

**Untersuchung der Plasmakinetik und des Metabolismus von L-Theanin bei gesunden
Probanden nach Bolusgabe von isoliertem L-Theanin und Grüntee**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft
(Dr.oec.troph.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

genehmigte Dissertation

vorgelegt am 18. Januar 2013

von

Lisa Scheid

aus Aachen

Referent:	Prof. Dr. Peter Stehle
Koreferentin:	Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein
Tag der mündlichen Prüfung:	21.06.2013
Erscheinungsjahr:	2013

Meinen Eltern

Kurzfassung: Untersuchung der Plasmakinetik und des Metabolismus von L-Theanin bei gesunden Probanden nach Bolusgabe von isoliertem L-Theanin und Grüntee

Hintergrund: L-Theanin (5-N-Ethyl-L-Glutamin) ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die v.a. durch den Verzehr von Tee (*Camellia sinensis*) aufgenommen wird. Da L-Theanin die kognitive Leistungsfähigkeit und die Gemütslage verbessern soll, wird L-Theanin in isolierter Form als Nahrungsergänzungsmittel Suntheanine[®] hergestellt und in funktionellen Getränken zugesetzt. Als Metabolite von L-Theanin werden Ethylamin und Glutaminsäure betrachtet, basierend auf tierexperimentellen Studien. Daten zum Metabolismus von L-Theanin im menschlichen Organismus fehlen. Daher sollte die vorliegende Studie klären, ob die Bolusgabe von 100 mg L-Theanin in isolierter Form und in Form von Grüntee zu einer Konzentrationsänderung von L-Theanin, Ethylamin, Glutaminsäure u.a. proteinogener Aminosäuren in Plasma, Erythrozyten und Urin von gesunden Probanden führt.

Methode: In einer randomisierten Crossover-Studie erhielten 12 gesunde Probanden morgens nüchtern 100 mg L-Theanin in isolierter Form als Kapsel (Suntheanine[®]) und nach einer zweiwöchigen Washout-Phase dieselbe Dosis in Form von 250 ml Grüntee. An zwei weiteren Studientagen erhielten drei Probanden zusätzlich jeweils 50 mg und 200 mg L-Theanin als Kapsel. Am jeweiligen Untersuchungstag wurden 8 Blutentnahmen durchgeführt (vor sowie 0,5 h, 0,75 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h und 24 h nach Bolusgabe) und die Probanden sammelten Nüchtern- und 24-Stunden-Urin. Die Konzentration von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin in Plasma, Erythrozyten und Urin wurde nach Vorsäulenderivatisierung mittels reversed-phase HPLC analysiert. Die Konzentrations-Zeit-Kurven von L-Theanin im Plasma wurden mit Hilfe eines Ein-Kompartiment-Modells simuliert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS 19.0.

Ergebnisse: Die Konzentration von L-Theanin im Plasma stieg nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin an und erreichte nach 24 h wieder die Konzentration zur Baseline. Dabei war die Plasmakinetik von L-Theanin nach Aufnahme beider Studienprodukte vergleichbar und die maximale Plasmakonzentration von L-Theanin wurde 0,8 h nach Aufnahme von Kapsel ($24,3 \pm 5,7 \mu\text{mol/l}$) und Grüntee ($26,5 \pm 5,2 \mu\text{mol/l}$) erreicht. Das berechnete Verteilungsvolumen von 16 bis 17 Litern lässt eine Verteilung von L-Theanin in die peripheren Gewebe und gut durchbluteten Organe vermuten. Der Verzehr beider Studienprodukte führte außerdem zu einem Konzentrationsanstieg von L-Theanin in den Erythrozyten – bis 24 h nach Bolusgabe – und zu einer renalen Ausscheidung von L-Theanin. Die Konzentration von Ethylamin und Glutaminsäure im Plasma stieg nach Intervention ebenfalls an und beide Substanzen wurden mit dem 24-Stunden-Urin ausgeschieden. Die AUC von L-Theanin und Ethylamin im Plasma sowie L-Theanin in den Erythrozyten änderte sich dosisabhängig nach Aufnahme von 50 mg, 100 mg und 200 mg isoliertem L-Theanin. Die Konzentration anderer proteinogener Aminosäuren in Plasma, Erythrozyten und Urin blieb unverändert. Auf Grundlage der ausgeschiedenen Stoffmenge von L-Theanin und Ethylamin im Urin sowie der kinetischen Parameter von L-Theanin im Plasma scheint die Bioverfügbarkeit von L-Theanin zwischen 52% und 74% zu liegen.

Schlussfolgerung: L-Theanin wird nach Aufnahme von Kapsel und Grüntee rasch resorbiert und scheint größtenteils zu Ethylamin und Glutaminsäure hydrolysiert zu werden, welche mit dem Urin ausgeschieden werden. Ein geringer Anteil von L-Theanin wird intrazellulär retiniert. Plasmakinetik und Metabolismus von L-Theanin sind nach Aufnahme beider Studienprodukte vergleichbar, so dass nach Grünteeverzehr – in Hinblick auf die funktionellen Wirkungen von L-Theanin – vergleichbare Effekte eintreten können wie nach Konsum von isoliertem L-Theanin. Die diskutierten funktionellen Wirkungen von L-Theanin sind demnach möglich, könnten jedoch auch durch potenzielle Endprodukte des Metabolismus von L-Theanin erklärt werden. Da Glutamin im menschlichen Organismus aus Glutaminsäure synthetisiert wird, könnte L-Theanin zudem eine alternative Glutaminquelle für kritisch Kranke darstellen.

Abstract: Kinetics of L-Theanine uptake and metabolism in healthy participants after ingestion of L-Theanine via capsules and green tea

Background: L-Theanine (5-N-ethyl-L-glutamine) is a non-proteinogenic amino acid primarily ingested by tea (*Camellia sinensis*). Since L-Theanine is suggested to improve cognition and mood, L-Theanine is available as a nutritional supplement and is now used as an ingredient in functional drinks. In rats, ethylamine and glutamic acid increased in plasma and urine after L-Theanine intake. Since data on the metabolic fate of L-Theanine from human studies are lacking, the present study investigated the kinetics of L-Theanine uptake and its metabolites ethylamine and glutamic acid in plasma and erythrocytes as well as their urinary excretion after bolus intake of capsules and green tea in healthy participants.

Methods: Within a randomized crossover trial, 12 participants ingested a bolus of 100 mg L-Theanine after an overnight fast, either in isolated form via capsules (Suntheanine®) or via 250 mL green tea. On further occasions, three participants received an additional bolus of 50 mg and 200 mg L-Theanine via capsules, respectively. All treatments were separated by a washout period of 2 weeks. On each study day, blood and urine were collected before and up to 24 h post consumption (blood: 0.5 h, 0.75 h, 1 h, 1.5 h, 2 h, 3 h and 24 h) to determine the concentration of L-Theanine, proteinogenic amino acids, and of ethylamine in plasma, erythrocytes, and in urine by reversed-phase HPLC following pre-column derivatization. Each plasma concentration-time curve of L-Theanine was fitted using a 1-compartment model. Statistical analysis was performed using SPSS 19.0.

Results: In plasma, L-Theanine concentration increased time-dependently and returned to baseline 24 h after intake of 100 mg L-Theanine, with similar plasma kinetics after both treatments. Maximum plasma concentration of L-Theanine occurred 0.8 h after intake of 100 mg L-Theanine via capsules ($24.3 \pm 5.7 \mu\text{mol/L}$) and tea ($26.5 \pm 5.2 \mu\text{mol/L}$), respectively. It can be assumed that L-Theanine is not only distributed in plasma, but also in further tissues with regard to the hypothetical distribution volume of 16 - 17 liter. Furthermore, L-Theanine increased in erythrocytes and was excreted by urine with comparable results after both treatments. Ethylamine and glutamic acid increased in plasma and were excreted by urine after intake of capsules and tea. The AUC of L-Theanine and ethylamine in plasma as well as L-Theanine in erythrocytes increased dose-dependently after intake of 50 mg, 100 mg, and 200 mg L-Theanine via capsules. Other proteinogenic amino acids in plasma, erythrocytes and urine were not affected. Considering the renal excretion of L-Theanine and ethylamine within 24 h and the maximum plasma concentration of L-Theanine in plasma with regard to the distribution volume, 52% - 74% of ingested L-Theanine should reach the organism, respectively.

Conclusion: L-Theanine is rapidly absorbed in healthy participants after intake of capsules and green tea. The major part of L-Theanine seems to be hydrolyzed to ethylamine and glutamic acid, which are excreted by urine. A minor part of L-Theanine is retained in erythrocytes. Kinetics and urinary excretion of L-Theanine, ethylamine, and glutamic acid are comparable after intake of capsules and green tea. Thus, functional effects of L-Theanine intake are plausible and may result from L-Theanine, ethylamine, glutamic acid, or other by-products of the metabolism of L-Theanine. As glutamic acid is converted to glutamine, future studies should investigate if L-Theanine may be an alternative source of glutamine which is essential for critically ill patients.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Vorkommen und Struktur von Theanin.....	2
2.2 Theaninaufnahme	3
2.3 Absorption, Metabolismus und Ausscheidung von Theanin	4
2.3.1 <i>In vitro</i> -Untersuchungen und Tierstudien	4
2.3.2 Humanstudie.....	7
2.4 Funktionelle Wirkungen von Theanin	8
3 Zielsetzung	10
4 Material und Methoden	11
4.1 Studiendesign	11
4.2 Intervention	11
4.3 Probanden	13
4.3.1 Ein- und Ausschlusskriterien	13
4.3.2 Fallzahlabeschätzung	14
4.4 Durchführung.....	15
4.4.1 Blutentnahmen und Aufbereitung der Blutproben.....	16
4.4.2 Urinsammlung und Aufbereitung der Urinproben	17
4.5 Analytik von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin.....	17
4.6 Statistik	26
4.6.1 Simulation der Plasmakinetik von L-Theanin im Ein-Kompartiment-Modell	26
4.6.2 Kinetik der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin	28
4.6.3 Analytische Statistik	28

5	Ergebnisse	30
5.1	Probanden und Compliance.....	30
5.2	Simulation der Plasmakinetik von L-Theanin im Ein-Kompartiment-Modell	30
5.3	Änderungen des Aminosäureprofils in Plasma, Erythrozyten und Urin.....	36
5.3.1	Plasma.....	36
5.3.2	Erythrozyten.....	41
5.3.3	Urin	43
6	Diskussion.....	45
6.1	Plasmakinetik von L-Theanin	45
6.2	Metabolismus von L-Theanin	49
6.3	Schlussbetrachtung	51
7	Zusammenfassung	56
8	Literaturverzeichnis.....	58
9	Anhang	64

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (area under the curve)
AUC ₇₀	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, korrigiert auf ein Körpergewicht von 70 kg
BMI	Body Mass Index
C _{max}	Maximale Konzentration
C _{max,70}	Maximale Konzentration, korrigiert auf ein Körpergewicht von 70 kg
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
GRAS	Generally Recognized as Safe
γ-GTP	γ-Glutamyltranspetidase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.Tr.	in Trockenmasse
MW	Mittelwert
3-MPA	3-Mercaptopropionsäure
<i>n</i>	Stichprobenumfang
Nva	L-Norvalin
OPA	ortho-Phtaldialdehyd
<i>r</i>	Korrelationskoeffizient
RQ	Quadratsumme der Residuen
RP	Reversed-phase
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SSA	5-Sulfosalicylsäure
<i>t</i> _{lag}	Time lag bzw. Verzögerungszeit
<i>t</i> _{max}	Zeitpunkt bis zum Erreichen der maximalen Konzentration
<i>t</i> _{1/2,a}	Absorptionshalbwertszeit
<i>t</i> _{1/2,e}	Eliminationshalbwertszeit
V _{hyp}	Hypothetisches Verteilungsvolumen
vs.	Versus

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Metabolismus von L-Theanin bei Ratten	5
Tabelle 2: Stoffmengen von L-Theanin, Ethylamin und Glutaminsäure im Urin von Ratten...	7
Tabelle 3: Dosis an L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin in einer Kapsel Suntheanine® und 250 ml Grüntee	13
Tabelle 4: Geräte und Materialien.....	18
Tabelle 5: Modellparameter für die Simulation der Konzentrations-Zeit-Kurve von L-Theanin im Plasma nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel und Grüntee	30
Tabelle 6: Plasmakinetik von L-Theanin nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel und Grüntee	35
Tabelle 7: Plasmakinetik von L-Theanin, Ethylamin und Glutaminsäure nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel und Grüntee	40
Tabelle 8: Kinetische Parameter von L-Theanin in den Erythrozyten nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel und Grüntee	42
Tabelle 9: Stoffmengen von L-Theanin, Glutaminsäure und Ethylamin im Urin nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel und Grüntee	43
Tabelle 10: Stoffmengen von L-Theanin, Ethylamin und Glutaminsäure im Urin nach Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg L-Theanin als Kapsel	44
Tabelle 11: Mittelwerte der Modellparameter	47
Tabelle 12: Stoffmengen von L-Theanin und Ethylamin in Plasma und 24-Stunden-Urin.....	50

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Theaninsynthese in der Teepflanze	2
Abbildung 2: Ungemahlener und gemahlener Grüntee	12
Abbildung 3: Studienablauf.....	16
Abbildung 4: Chromatogramm der Standardlösung	20
Abbildung 5: Chromatogramm des Inhalts einer Kapsel Suntheanine®	21
Abbildung 6: Chromatogramm des Grüntees Lung Ching.....	21
Abbildung 7: Chromatogramme von Plasmaproben, gewonnen vor (A) und 1 h nach Bolusgabe (B) von 100 mg L-Theanin als Kapsel.....	22
Abbildung 8: Chromatogramme von Erythrozytenhämolsat, gewonnen vor (A) und 1 h nach Bolusgabe (B) von 100 mg L-Theanin als Grüntee	23
Abbildung 9: Chromatogramm einer Urinprobe, gewonnen 0 - 3 h nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel.....	24
Abbildung 10: Simulierte Konzentrations-Zeit-Kurven und Messwerte von L-Theanin im Plasma nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel	33
Abbildung 11: Simulierte Konzentrations-Zeit-Kurven und Messwerte von L-Theanin im Plasma nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Grüntee	35
Abbildung 12: Konzentration von L-Theanin im Plasma nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel (A) und Grüntee (B).....	36
Abbildung 13: Konzentration von L-Theanin im Plasma nach Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg L-Theanin als Kapsel	37
Abbildung 14: Konzentration von Ethylamin und Glutaminsäure im Plasma nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel (A und C) und Grüntee (B und D).....	39
Abbildung 15: Konzentration von Ethylamin im Plasma nach Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg L-Theanin als Kapsel	39
Abbildung 16: Konzentration von L-Theanin in den Erythrozyten nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel (A) und Grüntee (B).....	41
Abbildung 17: Konzentration von L-Theanin in den Erythrozyten nach Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg L-Theanin als Kapsel.....	42
Abbildung 18: Simulation der dosis- und zeitabhängigen Konzentration von L-Theanin im Plasma bis 4 h (A) bzw. 12 h (B) nach Aufnahme von L-Theanin	48
Abbildung 19: Absorption, Metabolismus und Ausscheidung von L-Theanin	53
Abbildung 20: Mögliche Endprodukte des Metabolismus von L-Theanin	55

1 Einleitung

Theanin (5-N-Ethyl-Glutamin) ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die natürlicherweise in der Teepflanze (*Camellia sinensis*) [1] und im Maronenröhrling (*Xerocomus badius*) [2] vorkommt. In den Teeblättern macht ihr Anteil an der Summe aller Aminosäuren bis zu 50% aus, so dass Theanin v.a. durch den Verzehr von grünem, weißem, schwarzem und Oolong-Tee aufgenommen wird [3-5]. Eine Tasse Grüntee (150 ml) enthält etwa 31 mg Theanin [6], wobei es sich vorrangig um das L-Enantiomer des Theanins handelt [7]. L-Theanin in isolierter Form wird in Japan, Taiwan, den USA und Kanada seit Ende der 90er Jahre als Nahrungsergänzungsmittel Suntheanine[®] hergestellt und ist seitdem auch in Deutschland erhältlich. Da L-Theanin die kognitive Leistungsfähigkeit und die Gemütslage beim Menschen verbessern soll, wird Suntheanine[®] in Asien, den USA und Kanada zudem in funktionellen Getränken zugesetzt [8].

In Deutschland ist die Anreicherung von Lebensmitteln mit L-Theanin nicht erlaubt, da die bisher publizierten Daten bzgl. erwünschter und unerwünschter Wirkungen einer Aufnahme von isoliertem L-Theanin unzureichend sind und damit eine Risikobewertung nicht möglich ist [9]. Anträge auf Zulassung von Health Claims bzgl. L-Theanin wurden im Jahr 2011 von der European Food Safety Authority abgelehnt, da die leistungs- und entspannungsfördernden Wirkungen von L-Theanin beim Menschen nicht ausreichend belegt waren [10]. Auch wenn im Jahr 2010 erste Daten zur Plasmakinetik von L-Theanin beim Menschen publiziert wurden [11], sind darüber hinaus Informationen zum Metabolismus von L-Theanin im menschlichen Organismus erforderlich, um die Wirksamkeit von L-Theanin bewerten zu können. Bisher liegen jedoch ausschließlich tierexperimentelle Daten zum Metabolismus von L-Theanin vor. Ziel der vorliegenden Studie war daher, die Plasmakinetik, den Metabolismus und die Ausscheidung von L-Theanin bei gesunden Probanden zu untersuchen.

2 Literaturübersicht

2.1 Vorkommen und Struktur von Theanin

Theanin (5-N-Ethyl-Glutamin) ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die bisher ausschließlich in der Teepflanze (*Camellia sinensis*) [1] und im Maronenröhrling (*Xerocomus badius*) [2] nachgewiesen wurde.

In der Wurzel der Teepflanze wird Theanin durch die Theaninsynthetase aus Ethylamin und Glutaminsäure synthetisiert (Abbildung 1). Ethylamin entsteht durch Decarboxylierung von Alanin, katalysiert durch die Alanindecarboxylase [12].

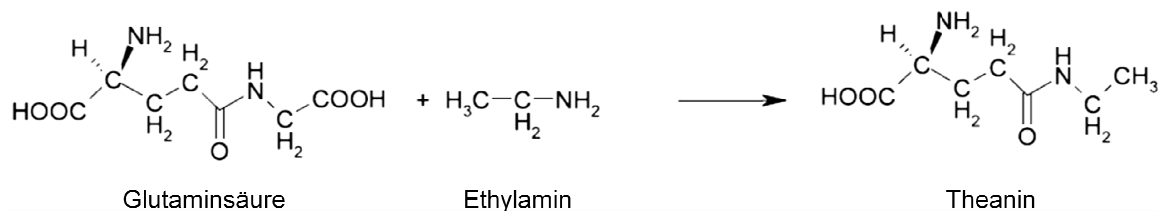


Abbildung 1: Theaninsynthese in der Teepflanze.

Theanin dient der Teepflanze zur Speicherung und zum Transport von Stickstoff [13]. Nach der Synthese gelangt Theanin in die Sprossspitzen der Pflanze und reichert sich in den Teeblättern an. Dort macht ihr Anteil bis zu 50% an der Summe aller Aminosäuren aus [3-5]. Der maximale Theaningehalt in den Teeblättern wird 45 Tage nach Pflanzung der Setzlinge erreicht. Danach wird Theanin wieder zu Ethylamin und Glutaminsäure abgebaut, so dass am 90. Tag nach der Pflanzung nur noch 20% des maximalen Theaningehaltes in den Teeblättern nachweisbar waren [14].

Neben der Funktion als Stickstofflieferant wird Theanin in den Teeblättern für die Synthese von Flavanolen benötigt. Hierbei wird der N-Ethyl-Kohlenstoff des Theanins in einer lichtabhängigen Reaktion in das Phloroglucinol-Gerüst (A-Ring) des Catechins eingebaut [15].

Der Ablauf der Theaninsynthese und die Funktion des Theanins im Maronenröhrling sind noch nicht geklärt. Daten zum Theaningehalt im Maronenröhrling fehlen.

2.2 Theaninaufnahme

Theanin wird wahrscheinlich vorrangig durch den Verzehr von grünem, weißem, schwarzem und Oolong-Tee aufgenommen. Die Teepflanze enthält fast ausschließlich L-Theanin; während das D-Enantiomer lediglich 1,8% des Gesamttheanins ausmacht [7]. Daher wurde in den Studien zum Theaningehalt im Tee(-aufguss) nicht zwischen den Enantiomeren differenziert. In den bisher veröffentlichten Studien zur funktionellen Wirkung von Theanin wurde ausschließlich L-Theanin verabreicht und untersucht.

Der Gehalt von Theanin in den Teeblättern wird durch den Welkvorgang und die weitere Verarbeitung des Tees beeinflusst. Unterschiede im Theaningehalt bei fermentiertem und halb bzw. nicht fermentiertem Tee wurden dabei jedoch nicht beobachtet [3-5]. Die Konzentration von Theanin im Teeaufguss hängt neben der Teesorte auch von der Zubereitung (Einwaage der Teeblätter, Ziehzeit, Wassertemperatur und -volumen) ab. Ein Teeaufguss, zubereitet aus 2,5 g Grüntee (1,5% Theanin i.Tr.) und 150 ml kochendem Wasser, enthält nach einer Ziehzeit von 5 Minuten etwa 31 mg Theanin [6]. Die Konzentration von Theanin in den Aufgüssen von 66 verschiedenen Grün- und Schwarztees, die laut Herstellerempfehlung zubereitet wurden, lag zwischen 5,4 mg/l und 161,3 mg/l. Die höchste Theaninkonzentration wurde im Aufguss der Grünteesorte Lung Ching nachgewiesen, wobei die mittlere Theaninkonzentration von Grün- und Schwarztee vergleichbar war [16]. Aufgrund der Variabilität der Theaninkonzentration im Teeaufguss liegen keine Angaben zur Höhe der täglichen Theaninaufnahme durch den Verzehr von Tee vor.

L-Theanin wird in Japan, Taiwan, den USA und Kanada seit Ende der 90er Jahre als Nahrungsergänzungsmittel Suntheanine[®] vermarktet [8]. Dieses Produkt enthält ausschließlich das L-Enantiomer des Theanins, welches aus Ethylamin und Glutaminsäure durch eine bakterielle Glutaminase (*Pseudomonas nitroreducens*) synthetisiert wird [17]. In den USA hat Suntheanine[®] im Jahr 2007 den GRAS-Status erhalten (Generally Recognized as Safe) und wird seitdem als Geschmacksverstärker in Lebensmitteln wie Keksen, Eiscreme, Kaugummi und Schokolade eingesetzt [8]. Da L-Theanin die kognitive Leistungsfähigkeit und die Gemütslage verbessern soll, wird Suntheanine[®] zudem in funktionellen Getränken zugesetzt. In den USA ist der L-Theaningehalt dieser Getränke auf 250 mg/Portion limitiert [8], während es in Japan keine Höchstmengen gibt [18].

2.3 Absorption, Metabolismus und Ausscheidung von Theanin

2.3.1 *In vitro*-Untersuchungen und Tierstudien

In vitro Studien an Segmenten des Schweinedünndarms zeigten, dass L-Theanin durch einen Na⁺-gekoppelten Symporter absorbiert wird. Dieser Symporter befördert auch Glutamin durch die Membran, wobei seine Affinität zu Glutamin 7-fach höher war als zu L-Theanin [19].

- **Plasmakinetik und Verteilung**

Nach oraler Gabe von 100 mg bis 1000 mg isoliertem L-Theanin (Suntheanine®) stieg die Plasmakonzentration von L-Theanin bei Ratten dosisabhängig an [20,21]. Auch die intragastrale Gabe von 440 mg L-Theanin führte bei Ratten zu einem Anstieg der L-Theaninkonzentration im Plasma [22]. Dabei wurde die maximale Plasmakonzentration von L-Theanin 0,5 h nach oraler Aufnahme [20, 21] und 1 h nach intragastraler Gabe von L-Theanin [22] erreicht.

Über das Blut gelangt L-Theanin in periphere Organe und Gewebe. Bei intraperitonealer Injektion von ¹⁴C-markiertem L-Theanin bei Mäusen (18 - 20 g, *n* = 4) war L-Theanin bereits nach 0,25 h im Gehirn der Tiere nachweisbar [23]. In einer Studie mit Ratten (90 - 110 g, *n* = 6) führte die intragastrale Applikation von 440 mg L-Theanin zu einem Anstieg der L-Theaninkonzentration in Leber und Gehirn im Vergleich zur Baseline. Die maximale Konzentration von L-Theanin in der Leber wurde 1 h nach Applikation erreicht, im Gehirn der Tiere nach 5 h. Nach 24 h erreichte die Konzentration von L-Theanin in Plasma, Leber und Gehirn wieder die Konzentration zur Baseline [22]. In einer weiteren Studie mit Ratten (150 g, *n* = 6) führte die intragastrale Applikation von 150 mg, 300 mg und 600 mg isoliertem L-Theanin zu einem dosisabhängigen Konzentrationsanstieg von L-Theanin im Gehirn, bei einer gleichzeitigen Abnahme von Phenylalanin, Threonin und Tyrosin. Dies weist darauf hin, dass L-Theanin mit diesen Aminosäuren um den Transporter für neutrale L-Aminosäuren zur Passage der Blut-Hirn-Schranke konkurrieren könnte [24].

- **Metabolismus**

Ethylamin und Glutaminsäure werden als Metabolite von L-Theanin betrachtet. Die orale Aufnahme von 100 mg, 200 mg und 400 mg L-Theanin führte bei Ratten (110 - 140 g, *n* = 6) zu einem dosisabhängigen Anstieg der Konzentration von Ethylamin im Plasma [20]. Dabei wurde die maximale Plasmakonzentration von Ethylamin 2 h nach Aufnahme von 400 mg

L-Theanin erreicht und war um das 1,4-fache geringer als die C_{\max} von L-Theanin im Plasma [20]. Auch nach intragastraler Applikation von 440 mg L-Theanin stieg die Konzentration von Ethylamin und Glutaminsäure in Plasma, Leber und Gehirn von Ratten an, ebenso die Glutaminkonzentration im Gehirn der Tiere. Hier war die maximale Konzentration von Ethylamin und Glutaminsäure im Plasma, Leber und Gehirn ebenfalls um das 3- bis 13-fache geringer als die C_{\max} von L-Theanin [22].

Tabelle 1 zeigt den Metabolismus von L-Theanin nach Bolusgabe von L-Theanin, basierend auf tierexperimentellen Untersuchungen.

Tabelle 1: Metabolismus von L-Theanin bei Ratten.

	<i>n</i>	L-Theanin [mg]	Untersuchung		Ergebnisse		
			Substanz	Probe	Effekt	C_{\max} [$\mu\text{mol/l}$] ¹	t_{\max} [h]
Unno et al. 1999 [20]	6	oral: 100,200,400	L-Theanin	Plasma	↑ _D	4500 (400 mg)	0,5 (400 mg)
			Ethylamin		↑ _D	3200 (400 mg)	2 (400 mg)
Terashima et al. 1999 [22]	6	intragastral: 440	L-Theanin	Plasma	↑	1300	1
			Ethylamin		↑	250	5
			Glutaminsäure		↑	100	1
			L-Theanin	Leber	↑	3000	1
			Ethylamin		↑	850	5
			Glutaminsäure		↑	750	2
			L-Theanin	Gehirn	↑	1500	5
			Ethylamin		↑	600	5
			Glutaminsäure		↑	1500	8
Glutamin	↑	7500	5				
Desai et al. 2005 [21]	3	oral: 250,500,1000	L-Theanin	Plasma	↑ _D	3500 (500 mg)	0,5 (500 mg)

¹Konzentrationen sind gerundete Angaben [$\mu\text{mol/l}$], basierend auf den Konzentrations-Zeit-Kurven der jeweiligen Studie. ↑ Konzentrationsanstieg im Vergleich zur Baseline; ↑_D, Dosisabhängiger Konzentrationsanstieg.

In vitro Studien mit dem Nierenhomogenat von Ratten zeigten, dass die Zugabe von 2 mM bzw. 20 mM L-Theanin zu einem Konzentrationsanstieg von Ethylamin und Glutaminsäure im Inkubationsmedium führte, bei gleichzeitiger Abnahme der L-Theaninkonzentration [20, 25]. Nach Zugabe von L-Theanin zum Homogenat aus Dünndarm, Leber, Plasma, Gehirn, Herz, Milz oder Muskel von Ratten waren diese Änderungen nicht nachweisbar [20, 25]. Weitere *in vitro* Studien zeigten, dass L-Theanin nach Zugabe von Glutaminase bzw. γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GTP) zu Ethylamin und Glutaminsäure hydrolysiert wird [25, 26]. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass L-Theanin *in vivo* in der Niere von Ratten durch die Glutaminase und/oder γ -GTP zu Ethylamin und Glutaminsäure hydrolysiert werden könnte.

- **Ausscheidung**

L-Theanin, Ethylamin und Glutaminsäure wurden nach oraler und intragastraler Gabe von L-Theanin dosisabhängig mit dem Urin von Ratten ausgeschieden [20-22, 27]. Nach oraler Aufnahme von 100 mg, 200 mg und 400 mg isoliertem L-Theanin wurden 2%, 14% und 21% der oral verabreichten Menge an L-Theanin im 24-Stunden-Urin von Ratten nachgewiesen [20]. Die intragastrale Applikation von 440 mg isoliertem L-Theanin führte zu einer renalen Ausscheidung von 37% der intragastral verabreichten L-Theaninmenge [22].

Auch Ethylamin und Glutaminsäure wurden nach L-Theaningabe renal ausgeschieden. Nach oraler Aufnahme von 1 g Tee-Extrakt, gelöst in 5 ml Wasser, wurde Ethylamin im 24-Stunden-Urin von Ratten (200 - 260 g, $n = 4$) nachgewiesen, nicht aber nach Aufnahme einer Natriumchloridlösung (Kontrolle) [27]. Die orale Bolusgabe von 100 mg bis 400 mg L-Theanin führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der Stoffmenge von Ethylamin und Glutaminsäure im 24-Stunden-Urin von Ratten, wobei die Stoffmenge von Ethylamin nach Aufnahme von 100 mg bzw. 200 mg L-Theanin um das 10- bzw. 4-fache höher war als die Stoffmenge von L-Theanin. Nach Aufnahme von 400 mg L-Theanin waren die Stoffmengen von Ethylamin und L-Theanin im Urin dagegen vergleichbar [20]. Auch die intragastrale Gabe von 440 mg L-Theanin bei Ratten führte neben L-Theanin zu einer renalen Ausscheidung von Ethylamin und Glutaminsäure, mit vergleichbaren Stoffmengen von L-Theanin und Ethylamin im 24-Stunden-Urin [22]. Die renale Ausscheidung von Glutaminsäure war nach oraler und intragastraler Bolusgabe – im Unterschied zu L-Theanin und Ethylamin – vergleichsweise gering [20, 22].

Tabelle 2 zeigt die Stoffmengen von L-Theanin, Ethylamin und Glutaminsäure, die nach Aufnahme von L-Theanin im Urin von Ratten nachgewiesen wurden.

Tabelle 2: Stoffmengen von L-Theanin, Ethylamin und Glutaminsäure im Urin von Ratten.

	L-Theanindosis			
	0 mg	100 mg	200 mg	400 mg ¹ bzw. 440 mg ²
Unno et al. 1999 [20]¹				
L-Theanin [μmol]	n.d.	12 \pm 6	165 \pm 16	487 \pm 207
Ethylamin [μmol]	n.d.	151 \pm 2	255 \pm 27	481 \pm 66
Glutaminsäure [μmol]	n.d.	5 \pm 3	70 \pm 6	132 \pm 18
Terashima et al. 1999 [22]²				
L-Theanin [μmol]	n.d.	-	-	633 \pm 95
Ethylamin [μmol]	n.d.	-	-	560 \pm 40
Glutaminsäure [μmol]	n.d.	-	-	87 \pm 8

Daten: Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD, jeweils $n = 6$). ¹Orale Gabe von 100 mg, 200 mg und 400 mg L-Theanin. ²Intragastrale Gabe von 440 mg L-Theanin. n.d., nicht detektierbar.

2.3.2 Humanstudie

Die Bolusgabe von 25 mg, 50 mg und 100 mg isoliertem L-Theanin (Suntheanine[®], gelöst in 314 ml Wasser) sowie 25 mg und 50 mg L-Theanin in Form von Schwarztee (314 ml) führte bei 15 gesunden Männern zu einem dosisabhängigen Konzentrationsanstieg von L-Theanin im Plasma. Dabei war die Plasmakinetik von L-Theanin nach Aufnahme beider Verzehrsformen vergleichbar. Die maximale Plasmakonzentration von L-Theanin wurde 41 bis 46 min nach Aufnahme von isoliertem L-Theanin und 51 bis 55 min nach Verzehr von Schwarztee erreicht. Nach Bolusgabe von 100 mg isoliertem L-Theanin lag die maximale Plasmakonzentration von L-Theanin bei $25,4 \pm 4,1 \mu\text{mol/l}$ (MW \pm SD) und für die Verteilung von L-Theanin im Organismus wurde ein hypothetisches Volumen von 15 bis 19 Litern berechnet. Die Eliminationshalbwertszeit lag bei 64 bis 70 min. Acht Stunden nach Bolusgabe war L-Theanin noch immer im Plasma nachweisbar [11].

Weitere Untersuchungen zur Plasmakinetik von L-Theanin sowie Daten zum Metabolismus von L-Theanin im menschlichen Organismus liegen bisher nicht vor.

2.4 Funktionelle Wirkungen von Theanin

Die Literaturdatenbank PubMed enthält mehr als 40 Tier- und Humanstudien zur funktionellen Wirkung von L-Theanin. Im Fokus der Humanstudien stehen hierbei Untersuchungen zur Wirkung von L-Theanin auf die kognitive Leistungsfähigkeit und Gemütslage. Hinweise bzgl. der entsprechenden Wirkmechanismen stammen aus tierexperimentellen Studien sowie aus *in vitro*-Untersuchungen.

Tierexperimentelle Studien zeigten, dass die intragastrale Applikation von 150 mg, 300 mg und 600 mg L-Theanin zu einem dosisabhängigen Anstieg der Dopaminkonzentration im Gehirn von Ratten (100 g, $n = 6$) im Vergleich zur Baseline führt [24]. Eine Studie mit Mäusen (20 g, $n = 4$) zeigte, dass 0,5 h nach intraperitonealer Injektion von 30 mg L-Theanin die Konzentration von Dopamin und γ -Aminobuttersäure im Gehirn der Tiere im Vergleich zur Baseline erhöht war [28]. Zwei Stunden nach intragastraler Applikation von 200 mg, 400 mg und 800 mg L-Theanin wurde im Gehirn von normotensiven Ratten (400 g, $n = 4$) eine geringere Serotoninkonzentration im Vergleich zur Kontrolle (Natriumchloridlösung) beobachtet [29]. Die intraperitoneale Injektion von 200 mg, 400 mg, 600 mg und 800 mg L-Theanin führte ebenfalls zu einer Abnahme der Serotoninkonzentration im Gehirn von spontan hypertensiven und normotensiven Ratten (400 g, jeweils $n = 6$). Gleichzeitig wurde eine dosisabhängige Senkung des systolischen und diastolischen Blutdrucks bei den hypertensiven Ratten beobachtet, während bei den normotensiven Ratten kein Effekt von L-Theanin auf den Blutdruck nachgewiesen wurde [30]. Eine weitere Studie mit spontan hypertensiven Ratten (300 g, $n = 6$) zeigte ebenfalls eine Senkung des systolischen und diastolischen Blutdrucks nach intraperitonealer Injektion von 600 mg L-Theanin im Vergleich zur Baseline [31].

In Humanstudien führte die Bolusgabe von 50 mg bis 200 mg isoliertem L-Theanin zu einer Erhöhung der α -Wellen-Aktivität im Gehirn gesunder Probanden, die mittels Elektroenzephalogramm gemessen wurde und auf einen entspannten Wachzustand hinweist [32]. Die Bolusgabe von 200 mg bzw. 250 mg isoliertem L-Theanin führte zu einer Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit und Gemütslage gesunder Probanden im Vergleich zur Kontrolle [33, 34]. Die kognitive Leistungsfähigkeit wurde hierbei mit Hilfe von standardisierten Computertests anhand von Reaktionszeit und Fehlerquote untersucht. Die Angaben zur Gemütslage basierten auf der subjektiven Einschätzung der Probanden. Die Autoren postulierten, dass die Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit und der Gemütslage nach L-Theaningabe auf eine erhöhte α -Wellen-Aktivität und/oder auf einen

Konzentrationsanstieg der γ -Aminobuttersäure im Gehirn der Probanden zurückzuführen sein könnte [35].

Auch eine synergistische Wirkung von L-Theanin und Koffein wird diskutiert, da die Bolusgabe von 100 mg L-Theanin in Kombination mit 50 mg Koffein zu einer verkürzten Reaktionszeit und einer geringeren Fehlerquote bei Computertests im Vergleich zur Kontrolle (Wasser) führte, aber die isolierte Gabe von 100 mg L-Theanin oder 50 mg Koffein keine Effekte zeigte [36]. Die Bolusgabe von 250 mg L-Theanin und 150 mg Koffein verkürzte die Reaktionszeit und verbesserte die kognitive Leistungsfähigkeit der Probanden im Vergleich zur Kontrolle [37]. Andere Studien zeigten hingegen keine Effekte der L-Theaningabe auf die Reaktionszeit und kognitive Leistungsfähigkeit von gesunden Probanden – weder bei isolierter Gabe noch in Kombination mit Koffein [38, 39].

Die Wirkung einer regelmäßigen Einnahme von L-Theanin wurde bisher nur in einer randomisierten, doppelblinden und kontrollierten Studie an 40 Schizophrenie-Patienten untersucht. Nach der täglichen Aufnahme von 400 mg L-Theanin über acht Wochen verbesserte sich die subjektiv eingeschätzte Gemütslage der Patienten und das Angstepfinden nahm im Vergleich zur Placebogruppe ab [40].

Um die Wirksamkeit von L-Theanin bewerten zu können, sind Informationen zum Metabolismus von L-Theanin im menschlichen Organismus erforderlich.

3 Zielsetzung

Die vorliegende Studie untersuchte folgende Fragestellungen:

- Führt die Bolusgabe von 100 mg L-Theanin in isolierter Form bzw. in Form von Grüntee zu einer Konzentrationsänderung von L-Theanin sowie der potentiellen Metabolite Ethylamin und Glutaminsäure in Plasma, Erythrozyten und Urin gesunder Erwachsener?
- Führt die Bolusgabe von L-Theanin zu einer Konzentrationsänderung der proteinogenen Aminosäuren in Plasma, Erythrozyten und Urin gesunder Erwachsener?
- Unterscheiden sich Plasmakinetik und Metabolismus von L-Theanin nach dem Verzehr von isoliertem L-Theanin und Grüntee?

4 Material und Methoden

Die Interventionsstudie wurde gemäß den Empfehlungen des Weltärztebundes (Deklaration von Helsinki 2008 [41]) und den EU-Richtlinien der „Good Clinical Practice“ durchgeführt.

Der Prüfplan wurde am 22.09.2010 von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn genehmigt (Lfd. Nr. 185/10). Die Durchführung der Studie erfolgte an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn am Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften, Fachbereich Ernährungsphysiologie, in Kooperation mit den Ärzten Herrn Dr. Hannes Herholz und Herrn Dr. Jörg Ellinger aus dem Universitätsklinikum Bonn.

4.1 Studiendesign

Die Interventionsstudie wurde randomisiert und im Crossover-Design durchgeführt. Die Randomisierung wurde nach Geschlecht stratifiziert und die Probanden mittels Losverfahren („Ziehen ohne Zurücklegen“) auf zwei Gruppen (A und B) verteilt. Die Kennzeichnung der entnommenen Proben wurde verschlüsselt und erst nach Auswertung der Daten offengelegt.

4.2 Intervention

L-Theanin in isolierter Form wurde als Nahrungsergänzungsmittel (Suntheanine[®], Taiyo Europe, Filderstadt) verabreicht. Eine Kapsel enthielt laut Hersteller 100 mg L-Theanin, das enzymatisch aus Ethylamin und Glutaminsäure hergestellt worden war. Eigene Analysen zeigten einen L-Theaningehalt von $100,5 \pm 8,7$ mg (MW \pm SD) pro Kapsel ($n = 10$, zufällige Stichproben). Zur Analyse des L-Theaningehaltes (Kapitel 4.5) wurde der gesamte Kapselinhalt in Reinstwasser gelöst.

Die Teeaufgüsse wurden mit handelsüblichem Grüntee der Sorte Lung Ching (Nr. 520) hergestellt, der von der Firma TeeGschwendner, Meckenheim, zur Verfügung gestellt wurde. Die Teeblätter wurden auf eine Größe von 1,4 mm gemahlen (Rotormühle SR-100, Retsch, Haan), um die Extraktion von L-Theanin im Teeaufguss zu erhöhen und die Konzentrationsunterschiede zwischen den Aufgüssen zu verringern (Abbildung 2).



Abbildung 2: Ungemahlener und gemahlener Grüntee.

An jedem Studientag wurden 7 g des gemahlene Grüntees mit 250 ml kochendem Wasser aufgebrüht. Die Ziehzeit betrug 10 min. Von jedem Aufguss wurde eine Probe entnommen (1 ml) und für die spätere Analytik (Kapitel 4.5) bei -80 °C eingefroren. Der L-Theaningehalt in 250 ml Grüntee ($n = 7$, täglich frisch zubereitet) war mit $102,8 \pm 4,3$ mg (MW \pm SD) vergleichbar mit dem L-Theaningehalt einer Kapsel Suntheanine®.

Tabelle 3 zeigt die Dosis an L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin, die mit einer Kapsel Suntheanine® bzw. 250 ml Grüntee aufgenommen wurde.

Tabelle 3: Dosis an L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin in einer Kapsel Suntheanine[®] und 250 ml Grüntee.

	Kapsel		Grüntee	
	[mg]			
L-Theanin	100,5	± 8,7	102,8	± 4,3
Proteinogene Aminosäuren				
Alanin	n.d.		3,8	± 0,2
Arginin	n.d.		7,4	± 0,1
Asparagin	n.d.		4,1	± 0,1
Glutamin	n.d.		24,3	± 0,5
Glutaminsäure	n.d.		17,8	± 0,9
Glycin	n.d.		0,7	± 0,1
Isoleucin	n.d.		1,1	± 0,1
Leucin	n.d.		2,0	± 0,3
Lysin	n.d.		0,9	± 0,1
Phenylalanin	n.d.		2,5	± 0,1
Serin	n.d.		5,3	± 0,4
Threonin	n.d.		3,5	± 0,2
Tryptophan	n.d.		1,2	± 0,1
Tyrosin	n.d.		1,7	± 0,3
Valin	n.d.		1,7	± 0,1
Ethylamin	n.d.		2,7	± 0,3

Daten: MW ± SD für Kapsel ($n = 10$) und Grüntee ($n = 7$). n.d., nicht detektierbar ($< 0,8$ pmol/l für die proteinogenen Aminosäuren und $< 0,08$ µmol/l für Ethylamin).

4.3 Probanden

4.3.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Probanden wurden durch Aushänge an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn rekrutiert.

An der Studie konnten nur gesunde Erwachsene teilnehmen. Bei der Auswahl der Probanden wurde auf eine möglichst homogene Gruppe geachtet, um individuelle Unterschiede bei den Untersuchungsparametern zu minimieren. Mit Hilfe eines Fragebogens wurde der Gesundheitsstatus der Interessenten überprüft, wobei die Angaben auf der

subjektiven Einschätzung basierten. Mit dem Fragebogen wurden darüber hinaus die Ein- und Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der vorliegenden Studie erfasst.

Die Probanden mussten folgende **Einschlusskriterien** erfüllen:

- Alter: 18 - 40 Jahre
- Normalgewicht: Body Mass Index (BMI) > 18,5 - 24,9 kg/m² [42]
- Nichtraucher
- Schriftliche Einverständniserklärung

Zum **Ausschluss** führten folgende Kriterien:

- Bekannte Erkrankungen
- Bekannte Unverträglichkeiten gegenüber den Studienprodukten
- Schwangerschaft oder Stillzeit
- Konsum von betäubungsmittelgesetzpflichtigen Drogen
- Konsum von bewusstseinsverändernden Drogen
- Regelmäßige Einnahme von Medikamenten (Ausnahme: orale Kontrazeptiva)
- Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln
- Blutspende ein Monat vor Studienbeginn
- Teilnahme an einer anderen Studie zeitgleich oder innerhalb der letzten 30 Tage vor Studienbeginn

Die Probanden wurden mündlich und schriftlich über die Zielsetzung und den Ablauf der Studie sowie über potentielle Risiken der Teilnahme informiert. Bei einer Informationsveranstaltung standen die Ärzte für medizinische Fragen zur Verfügung. Frauen, die regelmäßig orale Kontrazeptiva einnahmen, mussten dies schriftlich erklären. Andernfalls wurde zu Studienbeginn ein Schwangerschaftstest durchgeführt, um eine Schwangerschaft auszuschließen.

4.3.2 Fallzahlabschätzung

Eine Fallzahlabschätzung war in der Phase der Studienplanung (04 - 09/2010) nicht möglich, da entsprechende Daten aus Humanstudien nicht verfügbar waren.

Es wurden 12 Probanden für die Teilnahme an der Studie rekrutiert (6 Frauen und 6 Männer), um eine statistische Auswertung, auch nach eventuellem Ausscheiden von

Probanden, zu gewährleisten. Dieser Stichprobenumfang hat sich in früheren Studien, die am Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften durchgeführt wurden, bewährt.

4.4 Durchführung

Die Studie wurde an 7 Studientagen von April bis Juni 2011 am Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften, Fachbereich Ernährungsphysiologie, durchgeführt. An jedem Studientag wurden maximal 4 Probanden untersucht.

Gruppe A erhielt am ersten Studientag 100 mg L-Theanin in isolierter Form als Kapsel (Suntheanine[®]) und nach einer mindestens zweiwöchigen Washout-Phase 100 mg L-Theanin in Form von 250 ml Grüntee. Gruppe B erhielt die gleichen Produkte in umgekehrter Reihenfolge. An zwei weiteren Studientagen erhielten drei zufällig ausgewählte Probanden zusätzlich jeweils 50 mg und 200 mg L-Theanin in isolierter Form als Kapsel (Suntheanine[®]), um die Konzentrationsänderung von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin in Plasma, Erythrozyten und Urin in Abhängigkeit von der aufgenommenen Dosis zu überprüfen (50 mg vs. 100 mg vs. 200 mg).

Vier Tage vor der jeweiligen Untersuchung sowie am Studientag selber sollten die Probanden auf theaninhaltige Lebensmittel verzichten, um mögliche Störeinflüsse durch die Zufuhr von L-Theanin zu vermeiden. Hierzu erhielten die Probanden eine Liste mit Lebensmitteln, die gemieden werden sollten (grüner, schwarzer, weißer und Oolong-Tee, teehaltige Produkte, Pilze sowie pilzhaltige Produkte). Die Einhaltung der diätetischen Restriktionen wurde mit Hilfe eines 5-Tage-Ernährungsprotokolls überprüft. Ab 20 Uhr des Vorabends der jeweiligen Untersuchung sollten die Probanden auf sportliche Aktivitäten verzichten und durften nur noch Wasser trinken.

An jedem Studientag wurden 8 Blutentnahmen durchgeführt. Die erste Blutentnahme erfolgte morgens nüchtern nach 12-stündiger Nahrungskarenz. Anschließend erhielten die Probanden die Kapsel(n) Suntheanine[®] oder 250 ml Grüntee. Die Kapseln wurden mit 250 ml Mineralwasser aufgenommen und der Grüntee wurde lauwarm verzehrt. Beide Studienprodukte wurden innerhalb von 5 min konsumiert. Es folgten 7 weitere Blutentnahmen zu den Zeitpunkten 0,5 h, 0,75 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h und 24 h nach Aufnahme von Kapsel oder Grüntee. Die ersten Blutentnahmen erfolgten in relativ kurzen Intervallen, da die maximale Plasmakonzentration von L-Theanin nach einer Stunde zu erwarten war [20, 22] und eine engmaschige Verlaufskontrolle genauere Daten zur Kinetik von L-Theanin und deren Metabolite in Plasma und Erythrozyten liefert. Bis zur

7. Blutentnahme (3 h nach Bolusgabe) blieben die Probanden im Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften und durften nur Mineralwasser trinken, um die Untersuchungen unter möglichst standardisierten Bedingungen durchzuführen. Danach konnten die Probanden das Institut verlassen und sollten – bis auf den Verzehr von theaninhaltigen Produkten – ihrer gewohnten Kost nachgehen. Am nächsten Morgen wurde nach einer 12-stündigen Nahrungskarenz die 24-Stunden-Blutentnahme durchgeführt.

Während der jeweiligen Studientage sammelten die Probanden Urin. Spontanurin wurde nüchtern vor Einnahme der Studienprodukte abgegeben. Nach Aufnahme von Kapsel oder Grüntee wurde Urin in zwei Intervallen (0 - 3 h und 3 - 24 h) gesammelt.

Abbildung 3 zeigt den Ablauf der Studientage.

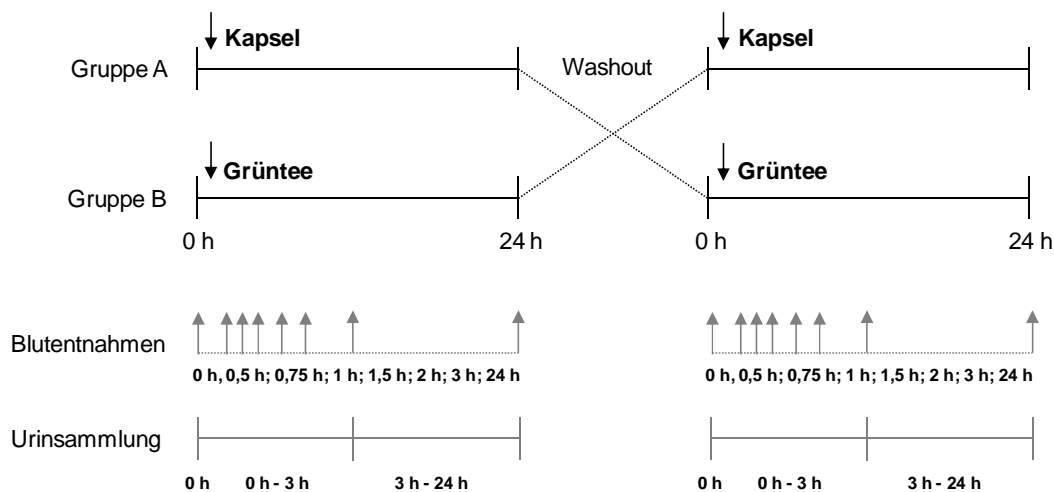


Abbildung 3: Studienablauf.

4.4.1 Blutentnahmen und Aufbereitung der Blutproben

Für die Analyse von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin im Plasma wurden insgesamt 1000 µl heparinisiertes Plasma benötigt. Zusätzlich wurde eine Reserve von 2000 µl Plasma einkalkuliert, um die Analyse (Kapitel 4.5) gegebenenfalls wiederholen zu können. Bei einem Plasmaanteil von 55% am Vollblut wurde zur Gewinnung von 3000 µl Plasma 7,5 ml Vollblut entnommen.

Die Blutentnahme am Studientag erfolgte durch Punktion der Armvene unter Verwendung einer peripheren Verweilkanüle (Vasofix Braunüle® 20G, Braun, Melsungen). Dabei wurde das Vollblut in Lithium-Heparin Monovetten® überführt (7,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht). Für die

24-Stunden-Blutentnahme wurde die Armvene ein weiteres Mal punktiert. Pro Studientag wurden bei 8 Blutentnahmen à 7,5 ml bei jedem Probanden insgesamt 60 ml Blut entnommen.

Die Blutproben wurden nach der Entnahme in ein Eiswasserbad gestellt und anschließend zentrifugiert (3000 x g, 20 min, 4 °C), um Plasma und Zellen voneinander zu trennen. Das frisch gewonnene Plasma (1 ml) wurde mit 100 µl einer 30%igen Sulfosalicylsäurelösung (SSA) versetzt, gevortext und 60 Minuten bei 4 °C inkubiert, um eine vollständige Proteinfällung zu gewährleisten. Nach anschließender Zentrifugation (3000 x g, 20 min, 4 °C) wurde der Überstand aliquotiert und bei -80 °C bis zur Analyse (Kapitel 4.5) aufbewahrt.

Die Erythrozyten wurden zweimal mit 5 ml einer EDTA-haltigen Natriumchloridlösung (28,64 g Na₂EDTA x H₂O + 7 g NaCl / Liter Reinstwasser, pH 7,4) gewaschen und anschließend zentrifugiert (3000 x g, 20 min, 4 °C). Die gewaschenen Erythrozyten wurden in Eppendorfgefäße überführt und zur Hämolyse für mindestens 24 h bei -80 °C aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben aufgetaut und im Verhältnis 1:5 mit Reinstwasser verdünnt. Das verdünnte Erythrozyten-Hämolysat (1 ml) wurde mit 100 µl einer 30%igen SSA versetzt, gevortext und 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (3000 x g, 20 min, 4 °C) wurde der proteinfreie Überstand in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80 °C bis zur Analyse (Kapitel 4.5) aufbewahrt.

4.4.2 Urinsammlung und Aufbereitung der Urinproben

Die Probanden sammelten ihren Urin in 24-Stunden-Urin-Probebehältern (2 L, Sarstedt, Nümbrecht), die entsprechend der Zeitintervalle (Nüchtern, 0 - 3 h und 3 - 24 h) beschriftet wurden. Nach Abgabe der Probebehälter wurde das Urinvolumen bestimmt, um die Stoffmengen von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin im Urin zu berechnen. Jeweils 1 ml Urin (ohne Zusätze, bei 4 °C gelagert) wurde mit 100 µl einer 30%igen SSA versetzt, gevortext und 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (3000 x g, 20 min, 4 °C) wurde der proteinfreie Überstand in Falcon[®]-Röhrchen aliquotiert und bei -80 °C bis zur Analyse (Kapitel 4.5) aufbewahrt.

4.5 Analytik von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin

Die Konzentration von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin in Kapseln und Grüntee sowie in den deproteinisierten Proben von Plasma, Erythrozyten und Urin wurde mittels reversed-phase HPLC (RP-HPLC) und anschließender Fluoreszenzdetektion

ermittelt. Vorab erfolgte eine Vorsäulenderivatisierung mit Orthophtaldehyd und 3-Mercaptopropionsäure (OPA/3-MPA) in Anlehnung an Fürst et al. [43-45].

Folgende Geräte und Materialien (Tabelle 4) wurden benötigt:

Tabelle 4: Geräte und Materialien.

Geräte/Materialien	Hersteller	Produktnummer
HPLC-System		
HPLC-Sample Injector	Sykam, Fürstenfeldbruck, D	S5200
HPLC-Solvent Delivery System	Sykam, Fürstenfeldbruck, D	S2100
Säulenofen	Sykam, Fürstenfeldbruck, D	171023
Inertsil-Säule	VDS Optilab, Berlin, D	ODS-2,5 µm x 4,6 mm
Fluoreszenzdetektor	Shimadzo, Tokio, J	RF-10 A XL
Sonstige Geräte		
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, D	5415 R
Megafuge	Heraeus, Hanau, D	1.0 R
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, D	TE 2145-OCE
Vortexer	VWR, Darmstadt, D	VV3
Wasseraufbereitungsanlage	TKA, Niederelbert, D	ASTM I
Verbrauchsmaterial		
Eppendorf Safe Lock [®] 1,5 ml	Merck, Darmstadt, D	0030.120.086
Falcon [®] Tubes 15 ml	Carl Roth, Karlsruhe, D	AN 76.1
Glasvials 2 ml	Macherey-Nagel, Düren, D	702 01HP
Bördelkappe	Macherey-Nagel, Düren, D	702 56
Membranfilter 0,45 µm	Whatman, Dassel, D	OE 67
Reagenzien		
L-Theanin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D	T6576
Ethylamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D	283-1
Aminosäurenstandardlösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D	AA-S-18
L-Norvalin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D	N-7627
3-Mercaptopropionsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D	M-6750
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D	1.06346
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D	6580
Natriumhydroxid-Plättchen	Merck, Darmstadt, D	1.06498.1000
Borsäure	Merck, Darmstadt, D	160
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck, Darmstadt, D	8418
Methanol (HPLC Grade)	J.T. Baker, München, D	8402
5-Sulfosalicylsäure	J.T. Baker, München, D	1198
Tetrahydrofuran Solv	AppliChem, Darmstadt, D	11595
o-Phthaldialdehyd	Serva, Heidelberg, D	3280.01
Acetonitril (HPLC Grade)	VWR, Darmstadt, D	20060.320

Folgende Lösungen wurden benötigt:

- Boratpuffer, 1,0 M, pH 10,2
61,8 g Borsäure wurden in 800 ml Reinstwasser gelöst und bei 21 °C auf pH 10,2 durch langsame Zugabe von NaOH-Plätzchen eingestellt. Anschließend wurde mit Reinstwasser auf 1 L aufgefüllt und der Puffer bei 4 °C gelagert.
- Fällungsreagenz, 30% SSA, 1 mM L-Norvalin (Nva)
35 g SSA und 11,72 mg Nva wurden in 100 ml Reinstwasser gelöst und bei 4 °C gelagert.
- L-Theanin- und Ethylamin-Stammlösung, 2,5 mM
21,77 mg L-Theanin und 10,19 mg Ethylamin wurden in 50 ml HCl (0,1%) gelöst und bei -80 °C aufbewahrt.
- OPA-Stammlösung, 47,6 mM
50 mg OPA wurden in 4,5 ml Methanol gelöst, mit 50 µl 3-MPA und 500 µl Boratpuffer versetzt und bei 4 °C gelagert.
- OPA-Arbeitslösung, 5 mM (täglich frisch angesetzt)
500 µl der OPA-Stammlösung wurden 1:5 mit 7 ml Boratpuffer (1,0 M, pH 10,2) verdünnt.
- Natriumphosphatpuffer, 12,5 M, pH 7,2
1,55 g NaH_2PO_4 und 2,78 Na_2HPO_4 wurden in 2,15 L Reinstwasser gelöst, durch einen 4,5 µm Membranfilter gegeben und das Filtrat bei 4 °C gelagert.
- Standardlösung, 2,08 µM
200 µl der L-Theanin- und Ethylamin-Stammlösung und 200 µl der Aminosäurenstandardlösung wurden mit 200 ml Reinstwasser und 40 ml Boratpuffer (1,0 M, pH 10,2) verdünnt und bei -80 °C aufbewahrt.

Probenvorbereitung

Von den proteinfreien Überständen aller Proben wurden jeweils 20 µl zu 1 ml Reinstwasser und 0,2 ml Boratpuffer in Glasvials pipettiert und gevortext. Die Glasvials wurden entweder sofort in den auf 4 °C gekühlten Probengeber gestellt und innerhalb von 24 h analysiert oder bei -80 °C bis zur Analyse (Kapitel 4.5) aufbewahrt.

Jede Probe wurde vollautomatisch mit OPA/3-MPA derivatisiert und anschließend auf die Säule injiziert. Die Trennung von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin erfolgte mittels ansteigender Acetonitril-Gradientenelution auf einer RP-HPLC-Säule. Diese wurde im Säulenofen auf 23 °C temperiert.

Chromatographiebedingungen

- Flußrate: 0,9 ml/min
- Eluent A: 1,4% Tetrahydrofuran in Natriumphosphatpuffer (12,5 mM, pH 7,2)
- Eluent B: 36% Methanol, 16% Acetonitril, 48% Natriumphosphatpuffer (12,5 mM, pH 7,2)
- Säule: Inertsil RP-C18, 5 µm, 250 × 4,6 mm
- Gradient: 0 - 17 min, 5 - 30% B; 17 - 37 min, 30 - 65% B; 37 - 50 min, 65 - 100% B; 50 - 52 min, 100 - 5% B
- Fluoreszenzdetektion: Anregung (λ_{ex}) mit 330 nm, Emission (λ_{em}) bei 450 nm

Abbildung 4 zeigt ein typisches Chromatogramm der Standardlösung. Abbildungen 5 - 9 zeigen typische Chromatogramme von Kapselinhalt und Grüntee sowie von Plasma, Erythrozyten und Urin.

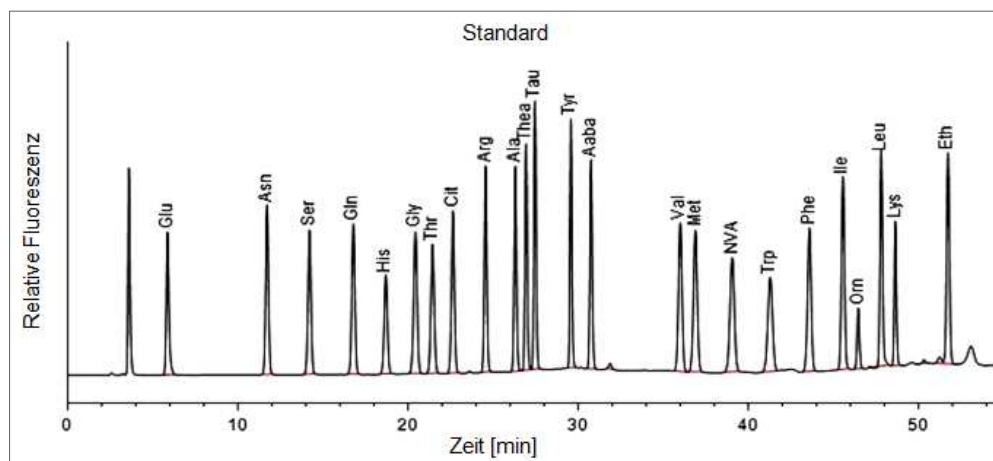


Abbildung 4: Chromatogramm der Standardlösung.

Konzentration der Aminosäuren und Ethylamin in der Standardlösung: 2,08 µM. HPLC-Analyse: Vorsäulenderivatisierung mit Orthophtaldehyd und 3-Mercaptopropionsäure. Fluoreszenzdetektion: λ_{ex} : 330 nm, λ_{em} : 450 nm; Laufmittel: Natriumphosphatpuffer mit Tetrahydrofuran (1,4%), Methanol, Acetonitril (48/36/16; v/v/v); 0,9 ml/min; Injektionsvolumen: 20 µl. AaBb, alpha-Aminobuttersäure; Ala, Alanin; Asn, Asparagin; Arg, Arginin; Cit, Citronin; Eth, Ethylamin; Glu, Glutaminsäure; Gln, Glutamin; Gly, Glycin; His, Histidin; Ile, Isoleucin; Leu, Leucin; Lys, Lysin; Met, Methionin; Nva, L-Norvalin; Orn, Ornithin; Ser, Serin; Tau, Taurin; Thea, Theanin; Thr, Threonin; Tyr, Tyrosin; Val, Valin.

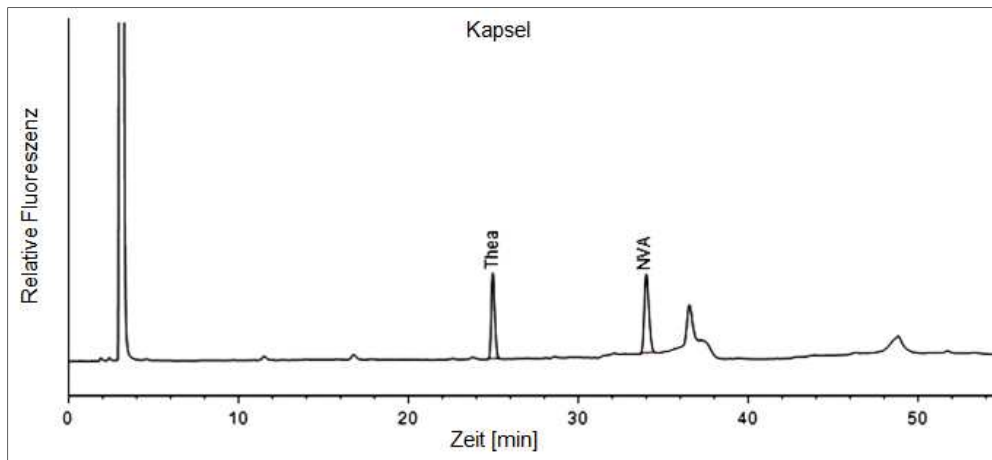


Abbildung 5: Chromatogramm des Inhalts einer Kapsel Suntheanine®.

HPLC-Analyse: Vorsäulenderivatisierung mit Orthophtaldehyd und 3-Mercaptopropionsäure. Fluoreszenzdetektion: λ_{ex} : 330 nm, λ_{em} : 450 nm; Laufmittel: Natriumphosphatpuffer mit Tetrahydrofuran (1,4%), Methanol, Acetonitril (48/36/16; v/v/v); 0,9 ml/min; Injektionsvolumen: 20 μl . Thea, L-Theanin; Nva, L-Norvalin.

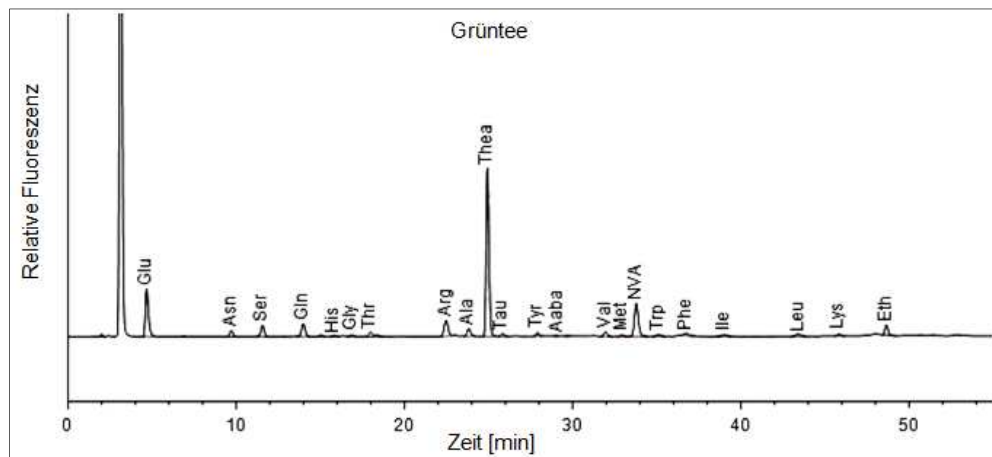


Abbildung 6: Chromatogramm des Grüntees Lung Ching.

HPLC-Analyse: Vorsäulenderivatisierung mit Orthophtaldehyd und 3-Mercaptopropionsäure. Fluoreszenzdetektion: λ_{ex} : 330 nm, λ_{em} : 450 nm; Laufmittel: Natriumphosphatpuffer mit Tetrahydrofuran (1,4%), Methanol, Acetonitril (48/36/16; v/v/v); 0,9 ml/min; Injektionsvolumen: 20 μl . Ala, Alanin; Asn, Asparagin; Arg, Arginin; Eth, Ethylamin; Glu, Glutaminsäure; Gln, Glutamin; Gly, Glycin; His, Histidin; Ile, Isoleucin; Leu, Leucin; Lys, Lysin; Met, Methionin; Nva, L-Norvalin; Ser, Serin; Tau, Taurin; Thea, Theanin; Tyr, Tyrosin; Val, Valin.

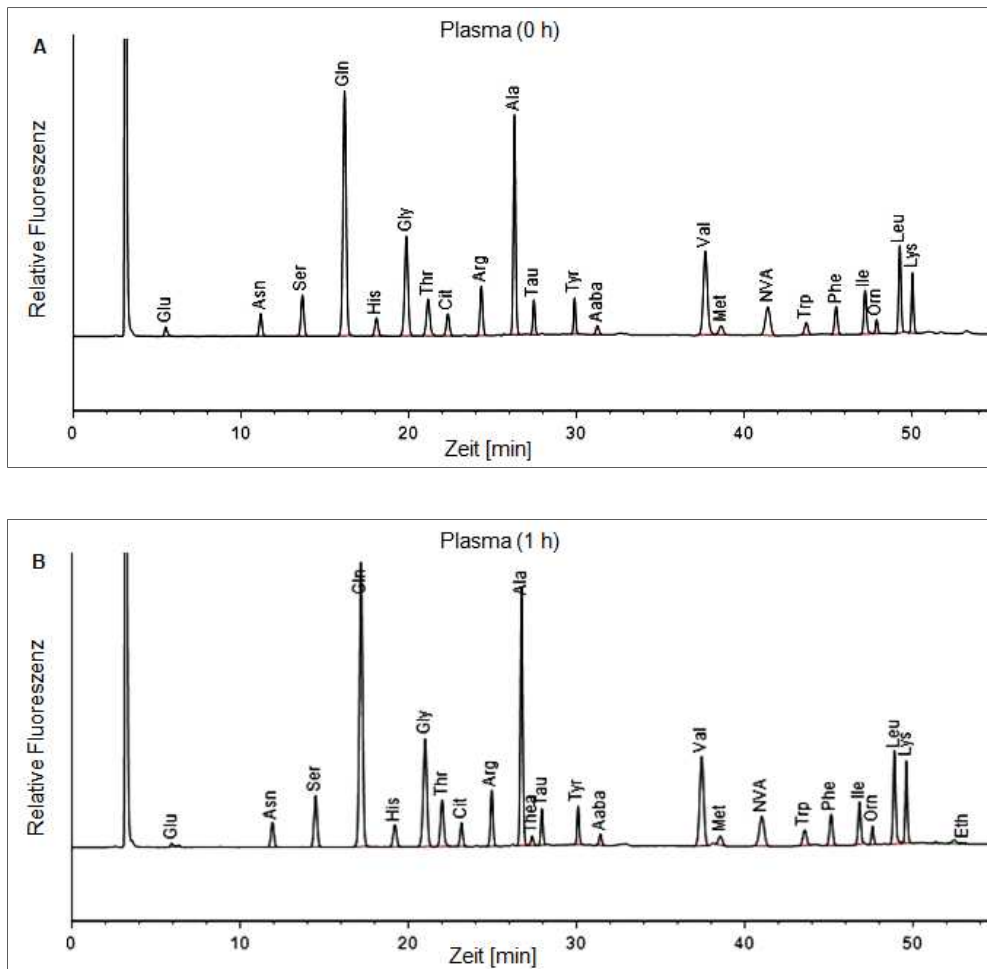


Abbildung 7: Chromatogramme von Plasmaproben, gewonnen vor (A) und 1 h nach Bolusgabe (B) von 100 mg L-Theanin als Kapsel.

HPLC-Analyse: Vorsäulenderivatisierung mit Orthophtaldehyd und 3-Mercaptopropionsäure. Fluoreszenzdetektion: λ_{ex} : 330 nm, λ_{em} : 450 nm; Laufmittel: Natriumphosphatpuffer mit Tetrahydrofuran (1,4%), Methanol, Acetonitril (48/36/16; v/v/v); 0,9 ml/min; Injektionsvolumen: 20 μl . AaBb, alpha-Aminobuttersäure; Ala, Alanin; Asn, Asparagin; Arg, Arginin; Cit, Citronin; Eth, Ethylamin; Glu, Glutaminsäure; Gln, Glutamin; Gly, Glycin; His, Histidin; Ile, Isoleucin; Leu, Leucin; Lys, Lysin; Met, Methionin; Nva, L-Norvalin; Orn, Ornithin; Ser, Serin; Tau, Taurin; Thea, Theanin; Thr, Threonin; Tyr, Tyrosin; Val, Valin.

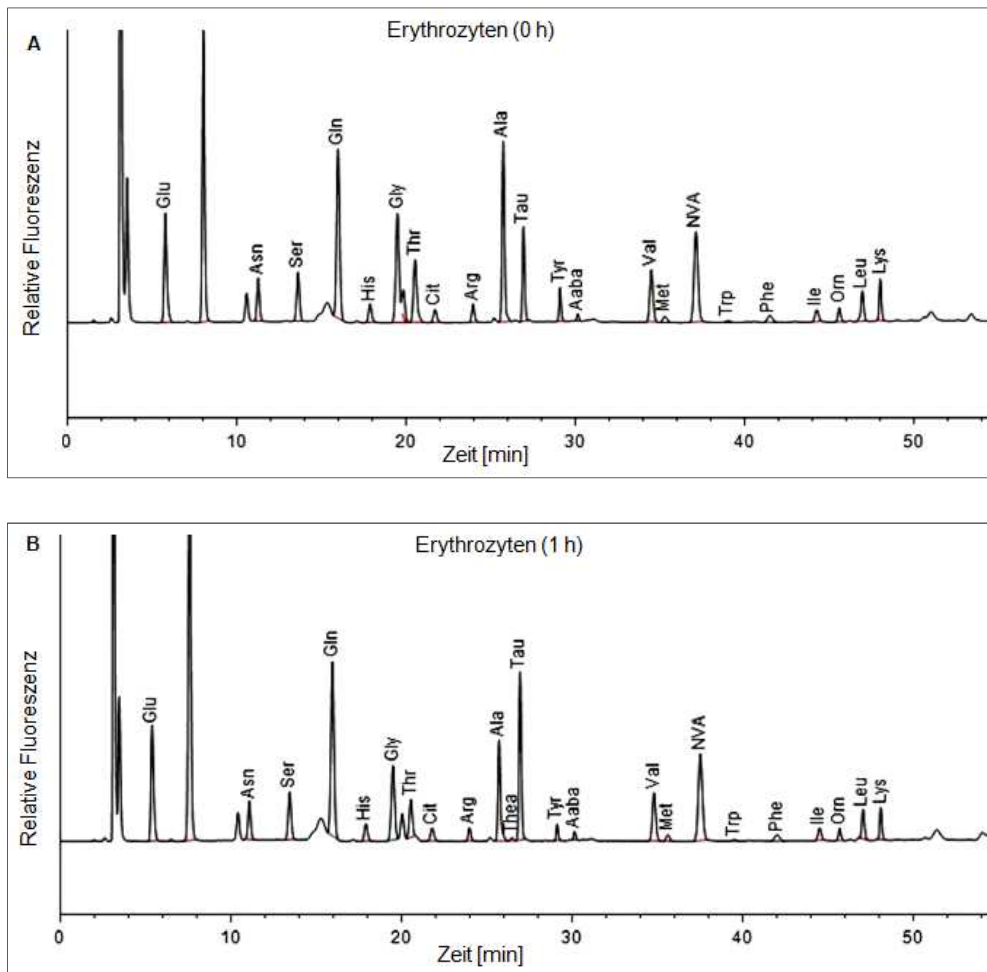


Abbildung 8: Chromatogramme von Erythrozytenhämolyolat, gewonnen vor (A) und 1 h nach Bolusgabe (B) von 100 mg L-Theanin als Grüntee.

HPLC-Analyse: Vorsäulenderivatisierung mit Orthophtaldehyd und 3-Mercaptopropionsäure. Fluoreszenzdetektion: λ_{ex} : 330 nm, λ_{em} : 450 nm; Laufmittel: Natriumphosphatpuffer mit Tetrahydrofuran (1,4%), Methanol, Acetonitril (48/36/16; v/v/v); 0,9 ml/min; Injektionsvolumen: 20 μ l. AaBb, alpha-Aminobuttersäure; Ala, Alanin; Asn, Asparagin; Arg, Arginin; Cit, Citronin; Eth, Ethylamin; Glu, Glutaminsäure; Gln, Glutamin; Gly, Glycin; His, Histidin; Ile, Isoleucin; Leu, Leucin; Lys, Lysin; Met, Methionin; Nva, L-Norvalin; Orn, Ornithin; Ser, Serin; Tau, Taurin; Thea, Theanin; Thr, Threonin; Tyr, Tyrosin; Val, Valin.

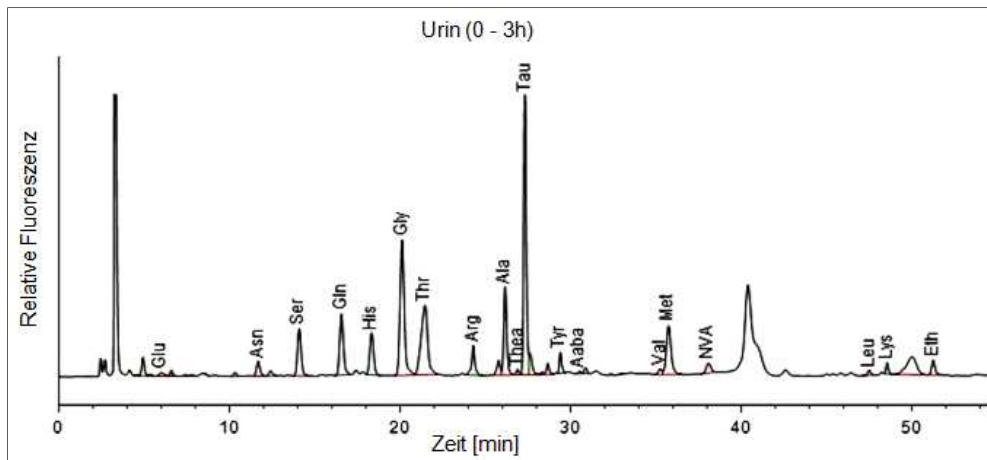


Abbildung 9: Chromatogramm einer Urinprobe, gewonnen 0 - 3 h nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel.

HPLC-Analyse: Vorsäulenderivatisierung mit Orthophtaldehyd und 3-Mercaptopropionsäure. Fluoreszenzdetektion: λ_{ex} : 330 nm, λ_{em} : 450 nm; Laufmittel: Natriumphosphatpuffer mit Tetrahydrofuran (1,4%), Methanol, Acetonitril (48/36/16; v/v/v); 0,9 ml/min; Injektionsvolumen: 20 μl . AaBb, alpha-Aminobuttersäure; Ala, Alanin; Asn, Asparagin; Arg, Arginin; Cit, Citronin; Eth, Ethylamin; Glu, Glutaminsäure; Gln, Glutamin; Gly, Glycin; His, Histidin; Ile, Isoleucin; Leu, Leucin; Lys, Lysin; Met, Methionin; Nva, L-Norvalin; Orn, Ornithin; Ser, Serin; Tau, Taurin; Thea, Theanin; Thr, Threonin; Tyr, Tyrosin; Val, Valin.

Die HPLC-Analytik für den Nachweis proteinogener Aminosäuren im biologischen Material wurde bereits in früheren Arbeiten validiert [43-45]. Das Detektionslimit für alle proteinogenen Aminosäuren lag bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von 2,5:1 bei 8 pmol/l. Die Reproduzierbarkeit der proteinogenen Aminosäuren lag zwischen 0,7% und 4,3% (Intra- und Interassayvarianz).

Die o.g. HPLC-Analytik wurde ergänzend für den Nachweis von L-Theanin und Ethylamin validiert. Sowohl L-Theanin als auch Ethylamin konnten anhand der Standardlösung über die Retentionszeit eindeutig identifiziert werden (Abbildung 4). Bestimmungs- und Nachweisgrenze von L-Theanin und Ethylamin wurden nach der Methode der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermittelt [46]. Die Bestimmungsgrenze für L-Theanin lag bei 0,02 $\mu\text{mol/l}$ und für Ethylamin bei 0,1 $\mu\text{mol/l}$ (Signal/Rausch-Verhältnis: 2,5:1). Die entsprechende Nachweisgrenze lag bei 0,01 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 0,08 $\mu\text{mol/l}$. Reproduzierbarkeit und Linearität von L-Theanin und Ethylamin wurden mittels Standardlösungen (Konzentrationsbereich: 0,005 - 50 $\mu\text{mol/l}$) untersucht. Als Maß für die Reproduzierbarkeit wurde der

Variationskoeffizient für 10 Analysen der Standardlösung berechnet. Dieser lag für L-Theanin und Ethylamin bei < 1% (Intra- und Interassayvarianz). Die Linearität von L-Theanin und Ethylamin war für Konzentrationen zwischen der jeweiligen Nachweisgrenze und 50 µmol/l gegeben ($r > 0,95$). Die Wiederfindung von L-Theanin und Ethylamin in Reinstwasser, Plasma, Erythrozyten und Urin lag bei 95% bis 108%.

Berechnung der Konzentration von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin

Zur quantitativen Auswertung wurde für jede Probenreihe der Mittelwert der Standards vor und nach der Serie herangezogen, wobei die entsprechende Standardlösung jeweils nach 10 bis 12 Proben analysiert wurde. Die Korrektur von Pipettierungenauigkeiten erfolgte mit Hilfe eines internen Standards (1 mM L-Norvalin), welcher der SSA-Lösung zugesetzt wurde.

Die Konzentration von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin in jeder Probe wurde anhand der integrierten Peakflächen nach folgender Gleichung berechnet:

$$Konz._{PROBE} = \frac{Fläche_{PROBE}}{Fläche_{STANDARD}} \times \frac{Fläche_{Norvalin_{PROBE}}}{Fläche_{Norvalin_{STANDARD}}} \times Faktor$$

$$Faktor = \frac{Konz._{Norvalin \text{ nach SSA-Fällung}}}{Konz._{Norvalin_{STANDARD}}} \times Konz._{PROBE} \times Verdünnung \text{ durch SSA}$$

$$= \frac{90,91 \text{ [nmol / ml]}}{2,08 \text{ [nmol / ml]}} \times 2,08 \text{ [nmol / ml]} \times 1,1 = 100$$

Die Integration der Peakflächen erfolgte mit Hilfe der Software ChromStar 7, Version 1.1.6.7 (Software für Chromatographie und Prozessanalytik, Weyhe-Leeste).

4.6 Statistik

4.6.1 Simulation der Plasmakinetik von L-Theanin im Ein-Kompartiment-Modell

Die Plasmakinetik von L-Theanin wurde mit Hilfe eines Ein-Kompartiment-Modells simuliert, um neben den kinetischen Parametern AUC, C_{\max} und t_{\max} weitere Kenngrößen zur Einschätzung der Bioverfügbarkeit, der Umsatzgeschwindigkeit und der Verteilung von L-Theanin im Organismus zu erhalten.

L-Theanin ist wasserlöslich und verteilt sich nach oraler Gabe rasch über das Blut in die peripheren Organe [20]. Da das Blut und die gut durchbluteten Organe (z.B. Leber, Herz, Gehirn und Nieren) als ein zentrales Kompartiment definiert werden können, wurde der Verlauf der Plasmakonzentration von L-Theanin nach Kapsel- und Grünteeverzehr im Ein-Kompartiment-Modell simuliert. Bei oraler Applikation wird die Konzentration von L-Theanin im Plasma von der gleichzeitig ablaufenden Absorption und Elimination, einer Kinetik 1. Ordnung, bestimmt. Dabei wird der Organismus als ein Kompartiment betrachtet, in dem sich durch schnelle Verteilung von L-Theanin ein Fließgleichgewicht zwischen allen Bestandteilen des Verteilungsraumes einstellt.

Um die Verzögerung zwischen der oralen Aufnahme von L-Theanin und dem Auftreten von L-Theanin im Plasma zu berücksichtigen, wurde das Modell durch eine Time lag bzw. Verzögerungszeit ergänzt und durch folgende Gleichung beschrieben [47]:

$$c_t = \frac{a \times k_1}{k_1 - k_2} \times (e^{-k_2 \times (t - t_{\text{lag}})} - e^{-k_1 \times (t - t_{\text{lag}})})$$

Hierbei bezeichnet c_t die Plasmakonzentration von L-Theanin [$\mu\text{mol/l}$] zum Zeitpunkt t [h] und a die Konzentration von L-Theanin, die nach Absorption im Organismus erreicht wird. Die Konzentration a resultiert aus dem Quotient aus der verabreichten L-Theanindosis D [μmol], korrigiert mit dem Faktor f für eventuelle Verluste und Veränderungen von L-Theanin in Magen, Darm und/oder Leber, und dem hypothetischen Verteilungsvolumen V_{hyp} [L]:

$$a = \frac{D \times f}{V_{\text{hyp}}}$$

Die Geschwindigkeitskonstante k_1 gibt die L-Theaninmenge an, die pro Zeiteinheit in den Organismus gelangt [h^{-1}]. Die Eliminationsgleichgewichtskonstante k_2 entspricht dem Anteil des Verteilungsvolumens, der in einer Stunde von L-Theanin „befreit“ wird [h^{-1}]. t ist die Zeit

[h] und t_{lag} die Time lag bzw. Verzögerungszeit zwischen der oralen Aufnahme von L-Theanin und dem Auftreten von L-Theanin im Plasma [h].

Die Modellparameter a , k_1 , k_2 und t_{lag} wurden für jeden Probanden durch nichtlineare Regression mit Hilfe des Bootstrap-Verfahrens (SPSS, Version 19.0, Chicago, IL, USA) geschätzt [47]. Durch Einsatz von a , k_1 , k_2 und t_{lag} in die Gleichung des Ein-Kompartiment-Modells wurden fehlende Messwerte (c_t) interpoliert und die Konzentrations-Zeit-Kurve von L-Theanin für jeden Probanden simuliert.

Auf Basis der Modellparameter a , k_1 , k_2 und t_{lag} wurden zudem die kinetischen Parameter von L-Theanin im Plasma für jeden Probanden berechnet [47]:

- Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve [AUC; $\mu\text{mol/l} \times \text{h}$]:

$$AUC = \frac{a}{k_2}$$

- Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration [t_{max} ; h]:

$$t_{max} = \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{k_2 - k_1}$$

- Die maximale Plasmakonzentration von L-Theanin [C_{max} , $\mu\text{mol/l}$]:

$$c_{max} = \frac{a \times k_1}{k_1 - k_2} \times (e^{-k_2 \times t_{max}} - e^{-k_1 \times t_{max}})$$

- Die Absorptionshalbwertszeit [$t_{1/2,a}$; h]:

$$t_{1/2,a} = \frac{\ln 2}{k_1}$$

- Die Eliminationshalbwertszeit [$t_{1/2,e}$; h]:

$$t_{1/2,e} = \frac{\ln 2}{k_2}$$

- Das hypothetische Verteilungsvolumen V_{hyp} [L]:

$$V_{hyp} = \frac{D}{a}$$

Die AUC und C_{\max} wurden anschließend auf ein Körpergewicht von 70 kg korrigiert ($C_{\max,70}$; AUC_{70}).

Die Varianzen der kinetischen Parameter wurden anhand der Standardabweichungen von a , k_1 , k_2 und t_{lag} und deren Korrelationen (SPSS) mittels Kovarianz-Matrix berechnet. Um die Heterogenität der Varianzen zu berücksichtigen, wurden die Parameter anhand ihrer Standardabweichungen gewichtet (Anhang C), wobei das Gewicht W_i inversiv proportional zur Varianz σ_i^2 ist:

$$W_i = \frac{1}{\sigma_i^2}$$

Die Ergebnisse wurden als gewichtete Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) angegeben.

4.6.2 Kinetik der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin

Die Kinetik der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin im Plasma sowie aller Substanzen in den Erythrozyten wurde durch C_{\max} [$\mu\text{mol/l}$], t_{\max} [h] und die AUC [$\mu\text{mol/l} \times \text{h}$] beschrieben. C_{\max} und t_{\max} wurden anhand der Konzentrations-Zeit-Kurven ermittelt und die AUC mit Hilfe der Trapezregel berechnet. C_{\max} und AUC wurden anschließend auf ein Körpergewicht von 70 kg korrigiert ($C_{\max,70}$; AUC_{70}). Da Glutaminsäure bereits vor Aufnahme der Studienprodukte in Plasma und Erythrozyten nachweisbar war, wurde die jeweilige Baseline-Konzentration von Glutaminsäure vor Berechnung der kinetischen Parameter von den Konzentrationen nach Intervention subtrahiert.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) und bei fehlender Normalverteilung als Median und Quartile angegeben.

4.6.3 Analytische Statistik

Die Verteilung der metrischen Daten wurde mittels Kolmogorov-Smirnow-Test geprüft. Falls keine Normalverteilung vorlag, wurden die Daten vor der statistischen Auswertung logarithmiert (Ethylamin im Plasma und L-Theanin in den Erythrozyten), um eine Normalverteilung zu erzielen.

Der Einfluss von Zeit, Intervention und Interaktionen von Zeit und Intervention (Zeit \times Intervention) auf die gemessenen Konzentrationen von L-Theanin, der nicht-proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin in Plasma und Erythrozyten wurde mit Hilfe der ANOVA

untersucht. Wenn ein Einfluss der Zeit auf die Konzentration festgestellt werden konnte, wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten mittels Post hoc Tukey-Test analysiert. Die kinetischen Parameter von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin in Plasma und Erythrozyten sowie deren Stoffmenge im Urin nach Kapsel- und Grünteeverzehr (s.o) wurden mittels gepaarten T-Tests miteinander verglichen, falls eine Normalverteilung der Daten angenommen werden konnte. Andernfalls wurde der Mann-Whitney *U*-Test angewendet. Um dosisabhängige Effekte zu untersuchen, wurde die AUC_{70} von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin in Plasma und Erythrozyten nach Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg isoliertem L-Theanin mittels ANOVA und anschließendem Post hoc Tukey-Test miteinander verglichen.

Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ festgelegt. Bei normalverteilten Daten wurden die Ergebnisse als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) und bei fehlender Normalverteilung als Median und Quartile angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS 19.0.

5 Ergebnisse

5.1 Probanden und Compliance

Die Probanden waren im Durchschnitt $28,7 \pm 3,8$ Jahre alt, wogen $68,7 \pm 9,6$ kg und der BMI lag bei $22,3 \pm 1,5$ kg/m². Da es sich um gesunde Probanden handelte, die bezüglich Alter und BMI vergleichbar waren, kann man davon ausgehen, dass die Plasmakinetik, der Metabolismus und die Ausscheidung von L-Theanin ebenfalls vergleichbar waren.

Alle 12 Probanden beendeten die Studie. Die Proben von Plasma und Erythrozyten konnten von allen Teilnehmern analysiert und ausgewertet werden. Da zwei Probanden kein Urin sammelten, wurden die Urinproben von insgesamt 10 Teilnehmern analysiert und ausgewertet.

Laut Ernährungsprotokoll verzehrten die Probanden vier Tage vor und während der Untersuchung – abgesehen von den Studienprodukten – keine theaninhaltigen Lebensmittel. Zur Baseline waren L-Theanin und Ethylamin in Plasma, Erythrozyten und Urin der Probanden konsequenterweise nicht nachweisbar.

5.2 Simulation der Plasmakinetik von L-Theanin im Ein-Kompartiment-Modell

Für die Simulation der Konzentrations-Zeit-Kurven von L-Theanin im Plasma wurden die Modellparameter a , k_1 , k_2 und t_{lag} auf Basis der Messwerte für jeden Probanden geschätzt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Modellparameter für die Simulation der Konzentrations-Zeit-Kurve von L-Theanin im Plasma nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel und Grüntee.

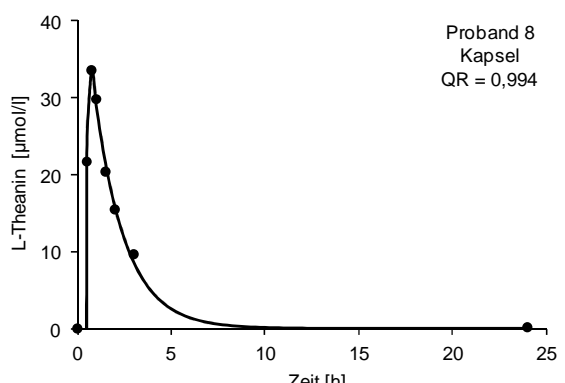
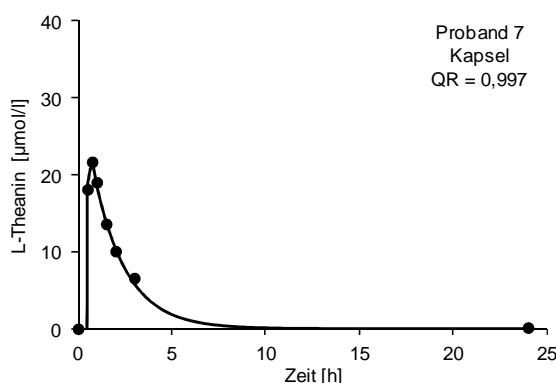
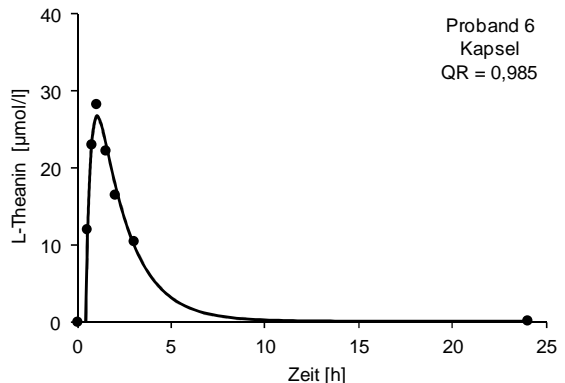
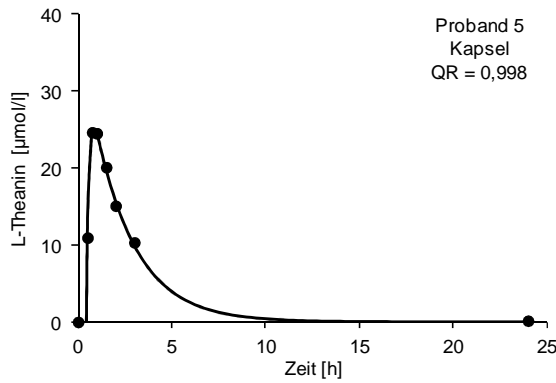
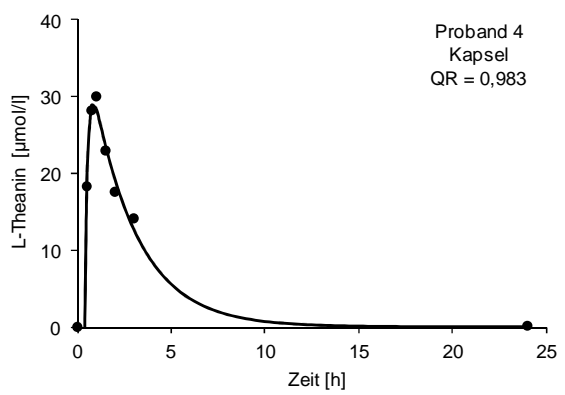
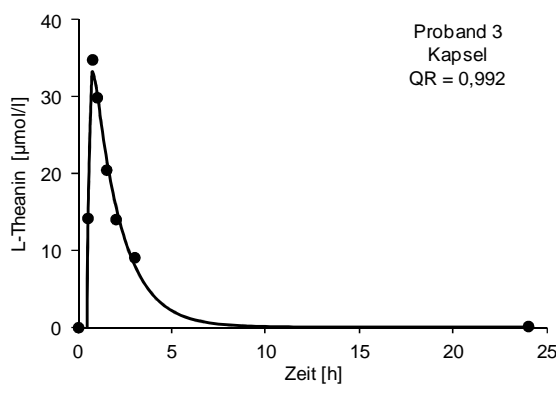
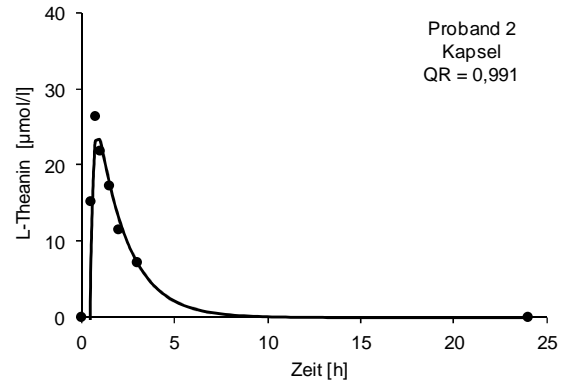
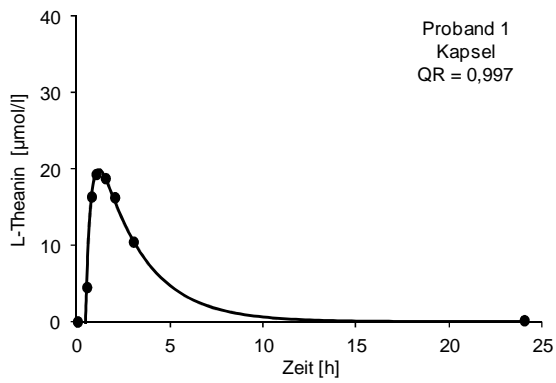
	a [$\mu\text{mol/l}$]	k_1 [h^{-1}]	k_2 [h^{-1}]	t_{lag} [h]
Kapsel				
Proband 1	$26,72 \pm 2,84$	$3,43 \pm 1,26$	$0,41 \pm 0,10$	$0,45 \pm 0,06$
Proband 2	$26,88 \pm 4,93$	$1,36 \pm 0,07$	$0,35 \pm 0,08$	$0,49 \pm 0,13$
Proband 3	$31,50 \pm 2,83$	$7,42 \pm 6,52$	$0,76 \pm 0,18$	$0,44 \pm 0,09$
Proband 4	$35,17 \pm 3,60$	$6,50 \pm 3,80$	$0,41 \pm 0,08$	$0,38 \pm 0,10$
Proband 5	$30,34 \pm 2,93$	$2,25 \pm 2,22$	$0,46 \pm 0,10$	$0,44 \pm 0,09$
Proband 6	$37,97 \pm 4,65$	$3,61 \pm 2,77$	$0,59 \pm 0,17$	$0,39 \pm 0,09$
Proband 7	$25,33 \pm 1,99$	$3,31 \pm 3,86$	$0,58 \pm 0,08$	$0,43 \pm 0,09$
Proband 8	$39,16 \pm 2,89$	$6,90 \pm 3,27$	$0,61 \pm 0,10$	$0,45 \pm 0,07$

	a [$\mu\text{mol/l}$]	k_1 [h^{-1}]	k_2 [h^{-1}]	t_{lag} [h]
Proband 9	62,50 \pm 9,34	1,78 \pm 1,37	0,97 \pm 0,20	0,50 \pm 0,19
Proband 10	31,49 \pm 3,62	2,83 \pm 3,29	0,40 \pm 0,06	0,37 \pm 0,09
Proband 11	32,39 \pm 2,18	6,26 \pm 2,57	0,55 \pm 0,06	0,39 \pm 0,09
Proband 12	42,37 \pm 9,39	1,64 \pm 1,61	0,69 \pm 0,32	0,46 \pm 0,08
Grüntee				
Proband 1	26,88 \pm 2,24	7,36 \pm 1,51	0,35 \pm 0,09	0,48 \pm 0,12
Proband 2	31,50 \pm 2,59	5,42 \pm 6,51	0,76 \pm 0,14	0,44 \pm 0,14
Proband 3	66,86 \pm 11,5	0,87 \pm 1,52	0,87 \pm 0,29	0,26 \pm 0,32
Proband 4	62,23 \pm 4,80	0,99 \pm 0,05	0,99 \pm 0,03	0,19 \pm 0,04
Proband 5	53,77 \pm 16,1	0,75 \pm 0,92	0,75 \pm 0,30	0,33 \pm 0,23
Proband 6	46,26 \pm 6,06	1,59 \pm 1,41	0,60 \pm 0,12	0,24 \pm 0,14
Proband 7	25,17 \pm 3,56	4,28 \pm 1,23	0,49 \pm 0,06	0,35 \pm 0,05
Proband 8	36,39 \pm 2,36	6,28 \pm 2,10	0,51 \pm 0,06	0,32 \pm 0,11
Proband 9	48,59 \pm 9,06	2,35 \pm 1,24	0,57 \pm 0,18	0,23 \pm 0,08
Proband 10	45,52 \pm 3,93	2,12 \pm 0,71	0,59 \pm 0,08	0,24 \pm 0,08
Proband 11	27,71 \pm 3,57	3,99 \pm 2,22	0,32 \pm 0,10	0,37 \pm 0,14
Proband 12	37,46 \pm 3,51	2,35 \pm 2,28	0,55 \pm 0,09	0,17 \pm 0,20

Daten: MW \pm SD. a , Konzentration von L-Theanin, die nach Absorption den Organismus erreicht [$\mu\text{mol/l}$]; k_1 , Absorptionskonstante [h^{-1}]; k_2 , Eliminationskonstante [h^{-1}]; t_{lag} , Verzögerungszeit zwischen der oralen Aufnahme von L-Theanin und dem Auftreten von L-Theanin im Plasma [h].

Durch Einsatz von a , k_1 , k_2 und t_{lag} in das Ein-Kompartiment-Modell (Kapitel 4.6.1) konnten die fehlenden Messwerte interpoliert und die Konzentrations-Zeit-Kurven von L-Theanin im Plasma für alle 12 Probanden simuliert werden. Die Quadratsumme der Residuen lag dabei zwischen 0,9 und 1 (Abbildung 10 und Abbildung 11), was für eine gute Anpassung der simulierten Regressionskurve an die gemessenen Plasmakonzentrationen von L-Theanin spricht.

Abbildung 10 zeigt die simulierten Konzentrations-Zeit-Kurven und die Messwerte von L-Theanin im Plasma der 12 Probanden nach Aufnahme von 100 mg isoliertem L-Theanin.



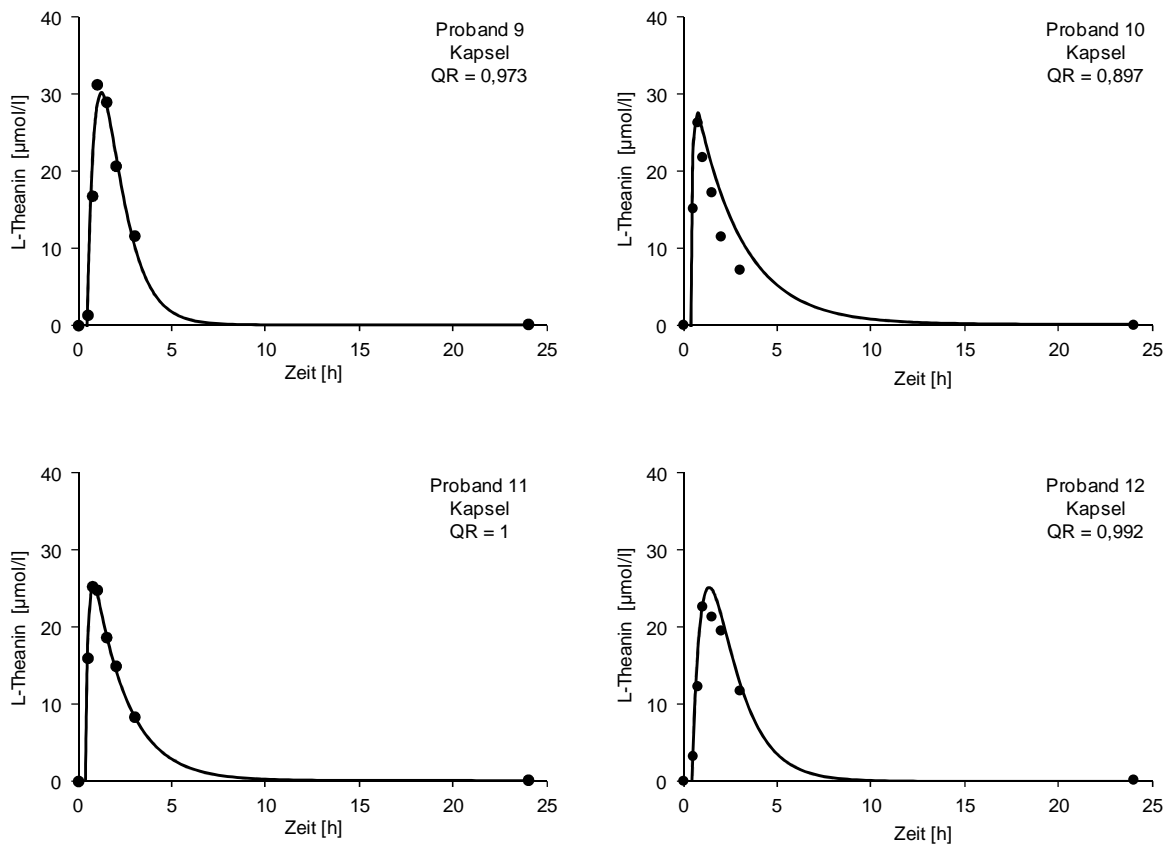
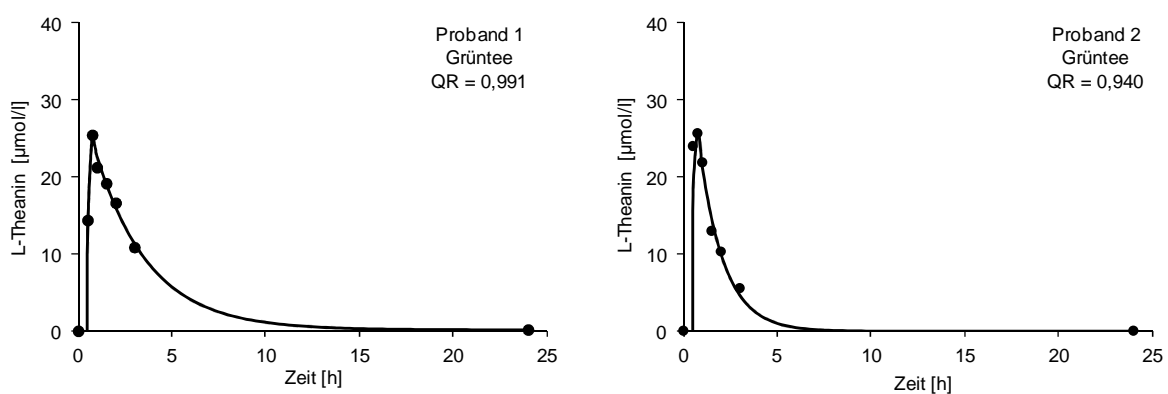
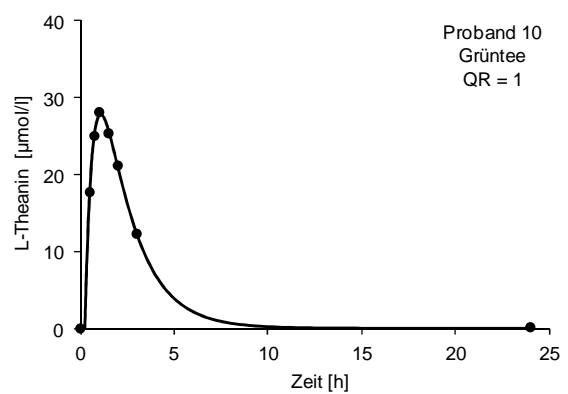
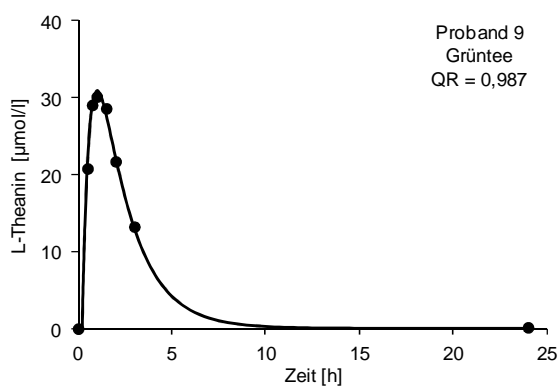
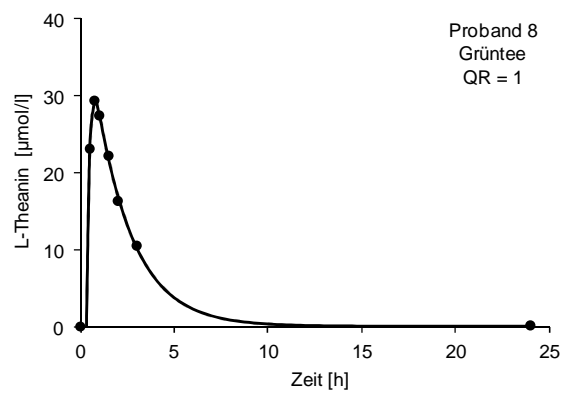
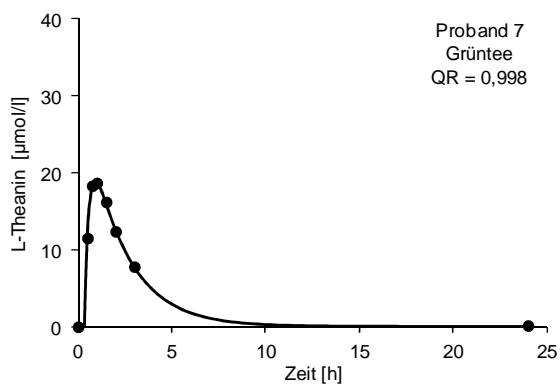
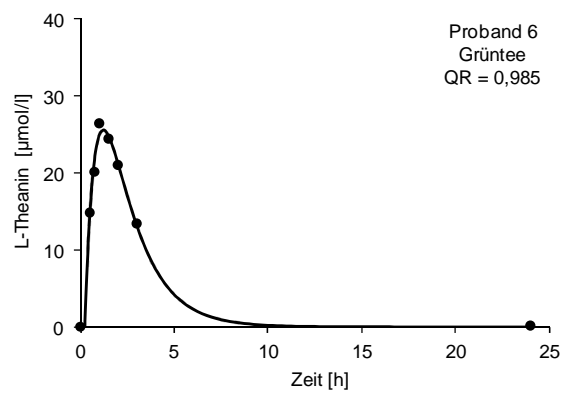
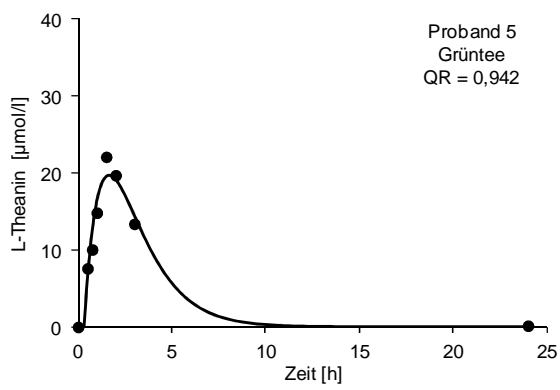
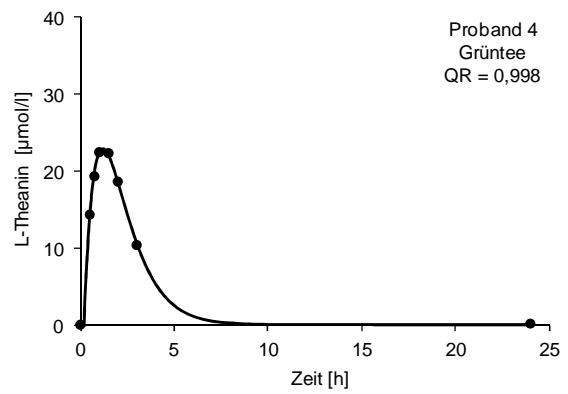
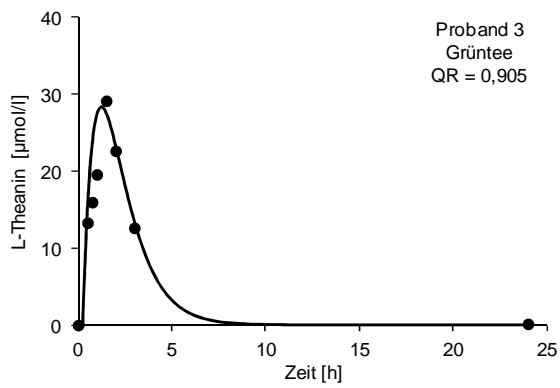


Abbildung 10: Simulierte Konzentrations-Zeit-Kurven und Messwerte von L-Theanin im Plasma nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel. Die Punkte kennzeichnen die gemessenen Konzentrationen von L-Theanin im Plasma zur Baseline sowie 0,5 h, 0,75 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h und 24 h nach Bolusgabe. Die Kurve wurde mit Hilfe des Ein-Kompartiment-Modells simuliert. QR, Quadratsumme der Residuen.

Abbildung 11 zeigt die simulierten Konzentrations-Zeit-Kurven und die Messwerte von L-Theanin im Plasma der 12 Probanden nach Aufnahme von 100 mg L-Theanin als Grüntee.





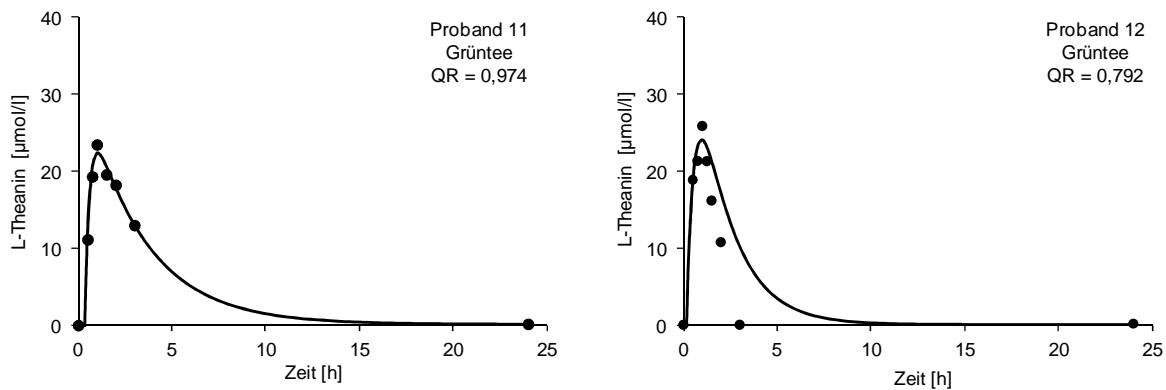


Abbildung 11: Simulierte Konzentrations-Zeit-Kurven und Messwerte von L-Theanin im Plasma nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Grüntee. Die Punkte kennzeichnen die gemessenen Konzentrationen von L-Theanin im Plasma zur Baseline sowie 0,5 h, 0,75 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h und 24 h nach Bolusgabe. Die Kurve wurde mit Hilfe des Ein-Kompartiment-Modells simuliert. RQ, Quadratsumme der Residuen.

Weiterhin wurden auf Grundlage der Modellparameter die kinetischen Parameter AUC_{70} , $C_{max,70}$, t_{max} , $t_{1/2,a}$, $t_{1/2,e}$ und V_{hyp} berechnet (Tabelle 6).

Tabelle 6: Plasmakinetik von L-Theanin nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel und Grüntee.

	Kapsel	Grüntee
AUC_{70} [$\mu\text{mol/l} \times \text{h}$]	57,1 \pm 3,6	56,2 \pm 2,2
$C_{max,70}$ [$\mu\text{mol/l}$]	24,3 \pm 5,7	26,5 \pm 5,2
t_{max} [h]	0,8 \pm 0,02	0,8 \pm 0,01
$t_{1/2,a}$ [h]	0,3 \pm 0,01	0,2 \pm 0,01
$t_{1/2,e}$ [h]	1,2 \pm 0,03	0,8 \pm 0,01
V_{hyp} [L]	17,1 \pm 0,6	15,8 \pm 0,6

Daten: Gewichtete MW \pm SEM ($n = 12$), berechnet mit Hilfe des Ein-Kompartiment-Modells. AUC_{70} , Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, korrigiert auf ein Körpergewicht von 70 kg [$\mu\text{mol/l} \times \text{h}$]; $C_{max,70}$, maximale Konzentration von L-Theanin im Plasma, korrigiert auf ein Körpergewicht von 70 kg [$\mu\text{mol/l}$]; t_{max} , Zeit bis zum Erreichen der maximalen Konzentration von L-Theanin im Plasma [h]; $t_{1/2,a}$, Absorptionshalbwertszeit [h]; $t_{1/2,e}$, Eliminationshalbwertszeit [h]; V_{hyp} , hypothetisches Verteilungsvolumen [L].

5.3 Änderungen des Aminosäureprofils in Plasma, Erythrozyten und Urin

5.3.1 Plasma

L-Theanin und Ethylamin waren vor Intervention nicht im Plasma nachweisbar, die Konzentration von Glutaminsäure im Plasma lag zur Baseline bei $20,7 \pm 6,2 \mu\text{mol/l}$.

Die Plasmakonzentration von *L-Theanin* stieg nach Aufnahme von Kapsel und Grüntee an, wobei sich die Konzentrationen zu allen Zeitpunkten bis 3 h nach Intervention voneinander unterschieden ($P < 0,001$). Nach 24 h erreichte L-Theanin wieder die Konzentration zur Baseline. Abbildung 12 zeigt die durchschnittlichen Konzentrationen von L-Theanin im Plasma der 12 Probanden nach Kapsel- und Grünteeaufnahme.

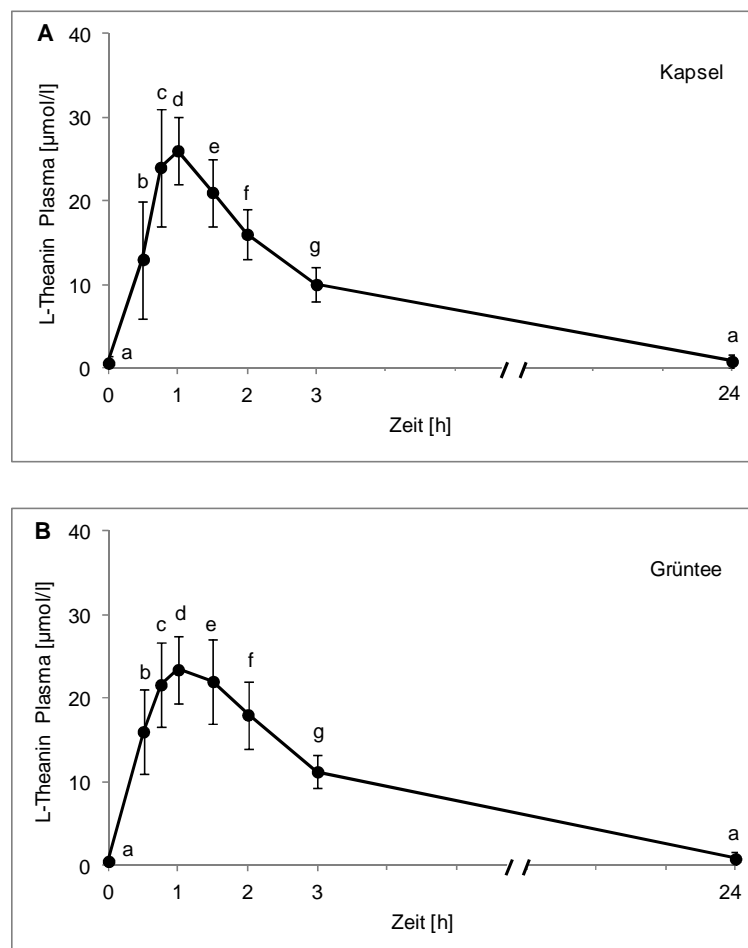


Abbildung 12: Konzentration von L-Theanin im Plasma nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel (A) und Grüntee (B). Daten: MW \pm SD ($n = 12$). Zeitpunkte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich bzgl. der Konzentration signifikant voneinander.

Die maximale Plasmakonzentration von L-Theanin wurde 0,8 h nach Aufnahme von Kapsel ($C_{\max,70}$: $24,3 \pm 5,7 \mu\text{mol/l}$, $n = 12$) und Grüntee ($C_{\max,70}$: $26,5 \pm 5,2 \mu\text{mol/l}$, $n = 12$) erreicht.

Die AUC_{70} von L-Theanin im Plasma änderte sich dosisabhängig nach Bolusgabe von 50 mg ($35,5 \pm 10,7 \mu\text{mol/l} \times \text{h}$, $n = 3$), 100 mg ($65,4 \pm 17,6 \mu\text{mol/l} \times \text{h}$, $n = 3$) und 200 mg L-Theanin ($173,4 \pm 23,0 \mu\text{mol/l} \times \text{h}$, $n = 3$), da sich die AUC_{70} nach Aufnahme dieser Dosen signifikant voneinander unterschieden (alle Vergleiche: $P < 0,05$). Abbildung 13 zeigt die dosisabhängige Änderung von L-Theanin im Plasma nach Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg L-Theanin.

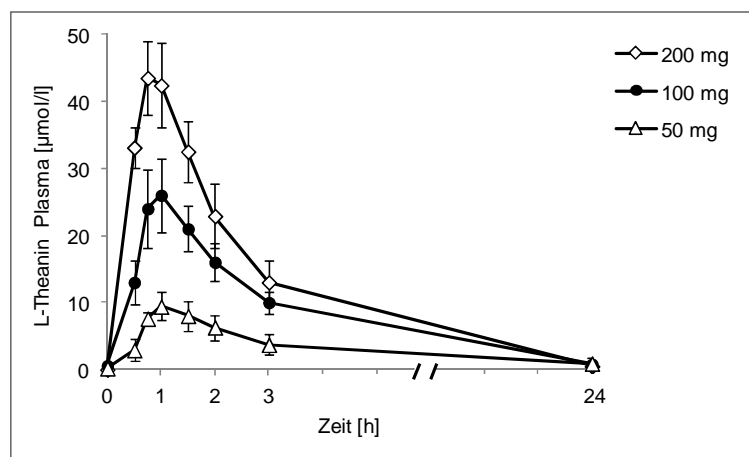
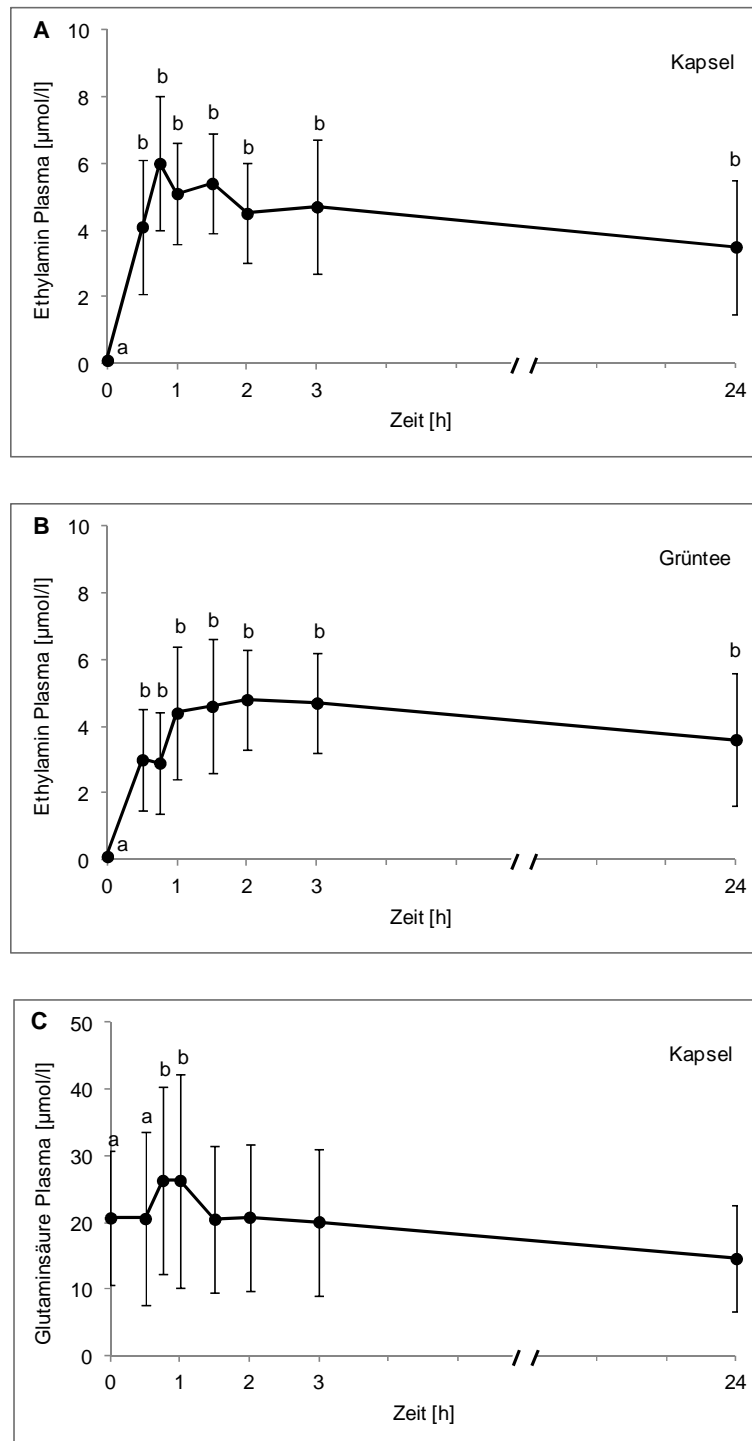


Abbildung 13: Konzentration von L-Theanin im Plasma nach Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg L-Theanin als Kapsel. Daten: MW \pm SD ($n = 3$).

Die Konzentration von *Ethylamin* im Plasma war 0,5 h ($P = 0,016$), 0,75 h ($P = 0,001$), 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h und 24 h (alle Zeitpunkte: $P < 0,001$) nach Kapsel- und Grünteeaufnahme im Vergleich zur Baseline erhöht. Die maximale Plasmakonzentration von Ethylamin wurde 5,4 h nach Kapselaufnahme ($6,1 \pm 3,7 \mu\text{mol/l}$, $n = 12$) und 5,2 h nach Grünteeverzehr ($8,2 \pm 4,2 \mu\text{mol/l}$, $n = 12$) erreicht.

Die Konzentration von *Glutaminsäure* im Plasma stieg 0,75 h ($P = 0,012$) und 1 h ($P = 0,009$) nach Aufnahme beider Studienprodukte im Vergleich zur Baseline an; wobei die $C_{\max,70}$ von Glutaminsäure 1,3 h nach Kapselaufnahme ($C_{\max,70}$: $12,9 \pm 9,1 \mu\text{mol/l}$, $n = 12$) und 1,6 h nach Grünteeverzehr ($C_{\max,70}$: $13,1 \pm 4,1 \mu\text{mol/l}$, $n = 12$) erreicht wurde.

Abbildung 14 zeigt die durchschnittlichen Konzentrationen von Ethylamin und Glutaminsäure im Plasma der 12 Probanden nach Kapsel- und Grünteeaufnahme.



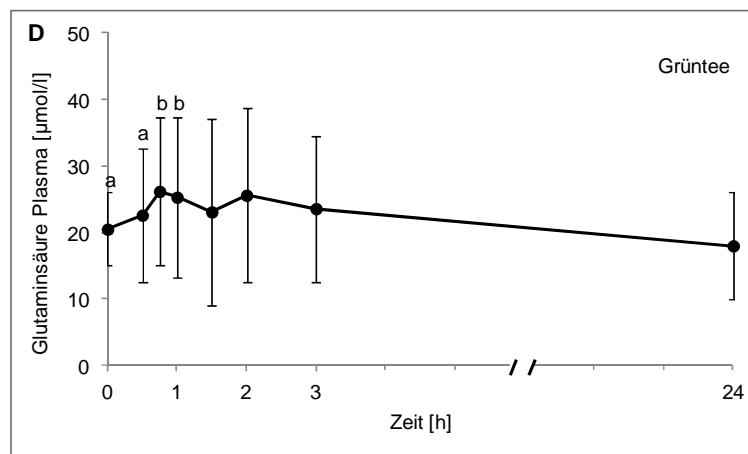


Abbildung 14: Konzentration von Ethylamin und Glutaminsäure im Plasma nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel (A und C) und Grüntee (B und D). Daten: MW \pm SD ($n = 12$). Zeitpunkte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich bzgl. der Konzentration signifikant voneinander.

Die AUC_{70} von Ethylamin im Plasma stieg dosisabhängig nach Aufnahme von 50 mg ($54,2 \pm 23,7 \mu\text{mol/l} \times \text{h}$, $n = 3$), 100 mg ($98,3 \pm 75,4 \mu\text{mol/l} \times \text{h}$, $n = 3$) und 200 mg L-Theanin ($251,3 \pm 61,3 \mu\text{mol/l} \times \text{h}$, $n = 3$) an (alle Vergleiche: $P < 0,05$) (Abbildung 15). Die AUC_{70} von Glutaminsäure im Plasma war dagegen unabhängig von der L-Theanindosis.

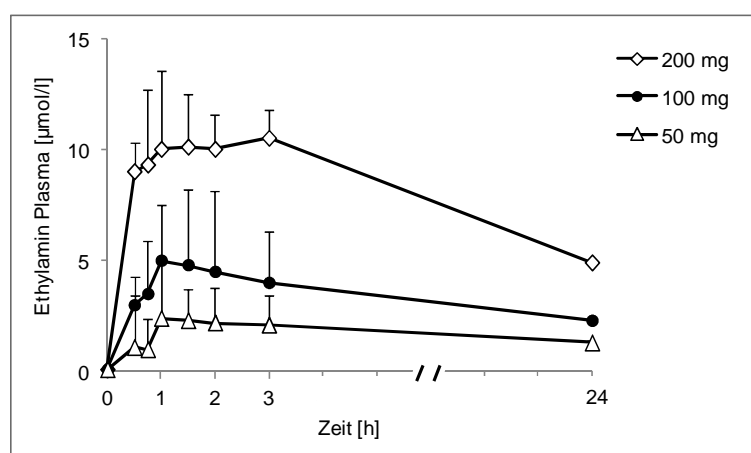


Abbildung 15: Konzentration von Ethylamin im Plasma nach Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg L-Theanin als Kapsel. Daten: MW \pm SD ($n = 3$).

Alle kinetischen Parameter von L-Theanin, Ethylamin und Glutaminsäure im Plasma waren nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin in isolierter Form und in Form von Grüntee vergleichbar (Tabelle 7).

Tabelle 7: Plasmakinetik von L-Theanin, Ethylamin und Glutaminsäure nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel und Grüntee.

	Kapsel	Grüntee
L-Theanin		
AUC_{70} [$\mu\text{mol/l} \times \text{h}$]	57,1 \pm 3,6	56,2 \pm 2,2
$C_{\text{max},70}$ [$\mu\text{mol/l}$]	24,3 \pm 5,7	26,5 \pm 5,2
t_{max} [h]	0,8 \pm 0,02	0,8 \pm 0,01
$t_{1/2,a}$ [h]	0,3 \pm 0,01	0,2 \pm 0,01
$t_{1/2,e}$ [h]	1,2 \pm 0,03	0,8 \pm 0,01
V_{hyp} [L]	17,1 \pm 0,6	15,8 \pm 0,6
Ethylamin		
AUC_{70} [$\mu\text{mol/l} \times \text{h}$]	101,3 \pm 75,1	109,2 \pm 83,7
$C_{\text{max},70}$ [$\mu\text{mol/l}$]	6,1 \pm 3,7	8,2 \pm 4,2
t_{max} [h]	5,4 \pm 8,7	5,2 \pm 8,8
Glutaminsäure		
AUC_{70} [$\mu\text{mol/l} \times \text{h}$]	38,9 \pm 13,6	41,7 \pm 16,5
$C_{\text{max},70}$ [$\mu\text{mol/l}$]	12,9 \pm 9,1	13,1 \pm 4,1
t_{max} [h]	1,3 \pm 0,4	1,6 \pm 0,2

Daten: Gewichtete MW \pm SEM für L-Theanin ($n = 12$), alle Parameter berechnet mit Hilfe des Ein-Kompartiment-Modells. MW \pm SD für Ethylamin und Glutaminsäure ($n = 12$). Die AUC_{70} für Ethylamin und Glutaminsäure wurde mit Hilfe der Trapezregel berechnet. Die Baseline-Konzentration von Glutaminsäure wurde vor Berechnung der kinetischen Parameter von den Messwerten nach Intervention subtrahiert. AUC_{70} , Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, korrigiert auf ein Körpergewicht von 70 kg [$\mu\text{mol/l} \times \text{h}$]; $C_{\text{max},70}$, maximale Konzentration im Plasma, korrigiert auf ein Körpergewicht von 70 kg [$\mu\text{mol/l}$]; t_{max} , Zeit bis zum Erreichen der maximalen Konzentration im Plasma [h]; $t_{1/2,a}$, Absorptionshalbwertszeit [h]; $t_{1/2,e}$, Eliminationshalbwertszeit [h]; V_{hyp} , hypothetisches Verteilungsvolumen [L].

Die Konzentration weiterer proteinogener Aminosäuren im Plasma änderte sich zu keinem Zeitpunkt. Die Reihenfolge der Intervention sowie die Interaktion von Intervention und Zeit zeigten keinen Einfluss auf die Konzentration von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin im Plasma.

5.3.2 Erythrozyten

L-Theanin und Ethylamin waren vor Intervention nicht in den Erythrozyten nachweisbar, die Konzentration von Glutaminsäure lag zur Baseline bei $179,5 \pm 81,7 \mu\text{mol/l}$.

Die Konzentration von *L-Theanin* in den Erythrozyten stieg 1 h ($P = 0,05$), 1,5 h, 2 h, 3 h und 24 h (alle Zeitpunkte: $P < 0,001$) nach Aufnahme von Kapsel und Grüntee im Vergleich zur Baseline an (Abbildung 16).

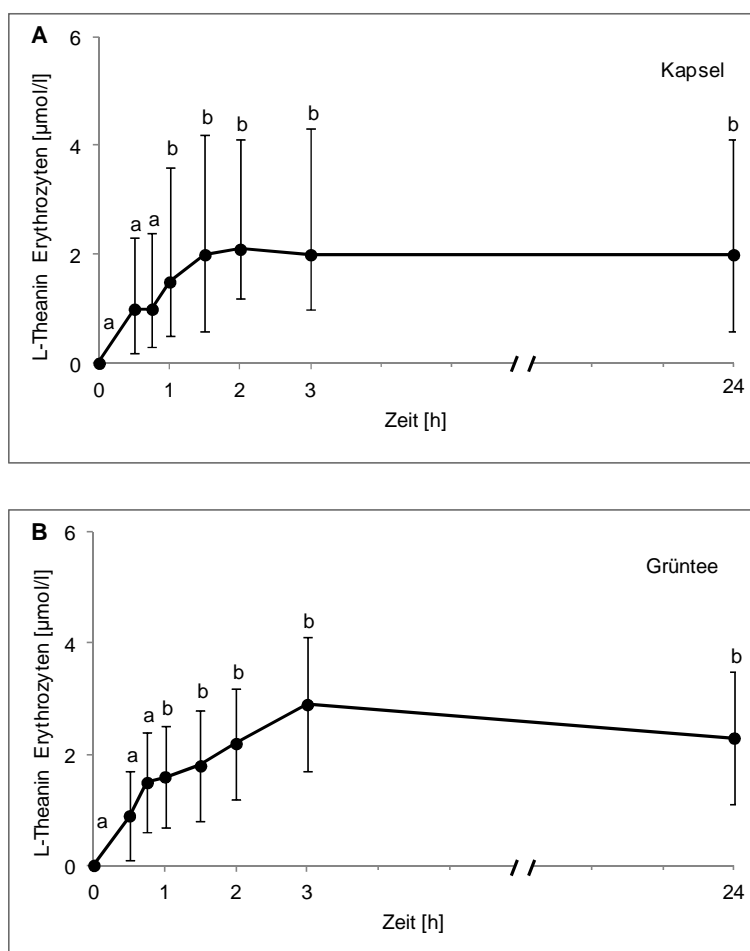


Abbildung 16: Konzentration von L-Theanin in den Erythrozyten nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel (A) und Grüntee (B). Daten: Median und Quartile ($n = 12$). Zeitpunkte mit verschiedenen Buchstaben unterscheiden sich bzgl. der Konzentration signifikant voneinander.

Die $C_{\text{max},70}$ von L-Theanin in den Erythrozyten wurde 2 h nach Kapselaufnahme ($2,8 [1,8; 3,9] \mu\text{mol/l}$, $n = 12$) und 3 h nach Grünteeverzehr ($3,2 [2,6; 4,4] \mu\text{mol/l}$, $n = 12$) erreicht.

Die AUC_{70} von L-Theanin in den Erythrozyten stieg dosisabhängig nach Aufnahme von 50 mg ($32,4 \pm 19,8 \mu\text{mol/l} \times \text{h}$, $n = 3$), 100 mg ($48,7 \pm 28,1 \mu\text{mol/l} \times \text{h}$, $n = 3$) und 200 mg ($123,1 \pm 43,7 \mu\text{mol/l} \times \text{h}$, $n = 3$) L-Theanin in Kapselform an (alle Vergleiche: $P < 0,05$) (Abbildung 17).

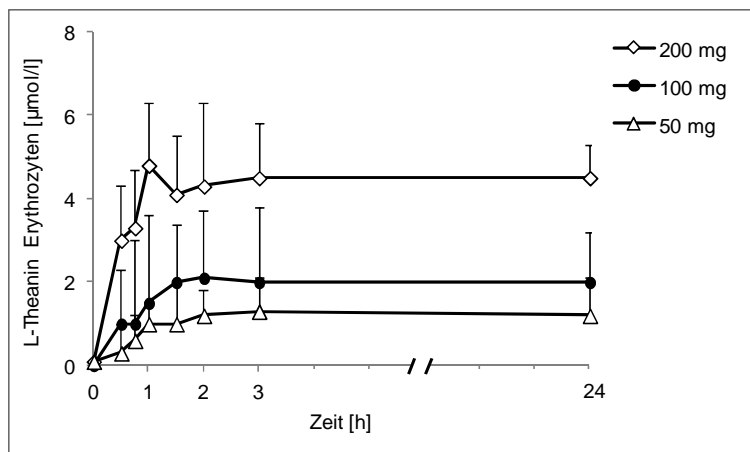


Abbildung 17: Konzentration von L-Theanin in den Erythrozyten nach Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg L-Theanin als Kapsel. Daten: MW \pm SD ($n = 3$).

Alle kinetischen Parameter von L-Theanin in den Erythrozyten waren nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin in isolierter Form und als Grüntee vergleichbar (Tabelle 8).

Tabelle 8: Kinetische Parameter von L-Theanin in den Erythrozyten nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel und Grüntee.

	Kapsel	Grüntee
AUC_{70} [$\mu\text{mol/l} \times \text{h}$]	47,8 [25,2; 73,5]	62,4 [43,6; 90,5]
$C_{\text{max},70}$ [$\mu\text{mol/l}$]	2,8 [1,8; 3,9]	3,2 [2,6; 4,4]
t_{max} [h]	2,0 [1,0; 18,8]	3,0 [2,0; 18,8]

Daten: Median und Quartile ($n = 12$). AUC_{70} , Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve, korrigiert auf ein Körpergewicht von 70 kg [$\mu\text{mol/l} \times \text{h}$]; $C_{\text{max},70}$, maximale Konzentration von L-Theanin in den Erythrozyten, korrigiert auf ein Körpergewicht von 70 kg [$\mu\text{mol/l}$]; t_{max} , Zeit bis zum Erreichen der maximalen Konzentration von L-Theanin in den Erythrozyten [h].

Die Konzentration von *Glutaminsäure* und weiteren proteinogenen Aminosäuren in den Erythrozyten änderte sich zu keinem Zeitpunkt. *Ethylamin* wurde in den Erythrozyten nicht nachgewiesen.

5.3.3 Urin

L-Theanin und Ethylamin waren vor Intervention nicht im Nüchternurin nachweisbar. Die mediane Konzentration von *Glutaminsäure* im Nüchternurin lag bei 0,8 [0,3; 2,1] $\mu\text{mol/l}$.

Nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel und Grüntee wurden *L-Theanin* und *Ethylamin* mit dem Urin ausgeschieden. Auch die Stoffmenge von *Glutaminsäure* im Urin stieg nach Aufnahme beider Studienprodukte im Vergleich zum Nüchternurin an. Tabelle 9 zeigt die Stoffmengen von L-Theanin, Ethylamin und *Glutaminsäure*, die in den Zeitintervallen 0 - 3 h und 3 - 24 h mit dem Urin der Probanden ausgeschieden wurden.

Tabelle 9: Stoffmengen von L-Theanin, *Glutaminsäure* und Ethylamin im Urin nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin als Kapsel und Grüntee.

	Kapsel		Grüntee	
	0 - 3 h	3 - 24 h	0 - 3 h	3 - 24 h
	<i>[μmol]</i>			
L-Theanin	9,5 [2,2; 13,2]	7,8 [4,8; 17,9]	7,1 [2,8; 15,1]	7,2 [4,1; 14,4]
Ethylamin	92,9 [39,5; 142,7]	179,1 [62,5; 260,9]	101,2 [48,5; 126,7]	207,1 [123,2; 334,1]
<i>Glutaminsäure</i>	2,6 [1,5; 3,5]	21,3 [16,8; 35,1]	2,2 [1,1; 3,8]	24,8 [11,5; 28,5]

Daten: Median und Quartile ($n = 10$). Keine signifikanten Unterschiede nach Kapsel- und Grünteeaufnahme nachweisbar (Mann-Whitney *U*-Test).

Die Stoffmengen von L-Theanin, Ethylamin und *Glutaminsäure* im Urin waren nach Aufnahme beider Studienprodukte vergleichbar (Tabelle 9). Nach Kapsel- und Grünteeaufnahme wurden etwa 3% der oral aufgenommenen L-Theaninmenge (~ 575 μmol) innerhalb 24 h mit dem Urin der Probanden ausgeschieden.

Tabelle 10 zeigt die Stoffmengen von L-Theanin, Ethylamin und Glutaminsäure im Urin nach Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg L-Theanin.

Tabelle 10: Stoffmengen von L-Theanin, Ethylamin und Glutaminsäure im Urin nach Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg L-Theanin als Kapsel.

	0 - 3 h			3 - 24 h		
	50 mg	100 mg	200 mg	50 mg	100 mg	200 mg
	<i>[μmol]</i>					
L-Theanin						
Proband 1	2,8	9,8	22,9	10,2	24,2	38,9
Proband 2	6,1	15,4	49,6	10,7	8,6	25,5
Proband 3	5,4	11,7	38,5	12,3	9,4	30,6
Ethylamin						
Proband 1	17,7	30,8	160,3	26,7	56,3	237,8
Proband 2	43,6	66,9	233,4	34,9	81,1	169,1
Proband 3	42,9	70,2	198,6	41,4	74,2	202,6
Glutaminsäure						
Proband 1	1,5	2,8	14,5	10,8	37,8	11,2
Proband 2	n.d.	3,3	n.d.	12,2	30,8	15,3
Proband 3	2,4	4,7	23,4	14,7	24,2	34,8

n.d. = nicht detektierbar.

6 Diskussion

Theanin (5-N-Ethyl-Glutamin) ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die v.a. durch den Verzehr von grünem, weißem, schwarzen und Oolong-Tee aufgenommen wird. Eine Tasse Grüntee (150 ml), zubereitet nach Herstellerempfehlung, enthält etwa 31 mg Theanin [6], wobei es sich fast ausschließlich um das L-Enantiomer handelt [7]. L-Theanin in isolierter Form wird in Japan, Taiwan, den USA und in Kanada seit Ende der 90er Jahre als Nahrungsergänzungsmittel Suntheanine[®] vermarktet und ist seitdem auch in Deutschland erhältlich [8]. Da L-Theanin die kognitive Leistungsfähigkeit und die Gemütslage verbessern soll [32, 35], wird Suntheanine[®] in Asien, den USA und Kanada auch in funktionellen Getränken zugesetzt. In Deutschland ist dies nicht erlaubt, da die bisher publizierten Daten bzgl. erwünschter und unerwünschter Wirkungen einer Aufnahme von isoliertem L-Theanin unzureichend sind und daher eine Risikobewertung nicht möglich ist. Ethylamin und Glutaminsäure werden als Metabolite von L-Theanin betrachtet, basierend auf tierexperimentellen Daten [20, 22]. Untersuchungen zum Metabolismus von L-Theanin im menschlichen Organismus liegen bisher nicht vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob die Bolusgabe von 100 mg L-Theanin in isolierter Form bzw. in Form von Grüntee zu einer Änderung der Konzentration bzw. Stoffmenge von L-Theanin, Ethylamin, Glutaminsäure u.a. proteinogenen Aminosäuren in Plasma, Erythrozyten und Urin gesunder Probanden führt. Weiterhin sollte die vorliegende Arbeit klären, ob sich Plasmakinetik und Metabolismus von L-Theanin nach dem Verzehr von isoliertem L-Theanin und Grüntee unterscheiden.

6.1 Plasmakinetik von L-Theanin

Die Konzentration von L-Theanin im Plasma stieg nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin an und erreichte nach 24 h wieder die Konzentration zur Baseline (Abbildung 12). Dabei war die Plasmakinetik von L-Theanin nach Aufnahme von Kapsel und Grüntee vergleichbar (Tabelle 6). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie entsprechen den Beobachtungen von van der Pijl et al. [11]; hier führte die Bolusgabe von 100 mg L-Theanin in isolierter Form und in Form von Schwarztee zu einem Anstieg der Plasmakonzentration von L-Theanin, wobei die Plasmakinetik von L-Theanin nach Aufnahme beider Studienprodukte ebenfalls vergleichbar war. Ein Einfluss auf die Absorption von L-Theanin durch andere Substanzen im Grün- oder Schwarztee, z.B. Glutamin oder andere proteinogene Aminosäuren (Tabelle 3), u.a. bedingt

durch Nutzung derselben Transporter in der Bürstensaummembran [19], ist somit unwahrscheinlich.

Mittels Ein-Kompartiment-Modell und Integration einer Verzögerungszeit (t_{ag} : 10 - 24 min) konnten alle Konzentrations-Zeit-Kurven von L-Theanin im Plasma mit einer guten Anpassung an die Messwerte simuliert werden. Die maximale Plasmakonzentration von L-Theanin wurde 0,8 h nach Kapsel- ($24,3 \pm 5,7 \mu\text{mol/l}$) und Grünteeaufnahme ($26,5 \pm 5,2 \mu\text{mol/l}$) erreicht. Ähnliche Ergebnisse erzielten van der Pijl et al. [11]: Die maximale Konzentration von L-Theanin im Plasma ($25,4 \pm 4,1 \mu\text{mol/l}$) wurde 0,75 h nach Bolusgabe von 100 mg isoliertem L-Theanin beobachtet. Dabei wurde die Plasmakinetik von L-Theanin ebenfalls mit Hilfe eines Ein-Kompartiment-Modells unter Berücksichtigung einer t_{ag} berechnet. Bei van der Pijl et al. war die t_{ag} mit 8 bis 10 min kürzer als in der vorliegenden Studie. Dies ist möglicherweise dadurch bedingt, dass Suntheanine[®] in Wasser gelöst verabreicht wurde – und nicht wie in der vorliegenden Studie als Kapsel. In beiden Studien wurde L-Theanin von den nüchternen Probanden rasch absorbiert und die maximale Plasmakonzentration innerhalb einer Stunde nach Aufnahme der unterschiedlichen Studienprodukte erreicht.

In der vorliegenden Studie wurden zusätzlich zu den Parametern t_{ag} , $C_{max,70}$, t_{max} und AUC_{70} weitere Kenngrößen zur Einschätzung der Plasmakinetik ($t_{1/2,a}$ und $t_{1/2,e}$) und der Verteilung von L-Theanin im Organismus (V_{hyp}) berechnet, wobei nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden wie bei van der Pijl et al. [11]. Dies ist nicht verwunderlich, da in beiden Studien Suntheanine[®] verabreicht wurde, die Probanden bezüglich Alter, BMI und Gesundheitsstatus vergleichbar waren und die Parameter C_{max} und AUC in beiden Studien auf ein Körpergewicht von 70 kg korrigiert wurden. Bei einem mittleren Verteilungsvolumen von 16 bis 17 Litern in der vorliegenden Studie und 19 Litern bei van der Pijl et al. [11] kann angenommen werden, dass L-Theanin über das Blut in die peripheren Gewebe und Organe gelangt. Bei Ratten wurde L-Theanin bereits 1 h nach Bolusgabe in Leber und Gehirn nachgewiesen [22]. Die rasche Elimination von L-Theanin aus dem Plasma, mit einer Halbwertszeit von 0,8 h bis 1,2 h in der vorliegenden Arbeit (Tabelle 6) und etwa 1 h bei van der Pijl et al. [11], spricht ebenfalls für eine rasche Verteilung von L-Theanin in die gut durchbluteten Gewebe und Organe des menschlichen Organismus.

Die AUC_{70} von L-Theanin im Plasma änderte sich dosisabhängig nach Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg isoliertem L-Theanin (Abbildung 13). Auch in der Studie von van der Pijl et al. [11] führte die Bolusgabe von 25 mg, 50 mg und 100 mg L-Theanin zu einem

dosisabhängigen Anstieg der Plasmakonzentration von L-Theanin: $C_{\max,70}$ und AUC_{70} stiegen mit zunehmender L-Theanindosis an, während t_{\max} und V_{hyp} vergleichbar waren.

Mit Hilfe des Ein-Kompartiment-Modells ist eine Simulation der Plasmakinetik von L-Theanin auch für Bolusgaben möglich, die in der vorliegenden Studie nicht untersucht wurden. Durch den Einsatz der Mittelwerte von a , k_1 , k_2 und t_{lag} (Tabelle 11) in das Ein-Kompartiment-Modell können die Konzentrations-Zeit-Kurven von L-Theanin im Plasma für weitere Dosierungen simuliert werden.

Tabelle 11: Mittelwerte der Modellparameter.

a [$\mu\text{mol/l}$]	k_1 [h^{-1}]	k_2 [h^{-1}]	t_{lag} [h]
28,76 \pm 5,02	3,57 \pm 2,26	0,59 \pm 0,13	0,37 \pm 0,12

Daten: MW \pm SD ($n = 12$). a , Konzentration von L-Theanin, die nach Absorption den Organismus erreicht [$\mu\text{mol/l}$]; k_1 , Absorptionskonstante [h^{-1}]; k_2 , Eliminationskonstante [h^{-1}]; t_{lag} , Verzögerungszeit zwischen der oralen Aufnahme von L-Theanin und dem Auftreten von L-Theanin im Plasma [h].

Abbildung 18 zeigt die simulierte dosis- und zeitabhängige Plasmakonzentration von L-Theanin nach Aufnahme von bis zu 200 mg L-Theanin. Die Abbildung macht noch einmal deutlich, dass L-Theanin – unabhängig von der Dosis – rasch absorbiert wird. Die Elimination von L-Theanin aus dem Plasma erfolgt ebenfalls rasch, spätestens 12 h nach Aufnahme erreicht die Plasmakonzentration von L-Theanin wieder die Konzentration zur Baseline (Abbildung 18).

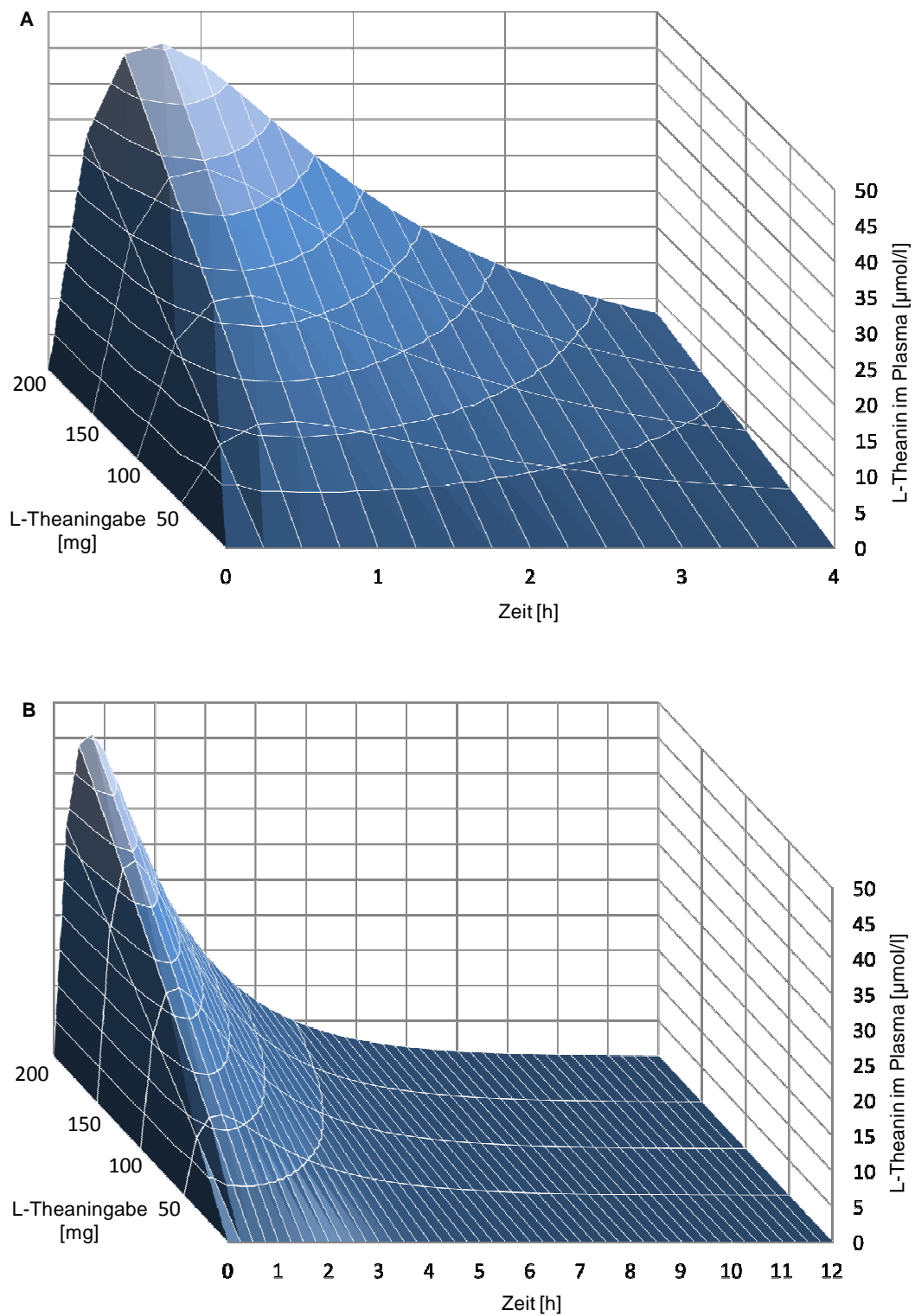


Abbildung 18: Simulation der dosis- und zeitabhängigen Konzentration von L-Theanin im Plasma bis 4 h (A) bzw. 12 h (B) nach Aufnahme von L-Theanin.

6.2 Metabolismus von L-Theanin

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass L-Theanin im menschlichen Organismus zu Ethylamin und Glutaminsäure metabolisiert wird, da nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin die Konzentration von Ethylamin und Glutaminsäure im Plasma anstieg (Abbildung 14) und beide Substanzen mit dem 24-Stunden-Urin ausgeschieden wurden (Tabelle 9). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass lediglich etwa 3% der oral aufgenommenen Stoffmenge von L-Theanin (100 mg) mit dem 24-Stunden-Urin der Probanden ausgeschieden wurde, aber eine vielfach höhere Stoffmenge von Ethylamin (Tabelle 9). Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen bei Ratten: Hier wurden lediglich etwa 2% der verabreichten Menge an L-Theanin (100 mg) mit dem 24-Stunden-Urin ausgeschieden und eine 10-fache höhere Stoffmenge an Ethylamin im Rattenurin nachgewiesen. Nach oraler Gabe von 400 mg L-Theanin waren etwa 21% der verabreichten Dosis im 24-Stunden-Urin der Ratten nachweisbar, wobei die renale Ausscheidung von Ethylamin und L-Theanin vergleichbar war [20]. Möglicherweise ist bei höheren Dosen an L-Theanin die enzymatische Hydrolyse von L-Theanin limitiert.

Plasmakinetik und renale Ausscheidung von Ethylamin und Glutaminsäure waren in der vorliegenden Studie nach Kapsel- und Grünteeaufnahme vergleichbar. Die maximale Konzentration von Ethylamin bzw. Glutaminsäure im Plasma wurde 5,4 h bzw. 1,3 h nach Bolusgabe erreicht, war jedoch um das 4-fache bzw. um die Hälfte niedriger als die maximale Konzentration von L-Theanin im Plasma (Tabelle 8). Bisher bestätigen ausschließlich tierexperimentelle Studien, dass die Bolusgabe von L-Theanin zu einem Anstieg von Ethylamin und Glutaminsäure im Plasma führt [20, 22]. Auch hier wurde die maximale Plasmakonzentration von L-Theanin innerhalb 1 h erreicht und die maximale Konzentration von Ethylamin und Glutaminsäure im Plasma war um ein Vielfaches niedriger als die $C_{\max,70}$ von L-Theanin [20, 22].

Sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte kann der Konzentrationsanstieg von Glutaminsäure im Plasma sowie deren renale Ausscheidung nicht ausschließlich auf die Aufnahme von L-Theanin zurückgeführt werden. Glutaminsäure unterliegt im Aminosäurestoffwechsel einem ständigen Turnover, an dem v.a. die Glutaminase, die Glutamat-Dehydrogenase und die Transaminase beteiligt sind [48]. Der Organismus ist darüber hinaus bestrebt, die Konzentration von Glutaminsäure – ein Neurotransmitter – durch homöostatische Regulation niedrig zu halten [48]. Dies ist möglicherweise eine Erklärung dafür, dass die Plasmakonzentration von Glutaminsäure nur kurzfristig anstieg und nach 1,5 h wieder die Baseline erreichte, während die Konzentration von Ethylamin im Plasma

auch noch 24 h nach Bolusgabe erhöht war (Abbildung 14). Auch die Stoffmenge von Glutaminsäure im Urin der Probanden bzw. von Ratten [20, 22] war um das 10- bzw. 4-fache geringer als die Stoffmenge von Ethylamin, da Ethylamin wahrscheinlich – im Unterschied zu Glutaminsäure – nicht metabolisiert und in relativ hohen Mengen mit dem Urin ausgeschieden wird. Die Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg L-Theanin führte zu einer dosisabhängigen Konzentrationsänderung von Ethylamin im Plasma (Abbildung 15), nicht aber von Glutaminsäure. Dies ist möglicherweise ebenfalls durch die homöostatische Regulation von Glutaminsäure zu erklären.

Die Plasmakonzentration von Glutaminsäure sowie deren renale Ausscheidung lassen keinen Rückschluss auf die Bioverfügbarkeit von L-Theanin zu. Wenn man jedoch berücksichtigt, dass L-Theanin *in vitro* zu gleichen Anteilen an Ethylamin und Glutaminsäure hydrolysiert wird, entspricht die renale Ausscheidung von 272 μmol Ethylamin nach Kapselaufnahme bzw. 308 μmol Ethylamin nach Grünteeverzehr 47% bzw. 52% der oral zugeführten L-Theaninmenge. Tabelle 12 zeigt die Stoffmengen von L-Theanin und Ethylamin in Plasma und Urin, die in der vorliegenden Arbeit und bei Ratten nachgewiesen wurden [22].

Tabelle 12: Stoffmengen von L-Theanin und Ethylamin in Plasma und 24-Stunden-Urin.

	Suntheanine®			Grüntee		
	Aufnahme	Plasma	Urin	Aufnahme	Plasma	Urin
	<i>[μmol (%)]</i>					
Scheid et al. 2012 [49]						
L-Theanin	575 (100)	146 (25)	17 (3)	592 (100)	159 (27)	14 (3)
Ethylamin	-	37 (6)	272 (47)	-	49 (8)	308 (52)
Terashima et al. 1999 [22]						
L-Theanin	575 (100)	7,8 (1)	12 (2)	-	-	-
Ethylamin	-	12 (2)	151 (26)	-	-	-

Die Stoffmengen im Plasma wurden berechnet auf Grundlage der $C_{\text{max},70}$ ([49] und [22]) und einem postulierten Blutvolumen von 6 L für die Probanden und 60 ml/kg für Ratten [22]. Die Stoffmengen im 24-Stunden-Urin entsprechen der Studiendaten ([49] und [22]). Die prozentualen Angaben entsprechen dem Anteil der Stoffmenge, bezogen auf die Zufuhr von 100 mg L-Theanin.

Die Bioverfügbarkeit von L-Theanin ist wahrscheinlich höher als auf Basis der renalen Ausscheidung von L-Theanin und Ethylamin berechnet werden kann, da L-Theanin auch 24 h nach Bolusgabe noch in den Erythrozyten nachweisbar war und somit eine intrazelluläre Retention angenommen werden kann. Zudem war die Plasmakonzentration von Ethylamin bis 24 h nach Bolusgabe erhöht, so dass die renale Ausscheidung von Ethylamin wahrscheinlich nicht vollständig erfasst wurde. Berücksichtigt man das Verteilungsvolumen von 16 bis 17 Litern und die $C_{\max,70}$ von L-Theanin im Plasma (Tabelle 6), dann sind 72% bzw. 74% der zugeführten Menge an L-Theanin nach Kapsel- bzw. Teeaufnahme für den Organismus verfügbar.

6.3 Schlussbetrachtung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Plasmakinetik und des Metabolismus von L-Theanin im menschlichen Organismus. L-Theanin wurde erstmalig im Urin sowie intrazellulär in den Erythrozyten von gesunden Probanden nachgewiesen und Ethylamin und Glutaminsäure als potentielle Metabolite in Plasma und Urin quantifiziert.

Die Konzentrations-Zeit-Kurven von L-Theanin im Plasma konnten mit Hilfe des Ein-Kompartiment-Modells für jeden Probanden simuliert werden. Unter Berücksichtigung einer Verzögerungszeit wurde eine gute Anpassung der simulierten Kurve an die Messwerte erzielt, so dass die Parameter valide Daten zur Plasmakinetik von L-Theanin liefern. Durch Interpolation der fehlenden Messwerte erlaubt das Modell eine Einschätzung der Plasmakonzentration von L-Theanin zu allen Zeitpunkten und für alle Dosierungen, die durch den Verzehr von Grüntee bzw. Nahrungsergänzungsmitteln aufgenommen werden können (Abbildung 18).

Die Durchführung der Studie im Crossover-Design erlaubt die Aussage, dass Plasmakinetik und Metabolismus von L-Theanin nach Aufnahme von isoliertem L-Theanin und Grüntee vergleichbar sind. Die in der vorliegenden Studie verabreichte Dosis von 100 mg L-Theanin ist realistisch und kann – trotz der langen Ziehzeit von 10 min in der Studie – auch durch den Verzehr von handelsüblichem Tee (4 Tassen, ~ 500 ml) aufgenommen werden, wenn dieser nach Herstellerempfehlung zubereitet wird (80 °C warmes Wasser, 1 min Ziehzeit). Unerwünschte Wirkungen durch die Aufnahme von 100 mg L-Theanin traten weder nach Kapsel- noch nach Grünteeverzehr auf. Die mit Suntheanine® angereicherten funktionellen Getränke, die zurzeit in Asien, USA und Kanada vermarktet werden, enthalten pro Portion (250 ml) bis zu 200 mg L-Theanin – diese Dosis wurde auch in der vorliegenden Studie

verabreicht und von den Probanden toleriert. In den Studien zur funktionellen Wirkung von L-Theanin wurden Bolusgaben von bis zu 400 mg L-Theanin eingesetzt, die allenfalls durch den Verzehr von isoliertem L-Theanin als Nahrungsergänzungsmittel aufgenommen werden können.

Die quantitative Bestimmung von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin in Plasma, Erythrozyten und Urin erfolgte mittels RP-HPLC-Analytik nach vorheriger Vorsäulenderivatisierung mit OPA/3-MPA. Die Reproduzierbarkeit und hohe Empfindlichkeit der hier verwendeten Analytik für Aminosäuren im biologischen Material [43-45] wurde auch für L-Theanin und Ethylamin erzielt. Die Methode erlaubte jedoch nicht die Differenzierung zwischen den L- und D-Enantiomeren des Theanins. Da das D-Enantiomer in der Teepflanze maximal 1,8% des Gesamttheanins ausmacht [7] und Suntheanine® ausschließlich L-Theanin enthält, ist die fehlende Differenzierung zwischen den D- und L-Enantiomeren für die Ergebnisse der vorliegenden Studie jedoch nicht relevant.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine relativ hohe inter-individuelle Variabilität bei der Konzentration von Ethylamin und Glutaminsäure in Plasma und Erythrozyten beobachtet, obwohl C_{max} und AUC für jeden Probanden auf ein Körpergewicht von 70 kg korrigiert wurden. Da es sich um gesunde Probanden handelte, die bezüglich Alter und BMI vergleichbar waren, ist diese Variabilität möglicherweise durch individuelle Unterschiede in Absorption, Metabolismus und Exkretion zu erklären.

Da Glutaminsäure im menschlichen Organismus einem ständigen Turnover unterliegt, kann deren Konzentration im Plasma bzw. renale Ausschweifung nicht ausschließlich auf die Bolusgabe zurückgeführt werden und Rückschluss auf die Bioverfügbarkeit von L-Theanin sind nicht möglich. Um genaue Informationen über den Metabolismus von L-Theanin und der potentiellen Metabolite zu erlangen, wären Interventionsstudien mit stabil markiertem L-Theanin notwendig. Invasive Methoden, die zur Bestimmung von L-Theanin und der Metabolite in Organen und Geweben erforderlich wären, sind in Humanstudien nicht möglich. Daher liefert die vorliegende Arbeit – unter Berücksichtigung der Erkenntnisse aus Tier- und *in vitro*-Studien – wichtige Hinweise zum Metabolismus von L-Theanin im menschlichen Organismus.

Abbildung 19 fasst die Erkenntnisse zur Absorption, zum Metabolismus und zur Ausscheidung von L-Theanin zusammen, basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, der Studie von van der Pijl et al. [11] sowie den Ergebnissen aus Ratten- und *in vitro*-Studien [20-22, 25, 26].

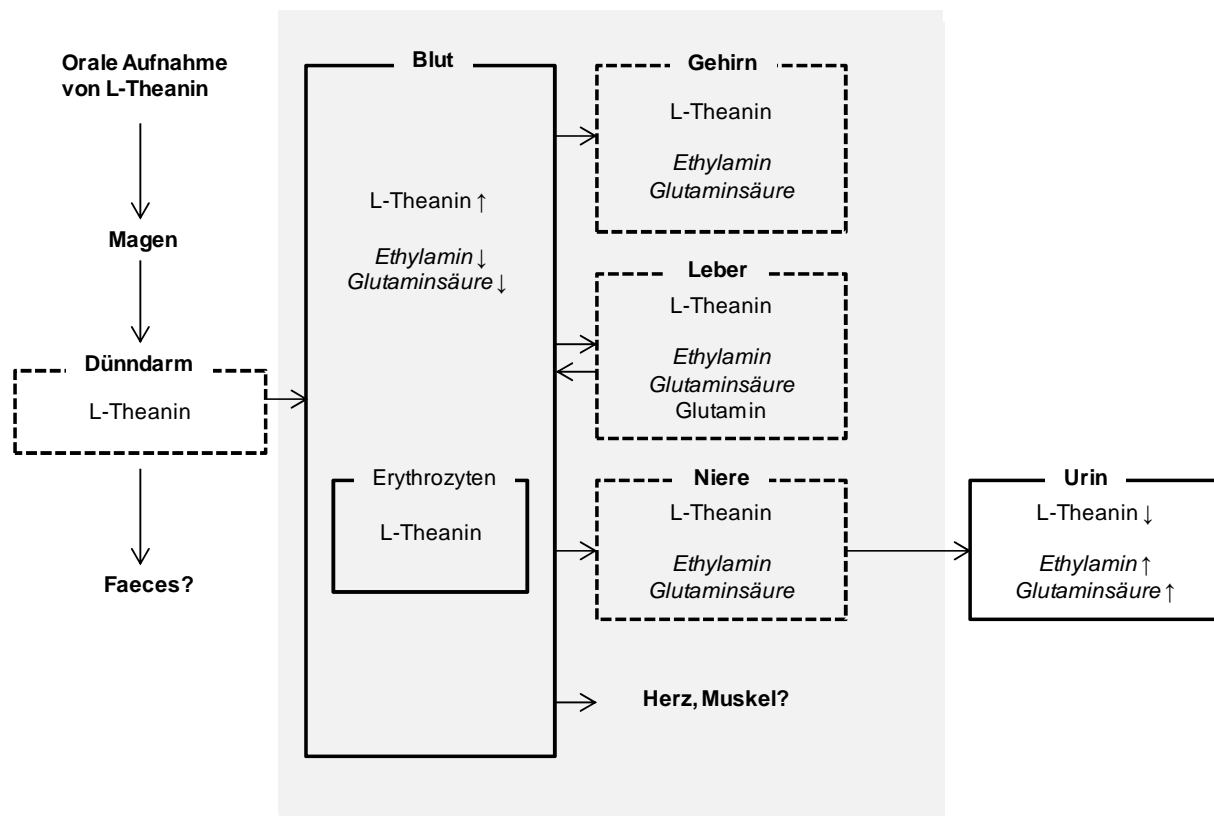


Abbildung 19: Absorption, Metabolismus und Ausscheidung von L-Theanin. Die Abbildung zeigt Ergebnisse aus Humanstudien (durchgezogene Linie) und impliziert Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien (gestrichelte Linie). Metabolite von L-Theanin sind kursiv dargestellt. Die Pfeile kennzeichnen die Höhe der Konzentration bzw. Stoffmenge von L-Theanin in Relation zu Ethylamin und Glutaminsäure. ↑, relativ hohe Konzentration/Stoffmenge; ↓, relativ niedrige Konzentration/Stoffmenge.

Der potentielle Metabolismus von L-Theanin im menschlichen Organismus nach oraler Aufnahme kann wie folgt postuliert werden: L-Theanin wird aus theaninhaltigen Lebensmitteln absorbiert, wahrscheinlich durch einen Na^+ -gekoppelten Symporter, der im Dünndarm lokalisiert ist [19]. Eine Hydrolyse von L-Theanin in Darm und/oder Plasma ist unwahrscheinlich, da L-Theanin im Homogenat aus Dünndarm und Plasma von Ratten [20, 25] sowie im Humanplasma und im Homogenat der Schweinemukosa stabil war (eigene Daten, Anhang A). Die maximale Konzentration von L-Theanin im Plasma wird innerhalb 1 h nach Aufnahme erreicht (Tabelle 6 und [11]). Die Elimination von L-Theanin aus dem Plasma erfolgt ebenfalls rasch, mit einer Halbwertszeit von 0,8 h bis 1,2 h (Tabelle 6), bis L-Theanin 24 h nach Bolusgabe nicht mehr nachweisbar ist (Abbildung 12). Über das Blut gelangt L-Theanin in die peripheren Gewebe und Organe, wie bei Ratten nachgewiesen wurde [22]. Das Verteilungsvolumen von 16 bis 19 Litern (Tabelle 6 und [11]) lässt eine Verteilung von L-Theanin in die gut durchbluteten Gewebe und Organe des menschlichen Organismus

vermuten. Intrazellulär ist L-Theanin in den Erythrozyten nachweisbar und wird dort möglicherweise retiniert (Abbildung 16).

Ethylamin und Glutaminsäure, die als Metabolite von L-Theanin betrachtet werden, erreichen ihre maximale Plasmakonzentration 1 h bis 5 h nach Bolusgabe (Abbildung 14) und wurden zeitgleich in Leber und Gehirn von Ratten nachgewiesen [22]. Ein First-Pass-Effekt in der Leber ist für L-Theanin unwahrscheinlich, da die maximale Konzentration von L-Theanin im Plasma vielfach höher war als die maximale Plasmakonzentration von Ethylamin und Glutaminsäure (Tabelle 7). Vielmehr ist auf Grundlage tierexperimenteller Studien und *in vitro*-Untersuchungen anzunehmen, dass L-Theanin *in vivo* durch die Glutaminase und/oder γ -GTP in der Niere zu Ethylamin und Glutaminsäure hydrolysiert wird [20, 25, 26]. Eigene Untersuchungen bekräftigen diese Hypothese, da L-Theanin *in vitro* durch die γ -GTP zu Ethylamin und Glutaminsäure hydrolysiert wurde (Anhang A). Glutaminase und γ -GTP sind jedoch auch in der Leber lokalisiert, so dass eine Metabolisierung von L-Theanin in der Leber nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Da die Glutaminkonzentration in Leber und Gehirn von Ratten nach Bolusgabe von L-Theanin ebenfalls anstieg [22], und Glutamin aus Glutaminsäure synthetisiert wird, ist eine erhöhte Bereitstellung von Glutamin durch die Aufnahme von L-Theanin prinzipiell möglich.

L-Theanin, Ethylamin und Glutaminsäure werden nach L-Theaninaufnahme renal ausgeschieden. Die Stoffmengen von L-Theanin und Ethylamin im Urin entsprechen 47% bzw. 52% der oral verabreichten L-Theaninmenge nach Kapsel- bzw. Grünteeaufnahme. Dieser Anteil scheint demnach den systemischen Kreislauf zu erreichen. Berücksichtigt man die maximale Plasmakonzentration und das Verteilungsvolumen von L-Theanin (Tabelle 7), liegt deren Bioverfügbarkeit bei mindestens 72 - 74%. Faeces wurden weder in der vorliegenden Arbeit noch in anderen Studien untersucht, so dass potentielle Verluste bei unvollständiger Absorption nicht ausgeschlossen werden können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass L-Theanin in isolierter Form und aus Grüntee rasch resorbiert und wahrscheinlich größtenteils zu Ethylamin und Glutaminsäure hydrolysiert wird. Die diskutierten funktionellen Wirkungen von L-Theanin sind demnach möglich, könnten jedoch auch durch potenzielle Endprodukte des Metabolismus von L-Theanin erklärt werden (Abbildung 20).

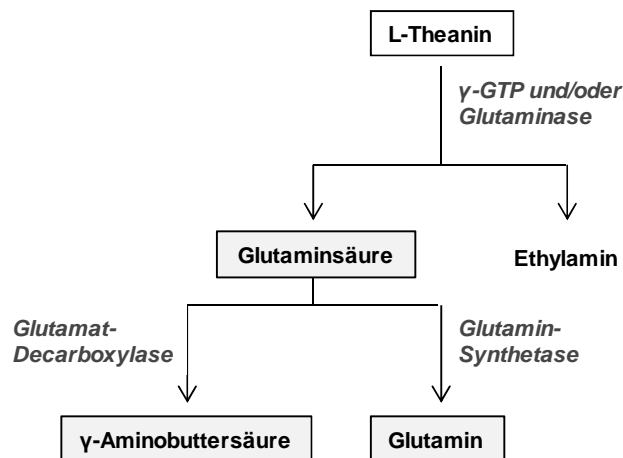


Abbildung 20: Mögliche Endprodukte des Metabolismus von L-Theanin.

Die Steigerung der kognitiven Leistungsfähigkeit und die Verbesserung der Gemütslage, die als funktionelle Wirkungen von L-Theanin diskutiert werden, könnten möglicherweise auf die erhöhte Verfügbarkeit der Neurotransmitter Glutaminsäure und/oder γ -Aminobuttersäure zurückgeführt werden.

Da Glutamin im menschlichen Organismus aus Glutaminsäure synthetisiert wird, könnte L-Theanin zudem eine alternative Glutaminquelle für kritisch Kranke darstellen.

Zukünftige Interventionsstudien mit stabil markiertem L-Theanin könnten diese Fragestellungen klären.

7 Zusammenfassung

L-Theanin (5-N-Ethyl-L-Glutamin) ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, die natürlicherweise in der Teepflanze (*Camellia sinensis*) vorkommt und in isolierter Form als Nahrungsergänzungsmittel Suntheanine[®] erhältlich ist. Da L-Theanin die kognitive Leistungsfähigkeit und die Gemütslage verbessern soll, wird Suntheanine[®] auch in funktionellen Getränken zugesetzt. Daten zum Metabolismus von L-Theanin im menschlichen Organismus liegen bisher nicht vor. Die vorliegende Arbeit sollte daher klären,

- a) ob die Bolusgabe von 100 mg L-Theanin in isolierter Form bzw. in Form von Grüntee zu einer Konzentrationsänderung von L-Theanin sowie der in tierexperimentellen Studien nachgewiesenen Metabolite Ethylamin und Glutaminsäure in Plasma, Erythrozyten und Urin gesunder Probanden führt,
- b) ob dadurch die Konzentration der proteinogenen Aminosäuren in Plasma, Erythrozyten und Urin der Probanden beeinflusst wird und
- c) ob sich Plasmakinetik und Metabolismus von L-Theanin nach Verzehr von isoliertem L-Theanin und Grüntee unterscheiden.

Zur Klärung dieser Fragen wurde eine Interventionsstudie im Crossover-Design mit 12 gesunden Erwachsenen durchgeführt. Durch Randomisierung wurden die Probanden auf zwei Gruppen (A und B) aufgeteilt. Gruppe A erhielt morgens nüchtern nach 12-stündiger Nahrungskarenz 100 mg isoliertes L-Theanin (eine Kapsel Suntheanine[®]) und nach einer mindestens zweiwöchigen Washout-Phase dieselbe Dosis in Form von 250 ml Grüntee. Der Teeaufguss wurde mit 7 g gemahlener Teeblättern der Sorte Lung Ching hergestellt, die für 10 min mit 250 ml kochendem Wasser aufgebrüht wurden. Gruppe B erhielt die gleichen Produkte in umgekehrter Reihenfolge. An zwei weiteren Studientagen erhielten drei Probanden zusätzlich jeweils 50 mg und 200 mg L-Theanin in isolierter Form als Kapsel. An jedem Untersuchungstag wurden 8 Blutentnahmen durchgeführt, die nüchtern vor (Baseline) sowie 0,5 h, 0,75 h, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3 h und 24 h nach Intervention erfolgten, und die Probanden sammelten Nüchtern- und 24-Stunden-Urin. Vier Tage vor und an den jeweiligen Studientagen sollten die Probanden – abgesehen von den Studienprodukten – auf theaninhaltige Produkte verzichten und die verzehrten Lebensmittel in standardisierten Ernährungsprotokollen dokumentieren.

Die Konzentration von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin in Plasma, Erythrozyten und Urin wurde mittels reversed-phase HPLC und anschließender Fluoreszenzdetektion ermittelt. Vorab erfolgte eine Vorsäulenderivatisierung mittels

Orthophtaldialdehyd und 3-Mercaptopropionsäure. Die Konzentrations-Zeit-Kurven von L-Theanin im Plasma jedes Probanden wurden mit Hilfe eines Ein-Kompartiment-Modells simuliert.

Die Konzentration von L-Theanin im Plasma stieg nach Bolusgabe von 100 mg L-Theanin an und erreichte nach 24 h wieder die Konzentration zur Baseline, wobei die Plasmakinetik von L-Theanin nach Aufnahme von isoliertem L-Theanin und Grüntee vergleichbar war. Die Konzentrations-Zeit-Kurven von L-Theanin im Plasma konnten mit Hilfe des Ein-Kompartiment-Modells mit einer guten Anpassung an die Messwerte simuliert werden. Die maximale Plasmakonzentration von L-Theanin wurde 0,8 h nach Aufnahme von Kapsel ($24,3 \pm 5,7 \mu\text{mol/l}$) und Grüntee ($26,5 \pm 5,2 \mu\text{mol/l}$) erreicht. Das Verteilungsvolumen von 16 bis 17 Litern lässt eine Verteilung von L-Theanin in die peripheren Gewebe und gut durchbluteten Organe vermuten. Beide Studienprodukte führten außerdem zu einem Anstieg der L-Theaninkonzentration in den Erythrozyten – bis 24 h nach Bolusgabe – und zu einer Ausscheidung von L-Theanin im 24-Stunden-Urin. Die Konzentration von Ethylamin und Glutaminsäure im Plasma stieg nach Verzehr von isoliertem L-Theanin und Grüntee ebenfalls an und beide Substanzen wurden mit dem Urin ausgeschieden. Die AUC von L-Theanin und Ethylamin im Plasma sowie L-Theanin in den Erythrozyten änderte sich dosisabhängig nach Bolusgabe von 50 mg, 100 mg und 200 mg L-Theanin. Die Konzentration anderer proteinogener Aminosäuren in Plasma, Erythrozyten und Urin blieb unverändert. Auf Grundlage der renalen Ausscheidung von L-Theanin und Ethylamin sowie der kinetischen Parameter von L-Theanin im Plasma scheint die Bioverfügbarkeit von L-Theanin zwischen 52% und 74% zu liegen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass L-Theanin in isolierter Form und aus Grüntee rasch absorbiert und wahrscheinlich größtenteils zu Ethylamin und Glutaminsäure hydrolysiert wird, welche vorrangig mit dem Urin ausgeschieden werden. Ein geringer Anteil von L-Theanin wird intrazellulär retiniert. Plasmakinetik und Metabolismus von L-Theanin sind nach Aufnahme beider Studienprodukte vergleichbar, so dass nach Grünteeverzehr – in Hinblick auf die funktionellen Wirkungen von L-Theanin – vergleichbare Effekte eintreten können wie nach Konsum von isoliertem L-Theanin. Die diskutierten funktionellen Wirkungen von L-Theanin sind demnach möglich, könnten jedoch auch durch potenzielle Endprodukte des Metabolismus von L-Theanin erklärt werden. Da Glutamin im menschlichen Organismus aus Glutaminsäure synthetisiert wird, könnte L-Theanin zudem eine alternative Glutaminquelle für kritisch Kranke darstellen.

8 Literaturverzeichnis

1. Sakato Y (1950): The chemical constituents of tea. A new amide, theanine. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, 23.
2. Casimir J, Jadot J, Renard M (1960): Separation and characterization of N-ethyl-gamma-glutamine from *Xerocomus badius*. *Biochim Biophys Acta*, 39: 462-468.
3. Thippeswamy R, Gouda KG, Rao DH, Martin A, Gowda LR (2006): Determination of theanine in commercial tea by liquid chromatography with fluorescence and diode array ultraviolet detection. *J Agric Food Chem*, 54: 7014-7019.
4. Alcazar A, Ballesteros O, Jurado JM, Pablos F, Martin MJ, Vilches JL, Navalon A (2007): Differentiation of green, white, black, Oolong, and Pu-erh teas according to their free amino acids content. *J Agric Food Chem*, 55: 5960-5965.
5. Kato M, Gyoten Y, Sakai-Kato K, Toyooka T (2003): Rapid analysis of amino acids in japanese green tea by microchip electrophoresis using plastic microchip and fluorescence detection. *J Chromatogr A*, 1013: 183-189.
6. Bruchhausen F, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U (1992): Hager's Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. *Springer-Verlag*, Stuttgart, 5. Auflage: 628-640.
7. Eckborg-Ott KH, Taylor A, Armstrong DW (1997): Varietal differences in the total and enantiomeric composition of theanine in tea. *J Agric Food Chem*, 45: 353-363.
8. Food and Drug Administration (2007): GRAS Notification - Suntheanine. http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/615880A.PDF. 03. Juli 2012.
9. Bundesinstitut für Risikobewertung (2003): Getränke mit isoliertem L-Theanin. http://www.bfr.bund.de/cm/208/getraenke_mit_isoliertem_l_theanin.pdf. 03. Juli 2012.

10. European Food Safety Authority (2011): Scientific Opinion on the substantiation of health claims to L-theanine from *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Tea) and improvement of cognitive function, alleviation of physical stress, maintenance of normal sleep and reduction of menstrual discomfort. *EFSA Journal* 9(6): 22-38.
11. van der Pijl PC, Chen L, Mulder TPJ (2010): Human disposition of L-theanine in tea or aqueous solution. *J Funct Foods*, 2: 239-244.
12. Deng WW, Ogita S, Ashihara H (2009): Ethylamine content and theanine biosynthesis in different organs of *Camellia sinensis* seedlings. *Z Naturforsch C*, 64: 387-390.
13. Tshushida T (1987): Metabolism of L-theanine in tea leaves. *Jpn Agric Res Q* 21: 42-46.
14. Feldheim W, Yongvanit P, Cummings PH (1986): Investigation of the presence and significance of theanine in tea plant. *J Sci Food Agric*, 7: 527-534.
15. Kito M, Kokura H, Izaki J, Sasaoka K (1968): Theanine, a precursor of the phloroglucinol nucleus of catechins in tea plants. *Phytochemistry*, 7: 559-603.
16. Engelbert AK (2010): Persönliche Mitteilung am 21.03.2010.
17. Desai MJ, Armstrong DW (2004): Analysis of derivatized and underivatized theanine enantiomers by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 18: 251-256.
18. Juneja LR, Chu DC, Okubo T, Nagato Y, Yokogoshi H (1999): L-theanine - a unique amino acid of green tea and its relaxation effects in humans. *Trends Food Sci Technol*, 10: 199-204.
19. Kitaoka S, Hayashi H, Yokogoshi H, Suzuki Y (1996): Transmural potential changes associated with the in vitro absorption of theanine in the guinea pig intestine. *Biosci Biotechnol Biochem*, 60: 1768-1771.

20. Unno T, Suzuki Y, Kakuda T, Hayakawa T, Tsuge H (1999): Metabolism of theanine, gamma-glutamylethylamide, in rats. *J Agric Food Chem*, 47: 1593-1596.
21. Desai MJ, Gill MS, Hsu WH, Armstrong DW (2005): Pharmacokinetics of theanine enantiomers in rats. *Chirality*, 17: 154-162.
22. Terashima T, Takido J, Yokogoshi H (1999): Time-dependent changes of amino acids in the serum, liver, brain and urine of rats administered with theanine. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63: 615-618.
23. Kimura R, Murata T (1971): Influence of alkylamides of glutamic acid and related compounds on the central nervous system. I. Central depressant effect of theanine. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 19: 1257-1261.
24. Yokogoshi H, Kobayashi M, Mochizuki M, RTerashima T (1998): Effects of theanine, γ -glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats. *Neurochem Res*, 23: 667-673.
25. Tsuge H, Sano S, Hayakawa T, Kakuda T, Unno T (2003): Theanine, gamma-glutamylethylamide, is metabolized by renal phosphate-independent glutaminase. *Biochim Biophys Acta*, 1620: 47-53.
26. Sadzuka Y, Sugiyama T, Nagamine M, Umegaki K, Sonobe T (2006): Efficacy of theanine is connected with theanine metabolism by any enzyme, not only drug metabolizing enzymes. *Food Chem Toxicol*, 44: 286-292.
27. Asatoor AM (1966): Tea as a source of urinary ethylamine. *Nature*, 210: 1358-1360.
28. Kimura R, Kurita M, Murata T (1975): Influence of alkylamides of glutamic acid and related compounds on the central nervous system. III. Effect of theanine on spontaneous activity of mice. *Yakugaku Zasshi*, 95: 892-895.
29. Yokogoshi H, Mochizuki M, Saitoh K (1998): Theanine-induced reduction of brain serotonin concentration in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 62: 816-817.

30. Yokogoshi H, Kato Y, Sagesaka YM, Takihara-Matsuura T, Kakuda T, Takeuchi N (1995): Reduction effect of theanine on blood pressure and brain 5-hydroxyindoles in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 59: 615-618.
31. Yokogoshi H, Kobayashi M (1998): Hypotensive effect of gamma-glutamylmethylamide in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*, 62: 1065-1068.
32. Vuong QV, Bowyer MC, Roach PD (2011): L-theanine: properties, synthesis and isolation from tea. *J Sci Food Agric*, 91: 1931-1939.
33. Rogers PJ, Smith JE, Heatherley SV, Pleydell-Pearce CW (2008): Time for tea: mood, blood pressure and cognitive performance effects of caffeine and theanine administered alone and together. *Psychopharmacology (Berl)*, 195: 569-577.
34. Gomez-Ramirez M, Higgins BA, Rycroft JA, Owen GN, Mahoney J, Shpaner M, Foxe JJ (2007): The deployment of intersensory selective attention: a high-density electrical mapping study of the effects of theanine. *Clin Neuropharmacol*, 30: 25-38.
35. Nathan PJ, Lu K, Gray M, Oliver C (2006): The neuropharmacology of L-theanine (N-ethyl-L-glutamine): a possible neuroprotective and cognitive enhancing agent. *J Herb Pharmacother*, 6: 21-30.
36. Kelly SP, Gomez-Ramirez M, Montesi JL, Foxe JJ (2008): L-theanine and caffeine in combination affect human cognition as evidenced by oscillatory alpha-band activity and attention task performance. *J Nutr*, 138: 1572S-1577S.
37. Haskell CF, Kennedy DO, Milne AL, Wesnes KA, Scholey AB (2008): The effects of L-theanine, caffeine and their combination on cognition and mood. *Biol Psychol*, 77: 113-122.
38. Gomez-Ramirez M, Kelly SP, Montesi JL, Foxe JJ (2009): The effects of L-theanine on alpha-band oscillatory brain activity during a visuo-spatial attention task. *Brain Topogr*, 22: 44-51.

39. Einother SJ, Martens VE, Rycroft JA, De Bruin EA (2010): L-theanine and caffeine improve task switching but not intersensory attention or subjective alertness. *Appetite*, 54: 406-409.
40. Ritsner MS, Miodownik C, Ratner Y, Shleifer T, Mar M, Pintov L, Lerner V (2011): L-theanine relieves positive, activation, and anxiety symptoms in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder: an 8-week, randomized, double-blind, placebo-controlled, 2-center study. *J Clin Psychiatry*, 72: 34-42.
41. Bundesärztekammer (1991): Deklaration von Helsinki. *Dtsch Ärztebl*, 88: 2927-2928.
42. WHO (2000): Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 894: 1-253.
43. Fuerst P, Pollack L, Graser TA, Godel H, Stehle P (1990): Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. *J Chromatogr*, 499: 557-569.
44. Graser TA, Godel HG, Albers S, Földi P, Fürst P (1985): An ultra rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for determination of tissue and plasma free amino acids. *Anal Biochem*, 151: 142-152.
45. Godel H, Graser TA, Földi P, Pfaender P, Fuerst P (1984): Measurements of free amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 297: 49-61.
46. Frehse H, Thier HP (1991): The limits of detection and determination in residue analyses - their derivation according to the new DFG-approach. *GIT Fachz Lab*, 35: 285-291.
47. Gabrielsson J, Weiner D (2000): Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts and applications. *Swedish pharmaceutical press*: 27-69.
48. Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ (2002): Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci*, 3: 748-755.

49. Scheid L, Ellinger S, Alteheld B, Herholz H, Ellinger J, Henn T, Helfrich HP, Stehle P (2012): Kinetics of L-theanine uptake and metabolism in healthy participants are comparable after ingestion of L-theanine via capsules and green tea. *J Nutr*, 142: 2091-2096.

9 Anhang

Anhang A: In vitro Vorversuche

1 Ziel

Vor Planung der Interventionsstudie sollte geklärt werden, ob L-Theanin nach Zugabe von Plasma, Mukosa, Peptidasen und/oder γ -GTP hydrolysiert wird (in Anlehnung an Sadzuka et al., 2006 und Herzog et al., 1996).

2 Methoden

- **Lösungen**

L-Theanin Standard (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde in 50 ml Hank's Buffered Salt Solution (HBSS, pH 7,4, Sigma-Aldrich) gelöst. Die Stammlösung (1 mM L-Theanin) wurde im Inkubationsmedium mit HBSS auf eine Endkonzentration von 100 μ M bzw. 500 μ M L-Theanin verdünnt und mit Plasma, Mukosa, Peptidasen (vom Schwein, Sigma-Aldrich) und γ -GTP (vom Schwein, Sigma-Aldrich) inkubiert.

- **Probenmaterial**

Gepoolte Plasmaproben von gesunden Probanden wurden bis zur Inkubation bei -80 °C eingefroren. Die Peptidasen und γ -GTP wurden unmittelbar vor Inkubation mit L-Theanin in HBSS-Puffer gelöst (pH 7,4 für Peptidasen, pH 8,6 für γ -GTP).

Für die Gewinnung der Mukosa wurde der gesamte Dünndarm eines Schweins direkt nach der Schlachtung entnommen und in einem mit Natriumchlorid gefüllten und gekühlten Transportbehälter in das Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften transportiert. Dort wurde der obere Teil des Dünndarms abgetrennt, mehrfach mit einer eiskalten Natriumchloridlösung gespült und längs aufgeschnitten. Mit einem saugfähigen Papier wurde überschüssige Natriumchloridlösung sowie Mukusreste entfernt. Mit Hilfe von Glasobjektträgern wurde die Mukosa sorgfältig abgeschabt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, in Alufolie eingehüllt und bis zur weiteren Aufbereitung bei -80 °C aufbewahrt. Die Darmmukosa (6 g) wurde kurz vor Inkubation mit L-Theanin in 15 ml HBSS mit 5 Strokes eines Potters (Braun, Melsungen) unter Kühlung homogenisiert. Nach Zugabe von 120 ml gekühlter HBSS wurde das Homogenat für die Inkubation und die anschließende Proteinbestimmung eingefroren.

- **Durchführung**

Das Probenmaterial wurde aufgetaut, in ein Reaktionsgefäß mit Magnetrührer (Eppendorf AG, 5320) pipettiert und auf 37 °C temperiert (jeweils $n=3$). Durch Zugabe der L-Theaninlösung wurde die Reaktion gestartet. Vor und 15, 30, 60 und 120 min nach Inkubationsstart wurden Aliquote aus dem Inkubationsmedium entnommen, mit einer 30% SSA (mit 1 mM Norvalin als internen Standard) versetzt, gevortext und 60 min bei 4 °C inkubiert, um eine vollständige Proteinfällung zu gewährleisten. Nach anschließender Zentrifugation (3000 x g, 20 min, 4 °C) wurde der proteinfreie Überstand bis zur Analyse (Kapitel 4.5) bei -80 °C aufbewahrt.

- **Analytik**

Die Konzentration von L-Theanin, der proteinogenen Aminosäuren und Ethylamin im Inkubationsmedium wurden mittels RP-HPLC und anschließender Fluoreszenzdetektion ermittelt. Vorab erfolgte die Probenaufbereitung und Vorsäulenderivatisierung wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben (Kapitel 4.5).

3 Ergebnisse

Bei Inkubation mit γ -GTP nahm die Konzentration von L-Theanin ab (Abbildung 1), mit einem gleichzeitigen Konzentrationsanstieg von Ethylamin (Abbildung 2) und Glutaminsäure im Inkubationsmedium (Abbildung 3).

Während der gesamten Inkubationsdauer blieb die Konzentration anderer Aminosäuren unverändert. In einem Ansatz ohne L-Theanin trat keine Änderung – insbesondere von Ethylamin und Glutaminsäure – auf. Bei Inkubation mit Plasma, Mukosa und Peptidasen blieb die Konzentration von L-Theanin im Medium unverändert und Ethylamin und Glutaminsäure waren nicht nachweisbar.

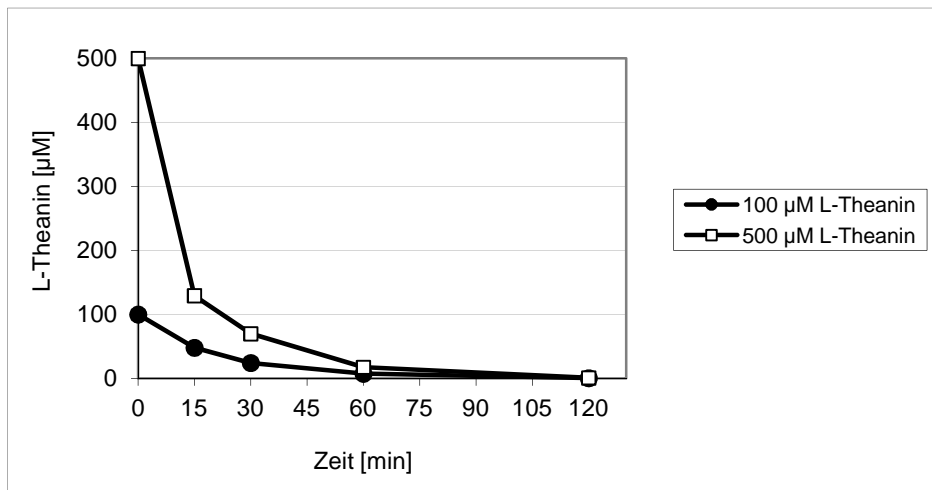


Abbildung 1: L-Theaninkonzentration im Inkubationsmedium nach Zugabe von γ -GTP ($n = 1$).

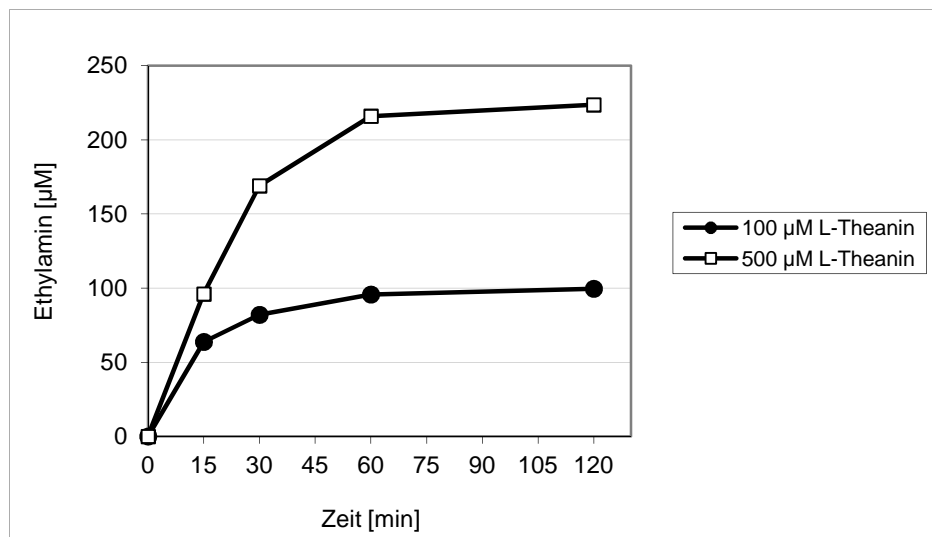


Abbildung 2: Ethylaminkonzentration im Inkubationsmedium nach Zugabe von γ -GTP ($n = 1$).

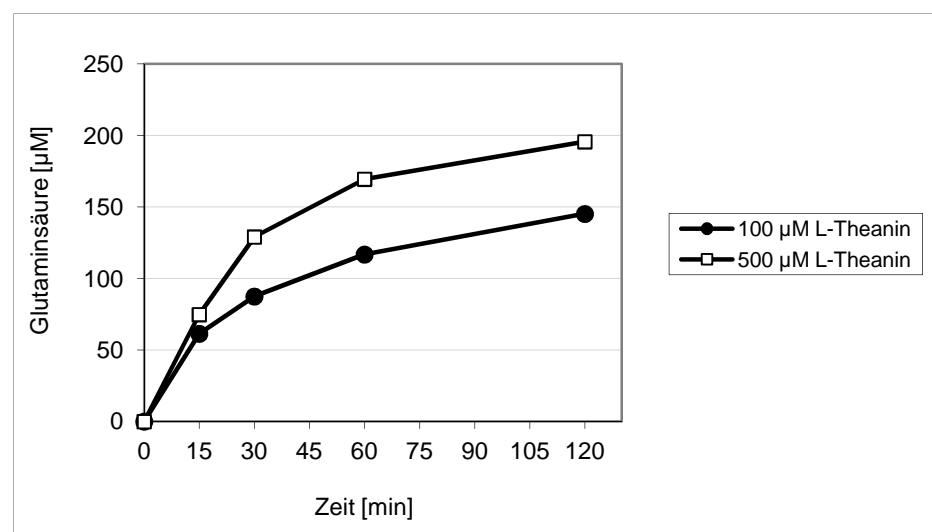


Abbildung 3: Glutaminsäurekonzentration im Inkubationsmedium nach Zugabe von γ -GTP ($n = 1$).

4 Fazit

Die Hydrolyse von L-Theanin wird *in vitro* durch γ -GTP katalysiert. Plasma, Mukosa und Peptidasen scheinen L-Theanin nicht zu hydrolysieren. Eine Hydrolyse von L-Theanin *in vivo* bei der Verdauung und Absorption sowie unmittelbar nach der Absorption ist somit unwahrscheinlich.

5 Literatur

Sadzuka Y, Sugiyama T, Nagamine M, Umegaki K, Soube T. Efficacy of theanine is connected with theanine metabolism by any enzyme, not only drug metabolizing enzymes. *Food Chem Tox*, 2008; 44: 286 - 292.

Herzog B, Frey B, Pogan K, Stehle P, Fürst P: In vitro peptidase activity of rat mucosa cell fractions against glutamine-containing dipeptides. *J Nutr Biochem* 1996; 7: 135 - 141.

Anhang B:**Fragebogen für Probanden/Probandinnen**

zur Studie

„Bolusgabe von L-Theanin als Kapseln und Grüntee:

Untersuchung der Plasmakinetik und des Metabolismus bei gesunden Probanden“

Name, Vorname:

Anschrift:

Tel.-Nr.:

Email-Adresse:

Geburtstag:

Körpergröße:

Körpergewicht:

Zutreffendes bitte ankreuzen

	Ja	Nein
Alter: 18.40 Jahre?		
Rauchen Sie?		
Haben Sie in den letzten 6 Monaten geraucht?		
Leiden Sie an einer Erkrankung der Leber, der Nieren und des Magen-Darm-Traktes?		
Frauen: Ist eine Schwangerschaft bekannt bzw. wahrscheinlich?		
Frauen: Stillen Sie?		
Nehmen Sie regelmäßig Vitaminpräparate oder Nahrungsergänzungsmittel ein (z.B. Teekapseln, Bioaktivkonzepte)?		
Konsumieren Sie Drogen oder andere psychotrope Substanzen, die dem Betäubungsmittelgesetz unterliegen?		
Haben Sie innerhalb des vergangenen Monats Blut gespendet?		
Haben Sie im letzten Monat an einer klinischen Studie teilgenommen bzw. nehmen Sie derzeit an einer anderen klinischen Studie teil?		
Nehmen Sie regelmäßig Medikamente ein?		
Wenn ja, welche?		
Trinken Sie täglich grünen/schwarzen/weißen Tee oder Kaffee?		
Wenn ja, wie viele Tassen (ca.150 ml) täglich?		

Anhang C: Berechnung der Plasmakinetik von L-Theanin auf Grundlage der Modellparameter am Beispiel der AUC.

	AUC ($\mu\text{mol/lxh}$) ¹	AUC ₇₀ ($\mu\text{mol/lxh}$) ²	σAUC ($\mu\text{mol/lxh}$) ³	σAUC_{70} ($\mu\text{mol/lxh}$) ⁴	Gew.faktor für AUC ⁵	AUC ₇₀ gew. ($\mu\text{mol/lxh}$) ⁶	σAUC_{70} gew. ($\mu\text{mol/lxh}$) ⁷
K1	65,32	65,32	10,37	10,37	0,0093	1,93	0,0008
K2	77,03	65,76	12,50	10,67	0,0088	1,84	0,0009
K3	41,55	51,94	6,87	8,58	0,0136	2,24	0,0015
K4	85,15	110,38	9,25	11,99	0,0070	2,44	0,0005
K5	65,95	63,24	9,58	9,18	0,0119	2,38	0,0012
K6	64,25	60,78	13,61	12,87	0,0060	1,16	0,0004
K7	43,83	36,09	4,35	3,58	0,0779	8,95	0,0217
K8	64,52	75,27	7,92	9,24	0,0117	2,81	0,0012
K9	64,57	66,47	6,62	6,81	0,0216	4,56	0,0031
K10	78,33	92,93	6,23	7,39	0,0183	5,42	0,0024
K11	58,90	57,26	2,91	2,83	0,1247	22,76	0,0440
K12	61,67	56,06	19,93	18,12	0,0030	0,54	0,0001
T1	77,03	77,03	22,92	22,92	0,0019	0,35	8,3070
T2	41,55	35,47	5,64	4,82	0,0431	3,68	0,0089
T3	77,21	96,51	19,19	23,98	0,0017	0,40	7,2488
T4	62,65	81,21	4,97	6,44	0,0241	4,72	0,0037
T5	72,05	69,09	25,19	24,16	0,0017	0,28	7,0950
T6	76,98	72,82	7,26	6,87	0,0212	3,72	0,0030
T7	51,37	42,30	2,61	2,15	0,2173	22,16	0,1012
T8	72,05	84,06	4,31	5,02	0,0396	8,03	0,0078
T9	84,94	87,44	12,85	13,22	0,0057	1,20	0,0004
T10	77,81	92,32	4,33	5,14	0,0379	8,43	0,0073
T11	86,87	84,46	19,40	18,86	0,0028	0,57	0,0001
T12	67,98	61,80	8,30	7,55	0,0176	2,61	0,0023
MW K ⁸						57,10	3,5692
MW T ⁹						56,21	2,1620

¹AUC berechnet auf Grundlage der Modellparameter (Kapitel 4.6.1), ² AUC korrigiert auf ein Körpergewicht von 70 kg, ³Varianz (σ) der AUC berechnet anhand der SD der Modellparameter und deren Korrelation mittels Kovarianz-Matrix; ⁴Varianz der AUC, korrigiert auf ein Körpergewicht von 70 kg;

⁵Gewichtungsfaktor; ⁶gewichtete AUC, korrigiert auf ein Körpergewicht von 70 kg; ⁷gewichtete Varianz der AUC, korrigiert auf ein Körpergewicht von 70 kg;

⁸MW der Daten nach Kapselaufnahme, ⁹MW der Daten nach Grünteeverzehr. Kn, Proband n nach Kapselaufnahme; Tn, Proband n nach Grünteeverzehr.

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, besonders bei:

Prof. Dr. Peter Stehle für die Formulierung dieses spannenden Themas, die wohlwollende wissenschaftliche Betreuung und auch für seine persönliche Unterstützung,

Prof. Dr. Dr. Helga Sauerwein für das Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Koreferats,

Prof. Dr. Sabine Ellinger für die konstruktive Durchsicht dieser Arbeit, die herzliche Zusammenarbeit sowie ihr außerordentliches Engagement,

Dr. Birgit Alteheld für die vielen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche und ihre Denkanstöße rund um die Analytik,

Christel Bierschbach für ihre zuverlässige Unterstützung bei der HPLC-Analytik und auch darüber hinaus,

Adelheid Schuch, Erika Blatzheim und Tomislav Balen für die gute Zusammenarbeit im Labor und für jegliche Hilfestellung bei IT-Fragestellungen,

Prof. Hans-Peter Helfrich für seine maßgebliche Unterstützung bei der mathematischen Modellierung der Konzentrations-Zeit-Kurven und der Berechnung der kinetischen Parameter,

Dr. Benno Zimmermann für seine hilfreichen Ratschläge bei der Methodvalidierung,

Dr. Jörg Ellinger und Dr. Hannes Herholz für die ärztliche Betreuung des Projektes,

Dr. Thomas Henn und der Firma TeeGschwendner für die Bereitstellung des Grünteest,

Frau Dr. Ute Brehme für ihre persönliche Unterstützung als Mentorin,

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften, Fachbereich Ernährungsphysiologie, für die herzliche Zusammenarbeit,

der Graduiertenförderung Nordrhein-Westfalen für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen eines Abschlussstipendiums,

und bei meiner Familie, die mich stets unterstützt und motiviert hat.