modell die Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen in vitro zu prüfen. In der Versuchsreihe II wurde anstelle des Catechins Tee-Extrakt eingesetzt, um die Wirkungen verschiedener Teecatechine hinsichtlich der Fähigkeit, Eisen zu binden, zu testen. Die Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen wurden in der Versuchsreihe III anhand von Tee-Extrakt und einem Lebensmittel (Rezepturen s. Arbeitsvorschriften 8.3) untersucht. In allen Versuchsreihen wurden die Konzentrationen an Eisen und Gesamtphenolen sowie die antioxidative Aktivität photometrisch und die Konzentrationen an Catechin bzw. an Epigallocatechin, Catechin, Epigallocatechingallat, Epicatechin und Epicatechingallat in den Tee-Extrakten flüssigchromatographisch vor und nach der Diffusion analysiert. Bei allen Versuchsansätzen wurde nach der Inkubationszeit ebenfalls Probenmaterial entnommen, um

die Parameter Eisengehalt, Gesamtphenolgehalt, antioxidative Aktivität und Catechingehalt zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Ausgangslösung und der inkubierten Lösung ($p > 0,05$). Deswegen wurde in der Ergebnisdarstellung auf die Werte von Eisengehalt, Gesamtphenolgehalt, antioxidative Aktivität und Gehalte der Catechine der inkubierten Lösungen verzichtet.

4.2.1 Ergebnisse zu Versuchsreihe I

Für die Ansätze dieser Versuchsreihe wurden Standardsubstanzen verwendet, um zunächst ein relativ einfaches Modellsystem zu prüfen. Die Ansätze enthielten Phosphatpuffer (pH 7,4), Catechin und Eisensalze ($FeCl_2$ bzw. $FeCl_3$), welche in verschiedenen molaren Verhältnissen eingesetzt wurden.

Der erste Ansatz bestand aus 50 ml Phosphatpuffer, in denen 50 mg Catechin und 10 mg Eisen(II)-chlorid gelöst wurden. Das molare Verhältnis von Catechin zu Eisen betrug 3,4 : 1 in diesem Ansatz. Nach der Zugabe des Eisensalzes zu dem farblosen Gemisch aus Phosphatpuffer und Catechin färbte sich die Lösung blau-schwarz. Dieser Ansatz wurde eine Stunde unter Rühren im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, anschließend erfolgte die Dialyse. In der Ausgangslösung und in dem Eluat wurden photometrisch der Eisengehalt, die antioxidative Aktivität mit dem TEAC I-Test, der Gesamtphenolgehalt sowie flüssigchromatographisch die Catechinkonzentration quantifiziert. Tabelle 4.16 zeigt diese Parameter vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Catechin und zweiwertigem Eisen in einem molaren Verhältnis von 3,4 : 1.

Tabelle 4.16: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte (GAE) [mmol/l], TEAC-Werte [mmol/l] und Gehalt an Catechin [mmol/l] ($\bar{x} \pm s$) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Catechin und Fe(II) in einem molaren Verhältnis von 3,4 : 1 (n = 5)

	Fe(II) [mmol/l]		**GAE [mmol/l]**		**TEAC [mmol/l]**		**Catechin [mmol/l]**	
Vor Diffusion	2,53 ±	0,20 ^{A}	93 ±	11 ^{A}	7,16 ±	0,58 ^{A}	106 ±	2 ^{A}
Nach Diffusion	0,49 ±	0,00 ^{B}	68 ±	3 ^{B}	5,43 ±	0,70 ^{B}	56 ±	17 ^{B}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA

Alle vier untersuchten Parameter wiesen einen signifikanten Abfall ihrer Konzentrationen im Verlauf der Diffusion auf. Bereits nach Zugabe von Eisen zu der Catechin-Pufferlösung veränderte sich das ursprüngliche Verhältnis von Catechin zu Eisen auf 40 zu 1. Die blau-schwarze Farbe spricht für die direkte Bildung der Eisen-Catechinkomplexe. Im Eluat lag ein

molares Verhältnis von Catechin zu Eisen von 110 : 1. Nur 19,4 % des Eisens und 52,9 % des Catechins der Ausgangslösung wurden im Eluat nachgewiesen. Der signifikante Abfall der Eisengehalte, Gesamtphenolgehalte, antioxidativen Aktivität und der Catechinkonzentration beruhte auf der Komplexbildung zwischen den Eisenionen und Catechin.

Der Ansatz mit Catechin und dreiwertigem Eisen in einem molaren Verhältnis von 4 : 1 zeigte ähnliche Ergebnisse. Nach Zugabe des Eisen(III)-chlorids zu der Catechin-Pufferlösung trat die blau-schwarze Färbung ein. Die folgende Tabelle zeigt die untersuchten Parameter vor und nach der Diffusion.

Tabelle 4.17: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte (GAE) [mmol/l], TEAC-Werte [mmol/l] und Gehalt an Catechin [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Catechin und Fe(III) in einem molaren Verhältnis von 4 : 1 (n = 5)

	Fe(III) [mmol/l]	GAE [mmol/l]	TEAC [mmol/l]	Catechin [mmol/l]
Vor Diffusion	1,70 ± 0,05 ^{A}	99 ± 4 ^{A}	7,23 ± 0,47 ^{A}	106 ± 2 ^{A}
Nach Diffusion	0,36 ± 0,02 ^{B}	76 ± 9 ^{B}	5,72 ± 0,61 ^{B}	77 ± 6 ^{B}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA

Die vier analysierten Parameter fielen signifikant nach der Diffusion ab verglichen mit den Werten vor der Diffusion. Das zu Beginn eingesetzte molare Verhältnis veränderte sich bereits beim Zusammenmischen von Catechin und dreiwertigem Eisen (C : $FeCl_3$ = 63 : 1), was durch die sofortige Ausbildung der blau-schwarzen Farbe sichtbar wurde. 21,2 % des eingesetzten Eisen wurden im Eluat nachgewiesen, 72,4 % des Catechins wurden im Eluat quantifiziert.

4.2.2 Ergebnisse zu Versuchsreihe II

In diesem Teil der experimentellen Arbeit wurden die Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisensalzen ($FeCl_2$ und $FeCl_3$) geprüft. Dazu wurden zwei Grüntees, China Gunpowder und Ceylon Pekoe, aufgebrüht (s. 3.1.1). Die einzelnen Ansätze setzten sich aus 50 ml Tee-Extrakt und 5 mg des Eisensalzes $FeCl_2$ oder $FeCl_3$ zusammen. Dieses Gemisch wurde eine Stunde unter Rühren im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, anschließend erfolgte die Dialyse. In der Ausgangslösung sowie im Eluat wurden der Eisengehalt, die antioxidative Aktivität mit dem TEAC I-Test und der Gesamtphenolgehalt (GAE) bestimmt. Außerdem wurden die Teecatechine Epigallocatechin, Catechin, Epigallocatechingallat, Epicatechin und Epicatechingallat in der Ausgangslösung und dem Eluat flüssigchromatographisch quantifi-

ziert. Die bereits beschriebene blau-schwarze Färbung der Lösung der Versuchsreihe I trat ebenfalls bei diesen Ansätzen auf.

4.2.2.1 Ergebnisse mit China Gunpowder

Zunächst wurden die Wechselwirkungen zwischen China Gunpowder-Tee-Extrakt und Eisen(II)- und Eisen(III)-chlorid geprüft. Tabelle 4.18 zeigt Eisen- und Gesamtphenolgehalte sowie antioxidative Aktivität vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus China Gunpowder-Tee-Extrakt und 5 mg Eisen(II)-chlorid.

Tabelle 4.18: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte [mmol/l] und TEAC-Werte [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus China Gunpowder-Tee-Extrakt und Eisen(II)-chlorid (n = 5)

	Fe(II) [mmol/l]	GAE [mmol/l]	TEAC [mmol/l]
Vor Diffusion	0,79 ± 0,22 ^{A}	73 ± 9 ^{A}	5,38 ± 0,61 ^{A}
Nach Diffusion	0,05 ± 0,07 ^{B}	55 ± 10 ^{B}	4,65 ± 0,69 ^{A}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA

Deutlich erkennbar war der signifikante Abfall der Eisen(II)-konzentration von 100 % im Dialysat auf 7 % im Eluat. Die Veränderung des Gesamtphenolgehaltes war ebenfalls signifikant. Demgegenüber zeigte die antioxidative Aktivität keine signifikante Veränderung vor und nach der Diffusion aufgrund der relativ hohen Standardabweichung. Tabelle 4.19 zeigt die dazugehörigen Konzentrationen der Flavanole in dem Ansatz von China Gunpowder-Tee-Extrakt und 5 mg Eisen(II)-chlorid vor und nach der Diffusion.

Tabelle 4.19: Konzentrationen der Catechine [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus China Gunpowder-Tee-Extrakt und Eisen(II)-chlorid (n = 5)

	EGC	C	EGCG	EC	ECG
Vor Diffusion	0,93 ± 0,14 ^{A}	n. n.	0,55 ± 0,19 ^{A}	1,37 ± 0,12 ^{A}	0,15 ± 0,03 ^{A}
Nach Diffusion	0,82 ± 0,10 ^{A}	n. n.	0,33 ± 0,14 ^{B}	1,17 ± 0,17 ^{A}	0,10 ± 0,03 ^{B}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA

Catechin wurde weder in der Ausgangslösung noch im Eluat nachgewiesen. Die Konzentrationen der Catechine Epigallocatechin, Epigallocatechingallat, Epicatechin und Epicatechingallat nahmen nach der Diffusion ab. Die Konzentrationen von Epicatechingallat und Epigallocatechingallat waren im Eluat signifikant niedriger als in der Ausgangslösung. 67 % Epicatechingallat und 60 % Epigallocatechingallat der Ausgangslösung wurden in dem Eluat nach der Diffusion nachgewiesen. Die Abnahme der verschiedenen Parameter lässt auf Wechselwirkungen zwischen den Teepolyphenolen und Eisen schließen. Die Gallatgruppen von Epi-

catechingallat und Epigallocatechingallat binden Eisen, und diese Komplexe passieren aufgrund ihrer Größe die Membran nicht. Der entsprechende Ansatz bestehend aus China Gunpowder-Tee-Extrakt und Eisen(III)-chlorid zeigte nur für die Eisenkonzentration und für Epicatechingallat im Eluat signifikant niedrigere Werte verglichen mit denen vor der Diffusion (Daten nicht gezeigt).

4.2.2.2 Ergebnisse mit Ceylon Pekoe

In diesen Ansätzen wurden die Wechselwirkungen zwischen Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und Eisen(II)- und Eisen(III)-chlorid getestet. Die folgende Tabelle veranschaulicht die Veränderungen der Eisen(III)- und Gesamtphenolgehalte sowie der antioxidativen Aktivität eines Gemisches aus Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und 5 mg Fe(III)-chlorid nach dem Diffusionsprozess gegenüber den Werten vor der Diffusion.

Tabelle 4.20: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte [mmol/l] und TEAC-Werte [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und Eisen(III)-chlorid (n = 5)

	Fe(III) [mmol/l]	GAE [mmol/l]	TEAC [mmol/l]
Vor Diffusion	0,60 ± 0,05 ^{A}	107 ± 9 ^{A}	6,82 ± 2,43 ^{A}
Nach Diffusion	0,06 ± 0,08 ^{B}	90 ± 7 ^{B}	6,27 ± 2,34 ^{A}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA

Die Gesamtphenolgehalte und die Eisenkonzentrationen waren im Eluat signifikant niedriger als in der Ausgangslösung. Der Gehalt an Eisen fiel von 100 % in der Ausgangslösung auf 10 % in dem Eluat. Die antioxidative Aktivität zeigte keine signifikante Veränderung vor und nach der Diffusion. Tabelle 4.21 stellt die dazugehörigen Konzentrationen der Flavanole in dem Ansatz von Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und 5 mg Eisen(III)-chlorid vor und nach der Diffusion dar.

Tabelle 4.21: Konzentrationen der Catechine [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und Eisen(III)-chlorid (n = 5)

	EGC	C	EGCG	EC	ECG
Vor Diffusion	1,01 ± 0,10 ^{A}	0,29 ± 0,04 ^{A}	1,04 ± 0,08 ^{A}	1,57 ± 0,09 ^{A}	0,26 ± 0,03 ^{A}
Nach Diffusion	0,92 ± 0,08 ^{A}	0,28 ± 0,05 ^{A}	0,74 ± 0,14 ^{B}	1,60 ± 0,14 ^{A}	0,19 ± 0,06 ^{B}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA

Epigallocatechin, Catechin und Epicatechin zeigten keine Veränderungen während des Diffusionsprozesses, doch die Konzentrationen an Epigallocatechingallat und Epicatechingallat waren im Eluat signifikant niedriger verglichen mit der Ausgangslösung. Die Konzentration

an Epigallocatechingallat sank um 30 % und der Gehalt an Epicatechingallat um 25 % gegenüber der Ausgangslösung, da die Gallatgruppen von Epigallocatechingallat und Epicatechingallat Eisen binden.

Der analoge Ansatz zwischen Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und 5 mg Eisen(II)-chlorid zeigte vergleichbare Ergebnisse. Die folgende Tabelle stellt die Konzentrationen an Eisen(II) und die Gesamtphenolgehalte sowie die antioxidative Aktivität eines Gemisches aus Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und 5 mg Fe(II)-chlorid vor und nach der Diffusion dar.

Tabelle 4.22: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte [mmol/l] und TEAC-Werte [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und Eisen(II)-chlorid (n = 5)

	Fe(II) [mmol/l]		GAE [mmol/l]		TEAC [mmol/l]	
Vor Diffusion	0,81 ±	0,14 ^{A}	97 ±	7 ^{A}	6,66 ±	1,96 ^{A}
Nach Diffusion	0,17 ±	0,02 ^{B}	76 ±	7 ^{B}	6,10 ±	2,01 ^{A}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA

Nach der Diffusion wurde 20 % des eingesetzten Eisens nachgewiesen. Die Gesamtphenole zeigten nach der Diffusion signifikante Veränderungen verglichen mit denen vor der Diffusion. Die antioxidative Aktivität lag bei beiden Messpunkten in einem vergleichbaren Bereich. Tabelle 4.23 zeigt die dazugehörigen Konzentrationen der Flavanole in dem Ansatz von Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und 5 mg Eisen(II)-chlorid vor und nach der Diffusion.

Tabelle 4.23: Konzentrationen der Catechine [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und Eisen(II)-chlorid (n = 5)

	EGC		C		EGCG		EC		ECG	
Vor Diffusion	0,90 ±	0,09 ^{A}	0,23 ±	0,04 ^{A}	0,90 ±	0,02 ^{A}	1,47 ±	0,07 ^{A}	0,24 ±	0,02 ^{A}
Nach Diffusion	0,83 ±	0,05 ^{A}	0,22 ±	0,05 ^{A}	0,74 ±	0,01 ^{B}	1,46 ±	0,10 ^{A}	0,18 ±	0,02 ^{B}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA

Wie bereits bei dem Ansatz zwischen Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt und Eisen(III)-chlorid beschrieben, sanken die Konzentrationen von Epigallochatechingallat und Epicatechingallat nach der Diffusion signifikant verglichen mit den Ausgangswerten.

4.2.3 Ergebnisse zu Versuchsreihe III

In der Versuchsreihe III wurden die Wechselwirkungen zwischen den Teepolyphenolen und einem Lebensmittel geprüft. Als Lebensmittel dienten zwei verschiedene Säuglingsnahrungen (Rezepturen s. Arbeitsvorschriften 8.3), die mit dem Tee-Extrakt von Ceylon Pekoe versetzt und wie die Proben der Versuchsreihen I und II behandelt wurden. Ein Ansatz enthielt 50 ml

Tee-Extrakt und 6,75 g Pre-Säuglingsnahrung bzw. 6,25 g Milchbrei[10]. Die Diffusion dieser Proben dauerte jeweils 2 - 3 h aufgrund der viskosen Konsistenz. Säuglingsnahrungen wurden aufgrund ihrer relativ guten Löslichkeit als Lebensmittel gewählt, da diese für den Versuchsansatz unabdingbar war. Diese Säuglingsnahrungen besitzen zusätzlich einen definierten Eisengehalt.

4.2.3.1 Ansätze mit Pre-Säuglingsnahrung und Ceylon Pekoe

Die für diese Untersuchung eingesetzte Pre-Säuglingsnahrung eignet sich als Nahrung für den Säugling direkt nach der Geburt. Aufgrund der Trübung wurden alle Proben außer dem Eluat vor der Analyse mit Wasser verdünnt, zentrifugiert und filtriert. Die bei Versuchsreihe I und II beschriebene blau-schwarze Färbung der Ansätze trat in dieser Versuchsreihe nicht auf. Tabelle 4.24 zeigt die Eisengehalte, Gesamtphenolgehalte sowie die antioxidative Aktivität vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Pre-Säuglingsnahrung und Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt.

Tabelle 4.24: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte (GAE) [mmol/l] und TEAC-Werte [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Pre-Säuglingsnahrung und Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt (n = 5)

	∑ Fe(II+III) [mmol/l]		GAE [mmol/l]		TEAC [mmol/l]	
Vor Diffusion	0,27 ±	0,19 ^{A}	4,53 ±	0,55 ^{A}	3,41 ±	0,26 ^{A}
Nach Diffusion	0,05 ±	0,02 ^{B}	1,33 ±	0,29 ^{B}	1,27 ±	0,20 ^{B}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA

In dieser Versuchsreihe war ebenfalls ein signifikanter Abfall der Eisenkonzentration, des Gesamtphenolgehaltes und der antioxidativen Aktivität nach der Diffusion zu verzeichnen. Tabelle 4.25 präsentiert die dazugehörigen Konzentrationen der Flavanole vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Pre-Säuglingsnahrung und Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt.

Tabelle 4.25: Konzentrationen der Catechine [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Pre-Säuglingsnahrung und Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt (n = 5)

	EGC		C		EGCG		EC		ECG	
Vor Diffusion	0,95 ±	0,12 ^{A}	0,20 ±	0,06 ^{A}	1,04 ±	0,16 ^{A}	1,41 ±	0,08 ^{A}	0,30 ±	0,00 ^{A}
Nach Diffusion	0,18 ±	0,04 ^{B}	0,01 ±	0,01 ^{B}	0,34 ±	0,05 ^{B}	0,02 ±	0,00 ^{B}	0,05 ±	0,01 ^{B}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA

[10] Aufgrund der schlechteren Löslichkeit des Milchbreis wurde weniger eingewogen als bei der Pre-Säuglingsnahrung.

Die Gehalte aller analysierten Catechine wiesen einen signifikanten Abfall auf. Die Reduktion der Catechinkonzentrationen sind nicht nur auf die Komplexbildung mit Eisen zurückzuführen, sondern vermutlich auch auf die Komplexbildung mit den Proteinen [SERAFINI et al. 1996] und mit anderen zweiwertigen Ionen wie z. B. Magnesium und Calcium [ZEYUAN et al. 1998b].

4.2.3.2 Ansätze mit Milchbreipulver und Ceylon Pekoe

Die in diesem Versuch eingesetzte Säuglingsnahrung ist für Säuglinge nach dem 4. Monat als Nahrungszusatz geeignet. Das viskose Probenmaterial wurde ebenfalls vor der Analyse mit Wasser verdünnt, zentrifugiert und filtriert. Die folgende Tabelle zeigt die Eisen- und Gesamtphenolgehalte sowie die antioxidative Aktivität als TEAC-Werte vor und nach dem Diffusionsprozess eines Gemisches aus Milchbrei und Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt.

Tabelle 4.26: Eisengehalte [mmol/l], Gesamtphenolgehalte (GAE) [mmol/l] und TEAC-Werte [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Milchbreipulver und Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt (n = 5)

	∑ Fe(II+III) [mmol/l]		**GAE [mmol/l]**		**TEAC [mmol/l]**	
Vor Diffusion	0,19[11] ±	0,08 ^{A}	3,57 ±	0,81 ^{A}	3,14 ±	0,29 ^{A}
Nach Diffusion	0,07 ±	0,06 ^{B}	1,95 ±	0,11 ^{B}	1,16 ±	0,30 ^{B}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA

Die Konzentrationen der untersuchten Parameter waren im Eluat deutlich reduziert. Der Eisengehalt sowie der Gesamtphenolgehalt und die antioxidative Aktivität wiesen einen signifikanten Abfall nach der Diffusion auf. Tabelle 4.27 stellt die dazugehörigen Konzentrationen der Flavanole vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Milchbrei und Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt dar.

Tabelle 4.27: Konzentrationen der Catechine [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) vor und nach der Diffusion eines Gemisches aus Milchbreipulver und Ceylon Pekoe-Tee-Extrakt (n = 5)

	EGC		**C**		**EGCG**		**EC**		**ECG**	
Vor Diffusion	0,95 ±	0,25 ^{A}	0,20 ±	0,09 ^{A}	1,01 ±	0,23 ^{A}	1,20 ±	0,08 ^{A}	0,20 ±	0,00 ^{A}
Nach Diffusion	0,45 ±	0,14 ^{B}	0,10 ±	0,07 ^{A}	0,69 ±	0,28 ^{A}	0,24 ±	0,00 ^{B}	0,02 ±	0,01 ^{B}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA

Die Catechine im Eluat sanken, wobei signifikante Veränderungen nur bei Epigallocatechin, Epicatechin und Epicatechingallat vorlagen.

[11] Wegen der niedrigeren Einwaage enthält dieser Milchbreiansatz weniger Eisen als der Ansatz mit der Pre-Säuglingsnahrung (s. Tabelle 4.24).

Die signifikanten Reduktionen von Epigallocatechin, Epicatechin und Epicatechingallat sind auf die Komplexbildung mit Eisen zurückzuführen, wobei auch in diesem Ansatz Wechselwirkungen mit den Milchproteinen [SERAFINI et al. 1996] und mit zweiwertigen Ionen möglich sind [ZEYUAN et al. 1998b]. Des weiteren ist die Komplexbildung zwischen den in dem laut Zutatenliste glutenhaltigen Milchbrei enthaltenen Phytaten aus Weizenmehl, Bananenflocken und Hartweizengrieß und Eisen denkbar [DAVIDSSON et al. 2001].

In allen drei Versuchsreihen wurde die Komplexbildung zwischen Eisen und Teepolyphenolen aufgrund der signifikanten Veränderungen der untersuchten Parameter festgestellt. Die Ergebnisse dieser in vitro-Untersuchungen gaben Anlass für die Humanstudie „Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen unter physiologischen Bedingungen“, deren Ergebnisse im folgenden Abschnitt dargestellt werden.

4.3 Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen unter physiologischen Bedingungen

4.3.1 Charakterisierung der Tees

Für diese Studie standen als grüner Tee „China Gunpowder“ und als schwarzer Tee „India Oothu“ zur Verfügung. Der grüne Tee enthielt 512 mg/l Gesamtphenole und der schwarze Tee 467 mg/l Gesamtphenole. Der TEAC-Wert des grünen Tees betrug 3,02 mmol/l und der des schwarzen Tees 2,05 mmol/l.

4.3.2 Analyse des Eisenstatus und des antioxidativen Status

Die Humanstudie sollte in vivo die Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen untersuchen. An der Humanstudie nahmen 34 Probanden teil, 20 Mischköstler und 14 Vegetarier. Die Mischkost ist durch den Konsum aller Lebensmittelgruppen gekennzeichnet. Die Vegetarier ernährten sich nach einer lakto-ovo-vegetabilen Kostform, die durch einen Verzicht auf Fleisch, Wurstwaren und Fisch und Fischwaren gekennzeichnet ist. Eier, Milch- und Milchprodukte waren erlaubt. Zur Beurteilung des Eisenstatus der Probanden und Probandinnen wurden folgende Parameter bestimmt: Hämoglobin (Hb) und Hämatokrit (Hkt) im Vollblut, Ferritin, Transferrin (TF), Freies Eisen und Freie Eisenbindungskapazität (EBK) im Plasma. Tabelle 4.28 zeigt die Referenzbereiche für die genannten Parameter.

Tabelle 4.28: Referenzbereiche der Parameter des Eisenstatus für Frauen (w) und Männer (m) [KRAPF et al. 1995, GREILING und GESSNER 1995, BUDDECKE und FISCHER 1992]

Parameter des Eisenstatus		Referenzbereich
Hämoglobin (Hb) [mmol/l]	w	7,4 - 10,7
	m	8,6 - 12,1
Hämatokrit (Hkt) [%]	w	35,0 - 47,0
	m	40,0 - 52,0
Ferritin [µg/l]	w	10,0 - 260,0
	m	46,0 - 310,0
Transferrin (TF) [g/l]	w/m	2,5 - 4,3
Freies Eisen [µmol/l]	w/m	11,0 - 27,0
Freie Eisenbindungskapazität (EBK) [µmol/l]	w/m	55,0 - 75,0

Zu den Parametern Superoxiddismutase (SOD) und Glutathion sowie zu der antioxidativen Aktivität mit dem FRAP-Test existieren bislang keine Referenzwerte. Eine gute Vitamin C-Versorgung ist bei einer Plasmakonzentration ab 36,8 µmol/l gegeben [HESEKER et al. 1994]. Die Studie war in zwei Teile (je 5 Wochen) untergliedert. Zu Beginn der Studie ernährten sich die Probanden flavonoidarm, v. a. Verzicht auf Flavanole, (Verzicht auf schwarzen und grünen Tee, kakaohaltige Lebensmittel, Kaffee, weiße und rote Trauben, Weiß- und Rotwein, Säfte aller Art), und ab der zweiten Woche konsumierten die Probanden 8 - 10 Tassen (1 Liter/d) grünen oder schwarzen Tee zu den Mahlzeiten (s. Abbildung 3.7).

4.3.2.1 Eisenstatus und antioxidativer Status nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung

Im folgenden wird der Eisenstatus und der antioxidative Status der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach ihrer Kostform, nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten und zweiten Teil der Interventionsstudie dargestellt. Die folgende Tabelle zeigt die ermittelten Parameter des Eisenstatus im Vollblut und Plasma nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten Teil der Interventionsstudie.

Tabelle 4.29: Eisenstatusparameter Hämoglobin (Hb), Hämatokrit (Hkt) im Vollblut, Ferritin, Transferrin (TF), Freies Eisen und Freie Eisenbindungskapazität (EBK) im Plasma ($\bar{x}$, min. - max.) der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten Teil der Interventionsstudie

	Hb [mmol/l]	**Hkt [%]**	**Ferritin [µg/l]**	**TF [g/l]**	**Eisen [µmol/l]**	**EBK [µmol/l]**
Mischköstlerinnen	**8,5** ^{A}	**40,2** ^{A}	**25,3** ^{A}	**2,6** ^{A}	**21,6** ^{A}	**68,3** ^{A}
w (n = 15)	7,7 - 9,5	36,0 - 44,0	3,1 - 76,0	1,3 - 3,8	8,4 - 36,9	5,0 - 97,8
Vegetarierinnen	**8,3** ^{A}	**40,1** ^{A}	**21,6** ^{A}	**2,9** ^{A}	**15,2** ^{A}	**68,5** ^{A}
w (n = 10)	7,1 - 9,1	37,0 - 45,0	4,1 - 80,4	1,4 - 4,1	6,1 - 25,6	45,0 - 101,3
Mischköstler	**9,6** ^{B}	**44,4** ^{B}	**37,5** ^{A}	**3,2** ^{A}	**15,1** ^{A}	**63,0** ^{A}
m (n = 5)	8,9 - 10,3	41,0 - 48,0	13,9 - 64,8	1,9 - 6,3	10,3 - 21,0	54,6 - 75,7
Vegetarier	**9,4** ^{B}	**44,8** ^{B}	**53,3** ^{B}	**2,1** ^{A}	**18,1** ^{A}	**54,0** ^{A}
m (n = 4)	9,1 - 9,7	44,0 - 45,0	10,3 - 99,2	1,5 - 2,8	11,8 - 23,3	46,9 - 56,0

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA und anschließendem LSD-Test

Nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten Teil der Interventionsstudie unterschieden sich die Mischköstlerinnen und die Vegetarierinnen nicht signifikant in Hämoglobin, Hämatokrit, Ferritin, Transferrin, Eisen und Eisenbindungskapazität ($p > 0,05$). Zwischen Männern und Frauen wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Parameter Transferrin, Eisen und Eisenbindungskapazität festgestellt ($p > 0,05$). Die Mischköstler und die Vegetarier hatten demgegenüber signifikant höhere Hämoglobin- und Hämatokritwerte verglichen mit den Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen ($p < 0,05$). Bezüglich der Ferritinwerte zeichneten sich die vegetarisch lebenden Männer durch signifikant höhere Plasmaspiegel verglichen mit den Mischköstlern, Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen aus ($p < 0,05$). Sowohl die Männer als auch die Frauen beider Kostformen lagen mit ihren Hämoglobin-, Hämatokrit-, Eisen- und Eisenbindungskapazitätswerten nach der ersten Woche der Studie im Rahmen der Referenzbereiche. Vier Vegetarierinnen und zwei Mischköstlerinnen hatten bereits Ferritinspiegel im Plasma unter 10 µg/l nach der ersten Woche der Studie. 60 % der Mischköstlerinnen und 70 % der Vegetarierinnen wiesen zu Beginn der Studie Ferritinspiegel unter 25 µg/l auf. 40 % der weiblichen und männlichen Mischköstler und 30 % der weiblichen Vegetarier und 75 % der männlichen Vegetarier zeigten Transferrinplasmaspiegel unter 2,5 g/l. Die Initialwerte der ersten Blutabnahme im ersten Teil der Interventionsstudie (s. Abbildung 3.7) unterschieden sich nicht signifikant von den Werten der zweiten Blutabnahme, die in der Tabelle 4.29 dargestellt wurden ($p > 0,05$) (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4.30 zeigt die ermittelten Parameter des Eisenstatus im Vollblut und Plasma nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung im zweiten Teil der Interventionsstudie.

Tabelle 4.30: Eisenstatusparameter Hämoglobin (Hb) Hämatokrit (Hkt) im Vollblut, Ferritin, Transferrin (TF), Freies Eisen und Freie Eisenbindungskapazität (EBK) im Plasma ($\bar{x}$, min. - max.) der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung im zweiten Teil der Interventionsstudie

	Hb [mmol/l]	Hkt [%]	Ferritin [µg/l]	TF [g/l]	Eisen [µmol/l]	EBK [µmol/l]
Mischköstlerinnen	**8,3** ^{A}	**40,2** ^{A}	**24,1** ^{A,B}	**3,4** ^{A}	**21,3** ^{A}	**67,3** ^{A}
w (n = 15)	7,6 - 9,2	32,0 - 44,0	4,9 - 61,8	2,8 - 4,6	7,0 - 35,1	49,0 - 80,6
Vegetarierinnen	**7,9** ^{A}	**37,7** ^{B}	**14,9** ^{B}	**3,3** ^{A}	**14,9** ^{A}	**67,6** ^{A}
w (n = 10)	7,0 - 8,9	32,0 - 43,0	3,7 - 29,7	2,3 - 4,2	2,3 - 25,2	53,9 - 87,1
Mischköstler	**9,6** ^{B}	**44,6** ^{C}	**37,2** ^{A,C}	**2,9** ^{A,B}	**23,0** ^{A}	**53,9** ^{B}
m (n = 5)	8,8 - 10,2	41,0 - 46,0	21,1 - 62,2	2,4 - 4,1	8,6 - 40,5	38,7 - 72,4
Vegetarier	**10,0** ^{B}	**45,0** ^{C}	**52,6** ^{C}	**2,6** ^{B}	**16,1** ^{A}	**56,1** ^{A,B}
m (n = 4)	9,1 - 10,6	44,0 - 47,0	14,5 - 95,5	2,2 - 3,4	13,5 - 17,8	46,2 - 64,2

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA und anschließendem LSD-Test

Nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im zweiten Teil der Interventionsstudie unterschieden sich die Mischköstlerinnen und die Vegetarierinnen nicht signifikant in Hämoglobin, Ferritin, Transferrin, Eisen und Eisenbindungskapazität ($p > 0,05$). Die Mischköstlerinnen hatten dagegen höhere Hämatokritwerte als die Vegetarierinnen ($p < 0,05$). Beim Vergleich der weiblichen und männlichen Probanden zeigten die Männer signifikant höhere Hämoglobin- und Hämatokritwerte bei beiden Kostformen ($p < 0,05$). Sowohl die Männer als auch die Frauen beider Kostformen lagen mit ihren Hämoglobin-, Hämatokrit-, Eisen- und Eisenbindungskapazitätswerten nach der ersten Woche der Studie im Rahmen der Referenzbereiche. Fünf Vegetarierinnen und eine Mischköstlerin hatten bereits Ferritinspiegel im Plasma unter 10 µg/l nach der ersten Woche der Studie. 60 % der Mischköstlerinnen und 70 % der Vegetarierinnen wiesen zu Beginn des zweiten Teils der Interventionsstudie Ferritinspiegel unter 25 µg/l auf. 50 % der Vegetarier, 10 % der Vegetarierinnen und 20 % der Mischköstler zeigten Transferrinspiegel unter 5 g/l. Die Vegetarier hatten signifikant höhere Ferritinspiegel im Plasma als die Vegetarierinnen und die Mischköstlerinnen nach der ersten Woche der Studie ($p < 0,05$). Die Ferritinspiegel der Vegetarier und Mischköstler lagen in einem vergleichbaren Bereich. Die Initialwerte der ersten Blutabnahme im zweiten Teil der Interventionsstudie (s. Abbildung 3.7) unterschieden sich nicht signifikant von den Werten, die in der Tabelle 4.30 präsentiert wurden ($p > 0,05$) (Daten nicht gezeigt). Ausnahme bildeten die Ferritinspiegel der Frauen, die den schwarzen Tee konsumierten, da deren Initialwerte signifikant höher waren als die Ferritinspiegel nach der flavonoidarmen Woche.

Beim Vergleich der flavonoidarmen Phasen im ersten und zweiten Teil der Interventionsstudie zeigten nur die Mischköstlerinnen signifikant höhere Transferrinspiegel nach der

zweiten flavonoidarmen Phase verglichen mit den Transferrinspiegeln nach der ersten flavonoidarmen Phase. Die anderen analysierten Parameter des Eisenstatus wiesen keine signifikanten Unterschiede bei der Gegenüberstellung der flavonoidarmen Phasen im ersten und zweiten Teil der Interventionsstudie auf.

LARSSON und JOHANSSON [2002] beschreiben eine vergleichbare Prävalenz zu einem niedrigen Eisenstatus bei Veganern und Mischköstlern. Demgegenüber beschreiben BALL und BARTLETT [1999] bei Vegetarierinnen niedrigere Ferritinspiegel als bei Mischköstlerinnen. In der beschriebenen Humanstudie zeigten Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen vergleichbare Ferritinspiegel. In der Studie von BALL und BARLETT [1999] hatten sowohl 18 % der Vegetarierinnen als auch 13 % der Mischköstlerinnen depletierte Ferritinspiegel unter 12 µg/l, was in der vorgestellten Studie bestätigt wurde. HALLBERG et al. [1995] sehen bei Frauen, die eine Kost mit einer niedrigen Eisenbioverfügbarkeit konsumieren, einen adäquaten Eisenstatus nicht gewährleistet.

Die folgenden Abbildungen zeigen die GSH- und SOD-Gehalte im Vollblut aller Gruppen nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten und zweiten Teil der Interventionsstudie.

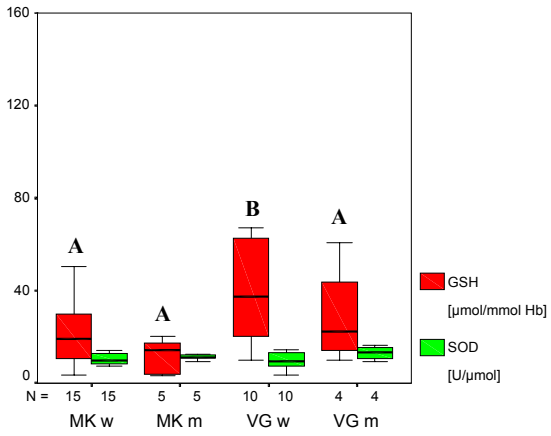


Abbildung 4.9: GSH- [µmol/mmol Hb] und SOD- [U/µmol Hb] Gehalte der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten Teil der Interventionsstudie (Boxplots[12] mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA und anschließendem LSD-Test (MK = Mischköstler, VG = Vegetarier))

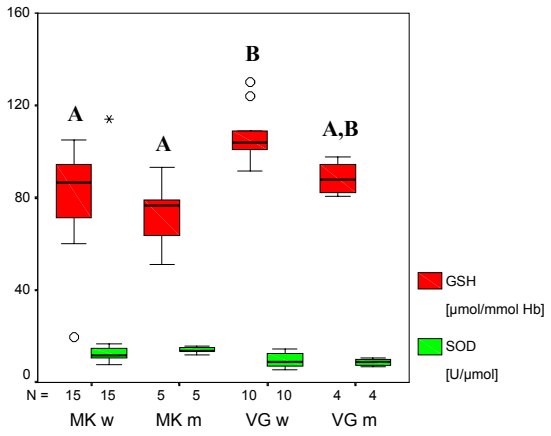


Abbildung 4.10: GSH- [µmol/mmol Hb] und SOD- [U/µmol Hb] Gehalte der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im zweiten Teil der Interventionsstudie (Boxplots mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA und anschließendem LSD-Test (MK = Mischköstler, VG = Vegetarier))

[12] Boxplots präsentieren den Median mit der 25th und 75th Perzentile, kleine Kreise zeigen Ausreißer und Kreuze Extremwerte

Nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten Teil der Interventionsstudie zeigten die Vegetarierinnen signifikant höhere GSH-Spiegel verglichen mit den 3 anderen Gruppen ($p < 0,05$). Demgegenüber unterschieden sich die SOD-Konzentrationen nicht in den Gruppen. Nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im zweiten Teil der Interventionsstudie zeigten die Vegetarierinnen signifikant höhere GSH-Spiegel verglichen mit den weiblichen und männlichen Mischköstlern ($p < 0,05$), wohingegen sich die GSH-Spiegel der männlichen Vegetarier von denen der männlichen und weiblichen Mischköstler nicht unterschieden ($p > 0,05$). Die GSH-Spiegel aller Gruppen waren signifikant höher nach der flavonoidarmen Phase im zweiten Teil der Interventionsstudie gegenüber denen im ersten Teil der Studie. Die Mischköstler hatten höhere SOD-Spiegel im zweiten Teil verglichen mit dem ersten, demgegenüber waren diese bei den Vegetariern in dem zweiten Teil signifikant niedriger als im ersten Teil.

Die Abbildungen 4.11 und 4.12 zeigen die Vitamin C-Konzentrationen im Plasma der Frauen und Männer beider Kostformen nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten und zweiten Teil der Interventionsstudie.

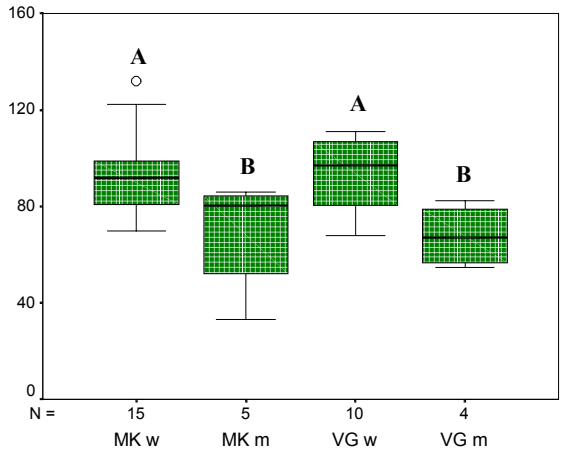


Abbildung 4.11: Vitamin C-Gehalte im Plasma [µmol/l] der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten Teil der Interventionsstudie (Boxplots mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant, berechnet mit ANOVA und anschließendem LSD-Test)

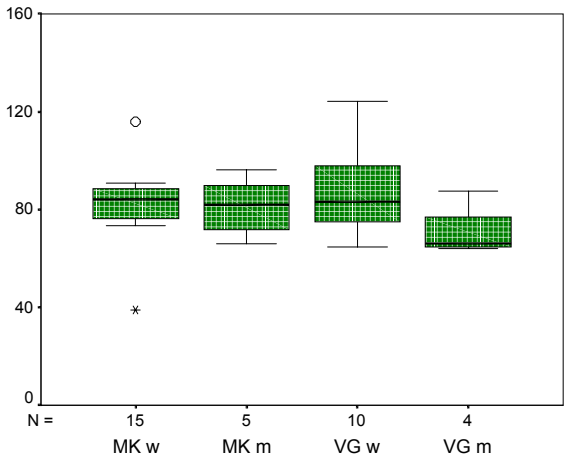


Abbildung 4.12: Vitamin C-Gehalte im Plasma [µmol/l] der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung im zweiten Teil der Interventionsstudie

Frauen zeigten signifikant höhere Vitamin C-Gehalte im Plasma als Männer nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten Teil der Interventionsstudie ($p < 0,05$), wohingegen nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im zweiten Teil der Interventionsstudie die Vitamin C-

Gehalte im Plasma aller Gruppen vergleichbar waren. Ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit der Kostform wurde nicht festgestellt. Beim Vergleich der Vitamin C-Konzentrationen im Plasma aller Gruppen konnte kein Unterschied zwischen beiden flavonoidarmen Phasen festgestellt werden.

Tabelle 4.31 zeigt die FRAP-Werte der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach der ersten Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten und zweiten Teil der Interventionsstudie.

Tabelle 4.31: FRAP-Werte [µmol/l Fe^{2+}] ($\bar{x} \pm s$) der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, nach der ersten Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten und zweiten Teil der Interventionsstudie

	FRAP-Werte [µmol/l Fe^{2+}]			
	1. Teil Interventionsstudie		2. Teil Interventionsstudie	
	FRAP 2		FRAP 2	
MK w (n = 15)	1493 ±	174 ^{A}	1179 ±	281 ^{A}
VG w (n = 10)	1605 ±	161 $^{A, B}$	946 ±	157 ^{B}
MK m (n = 5)	1757 ±	98 ^{B}	1430 ±	185 ^{C}
VG m (n = 4)	1774 ±	103 ^{B}	1135 ±	265 $^{A, B}$

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$), berechnet mit ANOVA und anschließendem LSD-Test

Nach der Woche flavonoidarmer Ernährung des ersten Teils der Studie zeigten die Mischköstler und Vegetarier signifikant höhere FRAP-Werte verglichen mit den Mischköstlerinnen. Die FRAP-Werte der Vegetarierinnen lagen in einem vergleichbaren Bereich mit den FRAP-Werten aller drei Gruppen. Im zweiten Teil der Studie hatten die Mischköstler signifikant höhere FRAP-Werte verglichen mit den drei Gruppen. Nach der flavonoidarmen Ernährung des zweiten Teils der Interventionsstudie waren die FRAP-Werte der Mischköstler, Vegetarier und Vegetarierinnen signifikant niedriger verglichen mit den FRAP-Werten nach der flavonoidarmen Phase des ersten Teils der Inverventionsstudie. Die FRAP-Werte der Mischköstlerinnen waren nach der flavonoidarmen Woche im ersten und zweiten Teil vergleichbar.

4.3.2.2 Analyse des Eisenstatus und des antioxidativen Status im Verlauf der Studie

Im folgenden wird der Einfluss eines über 4 Wochen andauernden täglichen Konsums von einem Liter grünem bzw. schwarzem Tee auf den Eisenstatus und den antioxidativen Status der weiblichen und männlichen Probanden, unterteilt nach der Kostform, dargestellt. Der Konsum von grünem oder schwarzem Tee beeinflusste den Eisenstatus in Abhängigkeit von dem Geschlecht und der Kostform unterschiedlich. Deswegen werden im folgenden die einzelnen Gruppen getrennt nach Kostform, Geschlecht und Teesorte betrachtet.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ferritingehalte der Mischköstler bei Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee und bei Verzicht auf Tee im Verlauf der Studie.

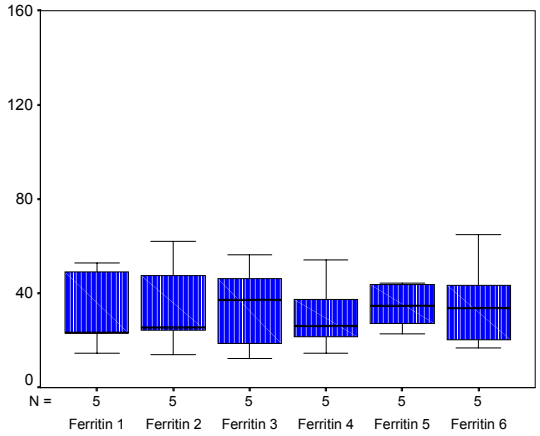


Abbildung 4.13: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Mischköstler nach Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee im Laufe der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung

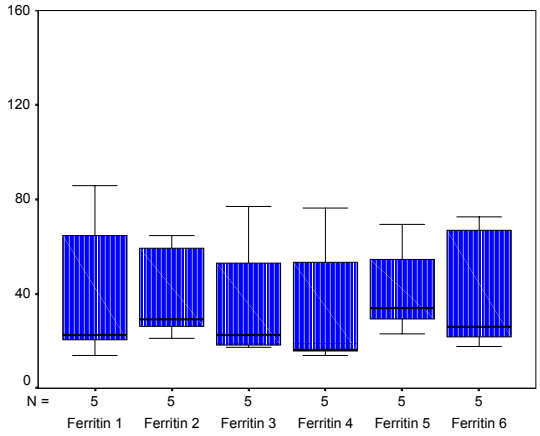


Abbildung 4.14: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Mischköstler bei Verzicht auf grünen bzw. schwarzen Tee im Laufe der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung

Die Ferritingehalte im Plasma der Mischköstler veränderten sich nicht signifikant bei Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee, und die entsprechende Kontrollgruppe zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der Ferritinspiegel im Plasma ($p > 0,05$). Der Konsum von grünem oder schwarzem Tee beeinflusste die anderen Parameter des Eisenstatus ebenfalls nicht. Somit beeinflusste der tägliche, über 4 Wochen andauernde, Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee den Eisenstatus von Mischköstlern nicht. Auf die alleinige Betrachtung des Einflusses von grünem oder schwarzen Tee wurde aufgrund der ebenfalls nicht signifikanten Veränderung der Eisenstatusparameter verzichtet. Die Ferritinspiegel der Vegetarier wurden ebenfalls nicht durch den Konsum von schwarzem bzw. grünem Tee beeinflusst. Die Ferritinspiegel, die Freie Eisenbindungskapazität und die Freie Eisenkonzentration werden im Anhang dargestellt.

Bei den Mischköstlerinnen wurde der Eisenstatus durch den täglichen, über 4 Wochen andauernden, Konsum von schwarzem Tee beeinflusst. Abbildung 4.15 zeigt den Einfluss des Konsums von schwarzem Tee auf die Ferritinkonzentrationen im Plasma der Mischköstlerinnen. Abbildung 4.16 stellt die entsprechenden Ferritinspiegel der Mischköstlerinnen bei Verzicht auf Tee dar.

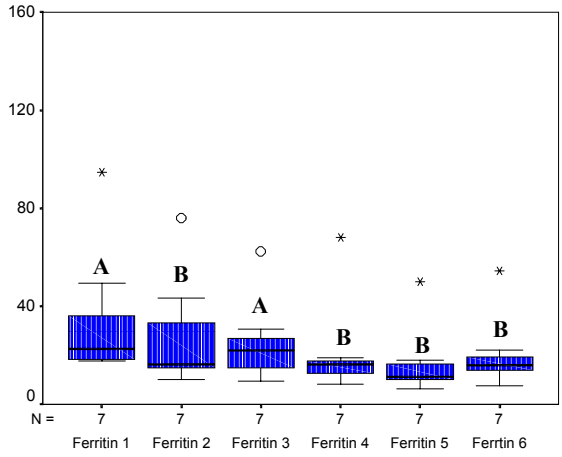


Abbildung 4.15: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Mischköstlerinnen nach Konsum von schwarzem Tee im Laufe der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung (Boxplots mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$), berechnet mit dem allgemeinen linearen Modell mit Messwiederholungen)

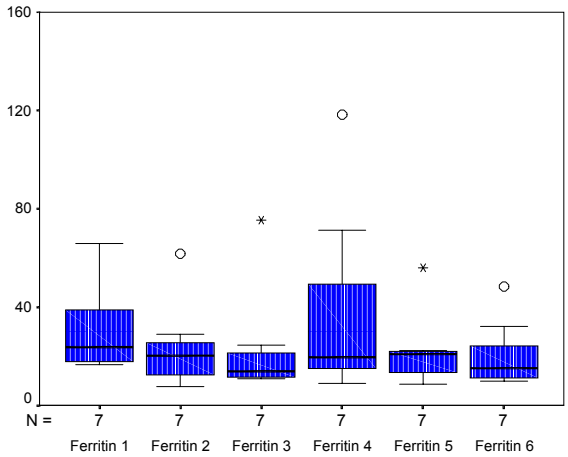


Abbildung 4.16: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Mischköstlerinnen bei Verzicht auf schwarzen Tee im Laufe der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung

Bereits nach 2-wöchigem Konsum von schwarzem Tee zeigten sich signifikant niedrigere Ferritinspiegel im Plasma der Mischköstlerinnen (Ferritin 4) verglichen mit den Basiswerten (Ferritin 1). Diese Ferritinkonzentrationen unterschieden sich nicht signifikant von denen der letzten Blutabnahme (Ferritin 6). Somit führte der tägliche, über 4 Wochen andauernde, Konsum von schwarzem Tee bei den Mischköstlerinnen zu signifikant niedrigeren Ferritinspiegeln im Vergleich zu den Basiswerten. Die entsprechende Kontrollgruppe zeigte keine signifikanten Veränderungen der Ferritingehalte im Plasma. Die Freie Eisenbindungskapazität, ein weiterer sensibler Parameter des Eisenstatus, zeigte noch keine signifikanten Veränderungen bei den Mischköstlerinnen nach Konsum von schwarzem Tee.

Zu Beginn der Studie waren 4 Vegetarierinnen in die Gruppe „Konsum von schwarzem Tee“ eingeteilt worden. Eine Vegetarierin vertrug aus gesundheitlichen Gründen das Trinken von einem Liter schwarzem Tee pro Tag nicht, und deswegen standen für die Auswertung nur 3 Vegetarierinnen, die schwarzen Tee konsumierten, zur Verfügung. Die folgende Tabelle zeigte die Ferritinkonzentrationen, die Freie Eisenbindungskapazität und die Freie Eisenkonzentration der Vegetarierinnen nach Konsum von schwarzem Tee bzw. bei Verzicht auf Tee.

Tabelle 4.32: Ferritingehalte [µg/l], Freie Eisenbindungskapazität [µmol/l] und Freie Eisen konzentrationen [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) der Vegetarierinnen nach Konsum von schwarzem Tee bzw. bei Verzicht auf Tee

Blutabnahmen	**Vegetarierinnen (n = 3) Konsum von schwarzem Tee**					
	Ferritin [µg/l]		**EBK [µmol/l]**		**Eisen [µmol/l]**	
1	16,89 ±	19,19 ^{A}	49,63 ±	36,62 ^{A}	25,03 ±	1,63 ^{A}
2	13,83 ±	12,01 ^{A}	62,43 ±	11,99 ^{A}	19,53 ±	8,62 ^{A}
3	10,90 ±	9,96 ^{A}	66,50 ±	22,16 ^{A}	26,10 ±	5,38 ^{A}
4	11,53 ±	8,77 ^{A}	65,37 ±	18,29 ^{A}	19,80 ±	7,21 ^{A}
5	10,37 ±	8,08 ^{A}	67,00 ±	13,09 ^{A}	18,10 ±	4,86 ^{A}
6	16,13 ±	18,92 ^{A}	64,40 ±	16,77 ^{A}	22,00 ±	5,44 ^{A}
Blutabnahmen	**Vegetarierinnen (n = 3) Verzicht auf Tee**					
	Ferritin [µg/l]		**EBK [µmol/l]**		**Eisen [µmol/l]**	
1	13,77 ±	12,63 ^{A}	67,20 ±	14,23 ^{A}	15,93 ±	12,02 ^{A}
2	12,10 ±	11,98 ^{A}	75,87 ±	16,28 ^{A}	17,83 ±	5,16 ^{A}
3	9,37 ±	8,53 ^{A}	80,97 ±	8,09 ^{A}	19,43 ±	4,34 ^{A}
4	9,13 ±	5,86 ^{A}	70,50 ±	17,13 ^{A}	24,37 ±	5,22 ^{A}
5	12,53 ±	14,00 ^{A}	60,07 ±	8,79 ^{A}	19,07 ±	8,71 ^{A}
6	10,67 ±	8,62 ^{A}	76,00 ±	11,34 ^{A}	15,37 ±	5,89 ^{A}

Mittelwerte in Spalten mit gleichen hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ($p > 0,05$), berechnet mit dem allgemeinen linearen Modell mit Messwiederholungen

Die Parameter Ferritin, Freie Eisenbindungskapazität und Freies Eisen wurden durch den täglichen, über 4 Wochen andauernden, Konsum von schwarzem Tee nicht signifikant beeinflusst. Die Mittelwerte der Ferritingehalte lagen im unteren Grenzbereich. Aufgrund der großen individuellen Schwankungsbreite wurden keine signifikanten Änderungen festgestellt. Bei den 3 Vegetarierinnen wurde somit der negative, bei den Mischköstlerinnen beschriebene, (s. Abbildung 4.16) Einfluss des Konsums von schwarzem Tee auf den Eisenstatus nicht bestätigt.

Die folgenden Abbildungen zeigen den Einfluss von täglichem, über 4 Wochen andauerndem, Konsum von grünem Tee auf den Eisenstatus von Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen.

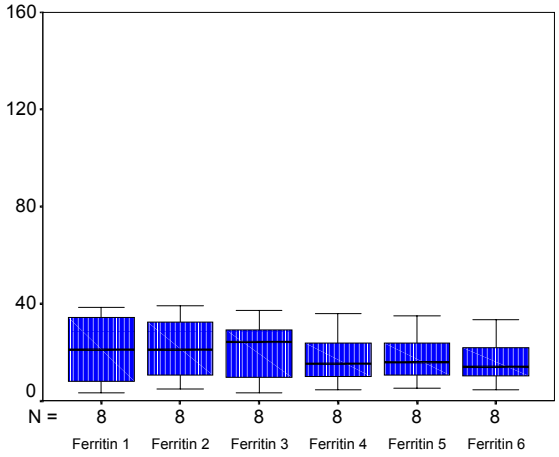


Abbildung 4.17: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Mischköstlerinnen nach Konsum von grünem Tee im Laufe der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung

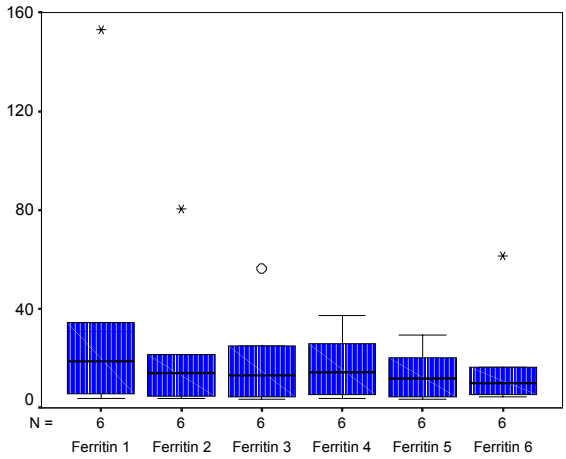


Abbildung 4.18: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Vegetarierinnen nach Konsum von grünem Tee im Laufe der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung

Die Ferritinspiegel der Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen wurden durch den täglichen, über 4 Wochen andauernden, Konsum von grünem Tee nicht signifikant beeinflusst. Somit zeigte der über 4 Wochen andauernde Konsum von grünem Tee keinen negativen Einfluss auf den Eisenstatus der Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen.

Tabelle 4.33 stellt die Ferritingehalte, Freie Eisenbindungskapazität und Freien Eisenkonzentrationen der Vegetarierinnen bei Konsum von grünem Tee bzw. bei Verzicht auf Tee dar.

Tabelle 4.33: Ferritingehalte [µg/l], Freie Eisenbindungskapazität [µmol/l] und Freie Eisenkonzentrationen [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) der Vegetarierinnen nach Konsum von grünem Tee bzw. bei Verzicht auf Tee

Blutabnahmen	**Vegetarierinnen (n = 6) Konsum von grünem Tee**					
	Ferritin [µg/l]		**EBK [µmol/l]**		**Eisen [µmol/l]**	
1	39,15 ±	56,91 ^{A}	66,88 ±	20,06 ^{A}	12,13 ±	6,45 ^{A}
2	23,02 ±	28,91 ^{A}	67,55 ±	20,69 ^{A}	23,65 ±	22,68 ^{A}
3	19,30 ±	19,82 ^{A}	64,90 ±	19,70 ^{A}	15,35 ±	8,80 ^{A}
4	17,05 ±	13,19 ^{A}	60,80 ±	16,07 ^{A}	15,72 ±	8,16 ^{A}
5	13,55 ±	9,93 ^{A}	64,68 ±	15,35 ^{A}	16,40 ±	7,11 ^{A}
6	17,93 ±	21,79 ^{A}	67,65 ±	21,55 ^{A}	11,40 ±	6,50 ^{A}
Blutabnahmen	**Vegetarierinnen (n = 6) Verzicht auf Tee**					
	Ferritin [µg/l]		**EBK [µmol/l]**		**Eisen [µmol/l]**	
1	14,14 ±	7,40 ^{A}	69,52 ±	16,76 ^{A}	16,42 ±	4,84 ^{A}
2	16,86 ±	11,28 ^{A}	69,48 ±	19,08 ^{A}	13,72 ±	3,28 ^{A}
3	12,88 ±	9,48 ^{A}	73,82 ±	20,09 ^{A}	13,56 ±	4,66 ^{A}
4	13,36 ±	7,91 ^{A}	67,98 ±	19,72 ^{A}	14,66 ±	4,05 ^{A}
5	17,64 ±	9,70 ^{A}	66,08 ±	12,07 ^{A}	13,68 ±	5,15 ^{A}
6	13,82 ±	8,28 ^{A}	75,56 ±	12,83 ^{A}	13,86 ±	4,43 ^{A}

Mittelwerte in Spalten mit gleichen hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ($p > 0,05$), berechnet mit dem allgemeinen linearen Modell mit Messwiederholungen

Bei den drei dargestellten Parametern wurden sowohl bei Konsum von grünem Tee als auch bei Verzicht auf Tee keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der Studie festgestellt.

Zu Beginn der Interventionsstudie zeigten 60 % der Mischköstlerinnen und 70 % der Vegetarierinnen bereits Ferritinspiegel unter 25 µg/l. Abbildung 4.19 veranschaulicht den Einfluss eines 4-wöchigen Teekonsums auf den Eisenstatus bei Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen mit niedrigen Ferritinspiegeln (< 25 µg/l). Abbildung 4.20 zeigt die Transferrinkonzentrationen dieser Frauen im Verlauf der Studie.

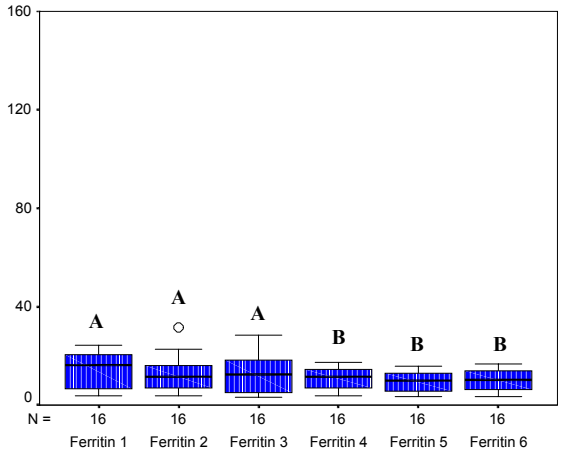


Abbildung 4.19: Ferritingehalte [µg/l] im Plasma der Frauen mit Ferritin-Ausgangswerten unter 25 µg/l zu Beginn der Studie nach Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee (Boxplots mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$), berechnet mit dem allgemeinen linearen Modell mit Messwiederholungen)

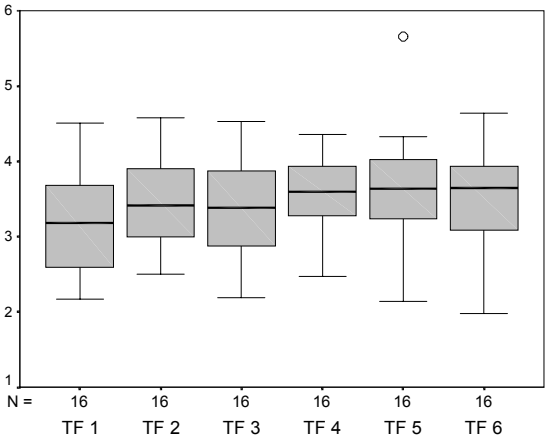


Abbildung 4.20: Transferringehalte [g/l] im Plasma der Frauen mit Ferritin-Ausgangswerten unter 25 µg/l zu Beginn der Studie nach Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee (TF = Transferrin)

Bereits nach 2-wöchigem Konsum von grünem bzw. schwarzen Tee unterschieden sich die Ferritingehalte (Ferritin 4) signifikant von den Basiswerten (Ferritin 1). Somit bewirkte der Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee eine Reduktion der Ferritingehalte im Plasma von Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen, bei denen zu Beginn der Studie bereits Ferritinspiegel unter 25 µg/l vorlagen. Die Transferrinspiegel dieser Frauen zeigten noch keine signifikanten Veränderungen im Verlauf der Studie nach Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee. Die Konzentrationen an Freier Eisenbindungskapazität sowie an Freiem Eisen im Plasma dieser Frauen veränderten sich ebenfalls nicht im Verlauf dieser Studie. Somit lag bei diesen Frauen ein prälatenter Eisenmangel vor. Schlussfolgernd ist der Eisenstatus der Frauen entscheidend, inwieweit ein 4-wöchiger Teekonsum die Parameter des Eisenstatus beeinflusst.

TEMME und VAN HOYDONCK [2002] schlussfolgern bei der Auswertung verschiedener Humanstudien zu Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen, dass bei einer adäquaten Eisenversorgung der Konsum von Tee keinen Einfluss auf den Eisenstatus besitzt. Eine adäquate Eisenversorgung war bei diesen Frauen nicht gegeben.

Tabelle 4.34 stellt die Eisenkonzentrationen der Probandinnen und Probanden beider Kostformen nach Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee dar.

Tabelle 4.34: Freie Eisenkonzentrationen [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) der Probandinnen und Probanden nach Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee

Blutabnahmen	Mischköstlerinnen (n = 8) Grüntee		Mischköstlerinnen (n = 7) Schwarztee		Mischköstler (n = 5)		Vegetarierinnen (n = 9)		Vegetarier (n = 4)	
	Eisenkonzentration [µmol/l]									
Eisen 1	20,35 ±	6,69 ^{A}	29,20 ±	25,43 ^{A}	15,66±	4,44 ^{A}	16,43 ±	8,26 ^{A}	15,25 ±	2,76 ^{A}
Eisen 2	22,33 ±	10,75 ^{A}	25,43 ±	6,28 ^{A,B}	18,72±	10,48 ^{A}	22,28 ±	18,56 ^{A}	16,80 ±	0,99 ^{A}
Eisen 3	16,49 ±	7,52 ^{A}	22,54 ±	6,44 ^{B}	18,54±	7,95 ^{A}	18,93 ±	9,19 ^{A}	20,68 ±	3,80 ^{A}
Eisen 4	19,80 ±	12,46 ^{A}	22,99 ±	4,76 ^{B}	13,62±	3,51 ^{A}	17,08 ±	7,67 ^{A}	18,03 ±	4,59 ^{A}
Eisen 5	19,81 ±	14,04 ^{A}	25,39 ±	10,01 ^{B}	25,32 ±	13,67 ^{A}	16,97 ±	6,18 ^{A}	15,45 ±	6,64 ^{A}
Eisen 6	16,85 ±	6,12 ^{A}	22,73 ±	7,74 ^{B}	14,54±	7,05 ^{A}	14,93 ±	7,87 ^{A}	18,57 ±	9,58 ^{A}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$), berechnet mit dem allgemeinen linearen Modell mit Messwiederholungen

Die Eisenkonzentrationen im Plasma veränderten sich bei den Mischköstlerinnen nach Konsum von grünem Tee nicht signifikant ($p > 0,05$). Demgegenüber führte der vierwöchige Konsum von schwarzem Tee bei den Mischköstlerinnen zum einem zu signifikant niedrigeren Ferritinspiegeln (s. Abbildung 4.16) und zum anderen zu signifikant niedrigeren Eisenkonzentrationen im Vergleich zu den Plasmakonzentrationen zu Beginn der Studie ($p < 0,05$). Bereits nach 1-wöchigem Konsum von schwarzem Tee lagen die Freien Eisenkonzentrationen (Eisen 3) signifikant niedriger verglichen mit den Ausgangswerten (Eisen 1). Die Eisenkonzentrationen im Plasma der Mischköstler, Vegetarier und Vegetarierinnen zeigten keine signifikant niedrigeren Konzentrationen im Verlauf der Studie. Bei diesen Probanden wurden auch keine signifikanten Veränderungen der Ferritingehalte im Lauf der Studie festgestellt.

Tabelle 4.35 zeigt die Hämoglobinkonzentrationen der Mischköstlerinnen, Mischköstler, Vegetarierinnen und Vegetarier nach Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee.

Tabelle 4.35: Hämoglobinkonzentrationen (Hb) [mmol/l] ($\bar{x}$ ± s) der Probandinnen und Probanden im Verlauf der Studie, unterteilt nach der Kostform

Blutabnahmen	Mischköstlerinnen (n = 15)	Mischköstler (n = 5)	Vegetarierinnen (n = 9)	Vegetarier (n = 4)
	Hämoglobinkonzentration [mmol/l]			
Hb 1	8,4 ± 0,6 ^{A}	9,6 ± 0,6 ^{A}	8,2 ± 0,7 ^{A}	9,3 ± 0,4 ^{A}
Hb 2	8,4 ± 0,4 ^{A}	9,5 ± 0,7 ^{A}	8,2 ± 0,7 ^{A}	10,0 ± 0,7 ^{A}
Hb 3	8,4 ± 0,5 ^{A}	9,3 ± 0,5 ^{A}	8,1 ± 0,5 ^{A}	9,5 ± 0,2 ^{A}
Hb 4	8,3 ± 0,5 ^{A}	9,4 ± 0,4 ^{A}	8,0 ± 0,6 ^{A}	9,2 ± 0,2 ^{A}
Hb 5	8,3 ± 0,4 ^{A}	9,4 ± 0,4 ^{A}	7,8 ± 0,6 ^{A}	9,3 ± 0,5 ^{A}
Hb 6	8,1 ± 0,6 ^{A}	9,5 ± 0,6 ^{A}	7,9 ± 0,6 ^{A}	9,4 ± 0,1 ^{A}

Mittelwerte in Spalten mit gleichen hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ($p > 0,05$), berechnet mit dem allgemeinem linearen Modell mit Messwiederholungen

Die Hämoglobinkonzentrationen im Vollblut aller Probandinnen und Probanden zeigten keine signifikanten Veränderungen ($p > 0,05$). Auch der Hämatokrit aller Probanden veränderte sich nicht signifikant ($p > 0,05$) (Daten nicht gezeigt). Die folgende Tabelle zeigt die Ascorbinsäurekonzentrationen der Probanden im Verlauf der Studie nach Konsum von grünem oder schwarzem Tee.

Tabelle 4.36: Ascorbinsäurekonzentrationen [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) im Plasma der Probandinnen und Probanden, unterteilt nach der Kostform

Blutabnahmen	Mischköstlerinnen (n = 15)	Mischköstler (n = 5)	Vegetarierinnen (n = 9)	Vegetarier (n = 4)
	Ascorbinsäurekonzentrationen [µmol/l]			
Vitamin C 1	76,16 ± 14,57 ^{A}	69,81 ± 10,03 ^{A}	78,93 ± 10,97 ^{A}	70,60 ± 24,10 ^{A}
Vitamin C 2	88,62 ± 21,25 ^{A,B,C}	68,27 ± 21,32 ^{A}	87,66 ± 16,13 ^{B}	73,77 ± 10,21 ^{A}
Vitamin C 3	86,66 ± 9,38 ^{B}	69,14 ± 6,83 ^{A}	93,71 ± 21,04 ^{B,C}	74,02 ± 13,19 ^{A}
Vitamin C 4	75,72 ± 14,53 ^{A}	68,03 ± 21,00 ^{A}	101,33 ± 28,23 ^{C}	83,61 ± 8,73 ^{A}
Vitamin C 5	78,79 ± 10,63 ^{A,C}	74,04 ± 10,11 ^{A}	95,68 ± 33,60 ^{A,B,C}	83,09 ± 24,19 ^{A}
Vitamin C 6	78,48 ± 10,89 ^{A,C}	69,63 ± 13,65 ^{A}	92,10 ± 24,39 ^{A,B}	86,55 ± 7,28 ^{A}

Mittelwerte in Spalten mit verschiedenen hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$), berechnet mit dem allgemeinen linearen Modell mit Messwiederholungen

Signifikante Veränderungen in den Plasmakonzentrationen der Ascorbinsäure zeigten die Mischköstlerinnen im Verlauf der Studie, wobei sich die Plasmaspiegel der zweiten Blutabnahme von denen der letzten Blutabnahme nicht signifikant unterschieden. Die Vegetarierinnen zeigten ebenfalls signifikante Unterschiede in den Plasmakonzentrationen der Ascorbinsäure im Laufe der Studie, wobei sich auch hier die Spiegel am Anfang (Vitamin C 1) und am Ende der Studie (Vitamin C 6) nicht unterschieden. Die Mischköstler und Vegetarier zeigten keine signifikanten Veränderungen der Ascorbinsäurekonzentrationen im Plasma im gesamten Verlauf der Studie. Abbildung 4.21 zeigt den Verlauf der FRAP-Werte im Plasma der

Probandinnen und der Probanden unterteilt nach ihren Kostformen nach Konsum von grünem Tee.

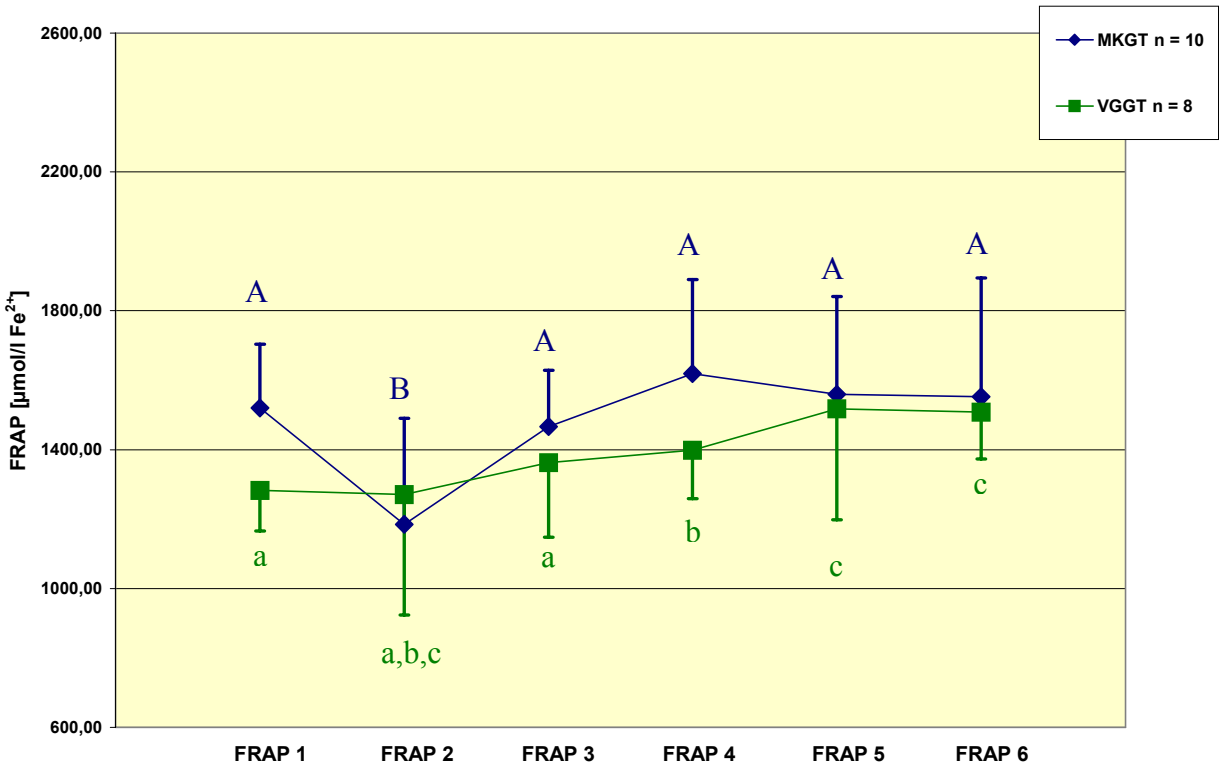


Abbildung 4.21: FRAP-Werte [µmol/l Fe^{2+}] der Probandinnen und Probanden unterteilt nach ihrer Kostform nach Konsum von grünem Tee im Verlauf der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung (MKGT = Mischköstler nach Konsum von grünem Tee, VGGT = Vegetarier nach Konsum von grünem Tee) (Punkte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$), berechnet mit dem allgemeinen linearen Modell mit Messwiederholungen)

Bei den weiblichen und männlichen Mischköstlern zeigten sich nach der Woche flavonoidarmer Ernährung signifikant niedrigere FRAP-Werte (FRAP 2) verglichen mit den FRAP-Werten der ersten Blutabnahme (FRAP 1) ($p < 0,05$). Somit bewirkte der Verzicht auf die flavonoidhaltigen Lebensmittel bei den Mischköstlern ein Absinken der antioxidativen Aktivität des Plasmas verglichen mit den Ausgangswerten. Im Verlauf der Studie stiegen die FRAP-Werte wieder an und unterschieden sich ebenfalls signifikant von FRAP 2. Der über 4 Wochen andauernde Konsum von einem Liter grünem Tee pro Tag bewirkte einen Wiederanstieg auf die Ausgangswerte. Die FRAP-Werte waren vergleichbar mit den FRAP-Werten der ersten Blutabnahme ($p > 0,05$). Hingegen unterschieden sich die FRAP 1- und FRAP 2-Werte der Vegetarierinnen nach der Woche flavonoidarmer Ernährung nicht signifikant ($p > 0,05$). Die flavonoidarme Ernährung zwischen FRAP 1- und FRAP 2-Werten bewirkte keine Verringerung der antioxidativen Aktivität des Plasmas, wie bei den Misch-

köstlern beschrieben. Im Verlauf der Studie stiegen die FRAP-Werte und FRAP 5 und FRAP 6 unterschieden sich signifikant von den FRAP-Werten zu Beginn der Studie (FRAP 1) ($p < 0,05$). Die Steigerung der antioxidativen Aktivität des Plasmas war infolge des über 4 Wochen andauernden Konsum von einem Liter grünem Tee pro Tag stärker als bei den Mischköstlern.

Abbildung 4.22 zeigt die FRAP-Werte der Probandinnen und Probanden, unterteilt nach ihren Kostformen, nach Konsum von schwarzem Tee.

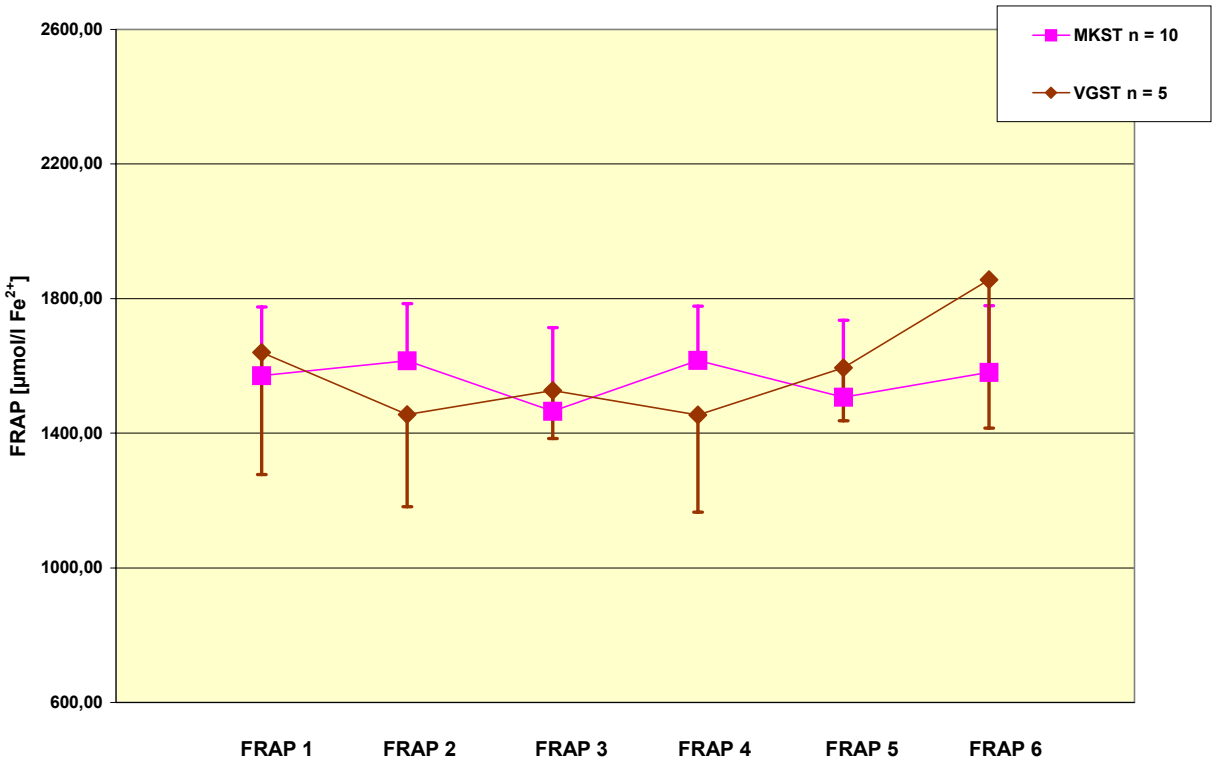


Abbildung 4.22: FRAP-Werte [µmol/l Fe^{2+}] der Probandinnen und Probanden unterteilt nach ihrer Kostform nach Konsum von schwarzem Tee im Verlauf der Studie nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung (MKST = Mischkost mit Konsum von schwarzem Tee, VGST = Vegetarier mit Konsum von schwarzem Tee)

Die Woche flavonoidarme Ernährung und der vierwöchige Konsum von schwarzem Tee beeinflusste die FRAP-Werte dieser Probanden nicht signifikant ($p > 0,05$).

4.4 Bestimmung der antioxidativen Aktivität und deren Bewertung

Die große Zahl verschiedener Tests zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität macht deren Vergleich notwendig. Um den Beitrag antioxidativer Verbindungen unterschiedlicher Struktur an dem Summenparameter antioxidative Aktivität zu ermitteln, wurde die Wirksamkeit von vier Einzelverbindungen in sechs verschiedenen in vitro-Tests überprüft: Trolox, ein wasser-

lösliches Vitamin E-Analog, Ascorbinsäure als ein weit verbreitetes Vitamin in Obst und Gemüse, Gallussäure als Vertreter der Polyphenole und Harnsäure als Antioxidans im menschlichen Plasma. Die Wirkungen dieser Einzelverbindungen wurden mit Hilfe des TEAC-Test I, II und III, TRAP-Test, DPPH-Test, DPMD-Test, FRAP-Test und PCL-Test analysiert. Die 6 dargestellten in vitro-Tests können in zwei Gruppen eingeteilt werden. 5 Methoden benutzen Radikale (TEAC I-III, TRAP, DPPH, DMPD, PCL) und eine Methode nutzt Metallionen (FRAP). Ein anderes Differenzierungsmerkmal ist das Reaktionsprinzip. 3 Methoden bestimmen die Verzögerung der Oxidation und verwenden die Lagphase als Maß der antioxidativen Wirkung (TEAC I, TRAP, PCL). In dem TEAC II- und III-Test, sowie in dem DPPH-, DMPD-Test wird die Radikalabfangende Wirkung von Antioxidantien gemessen, was in der Abnahme der Extinktion zu sehen ist. Die Zunahme der Extinktion aufgrund der Bildung von Fe(II)-Ionen wird im FRAP-Test analysiert.

Beim Vergleich von TEAC I-, TRAP- und PCL-Test sind Unterschiede in der Empfindlichkeit und der Messzeit zu finden. Der PCL-Test misst die antioxidative Wirksamkeit im nanomolaren Bereich und die Lagphasen liegen im Minutenbereich. Der TEAC-Tests misst in micromolaren Konzentrationen mit Lagphasen im Minutenbereich, wohingegen der TRAP-Test für vergleichbare Konzentrationen eine Messdauer von 1 Stunde benötigt.

Die folgende Tabelle zeigt die antioxidative Wirksamkeit der vier Substanzen in den verschiedenen TEAC-Tests.

Tabelle 4.37: TEAC-Werte [mmol/l] der vier Antioxidantien Trolox, Gallussäure, Harnsäure und Ascorbinsäure

Test \ Antioxidans	**Trolox**	**Gallussäure**	**Harnsäure**	**Ascorbinsäure**
TEAC I	1,00	2,24 ± 0,27	0,86 ± 0,13	1,06 ± 0,09
TEAC II	1,00	4,35 ± 0,22	0,86 ± 0,11	0,99 ± 0,09
TEAC III (hydrophil)	1,00	3,83 ± 0,10	0,83 ± 0,06	0,31 ± 0,03
TEAC III (lipophil)	1,00	3,35 ± 0,32	0,99 ± 0,17	1,14 ± 0,06

Der TEAC-Wert von Trolox in den vier Versionen des TEAC-Testes ist definitionsgemäß 1,00. Gallussäure, der Vertreter der Phenolcarbonsäuren, besaß die stärkste antioxidative Wirksamkeit in allen 4 in vitro-Tests. Harnsäure reagierte in den Tests vergleichbar. Die TEAC-Werte der Ascorbinsäure waren im TEAC I, II und TEAC III (lipophile Version) vergleichbar, wohingegen die Wirksamkeit der Ascorbinsäure in dem hydrophilen TEAC III-Test deutlich schwächer war. Abbildung 4.23 zeigt die antioxidative Wirksamkeit der Harnsäure in den TEAC-Tests II, III (hydrophil und lipophil) und im DPPH-Test.

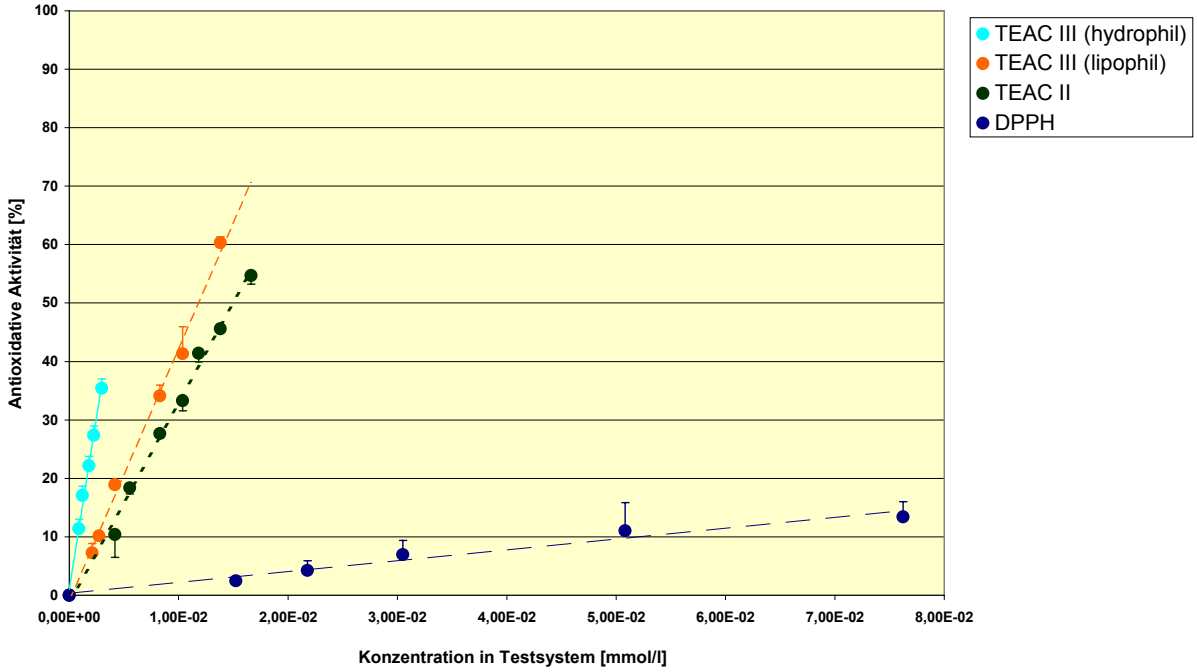


Abbildung 4.23: Antioxidative Aktivität der Harnsäure bei verschiedenen Konzentrationen in dem DPPH-, TEAC II-, TEAC III-Test (hydrophil und lipophil)

Die antioxidative Wirksamkeit der Harnsäure war in den drei Versionen des TEAC-Tests vergleichbar, wohingegen die Wirkung der Harnsäure in dem DPPH-Test sehr schwach war. In dem DMPD-Test zeigte die Harnsäure keine antioxidative Wirksamkeit.

Die weitere Bewertung der vorgestellten in vitro-Tests zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität erfolgte mit Getränken. Dazu standen Johannisbeersaft und -nektar, 2 Apfelsäfte, 2 Tomatensäfte sowie grüner und schwarzer Tee der Provenienzen Assam und Darjeeling zur Verfügung. Neben der Analyse der antioxidativen Aktivität der beschriebenen Getränke wurden auch die Ascorbinsäurekonzentration und die Gesamtphenolgehalte der Getränke ermittelt. Der Summenparameter Gesamtphenole nach Folin-Ciocalteu erfasst neben den phenolischen Gruppen auch Ascorbinsäure. Deshalb wurde auch der Anteil der Ascorbinsäure an dem Summenparameter Gesamtphenolgehalt ermittelt. Eine Lösung von 1 mg Ascorbinsäure pro Liter ergibt in dem Folin-Ciocalteu-Test einen Gesamtphenolwert von 0,506 ± 0,068 mg/l. Tabelle 4.38 zeigt die Ascorbinsäuregehalte und den Anteil der Ascorbinsäurekonzentration der Getränke an dem Gesamtphenolgehalt sowie die Gesamtphenolgehalte der untersuchten Getränke und die um die Ascorbinsäure korrigierten Gesamtphenolgehalte.

Tabelle 4.38: Ascorbinsäuregehalte [mg/l], Anteil der Ascorbinsäuregehalte an dem Gesamtphenolgehalt [mg/l] und Gesamtphenolgehalte (GAE) [mg/l] der Getränke und die um die Ascorbinsäure korrigierten Gesamtphenolgehalte (GAE) [mg/l]

Getränke	Ascorbinsäure [mg/l]		Anteil der Ascorbinsäure am GAE [mg/l]		GAE [mg/l]		Um Ascorbinsäure korrigierte GAE [mg/l]
SJS	2408 ±	38	1219 ±	3	5198 ±	45	3980
SJN	458 ±	8	232 ±	1	1122 ±	5	890
AS_a	311 ±	5	158 ±	0	749 ±	11	491
AS_b	76 ±	3	38 ±	0	492 ±	3	454
TS_a	84 ±	4	42 ±	0	256 ±	1	214
TS_b	75 ±	3	38 ±	0	199 ±	5	161
Grüner Darjeeling	60 ±	1	30 ±	0	532 ±	23	502
Grüner Assam	58 ±	1	30 ±	0	492 ±	6	463
Schwarzer Darjeeling	33 ±	0	19 ±	0	469 ±	51	450
Schwarzer Assam	38 ±	2	16 ±	0	411 ±	61	395

SJS = Schwarzer Johannisbeersaft, SJN = Schwarzer Johannisbeernektar, Apfelsaft = AS_a und AS_b, Tomatensaft = TS_a und TS_b

Schwarzer Johannisbeersaft hatte den höchsten Gehalt an Ascorbinsäure und an Gesamtphenolen. In allen in vitro-Tests zur Ermittlung der antioxidativen Aktivität hatte dieser Saft auch die höchste Aktivität. Die Säfte wiesen höhere Gehalte an Ascorbinsäure auf als die Tees. Demgegenüber hatten die Tees gleich hohe oder höhere Gesamtphenolgehalte verglichen mit den Apfel- und Tomatensäften. Der Anteil der Ascorbinsäure an dem Summenparameter Gesamtphenole war in Abhängigkeit von der Ascorbinsäurekonzentration der Getränke unterschiedlich. 23 % des Gesamtphenolgehaltes des schwarzen Johannisbeersaftes sind auf den Ascorbinsäuregehalt zurückzuführen und bei dem schwarzen Johannisbeernektar, bei beiden Tomatensäften und einem Apfelsaft (AS_a) liegt der Ascorbinsäureanteil an den Gesamtphenolgehalten bei ~20 %. Dadurch werden die Interaktionen der Ascorbinsäure mit den Folin-Reagenz deutlich. Die alleinige Betrachtung des protektiven Potenzials dieser Säfte mit der Folin-Ciocalteu-Methode ist zur Beurteilung des Polyphenolgehaltes unzureichend. Demgegenüber ist der Beitrag der Ascorbinsäure an den Gesamtphenolgehalten (~5 %) der Tees zu vernachlässigen und liegt innerhalb der Schwankungsbreite. Somit bietet die Bestimmung der Gesamtphenolgehalte eine gute Methode zur schnellen Einschätzung des protektiven Potenzials von Tees.

Die verschiedenen in vitro-Tests ergaben unterschiedliche Rangfolgen der Getränke bezüglich ihrer antioxidativen Aktivität. Tabelle 4.39 zeigt die antioxidative Aktivität der Getränke im TEAC-Test, im DPPH-Test und im DMPD-Test sowie den jeweiligen Beitrag der Ascorbinsäure zu dem antioxidativen Potenzial.

Tabelle 4.39: Antioxidative Aktivität als TEAC [mmol/l], und Anteil der Ascorbinsäure daran als $TEAC_{Ascorbinsäure}$ [mmol/l] in den Getränken im TEAC II-, TEAC III-Test (hydrophil und lipophil), DPPH-Test und DMPD-Test

		TEAC II	TEAC III hydrophil	TEAC III lipophil	DPPH	DMPD
SJS	**TEAC**	54,70	38,33	49,28	130,28	138,85
	$TEAC_{Ascorbinsäure}$	13,54	4,22	15,59	14,08	48,81
SJN	**TEAC**	13,13	6,44	8,58	55,83	49,90
	$TEAC_{Ascorbinsäure}$	2,58	0,81	2,97	2,68	9,29
Grüner Assam	**TEAC**	7,56	4,41	9,69	16,33	3,31
	$TEAC_{Ascorbinsäure}$	0,33	0,10	0,38	0,34	1,18
Schwarzer Assam	**TEAC**	7,43	3,88	7,50	16,82	2,35
	$TEAC_{Ascorbinsäure}$	0,21	0,07	0,24	0,22	0,76
Schwarzer Darjeeling	**TEAC**	6,67	5,76	7,70	16,72	2,05
	$TEAC_{Ascorbinsäure}$	0,18	0,06	0,21	0,19	0,66
Grüner Darjeeling	**TEAC**	6,76	5,11	7,82	17,02	3,35
	$TEAC_{Ascorbinsäure}$	0,33	0,10	0,39	0,35	1,21
AS_a	**TEAC**	5,11	4,36	3,02	6,86	8,59
	$TEAC_{Ascorbinsäure}$	1,75	0,55	2,02	1,82	6,32
AS_b	**TEAC**	3,63	2,64	4,91	8,40	8,35
	$TEAC_{Ascorbinsäure}$	0,43	0,13	0,49	0,44	1,53
TS_a	**TEAC**	4,79	0,68	1,33	1,39	8,81
	$TEAC_{Ascorbinsäure}$	0,50	0,15	0,54	0,49	1,70
TS_b	**TEAC**	2,15	0,49	1,10	1,46	7,70
	$TEAC_{Ascorbinsäure}$	0,42	0,13	0,49	0,44	1,53

Die untersuchten Getränke, mit Ausnahme der Tomatensäfte, hatten in allen Varianten des TEAC-Tests vergleichbare antioxidative Aktivitäten. Ascorbinsäure hatte im DMPD-Test die stärkste antioxidative Wirksamkeit, was sich in den relativen hohen Anteilen der Ascorbinsäure am antioxidativen Potenzial der Getränke im DMPD-Test widerspiegelt. Selbst niedrige Ascorbinsäurekonzentrationen in den Tees waren für ungefähr ein Drittel der Aktivität verantwortlich, was dem relativen Anteil der Ascorbinsäure am antioxidativen Potenzial des schwarzen Johannisbeersaftes entspricht. Die antioxidative Aktivität im DPPH-Test war sowohl für die Tee-Extrakte (16,33 - 17,02 mmol/l) als auch die Tomatensäfte (1,39 - 1,46 mmol/l) jeweils innerhalb der Getränkegruppe vergleichbar. Der Anteil der Ascorbinsäure an der antioxidativen Aktivität der Tee-Extrakte in dem DPPH-Test lag bei 2 %. Die bereits beschriebene schwache Wirksamkeit der Ascorbinsäure in der hydrophilen Version des TEAC III-Tests spiegelt sich auch in den Anteilen der Ascorbinsäure an dessen TEAC in allen Getränken wider. Der Beitrag der Ascorbinsäure an den TEAC-Werten ermittelt mit den TEAC II- und TEAC III-Tests (lipophile Version) war hingegen für alle Getränke vergleichbar.

5 Diskussion

5.1 Untersuchungen zu Teepolyphenolen

5.1.1 Einfluss von Herkunft, Sorte, Temperatur und Anzahl der Extraktionsvorgänge

Die vier grünen Tee-Extrakte und die 14 schwarzen Tee-Extrakte unterschieden sich nicht signifikant in ihren Gesamtphenolgehalten und in ihrer antioxidativen Aktivität. Die zwei Oolong-Tee-Extrakte zeigten signifikant niedrigere Gesamtphenolgehalte und antioxidative Aktivität.

SINGLETON und ROSSI [1965] erläuterten in der Originalarbeit der Folin-Ciocalteu-Methode die Interaktionen zwischen Folin-Ciocalteu-Reagenz bzw. Folin-Denis-Reagenz und Reduktionsmitteln, z. B. Ascorbinsäure, Eisen(II)-Ionen und Schwefeldioxid. Diese Interferenzen sind bei dem Einsatz des Folin-Denis-Reagenz stärker ausgeprägt, und deswegen bevorzugten die Autoren das Folin-Ciocalteu-Reagenz, das auch in den eigenen Untersuchungen eingesetzt wurde. SINGLETON [1973] schlägt die Bestimmung der Ascorbinsäure mit dem sogenannten Tillman's Reagenz vor, um so den Beitrag der Ascorbinsäure in der Folin-Ciocalteu-Methode zu ermitteln und zu subtrahieren. VINSON et al. [2001] stellten die Interferenzen des Folin-Ciocalteu-Reagenz mit Schwefeldioxid, das hauptsächlich in Wein und getrockneten Früchten vorkommt, fest. Somit ist diese Interferenz für die in dieser Arbeit untersuchten Tee-Extrakte unbedeutend. Die Reaktion von Zucker mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz ist bei einem basischen pH besonders ausgeprägt. Nach SINGLETON [1973] ist der Einfluss der reduzierenden Zucker bei Verwendung des Folin-Ciocalteu-Reagenz zu vernachlässigen. Die Interferenzen des Reagenz mit den genannten Reduktionsmitteln sind aufgrund der geringen Gehalte an Ascorbinsäure und Zucker in Tee zu vernachlässigen. Aus diesem Grund stellt die Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes von Tee-Extrakten einen Summenparameter zur schnellen Charakterisierung dar.

Der Einfluss von Sorte und Herkunft der 20 Teeproben wurde anhand der Parameter Gesamtphenolgehalte und antioxidative Aktivität beurteilt. Die Einteilung der Teesorten hinsichtlich ihrer Provenienzen ergab mit Hilfe der untersuchten Parameter Gesamtphenole und antioxidative Aktivität keinen eindeutigen Zusammenhang. FERNANDEZ et al. [2002] beurteilten den Einfluss von Herkunft und Sorte anhand von 13 Grüntees und 32 fermentierten Tees (Schwarz- und PuErh-Tee) der Provenienzen China, Japan, Kenia, Sri Lanka und Indien. Mit Hilfe der multivariaten Datenanalyse wurden die nichtfermentierten und fermentierten Tees anhand ihrer Gehalte an Gallussäure, Theobromin, Koffein und Teecatechinen unterteilt. Teeproben der gleichen Provenienzen lagen in vergleichbaren Bereichen. Somit reichten die

Anzahl der in der eigenen Studie eingesetzten Teeproben und die Analysen der zwei Parameter Gesamtphenole und antioxidative Aktivität für die Zuordnung nach Provenienzen nicht aus.

Das angewandte Extraktionsverfahren zur Herstellung der Tee-Extrakte wurde von LIEBERT et al. [1999] beschrieben und hinsichtlich verschiedener Aspekte überprüft. Die Autoren untersuchten Gesamtphenolgehalte und antioxidative Aktivität von grünen und schwarzen Tee-Extrakten bei Aufbrühzeiten von 0,5 min bis 10 min und zusätzlich mit und ohne Bewegen der Teeblätter. Die Gesamtphenolgehalte und die antioxidative Aktivität der Tee-Extrakte stiegen bei längeren Ziehzeiten und beim Bewegen der Teeblätter an. 70 - 80 % der nach 10 min extrahierten Polyphenole im Tee sind bereits nach 3 min Ziehzeit im Teegetränk enthalten [BÖHM 1999]. Bei einer Ziehzeit von 2 min war die Extraktion der Polyphenole ineffektiv und lag zwischen 35 - 55 % bezogen auf den Gesamtpolyphenolgehalt des Teeblattes (zweimalige, 10-minütige Extraktion von 0,2 g Teeblättern mit 70 %igen Methanol bei 70 °C) [LAKENBRINK et al. 2000].

Die Tee-Extrakte, die in dieser Arbeit diskutiert werden, wurden nach dem üblichen Extraktionsverfahren (1,3 g in 100 ml, Ziehzeit von 3 min) hergestellt. Die Extraktion der phenolischen Verbindungen mit der Aufbrühzeit von 3 min ist effektiv. Die Teeblätter wurden mit destilliertem Wasser aufgebrüht, da Wechselwirkungen zwischen zweiwertigen Ionen und den phenolischen Verbindungen in eigenen Untersuchungen festgestellt wurden. Zur Prüfung des Einflusses der Aufbrühtemperatur wurde sowohl mit siedendem destilliertem Wasser als auch mit auf 80 °C abgekühltem destilliertem Wasser aufgebrüht.

HENN und STEHLE [1998] beschrieben, wie in der eigenen Arbeit, vergleichbare Gesamtphenolgehalte und antioxidative Aktivität für 5 grüne und 18 schwarze Tee-Extrakte. Die beiden Oolong-Tee-Extrakte hatten niedrigere antioxidative Aktivität und Gesamtphenolgehalte als die grünen und schwarzen Tee-Extrakte. Die Anzahl der untersuchten Tees bei HENN und STEHLE [1998] stimmt in etwa mit der untersuchten Probenzahl der eigenen Untersuchungen überein.

KHOKHAR und MAGNUSDOTTIR [2002] zeigten signifikant niedrigere Gesamtphenolgehalte von 3 grünen Tee-Extrakten verglichen mit denen von 4 schwarzen Tee-Extrakten. Die höchsten Gesamtphenolgehalte hatte der schwarze Ceylon-Tee, der auch in der eigenen Arbeit hohe Gesamtphenolgehalte aufwies. Die unterschiedliche statistische Aussage zu der eigenen Arbeit ist auf die geringere Anzahl an untersuchten Teesorten bei KHOKHAR und MAGNUSDOTTIR zurückzuführen.

MANZOCCO et al. [1998] beschrieben höhere Gesamtphenolgehalte eines grünen Tees verglichen mit Gesamtphenolgehalten eines schwarzen Tees. Die Aussage dieser Arbeit ist sehr begrenzt, da nur jeweils ein Tee untersucht wurde.

ROBINSON et al. [1997] untersuchten das antioxidative Potenzial von 2 grünen und 18 schwarzen Tee-Extrakten unter verschiedenen Aufbrühbedingungen mit Hilfe von Chemolumineszenz. In ihren Untersuchungen hatte der Ceylon-Tee-Extrakt höhere antioxidative Aktivität als der Darjeeling-Tee-Extrakt. Die Autoren untersuchten den Einfluss verschiedener Aufbrühtemperaturen (50, 20, 10 °C) auf die antioxidative Aktivität der Tee-Extrakte, wobei diese Temperaturen für die Teezubereitung unüblich sind. Die Extraktion der phenolischen Verbindungen stieg bei höheren Aufbrühtemperaturen.

LANGLEY-EVANS [2000] untersuchte einen Grüntee und zwei Schwarztees hinsichtlich ihres antioxidativen Potenzials mit dem FRAP-Test. Der grüne Tee zeigte signifikant höhere antioxidative Aktivität als der schwarze Tee. Lange Ziehzeiten bis zu 15 min bewirkten eine Steigerung des antioxidativen Potenzials. Die FRAP-Werte des Grüntees stiegen bei steigenden Temperaturen linear an.

VON GADOW et al. [1997] bestimmten die antioxidative Aktivität von Rooibos Tee (unfermentiert, halbfermentiert und fermentiert) und von grünem, Oolong- und schwarzem Tee mit dem DPPH-Test. Grüner Tee-Extrakt zeigte die stärkste antioxidative Wirkung gefolgt von dem unfermentierten Rooibos-Tee-Extrakt. Die fermentierten und halbfermentierten Rooibos-Tee-Extrakte sowie die schwarzen und die Oolong-Tee-Extrakte zeigten geringere Aktivität in dem DPPH-Test.

Die Mehrfachextraktion der grünen Tees, ein übliches Verfahren bei der Zubereitung von grünem Tee, wurde erstmals in den eigenen Untersuchungen durchgeführt. Die Gesamtphenolgehalte, die antioxidative Aktivität und die Gehalte der Catechine nahmen von Aufguss zu Aufguss ab. In den fünften Aufgüssen aller grünen Tee-Extrakte wurden ~20 % der Gesamtphenolgehalte und der antioxidativen Aktivität verglichen mit dem erstem Aufguss nachgewiesen. Cirka 10 % der Catechine des ersten Aufgusses waren in den fünften Aufgüssen enthalten.

HICKS et al. [1996] untersuchten den Einfluss der Mehrfachextraktion auf den Koffein- und Theobromingehalt in Grün-, Oolong- und Schwarz-Tee, wobei die Koffein- und Theobromingehalte von Aufguss zu Aufguss abnahmen. Bereits 69 % des Koffeins und 67 % des Theobromins waren mit der ersten Extraktion der grünen, Oolong- und schwarzen Tees extra-

hiert. Die Autoren analysierten die verschiedenen Aufgüsse der Tee-Extrakte nicht hinsichtlich ihrer Polyphenolgehalte.

ASTILL et al. [2001] untersuchten den Einfluss der Aufbrühtemperatur auf die Gesamtphenolgehalte in grünem und schwarzem Tee. Die niedrigere Aufbrühtemperatur für die Herstellung des grünen Teegetränks bewirkte eine verringerte Extraktion der phenolischen Verbindungen. Außerdem beeinflusste die Größe der Teeblätter die Effektivität der Extraktion. Aus den kleineren Teeblättern der schwarzen Tees wurden mehr phenolische Inhaltsstoffe extrahiert als aus den großen Teeblättern der grünen Tees.

Der in den eigenen Untersuchungen analysierte Assam CTC zeichnete sich durch ein feines Teeblatt aus und hatte höhere Gesamtphenolgehalte und antioxidative Aktivität als der Assam BOP mit einem größeren Teeblatt. Der grüne Ceylon, charakterisiert durch ein gut verarbeitetes Blatt, zeigte die höchsten Gesamtphenolgehalte, antioxidative Aktivität und Gehalte der Catechine der grünen Tees.

5.1.2 Tee aus einer Rohware - Grün- und Schwarztee

Für diese Untersuchungen standen zwei grüne und schwarze Darjeelings und ein grüner und schwarzer Assam aus jeweils identischen Teeblättern zur Verfügung. Üblicherweise ist ein Teegarten nur auf die Produktion einer Teesorte spezialisiert. Zur Herstellung der genannten Teesorten wurde in den jeweiligen Teegärten innerhalb einer Produktionswoche von Schwarztee- auf Grünteeproduktion umgestellt. Die in dieser Studie verwendeten Teeblätter stammen jeweils aus dieser einen Woche. Somit beruhen die in den Ergebnissen dargestellten Unterschiede in Gesamtphenolgehalten, antioxidativer Aktivität und Gehalten an Gallussäure und Catechinen auf den Unterschieden bei der Produktion von Grün- bzw. Schwarztee. Die grünen und schwarzen Tee-Extrakte zeigten eine große Spannbreite in Gesamtphenolgehalten, antioxidativer Aktivität und in ihren Gehalten an Gallussäure und Catechinen.

Die folgende Abbildung zeigt die Reaktionen der Catechine Epicatechin, Epicatechingallat und Catechin sowie der Gallocatechine Epigallocatechingallat und Epigallocatechin bei der Herstellung von Schwarztee.

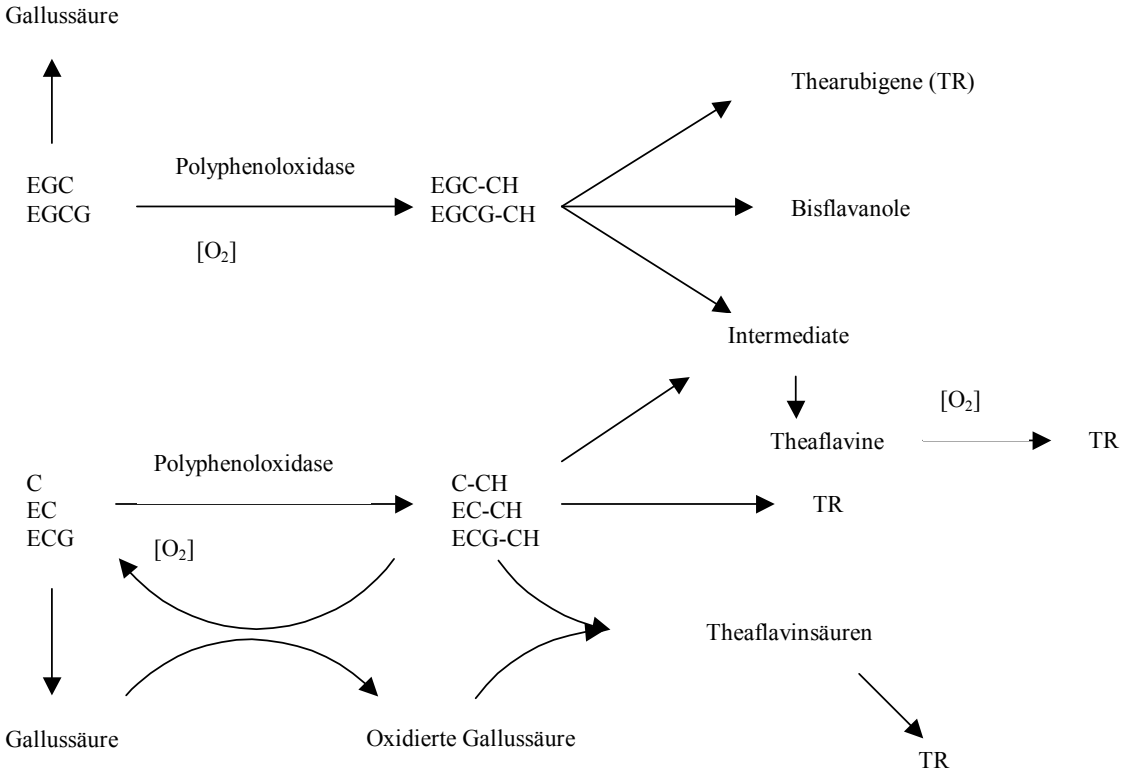


Abbildung 5.1: Reaktionen der Polyphenole bei der Herstellung von schwarzem Tee
[modifiziert nach ROBERTSON 1983a, GRAHAM 1992, KUHR 1993, OPIE et al. 1995]
EGC = Epigallocatechin, EGCG = Epigallocatechingallat, C = Catechin, EC = Epicatechin ECG = Epicatechin-gallat, CH = Chinon, TR = Thearubigene

Catechine bzw. Gallocatechine reagieren durch die Polyphenoloxidase zu den Chinonen, aus denen die höhermolekularen Theaflavine bzw. Theaflavingallate entstehen. Die farblosen Bisflavanole entstehen aus der Reaktion zweier Gallocatechine. Die Gallussäure ist kein Substrat für die Polyphenoloxidase. Die Phenolcarbonsäure entsteht u. a. aus der durch die Fermentation bedingte Abspaltung der Gallatreste der Flavanole. Die entstandene Gallussäure wird durch Catechin-Chinone zu Gallussäure-Chinonen oxidiert, die u. a. mit Epicatechin-Chinon zu der Epitheaflavinsäure reagieren können. Mit fortschreitender Oxidation nehmen die Gehalte der Theaflavine, Theaflavinsäuren und Bisflavanole ab, und es werden vorwiegend die höhermolekularen Thearubigene gebildet [ROBERTSON 1983a, GRAHAM 1992, KUHR 1993, OPIE et al. 1995].

In den eigenen Untersuchungen war Gallussäure in höheren Konzentrationen in den Schwarztees als in den Grüntees enthalten, was durch den Abbau der Gallatgruppen der Catechine bedingt war.

Nach Robertson [1983b] ist ein äquimolares Verhältnis zwischen Catechin und Gallocatechin in frischen Teeblättern optimal für die Bildung von Theaflavinen, da die Bildung von einem

Mol Theaflavin die Oxidation und Kondensation von einem Mol Gallocatechin und einem Mol Catechin benötigt. In grünen Teeblättern liegt zwischen Catechin und Gallocatechin ein niedrigeres molares Verhältnis vor. Die Gehalte an Catechinen variieren je nach Alter der Teeblätter. Die Konzentrationen an Epigallocatechingallat, Epicatechingallat und Epicatechin nehmen mit zunehmendem Alter ab, wohingegen die Konzentration von Epigallocatechin steigt.

Die Gehalte der Catechine nahmen von Grüntee zum Schwarztee in Folge der Fermentation ab. In den grünen Tee-Extrakten dominierte Epigallocatechingallat, gefolgt von Epigallocatechin. Die Verhältnisse zwischen Catechinen (C) und Gallocatechinen (GC) waren in dem grünen Darjeeling-Tee-Extrakt A (C : GC = 0,30 : 1), dem grünen Darjeeling-Tee-Extrakt B (C : GC = 0,35 : 1) und dem grünen Assam-Tee-Extrakt (C : GC = 0,48 : 1) vergleichbar. Durch die Fermentation zu den schwarzen Darjeelings A und B veränderte sich dieses Verhältnis in den Tee-Extrakten unwesentlich (A schwarz, C : GC = 0,45 : 1, B schwarz, C : GC = 0,38 : 1). 43 % der Catechine des grünen Darjeeling A wurden in dem schwarzen Darjeeling A nachgewiesen und 56 % der Catechine des grünen Darjeeling B in dem entsprechenden schwarzen Tee-Extrakt. Demgegenüber veränderte sich das Verhältnis zwischen Catechinen und Gallocatechinen zugunsten der Catechine in dem schwarzem Assam deutlich (C schwarz, C : GC = 3,15 : 1). Dieses Verhältnis resultiert aus dem anderen, bei dem schwarzen Assam angewandten, Fermentationsverfahren, dem sogenannten CTC-Verfahren.

ASTILL et al. [2001] untersuchten ebenfalls Grün- und Schwarztee aus identischen Teeblättern. Ihre Untersuchungen ergaben ebenfalls eine Reduktion von Catechinen bei der Schwarzteeproduktion. Besonders das CTC-Verfahren (C = Crushing, T = Tearing, C = Curling) bewirkte aufgrund der starken Zerkleinerung der Teeblätter eine starke Oxidation, die zu einem fast völligen Abbau der Catechine führte. Hingegen führte das orthodoxe Herstellungsverfahren, das durch eine schwächere Fermentation gekennzeichnet ist, zu einem hohen Gehalt an Catechinen in Schwarztee. Bei den schwarzen Darjeelings der eigenen Arbeit wurde ein orthodoxes Fermentationsverfahren angewandt.

Der schwarze Assam C hatte dennoch vergleichbare Gesamtphenolgehalte und antioxidative Aktivität wie der grüne Assam und der grüne Darjeeling. Dies ist auf die durch die Fermentation entstandenen Theaflavine zurückzuführen, die ebenfalls antioxidative Wirksamkeit besitzen [WISEMAN et al. 1997]. Gallussäure wurde in allen grünen und schwarzen Tee-Extrakten nachgewiesen. Der schwarze Assam enthielt die höchsten Gehalte an Gallussäure vergli-

chen mit den anderen Tee-Extrakten. Die antioxidative Wirkung von Gallussäure wurde von ARUOMA et al. [1993] beschrieben.

LAKENBRINK et al. [2000] untersuchten den Einfluss der Schwarzteeherstellung auf die Gesamtphenolgehalte, Gehalte der Catechine, Theaflavin- und Thearubigengehalte der Teeblätter. Das CTC-Verfahren bewirkte ebenfalls eine starke Reduktion der Catechingehalte und eine Erhöhung der Thearubigengehalte.

LEUNG et al. [2001a] untersuchten die antioxidative Aktivität grüner und schwarzer Tee-Extrakte und deren Einzelsubstanzen mit der LDL-Oxidation und dem Thiobarbitursäure-Test. Die phenolischen Verbindungen zeigten unterschiedliche antioxidative Wirksamkeit in folgender Reihenfolge: Theaflavin-3-,3'digallat > Epicatechingallat > Epigallocatechingallat ≥ Theaflavin-3'-gallat ≥ Theaflavin-3-gallat > Epicatechin > Epigallocatechin. Somit war die antioxidative Wirksamkeit von grünen und schwarzen Teepolyphenolen vergleichbar.

5.1.3 Tee aus einer Rohware - Grün-, Oolong- und Schwarztee

Zur Untersuchung des Einflusses des Herstellungsverfahrens auf die Parameter Gesamtphenolgehalte, antioxidative Aktivität und Gehalte an Gallussäure und Catechinen standen Grün-, Oolong- und Schwarztee aus zwei Provenienzen zur Verfügung.

Innerhalb der Darjeeling-Tee-Extrakte zeigten der grüne und der schwarze Tee-Extrakt second flush vergleichbare Gesamtphenolgehalte, FRAP- und TEAC-Werte. 70 % der Catechine des grünen Darjeeling-Tee-Extraktes wurden in dem schwarzen Darjeeling-Tee-Extrakt second flush, 51 % in dem schwarzen Darjeeling-Tee-Extrakt first flush und 44 % in dem Oolong-Tee-Extrakt nachgewiesen. Somit waren die Gehalte der Catechine des Oolong-Tee-Extraktes und des schwarzen Darjeeling-Tee-Extraktes first flush vergleichbar. Dennoch ergaben der FRAP- und der TEAC-Wert des Oolong-Tee-Extraktes niedrigere Werte als beim schwarzen Tee-Extrakt. Dies kann auf die durch die vollständige Fermentation entstandenen antioxidativ wirksamen Theaflavine in dem schwarzen Tee zurückgeführt werden. Die Konzentration an Gallussäure war in dem Oolong-Tee-Extrakt und in den beiden schwarzen Tee-Extrakten vergleichbar, aber in allen Fällen höher als im grünen Tee-Extrakt.

Der grüne China-Tee-Extrakt zeigte höhere Gesamtphenolgehalte, FRAP- und TEAC-Werte und Gehalte der Catechine gegenüber dem schwarzen Tee-Extrakt Nr. 2. Die Oolong-Tee-Extrakte Nr. 1 und Nr. 2 aus China hatten niedrigere Gesamtphenolgehalte, antioxidative Aktivität, Gallussäure- und Gehalte der Catechine als der Darjeeling-Oolong-Tee-Extrakt. Die Gehalte der Catechine des schwarzen Tee-Extraktes Nr. 1 waren niedriger als die des Oolong-

Tee-Extraktes Nr. 2. Die höhere antioxidative Aktivität des schwarzen Tee-Extraktes Nr. 1 ist auf die durch die Fermentation entstandene Gallussäure zurückzuführen. Der Oolong-Tee-Extrakt Nr. 2 und der schwarze Tee-Extrakt Nr. 2 hatten ähnliche Gehalte an Catechinen.

In der Literatur sind bis jetzt keine Daten zu Grün-, Oolong- und Schwarztee aus einer Rohware beschrieben.

ARTS et al. [2000] zeigten eine große Spannbreite in den Gehalten an Catechinen von schwarzen Tee-Extrakten. KUHR und ENGELHARDT [1991] stellten ebenfalls unterschiedliche Gehalte an Catechinen in schwarzen Tee-Extrakten fest, wobei ein Oolong-Tee-Extrakt vergleichbare Gehalte an Catechinen aufwies wie die schwarzen Tee-Extrakte. In der eigenen Arbeit besaß ein schwarzer Tee-Extrakt niedrigere Catechingehalte als ein Oolong-Tee-Extrakt.

Grüne, Oolong- und schwarze Tee-Extrakte fangen Superoxidanionen ab, wobei die Aktivität von Oolong-Tee-Extrakt stärker war als die von grünem und schwarzem Tee-Extrakt. Bei dem DPPH-Test zeigte der grüne Tee-Extrakt größeres antioxidatives Potenzial als der Oolong-Tee-Extrakt gefolgt von dem schwarzen Tee-Extrakt [YEN und CHEN 1995]. Aus diesem Grund sind diese Ergebnisse nicht ohne weiteres mit den eigenen Untersuchungen vergleichbar, da diese grünen, Oolong- und schwarzen Tees von YEN und CHEN [1995] nicht aus einer Rohware stammten.

STANDLEY et al. [2001] untersuchten den Einfluss der einzelnen Verfahrensschritte bei der Herstellung von schwarzem Tee verglichen mit unfermentiertem, dampfpasteurisiertem und sonnengetrocknetem Tee. Der unfermentierte Tee zeigte in dem DPPH-Test eine stärkere wasserstoffabgebende Wirkung als die Tees der anderen Verfahrensstufen. Der dampfpasteurisierte Tee bewies eine signifikant höhere antioxidative Wirksamkeit als der fermentierte und der sonnengetrocknete Tee.

XIE et al. [1993] beschrieben höhere Gehalte an Catechinen in Oolong-Tee als in grünem Tee und schwarzem Tee. Das angewandte Aufbrühregime mit 100 g Teeblättern in 300 ml kochendem Wasser 15 h geschüttelt ist unüblich und nicht direkt mit den eigenen Untersuchungen zu vergleichen. Der schwarze Tee-Extrakt enthielt hohe Mengen an Theaflavinen und Thearubigenen.

CHEN et al. [2001] untersuchten die Gehalte an Catechinen in grünem, Oolong- und schwarzen Tee-Extrakten und in industriell hergestellten Teegetränken (Tee-Extrakt in Dosen bzw. Flaschen). Diese Tees stammten nicht aus identischer Rohware. Die Autoren stellten den Tee-

Extrakt durch dreimaliges Aufbrühen von 10 g Teeblättern in je 140 ml auf 80 °C abgekühltem, destilliertem Wasser her [ZHANG et al. 1997]. Die höchsten Gehalte an Catechinen enthielten die grünen Tee-Extrakte, gefolgt von den Oolong- und schwarzen Tee-Extrakten. Die industriell hergestellten Teegetränke aus Japan zeigten höhere Gehalte der Catechine als die anderen Tee-Extrakte und Teegetränke. Das Catechin-Verhältnis innerhalb des grünen Teegetränks unterschied sich von dem grünen Tee-Extrakt. Das Autoklavieren und die Sterilisation des Teegetränks infolge des Herstellungsprozesses führte zu einer Epimerisierung von Epigallocatechingallat zu Gallocatechingallat [CHEN et al. 2001].

Die molaren Verhältnisse zwischen Catechinen und Gallocatechinen in den grünen, Oolong- und schwarzen Tee-Extrakten beider Provenienzen werden im folgenden diskutiert. Nach ROBERTSON [1983b] ist, wie bereits erläutert, ein äquimolares Verhältnis zwischen Catechin und Gallocatechin in frischen Teeblättern optimal für die Bildung von Theaflavinen (s. 5.1.2). Das Verhältnis zwischen Catechin und Gallocatechin war in dem grünen Darjeeling-Tee-Extrakt (C : GC = 0,74 : 1) und in dem grünem Tee-Extrakt aus China (C : GC = 0,37 : 1) jeweils kleiner als 1 : 1. Dieses Verhältnis ist mit den Tee-Extrakten der grünen Darjeelings und des grünen Assams (s. 5.1.2) vergleichbar. In dem schwarzen Tee-Extrakt Nr. 1 aus China verschob sich dieses Verhältnis unwesentlich (C : GC = 0,46 : 1) und lag in einem entsprechenden Bereich mit den schwarzen Darjeeling-Tee-Extrakten (s. 5.1.2). Demgegenüber hatte sich das molare Verhältnis zwischen Catechinen und Gallocatechinen zugunsten der Catechine verschoben und war äquimolar in dem Oolong-Tee-Extrakt und dem schwarzen Darjeeling-Tee-Extrakt first flush. In den Oolong-Tee-Extrakten und dem schwarzen Tee-Extrakt Nr. 2 aus China sowie in dem schwarzen Darjeeling-Tee-Extrakt second flush lag ein Überschuss an Catechinen vor (C : GC ~ 1,4 : 1).

Die grünen Tee-Extrakte aus Darjeeling, Assam und China (s. 4.1.4. und 4.1.5) enthielten deutlich niedrigere Catechinkonzentrationen als die grünen Tees der ersten Untersuchungen (s. 4.1.3). Die Spannbreite an Gehalten der Catechine in grünem Tee liegt laut ENGELHARDT [1999] zwischen 5 und 20 % und in schwarzem Tee bei 1 - 10 %. Catechine werden sowohl in grünem als auch in schwarzem Tee nachgewiesen, sie liegen generell in grünem Tee in höheren Konzentrationen vor [KUHR 1993].

Der Oolong-Darjeeling-Tee-Extrakt enthielt deutlich mehr Catechine als die Oolong-Tee-Extrakte aus China, was auf eine unterschiedliche Verarbeitung zurückgeführt werden kann. KUHR [1993] stellte ebenfalls deutliche Unterschiede im Catechingehalt von Oolong-Tees unterschiedlicher Provenienzen fest.

LIN et al. [1998] beschreiben eine Abnahme der Gehalte der Catechine infolge der Herstellung von Oolong-Tee und eine Zunahme der Gallussäurekonzentration. In den eigenen Untersuchungen nahmen die Gehalte der Catechine in den Oolong-Tee-Extrakten ebenfalls ab, bezüglich der Gallussäure wurde sowohl eine Abnahme als auch eine Zunahme festgestellt.

5.1.4 Anteil der Catechine am antioxidativen Potenzial

Aus den TEAC-Werten der einzelnen Catechine wurde über deren Gehalte in den Teesorten ihr Anteil am antioxidativen Potenzial der Tee-Extrakte berechnet. Mittels der Kalibriergeraden der einzelnen Catechinstandardsubstanzen war eine Kalkulation des TEAC-Wertes für die Tee-Extrakte möglich.

In den ersten Untersuchungen waren die kalkulierten Werte vergleichbar mit den TEAC-Werten der entsprechend den HPLC-Ergebnissen zusammengesetzten Catechinmischungen. Sie lagen aber deutlich höher als die gemessenen TEAC-Werte der vier grünen Tee-Extrakte. Die antioxidativen Aktivitäten der Tee-Extrakte betrugen 10 - 20 % der jeweils kalkulierten TEAC-Werte (s. 4.1.3).

In den zweiten Untersuchungen waren die TEAC-Werte der grünen, des Darjeeling-Oolong- und der schwarzen Tee-Extrakte sowohl höher als der TEAC-Wert der Catechinmischung als auch höher als die kalkulierten, aus den flüssigchromatographischen Catechingehalten ermittelten, TEAC-Werte. Der Anteil der Catechine an dem protektiven Potenzial dieser grünen Tees lag bei ~46 %. Somit stehen die hier vorgestellten Ergebnisse im Widerspruch zueinander. Die Gehalte an Catechinen dieser grünen, Oolong- und schwarzen Tee-Extrakte waren deutlich niedriger als die der vier grünen Tee-Extrakte.

Die Korrelation zwischen den Catechingehalten und den kalkulierten TEAC-Werten war für die 6 untersuchten grünen Tee-Extrakte und eine selbsthergestellte Catechinmischung in den eigenen Untersuchungen gut ($r = 0{,}9955$). Bei der Zugabe dieser Catechinmischung zu zwei grünen Tee-Extrakten ergab sich eine Addition der antioxidativen Aktivitäten resultierend aus der antioxidativen Aktivität der Catechinmischung und der des Tee-Extraktes. Theanin und Koffein zeigten keine Wirkung in dem TEAC I-Test und der Zusatz von einer Theanin- bzw. Koffeinlösung zu den Catechinmischungen veränderte deren antioxidative Aktivität nicht.

In der Literatur wurden bisher beide Ergebnisse beschrieben. FRANKEL et al. [1997] zeigten im Lipidsystem ebenfalls niedrigere antioxidative Aktivität von grünen Tee-Extrakten verglichen mit vergleichbaren Catechinlösungen. Die Autoren führten dieses Ergebnis auf antagonistische Wechselwirkungen zwischen Teecatechinen und anderen Tee-Inhaltsstoffen, z. B.

Pheophytinen, Metallen und Koffein, zurück. Die Wirkungen dieser Tee-Inhaltsstoffe auf die antioxidative Wirkung untersuchten die Autoren in dem Lipidsystem nicht. Sie sahen dringenden Forschungsbedarf in der antioxidativen Wirkung von Nicht-Catechin-Verbindungen in Tee-Extrakten.

RICE-EVANS et al. [1996] ermittelten einen 73 - 78 %igen Anteil der Catechine an dem protektiven Potenzial des Tee-Extraktes. Der kalkulierte TEAC-Wert und der analysierte TEAC-Wert der Mischung waren vergleichbar und 22 - 27 % niedriger als der TEAC-Wert des Tee-Extraktes. Den größten Beitrag an dem protektiven Potenzial hatten Epigallocatechin und Epigallocatechingallat. In den eigenen Untersuchungen hingegen leistete nur Epigallocatechin den höchsten Beitrag. Catechin besaß sowohl bei RICE-EVANS et al. [1996] als auch in der eigenen Arbeit einen geringen Anteil an dem antioxidativen Potenzial. Die Wirksamkeit der einzelnen Catechine war in den eigenen Untersuchungen in folgender Reihenfolge abzustufen: Epigallocatechin ≅ Epicatechingallat > Epicatechin > Epigallocatechingallat ≅ Catechin. Demgegenüber zeigten RICE-EVANS et al. [1996] die stärkste Wirksamkeit für Epigallocatechin, Epicatechingallat und Epigallocatechingallat.

Der verbleibende Teil der antioxidativen Aktivität der grünen Tee-Extrakte könnte auf nicht-polyphenolische Fraktionen des grünen Tees zurückgeführt werden, die möglicherweise antioxidative Wirksamkeit aufweisen. Untersuchungen zu nicht-polyphenolischen, lipidlöslichen Fraktionen des grünen Tees wurden bislang nur von HIGASHI-OKAI et al. [2000] bzw. OKAI und HIGASHI-OKAI [1997] durchgeführt. Zu den nicht-polyphenolischen Verbindungen zählen die Chlorophylle, Pheophytine, β-Carotin und Lutein. Die antioxidative Wirkung dieser nicht-polyphenolischen Verbindungen gegen die Bildung von Wasserstoffperoxid verläuft in folgender Reihenfolge: Chlorophyll a > Lutein > Pheophytin a > Chlorophyll b > β-Carotin > Pheophytin b [HIGASHI-OKAI et al. 2001].

RECORD und LANE [2001] stellten ebenfalls analoge Bereiche für die kalkulierten TEAC-Werte und die analysierten TEAC-Werte der Mischungen fest. Aber im Gegensatz zu FRANKEL et al. [1997] und zu den ersten eigenen Untersuchungen (s. 4.1.3) wiesen die Autoren höhere antioxidative Aktivität von grünen und schwarzen Tee-Extrakten verglichen mit der kalkulierten antioxidativen Aktivität von Polyphenolmischungen nach, was bei den Tees aus einer Rohware in der eigenen Arbeit bestätigt wurde (s. 4.1.5). Die Autoren untersuchten die antioxidative Aktivität mit dem FRAP-Test und Epicatechingallat zeigte stärkste antioxidative Wirksamkeit, gefolgt von Epigallocatechingallat. Die niedrigste antioxidative Wirkung wiesen Epigallocatechin und Epicatechin auf.

In den eigenen Untersuchungen zeigte Catechin den höchsten FRAP-Wert gefolgt von Epicatechingallat. Epigallocatechingallat und Epigallocatechin reagierten vergleichbar und schwächer als Epicatechingallat. Epicatechin besaß den niedrigsten FRAP-Wert. Die Reihenfolge stimmte mit der von RECORD und LANE [2001] überein. Die Autoren untersuchten die antioxidative Wirkung von Catechin in dem FRAP-Test nicht und bestimmten diese Substanz auch nicht flüssigchromatographisch.

UNNO et al. [2002] untersuchten die antioxidative Wirkung von Teecatechinen, grünem Tee-Extrakt und einer Catechinmischung mit Elektronenspinresonanz. Die stärkste Radikalfängereigenschaft hatte Epigallocatechingallat, gefolgt von Epigallocatechin, Epicatechingallat und Epicatechin. 86 % des protektiven Potenzials des Tee-Extraktes sind auf die Catechine zurückzuführen, wobei Epigallocatechingallat (48 %) und Epigallocatechin (26 %) den größten Beitrag leisten.

Der Anteil der Catechine an der antioxidativen Aktivität von Tee-Extrakten lag in einer weiteren Studie für den grünen Tee-Extrakt bei 77 % und bei dem schwarzen Tee-Extrakt bei 47 % [GARDNER et al. 1998]. In den eigenen Untersuchungen lag der Beitrag der Catechine an dem antioxidativen Potenzial der schwarzen Tee-Extrakte bei 32 %. Der restliche Teil der antioxidativen Aktivität ist auf die durch die Fermentation entstandenen Theaflavine zurückzuführen, die ebenfalls antioxidative Wirksamkeit zeigen [LEUNG et al. 2001a, WISEMAN et al. 1997].

Untersuchungen zum Einfluss von grünem Tee-Extrakt, Catechinen und einer Catechinmischung auf die durch einen Radikalbildner induzierten Proteinschäden wurden von NAKAGAWA et al. [2002] durchgeführt. Epicatechin und Catechin inhibierten die Entstehung von glycosilierten Produkten schwächer als Epigallocatechingallat und Epicatechingallat. Die Catechinmischung zeigte stärkere antioxidative Wirksamkeit als der Tee-Extrakt, wobei Koffein und Theanin die Bildung der glycosilierten Proteine schwach behinderten. In den eigenen Messungen zeigten diese beiden Tee-Inhaltsstoffe keine antioxidative Wirkung.

In den eigenen Untersuchungen lag bei den grünen Tee-Extrakten aus einer Rohware (s. 4.1.5) der Anteil der Catechine an dem protektiven Potential der grünen Tee-Extrakte bei ~46 %.

Die antioxidative Aktivität der Oolong-Tee-Extrakte aus China ist hauptsächlich auf die Catechine zurückzuführen, da die kalkulierten TEAC-Werte und die TEAC-Werte des Tee-Extraktes vergleichbar waren. Der Beitrag der Catechine an dem antioxidativen Potenzial des Darjeeling-Oolong-Tees liegt in den eigenen Untersuchungen ungefähr bei der Hälfte der

antioxidativen Aktivität. Die andere Hälfte der antioxidativen Aktivität ist auf die durch die Fermentation entstandenen Kondensationsprodukte wie z. B. Theaflavine zurückzuführen, die auch antioxidative Wirksamkeit zeigen [LEUNG et al. 2001a].

ZHU et al. [2002] untersuchten die antioxidative Aktivität von nach dem Molekulargewicht getrennten Fraktionen von Oolong-Tee. Die Fraktion mit einem Molekulargewicht unter 1 kDA zeigte starke antioxidative Wirksamkeit und die Autoren führten dies auf die Catechine zurück.

Die niedrigere antioxidative Aktivität der vier grünen Tee-Extrakte ist vermutlich auf antagonistische Wirkungen mit anderen Tee-Inhaltsstoffen zurückzuführen, die zum heutigen Zeitpunkt nicht genauer spezifiziert werden können.

5.2 In vitro-Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen

5.2.1 Einsatz der Standardsubstanzen

Die Untersuchungen der Versuchsreihe I zeigten einen deutlichen Abfall der Eisen- und Gesamtphenolgehalte, der Konzentration von Catechin sowie der antioxidativen Aktivität im Verlauf der Diffusion der Ansätze in einem molaren Verhältnis von Catechin zu zweiwertigem Eisen von 3,4 : 1 und von Catechin und dreiwertigem Eisen von 4 : 1. Bei beiden Ansätzen sank der Eisengehalt nach der Diffusion um ~80 %. Cirka 70 % der Gesamtphenole und der antioxidativen Aktivität wurden nach der Diffusion nachgewiesen. Alle Proben der Versuchsreihe I färbten sich nach Zugabe der Eisensalze sofort blau-schwarz.

DISLER et al. [1975b] beschrieben die blau-schwarze Farbentwicklung nach Mischung von Eisen mit pflanzlichen Lebensmitteln aufgrund der Bildung eines Eisen-Polyphenol-Komplexes. Die Entwicklung dieser intensiven Farbe stellten JOVANOVIC et al. [1998] bei der Herstellung von Lösungen aus Gallocatechinen und Eisensulfat bzw. Eisenchlorid fest. Die Autoren beschrieben Komplexe bestehend aus dreiwertigem Eisen und drei Molekülen Catechin, deren Stabilität bei pH 7 besonders ausgeprägt war. Des weiteren wiesen JOVANOVIC et al. [1998] die Bildung eines Eisen-Polyphenol-Komplexes und den daraus resultierenden Verlust der antioxidativen Wirkung der Gallocatechine nach. Sie begründen den Verlust der antioxidativen Aktivität mit dem hohen Oxidationspotential der Komplexe bei pH 7,0 und den nicht eintretenden reversiblen Ein-Elektronen-Redoxreaktionen.

Die antioxidative Aktivität sank bei den Ansätzen mit einem molaren Verhältnis von Catechin zu Eisen (3,1 : 1 bzw. 4 : 1) signifikant nach der Diffusion. Somit geht die antioxidative Wirksamkeit der Eisen-Polyphenol-Komplexe verloren.

Aufgrund der nicht verfügbaren Standardsubstanzen für Polyphenole des schwarzen Tees wurde in dieser in vitro-Studie auf die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen aus schwarzem Tee bzw. schwarzem Tee-Extrakt und Eisen verzichtet.

BRUNE et al. [1989] untersuchten die Wirkung von Standardsubstanzen wie z. B. Gallussäure, Catechin, Chlorogensäure und Tanninsäure auf die Behinderung der Nicht-Hämeisenaufnahme beim Menschen. Gallussäure und Chlorogensäure zeigten eine inhibierende Wirkung auf die Eisenabsorption. 5 mg, 25 mg bzw. 100 mg Tanninsäure reduzierten dosisabhängig die Eisenabsorption um 20 %, 67 % bzw. 88 %. Die Autoren erkannten eine Beziehung zwischen dem errechneten Gehalt an Galloylgruppen des eingesetzten Testmahles und deren inhibierendem Effekt auf die Eisenabsorption. Sie verglichen die Fähigkeit der Eisenhemmung von Tanninsäure (M = 1701 g/mol) und Gallussäure (M = 170 g/mol) in Abhängigkeit von der Anzahl der Galloylgruppen. Tanninsäure besitzt zehn Galloylgruppen und hemmt somit die Eisenabsorption zehnmal stärker als Gallussäure, die nur eine Galloylgruppe aufweist. Catechin wurde kein Hemmeffekt zugesprochen, was im Widerspruch zu den eigenen Untersuchungen steht. Die Autoren führten dies auf die Unlöslichkeit des Catechins in Wasser zurück, die eine Komplexbildung verhindert. Die eigene Studie zeigte eine gute Löslichkeit von Catechin in Wasser. Auch HURRELL et al. [1999] zweifelten an der Hypothese des fehlenden Hemmeffekts von Catechin auf die Nicht-Hämeisenaufnahme. Die Autoren wiesen in vivo catechinhaltigen Getränken, wie Kakao und rotem Wein, Hemmeffekte auf die Aufnahme von pflanzlichem Eisen nach.

LUCARINI et al. [2000] beschrieben in vitro bei Zusatz von Rotwein zu Broccoli und zu Kartoffeln eine Zunahme der Gesamtphenolgehalte und eine darauf zurückführende Abnahme der Verfügbarkeit von Eisen bei Broccoli um 45 % und bei Kartoffeln um 25 %.

RECORD et al. [1996] stellten bei Ratten keinen Einfluss des Konsums von grünem bzw. schwarzem Tee auf die Eisenaufnahme aus der Nahrung fest.

5.2.2 Einsatz von Tee-Extrakten und Eisensalz

Die Ansätze der Versuchsreihe II wiesen sowohl für die China Gunpowder-Extrakt- als auch für die Ceylon Pekoe-Extrakt-Ansätze eine Hemmung der Eisenabsorption um 90 % auf. Des weiteren sanken die Gesamtphenole nach der Diffusion um 25 %, und die antioxidative Akti-

vität fiel um 10 %. Nach Zugabe des Eisensalzes zu den Tee-Extrakten stellte sich die für Eisen-Polyphenol-Komplexe charakteristische blau-schwarze Färbung ein. Epigallocatechingallat und Epicatechingallat mit den höchsten Konzentrationen im Tee-Extrakt zeigten einen signifikanten Abfall im Verlauf des Diffusionsprozesses. Die Gehalte der anderen Catechine Epigallocatechin, Catechin und Epicatechin sanken auch nach der Diffusion, wobei diese Konzentrationsänderungen nicht signifikant gegenüber der Konzentration vor der Diffusion waren.

GILLOOLY et al. [1983] dokumentieren eine inverse Korrelation zwischen dem Gesamtpolyphenolgehalt von Gemüse und der Eisenabsorption. Die Verfasser zeigten bei Zugabe einer Eisenchloridlösung zu Gemüse, das mit einer niedrigen Eisenaufnahme in Zusammenhang gebracht wird, die Ausbildung der blau-schwarzen Farbe.

DISLER et al. [1975a] beschrieben bei Menschen die Behinderung der Eisenaufnahme aus Eisenchloridlösungen bei gleichzeitigem Konsum von 200 ml schwarzem Tee. In den eigenen Untersuchungen wurden die Wechselwirkungen zwischen Eisenchlorid bzw. pflanzlichem Eisen und Teepolyphenolen überprüft.

ZEYUAN et al. [1998b] wiesen ebenfalls in Untersuchungen an Ratten einen hemmenden Effekt der Grüntee-Extrakte und auch der Grüntee-Blätter auf die Absorption und die Verfügbarkeit von Eisen nach, wobei diese Wirkung bei Gabe von schwarzem Tee-Extrakt bzw. schwarzen Teeblättern noch stärker war. Die Autoren führten dies auf das unterschiedliche Polyphenolspektrum in grünen und schwarzen Tees zurück.

Der Genuss von Grüntee-Extrakten während einer Mahlzeit führte zu einer signifikanten Verringerung der Nicht-Hämeisenresorption. SAMMAN et al. [2001] schlussfolgern daraus, dass der Einsatz von polyphenolreichen Extrakten als Antioxidantien in Nahrungsmitteln immer mit einer Verringerung der Nutzbarkeit des pflanzlichen Nahrungseisens einhergeht.

MACPHAIL et al. [1981] untersuchten, ob der stabile Fe(III)-EDTA-Komplex vor den eisenabsorptionshemmenden Liganden geschützt ist. Die Absorption des Komplexes wurde nicht durch phytathaltigen Mais- oder Kleiebrei inhibiert, während polyphenolreicher Tee die Resorption des Eisens aus dem Komplex um 85 % verringerte.

Die in den eigenen Untersuchungen eingesetzten Tee-Extrakte enthielten die Catechine Epicatechingallat, Epigallocatechin und Epigallocatechingallat, welche ebenfalls Galloylgruppen besitzen. Vor allem die Konzentrationen von Epicatechingallat und Epigallocatechingallat wiesen nach der Diffusion durch die Ultrafiltrationsmembran erniedrigte Gehalte auf. Diese

Veränderungen resultieren aus Komplexbildungen. Aufgrund der Größe der Komplexe konnten diese die Membran nicht passieren.

DISLER et al [1975b] erklären, dass die unlöslichen und nicht absorbierbaren Eisen-Polyphenolkomplexe ein Molekulargewicht von 1500 - 5000 Dalton besitzen. Die in dieser Studie eingesetzte Ultrafiltrationsmembran ließ Moleküle mit einem Molekulargewicht über 1000 Dalton nicht mehr passieren.

Die Polymerisation zwischen den Eisenionen und Polyphenolen findet nach DISLER et al. [1975b] bei einem höheren pH (ab 5,5) bis zur Bildung eines stabilen octahedralen Komplex statt. Je alkalischer der pH-Wert ist, desto größer werden die Komplexe aufgrund der Liganden. Daraus folgt eine geringere Absorption der Komplexe durch die Membran bzw. die Darmmukosa.

5.2.3 Einsatz von Säuglingsnahrungen

Aufgrund des Versuchsaufbaues war es nötig, in der Versuchsreihe III auf ein Eisenhaltiges Lebensmittel zurückzugreifen, das zusammen mit dem Tee-Extrakt eine Suspension bildet. Exemplarisch wurde als Lebensmittel Formulakost für Säuglinge gewählt, um die Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und einem definierten Nicht-Hämeisenhaltigen Lebensmittel zu prüfen.

Die eigenen Untersuchungen zeigten die Verringerung der Eisenabsorption (55 - 85 %) durch die Gabe von Grüntee zu den Säuglingsnahrungen. Sowohl die Gesamtphenolgehalte als auch die antioxidative Aktivität wiesen nach der Diffusion deutliche Konzentrationsveränderungen auf. Die charakteristische blau-schwarze Färbung der Versuchsreihe I und II als Indikator der Komplexbildung [DISLER et al. 1975, JOVANOVIC et al. 1998] trat in beiden Säuglingsnahrungsansätzen nicht ein. Gründe dafür liegen zum einem in dem geringen Eisengehalt verglichen mit den Ansätzen der Versuchsreihe I und II und zum anderen in der stark weißmilchigen Färbung der Suspension. Die Konzentrationen der Teecatechine waren nach der Diffusion verändert, wobei besonders Epigallocatechin, Epicatechingallat und Epigallocatechingallat sowohl bei den Milchbreiansätzen als auch bei den Pre-Säuglingsnahrungsansätzen signifikant abfielen.

MINIHANE et al. [1993] bestimmten in vitro mit der AMICON-Rührzelle die Verfügbarkeit von Eisen aus Säuglingsnahrung unter physiologischen Bedingungen durch Simulation von gastrointestinalen Bedingungen. Zuerst erfolgte die Zugabe von Pepsin und die anschließende Inkubation für zwei Stunden bei 40 °C mit anschließender Zugabe von Pankreatin und pH-

Einstellung auf 7,0. Die Verfügbarkeit des in der Säuglingsnahrung enthaltenen Eisens wurde durch den Zusatz von Tanninsäure verschlechtert. Diese Wirkung konnte durch den Zusatz von Ascorbinsäure bzw. Zitronensäure aufgehoben werden. Für Catechin und Chlorogensäure wiesen die Autoren keine negative Wirkung auf die Verfügbarkeit von Eisen nach.

Dies steht im Widerspruch zu den eigenen Studien. In der Versuchsreihe I zeigte Catechin deutliche Inhibierung der Eisenverfügbarkeit durch Ausbildung eines Catechin-Eisen-Komplexes, der auch in anderen Arbeiten beschrieben wurde [JOVANOVIC et al. 1998, HURRELL et al. 1999]. Im Rahmen der Versuchsreihe III zeigten v. a. Epicatechingallat, Epigallocatechingallat und Epicatechin eine Behinderung der Eisenaufnahme. Ursachen dafür liegen in den höheren Konzentrationen dieser Flavanole verglichen mit dem Catechin und in einer höheren Affinität zu den Galloylgruppen von Epicatechingallat und Epigallocatechingallat [BRUNE et al. 1989].

MINIHANE et al. [1993] sahen in der beschriebene Methode einen guten Versuchsansatz, um die Verfügbarkeit aus Lebensmitteln schnell und kostengünstig zu bestimmen. Auch im Rahmen einer Untersuchung mit 9 Labors wurde die Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit von dieser in vitro-Methode zur Beurteilung der Verfügbarkeit von Eisen geprüft, die in Anlehnung an MILLER et al. [1981] modifiziert wurde. Die gastrointestinalen Bedingungen wurden hinsichtlich der Auswahl an Enzymen, Inkubationszeit, pH-Wert und Geräten präzisiert. Beim Vergleich der Ergebnisse verschiedener Labors war die Reproduzierbarkeit akzeptabel und vergleichbar mit Bio-Assay-Methoden. Die Reproduzierbarkeit war abhängig von dem Gehalt an dialysierbarem Eisen. Die exakte Einstellung des pH-Wertes bei der Simulation der intestinalen Verdauung war ein kritischer Faktor der in vitro-Studie [LUTEN et al. 1996]. Die gute Reproduzierbarkeit dieses in vitro-Modells wurde auch in der eigenen Arbeit bestätigt.

GIL-IZQUIERDO et al. [2002] sahen einen Nachteil in der von Miller et al. [1981] beschriebenen Methode, da bei festen Lebensmitteln der ständige Kontakt zwischen dem Dialysat und der Membran nicht gegeben ist. In der Methode von GIL-IZQUIERDO et al. [2002] ist ein enger Kontakt zwischen Lebensmittel und Membran verglichen mit den Bedingungen des Gastrointestinaltraktes gegeben. In den eigenen Untersuchungen wurden suspendierbares Lebensmittel eingesetzt und somit sind die von GIL-IZQUIERDO et al. [2002] geäußerten Bedenken bei der in dieser Arbeit eingesetzten Methode nicht relevant.

Untersuchungen von BRUNE et al. [1989] ergaben für gleichzeitigen Konsum von schwarzem Tee zu einer definierten Mahlzeit einen hemmenden Effekt von 68 % auf die

Eisenabsorption. HALLBERG und HULTHEN [2000] bestimmten für einen Grüntee eine Eisenresorptionshemmung von 83 %. MORCK et al. [1983] beschrieben für eine Hamburger-Mahlzeit die Reduktion der Eisenabsorption um 64 % durch eine Tasse schwarzen Tee. 100 ml Grüntee-Extrakt verabreicht mit einer Cerealien-Milch-Mahlzeit reduzierten das dialysierbare Eisen in vitro um 63 % [BROWN et al. 1990].

WANG und KIES [1991] fanden in ihrer Studie einen signifikant erniedrigten Serumeisenspiegel nach dem Konsum von schwarzem Tee. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nicht vergleichbar mit den eigenen Untersuchungen, da die Wechselwirkungen auf die Eisenabsorption mit Grüntee untersucht wurden. Schwarztee enthält aufgrund von Oxidationsvorgängen während der Fermentation weniger Catechine, dafür mehr Theaflavine. Sowohl die Strukturen als auch die Wirkungsmechanismen dieser Theaflavine sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

HALLBERG und HULTHEN [2000] und RECORD et al. [1996] bestätigen, dass vor allem die Galloylgruppen mit Eisen Komplexe bilden. Flavonoide mit einer Catecholgruppe am B-Ring gelten als gute Chelatoren für zweiwertiges Eisen [VAN ACKER et al. 1996].

Diese Aussagen beweisen, dass die Catechine der in den eigenen Versuchen eingesetzten Tee-Extrakte Wechselwirkungen mit Eisenionen eingehen, da die Catechine sowohl Galloyl- als auch Catecholgruppen besitzen. Die gezeigten Veränderungen der Gesamtphenolgehalte, der antioxidativen Aktivität sowie der Konzentrationen der Catechine dieser Versuchsreihe beruhen zum einen auf Wechselwirkungen zwischen dem Eisen und den Catechinen und zum anderen auf Wechselwirkungen zwischen Eisen und den Inhaltsstoffen Protein, Phytinsäure, Calcium und Magnesium. Die Gesamtphenolgehalte, die antioxidative Aktivität sowie die Konzentrationen der Catechine dieser Versuchsreihe wiesen im Unterschied zu den Versuchsreihen I und II nach der Diffusion große Konzentrationsveränderungen auf. Die gebildeten Komplexe weisen ein Molekulargewicht von über 1000 Dalton auf und können nicht die Ultrafiltrationsmembran passieren.

HALLBERG et al. [1992] untersuchten in vivo den Effekt von Calcium auf die Nicht-Hämeisenabsorption und zeigten eine starke dosisabhängige Beziehung zwischen dem Gehalt an Calcium in einem Nahrungsmittel und der Reduktion der Eisenabsorption. Die Hemmung der Eisenabsorption hatte ihr Maximum bei 300 - 600 mg Calcium. HALLBERG und HULTHEN [2000] beschreiben einen Algorithmus über den Effekt von Calcium auf die Eisenaufnahme. Calcium ist der einzige Faktor, der sowohl die Nicht-Hämeisen- als auch die Hämeisenabsorption beeinflusst [ZIJP et al. 2000].

Der in den eigenen Untersuchungen verwendete, laut Zutatenliste glutenhaltige Milchbrei enthielt u. a. Weizenmehl, Bananenflocken und Hartweizengrieß. Die in diesen Komponenten enthaltenen Phytate können ebenfalls mit Eisen unlösliche und nicht-absorbierbare Komplexe bilden.

MATUSCHEK and SVANBERG [2002] stellten in vitro bei Zugabe von Tanninsäure bzw. Grüntee-Extrakt die Verschlechterung der Verfügbarkeit von Eisen aus Weizenbrot fest. Die Oxidation der Polyphenole durch Tyrosinaseinkubaktion verbesserte die Verfügbarkeit des Eisens wieder.

In vitro-Studien von HAZELL und JOHNSON [1987] zeigten ebenfalls die inhibierende Wirkung von Phytat auf die Eisenabsorption. DAVIDSSON et al. [2001] wiesen in vivo auch die Inhibierung der Eisenresorption durch Phytinsäure nach, wobei durch das Entfernen der Phytinsäure aus dem Sojapulver die Eisenabsorption erhöht wurde. BOTHWELL et al. [1989] und GILLOOLY et al. [1983] bestätigten in vivo eine Hemmung der Eisenabsorption durch Komplexbildung der Phytate mit dem Mineralstoff.

Studien zur Untersuchung, ob die Zugabe von Milch zu Tee oder zu einer polyphenolreichhaltigen Mahlzeit die Eisenabsorption fördern, zeigten unterschiedliche Ergebnisse. CHRISTIAN und SESHADRI [1989] wiesen in vitro eine Erhöhung der Eisenverfügbarkeit nach Zugabe von Milch nach und führten dies auf die Proteinfraktion der Milch zurück. Bei gleichzeitiger Zugabe von Ascorbinsäure addierte sich die Steigerung der Eisenverfügbarkeit. SERAFINI et al. [1996] erläutern die Möglichkeit der Komplexbildung zwischen Polyphenolen und Milchproteinen, was von HURRELL et al. [1999] und DISLER et al. [1975a] nicht bestätigt wurde.

Die Ergebnisse der eigenen Studie beruhen auf in vitro-Untersuchungen, die nicht ohne weiteres auf den Menschen zu übertragen sind. Aber es wurden deutlich die signifikante Hemmung der Eisenresorption durch Teepolyphenole gezeigt. Untersuchungen der Eisenresorption und deren Beeinflussung an Caco-2 Zellen bieten eine andere Möglichkeit, in vitro die Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen zu prüfen [JOVANI et al. 2001, GLAHN et al. 1999, GLAHN et al. 1998].

5.3 Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen unter physiologischen Bedingungen

5.3.1 Eisenstatus und antioxidativer Status nach einer Woche flavonoidarmer Ernährung

Nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten Teil der Interventionsstudie unterschieden sich die Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen nicht signifikant in den Parametern Hämoglobin, Hämatokrit, Ferritin, Transferrin, Eisen und Eisenbindungskapazität. Ein vergleichbares Ergebnis wurde nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im zweiten Teil der Interventionsstudie bezüglich der Parameter Hämoglobin, Ferritin, Transferrin, Eisen und Eisenbindungskapazität ermittelt. Die Hämatokritwerte der Mischköstlerinnen waren höher als die der Vegetarierinnen.

Die Mischköstler und Vegetarier hatten signifikant höhere Hämoglobin- und Hämatokritwerte verglichen mit den Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen. Die Ferritinspiegel der Vegetarier waren signifikant höher als die der Mischköstler, Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten Teil der Interventionsstudie. Dieser Unterschied war im zweiten Teil der Studie nicht mehr so deutlich, da die Ferritinspiegel der Mischköstler und Vegetarier in einem analogen Bereich lagen.

HUANG et al. [1999] stellten vergleichbare Ferritinspiegel bei 16 Vegetariern und 14 Mischköstlern fest. Die Hämoglobinkonzentrationen der Vegetarier und Mischköstler waren signifikant höher als die der Vegetarierinnen und Mischköstlerinnen. Die Ferritinspiegel von 20 Mischköstlerinnen waren signifikant höher als die von 22 Vegetarierinnen. Dies steht im Wiederspruch zu den eigenen Ergebnissen, was möglicherweise auf die in der eigenen Studie niedrigere Probandenzahl von 15 Mischköstlerinnen und 10 Vegetarierinnen zurückzuführen ist.

In der Untersuchung von BALL und BARTLETT [1999], durchgeführt in Australien, beschrieben die Autoren eine vergleichbare Eisenaufnahme bei 24 Mischköstlerinnen und 50 Vegetarierinnen, wobei 80 % des Eisens bei beiden Gruppen aus Getreide bzw. Getreideprodukten stammte. 16 % des Eisens war bei den Mischköstlerinnen tierischer Herkunft. Hinsichtlich Hämoglobin- und Hämatokritwerten unterschieden sich die Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen nicht signifikant, wohingegen die Ferritinspiegel der Vegetarierinnen signifikant niedriger waren als die der Mischköstler. 12 % der Mischköstlerinnen zeigten Ferritinspiegel unter 12 µg/l. In der eigenen Studie wiesen 13 % der Mischköstlerinnen Ferritinspiegel unter 10 µg/l auf.

LARSSON und JOHANSSON [2002] stellten in einer Studie in Schweden mit 15 männlichen und 15 weiblichen Veganern und 15 männlichen und 15 weiblichen Mischköstlern eine vergleichbare Prävalenz für einen niedrigen Eisenstatus fest.

SHAW et al. [1995] ermittelteten bei, 32 weiblichen und 23 männlichen, vegetarisch lebenden Buddhisten signifikant niedrigere Hämoglobinkonzentrationen und Ferritinspiegel verglichen mit 20 Mischköstlerinnen und 39 Mischköstlern. 13 % der Mischköstlerinnen und 31 % der Vegetarierinnen waren anämisch.

In einer in 6 europäischen Ländern durchgeführten Studie, der sogenannten *Caleur Studie*, wurde der Eisenstatus von Mädchen und Frauen geprüft. Ein latenter Eisenmangel wurde für 4,3 % der Mädchen und 7,4 % der Frauen festgestellt [VAN DE VIJVER et al. 1999].

In Frankreich wurde der Eisenstatus von 6648 Frauen im Alter von 35 - 60 Jahren und von 3283 Männern im Alter von 45 - 65 Jahren anhand der Hämoglobin- und Ferritinspiegel überprüft. Die Männer zeigten einen guten Eisenstatus. 22,7 % der menstruierenden Frauen und 5,3 % der postmenopausalen Frauen zeigten Ferritinspiegel unter 15 µg/l. Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva führte zu höheren Ferritinspiegeln bei Frauen verglichen mit denen, die keine oralen Kontrazeptiva einnahmen [GALAN et al. 1998].

HALLBERG et al. [1995] stellten bei Frauen, die orale Kontrazeptiva einnehmen, eine schwächere Monatsblutung fest verglichen mit denen, die keine oralen Kontrazeptiva benutzen. Dennnoch hatten diese Frauen eine vergleichbare Prävalenz für einen niedrigen Eisenstatus, was auf die Einnahmedauer zurückgeführt wurde. In der eigenen Studie nahmen 80 % der Mischköstlerinnen und 70 % der Vegetarierinnen orale Kontrazeptiva.

CRAIG [1994] sah ein vergleichbares Risiko für Eisenmangel bei einer ausgewogenen Mischkost und einer ausgewogenen vegetarischen Kost.

Die 4 untersuchten Gruppen zeigten einen unterschiedlichen antioxidativen Status, wobei Literaturdaten zu den GSH- und den SOD-Werten zum heutigen Zeitpunkt relativ begrenzt sind [WINNEFELD et al. 1999].

Frauen zeigten nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im ersten Teil der Interventionsstudie signifikant höhere Ascorbinsäurekonzentrationen im Plasma als Männer. Die Ascorbinsäurekonzentrationen im Plasma aller Gruppen waren nach der Woche flavonoidarmer Ernährung im zweiten Teil der Interventionsstudie vergleichbar. Ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von der Kostform wurde nicht festgestellt.

LU et al. [2000] stellten ebenfalls vergleichbare Ascorbinsäurekonzentrationen für Vegetarier und Mischköstler fest. Hingegen beschrieben KOVACIKOVA et al. [1998] höhere Ascorbinsäurespiegel bei Vegetarierinnen verglichen mit Mischköstlerinnen, wobei die Ascorbinsäurekonzentrationen beider Gruppen niedriger waren als die Ascorbinsäuregehalte im Plasma der Probanden in der eigenen Studie.

Nach der Woche flavonoidarmer Ernährung des ersten Teils der Studie zeigten die Mischköstler und Vegetarier signifikant höhere FRAP-Werte verglichen mit den Mischköstlerinnen. Die FRAP-Werte der Vegetarierinnen lagen in einem vergleichbaren Bereich mit den FRAP-Werten der Gruppen. Im zweiten Teil der Studie hatten die Mischköstler signifikant höhere FRAP-Werte verglichen mit den Probanden der drei anderen Gruppen.

HERRMANN et al. [2001] ermittelten signifikant niedrigere antioxidative Aktivität im Plasma von Halbvegetariern verglichen mit Mischköstlern mit hohem Fleischkonsum. Dieses Ergebnis ist nicht direkt vergleichbar mit den eigenen Untersuchungen, da bei HERRMANN et al. [2001] ein kommerzieller, in Anlehnung an die Methode von MILLER et al. [1993] entwickelter, TEAC-Test angewandt wurde und in der eigenen Arbeit der FRAP-Test. Demgegenüber stellten NAGYOVA et al. [1998] im Plasma signifikant höhere antioxidative Aktivität bei Vegetariern verglichen mit Mischköstlern fest. Hier wurde ebenfalls der kommerzielle TEAC-Test angewandt.

5.3.2 Eisenstatus und des antioxidativen Status im Verlauf der Studie

Die Probanden sollten den grünen und schwarzen Tee ohne Zusatz von Milch und parallel zu der Mahlzeit trinken. Zu den Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Proteinen, z. B. aus der Milch, gibt es widersprüchliche Ergebnisse.

RICHELLE et al. [2001] untersuchten die antioxidative Aktivität mit Hilfe der LDL-Oxidation von häufig konsumierten polyphenolreichen Getränken wie Kaffee, Kakao und Tee. Alle Getränke zeigten eine weite Spannbreite in der Lagphasenverlängerung in Abhängigkeit von der Konzentration des Getränks. Der Zusatz von Milch zu den genannten Getränken veränderte die antioxidative Aktivität nicht. ARTS et al. [2002] stellten eine niedrigere antioxidative Aktivität einer Polyphenol-Protein-Mischung verglichen mit der Summe der antioxidativen Aktivität aus Polyphenolen und Proteinen fest. Das Ausmaß der Verringerung ist abhängig von der Polyphenolstruktur und der Art des Proteins, wobei Epigallocatechingallat und Epicatechingallat eine starke Affinität zu β-Casein aufweisen.

SERAFINI et al. [1996] erläuterten die Möglichkeit der Komplexbildung zwischen Polyphenolen und Milchproteinen. Die Autoren beschrieben signifikant niedrigere AUC-Werte im Plasma nach Konsum von grünem oder schwarzem Tee bei Zusatz von Milch verglichen mit den AUC-Werten im Plasma nach Teekonsum ohne Milchzusatz. Die Autoren vermuteten die Komplexbildung zwischen den Polyphenolen und den Milchproteinen, die im Magen nicht hydrolysiert werden können. Dagegen ermittelten HURRELL et al. [1999] und DISLER et al. [1975a] geringen oder gar keinen Einfluss der Milch auf die Hemmung der Eisenresorption durch Tee.

DISLER et al. [1975b] wiesen die hemmende Wirkung von Tee auf die Eisenabsorption sogar nach, wenn der Tee eine Stunde nach der Mahlzeit konsumiert wurde. In der eigenen Studie sollten die Probanden ihren Tee parallel zur Mahlzeit trinken.

GABRIELLI und DE SANDRE [1995] berichten von einer Patientin, die trotz Eisenbehandlung in Form von Eisensulfat, Symptome einer Eisenmangelanämie entwickelte. Ursachen sahen die Autoren im hohen Konsum von Tee (1,5 l/d) und in der Einnahme der Eisentabletten mit Tee, denn nach dem Verzicht auf Tee stabilisierte sich der Eisenstatus der Patientin wieder.

Die Ferritingehalte im Plasma der Mischköstler und der Vegetarier veränderten sich nicht signifikant bei Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee. Der Konsum von grünem oder schwarzem Tee beeinflusste die anderen Parameter des Eisenstatus ebenfalls nicht. Somit hatte der tägliche, über 4 Wochen andauernde, Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee keinen Einfluss auf den Eisenstatus von Mischköstlern und Vegetariern.

Untersuchungen zum Einfluss von Tee auf den Eisenstatus von Männern sind sehr begrenzt, da Männer nicht zu den vulnerablen Bevölkerungsgruppen bezüglich des Eisenstatus gehören.

TUNTAWIROON et al. [1991] untersuchten bei Männern die Inhibierung der Eisenresorption aus einer radioaktiv markierten Eisensulfatlösung durch die Gabe des Gemüses „Yod Kratin“ (Thailändisches Gemüse mit hohem Polyphenolgehalt). Die Eisenaufnahme sank mit steigender Menge an „Yod Kratin“, was auf den hohen Gehalt an Polyphenolen mit Galloylgruppen zurückzuführen ist. Diese Untersuchung ist nicht ohne weiteres auf die eigene Humanstudie übertragbar, da es sich um eine einmalige Gabe von einer Eisensulfatlösung und einem polyphenolreichen Lebensmittel handelt.

Der Eisenstatus von 31 gesunden Männern wurde über einen Zeitraum von 10 Wochen bei gleichzeitigem Konsum von Mahlzeiten mit einer niedrigen Eisenverfügbarkeit und schwar-

zem Tee überprüft. Die Ferritinspiegel sowie Hämoglobin und die Transferrinsättigung wurden durch die Mahlzeit mit niedriger bzw. hoher Eisenverfügbarkeit nicht beeinflusst [HUNT und ROUGHEAD 2000]. Dadurch werden die Ergebnisse der eigenen Studie, dass der Eisenstatus der Mischköstlern durch den Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee nicht beeinflusst wurde, bestätigt.

Der tägliche, über 4 Wochen andauernde, Konsum von schwarzem Tee führte bei den Mischköstlerinnen zu signifikant niedrigeren Ferritinspiegeln im Vergleich zu den Basiswerten. Die Freie Eisenbindungskapazität, ein weiterer sensibler Parameter des Eisenstatus, zeigte noch keine signifikanten Veränderungen bei dieser Gruppe. Demgegenüber waren die Konzentrationen an Freiem Eisen nach Konsum von schwarzem Tee signifikant niedriger im Verlauf der Studie verglichen mit den Basiswerten bei den Mischköstlerinnen. Bei den 3 Vegetarierinnen wurde aufgrund der großen individuellen Schwankungsbreite und der geringen Probandenanzahl der negative Einfluss des Konsums von schwarzem Tee auf den Eisenstatus nicht bestätigt.

Die Ferritinspiegel der Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen wurden durch den täglichen, über 4 Wochen andauernden, Konsum von grünem Tee nicht signifikant beeinflusst. Somit zeigte der über 4 Wochen andauernde Konsum von grünem Tee keinen negativen Einfluss auf den Eisenstatus der Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen.

Vor allem Studien mit radioaktiv-markiertem Eisen zur Untersuchung der Wirkungen der Polyphenole auf die Eisensaufnahme sind in der Literatur beschrieben. Desweiteren handelt es sich bei den folgenden Arbeiten um Untersuchungen, die den Einfluss von Tee auf die Eisenaufnahme anhand einer einmaligen Gabe von Tee überprüfen. HALLBERG und ROSSANDER [1982] untersuchten verschiedene Getränke in Bezug auf die Eisenabsorption mit radioaktiv-markiertem Eisen. Schwarzer Tee hemmte mit 62 % die Absorption des Nicht-Hämeisens nach Konsum eines Hamburgers am stärksten verglichen mit Kaffee (35 %).

HURREL et al. [1999] beschrieben in vivo eine dosisabhängige Beziehung zwischen der Hemmung der Eisenabsorption aus radioaktiv-markiertem Eisen und dem Gehalt an Polyphenolen von polyphenolreichen Getränken. Eine Tasse schwarzer Tee (~200 mg Polyphenole) zu einer Mahlzeit führte aufgrund des hohen Gehaltes an Galloylestern zu einer besonders ausgeprägten Behinderung der Nicht-Hämeisenaufnahme (79 - 94 %). Bei vergleichbaren Konzentrationen von Polyphenolen inhibierten schwarzer Tee und Pfefferminztee die Nicht-Hämeisenaufnahme analog und stärker als Kakao (~71 %). Der Einfluss von Grüntee wurde nicht untersucht.

Den Effekt von 200 ml Tee (Pot O'Gold) auf die Eisenabsorption untersuchten DISLER et al. [1975a] an indischen Hausfrauen. Der Konsum einer mit radioaktiv-markiertem Eisen(III)-chlorid bzw. Eisensulfat angereicherten Mahlzeit und das gleichzeitige Trinken von schwarzem Tee führten zur einer 80 %igen Verringerung der Eisenabsorption.

ROSSANDER et al. [1979] untersuchten den Einfluss von 150 ml schwarzen Tee bzw. 150 ml Kaffee auf die Verfügbarkeit von radioaktiv-markierten Eisen aus einem Frühstück bei Männern und Frauen. Beide polyphenolhaltigen Getränke behinderten die Eisenaufnahme, wobei die Wirkung des schwarzen Tees die des Kaffees übertraf.

SAMMAN et al. [2001] wiesen für Grüntee die Behinderung der Nicht-Hämeisenaufnahme mit Hilfe von radioaktiv-markiertem Eisen bei Frauen nach. Diese Arbeit ist nicht ohne weiteres mit der eigenen Studie zu vergleichen, da es sich bei SAMMAN et al. [2001] um einen Zeitraum von 4 Tagen handelte.

Die statistische Auswertung der Probandinnen, die bereits zu Beginn der Studie Ferritinspiegel unter 25 µg/l hatten, zeigte signifikant niedrigere Ferritinspiegel im Verlauf der Studie nach Konsum von schwarzem bzw. grünem Tee verglichen mit den Ausgangswerten.

TEMME und VAN HOYDONCK [2002] evaluierten 16 Studien, in denen die Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen geprüft wurden. Bei einer adäquaten Eisenversorgung wurde kein Einfluss eines hohen Teekonsums auf den Eisenstatus der westlichen Bevölkerung festgestellt.

In der *Caleur Studie* konnte keine Beziehung zwischen dem Teekonsum und dem Eisenstatus von Mädchen und Frauen festgestellt werden. Hingegen wurde eine schwache inverse Beziehung zwischen der Calciumaufnahme und den Ferritinspiegeln bei Mädchen und Frauen beschrieben [VAN DE VIJVER et al. 1999].

In einer in 5 Regionen von China durchgeführten Studie wurde bei 405 Frauen ebenfalls keine signifikante Beziehung zwischen der Eisenaufnahme, erhoben mit einem 3-Tage-Wiegeprotokoll, und den Parametern des Eisenstatus festgestellt. Des weiteren wurde der Zusammenhang zwischen einem hohen Teekonsum und einer damit verbundenen schlechteren Aufnahme von Eisen aus der Nahrung nicht bestätigt [ROOT et al. 1999].

DANGOUR et al. [2001] erläuterten eine signifikant negative Beziehung zwischen den Hämoglobinkonzentrationen und dem Konsum von Tee bei 3625 nicht-schwangeren Frauen

aus Kazakhstan, von denen bereits zu Beginn der Studie bei 40,2 % Anämie diagnostiziert wurde.

Die antioxidative Aktivität des Plasmas, ermittelt mit dem FRAP-Test, wurde ebenso wie der Eisenstatus durch den Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee unterschiedlich beeinflusst. Der tägliche, über 4 Wochen andauernde, Konsum von grünem Tee steigerte die antioxidative Aktivität des Plasmas verglichen mit den Ausgangswerten. Dieses Ergebnis konnte bei dem Konsum von schwarzem Tee nicht bestätigt werden.

YOUNG et al. [2002] zeigten bei Rauchern ebenfalls eine Steigerung der antioxidativen Aktivität im Plasma nach drei-wöchigem Konsum von grünem Tee. BENZIE et al. [1999] stellten eine Steigerung der antioxidativen Aktivität nach einer einmaligen Gabe von grünem Tee bei Nichtrauchern fest.

LEENEN et al. [2000] ermittelten eine Steigerung der FRAP-Werte nach einmaligem Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee unabhängig von der Zugabe von Milch zum Teegetränk. In den eigenen Untersuchungen wurde die Erhöhung der antioxidativen Aktivität nur nach täglichem, über 4 Wochen andauerndem, Konsum von grünem Tee nachgewiesen.

In der vorgestellten Studie unterschieden sich die Ascorbinsäurekonzentrationen nach der Woche flavonoidarmer Ernährung nicht signifikant von den Werten der letzten Blutabnahme.

Zum Einfluss der Ascorbinsäure auf die Aufnahme von pflanzlichem Eisen gibt es widersprüchliche Ergebnisse. COOK und REDDY [2001] ermittelten eine 8 %ige Variation in der Eisenaufnahme, die durch Ascorbinsäure bedingt war. Durch das Trinken von Orangensaft wurde die Aufnahme von Nicht-Hämeisen bei gleichzeitigem Konsum von Kaffee oder Tee gesteigert [HALLBERG et al. 1986]. Ascorbinsäure ist sowohl in ihrer natürlichen Form im Lebensmittel als auch als Supplement der effektivste Förder der Eisenaufnahme [HURRELL 1997]. Bei weiblichen Lakto-Ovo-Vegetariern wurde die Aufnahme von Eisen aus Tofu durch den Zusatz von Ascorbinsäure verbessert, was durch einen Anstieg der Hämoglobinkonzentration gezeigt wurde [KANDIAH 2002].

5.4 Bestimmung der antioxidativen Aktivität und deren Bewertung

Die 6 in vitro-Verfahren wurden zuerst mit 4 Antioxidantien, Ascorbinsäure, Gallussäure, Harnsäure und Trolox, überprüft. Innerhalb der TEAC-Tests ist der TEAC-Wert von Trolox definitionsgemäß 1,00. Die Wirksamkeit von Harnsäure war in den Tests vergleichbar. Ascorbinsäure reagierte in dem TEAC I-, TEAC II- und TEAC III-Test (lipophile Version) analog. In der hydrophilen Version des TEAC III-Tests zeigte Ascorbinsäure eine niedrigere

Wirkung. Gallussäure war das stärkste Antioxidans in den TEAC-Tests, wobei ihre Wirksamkeit in dem TEAC I-Test um das zweifache niedriger war als in den TEAC II- und III-Tests [SCHLESIER et al. 2002].

Einige Antioxidantien sind in der Lage, die Bildung freier Radikale zu verhindern, wohingegen andere Antioxidantien bereits gebildete Radikale abfangen können. Manche Antioxidantien zeigen beide Reaktionen (z. B. Quercetin). Somit ist es in dem TEAC I-Test nicht möglich, zwischen diesen beiden Reaktionswegen zu differenzieren [STRUBE et al. 1997]. Durch die vorherige Bildung des Radikalkations wird in den TEAC II- und III-Tests lediglich das Abfangen der Radikale als Maß der antioxidativen Wirkung bestimmt.

Dennoch zeigten die in der eigenen Arbeit untersuchten Antioxidantien teilweise vergleichbare Reaktivität in den verschiedenen Versionen des TEAC-Tests. Harnsäure reagierte in allen TEAC-Tests vergleichbar, was ebenfalls von RE et al. [1999] festgestellt wurde. Diese Autoren stellten für Ascorbinsäure in allen Versionen analoge antioxidative Wirkung fest, aber eigene Untersuchungen zeigten eine schwächere Reaktion der Ascorbinsäure in der hydrophilen Version des TEAC III-Tests.

Bisher sind in der Literatur relativ wenig Studien publiziert, die Tests zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität vergleichen. In der Übersichtsarbeit von WISEMAN et al. [1997] wird ebenfalls ein TEAC-Wert von 1 mM für Ascorbinsäure beschrieben. Theaflavin 3-3'-digallat besaß den höchsten TEAC-Wert (6,2 mM), gefolgt von Epicatechingallat und Epigallocatechingallat.

KIM et al. [2002] wiesen vergleichbar mit den eigenen Arbeiten stärkere antioxidative Wirksamkeit der Gallussäure gegenüber der Ascorbinsäure in dem TEAC III- und dem DPPH-Test nach. Die Autoren schlugen als Wert für die antioxidative Wirkung den VCEAC-Wert (VCEAC = vitamin C equivalent antioxidant capacity) vor aufgrund der besseren Verständlichkeit für den Laien. Des weiteren sahen die Verfasser Vorteile in dem TEAC-Test aufgrund der kürzeren Messzeit, der Wellenlänge und der Löslichkeit von ABTS in Wasser und organischen Lösungsmitteln.

PRIOR und CAO [1999] verglichen verschiedene Tests, wie z. B. den FRAP-, TEAC-, TRAP-, ORAC-Test, anhand ihrer Reaktionsprinzipien. Die Autoren zogen den ORAC-Test vor, da durch die Auswertung mit einer AUC-Technik (Area under the curve-Technik) sowohl die Stärke der Behinderung als auch die Dauer dieser Behinderung der Antioxidantien berechnet wird. Als Maß für die antioxidative Wirksamkeit dient bei dem TEAC- und dem TRAP-Test die sogenannte Lagphase.

RICE-EVANS [2000] verglich den TEAC-, ORAC- und FRAP-Test anhand deren Reaktionsprinzipien und der antioxidativen Aktivität von Plasma oder Serum, die mit den drei genannten Tests bestimmt wurde. Nachteile des FRAP-Tests sah die Autorin in dem unphysiologischen pH (3,6) und in der nicht vorhandenen Reaktion von Albumin in dem Test. Die Dauer des ORAC-Tests ist länger als die des TEAC Tests, wobei die Version II bzw. III des TEAC-Tests dem TEAC I-Test vorgezogen wird. Die antioxidative Aktivität von Plasma ermittelt mit dem FRAP-Test und die antioxidative Aktivität von Plasma und Serum bestimmt mit dem TEAC-Test lagen in einem vergleichbaren Bereich. Die antioxidative Aktivität von Serum war im FRAP-Test deutlich niedriger. Die Wirkung von Ascorbinsäure, Tocopherol und Harnsäure war analog in den Tests, wohingegen Albumin und Bilirubin unterschiedlich reagierten. Die drei Tests bieten zu dem heutigen Zeitpunkt keinen gesicherten Nachweis einer Steigerung der antioxidativen Aktivität nach Aufnahme von sekundären Pflanzenstoffen [RICE-EVANS 2000].

Im Rahmen einer europäischen Laborstudie wurden 8 verschiedene in vitro-Tests zur Messung der antioxidativen Aktivität verglichen wie z. B. der DPPH-, FRAP-, TEAC-, TRAP-Test. Die Autoren kamen zu der Schlussfolgerung, dass zum heutigen Zeitpunkt der perfekte Test noch nicht existiert und dass die Ergebnisse verschiedener Testverfahren zusammengetragen werden sollten [SERAFINI et al. 2001].

Demgegenüber sehen PULIDO et al. [2000] trotz des unphysiologischen pH-Werts in dem FRAP-Test einige Vorteile gegenüber anderen Methoden. Der FRAP-Test ist eine einfache und reproduzierbare Methode für die Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Plasma, Lebensmittelextrakten, Getränken und auch Standardsubstanzen. Dieser Test ist weiterhin unabhängig von der enzymatischen und nicht-enzymatischen Bildung von freien Radikalen. Dies ist nicht der Fall z. B. bei dem Xanthin/Xanthinoxidase-Test und dem TEAC-Test.

Die Wirkung der Harnsäure, als das Haupt-Antioxidans im Plasma, ist in vielen in vitro-Tests sehr ausgeprägt und mit Ascorbinsäure vergleichbar. Eigene Untersuchungen zeigten eine schwache Reaktion von Harnsäure in dem DPPH-Test, und in dem DMPD-Test besaß die Harnsäure überhaupt keine Wirkung. Möglicherweise können mit diesen Tests Veränderungen der antioxidativen Aktivität durch mit der Nahrung aufgenommene Polyphenole erfasst werden.

Die Sensitivität der 6 in vitro-Verfahren ist sehr unterschiedlich, nur der PCL-Test misst die antioxidative Wirkung in einem nanomolaren Bereich.

Zusätzlich zur Überprüfung der verschiedenen Tests wurde die antioxidative Wirkung von Getränken ermittelt. Dazu standen Johannisbeersaft und -nektar, 2 Apfelsäfte, 2 Tomatensäfte sowie grüner und schwarzer Tee der Provenienzen Assam und Darjeeling zur Verfügung. Neben der Analyse der antioxidativen Aktivität der beschriebenen Getränke wurden auch deren Ascorbinsäurekonzentration und deren Gesamtphenolgehalte analysiert.

Schwarzer Johannisbeersaft hatte den höchsten Gehalt an Ascorbinsäure und an Gesamtphenolen und auch die höchste Aktivität. Die Säfte wiesen höhere Gehalte an Ascorbinsäure auf als die Tees. Demgegenüber hatten die Tees gleich hohe oder höhere Gesamtphenolgehalte als die Apfel- und Tomatensäfte. 23 % des Gesamtphenolgehaltes des schwarzen Johannisbeersaftes und ~20 % des Gesamtphenolgehaltes der Tomatensäfte und eines Apfelsaftes sind auf den Ascorbinsäuregehalt zurückzuführen.

MILLER und RICE-EVANS [1997] zeigten, wie in der eigenen Arbeit, höhere antioxidative Aktivität von schwarzen Johannisbeergetränken verglichen mit Apfelsäften.

VINSON et al. [2001] schlagen die Analyse der Ascorbinsäure mit einer HPLC-Methode vor, um dadurch die Konzentration der Ascorbinsäure von dem Gesamtphenolgehalt abzuziehen. In der eigenen Arbeit wurde eine photometrische Methode zur Bestimmung der Ascorbinsäure in Getränken eingesetzt.

PROTEGGENTE et al. [2002] sehen v. a. bei Erdbeeren aufgrund der hohen Ascorbinsäurekonzentration die Gefahr der Interaktionen der Ascorbinsäure in dem Gesamtphenoltest, schwarze Johannisbeeren wurden in dieser Arbeit nicht analysiert. Somit ist die alleinige Analyse der Gesamtphenolgehalte von ascorbinsäurereichen Getränken, wie z. B. der Johannisbeersaft in der eigenen Studie, unzureichend zur Beurteilung des protektiven Potenzials.

Die untersuchten Getränke, mit Ausnahme der Tomatensäfte, hatten in allen Varianten des TEAC-Test vergleichbare antioxidative Aktivitäten. Ascorbinsäure hatte im DMPD-Test die stärkste antioxidative Wirksamkeit, was sich in den relativen hohen Anteilen der Ascorbinsäure am antioxidativen Potenzial im DMPD-Test wiederspiegelt. Selbst niedrige Ascorbinsäurekonzentrationen in den Tees waren für ungefähr ein Drittel der Aktivität verantwortlich, was dem relativen Anteil der Ascorbinsäure am antioxidativen Potenzial des schwarzen Johannisbeersaftes entspricht. Die antioxidative Aktivität in dem DPPH-Test war sowohl für die Tee-Extrakte als auch die Tomatensäfte vergleichbar. Der Anteil der Ascorbinsäure an der antioxidativen Aktivität der Tee-Extrakte in dem DPPH-Test lag bei 2 %. Die bereits beschriebene schwache Wirksamkeit der Ascorbinsäure in der hydrophilen Version des

TEAC III-Tests spiegelt sich auch in den Anteilen der Ascorbinsäure an dessen TEAC-Werten in allen Getränken wider. Der Beitrag der Ascorbinsäure an den TEAC-Werten ermittelt mit den TEAC II- und TEAC III-Tests (lipophile Version) war hingegen für alle Getränke vergleichbar.

Nach Zufuhr des hier untersuchten Johannisbeersaftes wurde in Arbeiten des Arbeitskreises eine maximale Erhöhung der antioxidativen Aktivität des Plasmas um 48 % gemessen [NETZEL et al. 2002].

Die Korrelation zwischen den Gesamtphenolgehalten und den antioxidativen Aktivitäten, ermittelt mit den TEAC II-, III-, DPPH- und DMPD-Tests, war gut (Mittelwert: r = 0,987).

ALONSO et al. [2002] beschreiben ebenfalls für Weiß- und Rotwein eine gute Korrelation zwischen Gesamtphenolgehalten nach Folin-Ciocalteu, einem kommerziellen TEAC-Test und einer elektrochemischen Methode zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität.

In Gemüse- und Frucht-Extrakten war die Korrelation zwischen TEAC-Werten und Gesamtphenolgehalten nach Folin-Ciocalteu gegeben. Die Korrelation zwischen FRAP-Werten und Gesamtphenolgehalten nach Folin-Ciocalteu dieser Extrakte war ebenfalls hoch (r = 0,95) [PROTEGGENTE et al. 2002], was eigene Messungen ebenso zeigten. Die Ascorbinsäuregehalte der pflanzlichen Extrakte korrelierten ebenso gut mit den FRAP-Werten (r = 0,99) und etwas schwächer mit den TEAC-Werten (r = 0,89). Eigene Untersuchungen zeigten für beide Kombinationen gute Korrelationen.

GIROTTI et al. [2002] zeigten eine relativ gute Korrelation zwischen Gesamtphenolgehalten nach Folin-Ciocalteu und der Messung der antioxidativen Aktivität mit Chemolumineszens (r = 0,8525). Diese Methode ist mit der in der eigenen Arbeit angewandten PCL-Methode vergleichbar. Eigene Untersuchungen zeigten ebenfalls eine gute Korrelation zwischen den beiden Parametern dort.

KÄHKÖNEN et al. [1999] hingegen stellten in pflanzlichen Extrakten keine Korrelation zwischen den Gesamtphenolgehalten und der antioxidativen Aktivität, ermittelt mit dem Methyl-Linolensäure-Test, fest. Die Autoren führten dies auf den Summenparameter Gesamtphenolgehalt zurück und schlugen eine flüssigchromatographische Analyse der polyphenolischen Verbindungen der pflanzlichen Extrakte vor.

CAO et al. [1998] untersuchten die antioxidative Aktivität in Serum und Urin älterer Frauen mit ORAC-, FRAP- und TEAC I-Test nach Konsum von Erdbeeren, Spinat, Rotwein und Vitamin C. Die FRAP- und ORAC-Werte stiegen infolge des Konsums aller Produkte vergli-

chen mit den Werten der Kontrollgruppe signifikant an. Bei dem TEAC-Test wurde nur nach Konsum von Spinat eine signifikante Steigerung festgestellt. Die ORAC-Werte des Urins stiegen je nach Lebensmittel um 10 - 45 %. Dies macht die Notwendigkeit des Einsatzes zweier Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität deutlich.

OU et al. [2002] verglichen den ORAC-Test und den FRAP-Test anhand von 927 gefriergetrockneten Gemüseproben. Die Analyse ergab eine unterschiedliche Rangfolge in dem ORAC-Test verglichen mit dem FRAP-Test. Die Autoren wiesen somit eine schlechte Korrelation zwischen den beiden Methoden nach. Ausnahmen bildeten Rote Beete, Karotte und weiße und rote Zwiebeln. Grund für die schlechte Korrelation sahen OU et al. [2002] in den verschiedenen Reaktionsprinzipien beider Tests.

STUPANS et al. [2002] untersuchten verschiedene phenolische Verbindungen, die Bestandteil der mediterranen Ernährung sind, mit dem DPPH-Test und der LDL-Oxidation. Die Messungen führten zu unterschiedlichen Rangfolgen der phenolischen Verbindungen in Abhängigkeit vom Testsystem. Somit existiert nicht unbedingt eine Korrelation zwischen Tests zur Messung der antioxidativen Aktivität.

Alle Untersuchungen zum Vergleich antioxidativer Testverfahren zeigten Unterschiede von Test zu Test [OU et al. 2002, RICE-EVANS 2000, SERAFINI et al. 2001, STUPANS et al. 2002, SCHLESIER et al. 2002]. Deswegen wird empfohlen, mindestens 2 verschiedene Tests zur Ermittlung der antioxidativen Aktivität von Plasma, Urin und Lebensmittelextrakten anzuwenden. Diese sollten in Hinblick der zu untersuchenden Matrix ausgewählt werden. Eine Bewertung der antioxidativen Aktivität von Plasma, Urin und Lebensmittelextrakten mittels einer Rangfolge innerhalb eines Tests ist jedoch möglich. Dennoch ist die Übertragung dieser in vitro-Ergebnisse auf den menschlichen Organismus nicht ohne weiteres möglich.

6 Zusammenfassung

Tee ist aufgrund seines guten Aromas und seiner gesundheitsfördernden Effekte weltweit ein sehr beliebtes Getränk. 4 Grüntee-Extrakte und 14 Schwarztee-Extrakte verschiedener Provenienzen unterschieden sich nicht signifikant in ihren Gesamtphenolgehalten und in ihren antioxidativen Aktivitäten. 2 Oolong-Tee-Extrakte zeigten demgegenüber signifikant niedrigere Gesamtphenolgehalte und antioxidative Aktivitäten. Die Einteilung der Teesorten hinsichtlich ihrer Provenienzen brachte mit Hilfe der untersuchten Parameter Gesamtphenole und antioxidative Aktivität keine genaue Zuordnung.

Die Mehrfachextraktion der grünen Tees, ein übliches, bei Verbrauchern angewandtes, Verfahren bei der Zubereitung von grünem Tee, wurde erstmals in den eigenen Untersuchungen durchgeführt. Die Gesamtphenolgehalte, die antioxidative Aktivität und die Gehalte der Catechine nahmen von Aufguss zu Aufguss ab. In den fünften Aufgüssen aller grünen Tee-Extrakte wurden ~20 % der Gesamtphenolgehalte und der antioxidativen Aktivität verglichen mit dem erstem Aufguss nachgewiesen. Cirka 10 % der Catechine des ersten Aufgusses waren in den fünften Aufgüssen enthalten. Hohe Aufbrühtemperaturen bewirkten eine vermehrte Extraktion der phenolischen Verbindungen.

Grün- und Schwarztee-Extrakte sowie Grün-, Oolong- und Schwarztee-Extrakte aus jeweils einer Rohware wurden auf Gesamtphenolgehalte, antioxidative Aktivität, Gehalten an Gallussäure und Catechinen untersucht. Die Fermentation von Grün- zu Schwarztee bewirkte einen Abbau der Catechine und einen damit verbundenen Konzentrationsanstieg der Gallussäure in schwarzem Tee und teilweise im Oolong-Tee. Bei orthodoxen Fermentationsverfahren wurden ~50 % der Catechine des grünen Tees in den entsprechenden schwarzen Tees nachgewiesen. Das CTC-Verfahren bewirkte einen sehr starken Abbau der Catechine, dennoch wies dieser schwarze Tee noch hohe Gesamtphenolgehalte und antioxidative Aktivität auf. Aus einem fein geschnittenen Blatt werden mehr phenolische Verbindungen extrahiert als aus einem großen Teeblatt.

Die grünen Tee-Extrakte aus Darjeeling, Assam und China enthielten deutlich niedrigere Catechinkonzentrationen als die vier grünen Tees der Provenienzen China Chun Mee, China Gunpowder, Japan Bancha und Ceylon Pekoe. Die Rohware, die Art der Verarbeitung und die damit verbundene Größe des Teeblattes sowie die Provenienz beeinflussen Gesamtphenolgehalte, antioxidative Aktivität, Gehalte an Gallussäure und Catechinen von

grünen, Oolong- und schwarzen Tee-Extrakten. Folge ist die unterschiedliche Spannbreite der analysierten Parameter bei den untersuchten Tees.

Aus TEAC-Werten der einzelnen Catechine wurde über deren Gehalte in den Tee-Extrakten ihr Anteil am antioxidativen Potenzial der Tee-Extrakte berechnet. Die kalkulierten Werte waren vergleichbar mit den gemessenen TEAC-Werten der Catechinmischungen. Sie lagen aber deutlich höher als die gemessenen TEAC-Werte der vier grünen Tee-Extrakte. Die antioxidativen Aktivitäten der Tee-Extrakte betrugen 10 - 20 % der jeweils kalkulierten TEAC-Werte. Die TEAC-Werte der grünen Tee-Extrakte, des Darjeeling-Oolong-Tee-Extraktes und der schwarzen Tee-Extrakte waren sowohl höher als der TEAC-Wert der Catechinmischung als auch höher als die kalkulierten TEAC-Werte. Ausnahmen bildeten die Oolong-Tee-Extrakte aus China, deren antioxidative Aktivitäten hauptsächlich auf die Catechine zurückzuführen sind, da die kalkulierten TEAC-Werte und die TEAC-Werte der Tee-Extrakte in einem vergleichbaren Bereich lagen. Somit stehen die hier vorgestellten Ergebnisse im Widerspruch zueinander. Die niedrigere antioxidative Aktivität der vier grünen Tee-Extrakte ist vermutlich auf antagonistische Wirkungen mit anderen Tee-Inhaltsstoffen zurückzuführen, die zum heutigen Zeitpunkt nicht genauer spezifiziert werden können.

Eisenmangel zählt in unserer heutigen Zeit zu den häufigsten Mangelerkrankungen innerhalb der Mikronährstoffe. Ursachen dafür liegen sowohl in einer zu geringen Aufnahme als auch in der schlechten Resorption vor allem des pflanzlichen Nicht-Hämeisens. Zu den vulnerablen Bevölkerungsgruppen zählen u. a. Frauen, Schwangere, Stillende und Vegetarier.

In in vitro-Modellversuchen wurden die Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen untersucht. Diese Untersuchungen sollten klären, inwieweit der Konsum von grünem Tee die Verfügbarkeit von Eisen aus der Nahrung für den Menschen beeinflusst. Diese Membranversuche wurden mittels Ultrafiltration in einer Rührzelle durchgeführt. Ansätze mit Catechinlösungen bzw. Tee-Extrakten reduzierten den membrangängigen (verfügbaren) Eisenanteil. Gesamtphenolgehalte, antioxidative Aktivität und Gehalte an Catechin bzw. Catechinen fielen signifikant nach der Diffusion ab. In den Ansätzen mit eisenhaltiger Säuglingsnahrung und Tee-Extrakten wiesen Eisengehalte, Gesamtphenolgehalte, antioxidative Aktivität und Konzentrationen der Catechine signifikante Veränderungen nach der Diffusion durch die Ultrafiltrationsmembran auf. Somit zeigten diese Modell-untersuchungen eine signifikante Hemmung der Eisenresorption durch Teepolyphenole.

Die Ergebnisse der in vitro-Untersuchung gaben Anlass für die Studie „Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen unter physiologischen Bedingungen“. In der Human-

studie wurden die Auswirkungen eines täglichen Teegenusses von einem Liter grünen oder schwarzen Tee auf den Eisenstatus bei 20 Mischköstlern und 14 Vegetariern untersucht.

Nach der Woche flavonoidarmer Ernährung unterschieden sich die Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen nicht signifikant in den Konzentrationen von Hämoglobin, Ferritin, Transferrin, Freiem Eisen und Eisenbindungskapazität. Die Mischköstler und Vegetarier hatten signifikant höhere Hämoglobin- und Hämatokritwerte verglichen mit den Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen. Die Ferritinspiegel der Vegetarier und der Mischköstler waren signifikant höher als die der Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen nach der Woche flavonoidarmer Ernährung. 60 % der Mischköstlerinnen und 70 % der Vegetarierinnen wiesen zu Beginn der Studie Ferritinspiegel unter 25 µg/l auf.

Der Eisenstatus von Mischköstlern und Vegetariern wurde durch Konsum von grünem bzw. schwarzem Tee im Verlauf der Studie nicht beeinflusst. Der tägliche, über 4 Wochen andauernde, Konsum von schwarzem Tee führte bei den Mischköstlerinnen zu signifikant niedrigeren Ferritinspiegeln und zu signifikant niedrigeren Freien Eisenkonzentrationen im Vergleich zu den Ausgangswerten. Der negative Einfluss des schwarzen Tees auf den Eisenstatus wurde bei den Vegetarierinnen nicht bestätigt. Das Trinken von grünem Tee hatte einerseits keine Auswirkungen auf den Eisenstatus von Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen, andererseits wurde die antioxidative Aktivität des Plasmas dieser Probandinnen gesteigert. Die Ferritinspiegel von Frauen, die bereits zu Beginn der Studie Werte unter 25 µg/l hatten, fielen nach Konsum von schwarzem bzw. grünem Tee im Verlauf der Studie signifikant ab. Somit ist der Eisenstatus ausschlaggebend für die Wirkung eines Teekonsums. Bei einem adäquaten Eisenstatus sind die Auswirkungen eines täglichen Konsums von 1 Liter Tee zu vernachlässigen.

Die große Zahl verschiedener Tests zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität macht deren Vergleich notwendig. Die antioxidative Aktivität von 6 verschiedenen in vitro-Verfahren, TEAC I-, II-, III-, TRAP-, FRAP-, DPPH-, DMPD- und PCL-Test, wurde mit Standardsubstanzen und Getränken getestet. Beim Vergleich von TEAC I-, TRAP- und PCL-Test sind Unterschiede in der Empfindlichkeit und der Messzeit zu finden. Nur der PCL-Test misst die antioxidative Wirksamkeit im nanomolaren Bereich mit Lagphasen im Minutenbereich. Der TEAC-Tests misst bei vergleichbaren Lagphasenzeiten in micromolaren Konzentrationen. Der TRAP-Test benötigt für analoge Konzentrationen wie im TEAC I-Test Messzeiten von 1 Stunde. Eine Bewertung der antioxidativen Aktivität mit einer Rangfolge ist jedoch innerhalb eines Tests möglich.

7 Schlussfolgerung

Grüner, Oolong- und schwarzer Tee bieten eine gute Quelle für Polyphenole. Die Catechine sind die Hauptphenole in grünem Tee, wobei diese Substanzen teilweise auch in nicht zu vernachlässigenden Konzentrationen in Oolong- und schwarzem Tee vorkommen. Die Fermentation bedingt den Abbau der Catechine und dadurch höhere Konzentrationen von aus den Gallatresten entstandener Gallussäure in Oolong- bzw. schwarzem Tee. Die Art der Fermentation ist entscheidend für das Polyphenolspektrum im Tee. Ein fein geschnittenes Teeblatt ermöglicht eine bessere Extraktion der polyphenolischen Verbindungen. Dieser Aspekt sollte in Zukunft für die Beurteilung von Teequalität bedacht werden. Niedrigere antioxidative Aktivität von Tee-Extrakten verglichen mit antioxidativer Wirksamkeit von Catechinmischungen lassen auf noch zu klärende antagonistische Wechselwirkungen im Tee-Extrakt schliessen.

Die in vitro-Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisensalzen bzw. eisenhaltiger Säuglingsnahrung stellten die Behinderung der Eisenaufnahme durch Catechin bzw. grünen Tee-Extrakt mit der Bildung von Eisen-Polyphenol-Komplexen fest. Nach vollständiger Identifizierung der phenolischen Verbindungen in schwarzem Tee und Verfügbarkeit der Standardsubstanzen sollten diese in vitro-Untersuchungen auch mit schwarzem Tee durchgeführt werden.

Aus den Ergebnissen der Humanstudie zu den Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen unter physiologischen Bedingungen lässt sich ableiten, dass der Eisenstatus ausschlaggebend ist für die Wirkung eines Teekonsums. Der Konsum von schwarzem oder grünem Tee zu einer Mahlzeit führte bei Mischköstlerinnen und Vegetarierinnen mit niedrigen Ferritinspiegeln zu Beginn der Studie zu einer Verschlechterung des Eisenstatus. Zukünftige Untersuchungen sollten den Einfluss von anderen polyphenolhaltigen Getränken, wie z. B. Kaffee, Kakao und Fruchtsäften, auf den Eisenstatus von Frauen prüfen.

Die Untersuchungen zum Vergleich antioxidativer Testverfahren zeigten Unterschiede von Test zu Test. Deswegen ist es notwendig, mindestens 2 verschiedene Tests zur Ermittlung der antioxidativen Aktivität unter Berücksichtigung der zu untersuchenden Matrix anzuwenden. Diese in vitro-Tests geben Hinweise auf ein mögliches protektives Potenzial von pflanzlichen Lebensmitteln. Darüber hinaus sind aber im Rahmen von Interventionsstudien Untersuchungen über die Verfügbarkeit von polyphenolischen Verbindungen und deren Metabolismus im menschlichen Körper notwendig, da die in vitro-Ergebnisse nicht ohne weiteres auf den menschlichen Organismus übertragbar sind.

8 Arbeitsvorschriften

Häufig verwendete Lösungsmittel, alle HPLC-Qualität
- Methanol CH_3OH
- Hexan C_6H_{14}
- Ethylacetat $CH_3COOC_2H_5$
- Ethanol CH_3CH_2OH

8.1 Photometrische Bestimmungsmethoden

Häufig verwendete Geräte und Hilfsmittel:
- Fluorimeter: TD 700 (Firma GAT, Bremerhaven)
- Metallblockthermostat: Modell 2103-DA (Firma Liebisch, Bielefeld)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 595 nm: Modell anthos ht2 (Anthos, Krefeld)
- pH-Meter: WTW pH Meter Microprocessor, Modell pH 537 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co. KG, Weilheim), pH-Elektrode (Nr. FB67 107-S7 Gesellschaft Ingold Meßtechnik, Steinbach)
- Photochem® (Analytik Jena AG, Jena)
- Reagenzglasschüttler: RS 1 (IDL GmbH & Co. KG, Nidderau)
- Spektralphotometer: zu Beginn Uvidec-610 (Firma Jasco, Groß-Umstadt), später V 530 (Firma Jasco, Groß-Umstadt)
- Thermomixer: Modell 5436 (Firma Eppendorf, Hamburg)
- Ultraschallbad: Sonorex RK 100, Bandelin (Firma Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin)
- Zentrifuge: Modell 5415 C (Firma Eppendorf, Hamburg)
- Fluoreszenzküvetten 1cm
- Glassäule (∅ 5 mm, etwa 30 cm lang), 20 cm hoch mit Sephadex G-15 gefüllt
- Glastrichter
- Kunststoffküvetten, halbmikro, 1 cm Schichtdicke
- Kunststoffküvetten, makro, 1 cm Schichtdicke
- Mehrfachpipette
- Membranfilter 0,2 µm, ∅ 25 mm (Schleicher & Schuell, Ref. Nr. 401306, Firma Schleicher & Schuell, Dassel)
- Mikrotiterplatten (96 wells)
- pH-Papier
- Reagenzgläser SVL 16 (16 x 100 mm), mit Schraubdeckel und PTFE-beschichteter Gummidichtung (Firma Pyrex, Nr. 1636/26 MP, QVS Labortechnik, Ilmenau)
- Reaktionsgefäße 1,25 ml
- Reaktionsgefäße 1,5 ml
- Reaktionsröhrchen
- Stoppuhr

8.1.1 Bestimmung der Gesamtphenolgehalte

Chemikalien:
- Folin-Ciocalteu-Reagenzlösung: Folin-Ciocalteu-Reagenz (Nr. 47641, Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wird 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.
- Natriumcarbonat-Lösung, 75g/l: 40,5 g Na_2CO_3 x 10 H_2O werden in 200 ml destilliertem Wasser gelöst.
- Gallussäure-Monohydrat-Stammlösung, 10,5 mg/100 ml: 5,25 mg Gallussäure-Monohydrat (Nr. 48630, Fluka) werden in 50 ml destilliertem Wasser gelöst.
- Gallussäure-Monohydrat-Standardlösungen, 2,1/4,2/6,3/8,4 und 10,5 mg/100 ml: Stammlösung (10,5 mg/100 ml) wird 1+4/2+3/3+2/4+1 mit destilliertem Wasser verdünnt, die Konzentration 10,5 mg/100 ml wurde auch eingesetzt (täglich frisch herzustellen).

Arbeitsweise:
200 µl Tee-Extraktlösung bzw. Gallussäure-Monohydrat-Standardlösung bzw. destilliertes Wasser für den Blindwert werden in einer Küvette mit 1 ml verdünnter Folin-Ciocalteu-Reagenzlösung und

800 µl Natriumcarbonatlösung gemischt und 2 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Extinktion wird anschließend bei 750 nm gemessen.

Über die Kalibrierung mit Gallussäure-Monohydrat wird der Gesamtphenolgehalt in Gallussäureäquivalenten (GAE) in mmol/l, mg/l bzw. mg/g angegeben. Der Linearitätsbereich liegt zwischen 2,1 und 10,5 mg/100 ml (r = 0,999) und der Variationskoeffizient liegt unter 5 %.

8.1.2 Bestimmung der Vitamin C-Gehalte in Getränken und in Plasma

Chemikalien:

- Schwefelsäure, 9 n: zu 3 Volumenteilen destilliertem Wasser wird vorsichtig 1 Volumenteil konzentrierte Schwefelsäure H_2SO_4 (Eisbad) gegeben.
- 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung: 220 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin p.a. (Nr. 42210, Fluka) werden in 10 ml H_2SO_4 (9 n) gelöst und vor Gebrauch filtriert (ca. 3 Wochen haltbar).
- Trichloressigsäure-Lösung, 5 g/100 ml: 5 g TCA p.a. werden im Messkolben in destilliertem Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.
- Messschwefelsäure: zu 100 ml destilliertem Wasser werden 875 ml konzentrierte H_2SO_4 p.a. (Eisbad) vorsichtig hinzugefügt und auf 1000 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt.
- Thioharnstoff-Lösung, 5 g/100 ml: 5 g Thioharnstoff p.a. werden in ca. 20 ml destilliertem Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.
- Kupfersulfat-Lösung: 0,6 g $CuSO_4$ x 5 H_2O p.a. werden im Messkolben in destilliertem Wasser gelöst und auf 100 ml aufgefüllt.
- DNP-Reagenz: 1 Volumenteil (z. B. 0,1 ml) Thioharnstoff-Lösung (5 g/100 ml), 1 Volumenteil (z. B. 0,1 ml) Kupfersulfat-Lösung und 20 Volumenteile (z. B. 2,0 ml) Dinitrophenylhydrazin-Lösung (2,2 g/100 ml) werden gemischt (gekühlt ca. 1 Woche haltbar).
- Ascorbinsäurestammlösung, 1 mg/ml: 50 mg Ascorbinsäure werden in 50 ml TCA (5 g/100 ml) gelöst, diese Stammlösung wird tiefgefroren gelagert. Diese Lösung ist tiefgefroren mehrere Monate haltbar.
- Ascorbinsäurestandardlösungen, 2/6/12/20 µg/ml: 0,1/0,3/0,6/1,0 ml Ascorbinsäurestammlösung (1 mg/ml) wird in 50 ml Messkolben mit destilliertem Wasser verdünnt (täglich frisch herzustellen).

Arbeitsweise:

Jeweils 200 µl Tee-Extraktlösung, Getränk, Ascorbinsäurestandardlösung sowie destilliertes Wasser für den Blindwert werden in einem Reaktionsgefäß mit 300 µl TCA (5 g/100 ml) versetzt, auf einem Reagenzglasschüttler gemischt und 5 min mit 12000 U/min zentrifugiert. Jeweils 200 µl Plasma werden vor dem Einfrieren mit jeweils 300 µl TCA versetzt. Die Plasmaproben werden nach dem Auftauen wie die anderen Proben behandelt. 300 µl des Probenüberstandes werden mit 100 µl DNP-Reagenz versetzt und gemischt. Dieser Ansatz wird 1 Stunde auf dem Thermomixer bei 60 °C temperiert. Danach werden die Proben im Eisbad gekühlt, nach 5 min mit 400 µl Messschwefelsäure versetzt und kräftig gemischt. Die Proben werden zur Reaktion 20 min dunkel gestellt und anschließend photometrisch bei 520 nm gemessen. Über die Kalibrierung mit Ascorbinsäure wird der Ascorbinsäuregehalt in Tee-Extraktlösungen und Getränken in mg/l und in Plasma in µmol/l angegeben. Der Linearitätsbereich liegt zwischen 2 und 20 µg/ml (r = 0,996) und der Variationskoeffizient liegt unter 5 %.

8.1.3 Bestimmung der antioxidativen Aktivität

8.1.3.1 TEAC I-Test

Chemikalien:

- Phosphatpuffer pH 7,3: 200 ml KH_2PO_4-Lösung (9,073 g/l KH_2PO_4 in destilliertem Wasser gelöst) und 800 ml Na_2HPO_4 x 2 H_2O-Lösung (11,87 g/l Na_2HPO_4 x 2 H_2O in destilliertem Wasser gelöst) werden gut gemischt.
- ABTS-Stammlösung, 5 mmol/l: 27,4 mg ABTS [2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)] (Nr. A 1888, Sigma, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) werden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst.
- ABTS-Arbeitslösung, 500 µmol/l: ABTS-Stamm-Lösung (5 mmol/l) wird 1:10 mit dem Phosphatpuffer verdünnt (täglich frisch herzustellen).

- Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung, 2,5 mg/10 ml: 2,5 mg $K_3[Fe(CN)_6]$ werden in 10 ml Phosphatpuffer gelöst (täglich frisch herzustellen).
- Myoglobin-Lösung: 6,8 mg Myoglobin (Nr. M 1882, Sigma) werden in 1 ml Phosphatpuffer gelöst (täglich frisch herzustellen).
- Metmyoglobin-Lösung, ca. 40 µmol/l: 1 ml Myoglobin-Lösung und 1 ml Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung werden zusammengegeben und 5 min dunkel stehen gelassen, diese Lösung wird über eine mit Sephadex gefüllte Glassäule gegeben und mit Phosphatpuffer eluiert. Die Extinktion der Metmyoglobin-Lösung wird bei 490 nm, 560 nm, 580 nm und 700 nm gemessen. Die Extinktion bei 700 nm wird von den übrigen Extinktionen abgezogen. Die Konzentration ergibt sich nach folgender Formel:
  $c\ [\mu mol/l] = 146 \times E_{490} - 108 \times E_{560} + 2{,}1 \times E_{580}$
- Trolox-Stammlösung, 2,5 mmol/l: 12,5 mg Trolox® (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure) (Nr. 39,192-1, Aldrich) werden in 20 ml destilliertem Wasser im Ultraschallbad gelöst.
- Trolox-Standardlösungen, 0,250/0,417/0,625/0,833/1,250 mmol/l: Trolox-Stammlösung (2,5 mmol/l) wird 1:10/1:6/1:4/1:3/1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt (täglich frisch herzustellen).
- Wasserstoffperoxid-Lösung, 0,5 g/100 ml Puffer: Eine H_2O_2-Lösung 10 % wird 1:20 mit Phosphatpuffer verdünnt (täglich frisch herzustellen).

Arbeitsweise:
600 µl ABTS-Arbeitslösung, 70 µl Metmyoglobinlösung, 20 µl Tee-Extraktlösung bzw. Getränk bzw. Trolox-Standardlösung bzw. destilliertes Wasser für den Blindwert und 1 ml Phosphatpuffer werden in eine Küvette pipettiert und gemischt. Nach Zugabe von 300 µl Wasserstoffperoxid-Lösung wird die Messung bei 734 nm sofort gestartet und 3 min lang aufgezeichnet. Für alle Analysen werden graphisch die Lagphasen ermittelt. Über die Kalibrierung mit Trolox wird der TEAC-Wert in mmol/l ermittelt. Der Linearitätsbereich liegt zwischen 0,1 und 1,25 mmol/l (r = 0,995) und der Variationskoeffizient liegt unter 5 %. Abbildung 8.1 veranschaulicht den Extinktionsverlauf beim TEAC I-Test.

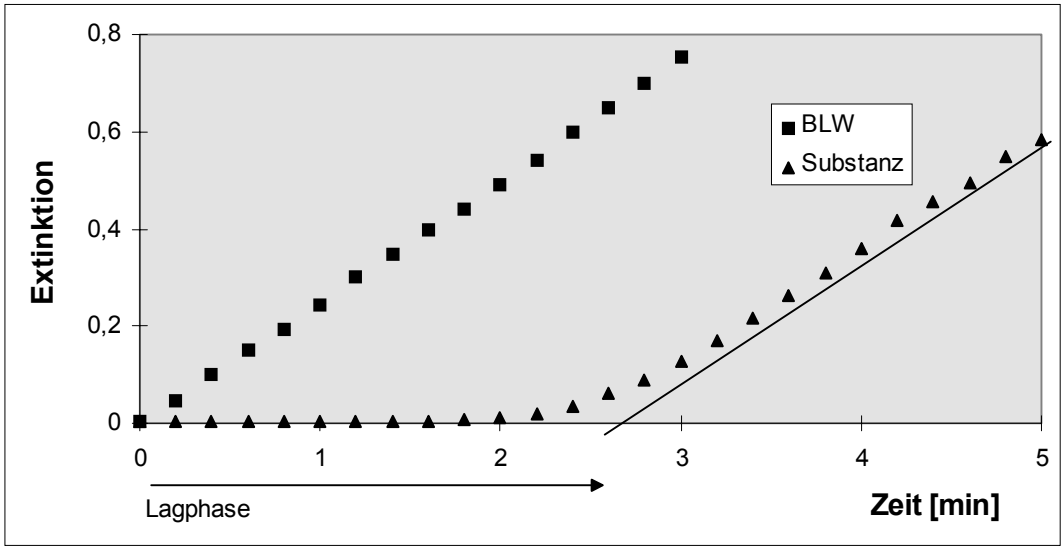


Abbildung 8.1: Schematische Darstellung des Extinktionsverlaufs des Blindwertes (BLW) und der Substanz beim TEAC I-Test

8.1.3.2 TEAC II-Test

Chemikalien:
- LDL-Phosphatpuffer pH 7,4: 218 mg KH_2PO_4 wasserfrei (oder 221 mg NaH_2PO_4 Monohydrat), 1,494 g $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$ und 8,766 g NaCl werden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst.
- ABTS-Stammlösung: Eine Spatelspitze ABTS wird in einem kleinem Becherglas in einigen Millilitern LDL-Phosphatpuffer gelöst.
- Mangandioxid MnO_2

- $ABTS^{\bullet+}$-Stammlösung: Ein Löffelspatel MnO_2 wird in ein Filterpapier gegeben und mit einigen Millilitern LDL-Phosphatpuffer befeuchtet. Dieser Puffer wird verworfen. Dann wird die ABTS-Stammlösung in das Filterpapier mit dem Mangandioxid gegossen und mit einigen Millilitern Puffer nachgewaschen. Die entstandene grüne $ABTS^{\bullet+}$-Stammlösung wird durch einen Membranfilter (0,2 µm) filtriert. Diese $ABTS^{\bullet+}$-Stammlösung hält sich mehrere Wochen im Kühlschrank in einer dunklen Flasche.
- $ABTS^{\bullet+}$-Arbeitslösung: Die $ABTS^{\bullet+}$-Stammlösung wird mit LDL-Phosphatpuffer verdünnt, bis die Extinktion bei 734 nm ~0,700 ± 0,020 beträgt. Diese Arbeitslösung wird 2 h bei Raumtemperatur in einer dunklen Flasche stehen gelassen, um dann für den Test eingesetzt zu werden (täglich frisch herzustellen).
- Trolox-Stammlösung, 2,5 mmol/l: s. TEAC I-Test.
- Trolox-Standardlösungen, 0,0125/0,025/0,05/0,1/0,125 mmol/l: Trolox-Stammlösung (2,5 mmol/l) wird 1:200/1:100/1:50/1:25/1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt (täglich frisch herzustellen).

Arbeitsweise:
Alle Arbeitsschritte werden unter reduziertem Licht durchgeführt.
Wasserlösliche Antioxidantien
Vor Beginn der Messung wird die Extinktion der $ABTS^{\bullet+}$-Arbeitslösung notiert. 1 ml $ABTS^{\bullet+}$-Arbeitslösung und 100 µl Tee-Extraktlösung bzw. Getränk bzw. Troloxstandardlösung bzw. destilliertes Wasser für den Blindwert werden in Reaktionsgefäße pipettiert und 30 s geschüttelt. Nach 2 min wird die Lösung in Halbmikrokunststoffküvetten überführt und die Extinktion gemessen.

Lipophile Antioxidantien
Vor Beginn der Messung wird die Extinktion der $ABTS^{\bullet+}$-Arbeitslösung notiert. 1 ml $ABTS^{\bullet+}$-Arbeitslösung und 100 µl Getränk bzw. Trolox-Standardlösung bzw. destilliertes Wasser für den Blindwert bzw. Hexan für den Blindwert werden in Reaktionsgefäße pipettiert und 30 s auf dem Reagenzglasschüttler geschüttelt. Danach wird 1 min bei 14000 U/min zentrifugiert, und die Schicht unter dem Lösungsmittel wird mittels Pasteurpipette bzw. Pipette in Halbmikroküvetten überführt. Die Extinktion wird nach 2 min gemessen.

Über die Kalibrierung mit Trolox wird der TEAC-Wert ermittelt, der angibt, welche Troloxkonzentration in mmol/l der antioxidativen Aktivität des Lebensmittelextraktes entspricht. Der Linearitätsbereich liegt zwischen 0,0125 und 0,125 mmol/l (r = 0,994) und der Variationskoeffizient liegt unter 5 %.

8.1.3.3 TEAC III-Test

Chemikalien:
- LDL-Phosphatpuffer pH 7,4: 218 mg KH_2PO_4 wasserfrei (oder 221 mg NaH_2PO_4 Monohydrat), 1,494 g Na_2HPO_4 x $2H_2O$ und 8,766 g NaCl werden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst.
- ABTS-Stammlösung, 7 mmol/l: 384 mg ABTS werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst.
- Kaliumpersulfat-Lösung, 2,45 mmol/l: 66,2 mg Kaliumpersulfat $K_2O_8S_2$ (Nr. 60489, Fluka) werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst.
- $ABTS^{\bullet+}$-Arbeitslösung: 100 ml ABTS-Stammlösung und 100 ml Kaliumpersulfat-Lösung werden in einem Becherglas gemischt, diese Lösung wird bei Raumtemperatur gelagert und in einer dunklen Flasche aufbewahrt. Das $ABTS^{\bullet+}$-Radikal ist nach 24 h vollständig gebildet. Vor dem Messen wird die Extinktion dieser Lösung auf 0,700 ± 0,100 eingestellt. Für die wasserlösliche Variante wird das $ABTS^{\bullet+}$-Radikal mit LDL-Phosphatpuffer verdünnt und für die lipidlösliche Variante wird das $ABTS^{\bullet+}$-Radikal mit Ethanol verdünnt.
- Trolox-Stammlösung, 2,5 mmol/l: s. TEAC I-Test.
- Trolox-Standardlösungen, 0,125/0,250/0,500/0,833/1,250 mmol/l: Trolox-Stammlösung (2,5 mmol/l) wird 1:20/1:10/1:5/1:3/1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt (täglich frisch herzustellen).

Arbeitsweise:
Alle Arbeitsschritte werden unter reduziertem Licht durchgeführt.

Wasserlösliche und lipidlösliche Antioxidantien
1 ml $ABTS^{\bullet+}$-Arbeitslösung und 100 µl Tee-Extraktlösung bzw. Getränk bzw. Trolox-Standardlösung bzw. destilliertes Wasser für den Blindwert bei wasserlöslichen Antioxidantien bzw. Ethanol für den Blindwert bei lipidlöslichen Antioxidantien werden in Reaktionsgefäße pipettiert und 45 s auf dem Reagenzglasschüttler geschüttelt. Die Extinktion dieser Lösungen wird nach 1 min bei 734 nm abgelesen.

Über die Kalibrierung mit Trolox wird der TEAC-Wert ermittelt, der angibt, welche Troloxkonzentration in mmol/l der antioxidativen Aktivität des Lebensmittelextraktes entspricht. Der Linearitätsbereich liegt zwischen 0,125 und 1,250 mmol/l (r = 0,993), der Variationskoeffizient liegt unter 5 %.

8.1.3.4 TRAP-Test

Chemikalien:

- Phosphatpuffer, pH 7,0: 4,216 g KH_2PO_4 und 7,832 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O werden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst.
- ABAP-Stammlösung, 130 mmol/l: 705 g ABAP [2,2'-Azo-bis(2-amidinopropan)-hydrochlorid] (Nr. 08963, Polysciences, Warrington, USA) werden in 20 ml Phosphatpuffer gelöst.
- ABAB-Arbeitslösung, 26 mmol/l: ABAP-Stammlösung wird 1:5 mit Phosphatpuffer verdünnt (täglich frisch herzustellen).
- Trolox-Stammlösung, 2,5 mmol/l: s. TEAC I-Test.
- Trolox-Standardlösung, 0,25/0,42/0,5/0,625 mmol/l: Trolox-Stammlösung (2,5 mmol/l) wird 1:10/1:6/1:5/1:4 mit Phosphatpuffer verdünnt (täglich frisch herzustellen).
- R-Phycoerythrin-Lösung: ca. 100 µl Suspension (Nr. P-0159, Aldrich) werden mit 100 ml Phosphatpuffer verdünnt. Die Extinktion dieser Lösung wird bei 565 nm gegen den Phosphatpuffer (pH 7,0) gemessen und sollte 0,010 betragen.

Arbeitsweise:
1,5 ml R-Phycoerythrin und 0,6 ml Phosphatpuffer werden in eine Fluoreszenzküvette gegeben und gemischt. Als Blindwert wird destilliertes Wasser eingesetzt. Mit Hilfe dieser zwei Lösungen wird der gerätespezifische Messbereich von „0 bis 800“ eingestellt. 750 µl R-Phycoerythrin, 250 µl Phosphatpuffer und 50 µl Tee-Extraktlösung bzw. Getränk bzw. Trolox-Standardlösung bzw. destilliertes Wasser für den Blindwert werden in Fluoreszenzküvetten pipettiert, gemischt und 10 min im Metallblockthermostat bei 37 °C vorgewärmt. Nach Zugabe von ABAP-Arbeitslösung wird die Messung sofort begonnen (Anregung 495 nm, Emission 575 nm). Die Fluoreszenzmessung wird alle 5 min durchgeführt. Die Küvetten bleiben in der Zwischenzeit im Metallblockthermostat bei 37 °C stehen. Die Messung wird solange fortgesetzt, bis die Fluoreszenzsignale über einen längeren Zeitraum (etwa 20 min) gleichmäßig fallen. Abbildung 8.2 veranschaulicht den Fluoreszenzverlauf beim TRAP-Test.

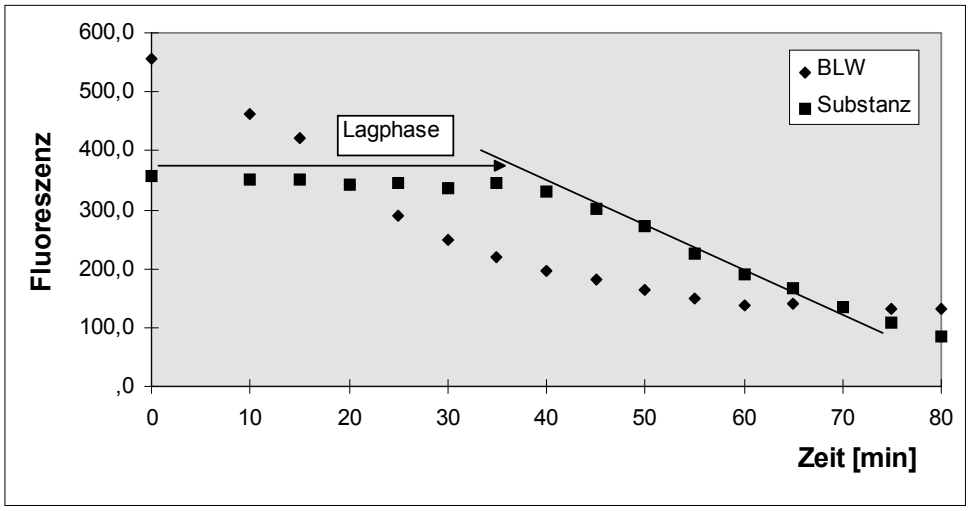


Abbildung 8.2: Schematische Darstellung des Fluoreszenzverlaufs des Blindwertes (BLW) und der Substanz beim TRAP-Test

Die Lagphasen der Analysen werden graphisch erfasst (s. Abbildung 8.2) und mittels Trolox kalibriert. Die so ermittelten TEAC-Werte (vgl. TEAC) werden mit „2“[13], dem stöchiometrischen Faktor von Trolox, sowie dem Verdünnungsfaktor der untersuchten Probe multipliziert und ergeben die molare Menge an Radikalen, die von einem Liter der untersuchten Probe abgefangen werden, den sogenannten TRAP-Wert. Der Linearitätsbereich liegt zwischen 0,25 und 0,625 mmol/l (r = 0,992), der Variationskoeffizient liegt unter 5 %.

8.1.3.5 DPPH-Test

Chemikalien:

- DPPH$^{\bullet}$-Arbeitslösung, 0,0609 mmol/l: 2,4 mg DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil) (Nr. D 9132, Sigma) werden in 100 ml Methanol gelöst.
- Trolox-Stammlösung, 2,5 mmol/l: s. TEAC I-Test.
- Trolox-Standardlösungen 0,125/0,250/0,500/0,833/1,25 mmol/l: Trolox-Stammlösung (2,5 mmol/l) wird 1:20/1:10/1:5/1:3/1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt (täglich frisch herzustellen).

Arbeitsweise:

1,95 ml DPPH$^{\bullet}$-Arbeitslösung werden in Kunststoffküvetten pipettiert, die Anfangsextinktion wird notiert (A_0) bei λ = 515 nm. Danach erfolgt die Zugabe von jeweils 20 µl Tee-Extraktlösung bzw. Getränk bzw. Trolox-Standardlösung. Nach dem Mischen der Lösungen wird die Extinktion nach 2/3/4/5/10 und 15 min aufgezeichnet bis $\Delta E < 0{,}003$/min beträgt. Die Extinktionsdifferenzen werden graphisch erfasst und auf die Kalibrierung mit Trolox bezogen. Der Linearitätsbereich liegt zwischen 0,125 und 1,25 mmol/l (r = 0,999) und der Variationskoeffizient liegt unter 5 %. Abbildung 8.3 zeigt den Extinktionsverlauf des Blindwertes (BLW) und der Substanz beim DPPH-Test.

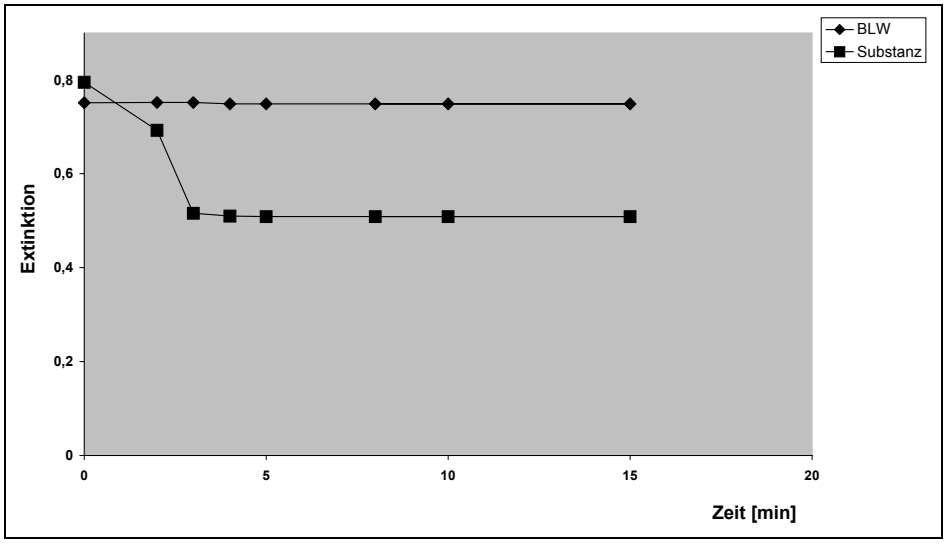


Abbildung 8.3: Schematische Darstellung des Extinktionsverlaufs des Blindwertes (BLW) und der Substanz beim DPPH-Test

8.1.3.6 DMPD-Test

Chemikalien:

- DMPD-Stammlösung, 100 mmol/l: 209 mg DMPD (N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin oder 4-Amino-N,N-dimethylanilin-dihydrochlorid) (Nr. 07767, Fluka) werden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst.
- Natriumacetat wasserfrei, 0,1 mol/l: 8,204 g $NaOOC_2H_3$ bzw. 13,61 g $NaOOC_2H_3$ x 3 H_2O werden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst (= A).
- Essigsäure, 0,1 mol/l: 6,005 g TCA werden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst (= B).

[13] 1 mol Trolox ist in der Lage 2 mol Radikale abzufangen. Aufgrund der Definition des TRAP-Wertes (er gibt an, wie viel mol Radikale abgefangen werden) ergibt sich der stöchiometrische Faktor von 2 verglichen mit dem TEAC-Test.

- Acetat-Puffer, pH 5,25: x Teile A + (100-x) Teile B, d. h. 76,8 ml Natriumacetatlösung (0,1 mol/l) wird mit 0,1 M Essigsäure auf 100 ml aufgefüllt.
- Eisen(III)-chloridlösung, 0,05 mol/l: 81,1 mg $FeCl_3$ werden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst bzw. 135 mg $FeCl_3$ x 6 H_2O werden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst.
- $DMPD^{\bullet+}$-Arbeitslösung: 1 ml von der DMPD-Stammlösung (100 mmol/l) wird zu 100 ml 0,1 M Acetat-Puffer (pH 5,25) gegeben. Zu dieser Lösung werden 0,2 ml der Eisen(III)-chloridlösung (0,05 mol/l) gegeben. Diese Lösung wird 1 h stehen gelassen. 1 ml dieser Lösung wird in eine Halbmikroküvette pipettiert, bei 505 nm wird die Extinktion gemessen. Der Extinktionswert sollte bei 0,900 ± 0,100 liegen. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur 12 h stabil (täglich frisch herzustellen).
- Trolox-Stammlösung, 2,5 mmol/l: s. TEAC I-Test.
- Trolox-Standardlösungen, 0,050/0,125/0,250/0,500/0,833 mmol/l: Trolox-Stammlösung (2,5 mmol/l) wird 1:50/1:20/1:10/1:5/1:3 mit destilliertem Wasser verdünnt (täglich frisch herzustellen).

Arbeitsweise:
50 µl Tee-Extraktlösung bzw. Getränk bzw. Trolox-Standardlösung bzw. destilliertes Wasser werden in Reaktionsgefäße pipettiert. Nach Zugabe von 1 ml $DMPD^{\bullet+}$-Lösung werden die Reaktionsgefäße im Thermomixer bei 25 °C 10 min bei 1000 U/min geschüttelt. Nach 10 min wird die Lösung in Halbmikroküvetten umgefüllt und die Extinktion bei 505 nm abgelesen. Über die Kalibrierung mit Trolox wird der TEAC-Wert ermittelt, der angibt, welche Troloxkonzentration in mmol/l der antioxidativen Aktivität des Lebensmittelextraktes entspricht. Der Linearitätsbereich liegt zwischen 0,05 und 0,833 mmol/l (r = 0,995), der Variationskoeffizient liegt unter 5 %.

8.1.3.7 FRAP-Test

Chemikalien:
- Acetatpuffer, 300 mmol/l, pH 3,6: 3,1 g $NaOOC_2H_3$ x 3 H_2O und 16 ml konzentrierte Essigsäure werden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst.
- Salzsäure, 40 mmol/l: 320 µl rauchende Salzsäure (37 %) werden mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 100 ml verdünnt.
- TPTZ-Stammlösung, 10 mmol/l: 31,2 mg TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-s-triazin) (Nr. S 1253, Sigma) werden in 10 ml HCl gelöst.
- Eisen(III)-chloridlösung, 20 mmol/l: 54,1 mg $FeCl_3$ x 6 H_2O werden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst.
- FRAP-Reagenz: 10 Volumenteile Acetatpuffer werden mit 10 Volumenanteilen Eisen(III)-chloridlösung und 1 Volumenteil TPTZ-Lösung gemischt (täglich frisch herzustellen).
- Eisen(II)-sulfatstammlösung, 5 mmol/l: 13,9 mg $FeSO_4$ x 7 H_2O werden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst (täglich frisch herzustellen).
- Eisen(II)-sulfatstandardlösung, 500/625/1000/1667/2500 µmol/l: Eisen(II)-sulfatstammlösung (5 mmol/l) wird 1:10/1:8/1:5/1:3/1:2 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Arbeitsweise:
Mit Hilfe der Mehrfachpipette werden 30 µl Wasser und 10 µl Tee-Extraktlösung bzw. Getränk bzw. Plasma bzw. Urin bzw. Standardlösung bzw. Wasser für den Blindwert in die Vertiefungen (wells) der Mikrotiterplatte pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird in das Mikrotiterplattenphotometer gestellt. Nach Zugabe von jeweils 200 µl FRAP-Reagenz mit der Mehrfachpipette wird die Messung sofort gestartet. Das Photometer ist so programmiert, dass zunächst 10 s geschüttelt (low) wird und nach weiteren 470 s, also nach einer Gesamtzeit von 8 min, der Messwert bei 595 nm ermittelt wird. Anhand der Eisen(II)-sulfat-Kalibrierung wird der FRAP-Wert in µmol/l für die Proben ermittelt. Der Linearitätsbereich liegt zwischen 500 und 2500 µmol/l (r = 0,995) und der Variationskoeffizient liegt unter 5 %.

8.1.3.8 PCL-Test (ACW-Kit)

Chemikalien:
- Reagens 1: ACW Diluent
- Reagens 2: Puffer PL-1
- Reagens 3: PS-1 Stammlösung (Photosensibilisator und Detektorsubstanz)

- PS-1 Arbeitslösung: Die PS-1 Stammlösung wird aufgetaut, mit 750 µl der Reagens 1 aufgefüllt und kurz geschüttelt.
- Reagens 1 und 2 sind einsatzfertig.
- Reagens 4: Trolox-Stammlösung, 2,5 mmol/l: s. TEAC I-Test.
- Trolox-Standardlösungen, 0,025/0,050/0,100/0,179 mmol/l: Trolox-Stammlösung (2,5 mmol/l) wird 1:100/1:50/1:25/1:14 mit destilliertem Wasser verdünnt (täglich frisch herzustellen).

Arbeitsweise:
Die folgende Tabelle veranschaulicht das Pipettierschema beim PCL-Test.
Tabelle 8.1: Pipettierschema beim PCL-Test

Reagenz [µl]	1	2	PS-1	Trolox	H_2O	Plasma
BLW	1500	1000	25		10	
Standard	1500	1000	25	10		
Probe ACW	1500	1000	25			10

Die Reagenzien werden in Reaktionsröhrchen nach obigem Schema pipettiert, gemischt und gemessen. Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf des Blindwertes und der Substanz beim PCL-Test.

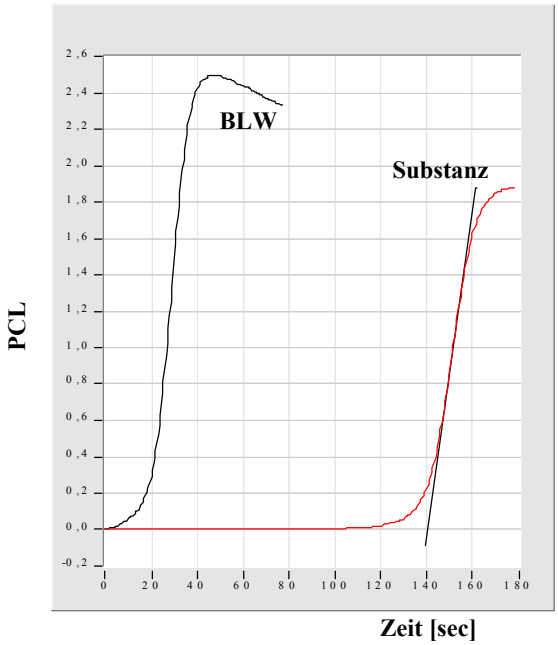


Abbildung 8.4: Verlauf des Blindwertes (BLW) und der Substanz beim PCL-Test

Die zur Verfügung stehende Software „PCL-soft“ ermittelt die Lagphasen der Trolox-Standardlösungen. Mit diesen Lagphasen wird eine Kalibriergerade ermittelt, mit deren Hilfe die antioxidative Aktivität der untersuchten Substanz in mmol/l ermittelt wird. Der Linearitätsbereich liegt zwischen 0,025 und 0,179 mmol/l (r = 1) und der Variationskoeffizient liegt unter 5 %.

8.1.4 Bestimmung von Eisen

Chemikalien:

- Schwefelsäure, verdünnt: 1 Volumenteil Schwefelsäure (98 %) wird vorsichtig mit 3 Volumenteilen destilliertem Wasser verdünnt.
- Essigsäure 96 % (Eisessig)
- Ammoniumacetat-Eisessig-Lösung: 40 g Ammoniumacetat CH_3COONH_4 wird in 100 ml Messkolben eingewogen, in 50 ml Eisessig gelöst und mit destilliertem Wasser aufgefüllt.
- Hydroxylammoniumchlorid-Lösung: 10 g Hydroxylammoniumchlorid NH_2OH x HCl werden in einem 100 ml Kolben mit destilliertem Wasser gelöst, Lösung ca. 1 Woche haltbar.
- Phenanthrolin-Lösung: 0,25 g 1,10-Phenantrolin (Nr. 1.07225, Merck, Darmstadt) werden in einem Becherglas eingewogen und in kochendem destilliertem Wasser gelöst, in einen 100 ml

Messkolben überführt, gegebenenfalls vor der Messung nochmals filtriert, Lösung ist im Dunklen eine Woche haltbar.

- Eisen(II)-Stammlösung, 1000 mg Fe^{2+}/l: 0,70215 g Ammoniumeisen(II)-sulfat-Hexahydrat $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ x 6 H_2O (Mohrsches Salz) werden in einem 100 ml Kolben in destilliertem Wasser gelöst, mit 15 ml Hydroxylammoniumchlorid und 1 ml Schwefelsäure (98 %) und mit destilliertem Wasser aufgefüllt, Lösung ist etwa 6 Monate haltbar. Von dieser Lösung wird für die photometrische Bestimmung eine Eisen(II)-Standard-Lösung I (c = 20 mg Fe^{2+}/l) und eine Eisen(II)-Standard-Lösung II (c = 1 mg Fe^{2+}/l) hergestellt.
- Eisen(II)-Standard-Lösung I, 20 mg Fe^{2+}/l: 2 ml der Eisen(II)-Stammlösung werden in einem 100 ml Messkolben mit destilliertem Wasser aufgefüllt (täglich frisch herzustellen).
- Eisen(II)-Standard-Lösung II, 1 mg Fe^{2+}/l: 100 µl der Eisen(II)-Stammlösung werden in einem 100 ml Messkolben mit destilliertem Wasser aufgefüllt (täglich frisch herzustellen).
- Eisen(II)-Standardlösungen, verdünnt: Zur Erstellung der Kalibrierkurve wird jeweils entsprechend der zu erwartenden Eisenkonzentrationen der Probe die Eisen(II)-Standard-Lösung I oder II hergestellt. In sechs 10 ml Messkolben werden zunächst 100 µl verdünnte Schwefelsäure pipettiert, danach werden 0 ml (BLW) sowie 500 µl, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml und 2,5 ml der Eisen(II)-Standardlösung I zugegeben und mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt (täglich frisch herzustellen).

Arbeitsweise:
Bestimmung des gelösten Eisens (Fe(II))
2,5 ml Probe, Standard, BLW werden in einem 5 ml Messkolben pipettiert. Nach Zugabe von 250 µl Ammoniumacetat-Eisessig-Lösung soll der pH-Wert zwischen 3,4-5,5 liegen. Nach Zugabe von 100 µl Phenanthrolin-Lösung wird bis zur Marke mit destilliertem Wasser aufgefüllt, gemischt und die Lösung 15 min stehen gelassen. Anschließend wird die Extinktion der Lösung bei 510 nm gemessen. Der Linearitätsbereich liegt zwischen 1 und 5 mg/l (r = 0,993), der Variationskoeffizient liegt unter 5 %.

Bestimmung des gesamten gelösten Eisens (Fe(II) + Fe(III))
2,5 ml der Probe, Standard, BLW werden in einen 5 ml Messkolben pipettiert. Nach Zugabe von 250 µl Ammoniumacetat-Eisessig-Lösung sowie 100 µl Hydroxylammoniumchlorid-Lösung soll der pH-Wert bei 3,4-5,5 liegen. Nach Zugabe von 100 µl Phenanthrolin-Lösung wird mit destilliertem Wasser aufgefüllt, gemischt und die Lösung 15 min stehen gelassen. Anschließend wird die Extinktion der Lösung bei 510 nm gemessen.

Anhand der Kalibrierung mit dem Eisenstandard wird der Eisengehalt als Fe^{2+} oder Fe^{3+} in den untersuchten Proben ermittelt.

8.2 HPLC-Methoden

8.2.1 Isokratische HPLC-Methode zur Bestimmung der Catechine in Tee

Häufig verwendete Geräte und Hilfsmittel:

- Reagenzglasschüttler: RS 1 (IDL GmbH & Co. KG, Nidderau)
- pH-Meter: WTW Microprocessor Modell pH 537 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co. KG, Weilheim), pH-Elektrode (Nr. FB67 107-S7 Gesellschaft Ingold Meßtechnik, Steinbach)
- Ultraschallbad: Branson 8210 (Firma Branson Ultrasonics B.V., Soest, Niederlande)
- Ultraschallbad: Sonorex RK 100, Bandelin (Firma Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin)
- Wasseranlage: Modell Millipore-Q RG (Laboratory Water Division, Millipore GmbH, Eschborn)
- Reaktionsgefäße

HPLC-Anlage:

- Pumpe: L-6200 (Merck, Darmstadt)
- UV-Detektor: Lambda 1000 (Bischoff, Leonberg)
- Integrator: Chromatopac C-R6A (Shimadzu, Duisburg)
- Säule: Ultrasep ES 100 RP 18 (250 x 4,0 mm, 6,0 µm) (Bischoff, Leonberg)

HPLC-Bedingungen:
- Mobile Phase: isokratisch, Wasser : Methanol (72+28, v/v), Wasser mit Phosphorsäure (85 %) auf pH 2,7 eingestellt
- Flußrate: 1,0 ml/min
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Wellenlänge: UV 280 nm
- Säulentemperatur: Raumtemperatur

Chemikalien:
- (-)-Epigallocatechin, 0,848 mmol/l: 1,3 mg Epigallocatechin ([2R, 3R]-2-[3,4,5,-Trihydroxyphenyl]-3,4-dihydro-1-[2H]-benzopyran-3,5,7-triol) $C_{15}H_{14}O_7$ (Nr. E 3768, Sigma) werden in 5 ml Methanol gelöst.
- (+)-Catechin, 1,834 mmol/l: 2,13 mg Catechin ([2R, 3S]-2-[3,4-Dihydroxyphenyl]-3,4-dihydro-1-[2H]-benzopyran-3,5,7-triol) $C_{15}H_{14}O_6$ (Art. 6200.1, Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe) werden in 4 ml Methanol gelöst.
- (-)-Epigallocatechingallat, 1,523 mmol/l: 3,49 mg Epigallocatechingallat ([2R, 3R]-2-[3,4,5-Trihydroxyphenyl]-3,4-dihydro-1-[2H]-benzopyran-3,5,7-triol-3-[3,4,5-trihydroxybenzoat]) $C_{22}H_{18}O_{11}$ (Nr. E 4143, Sigma) werden in 5 ml Methanol gelöst.
- (+)-Epicatechin, 0,826 mmol/l: 1,20 mg Epicatechin ([2S, 3S]-2-[3,4-Dihydroxyphenyl]-3,4-dihydro-1-[2H]-benzopyran-3,5,7-triol) $C_{15}H_{14}O_6$ (Nr. E 4143, Sigma) werden in 5 ml Methanol gelöst.
- (-)-Epicatechingallat, 0,610 mmol/l: 1,35 mg Epicatechingallat ([2R, 3R]-2-[3,4-Dihydroxyphenyl]-3,4-dihydro-1-[2H]-benzopyran-3,5,7-triol-3-[3,4,5-trihydroxybenzoat]) $C_{22}H_{18}O_{18}$ (Nr. E 3893, Sigma) werden in 5 ml Methanol gelöst.

Arbeitsweise:
Die Tee-Extrakte werden für die HPLC-Analyse mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Die Stammlösungen der Catechine werden entsprechend der zu erwartenden Konzentration in den Tee-Extraktlösungen mit mobiler Phase verdünnt. Mittels dieser chromatographischen Bedingungen ist die Elution der genannten 5 Catechine innerhalb von 15 min in folgender Elutionsreihenfolge möglich: Epigallocatechin, Catechin, Epigallocatechingallat, Epicatechin und Epicatechingallat.

Lebensmittel:
Grüner Tee verschiedener Provenienzen
- China Chun Mee, China Gunpowder, Ceylon Pekoe, Japan Bancha

8.2.2 Gradienten-HPLC-Methode zur Bestimmung der Catechine und Phenolcarbonsäuren in Tee

HPLC-Anlage:
- Pumpe: L-6200 (Merck, Darmstadt)
- UV-Detektor: zu Beginn Lambda 1000 (Bischoff, Leonberg), später UV-Detektor L-7400 (Firma Merck Hitachi, Darmstadt)
- Integrator: zu Beginn Chromatopac C-R6A (Firma Shimadzu, Duisburg), später HSM-Manager unter Windows NT
- Säulenthermostat: zu Beginn L-5025 (Merck, Darmstadt), später Shimadzu CTO-10 AC (Firma Shimadzu, Duisburg)
- Säule: Prontosil RP 18 (250 x 4 mm, 5µm) (Bischoff, Leonberg)
- Vorsäule: Phenomenex C18 (ODS, Octadecyl) 4 mm L x 3,0 mm ID (Firma Phenomenex, Hösbach)

HPLC-Bedingungen:
- Mobile Phase: Gradientenprogramm s. folgende Tabelle

Tabelle 8.2: Gradientenprogramm zur Analyse von Catechinen und Phenolcarbonsäuren

Zeit [min]	Wasser pH 2,7 [%]	Methanol [%]	Flow [ml]
0,0 - 24,0	82	18	1,000
25,0 - 40,0	75	25	1,000
41,0 - 51,0	82	18	1,000

- Flußrate: 1,0 ml/min
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Wellenlänge: UV 280 nm
- Säulentemperatur: 35 °C

Chemikalien:
- Methanol CH_3OH
- Gallussäure, 2,55 mmol/l: 4,8 mg Gallussäure-Monohydrat (3,4,5-Trihydroxybenzoesäure) (Nr. 48630, Fluka) werden in 10 ml Methanol gelöst.
- Protocatechusäure, 4,08 mmol/l: 6,3 mg Protocatechusäure (3,4-Dihydroxybenzoesäure) (Nr. P 5630, Sigma) werden in 10 ml Methanol gelöst.
- Gentisinsäure, 4,61 mmol/l: 7,1 mg Gentisinsäure (2,5-Dihydroxybenzoesäure) (Nr. G 5244, Sigma) werden in 10 ml Methanol gelöst.
- p-Hydroxybenzoesäure, 5,28 mmol/l: 7,3 mg p-Hydroxybenzoesäure (para-Hydroxybenzoesäure) (Nr. H 5376, Sigma) werden in 10 ml Methanol gelöst.
- Chlorogensäure, 1,83 mmol/l: 6,5 mg Chlorogensäure (1,3,4,5-Tetrahydroxycyclohexancarboxyl-säure-3-, 5-O-Caffeoylzimtsäure) (Nr. C 3878, Sigma) werden in 10 ml Methanol gelöst.
- Vanillinsäure, 3,12 mmol/l: 5,8 mg Vanillinsäure (4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure) (Nr. V 2250, Sigma) werden in 10 ml Methanol gelöst.
- Kaffeesäure, 2,66 mmol/l: 4,8 mg Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) (Nr. C 0625, Sigma) werden in 10 ml Methanol gelöst.
- Syringasäure, 3,23 mmol/l: 6,4 mg Syringasäure (4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure) (Nr. S 6881, Sigma) werden in 10 ml Methanol gelöst.
- p-Cumarsäure, 4,38 mmol/l: 7,2 mg p-Cumarsäure (4-Hydroxyzimtsäure) (Nr. C 9008, Sigma) werden in 10 ml Methanol gelöst.
- Ferulasäure, 4,09 mmol/l: 7,95 mg Ferulasäure (4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure) (Nr. F 3500, Sigma) werden in 10 ml Methanol gelöst.
- Sinapinsäure, 2,58 mmol/l: 5,8 mg Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-Hydroxyzimtsäure) (Nr. D 7927, Sigma) werden in 10 ml Methanol gelöst.
- p-Hydroxybenzoesäuremethylester, 5,55 mmol/l: 8,4 mg p-Hydroxybenzoesäuremethylester (Nr. H 5501, Sigma) werden in 10 ml Methanol gelöst.
- Konzentrationen der Stammlösungen der Catechine: s. 8.2.1

Lebensmittel:
- Tee verschiedener Provenienzen

8.3 In vitro-Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen

Geräte:
- Membranfilter: Ultrafiltrationsmembran ∅ 44,5 mm, Material: regenerierte Cellulose Kat. Nr. 13322 (Firma Milipore Corporation, Bedford, USA)
- Reagenzglasschüttler (heizbar): MEA 11 (IDL GmbH & Co. KG, Nidderau)
- Ultrafiltrationskammer: AMICON-Rührzelle Typ Nr. 805 (Firma Amicon Inc, Beverly, USA)
- Thermometer
- Wasserbad: GFL Typ 1003 (GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)

Chemikalien:
- Stickstoff 4.6 (gasförmig)
- Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat (Nr. 1.03861.0250, KMF Laborchemie Handels-GmbH, Leipzig)
- Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat (Nr. 1.03943.0250, KMF)
- 1,10-Phenanthrolin-Monohydrat (Nr. 1.07225.0005, KMF)

- Phosphatpuffer pH 7,3: 200 ml KH_2PO_4-Lösung (9,073 g/l KH_2PO_4 in Wasser) und 800 ml Na_2HPO_4 x 2 H_2O-Lösung (11,87 g/l Na_2HPO_4 x 2 H_2O in Wasser) werden gut gemischt.
- Methanol CH_3OH
- Konzentrationen der Stammlösungen der Catechine: s. Arbeitsvorschriften 8.2.1
- Aufbewahrungslösung für die Biomembran: Wasser : Ethanol = 80 : 20 (v/v)

Lebensmittel:
- Grüner Tee: China Gunpowder und Ceylon Pekoe
- Säuglingsnahrung: pre Milasan (Milasan, Stendal)
- Milchbrei: Milasan Milchbrei Banane (Milasan, Stendal)

Die folgende Tabelle zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Säuglingsnahrungen laut Rezeptur.

Tabelle 8.3: Zusammensetzung laut Rezeptur der Pre-Säuglingsnahrung und des Milchbreis

		Pre-Säuglingsnahrung [100 g Pulver]	Milchbrei [100 g Pulver]
Brennwert	[kJ]	2150	1840,0
Eiweiß	[g]	11,9	13,0
Kohlenhydrate	[g]	58,0	66,0
Fett	[g]	26,0	13,7
Natrium	[mg]	170	-
Kalium	[mg]	490	-
Calcium	[mg]	410	380
Magnesium	[mg]	40	-
Phosphor	[mg]	256	-
Chlorid	[mg]	300	-
Eisen	[mg]	4,00	7,5
Kupfer	[mg]	0,30	-
Zink	[mg]	3,10	2,5
Jod	[µg]	70,00	62
Vitamin A	[µg]	510	310
Vitamin D	[µg]	8	5,0
Vitamin E	[mg]	4,3	3,0
Vitamin K	[µg]	40	-
Vitamin C	[mg]	55	35
Vitamin B_1	[mg]	0,4	0,8
Vitamin B_2	[mg]	0,55	0,3
Vitamin B_6	[mg]	0,4	0,3
Vitamin B_{12}	[µg]	1,3	0,8
Niacin	[mg]	6,0	4,0
Folsäure	[µg]	42	37
Biotin	[µg]	12	25
Pantothensäure	[mg]	2,7	1,5
Taurin	[mg]	44	-

Bestimmung der Eisengehalte: s. 8.1.4

HPLC-Anlage:
- Integrator: zu Beginn Chromatopac C-R6A (Firma Shimadzu, Duisburg), später HSM-Manager unter Windows NT
- Pumpe: L-6200 (Merck, Darmstadt)
- Säule: Prontosil RP 18 (250 x 4 mm, 5µm) (Bischoff, Leonberg)
- Säulenthermostat: zu Beginn L-5025 (Merck, Darmstadt), später Shimadzu CTO-10 AC (Firma Shimadzu, Duisburg)
- UV-Detektor: zu Beginn Lambda 1000 (Bischoff, Leonberg), später UV-Detektor L-7400 (Firma Merck Hitachi, Darmstadt)
- Vorsäule: Phenomenex C18 (ODS, Octadecyl) 4 mm L x 3.0 mm ID (Firma Phenomenex, Hösbach)

HPLC-Bedingungen:
Für Versuchsreihe I (Ansatz Catechin und Eisensalz)
- Isokratische HPLC-Methode: s. 8.2.1

Für Versuchsreihe II (Ansatz Tee-Extraktlösung und Eisensalz) und III (Ansatz Tee-Extraktlösung und Lebensmittel)
- Gradienten-HPLC-Methode: s. 8.2.2

8.4 Bestimmungsmethoden zur Beurteilung von Eisenstatus, Superoxiddismutase und Glutathion

Die Bestimmung des Hämatokrit wurde im Labor des Lehrbereichs Humanernährung durchgeführt. Die Bestimmung der anderen Parameter des Eisenstatus, des Glutathions und der Superoxiddismutase wurde im Labor des Instituts für Klinische Chemie, Bachstrasse 18, durchgeführt. Nur teilweise stehen die genauen Vorschriften zur Bestimmung der Parameter zur Verfügung.

8.4.1 Bestimmung des Hämatokrits

Geräte:
- Hämatokrit-Zentrifuge: Typ 2010 (Firma Hettich, Tuttlingen)
- Hämatokrit-Kappillaren: Na-heparinisierte Hämatokrit-Kappillaren Länge 75 ± 1,00 mm, Innen ∅ 1,15 ± 0,05 mm, Außen ∅ 1,55 ± 0,05 mm (Nr. 7493, Firma Brand GmbH + Co, Fabrik für Laborgeräte, Wertheim)
- Versiegelungswachsplatte: (Nr. 749500, Firma Brand)

Arbeitsweise:
Aus einer Vollblutmonovette wird eine Hämatokrit-Kapillare bis zu etwa ¾ mit Blut gefüllt. An der mit Blut gefüllten Seite wird die Kapillare durch Eindrücken in die Versiegelungswachsplatte verschlossen, mit der verschlossenen Seite nach außen in die Kerbe des Zentrifugenaufsatzes gelegt und 5 min mit 12000 U/min zentrifugiert. Mit Hilfe einer Schablone wird der Hämatokrit in % abgelesen.

8.4.2 Bestimmung des Hämoglobins

Die Bestimmung des Hämoglobin im Vollblut erfolgte im Blutbildautomaten.

8.4.3 Bestimmung des Ferritins

Die Bestimmung des Ferritins wurde mit Hilfe von Antigen-Antikörper-Chemolumineszens durchgeführt. Die Messung des Ferritins erfolgt mittels eines Testkits der Firma Chiron Diagnostics Corporation, East Walpole, USA. Das Prinzip dieses Tests beruht auf einem Chemolumineszens-Immunoassay, der zwei verschiedene Anti-Ferritin-Antikörper benutzt. Die Kalibrationskurve verläuft zwischen 0,5 bis 1650 µg/l linear (r = 0,999) und der Variationskoeffizient liegt bei 5 %.

8.4.4 Bestimmung des Transferrins

Die Bestimmung des Transferrins erfolgte mittels Immunonephelometrie. Die Transferrinbestimmung erfolgt mittels eines Testkits (Immage, Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim-Lohdorf) im Nephelometer. Die Kalibrationskurve verläuft zwischen 0,75 bis 7,5 g/l linear (r = 0,994) und der Variationskoeffizient liegt bei 3,3 %.

8.4.5 Bestimmung des Freien Eisens

Geräte:
- Flammenatomabsorptionsspektrometer AAS5 FL (Analytik Jena AG, Jena)

Chemikalien:
- Salzsäure 32 %, Selectipur, (Nr. 1.00322.2500, Merck) (= Ch 1)
- Trichloressigsäure > 99 %, p.a., (Nr. 8789.1, Roth) (= Ch 2)
- Eisen-Stammlösung (Titrisol Nr. 109972, Merck) 1g Fe/l ($FeCl_3$ in verd. HCl) (= Ch 3)
- Kontrollserum L und LP von Dade-Behring (Dade Behring Holding GmbH, Liederbach) (= Ch 6)

- HCl, 0,1 n :11,4 ml HCl (32 %) (Ch 1) werden mit bidestilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt (= S 1).
- HCl, 4 n: 114 ml HCl (32 %) (Ch 1) werden mit bidestilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt (= S 2).
- Trichloressigsäurelösung, (10 %): 100 g Trichloressigsäure (Ch 2) werden mit bidestilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt (= S 3).
- Fe-Arbeitslösung, 1000 µmol/l Fe: 28,206 ml Eisenstammlösung (Ch 3) werden mit HCl (0,1 n) (S 1) auf 500 ml aufgefüllt (= Fe 0).
- Fe-Bezugslösungen: 5; 10; 20; 30 und 50 µmol/l Fe: Jeweils 0,5, 1, 2, 3 und 5 ml Fe-Arbeitslösung (Fe 0) werden mit HCl (0,1 n) (S 1) auf 100 ml aufgefüllt (= Fe 1-5).

Arbeitsweise:
Eisen im Serum ist eiweißgebunden und muss durch Säurebehandlung vom Protein abgespalten werden. 1 ml Serum wird in ein 3 ml Probenröhrchen pipettiert und zur Trennung der Metall-Eiweißbindung wird 0,1 ml HCl (4 n) (S 2) zugesetzt. Nach 30 min werden 0,5 ml Trichloressigsäure (10 %) (S 3) hinzugegeben, um das Eiweiß auszufällen. Prüflösung ist der nach Zentrifugation (5 min bei 5000 U/min) verbleibende klare Überstand. Die Kalibrierstandards werden analog den Seren mit HCl (4 n) (S 2) und Trichloressigsäure (10 %) (S 3) versetzt. Eine Zentrifugation ist nicht erforderlich.

Messungen am Flammenatomabsorptionsspektrometer AAS5 FL:
Die angegebenen Geräteparameter haben orientierenden Charakter, die erforderlichen Optimierungen sind entsprechend der Bedienungsanleitung auszuführen. Wichtig ist die exakte Justierung der Pipettiereinrichtung, damit die Kanüle des Probengebers in den Überstand und nicht in den eiweißhaltigen Unterstand taucht. Der Ablauf der Analyse sollte nach einem gleichbleibenden Schema erfolgen:

Einstellen der Geräteparameter (Methode „Fe+Cu+Zn Multielementmessung“ aufrufen)
- Bestückung des Probentellers:
  - Pos. 89 = Blindwert
  - Pos. 78 - 82 = Standard 1-5
  - Pos. 1 - 4 = je 2x Kontrollen L und LP
  - bis Pos. 5... = Plasma
- Auswahl des Arbeitsbereiches (Anzahl der Proben)
- gründliches Spülen
- Start, automatischer Analysenablauf mit:
- Doppelbestimmung der Kalibrierlösungen (Aufnahme der Kalibrationskurve für Eisen)
- Vermessen von maximal 20 Prüflösungen
- Rekalibrierung nach 20. Prüflösung

Sind am Brenner Verunreinigungen zu erkennen, ist dieser zu reinigen. Die Messzeit für eine Probe beträgt 35 s. So lassen sich durchschnittlich 50 Prüflösungen pro Stunde analysieren.
Die Kalibrationskurve von 5 bis 50 µmol/l Fe-Standardlösung verläuft nicht linear. Die serielle Präzision liegt bei 4,6 %.

Geräteeinstellungen des Flammenatomabsorptionsspektrometer AAS5 FL

Linie:	248,3 nm	Mess-Mode:	max	Flamme:	C_2H_2/Luft
Spalt:	0,2 nm	Int.-Zeit:	6,0 s	Gasfluss:	82 NL/h
Lampe/HKL:	5,0 mA	AZ-Zeit:	1,0 s	Zus.Luft:	120 NL/h
PTM:	441 V	Lfd. Mitt.:	2	Brenner:	50 mm
D2HKL:	aus	Goly-Sav.:	19	Höhe:	6 mm
				Winkel:	0°
				Zerstäuber:	5,0 ml/min
Statistik:	aus	Probengeber Typ: AS 51/89 Positionen			
Zyklen: 1		Tauchzeit:	1,0 s		
Leerzyklen:	0	Spülung: nach Messung/5 s			

8.4.6 Bestimmung der Freien Eisenbindungskapazität

Geräte:
- Flammenatomabsorptionsspektrometer AAS5 FL (Analytik Jena AG, Jena)

Chemikalien:
- Eisenstammlösung (Titrisol Nr. 9972, Firma Merck Darmstadt), 1 g Fe/l ($FeCl_3$ in verdünnter HCl)
- HCl (32 %), Selectipur (Nr. 1003222500, Merck) (= Chemikalie = Ch 1)
- $MgCl_2$ (BZr 63064, Fluka) (Ch 2)
- Na_2CO_3 (Nr. A947791739, Merck) (Ch 3)
- 96 % Essigsäure (Nr. 6085, J.T.Baker) (Ch 4)
- Kontrollserum L und LP (Dade Behring) (Ch 5)
- HCl, 0,1 n: 11,4 ml HCl 32 % (Ch 2) wird mit bidestilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt (S 1).
- HCl, 4 n: 114 ml HCl 32 % (Ch 2) wird mit bidestilliertem Wasser auf 250 ml aufgefüllt (S 2).
- Eisen-Arbeitslösung, 1000 µmol/l Fe: 55,89 ml Fe-Stammlösung (Ch 1) wird mit HCl (0,1 n) (S 1) auf einen Liter aufgefüllt (= EBK 0) (0 Verdünnung).
- Eisen-Bezugslösungen, 30; 60; 90; 120 µmol/l Fe**:** Jeweils 3, 6, 9, 12 ml Eisen-Arbeitslösung (EBK 0) wird mit HCl (0,1 n) (S 1) auf 100 ml aufgefüllt (= EBK 1-4).
- Eisenchlorid-Magnesiumchlorid-Reaktionslösung (Fe-Mg-RL): 5 ml Fe-Stammlösung (Ch 1), 47,5 g $MgCl_2$ (Ch 3), 1 ml HCl (4 n) (S 2) werden mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt (= EBK 5).
- Magnesiumchlorid-Reaktionslösung für Eichkurve (Mg-RL): 47,5 g $MgCl_2$ (Ch 3), 1 ml HCl 4 n (S 2) werden mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt (= EBK 6).
- Na_2CO_3-Lösung, 20 %: 100 g Na_2CO_3 (Ch 4) werden mit bidestillertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt (= EBK 7).
- Essigsäure, 30 %: 30 ml Essigsäure (96 %) werden mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt (= EBK 8).

Arbeitsweise:
500 µl Plasma werden in 3 ml Probenröhrchen pipettiert und 1 ml der Eisenchlorid-Magnesiumchlorid-Reaktionslösung (EBK 5) und 500 µl Na_2CO_3-Lösung (20 %) (EBK 7) zugegeben. Nach Rühren lässt man zur vollständigen Fällung des Magnesiumcarbonats und Absorption des Eisen(III)-hydroxids die Proben 40 min stehen. 500 µl des nach Zentrifugation gebildeten Überstandes werden in ein sauberes Probenröhrchen überführt und 50 µl der Essigsäure (30 %) (EBK 8) zugegeben. Es kommt zu einer Schäumungsreaktion. Die Prüflösung wird vor der Untersuchung am Flammenatomabsorptionsspektrometer 45 min stehen gelassen und zwischendurch mehrmals geschüttelt. Die Kalibrierstandards werden analog den Plasmaproben vorbereitet. Anstelle der Eisen-Magnesiumchlorid-Reaktionslösung wird jedoch die eisenfreie Magnesiumchloridlösung (EBK 6) zugegeben. Nach Natriumcarbonatzugabe (EBK 7) werden die Standardlösungen gerührt und 40 min stehen gelassen. Eine Zentrifugation ist nicht erforderlich. Zum Ansatz (2 ml) wird das 4-fache Volumen Essigsäure (EBK 8) gegeben und die Standards wie die Serumproben weiterbehandelt. Die Kalibrationskurve verläuft zwischen 30 und 120 µmol/l nicht linear. Der Variationskoeffizient liegt bei 4,0 %.

8.4.7 Bestimmung der Superoxiddismutase

Geräte:
- Spektrometer: Model UV2 (UNICAM Chromatography GmbH & Co. KG, Kassel)

Chemikalien:
- 3-(Cyclohexylamino)-propan-1-sulfonsäure 99 % Caps (= Ch 1) (Nr. 16,376-7, Aldrich)
- Dinatrium-EDTA (Ethylendiamin-N,N,N‘,N‘-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (Nr. 10,631-3, Aldrich) (= Ch 2)
- Xanthin 98 % (2,6 Dihydroxypurin) (Nr. 38420, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) (= Ch 3)
- 2-(-4-Iodophenyl)-3-(-4-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazoliumchlorid (INT) (Nr. I-1,040-6, Aldrich) (= Ch 4)
- Xanthinoxidase (1,0 U/mg Protein ≅ 10,7 mg/ml) (Nr. 38418, SERVA) (= Ch 5)
- Natriumdihydrogenphosphat (Nr. 22,990-2, Aldrich), (= Ch 6)
- Superoxiddismutase, 3220 U/mg (Nr. 35700, SERVA) (= Ch 7)

- RanSOD Control (Randox) (RanSOD Control) Kontrolle in 2 ml Wasser lösen; in 250 µl Portionen einfrieren. Kontrolle täglich mitführen (Ergebnis x 2, da in 2 ml und nicht in 1 ml gelöst) (Nr. SD126, Randox Laboratories GmbH, Krefeld) (= Ch 8).
- RanSOD Kit (Nr. SD125, Randox) (= Ch 9).
- Caps-Puffer, pH 10,2: 11,066 g 3-(Cyclohexylamino)-propan-1-sulfonsäure (Ch 1) und 350 mg Dinatrium-EDTA (= Ch 2) werden in einem Liter bidestilliertem Wasser gelöst, der pH wird auf 10,2 eingestellt (= SOD 1).
- Mix-Substrat: 7,6 mg Xanthin (Ch 3) und 12,6 mg 2-(-4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-tetrazoliumchlorid (INT) (Ch 4) werden in einem Liter Caps-Puffer (SOD 1) gelöst (= SOD 2).
- Xanthinoxidase-Lösung: 100 µl Xanthinoxidase (Ch 5) werden in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst (= SOD 3).
- Phosphatpuffer, pH 7,0: 1,2 g Natriumhydrogenphosphat (0,01 mmol) (Ch 6) werden in einem Liter bidestilliertem Wasser gelöst und auf pH 7,0 eingestellt (= SOD 4).
- SOD-Arbeitslösung, 32,2 U/100 µl: 1 mg Superoxiddismutase werden in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst, dies entspricht 3220 U/10 ml bzw. 322 U/ml bzw. 32,2 U/100 µl (= SOD 5).
- SOD-Bezugslösung 1: 0 µl SOD 5/10 ml SOD 4 z. B. 0 U/ml (= SOD 6)
- SOD-Bezugslösung 2: 20 µl SOD 5/10 ml SOD 4 0,54 U/ml (= SOD 7)
- SOD-Bezugslösung 3: 50 µl SOD 5/10 ml SOD 4 1,35 U/ml (= SOD 8)
- SOD-Bezugslösung 4: 50 µl SOD 5/5 ml SOD 4 2,70 U/ml (= SOD 9)
- SOD-Bezugslösung 5: 100 µl SOD 5/5 ml SOD 4 5,40 U/ml (= SOD 10)
- Kalibrierkurve SOD 7 bis SOD 10 wird mit RanSOD-Kit (Ch 9) eingestellt.

Arbeitsweise:
Vollblut wird 1:50 mit Phosphatpuffer (SOD 4) verdünnt. In Quarzhalbmikroküvetten (1 cm Schichtdicke) werden 800 µl Mix-Substrat (SOD 2) pipettiert, danach werden 20 µl verdünnte Probe bzw. 20 µl Bezugslösung (SOD 6 - SOD 10) zur Erstellung der Kalibrierkurve dazugegeben. Die Küvetten (8 Küvetten können gleichzeitig vermessen werden) werden in das Gerät gestellt, 60 µl Xanthinoxidase-Lösung (SOD 3) werden zugegeben, gemischt und sofort am UNICAM Spektrometer UV 2 (UNICAM Chromatography GmbH & Co. KG, Kassel) bei der Wellenlänge von 505 nm gemessen. Mit den Messwerten der Kalibrierkurve wird die Probenkonzentration berechnet. Die Kontrolle (Ch 8) wird täglich mitgeführt. Der Hämoglobingehalt des Blutes wird bestimmt. Die SOD-Konzentration (U/ml) wird in U/µmol Hb umgerechnet. Die Kalibrationskurve verläuft zwischen 0,54 bis 5,40 U/ml nicht linear. Der Variationskoeffizient liegt bei 8,7 %.

8.4.8 Bestimmung des Glutathions

Geräte:
- Spektrometer: Model UV2 (UNICAM Chromatography GmbH & Co KG, Kassel)

Chemikalien:
- Methaphosphorsäure in Stücken (Nr. 100456, Merck) (= Ch 1)
- Natriumdihydrogenphosphat (Nr. 33,198-8, Aldrich) (= Ch 2)
- Dinatrium-EDTA (Nr. 10,631-3, Aldrich) (= Ch 3)
- 5,5‘-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure) (Ellman‘s Reagens = 5‘5-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)) (Nr. 104477, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) (= Ch 4)
- NADPH-Na-Salz (Nr. 107816, Roche Diagnostics) (= Ch 5)
- Glutathion-Reduktase (Nr. 697788, Roche Diagnostics) (= Ch 6)
- Glutathion reduziert (Nr. 2315002, SERVA) (= Ch 7)
- Metaphosphorsäure-Lösung, 5 %: 5 g Metaphosphorsäure (Ch 1) wird in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst (= GSH 1).
- Phosphatpuffer für GSH, pH 7,5: 11,9 g Natriumdihydrogenphosphat (100 mmol/l) (Ch 2) und 1,86 g EDTA-Na_2 (5 mmol/l) (Ch 3) werden in einem Liter bidestilliertem Wasser gelöst und mit NaOH auf einen pH von 7,5 eingestellt (= GSH 2).
- Ellman’s Reagens-Lösung, 1,26 mmol/l: 50 mg Ellman’s Reagenz (Ch 4) werden in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst (= GSH 3).
- NADPH-Lösung, 0,72 mmol/l: 30,6 mg NADPH-Na-Salz (Ch 5) werden in 50 ml Phosphatpuffer (GSH 2) gelöst (= GSH 4).

- Glutathion-Reduktase-Lösung: 50 µl Glutathionreduktase (Ch 6) werden in 40 ml Phosphatpuffer (GSH 2) gelöst (= GSH 5).
- Glutathion-Standard-Lösung, 1,63 mmol/l: 5 mg Glutathion reduziert (Ch 7) wird in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst (= GSH 6).

Arbeitsweise:
Die Bestimmung des Glutathions erfolgt im Vollblut. In Eppendorfreaktionsgefäßen werden je 200 µl Blut oder Glutathion-Standard-Lösung (GSH 6) bzw. bidestilliertes Wasser (Leerwert) pipettiert und 800 µl Metaphosphorsäure-Lösung (GSH 1) (zur Fällung des Eiweiß) zugegeben. Der Probenansatz wird kurz geschüttelt und nach 20 min mit 13000 U/min zentrifugiert. Der nach Zentrifugation gebildete Überstand wird mit Phosphatpuffer (GSH 2) im Verhältnis 1 : 21 (50 µl Überstand + 1000 µl Puffer) verdünnt. Zur Bestimmung von Glutathion im Vollblut werden Quarzmikroküvetten (1 cm Schichtdicke) verwendet, in denen 300 µl Ellman's Reagenz-Lösung (GSH 3), 300 µl Glutathion-Reduktase-Lösung (GSH 5), 50 µl verdünnter Probenüberstand und 300 µl NADPH-Lösung (GSH 4) pipettiert werden. In den Küvetten wird der Messansatz mit einem Spatel gerührt, der Küvettenhalter des Spektrometers UV2 (Unicam) wird mit den Proben bestückt und bei 412 nm die Extinktion photometrisch bestimmt. So können gleichzeitig 8 Küvetten d. h. 4 Doppelbestimmungen gemessen werden. Von den gemessenen Absorptionswerten für die Blutproben und dem Standard wird zunächst die Absorption des Leerwertes subtrahiert. Die so gebildeten Differenzen für Probe und Standard werden dividiert und mit 1630 µmol/l (GSH-Konzentration im Standard) multipliziert. Ergebnis ist die GSH-Konzentration im Vollblut. Um diese Konzentration auf den Hb-Wert zu berechnen, wird der Hämoglobingehalt des Vollblutes bestimmt. Der Quotient aus den Konzentrationen von Glutathion und Hämoglobin entspricht der GSH-Menge in (µmol/l)/mmol/l Hb. Eine Aussage über die Linearität der Kalibrationskurve kann nicht getroffen werden, da nur ein Blindwert und ein Standard zur Kalibrierung eingesetzt wird. Der Variationskoeffizient liegt bei 9,0 %.

8.5 Statistische Analyse

Die statistische Berechnung erfolgte mit SPSS für Windows 10.0.5 (Freigabe 27.11.1999), SPSS Inc., Chicago, USA. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Der jeweils angewandte Test zur statistischen Berechnung ist bei den Tabellen und Abbildungen angegeben.

9 Literaturverzeichnis

1 Aalderink J, Hoffmann I, Groeneveld M, Leitzmann C (1994):
Ergebnisse der Gießener Vollwert-Ernährungs-Studie. Lebensmittelverzehr und Nährstoffaufnahme von Vollwertköstlerinnen und Mischköstlerinnen. *Ernährungs-Umschau* 41: 328-335.

2 Alonso AM, Domínguez C, Guillén DA, Barroso CG (2002):
Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *J Agric Food Chem* 50: 3112-3115.

3 Appleby PN, Thorogood M, Mann JI, Key TJA (1999):
The Oxford vegetarian study: an overview. *Am J Clin Nutr* 70 (Suppl.): 525-531.

4 Arts ICW, Hollman PCH (1998):
Optimization of a quantitative method for the determination of catechins in fruits and legumes. *J Agric Food Chem* 46: 5156-5162.

5 Arts ICW, van de Putte B, Hollman PCH (2000):
Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J Agric Food Chem* 48: 1752-1757.

6 Arts MJTJ, Haenen GRMM, Wilms LC, Beetstra SAJN, Heijnen CGM, Voss H-P, Bast A (2002):
Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity. *J Agric Food Chem* 50: 1184-1187.

7 Aruoma OI, Murcia A, Butler J, Halliwell B (1993):
Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *J Agric Food Chem* 41: 1880-1885.

8 Astill C, Birch MR, Dacombe C, Humphrey PG, Martin PT (2001):
Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *J Agric Food Chem* 49: 5340-5347.

9 Balentine DA, Wiseman SA, Bouwens LCM (1997):
The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37: 693-704.

10 Ball MJ, Bartlett MA (1999):
Dietary intake and iron status of Australian vegetarian women. *Am J Clin Nutr* 70: 353-358.

11 Benzie IFF, Strain JJ (1996):
The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70-76.

12 Benzie IFF, Szeto YT (1999):
Total antioxidant capacity of teas by ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* 47: 633-636.

13 Benzie IFF, Szeto YT, Strain JJ, Tomlinson B (1999):
Consumption of green tea causes rapid increase in plasma antioxidant power in humans. *Nutr Cancer* 34: 83-87.

14 Bitsch I (1998):
Die Mär vom Eisenräuber. *W.I.T.* 2: 8-14.

15 Bitsch R, Sinnhuber S, Oberritter H, Großklaus R, Müller MJ, Wolfram G (1994):
Alternative Diäten - Wunderdiäten. *Akt Ernähr Med* 19: 195-211.

16 Bitsch R (1996):
Eisenbedarf und vegetarische Ernährung. *Ernährungs-Umschau* 43: 214-217.

17 Bitsch R (1999):
Pflanzliche Phenole und ihre gesundheitliche Wirkung. *VitaMinSpur* 14: 16-20.

18 Bitsch R, Netzel M, Carlé E, Strass G, Kesenheimer B, Herbst M, Bitsch I (2001):
Bioavailability of antioxidative compounds from Brettacher apple juice in humans. *Innov Food Sci Emerg Technol* 1: 245-249.

19 Blot WJ, McLaughlin JK, Chow W-H (1997):
Cancer rates among drinkers of black tea. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37: 739-760.

20 Böhm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke A (1998):
Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Krankheiten. *Z Ernährungswiss* 37: 147-163.

21 Böhm H (2000a):

Das Französische Paradoxon - Gesundheit durch Phenole des Weins? *Ernährungs-Umschau* 47: 44-49

22 Böhm V (1999):
Antioxidative Aktivität von Tee: Einfluß der Extraktionszeit und der Extraktionsvorgänge. *W.I.T.* 2: 11-19.

23 Böhm V (2000b):
Bestimmung der antioxidativen Kapazität - methodische Ansätze und Bewertung. *Ernährungs-Umschau* 47: 372-375.

24 Bokuchava MA, Skobeleva NI (1969):
The chemistry and biochemistry of tea and tea manufacture. *Adv Food Res* 17: 215-292.

25 Bothwell TH, Baynes RD, MacFarlane BJ, MacPhail AP (1989):
Nutritional iron requirements and food iron absorption. *J Intern Med* 226: 357-365.

26 Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995):
Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 28: 25-30.

27 Bravo L (1998):
Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56: 317-333.

28 Brown RC, Klein A, Simmons WK, Hurrell RF (1990):
The influence of Jamaican herb teas and other polyphenol-containing beverages on iron absorption in the rat. *Nutr Res* 10: 343-353.

29 Brune M, Rossander L, Hallberg L (1989):
Iron absorption and phenolic compounds: importance of different phenolic structures. *Eur J Clin Nutr* 43: 547-558.

30 Buddecke E, Fischer M (1992):
Pathophysiologie, Pathobiochemie, Klinische Chemie. Walter de Gruyter Berlin New York.

31 Bundgaard T, Wildt J, Frydenberg M, Elbrond O, Nielsen JE (1995):
Case-control study of squamous cell cancer of the oral cavity in Denmark. *Cancer Causes Control* 6: 57-67.

32 Burda S, Oleszek W, Lee CY (1990):
Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage. *J Agric Food Chem* 38: 945-948.

33 Cao G, Alessio HM, Cutler RG (1993):
Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Rad Biol Med* 14: 303-311.

34 Cao G, Russel RM, Lischner N, Prior RL (1998):
Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or Vitamin C in elderly women. *J Nutr* 128: 2383-2390.

35 Cao Y, Cao R (1999):
Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 398: 381.

36 Cao Y, Cao R, Bråkenhielm E (2002):
Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *J Nutr Biochem* 13: 380-390.

37 Caragay AB (1992):
Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Tech* 46: 65-68.

38 Chanarin I, Malkowska V, O'Hea A-M, Rinsler MG, Price AB (1985):
Megaloblastic anaemia in a vegetarian Hindu community. *Lancet* 23: 1168-1172.

39 Chen Z-Y, Zhu QY, Tsang D, Huang Y (2001):
Degradation of green tea catechins in tea drinks. *J Agric Food Chem* 49: 477-482.

40 Christian P, Seshadri S (1989):
Counteracting the inhibitory effect of tea on the in-vitro availability of iron from cereal meals. *J Sci Food Agric* 49: 431-436.

41 Clifford MN, Copeland EL, Bloxsidge JP, Mitchell LA (2000):
Hippuric acid as a major excretion product associated with black tea consumption. *Xenobiotica* 30: 317-326.

42 Clinton WP (1985):
The chemistry of coffee. In: 11e Colloque Scientifique International sur le Café, Asociation Scientifique International du Café,Lomé/Paris, 87-92.

43 Cook JD, Lipschitz DA, Miles LEM, Finch CA (1974):
Serum ferritin as a measure of iron stores in normal subjects. *Am J Clin Nutr* 27: 681-687.

44 Cook JD, Reddy MB, Hurrell RF (1995):
The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 61: 800-804.

45 Cook JD, Reddy MB (2001):
Effect of ascorbic acid intake on nonheme-iron absorption from a complete diet. *Am J Clin Nutr* 73: 93-98.

46 Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Viseu dos Santos AC, Wood EG, Carrier MJ (2001):
Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* 414: 863-864.

47 Craig WJ (1994):
Iron status of vegetarians: *Am J Clin Nutr* 59 (Suppl.): 1233-1237.

48 Dalluge JJ, Nelson BC, Thomas JB, Welch MJ, Sander LC (1997):
Capillary liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for the separation and detection of catechins in green tea and human plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom* 11: 1753-1756.

49 Dalluge JJ, Nelson BC, Thomas JB, Sander LC (1998):
Selection of column and gradient elution system for separation of catechins in green tea using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 793: 265-274.

50 Dangour AD, Hill HL, Ismail SJ (2001):
Haemoglobin status of adult non-pregnant Kazakh women living in Kzyl-Orda region, Kazakhstan. *Eur J Clin Nutr* 55: 1068-1075.

51 Davidsson L, Dimitriou T, Walczyk T, Hurrell RF (2001):
Iron absorption from experimental infant formulas based on pea (Pisum sativum)-protein isolate: the effects of phytic acid and ascorbic acid. *Br J Nutr* 85: 59-63.

52 Depeint F, Gee JM, Williamson G, Johnson IT (2002):
Evidence of consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. *Proc Nutr Soc* 61: 97-103.

53 Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung und Schweizerische Vereinigung für Ernährung (Hrsg.) (2000):
Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 1. Auflage 1. korrigierter Nachdruck Umschau Braus GmbH Verlagsgesellschaft Frankfurt/Main.

54 Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. DGE (Hrsg.) (2000):
Ernährungsbericht 2000. Druckerei Henrich GmbH Frankfurt/Main.

55 Deutscher Teeverband (Hrsg.) (2000):
Tee als Wirtschaftsfaktor - Aktuelles Zahlenmaterial. Deutscher Teeverband e. V., Hamburg.

56 Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Bornett F, Fern EB, Roberfroid MB (1999):
Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *Br J Nutr* 81 (Suppl. 1): 1-27.

57 Disler PB, Lynch SR, Charlton RW, Torrance JD, Bothwell TH, Walker RB, Mayet F (1975a):
The effect of tea on iron absorption. *Gut* 16: 193-200.

58 Disler PB, Lynch SR, Torrance JD, Sayers MH, Bothwell TH, Charlton RW (1975b):
The mechanism of the inhibition of iron absorption by tea. *South African J Med Sci* 40: 109-116.

59 Donovan UM, Gibson RS (1996):
Dietary intakes of adolescent females consuming vegetarian, semi-vegetarian, and omnivorous diets. *J Adolesc Health* 18: 292-300.

60 Dreosti IE (1996):
Bioactive ingredients: Antioxidants and Polyphenols in tea. *Nutr Rev* 54: 51-58.

61 Engelhardt U (1995):
Polyphenole im Tee. Habilitationsschrift Braunschweig.

62 Engelhardt U (1999):
Grüner und schwarzer Tee - Gemeinsamkeiten und Unterschiede. *W.I.T.* 2: 1-8.

63 Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ (2000):
Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oil and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J Agric Food Chem* 48: 648-656.

64 Esterbauer H, Striegl G, Puhl H, Rotheneder M (1989):

Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad Res Comms* 6: 67-75.

65 Farkas CS, Harding le Riche W (1987):
Effect of tea and coffee consumption on non-haem iron absorption. *Hum Nutr Clin Nutr* 41C: 161-163.

66 Fernández PL, Pablos F, Martín MJ, Gonzáles AG (2002):
Study of catechin and xanthine tea profiles as geographical tracers. *J Agric Food Chem* 50: 1833-1839.

67 Fogliano V, Verde V, Randazzo G, Ritieni A (1999):
Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J Agric Food Chem* 47: 1035-1040.

68 Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE (1993):
Inhibition of oxidation of human low-densitiy lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341 454-457.

69 Frankel EN, Huang, S-W, Aeschbach R (1997):
Antioxidant activity of green teas in different lipid systems. *JAOCS* 74: 1309-1315.

70 Fraser GE (1999):
Associations between diet and cancer, ischemic heart disease, and all-cause mortality in non-Hispanic white California Seventh-day adventists. *Am J Clin Nutr* 70 (Suppl.): 532-538.

71 Gabrielli GB, de Sandre G (1995):
Excessive tea consumption can inhibit the efficacy of oral iron treatment in iron-deficiency anemia. *Haematologica* 80: 518-520.

72 Galan P, Yoon H-C, Preziosi P, Viteri F, Valeix P, Fieux B, Briançon S, Malvy D, Roussel A-M, Favier A, Hercberg S (1998):
Determing factors in the iron status of adult women in the SU.VI.MAX study. *Eur J Clin Nutr* 52: 383-388.

73 Gardner PT, McPhail DB, Duthie GG (1998):
Electron spin resonance spectroscopic assessment of the antioxidant potential of teas in aqueous and organic media. *J Sci Food Agric* 76: 257-262.

74 Gao YT, McLaughlin JK, Blot WJ, Ji BT, Dai Q, Fraumeni JF (1994):
Reduced risk of esophageal cancer associated with green tea consumption. *J Natl Cancer Inst* 86: 855-858.

75 Gee JM, DuPont MS, Day AJ, Plumb GW, Williamson G, Johnson IT (2000):
Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 130: 2765-2771.

76 Gee JM, Johnson IT (2001):
Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. *Curr Med Chem* 8: 1245-1255.

77 Ghiselli A, Serafini M, Maiani G, Azzini E, Ferro-Luzzi A (1995):
A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Rad Biol Med* 18: 29-36.

78 Ghiselli A, Natella F, Guidi A, Montanari L, Fantozzi P, Scaccini C (2000):
Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr Biochem* 11: 76-80.

79 Gil-Izquierdo A, Zafrilla P, Tomás-Barberán FA (2002):
An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *Eur Food Res Technol* 214: 155-159.

80 Gillooly M, Bothwell TH, Torrance JD, MacPhail AP, Derman DP, Bezwoda WR, Mills W, Charlton RW, Mayet F (1983):
The effects of organic acids, phytates and polyphenols on the absorption of iron from vegetables. *Br J Nutr* 49: 331-342.

81 Girotti S, Bolelli L, Fini F, Budini R, Arfelli G (2002)
Chemiluminescent determination of antioxidant capacity of beverages. *Ital J Food Sci* 2: 113-122.

82 Glahn RP, Lee OA, Yeung A, Goldman MI, Miller DD (1998):
Caco-2 cell Ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *J Nutr* 128: 1555-1561.

83 Glahn RP, Lee OA, Miller DD (1999):
In vitro digestion/Caco-2 cell culture model to determine optimal ascorbic acid to Fe ratio in rice cereal. *J Food Sci* 64: 925-928.
84 Goldbohm RA, Hertog MGL, Brants HAM, van Poppel G, van den Brandt PA (1996):
Consumption of black tea and cancer risk: a prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst* 88: 93-100.
85 Graham HN (1992):
Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 21: 334-350.
86 Grantham-McGregor S, Ani C (2001):
A review of studies on the effect of iron deficiency on cognitive development in children. *J Nutr* 131: 649-668.
87 Greiling H, Gressner AM (Hrsg.) (1995):
Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. 3. Auflage Schattauer Verlag Stuttgart.
88 Haddad EH, Berk LS, Kettering JD, Hubbard RW, Peters WR (1999):
Dietary intake and biochemical, hematologic, and immune status of vegans compared with nonvegetarians. *Am J Clin Nutr* 70 (Suppl.): 586-593.
89 Hahn A, Leitzmann C (2000):
Alternative Ernährungsformen Teil 1: Ursprung - Antike. *ERNO* 1: 176-186.
90 Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR (1998):
HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *J Sci Food Agric* 77: 543-551.
91 Hallberg L, Rossander L (1982):
Effect of different drinks on the absorption of non-heme iron from composite meals. *Human Nutr Appl Nutr* 36A: 116-123.
92 Hallberg L, Brune M, Rossander L (1986):
Effect of ascorbic acid on iron absorption from different types of meals. Studies with ascorbic acid-rich foods and synthetic ascorbic acid given in different amounts with different meals. *Hum Nutr Appl Nutr* 40A: 97-113.
93 Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, Sandberg AS, Rossander-Hultén L (1991):
Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 53: 112-119.
94 Hallberg L, Rossander-Hultén L, Brune M, Gleerup A (1992):
Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance. *Eur J Clin Nutr* 46: 317-327.
95 Hallberg L, Hulthén L, Bengtsson C, Lapidus L, Lindstedt G (1995):
Iron balance in menstruating women. *Eur J Clin Nutr* 49: 200-207.
96 Hallberg L, Hultén L, Garby L (1998):
Iron stores in man in relation to diet and iron requirements. *Eur J Clin Nutr* 52: 623-631.
97 Hallberg L, Hulthén L (2000):
Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. *Am J Clin Nutr* 71: 1147-1160.
98 Hallberg L (2001):
Perspectives on nutritional iron deficiency. *Annu Rev Nutr* 21: 1-21.
99 Hallberg L (2002):
Advantages and disadvantages of an iron-rich diet. *Eur J Clin Nutr* 56 (Suppl. 1): 12-18.
100 Halliwell B (1990):
How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad Res Comms* 9: 1-32.
101 Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI (1995):
Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35: 7-20.
102 Hambræus L (1999):
Animal- and plant-food-based diets and iron status: benefits and costs. *Proc Nutr Soc* 58: 235-242.
103 Harborne JB (1980):
Plant phenolics. In: Bell EA, Charlwood BV (eds): Secondary plant products. Springer Verlag Berlin.
104 Hazell T, Johnson IT (1987):

In vitro estimation of iron availability from a range of plant foods: influence of phytate, ascorbate and citrate. *Br J Nutr* 57: 223-233.

105 Henn T, Stehle P (1998):
Gesamtphenolgehalt und antioxidative Kapazität handelsüblicher Getränke. *Ernährungs-Umschau* 45: 308-313.

106 Herrmann K (1984):
Pflanzenphenole. Jahrbuch 1984 Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V. Bonn.

107 Herrmann K (1991):
Hydroxyzimtsäure-Verbindungen als biologisch aktive Inhaltsstoffe von Lebensmitteln. *Ernährungs-Umschau* 38: 148-154.

108 Herrmann W, Schorr H, Purschwitz K, Rassoul F, Richter V (2001):
Total homocysteine, vitamin B_{12}, and total antioxidant status in vegetarians. *Clin Chem* 47: 1094-1101.

109 Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D (1993):
Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342: 1007-1011.

110 Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB (1995):
Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155: 381-386.

111 Hertog MGL, Sweetnam PM, Fehily AM, Elwood PC, Kromhout D (1997):
Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the caerphilly study. *Am J Clin Nutr* 65: 1489-1494.

112 Heseker H (1997):
Eisen Funktionen, Physiologie, Stoffwechsel, Empfehlungen und Versorgung in der Bundesrepublik Deutschland. *Ernährungs-Umschau* 44: 455-458.

113 Heseker H, Schneider R, Moch KJ, Kohlmeier M, Kübler W (1994):
Vitaminversorung Erwachsener in der Bundesrepublik Deutschland. In: Kübler W, Anders HJ, Heeschen W: VERA-Schriftenreihe Bd. IV Wiss Fachverlag Dr. Fleck Niederkleen.

114 Hicks MB, Hsieh Y-HP, Bell LN (1996):
Tea preparation and its influence on methylxanthine concentration. *Food Res Intern* 29: 325-330.

115 Higashi-Okai K, Taniguchi M, Okai Y (2000):
Pontent antioxidative activity of non-polyphenolic fraction of green tea (Camellia sinensis) - association with pheophytins a und b. *J Sci Food Agric* 80: 117-120.

116 Higashi-Okai K, Yamazaki M, Nagamori H, Okai Y (2001):
Identification and antioxidant activity of several pigments from the residual green tea (Camellia sinensis) after hot water extraction. *J UOEH* 23: 335-344.

117 Hodgson JM, Morton LW, Puddey IB, Beilin LJ, Croft KD (2000):
Gallic acid metabolites are markers of black tea intake in humans. *J Agric Food Chem* 48: 2276-2280.

118 Hodgson JM, Puddey IB, Burke V, Beilin LJ, Mori TA, Chan S-Y (2002):
Acute effects of ingestion of black tea on postprandial platelet aggregation in human subjects. *Br J Nutr* 87: 141-145.

119 Hoffmann I, Groeneveld MJ, Boeing H, Koebnick C, Golf S, Katz N, Leitzmann C (2001):
Giessen wholesome nutrition study: relation between a health-conscious diet and blood lipids. *Eur J Clin Nutr* 55: 887-895.

120 Hollman PCH, de Vries JHM, van Leeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB (1995):
Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 62: 1276-1282.

121 Huang M-T, Smart RC, Wong C-Q, Conney AH (1988):
Inhibitor effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 48: 5941-5946.

122 Huang Y-C, Lin W-J, Cheng C-H, Su K-H (1999):
Nutrient intakes and iron status of healthy young vegetarians and nonvegetarians. *Nutr Res* 19: 663-674.

123 Hung C-J, Huang P-C, Lu S-C, Li Y-H, Huang H-B, Lin B-F, Chang S-J, Chou H-F (2002):
Plasma homocysteine levels in Taiwanese vegetarians are higher than those of omnivores. *J Nutr* 132: 152-158.

124 Hunt JR, Roughead ZK (2000):
Adaptation of iron absorption in men consuming diets with high or low iron bioavailability. *Am J Clin Nutr* 71: 94-102.

125 Hurrell RF (1997):
Bioavailability of iron. *Eur J Clin Nutr* 51 (Suppl. 1): 4-8.

126 Hurrell RF, Reddy M, Cook JD (1999):
Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. *Br J Nutr* 81: 289-295.

127 Jardine D, Antolovich M, Prenzler PD, Robards K (2002):
Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) investigation of the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) reaction. *J Agric Food Chem* 50: 1720-1724.

128 Jovaní M, Barberá R, Farré R, de Aquilera EM (2001):
Calcium, iron, and zinc uptake from digests of infant formulas by Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 49: 3480-3485.

129 Jovanovic SV, Simic MG, Steenken S, Hara Y (1998):
Iron complexes of gallocatechins. Antioxidant action or iron regulation? *J Chem Soc* 2: 2365-2369.

130 Justesen U, Knuthsen P, Leth T (1997):
Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Lett* 114: 165-167.

131 Kähkönen MP, Hopia AI, Vuorela HJ, Rauha J-P, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M (1999):
Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 47: 3954-3962.

132 Kandiah J (2002):
Impact of tofu or tofu + orange juice on hematological indices of lacto-ovo vegetarian females. *Plant Foods Hum Nutr* 57: 197-204.

133 Key TJ, Davey GK, Appleby PN (1999a):
Health benefits of a vegetarian diet. *Proc Nutr Soc* 58: 271-275.

134 Key TJ, Fraser GE, Thorogood M, Appleby PN, Beral V, Reeves G, Burr ML, Chang-Claude J, Frentzel-Beyme R, Kuzma JW, Mann J, McPherson K (1999b):
Mortality in vegetarians and nonvegetarians: detailed findings from a collaborative analysis of 5 prospective studies. *Am J Clin Nutr* 70 (Suppl.) 516-524.

135 Khokhar S, Magnusdottir SGM (2002):
Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *J Agric Food Chem* 50: 565-570.

136 Kim D-O, Lee KW, Lee HJ, Lee CY (2002):
Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem 50*: 3713-3717.

137 Klipstein-Grobusch K, Koster JF, Grobbee DE, Lindemans J, Boeing H, Hofman A, Witteman JCM (1999):
Serum ferritin and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam study. *Am J Clin Nutr* 69: 1231-1236.

138 Kobayashi Y, Suzuki M, Satsu H, Arai S, Hara Y, Suzuki K, Miyamoto Y, Shimizu M (2000):
Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. *J Agric Food Chem* 48: 5618-5623.

139 Kohlmeier M, Thefeld W, Stelte W, Grimm R, Häußler A, Hünchen K, Reuter U, Saupe J, Schek A, Kübler W (1995):
Versorgung Erwachsener mit Mineralstoffen und Spurenelementen in der Bundesrepublik Deutschland. Differenzierung nach Alter und Geschlecht. In: Kübler W, Anders HJ, Heeschen W: VERA-Schriftenreihe Bd. V Wiss Fachverlag Dr. Fleck Niederkleen.

140 Kováčiková Z, Čerhata D, Kadrabová J, Madarič A, Ginter E (1998):
Antioxidant status in vegetarians and nonvegetarians in Bratislava region (Slovakia). *Z Ernährungswiss* 37: 178-182.

141 Krapf FE, Bieger WP, Tiller FW (1995):

Labordatenbuch. 1. Auflage Urban & Schwarzenberg München Wien Baltimore.

142 Kromidas S, Klinkner R, Mertens R (1995):
Methodenvalidierung im analytischen Labor. *Nachr Chem Tech Lab* 43: 669-676.

143 Kuhnert N (2002):
Funktionelle Lebensmittel - eine kritische Betrachtung. *Nachrichten aus der Chemie* 50: 142-146.

144 Kuhr S (1993):
Flavanale, Flavon-C-Glykoside und höhermolekulare Polyphenole im Tee. Dissertation Braunschweig.

145 Kuhr S, Engelhardt UH (1991):
Determination of flavonols, theogallin, gallic acid and caffeine in tea using HPLC. *Z Lebensm Unters Forsch* 192: 526-529.

146 Lakenbrink C, Lapczynski S, Maiwald B, Engelhardt UH (2000):
Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J Agric Food Chem* 48: 2848-2852.

147 Landau JM, Yang CS (1997):
The effect of tea on health. *Chem Ind* 17: 904-906.

148 Langley-Evans SC (2000):
Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. *Intern J Food Sci Nutr* 51: 181-188.

149 Larsson CL, Johansson GK (2002):
Dietary intake and nutritional status of young vegans and omnivores in Sweden. *Am J Clin Nutr* 76: 100-106.

150 Leblanc JC, Yoon H, Kombadjian A, Verger P (2000):
Nutritional intakes of vegetarian populations in France. *Eur J Clin Nutr* 54: 443-449.

151 Lee M-J, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS (2002):
Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 1025-1032.

152 Leenen R, Roodenburg AJC, Tijburg LBM, Wiseman SA (2000):
A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. *Eur J Clin Nutr* 54: 87-92.

153 Leonardi C, Ambrosino P, Esposito F, Fogliano V (2000):
Antioxidative activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes. *J Agric Food Chem* 48: 4723-4727.

154 Leung LK, Su Y, Chen R, Zhang Z, Huang Y, Chen Z-Y (2001a):
Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *J Nutr* 131: 2248-2251.

155 Leung SSF, Lee RHY, Sung RYT, Luo H, Lam CWK, Yuen MP, Hjelm M, Lee SH (2001b):
Growth and nutrition of Chinese vegetarian children in Hong Kong. *J Paediatr Child Health* 37: 247-253.

156 Li C, Xiaofeng M, Winnik B, Lee M-J, Lu H, Sheng S, Buckley B, Yang CS (2001):
Analysis of urinary metabolites of tea catechins by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 14: 702-707.

157 Liebert M, Licht U, Böhm V, Bitsch R (1999):
Antioxidant properties and total phenolics content of green and black tea under different brewing conditions. *Z Lebensm Unters Forsch A* 208: 217-220.

158 Lin J-K, Lin C-L, Liang Y-C, Lin-Shiau S-Y, Juan I-M (1998):
Survey of catechins, gallic acid, and methylxantines in green, Oolong, Pu-erh, and black teas. *J Agric Food Chem* 46: 3635-3642.

159 Lu S-C, Wu W-H, Lee C-A, Chou H-F, Lee H-R, Huang P-C (2000):
LDL of Taiwanese vegetarians are less oxidizable than those of omnivores. *J Nutr* 130: 1591-1596.

160 Lucarini M, di Lullo G, Cappelloni M, Lombardi-Boccia G (2000):
In vitro estimation of iron and zinc dialysability from vegetables and composite dishes commonly consumed in Italy: effect of red wine. *Food Chem* 70: 39-44.

161 Luten J, Crews, H, Flynn S, van Dael P, Kastenmayer P, Hurrell R, Deelstra H, Shen L-H, Fairweather-Tait S, Hickson K, Farré R, Schlemmer U, Frøhlich W (1996):
Interlaboratory trial on the determination of the in vitro iron dialysability from food. *J Sci Food Agric* 72: 415-424.

162 MacPhail AP, Bothwell TH, Torrance JD, Derman DP, Bezwoda WR, Charlton RW, Mayet F (1981):
Factors affecting the absorption of iron from Fe(III)EDTA. *Br J Nutr* 45: 215-227.

163 Maiani G, Serafini M, Salucci M, Azzini E, Ferro-Luzzi A (1997):
Application of a new high-performance liquid chromatographic method for measuring selected polyphenols in human plasma. *J Chromatogr B* 692: 311-317.

164 Manzocco L, Anese M, Nicoli MC (1998):
Antioxidant properties of tea extracts as affected by processing. *Lebensm Wiss Technol* 31: 694-698.

165 Marx JJM (1997):
Iron deficiency in developed countries: prevalence, influence of lifestyle factors and hazards of prevention. *Eur J Clin Nutr* 51: 491-494.

166 Matthews JH, Wood JK (1984):
Megaloblastic anaemia in vegetarian Asians. *Clin Lab Haematol* 6: 1-7.

167 Matissek R, Schnepel FM, Steiner G (1989):
Lebensmittelanalytik: Gründzüge, Methode, Anwendungen. 1. Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg.

168 Matuschek E, Towo E, Svanberg U (2001):
Oxidation of polyphenols in phytate-reduced high-tannin cereals: effect on different phenolic groups and on in vitro accessible iron. *J Agric Food Chem* 49: 5630-5638.

169 Matuschek E, Svanberg U (2002):
Oxidation of polyphenols and the effect of in vitro accessibility in a model food system. *J Food Sci* 67: 420-424.

170 McGready R, Simpson JA, Cho T, Dubowitz L, Changbumrung S, Böhm V, Munger RG, Sauberlich HE, White NJ, Nosten F (2001):
Postpartum thiamine deficiency in a Karen displaced population. *Am J Clin Nutr* 74: 808-813.

171 McKay DL, Blumberg JB (2002):
The role of tea in human health: an update. *J Am Coll Nutr* 21: 1-13.

172 Merhav H, Amitai Y, Palti H, Godfrey S (1985):
Tea drinking and microcytic anemia in infants. *Am J Clin Nutr* 41: 1210-1213.

173 Merken HM, Beecher GR (2000):
Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J Agric Food Chem* 48: 577-599.

174 Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, van Campen D (1981):
An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr* 34: 2248-2256.

175 Miller JC, Miller JN (1993):
Statistics for analytical chemistry. 3. Auflage Ellis Horwood PTR Prentice Hall New York.

176 Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A (1993):
A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 84: 407-412.

177 Miller NJ, Diplock AT, Rice-Evans CA (1995):
Evaluation of the total antioxidant activity as a marker of the deterioration of apple juice on storage. *J Agric Food Chem* 43: 1794-1801.

178 Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA (1996):
Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett* 384: 240-242.

179 Miller NJ, Rice-Evans CA (1997):
The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chem* 60: 331-337.

180 Minihane AM, Fox TE, Fairweather-Tait SJ (1993):
A continuous flow in vitro method to predict bioavailability of Fe from foods. *Bioavailability* 93: 175-179.

181 Moran JF, Klucas RV, Grayer RJ, Abian J, Becana M (1997):

Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. *Free Rad Biol Med* 22: 861-870.

182 Morck TA, Lynch SR, Cook JD (1983):
Inhibition of food iron absorption by coffee. *Am J Clin Nutr* 37: 416-420.

183 Mosel HD, Herrmann K (1974):
Changes in catechins und hydroxycinnamic acid derivatives during development of apples and pears. *J Sci Food Agric* 25: 251-256.

184 Mukamal KJ, Maclure M. Muller JE, Sherwood JB, Mittleman MA (2002):
Tea consumption and mortality after acute myocardial infarction. *Circulation* 105: 2476-2481.

185 Mukhtar H, Ahmad N (2000):
Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr* 71 (Suppl.): 1698-1702.

186 Nagyová A, Kudláčková M, Grančičová E, Magálová (1998):
LDL oxidizability and antioxidative status of plasma in vegetarians. *Ann Nutr Metab* 42: 328-332.

187 Nakagawa K, Miyazawa T (1997):
Chemiluminescence-high-performance liquid chromatographic determination of tea catechin, (-)-epigallocatechin 3-gallate, at picomole levels in rat and human plasma. *Anal Biochem* 248: 41-49.

188 Nakagawa T, Yokozawa T, Terasawa K, Shu S, Juneja LR (2002):
Protective activity of green tea against free radical- and glucose-mediated protein damage. *J Agric Food Chem* 50: 2418-2422.

189 Netzel M, Straß G, Bitsch I, Rechner A, Dietrich H, Böhm V, Bitsch R (2002):
Bioaktive Fruchtsäfte - in vivo Untersuchungen mit schwarzen Johannisbeersaft, naturtrübem Apfelsaft und Mehrfruchtsaft. *Flüssiges Obst* 2: 113-116.

190 Nieman DC (1999):
Physical fitness and vegetarian diets: is there a relation? *Am J Clin Nutr* 70 (Suppl.): 570-575.

191 Okai Y, Higashi-Okai K (1997):
Potent suppressing activity of the non-polyphenolic fraction of green tea (Camellia sinensis) against genotoxin-induced umu C gene expression in Salmonella typhimurium (TA 1535/pSK 1002) - association with pheophytins a and b. *Cancer Lett* 120: 117-123.

192 Opie SC, Clifford MN, Robertson A (1995):
The formation of thearubigen-like substances by in-vitro polyphenol oxidase-mediated fermentation of individual flavan-3-ols. *J Sci Food Agric* 67: 501-505.

193 Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL (2001):
Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 49: 4619-4626.

194 Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK (2002):
Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J Agric Food Chem* 50: 3122-3128.

195 Pascal G (1996):
Functional foods in the European union. *Nutr Rev* 54: 29-32.

196 Pietta PG, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P, Bombardelli E (1998):
Catechin metabolites after intake of green tea infusions. *Biofactors* 8: 111-118.

197 Pongstaporn W, Bunyaratavej A (1999):
Hematological parameters, ferritin and vitamin B_{12} in vegetarians. *J Med Assoc Thai* 82: 304-311.

198 Pool-Zobel BL, Bub A, Schröder N, Rechkemmer G (1999):
Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *Eur J Nutr* 38: 227-234.

199 Pool-Zobel BL, Adlercreutz H, Glei M, Liegibel UM, Sittlingon J, Rowland I, Wähälä K, Rechkammer G (2000):
Isoflavonoids and lignans have different potentials to modulate oxidative genetic damage in human colon cells. *Carcinogenesis* 21: 1247-1252.

200 Popov I, Lewin G (1999):

Antioxidative homeostasis: Characterization by means of chemiluminescent technique. *Methods Enzym* 300: 437-456.

201 Prior RL, Cao G (1999):
In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad Biol Med* 27: 1173-1181.

202 Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, van Buren L, Wagner E, Wiseman S, van de Put F, Dacombe C, Rice-Evans CA (2002):
The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetable reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Rad Res* 36: 217-233.

203 Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F (2000):
Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* 48: 3396-3402.

204 Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999):
Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med* 26: 1231-1237.

205 Record IR, McInerney JK, Dreosti IE (1996):
Black tea, green tea, and tea polyphenols. Effects on trace element status in weanling rats. *Biol Trace Elem Res* 53: 27-43

206 Record IR, Lane JM (2001):
Simulated intestinal digestion of green and black teas. *Food Chem* 73: 481-486.

207 Renaud S, de Lorgeril M (1992):
Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339: 1523-1526

208 Renaud SC, Guéguen R, Schenker J, d`Houtaund A (1998):
Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology* 9: 184-188.

209 Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996):
Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 20: 933-956.

210 Rice-Evans CA (2000):
Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. *Free Rad Res* 33: 59-66.

211 Richelle M, Tavazzi I, Offord E (2001):
Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *J Agric Food Chem* 49: 3438-3442.

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

213 Roberfroid MB (2000):
Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr* 71: 1660-1664.

214 Robertson A (1983a):
Effects of physical and chemical conditions on the in vitro oxidation of tea leaf catechins. *Phytochemistry* 22: 889-896.

215 Robertson A (1983b):
Effects of catechin concentration on the formation of black tea polyphenols during in vitro oxidation. *Phytochemistry* 22: 897-903.

216 Robinson EE, Maxwell SRJ, Thorpe GHG (1997):
An investigation of the antioxidant activity of black tea using enhanced chemiluminescence. *Free Rad Res* 26: 291-302.

217 Rogers MA, Vaughan TL, Davis S, Thomas DB (1995):
Consumption of nitrate, nitrite, and nitrosodimethylamine and the risk of upper aerodigestive tract cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4: 29-36.

218 Rohe M (2001):
Antioxidantien: Erfassung der antioxidativen Kapazität komplexer Proben mit der Chemilumineszenzmethode. *Labo* 9: 10-14.

219 Root MM, Hu J, Stephenson LS, Parker RS, Campbell TC (1999):
Iron status of middle-aged women in five counties of rural China. *Eur J Clin Nutr* 53: 199-206.

220 Rossander L, Hallberg L, Björn-Rasmussen E (1979):

Absorption of iron from breakfast meals. *Am J Clin Nutr* 32: 2484-2489.

221 Rungruangsak K, Tosukhowong P, Panijpan B, Vimokesant SL (1977):
Chemical interactions between thiamin and tannic acid. I. Kinetics, oxygen dependence and inhibition by ascorbic acid. *Am J Clin Nutr* 30: 1680-1685.

222 Salonen JT, Nyyssönen K, Korpela H, Tuomilehto J, Seppänen R, Salonen R (1992):
High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 86: 803-811.

223 Samman S, Sandström B, Toft MB, Bukhave K, Jensen M, Sórensen SS, Hansen M (2001):
Green tea or rosemary extract added to foods reduces nonheme-iron absorption. *Am J Clin Nutr* 73: 607-612.

224 Sanders TAB, Reddy S (1994):
Vegetarian diets and children. *Am J Clin Nutr* 59 (Suppl.): 1176-1181.

225 Sanders TAB (1999):
Meat or wheat for the next millenium? A debate pro veg. The nutritional adequacy of plant-based diets. *Proc Nutr Soc* 58: 265-269.

226 Sano M, Suzuki M, Miyase T, Yoshino K, Maeda-Yamamoto M (1999):
Novel antiallergic catechin derivates isolated from Oolong tea. *J Agric Food Chem* 47: 1906-1910.

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

228 Schlesier K, Böhm V, Bitsch R (1999):
Einfluß unterschiedlicher Zubereitungstechniken auf Gesamtphenolgehalte, antioxidative Aktivität und Catechingehalte von grünem Tee. *Lebensmittelchemie* 53: 148.

229 Schlesier K, Böhm V, Bitsch R (2001a): Unterschiede im protektiven Potential von Grün- und Schwarztee aus gleichen Teeblättern. *Proc Germ Nutr Soc* 3: 22.

230 Schlesier K, Böhm V, Bitsch R (2001b): HPLC-Methode zur Detektion von Flavonoiden und Phenolcarbonsäuren in Obst und Gemüse. *Lebensmittelchemie* 55: 38-39.

231 Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R (2002):
Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Rad Res* 36: 177-187.

232 Schroeter KA (2001):
Lebensmittelrechtliche Aspekte: Abgrenzungsfragen, Rechtssetzungsbedarf, Werbung (Health Claims). In: Funktionelle Lebensmittel - Lebensmittel der Zukunft. Lebensmittelchemische Gesellschaft 1. Auflage Behrs Verlag GmbH Hamburg.

233 Schubert R, Leupold M (2001)
Vorteile und Nachteile vegetarischer Kostformen. *Ernährungs-Umschau* 48: 96-101.

234 Sebeková K, Krajcovidová-Kudlácková M, Schinzel R, Faist V, Klvanová J, Heidland A (2001):
Plasma levels advanced glycation end products in healthy, long-term vegetarians and subjects on a western mixed diet. *Eur J Nutr* 40: 275-281.

235 Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A (1996):
In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur J Clin Nutr* 50: 28-32.

236 Serafini M, Maiani G, Mayer B, Hermetter A, Castilla P, Lasunción MA, Wilczak J, Ostaszewski P, Pulido R, Saura-Calixto (2001):
Comparison of total antioxidant capacity assays: a European interlaboratory study. In: Bioactive compounds in plant foods. Health effects and perspectives for the food industry. European Scientific Conference, Tenerife, Canary Islands, Spain.

237 Shahrzad S, Bitsch I (1996):
Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 741: 223-231.

238 Shahrzad S, Aoyagi K, Winter A, Koyama A, Bitsch I (2001):
Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J Nutr* 131: 1207-1210.

239 Shaw N-S, Chin C-J, Pan, W-H (1995):
A vegetarian diet rich in soybean products compromises iron status in young students. *J Nutr* 125: 212-219.

240 Siegenberg D, Baynes RD, Bothwell TH, Macfarlane BJ, Lamparelli RD, Car NG, MacPhail P, Schmidt U, Tal A, Mayet F (1991):
Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *Am J Clin Nutr* 53: 537-541.

241 Silver J (1993):
Chemistry of iron. First Edition Chapmann & Hall London United Kingdom.

242 Singleton VL, Rossi JA (1965):
Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158.

243 Singleton VL (1973):
Analytical fractionation of the phenolic substances of grapes and wine and some practical uses of such analyses. *Adv Chem Ser* 137: 184-211.

244 Soustre Y, Dop MC, Galan P, Hercberg S (1986):
Dietary determinants of the iron status in menstruating women. *Int J Vitam Nutr Res* 56: 281-286.

245 Speitling A, Hüppe R, Kohlmeier M, Matiaske B, Stelte W, Thefeld W, Wetzel S (1992):
Methodenhandbuch In: Kübler W, Anders HJ, Heeschen W, Kohlmeier M (Hrsg.): Verbundstudie Ernährungserhebung Risikofaktoren Analytik Band I Wissenschaftlicher Fachverlag Dr. Fleck Niederkleen.

246 Standley L, Winterton P, Marnewick JL, Gelderblom WCA, Joubert E, Britz TJ (2001):
Influence of processing stages on antimutagenic and antioxidant potentials of Rooibos tea. *J Agric Food Chem* 49: 114-117.

247 Strube M, Haenen GRMM, van den Berg H, Bast A (1997):
Pitfalls in a method for assessment of total antioxidant capacity. *Free Rad Res* 26: 515-521.

248 Stupans I, Kirlich A, Tuck KL, Hayball PJ (2002):
Comparison of radical scavenging effect, inhibition of microsomal oxygen free radical generation, and serum lipoprotein oxidation of several natural antioxidants. *J Agric Food Chem* 50: 2464-2469.

249 Swain JH, Tabatabai LB, Reddy MB (2002):
Histidine content of low-molecular-weight beef proteins influences nonheme iron bioavailability in Caco-2 cells. *J Nutr* 132: 245-251.

250 Tedesco I, Russo M, Iacomino G, Russo GL, Carraturo A, Faruolo C, Moio L, Palumbo R (2000):
Antioxidant effect of red wine polyphenols on red blood cells. *J Nutr Biochem* 11: 114-119.

251 Temme EHM, van Hoydonck PGA (2002):
Tea consumption and iron status. *Eur J Clin Nutr* 56: 379-386.

252 The American Dietetic Association (1997):
Position of the American Dietetic Association: vegetarian diets. *J Am Diet Assoc* 97: 1317-1321.

253 The British Nutrition Foundation (1995):
Iron. First Edition Chapman & Hall London United Kingdom.

254 Tijburg LBM, Mattern T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB (1997):
Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37: 771-785.

255 Tokunaga S, White IR, Frost C, Tanaka K, Kono S, Tokudome S, Akamatsu T, Moriyama T, Zakouji H (2002):
Green tea consumption and serum lipids and lipoproteins in a population of healthy workers in Japan. *Ann Epidemiol* 12: 157-165.

256 Trevisanato SI, Kim Y-I (2000):
Tea and health. *Nutr Rev* 58: 1-10.

257 Tuntawiroon M, Sritongkul N, Brune M, Rossander-Hultén L, Pleehachinda R, Suwanik R, Hallberg L (1991):
Dose-dependent inhibitory effect of phenolic compounds in foods on nonheme-iron absorption in men. *Am J Clin Nutr* 53: 554-557.

258 Unno T, Yayabe F, Hayakawa T, Tsuge H (2002):
Electron spin resonance spectroscopic evaluation of scavenging activity of tea catechins on superoxide radicals generated by a phenanzine methosulfate and NADH system. *Food Chem* 76: 259-265.

259 Van Acker SABE, van den Berg D-J, Tromp MNJL, Griffioen DH, van Bennekom WP, van der Vijgh WJF, Bast A (1996):
Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad Biol Med* 20: 331-342.

260 Van de Vijver LPL, Kardinaal AFM, Charzewska J, Rotily M, Charles P, Maggiolini M, Ando S, Väänänen K, Wajszczyk B, Heikkinen J, Deloraine A, Schaafsma G (1999):
Calcium intake is weakly but consistently negatively associated with iron status in girls and women in six European countries. *J Nutr* 129: 963-968.

261 Van Dusseldorp M, Schneede J, Refsum H, Ueland PM, Thomas CMG, de Boer E, van Staveren WA (1999):
Risk of persistent cobalamin deficiency in adolescents fed a macrobiotic diet in early life. *Am J Clin Nutr* 69: 664-671.

262 Vinson JA, Proch J, Bose P (2001):
Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. *Methods Enzym* 335: 103-114.

263 Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF (1997):
Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (Aspalathus linearis) with green, oolong,and black tea. *Food Chem* 60: 73-77.

264 Wang H, Cao G, Prior RL (1996):
Total antioxidant capacity of fruits. *J Agric Food Chem* 44: 701-705.

265 Wang RSA, Kies C (1991):
Niacin, thiamin, iron and protein status of humans as affected by consumption of tea (Camellia sinensis) infusions. *Plant Foods Hum Nutr* 41: 337-353.

266 Warden BA, Smith LS, Beecher GR, Balentine DA, Clevidence BA (2001):
Catechins are bioavailable in men and woman drinking black tea throughout the day. *J Nutr* 131: 1731-1737.

267 Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H (2000):
Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 60: 3823-3831.

268 Weststrate JA, Meijer GW (1998):
Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur J Clin Nutr* 52: 334-343.

269 Winnefeld K, Streck S, Treff E, Jütte H, Kroll E, Marx H (1999):
Referenzbereiche antioxidativer wirkender Parameter im Vollblut (Erythrozyten) einer Thüringer Region. *Med Klin* 94 (Suppl 3): 101-102.

270 Wiseman SA, Balentine DA, Frei B (1997):
Antioxidants in tea. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37: 705-718.

271 World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research (1997):
Food, Nutrition, and the Prevention of Cancer: A global perspective, 427.

272 WHO (1992):
89th Session of the executive board, Geneva, WHO.

273 Wulf LW, Nagel CW (1976):
Analysis of phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography. *J Chromatogr* 116: 271-279.

274 Xie B, Shi H, Chen Q, Ho C-T (1993):
Antioxidant properties of fractions and polyphenol constituents from green, oolong and black teas. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 17: 77-84.

275 Yamane T, Nakatani H, Kikuoka N, Matsumoto H, Iwata Y, Kitao Y, Oya K, Takahashi T (1996):
Inhibitory effects and toxicity of green tea polyphenols for gastrointestinal carcinogenesis. *Cancer* 77 (Suppl.): 1662-1667.

276 Yang CS, Landau JM, Huang M-T, Newmark HL (2001):
Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 21: 381-406.

277 Yen G-C, Chen H-Y (1995):
Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenity. *J Agric Food Chem* 43: 27-32.

278 Young JF, Dragsted LO, Haraldsdóttir J, Daneshvar B, Kall MA, Loft S, Nilsson L, Nielsen SE, Mayer B, Skibsted LH, Huynh-Ba T, Hermetter A, Sandström B (2002):
Green tea extract only affects markers of oxidative status postprandially: lasting antioxidant effect of flavonoid-free diet. *Br J Nutr* 87: 343-355.

279 Zeyuan D, Bingyin T, Xiaolin L, Jinming H, Yifeng C (1998a):
Effect of green tea and black tea on the blood glucose, the blood triglycerides, and antioxidation in aged rats. *J Agric Food Chem* 46: 3875-3878.

280 Zeyuan D, Bingying T, Xiaolin L, Jinming H, Yifeng C (1998b):
Effect of green tea and black tea on the metabolism of mineral elements in old rats. *Biol Trace Elem Res* 65: 75-86.

281 Zhang A, Chan PT, Luk YS, Ho WKK, Chen Z-Y (1997):
Inhibitory effect of jasmine green tea epicatechin isomers on LDL-Oxidation. *J Nutr Biochem* 8: 334-340.

282 Zhu QY, Hackmann RM, Ensunsa JL, Holt RR, Keen CL (2002):
Antioxidative activities of Oolong tea. *J Agric Food Chem* 50: 6929-6934.

283 Zijp IM, Korver O, Tijburg LBM (2000):
Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40: 371-398.

Anhang

Tabelle A 1: Gehalte der Catechine [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) in den 1. - 5. Aufgüssen des China Gunpowder

Catechine [µmol/l]	**China Gunpowder Siedendes Wasser**									
	1. Aufguss		2. Aufguss		3. Aufguss		4. Aufguss		5. Aufguss	
EGC	979,43 ±	2,77	325,58 ±	3,35	207,23 ±	10,97	73,29 ±	2,54	53,49 ±	3,04
C	178,58 ±	9,00	94,27 ±	7,27	53,71 ±	2,31	18,28 ±	2,08	9,22 ±	1,27
EGCG	798,40 ±	27,93	83,41 ±	2,77	45,11 ±	2,93	13,14 ±	1,85	5,22 ±	0,46
EC	1077,62 ±	2,89	192,62 ±	18,24	117,53 ±	9,89	45,05 ±	0,69	22,61 ±	0,35
ECG	300,93 ±	12,81	101,37 ±	7,62	77,76 ±	2,66	43,18 ±	1,73	24,65 ±	1,15
	China Gunpowder 80 °C-Wasser									
EGC	1051,91 ±	25,62	339,86 ±	16,85	189,44 ±	11,43	140,06 ±	4,39	51,26 ±	2,08
C	216,70 ±	16,74	32,32 ±	3,92	27,42 ±	3,00	15,18 ±	2,31	6,28 ±	0,35
EGCG	953,07 ±	37,05	76,64 ±	6,81	28,89 ±	2,77	51,99 ±	7,50	21,06 ±	1,66
EC	1046,03 ±	16,16	171,35 ±	11,24	112,47 ±	6,46	51,99 ±	7,50	21,06 ±	1,66
ECG	337,09 ±	13,16	110,84 ±	2,31	80,53 ±	5,15	53,79 ±	3,66	22,74 ±	2,17

Tabelle A 2: Gehalte der Catechine [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) in den 1. - 5. Aufgüssen des Japan Bancha

Catechine [µmol/l]	**Japan Bancha Siedendes Wasser**									
	1. Aufguss		**2. Aufguss**		**3. Aufguss**		**4. Aufguss**		**5. Aufguss**	
EGC	1856,84 ±	40,40	728,62 ±	47,44	195,56 ±	22,62	104,55 ±	10,04	43,15 ±	7,26
C	62,52 ±	3,92	34,85 ±	0,35	7,43 ±	0,58	n. n.		n. n.	
EGCG	965,15 ±	557,37	418,87 ±	76,87	144,19 ±	6,03	94,52 ±	0,00	29,18 ±	0,09
EC	1512,49 ±	60,60	574,60 ±	9,23	149,09 ±	4,27	101,10 ±	7,27	65,22 ±	5,50
ECG	279,95 ±	25,43	84,39 ±	11,07	42,17 ±	0,50	32,24 ±	1,05	15,20 ±	1,10
	Japan Bancha 80 °C-Wasser									
EGC	1701,35 ±	89,69	591,90 ±	0,00	119,49 ±	7,62	67,99 ±	1,27	47,34 ±	0,00
C	37,22 ±	3,92	28,97 ±	2,42	10,53 ±	1,27	n. n.		n. n.	
EGCG	798,16 ±	25,28	333,09 ±	27,36	134,40 ±	11,83	97,05 ±	4,50	60,24 ±	5,94
EC	1351,86 ±	64,52	352,19 ±	18,58	152,79 ±	13,67	93,87 ±	6,45	65,87 ±	6,39
ECG	237,59 ±	25,51	101,86 ±	0,23	49,87 ±	4,50	56,26 ±	32,58	31,31 ±	0,18

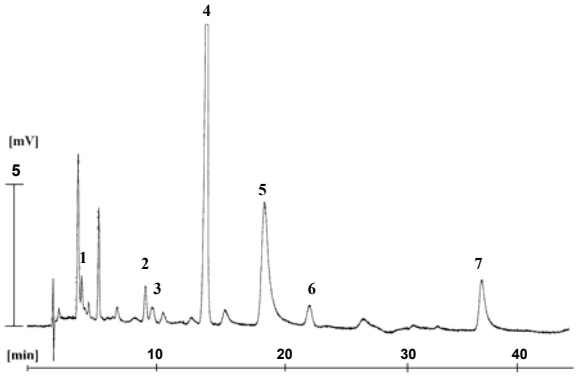


Abbildung A 1: HPLC-Chromatogramm des grünen Darjeeling A bei einer Aufbrühtemperatur von 100 °C (1 = GS, 2 = EGC, 3 = C, 4 = Koffein, 5 = EGCG, 6 = EC, 7 = ECG)

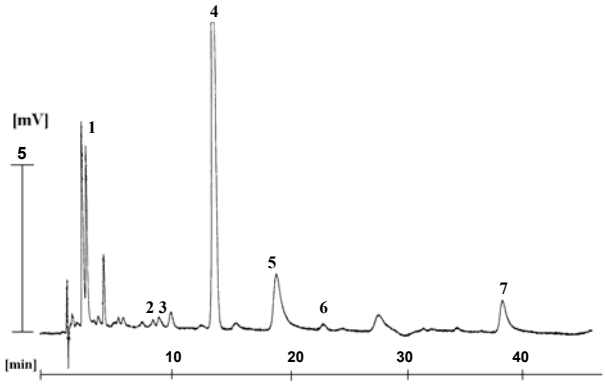
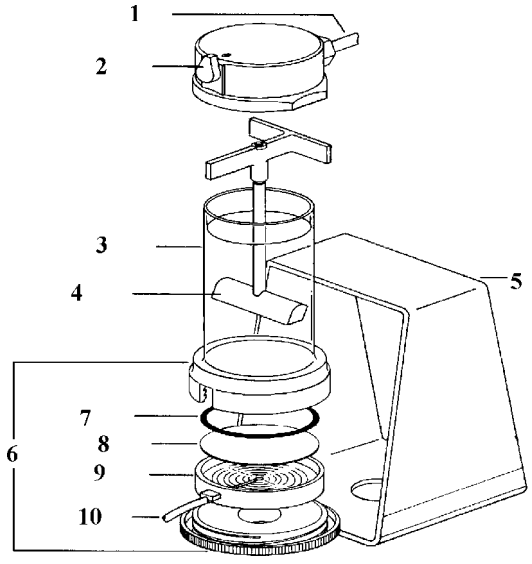


Abbildung A 2: HPLC-Chromatogramm des schwarzen Darjeeling A bei einer Aufbrühtemperatur von 100 °C



1	Druckeingang
2	Druckausgleichsventil
3	Transparenter Mantel
4	Rührer
5	Halter
6	Becherartiger Aufbau
7	Gummiring
8	Membran
9	Membranträger
10	Filtratausgang

Abbildung A 3: Aufbau der verwendeten AMICON-Rührzelle

Tabelle A 3: Ferritingehalte [µg/l], Freie Eisenbindungskapazität [µmol/l] und Freie Eisenkonzentrationen [µmol/l] ($\bar{x}$ ± s) der Vegetarier nach Konsum von grünem und schwarzem Tee bzw. Verzicht auf Tee

Blutabnahmen	**Vegetarier (n = 4) Konsum von grünem bwz. schwarzem Tee**					
	Ferritin [µg/l]		**EBK [µmol/l]**		**Eisen [µmol/l]**	
1	59,50 ±	42,79 [A]	51,25 ±	8,41 [A]	16,73 ±	3,38 [A]
2	53,55 ±	34,98 [A]	53,85 ±	8,79 [A]	16,80 ±	0,99 [A]
3	62,85 ±	41,54 [A]	59,00 ±	11,89 [A]	20,68 ±	3,80 [A]
4	48,93 ±	33,38 [A]	53,58 ±	7,38 [A]	18,03 ±	4,59 [A]
5	65,35 ±	50,25 [A]	52,58 ±	10,57 [A]	15,45 ±	6,64 [A]
6	72,58 ±	47,86 [A]	53,78 ±	12,75 [A]	18,85 ±	7,84 [A]
Blutabnahmen	**Vegetarier (n = 4) Verzicht auf Tee**					
	Ferritin [µg/l]		**EBK [µmol/l]**		**Eisen [µmol/l]**	
1	68,70 ±	41,54 [A]	54,13 ±	6,03 [A]	13,45 ±	4,92 [A]
2	52,38 ±	34,82 [A]	56,18 ±	1,01 [A]	17,38 ±	5,59 [A]
3	48,55 ±	32,84 [A]	51,60 ±	5,44 [A]	17,65 ±	7,09 [A]
4	66,23 ±	45,54 [A]	51,83 ±	4,75 [A]	15,50 ±	3,01 [A]
5	55,95 ±	42,93 [A]	54,08 ±	2,26 [A]	16,83 ±	5,45 [A]
6	62,90 ±	45,32 [A]	57,28 ±	7,99 [A]	16,88 ±	5,23 [A]

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass mir die Promotionsordnung der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Jena, den 28.11.2002

Lebenslauf

Name	Karin Schlesier
Geburtsdatum und -ort	28. September 1971 in Saarbrücken
Staaatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1978 - 1982	Grundschule Saarbrücken Ost, Saarbrücken
1982 - 1991	Staatliches Gymnasium am Rotenbühl, Saarbrücken
17. Mai 1991	Allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 1991 - April 1998	Studium der Haushalts- und Ernährungswissenschaften an der Justus-Liebig-Universität Gießen
25. Januar 1994	Vordiplom Fachrichtung im Hauptstudium: Ernährungswissenschaft Wahlpflichtfächer: Lebensmitteltechnologie und Pathophysiologie Thema der Diplomarbeit im Fach pflanzliche Lebensmittel: Antikarzinogen wirksame Phenolcarbonsäuren in Fruchtsäften und Weinen aus der gleichen Obstcharge
21. April 1998	Diplom als Oecotrophologin
12. Oktober 1998	Zusatzfach: Arbeits-, Berufs- und Wirtschaftspädagogik

Beruflicher Werdegang

01.08.1998 - 30.11.2002	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Ernährungswissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena im Lehrbereich Humanernährung unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Bitsch
Seit 1.12.2002	Wissenschaftliche Angestellte am Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin

Jena, 28.11.2002

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Roland Bitsch für die Überlassung des Themas, für die interessanten Diskussionen und wertvollen Anregungen während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. habil. Volker Böhm danke ich sehr für die konstruktive und kreative Zusammenarbeit, für die hilfreichen Diskussionen und für das stete Interesse an den Ergebnissen der Arbeit.

Frau Herta Graf, Frau Heike Schmidt und Frau Irmtraud Schmuck danke ich für die technische Unterstützung im Labor.

Dem Lehrbereich Lebensmittelchemie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Lukas danke ich für die Bereitstellung des Säulenofens.

Dem Arbeitskreis Lebensmittel- und Ernährungswissenschaft von Frau Prof. Dr. I. Bitsch der Justus-Liebig-Universität Giessen danke ich für die Bereitstellung der AMICON-Rührzelle, die in den in vitro-Untersuchungen zu Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen eingesetzt wurde.

Weiterer Dank gilt allen hier nicht genannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Ernährungswissenschaften für die gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Urs Dieter Kuhn danke ich für die Durchführung der Blutabnahmen bei der Humanstudie und für das Interesse an deren Ergebnissen. Weiterer Dank gilt auch Frau Dr. Ursula Kuschel für die Durchführung der Blutabnahmen.

Herrn Prof. Dr. Klaus Winnefeld, Herrn Dr. Michael Kiehntopf und Herrn Dr. Martin Roskos danke ich für die Zusammenarbeit im Rahmen der Humanstudie „Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen unter physiologischen Bedingungen“. Frau Sybille Streck danke ich für die Durchführung der Bestimmung der Eisenstatusparameter.

Mein besonderer Dank gilt den Probanden und Probandinnen für die Teilnahme an der Humanstudie.

Nadine Gallitschke danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des DFG-Projektes.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn, danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des DFG-Projekts „Untersuchungen zu ausgewählten protektiven Inhaltsstoffen in Obst, Gemüse und daraus hergestellten Erzeugnissen sowie zur Bioverfügbarkeit exemplarischer Carotinoide beim Menschen“. Der Internationalen Stiftung für Ernährungsforschung und Ernährungsaufklärung, Basel, Schweiz danke ich für die finanzielle Unterstützung der Humanstudie „Wechselwirkungen zwischen Teepolyphenolen und Eisen unter physiologischen Bedingungen“.

Den Bibliothekarinnen Frau Susanne Wille und Frau Antje Lauterbach danke ich für die freundliche und tatkräftige Unterstützung bei der Beschaffung von Literatur.

Des weiteren bedanke ich mich für die Bereitstellung der Teesorten bei der Hälssen & Lyon GmbH, Hamburg und der Teekanne AG, Düsseldorf.

Katja Kranl und Andrea Heckel danke ich für das unermüdliche Korrekturlesen des Manuskripts.

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei Frau Charlotte Flügel für die moralische und liebevolle Unterstützung.

Ich bedanke mich sehr bei meiner Schwester Sabine und meinem Schwager Christoph, die mit Rat und Tat zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern für die vielseitige und stete Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion. Sie standen mir stets zur Seite und haben dadurch zum erfolgreichen Abschluss der Promotion beigetragen.