

Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften – Ernährungsphysiologie

Leiter: Prof. Dr. Peter Stehle

Flavonoidgehalt in der Muttermilch nach Intervention mit einem Sojagetränk oder entkoffeiniertem schwarzen Tee

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft

(Dr. oec. troph.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 18.10.2011

von

Pamela Meinardus

aus

Trier

Referent: Prof. Dr. P. Stehle
Koreferent: Prof. Dr. R. Galensa
Koreferent: PD Dr. F. Jochum

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 2012
Erscheinungsjahr: 2012

Meiner Familie

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Peter Stehle für die Überlassung des Themas und seinen wertvollen Anregungen und Ratschläge, die meine Arbeit förderten.

Besonders bedanke ich mich bei PD. Dr. Frank Jochum für die Betreuung des Projektes als Prüfarzt.

Herrn Prof. Rudolf Galensa danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Birgit Alteheld für ihre hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sowie für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herr Norbert Dahlinger hat die Probandinnenrekrutierung im Evangelischen Waldkrankenhaus durchgeführt. Vielen Dank!

Den Mitarbeitern am Institut, besonders Tomislav Balen und Adelheid Schuch, danke ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima im Institut.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für ihre Unterstützung und ihre Ermutigung in allen Phasen der Arbeit.

Zusammenfassung

Viele in vivo Studien zeigen, dass Flavonoide (Isoflavone und Flavanole) ein breites Wirkspektrum mit einem positiven Einfluss auf diverse Stoffwechselforgänge besitzen. So können sie zum Beispiel aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaft und über die Regulation des Zellwachstums die Krebsentstehung hemmen und haben unter anderem auch einen positiven Einfluss auf das Immunsystem. Möglicherweise kann eine lebenslange Zufuhr (beginnend mit flavonoidreicher Muttermilch) diese positiven Einflüsse unterstützen. Das Ziel der Arbeit war zu untersuchen, ob eine Intervention mit flavonoidreichen Getränken die flavonoidkonzentration in der Muttermilch beeinflusst. Zusätzlich sollten mit geeigneten Testverfahren qualitative Unterschiede der Milch (antioxidative Kapazität und Glutathion) durch die flavonoidreiche Intervention untersucht werden.

44 Stillenden aus dem evangelischen Waldkrankenhaus Berlin-Spandau wurden rekrutiert und in drei Gruppen eingeteilt. Jeweils 18 Probandinnen tranken 1 x täglich über einen Zeitraum von 6 Tagen ein Sojagetränk (TetraPak[®] à 250 mL) der Marke Alpro[®] soja (18 Probandinnen) und 300 mL (2 x 3 g/ 150 mL) entkoffeinier-ten schwarzen Darjeeling-Tee der Firma TeeGschwendner. Die übrigen 8 Frauen tranken Wasser statt der Testgetränke (Kontrollgruppe). Insgesamt wurden zu vier Zeitpunkten Milchproben entnommen; einmal vor, zweimal während und einmal nach der Intervention. Insgesamt wurden mit dem Sojagetränk 12,4 mg Isoflavone / Tag und mit dem Tee 67 mg Flavanole / Tag aufgenommen.

Die Konzentrationen der Flavonoide (Isoflavone, Flavanole) (RP-HPLC und elektrochemischer Detektion), des Glutathion (RP-HPLC und Fluoreszenzdetektion) und der antioxidativen Kapazität (TEAC) wurden in allen Milchproben untersucht. Die Aufnahme der nutritiven Antioxidantien und der Flavonoide während der Intervention wurde mit einem standardisierten 3-Tage Ernährungsprotokoll ermittelt und mittels Ebis pro[®] ausgewertet.

Es konnte eine signifikante Veränderung der Isoflavonkonzentration in der Muttermilch durch die Intervention mit dem Sojagetränk festgestellt werden (0 nmoL bis 12 nmoL, $p < 0,005$). Die mit dem Tee verabreichten Flavanole konnten dagegen in der Milch nicht nachgewiesen werden. Gründe für die bessere Bioverfügbarkeit der Isoflavone sind möglicherweise auf ihre chemische Struktur zurückzuführen, da sie im Gegensatz zu Flavanolen mit einem Zuckermolekül glycosidisch verbunden sind. Diese Bindung an ein Zuckermolekül bietet Schutz vor Abbau durch Darmbakterien. Nach einer 6-tägigen Intervention mit einem Sojagetränk nimmt ein gestillter Säugling täglich 9,6 nmoL (<0,01 mg) Isoflavone mit der Muttermilch auf. Unterschiede in der Muttermilch hinsichtlich Glutathiongehalt und antioxidative Kapazität sind durch die Intervention nicht aufgetreten. Denkbar ist allerdings, dass dann, wenn Säuglinge über einen längeren Zeitraum mit flavonoidangereicherter Muttermilch gestillt werden, dies einen positiven Effekt für die Kinder haben kann.

Summary

Several in vivo studies suggested an enormous bioefficacy of flavonoids (isoflavones and flavanols) in humans. They have beneficial effects in prevention or treatment of many hormone-dependent or cardiovascular diseases. Maybe a lifetime exposure to these substances, beginning with flavonoid-rich breastmilk, confirms these health benefits. The aim of this study was to investigate whether an intervention with flavonoid-rich beverages influences the flavonoid concentration and markers of the antioxidant capacity in human breast milk.

44 breastfeeding women were recruited and divided in three groups. 18 women consumed one daily serving of a soydrink (250 mL containing 12 mg isoflavones) respectively two cups of decaffeinated black tea (2 x 3 g/ 150 mL containing 67 mg/ 300 mL) for 6 days. 8 women belonged to the control group and drank water. They collected their own milk one day before, two times during and one day after the intervention period.

For quantifying isoflavones and flavanols in human breast milk we established a method for using HPLC and electrochemical detection. The analytes in the human milk were hydrolyzed enzymatically and then extracted by using SPE cartridges (Strata X; HLB Oasis) before HPLC analysis. The glutathione content were measured by HPLC with fluorometric detection, and the antioxidant capacity was determined by the TEAC assay.

The isoflavone values increased significantly in the soygroup (0 nmoL to 12 nmoL, $p < 0,005$), flavanols were not detected in the human milk after consuming decaffeinated black tea. Isoflavones are better absorbed than flavanols possibly because of their chemical structure occurring as glycosides. After a daily intervention with a soydrink containing 12 mg per serving size for six days, a 4 month old infant would be exposed to 9,6 nmoL ($< 0,01$ mg) per day, adjusted to body weight and daily volume (700-850 mL) of milk consumed. The antioxidative parameters didn't change after consuming flavonoid-rich beverages. Nevertheless a constant exposure to isoflavone in infants breastfed by mothers consuming soy will maybe result in healthy benefits for the infants.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Vorkommen und Verzehr von Flavonoiden	1
1.2 Absorption und Metabolismus der Flavonoide	7
1.3 Wirkung von Flavonoiden	9
1.4 Biosynthese der Muttermilch	10
1.5 Flavonoide – ernährungsphysiologisch wertvolle Bestandteile der Muttermilch	13
1.6 Ziel	14
2. Material	15
2.1 Chemikalien	15
2.2 Geräte	17
2.3 HPLC-Systeme	18
2.3.1 HPLC-Geräte	18
2.3.2 HPLC-Säulen	18
2.3.3 HPLC-Auswerteprogramm	18
2.4 Hilfsmittel	19
3. Methoden	20
3.1 Rekrutierung der Probandinnen	20
3.2 Studiendesign	21
3.3 Testgetränke	22
3.4 Nutritive Aufnahme von Flavonoiden und Antioxidantien	23
3.5 Flavonoidbestimmung	23
3.5.1 Probenaufbereitung	23
3.5.2 Chromatographische Bestimmung der Flavonoide	28
3.5.3 Methodvalidierung	32
3.6 Glutathion	33
3.7 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)	34
3.8 Statistische Auswertung	36
4. Ergebnisse	37
4.1 Charakteristik der Probandinnen	37
4.2 Nutritive Aufnahme von Antioxidantien und Flavonoiden	38
4.3 Validierung von HPLC-Analytik und Probenaufbereitung	39
4.3.1 Validierung der HPLC-Methode	39
4.3.2 Validierung der SPE	41
4.4 Flavonoidgehalte und antioxidative Kapazität in den Testgetränken	42
4.5 Flavonoidgehalt in der Muttermilch	44
4.5.1 Intervention mit dem Sojagetränk	44
4.5.2 Intervention mit entkoffeiniertem Schwarztee	46
4.6 Glutathion	47
4.7 Antioxidative Kapazität in der Muttermilch	48
5. Diskussion	50
5.1 Studiendesign,-durchführung und Methoden	50
5.2 Flavonoidgehalte in den Testgetränken	57
5.3 Flavonoide in der Muttermilch	58
5.3.1 Isoflavongehalt in der Muttermilch	58
5.3.2 Flavanolgehalt in der Muttermilch	63

5.4 Glutathion.....	65
5.5 Die antioxidative Kapazität.....	67
5.5.1 Die antioxidative Kapazität der Testgetränke.....	67
5.5.2 Die antioxidative Kapazität der Muttermilch.....	69
6 Abschließende Betrachtung.....	73
Literatur.....	75
Anhang.....	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durchschnittswerte (Minimum- und Maximalwerte) der Isoflavongehalte (Aglykone) verschiedener Lebensmittel (mg/100 mL bzw. mg/100 g) [10].....	4
Tabelle 2: Durchschnittswerte (Minimum- und Maximalwerte) der Flavanolgehalte verschiedener verzehrsfähiger Lebensmittel (mg/100 mL bzw. mg/100 g) [15]6	
Tabelle 3: Energie- und Nährstoffgehalt des Sojagetränkes (Daten von Alpro [®] soja)	22
Tabelle 4: Anthropometrische Daten der Probandinnen.....	37
Tabelle 5: Tägliche nutritive Energie- und Antioxidantienaufnahme während der Intervention (MW \pm SD) (Berechnung ohne Testgetränke)	38
Tabelle 6: Tägliche nutritive Flavonidaufnahme während der Intervention (MW \pm SD) (Berechnung ohne Testgetränke)	38
Tabelle 7: Wiederfindungen (%) der Flavonoide nach entsprechender Probenaufbereitung (n=3)	41
Tabelle 8: Durchschnittliche Flavanolgehalte im Tee (n=5)	43
Tabelle 9: Isoflavonkonzentrationen in der Muttermilch (nmol/L); Durchschnittswerte (Minimum- und Maximalwerte)	45
Tabelle 10: Durchschnittliche Glutathionkonzentration (μ mol/L) in der Muttermilch	47
Tabelle 11: Antioxidative Kapazität (mmol/L) in der Muttermilch.....	49
Tabelle 12: Vergleich der Bioverfügbarkeit verschiedener Flavonoide [2].....	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln der Flavonoide:.....	2
Abbildung 2: Strukturformeln der Isoflavone	3
Abbildung 3: Chemische Struktur der Isoflavone und ihrer Konjugate (modifiziert nach [6]):	3
Abbildung 4: Chemische Struktur der Flavanole und ihrer Konjugate (modifiziert nach [14]):	5
Abbildung 5: Absorptionswege der Flavonoide (modifiziert nach [2, 23])	9
Abbildung 6: Darstellung des Brustdrüsengewebes (eigene Darstellung).....	11
Abbildung 7: Mechanismen der Milchsekretion [52]	12
Abbildung 8: Ablauf der Studiendurchführung	21
Abbildung 9: Arbeitsschritte zur Flavanolbestimmung im Tee in Anlehnung an [76]	25
Abbildung 10: Probenaufbereitung zur Isoflavonbestimmung in der Muttermilch mittels SPE	27
Abbildung 11: Probenaufbereitung zur Flavanolbestimmung in der Muttermilch mittels SPE	28
Abbildung 12: Typische Chromatogramme der HPLC-Analytik zur Isoflavonbestimmung	30
Abbildung 13: Typische Chromatogramme der HPLC-Analytik zur Flavanolbestimmung	31
Abbildung 14: Bildung des ABTS-Radikals	34
Abbildung 15: Korrelation zwischen Peakfläche (mV) und Konzentration von Genistein (GE) und Daidzein (DA) (Doppelbestimmung)	39
Abbildung 16: Korrelation zwischen Peakfläche (mV) und Konzentration von Epicatechin (Epi), Catechin (Cat), Epicatechingallat (ECG) und Epigallocatechingallat (EGCG) (Doppelbestimmung)	40
Abbildung 17: Durchschnittliche Isoflavonkonzentration des Sojagetränkes (n=6).....	42
Abbildung 18: Antioxidative Kapazität in den Testgetränken (n=10)	43
Abbildung 19: Daidzein- und Genisteinkonzentration in der Muttermilch der Sojagruppe (n=18).....	46

Abbildung 20: Antioxidative Kapazität in der lipophilen und wässrigen Phase der Muttermilch (MW \pm SD).....	48
Abbildung 21: Glutathionaufnahme und –synthese in der Zelle	67
Abbildung 22: Abbau von Epicatechin [112]	69

1. Einleitung

1.1 Vorkommen und Verzehr von Flavonoiden

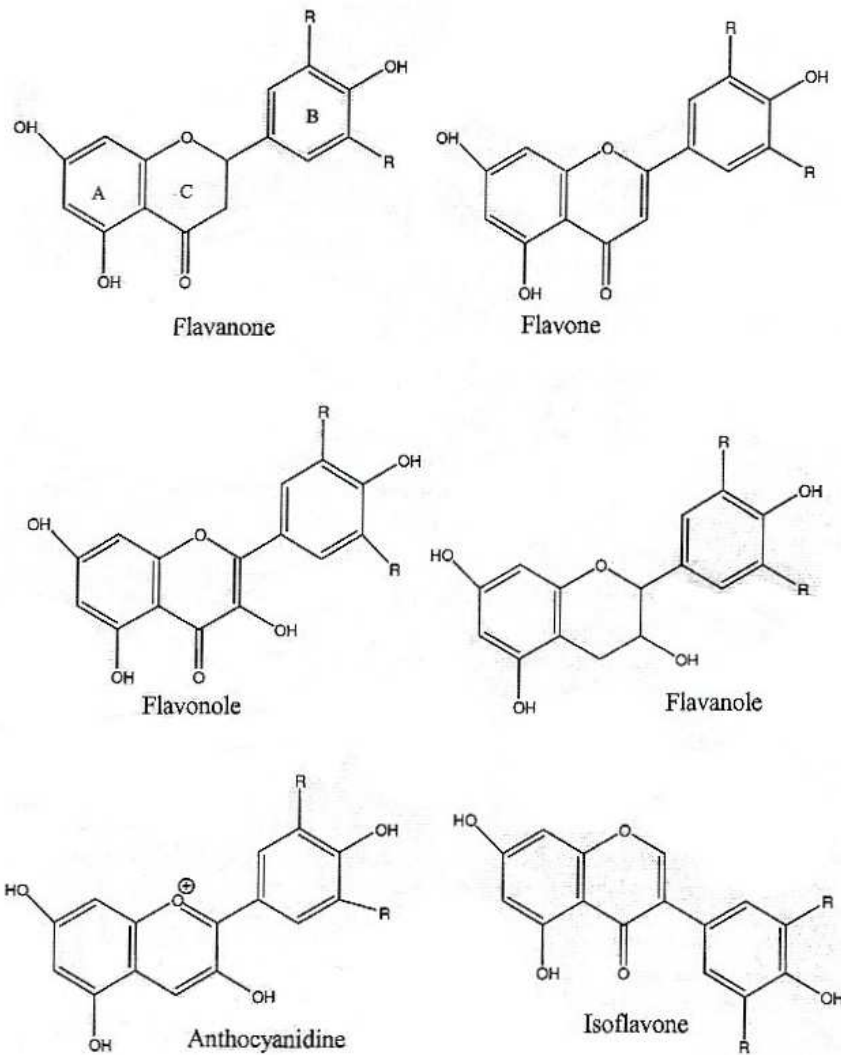
Sekundäre Pflanzenstoffe, wie beispielsweise isoprenoide (Terpene, Steroide und Carotinoide) sowie phenolische Verbindungen (Phenole und Polyphenole), werden im so genannten „sekundären Stoffwechsel“ der Pflanze gebildet und sind in den pflanzlichen Lebensmitteln in unterschiedlichen Konzentrationen nachweisbar. Der Pflanze dienen sie als effektive chemische Abwehrstoffe gegen Viren und als Lockstoff für pollenverbreitende Insekten und samenverbreitende Fruchtfresser. Sekundäre Pflanzenstoffe befinden sich überwiegend an bzw. in den Randschichten der Pflanze sowie an den äußeren Blättern. Noch bis vor wenigen Jahren wurde dieser chemisch sehr heterogenen Stoffgruppe ernährungsphysiologisch wenig Beachtung beigemessen; heute zeigen aktuelle Forschungsarbeiten, dass diese Substanzen in vielfältiger Weise im menschlichen Organismus „bioaktiv“ sein können. In verschiedenen *in vitro* und tierexperimentellen *in vivo* Studien wurden unter Anderem folgende Wirkungen festgestellt [1, 2]:

- Immunmodulation
- Entzündungshemmung
- Senkung des Cholesterinspiegels
- Antioxidative und hormonähnliche Eigenschaften
- Inhibition der Kanzerogenese

Sowohl quantitativ als auch qualitativ gehören die zu den Polyphenolen zählenden **Flavonoide** zu den wichtigsten Vertretern der sekundären Pflanzenstoffe. Chemisch betrachtet besitzen die Flavonoide das Flavon-Grundgerüst als gemeinsames Merkmal bestehend aus zwei Benzolringen (A und B), die durch einen heterozyklischen Pyranring (C) verbunden sind (siehe Abbildung 1) [3].

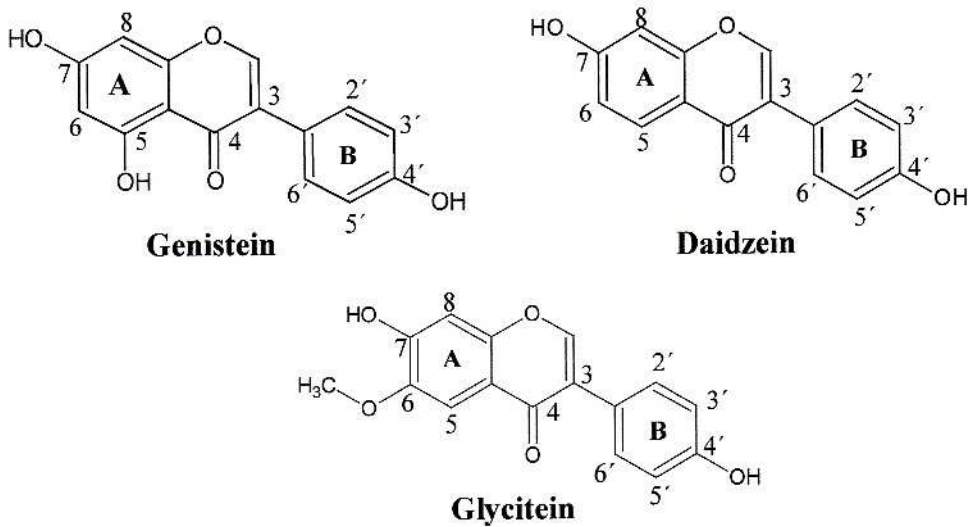
Insgesamt wurden mehr als 6000 unterschiedliche Flavonoide beschrieben und definiert. Untergruppen sind: Isoflavone, Flavanole, Flavone, Flavonole, Anthocyanidine und Flavanone.

Abbildung 1: Strukturformeln der Flavonoide:



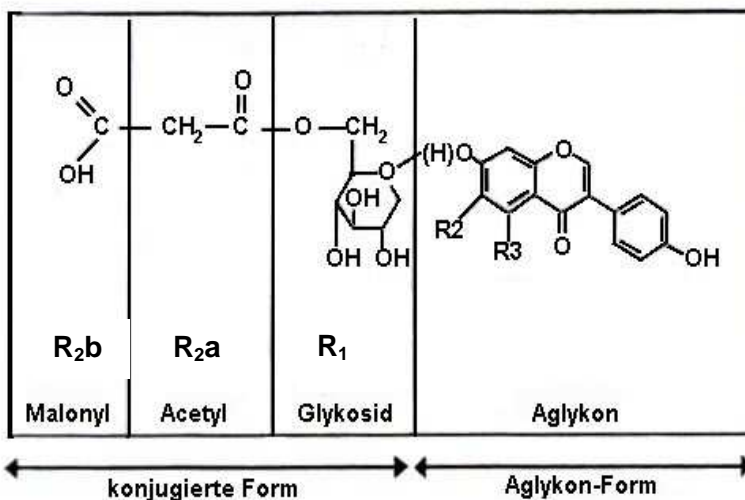
Eine Untergruppe der Flavonoide bilden die für tropische Hülsenfrüchte charakteristischen **Isoflavone**. Zu den Hauptvertretern der Isoflavone gehören Genistein und Daidzein sowie das in geringeren Mengen vorkommende Glycitein (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2: Strukturformeln der Isoflavone:



In der Regel liegen die Isoflavone in Form von Glykosiden (Genistin, Daidzin sowie Glycetin) vor. Dabei ist der Saccharidrest (in Abbildung 3: R₁) am C-7 des A-Ringes gebunden. Daneben kommen auch häufig die entsprechenden 6''-O-Acetyl- und 6''-O-Malonylglycoside vor, bei denen am C-6'' der Glucose ein Acetyl- oder Malonylrest gebunden ist (in Abbildung 3: R_{2a} bzw. R_{2b}) [4, 5].

Abbildung 3: Chemische Struktur der Isoflavone und ihrer Konjugate (modifiziert nach [6]):



Quantitativ bedeutsame Mengen befinden sich in der Sojabohne und daraus hergestellten Produkten. Während in unfermentierten Sojaprodukten die Isoflavone

hauptsächlich in Form ihrer Glykoside auftreten, dominieren in fermentierten Soja-
produkten (Tofu, Miso, Tempeh) die Aglykone [7-9]

Der Gehalt an Gesamt-Isoflavonen in der Sojabohne ist abhängig von Sorte, Her-
kunft sowie Anbaubedingungen und schwankt zwischen ca. 60 mg und 265
mg/100 g essbarer Portion. Quantitativ weniger bedeutsame Quellen für Daidzein
und Genistein sind unter anderem Erdnüsse und Pflaumen (siehe Tabelle 1) [10]..

**Tabelle 1: Durchschnittswerte (Minimum- und Maximalwerte) der Isoflavon-
gehalte (Aglykone) verschiedener Lebensmittel (mg/100 mL bzw. mg/100 g)
[10]**

	Daidzein	Genistein
Sojagetränk	3,4 (0,7 - 9,8)	5,4 (1,1 - 11,3)
sojahaltige Säug- lingsnahrung	1,4 (0,8 - 1,9)	1,8 (1,6 - 2,3)
Miso	16,1 (7,1 - 36,6)	24,6 (11,7 - 52,4)
Tofu	11,7 (8 - 25,3)	16,6 (11,1 - 42,2)
Tempeh	17,6 (4,7 - 27,3)	24,9 (1,1 - 39,8)
Erdnüsse	0,03 (0,01 – 0,1)	0,24 (0,1 - 0,4)
Pflaumen	0,005	0,55
Erbsen, roh	2,42 (0 - 7,3)	0

0 = unterhalb der Nachweisgrenze

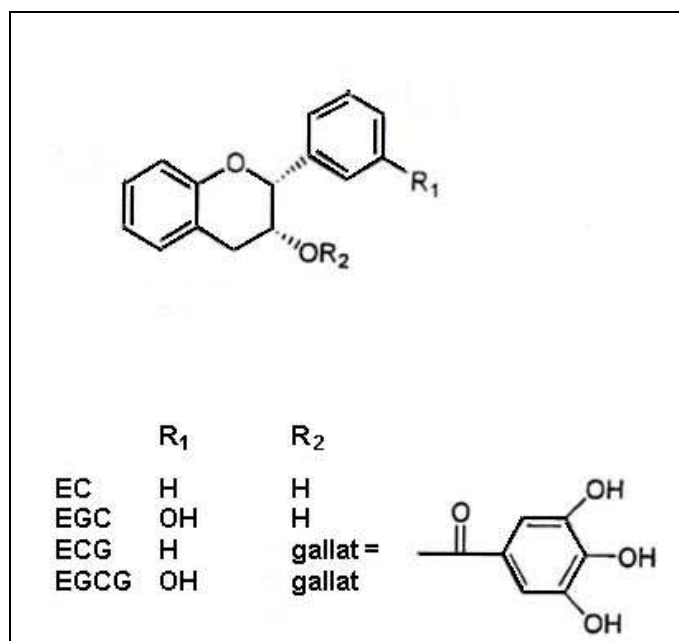
Die durchschnittliche tägliche Aufnahme von Sojaprodukten in asiatischen Län-
dern wird auf etwa 30 g/Tag geschätzt. Dies entspricht einer Isoflavonaufnahme
von etwa 60-90 mg/Tag [11]. In westlichen Ländern wird Soja eher selten verzehrt,
die Isoflavonaufnahme beträgt weniger als 1 mg/Tag [12]. Bei regelmäßigem Ver-
zehr von sojahaltigen Lebensmitteln, wie bei den Asiaten, wurden Nüchtern-

Plasmakonzentrationen an Gesamisoflavonen von etwa 870 nmol/L gemessen, während sie bei Europäern nur bei ca. 10 nmol/L lagen [13].

Isoflavonhaltige Proteinisolate sind heutzutage nicht nur in traditionellen asiatischen bzw. klar deklarierten Sojaprodukten enthalten, sondern auch in vielen Backwaren, Soßen, Suppen, Speiseeis, Sportlernahrung oder Fertiggerichten. Sojaprotein besitzt funktionelle Eigenschaften bei vielen Verarbeitungsprozessen von Lebensmitteln. Unter anderem trägt Sojaprotein zur Stabilisierung von Emulsionen und zur Verbesserung des Wasserbindungsvermögens von Produkten bei. Neben dem isolierten Sojaprotein finden auch beispielsweise Sojamehl und Sojalecithin im Herstellungsprozess vieler Lebensmittel Anwendung. Aufgrund der breiten Verwendung dieser Substanzen sind Isoflavone inzwischen in einer großen Anzahl von Lebensmitteln nachweisbar.

Flavanole, eine weitere Untergruppe der Flavonoide, kommen besonders reichlich im grünen und schwarzen Tee sowie in Obst, Wein und Schokolade vor (siehe Tabelle 2). Im Gegensatz zu den Isoflavonen liegen Flavanole nicht als Glykoside, sondern als Gallatester vor (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4: Chemische Struktur der Flavanole und ihrer Konjugate (modifiziert nach [14]):



Die durchschnittliche tägliche Aufnahme an Flavanolen beträgt etwa 18-50 mg/Tag in Europa, wobei Tee, Schokolade, Äpfel, Birnen, Trauben und Rotwein

die Hauptquellen darstellen [2]. In Tabelle 2 sind die Minimum- und Maximalwerte der Flavanolgehalte verschiedener Lebensmittel aufgeführt.

Tabelle 2: Durchschnittswerte (Minimum- und Maximalwerte) der Flavanolgehalte verschiedener verzehrfähiger Lebensmittel (mg/100 mL bzw. mg/100 g) [15]

	Cat	Epi	EGCG	ECG
Schwarzer Tee	1,5 (0,4 – 4,8)	2,1 (0,6 – 8,7)	9,3 (0,7 – 40,7)	5,9 (0,8 – 18,9)
Schwarzer Tee (entkoffeiniert)	0	0,5 (0,3 – 0,9)	1,0 (0,5 – 2,6)	0,6 (0,3 – 1,7)
Rotwein	7,0 (0 – 39)	3,3 (0,2 – 16,5)	0	0 (0 – 0,1)
Äpfel mit Schale	0,9 (0 - 5,5)	6,1 (0,8 - 19,2)	0,3 (0 - 6,3)	0 (0 - 0,2)
Pflaumen, dunkel	17,6 (6,1 – 29)	2,4 (0 – 4,9)	0,5 (0 – 0,9)	0
Trauben, dunkel	10,1 (8,9 – 10,8)	8,7 (8,6 – 8,7)	0	2,8
Dicke Bohnen, roh	12,8	22,5	0	0
Dicke Bohnen, gekocht	8,2	7,8	0	0

0 = unterhalb der Nachweisgrenze

1.2 Absorption und Metabolismus der Flavonoide

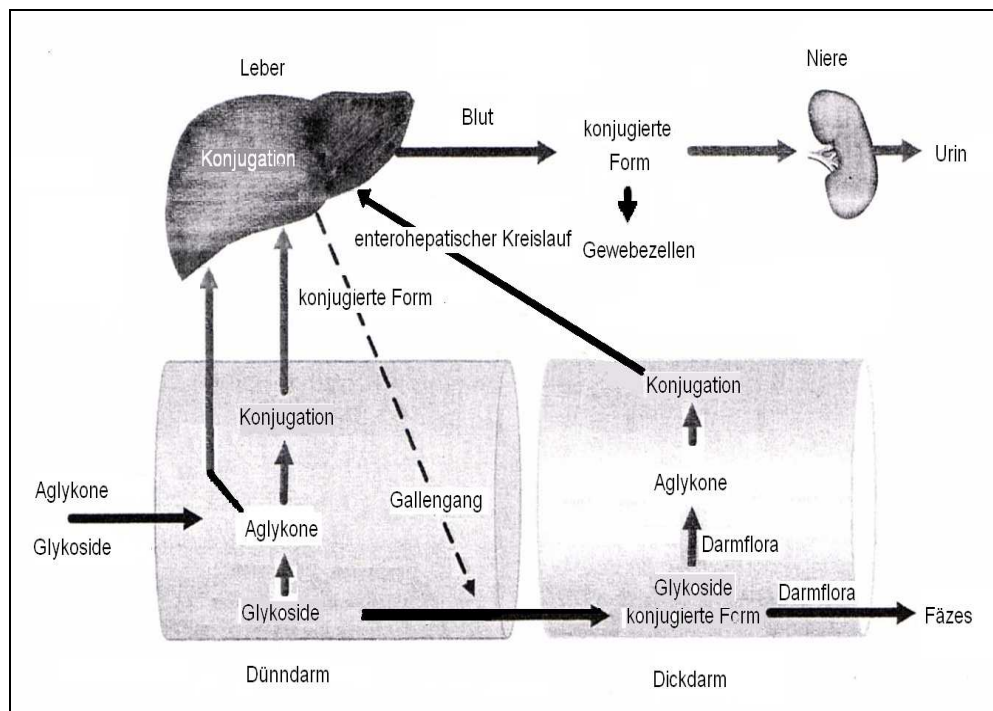
Die mit der Nahrung aufgenommenen Flavonoidaglykone können im Dün- und Dickdarm durch passive Diffusion absorbiert werden.

Für die in Lebensmitteln überwiegend vorliegenden **Glykosidderivate** (z.B. Genistin und Daidzin) werden mehrere Absorptionswege diskutiert, wobei die jeweilige qualitative und quantitative Rolle unklar ist. Aufgrund erster Studien wurde angenommen, dass Glykoside erst im Dickdarm durch bakterielle β -Glykosidasen, β -Glukuronidasen und Sulfatasen zu den entsprechenden Aglykonen metabolisiert und anschließend als Aglykone absorbiert werden. Aufgrund von Humanstudien mit Ileostomie-Patienten und von experimentellen Untersuchungen mit keimfrei gehaltenen Ratten wurde jedoch festgestellt, dass eine Abspaltung des Zuckerrestes auch durch dünnarmeigene zytosolische bzw. Membran-gebundene β -Glykosidasen, wie bspw. die Lactase-Phlorizin-Hydrolase, erfolgen kann [16, 17]. Es besteht zusätzlich die Möglichkeit, Flavonoide in ihrer Glykosidform ohne vorangegangener Hydrolyse aufzunehmen. Sie können über den Na^+ -abhängigen Glucose-Transporter (SGLT1), der sich in der Bürstensaummembran befindet, absorbiert werden. Studien mit Quercetin-Glykoside bestätigen dies [18]. In einer Studie von Setchell et al. [19] konnten nach Gabe von Genistin und Daidzin diese Isoflavonglycoside im menschlichen Plasma jedoch nicht nachgewiesen werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Absorptionsraten der Isoflavone bei 20-55% und die der Flavanole bei 5% liegen [20]. In einem Review-Artikel von Manach et al. [2] wurden die biokinetischen Daten von insgesamt 97 Bioverfügbarkeitsstudien über Polyphenole zusammengestellt. Aus allen Studien wurden die maximalen Plasmakonzentrationen der Flavonoide zusammengefasst und so umgerechnet, dass sie einer Gabe von 50 mg des gemessenen Flavonoidäquivalents entsprechen. Es hat sich beim Vergleich der Werte herausgestellt, dass nach enzymatischer Behandlung das Genistein einen durchschnittlichen maximalen Plasmawert von 2,56 $\mu\text{mol/L}$ erreichte. Nach Verabreichung der Glykoside Daidzin und Genistin konnten maximale Plasmawerte von 1,92 bzw. 1,84 $\mu\text{mol/L}$ gemessen werden. Daidzein erreichte nach entsprechender Intervention einen mittleren Wert von 1,57 $\mu\text{mol/L}$. Die Flavanole schnitten schlechter ab. Sowohl Catechin als auch Epicatechin erreichten nur Konzentrationen von 0,4 $\mu\text{mol/L}$ und das EGCG einen mittleren Wert von 0,12 $\mu\text{mol/L}$.

In den Enterocyten des Dünndarms erfolgen nach Absorption die ersten Konjugationsreaktionen durch Phase II-Enzyme (UDP-Glukuronyltransferase (UGT), Sulfotransferase (SULT) und Catechol-O-Methyltransferase (COMT)) [21, 22]. Auf welche Weise Flavonoide letztendlich die Enterocyten zur Blutseite verlassen, ist noch unklar. Nicht im Dünndarm absorbierte Flavonoide gelangen letztlich in den Dickdarm und können durch die Darmflora reduktiv metabolisiert oder mit dem Faeces ausgeschieden werden [2, 22, 23].

Nach der Absorption aus dem Darm gelangen Metabolite via Pfortader in die Leber. Dort werden sie wiederum durch Phase-II-Konjugationsreaktionen zu Mono- und Diglukuroniden, aber auch zu Mono- und Disulfaten sowie zu Sulfoglukuronide umgesetzt. In dieser Form, je nach Metabolisierung, werden sie sowohl renal als auch biliär ausgeschieden [24-26]. Gelangen die Konjugate mit der Galle in den Darm, können sie durch Enzyme der Darmflora gespalten und die so entstandenen Aglykone erneut absorbiert werden. Damit unterliegen die Flavonoide ähnlich den körpereigenen Steroidhormonen einem enterohepatischen Kreislauf [27-29]. Viele Studienergebnisse zeigen einen biphasischen Verlauf der Plasma-Isoflavonkonzentrationen. Dies ist auf den oben genannten enterohepatischen Kreislauf der Substanzen bzw. auf eine Resorption im Dickdarm mit vorangehender geringerer Resorption im Magen-Duodenum-Jejunum-Bereich zurückzuführen. Neben der biliären und renalen Ausscheidung über die Niere gelangen die Konjugate auch in den systemischen Kreislauf und so zu den verschiedenen Gewebezellen, demnach auch zum Brustdrüsengewebe und somit möglicherweise in die Muttermilch (siehe Abbildung 5).

Abbildung 5: Absorptionswege der Flavonoide (modifiziert nach [2, 23])

1.3 Wirkung von Flavonoiden

Wie in Kapitel 1.1 erwähnt, besitzen Flavonoide unter anderem eine antioxidative Eigenschaft. Durch die Abgabe von Wasserstoffatomen aus den phenolischen Hydroxylgruppen sind sie wirksame Fänger der Radikalen Hydrogenperoxid, Superoxid und Singulett-Sauerstoff [30-32]. Mit Hilfe geeigneter Testverfahren (FRAP, TEAC) konnten in den letzten Jahren einige klinische Studien belegen, dass die Einzeldosis eines Teeaufgusses die antioxidative Kapazität des Plasmas erhöht [33-38]. In Studien mit mehrmaligen Teegaben über einen längeren Zeitraum (1-2 Wochen) konnten Biomarker, die für den oxidativen Status charakteristisch sind, signifikant gesenkt werden [37, 39]. Flavonoide agieren auch als Antioxidantien durch ihre direkte Hemmung von Enzymen. Beispielsweise inhibieren Isoflavone die Lipoygenase und reduzieren somit das arteriosklerotische Risiko [40]. Eine weitere antioxidative Eigenschaft der Flavonoide ist ihre induzierende Wirkung auf die protektiv wirkenden Enzyme Glutamat-Cystein-Ligase (GCL) und Glutathion-Peroxidase.

Das Glutathion (GSH) ist ein körpereigenes Antioxidanz und schützt Makromoleküle, wie etwa Proteine und Membranlipide, vor reaktiven Sauerstoffspezies. Dabei wird – katalysiert durch die Glutathion-Peroxidase – GSH durch H_2O_2 in GSSG (Glutathiondisulfid) oxidiert, woraus durch die Glutathion-Reductase mit NADPH

als Wasserstoffdonator GSH regeneriert wird. Viele experimentelle und klinische Studien belegen, dass Flavonoide einen direkten Einfluss auf die Enzymaktivität der Glutathionperoxidase haben [39, 41, 42].

Glutathion ist ein Tripeptid und besteht aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin, wobei die Enzyme Glutamat-Cystein-Ligase (GCL) und Glutathionsynthase die Synthese aus den drei Aminosäuren katalysieren. Durch die induzierende Wirkung der Flavonoide auf die Glutamat-Cystein-Synthase wird die Glutathionbildung und -konzentration im Plasma beeinflusst. Fu et al. [43] zeigten in einer experimentellen Studie, dass das Epigallocatechingallat (EGCG) die Synthese von Glutathion positiv beeinflusst, indem durch das EGCG eine gesteigerte Genexpression der katalytischen Enzymunterheit eingeleitet wird.

Glutaminsäure, ein wesentlicher Baustein des Glutathions, kommt besonders reichlich in Sojaprodukten vor. Somit stellt sich die Frage, ob durch den Konsum des hier verabreichten Sojagetränkes die Glutathionsynthese beeinflusst werden kann. Sowohl in experimentellen als auch in Humanstudien konnte nachgewiesen werden, dass vor allem die Verabreichung von Glutamin, das in den Zellen zu Glutaminsäure desaminiert, die Glutathionsynthese steigern kann [44-46].

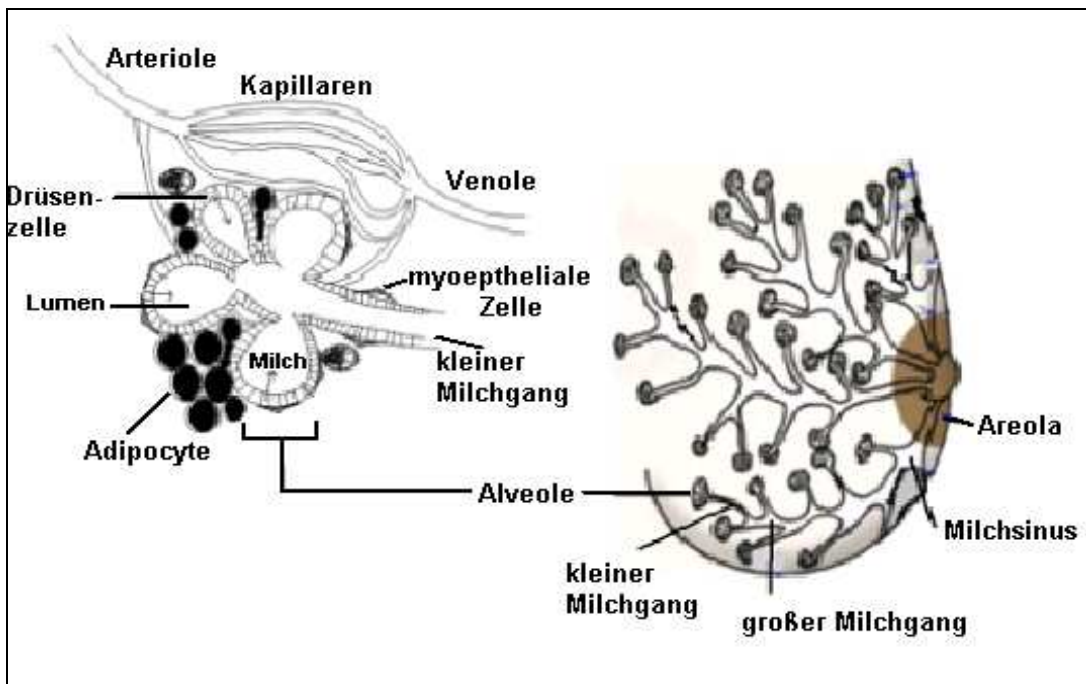
1.4 Biosynthese der Muttermilch

Schon während der Schwangerschaft verändert sich das Brustdrüsengewebe zur Vorbereitung der Milchproduktion nach der Geburt. Unter Einfluss der Steroidhormone Östrogen und Progesteron reifen die milchproduzierenden Zellen (Laktozyten) der Alveolen sowie die Epithelzellen der Milchgänge heran. Nach der Geburt erfolgt die Milchsekretion unter dem Einfluss des Prolaktins und des Oxytocins. Im Verlauf der Stillzeit ist die Milchproduktion primär von dem Trinkverhalten des Kindes und somit von dem Muttermilchbestand in den Alveolen des Brustgewebes abhängig. Es wird spekuliert, ob die Syntheserate unter anderem von einem Molkenprotein gesteuert wird, dem sogenannten „Feedback inhibitor of lactation“ (FIL) [47]. Wilde et al. [48] haben zum ersten Mal in Ziegenmilch dieses Molkenprotein gefunden und mit FIL beschrieben. Sie haben festgestellt, dass dieses Protein die Synthese von Bestandteilen der Muttermilch und somit auch die Milchsynthese unterdrücken kann. Demnach wirkt das in der Milch enthaltene Molkenprotein

(FIL) als Inhibitor, so dass die Milchsynthese bei gefüllten Lumen der Alveole herabgesetzt wird.

Etwa 750-800 mL Muttermilch werden täglich gebildet. In der Brustdrüse werden die meisten Milchbestandteile in den Laktozyten bereitgestellt und in das Lumen der Alveole sekretiert [47]. Dort bleibt die Milch so lange bis sie durch Kontraktion (von dem Hormon Oxytocin gesteuert) der myoepithelialen Zellen in die kleineren Milchgänge entleert wird und von dort aus die größeren Milchgänge erreicht. Die kleinen Milchgänge vereinigen sich zu 15 bis 25 Hauptgängen, die sich zu kleinen Sinussen nahe der Areola erweitern [49]. Im Gegensatz zu den kleinen Milchgängen spielen die großen Milchgänge eine passive Rolle bei der Milchsynthese. Sie dienen lediglich dem Transport der Milch aus dem Lumen der Alveole zu den Sinussen unterhalb der Areola (siehe Abbildung 6).

Abbildung 6: Darstellung des Brustdrüsengewebes (eigene Darstellung)

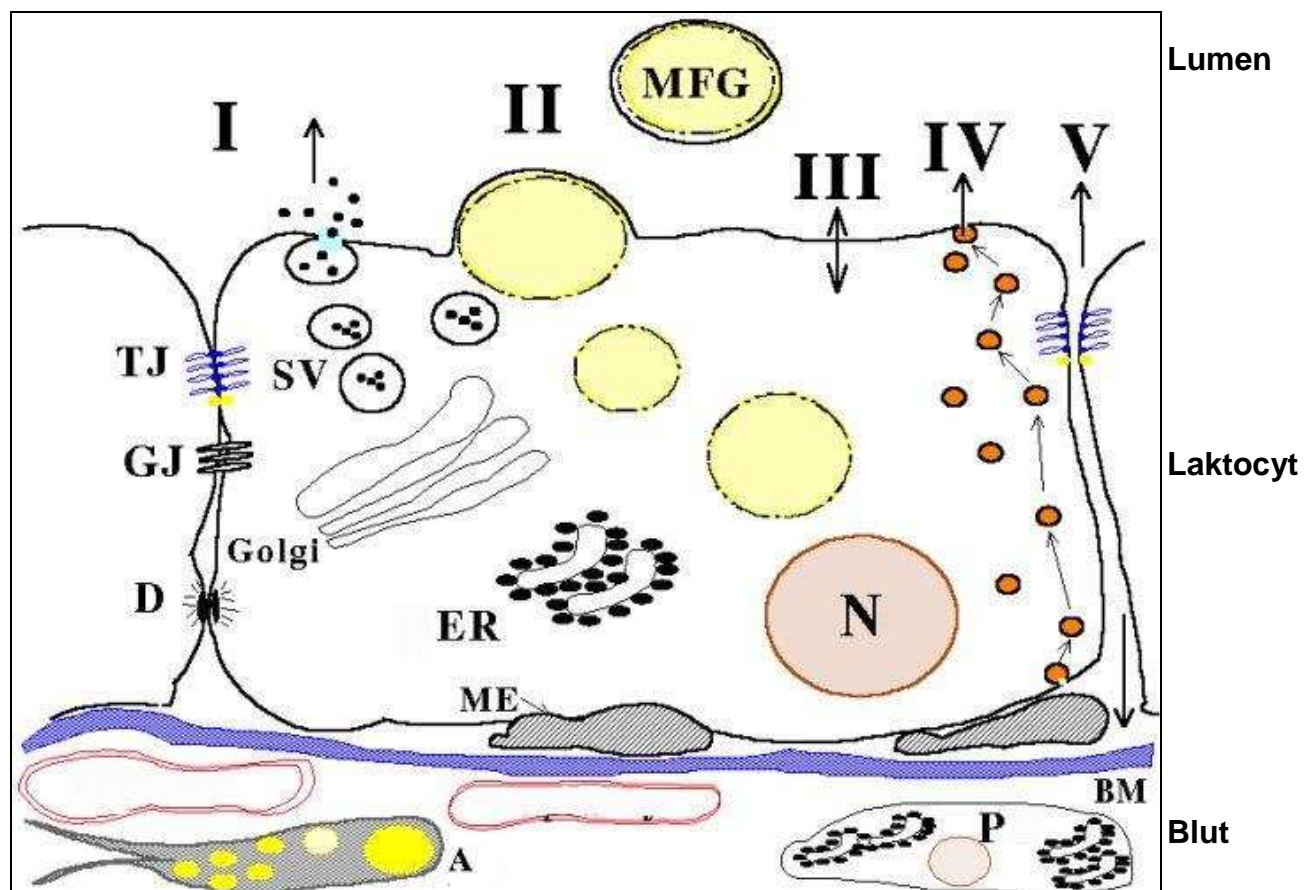


Die Milchgänge und Alveolen sind im Bindegewebe eingebettet, das noch weitere für die Milchbildung wichtige Zelltypen enthält (siehe Abbildung 6). Die Fibroblasten und die Fettzellen (Adipozyten) sind Quellen verschiedener Wachstumsfaktoren wie bspw. das IGF1 (insulin-like growth factor) [50, 51]. Darüber hinaus sind sie möglicherweise für die Bildung der Lipoprotein-Lipase zuständig, die die Milchlipidsynthese aktiviert [52]. Ebenfalls im Bindegewebe eingebettet sind Plas-

mazellen. Sie sind ursprüngliche B-Lymphocyten, die das Brustgewebe als Zielort angesteuert und sich dort niedergelassen haben. Die Zellen produzieren Immunglobuline, die dann über Transcytose in die Milch gelangen [53].

Es gibt fünf verschiedene Prozesse der Milchsekretion, die in Abbildung 7 graphisch dargestellt sind. Vier Transportwege sind transzellulär, wobei mindestens zwei Membranbarrieren durchquert werden. Der fünfte erfolgt parazellulär und ermöglicht einen direkten Austausch der Bestandteile zwischen Blut und Milch. Ausgenommen ist die Fettsekretion; sie erfolgt über apikale Abschnürung der Milchfettglobuli (MFG) [52, 54].

Abbildung 7: Mechanismen der Milchsekretion [52]



A = Adipocyte; BM = Basalmembran; D = Desmosom; ER = endoplasmatisches Retikulum; GJ = gap junction; ME = myoepitheliale Zelle; MFG = Milchfettglobuli; N = Nucleus; P = Plasmazelle; SV sekretorische Vesikel; TJ = tight junction

I Exocytose (z.B. Protein, Lactose) [55, 56] **II** Fettsekretion durch apikale Abschnürung (Apocytose) der MFG [57] **III** Diffusion durch apikale Membran (z.B. Na^+ , Cl^- , K^+ , Aminosäuren) [58, 59] **IV** Transcytose (meist rezeptorvermittelt) u.a. von en-

dokrinen Hormonen (Insulin, Prolaktin und IGF1) [60, 61] **V** parazellulärer Transport von Plasmabestandteilen (Leukozyten)

Das Besondere beim parazellulären Transport ist, dass Substanzen aus dem Interstitium direkt in die Milch gelangen, da die Tight Junctions (Verschlusskontakt zweier Zellen) unter Umständen durchlässig werden. Das heißt, Plasmabestandteile wie bspw. Cytokine oder inflammatorische Zellen, können auf direktem Weg aus dem Interstitium in das Lumen der Alveole gelangen [52].

1.5 Flavonoide – ernährungsphysiologisch wertvolle Bestandteile der Muttermilch

Die Muttermilch ist die empfohlene Ernährung für den Säugling, da sie die für ihn erforderlichen Nährstoffe in optimaler Form und Menge enthält. Einzigartig für die Muttermilch sind zudem die darin enthaltenen Hormone, die das Wachstum beeinflussen, sowie die Immunstoffe und Antioxidantien, die seine Abwehr stärken. Zu den Antioxidantien zählen enzymatische und nicht-enzymatische antioxidative Bestandteile wie bspw. Katalase, Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase, Glutathion, Vitamin C, E und A sowie das β -Carotin [62, 63]. Viele Studien belegen, dass der Gehalt an bestimmten Nährstoffen in der Muttermilch, wie u.a. die oben genannten antioxidativ wirksamen Vitamine, von der Ernährung der Mutter abhängt [64-66].

Auf welche Weise Flavonoide in die Muttermilch gelangen, ist unklar, jedoch wurden sie schon nach flavonoidreicher Kost in der Milch nachgewiesen [67-70]. Aufgrund der angenommenen antioxidativen Wirkung können Flavonoide als ernährungsphysiologisch wertvoll angesehen werden und haben nach dem Transport aus dem Blut in die Alveole möglicherweise einen Einfluss auf die Qualität der Muttermilch. Erste Studien zum Gehalt von Isoflavonen in Muttermilch wurden von der Arbeitsgemeinschaft Franke durchgeführt [67, 68, 71]. Nach Erarbeitung eines neuen analytischen Verfahrens unter Verwendung eines HPLC- Massenspektrometers analysierten sie in einer aktuellen Studie den Isoflavongehalt der Muttermilch von 7 Probandinnen. Sie erfassten einen signifikanten Anstieg von 5 nmol Gesamtisoflavon/L auf 71 nmol Gesamtisoflavon/L Muttermilch nach Verzehr ei-

nes Sojagetränkes (55 mg Gesamtisoflavin /36,5 mg). Weitere analytisch funktionelle Marker wurden nicht untersucht [71].

1.6 Ziel

Die Datenlage hinsichtlich des Transfers von Flavanoiden aus der Ernährung der Mutter in die Muttermilch ist nicht ausreichend. Das Ziel der Untersuchung in Zusammenarbeit mit dem Evangelischen Waldkrankenhaus in Berlin ist somit die Beantwortung der unten formulierten Fragen nach einer Intervention mit einem Sojagetränk und entkoffeiniertem Schwarztee bei Stillenden.

- 1) Sind Isoflavone und Flavanole nach einer Sojagetränk- bzw. Teeintervention bei stillenden Frauen in der Muttermilch nachweisbar?
- 2) Verändert sich die antioxidative Kapazität (TEAC) und der Glutathiongehalt in der Muttermilch nach der Soja- bzw. Teeintervention?

2. Material

2.1 Chemikalien

Sigma Aldrich, Steinheim, D

Ammoniumacetat

Cystein

Daidzein

Epicatechin

Epigallocatechingallat

Genistein

β -Glucosidase (EC 3.2.1.21)

Glutathion, red. Form

Glycin

Homocystein

Kaliumhexacyanoferrat III

Myoglobin

N-(2-Mercaptopropionyl)-Glycine (MPG)

Phenolphthalein

Phenolphthalein Glucuronsäure

p-Nitrocatechol Sulfat

Tri-n-Butylphosphin

β -Glucuronidase IX-A, E. coli (EC 3.2.1.31)

2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)

6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox)

E. Merck, Darmstadt, D

Aluminiumoxid

BHT 2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol (Butylhydroxytoluol)

Borsäure

Diethylether

di-Kaliumphosphat

di-Natriumhydrogenphosphat-1-Hydrat

di-Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat

Essigsäure

Ethanol

Kaliumdihydrogenphosphat

Kaliumhydroxyd-Plätzchen

N,N-Dimethylformamid (DMF)

Natriumacetat

Natriumchlorid

Perchlorsäure etwa 70%

Phosphorsäure

Salzsäure (37%)

Sulfosalicylsäure (SSA)

Titriplex III (EDTA)

Wasserstoffperoxid 30%

Carl Roth, Karlsruhe, D

Acetonitril

Hexan

Methanol

Tetrahydrofuran, Roti®Solv HPLC

FlukaChemie GmbH, Buchs, D

7-Fluorobenzofurazane-4-sulfonic acid Ammonium Salz (SBD-F)

Catechin

Flavon

Bachem, Weil am Rhein, D

Cys-Gly

Praxair, Biebesheim am Rhein, D

Stickstoff

2.2 Geräte

Eppendorf, Hamburg, D

Tischzentrifuge 5415

Heraeus, Hanau, D

Tischkühlzentrifuge 1.0 R

Savant Instruments, Holbrook, USA

Kühlfalle mit Glaseinsatz

Speed Vac Konzentrator Sc110

Scientific Industries, Bohemia, USA

Schüttler Roto Shake Genie

Sartorius, Göttingen, D

Elektronische Analysenwaage Sartorius R 160 P

Hartschalenwaage

Kontron Instruments, Zürich, CH

Spektrophotometer Uvicon 922

Heidolph, Kehlheim, D

Vortex Heidolph REAX 2000

Knick, Egelsbach, D

pH-Meter

Macherey und Nagel, Düren, D

SPE-Station

Gerhardt, Königswinter, D

Magnetrührer MR 2002

2.3 HPLC-Systeme

2.3.1 HPLC-Geräte

Sykam, München, D

Autoinjektor S5200

HPLC-Pumpe S1122

Eluentenmischer S 8111

Säulen Thermoregler S 4011

HPLC-Pumpe S1100

Eluentenmischer S 8110

Säulen Thermoregler S 4010

Biometra, Göttingen, D

Elektrochemische Detektor EC-D EP 30

Merck Hitachi, Darmstadt, D

Fluoreszenzdetektor LaChrom L-1585

2.3.2 HPLC-Säulen

VDS optilab Chromatographie Technik GmbH, Berlin, D

Prontosil 120 C 18H, 250 x 4,6 mm, 5 µm

Thermo electron corportion, Waltham, USA

Hypersil ODS , 250 x 4 mm, 3µm

Mz Analysentechnik, Mainz, D

PerfectBond ODS-HD, 150 x 4 mm, 5 µm

2.3.3 HPLC-Auswerteprogramm

Software für Chromatographie und Prozessanalytik GmbH, Weyhe

Leeste, D

ChromStar Light Version 6.3

2.4 Hilfsmittel

Faust, Meckenheim, D

verschließbare Reagenzgläser

Reagenzgläser

Brand, Wertheim, D

Küvetten

Spectrum, Los Angeles, USA

Dialyserohr zur Enzymaufreinigung

Phenomenex, Aschaffenburg, D

Strata-X 33µm

Waters, Eschborn, D

OASIS®HLB

BBraun, Melsungen, D

Plastikspritzen

Schleicher & Schüll, Dassel, D

Spritzenfilter

3. Methoden

Das vorliegende Projekt wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer Berlin geprüft und genehmigt.

Alle Probandinnen gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

Die Studie wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin des Evangelischen Waldkrankenhauses in Berlin-Spandau durchgeführt. PD Dr. Jochum betreute diese Studie als Prüfarzt.

3.1 Rekrutierung der Probandinnen

Über den Zeitraum von 24 Monaten erfolgte die Rekrutierung der Probandinnen im Evangelischen Waldkrankenhaus Spandau. Alle Wöchnerinnen wurden nach der Entbindung des Kindes befragt, ob sie an der Studie teilnehmen wollen. Bei vorhandenem Interesse wurden sie etwa 2-3 Wochen später zu Hause besucht und eingehend über das Projekt aufgeklärt. Mit Hilfe eines Fragebogens wurden die Ausschlusskriterien überprüft. Die anschließende Rekrutierung in drei Gruppen erfolgte blockrandomisiert mit ungleichen Gruppengrößen über Losverfahren.

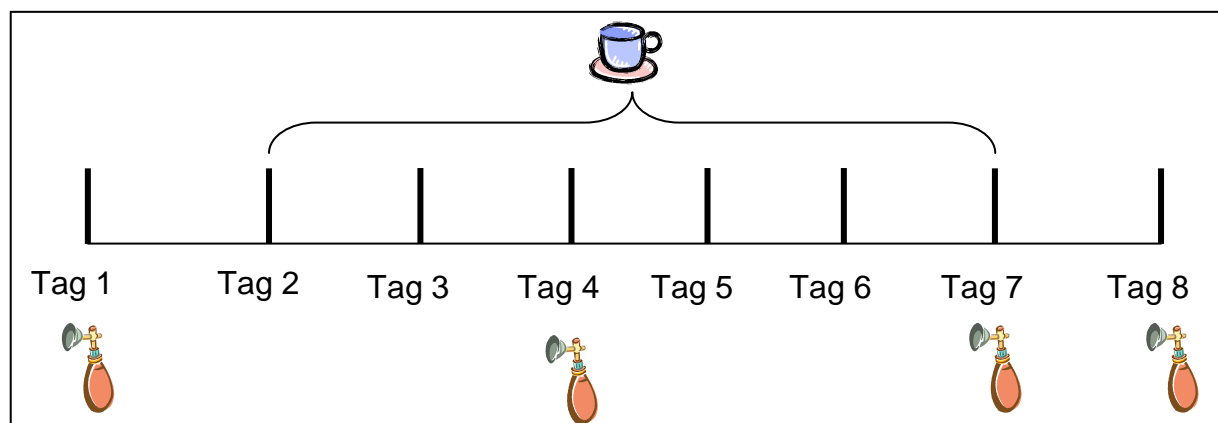
Ausschlusskriterien waren:

- Abstillen vor dem 27. Tag der Laktation
- Regelmäßige Einnahme von Medikamenten (Antibiotika, Diuretika, Schilddrüsenhormone) und Supplemente mit antioxidativen Substanzen (Vit. C, E, Carotinoiden)
- Bekannte Erkrankungen der Leber, der Nieren, des Magen-Darm-Traktes
- Vorliegen von Allergien und Stoffwechselerkrankungen (Laktoseintoleranz, Diabetes mellitus)
- Vegetarische Ernährungsform
- Essstörungen (Anorexia nervosa, Bulimia nervosa)
- Teilnahme an einer anderen Studie gleichzeitig oder innerhalb der letzten 30 Tage
- Rauchen
- BMI < 15 und > 30 postpartal

3.2 Studiendesign

Die Interventionsstudie war randomisiert und wurde monozentrisch durchgeführt. Die Studiendauer betrug insgesamt acht Tage und startete ab dem 27. Laktationstag. Über einen Zeitraum von sechs Tagen nahmen die Stillenden täglich ein Testgetränk zu sich (siehe Abb.8). Insgesamt nahmen 44 Frauen an der Studie teil: 18 Frauen tranken 250 mL Sojagetränk (1 Tetra Pak[®]) und 18 Probandinnen nahmen täglich 2 Tassen entkoffeinierten schwarzen Tee (ca. 300 mL) zu sich. Weitere 8 Frauen bildeten die Kontrollgruppe (entsprechenden Mengen an Wasser). Die Probandinnen wurden gebeten, während des Studienverlaufs auf flavonoidreiche Lebensmittel und Getränke (Tee, Kaffee, Schokolade, sojahlaltige Lebensmittel) zu verzichten. Zur Überprüfung des Ernährungsverhaltens führten alle 44 Probandinnen ein standardisiertes Ernährungsprotokoll an 3 Tagen im Interventionszeitraum (siehe unten).

Abbildung 8: Ablauf der Studiendurchführung



Die Aufnahme des Studiengetränks erfolgte vormittags; 10-12 Stunden später erfolgte die Probenentnahme mit entsprechenden Milchpumpen während des üblichen Stillrhythmus durch die Mütter selbst. Insgesamt wurde zu vier Zeitpunkten Muttermilch abgepumpt, einmal vor, zweimal während und einmal nach der Intervention mit dem Testgetränk (Abb. 8). Bis zur Lagerung im Krankenhaus wurden die Proben im Haushalt (Tiefkühlfach) der Probandin eingefroren. Auf Tockeneis wurden die Proben nach Bonn verschickt und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

3.3 Testgetränke

Für die Studie wurden zwei Testgetränke verwendet. Eine Gruppe erhielt ein Sojagetränk mit Vanillearoma der Marke Alpro® soja. Die Energie- und Nährstoffzufuhr pro 100 mL sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Energie- und Nährstoffgehalt des Sojagetränkes (Daten von Alpro® soja)

<i>Durchschnittliche Nährwerte pro 100 mL</i>	
Energie	62 kcal
Protein	3,3 g
Kohlenhydrate	7,9 g
davon	
• Zucker	7,8 g
• Laktose	0 g
Fett	1,8 g
Ballaststoffe	0,6 g
Natrium	0,05 g
Calcium	120 mg
Vitamine	
• B2	0,24 mg
• B12	0,15 µg

Die zweite Gruppe konsumierte einen entkoffeinierten schwarzen Darjeeling Tee (TeeGschwendner, Meckenheim, D), der vor Vergabe an die Probandinnen in Teebeutel abgefüllt wurde. Es wurden pro Probandin 6 x 2 Teebeutel mit jeweils 3 g Darjeeling-Tee abgewogen. Täglich sollten 2 Tassen Tee (ca. 300 mL) mit jeweils einem Teebeutel aufgebrüht (3 min Ziehzeit) und getrunken werden. Die Probandinnen durften den Tee nach Belieben süßen.

3.4 Nutritive Aufnahme von Flavonoiden und Antioxidantien

Während der Interventionswoche wurde von den Probandinnen ein standardisiertes dreitägiges Ernährungsprotokoll geführt.

Die verzehrten Lebensmittel wurden nach Gruppen sortiert (z.B. Brot, Obst und Gemüse) und in haushaltsüblichen Verzehrsmengen angegeben (z.B. eine Scheibe Vollkornbrot = 50 g). Die verzehrten Portionen wurden von den Probandinnen geschätzt.

Die Berechnung der durchschnittlichen täglichen Aufnahme von Energie, antioxidativen Vitaminen (Vitamin A, E und C) und dem antioxidativ wirkendem Mineralstoff Zink erfolgte unter der Verwendung der Software EBIS pro[®] für Windows, Version 4.0 (Erhardt, Universität Hohenheim). Basis dieses Programms ist die Datenbank des Bundeslebensmittelschlüssels (BLS II.3). Nährstoffangaben zu Lebensmitteln, die nicht im BLS II.3 enthalten sind, wurden bei den Herstellern nachgefragt. Bei zusammengesetzten und verarbeiteten Lebensmitteln, bei denen nur Daten für die Rohprodukte vorlagen, wurden anhand von Rezepten oder durch die Angaben zu den Gehalten der Rohprodukte im Endprodukt Umrechnungen vorgenommen (bei Fertiggerichten z.B. Pizza). Da der BLS keine Angaben zu Flavonoidgehalten, im Speziellen zu den Isoflavon- und Catechinkonzentrationen in Lebensmitteln enthält, wurden aus internationalen Datenbanken Angaben entnommen und in das Programm eingefügt [10, 15, 72-74]. So konnte die tägliche Aufnahme von Flavonoiden mit der Nahrung ermittelt werden.

3.5 Flavonoidbestimmung

3.5.1 Probenaufbereitung

- **Sojagetränk**

Das Sojagetränk wurde in Anlehnung an Knight et al. [75] aufbereitet. Jeweils 1 mL Sojagetränk wurde mit 1 mg Glucosidase versetzt und bei 37 °C 24 Stunden lang inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine dreistündige Extraktion der freigesetzten Aglykone mit 4 mL Methanol bei Raumtemperatur. Nach der Extraktion wurde die Probe bei 2000 x g 10 Minuten lang zentrifugiert, sodass der Überstand abpipettiert werden konnte. Dieser wurde im Speed Vac getrocknet und mit 1 mL Laufmit-

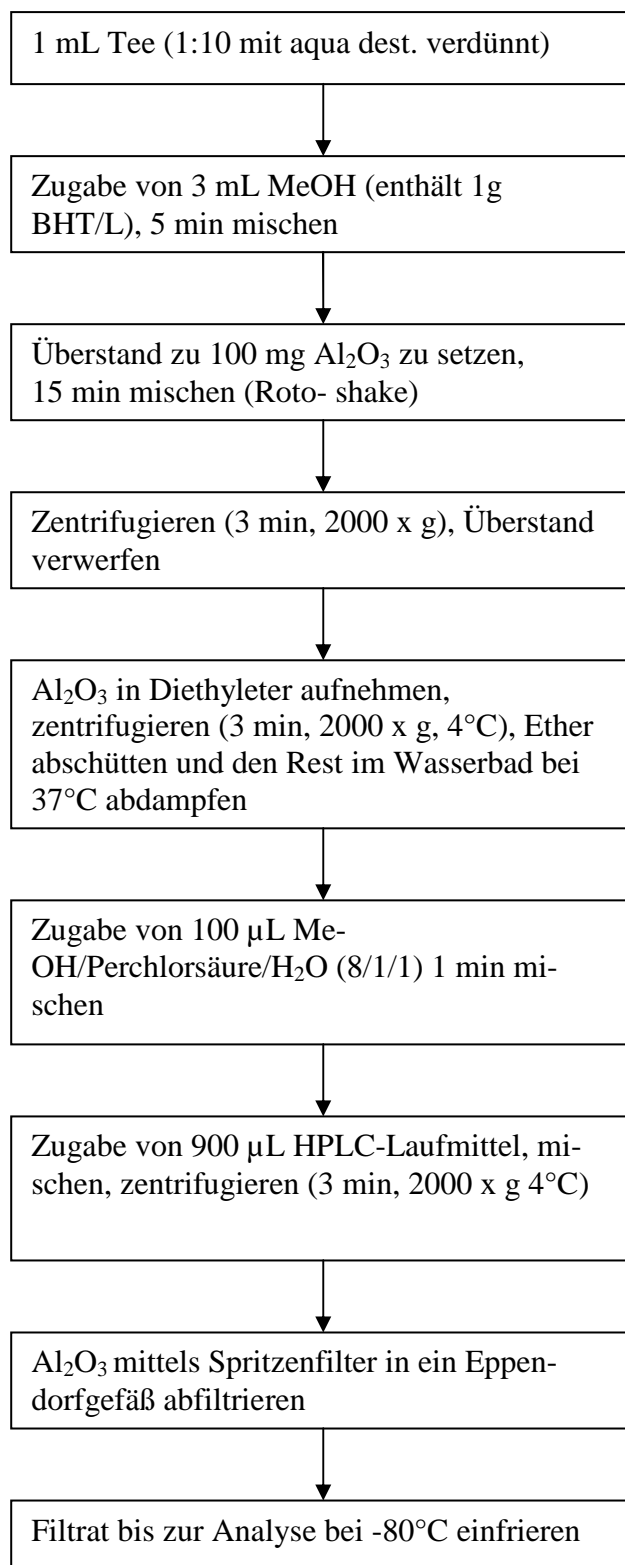
tel aufgefüllt. Die aufbereiteten Proben lagerten bis zur HPLC-Analyse bei -80°C in Eppendorfgefäßen.

- **Tee**

Die Aufarbeitung der Teeproben gelang durch Anwendung einer modifizierten Festphasenextraktion in Anlehnung an Kivits et al. [76] (siehe Ablauf in Abbildung 9).

Entkoffeinierter Tee (3 g) wurde in 150 mL siedendem Wasser 3 Minuten aufgebriht. Anschließend wurde die Teeprobe 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. 1 mL der Teeprobe wurde mit 3 mL Methanol (zum Oxidationsschutz mit 1 g BHT/L versetzt) 5 Minuten gemischt (Roto-Shake). Danach wurden 100 mg Aluminiumoxid (Adsorption der Flavanole) zugesetzt. Nach erneutem Mischen (15 Minuten auf dem Roto-Shake) und Zentrifugieren (3 Minuten, 4°C , $2000 \times g$) wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Aluminiumoxid mit 3 mL Diethylether gewaschen (1 Minute mischen). Der Diethylether wurde nach erneuter Zentrifugation (3 Minuten, 4°C , $2000 \times g$) abpipettiert und der verbleibende Rest im Wasserbad bei 37°C abgedampft. Das Herauslösen der Gesamtcatechine aus dem Aluminiumoxid erfolgte durch Zugabe von 100 μL Methanol/Perchlorsäure/Wassergemisch (8:1:1) und anschließendem 1 minütigem Ausschütteln mit 900 μL Laufmittel. Nach Zentrifugation (3 Minuten, $2000 \times g$, 4°C) wurde das Aluminiumoxid über Spritzenfilter (0,2 μm) vom klaren Überstand getrennt. Die aufbereiteten Proben lagerten bis zur HPLC-Analyse bei -80°C in Eppendorfgefäßen. Der Variationskoeffizient der Flavanole lag zwischen 4,7 und 12,9% (Cat: 12,9%; Epi: 4,7%; EGCG: 10,8% und ECG: 6,7%).

Abbildung 9: Arbeitsschritte zur Flavanolbestimmung im Tee in Anlehnung an [76]

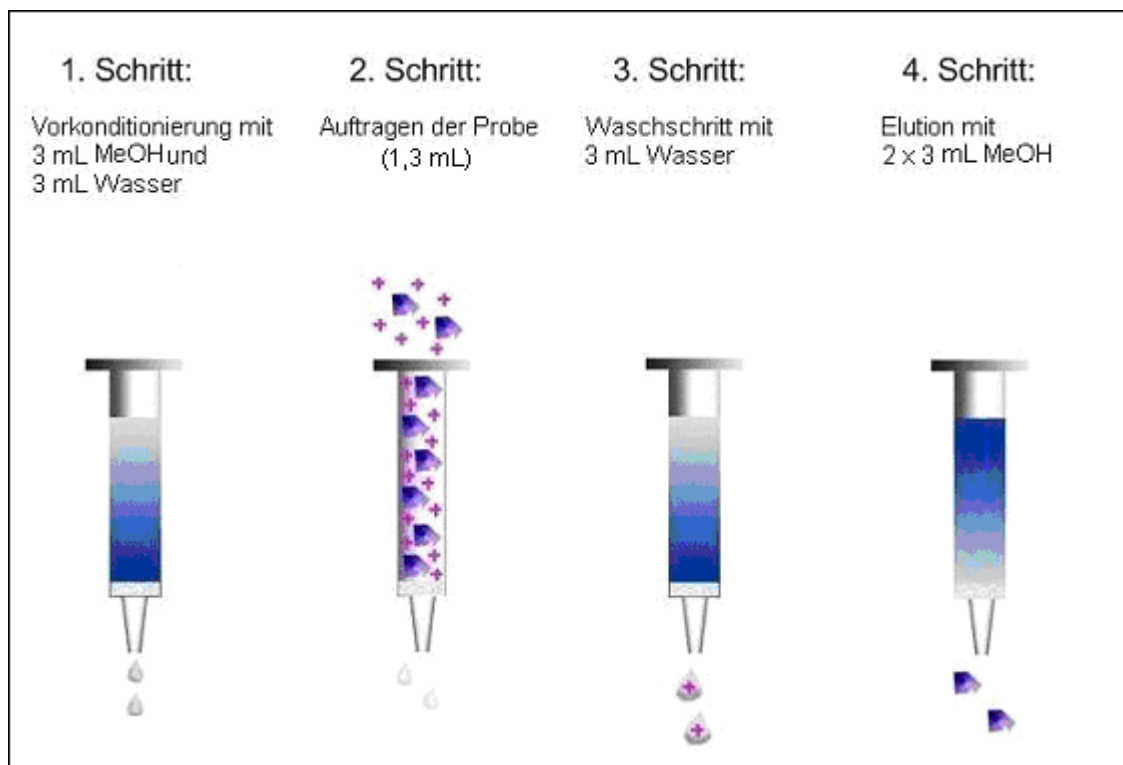


- **Muttermilch**
- **Probenaufbereitung zur Isoflavonbestimmung mittels Festphasenextraktion / Solid-Phase Extraction (SPE)**

Zur Entfernung der abgesetzten Fettschicht wurden die Muttermilchproben 5 Minuten bei 1800 x g zentrifugiert. Der entrahmten Muttermilch (1 mL) wurden 50 µL dialysiertes und verdünntes Enzymgemisch (Glucuronidase (200kU/L) /Sulfatase (5kU/L)) zugegeben. Da das pH-Optimum dieser Enzyme im leicht sauren Bereich liegt (pH 5), ist das Zusetzen von 250 µL Natriumacetatpuffer (pH 4) erforderlich. Die Proben wurden bei 38°C im Wasserbad 1 Stunde zur vollständigen Hydrolyse der glucuronidierten und sulfatierten Isoflavone inkubiert.

Anschließend wurden die Isoflavone in der Muttermilchprobe mittels Festphasenextraktion extrahiert. Verwendet wurden dazu Strata X Kartuschen der Firma Phenomenex (Adsorption der Isoflavone an Styroldivinylbenzolpolymeren) [77].

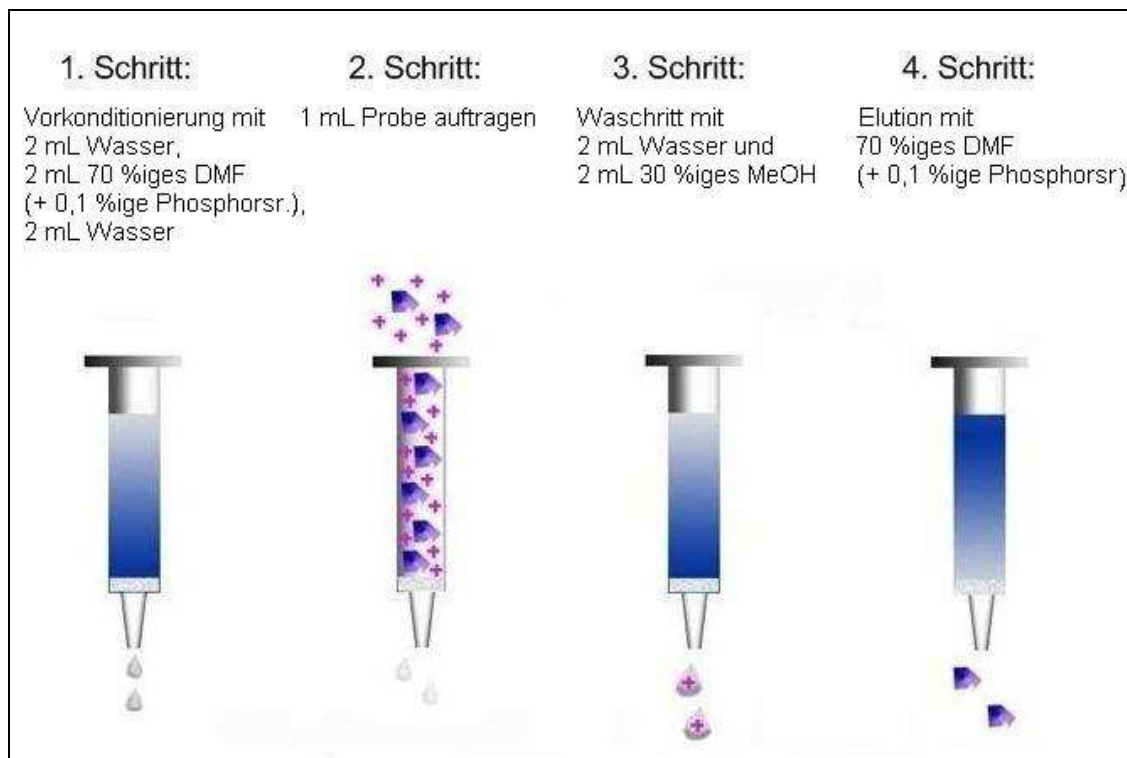
Zunächst wurde die Säule mit 3 mL Methanol und 3 mL Wasser vorkonditioniert. Anschließend erfolgte das Auftragen der mit den Enzymen behandelten Muttermilchprobe (1,3 mL) auf die Kartusche. Nach Durchlaufen der Probe wurde die Festphase der Kartusche mit 3 mL Wasser gereinigt. Die folgende Elution gelang erfolgreich mit zweimaligem Auftragen von 3 mL Methanol (Abb. 10). Anschließend wurde das Eluat im Speed Vac Konzentrator getrocknet und danach mit 1 mL HPLC Laufmittel gelöst. Bis zur HPLC-Analyse wurden die aufgereinigten Proben bei -80°C gelagert.

Abbildung 10: Probenaufbereitung zur Isoflavonbestimmung in der Muttermilch mittels SPE

- **Probenaufbereitung zur Flavanolbestimmung mittels Festphasenextraktion / Solid-Phase Extraction (SPE)**

Die entfettete Milch (1 mL) wurde mit 250 μ L 0.1 M Natrium-Phosphat-Puffer (+ 0.5 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$) (pH 3.5) versetzt, anschließend mit 50 μ L Glucuronidase/Sulfatase-Lösung behandelt und eine Stunde in einem auf 37°C temperierten Wasserbad inkubiert. Die Probe wurde dann mit 10 μ L Ethylgallat (10 μ mol/L) versetzt. Die weitere Aufarbeitung der Muttermilchproben erfolgte mit einer HLB-Festphasenextraktionssäule (Hydrophilic-Lipophilic-Balanced Reversed-Phase) in einer modifizierten Form nach Unno et al. [78]. Die Arbeitsschritte der Festphasenextraktion (SPE) sind in Abbildung 11 dargestellt.

Abbildung 11: Probenaufbereitung zur Flavanolbestimmung in der Muttermilch mittels SPE



3.5.2 Chromatographische Bestimmung der Flavonoide

Die Bestimmung der Flavonoide in den aufgereinigten Testgetränken und den Muttermilchproben erfolgte mittels HPLC und anschließender elektrochemischer Detektion. Die elektrochemische Detektion ist für Stoffe geeignet, die elektroaktive Verbindungen enthalten. Die phenolischen Gruppen der Flavonoide werden an der Oberfläche der Arbeitselektrode, die ein bestimmtes Potential aufweist, oxidiert und erzeugen somit einen messbaren Elektronenfluss. Der entstandene Strom ist direkt proportional zur Flavonoidkonzentration im Analysat. Typische Chromatogramme sind in den Abbildungen 12 und 13 gezeigt.

- **HPLC-Bedingungen der Isoflavone:**

Flussrate: 0,9 mL/min

Injektionsvolumen: 20 µL

Isokratisches Laufmittel: 0.1 m Ammoniumacetatpuffer (pH 4.6)/Methanol/EDTA (50+50+1)

Säule: ProntoSil mit Vorsäule

Detektion: elektrochem. Detektion, 750 mV

Die Konzentrationsberechnung erfolgte durch Vergleich mit einem Isoflavonstandardgemisch (Daidzein und Genistein: jeweils 100 nmol/L, wiederholte Analyse nach acht Muttermilchproben).

- **HPLC-Bedingungen der Flavanole:**

Flussrate: 0,6 mL/min

Injektionsvolumen: 30 µl

Isokratisches Laufmittel: 0.2 M Phosphorsäure/Acetonitril/Tetrahydrofuran (86 + 12.5 + 1.5)

Säule: ODS Hypersil, 250 x 4,6 mm

Detektion: elektrochem. Detektion, 650 mV

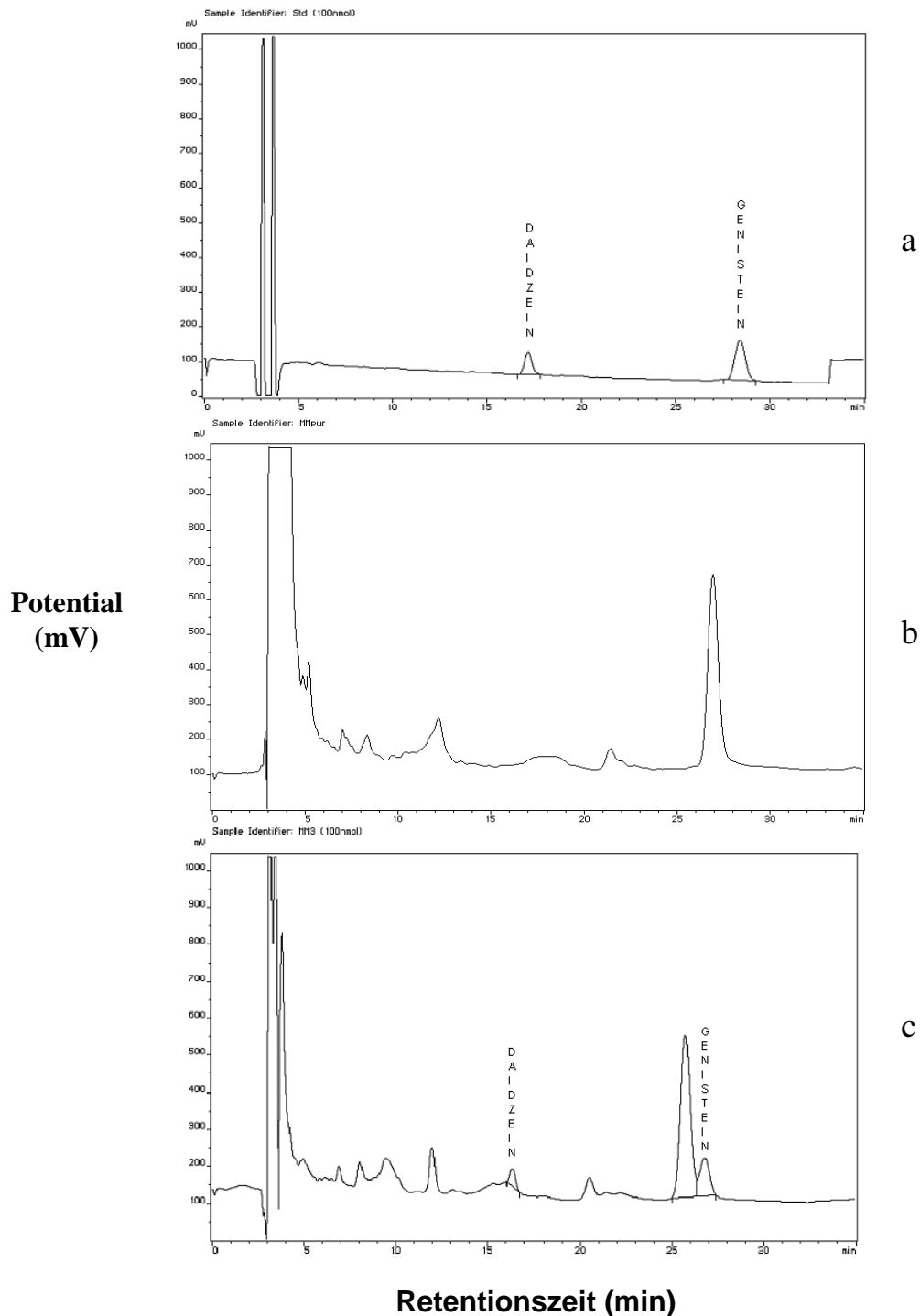
Die Konzentrationsberechnung erfolgte anhand der Analyse eines Flavanolstandardgemisches bestehend aus Catechin (Cat), Epicatechin (Epi), Epigallocatechingallat (EGCG) und Epicatechingallat (ECG) mit einer Konzentration von jeweils 80 nmol/L. Vor jeder Analysereihe wurde das für die entsprechende Probenaufbereitungsreihe frisch angesetzte Ethylgallat (ETG) als internen Standard zugesetzt (100 nmol/L), sodass eine Korrektur durch Verluste während der Probenaufbereitung durch den Bezug auf den internen Standard möglich war. Jeweils nach einer Serie von 8 Proben (= 1 Probandin) wurde eine Standardlösung (80 nmol/L) analysiert. Die Berechnung der Flavanolkonzentration in der Probe erfolgte anhand der integrierten Peakflächen der einzelnen Flavanole mit folgender Formel:

$$C_{\text{Flavanol Probe}} \text{ (nmol/L)} = \frac{P_{\text{Flavanol Probe}} \cdot P_{\text{ETG Standard}} \cdot C_{\text{ETG Probe}}}{P_{\text{Flavanol Standard}} \cdot P_{\text{ETG Probe}} \cdot C_{\text{ETG Standard}}} \cdot C_{\text{Flavanol Standard}} \cdot V$$

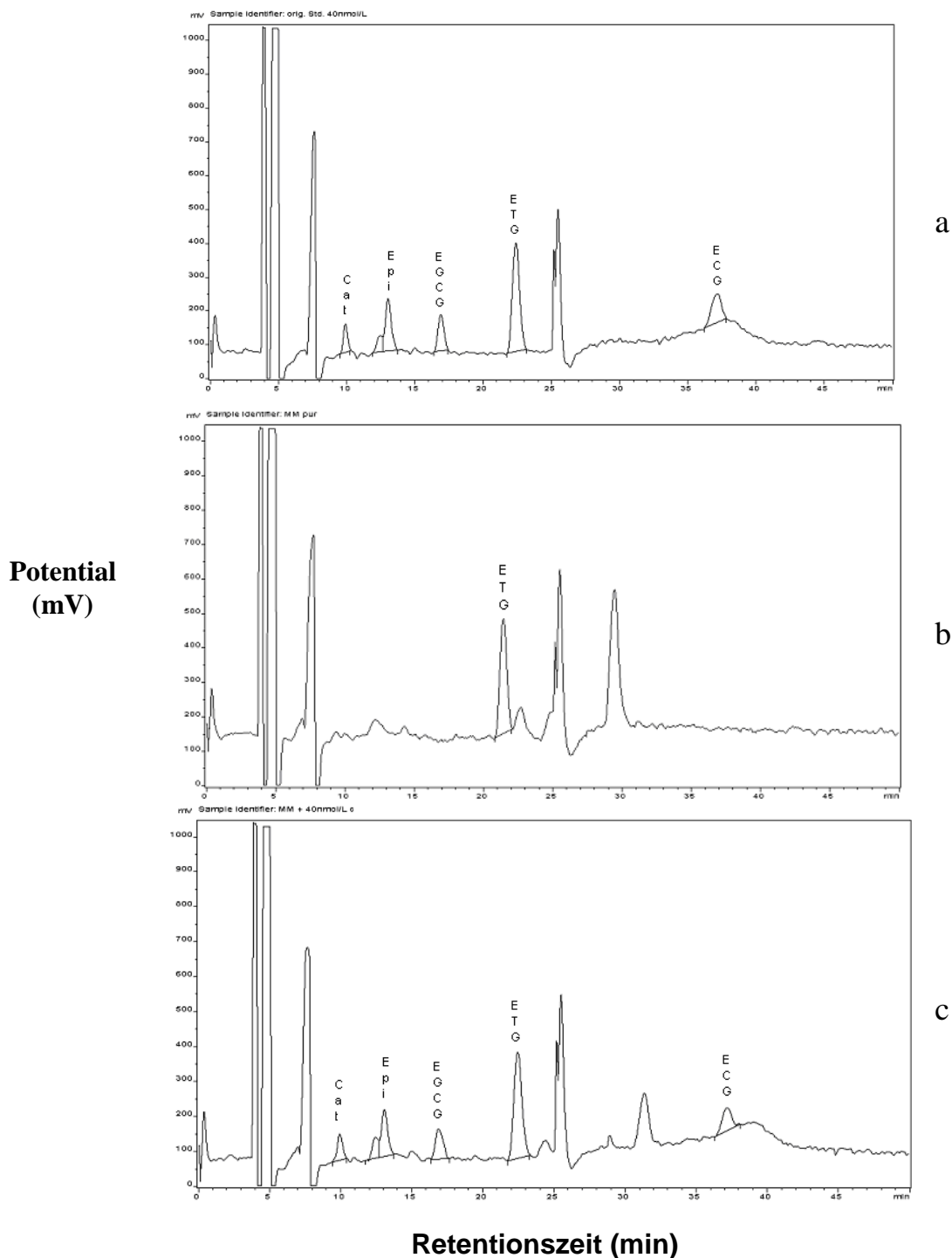
P: Peakfläche

C: Konzentration

V: Verdünnung

Abbildung 12: Typische Chromatogramme der HPLC-Analytik zur Isoflavonbestimmung

HPLC- Chromatogramme einer Isoflavon-Standardlösung (100 nmol/L) (a), einer aufbereiteten Muttermilchprobe (b) und einer aufbereiteten, mit Isoflavon-Standard (100 nmol/L) versetzten Muttermilchprobe (c) (elektrochemische Detektion: 750 mV; Laufmittel: 0.1 m Ammoniumacetatpuffer (pH 4.6)/Methanol/EDTA (50+50+1), Flussrate: 0,9 mL/min; Injektionsvolumen: 20 μ L)

Abbildung 13: Typische Chromatogramme der HPLC-Analytik zur Flavanolbestimmung

HPLC- Chromatogramme einer Flavanol-Standardlösung (40 nmol/L) mit dem internen Standard versetzt (a), einer aufbereiteten Muttermilchprobe mit dem internen Standard versetzt (b) und einer aufbereiteten mit Isoflavon-Standard (100 nmol/L) und dem internen Standard versetzten Muttermilchprobe (c) (elektrochemische Detektion: 650 mV; Laufmittel: 0.2 M Phosphorsäure/Acetonitril/Tetrahydrofuran (86 + 12.5 + 1.5, Flussrate: 0,6 mL/min; Injektionsvolumen: 30 μ L)

3.5.3 Methodvalidierung

- **Validierung der SPE-Aufbereitungsmethoden**

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der SPE-Aufbereitungsmethoden wurden drei Muttermilchproben mit einer Flavonoid-Standardlösung (40 nmol/L bzw. 25 nmol/L) versetzt und unter den in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Methoden aufbereitet.

Die Wiederfindungen der Flavonoide in der Muttermilchprobe wurden nach SPE-Aufbereitung ermittelt.

- **Validierung der RP-HPLC zur Quantifizierung der Flavonoide**

Zur Bestimmung der Linearität der HPLC-Methoden für Catechin, Epicatechin, Epicatechingallat, Epigallocatechingallat, Epicatechingallat sowie die Linearität für die Isoflavone Daidzein und Genistein wurden von den Standardlösungen der Flavonoide verschiedene Verdünnungen hergestellt. Jede Verdünnungsstufe wurde unter den in Kapitel 3.5.3 angegebenen Chromatographiebedingungen doppelt analysiert. Als Maß für die Güte der linearen Approximation wurde der Korrelationskoeffizient bestimmt.

Die Reproduzierbarkeit der HPLC-Methode für die Flavonoide, ausgedrückt als Standardabweichung und Variationskoeffizient, erfolgte anhand der Analyse von 10 neu pipettierten Standardlösungen.

3.6 Glutathion

Glutathion schützt Sulfhydrylgruppen in Proteinen vor Oxidation und regeneriert das Tocopheryl-Radikal. Zur Stabilisierung von Glutathion während der Aufarbeitung werden die oxidationsempfindlichen Thiole mit Tri-n-Butylphosphin reduziert und stabilisiert. Gleichzeitig werden proteingebundene Thiolverbindungen gelöst. Die Proteine werden mit Sulfosalicylsäure (SSA) gefällt, die N-2-Mercaptopropionylglycin (MPG) als internen Standard enthält.

Die reduzierten Thiole wurden mit Ammonium-7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonat (SBD-F), einem Reagenz, das spezifisch mit Thiolgruppen reagiert, zu stabilen Derivaten mit fluoreszierenden Eigenschaften umgesetzt.

Probenderivatisierung: 150 µL Probe (Muttermilch und Sojagetränk) wurden mit 15 µL Butylphosphin versetzt und anschließend 30 Minuten bei 4°C inkubiert. 15 µL 30%ige SSA + EDTA (5,5 mM) + MPG (25 µM) wurden dazupipettiert, gemischt und danach bei 1500 x g bei 4°C 20 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µL Überstand abpipettiert und mit 200 µL Boratpuffer (2,5 M, pH 9,5 + 4 mM EDTA) und 100 µL SBD-F Lösung versetzt. Nach einer 60 minütigen Inkubation bei 56°C wurde die Probe auf 4°C abgekühlt und analysiert mittels RP-HPLC.

Die Trennung erfolgte mittels HPLC auf einer RP-18-Säule. Die Detektion erfolgte fluorimetrisch, die Konzentrationen wurden durch Vergleich mit einem Standardgemisch und MPG als internem Standard ermittelt. Der Variationskoeffizient dieser Methode beträgt 1,1% [79].

HPLC-Bedingungen:

Flussrate: 0,9 mL/min

Injektionsvolumen: 20µL

Eluent A: 4% Methanol in 0,1 M Phosphatpuffer pH 6 gelöst

Eluent B: Wasser, Methanol (1+1)

Säule: PerfectBond, 150 x 4,6 mm

Gradient: 0', 100% A, 0% B; 6', 100% A, 0% B; 9', 0% A, 0% B; 10', 0% A, 0% B; 15', 0% A, 100% B; 20', 0% A, 100% B; 25', 100% A, 0% B; 32', 100% A, 0% B; 40', 100% A, 0% B; 41', 100% A, 0% B; 42', 100% A, 0% B; 45', 0% A, 100% B

Detektion: Fluoreszenzdetektion, Ex. 385 nm; Em. 515 nm

3.7 Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

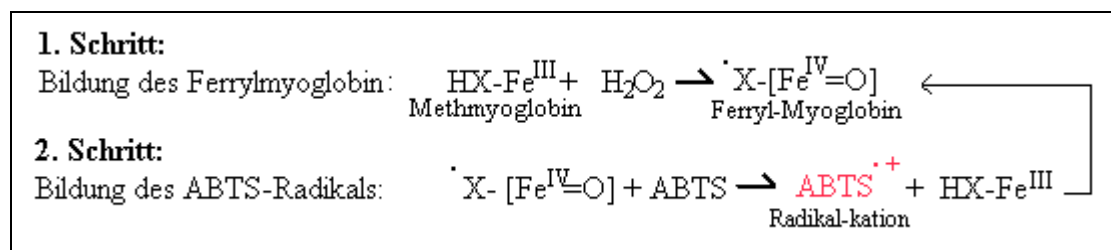
Zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in den Testgetränken und in der Muttermilch wurde ein sogenannter Trolox equivalent antioxidant capacity – Test (TEAC) nach Miller et al [80] durchgeführt.

Das Prinzip dieses Tests basiert darauf, dass das Peroxidase-Substrat ABTS (2,2'-Azinobis-[3-ethylbenzothiazolin-6-sulphonsäure]) mit Metmyoglobin inkubiert wird. Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oxidiert das Metmyoglobin zu einem Ferrylmyoglobin-Radikal. Ferrylmyoglobin gibt sein Radikal an das ABTS-Molekül ab (siehe Abbildung 14).

Die im Medium enthaltenen Antioxidantien dienen als Wasserstoffdonatoren und unterdrücken dadurch die Bildung des ABTS-Radikals. Das Ausmaß dieser Hemmung wurde dann mit der Inhibition durch die Standard-Substanz 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure (Trolox), einer wasserlöslichen synthetischen Form von Vitamin E, verglichen.

Das blaugüne ABTS-Radikal wurde anhand der Absorption bei 743 nm gemessen. In Gegenwart von antioxidativen Substanzen wurde die Farbreaktion proportional zur Konzentration verzögert, da die Bildung des ABTS-Radikals (Radikal-kation) durch die Antioxidantien gehemmt wurde. Der Variationskoeffizient betrug 2,85%.

Abbildung 14: Bildung des ABTS-Radikals



Probenaufbereitung Muttermilch- und Sojagetränk-Proben wurden jeweils im Verhältnis 1:1 mit Hexan (v/v) gemischt und anschließend 1 Stunde auf den Roto-Shake gelegt. Dann wurden die Proben 10 Minuten lang bei 1800 x g zentrifugiert, sodass zwei Phasen vorlagen, eine organische und eine wässrige Phase. Beide Phasen wurden getrennt abpipetiert (jeweils 200 µL), im Speed-Vac-Konzentrator getrocknet und der Rückstand in jeweils 200 µL PBS (5 mM, pH 7,4) aufgenommen.

men. Die antioxidative Kapazität in beiden Phasen wurde gemessen [81]. Die Messung im verdünnten Tee (1:10) erfolgte ohne vorherige Aufbereitung.

Zur Messung wurden folgende Volumen an Reaktionslösungen und Probe in Halbmikroküvetten pipettiert: 8,4 µL Probe, 506 µL PBS, 36 µL Metmyoglobin (70 µmol/L) und 300 µL ABTS (500 µmol/L) wurden gemischt und 15 Minuten im Photometer bei 30°C inkubiert. Durch Zugabe von 150 µL H₂O₂ – Arbeitslösung wurde die Reaktion gestartet.

Berechnung: Um das Ausmaß der Reduktion des ABTS-Radikals zu bestimmen, wurde die Absorption der Probe (Testgetränk/Muttermilch) nach 3 Minuten Inkubation bei 30°C mit einer Wellenlänge von 734 nm gemessen und mit der Absorption des Leerwerts entsprechend folgender Formel

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Abs. Leerwert} - \text{Abs. Probe})}{\text{Abs. Leerwert}} * 100$$

verglichen. Dadurch erhielt man die prozentuale Inhibition der Reaktion, die proportional zur antioxidativen Kapazität ist [82]. Die antioxidative Kapazität der Probe wurde anhand der Trolox-Standardgeraden (0 – 2,5 mmol/L) berechnet und in Troloxäquivalenten angegeben.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Programmes SPSS, Version 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) auf der Basis von parametrischen und nichtparametrischen Testverfahren. Die Untersuchung auf Normalverteilung wurde mittels Kolmogorov Smirnov Test durchgeführt. Die Unterschiede vor, während und nach der Intervention wurden mit dem gepaarten t-Test und des Wilcoxon Tests überprüft. Mit Hilfe der ANOVA und des Mann-Whitney-U-Tests konnten Unterschiede zwischen den Gruppen untersucht werden. Allen statistischen Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt.

Soweit nicht anders angegeben, wurden in Text, Tabellen und Darstellungen das arithmetische Mittel (MW) und Standardabweichungen (SD) sowie das Minimum (Min) und Maximum (Max) angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Charakteristik der Probandinnen

Insgesamt haben 44 Stillende an der Studie teilgenommen, die in drei Gruppen randomisiert wurden. Acht Probandinnen gehörten zur Wasser-Gruppe (Kontrollgruppe), 18 zur Sojadrink-Gruppe (Gruppe 1) und 18 zur Tee-Gruppe (Gruppe 2). In Tabelle 4 sind die anthropometrischen Merkmale des Probandenkollektivs aufgeführt.

Tabelle 4: Anthropometrische Daten der Probandinnen

		Kontrolle (n=8)	Gruppe 1 (Soja) (n=18)	Gruppe 2 (Tee) (n=18)
Alter (Jahre)	MW ± SD	29 ± 2	31 ± 7	31 ± 4
	Min / Max	26 / 31	20 / 43	25 / 40
Gewicht (kg)	MW ± SD	74 ± 8	68 ± 10	70 ± 10
	Min / Max	61 / 86	53 / 85	53 / 90
Größe (cm)	MW ± SD	169 ± 7	170 ± 5	168 ± 8
	Min / Max	156 / 175	162 / 180	150 / 180
BMI (kg/m ²)	MW ± SD	26 ± 2	24 ± 4	25 ± 3
	Min / Max	23 / 28	19 / 30	20 / 30

Die Gruppen waren hinsichtlich Alter, Gewicht, Größe und BMI vergleichbar (t-test).

4.2 Nutritive Aufnahme von Antioxidantien und Flavonoiden

In den Tabellen 5 und 6 sind die täglichen durchschnittlichen Energieaufnahmen und die Aufnahmen an ausgewählten Antioxidantien zusammengestellt. Die durchschnittlichen nutritiven Aufnahmen an Energie-, Antioxidantien- und Flavonoidenzufuhr unterschieden sich in den drei Gruppen nicht.

Tabelle 5: Tägliche nutritive Energie- und Antioxidantienaufnahme während der Intervention (MW \pm SD) (Berechnung ohne Testgetränke)

	Kontrolle (n=8)	Gruppe 1 (Soja) (n=18)	Gruppe 2 (Tee) (n=18)	Gesamt (n=44)
Energie (kcal)	2411 \pm 913	2117 \pm 706	2346 \pm 516	2264 \pm 673
Vitamin C (mg)	102 \pm 78	143 \pm 85	164 \pm 114	145 \pm 98
Vitamin E (mg)	12 \pm 9	12 \pm 5	13 \pm 5	12 \pm 6
Zink (mg)	12 \pm 3	12 \pm 3	13 \pm 5	12 \pm 4

Tabelle 6: Tägliche nutritive Flavonoidaufnahme während der Intervention (MW \pm SD) (Berechnung ohne Testgetränke)

	Kontrolle (n=8)	Gruppe 1 (Soja) (n=18)	Gruppe 2 (Tee) (n=18)	Gesamt (n=44)
GE (μ g)	81 \pm 50	122 \pm 123	140 \pm 132	125 \pm 118
DA (μ g)	130 \pm 95	142 \pm 230	93 \pm 270	119 \pm 157
Cat (mg)	4,1 \pm 4,5	4,2 \pm 3,9	15,8 \pm 10,2	9 \pm 23
Epi (mg)	4,2 \pm 3,5	4,9 \pm 4,9	8,0 \pm 7,5	6 \pm 6
EGCG (mg)	4,9 \pm 9,9	1,8 \pm 4,1	7,7 \pm 4,2	5 \pm 13
ECG (mg)	2,9 \pm 6,3	0,6 \pm 2,6	2,1 \pm 2,0	2 \pm 5

4.3 Validierung von HPLC-Analytik und Probenaufbereitung

4.3.1 Validierung der HPLC-Methode

Die Flavonoide konnten mittels RP-HPLC mit anschließender elektrochemischer Detektion erfasst und quantifiziert werden. Die genauen Beschreibungen der chromatographischen Bedingungen sind in Kapitel 3.5.3 aufgeführt. Die Standard-Variationskoeffizienten für Daidzein und Genistein betragen 4,2 und 3,3%. Die Variationskoeffizienten für Flavanole betragen 4,7-8% (Cat: 6,9%, Epi: 5,3%, EGCG: 8% und ECG: 4,7%). Wie in den Abbildungen 15 und 16 ersichtlich, zeigte die Analysenmethode mittels HPLC im Konzentrationsbereich zwischen 6,25 und 100 Isoflavonstandardgemisch/L und im Bereich von 5 und 80 nmol Flavanolstandardgemisch/L hervorragende Linearität (hohe Bestimmtheitsmaße von $R^2 > 0,99$). Das Detektionslimit der Methode lag für die **Isoflavone** bei 6,25 nmol/L (DA) und 2,5 nmol/L (GE) und das der **Flavanole** bei 2,5 (Cat und Epi) und 5 nmol/L (EGCG und ECG) bei einem Signal/Rausch - Verhältnis von 2:1.

Abbildung 15: Korrelation zwischen Peakfläche (mV) und Konzentration von Genistein (GE) und Daidzein (DA) (Doppelbestimmung)

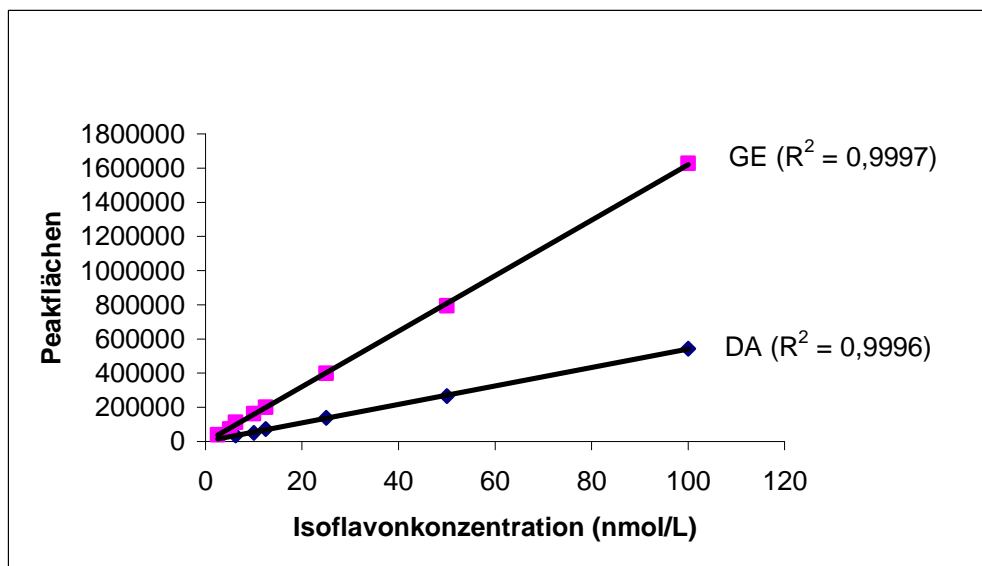
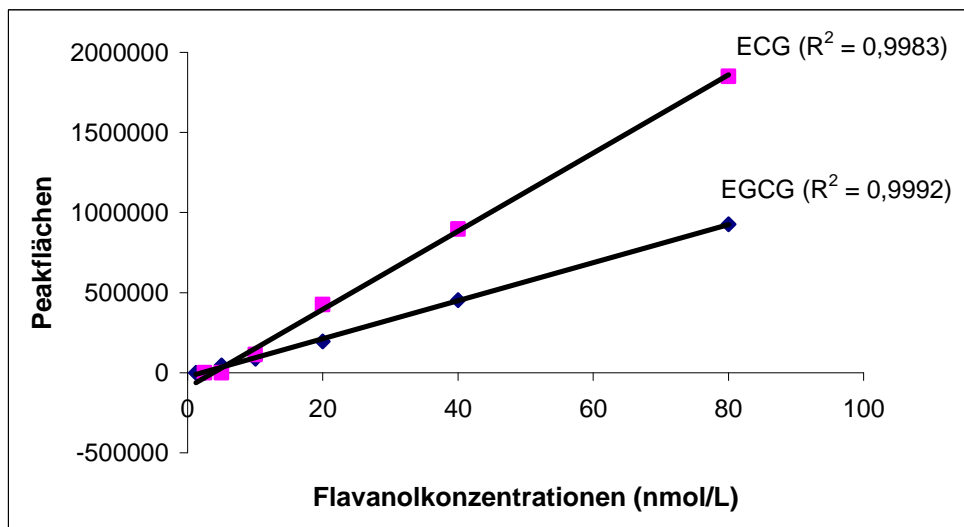
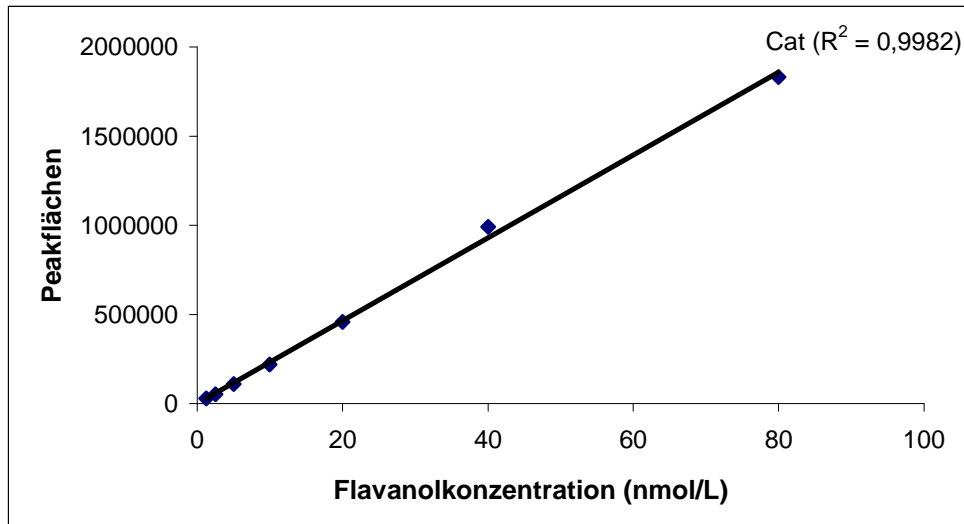
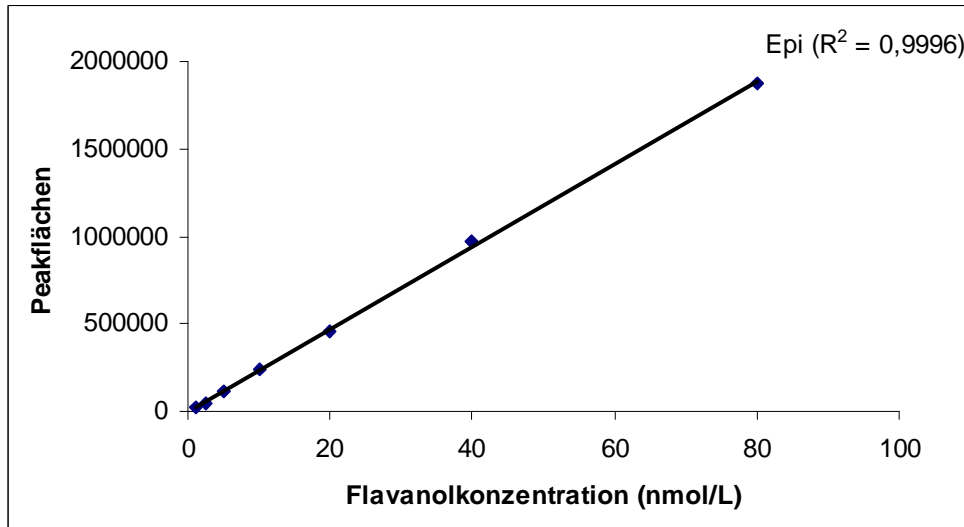


Abbildung 16: Korrelation zwischen Peakfläche (mV) und Konzentration von Epicatechin (Epi), Catechin (Cat), Epicatechingallat (ECG) und Epigallocatechingallat (EGCG) (Doppelbestimmung)



4.3.2 Validierung der SPE

Die Reproduzierbarkeit der beiden eingesetzten SPE-Methoden (Flavanolbestimmung mit waters Kartuschen; Isoflavonbestimmung mit Strata X Kartuschen) wurde durch die Aufbereitung und nachfolgende Analyse von jeweils drei entweder mit Isoflavonen (100 nmol/L) oder Flavanolen (40 nmol/L) versetzten Muttermilchproben bewertet. Der Variationskoeffizient (VK) der Isoflavone lag bei 3,8 (Daidzein) und 5% (Genistein) und der der Flavanole zwischen 4,6 und 11,7% (Cat: 11,7%; Epi: 7,7%; EGCG: 4,6% und ECG: 8,4%).

Die Wiederfindungen (WF) der Flavonoide nach Aufbereitung der Muttermilchproben wurden sowohl im hohen Bereich (100 nmol Isoflavonstandardgemisch/L, 40 nmol Flavanolstandardgemisch/L) als auch im niedrigen (25 nmol Isoflavonstandardgemisch/L, 10 nmol Flavanolstandardgemisch/L) berechnet. In Tabelle 7 sind die durchschnittlichen Wiederfindungen nach jeweils dreimaliger Aufbereitung dargestellt.

Tabelle 7: Wiederfindungen (%) der Flavonoide nach entsprechender Probenaufbereitung (n=3)

(n = 3)	Cat	Epi	EGCG	ECG
WF im hohen Bereich	102,3 ± 4,8	101,3 ± 3,1	107,5 ± 1,9	79,6 ± 2,7
WF im niedrigen Bereich	100,7 ± 1,3	106,7 ± 1,5	78,1 ± 0,3	76,6 ± 1,2

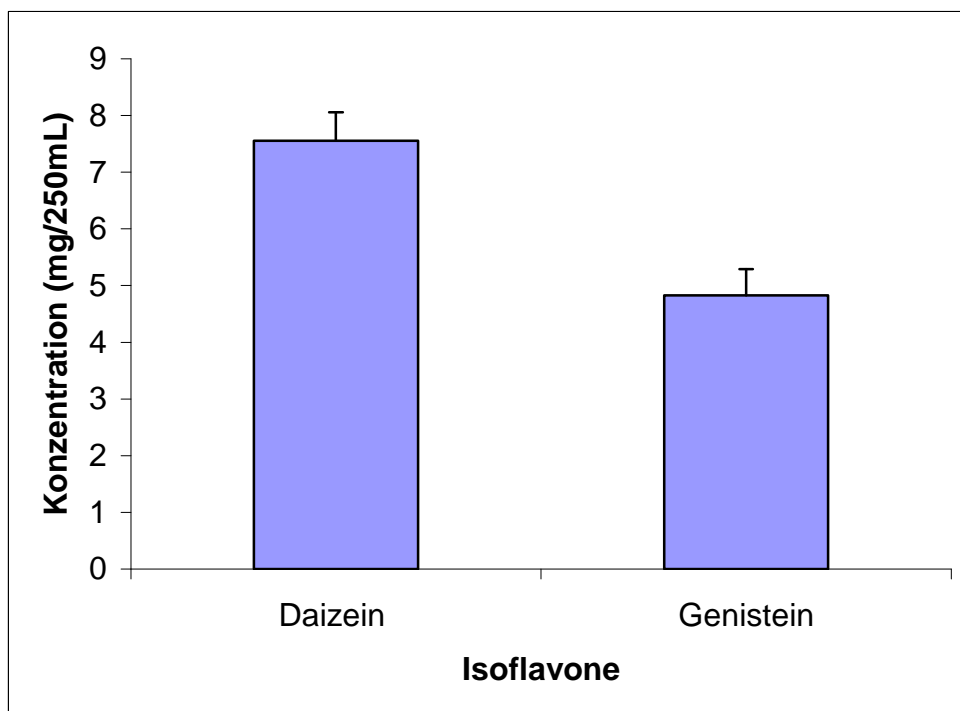
(n = 3)	DA	GE
WF im hohen Bereich	97,2 ± 3,7	107,7 ± 5,4
WF im niedrigen Bereich	104,4 ± 1,9	96,4 ± 0,6

4.4 Flavonoidgehalte und antioxidative Kapazität in den Testgetränken

- **Flavonoidgehalt**

Die Isoflavonkonzentrationen im verwendeten Sojagetränk wurden in zwei 250 mL Tetra Pak-Portionen aus einer Charge bestimmt. Jeweils drei Aliquote (à 1 mL) einer Packung wurden extrahiert, doppelt aufbereitet und analysiert. Die mittlere Daidzein-Konzentration lag bei $7,6 \pm 0,5$ und die des Genisteins bei $4,8 \pm 0,5$ mg/250 mL Testgetränk (Abbildung 17). Mit dem Sojagetränk nahmen die Stillenden somit täglich 12,4 mg Isoflavone bei 100%iger Compliance auf. Die tägliche mittlere Isoflavonaufnahme der Sojagruppe lag bei 12,7 mg Isoflavone (+ 0,3 mg Isoflavone mit der Ernährung).

Abbildung 17: Durchschnittliche Isoflavonkonzentration des Sojagetränkes (n=6)



Die Flavanolgehalte (Cat, Epi, ECG und EGCG) im Teegetränk wurden in fünf verschiedenen Teeaufgüssen (3 g/150 mL, 3 min.) gemessen. In Tabelle 8 sind die mittleren Gehalte der Flavanole im Tee angegeben. Die tägliche Flavanolzufuhr (300 mL Tee/Tag) lag bei etwa 67 mg; unter Berücksichtigung der Ernährung nahmen die Stillenden durchschnittlich 99 mg Flavanole am Tag auf.

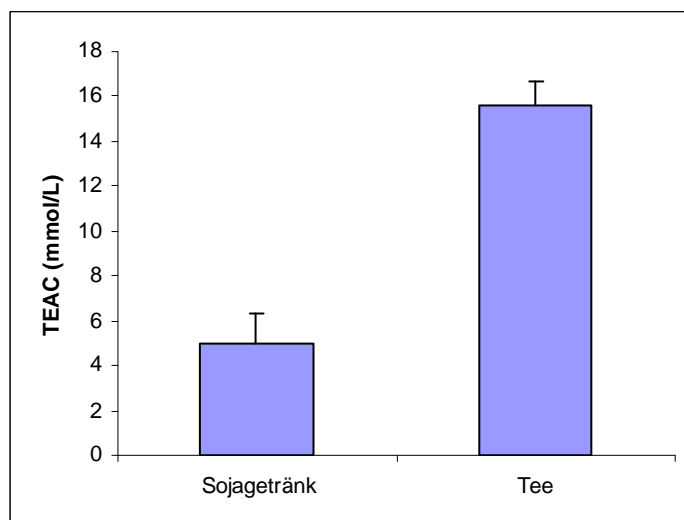
Tabelle 8: Durchschnittliche Flavanolgehalte im Tee (n=5)

<i>mg/L</i>	<i>MW</i>	<i>± SD</i>	<i>mg/300 mL</i>	<i>MW</i>	<i>± SD</i>
Cat	2,9	0,3	Cat	0,9	0,1
Epi	20,9	0,9	Epi	6,3	0,3
ECG	67,4	4,5	ECG	20,2	1,4
EGCG	131,8	14,2	EGCG	39,6	4,3

- **Antioxidative Kapazität**

Jeweils zwei Aliquote aus fünf Teeaufgüssen und zwei Aliquote aus zwei Sojage-tränckpackungen wurden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität verwendet. Im Tee konnte ein TEAC Wert von 15,6 mmol/L \pm 1,06 und im Sojage-tränk ein Wert von 5 mmol/L \pm 1,3 nachgewiesen werden. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

Abbildung 18: Antioxidative Kapazität in den Testgetränken (n=10)



4.5 Flavonoidgehalt in der Muttermilch

4.5.1 Intervention mit dem Sojagetränk

Vor der Intervention lag der Isoflavon-Gehalt in der Muttermilch bei allen Probandinnen unter dem Detektionslimit (Daidzein: 6,25 nmol/L, Genistein: 2,5 nmol/L). Nach Konsum des Sojagetränkes konnten in insgesamt 17 [von insgesamt 54 (3 Abnahmetage x 18)] Milchproben keine Isoflavone oberhalb des Detektionslimits gemessen werden. Für die statistische Berechnung wurde in diesen Fällen der Daidzein- und Genisteingehalt auf einen Wert festgelegt, der 10% unterhalb des entsprechenden Detektionslimits lag (Daidzein: 5,6 nmol/L und Genistein: 2,3 nmol/L).

- **Veränderungen der Isoflavonkonzentrationen nach Intervention**

Die **Gesamt-Isoflavonkonzentration** in der Muttermilch veränderte sich in der Sojagruppe signifikant (Tab.9). Im Vergleich zu den Ausgangswerten (t_1) sind die Konzentrationen nach 3 bzw. 6 Interventionstagen ($t_{4, 7}$) ($p < 0,005$) sowie am ersten Tag nach der Intervention (t_8) signifikant höher ($p = 0,03$).

Auch **Genistein** steigt im Vergleich zum Ausgangswert signifikant an (t_4 zu t_1 : $p = 0,001$; t_7 zu t_1 : $p = 0,006$; t_8 zu t_1 : $p = 0,04$; t_8 zu t_4 : $p = 0,013$). Die Konzentrationen von **Daidzein** sind dagegen nur während der Intervention ($t_{4, 7}$) signifikant zum Ausgangswert (t_1) angestiegen ($p = 0,001$ bzw. $p = 0,05$). Die Daidzein- und Genisteinkonzentrationen sind an allen Abnahmetagen hochsignifikant verschieden (t_4 : $p = 0,001$; t_7 : $p = 0,003$; t_8 : $p = 0,001$). Die Ergebnisse sind zusätzlich graphisch dargestellt.

Tabelle 9: Isoflavonkonzentrationen in der Muttermilch (nmol/L); Durchschnittswerte (Minimum- und Maximalwerte)

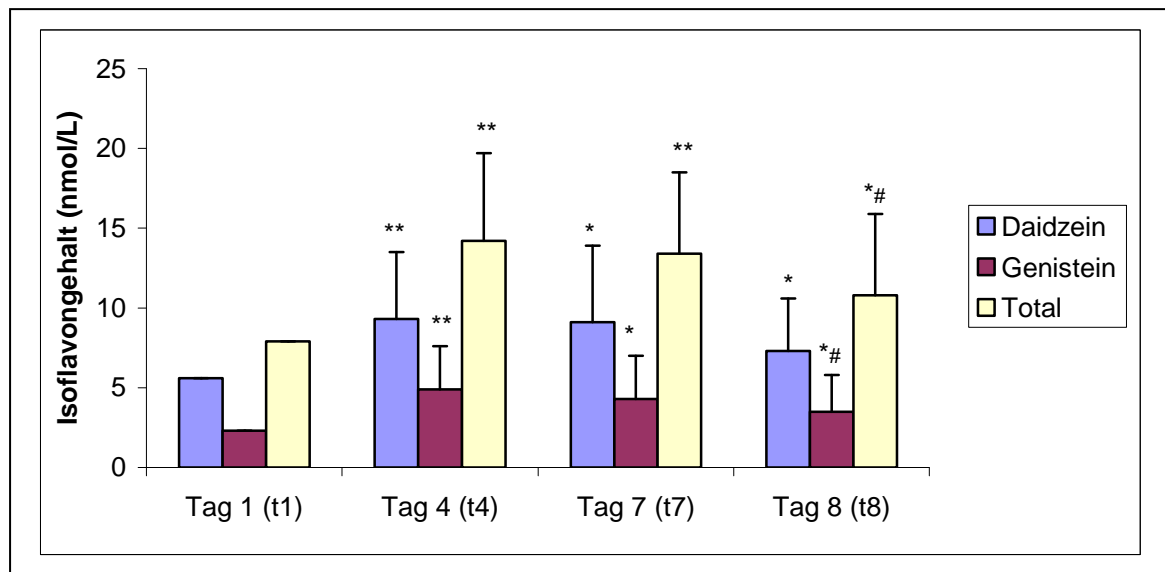
	<i>Kontrolle</i> (<i>n</i> = 8)	<i>Gruppe 1</i> (<i>Soja</i>) (<i>n</i> = 18)
t ₁	Daidzein	< DL
	Genistein	< DL
	Total	< DL
t ₄	Daidzein	9,3 ± 4,2 ^{**} (5,6 – 19,4)
	Genistein	4,9 ± 2,7 ^{**} (2,3 – 12,6)
	Total	14,2 ± 5,5 ^{**} (7,9 – 25,6)
t ₇	Daidzein	9,1 ± 4,8 [*] (5,6 – 20,6)
	Genistein	4,3 ± 2,7 [*] (2,3 – 11)
	Total	13,4 ± 5,1 ^{**} (7,9 – 22,9)
t ₈	Daidzein	7,3 ± 3,3 [*] (5,6 – 15,3)
	Genistein	3,5 ± 2,3 ^{*#} (2,3 – 10,8)
	Total	10,8 ± 5,1 ^{*#} (7,9 – 23,1)

< DL = Werte unterhalb des Detektionslimits (Daidzein: 6,25 nmol/L, Genistein: 2,5 nmol/L); für die statistische Auswertung wurde mit 5,6 nmol Daidzein/L und 2,3 nmol Genistein/L und 7,9 nmol Gesamt-Isoflavone/L gerechnet

^{**} hochsignifikante (p<0,005) bzw. ^{*} signifikante (p<0,05) Veränderung zu t₁

[#] signifikante Veränderungen zu t₄

Abbildung 19: Daidzein- und Genisteinkonzentration in der Muttermilch der Sojagruppe (n=18)



** hochsignifikante ($p < 0,005$) bzw. * signifikante ($p < 0,05$) Veränderung zu t_1
 # signifikante ($p < 0,05$) Veränderungen zu t_4

4.5.2 Intervention mit entkoffeiniertem Schwarztee

Weder in der Kontrollgruppe noch in der Interventionsgruppe waren Flavanole in der Muttermilch nachweisbar. Da Ethylgallat als interner Standard mitgeführt und in den Muttermilchproben nach entsprechender Aufbereitung sehr gut wiedergefunden wurde, sind Verluste durch die Aufbereitung auszuschließen. Trotz der Etablierung einer sehr sensitiven Methode mit einem geringen Detektionslimit von 2,5 (Cat und Epi) und 5 nmol/L (EGCG und ECG) waren Flavanole in der Milch nicht nachweisbar.

4.6 Glutathion

Während der Intervention traten keine signifikanten Veränderungen im Glutathiongehalt der Muttermilch auf (Tabelle 10). Die Glutathionkonzentrationen in der Muttermilch der beiden Interventionsgruppen waren mit denen der Kontrollgruppe an jedem Abnahmetermin vergleichbar.

Tabelle 10: Durchschnittliche Glutathionkonzentration ($\mu\text{mol/L}$) in der Muttermilch

	t ₁	t ₄	t ₇	t ₈
Kontrolle (n = 8)	2,4 ± 1,1	2,4 ± 1,4	1,9 ± 1,4	2,1 ± 0,8
Gruppe 1 (Soja) (n = 18)	2,4 ± 1,4	2,2 ± 1,2	2,2 ± 1,1	2,0 ± 0,7
Gruppe 2 (Tee) (n = 18)	1,9 ± 0,9	2,0 ± 1,1	1,9 ± 0,8	2,0 ± 0,7
Gesamt (n = 44)	2,2 ± 1,2	2,1 ± 1,2	2,0 ± 1,0	2,0 ± 0,7

4.7 Antioxidative Kapazität in der Muttermilch

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den beiden Interventionsgruppen ist die antioxidative Kapazität in der wässrigen Phase signifikant höher als in der lipophilen Phase ($p < 0,001$). Die Werte jedes Abnahmetermins sind mit den Ergebnissen der jeweiligen anderen Gruppe vergleichbar. Es gibt keine signifikanten Unterschiede im Gruppenvergleich (siehe Abbildung 20).

Während der Intervention ändert sich das antioxidative Potential in der Kontroll- und in beiden Interventionsgruppen nicht (Tabelle 11).

Abbildung 20: Antioxidative Kapazität in der lipophilen und wässrigen Phase der Muttermilch (MW \pm SD)

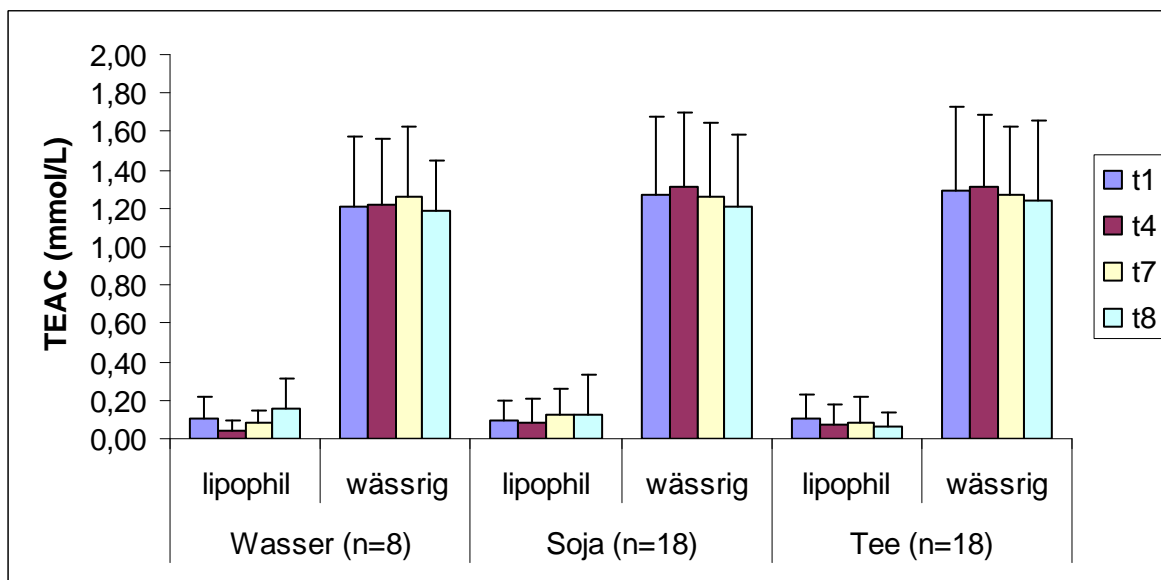


Tabelle 11: Antioxidative Kapazität (mmol/L) in der Muttermilch

		<i>Kontrolle</i> (<i>n</i> = 8)	<i>Gruppe 1</i> (<i>Soja</i>) (<i>n</i> = 18)	<i>Gruppe 2</i> (<i>Tee</i>) (<i>n</i> = 18)
t ₁	lipophil	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
	wässrig	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,3 ± 0,4
	Total	1,3 ± 0,4	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,5
t ₄	lipophil	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
	wässrig	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,3 ± 0,4
	Total	1,3 ± 0,3	1,4 ± 0,4	1,4 ± 0,4
t ₇	lipophil	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1
	wässrig	1,3 ± 0,4	1,3 ± 0,4	1,3 ± 0,4
	Total	1,3 ± 0,4	1,4 ± 0,5	1,4 ± 0,4
t ₈	lipophil	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1
	wässrig	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,4
	Total	1,3 ± 0,4	1,4 ± 0,5	1,3 ± 0,4

5. Diskussion

5.1 Studiendesign,-durchführung und Methoden

Viele *in vivo* Studien zeigen, dass Flavonoide gesundheitsfördernde Eigenschaften besitzen [1, 83-85]. Nach entsprechender Intervention sind sie im Plasma nachweisbar und haben eine positive Wirkung auf verschiedene Stoffwechsellvorgänge, was unter anderem auf ihre antioxidativen Eigenschaften zurückzuführen ist. Ergebnisse aus experimentellen Tierstudien zeigen, dass Krebserkrankungen bei Tieren signifikant weniger auftreten, wenn diese als Jungtiere mit Genistein behandelt wurden [86, 87]. Solche Ergebnisse sprechen dafür, dass das Stillen durch eine flavonoidkonsumierende Mutter krebsvorbeugende Wirkung beim Kind haben kann. Die Dosierungen in den tierexperimentellen und in vielen *in vivo* Studien sind jedoch höher als die Konzentrationen, die über den üblichen täglichen Verzehr von Lebensmitteln erreicht werden können. Dennoch postulieren Franke et al. einen krebsvorbeugenden Effekt durch Isoflavon-Exposition in einer sehr frühen besonders kritischen Entwicklungsphase. In der vorliegenden Studie sollte überprüft werden, ob durch einen sechstägigen Konsum eines handelsüblichen flavonoidreichen Getränkes Flavonoide in die Muttermilch übergehen und ob sich dadurch die Qualität der Muttermilch verändert.

- **Studiendesign und -durchführung**

Im Rahmen einer monozentrischen Studie mit kontrolliertem Design wurde eine Intervention mit 44 Stillenden durchgeführt. Dabei handelte es sich um Stillende, die den 27. Laktationstag abgeschlossen und demnach keine Stillprobleme hatten sowie den üblichen Stillrhythmus gewohnt waren. Die Rekrutierung erfolgte blockrandomisiert über 24 Monate im Evangelischen Waldkrankenhaus Berlin-Spandau. Die Probandinnen gaben ihr schriftliches Einverständnis und erhielten nach einer eingehenden Projektaufklärung und Überprüfung der Ausschlusskriterien ein handelsübliches flavonoidreiches Getränk. Dabei handelte es sich um ein Sojagetränk mit Vanillegeschmack (250 mL/Tag; Alpro[®] soja) und um einen entkoffeinierten Schwarztee (300 mL/Tag; TeeGschwender). Die Wahl fiel auf einen entkoffeinierten Tee, da in der Stillzeit das Koffein über die Muttermilch an den Säugling weitergegeben wird. Säuglingen fehlt ein bestimmtes Enzym in der Le-

ber, das zum Abbau des Koffeins notwendig ist. Dementsprechend ist die Wirkung des Koffeins bei Neugeborenen sehr stark.

Über einen Zeitraum von sechs Tagen sollten die Getränke jeden Morgen getrunken und am Abend die Muttermilch mit einer Pumpe abgepumpt werden. Denn Franke et al. haben in ihrer Studie festgestellt, dass nach etwa 12 Stunden der Isoflavon-Maximalwert in der Muttermilch erreicht wird [68]. In der vorliegenden Studie wurden täglich verzehrsübliche Dosierungen (250mL = 1TetraPak Sojamilch bzw. 300mL = 2 Tassen Tee) über einen Zeitraum von sechs Tagen konsumiert, um zu überprüfen, ob positive physiologische Effekte durch einen üblichen täglichen Verzehr von Lebensmitteln beobachtet werden können. Zusätzlich wurden die Frauen angehalten, ein 3-tägiges Ernährungsprotokoll selbstständig zu führen, um den Anteil der nutritiven Zufuhr an Antioxidantien und Flavonoiden über die Lebensmittel ermitteln zu können. Die berechnete Isoflavonzufuhr lag im Mittel bei 244 µg/Tag und ist vergleichbar mit den Werten aus holländischen Verzehrstudien. Dort ermittelte Boker et al. eine Menge von 312 µg/Tag [88]. Dagegen sind die ermittelten Werte in der hier vorliegenden Studie im Vergleich zu den in Asien festgestellten Mengen sehr niedrig. Die mittlere Isoflavonaufnahme in China und Korea liegt bei 7,8 mg/Tag und in Japan liegt sie zwischen 30,5 bis 89,9 mg/Tag [89-91]. Die mittlere Flavanolzufuhr der Stillenden lag bei etwa 22 mg/Tag. Diese Menge ist geringer als die, welche in einer holländischen Studie von Arts et al. ermittelt wurde. Arts et al. bestimmten eine durchschnittliche Flavanolzufuhr von 59,8 mg/Tag [72, 92]. Dass Flavonoide mit den Lebensmitteln über den gesamten Studienzeitraum konsumiert wurden, konnte nicht ausgeschlossen werden. Obst und Gemüse stellen eine reichhaltige Flavonoidquelle dar, auf die die Stillenden acht Tage nicht verzichten sollten. Zudem konnte aus organisatorischen Gründen den Stillenden kein standardisiertes Essen über acht Tage angeboten werden, da sie sich nicht über den Studienzeitraum im Krankenhaus befanden. Bei der Auswertung der Ernährungsprotokolle wurde außerdem festgestellt, dass die durchschnittliche Energiezufuhr der Stillenden nur 2264 ± 673 kcal/Tag betrug und somit um etwa 24% unterhalb des Richtwertes für Stillende der gemeinsamen Referenzwerte der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Ernährung (D A CH, 2000) lag. Dies ist womöglich auf eine Unterschätzung der eigenen Verzehrsmengen (Underreporting) zurückzuführen. Nach Goldberg et al. [93] liegt dann ein „Underreporting“ vor, wenn der Quotient

aus der Energiezufuhr und dem Grundumsatz unter 1,1 lag, was bei drei Ernährungsprotokollen der Fall war.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung der Muttermilch. Eine zusätzliche Messung der Flavonoidkonzentration und des antioxidativen Potentials im Blutplasma der Säuglinge hätte weiterführende Erkenntnisse gebracht. Da Säuglinge aber über sehr wenig Blut verfügen und zu dem Zeitpunkt noch nicht feststand, ob und wie viel Flavonoide in die Muttermilch übergehen, wäre es schwierig gewesen, dieses Vorhaben von der Ethikkommission genehmigen zu lassen.

- **Methoden**

- **Chromatographische Bestimmung der Flavonoide**

Grundvoraussetzung für die Bestimmung der Flavonoide war die Etablierung einer reproduzierbaren und routinemäßig anwendbaren Analyseverfahren zur Auftrennung und Quantifizierung der Flavonoide in der Muttermilch.

Aus der Literatur bekannte Verfahren zur Flavonoidbestimmung sind die HPLC-Massenspektrometrie (MS), Gaschromatographie (GC) und verschiedene Enzymimmunoassays (ELISA, RIA). Neben diesen genannten Methoden wird die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) zur Konzentrationsbestimmung von Flavonoiden sowohl im Lebensmittel als auch im biologischen Material häufig beschrieben [67-69, 71, 94-97]. In der vorliegenden Studie wurden die Flavonoide mit einem elektrochemischen Detektor gemessen. Die beiden Flavonoidgruppen (Isoflavone und Flavanole) besitzen jedoch verschiedene Oxidationspotentiale. Demnach mussten zwei getrennte Analysen mittels HPLC erfolgen.

- Isoflavone

Aus der Literatur ist bekannt, dass das optimale Potential zur elektrochemischen Detektion der Isoflavone bei 750 mV liegt [97]. Auch in der vorliegenden Studie waren nach Injektion eines angesetzten Standards entsprechende Peaks für Genistein und Daidzein bei diesem Potential nachweisbar. Bei der Wahl des geeigneten Laufmittels fiel die Entscheidung auf das von King und Bursill [98] verwendete isokratische Verfahren mit einem Ammoniumacetat-Methanol-EDTA-haltigem Laufmittel. Das in der vorliegenden Arbeit ermittelte Detektionslimit für Genistein und Daidzein lag bei 2,5 bzw. 6,25 nmol/L. Der Vergleich mit anderen Studien

zeigt die hohe Sensitivität des beschriebenen Verfahrens. Vergleichbar sind die Werte mit denen von Gamache et al. [99], die mit einem Coul-Array-Detektor analysiert haben und somit gleichzeitig mit mehreren Potentialen messen konnten. Sie erreichten ein Detektionslimit von 5,2 nmol/L für Daidzein und von 7,3 nmol/L für Genistein. Studien, in denen das Daidzein und das Genistein mittels Fluoreszenzdetektion analysiert wurden, liegen nicht vor, obwohl dieses Detektionsverfahren weitaus empfindlicher ist als die Messung mittels UV-Detektion. Wang et al. [100] untersuchten in einer Studie den Isoflavongehalt in der Sojabohne mittels UV- und Fluoreszenzdetektion. Ein Standardgemisch bestehend aus fünf Isoflavonen wurde von dem UV-Detektor analysiert, jedoch nicht alle von dem Fluoreszenzdetektor. Er detektierte nur das Daidzein, Formononetin und das Coumestrol. Genistein und Biochanin A haben keine fluoreszierenden Eigenschaften, sodass die Messung mit einem entsprechenden Detektor nicht möglich ist [97].

Die abschließende Überprüfung der Reproduzierbarkeit und Linearität der Isoflavone zusammen mit dem Laufmittel zeigte sehr gute Resultate. Für beide Isoflavone ergab sich eine hervorragende Reproduzierbarkeit. Der Variationskoeffizient für Genistein lag bei 3,3% und der für Daidzein bei 4,2%. In einem Konzentrationsbereich von 6,25 – 100 nmol/L konnte eine sehr gute Linearität nachgewiesen werden (siehe Abbildung 15). Somit wurde eine sensitive und reproduzierbare Methode zur chromatographischen Isoflavonbestimmung etabliert.

- Flavanole

Flavanolbestimmungen in der Muttermilch mittels HPLC liegen bis dato nicht vor. Demnach waren auch hier Studien, in denen die Flavanolkonzentration im Plasma mittels HPLC und anschließender elektrochemischer Detektion bestimmt wurden, Orientierungshilfen. Doch viele Autoren verwendeten für ihre Flavanolanalysen einen Dioden-Array Detektor, da im Allgemeinen die Polyphenole aufgrund ihrer Molekülstruktur UV-Licht sehr gut absorbieren können.

Einige Arbeitsgruppen, die sich mit der Analyse von Flavanolen im Plasma mittels HPLC und anschließender elektrochemischer Detektion beschäftigt haben, verwendeten entweder einen Single Cell, einen Dual Channel oder Multichannel Detektor. Diese Detektoren messen entweder nur bei einem Potential oder bei zwei bzw. mehr Potentialen gleichzeitig [78, 101, 102]. Die von den verschiedenen Arbeitsgruppen eingestellten Potentiale liegen im Bereich von 250mV - 800mV. Die

Proben der vorliegenden Studie wurden bei einem Potential von 650mV analysiert. Erst bei diesem Potential waren deutliche Peaks aller Flavanole erkennbar (siehe Abbildung 13).

Die Wahl des Laufmittels zur Flavanolbestimmung fiel in der vorliegenden Arbeit auf das von Starp et al. [103] und Breidenassel et al. [104] verwendete isokratische Verfahren mit einem Phosphorsäure-Acetonitril-haltigem Laufmittel, bei dem die Detektion mit einem UV- bzw. Fluoreszenzdetektor erfolgte. Bei dem Verfahren mit dem UV-Detektor lag die Nachweisgrenze bei 1,5 µmol/L und mit dem Fluoreszenzdetektor bei 500 nmol/L [103, 104]. In der vorliegenden Arbeit konnten mit dem elektrochemischen Detektor Flavanolkonzentrationen im Bereich von 5 nmol/L nachgewiesen werden. Es wurde in Anlehnung an Umegaki et al. [102] das Ethylgallat als interner Standard eingesetzt.

Die getestete Reproduzierbarkeit erzielte zusammen mit der gemessenen Linearität hervorragende Ergebnisse. Der Variationskoeffizient als Maß für die Reproduzierbarkeit lag zwischen 5-9% und der Korrelationskoeffizient als Ausdruck für die Linearität betrug 0,9982 und 0,9996 (siehe Abbildungen 16).

Wie für die Isoflavonbestimmung konnte auch für die Flavanolbestimmung eine sensitive Methode mit einem geringen Detektionslimit etabliert werden.

- **Aufbereitung der Muttermilch mittels SPE**

Für die Aufreinigung der Muttermilchproben zur Flavonoidbestimmung erfolgten zwei getrennte Probenaufbereitungen. Beide Aufbereitungen erfolgten mit SPE Kartuschen. Für die Bestimmung der Flavonoide in biologischem Material ist eine vorherige enzymatische Behandlung der Proben notwendig. Die glukuronidierten und sulfatierten Flavonoidmetabolite werden durch das aus Glukuronidase und Sulfatase bestehende Enzymgemisch hydrolysiert, so dass nach entsprechender Inkubation die dann vorliegenden Aglykone analysiert werden können. In der Testphase wurde festgestellt, dass durch die Enzymbehandlungen Verunreinigungen in der Probe auftraten. Eine Dialyse der Enzymlösung über Nacht gegen destilliertes Wasser zeigte wesentliche Verbesserungen. Bevor jedoch das dialysierte Enzymgemisch den Proben zugesetzt werden konnte, wurde die Aktivität der Glukuronidase und der Sulfatase überprüft. Dabei erfolgten eine photometrische Messung der Enzym-Umsetzungsrate und eine anschließende Berechnung der Aktivi-

täten beider Enzyme. Die Verluste durch die Dialyse waren minimal, sodass eine Verdünnung der Enzymlösung vor Zugabe zu den Proben notwendig wurde.

- Isoflavone

In Vorversuchen wurden Aufbereitungen mit Ethylacetat als Bestandteil der Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Franke et al. getestet [71]. Es wurden sowohl Standards als auch mit einer genauen Isoflavonkonzentration versetzte Muttermilchproben zur Analyse herangezogen. Doch das Arbeiten mit Ethylacetat und die anschließende Stickstoffbegasung erwiesen sich als ungünstig, da bei der elektrochemischen Detektion die Isoflavone von dem Ethylacetat überdeckt wurden und so nicht nachgewiesen werden konnten.

Als Alternative zur Flüssig-Flüssig Extraktion wurde die Festphasenextraktion mit entsprechenden SPE-Kartuschen in Betracht gezogen, da viele Autoren dieses Verfahren zur Aufbereitung von Plasma- und Urinproben verwendeten [105-108]. In einer Studie von Rostagno et al. [77] wurden acht verschiedene SPE-Kartuschen für die Probenaufbereitung zur Isoflavonbestimmung getestet. Dabei handelte es sich um Kartuschen mit unterschiedlichen Sorbentien (Silika-, Divinylbenzol- und modifiziertes Divinylbenzol-Sorbens). Erst die Anwendung von Strata X Kartuschen, deren Festphase aus Styroldivinylbenzopolymere besteht, zeigte zufriedenstellende Ergebnisse (siehe Kapitel 4.3.2). Sowohl in der oben genannten Studie als auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde mit Methanol als Elutionsmittel gearbeitet. Es konnte gezeigt werden, dass die Isoflavone von der Festphase zurückgehalten und mit dem Elutionsmittel herausgelöst wurden. In der vorliegenden Arbeit und auch in der Studie von Rostagno et al. [77] konnten mit dieser Methode sehr gute Wiederfindungen erzielt werden. Es liegt daran, dass die Isoflavone aufgrund ihrer chemischen Struktur mit allen polaren, lipophilen und auch aromatischen Anteilen des Sorbens interagieren können. Somit liegt eine insgesamt relativ feste Bindung vor, die aber durch ein Lösemittel wie Methanol gut aufgelöst werden kann.

Mit dem Speed-Vac Konzentrator konnten unter Vakuum maximal 32 Lösungen gleichmäßig bis zur Trockene eingeeengt werden; die zu messenden Isoflavone verblieben als dünner Film am Boden des Röhrchens und wurden anschließend mit dem verwendeten HPLC-Laufmittel gelöst und nochmals mit Filtereinheiten filtriert. Die Wiederfindungen lagen bei 96-108% und die Reproduzierbarkeit der

Aufbereitung bei einem Variationskoeffizienten 3,8 % (Daidzein) und bei 5% (Genistein).

- Flavanole

In den Vorversuchen wurden die Muttermilchproben nach Kivits et al. [76] aufbereitet, da diese Methode für die Flavanolbestimmung im Tee und auch im Plasma etabliert ist. Jedoch zeigten sich keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da die Flavanolpeaks in der Probe durch andere Peaks überdeckt wurden. Verschiedene Autoren führten Festphasenextraktionen mit entsprechenden Kartuschen durch, sodass dieses Verfahren als Alternative zur Aufbereitung nach Kivits et al. in Betracht gezogen wurde. Beispielsweise verwendeten Umegaki et al. C18 Kartuschen zur Probenaufreinigung und Methanol als Elutionsmittel [102]. Auch in der vorliegenden Arbeit gelang durch das Verwenden herkömmlicher C18 Kartuschen mit Methanol als Eluenten eine bessere Aufreinigung der Probe. Jedoch wurden sehr geringe Wiederfindungen der Flavanole in der Milch gemessen (< 65%). Auch das Verwenden verschiedener Elutionsmittel (Methanolverdünnungen oder Ethylacetat), die in diversen Studien für die Flavanolaufbereitung beschrieben wurden [101, 102, 109], und mehrmaliges Eluieren (2-3 mal) zeigten keine Besserung. Demnach lag die Vermutung nahe, dass die Flavanole von der C18-Säule, genauer von dem Füllmaterial, nicht zurückgehalten wurden.

Unno et al. [78] testeten verschiedene SPE-Kartuschen und zusätzlich unterschiedliche Elutionsmittel. Unter anderem wurden neben den C18 Kartuschen die Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) Kartuschen der Firma waters[®] getestet. Verschiedene Studien zeigten, dass diese Festphase, bestehend aus dem hydrophilen N-Vinylpyrrolidon und dem lipophilen Divinylbenzol, für die Retention von Flavanolverbindungen vorteilhaft war und demnach für Aufarbeitungen zur Bestimmung von polyphenolischen Verbindungen eingesetzt wurden [110-112].

Nach Elution mit Methanol lagen die Wiederfindungen zwischen 5 und 89%, wobei die Gallate kaum nachweisbar waren (5-17%). Die Ergebnisse der übrigen Flavanole waren vergleichbar mit der C18- Kartuschen-Aufbereitung. Erst die Kombination von HLB-Festphasenextraktion und einem 70% DMF-Wasser Elutionsgemisch zeigte sehr gute Wiederfindungen aller Flavanole (86-99%) [78]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben nach der Festphasenextraktion im Speed Vac getrocknet und anschließend in dem HPLC-Laufmittel gelöst. Eine Filtrierung der

Analyte schloß die Probenaufreinigung ab. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten durch das Aufarbeiten der Muttermilchproben mit HLB-Kartuschen und dem DMF/Wasser Elutionsmittel hervorragende Wiederfindungen (77-108%) erzielt werden (siehe Kapitel 4.3).

Bei dieser Aufbereitung wurde Ethylgallat als internen Standard eingesetzt. Da Ethylgallat sowohl bei -80°C als auch bei $+3^{\circ}\text{C}$ nur eine Woche stabil ist, wurde es für jede Aufbereitungsreihe frisch angesetzt. Der interne Standard wurde erst nach der Enzymbehandlung zugesetzt, weil die Enzyme das Ethylgallat hydrolysieren können [102]. Die Reproduzierbarkeit der Methode lag zwischen 4,6 und 11,7%.

5.2 Flavonoidgehalte in den Testgetränken

Die Konzentrationen der Isoflavone (Dai: $7,56 \pm 0,5$ mg Ge: $4,83 \pm 0,46$ mg pro 250 mL Sojagetränk) und der Flavanole (Cat: $2,9 \pm 0,3$, Epi: 21 ± 1 , ECG: $67,4 \pm 4,5$, EGCG: $131,8 \pm 14,2$ pro Liter Tee) sind vergleichbar mit Werten anderer Studien, in denen diese Testgetränke untersucht wurde [75, 113, 114]. In einer Studie von Henning et al. [14] wurden 18 verschiedene Teesorten, darunter auch entkoffeinierter schwarzer Tee, hinsichtlich ihrer Flavanolkonzentration untersucht. Im entkoffeinierten schwarzen Tee konnten sie keine Flavanole nachweisen. Auch in der für die Auswertung der Ernährungsprotokolle verwendeten Datenbank [15] sind nur Flavanolspuren im entkoffeinierten Tee aufgelistet. Allerdings sind die genauen Teesorten (bspw. Darjeeling oder Ceylon) in dieser Datenbank nicht erfasst, sondern der Tee wird nur als schwarzer oder grüner Tee beschrieben. Khokhar und Magnusdottir [115] haben in ihrer Arbeit herausgefunden, dass besonders die Darjeeling Teesorte eine hohe Flavanolkonzentration besitzt. Die hohe Flavanolkonzentration in der Darjeeling Teesorte ist auf verschiedene Einflussfaktoren zurückzuführen. Es ist bekannt, dass feinblättrige Teesorten wie der Darjeeling-Tee eine höherer Extraktionsausbeute besitzen als grobblättrige Tees. Auch haben die Herkunft und Wachstumsbedingung Einfluss auf den Flavanolgehalt in der Pflanze. Tees aus hoch gelegenen Plantagen (1300-2000 m), wie das Teedistrikt Darjeeling in Indien, sind qualitativ hochwertiger als bspw. Tees aus dem südlich gelegenen Ceylon. Dort werden die Tees als sogenannte „Lowgrows“ (< 650 m) und „Mediums“ (650-1300 m) angebaut [116]. Ein weiterer Grund ist die Entkoffeinierungsmethode. Bei dem hier verabreichten Tee wurde

die schonende Kohlendioxid-Methode angewandt, bei der die Flavanole erhalten bleiben. Dabei werden die Teeblätter gewässert und anschließend kontinuierlich mit Kohlendioxid begast, das das Koffein bindet. Kieselerde oder Aktivkohle wirken dann wie eine Art Magnet und helfen das so gelöste Koffein zu extrahieren.

5.3 Flavonoide in der Muttermilch

Es stellte sich zunächst die Frage, wie diese Substanzen in das Brustdrüsengewebe und letztendlich in die Milch gelangen könnten.

Wie in Kapitel 1.3 schon ausgeführt, gibt es verschiedene Transportwege, um Inhaltsstoffe aus dem Blut in die Milch zu befördern. Jedoch ist es bis dato noch nicht geklärt, auf welchem Wege die Flavonoide die Zellwand passieren. Da die Flavonoide im Blut metabolisiert vorliegen, also glukuronidiert und sulfatiert sind, wird der Transport in die Epithelzelle der Muttermilchdrüse anders erfolgen als die Aufnahme der Flavonoide in die Enterocyten. Eine Diffusion der glukuronidierten Substanzen ist aufgrund ihrer starken sauren Eigenschaft ($pK_A = 2-3$) unwahrscheinlich [21]. Neben der Transcytose könnte auch der parazelluläre Weg über die Tight Junctions eine Alternative sein. Das bedeutet, dass die metabolisierten Flavonoide ungehindert aus dem Blutstrom in das Lumen der Alveole und somit in die Muttermilch gelangen.

5.3.1 Isoflavongehalt in der Muttermilch

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Isoflavonkonzentrationen in der Muttermilch durch die Intervention signifikant angestiegen sind, im Verlauf der Testphase konstant blieben und am Tag nach der Intervention im Vergleich zum ersten Interventionstag wieder signifikant abgesunken sind. Im Rahmen einiger Bioverfügbarkeitsstudien wurden ähnliche Ergebnisse in Plasmaproben erzielt [83, 117].

Viele Autoren stellten in Untersuchungen fest, dass Isoflavone besser absorbiert werden als die übrigen Untergruppen der Polyphenole [2]. Andlauer et al. [21] untersuchten mit einem Perfusionsmodell an einem isolierten Rattendünndarm die Absorption von Genistin. Sie stellten eine Absorptionsrate im Dünndarm von etwa

15% fest. Im Vergleich zum Genistin werden die Flavanole Epicatechin und Catechin nur zu etwa 4% absorbiert [89]. Die Absorptionsraten von den übrigen Isoflavonen im Dünndarm liegen nicht vor. Jedoch zeigen Interventionsstudien am Menschen, in denen die Bioverfügbarkeit der Isoflavone anhand der Urinausscheidung überprüft wurde, dass die Absorptionsrate von Daidzein zwischen 20 und 50% und die von Genistein zwischen 5 und 20% liegen. Die Wiederfindung im Faeces liegt unter 5% [23].

In Tabelle 12 sind die durchschnittlichen maximalen Plasmakonzentrationen (C_{\max}) und deren Zeitpunkte (T_{\max}) von Probanden aus Bioverfügbarkeitsstudien zusammengefasst, die jeweils 50 mg Aglykonäquivalente einnahmen.

Tabelle 12: Vergleich der Bioverfügbarkeit verschiedener Flavonoide [2]

	T_{\max} (h)		C_{\max} ($\mu\text{mol/L}$)		$T_{1/2}$ (h)	
	MW	Min - Max	MW	Min - Max	MW	Min - Max
Daidzein	4,9	3,0 - 6,6	1,6	0,8 - 3,0	8,5	7,7 - 9,3
Genistein	4,1	3,0 - 5,2	2,7	1,3 - 4,5	7,1	6,8 - 7,5
EGC	1,4	0,5 - 2,0	1,1	0,3 - 2,7	2,3	1,7 - 2,8
EGCG	2,3	1,6 - 3,2	0,1	0 - 0,4	3,5	2,5 - 5,1
Cat/Epi	1,8	0,5 - 2,5	0,4	0,1 - 1,1	2,5	1,1 - 4,1
Naringin	5,0	4,6 - 5,5	0,5	0,1 - 1,5	2,1	1,3 - 2,7
Hesperidin	5,5	5,4 - 5,8	0,5	0,2 - 0,9	2,2	

Ein Grund für die bessere Absorptionsrate der Isoflavone gegenüber anderer Polyphenole ist ihre chemische Struktur. Die Isoflavone sind in der Sojabohne und in nicht fermentierten Lebensmitteln, wie in dem hier verabreichten Sojagetränk, hauptsächlich an Zucker gebunden und liegen als Glykoside vor [7, 9]. Diese Zuckerkomponente schützt möglicherweise das Aglykon vor dem Abbau durch Darmbakterien. Nach erfolgter Hydrolyse des Zuckerrestes können so vermehrt unveränderte Aglykone aufgenommen werden. In der Pharmakologie wird dieses Verfahren der Anlagerung eines Schutzmoleküls an einen bestimmten Wirkstoff angewendet, um diesen vor Metabolisierungen durch Darmbakterien zu schützen. Ausserdem ist die verringerte Proteinbindung der Glycoside im Vergleich zu den Aglykonen ein weiterer Grund für die bessere Bioverfügbarkeit von Isoflavonen. In einer Studie mit dem Aglykon Quercetin und seinem 3-O-Rhamnosylglycosid Rutin

konnte gezeigt werden, dass die Absorption der Aglykone durch Nahrungsproteine erschwert wird [118].

Neben der besseren Bioverfügbarkeit der Isoflavone ist in der Tabelle ersichtlich, dass die nachweisbaren Isoflavonmetabolite nach 6-8 Stunden maximale Plasmakonzentrationen erreichen [2, 6, 119, 120], in der Milch nach etwa 10-14 Stunden [71]. Die meisten anderen Polyphenole erreichen dagegen viel früher ihre Maximalkonzentrationen im Plasma. Zudem werden Daidzein und Genistein sehr langsam abgebaut, ihre Halbwertszeiten liegen zwischen 6 und 8 Stunden [2]. In vivo bedeutet dies für die Isoflavone, dass sie einen höheren und länger andauernden Wirkspiegel im Plasma bzw. in der Milch besitzen. Dies begründet auch die stabile Isoflavonkonzentration in der Muttermilch während der Interventionsphase. Anhand der oben genannten Studien ist auch bekannt, dass die Ausgangswerte der Isoflavone im Plasma nach etwa 2 Tagen und in der Milch nach etwa 2-4 Tagen wieder erreicht werden. Dies spiegelt sich auch in dem vorliegenden Ergebnis wieder; die Isoflavonkonzentration am ersten Tag nach der Intervention (t_4) ist signifikant niedriger ($p = 0,02$) als die Konzentration am zweiten Abnahmetag während der Intervention (t_3).

Die Arbeitsgruppe Franke et al. [67 - 69, 71, 121] beschäftigt sich mit der Untersuchung der Isoflavonkonzentration in der Muttermilch. In einer ihrer älteren Studien erfolgte eine Intervention mit nur einer Probandin. Innerhalb von sechs Tagen wurden an drei Terminen 5-20 g geröstete Sojabohnen mit einem Genistein- und Daidzeingehalt von 913 bzw. 830 mg/kg konsumiert. Da Muttermilchproben nach jeder Fütterung des Säuglings gesammelt und analysiert wurden, konnte festgestellt werden, dass 12 Stunden nach der Intervention die maximalen Isoflavonkonzentrationen in der Muttermilch erreicht wurden. Bei einer Zufuhr von 5 g Sojabohnen, deren Isoflavonkonzentration vergleichbar mit der Konzentration in dem in der vorliegenden Studie verabreichten Testgetränk ist, waren die Werte in der Muttermilch auf circa 30 nmol Genistein/L und 18 nmol Daidzein/L angestiegen. In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls 12 Stunden nach Testgetränkzufuhr im Rahmen des üblichen Stillrhythmus Muttermilchproben gesammelt und am zweiten Abnahmetag ein durchschnittlicher Daidzeinwert von 9,3 nmol/L bzw. für Genistein von 4,9 nmol/L gemessen. Diese Werte sind sehr viel niedriger als die von Franke et al. ermittelten Konzentrationen. Deren Ergebnisse sind allerdings schwierig zu

interpretieren. In ihrer Studie wurde nur eine Stillende rekrutiert, da der Schwerpunkt der Arbeit in der Methodenetablierung lag. Die Analysen einer Probandin sind aber nicht repräsentativ, da sehr starke interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Isoflavonabsorption und -verteilung auftreten können [122, 123]. Trotzdem stellt sich die Frage, warum bei ähnlicher Isoflavonzufuhr diese Diskrepanz bezüglich der Flavonoidkonzentration in der Muttermilch zu beobachten ist. Ein möglicher Grund könnte die Darreichungsform des Lebensmittels sein. Isoflavone aus festen Nahrungsmitteln, wie sie von Franke et al. verabreicht wurden, erreichen ihre Maximalkonzentration im Plasma etwa nach 8 Stunden [120]. In einigen Studien, in denen ein Sojaproteingetränk verabreicht wurde, konnte festgestellt werden, dass das T_{max} der Plasma-Isoflavone bei etwa 6 Stunden lag, somit 2 Stunden früher [120]. Spekulation bleibt, ob in der hier vorliegenden Studie die Isoflavonkonzentrationen in der Muttermilch zu einem früheren Zeitpunkt der Milchprobensammlung höher gewesen wären.

In der zuletzt veröffentlichten Arbeit von Franke et al. [121] wurde eine Intervention mit 7 Probandinnen, die über einen Zeitraum von zwei bis vier Tagen täglich ein Sojaproteingetränk zu sich nahmen, durchgeführt. Die Sammlung der Muttermilchproben erfolgte 12 Stunden nach dem Konsum des Testgetränkes. Wie auch in der hier vorliegenden Arbeit konnten Franke et al. einen signifikanten Anstieg der Isoflavonkonzentration in der Muttermilch nachweisen. Die ermittelten Isoflavonkonzentrationen lagen bei etwa 70,7 nmol/L Muttermilch und sind somit höher als die in der vorliegenden Arbeit zum zweiten Abnahmetag (14,2 nmol/L). Allerdings enthielt das von Franke et al. verabreichte Sojaproteingetränk mehr Gesamtisoflavone (Dai + GE: 52,8 mg) als in der hier vorliegenden Arbeit (Dai + GE: 12,4 mg). Letztendlich sind die von Franke et al. gemessenen Konzentrationen in der Muttermilch mit den hier vorliegenden Ergebnissen vergleichbar, wenn die unterschiedlichen Isoflavonmengen in den beiden Testgetränken berücksichtigt werden.

Da in der Studie von Franke et al. die Gehalte von Daidzein und Genistein nicht einzeln sondern nur deren Verhältnis von 0,6 angegeben wurden, kann keine genaue Konzentrationsangabe der beiden Isoflavone wiedergegeben und mit den hier gemessenen Ergebnissen verglichen werden. Ausgehend von dem oben genannten Verhältnis ist es offensichtlich, dass, wie auch schon in der oben erwähn-

ten älteren Veröffentlichung, der Genisteingehalt in den Muttermilchproben tendenziell höher war als der Daidzeingehalt. Ob der Unterschied signifikant ist, wurde in beiden Veröffentlichungen nicht angegeben. In der vorliegenden Arbeit ist der Daidzeingehalt an allen Abnahmetagen signifikant höher als der Genisteingehalt. In verschiedenen Studien wurden die Wiederfindungen für Daidzein und deren Hauptmetaboliten im Urin untersucht. Sie liegen für Daidzein bei 27-62% und für Genistein bei 7-22% der verabreichten Dosis [98, 124, 125]. Da die Daidzein-Exkretion mit dem Urin höher als die von Genistein ist, liegt die Vermutung nahe, dass Daidzein besser absorbiert wird. Demgegenüber wurde aber in einer Studie von Setchell et al. [108] festgestellt, dass in der Blutzirkulation das Genistein eine höhere Bioverfügbarkeit besitzt als das Daidzein. In dieser Studie wurden 0,4 mg C¹³ markiertes Daidzein bzw. Genistein/kg KG eingesetzt und wurde nachgewiesen, dass nach Intervention das Genistein signifikant höhere Konzentrationswerte im Plasma aufwies als das Daidzein. Eine Erklärung für den Widerspruch könnte der hohe Genisteinabbau in der Galle sein, der in einer Tierstudie von Sfakianos et al. nachgewiesen wurde [126]. Spekulation bleibt, ob durch die höhere Daidzeinkonzentration in dem hier verabreichten Testgetränk und die später erfolgte zweite Absorption der Isoflavone im Zuge des enterohepatischen Kreislaufs (siehe Kapitel 1.2) mehr Daidzein als Genistein rückresorbiert wurde und somit vermehrt in die Muttermilch gelangte.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Isoflavone nach entsprechender Intervention mit einem Sojagetränk in der Muttermilch nachweisbar sind. Mit den in dieser Studie ermittelten durchschnittlichen Isoflavonkonzentrationen würde ein Säugling mit einer täglichen Trinkmenge von etwa 800 mL Muttermilch 4,2 µg Daidzein und 2,7 µg Genistein aufnehmen. Im Vergleich enthalten sojahaltige Säuglingsnahrungen etwa 24 - 47 mg Gesamtisoflavone/L [10, 127]. Umgerechnet würde ein Säugling (3 – 4 kg) mit einer Trinkmenge von 700 - 850 mL etwa 17 – 40 mg bzw. etwa 6 – 10 mg Isoflavone/kg Körpergewicht aufnehmen. Säuglinge können Isoflavone absorbieren, wobei die Absorptionsrate von der Reife des kindlichen Darmes abhängt [128, 129]. Aufgrund ihrer phytoöstrogenen Eigenschaften geraten die Isoflavone stark in die Kritik. In Tierstudien konnte nachgewiesen werden, dass Isoflavone das Immunsystem und die Organe des Fortpflanzungssystems beeinflussen können [130-133]. Jedoch muss ergänzt werden, dass solche

Beobachtungen gemacht werden, wenn sehr hohe Isoflavonkonzentrationen verabreicht werden. Diese Konzentrationen werden durch sojahaltige Säuglingsnahrung oder isoflavonangereicherter Muttermilch nicht aufgenommen.

5.3.2 Flavanolgehalt in der Muttermilch

Die tägliche Verabreichung von 300 mL (2 x 3 g /150 mL) Tee zeigte keine Effekte hinsichtlich der Flavanolkonzentration in der Muttermilch. Um diese Resultate zu erläutern, muss wie bei den Isoflavonen auch die Bioverfügbarkeit der Flavanole im menschlichen Organismus näher betrachtet werden.

Wie in Kapitel 1.3 schon erwähnt, ist das grundlegende Wissen zur Bioverfügbarkeit der Flavonoide, speziell der Flavanole, im Menschen noch sehr eingeschränkt. Bekannt ist, dass die biokinetischen Daten aller Flavanole sehr niedrig sind [2, 23].

In einer Studie von Warden et al. [114] tranken Probanden an einem Tag zu vier Zeitpunkten schwarzen Tee mit ungefähr der gleichen Flavanolzusammensetzung wie in dem hier verabreichten Tee. Blut- Urin und Faecesproben wurden in einem Zeitraum von 24-72 Stunden gesammelt. Letztendlich konnten insgesamt nur etwa 1,68% der zugeführten Flavanolkonzentration in unveränderter Form in Plasma, Urin und Faeces nachgewiesen werden. In einer Untersuchung am isolierten Rattendünndarm konnte nachgewiesen werden, dass nur etwa 4 % der verabreichten Flavanole absorbiert werden [74]. Die Ergebnisse aus Bioverfügbarkeitsstudien am Menschen zeigen ebenfalls niedrige Absorptionsraten, die zwischen 5-15% liegen [2].

Es gibt einige Faktoren, die die Absorptionsrate der Tee-Catechine im Dünndarm beeinflussen können. Viele Autoren vermuten, dass Flavanole aufgrund ihrer sauren Eigenschaften im alkalischen bzw. im neutralen Milieu instabil sind [134]. Bestätigt wurde dies unter anderem in einer Studie von Yoshino et al. [135] In dieser Untersuchung nahm innerhalb von 5 Minuten der Gehalt an EGCG in einem alkalischen Darmmilieu (pH 8.5) um 81,6% ab. Zudem wurde festgestellt, dass der Gehalt im neutralen Milieu des Plasmas einer Maus (pH 7.4) um 29.3% abnimmt. Ein weiterer Einflussfaktor ist die Fähigkeit der Flavanole sich an Nahrungsprotei-

ne zu binden. Im Gegensatz zu den Isoflavonen besitzen sie keine Glycosidgruppe, so dass die Phenolgruppen der Flavanol-Aglykone leichter mit den Hydroxylgruppen der Proteine reagieren können. Diese Bindung an Proteine erschwert die Absorption der Aglykone, da durch die Komplexbildung die Löslichkeit der Aglykone vermindert wird [134]. In den Enterocyten des Dünndarms werden die meisten Flavanole metabolisiert. Sehr häufig werden Flavanole durch das Enzym Catechol O-Methyltransferase (COMT) methyliert. Baba et al. [110] stellten bei Probanden nach Schokoladenverzehr fest, dass das in der Schokolade enthaltene Epicatechin zu 40 % methyliert im Plasma vorlag. In einer anderen Studie, in der Rotwein verabreicht wurde, wurden etwa 20 % der mit dem Rotwein zugeführten Catechine im Plasma der Probanden methyliert. Die methylierten Flavonoid-Metabolite werden häufig aufgrund fehlender Standardsubstanzen nicht in die Analyse zur Bestimmung biokinetischer Daten miteinbezogen [109, 136].

Eine weitere Überlegung für die geringe Bioverfügbarkeit bzw. niedrige Konzentration von Flavanolen im Plasma nach entsprechender Intervention kann eine sehr schnelle Absorption im Gastrointestinal-Trakt und anschließende Metabolisierung sowie die rasche Verteilung der Metabolite auf die verschiedenen Gewebe, u. a. das Brustdrüsengewebe, sein. Bei dem sogenannten First Pass Effect werden die absorbierten Substanzen in der Leber metabolisiert und mit dem Urin ausgeschieden (siehe Kapitel 1.3). Dieser Prozess könnte bei den Flavanolen so rasch erfolgen, dass sie im Plasma und in der Muttermilch nicht mehr nachweisbar sind [22, 134]. Andere Autoren begründen die niedrige Bioverfügbarkeit der Flavanole damit, dass durch die intestinalen Transportproteine, die sogenannten Multidrug Resistance Associated Proteine (MRP), die Flavanole auf die Seite des Darmlumens ausgeschieden werden [137-142]. Physiologisch dienen diese Transportproteine dem Efflux von endogenen cytotoxischen Verbindungen und sind entsprechend dicht angesiedelt in Geweben mit Barrierefunktion, wie dem Darm [143].

Ein weiterer Aspekt für die geringe Bioverfügbarkeit ist das enorme katalytische und hydrolytische Potential des Kolons. Der Dickdarm weist eine hohe Anzahl an Mikroorganismen (etwa 10^{12} Mikroorganismen/cm³) auf, deren Enzyme Hydrolysen, Dehydroxylierungen, O-Methylierungen, Decarboxylierungen sowie Ringspaltungen katalysieren. Eine große Anzahl der Flavanole, die absorbiert und metaboli-

siert werden, gelangen mit der Galle zurück in das Lumen und werden zusammen mit den zugeführten Flavanolen, die nicht im Dünndarm absorbiert werden, im Dickdarm durch die oben genannten Enzyme weiter metabolisiert. So entsteht eine Vielzahl neuer Metabolite und einfach strukturierte Substanzen wie bspw. diverse Lactonderivate, Hippursäure oder Hydroxyessigsäure, aber auch Phenylpropionsäure und verschiedene Benzoesäurederivate wie z.B. Vanillinsäure [144, 145]. Viele dieser Metabolite konnten auch schon im Urin und Plasma nachgewiesen werden, so auch in einer Interventionsstudie mit schwarzem Tee, in der ein signifikanter Anstieg der Hippursäure im Urin der Probanden gemessen wurde [146]. In einer anderen Interventionsstudie konnten nach Verabreichung von grünem Tee Laktonderivate im Plasma, Urin und Faeces der Probanden nachgewiesen werden. Dabei konnten die Autoren darlegen, dass die beiden gemessenen Laktone, (-)-5-(3',4',5'-trihydroxyphenyl)- γ -valerlaktone und (-)-5-(3',4'-dihydroxyphenyl)- γ -valerlaktone, nicht in der Leber, sondern möglicherweise durch anaerobe Bakterien der Mikroflora metabolisiert wurden [25]. Wahrscheinlich werden bis zu 50% der mit der Nahrung aufgenommenen Flavanole durch die Mikroflora des Kolons metabolisiert und somit erst bioverfügbar gemacht.

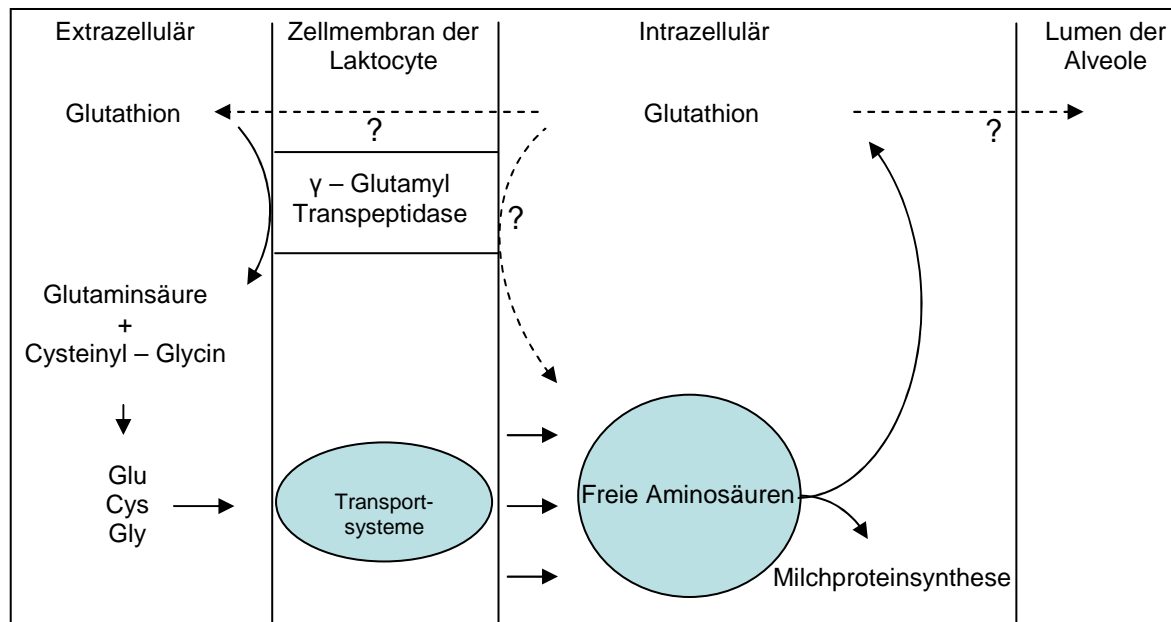
Zuletzt besteht die Möglichkeit, dass neben den vielen genannten physiologischen Einflussfaktoren die verwendete Analysemethode für den Nachweis von Flavanolen, sollten sie in geringen Spuren durch die Intervention in die Muttermilch gelangt sein, zu unempfindlich war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Flavanole in der Muttermilch nach einem täglichen Konsum von 300 mL (2 x 3g /150 mL) entkoffeinierten schwarzen Tee nicht nachweisbar sind.

5.4 Glutathion

In dieser Untersuchung konnte keine Veränderung des Gesamtglutathiongehalts in der Muttermilch durch eine Intervention nachgewiesen werden. Die durchschnittlichen Konzentrationen an jedem Abnahmetag waren innerhalb jeder Gruppe und beim Vergleich der einzelnen Gruppen annähernd übereinstimmend. Es gab keine signifikanten Unterschiede.

Glutathion, ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin, wird in allen Zellen, somit auch in den Laktocyten des Brustdrüsengewebes, synthetisiert. Die Aminosäure Glutamin ist eine Vorstufe der Glutaminsäure und kommt reichlich in Sojaprodukten vor. Vor allem das Sojaprotein stellt eine hohe Glutaminquelle dar; etwa 9,0 - 9,7 g Glutamin/100 g Protein wurden in Sequenzanalysen beschrieben [147, 148]. Das Molkenprotein enthält im Vergleich etwa 5,5 – 6,3 g Glutamin/100 g Protein [108, 149]. Somit lag die Vermutung nahe, dass durch den Konsum des Sojagetränkes vermehrt Glutamin bzw. Glutaminsäure für die Glutathionsynthese verfügbar war. Für die intrazelluläre Aufnahme der für die Synthese notwendigen extrazellulären Aminosäuren (Glutaminsäure, Cystein und Glycin), die zum Teil mit dem Testgetränk zugeführt wurden, ist unter anderem die γ -Glutamyl-Transpeptidase verantwortlich. Dieses Enzym ist an der extrazellulären Oberfläche der Plasmamembran lokalisiert [150] und wurde in weiterführenden Untersuchungen auch an den Zellmembranen des Brustdrüsengewebes charakterisiert und gemessen [151]. Darüberhinaus konnte das Enzym auch schon in der Milch nachgewiesen werden [152, 153]. Die Aufgabe des Enzyms besteht darin, das aus dem Plasma stammende Glutathion in seine Aminosäurenbestandteile zu spalten [154]. Die so entstandenen freien Aminosäuren können dann mittels der verschiedenen natriumabhängigen Aminosäuretransporter - Systeme in der Zellmembran in den Intrazellularraum der Zelle (z. B. Laktocyte) gelangen [58]. Diese Aminosäuren werden im „freien Aminosäurepool“ der Zelle gesammelt und dienen dann der Milchproteinsynthese oder werden wieder für die Glutathionbildung zusammengefügt. Wie das Glutathion zurück in das Plasma oder in das Lumen der Alveole und somit in die Milch gelangt, ist unklar (siehe Abbildung 21).

Abbildung 21: Glutathionaufnahme und –synthese in der Zelle

Warum sich der Glutathiongehalt in der Muttermilch nicht verändert hat, bleibt Spekulation. Möglicherweise war der Glutamingehalt in der Sojamilch nicht so hoch, um den Glutathiongehalt im Plasma und in der Muttermilch zu beeinflussen. Bezieht man sich aber auf die Angaben der oben genannten Sequenzanalysen, hätten die Probandinnen täglich etwa 0,08 g Glutamin mit dem Sojagetränk aufgenommen. In Humanstudien konnte nachgewiesen werden, dass durch Glutaminsupplementierung die Glutathionkonzentration signifikant ansteigt. Dabei handelte es sich aber um Supplementierungen von 30 - 45 g/Tag beim Menschen [155, 156].

5.5 Die antioxidative Kapazität

5.5.1 Die antioxidative Kapazität der Testgetränke

Das antioxidative Potential der Testgetränke lag im Sojagetränk bei 5 mmol/L und im Tee bei 15,6 mmol/L (TEAC-Wert).

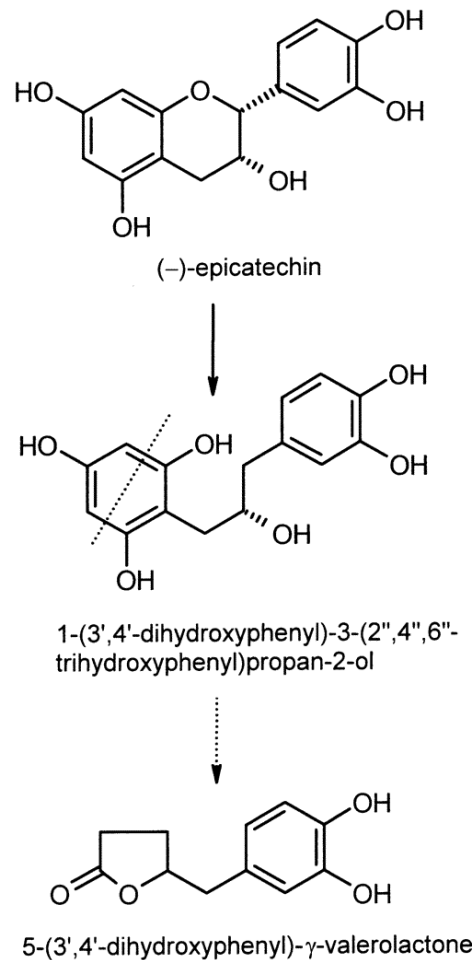
Auffällig ist die im Vergleich zum Tee niedrige antioxidative Kapazität in dem Sojagetränk, was auf den geringeren Gehalt an Flavonoiden zurückzuführen ist. So-

jamilch wird durch Einweichen und Pürieren der getrockneten Sojabohne hergestellt. Im Gegensatz zu Miso, Sojasoße und Tempeh wird das Sojagetränk nicht durch Fermentation gewonnen. In einer Studie von Wang et al. [157] konnte nachgewiesen werden, dass mit Bakterien versetzte und somit fermentierte Sojagetränke ein höheres antioxidatives Potential (8-10,6 mmol/L) aufweisen als unfermentiertes Soja (3,8 mmol/L). Dies ist u.a. auf die intrazellulären antioxidativen Peptide der zugesetzten Organismen oder auf die mögliche Bildung von Reduktionen (Ascorbinsäure), die als Radikalfänger wirken können, zurückzuführen. Wie in der Einleitung (Kapitel 1.1) schon erwähnt, liegen in der Sojabohne die Isoflavone meist in Form ihrer β -Glykoside Genistin, Daidzin sowie Glycetin vor. Einige Autoren stellten in *in vitro* Studien fest, dass die Aglykone Daizein und Genistein antioxidativ wirksamer sind als ihre glykosidische Form [158, 159]. Genistein hat insgesamt drei Hydroxylgruppen und besitzt ein antioxidatives Potential, ausgedrückt als TEAC-Wert, von 2,90 mmol/L. Daidzein mit zwei Hydroxylgruppen hat einen TEAC-Wert von 1,25 mmol/L. Die Autoren haben festgestellt, dass durch die Glycosylierung der OH-Gruppe im A-Ring des Genisteinmoleküls das antioxidative Potential um 60% abnimmt. Genistin hat einen TEAC-Wert von 1,24 mmol/L [159]. Die hohe antioxidative Kapazität des hier verabreichten Tees ist vergleichbar mit Ergebnissen aus anderen Studien [160]. Vor allem das EGCG und das ECG, deren Gehalte im verwendeten Teegetränk überwiegen, sind die stärksten Radikalfänger des Tees [14, 161]. Diese Eigenschaft ist auf ihre Molekülstruktur zurückzuführen. Einige Untersuchungen belegen, dass die Anzahl der Hydroxylgruppen im A- und B-Ring des Moleküls entscheidend ist. Je mehr OH-Gruppen im Molekül, umso größer ist das antioxidative Potential des Flavonoids [162].

Stewart et al. [163] haben die TEAC-Werte von Flavanolen untersucht und herausgefunden, dass das ECG und das EGCG mit sieben bzw. acht OH-Gruppen das höchste antioxidative Potential besitzen. Deren TEAC-Werte lagen bei 3,4 mmol/L. In einer Studie von Salah et al [145] lagen beide Werte sogar bei 4,93 mmol/L und 4,75 mmol/L, dagegen erreichte das Epicatechin nur einen TEAC-Wert von 2,5 mmol/L. Interessant ist das Ergebnis von Unno et al. [112]. Diese Arbeitsgruppe untersuchte die antioxidative Kapazität mittels TEAC von (-)-Epicatechin und seinem Abbauprodukt 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolakton. Sie stellte fest, dass das antioxidative Potential des Abbauprodukts nur halb so hoch ist (1,4 mmol/L) wie das Epicatechin (2,7 mmol/L). Der Abbau des Epicate-

chin zu 5-(3',4'-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton geht mit dem Verlust von Hydroxylgruppen einher und führt zu einer Minderung des antioxidativen Potentials (siehe Abbildung 22).

Abbildung 22: Abbau von Epicatechin [112]



5.5.2 Die antioxidative Kapazität der Muttermilch

In vorliegender Studie wurde die antioxidative Kapazität in der wässrigen und lipophilen Phase der Muttermilch vor, während und nach Intervention mit dem Sojage-tränk bzw. entkoffeinierten schwarzen Tee untersucht. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Phasen (wässrige und lipophile Phase) wurden zu allen Abnahmeterminen festgestellt ($p < 0,001$).

Da die gemessene antioxidative Kapazität in der wässrigen Muttermilch-Phase von beiden Interventionsgruppen mit der von der Kontrollgruppe vergleichbar war, ist davon auszugehen, dass die mit den Testgetränken zugeführten hydrophilen

Flavonoide auf diesen Konzentrationsunterschied keinen Einfluss haben. Andere Komponenten, wie beispielsweise das Vitamin C und die von dem Hexan denaturierten Kaseine stammenden Peptide, die ebenfalls bioaktiv wirken, haben einen weitaus größeren Einfluss auf die hohen Werte in der wässrigen Phase aller Gruppen [164]. Die Schwankungsbreite der antioxidativen Kapazität in der wässrigen Phase lag zwischen 1,08 mmol/L und 1,32 mmol/L. In einer Studie von Alberti-Fidanza et al. [165] wurde die antioxidative Kapazität der Muttermilch ohne vorangegangener Intervention erfasst. Die in dieser Studie ermittelten Werte (1.01 ± 0.37 mmol/L trolox eq.) sind gut vergleichbar mit den hier festgestellten Werten. In einer weiteren Studie von Hanna et al. [166] wurde die antioxidative Kapazität in der Muttermilch in Abhängigkeit von der Lagerdauer gemessen. Dort sind die Ergebnisse höher. In dieser Studie wurde gezeigt, dass das antioxidative Potential sowohl bei einer Lagerung der Muttermilchproben bei 4°C als auch bei -20°C über einen Zeitraum von sieben Tagen signifikant sank (frische Milch: 1.66; 4°C (48 Std.): 1.58; 4°C (7 Tage): 1.48; -20°C (48 Std.): 1.45; -20°C (7 Tage): 1.34). Die in unserer Arbeit vorliegenden Proben wurden über einen Zeitraum von acht Tagen von den Müttern selbst gesammelt bzw. gelagert (im Tiefkühlfach der Probandin) und anschließend nochmals bei -20°C im Berliner Waldkrankenhaus bis zur Lieferung nach Bonn eingefroren. Demnach könnten die niedrigeren Konzentrationen durch die notwendige lange Lagerzeit erklärt werden. Studien belegen, dass lange Lagerungen die Lipoprotein-Lipase-Aktivität positiv beeinflussen, sodass vermehrt freie Fettsäuren entstehen, die in cytotoxische Lipidperoxide übergehen können [167].

Es wurden keine Änderungen der antioxidativen Kapazität in der Muttermilch durch Gabe der hier vorgegebenen Testgetränke festgestellt. Da keine Studien zum antioxidativen Potential der Muttermilch nach Intervention mit flavonoidreichen Lebensmitteln vorliegen, fehlt der Vergleich mit entsprechenden Daten aus anderen Publikationen.

Plasmauntersuchungen bei Erwachsenen, in denen die antioxidative Wirkung nach einer isoflavonreichen Intervention gemessen wurde, liegen vor. In diesen Studien wurden nach Intervention keine antioxidativen Effekte nachgewiesen [168-170]. Rüfer et al. [171] stellten fest, dass Genistein und Daidzein eine Konzentration von 8,9 µmol/L im Plasma erreichen müssen, um eine antioxidative Wirksam-

keit zu erzielen (als Vergleich: In der hier vorliegenden Arbeit wurden Flavonoid-Maximalwerte in der Muttermilch von 0,03 $\mu\text{mol/L}$ erreicht). Nur in *in vitro* Untersuchungen und Tierstudien gelang ein antioxidativer Effekt, allerdings nach Zufuhr sehr hoher Isoflavonkonzentrationen [172]. Neben den viel zu geringen Isoflavonmengen wird zusätzlich spekuliert, ob die metabolisierten Formen der Isoflavone, die im Plasma und auch in der Muttermilch vorhanden sind, überhaupt noch antioxidative Eigenschaften besitzen. Turner et al. [173] untersuchten den Einfluss von metabolisierten Isoflavonen (sulfatierte Konjugate) auf die LDL-Oxidation und stellten fest, dass Monosulfat- und Disulfatmetabolite von Genistein und Daidzein weniger effektiv bzw. völlig wirkungslos sind. Vermutlich führen die Konjugation mit Glucuronsäure und die gemischte Konjugation mit Glucuronsäure und Sulfat ebenfalls zu einer reduzierten antioxidativen Kapazität.

Abgesehen von der geringen Isoflavonkonzentration in der Muttermilch könnten auch die Proteine in der Muttermilch das antioxidative Potential der Flavonoide schmälern. Arts et al. [174, 175] haben in *in vitro* Experimenten herausgefunden, dass die antioxidative Kapazität einer Flavonoid-Protein Lösung schwächer ist als die Summe der antioxidativen Potentiale der einzelnen Substanzen. Der Grund für diese Maskierung liegt in der hohen Affinität der Prolingruppen zu OH-Gruppen des Flavonoids mit der möglichen Konsequenz, dass die Radikalfänger-Funktion des Flavonoids geschwächt und deren antioxidatives Potential reduziert wird. Weiter spekulieren die Autoren, dass die im Gastrointestinaltrakt absorbierten Flavonoide sich an das Plasmaprotein Albumin binden können und dadurch ihr antioxidatives Potential geschmälert werden könnte [176, 177].

Eine klare Schutzwirkung der Flavanole ist vor allem aus *in vitro* und Tierstudien bekannt [178-181]. Interventionsstudien, in denen schwarzer Tee verabreicht wurde, zeigten unterschiedliche Veränderungen des antioxidativen Potentials im Plasma der Probanden. Einen schwachen Anstieg (2%) verzeichneten Leenen et al. [33] mittels des FRAP-Tests nach einer einmaligen Dosis von 2 g schwarzen Tee/300 mL. Serafini et al. [34] verabreichten einmalig 6 g schwarzen Tee/300 mL und ermittelten einen stärkeren Anstieg (29%) des antioxidativen Potentials mit Hilfe des TRAP-Tests. Van het Hof et al. [182], Maxwell et al. [183] und McAnlis et al. [184] haben in ihren Interventionsstudien mit schwarzem Tee keine Veränderungen feststellen können. Da verschiedene Testverfahren zur Ermittlung der antioxidativen Kapazität vorliegen, ist ein quantitativer Vergleich schwierig. In qualita-

tiver Hinsicht ist jedoch festzustellen, dass der Teekonsum zu einem signifikanten Anstieg der antioxidativen Kapazität im Plasma führen kann.

Abschließend ist festzuhalten, dass sich die antioxidative Kapazität in der Muttermilch nicht geändert hat. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass durch die Intervention zu wenig Isoflavone bzw. keine Flavanole in der Muttermilch nachweisbar waren (siehe Kap. 4.6.2).

6 Abschließende Betrachtung

In der vorliegenden Untersuchung wurde festgestellt, dass Isoflavone nach Intervention in der Muttermilch nachweisbar waren, Flavanole jedoch nicht. Obwohl Isoflavone in der Milch gemessen wurden, veränderten sich der Glutathiongehalt und antioxidative Kapazität in der Milch nicht. Womöglich waren die Glutamin- und Isoflavongehalte im Sojagetränk zu gering, um einen messbaren qualitativen Einfluss auf die oben genannten Parameter der Muttermilch zu haben.

Mit dem verabreichten Sojagetränk (250 mL) wurden etwa 12,4 mg (7,6 mg Daidzein und 4,8 mg Genistein) Gesamt-Isoflavon am Tag aufgenommen. Am ersten Abnahmetag während der Intervention lagen bei zwei Probandinnen die Maximalkonzentrationen von Daidzein bei 5,2 µg/L (20,6 nmol/L) und von Genistein bei 3,4 µg/L (12,6 nmol/L). Somit nimmt der Säugling mit einer Trinkmenge von etwa 800 mL Muttermilch täglich etwa 4,2 µg Daidzein und 2,7 µg Genistein auf. Im Vergleich zur Muttermilch sind die Isoflavonkonzentrationen in sojahaltiger Säuglingsnahrung entschieden höher. Im Durchschnitt enthalten die Formulanahrungen etwa 24 - 47 mg Gesamti Isoflavone/L [10, 127]. Ein Säugling (3 - 4 kg) mit einer täglichen Trinkmenge von 700 - 850 mL würde also täglich etwa 17 - 40 mg Isoflavone bzw. etwa 6 - 10 mg Isoflavone/kg Körpergewicht aufnehmen. Somit wird klar, dass die tägliche Isoflavon-Zufuhr mit der Muttermilch nach einer wie in dieser Studie erfolgten Intervention im Vergleich zur Zufuhr sojahaltiger Säuglingsnahrung weitaus geringer ist.

In Tierstudien wurden negative Effekte der Isoflavone auf die Entwicklung der Fortpflanzungsorgane und das Immunsystem festgestellt [130-133]. Jedoch waren die in diesen Studien verabreichten Isoflavonkonzentrationen weitaus höher als die Mengen, die mit der sojahaltigen Säuglingsnahrung, geschweige denn mit der isoflavonangereicherten Muttermilch aufgenommen werden können. Da diese Substanzen aber auch positive Eigenschaften besitzen, sollten mögliche Vorteile einer täglichen Isoflavonzufuhr nicht außer Acht gelassen werden. Betrachtet man das niedrige Auftreten hormonabhängiger Erkrankungen in asiatischen Ländern, wo Sojaprodukte täglich verzehrt werden, liegt die Vermutung nahe, dass unter anderem die in der Nahrung enthaltenen Isoflavone zu diesem Ergebnis beitragen. Demnach könnten sich auch positive Langzeiteffekte bei Kindern ergeben, die mit

sojahaltiger Formulanahrung genährt oder von Müttern gestillt werden, die isoflavonreiche Lebensmittel zu sich genommen haben. Bei Erwachsenen steht fest, dass eine Isoflavonaufnahme verschiedene Stoffwechselfvorgänge positiv beeinflussen können. Eine Stillende, die regelmäßig Sojaprodukte verzehrt, nimmt Isoflavone in verzehrsüblichen Mengen auf und gibt sie über die Muttermilch an das Kind weiter. Dabei handelt es sich um eine sehr niedrige Dosierung, die keine negativen Effekte hervorrufen kann.

Literatur

1. Watzl, B. and C. Leitzmann, *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Vol. Auflage: 3. 2005: Hippokrates.
2. Manach, C., G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, and C. Remesy, *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1 Suppl): p. 230S-242S.
3. Falbe, J. and M. Regitz, *Lexikon Chemie*. 10. Auflage ed. Vol. Band 3. 1997, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
4. Messina, M., *Soy, soy phytoestrogens (isoflavones), and breast cancer*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(4): p. 574-5.
5. Kurzer, M.S. and X. Xu, *Dietary phytoestrogens*. Annu Rev Nutr, 1997. **17**: p. 353-81.
6. Setchell, K.D., *Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones*. Am J Clin Nutr, 1998. **68**(6 Suppl): p. 1333S-1346S.
7. Chien, H.L., H.Y. Huang, and C.C. Chou, *Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria*. Food Microbiol, 2006. **23**(8): p. 772-8.
8. Dwyer, J.T., B.R. Goldin, N. Saul, L. Gualtieri, S. Barakat, and H. Adlercreutz, *Tofu and soy drinks contain phytoestrogens*. J Am Diet Assoc, 1994. **94**(7): p. 739-43.
9. Nakamura, Y., S. Tsuji, and Y. Tonogai, *Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake*. J AOAC Int, 2000. **83**(3): p. 635-50.
10. *USDA-Iowa State University Database on the Isoflavone Content of Foods*; <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isoflav.html>. 2002.
11. Messina, M., *Isoflavone intakes by Japanese were overestimated*. Am J Clin Nutr, 1995. **62**(3): p. 645.
12. van Erp-Baart, M.A., H.A. Brants, M. Kiely, A. Mulligan, A. Turrini, C. Sermoneta, A. Kilkinen, and L.M. Valsta, *Isoflavone intake in four different European countries: the VENUS approach*. Br J Nutr, 2003. **89 Suppl 1**: p. S25-30.
13. Adlercreutz, H., H. Markkanen, and S. Watanabe, *Plasma concentrations of phytoestrogens in Japanese men*. Lancet, 1993. **342**(8881): p. 1209-10.
14. Henning, S.M., C. Fajardo-Lira, H.W. Lee, A.A. Youssefian, V.L. Go, and D. Heber, *Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity*. Nutr Cancer, 2003. **45**(2): p. 226-35.
15. Bhagwat, S.A., J.M. Holden, D.B. Haytowitz, S.E. Gebhardt, A. Eldridge, J. Dwyer, and J. Peterson, *USDA database for the flavonoid content of selected foods*. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>. 2003, 2004, 2007.
16. Walsh, K.R., S.J. Haak, T. Bohn, Q. Tian, S.J. Schwartz, and M.L. Failla, *Isoflavonoid glucosides are deconjugated and absorbed in the small intestine of human subjects with ileostomies*. Am J Clin Nutr, 2007. **85**(4): p. 1050-6.
17. Rowland, I., H. Wiseman, T. Sanders, H. Adlercreutz, and E. Bowey, *Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora*. Biochem Soc Trans, 1999. **27**(2): p. 304-8.
18. Mullen, W., A. Boitier, A.J. Stewart, and A. Crozier, *Flavonoid metabolites in human plasma and urine after the consumption of red onions: analysis by liquid*

- chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection.* J Chromatogr A, 2004. **1058**(1-2): p. 163-8.
19. Setchell, K.D., N.M. Brown, L. Zimmer-Nechemias, W.T. Brashear, B.E. Wolfe, A.S. Kirschner, and J.E. Heubi, *Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability.* Am J Clin Nutr, 2002. **76**(2): p. 447-53.
 20. Wolters, M. and A. Hahn, [*Soy isoflavones--a therapy for menopausal symptoms?*]. Wien Med Wochenschr, 2004. **154**(13-14): p. 334-41.
 21. Andlauer, W., J. Kolb, P. Stehle, and P. Furst, *Absorption and metabolism of genistein in isolated rat small intestine.* J Nutr, 2000. **130**(4): p. 843-6.
 22. Spencer, J.P., *Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract.* J Nutr, 2003. **133**(10): p. 3255S-3261S.
 23. Manach, C. and J.L. Donovan, *Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans.* Free Radic Res, 2004. **38**(8): p. 771-85.
 24. Choudhury, R., S.K. Srail, E. Debnam, and C.A. Rice-Evans, *Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration.* Free Radic Biol Med, 1999. **27**(3-4): p. 278-86.
 25. Li, C., M.J. Lee, S. Sheng, X. Meng, S. Prabhu, B. Winnik, B. Huang, J.Y. Chung, S. Yan, C.T. Ho, and C.S. Yang, *Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion.* Chem Res Toxicol, 2000. **13**(3): p. 177-84.
 26. Rondelli, I., D. Acerbi, and P. Ventura, *Steady-state pharmacokinetics of ipriflavone and its metabolites in patients with renal failure.* Int J Clin Pharmacol Res, 1991. **11**(4): p. 183-92.
 27. Jager, W., E. Gehring, B. Hagenauer, S. Aust, A. Senderowicz, and T. Thalhammer, *Biliary excretion of flavopiridol and its glucuronides in the isolated perfused rat liver: role of multidrug resistance protein 2 (Mrp2).* Life Sci, 2003. **73**(22): p. 2841-54.
 28. Chen, J., H. Lin, and M. Hu, *Metabolism of flavonoids via enteric recycling: role of intestinal disposition.* J Pharmacol Exp Ther, 2003. **304**(3): p. 1228-35.
 29. Liu, Y., Y. Dai, L. Xun, and M. Hu, *Enteric disposition and recycling of flavonoids and ginkgo flavonoids.* J Altern Complement Med, 2003. **9**(5): p. 631-40.
 30. Cai, Q., R.O. Rahn, and R. Zhang, *Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals.* Cancer Lett, 1997. **119**(1): p. 99-107.
 31. Blokhina, O., E. Virolainen, and K.V. Fagerstedt, *Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review.* Ann Bot (Lond), 2003. **91 Spec No**: p. 179-94.
 32. Kondo, K., M. Kurihara, N. Miyata, T. Suzuki, and M. Toyoda, *Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation.* Arch Biochem Biophys, 1999. **362**(1): p. 79-86.
 33. Leenen, R., A.J. Roodenburg, L.B. Tijburg, and S.A. Wiseman, *A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans.* Eur J Clin Nutr, 2000. **54**(1): p. 87-92.
 34. Serafini, M., A. Ghiselli, and A. Ferro-Luzzi, *In vivo antioxidant effect of green and black tea in man.* Eur J Clin Nutr, 1996. **50**(1): p. 28-32.
 35. Benzie, I.F., Y.T. Szeto, J.J. Strain, and B. Tomlinson, *Consumption of green tea causes rapid increase in plasma antioxidant power in humans.* Nutr Cancer, 1999. **34**(1): p. 83-7.
 36. Nakagawa, K., M. Ninomiya, T. Okubo, N. Aoi, L.R. Juneja, M. Kim, K. Yamanaoka, and T. Miyazawa, *Tea catechin supplementation increases antioxidant ca-*

- capacity and prevents phospholipid hydroperoxidation in plasma of humans. *J Agric Food Chem*, 1999. **47**(10): p. 3967-73.
37. Sung, H., J. Nah, S. Chun, H. Park, S.E. Yang, and W.K. Min, *In vivo antioxidant effect of green tea*. *Eur J Clin Nutr*, 2000. **54**(7): p. 527-9.
 38. Langley-Evans, S.C., *Consumption of black tea elicits an increase in plasma antioxidant potential in humans*. *Int J Food Sci Nutr*, 2000. **51**(5): p. 309-15.
 39. Erba, D., P. Riso, A. Bordoni, P. Foti, P.L. Biagi, and G. Testolin, *Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans*. *J Nutr Biochem*, 2005. **16**(3): p. 144-9.
 40. Mahesha, H.G., S.A. Singh, and A.G. Rao, *Inhibition of lipoxygenase by soy isoflavones: evidence of isoflavones as redox inhibitors*. *Arch Biochem Biophys*, 2007. **461**(2): p. 176-85.
 41. Oh, H.Y., S.S. Kim, H.Y. Chung, and S. Yoon, *Isoflavone supplements exert hormonal and antioxidant effects in postmenopausal Korean women with diabetic retinopathy*. *J Med Food*, 2005. **8**(1): p. 1-7.
 42. Nagata, H., S. Takekoshi, T. Takagi, T. Honma, and K. Watanabe, *Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase*. *Tokai J Exp Clin Med*, 1999. **24**(1): p. 1-11.
 43. Fu, Y., S. Zheng, S.C. Lu, and A. Chen, *Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of activated hepatic stellate cells by enhancing the capacity of glutathione synthesis*. *Mol Pharmacol*, 2008. **73**(5): p. 1465-73.
 44. Yu, J.C., Z.M. Jiang, and D.M. Li, *Glutamine: a precursor of glutathione and its effect on liver*. *World J Gastroenterol*, 1999. **5**(2): p. 143-146.
 45. Newsholme, P., J. Procopio, M.M. Lima, T.C. Pithon-Curi, and R. Curi, *Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function*. *Cell Biochem Funct*, 2003. **21**(1): p. 1-9.
 46. Soh, H., M. Wasa, H.S. Wang, and M. Fukuzawa, *Glutamine regulates amino acid transport and glutathione levels in a human neuroblastoma cell line*. *Pediatr Surg Int*, 2005. **21**(1): p. 29-33.
 47. Kent, J.C., *How breastfeeding works*. *J Midwifery Womens Health*, 2007. **52**(6): p. 564-70.
 48. Wilde, C.J., C.V. Addey, L.M. Boddy, and M. Peaker, *Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk*. *Biochem J*, 1995. **305** (Pt 1): p. 51-8.
 49. Peaker, M., *Mechanism of milk secretion: milk composition in relation to potential difference across the mammary epithelium*. *J Physiol*, 1977. **270**(2): p. 489-505.
 50. Plath-Gabler, A., C. Gabler, F. Sinowatz, B. Berisha, and D. Schams, *The expression of the IGF family and GH receptor in the bovine mammary gland*. *J Endocrinol*, 2001. **168**(1): p. 39-48.
 51. Ilkbahar, Y.N., G. Thordarson, I.G. Camarillo, and F. Talamantes, *Differential expression of the growth hormone receptor and growth hormone-binding protein in epithelia and stroma of the mouse mammary gland at various physiological stages*. *J Endocrinol*, 1999. **161**(1): p. 77-87.
 52. Neville, M.C., *MILK SECRETION: AN OVERVIEW*. 1998.
 53. Hunziker, W. and J.P. Kraehenbuhl, *Epithelial transcytosis of immunoglobulins*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1998. **3**(3): p. 287-302.
 54. McManaman, J.L., M.E. Reyland, and E.C. Thrower, *Secretion and fluid transport mechanisms in the mammary gland: comparisons with the exocrine pancreas and the salivary gland*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2006. **11**(3-4): p. 249-68.
 55. Burgoyne, R.D. and J.S. Duncan, *Secretion of milk proteins*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1998. **3**(3): p. 275-86.

56. Palade, G., *Intracellular aspects of the process of protein synthesis*. Science, 1975. **189**(4200): p. 347-58.
57. Mather, I.H. and T.W. Keenan, *Origin and secretion of milk lipids*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1998. **3**(3): p. 259-73.
58. Baumrucker, C.R., *Amino acid transport systems in bovine mammary tissue*. J Dairy Sci, 1985. **68**(9): p. 2436-51.
59. Melvin, J.E., D. Yule, T. Shuttleworth, and T. Begenisich, *Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells*. Annu Rev Physiol, 2005. **67**: p. 445-69.
60. De Groot, N., P. Van Kuik-Romeijn, S.H. Lee, and H.A. De Boer, *Increased immunoglobulin A levels in milk by over-expressing the murine polymeric immunoglobulin receptor gene in the mammary gland epithelial cells of transgenic mice*. Immunology, 2000. **101**(2): p. 218-24.
61. Cox, D.B., R.A. Owens, and P.E. Hartmann, *Blood and milk prolactin and the rate of milk synthesis in women*. Exp Physiol, 1996. **81**(6): p. 1007-20.
62. Haskell, M.J. and K.H. Brown, *Maternal vitamin A nutriture and the vitamin A content of human milk*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1999. **4**(3): p. 243-57.
63. Goldman, A.S., R.M. Goldblum, and L.A. Hanson, *Anti-inflammatory systems in human milk*. Adv Exp Med Biol, 1990. **262**: p. 69-76.
64. Ortega, R.M., P. Andres, R.M. Martinez, and A.M. Lopez-Sobaler, *Vitamin A status during the third trimester of pregnancy in Spanish women: influence on concentrations of vitamin A in breast milk*. Am J Clin Nutr, 1997. **66**(3): p. 564-8.
65. Ortega, R.M., R.M. Martinez, P. Andres, L. Marin-Arias, and A.M. Lopez-Sobaler, *Thiamin status during the third trimester of pregnancy and its influence on thiamin concentrations in transition and mature breast milk*. Br J Nutr, 2004. **92**(1): p. 129-35.
66. Ortega, R.M., M.E. Quintas, R.M. Martinez, P. Andres, A.M. Lopez-Sobaler, and A.M. Requejo, *Riboflavin levels in maternal milk: the influence of vitamin B2 status during the third trimester of pregnancy*. J Am Coll Nutr, 1999. **18**(4): p. 324-9.
67. Franke, A., *Isoflavone content of breast milk and soy formulas: benefits and risks*. Clin Chem, 1997. **43**(5): p. 850-1; author reply 852.
68. Franke, A.A., L.J. Custer, and Y. Tanaka, *Isoflavones in human breast milk and other biological fluids*. Am J Clin Nutr, 1998. **68**(6 Suppl): p. 1466S-1473S.
69. Franke, A.A., M.C. Yu, G. Maskarinec, P. Fanti, W. Zheng, and L.J. Custer, *Phytoestrogens in human biomatrices including breast milk*. Biochem Soc Trans, 1999. **27**(2): p. 308-18.
70. Antignac, J.P., R. Cariou, B. Le Bizec, J.P. Cravedi, and F. Andre, *Identification of phytoestrogens in bovine milk using liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003. **17**(12): p. 1256-64.
71. Franke, A.A. and L.J. Custer, *Daidzein and genistein concentrations in human milk after soy consumption*. Clin Chem, 1996. **42**(6 Pt 1): p. 955-64.
72. Arts, I.C., B. van De Putte, and P.C. Hollman, *Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(5): p. 1752-7.
73. Liggins, J., L.J. Bluck, S. Runswick, C. Atkinson, W.A. Coward, and S.A. Bingham, *Daidzein and genistein contents of vegetables*. Br J Nutr, 2000. **84**(5): p. 717-25.
74. Mazur, W., *Phytoestrogen content in foods*. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1998. **12**(4): p. 729-42.
75. Knight, D.C., J.A. Eden, J.L. Huang, and M.A. Waring, *Isoflavone content of infant foods and formulas*. J Paediatr Child Health, 1998. **34**(2): p. 135-8.

76. Kivits, G.A., F.J.P. van der Sman, and L.B. Tijburg, *Analysis of catechins from black tea in humans: a specific and sensitive colorimetric assay of total catechins in biological fluids*. *Int J Food Sci Nutr*, 1997. **48**: p. 387-392.
77. Rostagno, M.A., M. Palma, and C.G. Barroso, *Solid-phase extraction of soy isoflavones*. *J Chromatogr A*, 2005. **1076**(1-2): p. 110-7.
78. Unno, T., Y.M. Sagesaka, and T. Kakuda, *Analysis of tea catechins in human plasma by high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(26): p. 9885-9.
79. Kuhn, K.S., A.I. Krasselt, and P. Furst, *Glutathione and glutathione metabolites in small tissue samples and mucosal biopsies*. *Clin Chem*, 2000. **46**(7): p. 1003-5.
80. Miller, N.J., C. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, and A. Milner, *A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates*. *Clin Sci (Lond)*, 1993. **84**(4): p. 407-12.
81. Pulido, R., M. Hernandez-Garcia, and F. Saura-Calixto, *Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet*. *Eur J Clin Nutr*, 2003. **57**(10): p. 1275-82.
82. Rice-Evans, C. and N.J. Miller, *Total antioxidant status in plasma and body fluids*. *Methods Enzymol*, 1994. **234**: p. 279-93.
83. Williamson, G. and C. Manach, *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **81**(1 Suppl): p. 243S-255S.
84. Kris-Etherton, P.M., K.D. Hecker, A. Bonanome, S.M. Coval, A.E. Binkoski, K.F. Hilpert, A.E. Griel, and T.D. Etherton, *Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer*. *Am J Med*, 2002. **113 Suppl 9B**: p. 71S-88S.
85. Thomasset, S.C., D.P. Berry, G. Garcea, T. Marczylo, W.P. Steward, and A.J. Gescher, *Dietary polyphenolic phytochemicals--promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(3): p. 451-8.
86. Murrill, W.B., N.M. Brown, J.X. Zhang, P.A. Manzollillo, S. Barnes, and C.A. Lamartiniere, *Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats*. *Carcinogenesis*, 1996. **17**(7): p. 1451-7.
87. Lamartiniere, C.A., J. Moore, M. Holland, and S. Barnes, *Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1995. **208**(1): p. 120-3.
88. Boker, L.K., Y.T. Van der Schouw, M.J. De Kleijn, P.F. Jacques, D.E. Grobbee, and P.H. Peeters, *Intake of dietary phytoestrogens by Dutch women*. *J Nutr*, 2002. **132**(6): p. 1319-28.
89. Nagata, C., S. Iwasa, M. Shiraki, T. Ueno, S. Uchiyama, K. Urata, Y. Sahashi, and H. Shimizu, *Associations among maternal soy intake, isoflavone levels in urine and blood samples, and maternal and umbilical hormone concentrations (Japan)*. *Cancer Causes Control*, 2006. **17**(9): p. 1107-13.
90. Chan, S.G., S.C. Ho, N. Kreiger, G. Darlington, K.F. So, and P.Y. Chong, *Dietary sources and determinants of soy isoflavone intake among midlife Chinese Women in Hong Kong*. *J Nutr*, 2007. **137**(11): p. 2451-5.
91. Park, M.K., Y. Song, H. Joung, S.J. Li, and H.Y. Paik, *Establishment of an isoflavone database for usual Korean foods and evaluation of isoflavone intake among Korean children*. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2007. **16**(1): p. 129-39.
92. Bedard, D., B. Shatenstein, and S. Nadon, *Underreporting of energy intake from a self-administered food-frequency questionnaire completed by adults in Montreal*. *Public Health Nutr*, 2004. **7**(5): p. 675-81.

93. Goldberg, G.R., A.E. Black, S.A. Jebb, T.J. Cole, P.R. Murgatroyd, W.A. Coward, and A.M. Prentice, *Critical evaluation of energy intake data using fundamental principles of energy physiology: 1. Derivation of cut-off limits to identify under-recording*. Eur J Clin Nutr, 1991. **45**(12): p. 569-81.
94. Lee, M.J., P. Maliakal, L. Chen, X. Meng, F.Y. Bondoc, S. Prabhu, G. Lambert, S. Mohr, and C.S. Yang, *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, 2002. **11**(10 Pt 1): p. 1025-32.
95. Rodriguez-Delgado, M.A., S. Malovana, J.P. Perez, T. Borges, and F.J. Garcia Montelongo, *Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection*. J Chromatogr A, 2001. **912**(2): p. 249-57.
96. Wu, Q., M. Wang, and J.E. Simon, *Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004. **812**(1-2): p. 325-55.
97. Wang, C.C., J.K. Prasain, and S. Barnes, *Review of the methods used in the determination of phytoestrogens*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002. **777**(1-2): p. 3-28.
98. King, R.A. and D.B. Bursill, *Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans*. Am J Clin Nutr, 1998. **67**(5): p. 867-72.
99. Gamache, P.H. and I.N. Acworth, *Analysis of phytoestrogens and polyphenols in plasma, tissue, and urine using HPLC with coulometric array detection*. Proc Soc Exp Biol Med, 1998. **217**(3): p. 274-80.
100. Wang, G., S. Kuan, O. Francis, and G.a.C.A. Ware, *A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products*. J. Agric. Food Chem., 1990. **38**: p. 185-190.
101. Lee, M.J., Z.Y. Wang, H. Li, L. Chen, Y. Sun, S. Gobbo, D.A. Balentine, and C.S. Yang, *Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995. **4**(4): p. 393-9.
102. Umegaki, K., A. Sugisawa, K. Yamada, and M. Higuchi, *Analytical method of measuring tea catechins in human plasma by solid-phase extraction and HPLC with electrochemical detection*. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2001. **47**(6): p. 402-8.
103. Starp, C., *Intestinale Absorption von Flavan-3-olen - In vitro Studien an Bürstensaummembranvesikeln (BSMV) aus Schweinedünndarm*. Schriftenreihe Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften. 2003, IEL-Ernährungsphysiologie Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität.
104. Breidenassel, C., *Intestinale Verwertung von Flavan-3-olen - Perfusionstudie am isolierten Rattendünndarm*. Schriftenreihe Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften. 2007, IEL-Ernährungsphysiologie Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität.
105. Franke, A.A., L.J. Custer, C.M. Cerna, and K. Narala, *Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine*. Proc Soc Exp Biol Med, 1995. **208**(1): p. 18-26.
106. Coward, L., M. Kirk, N. Albin, and S. Barnes, *Analysis of plasma isoflavones by reversed-phase HPLC-multiple reaction ion monitoring-mass spectrometry*. Clin Chim Acta, 1996. **247**(1-2): p. 121-42.
107. Richelle, M., S. Pridmore-Merten, S. Bodenstab, M. Enslin, and E.A. Offord, *Hydrolysis of isoflavone glycosides to aglycones by beta-glycosidase does not alter*

- plasma and urine isoflavone pharmacokinetics in postmenopausal women.* J Nutr, 2002. **132**(9): p. 2587-92.
108. Setchell, K.D., M.S. Faughnan, T. Avades, L. Zimmer-Nechemias, N.M. Brown, B.E. Wolfe, W.T. Brashear, P. Desai, M.F. Oldfield, N.P. Botting, and A. Cassidy, *Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women.* Am J Clin Nutr, 2003. **77**(2): p. 411-9.
 109. Bell, J.R., J.L. Donovan, R. Wong, A.L. Waterhouse, J.B. German, R.L. Walzem, and S.E. Kasim-Karakas, *(+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine.* Am J Clin Nutr, 2000. **71**(1): p. 103-8.
 110. Baba, S., N. Osakabe, A. Yasuda, M. Natsume, T. Takizawa, T. Nakamura, and J. Terao, *Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers.* Free Radic Res, 2000. **33**(5): p. 635-41.
 111. Ishii, K., T. Furuta, and Y. Kasuya, *High-performance liquid chromatographic determination of quercetin in human plasma and urine utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003. **794**(1): p. 49-56.
 112. Unno, T., K. Tamemoto, F. Yayabe, and T. Kakuda, *Urinary excretion of 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone, a ring-fission metabolite of (-)-epicatechin, in rats and its in vitro antioxidant activity.* J Agric Food Chem, 2003. **51**(23): p. 6893-8.
 113. Henning, S.M., Y. Niu, N.H. Lee, G.D. Thames, R.R. Minutti, H. Wang, V.L. Go, and D. Heber, *Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement.* Am J Clin Nutr, 2004. **80**(6): p. 1558-64.
 114. Warden, B.A., L.S. Smith, G.R. Beecher, D.A. Balentine, and B.A. Clevidence, *Catechins are bioavailable in men and women drinking black tea throughout the day.* J Nutr, 2001. **131**(6): p. 1731-7.
 115. Khokhar, S. and S.G. Magnusdottir, *Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United kingdom.* J Agric Food Chem, 2002. **50**(3): p. 565-70.
 116. Pettigrew, J., *Tee-Das Handbuch für Teeenießer.* 1998, Köln: Benedikt Taschen Verlag GmbH.
 117. Izumi, T., M.K. Piskula, S. Osawa, A. Obata, K. Tobe, M. Saito, S. Kataoka, Y. Kubota, and M. Kikuchi, *Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans.* J Nutr, 2000. **130**(7): p. 1695-9.
 118. Rawel, H.M., S. Rohn, and J. Kroll, *Influence of a sugar moiety (rhamnosylglucoside) at 3-O position on the reactivity of quercetin with whey proteins.* Int J Biol Macromol, 2003. **32**(3-5): p. 109-20.
 119. Cassidy, A., *Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans.* J AOAC Int, 2006. **89**(4): p. 1182-8.
 120. Cassidy, A., J.E. Brown, A. Hawdon, M.S. Faughnan, L.J. King, J. Millward, L. Zimmer-Nechemias, B. Wolfe, and K.D. Setchell, *Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods.* J Nutr, 2006. **136**(1): p. 45-51.
 121. Franke, A.A., B.M. Halm, L.J. Custer, Y. Tatsumura, and S. Hebshi, *Isoflavones in breastfed infants after mothers consume soy.* Am J Clin Nutr, 2006. **84**(2): p. 406-13.
 122. Rowland, I., M. Faughnan, L. Hoey, K. Wahala, G. Williamson, and A. Cassidy, *Bioavailability of phyto-oestrogens.* Br J Nutr, 2003. **89 Suppl 1**: p. S45-58.

123. Tsangalis, D., G. Wilcox, N.P. Shah, and L. Stojanovska, *Bioavailability of isoflavone phytoestrogens in postmenopausal women consuming soya milk fermented with probiotic bifidobacteria*. *Br J Nutr*, 2005. **93**(6): p. 867-77.
124. Shelnutt, S.R., C.O. Cimino, P.A. Wiggins, and T.M. Badger, *Urinary pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2000. **9**(4): p. 413-9.
125. Zhang, Y., G.J. Wang, T.T. Song, P.A. Murphy, and S. Hendrich, *Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein differs among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity*. *J Nutr*, 1999. **129**(5): p. 957-62.
126. Sfakianos, J., L. Coward, M. Kirk, and S. Barnes, *Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats*. *J Nutr*, 1997. **127**(7): p. 1260-8.
127. Setchell, K.D., L. Zimmer-Nechemias, J. Cai, and J.E. Heubi, *Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life*. *Am J Clin Nutr*, 1998. **68**(6 Suppl): p. 1453S-1461S.
128. Irvine, C.H., N. Shand, M.G. Fitzpatrick, and S.L. Alexander, *Daily intake and urinary excretion of genistein and daidzein by infants fed soy- or dairy-based infant formulas*. *Am J Clin Nutr*, 1998. **68**(6 Suppl): p. 1462S-1465S.
129. Setchell, K.D., L. Zimmer-Nechemias, J. Cai, and J.E. Heubi, *Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula*. *Lancet*, 1997. **350**(9070): p. 23-7.
130. Yellayi, S., A. Naaz, M.A. Szewczykowski, T. Sato, J.A. Woods, J. Chang, M. Segre, C.D. Allred, W.G. Helferich, and P.S. Cooke, *The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: a human health concern?* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(11): p. 7616-21.
131. Patisaul, H.B., A.E. Fortino, and E.K. Polston, *Neonatal genistein or bisphenol-A exposure alters sexual differentiation of the AVPV*. *Neurotoxicol Teratol*, 2006. **28**(1): p. 111-8.
132. Clotfelter, E.D. and A.C. Rodriguez, *Behavioral changes in fish exposed to phytoestrogens*. *Environ Pollut*, 2006. **144**(3): p. 833-9.
133. Casanova, M., L. You, K.W. Gaido, S. Archibeque-Engle, D.B. Janszen, and H.A. Heck, *Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro*. *Toxicol Sci*, 1999. **51**(2): p. 236-44.
134. Zhu, M., Y. Chen, and R.C. Li, *Oral absorption and bioavailability of tea catechins*. *Planta Med*, 2000. **66**(5): p. 444-7.
135. Yoshino, K., M. Suzuki, K. Sasaki, T. Miyase, and M. Sano, *Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma*. *J Nutr Biochem*, 1999. **10**(4): p. 223-9.
136. Donovan, J.L., J.R. Bell, S. Kasim-Karakas, J.B. German, R.L. Walzem, R.J. Hansen, and A.L. Waterhouse, *Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine*. *J Nutr*, 1999. **129**(9): p. 1662-8.
137. Hong, J., H. Lu, X. Meng, J.H. Ryu, Y. Hara, and C.S. Yang, *Stability, cellular uptake, biotransformation, and efflux of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in HT-29 human colon adenocarcinoma cells*. *Cancer Res*, 2002. **62**(24): p. 7241-6.
138. Chen, J., H. Lin, and M. Hu, *Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal Caco-2 model*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005. **55**(2): p. 159-69.
139. O'Leary, K.A., A.J. Day, P.W. Needs, F.A. Mellon, N.M. O'Brien, and G. Williamson, *Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepat-*

- ic model: the role of human beta-glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism.* Biochem Pharmacol, 2003. **65**(3): p. 479-91.
140. Vaidyanathan, J.B. and T. Walle, *Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2.* J Pharmacol Exp Ther, 2003. **307**(2): p. 745-52.
141. Walgren, R.A., K.J. Karnaky, Jr., G.E. Lindenmayer, and T. Walle, *Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2.* J Pharmacol Exp Ther, 2000. **294**(3): p. 830-6.
142. Walle, U.K., K.L. French, R.A. Walgren, and T. Walle, *Transport of genistein-7-glucoside by human intestinal CACO-2 cells: potential role for MRP2.* Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1999. **103**(1): p. 45-56.
143. Morris, M.E. and S. Zhang, *Flavonoid-drug interactions: effects of flavonoids on ABC transporters.* Life Sci, 2006. **78**(18): p. 2116-30.
144. Gonthier, M.P., V. Cheyner, J.L. Donovan, C. Manach, C. Morand, I. Mila, C. Lapiere, C. Remesy, and A. Scalbert, *Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols.* J Nutr, 2003. **133**(2): p. 461-7.
145. Salah, N., N.J. Miller, G. Paganga, L. Tijburg, G.P. Bolwell, and C. Rice-Evans, *Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants.* Arch Biochem Biophys, 1995. **322**(2): p. 339-46.
146. Mulder, T.P., A.G. Rietveld, and J.M. van Amelsvoort, *Consumption of both black tea and green tea results in an increase in the excretion of hippuric acid into urine.* Am J Clin Nutr, 2005. **81**(1 Suppl): p. 256S-260S.
147. Swails, W.S., S.J. Bell, and G.L. Blackburn, *Glutamine content of whole proteins: implications for enteral formulas.* Nutr Clin Pract, 1992. **7**(3): p. 133-4.
148. Lacey, J.M. and D.W. Wilmore, *Is glutamine a conditionally essential amino acid?* Nutr Rev, 1990. **48**(8): p. 297-309.
149. van Boekel, M.A. and A.P. Arentsen-Stasse, *Determination of aromatic biogenic amines and their precursors in cheese by high-performance liquid chromatography.* J Chromatogr, 1987. **389**(1): p. 267-72.
150. Hahn, R., A. Wendel, and L. Flohe, *The fate of extracellular glutathione in the rat.* Biochim Biophys Acta, 1978. **539**(3): p. 324-37.
151. Baumrucker, C.R. and P.A. Pocius, *gamma-Glutamyl transpeptidase in lactating mammary secretory tissue of cow and rat.* J Dairy Sci, 1978. **61**(3): p. 309-14.
152. Kitchen, B.J., *A comparison of the properties of membranes isolated from bovine skim milk and cream.* Biochim Biophys Acta, 1974. **356**(3): p. 257-69.
153. Sobiech, K.A., E. Ziomek, and A. Szewczuk, *Purification and some properties of gamma-glutamyl transpeptidase from cow's milk.* Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1974. **22**(5): p. 645-56.
154. Curthoys, N.P. and R.P. Hughey, *Characterization and physiological function of rat renal gamma-glutamyltranspeptidase.* Enzyme, 1979. **24**(6): p. 383-403.
155. Heyland, D., R. Dhaliwalm, A. Day, J. Drover, H. Cote, and P. Wischmeyer, *Optimizing the dose of glutamine dipeptides and antioxidants in critically ill patients: a phase I dose-finding study.* JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2007. **31**(2): p. 109-118.
156. Kumar, S., R. Kumar, S.B. Sharma, and B.K. Jain, *Effect of oral glutamine administration on oxidative stress, morbidity and mortality in critically ill surgical patients.* Indian J Gastroenterol, 2007. **26**(2): p. 70-3.

157. Wang, Y.C., R.C. Yu, and C.C. Chou, *Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria*. Food Microbiol, 2006. **23**(2): p. 128-35.
158. Rufer, C.E. and S.E. Kulling, *Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(8): p. 2926-31.
159. Ruiz-Larrea, M.B., A.R. Mohan, G. Paganga, N.J. Miller, G.P. Bolwell, and C.A. Rice-Evans, *Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones*. Free Radic Res, 1997. **26**(1): p. 63-70.
160. Kyle, J.A., P.C. Morrice, G. McNeill, and G.G. Duthie, *Effects of Infusion Time and Addition of Milk on Content and Absorption of Polyphenols from Black Tea*. J Agric Food Chem, 2007.
161. Henning, S.M., Y. Niu, Y. Liu, N.H. Lee, Y. Hara, G.D. Thames, R.R. Minutti, C.L. Carpenter, H. Wang, and D. Heber, *Bioavailability and antioxidant effect of epigallocatechin gallate administered in purified form versus as green tea extract in healthy individuals*. J Nutr Biochem, 2005. **16**(10): p. 610-6.
162. Cao, G., E. Sofic, and R.L. Prior, *Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships*. Free Radic Biol Med, 1997. **22**(5): p. 749-60.
163. Stewart, A.J., W. Mullen, and A. Crozier, *On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(1): p. 52-60.
164. Shah, N.P., *Effects of milk-derived bioactives: an overview*. Br J Nutr, 2000. **84 Suppl 1**: p. S3-10.
165. Alberti-Fidanza, A., G. Burini, and G. Perriello, *Total antioxidant capacity of colostrum, and transitional and mature human milk*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2002. **11**(4): p. 275-9.
166. Hanna, N., K. Ahmed, M. Anwar, A. Petrova, M. Hiatt, and T. Hegyi, *Effect of storage on breast milk antioxidant activity*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2004. **89**(6): p. F518-20.
167. Turoli, D., G. Testolin, R. Zanini, and R. Bellu, *Determination of oxidative status in breast and formula milk*. Acta Paediatr, 2004. **93**(12): p. 1569-74.
168. Samman, S., P.M. Lyons Wall, G.S. Chan, S.J. Smith, and P. Petocz, *The effect of supplementation with isoflavones on plasma lipids and oxidisability of low density lipoprotein in premenopausal women*. Atherosclerosis, 1999. **147**(2): p. 277-83.
169. Nestel, P.J., S. Pomeroy, S. Kay, P. Komesaroff, J. Behrsing, J.D. Cameron, and L. West, *Isoflavones from red clover improve systemic arterial compliance but not plasma lipids in menopausal women*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(3): p. 895-8.
170. Hodgson, J.M., I.B. Puddey, K.D. Croft, T.A. Mori, J. Rivera, and L.J. Beilin, *Isoflavonoids do not inhibit in vivo lipid peroxidation in subjects with high-normal blood pressure*. Atherosclerosis, 1999. **145**(1): p. 167-72.
171. Rüfer, *Bioverfügbarkeit, Metabolismus und biologische Aktivität von Isoflavonen und deren Metaboliten*. 2005.
172. Patel, R.P., B.J. Boersma, J.H. Crawford, N. Hogg, M. Kirk, B. Kalyanaraman, D.A. Parks, S. Barnes, and V. Darley-Usmar, *Antioxidant mechanisms of isoflavones in lipid systems: paradoxical effects of peroxy radical scavenging*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(12): p. 1570-81.
173. Turner, R., T. Baron, S. Wolfram, A.M. Minihane, A. Cassidy, G. Rimbach, and P.D. Weinberg, *Effect of circulating forms of soy isoflavones on the oxidation of low density lipoprotein*. Free Radic Res, 2004. **38**(2): p. 209-16.

174. Arts, M.J., G.R. Haenen, H.P. Voss, and A. Bast, *Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein*. Food Chem Toxicol, 2001. **39**(8): p. 787-91.
175. Arts, M.J., G.R. Haenen, L.C. Wilms, S.A. Beetstra, C.G. Heijnen, H.P. Voss, and A. Bast, *Interactions between flavonoids and proteins: effect on the total antioxidant capacity*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(5): p. 1184-7.
176. Jobstl, E., J.R. Howse, J.P. Fairclough, and M.P. Williamson, *Noncovalent cross-linking of casein by epigallocatechin gallate characterized by single molecule force microscopy*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(12): p. 4077-81.
177. Luck, G., H. Liao, N.J. Murray, H.R. Grimmer, E.E. Warminski, M.P. Williamson, T.H. Lilley, and E. Haslam, *Polyphenols, astringency and proline-rich proteins*. Phytochemistry, 1994. **37**(2): p. 357-71.
178. Seeram, N.P., S.M. Henning, Y. Niu, R. Lee, H.S. Scheuller, and D. Heber, *Catechin and caffeine content of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant capacity*. J Agric Food Chem, 2006. **54**(5): p. 1599-603.
179. Cabrera, C., R. Gimenez, and M.C. Lopez, *Determination of tea components with antioxidant activity*. J Agric Food Chem, 2003. **51**(15): p. 4427-35.
180. Higdon, J.V. and B. Frei, *Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2003. **43**(1): p. 89-143.
181. Crespy, V. and G. Williamson, *A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models*. J Nutr, 2004. **134**(12 Suppl): p. 3431S-3440S.
182. van het Hof, K.H., H.S. de Boer, S.A. Wiseman, N. Lien, J.A. Weststrate, and L.B. Tijburg, *Consumption of green or black tea does not increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans*. Am J Clin Nutr, 1997. **66**(5): p. 1125-32.
183. Maxwell, S. and G. Thorpe, *Tea flavonoids have little short term impact on serum antioxidant activity*. Bmj, 1996. **313**(7051): p. 229.
184. McAnlis, G.T., J. McEneny, J. Pearce, and I.S. Young, *Black tea consumption does not protect low density lipoprotein from oxidative modification*. Eur J Clin Nutr, 1998. **52**(3): p. 202-6.

Anhang

Probanden-Nr.:

--	--	--	--	--

Studie „Isoflavon- und Catechingehalt sowie antioxidative Kapazität von Muttermilch vor und nach Intervention mit Sojamilch bzw. entkoffeinierten Schwarztee“

Vollständig / Abbruch

Gründe für den Abbruch /Nichtteilnahme (zur internen Verbesserung)

1. medizinischer Art (siehe unten)
(Unfall, signifikante Neuerkrankung)
2. privat
(Rauchen, life style, Diät, sonstige)
3. organisatorisch
(Transportschwierigkeiten, Verlust von Einwilligungen und Fragebögen, sonstige)
4. technisch
(Abstillen, Stillschwierigkeiten, Abstreichschwierigkeiten, sonstige)

Probanden-Nr.:

Ausschlusskriterien (telefonisch erfragt ja / nein):

Abstillen vor dem 27. Tag der Laktation

Regelmäßige Einnahme von Medikamenten (Antibiotika, Diuretika,

Schilddrüsenhormone) und Supplemente mit antioxidativen Substanzen (Vit. C, E, Carotinoiden)

Bekannte Erkrankungen der Leber, der Nieren, des Magen-Darm-Traktes

Vorliegen von Allergien und Stoffwechselerkrankungen (Laktoseintoleranz, Diabetes mellitus)

Vegetarische Ernährungsform

Reichlicher Teegeuss

Essstörungen (Anorexia nervosa, Bulimia nervosa)

Teilnahme an einer anderen Studie gleichzeitig oder innerhalb der letzten 30 Tage

Rauchen

BMI < 15 und > 30 postpartal

Probanden-Nr.:

Einwilligungserklärung

Das Original dieser Einwilligungserklärung verbleibt bei den Unterlagen. Eine Kopie der Einwilligungserklärung wird dem Patienten ausgehändigt.

Ich _____
(Vorname, Name)

Geburtsdatum: _____

erkläre, dass ich die Probandeninformation zur wissenschaftlichen Untersuchung:

„Isoflavon- und Catechingehalt sowie antioxidative Kapazität von Muttermilch vor und nach Intervention mit Sojamilch bzw. entkoffeinierten Schwarztee“

und diese Einwilligungserklärung erhalten, gelesen und verstanden habe.

- Ich wurde für mich ausreichend mündlich und schriftlich über die wissenschaftliche Untersuchung informiert.
- Ich erkläre, dass ich damit einverstanden bin, dass Muttermilch, welche entnommen wird und nicht für die Routineuntersuchung nötig ist, für die o. g. wissenschaftliche Untersuchung genutzt werden kann.
- Ich weiß, dass ich jederzeit meine Einwilligung, ohne Angaben von Gründen, widerrufen kann, ohne dass dies für mich nachteilige Folgen hat.
- Ich bin damit einverstanden, dass die im Rahmen der wissenschaftlichen Untersuchung über mich erhobenen Krankheitsdaten sowie meine sonstigen mit dieser Untersuchung zusammenhängenden personenbezogenen Daten aufgezeichnet werden. Es wird gewährleistet, dass meine personenbezogenen Daten nicht an Dritte weitergegeben werden. Bei der Veröffentlichung in einer wissenschaftlichen Zeitung wird aus den Daten nicht hervorgehen, wer an dieser Untersuchung teilgenommen hat. Meine persönlichen Daten unterliegen dem Datenschutzgesetz.**
- Mit der vorstehend geschilderten Vorgehensweise bin ich einverstanden und bestätige dies mit meiner Unterschrift.

_____, _____
(Ort) (Datum)

(Probandin)

_____, _____
(Ort) (Datum)

(Prüfarzt)

Probanden-Nr.:

Fragebogen für Probanden/Probandinnen

zur Studie „Isoflavon- und Catechingehalt sowie antioxidative Kapazität von Muttermilch vor und nach Intervention mit Sojamilch bzw. entkoffeinierten Schwarztee“

Name, Vorname : _____

Anschrift : _____

Telefonnummer : _____

E-mail-Adresse : _____

Geburtstag : _____

Körpergröße : _____

Körpergewicht : _____

Geb. Datum Kind _____

1. Laktationstag _____

Zwillinge/Einling _____

Raucher Nichtraucher

	Ja	Nein
Teilnahme an anderen Studien		
Nehmen Sie zurzeit an einer anderen klinischen Studie teil?		
Haben Sie für die Dauer der oben genannten Studie die Teilnahme an (einer) anderen klinischen Studie/n zugesagt?		
Haben Sie im letzten Monat an einer klinischen Studie teilgenommen?		
Ernährung		
Ernähren Sie sich vegetarisch?		
Konsumieren Sie täglich Sojaprodukte?		
Trinken Sie täglich mehr als 5-6 Tassen schwarzen oder grünen Tee?		
Trinken Sie täglich mehr als 5-6 Tassen Kaffee / Tee / Kakao?		
Konsumieren Sie täglich eine oder mehrere Tafel/n Schokolade?		
Trinken Sie mehr als ein Glas Wein oder eine Flasche Bier am Tag?		
Besteht bei Ihnen eine Allergie gegenüber dem Testgetränk?		
Sport		
Treiben Sie regelmäßig Sport?		
Wenn ja, wie oft? ca. Stunden pro Woche		

Probanden-Nr.:

	Ja	Nein
Stillzeit		
Stillen Sie?		
Medikamente		
Nehmen Sie regelmäßig Medikamente ein?		
Wenn ja, welche (Antibiotika, Diuretika, Schilddrüsenhormone)?		
Erkrankungen		
Leiden Sie an einer Essstörung?		
Besteht bei Ihnen eine Allergie (bestimmte Nahrungsmittel, Heuschnupfen etc)		
Wenn ja, gegen welche Stoffe (z B. Sojaweiß, Gräser- bzw. Getreidepollen)?		
Leiden Sie an einer Fructose-, Glucose- oder Laktose-Intoleranz?		
Leiden Sie an einem Diabetes mellitus (Zuckerkrankheit)?		
Leiden Sie an einer Erkrankung der Schilddrüse?		
Leiden Sie an einer Erkrankung des Magen-Darm-Traktes?		
Leiden Sie an einer Erkrankung der Bauchspeicheldrüse oder der Leber/Galle?		
Leiden Sie an Autoimmunerkrankungen (z.B. Morbus Addison, Lupus Erythematodes, Hashimoto Thyreoiditis, primäres Myxödem, Colitis Ulcerosa, Rheumatoide Arthritis)?		
Leiden Sie an sonstigen Erkrankungen des Immunsystems?		
Leiden Sie momentan unter einer Infektionskrankheit?		
Haben Sie sonstige gesundheitliche Probleme?		
Wenn ja, welcher Art?		
Sind Sie momentan in einer besonderen Stresssituation?		

Wir möchten Sie darauf hinweisen, dass alle Ihre Angaben der Schweigepflicht und dem Datenschutz unterliegen und streng vertraulich behandelt werden.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift

Probanden-Nr.: **Verzehr über 3 Tage**

Anzahl am:		
Sonnt ag	Mont ag	Dienst ag

Brot	in Scheiben		
Weißbrot, Toastbrot			
Mischbrot, Graubrot, Roggenbrot			
Vollkornbrot (z. B. Roggen-, Weizenvollkorn)			
Mehrkornbrot (z. B. Sechskorn-, Vierkorn)			
Knäckebrot, Zwieback			

Brötchen	in Stück		
Brötchen, Semmel (aus Weißmehl)			
Roggenbrötchen			
Vollkornbrötchen, Mehrkornbrötchen			
Hörnchen, Croissant			

Brotaufstrich, Butter, Margarine, Öl	in Teelöffeln		
Marmelade, Konfitüre, Gelee			
Honig			
Nussnougatcreme			
<small>Sorte / Name</small>			
Butter (auch zum Kochen / Braten)			
Margarine (auch zum Kochen / Braten)			
Öl (auch zum Kochen / Braten)			

Müsli, Getreidebrei	in Eßlöffeln oder Portionen		
Haferflocken (trocken, in Eßlöffeln)			
Gemischtes Müsli (trocken, in Eßlöffeln)			
Cornflakes (trocken, in Eßlöffeln)			
Milchbrei (z.B. Grieß-, Hafer-, Reisbrei) (in Portionen)			

Kuchen und Gebäck	in Stück		
Sahnetorte, Crèmetorte			
Kuchen ohne Füllung/ohne Belag (z. B. Marmor-, Hefekuchen)			
Kuchen mit Füllung/mit Belag (z. B. Käsekuchen)			
Obstkuchen (z. B. Apfelkuchen)			
Stückchen, Teilchen (z. B. Plunder, Blätterteiggebäck)			
Kekse, Plätzchen			

Probanden-Nr.:

Anzahl am:		
Sonn- tag	Mon- tag	Diens- tag

Käse, Milchprodukte, Milch (eine Portion entspricht dem Belag einer Scheibe Brot)	in Portionen oder Tassen		
Fettgehalt in %			
Quark (in Portionen)			
Friskäse (in Portionen)			
Hartkäse (z. B. Emmentaler, Gouda) (in Portionen)			
Weichkäse (z. B. Brie, Camembert) (in Portionen)			
Joghurt natur (im Becher à 150 g)			
Joghurt mit Früchten (im Becher à 150 g)			
Milch (in Tassen à 150 ml)			
Kakaogetränk (in Tassen à 150 ml)			
Buttermilch (in Tassen à 150 ml)			
Saure Sahne (im Becher à 150 g)			
Süße Sahne/Schlagsahne (im Becher à 150 g)			

Wurst (eine Portion entspricht dem Belag einer Scheibe Brot)	in Portionen oder Stück		
Fetteiche Wurst (z. B. Salami, Cervelat, Streichwurst) (in Port.)			
Fettarme Wurst (z. B. Geflügelwurst, Bierschinken) (in Portionen)			
Lyoner, Gelbwurst, Fleischwurst (in Portionen)			
Fleischkäse, Bratwurst, Wienerle (in Stück)			
Roher Schinken (in Portionen)			
Gekochter Schinken (in Portionen)			
Speck (in Portionen)			
Fleisch, Fisch, Eier	in Portionen oder Stück		
Zubereitung / Sorte			
Rindfleisch, Kalbfleisch (in Portionen)			
Schweinefleisch (in Portionen)			
Geflügelfleisch (in Portionen)			
Lamm-, Schaffleisch (in Portionen)			
Wild (in Portionen)			
Innereien (z. B. Leber, Niere) (in Portionen)			
Frikadelle (in Stück)			
Fisch (in Portionen)			
Eier (in Stück)			

Suppe, Eintopf	in Tellern		
Klare Suppe			

Probanden-Nr.:

Gebundene Suppe/Crèmesuppe			
Eintopf mit Fleisch/Wurst			
Eintopf ohne Fleisch, Gemüseintopf			

Anzahl am:		
Sonn- tag	Mon- tag	Diens- tag

Kartoffeln, Nudeln, Reis, Pizza	in Portionen oder Stück		
Pellkartoffeln, Salzkartoffeln (in Portionen)			
Kartoffelbrei (in Portionen)			
Bratkartoffeln (in Portionen)			
Kartoffelklöße (in Stück)			
Pommes frites, Kroketten (in Stück)			
Nudeln ohne Füllung (in Portionen)			
Nudeln mit Füllung (z. B. Ravioli) (in Portionen)			
Reis (in Portionen)			
Getreide (z. B. Hirse, Polenta) (in Portionen)			
Pfannkuchen (in Stück)			
Pizza (in Stück)			

Gemüse (roh (r) od. gekocht (g) bitte angeben), Salat	in Portionen		
Sorte			
Kohlgemüse			
Bohnen, Erbsen			
Salat (Eisberg-, Kopf-, Feldsalat...)			
Pilze			
Fenchel			
Gurke			
Karotten			
Kohlrabi			
Paprika			
Porree			
Spargel			
Spinat			
Tomate			
Zwiebel			
Chicoree			
Obst	in Stück oder Portionen		
Sorte			
Apfel, Birne (in Stück)			
Aprikose (in Stück)			
Beeren, Kirschen (süß od. sauer) (in			

Probanden-Nr.:

Portionen)			
Pflaumen (in Stück)			
Pfirsich, Nektarine (in Stück)			
Zitrusfrüchte (z. B. Orange) (in Stück)			

	Anzahl am:		
	Sonn- tag	Mon- tag	Diens- tag
Soßen, Salatsoßen	in Portionen		
Bratensoße			
Butter-, Sahnesoße			
Hackfleischsoße			
Tomatensoße			
Salatsoße (Essig / Öl)			

Süßwaren, Knabbereien, Nachspeisen	in Stück, Tassen, Eßlöffeln oder Portionen		
Schokolade, Pralinen (weiß, dunkel) (in Stück)			
Sonstige Süßwaren (Bonbons, Lakritz) (in Stück)			
Knabbergebäck (in Tassen à 150 ml)			
Nüsse, Pistazien (in Eßlöffeln)			
Trockenfrüchte (in Stück)			

Kaffee, Tee, Kondensmilch, Zucker	in Tassen à 150 ml oder Teelöffeln		
Kaffee (koffeinhaltig) (in Tassen à 150 ml)			
Kaffee (entkoffeiniert) (in Tassen à 150 ml)			
Malzkaffee/Zichorienkaffee (in Tassen à 150 ml)			
Kräutertee, Früchtetee (in Tassen à 150 ml)			
Schwarzer Tee, grüner Tee (in Tassen à 150 ml)			
Zucker (in Teelöffeln)			
Kaffeesaahne, Kondensmilch (in Teelöffeln)			

Bier	in Flaschen à 500 ml		
Bier (z. B. Pils, Alt, Kölsch)			
Alkoholfreies Bier			
Malzbier			

Probanden-Nr.:

Anzahl am:		
Sonn- tag	Mon- tag	Diens- tag

Lebensmittel, die nicht aufgeführt sind	Menge		

Probanden-Nr.:

--	--	--	--

Nennen Sie mir bitte alle Medikamente einschließlich Vitamin- und Mineralstoffsupplemente und Stärkungsmittel, die Sie regelmäßig einnehmen (in den letzten 7 Tagen täglich oder alle 2 Tage).

a) verordnete Medikamente	Dosierung

b) nicht verordnete Medikamente	Dosierung

c) Supplemente	Dosierung

d) Stärkungsmittel, Tonika	Dosierung

Wie wird das 3-Tage-Schätzprotokoll ausgefüllt?

Allgemeine Hinweise

- Bitte notieren Sie an drei aufeinander folgenden Tagen **was** und **wie viel** Sie gerade essen und trinken.
- Beginn ist der **kommende Sonntag**, der zweite Tag ist der **Montag** und der dritte Tag ist der **Dienstag**.
- Halten Sie bitte diese Tage genau ein, damit wir Ihre Angaben mit denen der anderen Studienteilnehmer vergleichen können.

Bitte essen und trinken Sie an den 3 Tagen genauso wie immer!!!

Wie soll notiert werden?

- **Tragen Sie bitte grundsätzlich alles ein, was Sie verzehren**, d. h. alle Speisen und Getränke (auch Wasser zur Einnahme von Medikamenten, Milch und Zucker für den Kaffee oder Tee), Süßigkeiten und andere Kleinigkeiten zwischendurch und auch Präparate (z. B. Vitamin-, Mineralstoffpräparate, Stärkungsmittel) sowie Medikamente.
- Suchen Sie ein verzehrtes Lebensmittel in der entsprechenden **Lebensmittelgruppe** (z. B. Marmelade in der Gruppe *Brotaufstrich*).
- Schätzen Sie die **Menge** bitte gut ab und machen Sie in der Spalte **Anzahl** entweder für jede Portion einen Strich oder notieren Sie eine Ziffer (z. B. für 3 Scheiben Mischbrot entweder 3 Striche oder eine „3“ eintragen).
- Für die einzelnen Lebensmittel sind jeweils die gewöhnlichen **Maßeinheiten** angegeben. So wird Brot in *Scheiben* angegeben, Kuchen in *Stück*, Kaffee in *Kaffeetassen* und Bier in *Flaschen à 0,5 l*.
- Hat man eine **kleinere Portion** als angegeben gegessen bzw. getrunken (z. B. _ Teller Nudeln oder _ Apfel), trägt man einfach _ oder _ ein.
- Gerichte/Lebensmittel, die Sie **nicht in der Liste** finden können (z. B. Pommes Frites), tragen Sie bitte unter *Lebensmittel, die nicht aufgeführt sind* mit möglichst genauer Portionsangabe ein.

Tips

- Notieren Sie am besten **während oder direkt nach der Mahlzeit**.
- Am einfachsten ist es, wenn man den **Fragebogen immer dabei** hat, auch im Restaurant, bei Verwandten oder Freunden. So kann nichts vergessen werden.

- **Am Abend sollte man noch einmal über den vergangenen Tag nachdenken** - am besten mit der Liste in der Hand - ob etwas vergessen wurde und sollte das dann noch eintragen.
- Wenn möglich sollten **Gerichte zerlegt werden**, z. B. Spaghetti Bolognese in *Nudeln ohne Füllung* (Spaghetti) und in *Hackfleischsoße*.

Beispiele

- Sie essen am Sonntagmorgen 2 Scheiben Mischbrot mit Quark und Marmelade und trinken dazu 3 Tassen schwarzen Kaffee.

Anzahl am:		
Sonnt ag	Mont ag	Diens tag

Brot	in Scheiben		
Mischbrot, Graubrot, Roggenbrot			

Brotaufstrich, Butter, Margarine	in Teelöffeln		
Marmelade, Konfitüre, Gelee			

Käse, Milchprodukte, Milch	in Portionen		
(eine Portion entspricht dem Belag einer Scheibe Brot)			
	Fettgehalt in %		
Quark, Frischkäse (in Portionen)		

Kaffee, Tee, Kondensmilch, Zucker	in Tassen à 150 ml		
Kaffee (koffeinhaltig)			

- Sie essen am Montagabend 1 Frühlingsrolle und eine Portion Kopfsalat mit Dressing

Lebensmittel, die nicht aufgeführt sind	Maßeinheit notieren		

Gemüse, Salat	in Portionen		
	Sorte		
Grüner Salat/Blattsalat		

Soßen	in Portionen		
Salatsoße (Essig/Öl)			