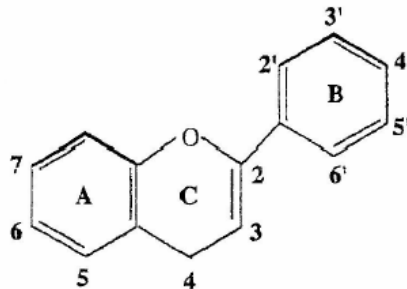


# Flavonoide

## Struktur und physiologische Bedeutung

Flavonoide sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, oder auch Polyphenole genannt. Man findet sie hauptsächlich in Blättern, Blüten und äußeren Pflanzenteilen wie Haut und Schale von Obst und Gemüse. Sie werden von den Pflanzen synthetisiert und spielen eine wichtige Rolle im Aufbau der Zellwände und schützen die Pflanze vor schädlichen Einflüssen wie UV-Licht und Krankheitserregern und sind an der Reparatur von Zellschäden beteiligt. [Williamson et al., 2000]  
Strukturell leiten sich die Flavonoide vom Flavangrundkörper (2-Phenylbenzodihydropyran) (Abb.1.1) ab.

Dieser besteht aus zwei aromatischen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring (C), wobei ihre große Variabilität hauptsächlich auf ihrem unterschiedlichen Hydroxylierungs- und /oder Methylierungsmuster der drei Ringe, sowie auf der Art, Anzahl und Anordnung nicht acylierter und acylierter Zuckerreste beruht. [Harborne, 2000]



**Abbildung 0.1** Strukturformel des Flavangrundkörpers

Flavonoide können aufgrund ihrer verschiedenen Oxidationsstufen am heterocyclischen Ring in 6 Hauptgruppen eingeteilt werden:

Flavanone (z.B. Naringenin, Hesperidin),

Flavone (z.B. Apigenin, Luteolin),

Flavonole (z.B. Quercetin, Kämpferol), Flavanole (Catechin, Epicatechingallate),

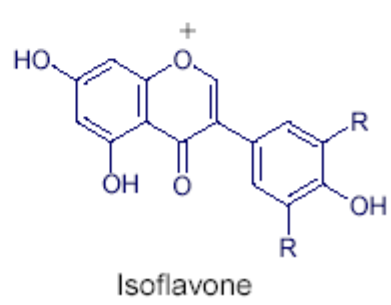
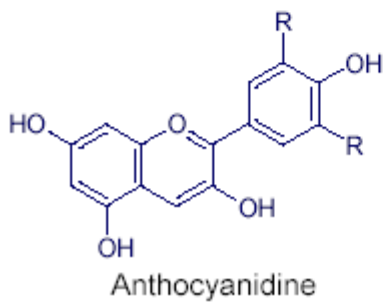
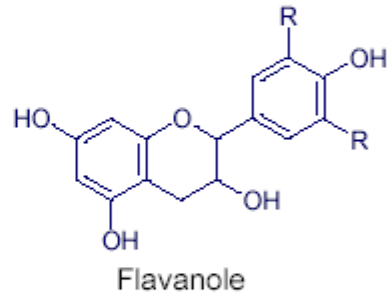
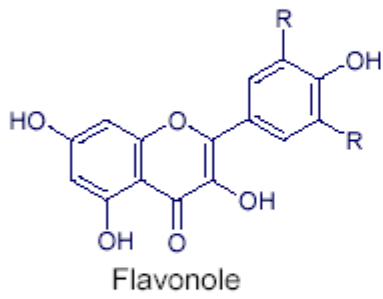
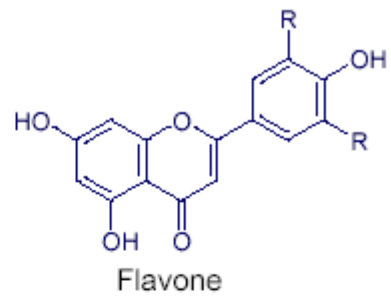
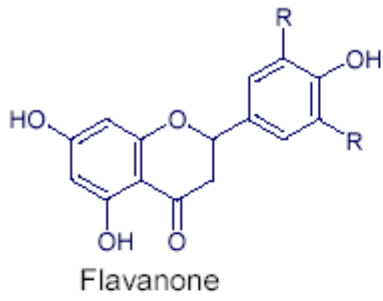
Anthocyanidine (z.B. Malvidin, Cyanidin)

und Isoflavonone (z.B. Genistein, Daizein) (Abb. 1.2).

Außerdem kann man noch Aurone, Chalkone, Desoxyanthocyanidine und Leukoanthocyanidine unterscheiden. [Watzl, 2001]

Weit verbreitet sind auch die aus zwei Flavonoideinheiten aufgebauten Bioflavonoide wie die Proanthocyanidine und Amentoflavonoide [Fugmann, 1997].





**Abbildung 0.2 Strukturformeln der sechs Flavonoidhauptgruppen**

Flavonoide kommen in der Natur nicht frei als Aglykone vor, sondern sind mit Ausnahme der Flavanole meist O- -glykosidisch gebunden.

Die bevorzugte Anlagerung der Saccharide ist meist die C-3-Position, in selteneren Fällen ist auch die C-7-Position besetzt. Das am häufigsten gebundene Monosaccharid ist DGlukose.

Daneben wurden aber auch andere Zucker wie Arabinose, Galactose oder L-Rhamnose gefunden. Die Glykosidierung erhöht die Polarität und damit die Löslichkeit der Flavonoidmoleküle, wodurch die Speicherung in den Pflanzenzellvakuolen möglich wird. [Watzl & Rechkemmer, 2001; Aherne & O'Brien, 2002]

Flavonoide sind Inhaltsstoffe vieler pflanzlicher Nahrungsmittel. Sie kommen in Gemüse, Obst und daraus hergestellten Getränken wie Tee, Kaffee, Wein und Fruchtsäften vor [Scalbert, 2002]. Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die Flavonoide und ihr Vorkommen in den verschiedenen Lebensmitteln.

<i>Flavonoidklasse</i>	<i>Beispiele</i>	<i>Vorkommen</i>
Flavonole	Quercetin, Kämpferol	Zwiebeln, Äpfel, Tee, Kirschen
Flavanole	Catechin, Epicatechingallate	Äpfel, grüner Tee, Rotwein
Flavanone	Naringenin, Hesperidin	Grapefruit, Orange
Flavone	Luteolin, Apigenin	Thymian, Petersilie
Anthocyanidine	Malvidin, Cyanidin	Blaue Trauben, Kirschen
Isoflavone	Genistein, Daidzein	Sojabohnen

**Tabelle 0.1** Gehalt an Flavonoiden in ausgewählten Lebensmitteln [Watzl & Rechkemmer, 2001; Aherne & O'Brien, 2002]

## Biosynthese der Polyphenole

Alle an der Biosynthese der Polyphenole mitwirkenden Stoffe entstammen dem Kohlehydratstoffwechsel. Die Biosynthese der aromatischen Verbindungen in der Pflanze setzen sich aus drei aufeinanderfolgenden Segmenten wie folgt zusammen:

Das *Shikimisäuresegment*, das die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan produziert, das *Phenylpropanoidsegment*, das die Hydroxyzimtsäure produziert, sowie das *Flavonoidsegment*, das diverse Flavonoide produziert.

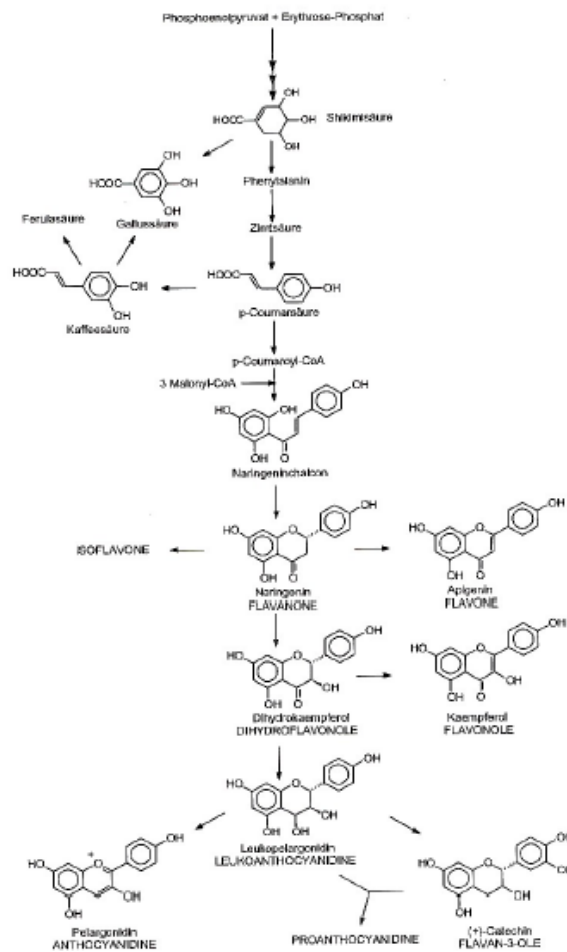


Abbildung 0.3 Biosynthesewege der Polyphenole in Pflanzen

Die Shikimisäure entsteht aus verschiedenen dem Kohlenhydratstoffwechsel entstammenden Vorstufen. Im Shikimisäuresegment führt der Syntheseweg über

Phenylalanin, aus dem durch Katalyse Zimtsäure entsteht. Aus der Zimtsäure wird nach enzymatischer Hydroxylierung die p-Coumarsäure gebildet. Diese kann durch fortschreitende Methylierung in Kaffeesäure, aus der weiter Lignin, ein wichtiger Bestandteil von Holz, synthetisiert werden kann, und Ferulasäure umgewandelt werden. Die p-Coumarsäure kann mit Hilfe von Malonyl-CoA zum Naringenin-chalcon weiterreagieren. Dies stellt nun das C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Grundgerüst dar, von dem sich die Flavonoide ableiten. Nach Ringschluss durch die Chalcon-Isomerase entsteht das Naringenin, von dem sich die Flavone, Isoflavone und Dihydrokaempferol ableiten.

Das Dihydrokaempferol kann durch Katalyse der Flavonol-Synthase, die eine Doppelbindung zwischen C<sub>2</sub>- und C<sub>3</sub>-Atom ausbildet, in ein Flavonol, das Kaempferol umgewandelt werden. Ein weiterer Weg des Dihydrokaempferol führt durch katalytische Reduktion der Dihydroflavonol-Reduktase zu einem Flavan-3,4-diol, die als kurzlebige Vorstufen der Anthocyane und Flavan-3-ole, sowie deren Kondensationsprodukten, den Proanthocyanidinen angesehen werden. Die Synthese der Flavan-3-ole und der Proanthocyanidine ist bisher im Detail noch nicht geklärt, ein Zusammenspiel verschiedener Enzyme wird diskutiert. [Forkmann, 1993]

Die Einführung der Hydroxylgruppen am B-Ring der Flavonoide wird durch Hydroxylasen katalysiert, wobei der Zeitpunkt, wann das geschieht, noch nicht geklärt ist. Die Bildung von Glykosiden erfolgt in der Pflanze meist erst sekundär. [Gross, 1992]

## **Resorption und Metabolismus**

Flavonoidaglyka sind hydrophob und können daher durch passive Diffusion über die Zellmembran transportiert werden, während durch erhöhte Hydrophilie der Flavonoidglykoside die Möglichkeit des passiven Transports reduziert wird. [Aherne & O'Brien, 2002]

Es konnte gezeigt werden, dass die Aglyka der Flavonole und Flavone im Dünndarm durch passive Diffusion absorbiert werden. [Watzl & Rechkemmer, 2001]

Als ersten Schritt des intestinalen Flavonoidmetabolismus wird die Deglykosylierung der Flavonoidglykoside der Nahrung angenommen, was für den weiteren Metabolismus essentiell ist.

Deglykosidierung kann entweder außerhalb der Zelle im Darmlumen stattfinden oder nach dem Transport innerhalb der Enterocyten [Williamson, 2000].

**Cytosolische- $\beta$ -Glukosidase (CBG)** in Dünndarm und Leber kann verschiedene phenolische Glukoside hydrolysieren. Dieses Enzym hat eine hohe Affinität zu Quercetin-4'-Glukosid und Genistein-7-Glukosid. Eine weitere  $\beta$ -Glukosidase im Dünndarm ist die **Laktase Phloridzin Hydrolase (LPH)**, die Aktivität gegenüber Flavonoidglukosiden zeigt.

Sie kann Phloridzin in das zugehörige Aglycon Phloretin hydrolysieren. Durch die Ähnlichkeit von Phloridzin zu anderen Flavonoidglykosiden ist es möglich, dass die LPH auch Flavonol-Glykoside hydrolysiert und damit auf der apikalen Seite der Zotten agiert und die Aglykone in das Lumen transportiert. Dadurch könnte der passive Transport in den Enterocyten erhöht werden. [Aherne & O'Brien, 2002] Das Disaccharid Rutin zeigt keine Affinität zur LPH.

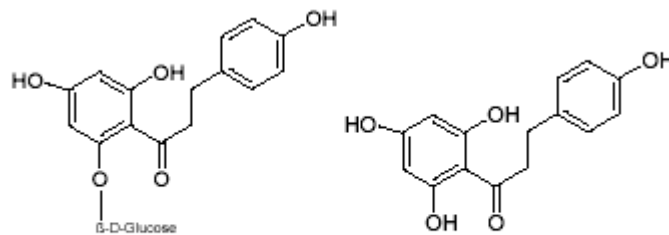


Abbildung 0.4 Strukturformel von Phloridzin und Phloretin

Daneben werden auch durch die Mikroflora des Darms Zuckerreste hydrolysiert. Darmbakterien besitzen verschiedene Enzyme wie Glykosidasen, Glukuronidasen. Die Flavonoide, die nicht im Dünndarm resorbiert werden, werden durch die Mikroorganismen im Kolon zu Aglyka und phenolischen Säuren metabolisiert. Diese werden dann im Ileum und Caecum des Kolon resorbiert. [Williamson, 2002]

Desweiteren bauen die Mikroorganismen die Flavonoide durch Spaltung des heterocyclischen C-Rings, der zu phenolischen Säuren oder deren Lactone führt, ab. Die Ringspaltung basiert dabei auf dem Hydroxylierungsgrad des Flavonoids. Sind im aromatischen B-Ring keine Hydroxylgruppen vorhanden oder sind freie Hydroxylgruppen an den Positionen 5 und 7 in Gegenwart von O-Methylgruppen vorhanden, wird die Ringspaltung vermieden. Bei Flavonoiden mit einer Hydroxylgruppe in der C-4'-Position wird die Ringspaltung allerdings beschleunigt. [Rice-Evans, 2000]

Die entstehenden phenolischen Säuren werden weiteren Reaktionen wie  $\beta$ -

Oxidation, Demethylierung oder Dehydroxylierung unterworfen, bevor sie resorbiert und mit dem Urin ausgeschieden werden. [Hollmann, 1997]

Flavonoidglykoside können aber auch aktiv über den Na<sup>+</sup>-abhängigen D-Glukose-Cotransporter SGLT1 transportiert werden und gehen als solche in die Blutbahn über. [Sesink et al., 2001] Studien an Ileostomie-Patienten, die oral Quercetinglykoside über Zwiebeln zuführten, deuten darauf hin, dass bestimmte Flavonolglykoside über den aktiven Transport des SGLT1 im Dünndarm absorbiert werden. [Hollman et al., 1995; Watzl & Rechkemmer, 2001]

Auch an Studien mit Caco-2-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass das Quercetin-4'-β-Glukosid (Abbildung 1.5) ein Substrat für SGLT1 ist. Die Absorption der Flavonoidglukoside durch die apikale Membran scheint durch ein Gleichgewicht zwischen der Aufnahme durch SGLT1 und dem Efflux durch MRP2 geregelt zu sein.

[Walgren et al., 2000]

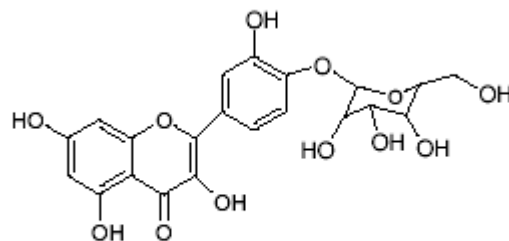


Abbildung 0.5 Strukturformel von Quercetin-4'-β-Glukosid

Nach der Resorption werden die Flavonoide an Albumin gebunden und über die Pfortader in die Leber transportiert. Die Leber ist das Hauptorgan, in dem der Metabolismus stattfindet, allerdings spielen auch die Nieren und die Darmmukosa eine Rolle beim weiteren Metabolismus.

In Abbildung 1.6 sind die möglichen Wege aufgenommener Polyphenole im Körper vereinfacht dargestellt.

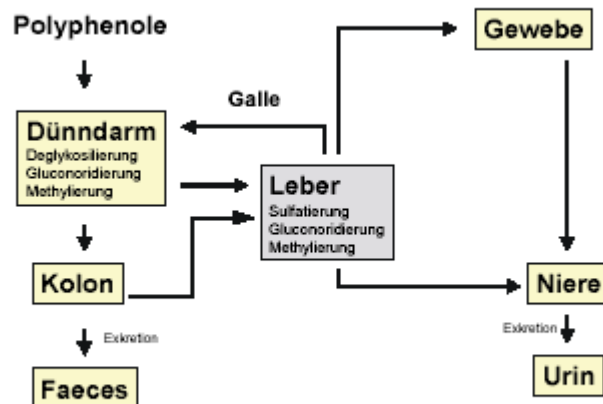
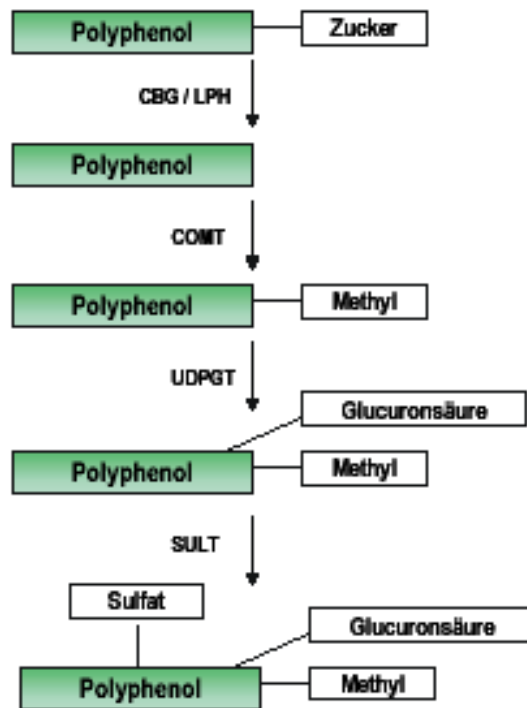


Abbildung 0.6 Metabolismus von Flavonoidglykosiden [modifiziert nach Rice-Evans, 2000]

Die maximale Flavonoidkonzentration im Plasma nach dem Verzehr von Lebensmitteln liegt bei 1-2  $\mu\text{M}$ . In der Leber unterliegen sie dann Phase I und II Reaktionen wie Hydroxylierung, Demethylierung und Konjugationen wodurch die Hydrophilie erhöht und somit die Elimination über den Urin erleichtert wird. [Aherne & O'Brien, 2002, Watzl & Rechkemmer 2001, Williamson 2000]

Die im Plasma an Albumine gebundenen Polyphenole durchlaufen über die Galle den enterohepatischen Kreislauf, wo sie im Dickdarm erneut bakteriellen Enzymen ausgesetzt sind und reabsorbiert werden. Dies führt zu einer verlängerten Anwesenheit der Polyphenole im Körper. [Manach, 2004]

In Abbildung 1.7 ist der Metabolismus, den der Flavonoide durchlaufen, in einem vereinfachten Modell dargestellt.



**Abbildung 0.7 Metabolismus von Polyphenolen** [modifiziert nach Scalbert & Williamson, 2000].  
 CBG: cytosolische- $\beta$ -Glucosidase; LPH: Lactase-Phloridzin-Hydrolase; COMT: Catechol-o-methyltransferase; UDPGT: UDP-Glucuronosyltransferase; SULT: Sulfotransferasen

# Antioxidative Eigenschaften, Tumorprotektive und immunmodulatorische Wirkung

Flavonoide wirken sowohl in lipophilen als auch in hydrophilen Systemen als Antioxidantien. Flavonole, eine Gruppe der Flavonoide, zu denen das Quercetin gehört, besitzen ein höheres Redoxpotential als Ascorbat und können daher auch Ascorbylradikale oxidieren. Für die antioxidative Wirkung sind *ortho*-ständige Hydroxylgruppen am B-Ring sowie die Doppelbindung in 2,3-Position und eine 3-Hydroxylgruppe verantwortlich, durch die Flavonoide durch die Abgabe der Wasserstoffionen reaktive Sauerstoffspezies abfangen können (siehe Abbildung 1.8). [Rice-Evans, 1996] [Lotito, 2004]

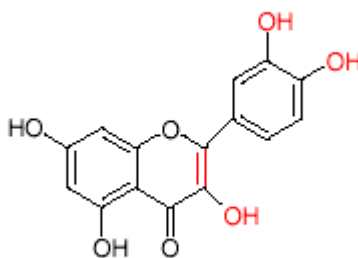


Abbildung 0.8 antioxidatives Potential von Quercetin

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen im Organismus hauptsächlich bei der in den Mitochondrien ablaufenden Atmungskette. Hierbei wird der Organismus mit einer schädlichen Form des Sauerstoffs, dem Superoxidanionradikal, konfrontiert. Als Folge chemischer Umsetzungen im Organismus entstehen aus dem Superoxid weitere ROS beispielsweise Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und das Hydroxylradikal ( $\cdot$ OH). Durch das Abfangen der Radikale durch Flavonoide entstehen Phenoxyintermediate, die relativ stabil sind und mit weiteren freien Radikalen reagieren können [Rice-Evans, 1996]. Eine weitere wichtige Eigenschaft des antioxidativen Potentials von Flavonoiden besteht in der Fähigkeit, Metalle wie Eisen- und Kupferionen, die die Autoxidation ungesättigter Lipide durch Fenton- und Haber-Weiss-Reaktionen beschleunigen können, zu chelatisieren [Thompson, 1976].

Quercetin und andere Flavonoide können mit intrazellulären Antioxidantien wie z.B. Gluthationperoxidase interagieren und möglicherweise deren antioxidative Fähigkeit erhöhen. Auch die Fähigkeit einiger Flavonoide zur Enzyminduktion spielt in antioxidativen Prozessen eine Rolle [Kuo, 1999].

Epidemiologische Studien weisen auf eine negative Korrelation zwischen der Flavonidaufnahme und dem Risiko für verschiedenste Krankheiten hin. So liegt die Mortalitätsrate an koronaren Herz-/Kreislauferkrankungen (KHK) in Frankreich niedriger als beispielsweise in Großbritannien, den USA oder Deutschland, obwohl die Aufnahme an gesättigten Fettsäuren sowie die Serumcholesterinwerte in allen Ländern vergleichbar sind. Der Schutz vor KHK wird auf den höheren Obst- und Gemüseverzehr sowie den Rotweinkonsum in Frankreich, das heißt die höhere Aufnahme an Polyphenolen zurückgeführt (French Paradoxon). [Renaud, 1992]

Als Grund für diese negative Korrelation wird auch die antioxidativen Eigenschaften von Polyphenolen angeführt. Durch ihre Fähigkeit ROS abfangen zu können und die Lipoproteine (besonders LDL) vor Oxidation zu schützen, kann es zu einem verminderten Risiko von KHK kommen. [Watzl & Rechkemmer 2001]

Aufgrund ihrer Redoxaktivität können Flavonoide auch DNA-Schäden verhindern. In vitro konnten in verschiedenen Zellen, in denen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung DNA-Schäden induziert wurden, durch zusätzliche Zugabe von Flavonoiden signifikante protektive Effekte festgestellt werden. [Johnson, 2000]

In Tierexperimenten wurde eine antikanzerogene Wirkung von Flavonoiden gegenüber Brust-, Dickdarm-, Magen-, sowie Lungenkrebs festgestellt. [Boyer, 2004] Da der Krebsentstehung multifaktorielle Prozesse zu Grunde liegen, werden verschiedene Mechanismen diskutiert, wie Flavonoide protektiv eingreifen können, wie z. B. die Modulation von Cytochrom-P450 abhängigen Monooxygenasen (z.B. Quercetin als Ah-Rezeptor Antagonist), die Induktion von Phase II Enzymen oder auch die Induktion von Apoptose. [Stibirova, 2000] [Marian, 1999]

Einige Flavonoide besitzen die Fähigkeit am Östrogenrezeptor zu binden und damit dessen Aktivität zu modulieren. Flavonoide mit antiöstrogenem Effekt gelten auch als potentielle Krebstherapeutika gegenüber Brust- und Prostatakrebsformen. [Stibirova, 2002]

Beobachtungen in vitro und in vivo deuten auf eine entzündungshemmende Wirkung von Flavonoiden hin. In vitro blockieren verschiedene Flavonoide die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) und Interleukin-6 (IL-6). [Pagonis, 1986]

**Flavonoide zeigen auch eine antivirale Wirkung. In vitro zeigt Quercetin Wirksamkeit gegen Herpes simplex Typ1- und Tollwut-Viren. Dieser Effekt beruht möglicherweise darauf, dass Quercetin virale Proteine bindet oder die Nukleinsäuresynthese beeinflusst. Für Methylquercetin wurde eine Blockade der Replikation des Poliovirus auf RNA-Ebene nachgewiesen. [Formica, 1995]**

## Toxizität

Es gibt keine Hinweise auf toxische Effekte durch Flavonoide beim Menschen. Obwohl für einige Flavonoide, insbesondere Quercetin, mutagene Wirkungen im Ames-Test belegt sind, sprechen Tierversuche nicht für eine kanzerogene Wirkung. [Middleton, 1994]

Aufgrund der geringen Resorptionsrate der Flavonoide können jedoch keine hohen Plasmakonzentrationen erreicht werden, so dass Flavonoide, die in vitro mutagen und zytotoxisch wirken, über die Nahrung in so hohen Konzentrationen nicht erreicht werden können. Gefahr kann eventuell durch Nahrungsergänzungsmittel ausgehen, in denen hohe Tagesdosen empfohlen werden. Hohe Flavonoidkonzentrationen in Flavonoidsupplementen während der Schwangerschaft stehen im Verdacht, das Leukämie-Risiko bei Kleinkindern zu erhöhen (Mechanismus wahrscheinlich über Gene, die an der Lymphozytendifferenzierung beteiligt sind). [Linseisen, 1997]

Klinisch bedeutsam sind Flavonoidinteraktionen mit dem für den Metabolismus von Medikamenten wichtigen Enzym CYP3A4. Naringenin, das beispielsweise in Grapefruitsaft enthalten ist, kann durch die Hemmung des Enzyms den Abbau von Medikamenten verzögern. [Hodek, 2002]

# Isolierung und Nachweis von Flavonoiden

## I. Hesperidin aus Orangenschalen

Hesperidin kann durch Extraktion getrockneter Orangenschalen mit Methanol in roher Form erhalten werden. Zuvor müssen alle lipophilen Bestandteile der Orangenschale – vor allem das ätherische Öl – durch Extraktion mit Petroläther entfernt werden. Durch umkristallisieren kann Hesperidin in reiner Form erhalten werden. Identität und Reinheit werden durch Schmelzpunkt und DC geprüft.

### Material und Chemikalien

Scheidemischer (Starmix), Sieb Nr. 4, Reagenzglas, 500 ml Rundkoben mit Schliff, Soxhlet Apparatur, Heizpilz, Büchner Nutsche 7cm, Rundfilter 7cm, Rotationsverdampfer, Kristallisierschale, Messzylinder 100 ml, DC Wanne, Magnetrührer beheizt. Petroleumbenzin, Methanol, Eisessig, DMSO, Ethylacetat, Aluminiumchlorid, Siedesteinchen, Kieselgel 60 F254, Salzsäure (konz), Mg-Späne.

### Durchführung

30 g getrocknete und im Mixer zerkleinerte Orangenschalen werden in einer Soxhlet Apparatur 2-3 Stunden mit 250 ml Petroleumbenzin (Kp. 40-60°C extrahiert und der erhaltene Extrakt verworfen. Das getrocknete Drogenpulver wird anschliessend weitere 2 Stunden mit Methanol extrahiert und die methanolische Lösung am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bis zur Sirupdicke eingedampft.

Anschließend wird der Rückstand in 6%-iger Essigsäure aufgenommen und der sich bildende gelbe Niederschlag aufgesaugt.

Zur Reinigung wird von dem Roh-Hesperidin eine 5 % Lösung in DMSO hergestellt, indem man das Hesperidin unter erwärmen auf einem Magnetrührer in Lösung bringt und dann langsam unter Rühren die gleiche Menge heißes Wasser zusetzt. Man lässt bei Raumtemperatur abkühlen und saugt die ausgefallenen Kristalle ab. Zuerst wird mit heißem Wasser, dann mit Isopropanol gewaschen.

# Prüfung auf Identität durch Nachweis des Aglycons Hesperidin

## Hydrolyse

50 mg Hesperidin werden in 10ml 12,5% Salzsäure 1 Stunde unter Rückfluss erhitzt. Nach dem Erkalten wird der Ansatz 3 mal mit je 10 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten Ethylacetatphasen werden auf 10 ml eingengt.

## Dünnschichtchromatographie

Schicht: Kieselgel 60F<sub>254</sub> 10 x 20 cm

Fliessmittel: Toluol Essigester Ameisensäure 40+10+5

Auftragung: 10 und 20ul

Vergleichslösung: 0,1% Hesperidinlösung in Methanol 10 und 20ul

Nachweis: Besprühen mit 5% Aluminiumchloridlösung in Ethanol

Nachbehandlung: Erhitzen auf einer Heizplatte, anschließend betrachten unter UV<sub>366 nm</sub>