

3 Material und Methoden

3.1 Mucosal-uptake-Technik

3.1.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienten 200 - 250g schwere weibliche Ratten (Wistar Hannover, Institut für Physiologie, Medizinische Fakultät der Universität zu Kiel). Die Tiere erhielten ein kommerzielles pelletiertes Rattenfutter (ssniff R/M-H, 10 mm, nitrosaminarm, ssniff Spezialdiäten GmbH, D-59494 Soest). Futter und Trinkwasser standen den Tieren zur freien Aufnahme zur Verfügung. Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Ratten das Futter entzogen. Die Tierversuche wurden mit Einverständnis der zuständigen Behörde sowie nach Absprache mit dem Tierschutzbeauftragten der Universität Kiel durchgeführt.

3.1.2 Elektrolytlösungen

Als Inkubationsmedium für das Darmgewebe wurde Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer (KHBP) verwendet (Tabelle 2). Für das Na^+ -freie Medium wurde NaCl isomolar durch Cholinchlorid und NaHCO_3 durch Cholinhydrogencarbonat ersetzt. Die Puffer wurden vor Gebrauch mit Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2) 30 Minuten lang begast und mit HCl bzw. NaOH oder KOH auf pH 7,0 eingestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffers (Na^+ -haltig und Na^+ -frei)

Na^+ -haltig		Na^+ -frei	
Substanz	Konz. [mmol/l]	Substanz	Konz. [mmol/l]
NaCl	118	Cholinchlorid	118
KCl	4,7	KCl	4,7
$\text{CaCl} \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2,5	$\text{CaCl} \times 2 \text{H}_2\text{O}$	2,5
KH_2PO_4	1,2	KH_2PO_4	1,2
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,2	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1,2
NaHCO_3	25	Cholinhydrogencarbonat	25

3.1.3 Gewebepräparation

Die Tiere wurden mit Diethylether betäubt. Nach Öffnung der Bauchhöhle wurde das zu untersuchende Darmsegment (mittleres Jejunum) entnommen, mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und in eiskalten, begasten (95 % O₂ und 5 % CO₂) KHBP überführt. Danach wurden die Tiere durch Entbluten getötet. Das entnommene Darmstück wurde der Länge nach entlang des Gekröseansatzes aufgeschnitten und in etwa 1 cm lange Stücke zerteilt. Die Darmstücke wurden so auf Plastikstöpsel mit einem Gummiring fixiert (Abbildung 3), dass nur die Mukosa dem Inkubationsmedium ausgesetzt war (Scharrer et al. 1981). Die dem Inkubationsmedium exponierte Fläche betrug 0,5 cm².

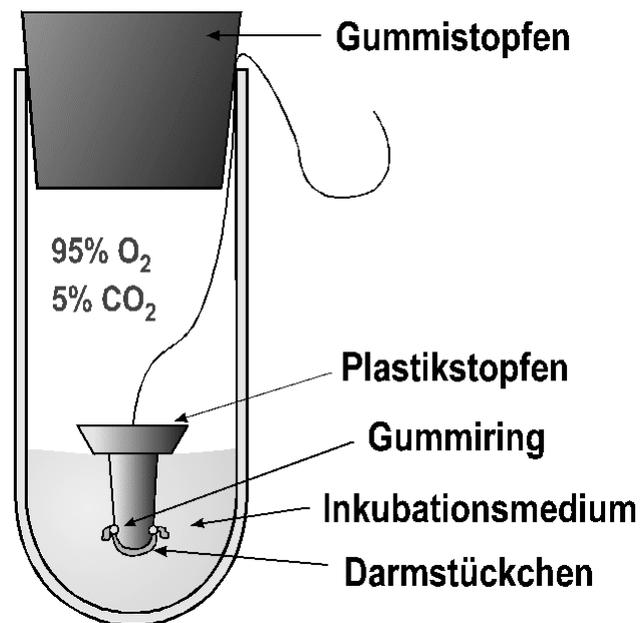


Abbildung 3: Versuchsanordnung zur Messung der mukosalen Substrataufnahme

3.2 Bestimmung der mukosalen Substrataufnahme

Nach dem Aufspannen wurden die Darmpräparate sofort für 10 Minuten in auf 37 °C vorgewärmten KHBP (Na⁺-haltig bzw. Na⁺-frei) vorinkubiert. Daraufhin wurden sie einzeln zur 3-minütigen Inkubation in 100 ml-Zentrifugengläser überführt, in welchen 25 ml auf 37 °C erwärmte, mit radioaktiver Substanz versehene Versuchslösung enthalten war. Unter diesen Bedingungen wurde der Einfluss von Quercetin (Dihydrat, purum, Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland), von Isoquercitrin, (TCL, Firma Extrasynthese, Genay, Frankreich bzw. Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland), von Spiraeosid (CHR, Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland) und von Rutin (purum DAB, Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland) auf die mukosale Aufnahme des radioaktiv markierten nicht metabolisierbaren Glukoseanaloges Methyl- α -D-Glukopyranosid (¹⁴C-MDG, 0,74 kBq/ml, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) durch die Bürstensaummembran gemessen. Die eingesetzten Flavonoide wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) vorgelöst und den Versuchsmedien zupipettiert. Die Endkonzentration von DMSO im Versuchsmedium betrug 0,5 %. Die Inkubationszeit von 3 Minuten wurde gewählt, da während dieses Zeitraumes die Messung initialer Aufnahmeraten gewährleistet war (siehe Kapitel 4.1.1). Bei den verwendeten Versuchslösungen handelte es sich um Na⁺-haltigen und Na⁺-freien KHBP, der direkt vor der Inkubation nochmals 15 Minuten mit Carbogengas begast worden war. Um den Einfluss der sog. „unstirred layer“ (unbewegte Flüssigkeitsschicht, die der Mukosa unmittelbar anhaftet) möglichst gering zu halten, wurden die Ansätze während der Inkubation im 37 °C warmen Schüttelwasserbad mit 150 Oszillationen/min geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jede Probe kurz mit eiskaltem, substratfreien Puffer abgespült, um oberflächlich anhaftendes Substrat zu entfernen.

Anschließend wurden das dem Inkubationsmedium exponierte Gewebe mit einem Skalpell entlang des Gummiringes ausgeschnitten und in 10 ml Reagenzgläser verbracht. Nach Zugabe von 0,4 ml einer gewebeauflösenden Flüssigkeit (Soluene-350, Packard Instrument B. V., Dreieich, Deutschland) wurden die Gewebeproben bei 50 °C bis zur vollständigen Auflösung für 3 - 5 h in einem Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Proben mit 0,1 ml Isopropanol und mit 0,2 ml Wasserstoffperoxid (30 - 31 %) versetzt. Nach 20 Minuten wurde den entfärbten Proben 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Hionic Fluor, Packard Instrument

B. V., Dreieich, Deutschland) hinzugefügt und die in der Mukosa akkumulierte Radioaktivität in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Tri-Carb 2300 TR, Packard Instrument B. V., Dreieich, Deutschland) gemessen. Die anhand der Radioaktivität berechnete Substrataufnahme wurde auf eine Mukosafläche von 1 cm² bezogen. Zur Bestimmung der unspezifischen natriumunabhängigen, nicht Carrier-vermittelten Aufnahme von ¹⁴C-markiertem MDG wurden Parallelversuche mit natriumfreien Inkubationsmedium durchgeführt.

Da die Radioaktivität in der Versuchslösung der Substratkonzentration proportional ist, lässt sich, unter Berücksichtigung der unter natriumfreien Bedingungen ermittelten unspezifisch bzw. Na⁺-unabhängig in die Mukosa aufgenommene Substratmenge, anhand der im Gewebe gemessenen Impulse die Na⁺-abhängige Substrataufnahme in die Mukosa wie folgt berechnen:

$$SA = \frac{[X_S - (X_{Chol} \cdot VL_S / VL_{Chol})]}{F \cdot VL_S} \cdot C_S \cdot V \cdot 1000$$

- SA = Substrataufnahme in nmol/cm² • 3 min
 X_s = Impulse im Gewebe
 X_{Chol} = Impulse im Gewebe bei natriumfreier Versuchslösung
 VL_s = Impulse in der Versuchslösung
 VL_{Chol} = Impulse der natriumfreien Versuchslösung
 C_s = Substratkonzentration in µmol/l
 V = zur Radioaktivitätsmessung verwendetes Volumen der Versuchslösung in ml
 F = exponierte Gewebefläche (0,5 cm²)

3.3 Ussing-Kammer-Versuche

3.3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Ratten (Wistar Hannover) mit einem Gewicht von 380 - 420 g verwendet (Institut für Physiologie der medizinischen Fakultät der Universität Kiel). Die Haltungs- und Fütterungsbedingungen stimmten mit denen unter 3.1.1 beschriebenen Konditionen überein. Die Tierversuche wurden mit Einverständnis der zuständigen Behörde sowie nach Absprache mit dem Tierschutzbeauftragten der Universität Kiel durchgeführt.

3.3.2 Elektrolytlösungen

Als Inkubationsmedium für die Ussing-Kammer-Versuche wurde Krebs-Phosphat-Puffer (KPP) verwendet, der durch Zugabe von Glukose (serosales Medium) bzw. von Mannit (mukosales Medium) modifiziert wurde. Für das Na⁺-freie Medium wurde NaCl isoton durch Cholinchlorid und Na₂HPO₄ durch H₃PO₄ (85 %) ersetzt. Die Lösungen wurden vor Gebrauch mit Sauerstoff 30 Minuten begast und mit HCl oder NaOH bzw. Tetramethylammoniumhydroxid auf pH 6,8 eingestellt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Krebs-Phosphat-Puffers (Na⁺-haltig und Na⁺-frei) ¹⁾

Na ⁺ -haltig		Na ⁺ -frei	
Substanz	Konz. [mmol/l]	Substanz	Konz. [mmol/l]
NaCl	120,8	Cholinchlorid	120,8
KCl	4,8	KCl	4,8
CaCl x 2 H ₂ O	1,3	CaCl x 2 H ₂ O	1,3
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2
Na ₂ HPO ₄	16,5	H ₃ PO ₄ (85 %)	16,5
Glukose / Mannit	10	Glukose / Mannit	10

¹⁾ mit HCL/NaOH bzw. Tetramethylammoniumhydroxid auf pH 6.8 eingestellt

3.3.3 Versuchsanordnung

Die Experimente wurden in einer modifizierten Ussing-Kammer (Ussing und Zerahn 1951) durchgeführt. Eine Kammer bestand aus zwei miteinander verschraubbaren Halbkammern aus Plexiglas, zwischen die das zu untersuchende Gewebe über einer 1 cm² großen, ovalen Öffnung eingespannt wurde. Dazu befanden sich am Rand der Öffnung 6 Nadelspitzen, mit deren Hilfe die Gewebestückchen unter mäßiger Spannung fixiert wurden. Durch zirkulierendes Wasser in einem Mantelsystem wurde die Kammerflüssigkeit mittels eines externen Wasserbades konstant auf 37 °C temperiert. An der oberen Seite der Kammer befand sich eine mit einem ca. 2 cm hohen Kamin versehene Öffnung. Diese diente einerseits zum Einfüllen der Elektrolytlösungen und der Applikation der Versuchssubstanzen, andererseits konnten über diese Öffnung Proben aus dem serosalen bzw. mukosalen Kompartiment der Ussing-Kammer entnommen werden. Über eine Bohrung am Boden jeder Kammerhälfte wurde die Elektrolytlösung kontinuierlich mit Sauerstoff zur Versorgung des Gewebes begast. Die Begasung konnte mittels Gasdurchflussmessern reguliert werden. Jede Kammerhälfte war seitlich in unmittelbarer Nähe (ca. 1 mm) des Gewebes mit einer feinen Bohrung ausgestattet. Diese wurden mit Agar beschickt und dienten zur Messung der Potentialdifferenz (PD) zwischen der serosalen und mukosalen Gewebeseite. Zur Einspeisung und Messung des Kurzschlussstromes (I_{sc}) befand sich mittig gegenüber dem Gewebe an den Stirnseiten der jeweiligen Kammerhälfte eine weitere Bohrung für Agarbrücken. Zum Abdichten der mit Acrylschrauben verschlossenen Kammerhälften wurde Silikonpaste (Baysilone[®], mittelviskos, Bayer Leverkusen, Deutschland) verwendet. Jede Kammerhälfte wurde mit 4 ml der entsprechenden auf 37 °C gewärmten Pufferlösung gefüllt. Das Gewebe konnte unter diesen Bedingungen für mehrere Stunden am Leben gehalten werden. Nach Diener et al. (1989) können auch nach 5 Stunden Versuchsdauer anhand morphologischer Untersuchungen an der Colon-Mukosa keine elektronenmikroskopisch erkennbaren Schäden nachgewiesen werden.

3.3.4 Elektrische Messungen

Die elektrischen Messungen wurden mit einer computergesteuerten „Voltage-Clamp“-Anlage für 6 Messkammern (Ingenieurbüro K. Mußler, Wissenschaftliche Geräte, Aachen, Deutschland) durchgeführt. Mit Hilfe von zwei in gesättigter KCl-Lösung getauchten Kalomelelektroden (XR100 Referenz Elektrode, Radiometer Copenhagen, Lyon, Frankreich), die über Agarbrücken (3 Gewichtsprozente Agar in KPP ohne CaCl) mit jeder Kammerhälfte verbunden waren, wurde die transepitheliale Potenzialdifferenz (PD) zwischen der serosalen und mukosalen Gewebeseite bestimmt. Diese PD, die auf elektrogenen Transportvorgängen (Nettoladungstransport) durch das Gewebe beruht, wurde über die „Voltage-Clamp“-Anlage automatisch durch Einspeisung eines entsprechenden Gegenstromes (Kurzschlussstrom = I_{sc}) auf Null fixiert. Zur Einspeisung des I_{sc} wurden $Ag^+/AgCl$ -Elektroden in 3 molarer KCl-Lösung verwendet, die ebenfalls über Agarbrücken mit der entsprechenden Kammerhälfte in Verbindung standen. Vor dem Einspannen des Versuchsgewebes wurde der Lösungswiderstand des Kammersystems (R_f) bestimmt und dieser während des Versuches automatisch kompensiert.

Definitionsgemäß ist der I_{sc} positiv, wenn es zu einer Verschiebung positiver Ladungsträger von mukosal nach serosal kommt. Dabei kann es sich um eine Kationen-Nettoresorption (von mukosal nach serosal) oder um eine Anionen-Nettosekretion (von serosal nach mukosal) handeln. Bei negativem I_{sc} liegen umgekehrte Verhältnisse vor. Im Rattenjejunum basiert die transepitheliale Spannung vornehmlich auf einer Na^+ -Resorption, im Colon hingegen auf einer Cl^- -Sekretion. In beiden Fällen wurde diese durch einen positiven I_{sc} kurzgeschlossen. Der I_{sc} wurde in $\mu A/cm^2$ gemessen. Da aber der Kurzschlussstrom als Maß für den Ionentransport dient, wurde der Strom in $\mu Eq/h/cm^2$, d.h. Transport eines einwertigen Teilchens pro Zeit und Fläche, umgerechnet. Findet also ein Nettotransport von 1 μmol eines einwertigen Ions in einer Stunde über eine Gewebefläche von 1 cm^2 statt, entspricht dies einem Strom von 26,9 $\mu A/cm^2$. Um die Gewebeleitfähigkeit (Gt) zu bestimmen, wurde von der „Voltage-Clamp“-Anlage alle 5 s bipolare Strompulse (Impulsdauer: 200 ms) von $\pm 10 \mu A$ über die I_{sc} -Elektroden eingespeist und die dadurch hervorgerufene Änderung der Potentialdifferenz als Mittelwert von 3 aufeinander folgenden Messungen registriert. Nach dem

Ohm'schen Gesetz wurde dann die Gewebeleitfähigkeit ($G_t = I/U$) automatisch berechnet. Die Gewebeleitfähigkeit [mS/cm^2] ist der reziproke Wert des Gewebewiderstandes [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]. I_{sc} und G_t wurden alle 6 s registriert.

3.3.5 Gewebepräparation

Die Tiere wurden mit Diethylether betäubt. Die Bauchhöhle wurde entlang der Linea alba eröffnet und das entsprechende Darmsegment (mittleres Jejunum bzw. proximales Colon) entnommen. Die Darmabschnitte wurden sogleich mit physiologischer Kochsalzlösung ausgespült und in eiskalten, mit Sauerstoff begasten Krebs-Phosphat-Puffer verbracht. Danach wurden die Tiere durch Entbluten getötet. Anschliessend wurde der Darm in 2,5 bis 3 cm lange Stücke zerteilt, auf einen Glasstab aufgezogen, in Längsrichtung entlang des Gekröseansatzes aufgeschnitten und unter Verwendung von gebogenen Pinzetten aufgespannt.

3.3.6 Vitalitätskriterien der Versuchsgewebe

Unmittelbar nach Beendigung des Versuches (ca. 2,5 h nach Einspannen des Gewebes) wurde bei Jejunum-Präparaten ein Glukosestimulationstest durch Zugabe von 20 mmol/l Glukose in das mukosale Kompartiment durchgeführt. Bei der Auswertung der Versuche wurden nur Darmgewebe berücksichtigt, die mit einer Erhöhung des I_{sc} $\geq 30\%$ gegenüber dem Basalwert reagierten. Als weiteres Ausschlusskriterium galt eine Gewebeleitfähigkeit $\leq 50 \text{ mS}/\text{cm}^2$. Zur Funktionsprüfung der Colonpräparate wurde am Versuchende Carbachol in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{mol}/\text{l}$ in das serosale Kompartiment der Kammer zugegeben. Auch bei diesem Test galt das Gewebe als vital, wenn eine Erhöhung des I_{sc} $\geq 30\%$ gegenüber dem Basalwert als Antwort auf eine durch Carbachol induzierte Clorid-Sekretion in das mukosale Kammer-Kompartiment bei gleichzeitiger Gewebeleitfähigkeit $\leq 50 \text{ mS}/\text{cm}^2$ auftrat.

3.3.7 Ablauf der Ussing-Kammer Versuche

Nach dem Einspannen des Darmgewebes in die Ussing-Kammer wurde eine 30-minütige Äquilibrierungszeit abgewartet. Es folgte die Zugabe der Testsubstanz in das mukosale bzw. serosale Kompartiment der Kammer. Als Lösungsvermittler diente DMSO mit einem Kammer-Volumenanteil von 0,25 %. Die erste Probe für die HPLC-Analyse (150 µl) wurde unmittelbar nach Zugabe der Testsubstanz aus dem serosalen und mukosalen Kompartiment entnommen. Weitere Probenentnahmen folgten in einstündigen Abständen. In Parallelversuchen wurden zu gleichen Zeitpunkten Kontroll-Proben aus dem serosalen und mukosalen Kompartiment von Ussing-Kammern entnommen, bei denen keine Testsubstanz zupipettiert worden war.

3.3.8 Gewebeextraktion

Zum Nachweis der Absorption bzw. Adsorption einer eingesetzten Testsubstanz in bzw. an das Darmgewebe wurden nach Beendigung des Versuches die eingespannten Darmgewebepreparate zum Teil einem Extraktionsprozess unterzogen. Das Darmgewebestück wurde dazu *in toto* mit 900 µl eines hypotonen Mediums (Lösung mit 16,5 mmol/l Na₂HPO₄ und 50 mmol/l Mannit) mittels eines Glas-Teflon-Homogenisators (Potter S, B. Braun Melsungen AG, Deutschland) durch 20 Hübe bei 1200 U/min homogenisiert. Nach Zugabe von 100 µl Methanol und 100 µl einer Genistein-Lösung (100 µmol/l in Methanol) als internen Standard und intensiver Durchmischung wurde der Inhalt des Homogenisatorgefäßes mit 5,5 ml Aceton in ein verschließbares Zentrifugenglas überführt und 20 min lang horizontal geschüttelt. Nach einer 45 minütigen Zentrifugation (3420 g) bei 4 °C wurde der Überstand in ein Reagenzglas dekantiert und bis zur Trockne eingedampft (SpeedVac-Concentrator, Savant instruments, inc., Farmingdale, N.Y.). Der Rückstand wurde in 200 µl Methanol gelöst, in ein Eppendorf-Cup überführt und 6 Minuten in einer Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5415 C) bei 14000 U/min zentrifugiert. Letztlich wurden 150 µl des so erhaltenen Überstandes zur HPLC-Analyse verwendet.

3.3.9 HPLC-Analytik

Zur Analyse der direkt aus den Flüssigkeitskompartimenten der Ussing-Kammer entnommenen Proben bzw. der Gewebeextrakte wurde eine HPLC-Anlage (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) der Firma Jasco[®], Labor- und Datentechnik GmbH, Deutschland verwendet. Die Anlage bestand aus einem Gradientenmischer (LG-980-02, Fa. Jasco[®]), einem Degaser (DG-980-50, Fa. Jasco[®]), zwei Pumpen (PU-980, Fa. Jasco[®]), einem Autosampler (AS-950, Fa. Jasco[®]) und einem Säulenofen (Fa. Jasco[®]). Die Trennung der Testsubstanzen erfolgte über eine analytische Säule (reversed-phase, Kromasil C₁₈-Säule, 250 x 4 mm, 5 µm Porengröße, Fa. Jasco[®]), der eine Vorsäule (Intersil ODS 2, 10 x 4 mm, 5 µm Porengröße, Fa. Jasco[®]) vorgeschaltet war. Für die Detektion der Substanzen bei der Wellenlänge von 254 nm wurde ein UV-Detektor (MD-1510, Fa. Jasco[®]) verwendet. Das Fließmittel bestand aus 67,5 % Phosphat-Puffer (25 mmol/l Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, pH 2,4), 28,0 % Acetonitril und 4,5 % Methanol. Die Flussrate betrug 1 ml/min bei konstanter Fließmittelzusammensetzung (isokratisches HPLC-Verfahren). Das Probeneinspritzvolumen betrug 30 µl. Um die Nachweisgrenze der Testsubstanzen zu erhöhen, wurde das Einspritzvolumen teilweise auf 80 µl erhöht. Die Nachweisgrenzen von Quercetin, Isoquercitrin und Rutin lagen bei 0,4, 0,1 bzw. 3,0 µmol/l. Die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte computerunterstützt mit Hilfe des Programmes Borwin[®] der Firma Jasco[®], wobei die Identifikation der Peaks anhand der Retentionszeiten im Vergleich mit authentischen Testsubstanzen durchgeführt wurde. Die Bestimmung der Konzentration der Testsubstanzen in den Proben erfolgte anhand von Standardkurven. Diese wurden vor jedem Versuch neu erstellt. Dazu wurde die Reinsubstanz in mehreren definierten Konzentrationen gemessen. Die ermittelten Peakflächen wurden zur Erstellung einer Kalibrationsgeraden gegen die Konzentrationen aufgetragen. Durch Bestimmung des Kalibrationsfaktors (Steigung der Geraden) ließ sich aus jeder beliebigen Peakfläche die Konzentration der Testsubstanz bestimmen.

Die Menge einer Testsubstanz, die sich nach einem Ussing-Kammer-Versuch im bzw. am Darmgewebe befand, wurde mit Hilfe der Kalibration mit internem Standard ermittelt. Hierzu wurde nativen Darmgewebe-Proben eine definierte in Methanol gelöste Menge an Reinsubstanz zugegeben. Genistein diente in sämtlichen Proben als interner Standard. Diese, mit Standard und internem Standard versetzten

Gewebeproben, durchliefen sämtliche Probenaufbereitungsschritte des Extraktionsverfahrens (siehe Kapitel 3.3.8). Die Eichgerade wurde anhand des Verhältnisses der Peakflächen der Testsubstanz zur Peakfläche des internen Standards erstellt. Mit den so erstellten Eichgeraden konnte nach Bestimmung der Flächenquotienten aus der Peakfläche der gefundenen Substanz in einer unbekannt Probe und der Peakfläche des zugegebenen internen Standards die Substanzmenge berechnet werden.

3.3.10 Enzym-Behandlung

Da möglicherweise gebildete Glukuronsäure- bzw. Schwefelsäure-Konjugate des Quercetins mit der angewandten UV-Detektion nicht identifiziert werden konnten, wurden jeweils 0,5 ml des serosalen und mukosalen Ussing-Kammer-Mediums nach Beendigung des Versuches mit β -Glucuronidase (Typ HP-2, Crude Solution From *Helix pomatia*, β -Glucuronidase-Aktivität 100000 units/ml, Sulfatase-Aktivität 5000 units/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) behandelt. Nach Überführung der Proben in Eppendorf-Cups wurden diese mit 10 μ l Essigsäure (0,583 M) auf pH 4,8 - 4,9 eingestellt. Nach Zugabe von 10 μ l β -Glucuronidase wurden die Proben bei 37 °C im Schüttel-Wasserbad 30 min lang inkubiert. Anschließend wurden 150 μ l für die HPLC-Analytik entnommen. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass diese Behandlung zu einer vollständigen Spaltung von Glukuroniden und Sulfaten führt (Caldwell 1985)

3.4 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern (SEM) dargestellt. Vergleiche von Gruppenmittelwerten auf statistisch signifikante Unterschiede wurden entweder mit dem Student T Test (Vergleich von 2 Gruppenmittelwerten) oder mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (Vergleich von mehr als 2 Gruppenmittelwerten) mit anschließendem multiplen paarweisen Vergleich von Gruppenmittelwerten nach Bonferoni durchgeführt. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm Instat V 2.05a (Graph Pad Software, San Diego, USA) durchgeführt.