

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Grundlagen und Kenntnisstand	3
2.1	Stilbene	3
2.1.1	Biosynthese	3
2.1.2	Funktion von Stilbenen in der Pflanze	6
2.1.3	Vorkommen	6
2.1.4	Physiologische Wirkung von Stilbenen	8
2.1.4.1	<i>Trans</i> -Resveratrol	9
2.1.4.2	Resveratrololigomere	11
2.1.5	Bioverfügbarkeit und Metabolismus von <i>trans</i> -Resveratrol im Menschen	11
2.1.5.1	Bioverfügbarkeit	11
2.1.5.2	Metabolismus	13
2.1.6	Weinrebenextrakt	14
2.1.6.1	Vineatrol 30®	14
2.1.6.2	Resverasorb®	16
2.2	Enzyme, pH-Werte und Elektrolytverhältnisse im Verdauungstrakt des Menschen	17
2.2.1	Der Verdauungstrakt	17
2.2.2	<i>In-vitro</i> -Verdau	20
2.2.2.1	<i>Trans</i> -Resveratrol im <i>in-vitro</i> -Verdau	20
2.3	Modell zur Untersuchung der Metabolisierung im Dünndarm	22
2.3.1	Caco-2-Zellen	22
2.3.2	Resveratrolderivate im Caco-2-Assay	24
2.4	Humane Mikrobiota	27
2.4.1	Mikrobiota Diversität im Verdauungstrakt	27
2.4.2	Funktion und Bedeutung der Darmmikrobiota	29
2.4.3	Dysbalancen in der Darmmikrobiota	31
2.4.4	<i>In-vitro</i> -Fermentationen	31
2.4.5	Biofermentation ausgewählter Polyphenole	32
2.4.5.1	Isoflavone	33
2.4.5.2	Stilbene	34
2.5	Methodenentwicklung, -validierung und -überprüfung	35
2.5.1	Methodenentwicklung	35
2.5.2	Methodenvalidierung	36
2.5.2.1	Anforderungen an eine LC-MS/MS-Methode	37
2.5.2.2	Definitionen, Kriterien und Anwendung	37
2.5.3	Methodenüberprüfung	41

3	Material	43
3.1	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software	43
4	Methoden	49
4.1	Charakterisierung des Weinrebenextraktes	49
4.1.1	Vincatrol 30®	49
4.1.2	Resverasorb®	49
4.2	Stabilität der Resveratrolderivate	50
4.2.1	Temperatur	50
4.2.2	Lichtverhältnisse	50
4.2.3	Physiologisch relevante pH-Werte und unterschiedliche Atmosphären	51
4.3	α-Amylase-Assay	52
4.3.1	Enzymaktivitätsmessung	52
4.3.2	Berechnung der Enzymaktivität	53
4.4	Stabilität und Wiederfindung der Resveratrolderivate gegenüber Verdauungssekreten	54
4.4.1	Herstellung der verschiedenen Verdauungssekrete	54
4.4.2	Aufarbeitung und Analyse der Proben	56
4.5	Caco-2-Transwell-System	56
4.5.1	Caco-2-Zellen	57
4.5.2	Inkulturnahme der Caco-2-Zellen	57
4.5.3	Subkultivierung	57
4.5.4	Kryopräservation	58
4.5.5	Prüfung auf Mycoplasmen	58
4.5.6	Zellzahl und Vitalitätsbestimmung	58
4.5.7	Transwell-Assay	58
4.5.8	Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER)	59
4.5.9	Durchführung der Fluoresceinmessung	59
4.5.10	Inkubation mit Stillbinderderivaten	60
4.6	Fermentation mit humaner Fäzesmikrobiota	61
4.6.1	Herstellung des Inkubationsmediums	61
4.6.2	Probanden	62
4.6.3	Herstellung der Fäzessuspension	62
4.6.4	Substrate	63
4.6.5	Anaerobe Fermentation	63
4.6.6	Probenahme	64
4.6.7	Optimierung der Flüssig-Flüssig-Extraktion	64
4.6.8	Aufarbeitung der Proben für die Analytik	65
4.6.9	Wiederfindung und Reproduzierbarkeit	65
4.6.10	Analytik	65
4.6.11	Isolierung von Lunularin	67
4.6.12	NMR-Messung	67
4.7	Plasma und Urin: LC-MS/MS-Methode	67
4.7.1	Methodenentwicklung	67
4.7.1.1	Chromatographische Trennmethode	67
4.7.1.2	Probenaufarbeitung	68
4.7.1.3	Matrixkalibrierung	69

4.7.1.4	Auswertung	70
4.7.2	Methodenvalidierung	71
4.7.2.1	Referenzmaterial	71
4.7.2.2	Wiederfindung, Matrixeffekt und Prozesseffizienz	71
4.7.2.3	Genauigkeit: Präzision und Richtigkeit	71
4.7.2.4	Stabilität	72
4.7.3	Methodenüberprüfung	72
4.7.3.1	Regelkarten	72
4.7.3.2	Systempräzision	72
4.7.3.3	Wiederfindung, Matrixeffekt, Qualitätskontrolle	72
4.7.4	Metaboliten-Profilung	73
4.8	<i>In-vivo</i> -Studien	73
4.8.1	Fütterungsstudie am Tiermodell Schwein	73
4.8.1.1	Machbarkeitsstudie	74
4.8.1.2	Modifizierte Hauptstudie	76
4.8.2	Humane Interventionsstudie	78
5	Ergebnisse	81
5.1	Charakterisierung des Weinrebenextraktes	81
5.1.1	Vineatrol 30®	81
5.1.2	Resverasorb®	83
5.2	Stabilität der Resveratrol-derivate	84
5.3	α -Amylase-Assay	86
5.3.1	Enzymaktivitätsmessungen	86
5.4	Stabilität und Wiederfindung der Resveratrol-derivate gegenüber Verdauungsssekreten	88
5.4.1	Wiederfindung	88
5.4.2	Stabilität	89
5.4.2.1	<i>Trans</i> -Resveratrol	89
5.4.2.2	Vineatrol 30®	89
5.4.2.3	Resverasorb®	90
5.5	Caco-2-Transwell-System	90
5.5.1	Monomere	91
5.5.2	Oligomere	93
5.6	Fermentation mit humaner Darmmikrobiota	95
5.6.1	Optimierung der Flüssig-Flüssig-Extraktion	95
5.6.2	Wiederfindung und Reproduzierbarkeit	95
5.6.3	Quantifizierung	95
5.6.4	Stabilität der eingesetzten Substanzen	96
5.6.5	<i>In-vitro</i> -Fermentation mit <i>trans</i> -Resveratrol	96
5.6.5.1	Bildung von Dihydroresveratrol	96
5.6.5.2	Bildung zweier unbekannter Metabolite	97
5.6.5.3	Gruppe der Dihydrodehydroxyresveratrol-Bildner über das Intermediat Dihydroresveratrol	105
5.6.5.4	Gruppe der Mischfermentation	106
5.6.6	<i>In-vitro</i> -Fermentation mit ϵ -Viniferin	109
5.6.6.1	Bildung von Dihydro- ϵ -Viniferin	109

5.6.6.2	Nicht-Fermenter	111
5.6.7	Positivkontrolle Daidzein	111
5.7	Studien zur Biotransformation <i>in vivo</i>	113
5.7.1	Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode	113
5.7.2	Methodenvalidierung	114
5.7.2.1	Wiederfindung und Matrixeffekt	114
5.7.2.2	Stabilität	114
5.7.2.3	Präzision und Richtigkeit	114
5.7.2.4	Nachweis- und Bestimmungsgrenze	115
5.7.3	Methodenüberprüfung	116
5.7.3.1	Systempräzision	116
5.7.3.2	Wiederfindung, Matrixeffekt und Prozesseffizienz	117
5.7.3.3	Regelkarten	117
5.8	Fütterungsstudie am Tiermodell Schwein	120
5.8.1	Hauptstudie	120
5.9	Humane Interventionsstudie	122
5.9.1	Plasma	123
5.9.1.1	Monomere	123
5.9.1.2	Humane Darmmikrobiota-Metabolite	126
5.9.1.3	Dimere	128
5.9.2	Urin	130
5.9.2.1	Ausscheidungs-Profil	130
5.9.2.2	Gesamtausscheidung	133
5.9.2.3	Prozentuale Ausscheidung	136
5.9.3	Untersuchung des Metabolitenprofils	137
6	Diskussion	141
6.1	Charakterisierung und Stabilität von Stilbenderivaten	141
6.2	Wechselwirkung mit Verdauungsenzymen	142
6.3	Stabilität der Resveratrolderivate gegenüber Sekreten des Verdauungstraktes	144
6.4	Modell zur Untersuchung der Metabolisierung im Dünndarm	145
6.5	Fermentation mit humaner Darmmikrobiota	147
6.6	LC-MS/MS-Methode: Entwicklung, Validierung, Überprüfung	150
6.7	<i>In-vivo</i> -Studien	152
6.7.1	Fütterungsstudie am Tiermodell Schwein	152
6.7.2	Humane Interventionsstudie	153
7	Zusammenfassung	159
	Literatur	162
8	Anhang	I
8.1	HPLC-Systeme	I
8.2	HPLC-Methoden	II
8.3	Stabilität der Resveratrolderivate	III
8.4	α -Amylase-Assay	IV
8.4.1	Aktivitätsphosphatpuffer	IV

8.5	Caco-2-Transwell-System	IV
8.5.1	Wiederfindung	IV
8.5.2	Quantifizierung	IV
8.6	Fermentation mit humaner Darmmikrobiota	V
8.6.1	Analytik	V
8.6.2	Semi-präparative HPLC-Methode	VI
8.6.3	NMR-Messung	VII
8.6.4	Quantifizierung	VII
8.6.5	Stabilität	VIII
8.7	<i>In-vitro</i> -Verdau	VIII
8.7.1	Isoflavon-Inkubationspuffer	VIII
8.8	Plasma und Urin: LC-MS/MS-Methode	IX
8.8.1	Methodenentwicklung	IX
8.8.2	Methodenüberprüfung	IX
8.8.2.1	Regelkarten	IX
8.9	Humane Interventionsstudie	XI
8.9.1	MS/MS-Parameter	XI
8.9.2	Kreatinin-Ausscheidung	XIII
Betreute Arbeiten		XIV
Publikationsliste		XVI
Lebenslauf		XX