

**ANALYTISCHE UNTERSUCHUNGEN ZU PHENOLISCHEN
INHALTSSTOFFEN AUS SALICIS CORTEX UNTER
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG IHRER
METABOLISIERUNG**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der
Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg

vorgelegt von

Monika Untergehrer

aus Rosenheim

2015

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2011 bis August 2015 unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg angefertigt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 01.10.2015

Datum der mündlichen Prüfung: 04.12.2015

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. Siavosh Mahboobi	(Vorsitzender)
	Prof. Dr. Jörg Heilmann	(Erstgutachter)
	Prof. Dr. Thomas J. Schmidt	(Zweitgutachter)
	Prof. Dr. Joachim Wegener	(dritter Prüfer)

Danksagung

Mein Dank richtet sich zuerst an Prof. Dr. Jörg Heilmann für die Vergabe des interessanten Dissertationsthemas, die Möglichkeit an seinem Lehrstuhl zu promovieren und die zahlreichen und sehr wertvollen Fachgespräche. Lieber Jörg, zudem möchte ich dir für dein Vertrauen, deine herzliche Art, die schönen Jahre an deinem Lehrstuhl und dafür, dass du immer mehr ein Freund als ein Chef warst, danken.

Ganz besonders möchte ich Dr. Guido Jürgenliemk danken für das interessante Wahlpflichtpraktikumsthema, welches mich veranlasst hat, eine Promotion anzustreben, für die gute Zusammenarbeit während des PB3-Praktikums und für die spannende Zeit während den Konferenzen. Lieber Guido, danke, dass du mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden bist.

Ein besonderer Dank geht an die massenspektroskopische Abteilung der Universität Regensburg, insbesondere an Josef Kiermaier für die Entwicklung der HPLC-MS Methode und die Aufnahme der MS-Daten sowie für die Beantwortung unzähliger Fragen.

An Dr. Birgit Kraus möchte ich auch ein großes Dankeschön richten für die Unterstützung und ihr „Know-how“ bei den zellbiologischen Untersuchungen sowie für die vielen sehr hilfreichen fachlichen Diskussionen.

Meinen herzlichen Dank möchte ich Frau PD Dr. Andrea Straßer und Herrn Dr. Hans-Joachim Wittmann aussprechen für die Durchführung der *in silico* Analysen und der gelungenen Kooperation.

Meinen Dank ausdrücken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Stefan Zahler für die wertvollen Fachgespräche und die Bereitstellung von HMEC-1 Zellen.

Ein sehr großes Dankeschön geht an Dr. Susanne Reintjes und das Team der pharmakologischen Prüfung, Prof. Dr. Frieder Kees, Dr. Georg Mair und Dr. Frank Schweda für die Planung, Unterstützung und Durchführung der Studie, da diese hervorragende Vorarbeit die Basis meines Dissertationsthemas darstellt.

Bedanken möchte ich mich auch bei Julianna Ziegler für die Hilfe und ihre Pipettierfreudigkeit während ihres Wahlpflichtpraktikums und ihres praktischen Jahres bei der Durchführung der Eriodictyol Gehaltsbestimmung und der Entwicklung der Zellkulturassays. Zudem geht mein Dank auch an Dagmar Flittner für die Isolierung des Salicortins und an Sebastian Pitzl für die Synthese des Naringenin-7-O- β -D-glucuronids sowie des Catechol-sulfats.

Der Firma Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH möchte ich für die finanzielle Unterstützung des β -Glucuronidase Projekts danken.

Ein herzlicher Dank geht auch an Frau Prof. Dr. Irmgard Merfort für die Bereitstellung des Quercetin-3-O- β -D-glucuronids.

Herrn Dr. E. Ades und Herrn F.J. Candal vom CDC (USA) und Herrn Dr. T. Lawley der Emory University (USA) sei für die Bereitstellung der HMEC-1 Zelllinie gedankt.

Mein Dank geht auch an die NMR-spektroskopische Abteilung der Universität Regensburg, insbesondere an Herrn Fritz Kastner für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Ein herzliches Dankeschön an Gabi Brunner, für ihre Hilfe bei Bestellungen, technischen oder Zellkultur-Problemen sowie für die Beantwortung unzähliger Fragen.

Frau Ohli und Frau Bauer sei gedankt für die Hilfe bei allen verwaltungstechnischen Fragen.

Bei Dr. Katharina Zenger, Eva Lotter, Dr. Sebastian „Schnibbo“ Schmidt und der Frohnatur Christian Zeh möchte ich mich recht herzlich für die gute Zusammenarbeit im PB3 Praktikum und für die vielen lustigen Stunden im Glaskasten bedanken. Herzlichen Dank an Anne Grashuber für die Vorbereitung, Planung und Unterstützung des PB3 Praktikums.

Vielen Dank:

Dr. Beata Kling für das Einbringen ihres Zellkultur und GraphPad „Know-hows“ und die vielen unvergesslichen Mädels-Abende und den einen ZAP-Abend (Alarm!).

Dr. Rosmarie Scherübl für die hilfreiche Diskussion von Validierungsfragestellungen, für ihre praktische Hilfe bei technischen Problemen der HPLC sowie für ihr stets heiteres Gemüt.

Dr. Marcel Flemming, meinem (Akademiker)-Gartenfreund. Marcel, danke für das viele Korrekturlesen und für die sehr humorvolle Zeit am Lehrstuhl, in den Mittagspausen und am Bismarckplatz.

Dr. Daniel Bücherl für die Erläuterung vieler Geräte und Methoden sowie für die intensive Zeit im HPLC-Raum.

Stefan Wiesneth, für die Hilfe bei der Extraktion der Weidenrinde und bei diversen PC Problemen und für die vielen kleinen mittäglichen erheiternden Missverständnisse.

Außerdem möchte ich mit Frau Schiller mit besten Grüßen verbleiben, nicht nur wegen unserer Verbundenheit zum Bäckereifach, sondern auch wegen der vielen lustigen Momente, deren Erläuterung den Rahmen sprengen würde (Bezze!).

Außerdem möchte ich mich noch für die kollegiale und sehr schöne Zusammenarbeit bedanken bei Sebastian Schwindl, Dr. Petr Jirasek, Markus Löhr, Sina Malenke, Angeliki Mathioudaki, Edna E. Makule, Ilya Volkov, Tri Hieu Nguyen, sowie meinen Wahlpflichtstudentinnen und Pharmazeutinnen im Praktikum für die gute Mitarbeit und Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit.

Meinen Eltern, meinem Bruder, Tanja und Markus sowie meiner Oma möchte ich danken, dass sie mich immer unterstützt haben und immer für mich da sind. Meinem Sebastian möchte ich abschließend Danke sagen für seine Geduld und für jeden einzelnen wunderschönen gemeinsamen Tag.

Meiner lieben Oma.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Untergehrer, M.; Bücherl, D.; Wittmann, H.-J.; Strasser, A.; Heilmann, J.; Jürgenliemk, G. **2015**: Structure dependent deconjugation of flavonoid-glucuronides by human β -glucuronidase - *In vitro* and *in silico* analyses. *Planta Med.* 81, 1182-1189.

Freischmidt, A.; Untergehrer, M.; Ziegler, J.; Knuth, S.; Okpanyi, S.; Müller, J.; Kelber, O.; Weiser, D.; Jürgenliemk, G. **2015**: Quantitative analysis of flavanones and chalcones from Willow bark. *Pharmazie* 70, 565-568.

Weitere Publikationsbeteiligungen:

Yancheva, D.; Cherneva, E.; Quick, M.; Mikhova, B.; Shivachev, B.; Nikolova, R.; Djordjevic, A.; Untergehrer, M.; Jürgenliemk, G.; Kraus, B.; Smelcerovic, A. **2015**: Synthesis, crystal structure and biological activity screening of novel *N*-(α -Bromoacyl)- α -amino esters containing valyl moiety. *Acta Chim. Slov.* 62, 689-699.

Herrmann, J. M.; Untergehrer, M.; Jürgenliemk, G.; Heilmann, J.; König, B. **2014**: Synthesis of phenyl-1-benzoxepinols isolated from Butcher's Broom and analogous benzoxepines. *EurJOC* 5, 3170-3181.

Posterbeiträge:

Knuth S.; Abdelsalam, R. M.; Khayyal, M. T.; Untergehrer, M.; Schweda, F.; Heilmann, J.; Kees, M. G.; Mair, G.; Kees, F.; Jürgenliemk, G. **2014**: Catechol is a bioactive metabolite of Salicis cortex. *ICP*, Nagoya, Japan.

Untergehrer, M.; Kraus, B.; Heilmann, J.; Jürgenliemk, G. **2013**: Deconjugation of polyphenol-glucuronides by a factor with β -glucuronidase activity from human monocytes (Mono Mac 6 cells). *GA*, Münster, Deutschland.

Herrmann, J.; Jürgenliemk, G.; Untergehrer, M.; Heilmann, J.; König, B. **2012**: Synthesis of Ruscozepine A and B, novel natural products isolated from Butcher's Broom. *EuCheMS*, Prag, Tschechien und *ORCHEM*, Weimar, Deutschland.

Freischmidt, A.; Knuth, S.; Untergehrer, M.; Okpanyi, S.; Müller, J.; Kelber, O.; Weiser, D.; Jürgenliemk, G.; Heilmann, J. **2012**: Eine neue Methode zur Quantifizierung von Chalkonen und Flavanonen in pharmazeutisch verwendeten Weidenrinden-Extrakten. *Phytotherapeutika*, Wien, Österreich.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Weide	1
1.2	Die Weidenrinde	2
1.2.1	Von der Weide zum Aspirin®	2
1.2.2	Die Weidenrinde (Salicis cortex)- Die Droge und ihre Monographien	2
1.2.3	Dosierung und Anwendung	3
1.2.4	Verträglichkeit, Kontraindikationen und Nebenwirkungen	4
1.2.5	Inhaltsstoffe von Salicis cortex	4
1.2.5.1	Phenolglucoside	5
1.2.5.2	Flavonoide.....	6
1.2.5.3	Mono-, oligo- und polymere Flavan-3-ole	7
1.3	Pharmakokinetische Untersuchungen.....	7
1.4	<i>In vivo</i> Untersuchungen zur pharmakologischen Wirkung von Weidenrinde.....	10
1.4.1	Präklinische Untersuchungen.....	10
1.4.2	Wirksamkeitsstudien	11
1.5	Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Weidenrinde.....	14
1.6	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	16
2	Quantifizierung von phenolischen Inhaltsstoffen aus Weidenrinde.....	17
2.1	Grundlage	17
2.1.1	Quantifizierung von Flavonoiden	17
2.1.2	Quantifizierung von Catechol	18
2.1.2.1	Vorkommen der HCC-Untereinheit	18
2.1.2.2	Abbaumechanismus der HCC-Untereinheit zu Catechol.....	19
2.1.2.3	Etablierte Catechol-gehaltsbestimmungen	19

2.2	Ergebnisse und Diskussion	21
2.2.1	Simultane Quantifizierung von Naringenin- und Eriodictyol-glucosiden.....	21
2.2.1.1	Reaktionsprinzip	21
2.2.1.2	Anwendbarkeit der Methode zur simultanen Bestimmung von Naringenin und Eriodictyol	21
2.2.1.3	Validierungsparameter	24
2.2.2	Quantifizierung der HCC-Untereinheit als Catechol	27
2.2.2.1	Reaktionsprinzip	27
2.2.2.2	Methodenentwicklung	28
2.2.2.3	Validierungsparameter	32
2.2.3	Catechol-, Naringenin-, und Eriodictyol-gesamtgehalt in verschiedenen Weidenrindenpräparaten.....	37
2.3	Zusammenfassung und Ausblick	39
2.4	Experimenteller Teil.....	41
2.4.1	Ausgangsmaterial	41
2.4.1.1	Weidenrindentrockenextrakt (STW)	41
2.4.1.2	Fertigarzneimittel	41
2.4.1.3	Weidenrindentrockenextrakt (Hermes)	41
2.4.1.4	<i>Salix daphnoides</i> Extrakt.....	41
2.4.2	Methoden für die simultane Quantifizierung von Naringenin- und Eriodictyolderivaten	42
2.4.2.1	Extraktvorbereitung.....	42
2.4.2.2	Vorbereitung von Einzelsubstanzen	43
2.4.2.3	Berechnung	43
2.4.2.4	HPLC-Methoden	43
2.4.2.5	Methodenvalidierung.....	45
2.4.3	Methoden für die Quantifizierung des Gesamt-catecholgehalts	48
2.4.3.1	Extraktaufarbeitung.....	48

2.4.3.2	Einzelsubstanzen	48
2.4.3.3	Reinheitsprüfung	48
2.4.3.4	Berechnung	49
2.4.3.5	HPLC-Methode	49
2.4.3.6	Methodenvalidierung	50
2.4.4	Geräte und Chemikalien	53
3	Analyse von Phase-II-Metaboliten nach Einnahme eines Weidenrindenextrakts	57
3.1	Grundlage	57
3.1.1	Resorption und Metabolisierung der Flavonoide	58
3.1.1.1	Freisetzung des Flavonoid-aglykons	58
3.1.1.2	Phase-II-Konjugation	58
3.1.1.3	Metabolisierung durch die Darmmikroflora	59
3.1.2	Klinische Prüfung	61
3.2	Ergebnisse und Diskussion	63
3.2.1	Metaboliten-Datenbank	63
3.2.2	Zusammensetzung der Prüfmedikation	63
3.2.2.1	Qualitative Zusammensetzung	63
3.2.2.2	Quantitative Zusammensetzung	66
3.2.3	Screening der Phase-II-Metaboliten von Polyphenolen durch HPLC-MS Analyse im Serum gesunder Probanden nach Einnahme eines Weidenrindenextrakts	67
3.2.3.1	Probenvorbereitung	67
3.2.3.2	Phase-II-Metaboliten der Flavonoide	67
3.2.3.3	Phase-II-Metaboliten phenylpropanoide Verbindungen	69
3.2.3.4	Weitere phenolische Verbindungen	70
3.2.4	Identifizierung der polyphenolischen Phase-II-Metaboliten	71
3.2.4.1	Identifizierung der polyphenolischen Aglyka nach enzymatischer Aufarbeitung ..	71

3.2.4.2	Identifizierung der polyphenolischen Phase-II-Metaboliten durch MS/MS-Fragmentierung.....	72
3.2.4.3	Metabolitenscreening und -identifizierung am Beispiel Naringenin-glucuronid	77
3.2.5	Verteilung der polyphenolischen Metaboliten in den Seren des Probandenkollektivs .	77
3.2.5.1	Verteilung der Phase-II-Metaboliten der Flavonoide.....	77
3.2.5.2	Verteilung der phenylpropanoiden Metaboliten	78
3.2.6	Semiquantitative Analyse der Phase-II-Metaboliten nach Einnahme der Prüfmedikation im Serum über 24 h.....	82
3.2.6.1	Phase-II-Metaboliten der Flavonoide	82
3.2.6.2	Phenylpropanoide Metaboliten.....	86
3.3	Zusammenfassung und Ausblick	89
3.4	Experimenteller Teil.....	92
3.4.1	Klinische Studie	92
3.4.2	Probenvorbereitung	94
3.4.2.1	Prüfmedikation.....	94
3.4.2.2	Serumproben	95
3.4.2.3	Standardlösungen.....	96
3.4.3	HPLC-DAD-Methode	97
3.4.4	HPLC-DAD-MS-Methode.....	98
3.4.5	Datenverarbeitung	99
3.4.5.1	Metaboliten-Datenbank.....	99
3.4.5.2	MS Reportmethode.....	104
3.4.5.3	Auswertung der MS/MS-Daten	104
3.4.6	Geräte und Chemikalien	105
4	<i>In vitro</i> und <i>in silico</i> Analysen zu polyphenolischen Phase-II-Metaboliten.....	109
4.1	Grundlage	109
4.1.1	Bedeutung des ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1).....	110

4.1.2	Vorkommen der β -Glucuronidase und deren Bedeutung für die Flavonoid-metabolisierung	111
4.1.3	Postulierter Mechanismus der Flavonoid-glucuronid Spaltung durch β -Glucuronidase... ..	112
4.2	Ergebnisse und Diskussion	114
4.2.1	Untersuchung der anti-inflammatorischen Eigenschaften von Phase-II-Metaboliten aus Weidenrinde	114
4.2.2	Strukturabhängige Dekonjugation von Flavonoid-glucuroniden durch humane β -Glucuronidase	116
4.2.2.1	Entwicklung eines Deglucuronidierungsassays	116
4.2.2.2	Testung von Polyphenol-glucuroniden im Deglucuronidierungsassay.....	117
4.2.2.3	Einfluss der Substratstruktur auf die Dekonjugation durch β -Glucuronidase aus MM6-Zellen.....	122
4.2.3	<i>In silico</i> Untersuchungen zur strukturabhängigen Dekonjugation durch humane β -Glucuronidase	124
4.2.3.1	Lage und Stabilisierung verschiedener Flavonoid-glucuronide im Aktiven Zentrum des Enzyms	124
4.2.3.2	Einfluss der Glucuronidierungsposition.....	126
4.2.3.3	Einfluss der aktiven Zentren der tetrameren β -Glucuronidase	127
4.2.3.4	Vergleich humaner mit boviner β -Glucuronidase	127
4.3	Zusammenfassung und Ausblick.....	130
4.3.1	ICAM-1 Expressionshemmung von Phase-II-Metaboliten.....	130
4.4	Experimenteller Teil	132
4.4.1	Zellkultur	132
4.4.1.1	Passagieren und Kultivieren	132
4.4.1.2	Bestimmung der Zellzahl	133
4.4.1.3	ICAM-1 Assay	133
4.4.1.4	Deglucuronidierungsassay	134

4.4.1.5	Boviner β -Glucuronidase Assay	135
4.4.2	HPLC-Methoden	135
4.4.3	Reinheitsbestimmung der Testverbindungen	136
4.4.4	Durchflusszytometrie	137
4.4.5	<i>In silico</i> Analysen	138
4.4.6	Statistik	138
4.4.7	Geräte und Chemikalien	139
5	Zusammenfassung	144
6	Abkürzungsverzeichnis	148
7	Literaturverzeichnis	153
8	Anhang: EIC, MS, MS/MS und NMR-Spektren	169
8.1	EIC und MS Spektren	169
8.2	MS/MS Spektren	176
8.3	NMR Daten	183
8.3.1	Salicortin	183
8.3.2	Catechol-sulfat	184
8.3.3	Naringenin-7-O- β -D-glucuronid	185
9	Erklärung zur Eigenständigkeit	186

1 EINLEITUNG

1.1 Die Weide

Die Familie der Weidengewächse (Salicaceae) umfasst 55 Gattungen und insgesamt 1010 Arten (Stevens 2012). Darunter befindet sich, neben der ebenfalls artenreichen Gattung *Populus*, die Gattung *Salix* L., welche je nach taxonomischer Bewertung zwischen 330-500 Arten umfasst (Ghahremaninejad et al. 2012; Meier und Meier-Liebi 2007). Die Weidengewächse kommen auf der nördlichen Hemisphäre weitverbreitet von der Arktis bis zu tropischen Gebieten vor. Auf der südlichen Hemisphäre sind hingegen nur wenige Arten beheimatet (Ghahremaninejad et al. 2012). Von den in Mitteleuropa heimischen Arten (ca. 35) kommt die Hälfte im alpinen Raum vor (Meier und Meier-Liebi 2007). Es handelt sich bei der Gattung *Salix* um Bäume (z.B. *S. alba*, *S. daphnoides*, *S. fragilis*) oder Sträucher (*S. caesia*, *S. helvetica*). In der Arktis sowie in den Alpen kommen auch Zwergsträucher (*S. arctica*, *S. alpina*) und Sträucher mit unterirdischen Trieben (*S. herbacea*) vor (**Abb. 1**; Chmelar und Meusel 1976). Die Blätter sind meist länglich bis lanzettlich und am Rand leicht gesägt (Wichtl 2002). Eine Blattbehaarung kann je nach Art auftreten (Meier und Meier-Liebi 2007). Die diözischen Weiden blühen meist vor oder mit Erscheinen der Blätter. Die Blütenstände (die Weidenkätzchen, Ähren) sind sitzend oder kurz gestielt und die Blütenstandsachsen meist behaart. Die männliche Blüte (**m**, **Abb. 1**) besteht aus 2-5 (max. 24) gelben, weit hervorragenden Staubblättern. Die weibliche Blüte (**w**, **Abb. 1**) besteht aus einem grünen Fruchtknoten mit zwei Fruchtblättern (Meier und Meier-Liebi 2007; Wichtl 2002). Der Griffel fehlt oder ist kurz ausgeprägt. Die Blüte besitzt zwei Narben die sich meist zur Seite biegen. Die Bestäubung der Blüten erfolgt hauptsächlich durch Insekten (Meier und Meier-Liebi 2007).



Abb. 1 Weide am Ufer der Donau sowie weibliche (**w**) und männliche (**m**) Blütenstände zweier Weiden (Donauufer zwischen Pentling und Matting, südlich von Regensburg).

1.2 Die Weidenrinde

1.2.1 Von der Weide zum Aspirin®

Aufzeichnungen über pflanzliche Arzneimittel, welche einen analgetischen Effekt von Weidenblättern beschrieben, gab es bereits im antiken Ägypten 1300 v. Chr. Die griechische und chinesische Zivilisation wandte Weidenrinde gegen Fieber und Schmerzen bereits vor mehr als 2000 Jahren an. Auch der griechische Philosoph Hippokrates (460-370 v. Chr.) empfahl das Kauen von Weidenrinde bei hoher Körpertemperatur und bei Schmerzen. Später verschrieb der griechische Arzt Dioscorides (1. Jahrhundert n. Chr.) Weidenrinde, um Entzündungssymptome zu mildern (Dombrowski und Alftermann 1993; Mahdi et al. 2006). Die moderne Forschung zu den Inhaltsstoffen und zur Wirkung begann im 18. Jahrhundert mit Edward Stone, welcher in einer klinischen Studie Patienten mit Schüttelfrost mit gemahlener Weidenrinde behandelte (Stone 1763). MacLagan (1876) verabreichte gemahlene Weidenrinde an Patienten mit akutem Rheuma und konnte einen vollständigen Rückgang des Fiebers und der Entzündung beobachten. Die Untersuchungen zum wirksamen Prinzip gipfelten in der Isolierung des Salicins aus Weidenrinde 1828 durch Buchner. Bereits in kleineren Menge gelang diese Isolierung ein paar Jahre zuvor auch den Italienern Fontana und Brugnatelli (Hedner und Everts 1998). Piria gelang 1838 die Gewinnung der Salicylsäure durch saure Hydrolyse und Oxidation aus Salicin (Wagner et al. 2003; Mahdi et al. 2006). Die chemische Synthese der Salicylsäure im Großmaßstab wurde von Kolbe etabliert, welche daraufhin von der Heyden Chemical Company als Analgetikum und Antipyretikum vertrieben wurde (Kolbe 1874). Aufgrund der starken Nebenwirkung wie Magenblutungen wurde die Salicylsäure von Hoffmann 1897 acetyliert (Mahdi et al. 2006; Wagner et al. 2003). Die daraus entstandene Acetylsalicylsäure wurde von der Firma Bayer am 6. März 1899 registriert und unter dem Namen Aspirin® an Kliniken verteilt, um Patienten zu behandeln. In Tablettenform kam Aspirin® 1900 auf den Markt und wird seitdem weltweit vertrieben (Mahdi et al. 2006). Mit dem Siegeszug des Aspirins verlor die Weidenrinde an therapeutischer Bedeutung. Erst in den letzten 20 Jahren rückte sie wieder in den Fokus der modernen Phytotherapie (Wagner et al. 2003).

1.2.2 Die Weidenrinde (*Salicis cortex*)- Die Droge und ihre Monographien

Bei der Weidenrinde handelt es sich um 1-2 mm dicke, manchmal röhrenförmig eingerollte Rindenstücke mit glatter, glänzender grünlich-gelber bis bräunlich-grauer Außenseiten (Wichtl

2002). Die Qualitätsanforderungen sind im Europäischen Arzneibuch aufgeführt. Für die Gewinnung der arzneibuchkonformen Weidenrinde werden im Arzneibuch die Stammpflanzen *S. purpurea*, *S. daphnoides* und *S. fragilis* namentlich erwähnt, jedoch sind auch alle weiteren Stammpflanzen arzneibuchkonform, welche einen Gesamt-salicylalkoholgehalt $\geq 1,5\%$ aufweisen. Für die Drogengewinnung wird die Rinde von 6-10 m hohen Bäumen genutzt. Neben der schonend getrockneten Weidenrinde sind zusätzlich die getrockneten Stücke junger Zweigspitzen, welche ebenfalls einen erhöhten Gesamt-salicylalkoholderivatgehalt aufweisen, zugelassen (Ph. Eur. 2015). Der monographierte Weidenrindentrockenextrakt (*Salicis corticis extractum siccum*) wird aus der Droge unter Verwendung von Wasser oder Wasser-Ethanol-Mischungen (max. 80% Ethanol (V/V)) hergestellt. Der Trockenextrakt muss einen Gesamt-salicylalkoholderivatgehalt von mindestens 5% aufweisen (Ph. Eur. 2015). Monographien zu *Salicis cortex*, welche Aussagen zur Qualität, Quantität, Anwendung, Wirksamkeit, Toxikologie u.v.m. treffen, wurden zusätzlich von der WHO (World Health Organisation), der EMA (European Medicines Agency), der ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy) sowie der Kommission E des BfArMs (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte) veröffentlicht.

1.2.3 Dosierung und Anwendung

Indiziert ist die Weidenrinde laut Kommission E des BfArMs bei fieberhaften Erkrankungen, rheumatischen Beschwerden und Kopfschmerzen. Weiter wird in der Monographie von 1984 eine mittlere Tagesdosis von 60-120 mg Gesamt-salicin in flüssigen oder festen Darreichungsformen zur innerlichen Anwendung empfohlen (Wichtl 2002). Die Monographie der ESCOP führt als Indikationsgebiete Rückenschmerzen sowie leichte rheumatische und osteoarthritische Beschwerden auf. Auch empfiehlt die ESCOP im Gegensatz zur Kommission E eine höhere Dosierung als standardisierter Trockenextrakt in Tablettenform mit 240 mg Gesamt-salicin pro Tag (E/S/C/O/P monographs 2003). Die HMPC (Committee on herbal medicinal products) Monographie der EMA wurde 2009 veröffentlicht. Darin wird eine Anwendung als Trockenextrakt (DEV 8-14:1, Auszugsmittel Ethanol 70% (V/V)) mit einem Gesamt-salicingehalt von 15% beschrieben. Das indizierte Anwendungsgebiet ist die befristete Behandlung von Rückenschmerzen. Traditionelle Anwendungsgebiete laut HMPC sind Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen (HMPC 2009). Empfohlen wird auch hier eine Dosierung von 240 mg Gesamt-salicin pro Tag. Auch die WHO erstellte 2009 eine Monographie zur Weidenrinde. Darin ist die Darreichungsform als Teedroge, trockener alkoholischer oder wässriger Extrakt, Fluidextrakt oder Tinktur angegeben. Eine Dosierung von 120-240 mg Gesamt-salicin pro Tag sollte in zwei Dosen verabreicht werden.

Aufgeführte klinisch belegte Indikationsgebiete sind laut WHO Fieber, Schmerzen sowie symptomatische Behandlung von leichten rheumatischen Beschwerden (WHO 2009).

1.2.4 Verträglichkeit, Kontraindikationen und Nebenwirkungen

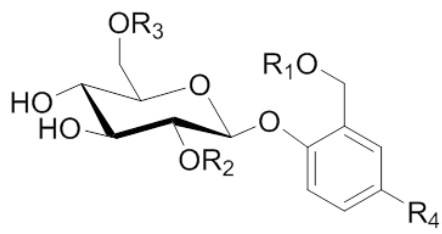
Aufgrund der wirksamen Bestandteile der Weidenrinde könnten prinzipiell sehr ähnliche Nebenwirkungen wie nach Gabe von Acetylsalicylsäure auftreten, da beide u. a. Salicylsäure als Metaboliten bilden. Dies kann aber aufgrund der geringen Dosis an Salicin und der Metabolisierung nach Resorption von Salicylalkohol im Gegensatz zur Acetylsalicylsäure nicht erwartet werden (Bracher et al. 2015). Auch in den zur Weidenrinde durchgeführten klinischen Studien konnten nur wenige unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie allergische Hautreaktionen oder gastrointestinale Störungen beobachtet werden (Chrubasik et al. 2000; Schmid et al. 2000, 2001b; Chrubasik et al. 2001b; Biegert et al. 2004; Uehleke et al. 2013). Weidenrinde gilt deshalb allgemein als sehr gut verträglich. Zudem konnte in Ratten keine Schädigung oder Läsionen der Magenschleimhaut durch Salicin beobachtet werden (Akao et al. 2002). Auch hemmte Weidenrindenextrakt bei einer täglichen Einnahme von 240 mg Gesamt-salicin die Thrombozytenaggregation nicht (Krivoy et al. 2001). Kontraindiziert ist Weidenrinde und deren Extrakte bei bekannter Hypersensitivität gegenüber anderen Salicylaten oder anderen NSAIDs (non steroidal anti-inflammatory drugs) sowie bei Asthma, im dritten Trimenon von Schwangerschaften und einem Glucose-6-phosphat Dehydrogenase Mangel (HMPC 2009). Des Weiteren sollte Weidenrinde bei bestehenden Leber- oder Nierenfunktionsstörungen, Blutgerinnungsstörungen sowie bei Magen- und Darm-Ulcera nur unter ärztlicher Aufsicht eingenommen werden. Die Anwendung bei Kindern wird aufgrund der möglichen Ausbildung eines Reye Syndroms nicht empfohlen (HMPC 2009; WHO 2009).

1.2.5 Inhaltsstoffe von *Salicis cortex*

Da es ca. 500 *Salix* Arten gibt und sich das Inhaltsstoffspektrum von Art zu Art unterscheiden kann, wird im Folgenden nur auf die pharmazeutisch vorrangig verwendeten Arten *S. daphnoides*, *S. fragilis* und *S. purpurea* eingegangen. Die Hauptinhaltsstoffe können in drei Klassen eingeteilt werden. Weidenrinde enthält ein breites Spektrum an Phenolglykosiden, welche am besten untersucht sind, darüber hinaus Flavonoide und Chalkone sowie die Klasse der Gerbstoffe. Im Folgenden soll auf die einzelnen Klassen genauer eingegangen werden.

1.2.5.1 Phenolglucoside

In Weidenrinde sind zahlreiche Salicylalkoholderivate enthalten. Sie basieren meist auf der Grundstruktur des Salicins (**Abb. 2**). Durch Veresterung mit Benzoyl-, Acetyl-, Salicyl- und Cumaroyl-gruppen oder mit der 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonyl-Untereinheit (HCC-Untereinheit) am Zucker oder an der phenolischen Teilstruktur entstehen Verbindungen wie z.B. das Hauptsalicylalkoholderivat Salicortin (**Abb. 2**). Daneben wurden Tremulacin, Tremuloidin, Fragilin, Populin, Populosid B, Salicylsalicin, Salicyltremuloidin, Salireposid, 2'-Acetylsalicortin und Trichocarposid aus den pharmazeutisch verwendeten Weiden isoliert (**Abb. 2**; Pearl und Darling 1971; Palo 1984; Kammerer et al. 2005; Poblocka-Olech et al. 2007; Boeckler et al. 2011; Freischmidt 2011). Das Salicin sowie das nach Deglucosidierung entstehende Saligenin ist nur in geringerem Ausmaß in der Droge enthalten (Meier und Meier-Liebi 2007; Kammerer et al. 2005). Neben den Salicylalkoholderivaten sind in Weidenrinde zusätzlich phenolische Verbindungen zu finden, welche nicht den Grundkörper Salicin besitzen. Darunter sind die glucosidisch gebundenen C₆-C₃-Körper Salidosid, Triandrin und Vimalin und die 1,2-Cyclohexandiolderivate Grandidentatin und sein Diastereomeres Purpurein sowie Isograndidentatin A und 6'-O-4-Hydroxybenzoylgrandidentatin (Pearl und Darling 1962, 1970; Palo 1984; Kammerer et al. 2005; Poblocka-Olech et al. 2007; Freischmidt 2011). Zusätzlich konnte schon früh gezeigt werden, dass es sich bei manchen Salicylalkoholderivaten um labile Substanzen handelt. Julkunen-Tiitto und Sorsa (2001) beobachteten eine starke Veränderung im Phenolglucosid-Spektrum nach Gefrier- oder Hitzetrocknung im Vergleich zur Frischpflanze. Auch kann die Extraktionsdauer das Phenolglykosid-Spektrum beeinflussen (Lindroth und Pajutee 1987). Besonders Verbindungen mit HCC Untereinheit, wie Salicortin und Tremulacin, zählen zu diesen labilen Substanzen. Unter Einfluss von Enzymen oder durch basischen pH-Wert kann beispielsweise aus Salicortin unter Abspaltung der HCC-Untereinheit Salicin entstehen. Aus der HCC-Untereinheit kann wiederum durch Decarboxylierung und Oxidation Catechol gebildet werden (Mattes et al. 1987; Julkunen-Tiitto und Meier 1992; Haruta et al. 2001; Ruuhola et al. 2003). Von Knuth et al. (2011) konnte zusätzlich eine Entstehung von Catechol aus Salicortin unter *in vitro* Bedingungen (37 °C, Zellkulturmedium) beobachtet werden. Hierbei wurde das Salicortin ohne Einfluss von Enzymen oder basischem pH-Wert sukzessive abgebaut. Für eine genauere Übersicht der daran beteiligten Prozesse dient **Abb. 5, S.20** und die dazugehörige Beschreibung ist unter **2.1.2.2, S.19** zu finden.







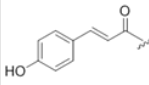








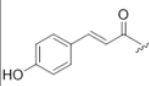
Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Fragilin	H	H		H
2'-O-Acetylsalicortin			H	H
Populin	H	H		H
Populosid B		H	H	H
Salicin	H	H	H	H
Salicortin		H	H	H
Salicoylsalicin		H	H	H
Salicoyltremuloidin			H	H
Salireposid		H	H	OH
Tremulacin			H	H
Tremuloidin	H		H	H
Trichocarposid		H	H	H

Abb. 2 Salicylalkoholderivate in pharmazeutisch genutzten *Salix* Arten (*S. daphnoides*, *S. purpurea* und *S. fragilis*).

1.2.5.2 Flavonoide

Die in *Salix* Arten hauptsächlich vorkommenden Flavonoidunterklassen sind die Flavanone und Chalkone. Daneben kommen Flavone, Flavonole und Flavanonole vor (Meier und Meier-Liebi 2007). Zu den Flavanonen zählt das in Weidenrinde dominierende Naringenin, welches im Pflanzenmaterial glucosidisch gebunden vorliegt. Je nach Extraktionsbedingungen können im Weidenrindenextrakt auch Flavonoid-aglyka vorkommen. Die identifizierten Naringenininderivate in den pharmazeutisch verwendeten *Salix* Arten sind Naringenin-7-O- β -D-glucosid, (2R/2S)-Naringenin-5-O- β -D-glucosid sowie cumaroylierte Derivate zu denen das 6''-O-*trans-p*-Cumaroyl-(2R/2S)-naringenin-5-O- β -D-glucosid zu zählen ist (Freischmidt 2011). Der Gehalt der Naringenininderivate wurde in *S. purpureae* cortex zu 7,5% bestimmt (Krauze-Baranowska et al. 2013). In Weidenrinde konnten zusätzlich das im B-Ring dihydroxylierte Flavanon Eriodictyol und

dessen 7-O- β -D-Glucosid nachgewiesen werden (Jarrett und Williams 1967; Freischmidt 2011). Zudem konnte aus *S. purpurea* das Flavon Apigenin-7-O-glucosid und die Flavanonole Taxifolin, Dihydrokämpferol sowie dessen Derivat Dihydrokämpferol-7-O- β -D-glucosid isoliert werden (Jarrett und Williams 1967; Freischmidt 2011). Die in Weidenrinde präsenten Chalkone sind Isosalipurposid und dessen cumaroyliertes Derivat 6''-O-*trans*-p-Cumaroyl-isosalipurposid (Freischmidt 2011; Jarrett und Williams 1967). In der Rinde von *S. daphnoides* betrug deren Gehalt 2,4% (Krauze-Baranowska et al. 2013). Einen Überblick über die wichtigsten Flavanon- und Chalkonderivate in Weidenrinde liefert **Abb. 6, S.22**. Zusätzlich konnte aus *S. daphnoides* das Anthocyan Cyanidin-3-O-glucosid isoliert werden (Bridle et al. 1970).

1.2.5.3 Mono-, oligo- und polymere Flavan-3-ole

Zu den polyphenolischen Inhaltsstoffen der Weidenrinde gehören auch die Catechingerbstoffe. Deren Gehalt wurde in der Rinde zu 3-20% bestimmt (Meier und Meier-Liebi 2007). Es handelt sich hauptsächlich um oligomere oder polymere Verbindungen aus den Flavan-3-olen (+)-Catechin und (-)-Epicatechin (Kolodziej 1990; Jürgenliemk et al. 2007; Esatbeyoglu et al. 2010). Daneben entstehen nach oxidativer Spaltung auch Delphinidin und Pelargonidin als Untereinheiten von polymeren Proanthocyanidinen (Wiesneth et al. 2015). Als Besonderheit der Proanthocyanidine der Weidenrinde kann die von den Phenolglucosiden bekannte HCC-Untereinheit auch an Catechin verestert vorliegen. Aus *S. purpurea*, *S. acutifolia* und *S. sieboldiana* konnte das monomere HCC-Catechin isoliert werden sowie aus *S. sieboldiana* dimere und trimere Procyanidine mit HCC-Untereinheit (Hsu et al. 1985; Zapesochneya et al. 2002; Jürgenliemk et al. 2007).

1.3 Pharmakokinetische Untersuchungen

Es existieren nur wenige Arbeiten zur Pharmakokinetik der Inhaltsstoffe von Weidenrinde nach oraler Einnahme. Bekannt ist, dass aus den Salicylalkoholderivaten Tremulacin, Salicortin und 2'-Acetylsalicortin bei der Extrakterstellung das Salicin entstehen kann, welches nach oraler Einnahme durch β -Glucosidasen im Darm zu Saligenin gespalten und durch Oxidation zur Salicylsäure umgewandelt werden kann (Shara und Stohs 2015). Salicylsäure kann dann analog zu Acetylsalicylsäure metabolisiert werden, wobei Gentisinsäure und Salicylursäure identifiziert wurden (Fötsch et al. 1989; Gopalan et al. 1992). Schmid et al. (2001a) untersuchten die Pharmakokinetik des Salicins und seiner Hauptmetaboliten. Hierfür wurde ein Weidenrindenextrakt (entsprechend 240 mg Salicin) in Tablettenform zu zwei Zeitpunkten (0 und 3 h) von zehn Freiwilligen eingenommen und die Konzentrationen der Salicylsäure, Gentisinsäure und Salicylursäure in Urin und Serum über 24 h bestimmt. Hauptmetabolit bei dieser Studie war im

Serum Salicylsäure, und die Eliminierung erfolgte hauptsächlich renal als Salicylursäure. Die maximale Serumkonzentration der Salicylsäure wurde nach weniger als 2 h (orale Einnahme) erreicht und lag bei 1,2 mg/l. Die ermittelte AUC (Area under the serum concentration curve) der Salicylsäure war einer Einnahme von nur 87 mg Acetylsalicylsäure äquivalent. Schmid et al. (2001a) schlossen aufgrund der geringen äquivalenten Acetylsalicylsäure Menge (therapeutische Dosis 500 mg) darauf, dass die in klinischen Studien nachgewiesene analgetische und anti-rheumatische Wirksamkeit der Weidenrinde nicht allein durch Salicylsäure zu begründen sei. Zusätzlich postulierten Schmid et al. (2001a) aufgrund der maximalen Serumkonzentrationen der Metaboliten bereits 1-3 h nach Einnahme, dass die Resorption im Dünndarm erfolgt. In einer weiteren kinetischen Studie wurde ebenfalls ein Weidenrindenextrakt (äquivalent zu 240 mg Salicin/Tag) an 10 Probanden verabreicht. Die maximale Serumkonzentration der Salicylsäure lag nach 2,7 h bei 25 µM und damit leicht über den von Schmid et al. (2001a) ermittelten Werten (Knuth et al. 2013). Zusätzlich zeigten die Arbeiten von Knuth und Mitarbeitern (2013) eine weitere Substanzklasse auf, die zur anti-inflammatorischen Wirkung der Weidenrinde beitragen kann. Nach Applikation eines Weidenrindenextrakts konnten relevante Mengen Catechol (13 µM, 1,2 h nach Applikation, nach enzymatischer Hydrolyse mit β -Glucuronidase und Sulfatase) im Serum gesunder Probanden detektiert werden. Da der applizierte Weidenrindenextrakt Salicortin und Tremulacin (Träger der HCC-Untereinheit) aber auch Catechol enthielt, wurde eine Genese des Serumcatechols sowohl aus der HCC-Untereinheit als auch aus dem genuin im Extrakt enthaltenen Catechol postuliert (Knuth et al. 2013). Außerdem konnte nach Applikation von Salicortin an Ratten Catechol-sulfat als Metabolit der HCC-Untereinheit detektiert werden (Knuth et al. 2013). Eine Übersicht zur Metabolisierung von Salicylalkoholderivaten liefert **Abb. 3**.

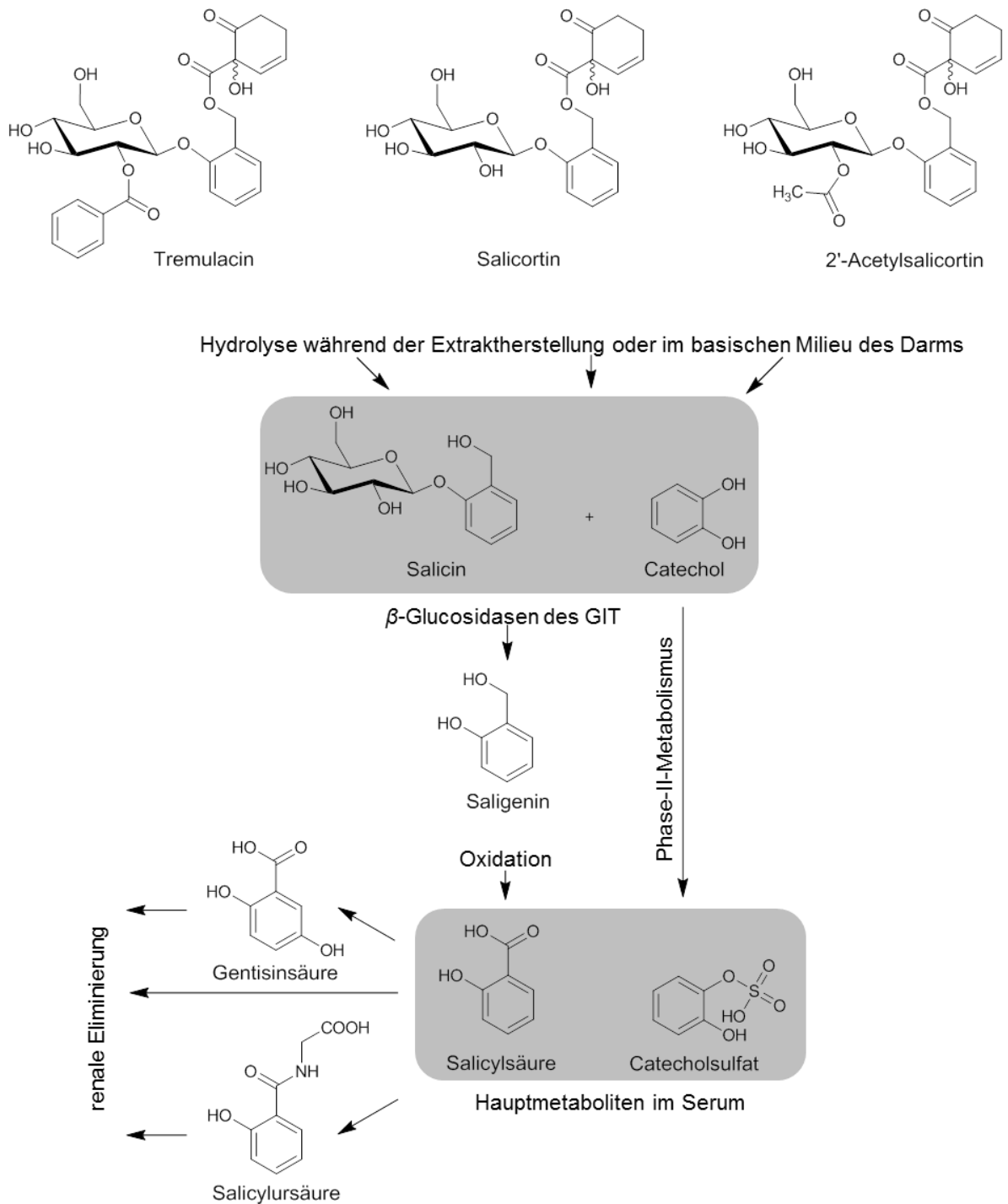


Abb. 3 Hauptsalicylalkoholderivate der Weidenrinde und ihre postulierte Metabolisierung im Menschen; Salicortin, Tremulacin und 2'-Acetylsalicortin können bei Extraktion, im basischen Milieu oder unter *in vitro* Bedingungen zu Salicin und Catechol abgebaut werden; nach Abspaltung der Glucose durch β -Glucosidasen des GIT (Gastrointestinaltrakt) und Oxidation des Salicins sowie Phase-II-Metabolisierung des Catechols sind Salicylsäure und das Catechol-sulfat die Hauptmetaboliten im humanen Serum; die Eliminierung der Salicylsäure und ihrer beiden Metaboliten Salicylursäure und Gentisinsäure erfolgt renal (Schmid et al. 2001a; Knuth et al. 2013).

1.4 *In vivo* Untersuchungen zur pharmakologischen Wirkung von Weidenrinde

1.4.1 Präklinische Untersuchungen

Das anti-inflammatorische, analgetische, antioxidative und antipyretische Potential der Weidenrinde wurde in verschiedenen Rattenmodellen untersucht. El-Shemy et al. (2007) testeten einen methanolischen *S. tetrasperma* Extrakt hinsichtlich seiner anti-entzündlichen Aktivität und ermittelten die Hemmung des Carrageen induzierten Rattenpfotenödems, welches ein Modell der akuten Entzündung darstellt. Nach oraler Verabreichung von 120 mg/kg Körpergewicht des Extrakts an fünf Ratten konnte eine 52%ige Hemmung des Ödems beobachtet werden. Dies lag im Bereich der Positivkontrolle Diclofenac (4 mg/kg Körpergewicht), welche zu einer 54%igen Hemmung führte (fünf Ratten). Khayyal et al. (2003) untersuchten ebenfalls den Effekt eines Weidenrindenextrakts (150 mg/kg) und dessen Fraktionen im Vergleich zu Acetylsalicylsäure (150 mg/kg) auf das Carrageen induzierte Rattenpfotenödem. Der Extrakt konnte das Ödem im selben Ausmaß wie Acetylsalicylsäure hemmen. Die Untersuchung der einzelnen Extraktfraktionen zeigte, dass nicht nur die salicinhaltige Fraktion sondern ebenso die polyphenolischen Fraktionen aktiv waren und somit auch zur anti-inflammatorischen Wirkung des Extraktes beitragen. In den Studien von Khayyal et al. (2005) wurde der Effekt des Weidenrindenextraktes in zwei Entzündungsmodellen untersucht, um den anti-inflammatorischen Wirkmechanismus genauer zu beschreiben. Der Effekt eines Weidenrindenextrakts auf verschiedene Entzündungsparameter wurde im 6-Tage Airpouch Modell als Beispiel der akuten Entzündung und im Adjuvant Induzierten Arthritis Modell als Modell der chronischen Entzündung gegen die Kontrollen Acetylsalicylsäure und Celecoxib untersucht. Der Extrakt zeigte eine mit Acetylsalicylsäure vergleichbare Reduktion des entzündlichen Exsudates, der Leukozyteninfiltration, der Entstehung der Prostaglandine und der Entstehung von Zytokinen (Khayyal et al. 2005). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Weidenrindenextrakt die GSH Werte (Glutathion) stärker steigerte als Acetylsalicylsäure und Celecoxib und damit einer Lipidperoxidation entgegenwirken könnte. Weidenrindenextrakt könnte somit oxidativem Stress besser entgegenwirken als Acetylsalicylsäure und Celecoxib. Auch in diesen Untersuchungen zeigte sich aufgrund der in Weidenrinde enthaltenen geringen Menge an Salicin (hier ca. 24%), dass die Wirkung nicht durch Salicin allein erklärbar ist. Die analgetische Wirkung von Weidenrindenextrakten wurde durch den Writhing Test in Mäusen und dem Randall-Selitto Test in Ratten untersucht. El-Shemy et al. (2007) nutzten den Writhing Test um den

methanolischen *S. tetrasperma* Extrakt (120 mg/kg Körpergewicht) hinsichtlich seines analgetischen Potentials zu untersuchen. Die durch intraperitoneale Applikation von Essigsäure induzierten Muskelkontraktionen konnten durch den Extrakt um 55% im Vergleich zur Kontrolle reduziert werden. Daraus schlossen die Autoren auf eine Schmerzhemmung und somit auf ein analgetisches Potential des untersuchten Weidenrindenextrakts (El-Shemy et al. 2007). Auch die Untersuchungen mittels Randall-Selitto Test, welcher auf der Testung der Druckempfindlichkeit auf ein Bierhefe induziertes Rattenpfotenödem basiert, zeigten nach oraler Gabe von 150 mg Weidenrindenextrakt pro kg Körpergewicht eine äquipotente Schmerzhemmung wie nach Gabe von Acetylsalicylsäure (150 mg/kg Körpergewicht; Khayyal et al. 2003). Zusätzlich unterstreichen diese Ergebnisse von Khayyal et al. (2003), dass der analgetische Effekt der Weidenrinde nicht nur durch Salicin verursacht werden kann, da es im untersuchten Extrakt nur ca. 25% ausmachte. Der Beitrag anderer Inhaltsstoffgruppen zur analgetischen Wirkung, besonders der Polyphenole (unter besonderer Berücksichtigung der Proanthocyanidine), wurde von Nahrstedt et al. (2007) diskutiert. Auch die Untersuchungen zum antipyretischen Effekt der Weidenrinde an Ratten mittels Bierhefe induzierter Hyperthermie und dem Airpouch Modell zeigen, dass die Wirkung nicht allein durch Salicin erklärt werden kann (Khayyal et al. 2003).

Zusammenfassend zeigen Weidenrindenextrakte in den *in vivo* Rattenmodellen anti-inflammatorisches, antipyretisches, analgetisches und antioxidatives Potential. Die eingesetzten Extrakte sind zudem in den hier beschriebenen *in vivo* Versuchen im selben Ausmaß aktiv wie die synthetischen Wirkstoffe Acetylsalicylsäure, Diclofenac oder Celecoxib. Jedoch kann die Wirksamkeit des Weidenrindenextrakts aufgrund seines niedrigen Gesamt-salicylalkoholgehalts nicht nur auf Salicin und der daraus *in vivo* entstehenden Salicylsäure zurückgeführt werden. Es müssen vielmehr andere Inhaltsstoffklassen, wie Flavonoide oder Gerbstoffe zur Wirkung beitragen.

1.4.2 Wirksamkeitsstudien

Um die Wirksamkeit von Weidenrindenpräparaten bei Schmerzen im unteren Rücken, Arthrose und rheumatischer Arthritis zu untersuchen, wurden eine Reihe klinischer Studien durchgeführt (Übersicht bei Vlachoianis et al. 2009).

Allen voran untersuchte die Arbeitsgruppe um S. Chrubasik in drei klinischen Studien die Wirksamkeit der Weidenrinde bei Rückenschmerzen. In einer randomisierten, doppelblinden Studie wurden 210 Patienten mit chronischen Rückenschmerzen in drei Gruppen unterteilt. Dabei nahm

eine Gruppe ein niedrig dosiertes Weidenrindenpräparat (entsprechend 120 mg Salicin/Tag), eine Gruppe ein hoch dosiertes Weidenrindenpräparat (entsprechend 240 mg Salicin/Tag) und eine weitere Gruppe ein Placebopräparat oral über vier Wochen ein. Als Notfallmedikation wurde Tramadol eingesetzt. Primärer Endpunkt der Studie war eine Schmerzfreiheit ohne Tramadol Medikation für mindestens fünf Tage in der letzten Studienwoche. Die Einstufung der Rückenschmerzen erfolgte mittels Arhus Index, welcher verschiedenste Parameter wie Schmerz, Invalidität und Funktionseinschränkungen bei Rückenschmerzen berücksichtigt. Von den 191 Patienten, welche die Studie regulär beendeten, waren 39% der hoch dosierten Gruppe, 21% der niedrig dosierten Gruppe und 6% der Placebogruppe schmerzfrei (Chrubasik et al. 2000). Dies ließ die Autoren auf eine gute Wirksamkeit und gute Verträglichkeit bei chronischen Rückenschmerzen schließen (Chrubasik et al. 2000). In einer weiteren offenen, nicht randomisierten Studie untersuchten Chrubasik und Mitarbeiter (2001a) 451 Patienten welche entweder ein Weidenrindenpräparat äquivalent zu 120 oder 240 mg Gesamt-salicin oder die konventionelle Therapie (NSAIDs, non steroidal anti-inflammatory drugs) bei Rückenschmerzen über vier Wochen erhielten. Die Rückenschmerzen wurden über den Arhus Index und über den globalen Schmerzscore bewertet. Am Ende der Studie konnte ein dosisabhängiger Effekt des Weidenrindenpräparats beobachtet werden, jedoch war die Therapie mit Weidenrinde der konventionellen Therapie gleichwertig und nicht überlegen einzustufen (Chrubasik et al. 2001a; Vlachojannis et al. 2009). Chrubasik und Mitarbeiter (2001b) untersuchten in einer zusätzlichen Studie die Wirksamkeit eines Weidenrindenpräparats (entsprechend 240 mg Salicin/Tag) bei Rückenschmerzen gegenüber dem synthetischen NSAID und COX-2 (Cyclooxygenase-2) Hemmer Rofecoxib. Am Ende der Studie konnte keine signifikante Überlegenheit des Weidenrindenpräparats gegenüber dem NSAID gezeigt werden.

In einer Studie zur Wirksamkeit eines Weidenrindenextrakts (entsprechend 240 mg Salicin/Tag) gegenüber eines Placebos bei Arthrose waren die beurteilten Parameter die Schmerzdimension im WOMAC Osteoarthritis Index (the western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index), die Steifigkeit der Gelenke und deren physiologische Funktion. Es zeigte sich in dieser randomisierten, doppelblinden Studie an 78 Arthrosepatienten eine Reduzierung um 14% vom Basallevel des WOMAC Index für den Weidenrindenextrakt. In der Placebogruppe wurde hingegen eine Erhöhung um 2% des WOMAC Index festgestellt (Schmid et al. 2000, 2001b). Die Autoren folgerten daher einen moderaten analgetischen Effekt von Weidenrinde in der Arthrosetherapie (Schmid et al. 2000, 2001b). Jedoch wurde in einer Studie zur Wirksamkeit bei Arthrose und rheumatoider Arthritis von Biegert et al. (2004) keine Überlegenheit des eingesetzten Weidenrindenextrakts

(entsprechend 240 mg Salicin/Tag) gegenüber dem Placebo festgestellt. Auch in dieser doppelblinden, randomisierten Studie mit einem Patientenkollektiv von 127 (mit Arthrose) und 27 (mit rheumatoider Arthritis) wählten die Autoren eine Verbesserung des WOMAC Schmerzindex als primären Endpunkt (Biegert et al. 2004). Beer und Wegener (2008) untersuchten die Wirksamkeit von Weidenrindenextrakt gegenüber der konventionellen Therapie bei 131 Patienten mit Knie- oder Hüftgelenkarthrose. Nach einer Studiendauer von sechs Wochen und einer Beurteilung durch den WOMAC Schmerzindex konnte von den Autoren ein vergleichbarer Effekt des Phytopharmakons gegenüber der herkömmlichen Therapie bei leichter bis mittelgradiger Arthrose gefolgert werden (Beer und Wegener 2008). Trotz der beiden positiven Studien ist die Wirksamkeit des Weidenrindenextrakts in der Therapie der Arthrose und rheumatoider Arthritis aufgrund der nicht einheitlichen Studienlage bislang nicht vollständig belegt (Chrubasik et al. 2007).

In einer aktuellen Studie wurde ein größeres Patientenkollektiv (insgesamt 436), erkrankt an Arthrose und/oder Rückenschmerzen, über einen Zeitraum von sechs Monaten mit einem Weidenrindenpräparat (Proaktiv®) behandelt. Zudem war eine Comedikation mit NSAIDs oder Opioiden erlaubt (Uehleke et al. 2013). Die zur Bewertung der Studie verwendete Schmerzintensitätsskala konnte im Vergleich zum Anfangswert um 33-44% gesenkt werden. Deshalb schlugen Uehleke et al. (2013) eine Basistherapie mit Proaktiv® in der Langzeitbehandlung von Erkrankungen des Bewegungsapparats vor. Zudem kann wenn nötig eine Kombination des Phytopharmakons mit NSAIDs oder Opiaten erfolgen.

Abschließend bleibt zu bemerken, dass die Wirksamkeit von Weidenrindenpräparaten in der Rückenschmerztherapie durch klinische Studien gut belegt ist, was eine Verwendung von Weidenrindenextrakten aufgrund ihrer analgetischen und anti-inflammatorischen Aktivität rechtfertigt (Shara und Stohs 2015). Jedoch sind die Studienergebnisse zur Behandlung von Arthrose und rheumatoider Arthritis nicht ganz einheitlich. Nicht zuletzt aufgrund der Anwendungsempfehlung der ESCOP zur Behandlung von Arthrose und rheumatoider Arthritis sollte deshalb hierzu eine weitere größer angelegte klinische Untersuchung erfolgen.

1.5 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Weidenrinde

Wie zahlreiche Studien belegen, sind für die Wirkung der Weidenrinde nicht nur die enthaltenen Salicylalkoholderivate verantwortlich (Nahrstedt et al. 2007). Eine Reihe an *in vitro* Testungen wurde deshalb durchgeführt, um die Wirkung der Weidenrinde zu erklären. Im Gegensatz zur Acetylsalicylsäure, welche die COX acetyliert und damit irreversibel hemmt, konnte für seinen Metaboliten (bzw. Metaboliten der Salicylalkoholderivate) Salicylsäure aus Weidenrinde kein hemmender Effekt auf die isolierte COX beobachtet werden. Jedoch wurde für Salicylsäure bzw. sein korrespondierendes Natriumsalz eine Hemmung der COX-2 vermittelten Prostaglandin Biosynthese in intakten Zellen beobachtet (Amann und Peskar 2002). Fiebich und Chrubasik (2004) postulierten eine COX-2 vermittelte PGE₂ (Prostaglandin E₂) Hemmung durch andere in Weidenrinde enthaltene Verbindungen, da die Einzelsubstanzen Salicin und Natriumsalicylat keine Aktivität zeigten. Zusätzlich konnten sie eine Hemmung der Freisetzung von TNF α (Tumor Necrosis Factor α), IL-1 β (Interleukin) und IL-6 in LPS-aktivierten (Lipopolysaccharid), humanen Monozyten zeigen. Salicin und Natriumsalicylat waren auch in diesem Experiment inaktiv (Fiebich und Chrubasik 2004). Außerdem wurden weitere, nicht mit den Cyclooxygenasen in Verbindung stehende Effekte des Natriumsalicylats beschrieben. So konnte ein Einfluss auf die MAPK (mitogen activated protein-kinase) Kaskade beobachtet werden. Zusätzlich konnten hemmende Eigenschaften des Natriumsalicylats auf Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (Nuklear Factor kappa B) und AP-1 (Activator protein 1) gezeigt werden (Amann und Peskar 2002). Untersuchungen zum genauen Mechanismus zeigten eine Hemmung der ATP-bindenden Region von IKK β durch Natriumsalicylat (Yin et al. 1998). Für eine genauere Übersicht der NF- κ B abhängigen Entzündungsprozesse dient **4.1.1, S.110**. Eine weitere Erklärung des Wirkmechanismus von Salicylsäure bzw. Salicylat wird in den Arbeiten von Fürst et al. (2006) diskutiert, welche ein NF- κ B unabhängiges Target des Salicylats, die HO-1 (heme oxygenase-1) beschreiben. In einem Endothelzellsystem, welches mit IL-4 (Interleukin-4) stimuliert wurde, konnte eine Hemmung der P-Selektin Expression durch Natriumsalicylat erreicht werden. Dies war wiederum auf eine HO-1 Induktion durch Natriumsalicylat zurückzuführen, was ein weiterer Ansatz zur Erklärung des Wirkmechanismus sein könnte. Jedoch ist die pharmakologische *in vivo* Relevanz der Ergebnisse von Fürst et al. (2006) aufgrund der getesteten sehr hohen Natriumsalicylat-konzentration (10 mM) fraglich. Jäggi et al. (2003) führten eine Reihe an *in vitro* Untersuchungen mit einem wässrigen Weidenrindenextrakt durch. Zusätzlich wurde der Extrakt in Fraktionen unterschiedlicher Lipophilie unterteilt und diese ebenso getestet. Hierbei konnte an den bei der Entzündung beteiligten Enzymsystemen COX-1, COX-2, LOX-5 (5-Lipoxygenase) und HLE (human leucocyte elastase)

eine Hemmung durch polyphenolhaltige Fraktionen, nicht jedoch durch die Salicylalkoholderivate enthaltende Fraktion beobachtet werden (in: Nahrstedt et al. 2007). Genauere Untersuchungen an humanen LPS stimulierten Monozyten ergaben eine Hemmung der mRNA- und Proteinexpression von TNF α und COX-2 (Bonaterra et al. 2010). Zudem konnte in aktivierten, proinflammatorischen Monozyten eine Hemmung der NO-Synthese durch den Weidenrindenextrakt und eine proanthocyanidinhaltige Fraktion gezeigt werden (Bonaterra et al. 2010). Für die polyphenolischen, inklusive der flavonoidhaltigen, Fraktionen konnten auch Radikalfängereigenschaften nachgewiesen werden (Germann 2005). Da die Aktivierung von NF- κ B und TNF α auch durch freie Radikale vermittelt werden kann, könnten diese Inhaltsstoffe so zur Entzündungshemmung beitragen (Nahrstedt et al. 2007). Auch Ishikado et al. (2013) konnten eine Induktion durch eine salicinarme Fraktion der Weidenrinde von antioxidativen Enzymen und gleichzeitig einen Schutz vor oxidativem Stress durch Aktivierung von Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) nachweisen. Freischmidt et al. (2012) zeigten eine TNF α induzierte Hemmung der ICAM-1 Expression durch einen Weidenrindenextrakt sowie durch die Inhaltsstoffe Catechol und Eriodictyol an Endothelzellen. Knuth et al. (2011) und Knuth (2013) führten die Reduktion der TNF α induzierte ICAM-1 Expressionshemmung durch die Salicylalkoholderivate und Träger der HCC-Untereinheit Salicortin und Tremulacin auf eine *in vitro* Instabilität und gleichzeitige Entstehung von Catechol zurück. Yang et al. (2013) beobachtete eine signifikante Hemmung der NO-Produktion in LPS-stimulierten Microgliazellen durch verschiedene Salicylalkoholderivate mit HCC-Untereinheit. Catechol hemmt nicht nur die ICAM-1 Expression, sondern konnte auch die LPS-induzierte NF- κ B Aktivierung, NO- und TNF α -Produktion in BV-2 Microgliazellen reduzieren (Zheng et al. 2008). Als Resümee lässt sich festhalten, dass aus Weidenrinde hergestellte Extrakte sowie Fraktionen oder einzelne Inhaltsstoffe in verschiedenen *in vitro* Testsystemen auf ihr anti-inflammatorisches, analgetisches oder antioxidatives Potential getestet wurden. Die Ergebnisse aus *in vitro* Untersuchungen weisen stark auf einen gemeinsamen Beitrag von Catechol, Flavonoiden und Gerbstoffen zur Wirkung hin.

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die anti-inflammatorische Wirkung der Weidenrinde wird am besten über das Zusammenspiel vieler Inhaltsstoffe und Inhaltsstoffgruppen erklärt. Neben dem aus den Salicylalkoholderivaten entstehenden Salicin, welches *in vivo* zur Salicylsäure metabolisiert wird, tragen Flavonoide und auch Gerbstoffe zur Wirkung bei (Nahrstedt et al. 2007). Die Bedeutung des aus der 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonyl-Untereinheit (HCC-Untereinheit) einiger Salicylalkoholderivate entstehenden, *in vitro* anti-inflammatorisch aktiven Catechols, wurde in jüngeren Arbeiten diskutiert und als zusätzliches Wirkprinzip beschrieben (Knuth et al. 2011). Die sulfatierte und glucuronidierte Derivate des Catechols stellen *in vivo* Metaboliten dar. Jedoch wurde im Gegensatz zur Salicylsäure kein freies Catechol im Serum humaner Probanden detektiert (Knuth et al. 2013). Die Diskrepanz zwischen den häufig pharmakologisch inaktiven Phase-II-Metaboliten von Polyphenolen *in vitro* und der, insbesondere anti-inflammatorischen Aktivität von Extrakten, Fraktionen oder phenolischen Substanzen *in vivo*, wird seit jüngerer Zeit durch die Dekonjugierung der Phase-II-Metabolite zu den korrespondierenden Aglyka erklärt. Gerade im entzündeten Gewebe scheint eine β -Glucuronidase aktiv zu sein, welche für diesen Effekt verantwortlich gemacht wird (Ishisaka et al. 2013).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Untersuchung des Dekonjugierungsverhaltens polyphenolischer Glucuronide durch humane β -Glucuronidase in einem *in vitro* System erfolgen. Dafür sollte ein Testsystem entwickelt werden, um im Rahmen einer möglichst breiten Untersuchung verschiedene Polyphenol- und insbesondere Flavonoid-glucuronide hinsichtlich ihrer Umsetzung durch humane β -Glucuronidase zu analysieren. Dies ist nicht nur für die (poly)phenolischen Inhaltsstoffe der Weidenrinde von Relevanz, sondern für viele weitere flavonoidhaltige Drogen. Da die Flavonoide aus Weidenrinde hinsichtlich ihrer *in vivo* Metabolisierung im Gegensatz zu den Salicylalkoholderivaten noch nicht untersucht wurden, sollten diese aus Serumproben einer pharmakokinetischen Studie identifiziert und ein Metabolitenprofil erstellt werden. Ferner sollten die ermittelten Hauptmetabolite *in vitro* hinsichtlich ihres anti-inflammatorischen Potentials getestet werden. Ein weiteres Ziel war die Entwicklung und Validierung einer Gehaltsbestimmungsmethode, welche eine Quantifizierung der HCC-Untereinheit als Catechol in Weidenrinde zulässt. Zudem sollte eine Quantifizierungsmethode für die enthaltenen Flavanon-glucoside etabliert werden, welche eine simultane Bestimmung der mengenmäßig dominierenden Naringenin-glucoside, der Chalkon-glucoside sowie der Eriodictyol-glucoside, ermöglicht.

2 QUANTIFIZIERUNG VON PHENOLISCHEN INHALTSSTOFFEN AUS WEIDENRINDE

2.1 Grundlage

Die Wirkung der Weidenrinde wird über eine Multikomponenten- / Multitarget- Theorie erklärt (Nahrstedt et al. 2007). So sind für den pharmakologischen und klinischen Effekt des Weidenrindenextrakts nicht nur die Salicylalkoholderivate verantwortlich. Polyphenole wie Flavonoide und Gerbstoffe tragen ebenfalls zur Wirkung bei (Vlachojannis et al. 2009). Zusätzlich konnte in einer aktuellen Studie gezeigt werden, dass das aus Salicortin entstehende Catechol anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt und somit für die Wirkung des Weidenrindenextrakts mitverantwortlich sein könnte (Knuth et al. 2011). Bisherige quantitative Untersuchungen zu *Salix spec.* fokussierten jedoch hauptsächlich auf die Gruppe der Salicylalkoholderivate. Diese werden nach basischer Hydrolyse mit Natriumhydroxid (Ph. Eur. 2015) oder Kaliumhydroxid (Poblocka-Olech et al. 2007) der Quantifizierung als Salicin mittels HPLC Analytik zugänglich gemacht. Die simultane Quantifizierung einzelner Salicylalkoholderivate (u.a. Salicin, Salicortin und Tremulacin) in Weidenrindenextrakt kann mittels HPLC und Gaschromatographie durchgeführt werden (Meier et al. 1988).

2.1.1 Quantifizierung von Flavonoiden

Nur wenige Arbeiten beschäftigten sich bisher mit der Quantifizierung von Flavonoiden aus Weidenrinde. Verschiedene Flavanon-, Flavon- und Flavonolglycoside wurden jeweils einzeln mittels HPLC Analytik unter Verwendung der entsprechenden Standardsubstanzen quantifiziert (Nyman und Julkunen-Tiitto 2000; Julkunen-Tiitto und Sorsa 2001; Tegelberg und Julkunen-Tiitto 2001; Kammerer et al. 2005; Zhao et al. 2014). Eine Gesamtbestimmung, wie sie im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur. 2015) für die Salicylalkoholderivate Anwendung findet, wurde für die in *S. purpurea* mengenmäßig dominierenden Flavanone (vorwiegend Naringenin-derivate) etabliert. Neben unveresterten Naringeninglucosiden wurden mit dieser Methode auch cumaroylierte Naringenin- und korrespondierende Chalkonglucoside, welche für *S. purpurea* beschrieben sind, einer Gehaltsbestimmung zugänglich (Freischmidt 2011). Eriodictyol, ein weiteres in Weidenrinde hauptsächlich als Eriodictyol-7-O- β -glucosid präsent Flavanon, besitzt *in vitro* eine starke anti-

inflammatorische Aktivität (Freischmidt et al. 2012). Eriodictyol und dessen Derivate wurden bisher aus *S. alba* und *S. purpurea* isoliert (Jarrett und Williams 1967; Du et al. 2009).

Um die Gruppe der in Weidenrinde vorkommenden und pharmakologisch wichtigen Flavanonglucoside und Chalkonglucoside zu quantifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine simultane Bestimmung von Naringenin- und Eriodictyolderivaten entwickelt und validiert. Die Arbeit basiert auf der von Freischmidt (2011) beschriebenen Methode, welche durch die vorliegenden Ergebnisse um die Bestimmung des Eriodictyolgehalts ergänzt wurde.

2.1.2 Quantifizierung von Catechol

2.1.2.1 Vorkommen der HCC-Untereinheit

In *Salix spec.* findet man die HCC-Untereinheit vorwiegend an Salicylalkoholderivate gebunden, des Weiteren an Catechin und an Catechingerbstoffen (vgl. **Abb. 2, S.6**). Viele *Populus* Arten (Salicaceae) besitzen ebenfalls ein breites, den *Salix* Arten ähnliches Spektrum an Substanzen mit dieser Untereinheit. Aus *Populus fremontii* und *P. deltoides* wurde ein für *Salix spec.* unbekanntes HCC-Salicortin isoliert (**Abb. 4**), welches zwei HCC-Untereinheiten besitzt (Boeckler et al. 2011). Andere Gattungen und Arten aus der Familie der Salicaceen, wie *Hamalium ceylanicum* und *Dovyalis hebecarpa* seien hier exemplarisch als Vertreter mit weiteren Salicylalkoholderivaten mit HCC-Untereinheit wie Homalosid B und ein Hydroxyanalogs des Tremulacins (4-Hydroxytremulacin) genannt (**Abb. 4**; Ekabo et al. 1993; Rasmussen et al. 2006).

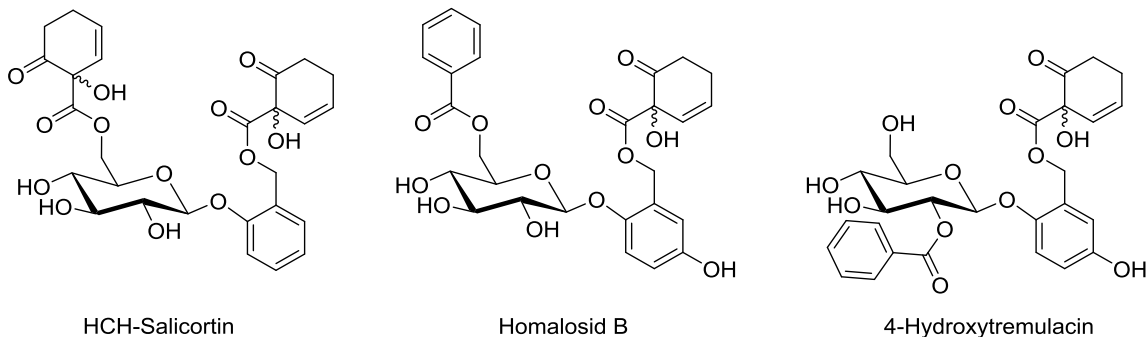


Abb. 4 Salicylalkoholderivate aus anderen Gattungen der Salicaceae; HCC-Salicortin aus *Populus fremontii*, Homalosid B aus *Hamalium ceylanicum* und ein Hydroxyanalogs des Tremulacins aus *Dovyalis hebecarpa*.

2.1.2.2 Abbaumechanismus der HCC-Untereinheit zu Catechol

Catechol, ein Bestandteil vieler Weidenrindenextrakte, wird als Abbauprodukt u.a. von Salicortin beschrieben. Es entsteht aus der HCC-Untereinheit des Salicortins via Decarboxylierung und anschließender Oxidation mit Luftsauerstoff (Pearl und Darling 1971; Clausen et al. 1989; Julkunen-Tiitto und Meier 1992; Haruta et al. 2001; Lindroth und Pajutee 1987). Ruuhola und Mitarbeiter (2003) zeigten im Gegensatz zu Mattes et al. (1987), dass der Abbau nicht nur enzymatisch durch Esterasen sondern auch nicht enzymatisch durch basischen pH bedingt sein kann. Eine detaillierte Übersicht der am Abbau von Salicortin beteiligten Prozesse findet sich in **Abb. 5**. Das aus Salicortin entstehende Salicin kann durch β -Glucosidase Aktivität unter Spaltung des Vollacetals zu Glucose und Saligenin abgebaut werden. Das freigesetzte 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carboxylat decarboxyliert zu 2-Hydroxy-3-cyclohexenon (2-HCH), welches mit Luftsauerstoff zu Catechol oxidiert wird. Unter Beteiligung weiterer Oxidationsprozesse oder auch enzymatisch durch Polyphenol Peroxidasen entsteht o-Chinon. Ausgehend von 2-HCH ist durch Enolisierung eine Umlagerung zu 6-Hydroxy-2-cyclohexenon (6-HCH) möglich (Ruuhola et al. 2003).

2.1.2.3 Etablierte Catechol-gehaltsbestimmungen

Quantitative Arbeiten bezüglich des genuinen im Weidenrindenextrakt enthaltenen Catechols und einzelner Salicylalkoholderivate wie Salicortin und Tremulacin wurden von Freischmidt (2011) und Knuth (2013) unter Verwendung externer Standards und HPLC-DAD Analytik durchgeführt. Hierbei wurden die Einzelkomponenten nebeneinander bestimmt. Eine quantitative Erfassung der Freisetzung des Catechols aus Salicylalkoholderivaten wurde von Ruuhola et al. (2003) etabliert, wobei Salicortin als Einzelsubstanz und in Extrakten aus *S. myrsinifolia*, *S. repens* und *S. pentandra* in einem Kaliumphosphatpuffer (pH=9) hydrolysiert und mittels HPLC-DAD analysiert wurde. Ruuhola et al. (2003) bestimmten ebenfalls den Catecholgehalt in intakten und homogenisierten Blättern der genannten Stammpflanzen. In Anwesenheit pflanzlicher Enzyme wie Esterasen und β -Glucosidasen (nach Homogenisation) fand eine Umsetzung zu Catechol statt. Die von Ruuhola et al. (2003) beschriebene Methode wurde jedoch weder validiert noch wurde auf eine quantitative Abspaltung und Oxidation der HCC-Untereinheit geachtet. Eine validierte Catechol-gehaltsbestimmungsmethode mit Hilfe von HPTLC und HPLC wurde hingegen von Poblocka-Olech et al. (2010) etabliert. Es erfolgte dabei der Vergleich des Catecholgehalts von vier *Salix* Arten (*S. purpurea*, *S. daphnoides*, *S. acutifolia* und *S. alba*) vor und nach Hydrolyse mit Kaliumhydroxid. Jedoch blieb eine quantitative Umsetzung zu Catechol außer Acht.

Auf dieser Grundlage wurde in der vorliegenden Arbeit ein enzymatischer Assay für die Quantifizierung des genuin enthaltenen Catechols und der HCC-Untereinheit als Catechol in Weidenrindenextrakt entwickelt und validiert.

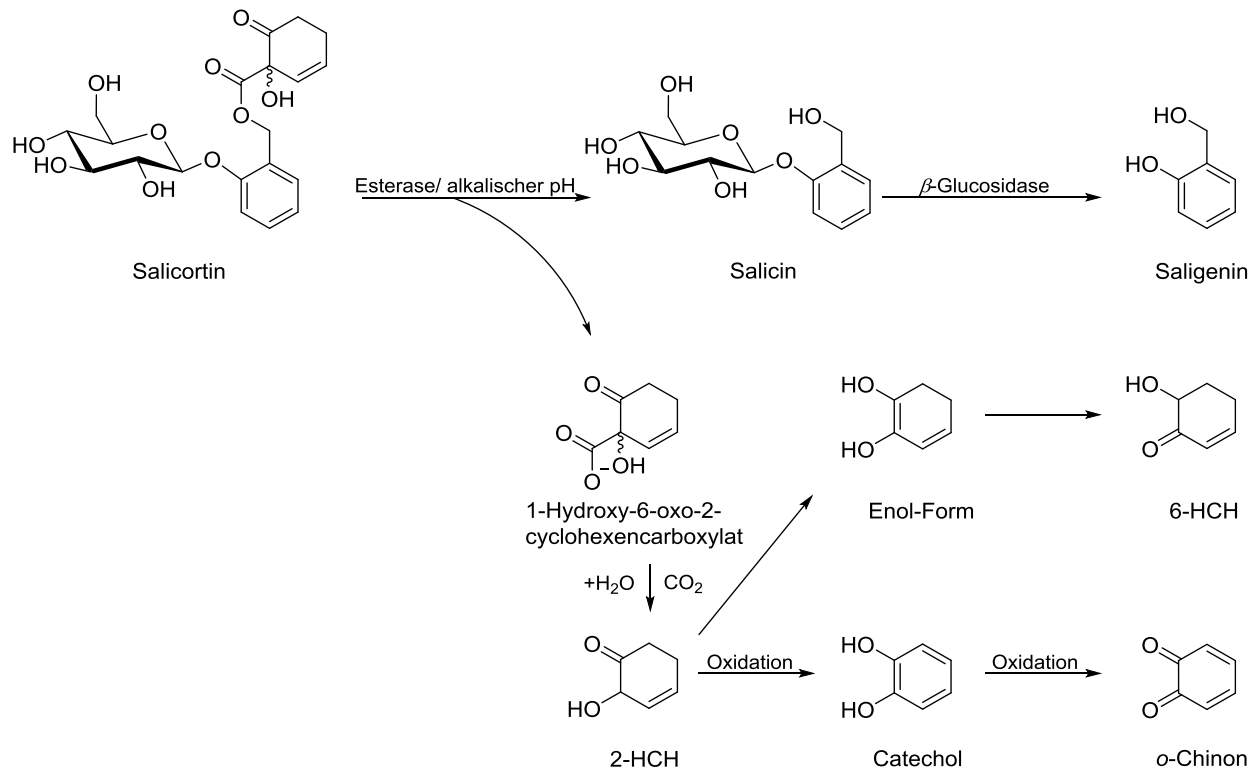


Abb. 5 Hydrolyseschema für Salicortin nach Ruuhola et al. (2003); durch alkalischen pH oder Esterasen wird Salicin und das 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexencarboxylat freigesetzt; Salicin kann unter Einfluss von Glucosidase zu Saligenin abgebaut werden; das Anion wird unter CO₂ Abspaltung zum 2-HCH; dieses kann durch oxidative Prozesse zu Catechol und weiter zu o-Chinon reagieren; eine weitere Reaktion des 2-HCH ist die durch Enolisierung bedingte Bildung von 6-HCH.

2.2 Ergebnisse und Diskussion

2.2.1 Simultane Quantifizierung von Naringenin- und Eriodictyol-glucosiden

2.2.1.1 Reaktionsprinzip

Freischmidt (2011) zeigte, dass Flavanon-5-O- β -glucoside und deren cumaroylierte Derivate sich durch saure Hydrolyse leicht in ihre Aglyka spalten lassen, wohingegen Flavanon-7-O- β -glucoside unter diesen Bedingungen nur sehr schwer gespalten werden können. Unter Einfluss von β -Glucosidase war die Spaltung des 7-O- β -Glucosids möglich, jedoch entzogen sich 5-O- β -Glucoside und acylierte Flavanon-glucoside dieser Umsetzung. Da die Flavanon-glucoside diese unterschiedlichen Hydrolyseverhalten zeigen, wurde von Freischmidt (2011) eine kombinierte Hydrolyse mit TFA (Trifluoressigsäure) und nachfolgendem β -Glucosidase Verdau entwickelt. Hierbei werden sowohl Naringenin-7-O- und -5-O- β -glucoside als auch cumaroylierte Derivate und Chalkon-glucoside quantitativ erfasst und zu Naringenin umgesetzt. Um die Gehaltsbestimmung der Flavanonderivate zu komplettieren, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit Eriodictyol-7-O- β -glucosid mit dieser Methode zu Eriodictyol umgesetzt und in die Quantifizierung einbezogen (**Abb. 6**). Die Bestimmung des Gesamt-flavanongehalts erfolgte per HPLC unter Zusatz von Hesperetin als internen Standard und Kalibrierung für Naringenin und Eriodictyol.

2.2.1.2 Anwendbarkeit der Methode zur simultanen Bestimmung von Naringenin und Eriodictyol

Zur Übersicht der zu erfassenden Flavanon- und Chalkon-glucoside wurde ein Weidenrindenextrakt (STW-Extrakt der Firma Steigerwald) per HPLC aufgetrennt und die verschiedenen Peaks mittels Retentionszeiten und UV Spektren den Referenzsubstanzen zugeordnet (**Abb. 7**; Freischmidt 2011). Neben den mengenmäßig dominierenden Naringeninderivaten liegen die Chalkone Isosalipurposid und dessen cumaroyliertes Derivat sowie Eriodictyol und sein Glucosid, als Minorkomponenten vor. Zur Überprüfung ob Eriodictyol-7-O- β -glucosid mit dieser Hydrolysemethode zum Aglykon gespalten wird, wurde es als Einzelsubstanz dem Versuch unterzogen. Naringenin-7-O- und -5-O- β -glucosid dienten als Vergleichssubstanzen und wurden ebenfalls hydrolysiert. Eine quantitative Umsetzung zu den Aglyka Naringenin und Eriodictyol konnte beobachtet werden (**Abb. 8**). Somit war die entwickelte Methode nach

Freischmidt (2011) für die simultane Bestimmung geeignet. Der bisher gewählte RP18-HPLC Gradient war aufgrund einer Überlagerung des Eriodictyolpeaks mit dem einer anderen, unbekannten Substanz zur Quantifizierung aber ungeeignet. Aus diesem Grund wurde für die Bestimmung an Stelle einer isokratischen Elution eine Gradientenelution über 25 min mit anschließendem Spül- und Rekalibrierungsschritt gewählt, welche eine separierte Auftrennung von Naringenin, Eriodictyol und des internen Standards lieferte (**Abb. 9**). Somit war eine quantitative Auswertung beider Analyten gegen den internen Standard Hesperetin möglich.

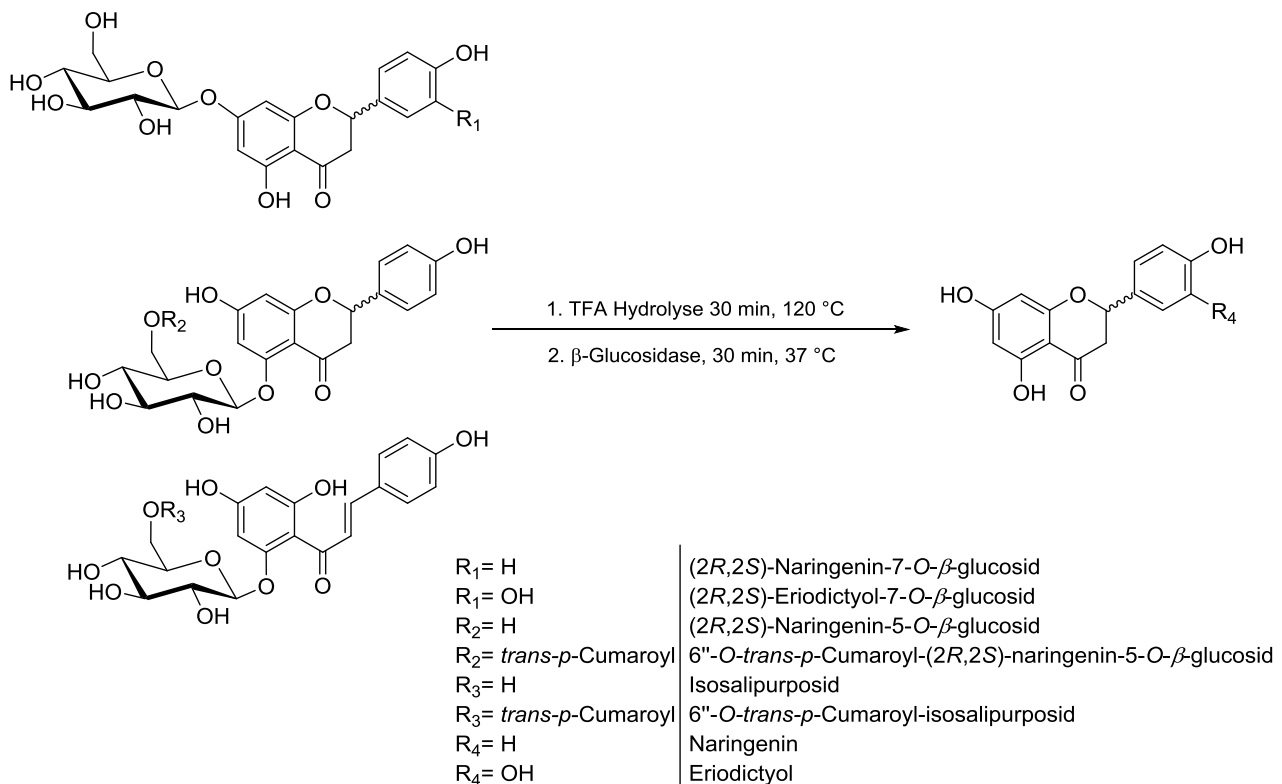


Abb. 6 Übersicht der bei der simultanen Gehaltsbestimmung von Naringenin und Eriodictyol erfassten Flavanon- und Chalkonglucoside; die teils cumaroylierten Naringenin-, Eriodictyol- und Chalkonglucoside werden nach Hydrolyse mit TFA und nachfolgender Inkubation mit β -Glucosidase zu den Aglyka Naringenin und Eriodictyol.

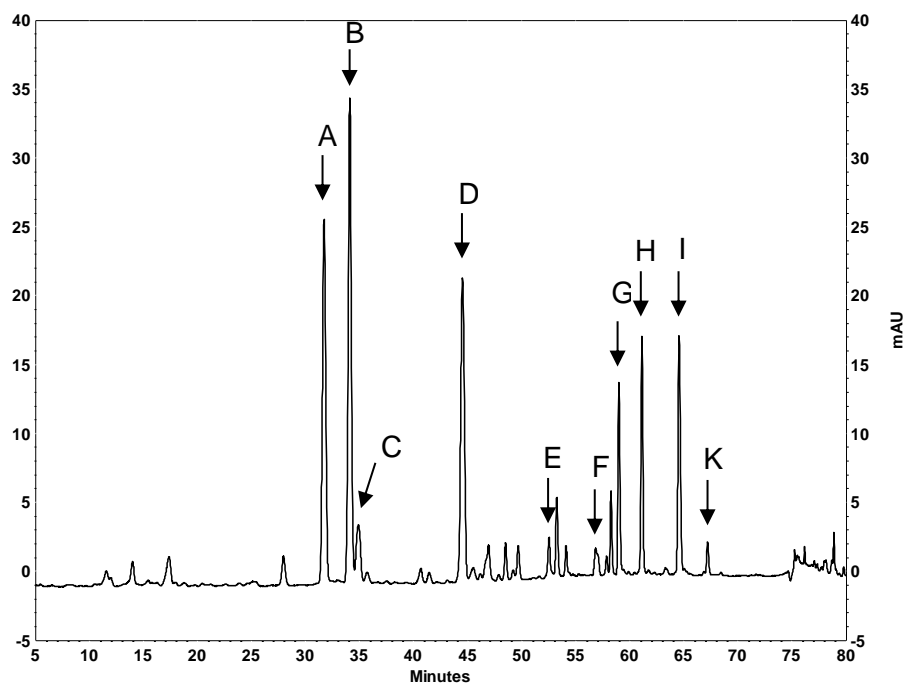


Abb. 7 HPLC-Chromatogrammausschnitt des unhydrolysierten STW Extrakts (5 mg/ml); **A** und **B**: (2*R*/2*S*)-Naringenin-5-*O*- β -glucosid, **C**: Eriodictyol-7-*O*- β -glucosid, **D**: Naringenin-7-*O*- β -glucosid, **E**: Isosalipurposid, **F**: Eriodictyol, **G** und **H**: 6''-*O*-*trans-p*-Cumaroyl-(2*R*/2*S*)-naringenin-5-*O*- β -glucosid, **I**: Naringenin, **K**: 6''-*O*-*trans-p*-Cumaroyl-isosalipurposid; Gradient NE1 (289 nm).

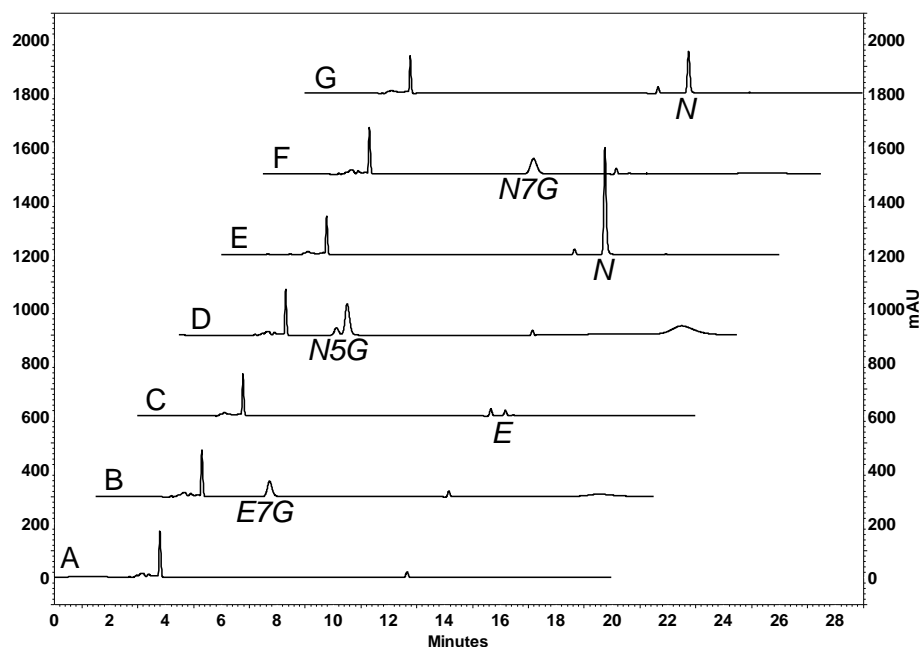


Abb. 8 Hydrolyse der Einzelsubstanzen zum korrespondierenden Aglykon; **A**: Lösungsmittelkontrolle, **B**: E7G (0,2 mg/ml) vor Hydrolyse, **C**: E7G nach Hydrolyse, **D**: N5G (0,6 mg/ml) vor Hydrolyse, **E**: N5G nach Hydrolyse, **F**: N7G (0,3 mg/ml) vor Hydrolyse, **G**: N7G nach Hydrolyse; Gradient NE3 (289 nm); E7G: Eriodictyol-7-*O*- β -glucosid, N5G: Naringenin-5-*O*- β -glucosid, N7G: Naringenin-7-*O*- β -glucosid, E: Eriodictyol, N: Naringenin.

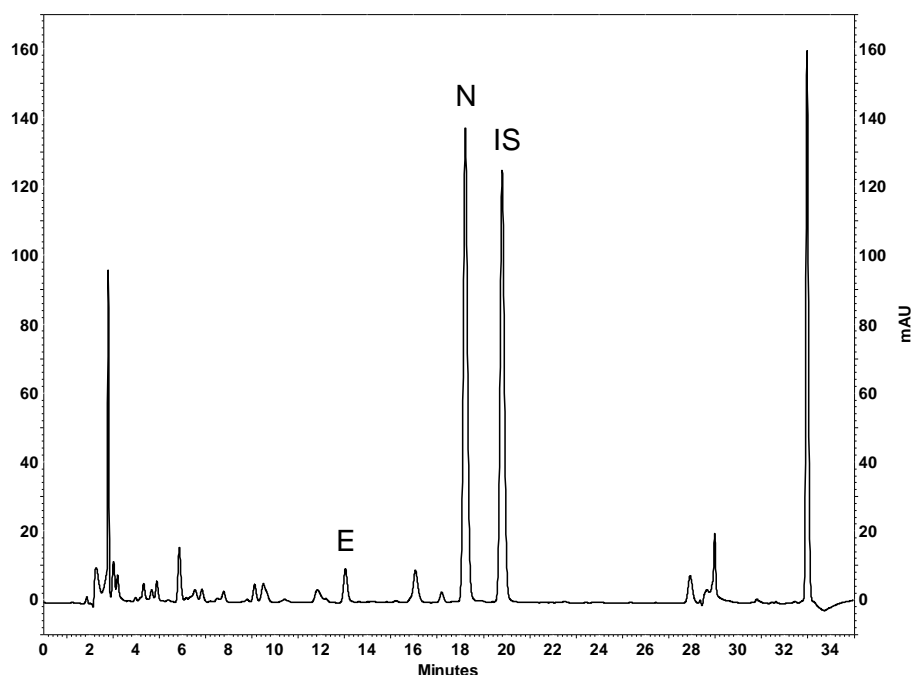


Abb. 9 HPLC Chromatogramm des hydrolysierten STW-Extrakts ($c_{\text{end}}=207 \mu\text{g/ml}$); $15,70 \mu\text{g/ml}$ Interner Standard (IS), $16,40 \mu\text{g/ml}$ Naringenin (N) und $1,11 \mu\text{g/ml}$ Eriodictyol (E); Gradient NE2 (289 nm).

2.2.1.3 Validierungsparameter

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bestimmung der Validierungsparameter für Naringenin komplettiert und für Eriodictyol vollständig durchgeführt.

Linearität

9-Punkt-Kalibriergeraden im Bereich von $0,2\text{--}10 \mu\text{g/ml}$ ($0,6\text{--}35 \mu\text{M}$) für Eriodictyol und von $0,5\text{--}70 \mu\text{g/ml}$ ($1,8\text{--}257 \mu\text{M}$) für Naringenin wurden angefertigt ($n=6$), der interne Standard wurde dreifach als Referenz vermessen und jeder Kalibrierlösung zugesetzt. Die Kalibriergeraden ergaben sich aus der Auftragung der Analyten Konzentration gegen die Fläche ($A_{\text{Analyt-korrigiert}}$; **Formel 1, S.43**). In **Tab. 1** sind die Kalibrierfunktionen und je das Bestimmtheitsmaß r^2 angegeben. Als Linearitätskriterien wurden das Bestimmtheitsmaß ($r^2 > 0,9980$), der y-Achsenabschnitt ($b < 0\text{--}5\%$ der Zielkonzentration) und die Reststandardabweichung ($\sigma < 1,5\text{--}2\%$ der Zielkonzentration; **Formel 5, S.46**) betrachtet (Kromidas 1999). Für Eriodictyol lag die Reststandardabweichung außerhalb des akzeptablen Bereichs (bei $4,12\%$). Deshalb wurde hier zusätzlich der Responsefaktor betrachtet (**Formel 2, S.45**). Nach Auftragung gegen die Konzentration ergab sich ein abgesicherter linearer Arbeitsbereich von $0,32\text{--}8,10 \mu\text{g/ml}$ ($1,1\text{--}28 \mu\text{M}$).

Detektions-und Quantifizierungslimit

Die Bestimmung der Detektions- und Quantifizierungslimits (**Formel 3** und **Formel 4, S.45**) erfolgte durch Berechnung aus der Reststandardabweichung (σ , **Formel 5, S.46**) und der Steigung der Kalibriergeraden (S) analog den Vorgaben der ICH Guidelines für Methodenvvalidierung (ICH 2005). Detektions- und Quantifizierungslimits für die beiden Analyten finden sich in **Tab. 1**.

Tab. 1 Detektions-und Quantifizierungslimit, Peakreinheit ($n=6$) und Linaritätsparameter der simultanen Quantifizierung von Naringenin und Eriodictyol.

Parameter	Eriodictyol	Naringenin
Kalibrierfunktion ($y=S \cdot x-b$)	$y=393436x-17072$	$y=403989x-268$
Bestimmtheitsmaß r^2	0,9997	1,0000
Detektionslimit (μM)	0,45	0,77
Quantifizierungslimit (μM)	1,35	2,34
Totale Peakreinheit (%)	67,76	95,01

Spezifität

Die totale Peakreinheit wurde mit Hilfe der HPLC Software berechnet. Ein Algorithmus verglich hierbei die UV-Spektren an jedem Punkt des Peaks des Analyten im Chromatogramm miteinander. Die Peakreinheit für Eriodictyol und Naringenin ist in **Tab. 1** gelistet ($n=6$). Die niedrige Reinheit des Eriodictyolpeaks war dessen geringer Konzentration geschuldet, da der Dioden Array Detektor mit sinkender Analytenkonzentration an Genauigkeit verliert.

Präzision (Wiederhol- und Laborpräzision sowie Reproduzierbarkeit)

Der Vergleich von Analysen eines Tages bzw. mehrerer Tage ergab Variationskoeffizienten (V_k) $< 5\%$ (Kromidas 1999). Auffallend ist auch, dass die bestimmten V_k Werte in einem engen Bereich lagen (**Tab. 2**). Somit wurden beide Analytenkonzentrationen im selben Maße an einem und an mehreren Tagen präzise bestimmt. Aufgrund des hohen apparativen Aufwands der Methode wurde der Gesamt-flavanongehalt des STW-Extrakts von drei unterschiedlichen Personen bestimmt. V_k lag bei 4,86% und somit im akzeptablen Bereich ($n=6$). Die Methode kann somit als reproduzierbar betrachtet werden.

Tab. 2 Eriodictyol- und Naringenin-gesamtgehalt, Wiederhol- und Laborpräzision der simultanen Gehaltsbestimmung (n=6); V_k : Variationskoeffizient.

Analyt	Eriodictyol (%)	Naringenin (%)
Gesamtgehalt (MW \pm StabW)	0,54 \pm 0,01	8,12 \pm 0,52
Wiederholpräzision (V_k)	2,16	2,08
Laborpräzision (V_k)	1,96	1,88

Wiederfindung

Die Wiederfindung der wichtigsten im STW-Extrakt vorkommenden Flavanonglucoside (Naringenin-7-O- und -5-O- β -glucosid sowie Eriodictyol-7-O- β -glucosid) wurde bestimmt. Hierfür wurden die im Extrakt vorliegenden Konzentrationen der Glucoside abgeschätzt. 20 und 40% (für Eriodictyol-7-O- β -glucosid und Naringenin-5-O- β -glucosid) sowie 40 und 80% (für Naringenin-7-O- β -glucosid) dieser geschätzten Konzentrationen wurden als Referenzsubstanz der Aufarbeitung unterzogen. Das Verhältnis ermittelter Naringenin- bzw. Eriodictyolkonzentration zu der über die Molare Masse errechneten Konzentration an Naringenin bzw. Eriodictyol ergab die Wiederfindung (**Tab. 3**). Es wurden Wiederfindungsraten von 89,4-99,2% erzielt. In einem zweiten Experiment wurde die Wiederfindung in der Matrix (Additionsmethode) ermittelt. Hierfür wurde der Eriodictyol- bzw. Naringeningehalt des STW-Extrakts bestimmt, welcher als Grundwert diente. Im selben Versuch (gleiche Einwaage) wurden die Referenzsubstanzen, 20 und 40% (für Eriodictyol-7-O- β -glucosid und Naringenin-5-O- β -glucosid) sowie 40 und 80% (für Naringenin-7-O- β -glucosid) der genuinen Menge zum STW-Extrakt pipettiert. Aus dem Naringenin- bzw. Eriodictyolgehalt des Grundwerts und den zugesetzten errechneten Referenzkonzentrationen ergab sich der theoretische Gehalt. Das Verhältnis aus gemessenem zu theoretischem Gehalt wurde als Wiederfindung definiert. Die Wiederfindungsraten lagen im Bereich zwischen 92,6-101,9% (**Tab. 3**). Sie sollten sich für Wirkstoffgehalte < 10% in einem Bereich zwischen 97-103% befinden (Kromidas 1999). Eine mögliche Ursache für die niedrigeren Werte von Naringenin-7-O- β -glucosid (80%) und Naringenin-5-O- β -glucosid (20%) könnten eventuelle Schwankungen des Basalwerts sein, welche schon bei der Methodenentwicklung von Freischmidt (2011) beobachtet wurden und sich auch während der vorliegenden Arbeiten zeigten. Beurteilt man die Wiederfindungsraten unter Einbeziehung von V_k der Methode für Naringenin, so sind Werte für die Wiederfindung ab 91,7% ($100\% - 4 \cdot V_k$) noch ausreichend (Kromidas 1999).

Tab. 3 Wiederfindungsraten der Referenzen und der Additionsmethode für Eriodictyol- und Naringenin-glucoside (MW \pm StabW, n=6, in Duplikaten); E7G: Eriodictyol-7-O- β -glucosid, N5G: Naringenin-5-O- β -glucosid, N7G: Naringenin-7-O- β -glucosid.

	E7G 20%	E7G 40%	N5G 20%	N5G 40%	N7G 40%	N7G 80%
Referenz	91,2 \pm 9,1	89,4 \pm 11,5	97,1 \pm 2,7	99,2 \pm 3,5	94,0 \pm 6,0	94,8 \pm 8,9
Additionsmethode	101,9 \pm 6,0	99,6 \pm 7,4	92,6 \pm 6,9	97,1 \pm 6,2	99,6 \pm 5,6	93,5 \pm 7,8

Stabilität

Die mittlere Naringeninkonzentration von sechs Proben betrug $17,54 \pm 0,36$ μ g/ml, und nach Lagerung von acht Stunden lag diese bei $17,31 \pm 0,34$ μ g/ml. Für Eriodictyol lagen die Werte vor und nach Lagerung für acht Stunden bei $0,93 \pm 0,05$ μ g/ml. Durch statistische Auswertung mittels t-Test ($p < 0,05$) konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Die Analytkonzentrationen in den Proben waren somit mindestens acht Stunden stabil.

2.2.2 Quantifizierung der HCC-Untereinheit als Catechol

2.2.2.1 Reaktionsprinzip

Die Abspaltung der HCC-Untereinheit kann entweder im Basischen bei pH=9 oder enzymatisch durch Esterasen erfolgen (Ruuhola et al. 2003). Gemäß der Reaktionsgleichung sollten z.B. aus Salicortin äquimolare Mengen Catechol und Salicin entstehen (**Abb. 10**). Dies war die Grundannahme auf welcher die Versuche basierten. In Vorversuchen konnte jedoch keine quantitative Spaltung in basischen Puffern erzielt werden und das Verhältnis des entstandenen Catechols zu Salicin war hier ca. 1:2. Dies ließ vermuten, dass das entstandene Catechol unter den Versuchsbedingungen nicht stabil war und zu o-Chinon oxidiert wurde (Ruuhola et al. 2003). Eine zweite Möglichkeit bestand darin, dass der oxidative Prozess welcher zur Entstehung des Catechols nötig ist, noch nicht vollständig war. Deshalb wurde eine schonende, enzymatische Methode entwickelt, welche eine möglichst vollständige Umsetzung zu Catechol ermöglicht. Ein Weidenrindenextrakt (STW-Extrakt) wurde unter Zugabe von Schweineleberesterase in einem Kaliumphosphatpuffer (pH=8) im Wasserbad (37 °C) inkubiert. Außerdem wurde Ascorbinsäure als wasserlösliches Antioxidans zugesetzt, um die Stabilität des Catechols zu erhöhen. Da das Enzym im Überschuss eingesetzt wurde, ist aufgrund einer unspezifischen β -Glucosidase Aktivität des Enzyms ein weiterer Abbau des Salicins zum Saligenin denkbar (**Abb. 10**).

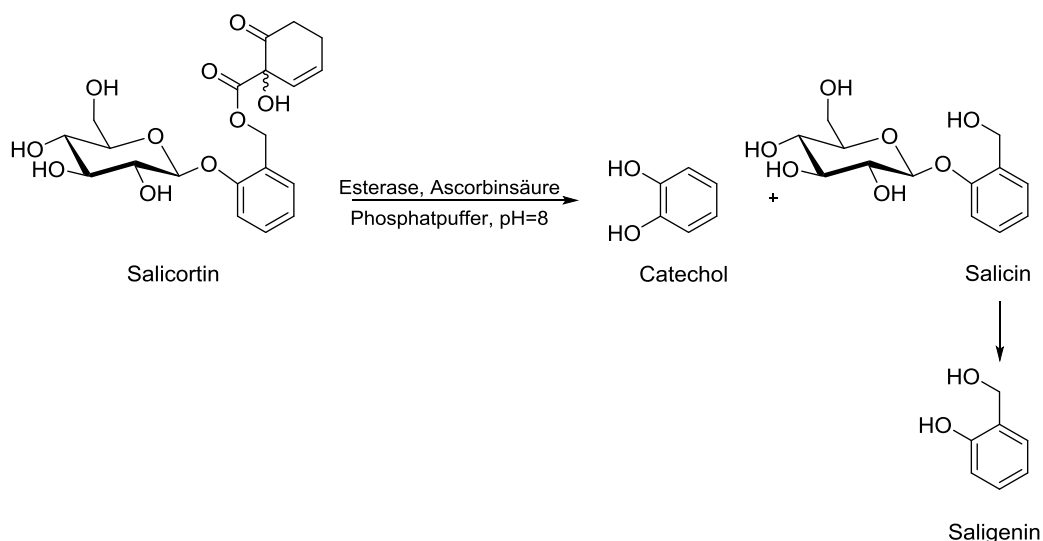


Abb. 10 Reaktionsschema der Gesamt-catecholgehaltsbestimmung; Salicortin wird unter Einfluss von Esterase zu Catechol und Salicin abgebaut; aufgrund der Enzymspezifität ist eine Spaltung von Salicin zu Saligenin möglich.

2.2.2.2 Methodenentwicklung

Interner Standard

Für die Quantifizierung von Catechol musste ein dem Catechol strukturell ähnlicher und gleichzeitig unter den Versuchsbedingungen inerten interner Standard verwendet werden. Methylcatechol besitzt diese Eigenschaften, und es weist ein dem Catechol ähnliches UV-Spektrum auf ($\lambda_{\text{max}}=281 \text{ nm}$). An jedem Versuchstag wurde Methylcatechol in Methanol zu $50 \mu\text{M}$ gelöst. $50 \mu\text{l}$ dieser internen Standard Lösung wurden jeder Analyse kurz vor der HPLC Analyse zugesetzt.

HPLC Methodenentwicklung

Als Standardsubstanz wurde Salicortin verwendet, welches das Hauptsalicylalkoholderivat des STW-Extrakts darstellt. Als mögliche Abbauprodukte wurden Catechol, Salicin und Saligenin betrachtet. Alle vier Analyten und der interne Standard wurden in Methanol zu je $100 \mu\text{M}$ verdünnt. Um diese Analyten mittels RP-18-HPLC-DAD aufzutrennen, wurde ein für die HPLC Analytik von Salicylalkoholderivaten übliches Fließmittel verwendet. Es bestand aus einer wässrigen Lösung von 1,8% THF und 0,5% Phosphorsäure und als stärkeres Eluens an RP-18 Material Methanol (Meier et al. 1988). Der entwickelte Gradient (CG) ermöglichte eine Auftrennung aller

Standardsubstanzen innerhalb von 48 min (**Abb. 11**). Er wurde sowohl zur quantitativen Bestimmung als auch zur Überprüfung der vollständigen Hydrolyse von Salicortin verwendet. Eine Vermessung des STW-Extrakts mit der entwickelten Methode ergab, dass die fünf Substanzen ebenfalls basisliniengetrennt in der Matrix analysiert werden konnten (**Abb. 11**). Eine Überlagerung mit anderen Substanzen der Matrix konnte durch Vergleich der UV-Spektren ausgeschlossen werden. Die vier Analyten wurden jeweils in ihrem UV-Maximum integriert und ausgewertet. Aufgrund des geringen Chromophors hätte eine einheitliche Auswertungswellenlänge zu falschen Ergebnissen geführt.

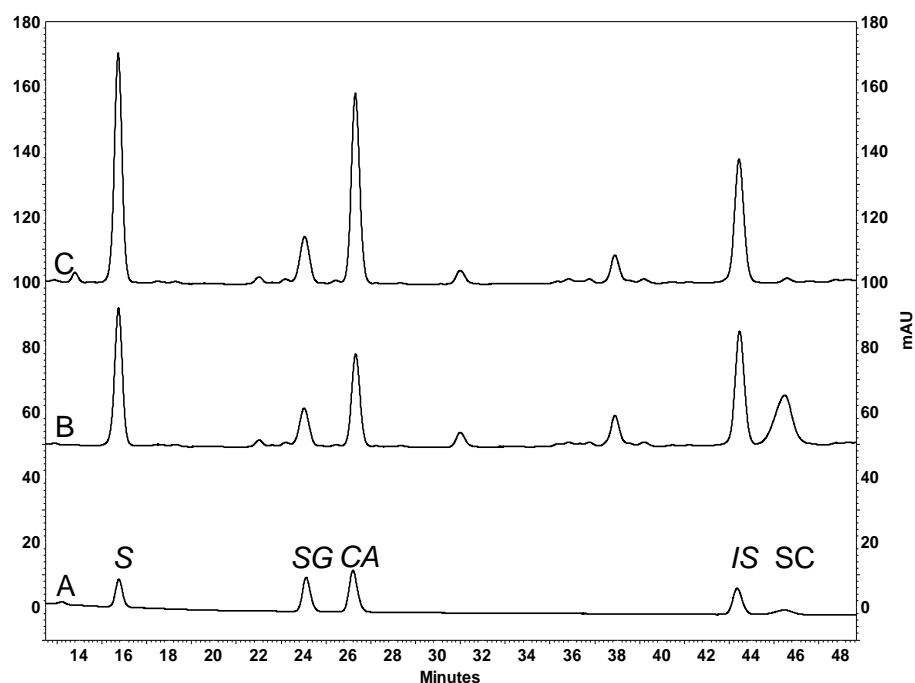


Abb. 11 Esterasehydrolyse des Weidenrindenextrakts; **A**: Standardsubstanzen (je 100 μ M) in Methanol, **B**: STW Extrakt nicht hydrolysiert (1,7 mg/ml, IS: 500 μ M), **C**: STW Extrakt (1,7 mg/ml, IS 500 μ M) hydrolysiert mit Esterase (c_0 =12 mg/ml); Gradient CG (270 nm); CA: Catechol, SG: Saligenin, S: Salicin, SC: Salicortin, IS: Interner Standard (Methylcatechol).

Probenvorbereitung

Der STW-Trockenextrakt wurde in Methanol 5% zu 14 mg/ml und Schweineleberesterase in einem Kaliumphosphatpuffer (pH=8) zu 12 mg/ml gelöst. Dem Puffer wurden 5 mg/ml Ascorbinsäure zugesetzt, um eine Oxidation des Catechols zu verhindern. Die Reaktionsmischung bestehend aus 600 μ l Extrakt und 1400 μ l Esterasepuffer wurden in einem 5 ml Messkolben verschlossen im Wasserbad bei 37 °C für 50 min inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die leicht basische Lösung

mit 2,5 µl Essigsäure neutralisiert, um eine Deprotonierung der phenolischen Hydroxylgruppen zurückzudrängen. Nachdem der Interne Standard zugesetzt war ($c_{\text{end}}=500 \mu\text{M}$), wurde um ein einheitliches Volumen zu erhalten und um das Enzym zu denaturieren, mit Methanol auf 5 ml aufgefüllt. Nach Membranfiltration über einen Spritzenvorsatzfilter wurden die Proben an der RP18-HPLC vermessen (**Abb. 11**). An jedem Versuchstag wurde ein STW-Extrakt aus der gleichen Einwaage nicht hydrolysiert vermessen. Hierzu wurden 600 µl Extrakt und 1400 µl Methanol 5% sowie 50 µl interne Standard Lösung zu 5000 µl mit Methanol verdünnt. Diese Probe diente als Basis für die Quantifizierung der im genuine Extrakt vorhandenen Menge an Salicortin und Catechol (**Abb. 11**). Gleichzeitig wurde über die Stoffmenge des genuine Salicortins die theoretische maximale Stoffmenge an entstehendem Catechol bestimmt.

Hydrolysedauer

Um die optimale Inkubationsdauer zu bestimmen wurde der STW-Extrakt wie oben beschrieben vorbereitet, für 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 70 min inkubiert und danach aufgearbeitet. Nach einer Inkubationszeit von 30 min war kein Salicortin mehr im Chromatogramm detektierbar. Jedoch zeigte sich durch Auswertung des Catecholgehalts in den einzelnen Analysen deutlich, dass erst nach 50 min die maximale Catecholkonzentration erreicht wurde (**Abb. 12A**). Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die Bildung des Catechols durch Oxidation nach Abspaltung der HCC-Untereinheit etwas Zeit benötigt. Aus **Abb. 12A** ist ebenfalls deutlich erkennbar, dass sich der Catecholgehalt bei Inkubationszeiten von 50-70 min nicht mehr nennenswert änderte und sich ein Plateau bildete, was für die Robustheit der Methode hinsichtlich der Inkubationszeit spricht. Vergleicht man den V_k des bestimmten Gesamt-catecholgehalts der Inkubationszeiten von 30-70 min so lag dieser bei 1,91%. Demnach erzielt man in diesem Inkubationsbereich richtige Ergebnisse. Für die Gehaltsbestimmung wurde daher die mittlere Inkubationszeit von 50 min gewählt. Die Bestimmung erfolgte in drei unabhängigen Experimenten.

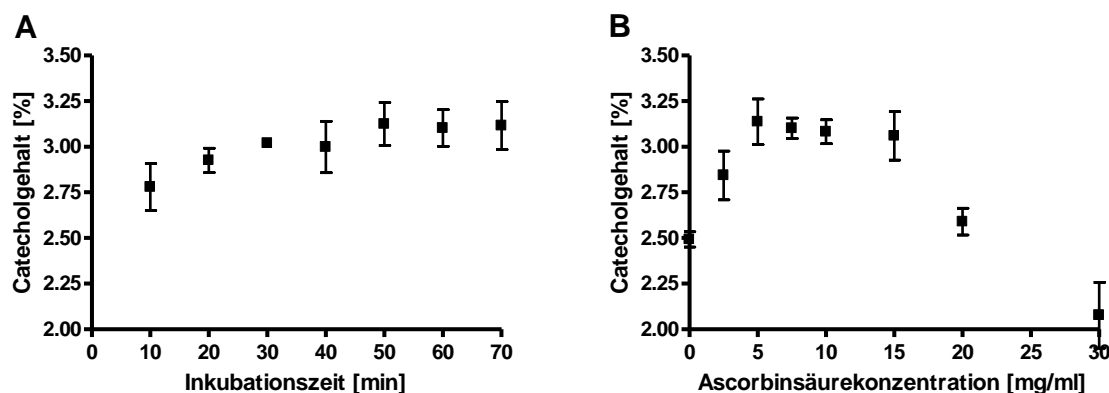


Abb. 12 Robustheitsparameter; **A**: Einfluss der Inkubationszeit (10-70 min) und **B**: der Ascorbinsäurekonzentration (0-30 mg/ml) auf den Catecholgehalt (MW \pm StabW, n=3, in Duplikaten).

Ascorbinsäurekonzentration

Aus der Catecholamin-analytik ist Ascorbinsäure als wirksames Antioxidans bekannt. Es drängt die im Basischen oder unter thermischer Belastung ablaufende Oxidation des Catechols zum o-Chinon zurück (Hugh et al. 1987). Deshalb wurde in den Versuchen zur Quantifizierung von Catechol ebenfalls Ascorbinsäure zugesetzt, um das entstandene Catechol zu stabilisieren. Zur Ermittlung der optimalen Ascorbinsäure-Konzentration, wurden die Versuche (siehe oben: Probenvorbereitung) mit 0-30 mg/ml Ascorbinsäure durchgeführt. Aus **Abb. 12B** wird deutlich, dass der ermittelte Catecholgehalt von der Ascorbinsäurekonzentration abhängig ist. Wurde keine oder wenig Ascorbinsäure zugesetzt, lag der erhaltene Catecholgehalt weit unter den maximal ermittelten Werten. Bei zu hohen Konzentrationen an Ascorbinsäure ($c_0=20-30$ mg/ml) sank der ermittelte Catecholgehalt ebenfalls. Eventuell ist dies auf unzulängliche Enzymaktivität aufgrund der Ionenstärke zurückzuführen. Der V_k der bestimmten Gesamt-catecholgehalte unter Zusatz von 2,5-15 mg/ml Ascorbinsäure lag bei 3,82%. Demnach erzielte man für diesen Konzentrationsbereich richtige Ergebnisse bzw. war die Methode hinsichtlich der Ascorbinsäurekonzentration robust. Für den hier beschriebenen Versuchsaufbau wurde eine Ascorbinsäurekonzentration von 5 mg/ml gewählt. Die Bestimmung erfolgte in drei unabhängigen Experimenten.

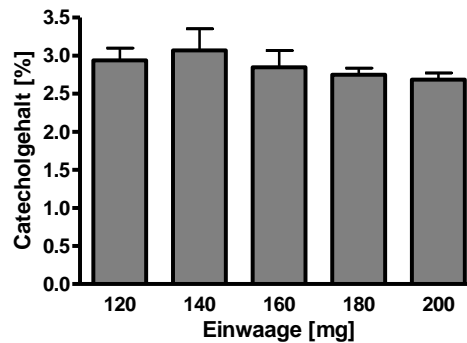


Abb. 13 Catecholgehalt in Abhängigkeit von der Einwaage ($MW \pm \text{StabW}$, $n=3$, in Duplikaten); $c_0(\text{STW Extrakt})=12\text{-}20 \text{ mg/ml}$.

Ermittlung der optimalen Einwaage

Um die für die Enzymmenge ($c_0=12 \text{ mg/ml}$) optimale Extrakteinwaage zu finden, wurden verschiedene STW-Extraktkonzentrationen hergestellt (12-20 mg/ml) und entsprechend der Probenaufarbeitung (siehe oben: *Probenvorbereitung*) behandelt. Der resultierende Catecholgehalt der verschiedenen Einwaagen wurde verglichen. Aus **Abb. 13** ist ersichtlich, dass er für alle Einwaagen in einem engen Bereich liegt. Der höchste Catecholgehalt konnte bei einer Einwaage von 140 mg STW Extrakt ermittelt werden, welche deshalb als Einwaagemenge festgelegt wurde. Vergleicht man den V_k des Catecholgehalts bei verschiedenen Einwaagen, so wird ersichtlich, dass für die eingesetzte Enzymmenge und Extrakteinwaagen von 120-180 mg ($V_k=4,73\%$) richtige Ergebnisse produziert werden konnten. Dies bedeutet, dass bei Weidenrindenextrakten mit geringerer oder höherer Menge an HCC-Untereinheiten die Gehaltsbestimmung ohne Änderung der Enzymmenge oder Einwaage erfolgen kann. Die Bestimmung erfolgte in drei unabhängigen Experimenten.

2.2.2.3 Validierungsparameter

Linearität

Um einen genauen Überblick über die Konzentrationen der Abbauprodukte Salicin, Saligenin und Catechol sowie dem Referenzdukt Salicortin zu erhalten, wurden vier 9-Punkt Kalibriergeraden (50-1000 μM) angefertigt ($n=3$). Aus drei unabhängigen Einwaagen wurden methanolische

Stammlösungen der Substanzen hergestellt, welche je zu neun Kalibrierlösungen verdünnt wurden. Jeder Kalibrierlösung wurde der interne Standard zugesetzt ($c_{\text{end}}=500 \mu\text{M}$). Generiert wurden die Kalibriergeraden durch Auftragung der Konzentrationen der Analyten gegen das Signalverhältnis von Analyt zu internem Standard. Die Kalibrierfunktionen und das Bestimmtheitsmaß r^2 sind in **Tab. 4** angegeben. Da es sich bei Catechol um den eigentlichen Analyten handelte, wurde hier besonders auf einen linearen Zusammenhang geachtet. So wurden als Linearitätskriterien das Bestimmtheitsmaß, der Achsenabschnitt und die Reststandardabweichung betrachtet (vgl. 2.2.1.3). Da das Bestimmtheitsmaß ($r^2=0,9927$) und die Reststandardabweichung ($\sigma>5\%$ der Zielkonzentration) außerhalb der vorgegebenen Kriterien lagen, wurde mit Hilfe des Responsefaktors ein abgesicherter linearer Bereich festgelegt. Für Catechol lag dieser bei 100-1000 μM . Eine mögliche Erklärung für die leichte Ungenauigkeit der Kalibrierung war, dass sie in Methanol vermessen wurde anstatt in Puffer, da sich Salicortin im Puffer ($\text{pH}=8$) bereits zu zersetzen begann. Durch Wiederholung der Experimente könnte man ein genaueres Ergebnis erzielen.

Tab. 4 Detektions- und Quantifizierungslimit, Peakreinheit ($n=6$) und Linearitätsparameter bei der Quantifizierung des Gesamt-catecholgehalts für die Analyten Catechol, Salicin, Saligenin und Salicortin.

Parameter	Catechol	Salicin	Saligenin	Salicortin
Kalibrierfunktion	$y=1,0486x+0,0454$	$y=0,8062x-0,0142$	$y=0,9762x+0,0198$	$y=0,7783x+0,0383$
Bestimmtheitsmaß r^2	0,9927	0,9978	0,9939	0,9938
Detektionslimit (μM)	0,20	0,11	0,18	0,18
Quantifizierungslimit (μM)	0,60	0,33	0,55	0,55
Totale Peakreinheit (%)	96,23	99,72	74,53	95,40

Detektions- und Quantifizierungslimit

Analog den Vorgaben der ICH wurden die Detektions- und Quantifizierungslimits aus der Steigung der Kalibriergeraden (S) und der Reststandardabweichung (σ) errechnet (ICH 2005). Trotz des schwachen Chromophors der Analyten lagen die Detektionslimits im Bereich 0,11-0,20 μM und die Quantifizierungslimits im Bereich 0,33-0,60 μM (**Tab. 4**).

Spezifität

Die absolute Peakreinheit wurde bestimmt (vgl. **2.2.1.3, S.24**). Für Catechol, Salicin und Salicortin lag diese bei > 95% (**Tab. 4**). Eine ausreichende Spezifität der Methode war somit gegeben. Mit sinkender Konzentration des Analyten sank die Genauigkeit des Detektors. Dies erklärte die etwas geringere Peakreinheit von Saligenin, welches in den Analysen nur als Minorkomponente vorlag. Die absolute Peakreinheit wurde in sechs unabhängigen Experimenten bestimmt.

Präzision (Wiederhol-, Labor- und Injektionspräzision)

Aus sechs unabhängigen Einwaagen an einem Tag (Wiederholpräzision) oder an mehreren Tagen (Laborpräzision) wurden Analysenansätze aufgearbeitet und vermessen. Beurteilt wurde die Präzision anhand von V_k . Dieser lag immer unter 5%, jedoch war erkennbar, dass die Gehaltsbestimmung innerhalb eines Tages präziser verlief, als an verschiedenen Tagen (**Tab. 5**). Dies kann durch Pipettierungenauigkeiten, kleine Wägefehler oder durch Instrument Ungenauigkeiten von Tag zu Tag bedingt sein. Durch sechsmalige Injektion (Injektionspräzision) derselben Analyse und Vergleich der gefundenen Peakflächen für Catechol und internen Standard wurde die Genauigkeit der HPLC Anlage überprüft. Es wurde für Catechol eine Peakfläche (Fläche \pm StabW) von 1041355 ± 14160 und für den internen Standard von 6388563 ± 67836 ermittelt. V_k war hier 1,36% für Catechol und 1,06% für den internen Standard. Dies spricht für eine hohe Präzision der Anlage.

Tab. 5 Wiederhol- und Laborpräzision der Catechol-gehaltsbestimmung (MW \pm StabW, n=6, in Duplikaten).

	Gesamtgehalt (%)	V_k (%)
Wiederholpräzision	3,33 \pm 0,05	1,42
Laborpräzision	3,11 \pm 0,14	4,39

Wiederfindung

Für die Ermittlung der Wiederfindung wurde überprüft, ob Catechol, welches einerseits genuin vorlag und andererseits durch Aufarbeitung entstanden war, stabil ist und richtig ermittelt werden konnte. Hierfür wurden drei verschiedene methanolische Catechol-stammlösungen hergestellt, welche in etwa 15, 30 und 60% der im STW-Extrakt enthaltenen Gesamtmenge entsprachen. Diese wurden entweder dem STW-Extrakt vor dem Versuch zugesetzt (Additionsmethode) oder ohne Matrix den Versuchsbedingungen unterzogen (Referenz). Der STW-Extrakt wurde zusätzlich ohne Catecholzusatz aufgearbeitet, um einen Catecholbasalwert zu erhalten. Aus dem erhaltenen Basalwert plus der aus der Einwaage errechneten Menge an zugesetzten Catechol ergab sich der theoretische Gesamt-catecholgehalt. Dieser wurde mit den ermittelten Gehalten der Additionsmethode ins Verhältnis gesetzt. Prozentual ausgedrückt ergab dieses Verhältnis die Wiederfindung. Für die Referenz wurde die Wiederfindung aus dem Quotienten ermittelter Catecholgehalt durch errechneten Catecholgehalt prozentual ausgedrückt. Aus **Tab. 6A** wird ersichtlich, dass Catechol ohne Matrix sehr niedrige Wiederfindungsraten (41,3-83,1%) besitzt. Dies deutete auf eine starke Instabilität des Catechols hin. In der Matrix hingegen war Catechol stabil und wurde zu 100% wiedergefunden. Catechol wird somit wahrscheinlich durch Begleitstoffe des STW-Extrakts stabilisiert. In einem weiteren Experiment sollte geprüft werden, ob sich aus Salicortin unter Versuchsbedingungen äquimolare Mengen Salicin und Catechol bilden. Hierfür wurden Salicortinstammlösungen hergestellt, welche ebenfalls in etwa 15, 30 und 60% der im STW-Extrakt enthaltenen Menge Salicortin entsprachen. Mit diesen Lösungen wurde, wie oben für die Additions- und Referenzmethode beschrieben, analog verfahren. Der theoretische Gesamt-catechol- bzw. -salicin-gehalt ergab sich für die Referenzmethode aus der eingesetzten errechneten Stoffmenge des Salicortins. Für die Additionsmethode ergab sich der theoretische Wert aus dem Basalwert von Catechol bzw. Salicin plus die eingesetzte errechnete Stoffmenge Salicortin. Aus **Tab. 6B** ist erkennbar, dass die Wiederfindung für Salicortin als Catechol ohne Matrix wiederum sehr gering war. In der Matrix wurden 89,8-92,7% des Catechols wiedergefunden. Der geringe Wert von nur 76,8% für die Addition von Salicortin 60% (**Tab. 6**) kann durch die nicht optimale Einwaagemenge erklärt werden. Es wurden bei der Wiederfindung 60% mehr Salicortin eingesetzt als im Extrakt vorhanden ist. Eine unzureichende enzymatische Aktivität war jedoch schon ab einer Steigerung der Einwaage von 43% zu beobachten (vgl. **2.2.2.2, S.32**). Da Catechol aus der Matrix zu 100% wiedergefunden wurde, lässt sich folgern, dass das bereits vorhandene und entstandene Catechol richtig bestimmbar war, die HCC-Untereinheit jedoch nur zu ca. 90% umgesetzt bzw. wiedergefunden wurde. Abschließend wurde die Wiederfindung von Salicin aus

Salicortin betrachtet, diese lag bei 86,2-90,0% ohne Matrix (**Tab. 6C**). Diese Werte lassen sich durch die Entstehung kleiner, nicht quantifizierbarer Mengen Saligenin als Abbauprodukt des Salicins teilweise erklären. In der Matrix wurde kein Abbau zum Saligenin beobachtet. Hier lagen die Wiederfindungsraten für Salicin bei 92,3-103,2%. Die geringeren Werte für Salicortin 60% in der Referenz und der Additionsmethode (vgl. **Tab. 6C**) erklären sich vermutlich ebenfalls aus der unzulänglichen Enzymaktivität in diesem Konzentrationsbereich.

Tab. 6 Wiederfindungsraten der Referenzen (ohne Matrix) und der Additionsmethode (MW \pm StabW, n=3, in Duplikaten); **A:** für Catechol, **B:** für Salicortin, gefunden und berechnet als Catechol, **C:** für Salicortin, gefunden und berechnet als Salicin; C: Catechol, SC: Salicortin, S: Salicin.

A	C 15%	C 30%	C 60%
Referenz	41,3 \pm 1,7	68,7 \pm 4,5	83,1 \pm 1,9
Additionsmethode	100,7 \pm 5,7	98,9 \pm 3,3	101,9 \pm 2,6

B	SC 15%	SC 30%	SC 60%
Referenz	31,4 \pm 2,1	53,1 \pm 5,0	53,3 \pm 2,6
Additionsmethode	92,7 \pm 2,8	89,8 \pm 2,9	76,8 \pm 6,9

C	SC 15%	SC 30%	SC 60%
Referenz	88,8 \pm 1,7	86,2 \pm 6,8	90,0 \pm 4,2
Additionsmethode	103,2 \pm 2,5	101,7 \pm 2,6	92,3 \pm 16,7

Stabilität

Drei Proben wurden nach siebenstündiger Lagerung ein weiteres Mal vermessen und mittels t-Test verglichen ($p < 0,05\%$). Der Gesamtgehalt (MW \pm StabW) vor Lagerung (452,2 \pm 56,5 μ M) unterschied sich nicht signifikant vom Gesamtgehalt nach sieben Stunden (456,3 \pm 57,0 μ M). Somit kann eine Stabilität der Proben für sieben Stunden angenommen werden.

Richtigkeit

Um die Richtigkeit zu überprüfen, wurden wie oben beschrieben Salicortin und Catechol im nicht hydrolysierten Extrakt quantifiziert und als Catechol berechnet. Diese Hilfsmethode wurde verwendet, um die ermittelten Werte der Catechol-gesamtgehaltsmethode zu bewerten. Ausgewertet wurden jeweils sechs Einwaagen des STW-Extraktes hydrolysiert und nicht hydrolysiert. Der prozentuale Gehalt ($MW \pm StabW$) wurde für die Catechol-gesamtgehaltsbestimmung zu $3,11 \pm 0,14\%$ und für die Hilfsmethode zu $4,30 \pm 0,30\%$ bestimmt ($n=6$). Dies ergab im direkten Vergleich eine Richtigkeit von 72% der Catechol-gesamtgehaltsbestimmung. Dieser niedrige Wert hat auch in der geringen Wiederfindung von nur ca. 90% seine Ursache und könnte auf eine eventuelle Ungenauigkeit der Referenzmethode schließen, welche nicht validiert wurde.

2.2.3 Catechol-, Naringenin-, und Eriodictyol-gesamtgehalt in verschiedenen Weidenrindenpräparaten

Die entwickelten Gehaltsbestimmungsmethoden aus 2.2.1, S.21 und 2.2.2, S.27 fanden Anwendung an vier verschiedenen Weidenrindenpräparaten. Neben dem zur Validierung gewählten STW-Extrakt der Firma Steigerwald, einem Trockenextrakt aus *S. purpurea* (Extraktionsmittel: Wasser; DEV 16:23-1) wurde ein Trockenextrakt aus *S. daphnoides* (Extraktionsmittel: Methanol 80%; DEV 4,32:1) untersucht. Ein Trockenextrakt und ein Fertigarzneimittel (Optovit® ActiFLEX) der Firma Hermes, ohne definierte Weidenrindenart (Extraktionsmittel: Ethanol 70%; DEV 8-14:1) sind gleichermaßen untersucht worden. Für den STW-Extrakt fand sich der höchste Gehalt an Catechol (3,33%), Eriodictyol (0,54%) und Naringenin (8,12%). Der *S. daphnoides* Extrakt enthielt 2,09% Gesamt-catechol und im Vergleich am wenigsten Flavanonderivate. Der Eriodictyolgehalt lag hier sogar unterhalb des Quantifizierungslimits. Dies galt ebenfalls für das Fertigarzneimittel Optovit® ActiFLEX. Das Fertigarzneimittel enthielt 1,70% Gesamt-catechol und 1,85% Gesamt-naringenin und lag damit im mittleren Bereich. Der Hermes Extrakt setzte sich aus relativ geringen Mengen Gesamt-catechol (1,41%) und Gesamt-flavanone (1,27%) zusammen. Der Gesamt-eriodictyolgehalt wurde hier zwar bestimmt, lag aber mit 0,93% im Bereich des Quantifizierungslimits (**Tab. 7**). Krauze-Baranowska et al. (2013) fokussierten die ebenfalls HPLC-basierte Bestimmung von Flavanonglucosiden aus Weidenrinde auf Einzelsubstanzen unter Verwendung externer oder interner Standards ohne Hydrolyse. Hierbei wurden das Chalkon Isosalipurposid und dessen cumaroyliertes Derivat sowie

Naringenin und dessen 5-O- und 7-O- β -Glucosid in verschiedenen *Salix* Präparaten quantifiziert und ein Gesamt-gehalt mittels Addition der Einzelsubstanzen bestimmt. Die von Krauze-Baranowska et al. (2013) gefundenen Gehalte bewegten sich in einer großen Spannweite (5-105 mg/g Droge) abhängig von der Weidenart und lagen im Bereich der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Gehalte. Bei den Arbeiten von Krauze-Baranowska et al. (2013) blieb jedoch die Quantifizierung von Eriodictyol und des cumaroylierten Naringenin-5-O- β -glucosids außer Acht. Freischmidt (2011) ermittelte einen genuinen Catecholgehalt von 2,3% für den hier untersuchten STW-Extrakt. Neben Ruuhola et al. (2003), welche den Catecholgehalt nach Hydrolyse in Kaliumphosphatpuffer untersuchten, betrachtete Poblocka-Olech et al. (2010) den Gehalt nach Hydrolyse mit 4%igem Kaliumhydroxid. Die Autoren konnten ebenfalls einen Anstieg des Catecholgehalts im basischen Hydrolysat nachweisen. So lagen die ermittelten Gehalte im Bereich von 1,77-12,57 mg/g Extrakt, je nach Weidenart und damit unter den in der hier vorliegenden Arbeit ermittelten Werten. Auf Vollständigkeit der Hydrolyse wurde in den bisher vorliegenden Arbeiten nicht geprüft. Aufgrund der verschiedenen Herstellungsverfahren und Stammpflanzen der untersuchten Trockenextrakte konnten die ermittelten Gehalte nur schwer miteinander verglichen werden. Für einen Vergleich der Inhaltsstoffquantitäten müsste Drogenmaterial verschiedener *Salix*-Arten auf dieselbe Art und Weise extrahiert werden und identische Extrakte mit den unterschiedlichen Methoden quantifiziert und die erhaltenen Ergebnisse statistisch miteinander verglichen werden.

Tab. 7 Vergleich des Gesamtcatechol-, Gesamteriodictyol- und Gesamtnaringenin-gehalts verschiedener Weidenrindenextrakte (MW \pm StabW, n=6); n.q.: nicht quantifizierbar (Methoden vgl. 2.4.3.1, S.48, Gradient CG bzw. 2.4.2.1, S.42, Gradient NE2)

Extrakt	Gesamt-catechol [%]	Gesamt-eriodictyol [%]	Gesamt-naringenin [%]	Gesamt-flavanon [%]
STW Extrakt	3,33 \pm 0,05	0,54 \pm 0,02	8,12 \pm 0,18	8,66 \pm 0,19
Hermes Extrakt	1,41 \pm 0,02	0,18 \pm 0,02	1,09 \pm 0,12	1,27 \pm 0,14
Optovit®	1,70 \pm 0,04	n.q.	1,85 \pm 0,25	1,85 \pm 0,25
<i>S. daphnoides</i> Extrakt	2,09 \pm 0,07	n.q.	0,93 \pm 0,18	0,93 \pm 0,18

2.3 Zusammenfassung und Ausblick

Freischmidt (2011) entwickelte eine Methode zur Quantifizierung von Naringenin-glycosiden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode auf Eriodictyol-glycoside ausgeweitet, da es einerseits *Salix*-Arten gibt, in denen Eriodictyol-glycoside überwiegen (Julkunen-Tiitto und Sorsa 2001). Andererseits gibt es Hinweise das Eriodictyol pharmakologisch interessanter sein könnte. Im Gegensatz zu Naringenin hemmt es beispielsweise die TNF α -induzierte ICAM-1 Expression *in vitro* (Freischmidt 2011). Durch die validierte, kombiniert saure und enzymatische Hydrolyse wurden Naringenin-glucoside, deren cumaroylierte Derivate, Eriodictyol-glucoside sowie Isosalipurposid und dessen cumaroyliertes Derivat als Naringenin und Eriodictyol (jeweiliges Aglykon) mittels HPLC-DAD Analytik erfasst. Für den STW-Weidenrindenextrakt ließ sich so ein Flavanongesamtgehalt von 8,66% ermitteln, welcher sich aus 8,12% Gesamt-naringenin und 0,54% Gesamt-eriodictyol zusammensetzte (**Tab. 2**). Im Vergleich dazu ermittelten Julkunen-Tiitto und Sorsa (2001) über die Quantifizierung von Einzelsubstanzen einen Gehalt von 3% Eriodictyol-7-O- β -glucosid und 0,4% Naringenin-7-O- β -glucosid bezogen auf die getrocknete Blattdroge von *S. purpurea*. Einige Weidenarten führen neben den Flavanonen auch Flavanonole, wie Taxifolin und Dihydrokämpferol in glucosidischer Form (Agnolet et al. 2012). Durch Anpassung des Gradienten und durch eventuelle Hydrolyseoptimierungen sollten diese mit der hier entwickelten Methode ebenfalls einer Quantifizierung zugänglich sein. Es wurden ebenfalls Flavone und Flavonole, wie Myricetin, Apigenin, Luteolin oder Quercetin in glucosidischer Form, in größeren Mengen im Blattmaterial für die Gattung *Salix* beschrieben und als Einzelsubstanzen (Aglykon oder Glucosid) quantifiziert (Nyman und Julkunen-Tiitto 2000; Tegelberg und Julkunen-Tiitto 2001; Zhao et al. 2014). Deshalb wäre die Quantifizierung aller für *Salix* beschriebenen Flavonoidglucoside als deren korrespondierenden Aglyka mit der kombinierten sauren und enzymatischen Hydrolyse ein interessanter Aspekt und eine Herausforderung für zukünftige Arbeiten. Diese effektive Methode zur Quantifizierung von Flavanonen und Chalkonen für Weidenrindenpräparate könnte gleichermaßen für andere Präparate, welche diese Inhaltsstoffe insbesondere Eriodictyolderivate führen, Anwendung finden. Die Möglichkeit einer breiten Anwendung der entwickelten Methode ist daher ebenfalls ein Aspekt, welcher in Zukunft untersucht werden könnte.

Durch frühere Arbeiten war bekannt, dass sich nach basischer Hydrolyse von Weidenpräparaten Catechol als Abbauprodukt des Salicortins bilden kann (Ruuhola et al. 2003). Unter verschiedenen basischen pH-Werten wurde der Catecholgehalt in Weide per HPLC bestimmt (Ruuhola et al. 2003; Poblocka-Olech et al. 2010). Julkunen-Tiitto und Meier (1992) konnten zeigen, dass Catechol auch durch den Einfluss von Esterasen aus Salicortin und Tremulacin freigesetzt werden kann. Da in

Vorversuchen unter basischen Bedingungen keine vollständige Hydrolyse des Salicortins, dem Hauptsalicylalkoholderivat der Weide, erreicht werden konnte, wurde eine quantitative Hydrolyse mit Schweineleberesterase etabliert. Hierbei wurde auf eine vollständige Hydrolyse des Standards Salicortin geachtet. Als Kontrolle dafür dienten die Wiederfindung des entstehenden Salicins und Catechols sowie die Stabilität des bereits im genuinen Extrakt enthaltenen Catechols. Es konnte in dem für die Etablierung und Validierung verwendeten STW-Extrakt ein Gesamt-catecholgehalt von 3,33% bestimmt werden. Die entwickelte und validierte Methode ist die erste, welche eine Quantifizierung von genuinem und in der HCC-Untereinheit gebundenem Catechol als Gesamt-catechol zulässt. Ob mit der entwickelten Methode auch andere Substanzen quantifizierbar sind, welche die Vorstufe des Catechols, die HCC-Untereinheit, enthalten, könnte anhand von Standardsubstanzen ermittelt werden. So bleibt zu überprüfen, ob die Wiederfindung von z.B. Tremulacin oder HCC-Catechin ausreichend ist. Eine Chance der Catecholgehaltbestimmung wäre ebenfalls eine Anwendung bei anderen Gattungen aus der Familie der Salicaceae (vgl. **2.1.2.1, S.18**), wie z.B. *Populus* Arten, welche auch ein breites Spektrum an Salicylalkoholderivaten mit HCC-Untereinheit besitzen (Boeckler et al. 2011).

Mit den beiden entwickelten Gehaltsbestimmungsmethoden können nun Weidenrinde und deren Präparate umfassender charakterisiert werden. So sind nicht nur die Salicylalkoholderivate über die Arzneibuchmethode (Ph. Eur. 2015) und die Gerbstoffe über die Hautpulvermethode (Ph. Eur. 2015), sondern nun auch die Flavanone, sowie das Gesamt-catechol einer Quantifizierung zugänglich. Da alle vier angeführten Substanzgruppen zur Wirksamkeit von Weidenrinde beitragen können, ist eine umfassende quantitative Aussage über die wichtigsten wirksamkeitsmitbestimmenden Stoffgruppen möglich (Nahrstedt et al. 2007).

2.4 Experimenteller Teil

2.4.1 Ausgangsmaterial

2.4.1.1 Weidenrindentrockenextrakt (STW)

Für die Etablierung und Validierung der hier beschriebenen Gehaltsbestimmungsmethoden wurde ein Trockenextrakt aus *S. purpurea* L. der Firma Steigerwald verwendet (STW 33-I, Charge WB 06-01). Hierbei handelte es sich um einen wässrigen Extrakt mit einem Droge-Extrakt-Verhältnis (DEV) von 16-23:1. Der Trockenextrakt wurde vom Hersteller mit 3,0% Siliciumdioxid (Ph. Eur.) und 1,2% Magnesiumstearat (Ph. Eur.) versetzt, der deklarierte Gesamt-salicingehalt betrug 23-26%.

2.4.1.2 Fertigarzneimittel

Der Gesamt-naringenin-, Gesamt-eriodictyol-, und Gesamt-catecholgehalt wurde für Optovit® ActiFLEX (Charge: 0113911) der Firma Hermes Arzneimittel GmbH bestimmt. Hierbei handelte es sich um überzogene Tabletten eines standardisierten Weidenrindentrockenextrakts (393 mg), entsprechend 60 mg Salicin. Als Auszugsmittel wurde laut Hersteller Ethanol 70% verwendet und das DEV lag bei 8-14:1. Zur Vorbereitung der Extraktion wurde eine Tablette im Mörser zerkleinert und homogenisiert. Zur Bestimmung des Gesamt-naringenin- und Gesamt-eriodictyolgehalts wurde das Homogenisat (393 mg) zu 100 ml Methanol/Wasser 7/3 (V/V), zur Bestimmung des Gesamt-catecholgehalts zu 25 ml Methanol/Wasser 0,5/9,5 (V/V) gelöst und wie unter **2.4.2.1**, **S.42** respektive **2.4.3.1**, **S.48** beschrieben verfahren.

2.4.1.3 Weidenrindentrockenextrakt (Hermes)

Die beschriebenen Gehaltsbestimmungen wurden weiter mit einem Weidenrindentrockenextrakt (97% nativ) der Firma Hermes Arzneimittel GmbH (Charge: 07001523) durchgeführt. Das DEV betrug 8-14:1 und der Gehalt an Gesamt-salicyl-Derivaten 15-18%.

2.4.1.4 *Salix daphnoides* Extrakt

Zur Herstellung dieses Extrakts wurde Rinde von *S. daphnoides* VILL. (Artikelnummer: 174702) der Firma Phytolab mit einer Ultrazentrifugalmühle zerkleinert (Sieb 0,5), 619,77 g des erhaltenen Drogenpulvers 1:1 mit Seesand vermengt und mit etwa 25 l Methanol/Wasser 8/2 (V/V) perkoliert.

Der erhaltene Extrakt wurde eingeeengt und gefriergetrocknet. Erhalten wurden 143,55 g *S. daphnoides* Trockenextrakt mit einem DEV von 4,32:1.

2.4.2 Methoden für die simultane Quantifizierung von Naringenin- und Eriodictyolderivaten

Für die folgenden Versuche wurde ausschließlich Reinstwasser und für die Chromatographie geeignetes Methanol verwendet.

2.4.2.1 Extraktvorbereitung

50 mg des STW Extrakts wurden in 10 ml Methanol/Wasser 7/3 (V/V) im Ultraschallbad für 15 min gelöst. Nach Filtration durch einen Faltenfilter, wurde 1 ml des Extrakts und 1 ml einer TFA-Lösung (11,5% TFA in einer entgasten Methanol/Wasser 3/7 (V/V) Mischung) in ein TFA-Hydrolysegefäß gegeben und bei 120 °C im Trockenschrank für 30 min hydrolysiert. Nach dem Abkühlen wurde das Hydrolysat mit 0,6 ml Natriumhydroxidlösung (2 M in Wasser) versetzt und quantitativ in einen 5 ml Messkolben überführt. Nach Zugabe von 1 ml Phosphatpuffer (1 M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ / $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in Wasser, pH=6,4) wurde mit Wasser zu 5 ml aufgefüllt. An dieser Stelle wurde der pH-Wert jeder Probe mit pH-Papier überprüft. Lag dieser zwischen 6-7, wurde weiter verfahren, lag er außerhalb dieses Bereichs, wurde die Probe verworfen. Für den zweiten Hydrolyseschritt wurde 1 ml dieser Lösung in einen weiteren 5 ml Messkolben pipettiert, mit 0,6 ml einer β -Glucosidase-Lösung (2 mg/ml in Wasser, ex amygdale, **Tab. 15, S.55**) und 1 ml Wasser versetzt. Diese Mischung wurde für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde 1 ml der Internen-Standard-Lösung (7,5 mg Hesperetin, **Tab. 15, S.55**) in 10 ml Methanol und anschließende 1:10 Verdünnung mit Methanol/Wasser 1/1 (V/V)) zugesetzt und zu 5 ml mit Methanol aufgefüllt. Nach Filtration durch einen Membranfilter wurden die Proben mittels analytischer HPLC (Gradient NE2, **Tab. 9**) vermessen. Die Herstellung der internen Standardlösung erfolgte an jedem Versuchstag frisch, für die Referenzmessung wurde sie 1:5 mit Methanol verdünnt und dreifach vermessen. Nicht hydrolysierte Proben wurden gelöst (s. oben), 1:25 mit Methanol/Wasser 7/3 (V/V) verdünnt, über einen Membranfilter filtriert und per HPLC (Gradient NE1, **Tab. 9**) vermessen.

2.4.2.2 Vorbereitung von Einzelsubstanzen

6 mg Naringenin-5-O- β -glucosid, 3 mg Naringenin-7-O- β -glucosid und 2 mg Eriodictyol-7-O- β -glucosid (alle **Tab. 15**, **S.55**) wurden in Methanol/Wasser 7/3 (V/V) zu je 10 ml gelöst. Mit diesen Einzelsubstanzen wurde wie unter **2.4.2.1**, **S.42** beschrieben verfahren. Nicht hydrolysierte Proben wurden 1:25 mit Methanol/Wasser 7/3 (V/V) verdünnt, über einen Membranfilter filtriert und an der HPLC (Gradient NE3, **Tab. 9**) vermessen.

2.4.2.3 Berechnung

Der interne Standard wurde dreifach injiziert und der Mittelwert der Flächen wurde berechnet. Für jede Probe wurde der Quotient der Fläche des Analyten (A_{Analyt}) zur Fläche des Internen Standards (A_{IS}) gebildet und mit dem Mittelwert der Fläche des Internen Standards ($A_{\text{IS-Referenz}}$) multipliziert (**Formel 1**). Diese erhaltene Fläche ($A_{\text{Analyt-korrigiert}}$) wurde in eine Naringenin- bzw. Eriodictyol-kalibrierfunktion eingesetzt, um die Konzentration des Analyten im Probenansatz zu erhalten.

$$A_{\text{Analyt-korrigiert}} = \frac{A_{\text{Analyt}} * A_{\text{IS-Referenz}}}{A_{\text{IS}}}$$

Formel 1 Berechnung der Fläche des Analyten ($A_{\text{Analyt-korrigiert}}$) für die Kalibriergerade; A_{Analyt} : gemessene Fläche des Analyten, A_{IS} : gemessene Fläche des internen Standards im Probenansatz, $A_{\text{IS-Referenz}}$: Mittelwert der Flächen der Internen Standard Referenz.

2.4.2.4 HPLC-Methoden

Folgende Geräteparameter (**Tab. 8**) und Gradienten (**Tab. 9**) wurden für die Gehaltsbestimmung verwendet.

Tab. 8 Gewählte Geräteparameter der analytischen HPLC für die simultane Quantifizierung von Naringenin- und Eriodictyolderivaten.

Parameter	Spezifikation	Hersteller
Säule	250-4 Purospher®Star-RP-18e (5 μ m)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Vorsäule	Purosher®Star RP-8e (5 μ m)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Injektionsvolumen	30 μ l	
Ofentemperatur	30 °C	
Autosampler-temperatur	20 °C	
Detektionswellenlänge	289 nm	

Fortsetzung **Tab. 8.**

Parameter	Spezifikation	Hersteller
Fließmittel A	0,1% Ameisensäure in Wasser	
Fließmittel B	95% Acetonitril in Wasser	

Tab. 9 Übersicht des Gradienten zur Überprüfung der Hydrolysedauer NE1, des Gradienten zur simultanen Quantifizierung NE2 und des Gradienten zur Hydrolyse der Einzelsubstanzen NE3; G: Gradient, A/B: Fließmittelzusammensetzung (V/V), t: Zeit (min), flow (ml/min).

G	t	A/B	flow
NE1	0-35	90/10→80/20	0,75
	35-45	80/20→75/25	0,75
	45-70	75/25→55/45	0,75
	70-73	55/45→0/100	0,75
	73-77	0/100	0,75
	77-81	0/100→90/10	0,75
	81-85	90/10	0,75
NE2	0-25	75/25→55/45	1,00
	25-26	55/45→0/100	1,00
	26-30	0/100	1,00
	30-31	0/100→75/25	1,00
	31-35	75/25	1,00
NE3	0-7	75/25	0,75
	7-9	75/25→30/70	0,75
	9-14	30/70	0,75
	14-16	30/70→75/25	0,75
	16-20	75/25	0,75

2.4.2.5 Methodenvalidierung

Kalibrierung

Eine Eriodictyol- (50 µg/ml), respektive eine Naringenin-stammlösung (70 µg/ml), wurden mit Methanol hergestellt. Aus dieser Stammlösung wurden neun Kalibrierlösungen verschiedener Konzentrationen im Bereich 0,2-10 µg/ml (0,6-35 µM) für Eriodictyol und im Bereich von 0,5-70 µg/ml (1,8-257 µM) für Naringenin durch Verdünnung mit Methanol hergestellt. Die interne-Standard-Lösung wurde wie unter **2.4.2.1, S.42** beschrieben hergestellt und den Kalibrierlösungen im Verhältnis 1:5 zugesetzt. Die interne Standard Lösung wurde ebenfalls (vgl. **2.4.2.1, S. 42**) dreifach vermessen. Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurde $A_{(\text{Analyt-korrigiert})}$ nach **Formel 1, S.43** berechnet und gegenüber der errechneten Konzentration des Analyten aufgetragen. Die Bestimmung der Kalibriergeraden erfolgte in sechs unabhängigen Experimenten. Das Bestimmtheitsmaß r^2 wurde mit Hilfe von Excel (Microsoft Office 2010) errechnet. Die Linearitätsprüfung erfolgte an Hand des y-Achsenabschnitts (b) und der Reststandardabweichung (σ ; **Formel 5**). Eine ermittelte Fläche einer Analyse wurde gewählt (Proben der Wiederholpräzision) und mit b bzw. σ prozentual ins Verhältnis gesetzt. Die Ermittlung des Response-Plots erfolgte durch die Auftragung der Responsefaktoren (**Formel 2**) gegen die Konzentrationen der Kalibriergeraden. Durch Einführung einer der x-Achse parallelen Geraden wurde manuell (Punkte, welche sich auf der Geraden befanden) der abgesicherte lineare Arbeitsbereich festgelegt.

$$R = \frac{A_i}{c_i}$$

Formel 2 Ermittlung des Responsefaktors R; c_i : Kalibrierkonzentration, A_i : Fläche der Kalibrierkonzentration.

Nachweisgrenze (LOD) und Quantifizierungsgrenze (LOQ)

Die Bestimmung der Nachweis-und Quantifizierungsgrenze erfolgte nach **Formel 3** respektive **Formel 4** durch Berechnung aus der Reststandardabweichung (σ ; **Formel 5**) und der Steigung (S) der Kalibriergeraden.

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{S}$$

Formel 3 Errechnung des LOD; S: Steigung der Kalibriergeraden, σ : Reststandardabweichung.

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

Formel 4 Errechnung des LOQ; S: Steigung der Kalibriergeraden, σ : Reststandardabweichung.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum [y_i - (S \cdot x_i + b)]^2}{N - 2}}$$

Formel 5 Errechnung der Reststandardabweichung (σ); S: Steigung der Kalibriergeraden, b: Ordinatenabschnitt, N: Anzahl der Kalibrierpunkte, x_i : Konzentrationswert, y_i : Signalwert (Absorption).

Total Peak Purity

Um die Peakreinheit zu bestimmen, wurde die HPLC Software EZChrom Elite 3.1.7 verwendet. Die Peakreinheit wurde sechsfach aus unabhängigen Chromatogrammen bestimmt.

Stabilität

Die Proben der Wiederholpräzision wurden 8 h bei 10 °C im Autosampler gelagert und ein weiteres Mal vermessen. Die erhaltenen Werte wurden mittels t-Test verglichen ($p < 0,05$).

Wiederholpräzision

Sechs Proben (sechs verschiedene Einwaagen) wurden innerhalb eines Tages aufgearbeitet und vermessen (**2.4.2.1**, **S.42**). Die Auswertung erfolgte anhand des Variationskoeffizienten (V_k ,

Formel 6). Lag dieser unter 5% wurde die Wiederholpräzision akzeptiert.

$$V_k = \frac{s}{\bar{x}}$$

Formel 6 Berechnung des Variationskoeffizienten V_k ; s: Standardabweichung, \bar{x} : Mittelwert der Konzentrationen.

Laborpräzision

Sechs Proben (sechs verschiedene Einwaagen) wurden an verschiedenen Tagen aufgearbeitet und vermessen (**2.4.2.1, S.42**). Die Auswertung erfolgte anhand von V_k (**Formel 6**). Lag dieser unter 5% wurde die Laborpräzision akzeptiert.

Wiederfindung

100 mg STW Extrakt wurden in 10 ml Methanol/Wasser 7/3 (V/V) im Ultraschallbad für 15 min gelöst. Weiter wurde eine Lösung Eriodictyol-7-O- β -glucosid (**Tab. 15, S.55**, 36 $\mu\text{g/ml}$) Methanol/Wasser 7/3 (V/V) hergestellt, welche in etwa 40% der im Extrakt genuin enthaltenen Menge an Eriodictyol-7-O- β -glucosid (E7G 40%) entsprach. Diese Lösung wurde 1:1 mit Methanol/Wasser 7/3 (V/V) verdünnt (E7G 20%). Für die Versuche zur Wiederfindung wurden die in **Tab. 10** gelisteten Proben vorbereitet und wie unter **2.4.2.1, S.42** beschrieben zur kombinierten TFA- und β -Glucosidase-hydrolyse verwendet. Für die Berechnung wurde mittels der Molaren Massen (M) von Eriodictyol-7-O- β -glucosid (M=450,39 g/mol) die entstandene Menge Eriodictyol (M=288,25 g/mol) im HPLC-Vial errechnet. Der gefundene Eriodictyolgehalt des Grundwerts diente als Basis, um den theoretischen Gehalt mittels Addition der Proben STW+E7G 40% und STW+E7G 20% zu errechnen (**Tab. 10**). Die Wiederfindungsrate errechnet sich aus **Formel 7**. Die Wiederfindung wurde in sechs unabhängigen Experimenten bestimmt.

$$W = \frac{G}{B} * 100\%$$

Formel 7 Errechnung der Wiederfindungsrate (W); G: gemessener Wert, B: berechneter Wert.

Tab. 10 Pipettierschema der für die Wiederfindung benötigten Proben; LM: Lösungsmittel (Methanol/Wasser 7/3 (V/V)), E7G: Eriodictyol-7-O- β -glucosid.

Bezeichnung	STW-Extrakt	E7G 40%	E7G 20%	LM
Grundwert	0,5 ml			0,5 ml
Blank				1,0 ml
LM+E7G 40%		0,5 ml		0,5 ml
LM+E7G 20%			0,5 ml	0,5 ml

Fortsetzung **Tab. 10.**

Bezeichnung	STW-Extrakt	E7G 40%	E7G 20%	LM
STW+E7G 40%	0,5 ml	0,5 ml		
STW+E7G 20%	0,5 ml		0,5 ml	

2.4.3 Methoden für die Quantifizierung des Gesamt-catecholgehalts

Für die folgenden Versuche wurde ausschließlich Reinstwasser und für die Chromatographie geeignetes Methanol verwendet.

2.4.3.1 Extraktaufarbeitung

140 mg STW Extrakt wurden in 10 ml Methanol/Wasser 0,5/9,5 (V/V) 15 min im Ultraschallbad gelöst. In einem Phosphatpuffer (100 mM, KH_2PO_4 / $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ in Wasser, pH=8) wurde Ascorbinsäure (**Tab. 15, S.55**) frisch zu 5 mg/ml gelöst. Daraufhin wurde eine Schweineleberesterase-Lösung (**Tab. 15, S.55**, 12 mg/ml) mit diesem Ascorbinsäure-Phosphatpuffer hergestellt. 600 µl des Extrakts und 1400 µl der Esterase-Lösung wurden in einen 5 ml Messkolben pipettiert und für 50 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 2,5 µl Essigsäure und 50 µl der Internen-Standard-Lösung (Lösung von Methylcatechol (**Tab. 15, S.55**) 50 mM in Methanol) zugesetzt und anschließend auf 5 ml mit Methanol aufgefüllt. Nach Filtration über einen Membranfilter wurde die Probe an der analytischen HPLC (Gradient CG, **Tab. 12**) stets doppelt vermessen. Eine nicht hydrolysierte Probe wurde immer mitgeführt. Dazu wurden 600 µl STW Extrakt mit 1400 µl Methanol/Wasser 0,5/9,5 (V/V) versetzt und wie oben behandelt.

2.4.3.2 Einzelsubstanzen

Salicortin, Catechol, Saligenin, Salicin und Methylcatechol (vgl. **Tab. 15**) wurden in DMSO zu 100 mM gelöst. Nach 1:1000 Verdünnung mit Methanol und Filtration durch einen Membranfilter wurden die Proben an der HPLC (Gradient CG, **Tab. 12**) vermessen.

2.4.3.3 Reinheitsprüfung

Der Standard Salicortin wurde im Rahmen einer Masterarbeit aus *S. daphnoides* analog dem Isolierungsschema von Knuth (2013) isoliert. Die Überprüfung der Identität erfolgte mittels ^1H NMR (400 MHz, 293 K, in Methanol- d_4) und einem Vergleich mit dem aus der Literatur bekannten ^1H NMR Spektrum. Die NMR Daten von Salicortin sind in **8.3.1, S.183** abgebildet. Die Überprüfung der

Reinheit erfolgte mittels HPLC-DAD (Gradient CG, **Tab. 12**). Für die Standardsubstanz konnte so eine Reinheit (HPLC) von $\geq 95\%$ ermittelt werden.

2.4.3.4 Berechnung

Aus den erhaltenen Flächen des Analyten und des internen Standards wurde ein Quotient gebildet. Aus der Kalibriergerade errechnete sich unter Einbeziehung der Konzentration des internen Standards (immer 500 μM) die Konzentration des Analyten im Probenansatz. Unter Berücksichtigung der Verdünnung, der Molaren Masse des Analyten und der Einwaage ließ sich der prozentuale Gehalt berechnen. Die Berechnung des genuine Catecholgehalts sowie des Salicortingehalts erfolgte analog aus dem nicht hydrolysierten Extrakt.

2.4.3.5 HPLC-Methode

Folgende Geräteparameter (**Tab. 11**) und Gradienten (**Tab. 12**) wurden für die Gehaltsbestimmung verwendet.

Tab. 11 Gewählte Geräteparameter der analytischen HPLC für die Quantifizierung des Gesamt-catecholgehalts.

Parameter	Spezifikation	Hersteller
Säule	Hibar [®] RT 250-4 cartridge with Purospher [®] Star-RP-18e (5 μm)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Vorsäule	Purospher [®] Star RP-8e (5 μm)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Injektionsvolumen	20 μl	
Ofentemperatur	25 °C	
Autosampler-temperatur	10 °C	
Detektionswellenlänge	275 nm für Catechol 268 nm für Salicin 273 nm für Saligenin 270 nm für Salicortin	
Fließmittel A	1,8% THF und 0,5% o-Phosphorsäure 85% in Wasser	
Fließmittel B	Methanol	

Tab. 12 Übersicht des Gradienten CG der Gehaltsbestimmung; G: Gradient, A/B: Fließmittelzusammensetzung (V/V), t: Zeit (min), flow (ml/min).

G	t	A/B	flow
CG	0-5	100/0	0,80
	5-10	100/0→97/3	0,80
	10-12	97/3→95/5	0,80
	12-17	95/5→90/10	0,80
	17-45	90/10→70/30	0,80
	45-48	70/30→0/100	0,80
	48-53	0/100	0,80
	53-58	0/100→100/0	0,80
	58-65	100/0	0,80

2.4.3.6 Methodenvalidierung

Kalibrierung

Es wurden für Catechol und Saligenin (100 mM), für Salicortin und Salicin (10 mM) sowie für den internen Standard (50 mM) Stammlösungen in Methanol hergestellt. Aus den Stammlösungen wurden neun Kalibrierlösungen im Bereich von 50-1000 µM unter Zusatz des internen Standards (Endkonzentration in der Kalibrierlösung war immer 500 µM) in Methanol verdünnt. Die Kalibrierlösungen wurden nach Filtration durch einen Membranfilter an der HPLC je zweimal vermessen. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden der Quotient aus der Konzentration des Analyten zur Konzentration des internen Standards auf der Abszisse und der Quotient aus der Fläche des Analyten zur Fläche des internen Standards auf der Ordinate aufgetragen. Das Bestimmtheitsmaß r^2 wurde mit Hilfe von Excel (Microsoft Office 2010) errechnet. Die Bestimmung der vier Kalibriergeraden erfolgte je in drei unabhängigen Experimenten. Die vier Kalibriergeraden stellen somit jeweils den Mittelwert aus drei Bestimmungen dar. Die Linearitätsprüfung erfolgte analog zu **2.4.2.5, S.45**.

Detektions- und Quantifizierungsgrenze

Die Bestimmung von LOD und LOQ erfolgte analog zu **2.4.2.5, S.45**.

Total Peak Purity

Für die vier Analyten Catechol, Salicin, Saligenin und Salicortin wurde die Peak-Reinheit wie unter **2.4.2.5, S.45** beschrieben berechnet.

Stabilität

Bereits vermessene hydrolysierte Proben wurden bei 10 °C für 7 h gelagert und erneut vermessen. Die Gehalte vor und nach der Lagerung wurden mittels t-Test verglichen ($p < 0,05$).

Robustheit

In einem ersten Experiment wurde der STW Extrakt wie unter **2.4.3.1, S.48** beschrieben behandelt und für variierende Zeiten (10-70 min) im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. In einem zweiten Versuchsaufbau wurden der Esterase-Phosphatpuffer (vgl. **2.4.3.1, S.48**) hergestellt (hier ohne Ascorbinsäurezusatz). Es wurde in Reaktionsgefäßen Ascorbinsäure im Bereich von 0-45 mg vorgelegt und je mit 1500 µl Esterase-Phosphatpuffer gelöst. Mit 1400 µl dieser Ascorbinsäure-Enzym-Pufferlösungen (0-30 mg/ml Ascorbinsäure) wurde die Hydrolyse durchgeführt (vgl. **2.4.3.1, S.48**). Beide Versuchsvarianten wurden in je drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die erhaltenen Konzentrationen wurden anhand von V_k verglichen (**Formel 6, S.46**).

Einwaage

Mit verschiedenen Extrakteinwaagen (120, 140, 160, 180, 200 mg) wurde wie unter **2.4.3.1, S.48** beschrieben verfahren. Die Bestimmung erfolgte in drei unabhängigen Experimenten. Die erhaltenen Konzentrationen wurden anhand von V_k verglichen (**Formel 6, S.46**).

Wiederfindung

Es wurden Stammlösungen von Salicortin (4 mM) und Catechol (2,5 mM) in Methanol hergestellt (60% Wert). Diese Stammlösungen wurden je 1:1 (30% Wert) und 1:4 (15% Wert) mit Methanol verdünnt. Die sechs Lösungen wurden den Proben nach unten stehendem Schema zugesetzt (**Tab. 13**). Mit den so erhaltenen aufgestockten Proben wurde die Hydrolyse, wie unter **2.4.3.1**, **S.48** beschrieben, durchgeführt und chromatographiert (**2.4.3.5**, **S.49**). Da aus Salicortin (424,40 g/mol) nach Hydrolyse theoretisch äquimolare Mengen Catechol (110,11 g/mol) entstehen sollten, wurden aus der Einwaage, der Verdünnung und der Molaren Masse die Konzentrationen an Catechol (in μM) in den Analysenansätzen errechnet. Diese wurden für die Wiederfindung aus der Matrix zu dem im Grundwert erhaltenen Catecholgehalt addiert. Die Wiederfindungsrate berechnet sich nach **Formel 7**, **S.47**. Die Wiederfindung wurde in drei unabhängigen Experimenten bestimmt.

Tab. 13 Spikingschema der für die Wiederfindung benötigten Proben; LM: Lösungsmittel (Methanol/Wasser 0,5/9,5 (V/V)), SC: Salicortin, C: Catechol, STW: Weidenrindenextrakt.

Bezeichnung	STW	SC 15%	SC 30%	SC 60%	C 15%	C 30%	C 60%	LM
Grundwert	300 μl							300 μl
Blank								600 μl
LM+SC 15%		300 μl						300 μl
LM+SC 30%			300 μl					300 μl
LM+SC 60%				300 μl				300 μl
LM+C 15%					300 μl			300 μl
LM+C 30%						300 μl		300 μl
LM+C 60%							300 μl	300 μl
STW+SC 15%	300 μl	300 μl						
STW+SC 30%	300 μl		300 μl					
STW+SC 60%	300 μl			300 μl				
STW+C 15%	300 μl				300 μl			
STW+C 30%	300 μl					300 μl		
STW+C 60%	300 μl						300 μl	

Wiederhol- und Laborpräzision

Die Versuche zur Wiederhol- und Laborpräzision wurden analog zu **2.4.2.5, S.45** ausgeführt und bewertet.

Messpräzision

Eine Probe wurde sechsmal an der HPLC injiziert und wie unter **2.4.3.5, S.49** beschrieben vermessen. Die Flächen des Analyten und des Internen Standards wurden anhand von V_k beurteilt. Die Messpräzision war gegeben bei einem $V_k < 5\%$ (**Formel 6, S.46**).

Richtigkeit

Die Flächen von Salicortin und Catechol in der nicht hydrolysierten Probe wurden über die Kalibriergeraden in Konzentrationen umgerechnet. Die Stoffmengen wurden addiert und als Catechol (in μM) berechnet. Im Hydrolysat (selbe Extrakteinwaage) wurde der Gesamt-catecholgehalt wie unter **2.4.3.1, S.48** und **2.4.3.4, S. 49** beschrieben bestimmt. Die Richtigkeit stellt das Verhältnis von Gesamt-catecholgehalt zur additiven Bestimmung aus dem genuinen Extrakt dar.

2.4.4 Geräte und Chemikalien

Die im **Kapitel 2** „Quantifizierung von phenolischen Inhaltsstoffen aus Weidenrinde“ verwendeten Geräte und Chemikalien sind in **Tab. 14** und **Tab. 15** zusammengefasst.

Tab. 14: Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien im **Kapitel 2**.

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Einmalspritzen (sterile)	Norm-Ject, Tuberculin, 1 ml	Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Deutschland
Faltenfilter	Grade 1289, 84 g/m ² , 90 mm Durchmesser	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Fortsetzung **Tab. 14.**

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Gefriertrocknungsanlage	P 10 mit Pumpe PK8D	Ilmvac, Ilmenau, Deutschland
HPLC, analytisch	Elite LaChrom, Autosampler L2200, Pumpe L2130, Säulenofen L2350, Dioden-Array-Detektor L2444; Software: EZChrom Elite 3.1.7	Hitachi, Tokio, Japan; Vertrieb: VWR, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Vial	11 mm CrimpSnap-Vial, braun, 2 ml	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Isopropanolbad	Kühler EK 30	Haake, Karlsruhe, Deutschland
Messkolben	Verschiedene Volumina	Brand, Wertheim, Deutschland
NMR	Avance III HD 400	Bruker Corporation, Billerica, MA, USA
Oberschalenwaage	MC 1, Laboratory LC 6200 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Pasteurpipetten	150 mm, 230 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland
pH-Meter	InoLab pH Level 1, Elektrode SenTix Mic	WTW, Weilheim, Deutschland
pH-Papier	Universal Indikator, pH 1-10	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pipetten	2,5 Research (0,1-2,5 µl) 10 Reference (2,5-10 µl) 100 Reference (10-100 µl) 1000 Reference (100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	0,5 µl, 10 µl 100 µl, 1000 µl	Kinesis, Lengenfeld, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reinstwasseranlage	Astacus LS	MembraPure, Berlin, Deutschland
Rotationsverdampfer	Laborota 4003 control, MR 3004 safety S, Rotavac vario control	Heidolph, Fürth, Deutschland
Schüttler	Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Spritzenvorsatzfilter	Perfect-Flow RC membrane (0,2 µm)	Wicom, Heppenheim, Deutschland
TFA-Hydrolysegefäß	Wheaton-V-Vials, 5 ml, mit PTFE/Silicon Septum	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Fortsetzung **Tab. 14.**

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Trockenschrank	771 364	Memmert, Schwabach, Deutschland
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner	VWR, Darmstadt, Deutschland
Ultrazentrifugalmühle	Ultrazentrifugalmühle 2011, Sieb 0,5	Retsch, Haan, Deutschland
Vial-Verschlusskappe	PP Schnappkappe, blau, für 11 mm SnapCrimp-Vial, mit Teflon/Silikon-Septum	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Wasserbad	Hbr 24 digital	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Tab. 15: Auflistung der verwendeten Referenzsubstanzen und Chemikalien im Kapitel 2.

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
4-Methylcatechol	purum, ≥95,0% (HPLC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Acetonitril LiChrosolv [®]	Reag. Ph. Eur., gradient grade for liquid chromatography	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure	98-99%, p.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Catechol	≥ 99%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
D-(-)-Salicin	≥ 99% (GC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	p.A., ≥ 99,0% (acidimetrisch)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat	p.A., 99,5% (acidimetrisch)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eriodictyol	≥ 99%, HPLC	Extrasynthese, Lyon, Frankreich
Eriodictyol-7-O-β-glucosid	≥ 99%, HPLC	Extrasynthese, Lyon, Frankreich
Essigsäure/ Eisessig	p.A., 100%, wasserfrei	Merck, Darmstadt, Deutschland
Esterase	Aus Schweineleber, lyophilisiert, ≥ 15 U/mg	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hesperetin	≥ 95%, HPLC	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	p.A., 99,5-100,5% (acidimetrisch)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Fortsetzung **Tab. 15.**

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
L-(+)-Ascorbinsäure	99%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	p.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol-d ₄	≥ 99,8%	Deuterio GmbH, Kastellaun, Deutschland
Methanol LiChrosolv®	Reag. Ph. Eur., gradient grade for liquid chromatography	Merck, Darmstadt, Deutschland
Naringenin	≥ 99%, HPLC	Extrasynthese, Lyon, Frankreich
Naringenin-5-O-β-glucosid	≥ 99%, HPLC	Isoliert aus STW-Extrakt (Freischmidt 2011)
Naringenin-7-O-β-glucosid	≥ 90%, HPLC	Extrasynthese, Lyon, Frankreich
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	p.A., 99,0-102,0% (acidimetrisch)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Pellets for analysis, ≥ 99% (acidimetrisch)	Merck, Darmstadt, Deutschland
ortho-Phosphorsäure	85%, p.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salicortin	95%, HPLC	Isoliert von D. Flittner aus <i>Salix daphnoides</i> VILL.
Salicylsäure	p.A., ≥ 99%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Saligenin (2-Hydroxy-benzylalkohol)	≥ 99%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Seesand	extra pure, 0,1-0,315 mm	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tetrahydrofuran, LiChrosolv®	for liquid chromatography, ≥ 99,9% (GC)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Trifluoressigsäure	ReagentPlus®, 99%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
β-Glucosidase	≥ 1000 U/mg, ex amygdale	Roth, Karlsruhe, Deutschland

3 ANALYSE VON PHASE-II-METABOLITEN NACH EINNAHME EINES WEIDENRINDENEXTRAKTS

3.1 Grundlage

Die Flavonoide und weitere Polyphenole der Weidenrinde wurden - im Gegensatz zu den Salicylalkoholderivaten - hinsichtlich ihrer nach Applikation entstehenden Metaboliten noch nicht untersucht (Nahrstedt et al. 2007). Deshalb sollten in dieser Arbeit die polyphenolischen Metaboliten eines Weidenrindenextraktes aus Serumproben einer pharmakokinetischen Studie identifiziert werden (Knuth et al. 2013). Durch die Identifizierung der relevanten *in vivo* Metaboliten soll ein grundlegender Beitrag zur Rolle der Polyphenole und ihrer Metabolite für die Wirkung bzw. Wirksamkeit von *Salicis cortex* geleistet werden. Die bisherigen Studien beschäftigten sich hauptsächlich mit der Resorption, Metabolisierung und Eliminierung von Flavonoiden und insbesondere Flavonolen aus Nahrungsmitteln. Hierbei galten Flavonoide längere Zeit als wenig bioverfügbar. Polyphenole, besonders Flavonoide, können nach Resorption renal oder biliär eliminiert werden (Scalbert et al. 2002). Untersuchungen mit radioaktiv markierten Flavonoiden zeigten zusätzlich eine Eliminierung als CO₂ mit der Atemluft (Walle 2004). Für das in Weidenrinde mengenmäßig dominierende Flavanon Naringenin beträgt die renale Exkretion nach Applikation des Aglykons bzw. eines Orangensafts ca. 5-8% (Kanaze et al. 2007; Manach et al. 2005). Die im Urin und im Plasma detektierten Metaboliten sind Naringenin-7-O-glucuronid und Naringenin-4'-O-glucuronid sowie Naringenin-di-O-glucuronid (Mullen et al. 2008; Bredsdorff et al. 2010; Brett et al. 2009). Im Urin wurden außerdem ein Naringenin-O-sulfat und ein gemischtes Naringenin-glucuronid-sulfat detektiert (Zhang und Brodbelt 2004). Für das Flavanon Eriodictyol, welches meist nur als Nebenkomponente in Weidenrindenextrakt präsent ist, konnte nach Applikation von Rooibos Tees der Metabolit Eriodictyol-O-sulfat im Urin nachgewiesen werden (Stalmach et al. 2009). Nach Applikation von Orangensaft, welcher 5 µmol Eriodictyol-7-O-rutinosid enthielt, konnte Eriodictyol-O-sulfat im Urin detektiert werden (Pereira-Caro et al. 2014). Neuere Studien zeigen die Bedeutung der Flavonoid-metabolisierung durch die Mikroflora des Kolons. Naringenin kann unter C-Ring Spaltung zu kleineren phenolischen Verbindungen abgebaut werden, welche resorbiert und im Urin gefunden werden konnten (Pereira-Caro et al. 2014). Betrachtet man diesen zusätzlichen Metabolisierungsweg, so entspricht die Summe der Metaboliten fast zu 100% der eingenommenen Menge an Naringenin (Pereira-Caro et al. 2014). In den nachfolgenden Kapiteln sollen die komplexen Resorptions- und Metabolisierungsprozesse der Flavonoide dargestellt werden.

3.1.1 Resorption und Metabolisierung der Flavonoide

3.1.1.1 Freisetzung des Flavonoid-aglykons

Flavonoide liegen in pflanzlichem Material häufig glycosidisch bzw. im hier untersuchten Weidenrindenextrakt überwiegend glucosidisch vor. Für eine Resorption muss diese glycosidische Bindung gespalten werden (Scalbert und Williamson 2000; Hollman 2004). Dies kann an drei Stellen passieren. Es konnte gezeigt werden, dass Flavonoid-glucoside bereits an der Mundschleimhaut einerseits von bakterieller andererseits vom Schleimhautepithel ausgehender β -Glucosidase Aktivität zum Aglykon gespalten werden können. Eine Resorption des Aglykons in der Mundschleimhaut wurde jedoch nicht beobachtet (Walle et al. 2005). Ein wichtiger Ort der Resorption und Metabolisierung der Flavonoide ist der Dünndarm. Im Gegensatz zu der oben genannten Flavonoid-glycosid-spaltung im vor Resorption, können hier die Flavonoid-glucoside über den Glucose Transporter SGLT1 (sodium dependent glucose transporter 1) in die Enterozyten aufgenommen werden und durch eine intrazelluläre β -Glucosidase C β G (cytosolic β -glucosidase) zum Aglykon gespalten werden (Scalbert und Williamson 2000; Nemeth et al. 2003; Walle 2004; Hollman 2004). Dieser beschriebene Resorptionsweg über SGLT1 unterliegt jedoch einer Regulierung durch einen massiven Efflux, gesteuert von einem apikalen Transporter MRP2 (multidrug resistance-associated protein 2). Dieser transportiert das aufgenommene Flavonoid-glucosid direkt zurück in das Darmlumen (Walle 2004). Durch die an den Mikrovilli lokalisierte, membrangebundene LPH (lactase phloridzin hydrolase) kann ebenfalls eine Spaltung von Flavonoid-glucosiden erfolgen, was den verbleibenden Aglyka eine passive Diffusion in die Enterozyten erlaubt (Scalbert und Williamson 2000; Nemeth et al. 2003; Walle 2004; Hollman 2004). Abschließend konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse von Flavonoid-glykosiden auch durch bakterielle Enzyme erfolgt (Rechner et al. 2004). Dies ist in der Hauptsache auf im Dickdarm befindliche β -Glucosidase und α -Rhamnosidase Aktivität von Bakterien zurückzuführen (Aura 2008). Abschließend bleibt zu bemerken, dass die C β G sowie die LPH Aktivität gegenüber Flavonoid-glucosiden besitzen, während andere Glycoside wie -rhamnoside hauptsächlich im Kolon metabolisiert werden (Scalbert und Williamson 2000; Hollman 2004).

3.1.1.2 Phase-II-Konjugation

Nach Flavonoid-glykosid-Applikation konnten nur selten freie Aglyka im Blut beobachtet werden (Scalbert et al. 2002). Die Hauptmetaboliten im Serum stellen glucuronidierte, sulfatierte oder gemischte Verbindungen dar (Hollman 2004; Santos-Buelga et al. 2012). Diese Verbindungen

können direkt in den Enterozyten oder im Zuge der enterohepatischen Phase-II-Metabolisierung entstehen. Das in den Enterozyten durch passive Diffusion aufgenommene Flavonoid-aglykon kann durch UGT (UDP-Glucuronosyltransferase) und SULT (Sulfotransferase) zu den korrespondierenden Phase-II-Metaboliten umgesetzt werden (Walle 2004; Scalbert et al. 2002; Scalbert und Williamson 2000). Die Aglyka werden einerseits über das MRP3 (multidrug resistance-associated protein 3) in den systemischen Kreislauf aufgenommen, andererseits können sie über das MRP2 in das Darmlumen zurücktransportiert werden und stehen dann der bakteriellen Metabolisierung zur Verfügung (Walle 2004). Eine chinesische Arbeitsgruppe beschrieb zusätzlich einen lokalen Recyclingmechanismus. Das in den Enterozyten gebildete Flavonoid-glucuronid Wogonin wurde ins Darmlumen zurücktransportiert, durch enterale β -Glucuronidase wieder gespalten und stand somit zur Resorption in die Enterozyten wieder zur Verfügung (Xia et al. 2012). In der Leber werden die über das Pfortadersystem transportierten Flavonoid-aglyka, Phase-II-Metaboliten oder Spaltprodukte der Flavonoide durch die Leberenzyme verstoffwechselt. Durch β -Glucuronidase Aktivität kann es zur Abspaltung der Glucuronsäure kommen (O'Leary et al. 2003). UGT und SULT der Leber lassen neue glucuronidierte und sulfatierte Verbindungen entstehen (O'Leary et al. 2003). Über die Galle werden diese wieder in das Darmlumen abgegeben und der enterohepatische Kreislauf schließt sich. Eine Vorhersage, welche Phase-II-Metaboliten entstehen, ist schwer zu treffen. Die SULT- und die UGT-Familie sind in viele Isoenzyme unterteilt, welche sich in Leber und in den intestinalen Geweben unterschiedlich verteilen. Außerdem besitzen sie unterschiedliche Substratspezifität gegenüber den Flavonoidklassen (Wu et al. 2011). Eine weitere Konjugationsreaktion ist die Methylierung von Flavonoiden mit Catecholstruktur. Diese können über die COMT (Catechol-O-Methyltransferase), welche in vielen Geweben vorkommt, mit einer Methylgruppe versehen werden (Scalbert und Williamson 2000; Hollman 2004). Im Zuge dessen kann es auch über die Cytochrom P 450 (CYP P450) Enzyme zu Demethylierungen des Flavonoids kommen. Eine Demethylierung wurde aber ausschließlich an der 4'-Position, nicht an der 3'-Position des B-Rings nachgewiesen (Scalbert und Williamson 2000).

3.1.1.3 Metabolisierung durch die Darmmikroflora

Die über den enterohepatischen Kreislauf rücktransportierten Flavonoid-metaboliten sowie nicht resorbierte Flavonoid-glykoside als auch die der lokalen enterischen Metabolisierung unterliegenden Flavonoide gelangen in das Kolon und können dort von der Mikroflora metabolisiert werden (Scalbert und Williamson 2000; **Abb. 14**). Das Kolon enthält ca. 10^{12} Mikroorganismen/cm³ (Scalbert und Williamson 2000). Diese Mikroflora besitzt ein großes Potential, Flavonoide zu modifizieren. Flavonoid-glucuronide oder auch -glykoside werden hier gespalten (Aura 2008). Das

Flavonoid-aglykon kann von den Bakterien ebenfalls zersetzt werden. Dies erfolgt über eine Spaltung des C-Rings des Flavonoids und es entstehen kleinere phenolische Verbindungen (Aura 2008). Im Folgenden soll explizit auf die denkbare Metabolisierung der Flavanone eingegangen werden, da diese die mengenmäßig dominierenden Flavonoide im hier untersuchten Weidenrindenextrakt darstellen.

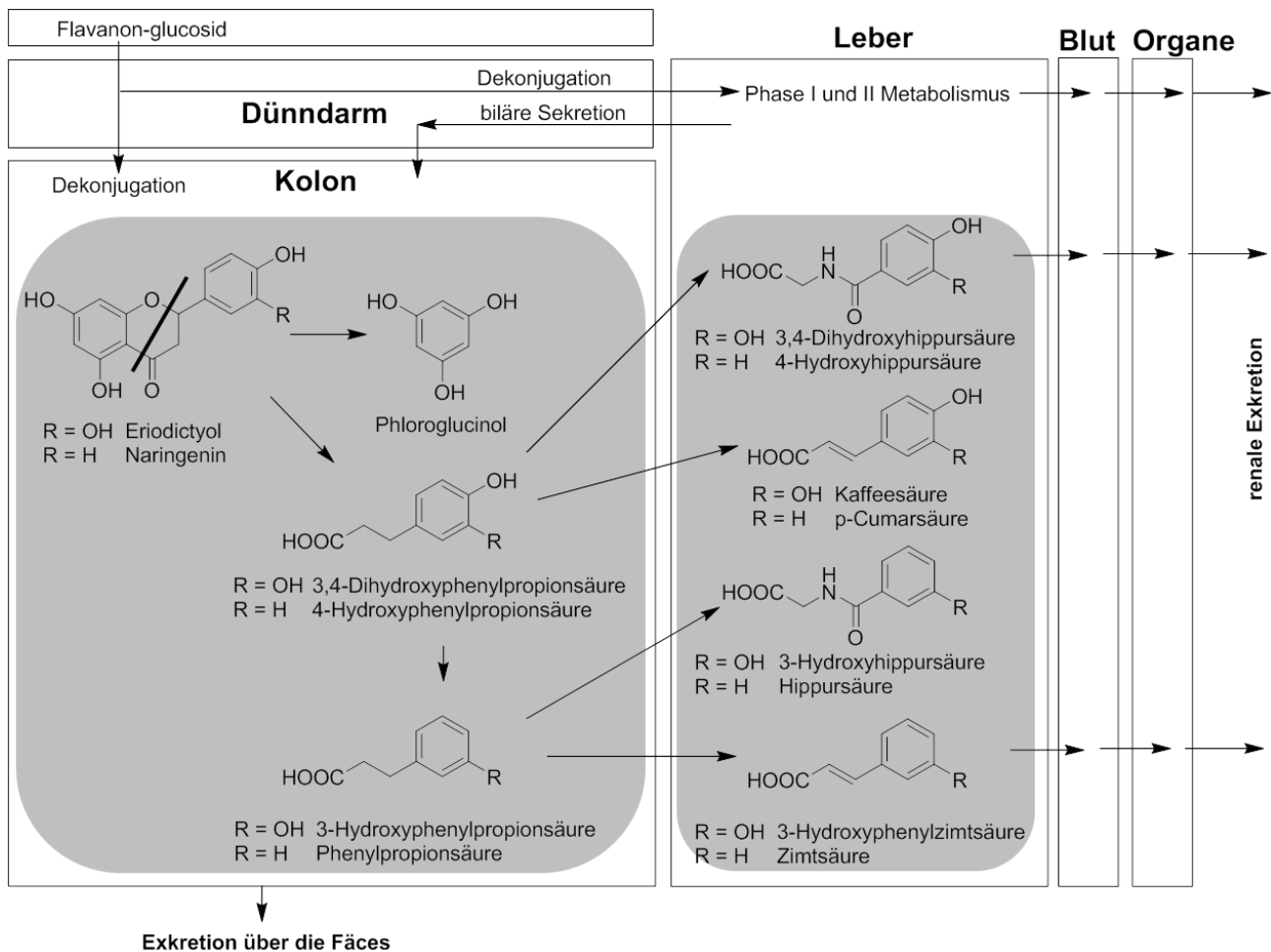


Abb. 14 Schema zur Resorption, Metabolisierung, Verteilung und Eliminierung von Flavonoiden nach van Duynhoven et al. (2011) und mögliche Metabolisierung von Flavanonen durch die Mikroflora des Kolons über Spaltung des C-Rings zu kleineren phenolischen Verbindungen (Rechner et al. 2004); Nach Resorption kann es in der Leber zu oxidativen Prozessen (z.B. β -Oxidation) und Kopplungsreaktionen kommen; Exemplarisch ist hier die Kopplung an Glycin dargestellt.

Durch bakterielle β -Glucosidase, β -Glucuronidase oder Sulfatase-Aktivität entstehen die Flavanon-aglyka (Hollman 2004; Aura 2008). Bezüglich der Weidenrinde sind hierbei besonders Naringenin und Eriodictyol von Bedeutung. Durch C-Ring Spaltung können Bruchstücke mit intaktem A-Ring entstehen, wie Phloroglucinol (Rechner et al. 2004). Bei den Bruchstücken mit intaktem B-Ring handelt es sich um C_6 - C_3 -Körper wie 4-Hydroxyphenylpropionsäure. Zusätzlich wurde eine

Dehydroxylierung des phenolischen Rings beobachtet (Rechner et al. 2004). Diese Ringspaltprodukte gelangen nach Resorption in den enterohepatischen Kreislauf (Hollman 2004). Über die verschiedenen Prozesse der Leber können sie modifiziert werden. Oxidation, β -Oxidation oder Konjugation mit Glucuronsäure, Sulfat bzw. Glycin wurden nachgewiesen (Rechner et al. 2002; Hollman 2004; Aura 2008). So können an der Seitenkette ungesättigte Phenolcarbonsäuren, wie Kaffeesäure und Cumarsäure oder an Glycin gekoppelte, durch β -Oxidation verkürzte C_6 - C_1 -Körper wie 4-Hydroxyhippursäure, entstehen (Rechner et al. 2004; Heilmann und Merfort 1998). Freie C_6 - C_1 Körper, wie 4-Hydroxybenzoesäure, wurden im Urin detektiert (Roowi et al. 2009). Ein Schema zum möglichen Metabolisierung von Eriodictyol und Naringenin durch bakterielle Ringspaltung ist in **Abb. 14** dargestellt. Zusätzlich sind Methylierungen für viele entstehende Ringspaltprodukte, welche eine Catecholstruktur besitzen, über die COMT denkbar (Rechner et al. 2002). Diese Ergebnisse stützen sich meist auf die *in vitro* Untersuchung mit Hilfe von humanen fäkalen Mikroorganismen. Welche dieser möglichen Metaboliten entstehen, ist stark von der vorhandenen Mikroflora abhängig. Zudem ist das Resorptionsverhalten dieser Metaboliten jedoch noch nicht ausreichend untersucht. Roowi et al. (2009) postulierte für das Flavanon Hesperetin eine Ringspaltung zwischen der Ether-O-Verknüpfung und dem A-Ring und zwischen C4 und A-Ring, da Verbindungen wie 3-Hydroxyphenylhydracrylsäure im Urin detektiert wurden. Ein weiterer Abbau zu C_6 - C_2 -Körpern, wie 3-Hydroxyphenylelessigsäure wurde daraus abgeleitet, da diese ebenfalls im Urin nachgewiesen wurden (Roowi et al. 2009). Alternativ könnten C_6 - C_2 -Körper über eine bakterielle α -Oxidation der C_6 - C_3 -Körper entstehen (Orrego-Lagaron et al. 2015).

3.1.2 Klinische Prüfung

Aus den Serumproben einer pharmakokinetischen Studie mit einem Weidenrindenpräparat sollen Phase-II-Metaboliten von phenolischen Inhaltsstoffen, insbesondere von Flavonoiden, identifiziert und ein Metabolitenprofil über 24 h erstellt werden. Die Vorbereitung und Durchführung der klinischen Studie wurde von Susanne Knuth und Mitarbeiter übernommen (Knuth et al. 2013). Hierbei wurde die für die klinische Prüfung notwendige Genehmigung des BfArM und eine positive Bewertung der Ethikkommission der bayerischen Ärztekammer eingeholt. Ebenfalls wurde eine EudraCT Nummer (2011-001829-24) sowie ein Studiencode (WBCat-1) bei der European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials (EudraCT) beantragt. Als Prüfmedikation wurde Optovit® ActiFLEX, ein Weidenrindentrockenextrakt in Tablettenform der Firma Hermes Arzneimittel gewählt (genauere Angaben sind **Tab. 33**, **S.106** zu entnehmen). Die Tagesmaximaldosis von vier Tabletten à 393 mg (entsprechend 240 mg Salicin) wurde von den Studienteilnehmern

eingegenommen, und es erfolgten jeweils 11 Blutentnahmen zwischen 0-24 h nach Applikation. Es wurden zehn Probanden rekrutiert, zusammengesetzt aus fünf Frauen (22-24 Jahre, Body-Mass-Index (BMI) 20,1-24,8 (kg/m²)) und fünf Männern (21-28 Jahre, BMI 21,5-23,8 (kg/m²)). Vier Frauen und vier Männer dieser Probanden erhielten die Prüfmedikation und zwei Probanden erhielten keine Medikation, hielten sich aber an den Diätplan und nahmen am Kinetiktag an den Blutabnahmen und Mahlzeiten teil. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch polyphenolische Inhaltsstoffe der Nahrung zu unterbinden, wurde ein strenger Diätplan erstellt und eingehalten (vgl.

Tab. 24, S.92).

3.2 Ergebnisse und Diskussion

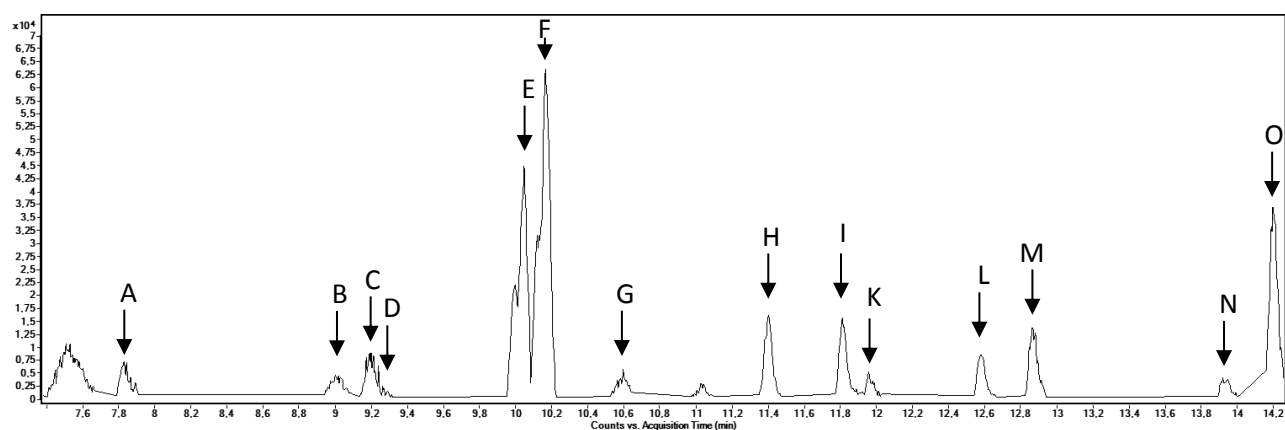
3.2.1 Metaboliten-Datenbank

Die Analyse der Serumproben erfolgte nach Aufarbeitung mittels HPLC-MS. Da in der Prüfmedikation ein breites Spektrum an genuinen polyphenolischen Verbindungen zu erwarten war und sich daraus ein umso größeres Spektrum an zu erwartenden polyphenolischen Metaboliten ergab, wurde eine Datenbank angelegt. Diese enthielt alle denkbaren polyphenolischen Inhaltsstoffe des Weidenrindenextrakts sowie Phase-II-Metaboliten aller Flavonoide und anderer Phenole. Die eingetragenen Phase-II-Metaboliten waren mono-sulfatierte und –glucuronidierte, diglucuronidierte sowie mit Glycin gekoppelte Verbindungen und gemischte Glucuronid-sulfate. Ebenfalls in die Datenbank aufgenommen wurden die denkbaren Flavonoid-Spaltprodukte der Metabolisierung der Mikroflora (vgl. **3.1.1.3, S.59**). Zudem wurden mögliche Phase-II-Metaboliten der Spaltprodukte berücksichtigt. Um möglichst alle Metaboliten in den Serumproben zu erfassen, wurde die Datenbank in eine Reportmethode eingebettet und jeder HPLC-MS Lauf damit ausgewertet (vgl. **3.4.5.1, S.99**). Das sich daraus ergebende Metabolitenprofil wurde gegen die Kontroll-gruppe und die in den Serumproben zum Zeitpunkt $t=0$ befindlichen Metaboliten abgeglichen und falls dort vorhanden, nicht berücksichtigt.

3.2.2 Zusammensetzung der Prüfmedikation

3.2.2.1 Qualitative Zusammensetzung

Um einen Überblick der qualitativ und quantitativ verabreichten Substanzen der Prüfmedikation Optovit® ActiFLEX zu erhalten, wurde ein Dragee des Fertigarzneimittels zerkleinert und mit Acetonitril zu 100 ml gelöst. Nach einer 1:100 Verdünnung mit Acetonitril ($c_{\text{end}}=39 \mu\text{g/ml}$) wurde es mittels HPLC-MS qualitativ untersucht. Nach Datenbank-Analyse und zusätzlicher Überprüfung durch Extraktion der verschiedenen relevanten Massen, konnten die in **Abb. 15** gezeigten Massen in der Prüfmedikation ermittelt werden. Neben Salicylsäure, Saligenin und Catechol (**A, C** und **D** in **Abb. 15**) fanden sich hauptsächlich Vertreter der Flavonoid- und Chalkon-glucoside. Es wurde die Masse von Naringenin-glucosid (Masse_{exakt} m/z 434,1213) vier Mal zu verschiedenen Retentionszeiten (**E, F, H** und **I** in **Abb. 15**) ermittelt, was auf das Substitutionsmuster (7-O- und 5-O-glucosid), die Auftrennung der Diastereomeren ((2R/2S)-5-O-glucoside) und der Massegleichheit mit dem korrespondierenden Chalkon Isosalipurposid zurückzuführen ist.



	RT (min)	<i>m/z</i> (exp.)	Error (ppm)	Score (%)	Summen- formel	Mögliche Verbindung
A	7,83	138,0320	2,26	87,01	C ₇ H ₆ O ₃	Salicylsäure
B	9,00	290,0796	2,06	83,06	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	Catechin
C	9,19	124,0523	0,53	86,88	C ₇ H ₈ O ₂	Saligenin
D	9,38	110,0295	0,20	86,83	C ₆ H ₆ O ₂	Catechol
E	10,04	434,1220	1,61	97,88	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	Naringenin-glucosid
F	10,16	434,1220	1,51	97,46	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	Naringenin-glucosid
G	10,62	450,1088	0,50	80,94	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	Eriodictyol-glucosid, Dihydrokämpferol-glucosid
H	11,40	434,1220	1,54	85,48	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	Naringenin-glucosid, Isosalipurposid
I	11,81	434,1220	1,63	80,59	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	Naringenin-glucosid, Isosalipurposid
K	11,96	288,0640	2,08	76,33	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	Eriodictyol, Dihydrokämpferol
L	12,58	580,1588	1,21	69,91	C ₃₀ H ₂₈ O ₁₂	Cumaroyl-naringenin-glucosid
M	12,87	580,1588	1,25	95,19	C ₃₀ H ₂₈ O ₁₂	Cumaroyl-naringenin-glucosid
N	13,93	580,1590	1,56	72,16	C ₃₀ H ₂₈ O ₁₂	Cumaroyl-isosalipurposid
O	14,20	272,0688	1,26	99,04	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	Naringenin

Abb. 15 TCC (total compound chromatogram) und die daraus ermittelten Massen der Prüfmedikation; Bezifferung **A-O** des TCC bezieht sich auf die Zuweisung in der darunterliegenden Tabelle; RT: Retentionszeit, Masse (exp.): ermittelte exakte Masse; Gradient FM2.

Dasselbe gilt für das cumaroylierte Derivat des Naringenin-glucosids. Es wurde zu drei Retentionszeiten detektiert (**L**, **M** und **N** in **Abb. 15**). Die Massen des Eriodictyol-glucosids und dessen Aglykons (Masse_{exakt} 450,1162 und 288,0685) konnten ermittelt werden, wobei wegen der Massegleichheit nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es sich um Dihydrokämpferol, einem weiteren für Weidenrinde beschriebenen Flavonoid, handelte (**G** und **K** in **Abb. 15**) (Freischmidt 2011). Des Weiteren konnten die Massen von Naringenin und Catechin (Masse_{exakt} 272,0685 und 290,0790) zugeordnet werden (**B** und **O** in **Abb. 15**). Für eine möglichst vollständige Übersicht der in der Prüfmedikation enthaltenen Polyphenole, wurde ein Dragee zusätzlich mit einem anderen Extraktionsmittel (Methanol/Wasser (7/3, V/V)) nach Zerkleinerung zu 100 ml gelöst und mittels HPLC-DAD und Vergleich mit entsprechenden Standardsubstanzen analysiert (**Abb. 16**). In der Prüfmedikation enthalten waren Dihydrokämpferol-7-*O*- β -D-glucosid (**A**), (2*R*/2*S*)-Naringenin-5-*O*- β -D-glucosid (**B** und **C**), Naringenin-7-*O*- β -D-glucosid (**D**), Dihydrokämpferol (**E**), Isosalipurposid (**F**), Eriodictyol (**G**), 6''-*O*-*trans*-*p*-Cumaroyl-(2*R*/2*S*)-naringenin-5-*O*- β -D-glucosid (**H** und **I**), Naringenin (**K**) und 6''-*O*-*trans*-*p*-Cumaroyl-isosalipurposid (**L**, alle in **Abb. 16**). Diese Ergebnisse stimmten mit den MS-Daten nahezu überein. Aus der HPLC-DAD Bestimmung ist außerdem ersichtlich, dass in der Prüfmedikation sowohl Dihydrokämpferol als auch Eriodictyol vorkamen.

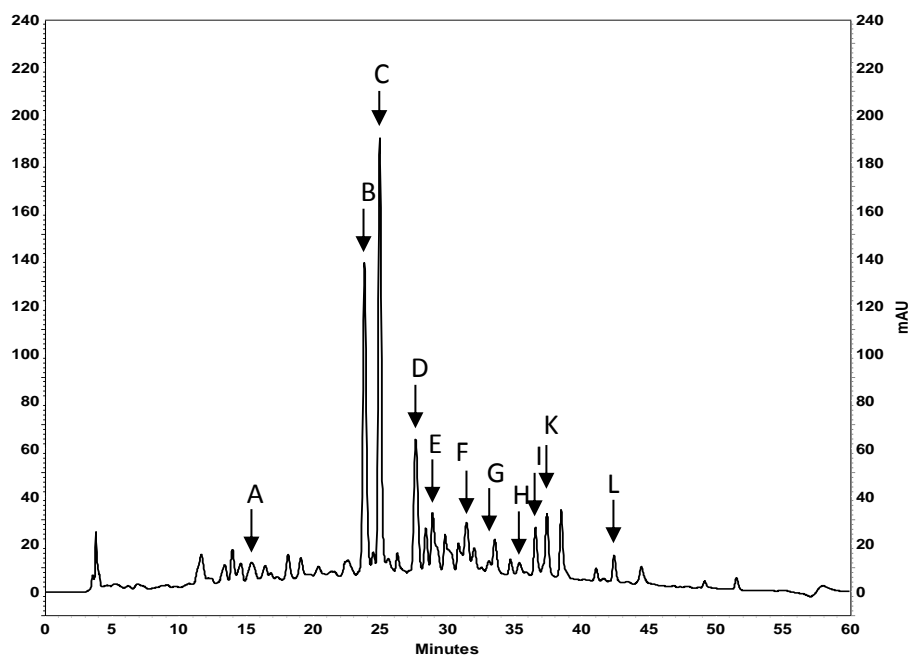


Abb. 16 Übersichtschromatogramm der relevanten Polyphenole in der Prüfmedikation ($C_{\text{end}}=3,9 \text{ mg/ml}$); **A**: Dihydrokämpferol-7-*O*- β -D-glucosid, **B** und **C**: (2*R*/2*S*)-Naringenin-5-*O*- β -D-glucosid, **D**: Naringenin-7-*O*- β -D-glucosid, **E**: Dihydrokämpferol, **F**: Isosalipurposid, **G**: Eriodictyol, **H** und **I**: 6''-*O*-*trans*-*p*-Cumaroyl-(2*R*/2*S*)-naringenin-5-*O*- β -D-glucosid, **K**: Naringenin, **L**: 6''-*O*-*trans*-*p*-Cumaroyl-isosalipurposid; Gradient FM1 (289 nm).

3.2.2.2 Quantitative Zusammensetzung

Zusätzlich zur qualitativen Untersuchung des Prüfmedikaments wurde es mit den in **Kapitel 2** beschriebenen Methoden quantitativ untersucht. So belief sich die verabreichte Gesamtcatecholmenge auf 26,72 mg und die Gesamt-naringeninmenge auf 29,08 mg. Der Gesamt-eriodictyolgehalt lag knapp außerhalb des in **Kapitel 2** (vgl. **2.2.1.3, S.24**) vorgegebenen LOQs, der hier ermittelte Wert von 1,57 mg kann deshalb nur als Anhaltspunkt dienen, was somit auch für die verabreichte Gesamt-flavanonmenge von 30,65 mg gilt. Laut Packungsbeilage des Prüfmedikaments war dieses auf eine Gesamt-salicylalkoholmenge von 60 mg pro Tablette standardisiert. Somit wurden 240 mg Gesamt-salicin verabreicht. Als Übersicht der applizierten Mengen an Polyphenolen dient **Tab. 16**. Verschiedene Studien zur Pharmakokinetik von Naringenin (verabreichte Menge 3,8-199 mg) aus Tomaten, Orangensaft oder Grapefruitsaft ermittelten maximale Plasmakonzentrationen an Naringenin nach enzymatischer Aufarbeitung mit Sulfatase und β -Glucuronidase von 0,12-5,99 μ M (Erlund et al. 2001; Bugianesi et al. 2002; Manach et al. 2003; Manach et al. 2005; Kanaze et al. 2007). Die im Rahmen dieser Studie verabreichte einmalige Menge von ca. 30 mg Naringenin lag damit im unteren Bereich, bezogen auf die Literaturdaten.

Tab. 16 Quantitative Zusammensetzung der Prüfmedikation Optovit® ActiFLEX; ^a bezieht sich auf die ermittelten Gehalte in **Kapitel 2**; ^b ermittelt analog zu **Kapitel 2**, jedoch unter dem LOQ für Eriodictyol; ^c gemäß den Angaben des Herstellers.

Verbindung	Gehalt (%)	Verabreichte Menge (mg)
Catechol (Gesamt) ^a	1,70	26,72
Naringenin (Gesamt) ^a	1,85	29,08
Eriodictyol (Gesamt) ^b	0,10	1,57
Flavanone (Gesamt) ^a	1,95	30,65
Salicylalkoholderivate (Gesamt) ^c	15,27	240,00

3.2.3 Screening der Phase-II-Metaboliten von Polyphenolen durch HPLC-MS Analyse im Serum gesunder Probanden nach Einnahme eines Weidenrindenextrakts

3.2.3.1 Probenvorbereitung

Die Serumproben (270 µl) der zehn Probanden (zwei davon Kontrolle) von je t=0-24 h wurden mit einem ascorbinsäurehaltigen (10 mg/ml) Natriumacetatpuffer (30 µl) versetzt, um die enthaltenen Polyphenol-metaboliten zu stabilisieren. Durch eine 1:3 Fällung mit Acetonitril wurden die Proteine denaturiert und abzentrifugiert. Aufgrund der geringen verabreichten Menge an Flavonoiden wurden die Serumproben aufkonzentriert. Hierzu wurden die Analysen (1200 µl) unter Stickstoff zur Trockne eingeeengt und in 100 µl 0,1% Ameisensäure in Wasser und 50 µl Acetonitril 95% aufgenommen, geschüttelt und zentrifugiert. Nach Membranfiltration wurden die Analysen direkt an der HPLC-MS vermessen und über eine Reportmethode mit integrierter Datenbank analysiert. Nach Abgleich mit den zum Zeitpunkt t=0 und in der Kontroll-gruppe ermittelten Massen konnten 21 mögliche polyphenolische Phase-II-Metaboliten ermittelt werden.

3.2.3.2 Phase-II-Metaboliten der Flavonoide

Die in **Tab. 17** angegebenen acht Verbindungen stellen die ermittelten glucuronidierten, sulfatierten und gemischt glucuronidierten / sulfatierten Flavonoid-metaboliten im Serum dar. Die Retentionszeiten, die experimentell ermittelten Massen $[M-H]^-$, die Angabe zur Abweichung von der theoretischen Masse (Error) sowie der sich aus einem Programmalgorithmus errechnende Score sind hier beispielhaft für einzelne Probanden angegeben (**Tab. 17**). Es konnte die Masse von Naringenin-glucuronid **1a/b** zu zwei verschiedenen Retentionszeiten detektiert werden, die Masse des Eriodictyol-glucuronids bzw. des massегleichen Dihydrokämpferol-glucuronids **2a-c** zu drei verschiedenen Retentionszeiten. Das Vorhandensein mehrerer Retentionszeiten weist auf verschiedene Konjugationspositionen am Aglykon hin, da für Naringenin bevorzugt eine Konjugation mit Glucuronsäure an C7 und C4' beschrieben ist (Brett et al. 2009). Für Eriodictyol respektive Dihydrokämpferol sind drei Glucuronidierungspositionen denkbar (C7, C3' und C4' für Eriodictyol; C3, C4' und C7 für Dihydrokämpferol).

Es wurden zwei gemischt glucuronidierte / sulfatierte Verbindungen detektiert. Die Massen von Verbindungen **3a/b** und **4** entsprechen Naringenin-glucuronid-sulfat und Catechin-glucuronid-sulfat.

Verbindungen **3a/b** wurden zusätzlich zu zwei unterschiedlichen Retentionszeiten ermittelt, was auf einen strukturellen Unterschied bei Massegleichheit hindeuten könnte.

Die größte Heterogenität fand sich unter den sulfatierten Metaboliten. Es konnten vier Massen unterschiedlicher Sulfate ermittelt werden. Naringenin-sulfat **5a/b** zu zwei unterschiedlichen Retentionszeiten, Catechin-sulfat **6**, Eriodictyol-sulfat / Dihydrokämpferol-sulfat **7** und Taxifolin-sulfat **8**. Die zum Metaboliten **7** passende Masse konnte im Gegensatz zur Masse der korrespondierenden glucuronidierten Verbindungen **2a-c** nur zu einer Retentionszeit ermittelt werden. Dies könnte auf eine selektive Entstehung nur einer sulfatierten Verbindung hinweisen oder auf eine zu geringe Konzentration der anderen Sulfate (unterhalb des Detektionslimits von 1000 Counts).

Das mögliche Aglykon der Verbindung **8** stellt keine genuin in der Prüfmedikation enthaltene Substanz dar. Es zeigte sich hier nicht nur eine Sulfatierung sondern zusätzlich eine Hydroxylierung am Aglykon. Taxifolin als Grundkörper ist hier lediglich eine Möglichkeit. Eine Hydroxylierung könnte auch an anderen Positionen am Aglykon stattfinden.

Als Kontrolle für eine stabile Retentionszeit und genügender Detektorsensitivität diente Naringenin-7-O- β -D-glucuronid (10 μ M), welches jeweils nach ca. acht Serumanalysen vermessen wurde. EIC (extracted ion chromatogram) und MS-Spektren zu Verbindung **1-8** sind unter **8.1**, **S.169** abgebildet. Es wurden zusätzlich die Massen zu einem diglucuronidierten Naringenin und einem methylierten Catechin-sulfat ermittelt, die Identifizierung mittels MS/MS-Fragmentierung blieb jedoch noch ergebnislos. Mit Hilfe von Referenzsubstanzen könnten diese Metaboliten zusätzlich identifiziert werden. Alle weiteren in der Metaboliten-Datenbank (**Tab. 30**, **S.99**) gelisteten Verbindungen wurden in den Probandenserum nach Einnahme des Weidenrindenpräparats nicht detektiert. Darunter waren auch intakte dimere Flavan-3-ole und deren Phase-II-Metaboliten, welche im Serum nicht nachgewiesen werden konnten.

Tab. 17 Phase-II-Metaboliten der Flavonoide identifiziert in humanem Blutserum von Proband 2 bzw. 4 zum Zeitpunkt $t=0,5$ bzw. 1 h nach Einnahme eines Weidenrindenextrakts mittels HPLC-MS, klassifiziert nach Konjugationsreaktion; #: Nummer der Verbindung, RT: Retentionszeit, NAR: Naringenin, ERI: Eriodictyol, CAT: Catechin, TAX: Taxifolin; Gradient FM2.

Phase-II-Reaktion	#	RT (min)	[M-H] ⁻ (experimentell)	Error (ppm)	Score (%)	Summen-formel	Möglicher Metabolit
Glucuronidierung	1a	9,73	447,0941	1,66	98,46	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	NAR-glucuronid
	1b	9,79	447,0940	1,09	99,27		
	2a	7,72	463,0881	0,27	66,24	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	ERI-glucuronid
	2b	9,64	463,0889	1,29	79,77		
	2c	10,00	463,0884	0,92	79,62		
Sulfatierung und Glucuronidierung	3a	8,36	527,0501	1,35	65,74	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	NAR-glucuronid-sulfat
	3b	9,40	527,0502	1,47	53,68		
	4	9,79	545,0623	3,00	85,19	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₅ S	CAT-glucuronid-sulfat
Sulfatierung	5a	11,28	351,0184	0,78	98,54	C ₁₅ H ₁₂ O ₈ S	NAR-sulfat
	5b	11,69	351,0184	1,05	98,96		
	6	8,57	369,0291	1,52	97,59	C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	CAT-sulfat
	7	11,48	367,0133	1,00	98,47	C ₁₅ H ₁₂ O ₉ S	ERI-sulfat
	8	10,04	383,0085	0,97	98,29	C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	TAX-sulfat

3.2.3.3 Phase-II-Metaboliten phenylpropanoider Verbindungen

Neben den Phase-II-Metaboliten der Flavonoide konnten sieben weitere phenolische Metaboliten bestimmt werden (**Tab. 18**). Es handelte sich hierbei hauptsächlich um sulfatierte Metaboliten. Die Verbindungen **9** und **12** stellen das Glucuronid und das Sulfat des Catechols dar. Sie wurden im Rahmen dieser klinischen Studie bereits identifiziert (Knuth et al. 2013). Eine weitere glucuronidierte Verbindung **10** mit einer Masse, die dem Saligenin-glucuronid entspricht, wurde ermittelt. Das korrespondierende Sulfat **13** des Saligenins konnte ebenfalls gefunden werden. Saligenin war in der Prüfmedikation enthalten, außerdem ist Saligenin ein Zwischenprodukt der Metabolisierung von Salicin zur Salicylsäure (Steinegger und Hovel 1972). Bei Verbindung **11** könnte es sich um das Sulfat der Salicylsäure handeln. Die Metaboliten **14** und **15** stellen sulfatierte C₆-C₃-Körper dar. Ermittelt werden konnten außerdem die Massen von Ferulasäure-sulfat **14** und Hydroxyphenylpropionsäure-sulfat **15**. Da Cumarsäure nach eigenen Ergebnissen zwar nicht frei in der Prüfmedikation detektiert werden konnte, aber mit verschiedenen Flavonoid-glucosiden verestert ist, könnte eine Freisetzung und Resorption dieser Cumarsäure ebenso möglich sein wie

die Entstehung nach C-Ring Spaltung von Naringeninderivaten. Verbindung **14** könnte einen Metaboliten der Cumarsäure darstellen. Die freie, nicht an Sulfat gebundene Form von **15** stellt ein Ringspaltprodukt des Naringenins dar (Orrego-Lagaron et al. 2015). **15** könnte über oxidative Prozesse und Methylierung via COMT zu Verbindung **14** reagieren. EIC und MS-Spektren der Verbindungen **9-15** sind unter **8.1, S.169** abgebildet. Während der Experimente wurde auch die Masse des Cumarsäure-sulfats ermittelt, jedoch konnte dessen Identität noch nicht mittels MS/MS bestätigt werden. Zusätzlich gab es Hinweise auf viele weitere phenolische Metaboliten. Darunter waren die Massen von C₆-C₃-Körpern, wie Kaffeesäure-sulfat und von C₆-C₁-Körpern sowie teils sulfatierte oder glucuronidierte trihydroxylierte Benzoessäure bzw. -aldehyd. Die beiden letztgenannten könnten Ringspaltprodukte darstellen und Derivate des Flavonoid A-Rings oder von Flavan-3-olen sein. Aufgrund der sehr heterogenen Verteilung im Probandenkollektiv konnte jedoch keine definitive Aussage zur Identität dieser C₆-C₁-Körper getroffen werden. Die Untersuchung einer größeren Kohorte könnte eine Strategie zur Identifizierung darstellen.

Tab. 18 Andere phenolische Verbindungen identifiziert in humanem Blutserum von Proband 6 bzw. 1 zum Zeitpunkt t=1 h nach Einnahme eines Weidenrindenextrakts mittels HPLC-MS, klassifiziert nach Konjugationsreaktion; #: Nummer der Verbindung, RT: Retentionszeit, CL: Catechol, SG: Saligenin, SS: Salicylsäure, FS: Ferulasäure, HPPS: Hydroxyphenylpropionsäure; Gradient FM2.

Phase-II-Reaktion	#	RT (min)	[M-H] ⁻ (experimentell)	Error (ppm)	Score (%)	Summenformel	Möglicher Metabolit
Glucuronidierung	9	5,51	285,0619	0,08	94,26	C ₁₂ H ₁₄ O ₈	CL-glucuronid
	10	7,18	299,0766	0,80	52,86	C ₁₃ H ₁₆ O ₈	SG-glucuronid
Sulfatierung	11	8,43	216,9813	4,24	88,12	C ₇ H ₆ O ₆ S	SS-sulfat
	12	7,86	188,9862	0,37	97,51	C ₆ H ₆ O ₆ S	CL-sulfat
	13	7,05	203,0019	0,24	99,16	C ₇ H ₈ O ₅ S	SG-sulfat
	14	4,91	273,0081	1,10	69,96	C ₁₀ H ₁₀ O ₇ S	FS-sulfat
	15	9,50	245,0135	1,75	92,97	C ₉ H ₁₀ O ₆ S	HPPS-sulfat

3.2.3.4 Weitere phenolische Verbindungen

Neben den zahlreichen mit Sulfat oder Glucuronsäure konjugierten Verbindungen konnten die Massen eines freien und eines an Glycin gebundenen Metaboliten, der Salicylsäure **16** und der Salicylursäure **17**, detektiert werden (**Tab. 19**). Bei Verbindung **17** könnte es sich aufgrund der Massengleichheit ebenfalls um 4-Hydroxyhippursäure oder 3-Hydroxyhippursäure handeln. Diese Metaboliten könnten durch Flavonoid-Ringspaltung entstanden sein. EIC und MS-Spektren zu Verbindungen **16** und **17** sind unter **8.1, S.169** abgebildet.

Tab. 19 Weitere phenolische Verbindungen identifiziert in humanem Blutserum von Proband 6 zum Zeitpunkt t=1 h nach Einnahme eines Weidenrindenextrakts mittels HPLC-MS; #: Nummer der Verbindung, RT: Retentionszeit, SS: Salicylsäure, SU: Salicylursäure; Gradient FM2.

#	RT (min)	[M-H] ⁻ (experimentell)	Error (ppm)	Score (%)	Summen- formel	Möglicher Metabolit
16	7,92	137,0241	2,41	99,10	C ₇ H ₆ O ₃	SS
17	7,96	194,0458	0,50	99,78	C ₉ H ₉ NO ₄	SU

3.2.4 Identifizierung der polyphenolischen Phase-II-Metaboliten

Da die durchgeführten HPLC-MS Analysen der Serumproben aller Probanden nur die exakten Massen der möglichen Phase-II-Metaboliten lieferten, können die unter **3.2.3** postulierten 17 Verbindungen nur unter Vorbehalt mit einem Substanznamen belegt werden. Es kann nicht definitiv ausgeschlossen werden, dass es sich bei den 17 Verbindungen um massengleiche Substanzen mit anderer Struktur handelt. Da polyphenolische, insbesondere Phase-II-Metaboliten der Flavonoide nicht oder nur sehr teuer beziehbar sind, wurden zunächst, nach enzymatischer Aufarbeitung der Serumproben mit Sulfatase und β -Glucuronidase, die Polyphenol-aglyka mittels MS und Retentionszeitvergleich mit entsprechenden Referenzsubstanzen identifiziert (vgl. **3.2.4.1**). Es erfolgte eine Absicherung der Ergebnisse der enzymatischen Aufarbeitung durch MS/MS Analyse der relevanten Massen der Phase-II-Metaboliten (vgl. **3.2.4.2**, **S.72**).

3.2.4.1 Identifizierung der polyphenolischen Aglyka nach enzymatischer Aufarbeitung

Die Serumproben von drei Probanden wurden wie unter **3.2.3.1**, **S.67** beschrieben aufgearbeitet. Zusätzlich wurden 270 μ l Blutserum derselben Probanden zeitgleich mit Sulfatase (3,5 mg) versetzt. Es wurden 30 μ l eines ascorbinsäurehaltigen (10 mg/ml), mit β -Glucuronidase versetzten (10 mg/ml) Natriumacetatpuffers zugesetzt und die Lösung bei 37 °C für 1,5 h inkubiert. Die beiden Enzyme wurden im Überschuss eingesetzt, da die in den Serumproben enthaltenen sulfatierten und glucuronidierten Verbindungen vollständig gespalten werden sollten. Die behandelten Analysen wurden nach Inkubation wie unter **3.2.3.1**, **S.67** beschrieben weiter aufgearbeitet und mittels HPLC-MS vermessen. Zusätzlich wurden Standardsubstanzen (10 μ M) möglicher Aglyka in 150 μ l 0,1% Ameisensäure / 95% Acetonitril (2:1) gelöst und analysiert. Die Standardproben wurden zusätzlich in Rattenserum gelöst, wie oben unter **3.2.3.1**, **S.67** beschrieben aufgearbeitet und vermessen. Die in Rattenserum durchgeführte Analyse der Standardsubstanzen diente zur Ermittlung des Einflusses der Matrix auf die Retentionszeit. In **Tab. 20** sind die ermittelten

Retentionszeiten der vermessenen Aglyka (RT (min) Aglykon Referenz) angegeben. Verbindungen **16** und **17** konnten über einen direkten Vergleich mit den in den Serumproben ermittelten Retentionszeiten der Salicylsäure bzw. der Salicylursäure zugeordnet werden (**Tab. 20**). Nach enzymatischer Hydrolyse konnten in den Serumproben die Massen des Naringenins, Catechols, Saligenins und der Ferulasäure ermittelt werden. Diese konnten über den Retentionszeitvergleich ihren Referenzsubstanzen zugeordnet werden (**Tab. 20**). Gleichmaßen waren die Massen der korrespondierenden Phase-II-Metaboliten und Verbindung **11**, das Sulfat der Salicylsäure nach Hydrolyse nicht mehr nachweisbar. So konnten **1a/1b**, **3a/b** und **5a/b** als Metaboliten des Naringenins, **9** und **12** als Metaboliten des Catechols, **10** und **13** als Metaboliten des Saligenins sowie **14** als Metabolit der Ferulasäure bestätigt werden. Jedoch wurden **2a-c**, **4**, **6-8** und **15** durch den enzymatischen Verdau nicht gespalten (**Tab. 20**). Es wurde kein korrespondierendes, freies Aglykon detektiert. Dies wurde von Donovan et al. (2006) für den Verdau mit Enzymen aus *Helix pomatia* bereits beobachtet. Auch dort wurden andere Sulfate gespalten das Quercetin-3'-O-sulfat jedoch nicht. Da die enzymatische Hydrolyse nur teilweise erfolgte und scheinbar nur für bestimmte Substrate möglich ist, könnte hier eine selektive Spaltung durch die verwendete Sulfatase aus *Helix pomatia* und der bovinen β -Glucuronidase vorliegen.

3.2.4.2 Identifizierung der polyphenolischen Phase-II-Metaboliten durch MS/MS-Fragmentierung

Da manche Phase-II-Metaboliten, besonders Sulfate, einer enzymatischen Aufarbeitung nicht oder in ungenügendem Ausmaß zugänglich waren, wurde eine MS/MS-Fragmentierung der relevanten Metaboliten durchgeführt. Hierzu wurden Serumproben von acht Probanden (nicht Kontroll-gruppe) der Blutentnahme-zeitpunkte 0,5 h und 1 h vorbereitet (**3.2.3.1**, **S.67**). Zusätzlich zur HPLC-MS Analyse wurden die relevanten Massen **1-15** in Kombination mit deren Retentionszeiten (vgl. **Tab. 17**; **Tab. 18** und **Tab. 19**) extrahiert und mittels Tandem-MS analysiert.

Tab. 20 Identifizierung der polyphenolischen Phase-II-Metaboliten in humanen Blutseren verschiedener Probanden zum Zeitpunkt t=0,5 bzw. 1 h nach Einnahme eines Weidenrindenextrakts mit Hilfe von MS/MS Fragmentierung und Vergleich der Retentionszeiten (RT) mit Referenzsubstanzen nach enzymatischer Hydrolyse (n. E. H.); #: Nummer der Verbindung, GluA: Glucuronyl-, SO₃: Sulfat-, n.d.: nicht detektiert, n.u.: nicht untersucht, exp.: experimentell, NAR: Naringenin, ERI: Eriodictyol, CAT: Catechin, TAX: Taxifolin, FS: Ferulasäure, HPPS: Hydroxyphenylpropionsäure, CL: Catechol, SG: Saligenin, SS: Salicylsäure, SU: Salicylsäure.

#	RT (min)	[M-H] ⁻ exp.	Fragment Ionen	RT (min) Aglykon n. E. H.	RT (min) Aglykon Referenz	Möglicher Metabolit
1a	9,73	447,0945	271,0625 (-GluA); 175,0258 (-NAR)	14,11	14,08	NAR-glucuronid
1b	9,79	447,0948	271,0620 (-GluA); 175,0254 (-NAR)			
2a	7,72	463,0882	n.d.	n.d.	13,60	ERI-glucuronid
2b	9,64	463,0874	287,0564 (-GluA);			
2c	10,00	463,0883	287,0563 (-GluA); 175,0213 (-NAR)			
3a	8,36	527,0508	n.d.	14,11	14,08	NAR-glucuronid-sulfat
3b	9,40	527,0508	n.d.			
4	9,79	545,0636	369,0250 (-GluA)	n.d.	9,19	CAT-glucuronid-sulfat
5a	11,28	351,0174	271,0611 (-SO ₃)	14,11	14,08	NAR-sulfat
5b	11,69	351,0199	271,0609 (-SO ₃)			
6	8,57	369,0292	289,0718 (-SO ₃)	n.d.	9,19	CAT-sulfat
7	11,48	367,0135	287,0563 (-SO ₃)	n.d.	13,60	ERI-sulfat
8	10,04	383,0079	303,0512 (-SO ₃)	n.d.	11,46	TAX-sulfat
9	5,51	285,0616	n.d.	9,25	9,38	CL-glucuronid
10	7,18	299,0783	123,0451 (-GluA)	9,11	9,17	SG-glucuronid
11	8,43	216,9819	137,0251 (-SO ₃)	7,90	7,96	SS-sulfat
12	7,86	188,9864	109,0302 (-SO ₃)	9,25	9,38	CL-sulfat
13	7,05	203,0028	123,0456 (-SO ₃)	9,11	9,17	SG-sulfat
14	4,91	273,0083	193,0504 (-SO ₃); 178,0260 (-CH ₃)	7,18	7,22	FS-sulfat
15	9,50	245,0494	165,0926 (-SO ₃); 79,9578 (-HPPS)	n.d.	n.d.	HPPS-sulfat
16	7,92	137,0241	n.u.	n.u.	7,96	SS
17	7,96	194,0458	n.u.	n.u.	7,99	SU

Das MS/MS Experiment wurde mit den Referenzsubstanzen Naringenin-7-O- β -D-glucuronid und Naringenin (je 10 μ M) etabliert. Als Referenzsubstanz der sulfatierten Verbindungen wurde 4-Methylumbelliferyl-sulfat (10 μ M) gewählt, die Stoßenergie betrug während des gesamten Experiments 15 eV. Die ermittelten Fragmentionen der Verbindungen **1-15** sind in **Tab. 20** aufgeführt. Bis auf Verbindung **2a** (erste Retentionszeit), **3a/b** und **9** konnte für alle Verbindungen eine Fragmentierung durch Verlust der Glucuronyl- oder Sulfateinheit beobachtet werden. Für **14** konnte zusätzlich ein Verlust der Methylgruppe beobachtet werden. Die gemischt glucuronidierte und sulfatierte Verbindung **4** zeigte nur eine Abspaltung der Glucuronyl-Einheit. Die Abspaltung der Sulfatgruppe wurde nicht beobachtet. Eventuell reichte die hier gewählte Stoßenergie für die Abspaltung der Sulfatgruppe nicht aus. Es konnten somit durch die kombinierte Analyse des Vergleichs der jeweiligen Retentionszeiten und der MS/MS-Fragmentierung 17 polyphenolische Metaboliten in humanem Blutserum nach Applikation der Tagesmaximaldosis eines Weidenrindenextrakts detektiert werden, darunter befanden sich die für Weidenrinde bereits bekannten Metaboliten Salicylsäure, Salicylursäure, Catechol-sulfat und -glucuronid (Pirker et al. 2004; Knuth et al. 2013). Für die mit dem Weidenrindenextrakt verabreichten Flavanon- und Chalkon-glucoside konnten eine Reihe an Phase-II-Metaboliten im Serum ermittelt werden. So konnten die Monoglucuronide von Naringenin und von Eriodictyol identifiziert werden. Da die Masse des Naringenin-glucuronids zu zwei Retentionszeiten und die Masse des Eriodictyol-glucuronids zu drei Retentionszeiten ermittelt werden konnte, handelte es sich wahrscheinlich um an verschiedenen Stellen des Aglykons glucuronidierte Phase-II-Metaboliten. Dies war mit den Ergebnissen einiger Arbeitsgruppen konsistent, welche ebenfalls Naringenin-glucuronid nach Applikation eines Orangensafts zu zwei Retentionszeiten detektierten und als Naringenin-7-O-glucuronid bzw. -4'-O-Glucuronid identifizierten (Zhang und Brodbelt 2004; Mullen et al. 2008; Bredsdorff et al. 2010). Für Eriodictyol wurde bisher nur nach Applikation in Ratten eine glucuronidierte Form im Urin beschrieben (Miyake et al. 2000). Denkbar wäre auch, dass es sich um Diastereomerenpaare handelt, da sowohl Naringenin als auch Eriodictyol an C2 ein Stereozentrum besitzen. Im Falle des zweiten Peaks, der dem Naringenin-glucuronid zugeordnet werden kann, könnte es sich auch um das ringoffene Chalkon handeln, welches dieselbe Masse aufweist. Endgültig ließe sich dies aber nur mit Referenzsubstanzen beweisen. Verbindung **4** konnte als gemischtes Glucuronid-Sulfat mittels MS/MS identifiziert werden. Die Metaboliten des Naringenins **3a/b** wurden zu zwei Retentionszeiten detektiert, was auf ein unterschiedliches Substitutionsmuster oder eine unterschiedliche Stereochemie an C2 schließen ließ. Die Identität konnte mit MS/MS jedoch nicht verifiziert werden. Zhang und Brodbelt (2004) ermittelten nach Grapefruitsafteinnahe von drei Freiwilligen ebenfalls die Masse des Naringenin-glucuronid-sulfats

zu zwei Retentionszeiten. Das gemischte Glucuronid-sulfat **4** wurde bereits im Urin und im Plasma von Ratten nachgewiesen (Liang et al. 2014). Unter den ermittelten sulfatierten Phase-II-Metaboliten **5-8** befand sich Naringenin-sulfat **5a/b**, für welches zwei Retentionszeiten ermittelt wurden. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Zhang und Brodbelt (2004) überein. Die unterschiedliche Retention kann wieder durch stereochemische oder strukturelle Unterschiede bedingt sein. Substanz **6** wurde von Del Rio et al. (2010) ebenfalls als Metabolit des Catechins beschrieben. Nach Rooibos Tee Applikation konnte wie hier für Weidenrinde der Metabolit **7** nachgewiesen werden (Stalmach et al. 2009). Substanz **8** erwies sich als sulfatierte Form des Taxifolins, welche von Vacek et al. (2012) bereits als möglicher Metabolit von Taxifolin in *in vitro* Experimenten beschrieben wurde. Jedoch konnte Taxifolin weder in glucosidischer noch in freier Form in der Prüfmedikation detektiert werden. Somit stellt **8** und insbesondere sein Aglykon einen Metaboliten dar. Dieser könnte nach Deglucosidierung und durch Hydroxylierung des B-Rings mittels CYP-Enzymen aus dem in der Prüfmedikation enthaltenen Dihydrokämpferol-7-O- β -D-glucosids entstehen. *In vitro* als auch *in vivo* konnten solche Hydroxylierungsreaktionen für Kämpferol zum Quercetin bereits gezeigt werden (Breinholt et al. 2002). Substanz **15** stellt ein Ringspaltprodukt des Naringenins bzw. eventuell des Isosalipurposids dar. Von Rechner et al. (2004) wurde das Aglykon von **15** als Ringspaltprodukt des Naringenins in *in vitro* Versuchen mit Kolonbakterien identifiziert. Phenolcarbonsäuren zirkulieren nach Resorption im Blut hauptsächlich in ihrer konjugierten Form (sulfatiert oder glucuronidiert), was auch in dieser Arbeit für **14** und **15** gezeigt werden konnte (Piazzon et al. 2012). Verbindung **14** kann entweder einen Metaboliten von **15** oder einen Metaboliten der in der Prüfmedikation enthaltenen, an Flavonoid-glucoside gebundenen Cumarsäure darstellen. Die MS/MS Spektren der identifizierten Verbindungen **1a/1b** sind unter **3.2.4.3** abgebildet und die Spektren von **2a-c** und **4-15** unter **8.2, S.176**.

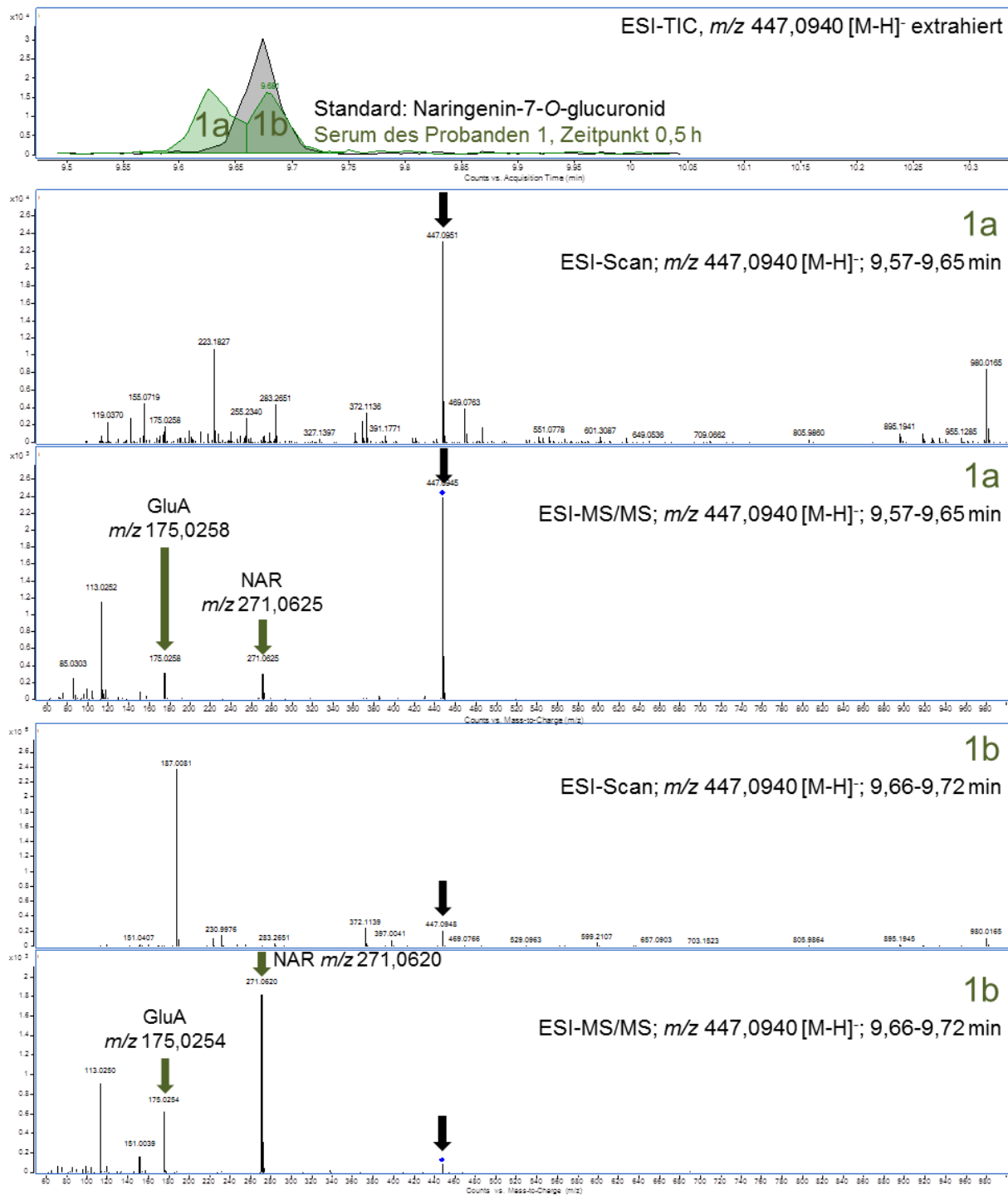


Abb. 17 Identifizierung von Naringenin-7-O- β -D-glucuronid (1b) im Serum eines Probanden (grün) mit Hilfe des synthetisierten Standards Naringenin-7-O- β -D-glucuronid (10 μ M, grau); abgebildet sind der ESI-TIC des m/z von 1a/1b 447,0940 [M-H]⁻ von Proband 1, t=0,5 h (grün) und des Standards (grau), sowie die zugehörigen MS- sowie MS/MS-Spektren von Proband 1, t=0,5 h; Molekülpeak: schwarzer Pfeil, Fragmente: grüner Pfeil, NAR: Naringenin, GluA: Glucuronsäure; Gradient: FM2.

3.2.4.3 Metabolitenscreening und -identifizierung am Beispiel Naringenin-glucuronid

Da Flavanon-glucuronide und -sulfate nicht oder nur teuer zu erwerben sind, wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit Naringenin-7-*O*- β -D-glucuronid synthetisiert und hier als Standardsubstanz verwendet (vgl. 3.4.2.3, S.96 und 4.4.3., S.136). Da für das m/z von 447,0940 $[M-H]^-$ von Naringenin-glucuronid zwei Peaks zu unterschiedlichen Retentionszeiten ermittelt werden konnten, wurde mit Hilfe des synthetisierten Standards (10 μ M) die Identität bestimmt (**Abb. 17**). Bei der Verbindung **1b** handelte es sich demnach um das 7-*O*-Glucuronid des Naringenins. Am MS/MS Fragmentmuster ließ sich erkennen, dass es sich bei beiden Verbindungen **1a** und **1b** um Naringenin-glucuronide handelte, jedoch war anhand der Fragmentierung kein Schluss auf die Glucuronidierungsposition möglich. Bei **1a** könnte es sich um den in der Literatur beschriebenen zweiten Metaboliten, das 4'-*O*-Glucuronid des Naringenins handeln (Zhang und Brodbelt 2004; Brett et al. 2009). Es könnte sich auch um das Diastereomer des (2*S*)-Naringenin-7-*O*-glucuronids handeln, da in der Prüfmedikation ebenfalls Verbindungen vorlagen, welche 2*R* konfiguriert waren. Wegen der zu geringen Substanzkonzentrationen nicht auswertbaren UV-Spur konnte zudem nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei **1a** um das ringoffene, korrespondierende, massegleiche und glucuronidierte Chalkon handelte.

3.2.5 Verteilung der polyphenolischen Metaboliten in den Seren des Probandenkollektivs

Um einen Überblick über die Verteilung der 17 ermittelten Metaboliten auf die acht Probanden zu erhalten, den Einfluss der verabreichten standardisierten Nahrung zu analysieren und um die interindividuelle Diversität darzustellen, wurden die 17 Metaboliten nach Vorkommen in den Seren der einzelnen Probanden aufgeschlüsselt. Hierzu wurden alle ermittelten Massen zu allen Blutentnahme-zeitpunkten mit weniger 10 ppm Abweichung und einer Intensität größer 1000 Counts berücksichtigt. Der Vergleich erfolgte tabellarisch unter Verwendung einer Farbkodierung (von blau nach rot), um das quantitative Vorkommen der Metaboliten (von 1-8 Probanden) in den Seren der Verum-Probanden zu erfassen (**Tab. 21** und **Tab. 22**).

3.2.5.1 Verteilung der Phase-II-Metaboliten der Flavonoide

Die Betrachtung der Phase-II-Metaboliten der Flavonoide unter Berücksichtigung der einzelnen Blutentnahme-zeitpunkte (0 h bis 24 h nach Applikation der Prüfmedikation) und die Verteilung der ermittelten Metaboliten unter den acht Verum-Probanden, zeigten folgende Unterschiede in der

Verteilung: Insgesamt fand man die größte Diversität an Metabolisierungsreaktionen am Aglykon Naringenin. Hier konnten sechs Metabolite detektiert werden. Für das Aglykon Eriodictyol waren vier, für Catechin zwei und für Taxifolin ein Phase-II-Metabolit nachweisbar. Eine mögliche Erklärung liegt in der verabreichten höheren Menge an Naringenin (ca. 30 mg) im Vergleich zu Eriodictyol (ca. 1,6 mg). Dadurch könnten entstehende Metaboliten des Eriodictyols unterhalb des Detektionslimits liegen. Diese Erklärung lässt jedoch Unterschiede in der Bioverfügbarkeit der einzelnen Aglyka außer Acht. Betrachtet man das gesamte Metabolitenkollektiv, so sind sulfatierte Verbindungen häufiger vertreten. Des Weiteren konnten alle Metabolite bereits 0,5 h nach Applikation der Prüfmedikation nachgewiesen werden, und nach 24 h war kein Phase-II-Metabolit der Flavonoide mehr detektierbar (**Tab. 21**). **5a** (RT 11,28 min) und **7** waren am längsten (bis 12 h) nach Applikation nachweisbar. Daneben waren **1a/1b** sowie **6** bis 8 h nach Applikation detektierbar. Der Einfluss der am Versuchstag standardisiert eingenommenen Nahrung wurde ebenfalls deutlich. So konnten in den Blutproben nach dem Frühstück **2a-c** und **8** nicht mehr ermittelt werden. Einen weiteren Einfluss hatte das Mittagessen. Danach konnten **3a/b**, **4** und **5b** (RT 11,69 min) nicht mehr gefunden werden. Durch den Vergleich der einzelnen Naringenin-glucuronide wird deutlich, dass **1a** in allen untersuchten Probanden gefunden werden konnte, **1b** jedoch nur in ca. der Hälfte der Probanden. Dies zeigte sich ebenfalls, wenn auch in abgeschwächter Form, für die Naringenin-sulfate **5a/b**. Hier kam das zur RT 11,28 min ermittelte Derivat **5a** in allen Probanden vor, das Derivat **5b** zur RT 11,69 min jedoch nicht. Auffällig ist auch, dass **3a/b** im Gegensatz zu **1a/b** und **5a/b** nur in maximal fünf Probanden detektiert wurde. Dies zeigt sich ebenfalls für die Metaboliten des Eriodictyols. So war das Sulfat **7** in allen Probanden präsent, die glucuronidierten Verbindungen **2a-c** jedoch nur in maximal fünf Probanden. Verbindungen **8** und **6** konnten in allen Probanden nachgewiesen werden, das gemischt glucuronidierte und sulfatierte Catechin jedoch nur in sechs Probanden. Die Ergebnisse zeigen also, dass die Flavonoid Phase-II-Metabolisierung starken interindividuellen Schwankungen unterliegen kann (**Tab. 21**). Zusätzlich scheint die Nahrung einen entscheidenden Einfluss auf die Verfügbarkeit der Flavonoid-metaboliten im Blutserum zu haben.

3.2.5.2 Verteilung der phenylpropanoiden Metaboliten

Unter den neun ermittelten phenolischen Metaboliten fanden sich vorwiegend glucuronidierte und sulfatierte Verbindungen. Alle Verbindungen waren bereits 0,5 h nach Applikation der Medikation nachweisbar (**Tab. 22**). Die Metaboliten der Salicylalkoholderivate **12**, **16** und **17** wurden bereits zum Zeitpunkt 0 h detektiert. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Auswaschphase vor Beginn des Prüftages zu kurz gewählt wurde oder es sich bei **12** und **17** (nicht jedoch **16**, da nur in einem

Probanden detektiert) zusätzlich um Metaboliten aus anderen Nahrungsmitteln oder endogenen Substanzen handelte. Eine genauere Analyse der Verteilung von **12** und **17** wird unter **3.2.6.2, S.86** diskutiert. Auffällig ist auch die Präsenz vieler Metaboliten bis 24 h nach Applikation der Prüfmedikation. Bis auf die glucuronidierten Verbindungen **9** und **10**, welche nur bis 6 h nach Applikation nachweisbar waren, konnten alle Metabolite der Salicylalkoholderivate 24 h im Serum nachgewiesen werden (**Tab. 22**). Dies ist ein Unterschied zu den Flavonoid-metaboliten welche bis maximal 12 h im Serum zu finden waren. Betrachtet man, die beiden C₆-C₃-Körper **14** und **15**, so fällt auf, dass beide bereits nach 0,5 h präsent waren. Dies spricht gegen eine Entstehung der beiden Substanzen durch die Mikroflora des Kolons. Die Metaboliten wären hier aufgrund der Darmpassage erst nach ca. 5-10 Stunden zu erwarten gewesen (Pereira-Caro et al. 2014). Eine Entstehung von **15** wurde für das in der Prüfmedikation enthaltene Isosalipurposid sowie die Naringeninderivate beschrieben, konnte aber ebenfalls nur als Metabolit des Kolons ermittelt werden (Tomas-Barberan und Clifford 2000). Da **15** im Zeitraum zwischen 6-10 h nicht nachweisbar aber nach 12 h in einem Probanden wieder präsent war, kann eine mögliche mikrobielle Entstehung von **15** postuliert werden (**Tab. 22**). Bei Verbindung **14** könnte es sich um einen Metaboliten der Cumarsäure handeln (vgl. **3.2.4.2, S.72**). Die Spaltung der an die Glucose des Naringenin-5- β -O-glucosids veresterten Cumarsäure ist nur durch die Esteraseaktivität der Mikroorganismen des Kolons möglich (Rechner et al. 2002). Da **14** bis 12 h nach Applikation nachweisbar ist, ist die Entstehung durch mikrobielle Metabolisierung für die späteren Blutentnahme-zeitpunkte nicht ausgeschlossen. Jedoch müssen **14** als auch **15**, bedingt durch die frühe Präsenz im Serum, im oberen Gastrointestinaltrakt (GIT) resorbiert worden sein. Ein markanter Einfluss der Mahlzeiten des Prüftages, welcher für die Phase-II-Metaboliten der Flavonoide beobachtet werden konnte, wurde für die phenolischen Metaboliten nicht beobachtet.

Tab. 21 Schema zur interindividuellen Verteilung der ermittelten Phase-II-Metaboliten der Flavonoide von 0-24 h nach Applikation der Prüfmedikation an acht Probanden unter Berücksichtigung der Mahlzeiten; Farbkodierung analog der unten stehenden Legende; #: Nummer der Verbindung, F: Frühstück, M: Mittagessen, A: Abendessen, RT: Retentionszeit, NAR: Naringenin, ERI: Eriodictyol, TAX: Taxifolin, CAT: Catechin.

Möglicher Metabolit	#	RT (min)	Zeitpunkt der Blutentnahme nach Applikation der Prüfmedikation (h)											
			0	0,5	1	1,5	2	3	4	6	8	10	12	24
NAR-glucuronid	1a	9,73	5	8	8	8	8	8	8	3	4	3		
NAR-glucuronid	1b	9,79	5	4	3	4	3	3	3	3	1			
NAR-sulfat	5a	11,28	8	7	8	8	7	6	6	3	2	1	1	
NAR-sulfat	5b	11,69	7	7	6	5	5	5	5		1			
NAR-glucuronid-sulfat	3a	8,36	2	4	5	5	5	5	3					
NAR-glucuronid-sulfat	3b	9,40	2	2	5	4	4	4	2					
ERI-glucuronid	2a	7,72	4	4	3	2								
ERI-glucuronid	2b	9,64	5	4	3	2								
ERI-glucuronid	2c	10,00	5	4	3	2								
ERI-sulfat	7	11,48	7	6	6	8	7	7	2	3	1	1		
TAX-sulfat	8	10,04	8	8	7	4								
CAT-sulfat	6	8,57	8	8	8	8	7	2	2	2	1			
CAT-glucuronid-sulfat	4	9,79	6	5	5	2	3	1						

↑
F

↑
M

↑
A

Anzahl der Erfassungen (Probanden)

1

2

3

4

5

6

7

8

Tab. 22 Schema zur interindividuellen Verteilung der ermittelten phenolischen Phase-II-Metaboliten von 0-24 h nach Applikation der Prüfmedikation an acht Probanden unter Berücksichtigung der Mahlzeiten; Farbkodierung analog der unten stehenden Legende; #: Nummer der Verbindung; F: Frühstück, M: Mittagessen, A: Abendessen, RT: Retentionszeit, FS: Ferulasäure, HPPS: Hydroxyphenylpropionsäure, CL: Catechol, SG: Saligenin, SS: Salicylsäure, SU: Salicylursäure.

Möglicher Metabolit	#	RT (min)	Zeitpunkt der Blutentnahme nach Applikation der Prüfmedikation (h)												
			0	0,5	1	1,5	2	3	4	6	8	10	12	24	
FS-sulfat	14	4,91		7	6	7	6	5	6	5	4	2	2		
HPPS-sulfat	15	9,50		6	5	2	2	1	2				1	1	
SG-sulfat	13	7,05		8	8	8	8	8	8	8	7	6	6	6	
SG-glucuronid	10	7,18		2	4	4	5	1							
CL-sulfat	12	7,86	8	8	8	8	8	8	8	7	7	6	6	6	
CL-glucuronid	9	5,51		8	8	7	6	6	4	1					
SS-sulfat	11	8,43		8	8	8	8	8	8	7	6	5	4	1	
SS	16	7,94	7	8	8	8	8	7	8	7	7	6	6	5	
SU	17	7,96	1	8	8	8	8	8	8	7	7	7	6	5	

</

3.2.6 Semiquantitative Analyse der Phase-II-Metaboliten nach Einnahme der Prüfmedikation im Serum über 24 h

Aufgrund fehlender Phase-II-Metaboliten der Flavonoide als Referenzsubstanzen und der hohen Diversität der ermittelten Metaboliten wurde keine quantitative Bestimmung der Einzelsubstanzen durchgeführt. Stattdessen wurden die Peakflächen des EIC Scans der relevanten Massen jedes Probanden zu jedem Blutentnahme-zeitpunkt von 0-24 h nach Verabreichen der Medikation ausgewertet und als $MW \pm StabW$ auf eine Zeitachse aufgetragen. Für die semiquantitative Auswertung wurden Peakflächen größer 1000 berücksichtigt. Da in der HPLC-MS-Analytik die Substanzen unterschiedlich stark ionisiert werden und somit für jede Substanz eine Kalibrierfunktion erstellt werden müsste, ließen die erhaltenen Peakfläche-Zeitkurven zwar keine absolute quantitative Aussage zu, und es konnten keine maximalen Serumkonzentrationen der Metaboliten errechnet werden, jedoch konnten die Zeitpunkte mit maximaler Peakfläche (des Weiteren als t_{max} bezeichnet) ermittelt werden.

3.2.6.1 Phase-II-Metaboliten der Flavonoide

Die Peakfläche-Zeitkurven aller acht identifizierten Phase-II-Metaboliten der Flavonoide sind in **Abb. 18**, **Abb. 19**, und **Abb. 20** angegeben. Bei näherer Betrachtung der beiden Naringenin-glucuronide **1a** und **1b** wurde deutlich, dass die maximale Fläche für **1a** nach 1 h und für **1b** bereits nach 0,5 h ermittelt werden konnte (**Abb. 18A**). Da von Yanez et al. (2008) kein Einfluss des Chiralitätszentrums der Flavanone Naringenin und Eriodictyol auf die Pharmakokinetik beobachtet wurde, könnte dies hier für **1a** bedeuten, dass es sich um das 4'-O-Glucuronid handelt. Für den gemischt glucuronidierten und sulfatierten Metabolit **3a** (RT 8,36 min) fand sich die maximale Peakfläche 2 h nach Einnahme des Weidenrindenextrakts. Von Mullen et al. (2006) wurde ein t_{max} von 2-3 h für das gemischte glucuronidierte und sulfatierte Quercetin im Gegensatz zu der monokonjugierten Verbindungen des Quercetins mit einem t_{max} von 0,5-1 h beobachtet. Sie postulierten deshalb eine Entstehung der gemischten Metaboliten in der Leber und nicht bereits am Dünndarmepithel. Die Peakfläche-Zeitkurve von **3b** (RT 9,40 min) war aufgrund starker interindividueller Schwankungen und somit hohen Standardabweichungen nicht auswertbar (**Abb. 18B**). Für die beiden Naringenin-sulfate **5a/b** konnte für das später retinierende Derivat **5b** ein t_{max} von 0,5 h und für die eher retinierende Verbindung **5a** ein t_{max} von 1 h ausgemacht werden, was mit den Daten für **1a/1b** übereinstimmt (**Abb. 18C**). In der Literatur ist ein t_{max} für Naringenin, verabreicht in Grapefruitsaft-, Orangensaftmatrix oder als Aglykon, nach enzymatischer

Aufarbeitung in humanem Plasma von 2-5,5 h beschrieben worden (Erlund et al. 2001; Bugianesi et al. 2002; Manach et al. 2005; Kanaze et al. 2007; Brett et al. 2009). Von Brett et al. (2009) wurden zwei Naringenin-glucuronide im Urin von freiwilligen Probanden als Naringenin-7-O- und 4'-O-glucuronid identifiziert. Zhang und Brodbelt (2004) beobachteten ebenfalls zwei Naringenin-glucuronide in humanem Urin und konnten keine Unterschiede hinsichtlich des t_{\max} im Urin feststellen.

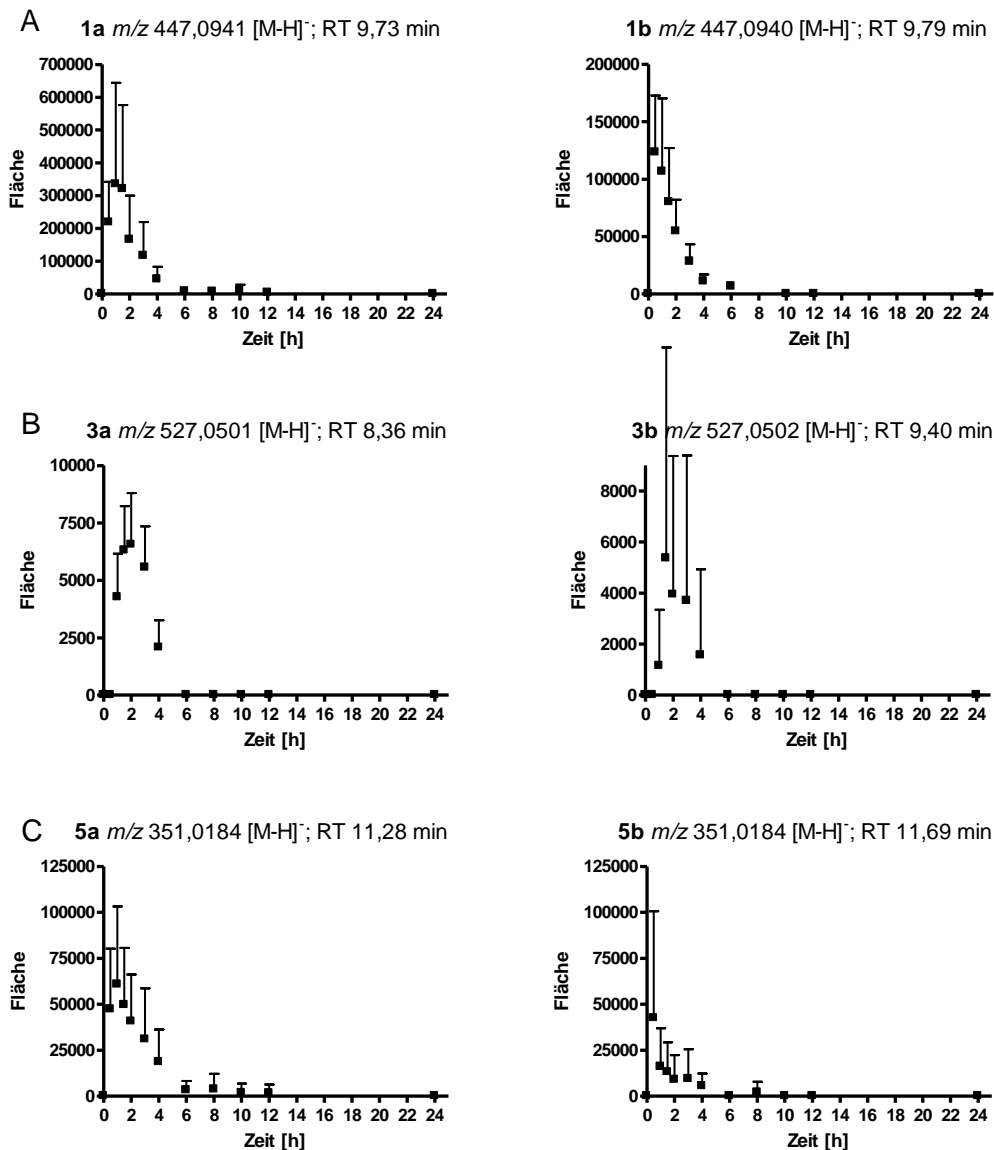


Abb. 18 Übersicht der Peakflächen der EIC Peaks der verschiedenen Naringenin (NAR) Phase-II-Metaboliten in Abhängigkeit von der Zeit (h) nach Applikation der Prüfmedikation; **A**: NAR-glucuronid **1a** und **1b**, **B**: NAR-glucuronid-sulfat **3a/b** zu beiden Retentionszeiten (RT), **C**: NAR-sulfat **5a/b** zu beiden RT; alle Angaben als MW \pm StabW aus Proben von acht Probanden.

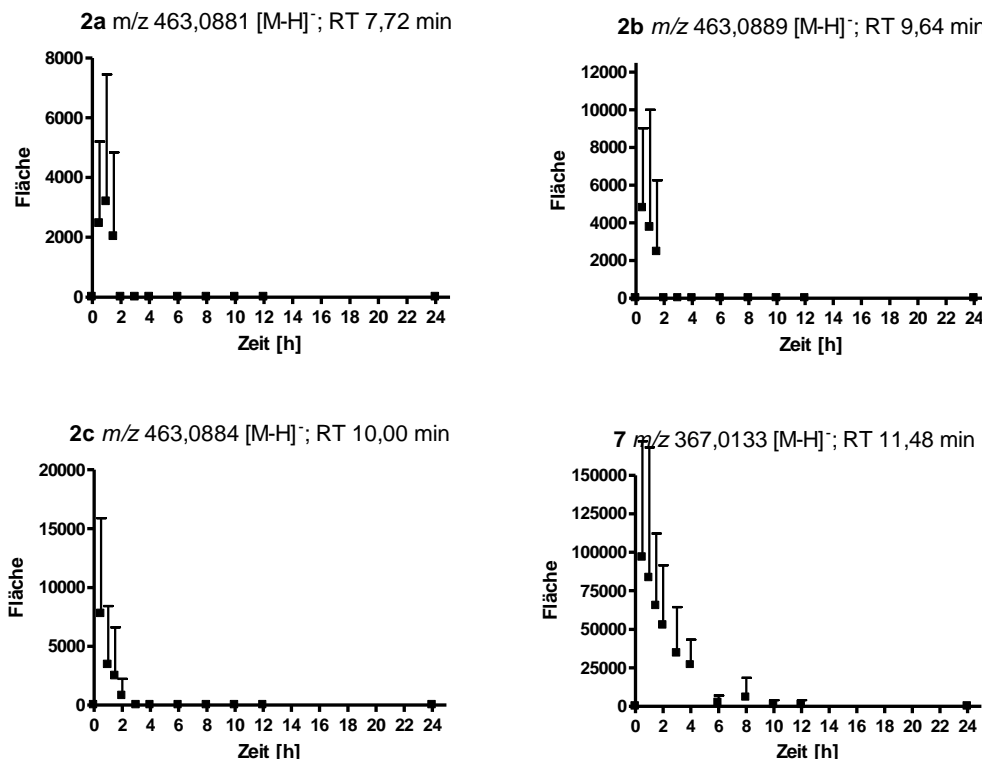


Abb. 19 Übersicht der Peakflächen der EIC Peaks der verschiedenen Eriodictyol (ERI) Phase-II-Metaboliten; ERI-glucuronide **2a-c** zu den drei ermittelten Retentionszeiten (RT) und von ERI-sulfat **7** in Abhängigkeit von der Zeit (h) nach Applikation der Prüfmedikation; alle Angaben als MW \pm StabW aus Proben von acht Probanden.

Für die ermittelten Eriodictyol-glucuronide **2a-c** wurde für **2a** (RT=7,72 min) ein t_{\max} von 1 h ermittelt, für die beiden anderen **2b/c** (Retentionszeiten 9,64 und 10,00 min) ein t_{\max} von 0,5 h. Das Eriodictyol-sulfat **7** hatte ebenfalls nach 0,5 h sein t_{\max} erreicht. Die glucuronidierten Verbindungen **2a-c** fielen bereits nach 2 h unter das Detektionslimit, wohingegen das Sulfat erst nach 10 h nicht mehr zu detektieren war (**Abb. 19**). Das in humanem Urin detektierte Eriodictyol-sulfat war dort von 2-10 h vorhanden (Pereira-Caro et al. 2014). Für die beiden Catechin-metabolite **4** und **6** ergab sich für das Sulfat **6** ein t_{\max} von 0,5 h, und für das gemischte Glucuronid-sulfat wurde eine Plateauphase von 0,5-1,5 h beobachtet (**Abb. 20**). Diese Ergebnisse entsprechen den für die Naringenin-metaboliten ermittelten Werte in dieser Arbeit und zusätzlich mit den in der Literatur ermittelten t_{\max} -Werten von 0,5-3 h für Catechin nach enzymatischer Aufarbeitung (Manach et al. 2005). Abschließend wurde für **8**, dessen Aglykon eventuell selbst einen Metaboliten darstellt, ein t_{\max} von nur 0,5 h ermittelt (**Abb. 20**). Dies würde bedeuten, dass die Hydroxylierung und die Kopplung an Sulfat des genuinen Dihydrokämpferols sehr schnell erfolgen könnten. Die hier ermittelten t_{\max} -Daten wiesen auf eine Resorption von Naringenin-, Eriodictyol-glucosiden und

Catechin im oberen intestinalen Trakt hin. Da die Metaboliten teils bis 10 h nach Applikation im Serum noch nachweisbar waren, ist eine rezyklische Resorption oder eine Resorption im Kolon nicht auszuschließen (Pereira-Caro et al. 2014).

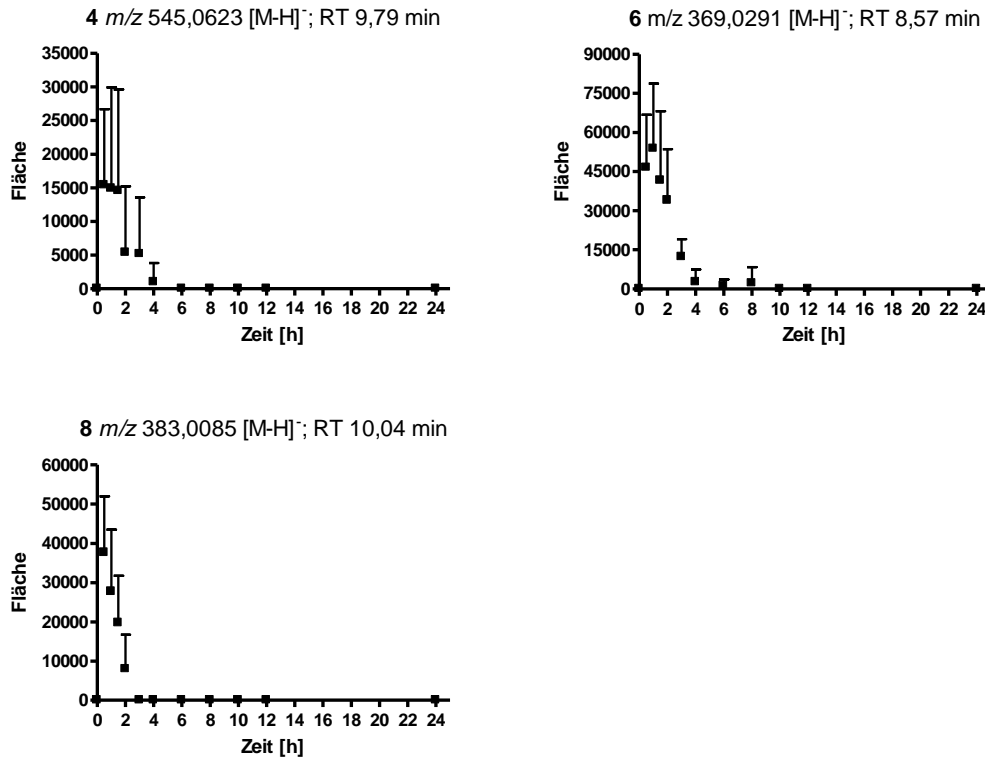
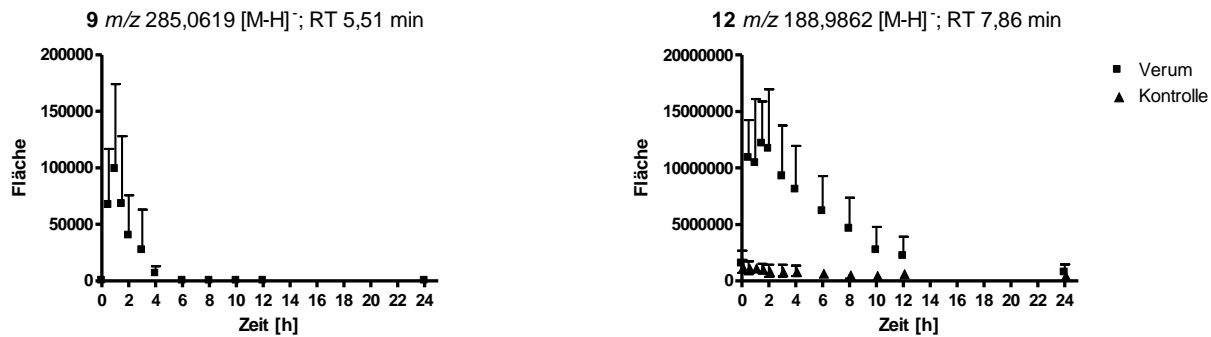


Abb. 20 Übersicht der Peakflächen der EIC Peaks der verschiedenen Catechin Phase-II-Metaboliten; CAT-glucuronid-sulfat **4** und von CAT-sulfat **6** sowie von TAX-sulfat **8** in Abhängigkeit von der Zeit (h) nach Applikation der Prüfmedikation; RT: Retentionszeit, CAT: Catechin, TAX: Taxifolin; alle Angaben als MW ± StabW aus Proben von acht Probanden.

3.2.6.2 Phenylpropanoide Metaboliten

A



B

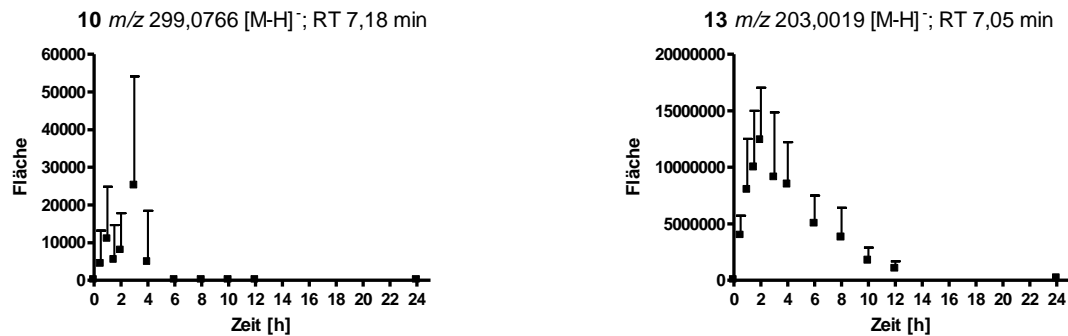


Abb. 21 Übersicht der Peakflächen der EIC Peaks verschiedener phenolischer Phase-II-Metaboliten in Abhängigkeit von der Zeit (h) in den Verum- und Kontroll-probanden nach Applikation der Prüfmedikation; **A**: CL-glucuronid **9** und CL-sulfat **12**, **B**: SG-glucuronid **10** und SG-sulfat **13**; RT: Retentionszeit, CL: Catechol, SG: Saligenin; alle Angaben als MW \pm StabW aus Proben von acht Verum-probanden, für Kontrolle aus Proben von zwei Probanden.

Unter den in **3.2.3.3**, **S.69** identifizierten phenolischen Metaboliten besitzen Ferulasäure-sulfat **14** und Hydroxyphenylpropionsäure **15** ein t_{\max} von 1,5 h bzw. 0,5 h. Dies spricht für eine schnelle Resorption und gleichzeitig gegen eine Entstehung durch Mikroorganismen des Kolons. Jedoch zeigte sich im späteren zeitlichen Verlauf, dass **14** und **15** bis 12 bzw. 24 h nach Einnahme der Prüfmedikation vorhanden waren. Es konnte sogar ein leichter Anstieg für **15** im Zeitraum von 12-24 h beobachtet werden (**Abb. 23**). Dies könnte bedeuten, dass die Quelle der C₆-C₃-Körper, **14** und **15** für den Zeitraum von 0-6 h eine andere war als zu späteren Zeitpunkten. Die genauere Analyse der identifizierten Metaboliten der Salicylalkoholderivate zeigt unterschiedliche t_{\max} Werte für die aus Catechol entstandenen Verbindungen **9** und **12**. So war **9** bereits nach 0,5 h maximal vorhanden aber nach 6 h bereits nicht mehr detektierbar. Das t_{\max} von **12** hingegen lag bei 1,5 h.

Außerdem war **12** bis 12 h nach Applikation noch nachweisbar. Der Metabolit war in den Seren der beiden Kontroll-probanden, wenn auch im Verhältnis in einem weit aus geringerem Ausmaß, ebenfalls vorhanden (**Abb. 21A**). Knuth et al. (2013) ermittelte dasselbe t_{\max} für Catechol nach enzymatischer Hydrolyse und detektierte kein Catechol in der Kontroll-gruppe. Dies ist auf die von Knuth et al. (2013) angewandte analytische Methode zurückzuführen, da in den hier beschriebenen Experimenten eine sensitivere HPLC-MS Analyse verwendet wurde. Für Salicylsäure **16** wurde von Knuth et al. (2013) ein t_{\max} von 2,68 h ermittelt und keine basale Salicylsäure **16** im Serum der Probanden wie auch der Kontroll-probanden detektiert. Die vorliegenden Ergebnisse konnten das ermittelte t_{\max} von Knuth et al. (2013) verifizieren. Zusätzlich wurde **16** in den Seren der Kontroll-probanden identifiziert, war aber im Vergleich zu den Verum-Probanden in einem weitaus geringeren Ausmaß vorhanden. Der Verlauf der Peakfläche-Zeitkurven von **11** und **17** gleicht der von **16** (**Abb. 22**). Das Vorhandensein einer sulfatierten Form der Salicylsäure **11** könnte die von Knuth (2013) ermittelte 2,7-fach höhere Maximalkonzentration an Salicylsäure im Gegensatz zur von Schmid et al. (2001a) ermittelten Maximalkonzentration bei selber Menge an applizierter Gesamt-salicylalkoholderivaten erklären. Knuth et al. (2013) verwendete eine enzymatische Hydrolyse mit Sulfatase und Glucuronidase vor Quantifizierung, Schmid et al. (2001a) jedoch nicht. t_{\max} von Saligenin-sulfat **13**, einem Metaboliten des Salicins, lag bei 2 h, und es war bis 12 h nachweisbar. Das korrespondierende Glucuronid **10** war bereits nach 6 h nicht mehr nachweisbar (**Abb. 21B**). Eine solch frühe Abnahme der Konzentration im Gegensatz zum korrespondierenden Sulfat wurde auch für **9** beobachtet (**Abb. 21A**). Es wurde kein freies Saligenin detektiert, wie von Fötsch et al. (1989) aus humanem Urin beschrieben.

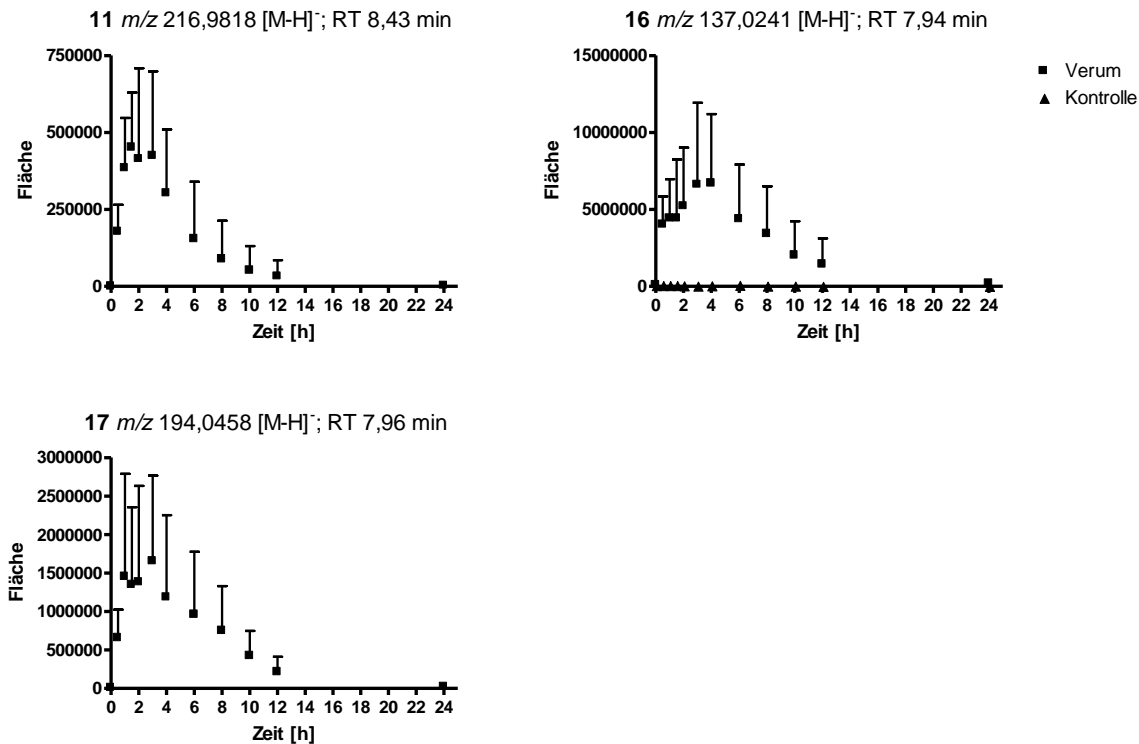


Abb. 22 Übersicht der Peakflächen der EIC Peaks von SS-sulfat **11**, SS **16** und SU **17** in Abhängigkeit von der Zeit (h) in den Seren der Verum- und Kontroll-probanden nach Applikation der Prüfmedikation; RT: Retentionszeit, SS: Salicylsäure, SU: Salicylsäure; alle Angaben als MW \pm StabW aus Proben von acht Verum-Probanden, für Kontrolle aus Proben von zwei Probanden.

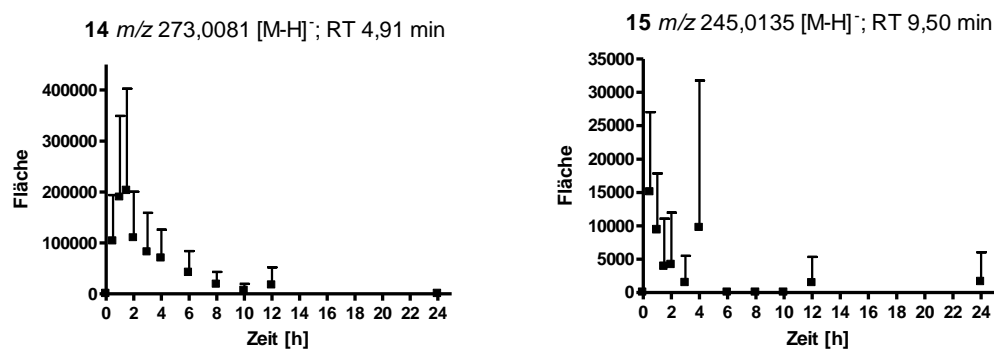


Abb. 23 Übersicht der Peakflächen der EIC Peaks der verschiedenen phenolischen C_6-C_3 Phase-II-Metaboliten; FS-sulfat **14** und von HPPS-sulfat **15** in Abhängigkeit von der Zeit (h) nach Applikation der Prüfmedikation; RT: Retentionszeit, HPPS: Hydroxyphenylpropionsäure, FS: Ferulasäure; alle Angaben als MW \pm StabW aus Proben von acht Probanden.

3.3 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen einer Klinischen Studie wurde einer Gruppe von zehn gesunden Probanden am Prüftag die Tagesmaximaldosis eines Weidenrindenpräparats verabreicht. Es erfolgten elf Blutentnahmen (Blutentnahme nüchtern zum Zeitpunkt 0 bis 24 h nach Applikation). Zwei der zehn Probanden nahmen keinen Extrakt ein und dienten als Kontrollgruppe. Ab 19 h vor Applikation wurde eine strenge polyphenolfreie Diät eingehalten. Am Prüftag nahmen die Probanden an standardisierten, polyphenolfreien Mahlzeiten teil. Eine Analyse der Prüfmedikation ergab eine verabreichte Menge an Flavanonen von 29 mg Gesamt-naringenin, 2 mg Gesamt-eriodictyol sowie 27 mg Gesamt-catechol und 240 mg Gesamt-salicylalkoholderivate berechnet als Salicin. Die Flavanone lagen hauptsächlich glucosidisch gebunden vor. Neben cumaroylierten Flavanonglucosiden lagen zusätzlich Dihydrokämpferol-7-O- β -D-glucosid, Catechin und das Chalkon Isosalipurposid vor.

Anhand der in der Prüfmedikation enthaltenen Verbindungen wurde eine Datenbank erstellt, welche alle denkbaren Metaboliten enthielt. Sowohl Phase-II-Metaboliten als auch die für Flavonoide beschriebene Ringspaltprodukte sowie deren konjugierte Verbindungen wurden darin berücksichtigt. Ein HPLC-MS Screening der Serumproben aller Probanden zu allen Zeitpunkten wurde durchgeführt. Die Identifizierung der Metaboliten erfolgte einerseits über einen Retentionszeitvergleich nach enzymatischer Hydrolyse mit den korrespondierenden Aglyka. Da aber nicht für alle Flavonoid-sulfate eine Spaltung zu den korrespondierenden Aglyka möglich war und deshalb eine Enzymspezifität der verwendeten Sulfatase diskutiert werden könnte, wurde andererseits eine Identifizierung über eine MS/MS-Fragmentierung durchgeführt. Insgesamt wurden 17 polyphenolische Metaboliten identifiziert. Darunter fanden sich acht Phase-II-Metaboliten der Flavonoide, überwiegend sulfatierte aber auch glucuronidierte Verbindungen neben gemischten Glucuronid-sulfaten (**1-8**). Verbindungen **1a-3b** und **5a/b** wurden zu mehreren Retentionszeiten detektiert, was auf einen strukturellen Unterschied wie z.B. der Glucuronidierungsposition hindeutet. Verbindung **1b** konnte als Naringenin-7-O- β -D-glucuronid bestätigt werden. Des Weiteren konnten mit **14** und **15** zwei mögliche Ringspaltprodukte der Flavonoide ermittelt werden. Außerdem konnten die bereits für Salicylalkoholderivate bekannten Metaboliten **9**, **12**, **16** und **17** identifiziert werden. Ebenso waren Phase-II-Metaboliten des Saligenins und der Salicylsäure im Serum präsent (**10-13**).

Eine Betrachtung der Seren einzelner Probanden und der verschiedenen Blutentnahme-zeitpunkte zeigte einen starken Einfluss der am Prüftag verzehrten Nahrung. So waren nach dem

standardisierten Frühstück bzw. Mittagessen viele Metabolite nicht mehr nachweisbar. Insgesamt unterlag die Flavonoid-metabolisierung starken interindividuellen Schwankungen. So waren manche Metaboliten nur im Serum von 50% der Probanden überhaupt nachweisbar. Alle an Glucuronsäure und/oder Sulfat gebundenen Flavonoide waren bereits nach 0,5 h präsent, was auf eine sehr schnelle Resorption im oberen GIT hinwies. Nur die Glucuronide **1a** und **1b** sowie die Sulfate **5a-7** waren bis 8 h nach Gabe der Prüfmedikation noch nachweisbar. Dies könnte durch eine lange Verweildauer im Serum, aber auch durch eine zusätzliche rezyklische Resorption oder Resorption im Kolon bedingt sein. Die potentiellen Ringspaltprodukte durch die Mikroflora des Kolons (**14** und **15**) waren, wie die konjugierten Flavonoide, bereits nach 0,5 h im Serum nachweisbar. Dies spricht gegen eine mikrobielle Entstehung, jedoch eventuell für eine Entstehung aus der in der Prüfmedikation an Flavonoid-glucoside veresterten Cumarsäure. Verbindungen **14** und **15** wurden nach 12-24 h im Serum einzelner Probanden detektiert. Hier war aufgrund der Zeit eine mikrobielle Entstehung wahrscheinlich. Unter den Metaboliten der Salicylalkoholderivate wurden nur geringe interindividuelle Schwankungen beobachtet. Lediglich die glucuronidierten Verbindungen **9** und **10** waren nicht im Serum aller Probanden präsent und nach 6 h nicht mehr nachweisbar. Die sulfatierten Verbindungen **11-13** sowie die Salicylsäure **16** und Salicylursäure **17** waren von 0,5 h bis 24 h im Serum aller Probanden nachweisbar. In einem zweiten Schritt wurden Peakfläche-Zeit-Plots angefertigt, um eine Aussage über das zeitliche Profil der Anwesenheit verschiedener Metabolite im Serum der Probanden von 0-24 h zu erhalten. An dieser Stelle sei angemerkt, dass es sich dabei nicht um eine korrekte quantitative Bestimmung zur Ermittlung „wahrer“ Konzentrationen handelte, sondern dass, aufgrund fehlender Referenzsubstanzen und der hohen Diversität der relevanten Phase-II-Metaboliten nur eine semiquantitative Auswertung erfolgte. Die Analyse der Peakfläche-Zeit-Plots ergab, dass die t_{\max} bei 0,5-1 h für die konjugierten Flavonoide lagen. Die gemischten Glucuronid-sulfate **3a** und **4** hatten ihr Maximum bei 2 h, was sich durch den für die Bildung der Metaboliten nötigen Ablauf zweier Phase-II-Reaktionen erklären lässt. Für die Verbindungen **1a/b**, **2a-c** und **5a/b**, welche zu mehreren Retentionszeiten detektiert wurden, konnte jeweils für das später Retinierende (jeweils **b** bzw. **c**) ein früheres t_{\max} von 0,5 h, für das eher Retinierende (jeweils **a**) ein späteres t_{\max} von 1 h nachgewiesen werden. Zusammengefasst lässt dies darauf schließen, dass z.B. **1b**, das Naringenin-7-O- β -D-glucuronid, schneller oder bevorzugt gebildet wurde und im Serum vorlag als **1a**, welches ebenfalls ein Naringenin-glucuronid darstellt und langsamer gebildet wurde. Für den Metaboliten **8**, dessen Aglykon nicht genuin in der Prüfmedikation enthalten war, wurde ein t_{\max} von nur 0,5 h ermittelt, was eine sehr schnelle Metabolisierung vermuten lässt. Die Betrachtung der aus den Salicylalkoholderivaten entstandenen Metaboliten ergab für **12** und **16** hinsichtlich t_{\max} und des

zeitlichen Verlaufes eine Übereinstimmung mit den von Knuth et al. (2013) ermittelten Werten. Zusätzlich konnte das basale Vorkommen von **12** und **16** in Verum- und Kontroll-probanden gezeigt werden.

Die für Flavonoide beschriebene, exzessive Phase-II-Metabolisierung des oberen GIT sowie des Kolons konnte für die mit der Prüfmedikation verabreichten, relativ geringen Mengen an Flavanonen belegt werden. Ob die Serumkonzentrationen und die Konzentrationsverhältnisse der Flavonoid-metaboliten pharmakologische Relevanz besitzen, sollte durch deren quantitative Bestimmung erfasst werden. Diese ist aber aufgrund der ermittelten Diversität an Metaboliten schwer durchführbar. Für Naringenin-7-O-glucuronid und Naringenin-4'-O-glucuronid sowie deren Aglykon Naringenin konnten sehr unterschiedliche Effekte auf Genexpressionsebene nach Inkubation der Substanzen auf aktivierten Macrophagen ermittelt werden (Dall'Asta et al. 2013). Deshalb sollten die einzelnen, hier ermittelten *in vivo* Metaboliten weiter auf ihre *in vitro* Aktivität untersucht werden, um den Beitrag der Flavonoide zur Wirkung der Weidenrinde besser zu verstehen. Auch sollte überprüft werden, ob eine Freisetzung der *in vitro* aktiven Flavonoid-aglyka oder der Ringspaltprodukte aus ihrer konjugierten Form am Wirkort wahrscheinlich ist. Dies gilt auch für das detektierte Catechol-sulfat, Salicylsäure-sulfat und Saligenin-sulfat.

3.4 Experimenteller Teil

3.4.1 Klinische Studie

Sponsor der klinischen Studie war Dr. Georg Mair (Neurologische Reha Intensiv, Bezirksklinikum Regensburg). Die Planung und Durchführung der Klinischen Studie wurde von Dr. Susanne Knuth übernommen. Die medizinische Anamnese, die körperliche Untersuchung, die Blutentnahmen und das EKG führten zwei Prüfarzte durch, Prof. Dr. Frank Schweda (Institut für Physiologie der Universität Regensburg) und Dr. Georg Mair. Die Urinuntersuchung fand am Prüfzentrum, die Blutanalyse am Universitätsklinikum Regensburg statt. Als Prüfzentrum wurde die anerkannte Prüfstelle des Lehrstuhls für Pharmakologie der Universität Regensburg unter Leitung von Prof. Dr. Frieder Kees gewählt (Knuth et al. 2013; Knuth 2013). Es wurden zehn studentische Probanden rekrutiert, welche den Ein- und Ausschlusskriterien entsprachen (**Tab. 23**). Alle Probanden wurden mündlich und schriftlich über den Ablauf und die Risiken der Studie aufgeklärt. Durch einen unmittelbar vor der Prüfung durchgeführten Schwangerschaftstest wurden Schwangerschaften ausgeschlossen. Am Kinetiktag erschienen diese Probanden am Prüfzentrum und bekamen eine Venenverweilkanüle gelegt. Acht der zehn Probanden wurde die Prüfmedikation, die maximale Tagesdosis Optovit® ActiFLEX (vier Dragees) appliziert. Alle Probanden nahmen am Kinetiktag gemäß **Tab. 24** am Ablauf teil. Es wurden bei jeder Blutabnahme ca. 7 ml Blut entnommen, welches in S-Monovetten gesammelt und sofort bei 4000 U/min 20 min zentrifugiert wurde. Der Überstand, das Blutserum, wurde abgenommen und im Tiefkühlschrank bis zur analytischen Auswertung gelagert. Zwischen der Blutabnahme $t=0-12$ h wurde die Verweilkanüle mit einer Mandrin verschlossen. Nach der Blutabnahme $t=12$ h wurde die Verweilkanüle entfernt und die Blutentnahme am nächsten Tag erfolgte mittels Venenpunktion (Knuth et al. 2013; Knuth 2013).

Tab. 23 Ein- und Ausschlusskriterien der Probandenrekrutierung zur klinischen Studie WBCat-1 (Knuth 2013).

Einschlusskriterien
Bodymassindex (kg/m^2) zwischen 18,0 und 27,5
Alter zwischen 18 und 45 Jahren
Schriftliche Einverständniserklärung der Probanden
Sichergestellte Kontrazeption
Erfüllung aller Einschlusskriterien der medizinischen Anamnese, Blut- und Urinanalyse, EKG sowie der körperlichen Untersuchung

Fortsetzung **Tab. 23.****Ausschlusskriterien**

Teilnahme an einer anderen Klinischen Studie vor weniger als vier Wochen vor Studienbeginn

Blutspende oder größerer Blutverlust vor weniger als zwei Monaten vor Studienbeginn

Besondere Diäten (z.B. Vegetarier, Veganer)

Regelmäßige Einnahme von Medikamenten in den letzten zwei Wochen vor Prüfbeginn (z.B. Antazida, CYP3A4 Hemmstoffe oder Induktoren) welche Einfluss auf die Pharmakokinetik der Prüfmedikation haben könnten

Einnahme von Medikamenten jeglicher Art während der Prüfung (ausgenommen orale Kontrazeption)

Bekannte Überempfindlichkeiten gegenüber dem Prüfpräparat oder Arzneistoffen mit chemisch ähnlicher Struktur (z.B. Salicylsäure, Acetylsalicylsäure oder sonstige Bestandteile des Prüfpräparats)

Vorliegen von Asthma bronchiale oder spastischer Bronchitis

Bekannte Überempfindlichkeit gegen andere Antirheumatika oder Entzündungshemmer

Allergieneigung oder allergische Schockreaktionen in der Anamnese

Akuter gastrointestinaler Ulkus oder manifeste Niereninsuffizienz

Hepatitis oder HIV-Infektion

Sonstige akute oder chronische Erkrankungen des GIT, der Leber, der Harnwege oder des Herzens

Unzureichende Kooperation mit dem Prüfer (Verdacht auf Non-Compliance)

Schwangerschaft oder Stillzeit

Medikamenten-, Drogen-, Nikotin- oder Alkoholabusus

Das Vorliegen eines geistigen Zustandes, welcher es dem Betreffenden nicht möglich macht, das Wesen der Prüfung, deren Tragweite und mögliche Folgen zu verstehen

Tab. 24 Diätplan und zeitlicher Ablauf der Klinischen Studie WBCat-01; t=Zeitpunkt ab Prüfmedikationseinnahme (Knuth 2013).

Zeitlicher Verlauf	Ereignis
Vortag, ab 12:00 Uhr	Jeglicher Verzicht auf Obst, Gemüse, Schokolade, Vollkornprodukte, Nüsse, Sprossen, Kräuter, Kaffee, schwarzer Tee, Rotwein, Bier, Cola, Säfte und Olivenöl
Vortag, ab 22:00 Uhr	Kompletter Verzicht auf Nahrung, Alkohol, Coffein und Nikotin
Kinetiktag, 7:00 Uhr, t=0 h	Nüchterne Blutentnahme mit nachfolgender Applikation der Prüfmedikation mit 250 ml Wasser
7:30 Uhr, t=0,5 h	Blutentnahme

Fortsetzung **Tab. 24.**

Zeitlicher Verlauf	Ereignis
8:00 Uhr, t=1 h	Blutentnahme
8:30 Uhr, t=1,5 h	Blutentnahme
9:00 Uhr, t=2 h	Blutentnahme mit anschließendem standardisiertem Frühstück, welches aus 1-2 hellen Brötchen mit Butter oder Rahmfrischkäse bestand. Wasser wurde nach Bedarf gereicht.
10:00 Uhr, t=3 h	Blutentnahme
11:00 Uhr, t=4 h	Blutentnahme
11:30 Uhr, t=4,5 h	Standardisiertes Mittagessen, bestehend aus Nudeln mit Sahnesauce (aus Sahne, jungem Gouda und Salz). Wasser wurde nach Bedarf gereicht.
13:00 Uhr, t=6 h	Blutentnahme
15:00 Uhr, t=8 h	Blutentnahme
17:00 Uhr, t=10 h	Blutentnahme mit anschließendem standardisiertem Abendessen, bestehend aus Weißbrot mit Butter oder jungem Gouda. Wasser wurde nach Bedarf gereicht.
19:00 Uhr, t=12 h	Blutentnahme, sowie möglichst Verzicht auf Nahrung über Nacht bis zur 24 h Blutentnahme. In jedem Fall aber Verzicht auf Obst, Gemüse, Schokolade, Vollkornprodukte, Nüsse, Sprossen, Kräuter, Kaffee, schwarzer Tee, Rotwein, Bier, Cola, Säfte und Olivenöl sowie Alkohol, Coffein und Nikotin.
Folgetag, 7:00 Uhr, t=24 h	Blutentnahme

3.4.2 Probenvorbereitung

Für die folgenden Versuche wurde ausschließlich Reinstwasser und für die Chromatographie geeignetes Methanol verwendet.

3.4.2.1 Prüfmedikation

Ein Dragee Optovit® ActiFLEX (393 mg) wurden im Mörser pulverisiert, in einen 100 ml Messkolben überführt und zu 100 ml mit Acetonitril im Ultraschallbad für 20 min gelöst. Nach einer 1:100 Verdünnung mit Acetonitril ($c_{\text{end}}=0,039 \text{ mg/ml}$) wurde die Lösung über einen Spritzenvorsatzfilter filtriert und via HPLC-DAD-MS vermessen. Für die Analyse mit analytischer HPLC-DAD wurde ein Dragee der Prüfmedikation im Mörser pulverisiert und in einen 100 ml Messkolben überführt, zu

100 ml mit Methanol/Wasser (7/3, V/V) verdünnt und für 20 min im Ultraschallbad gelöst und über einen Spritzenvorsatzfilter filtriert.

3.4.2.2 Serumproben

Nicht-enzymatische Aufarbeitung

Die Seren aller Probanden zu allen Zeitpunkten wurden im Tiefkühlschrank (T=-80 °C) zu 1 ml aliquotiert gelagert. Ein Natriumacetatpuffer (2 M, pH=4,7) wurde hergestellt und mit Essigsäure auf den geforderten pH-Wert eingestellt. Dieser wurde sterilfiltriert, zu 2 ml aliquotiert und im Tiefkühlschrank (T=-80 °C) gelagert. Am jeweiligen Versuchstag wurden die Serumproben und der Puffer aufgetaut und auf Eis gelagert. 270 µl einer Serumprobe wurden mit 30 µl einer frisch hergestellten Natriumacetatpuffer-Ascorbinsäure-Mischung (10 mg/ml) versetzt und geschüttelt. Die Probe wurde daraufhin mit 900 µl eiskaltem Acetonitril versetzt, für 5 min geschüttelt und anschließend für 20 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und unter Stickstoff zur Trockne gebracht. Zum trockenen Rückstand wurden 50 µl Acetonitril/Wasser 9,5/0,5 (V/V) und 100 µl Ameisensäure (0,1% in Wasser) gegeben, anschließend wurde die Lösung für 10 min geschüttelt und 5 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach Filtration durch einen Spritzenvorsatzfilter in ein HPLC-Vial mit einem 200 µl Insert wurden die Proben an der HPLC-DAD-MS vermessen.

Enzymatische Aufarbeitung

Zur Identifizierung der relevanten Flavonoid-aglyka der Phase-II-Metaboliten wurden einige Serumproben mit Sulfatase und β -Glucuronidase behandelt. Hierfür wurden die Serumproben und der Natriumacetatpuffer (s. oben) am Versuchstag aufgetaut, 270 µl Serumprobe wurden mit 3,5 mg Sulfatase versetzt und durch schütteln für ca. 5 min in einem Reaktionsgefäß gelöst. Dieser Lösung wurden 30 µl einer frisch hergestellten Natriumacetatpuffer-Ascorbinsäure-Mischung (10 mg/ml), welche 10 mg/ml β -Glucuronidase enthielt, zugesetzt. Der Versuchsansatz, welcher final 35 U Sulfatase und 3030 U β -Glucuronidase enthielt, wurde für 1,5 h im Inkubator bei 37 °C belassen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog der nicht-enzymatischen Aufarbeitung.

3.4.2.3 Standardlösungen

Alle Standardsubstanzen wurden jeweils in DMSO zu 100 mM gelöst. Nach einer 1:100 Verdünnung des jeweiligen Standards mit Acetonitril/Wasser 9,5/0,5 (V/V) wurden davon je 1,5 µl zu 150 µl einer Mischung aus 50 µl Acetonitril/Wasser 9,5/0,5 (V/V) und 100 µl Ameisensäure (0,1% in Wasser) gegeben. Nach Membranfiltration über einen Spritzenvorsatzfilter wurden die Proben (10 µM) in ein HPLC-Vial mit einem 200 µl Insert überführt und anschließend mittels HPLC-DAD-MS analysiert. Die im Rahmen einer Bachelorarbeit synthetisierte Standardsubstanz Naringenin-7-O-β-D-glucuronid diente in dieser aufgearbeiteten Form als Standard für alle HPLC-MS Läufe. Naringenin-7-O-β-D-glucuronid (10 µM) wurde an jedem Versuchstag vor der Probenmessung analysiert um die Eignung des HPLC-MS Systems zu gewährleisten. Während der Probenmessungen diente Naringenin-7-O-β-D-glucuronid als Qualitätsstandard. Es wurde jeweils nach 7-10 Messungen injiziert, um so den MS-Detektor auf Sensitivität zu überprüfen. Die Reinheits- und Identitätsprüfung des Standards Naringenin-7-O-β-D-glucuronid wurde wie unter **4.4.3, S.136** beschrieben durchgeführt. Die in DMSO gelösten Standardsubstanzen wurden in einem zweiten Versuch ebenfalls 1:100 mit Acetonitril/Wasser 9,5/0,5 (V/V) verdünnt und 1,5 µl zu 270 µl Rattenserum gegeben. Dieses mit Standardsubstanzen versetzte Rattenserum wurde wie unter **3.4.2.2, S.95** (nicht-enzymatische Aufarbeitung) beschrieben behandelt. Für die Identifizierung von phenolischen Inhaltsstoffen mittels HPLC-DAD der Prüfmedikation wurden verschiedene Standardsubstanzen zu ca. 500 µM in Methanol/Wasser (7/3, V/V) gelöst, filtriert und analysiert.

3.4.3 HPLC-DAD-Methode

Folgende Geräteparameter (**Tab. 25**) und folgender Gradient (**Tab. 26**) wurden für die Analyse der in der Prüfmedikation enthaltenen Polyphenole verwendet.

Tab. 25 Gewählte Geräteparameter der HPLC für die Identifizierung von Polyphenolen in Optovit® ActiFLEX.

Parameter	Spezifikation	Hersteller
Säule	Hibar® RT 250-4 cartridge with Purospher® Star-RP-18e (5 µm)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Vorsäule	Purospher® Star RP-8e (5 µm)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Injektionsvolumen	20 µl	
Ofentemperatur	40 °C	
Autosampler-temperatur	10 °C	
Detektionswellenlänge	289 nm	
Fließmittel A	0,5% o-Phosphorsäure 85% in Wasser	
Fließmittel B	Methanol	

Tab. 26 Übersicht des Gradienten FM1 der Identifizierung von Inhaltsstoffen der Prüfmedikation; G: Gradient, A/B: Fließmittelzusammensetzung (V/V), t: Zeit (min), flow (ml/min).

G	t	A/B	flow
FM1	0-45	80/20→20/80	0,60
	45-50	20/80	0,60
	50-51	20/80→80/20	0,60
	51-60	80/20	0,60

3.4.4 HPLC-DAD-MS-Methode

Folgende Geräteparameter (**Tab. 27** und **Tab. 29**) und folgender Gradient (**Tab. 28**) wurden für die Analyse von Phase-II-Metaboliten verwendet.

Tab. 27 Gewählte Geräteparameter der analytischen HPLC-DAD für die Analytik von Phase-II-Metaboliten.

Parameter	Spezifikation	Hersteller
Säule	Phenomenex Kinetex (5 µm), XB-C18, 100 Å, 250*4,6 mm	Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland
Injektionsvolumen	20 µl	
Ofentemperatur	30 °C	
Autosampler-temperatur	5 °C	
Detektionswellenlänge	190-640 nm	
Fließmittel A	Ammoniumacetat (10 mM) in Wasser	
Fließmittel B	Acetonitril	

Tab. 28 Übersicht des Gradienten FM2 der Phase-II-Metaboliten Analytik; G: Gradient, A/B: Fließmittelzusammensetzung (V/V), t: Zeit (min), flow (ml/min).

G	t	A/B	flow
FM2	0-3	95/5	1,0
	3-15	95/5→40/60	1,0
	15-16	40/60→5/95	1,0
	16-19	5/95	1,0
	19-20	5/95→95/5	1,0
	20-24	95/5	1,0

Tab. 29 Übersicht der Massenspektrometer-Einstellungen für die Analytik der Phase-II-Metaboliten.

Parameter	Einstellung
Aufnahmebereich	80-1200 <i>m/z</i>
Ionenpolarität	negativ
Scan Rate	3,00 Spektren/s
Gas Temperatur	300 °C
Gas Fluss	10 l/min
Nebulizer	45 psi
Hüllgas Temperatur	300 °C
Hüllgas Fluss	12 l/min

3.4.5 Datenverarbeitung

3.4.5.1 Metaboliten-Datenbank

Die Summenformeln und exakten Massen möglicher in Optovit® ActiFLEX enthaltener polyphenolischer Inhaltsstoffe und deren denkbarer Metaboliten wurden in eine Datenbank aufgenommen (**Tab. 30**). Diese wurde mittels Excel (Microsoft Office 2010) erstellt und in die Reportmethode der HPLC-MS-Software eingebettet.

Tab. 30 Erstellte MS Datenbank der möglichen polyphenolischen Verbindungen in der Prüfmedikation sowie der denkbaren polyphenolischen Metaboliten.

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C ₆ H ₆ O ₂	110,0368	Catechol
C ₇ H ₈ O ₂	124,0524	Saligenin
C ₆ H ₆ O ₃	126,0317	Phloroglucinol
C ₇ H ₆ O ₃	138,0317	Salicylsäure
C ₈ H ₁₀ O ₂	138,0681	Methylsaligenin
C ₇ H ₈ O ₃	140,0473	Methylphloroglucinol
C ₈ H ₈ O ₃	152,0473	Hydroxyphenylessigsäure, Dihydroxyphenylacetaldehyd
C ₇ H ₆ O ₄	154,0266	Trihydroxybenzaldehyd, Gentisinsäure
C ₉ H ₈ O ₃	164,0473	<i>trans-p</i> -Cumarsäure

Fortsetzung Tab. 30.

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C ₉ H ₁₀ O ₃	166,0630	Hydroxyphenylpropionsäure, Methyl Dihydroxyphenylacetaldehyd
C ₈ H ₈ O ₄	168,0423	Vanillinsäure, Methylgentisinsäure, Dihydroxyphenylessigsäure
C ₇ H ₆ O ₅	170,0215	Trihydroxybenzoesäure
C ₉ H ₉ NO ₃	179,0582	Hippursäure
C ₉ H ₈ O ₄	180,0423	Kaffeesäure
C ₁₀ H ₁₂ O ₃	180,0786	Methylhydroxyphenylpropionsäure
C ₉ H ₁₀ O ₄	182,0579	Dihydroxyphenylpropionsäure, Homovanillinsäure
C ₈ H ₈ O ₅	184,0372	Methylgallussäure
C ₆ H ₆ O ₅ S	189,9936	Catechol-sulfat
C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,0579	Ferulasäure
C ₉ H ₉ NO ₄	195,0532	Salicylsäure
C ₁₀ H ₁₂ O ₄	196,0736	Dihydroferulasäure
C ₇ H ₈ O ₅ S	204,0092	Saligenin-sulfat
C ₆ H ₆ O ₆ S	205,9885	Phloroglucinol-sulfat
C ₁₁ H ₁₂ O ₄	208,0736	Methylferulasäure
C ₁₀ H ₁₁ NO ₄	209,0688	Hydroxyphenylessigsäure-glycinkonjugat, Methylsalicylsäure
C ₉ H ₉ NO ₅	211,0481	Gentisinsäure-glycinkonjugat, Dihydroxyphenylessigsäure-glycinkonjugat
C ₇ H ₆ O ₆ S	217,9885	Salicylsäure-sulfat
C ₁₁ H ₁₃ NO ₄	223,0845	Hydroxypropionsäure-glycinkonjugat
C ₁₀ H ₁₁ NO ₅	225,0637	Vanillinsäure-glycinkonjugat
C ₉ H ₉ NO ₆	227,0430	Gallussäure-glycinkonjugat, Trihydroxybenzoesäure-glycinkonjugat
C ₈ H ₈ O ₆ S	232,0042	Hydroxyphenylessigsäure-sulfat, Dihydroxyphenylacetaldehyd-sulfat
C ₇ H ₆ O ₇ S	233,9834	Trihydroxybenzaldehyd-sulfat, Gentisinsäure-sulfat
C ₁₂ H ₁₄ NO ₄	236,0923	Cumarsäure-glycinkonjugat
C ₁₁ H ₁₁ NO ₅	237,0637	Kaffeesäure-glycinkonjugat
C ₁₁ H ₁₃ NO ₅	239,0794	Dihydroxyphenylpropionsäure-glycinkonjugat, Homovanillinsäure-glycinkonjugat
C ₉ H ₈ O ₆ S	244,0042	Cumarsäure-sulfat

Fortsetzung **Tab. 30.**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
$C_9H_{10}O_6S$	246,0198	Hydroxyphenylpropionsäure-sulfat
$C_8H_8O_7S$	247,9991	Vanillinsäure-sulfat, Dihydroxyphenylelessigsäure-sulfat
$C_7H_6O_8S$	249,9783	Trihydroxybenzoesäure-sulfat
$C_{12}H_{13}NO_5$	251,0794	Ferulasäure-glycinkonjugat
$C_{12}H_{15}NO_5$	253,0950	Dihydroferulasäure-glycinkonjugat
$C_9H_8O_7S$	259,9991	Kaffeesäure-sulfat
$C_9H_{10}O_7S$	262,0147	Dihydroxyphenylpropionsäure-sulfat, Homovanillinsäure-sulfat
$C_8H_8O_8S$	263,9940	Methylgallussäure-sulfat
$C_{15}H_{12}O_5$	272,0685	Naringenin
$C_{10}H_{10}O_7S$	274,0147	Ferulasäure-sulfat
$C_9H_9O_7S$	275,0100	Salicylursäure-sulfat
$C_{10}H_{12}O_7S$	276,0304	Dihydroferulasäure-sulfat
$C_{12}H_{14}O_8$	286,0689	Catechol-glucuronid
$C_{16}H_{14}O_5$	286,0841	Naringenin, methyliert
$C_{15}H_{12}O_6$	288,0685	Eriodictyol, Dihydrokämpferol
$C_{15}H_{14}O_6$	290,0790	Catechin
$C_{13}H_{16}O_8$	300,0845	Saligenin-glucuronid
$C_{12}H_{14}O_9$	302,0638	Phloroglucinol-glucuronid
$C_{16}H_{14}O_6$	302,0790	Hesperetin
$C_{15}H_{12}O_7$	304,0583	Taxifolin
$C_{16}H_{16}O_6$	304,0947	Methylcatechin
$C_{15}H_{14}O_6$	306,0740	Gallocatechin
$C_{13}H_{14}O_9$	314,0624	Salicylsäure-glucuronid
$C_{16}H_{16}O_7$	320,0896	Gallocatechin, methyliert
$C_{13}H_{12}O_{10}$	328,0430	Gentisinsäure-glucuronid
$C_{14}H_{16}O_9$	328,0794	Hydroxyphenylelessigsäure-glucuronid, Dihydroxyphenylacetaldehyd-glucuronid
$C_{13}H_{14}O_{10}$	330,0587	Trihydroxybenzaldehyd-glucuronid
$C_{15}H_{16}O_9$	340,0794	Cumarsäure-glucuronid

Fortsetzung Tab. 30.

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C ₁₅ H ₁₈ O ₉	342,0951	Hydroxyphenylpropionsäure-glucuronid
C ₁₄ H ₁₆ O ₁₀	344,0743	Vanillinsäure-glucuronid, Dihydroxyphenylelessigsäure-glucuronid
C ₁₃ H ₁₄ O ₁₁	346,0536	Trihydroxybenzoesäure-glucuronid
C ₁₅ H ₁₂ O ₈ S	352,0253	Naringenin-sulfat
C ₁₅ H ₁₆ O ₁₀	356,0743	Kaffeesäure-glucuronid
C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	358,0900	Dihydroxyphenylpropionsäure-glucuronid, Homovanillinsäure-glucuronid
C ₁₄ H ₁₆ O ₁₁	360,0693	Methylgallussäure-glucuronid
C ₁₅ H ₁₂ O ₉ S	368,0202	Eriodictyol-sulfat, Dihydrokämpferol-sulfat
C ₁₅ H ₁₄ O ₉ S	370,0359	Catechin-sulfat
C ₁₆ H ₁₈ O ₁₀	370,0900	Ferulasäure-glucuronid
C ₁₅ H ₁₇ NO ₁₀	371,0852	Salicylursäure-glucuronid
C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	372,1056	Dihydroferulasäure-glucuronid
C ₁₆ H ₁₄ O ₉ S	382,0359	Hesperetin-sulfat
C ₁₅ H ₁₂ O ₁₀ S	384,0151	Taxifolin-sulfat
C ₁₆ H ₁₆ O ₉ S	384,0515	Methylcatechin-sulfat
C ₁₅ H ₁₄ O ₁₀ S	386,0308	Gallocatechin-sulfat
C ₁₆ H ₁₆ O ₁₀ S	400,0464	Gallocatechin-sulfat, methyliert
C ₁₅ H ₁₂ O ₁₁ S ₂	431,9821	Naringenin-disulfat
C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	434,1213	Isosalipurposid, Naringenin-7-O-β-D-glucosid, Naringenin-5-O-β-D-glucosid
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,1006	Naringenin-glucuronid
C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	450,1162	Eriodictyol-7-O-β-D-glucosid, Dihydrokämpferol-7-O-β-D-glucosid
C ₁₆ H ₁₄ O ₁₂ S ₂	461,9927	Hesperetin-disulfat
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,0955	Eriodictyol-glucuronid, Dihydrokämpferol-glucuronid
C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	466,1111	Catechin-glucuronid
C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	478,1111	Hesperetin-glucuronid
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	480,0904	Taxifolin-glucuronid
C ₂₂ H ₂₄ O ₁₂	480,1268	Methylcatechin-glucuronid

Fortsetzung Tab. 30.

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C ₂₁ H ₂₂ O ₁₃	482,1060	Gallocatechin-glucuronid
C ₂₂ H ₂₄ O ₁₃	496,1217	Gallocatechin-glucuronid, methyliert
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	528,0574	Naringenin-glucuronid-sulfat
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₅ S	544,0523	Eriodictyol-glucuronid-sulfat, Dihydrokämpferol-glucuronid-sulfat
C ₂₁ H ₂₂ O ₁₅ S	546,0679	Catechin-glucuronid-sulfat
C ₂₂ H ₂₂ O ₁₅ S	558,0679	Hesperetin-glucuronid-sulfat
C ₂₁ H ₂₀ O ₁₆ S	560,0472	Taxifolin-glucuronid-sulfat
C ₂₂ H ₂₄ O ₁₅ S	560,0836	Methylcatechin-glucuronid-sulfat
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	578,1424	Procyanidin B1
C ₃₀ H ₂₈ O ₁₂	580,1581	6''-O- <i>trans</i> -p-Cumaroyl-isosalipurposid, 6''-O- <i>p-trans</i> -Cumaroyl-naringenin-5-O-β-D-glucosid
C ₃₁ H ₂₈ O ₁₂	592,1581	Procyanidin B1, methyliert
C ₂₇ H ₂₈ O ₁₇	624,1326	Naringenin-diglucuronid
C ₂₇ H ₂₈ O ₁₈	640,5004	Eriodictyol-diglucuronid, Dihydrokämpferol-diglucuronid
C ₂₇ H ₃₀ O ₁₈	642,1432	Catechin-diglucuronid
C ₂₈ H ₃₀ O ₁₈	654,1432	Hesperetin-diglucuronid
C ₂₇ H ₂₈ O ₁₉	656,1225	Taxifolin-diglucuronid
C ₂₈ H ₃₂ O ₁₈	656,1589	Methylcatechin-diglucuronid
C ₃₀ H ₂₆ O ₁₅ S	658,0992	Procyanidin B1-sulfat
C ₃₁ H ₂₈ O ₁₅ S	672,1149	Procyanidin B1-sulfat, methyliert
C ₃₆ H ₃₄ O ₁₈	754,1745	Procyanidin B1-glucuronid
C ₃₇ H ₃₆ O ₁₈	768,1902	Procyanidin B1-glucuronid, methyliert
C ₃₆ H ₃₄ O ₂₁ S	834,1313	Procyanidin B1-glucuronid-sulfat
C ₃₇ H ₃₆ O ₂₁ S	848,1470	Procyanidin B1-glucuronid-sulfat, methyliert
C ₄₂ H ₄₂ O ₂₄	930,2066	Procyanidin B1-diglucuronid
C ₄₃ H ₄₄ O ₂₄	944,2223	Procyanidin B1-diglucuronid, methyliert

3.4.5.2 MS Reportmethode

Die Auswertung aller MS-Daten erfolgte mit der Software Masshunter Qualitative Analysis (B. 05.00, Agilent). Die generierten MS-Rohdaten wurden zunächst mit der Reportmethode ausgewertet (**Tab. 31**). Die Datenbank wurde als csv-Datei in die Reportmethode integriert. Die daraus resultierenden „Compound Reports“ aller Zeitpunkte wurden miteinander verglichen. Die bereits im Nullwert vor Gabe der Prüfmedikation und die in den Seren der beiden Kontrollprobanden gefundenen Massen wurden bei der Auswertung der einzelnen Zeitpunkte nicht berücksichtigt. Das daraus erstellte Metabolitenprofil wurde weiterhin über die Extraktion und Integration der relevanten Massen in jedem Chromatogramm überprüft. Die Einstellungen wurden hierbei so gewählt, dass nur Massen mit weniger als 10 ppm Abweichung extrahiert und nur Peaks mit einer Fläche von mehr als 1000 Counts integriert wurden. Somit wurden für die endgültige Auswertung nur diese Massen berücksichtigt. Die ermittelten Peakflächen der relevanten Metaboliten wurden für jeden Zeitpunkt und Probanden als Mittelwert \pm StabW ausgedrückt ($n=8$). Als t_{\max} Werte wurden die Zeitpunkte mit der größten Peakfläche bezeichnet, diese wurden aus den Peakfläche-Zeit-Plots abgelesen.

Tab. 31 Gewählte Einstellungen der MS-Reportmethode.

Parameter	Einstellung
MS Chromatogramm Peak Filter	≥ 1000 Counts, ≤ 10 ppm
Molecular Feature Extraktion: m/z Bereich	100-1200
Molecular Feature Extraktion: Ionenladung	Negativ
Molecular Feature Extraktion: Zugelassene Ionen	-H, $+$ CH ₃ COO

3.4.5.3 Auswertung der MS/MS-Daten

Zur Überprüfung der ermittelten Verbindungen **1-15** wurden MS/MS-Spektren der relevanten Massen angefertigt. Dies erfolgte in einem eigenen Experiment. Hierbei wurden die Serumproben wie unter **3.4.2.2**, **S.95** beschrieben nicht-enzymatisch aufgearbeitet und wie unter **3.4.4**, **S.98** angegeben vermessen. Der MS-Software wurden die 15 Massen (experimentell ermittelte Masse) mit relevanter Retentionszeit ($\pm 0,25$ min) angegeben, um von diesen MS/MS-Spektren zu generieren. Zur Methodenentwicklung dienten Naringenin-7-*O*- β -D-glucuronid und Naringenin (je 10 μ M). Als Vertreter der sulfatierten Verbindungen wurde 4-Methylumbelliferyl-sulfat (10 μ M) gewählt. Aufgearbeitet wurden diese wie unter **3.4.2.3**, **S.96** beschrieben. Das Stoßgas war Stickstoff, und die Stoßenergie für das gesamte Experiment 15 eV. Es wurden nur einfach

geladene Ionen zugelassen, und das Auswahlfenster betrug ± 2 Da, um auch die ^{13}C Isotope zu erfassen.

3.4.6 Geräte und Chemikalien

Die im **Kapitel 3** „Analyse von Phase-II-Metaboliten nach Einnahme eines Weidenrindenextrakts“ verwendeten Geräte und Chemikalien sind in **Tab. 32** und **Tab. 33** zusammengefasst.

Tab. 32 Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien im **Kapitel 3**.

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Einmalspritzen (sterile)	Norm-Ject, Tuberculin, 1 ml	Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Deutschland
Gefrierschrank (T=-80 °C)	Modell 995	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
HPLC-DAD, analytisch	Elite LaChrom, Autosampler L2200, Pumpe L2130, Säulenofen L2350, Dioden-Array-Detektor L2444; Software: EZChrom Elite 3.1.7	Hitachi, Tokio, Japan; Vertrieb: VWR, Darmstadt, Deutschland
HPLC-DAD-MS, analytisch	Agilent, Binary Pump G4220A, HiP Sampler G4226A, Column Comp. G1316C, DAD G4212A,	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
HPLC-Vial	11 mm CrimpSnap-Vial, braun, 2 ml	Wicom, Heppenheim, Deutschland
HPLC-Vial Insert	Micro Insert, 300 μl , l=30 mm, $\varnothing=6$ mm	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Inkubator	AutoFlow IR Direct Heat, NU-5500 E T=37 °C, CO ₂ =5%	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Mandrin	Vasofix [®] Mandrin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Massenspektrometer	Agilent MS Q-TOF 6540 UHD, Ionenquelle: AJS ESI G6540A	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Monovetten-Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 R Sepatech	Thermo scientific, Langenselbold, Deutschland
Oberschalenwaage	MC 1, Laboratory LC 6200 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Fortsetzung **Tab. 32.**

Bezeichnung	Modell	Hersteller
pH-Meter	inoLab pH Level 1, Elektrode SenTix Mic	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten	2,5 Research (0,1-2,5 µl) 10 Reference (2,5-10 µl) 100 Reference (10-100 µl) 1000 Reference (100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	0,5 µl, 10 µl 100 µl, 1000 µl	Kinesis, Lengenfeld, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß	Eppendorf Tubes 3810X, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß-Zentrifuge	Jouan BR4i multifunction centrifuge	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Reinstwasseranlage	Astacus LS	MembraPure, Berlin, Deutschland
Schüttler	Vortex mixer VV3	VWR, Darmstadt, Deutschland
S-Monovette	7,5 ml S-Monovette®	Sarstedt AG u. Co., Nümbrecht, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Perfect-Flow RC membrane (0,2 µm)	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner	VWR, Darmstadt, Deutschland
Verweilkanüle	Vasofix® Braunüle®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Vial-Verschlusskappe	PP Schnappkappe, blau, für 11 mm SnapCrimp-Vial, mit Teflon/Silikon-Septum	Wicom, Heppenheim, Deutschland

Tab. 33 Auflistung der verwendeten Referenzsubstanzen und Chemikalien im **Kapitel 3.**

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
(2R/2S)-Naringenin-5-O-β-D-glucosid	Isolat aus STW-Extrakt	Isoliert im Rahmen einer Doktorarbeit (Freischmidt 2011)
3-(4-Hydroxyphenyl)-propionsäure	≥ 98%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
4-Methylumbelliferyl-sulfat	Kalium-Salz, ≥ 99% (HPLC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Fortsetzung **Tab. 33.**

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
6''-O- <i>trans</i> -p-Cumaroyl-(2 <i>R</i> /2 <i>S</i>)-naringenin-5-O- β -D-glucosid	Isolat aus STW-Extrakt	Isoliert im Rahmen einer Doktorarbeit (Freischmidt 2011)
6''-O- <i>trans</i> -p-Cumaroyl-isosalipurposid	Isolat aus STW-Extrakt	Isoliert im Rahmen einer Doktorarbeit (Freischmidt 2011)
Acetonitril LiChrosolv®	Reag. Ph Eur, gradient grade for liquid chromatography	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure	98-99%, p.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumacetat	Für die Massenspektrometrie	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Catechin	(+/-) Catechinhydrat	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Catechol	1,2-Dihydroxybenzen, $\geq 99\%$	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dihydrokämpferol	Isolat aus STW-Extrakt	Isoliert im Rahmen einer Doktorarbeit (Freischmidt 2011)
Dihydrokämpferol-7-O- β -D-glucosid	Isolat aus STW-Extrakt	Isoliert im Rahmen einer Doktorarbeit (Freischmidt 2011)
DMSO	p.A., 99%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eriodictyol	$\geq 99\%$ (HPLC)	Extrasynthese, Lyon, Frankreich
Eriodictyol-7-O- β -D-glucosid	$\geq 99\%$ (HPLC)	Extrasynthese, Lyon, Frankreich
Fertigarzneimittel Weidenrindenextrakt	Optovit® ActiFLEX 393 mg (100 St.), Weidenrindentrockenextrakt (8-14:1) entspricht 60 mg Salicin, Auszugsmittel Ethanol 70%, Zul. Nr.: 40294.00.00, PZN: 3768629, Charge: 0113911, verwendbar bis: 09/13	Hermes Arzneimittel, Großhesselohe, Deutschland
Ferulasäure	$\geq 98\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isosalipurposid	Isolat aus STW-Extrakt	Isoliert im Rahmen einer Doktorarbeit (Freischmidt 2011)
L-(+)-Ascorbinsäure	99%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol LiChrosolv®	Reag. Ph Eur, gradient grade for liquid chromatography	Merck, Darmstadt, Deutschland
Naringenin	$\geq 99,5\%$ (HPLC)	Extrasynthese, Lyon, Frankreich

Fortsetzung **Tab. 33.**

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Naringenin-7-O- β -D-glucosid	$\geq 99\%$ (HPLC)	Extrasynthese, Lyon, Frankreich
Naringenin-7-O- β -D-glucuronid (1b)	$\geq 95\%$	Synthetisiert im Rahmen einer Bachelorarbeit von S. Pitzl
Natriumacetat	p.A., wasserfrei, $\geq 99,0\%$	Merck, Darmstadt, Deutschland
o-Phosphorsäure	85%, p.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Rattenserum	Wistar ♂ Rattenserum (vom 29.08.2012)	Ratten: Animal Breeding Unit of the National Ophtalmology Institute, Giza, Ägypten, Serumgewinnung analog Knuth (2013)
Salicylsäure (16)	p.A., $\geq 99,0\%$	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Salicylursäure (17)	2-Hydroxyhippursäure, $\geq 97\%$	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Saligenin	2-Hydroxybenzylalkohol $\geq 99\%$	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Sulfatase	Aus <i>Helix pomatia</i> , Type H-1, lyophilisiert, ≥ 10000 U/g	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Taxifolin	$\geq 85\%$ (HPLC)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
β -Glucuronidase	Type B-10, aus boviner Leber, 10100 U/mg	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

4 IN VITRO UND IN SILICO ANALYSEN ZU POLYPHENOLISCHEN PHASE-II-METABOLITEN

4.1 Grundlage

Obwohl Polyphenole, besonders Flavonoide, einer ausgeprägten Phase-II-Metabolisierung und die entstehenden Phase-II-Metaboliten einer starken Eliminierung unterliegen, konnte die Akkumulierung dieser Verbindungen in vielen Geweben nachgewiesen werden. So finden sich in Herz, Lunge, Gehirn oder in Schaumzellen arteriosklerotischer Arterien erhöhte Konzentrationen an Phase-II-Metaboliten der Flavonoide, was einer kontinuierlichen, täglichen, flavonoidhaltigen Nahrung zuzuschreiben ist (de Boer et al. 2005; Kawai et al. 2008; Ishisaka et al. 2014). Die beschriebenen pharmakologischen Wirkungen der Flavonoide reichen von anti-inflammatorischen, antioxidativen, hepatoprotektiven und antimikrobiellen Eigenschaften über antiproliferative Effekte bis hin zur Prävention koronarer Herzkrankheit (Kumar und Pandey 2007). *In vitro* wurden die anti-inflammatorischen Effekte hauptsächlich für die Flavonoid-aglyka beobachtet (Nijveldt et al. 2001). Jedoch findet man *in vivo* fast ausschließlich Phase-II-Metaboliten oder Ring-Spaltprodukte und nur sehr wenige Aglyka der Flavonoide (Rechner et al. 2002; Walle 2004). Flavonoid-glucuronide, besonders das 3-O-Glucuronid des ubiquitär in pflanzlichen Nahrungsmitteln und in pflanzlichen Arzneimitteln vorkommenden Quercetins, welches gleichzeitig zu den meist untersuchten Flavonoid-glucuroniden zählt, zeigt nur geringe Aktivität in anti-inflammatorischen Zellkultur Assays (Day et al. 2000; Williamson et al. 2005). Gleichzeitig konnte in *ex vivo* Versuchen eine Spaltung des Baicalin-glucuronids, einem Flavon-glucuronid, in isolierten Geweben, wie Darm, Leber, Lunge, Niere, Prostata oder Pankreas gezeigt werden (Lu et al. 2014). Das Flavonoidrätsel, also die Frage ob die *in vivo* vorkommenden aber *in vitro* überwiegend inaktiven Phase-II-Metaboliten oder die korrespondierenden *in vitro* stark aktiven, jedoch *in vivo* kaum vorhandenen Flavonoid-aglyka für die pharmakologischen Wirkungen der Flavonoide verantwortlich sind, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen diskutiert (Sies und Packer 2005; Menendez et al. 2011; Perez-Vizcaino et al. 2012; Galindo et al. 2012). In Kapitel 4.1.2, S.111 und 4.1.3, S.112 werden die aktuellen Studien zur möglichen Freisetzung der Flavonoide aus ihren glucuronidierten Verbindungen näher erläutert.

4.1.1 Bedeutung des ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1)

Die molekularen Mechanismen einer Entzündungsreaktion sind sehr komplex und hängen u.a. von einem diffizilen Zusammenspiel vieler Zytokine und Transkriptionsfaktoren ab. Zusätzlich spielt die Adhäsionskaskade der Leukozyten an Endothelzellen bei der Immunantwort auf pathogen induzierte oder autoimmun bedingte Entzündungen eine zentrale Rolle (Cronstein und Weissmann 1993). Im Folgenden sollen die wichtigsten Aspekte und die Bedeutung des Immunglobulins ICAM-1 kurz umrissen werden.

Die Extravasation von Leukozyten aus dem Blut ins entzündete Gewebe läuft über einen mehrstufigen Prozess ab, welcher vom initialen Abbremsen der Leukozyten im Blutstrom bis zu deren Migration ins Gewebe reicht. Auf inflammatorische Stimuli hin exprimieren Endothelzellen der Blutgefäße E- und P-Selectin, welche mit dem P-Selectin Glykoprotein-1 der Leukozyten in Wechselwirkung treten und somit ein erstes Anheften und Verlangsamen („tethering und rolling“) der Leukozyten veranlasst (Ley et al. 2007; Chavakis et al. 2009). Der nächste Schritt ist die Aktivierung und das finale Anheften der Leukozyten an das Endothel. Dies wird über eine Expression von Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und VCAM-1 (vascular cell-adhesion molecule-1), von Zytokin aktivierten Endothelzellen vermittelt. Die Integrine der $\beta 1$ und $\beta 2$ Unterfamilie der Leukozyten binden an diese Adhäsionsmoleküle, wobei VLA4 (very late antigen 4) an VCAM-1 und LFA1 (lymphocyte function-associated antigen 1) an ICAM-1 binden (Cronstein und Weissmann 1993; Ley et al. 2007; Chavakis et al. 2009). Die anschließende Migration der Leukozyten ins Gewebe (Diapedese) kann para- oder transzellulär erfolgen. Beim transzellulären Transport spielt das Immunglobulin ICAM-1 für die Bildung von Kanälen an der endothelialen Zellmembran ebenfalls eine wichtige Rolle (Ley et al. 2007). Die ICAM-1 Expression kann durch viele Substanzen stimuliert werden, darunter $\text{TNF}\alpha$ (Roebuck und Finnegan 1999). Der Transkriptionsfaktor NF- κB , bestehend aus zwei Untereinheiten p65 und p50, nimmt hierbei eine Schlüsselrolle ein (Roebuck und Finnegan 1999; Tak und Firestein 2001). Er kann durch Zytokine ($\text{TNF}\alpha$), Pathogene wie LPS (Lipopolysaccharid), Zellschäden oder Stress aktiviert werden und reguliert Gene, welche für Entzündungen, Immunantwort, Apoptose und Zelldifferenzierung verantwortlich sind. Eine übermäßige NF- κB -Aktivierung wird mit Autoimmunkrankheiten, chronischer Entzündung und diversen Krebsarten assoziiert (Oeckinghaus et al. 2011). Im Zytoplasma liegt NF- κB in seiner inaktiven Form als Dimer gebunden an I κB (Inhibitor of κB) vor. Nach Stimulierung durch $\text{TNF}\alpha$ kommt es durch Phosphorylierung von I κB durch den IKK Komplex (I κB kinase complex), welcher aus zwei katalytischen Kinasen IKK α und IKK β besteht, zur

Freisetzung von NF- κ B. I κ B selbst wird ubiquitiniert und proteolytisch abgebaut (Tak und Firestein 2001; Oeckinghaus et al. 2011). NF- κ B transloziert nach seiner Freisetzung in den Zellkern und bindet an seine Promotorregion welche eine Transkription von u.a. ICAM-1 ermöglicht (Roebuck und Finnegan 1999; Tak und Firestein 2001). Diese kurze Zusammenfassung soll Hintergrundinformation zur Wahl des Testsystems der TNF α induzierten ICAM-1 Expressionshemmung liefern und stellt das zelluläre Entzündungsgeschehen nur auszugsweise dar.

4.1.2 Vorkommen der β -Glucuronidase und deren Bedeutung für die Flavonoid-metabolisierung

Für das *in vivo* und *in vitro* kardiovaskulär protektive Quercetin konnte im Rattenmodell gezeigt werden, dass nach Metabolisierung zum Quercetin-glucuronid ein blutdrucksenkender Effekt eintritt, welcher sich durch den spezifischen β -Glucuronidase-Inhibitor D-Saccharolacton unterdrücken lässt. Diese Ergebnisse lassen auf eine *in vivo* Dekonjugierung durch β -Glucuronidase und somit Aktivierung des Quercetins schließen (Menendez et al. 2011; Perez-Vizcaino et al. 2012; Galindo et al. 2012). Eine erhöhte Freisetzung lysosomaler β -Glucuronidase wurde für nekrotisches Gewebe von Tumoren gezeigt, welche dort hauptsächlich von Zellen der akuten und chronischen Entzündung sezerniert werden (Bosslet et al. 1998). Am Entzündungsort konnte eine erhöhte Freisetzung von Granulozyten, hauptsächlich von Neutrophilen und Eosinophilen beobachtet werden (Marshall et al. 1988). β -Glucuronidase kann außerdem von Makrophagen sezerniert werden, welche in das entzündete Gewebe einwandern (Marshall et al. 1988; Ishisaka et al. 2013). Von Shimoï et al. (2001) sowie Sies und Packer (2005) wurde eine Freisetzung von Luteolin aus seiner glucuronidierten Form für humanes hämolytisches Serum, LPS behandeltes Rattenplasma sowie für das Zelllysate von neutrophilen Granulozyten und der Zelllinien Caco-2 (human), HUVEC (human) und IMR-90 (human) beobachtet. Dies ließ die Arbeitsgruppe auf eine Freisetzung der β -Glucuronidase und gleichzeitig auf eine höhere Enzymaktivität am Entzündungsort schließen. Die glucuronidierten Phase-II-Metaboliten gewinnen damit einen Prodrug-Charakter. Korrespondierende Zelllinien von Makrophagen, Neutrophilen etc. wie RAW264 (murin), J774-1 (murin) oder d-THP-1 (human) besitzen ebenfalls β -Glucuronidase-Aktivität und können als Testsysteme dienen (Ishisaka et al. 2013). O'Leary et al. (2001) bestimmte die Kinetik der Dekonjugation verschiedener Quercetin-glucuronide durch zellfreie Extrakte aus der humanen Leber, von Neutrophilen und des Dünndarms sowie durch humane rekombinante β -Glucuronidase.

Da Flavonoide im Zuge der Phase-II-Metabolisierung nicht nur glucuronidiert sondern auch sulfatiert werden, lag der Fokus vieler Arbeitsgruppen gleichermaßen auf einer Sulfatase-Aktivität von Geweben, Zellen oder Zelllinien (Williamson et al. 2005). So sind Arylsulfatasen für Granulozyten beschrieben, jedoch konnte bis heute keine signifikante Dekonjugation der sulfatierten Flavonoide in Entzündungsmodellen detektiert werden (Isman et al. 2005; Ishisaka et al. 2013).

4.1.3 Postulierter Mechanismus der Flavonoid-glucuronid Spaltung durch β -Glucuronidase

Aufgrund der Akkumulation von Quercetin-3-O-glucuronid in arteriosklerotischen Aorten und besonders in den Schaumzellen, wurden Makrophagen als ein biologisches Target von Quercetin-3-O-glucuronid identifiziert (Kawai et al. 2008). Eine weitere japanische Arbeitsgruppe beobachtete eine Dekonjugation des Metaboliten und postulierte einen Mechanismus der Dekonjugation von Quercetin-glucuroniden (Ishisaka et al. 2013). Es wurde zusätzlich beobachtet, dass eine durch entzündliche Prozesse bedingte Schädigung von Mitochondrien in Abhängigkeit einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration zur Sekretion von β -Glucuronidase aus RAW264-Makrophagen führte. Das Ausmaß der Sezernierung des Enzyms war nicht abhängig von einer proinflammatorischen Stimulierung mit LPS. Gleichzeitig führte jedoch die durch LPS induzierte mitochondriale Schädigung zu erhöhten intrazellulären Lactatkonzentrationen und folglich über eine erhöhte Protonenkonzentration zur Erniedrigung des pH-Werts an der Zelloberfläche. Dieser erniedrigte pH-Wert stellte die Grundvoraussetzung für eine β -Glucuronidase-Aktivität dar. Quercetin-glucuronid band anionisch an DIDS-sensitive (4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure) Oberflächenproteine der Makrophagen und wurde dort zum Aglykon dekonjugiert (**Abb. 24**). Über einfache Diffusion kann das Aglykon in die Zelle und somit zum Wirkort gelangen, wo es durch intrazelluläre COMT weiter methyliert werden kann (Ishisaka et al. 2013). Die Konservierung der Flavonoide, als bei physiologischem pH stabile Glucuronide im Blutplasma, stellt einen weiteren Aspekt dieses Modells dar. Am Entzündungsort könnten diese in die aktiven, aber im physiologischen Plasma nicht stabilen Aglyka *in situ* freigesetzt werden (Ishisaka et al. 2013). Die Anwendbarkeit dieses Modells wurde jedoch noch nicht für eine größere Anzahl von möglichen Flavonoid-glucuroniden untersucht. Deshalb war es ein Ziel dieser Arbeit die Dekonjugation polyphenolischer Glucuronide durch humane β -Glucuronidase in einem *in vitro* System zu untersuchen. Dafür sollte ein Testsystem entwickelt werden, um im Rahmen einer möglichst breiten

Untersuchung verschiedenste Flavonoid-glucuronide hinsichtlich ihrer Umsetzung durch humane β -Glucuronidase zu analysieren.

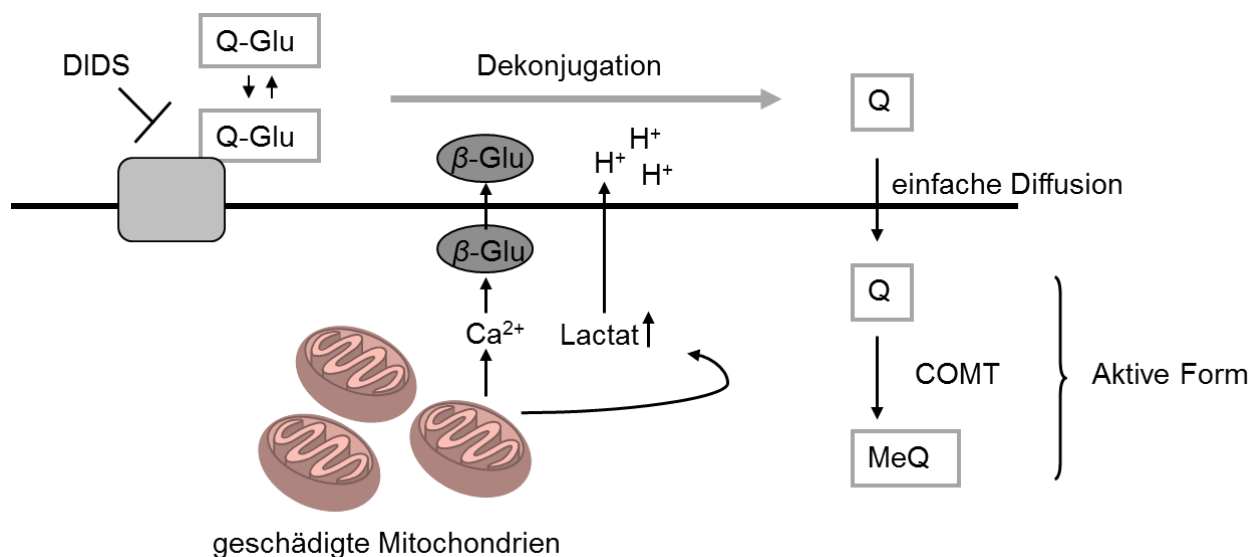


Abb. 24 Möglicher Mechanismus der Dekonjugation von Quercetin-glucuroniden durch Makrophagen nach Ishisaka et al. (2013); β -Glu: β -Glucuronidase, Q-Glu: Quercetin-glucuronid, Q: Quercetin, MeQ: methyliertes Quercetin, COMT: Catechol-O-Methyltransferase, DIDS: 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure.

4.2 Ergebnisse und Diskussion

4.2.1 Untersuchung der anti-inflammatorischen Eigenschaften von Phase-II-Metaboliten aus Weidenrinde

Die beiden Phase-II-Metaboliten Naringenin-7-O- β -D-glucuronid **1b** und Catechol-sulfat **12**, welche als wichtige Metaboliten der pharmakokinetischen Studie WBCat-1 identifiziert werden konnten (vgl. **Kapitel 3, S.57**), wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit synthetisiert und hier auf ihre biologische Aktivität untersucht. Da Weidenrinde entzündungshemmende Eigenschaften besitzt, wurde das ICAM-1 Assay Testsystem gewählt. Wie TNF α eine E-Selectin Expression in HUVEC Zellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) induziert, welches mittels eines E-Selectin spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpers per Durchflusszytometrie quantifiziert werden kann (Dirsch et al. 2004), induziert es in HMEC-1 Zellen (Human Microvascular Endothelial Cells-1) die Expression von ICAM-1 (Calis et al. 2008). HMEC-1 Zellen sind mit einem Virusgen enthaltenden Plasmid transfizierte und damit immortalisierte Endothelzellen, welche die morphologischen und funktionellen Eigenschaften normaler humaner Endothelzellen besitzen (Ades et al. 1992). Der konfluente Zell-Monolayer wurde mit dem proinflammatorischen Stimulus TNF α (10 ng/ml) 24 h stimuliert, woraufhin das Oberflächenprotein ICAM-1 vermehrt exprimiert wurde. Die Aufgabe der Testsubstanzen (5, 25 und 50 μ M für **1b**; 10, 50 und 100 μ M für **12**) erfolgte eine halbe Stunde vor der TNF α Stimulierung. Nach der Inkubation für 24 h und Fixierung der Zellen in Formalin wurde die ICAM-1 Expression der Zellen über einen spezifischen FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-markierten Antikörper an ICAM-1 mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die ICAM-1 Expression der nur mit TNF α stimulierten Zellen wurde als 100 Prozent gesetzt und alle anderen Daten prozentual hierzu ausgedrückt (Calis et al. 2008; Knuth et al. 2011; Freischmidt et al. 2012). Als anti-inflammatorisch wirksame Positivkontrolle wurde das Sesquiterpenlacton Parthenolid (5 μ M) verwendet, welches die TNF α induzierte ICAM-1 Expression unterdrückt (Hegner et al. 1999). Die Zellen wurden ebenfalls ohne TNF α -Stimulierung vermessen, um einen Wert der natürlichen ICAM-1 Expression zu erhalten.

Es konnte im Versuchsansatz weder für die glucuronidierte Verbindung **1b** noch für die sulfatierte Verbindung **12** eine signifikante Hemmung der TNF α induzierten ICAM-1 Expression im getesteten Konzentrationsbereich gezeigt werden. Die ICAM-1 Expression lag stets über 90% (**Abb. 25**). Die Positivkontrolle hemmte die Expression des Oberflächenproteins auf 31% der totalen Expression

und die natürliche ICAM-1 Expression lag bei 4%. Das Aglykon Naringenin (50 μ M) selbst wurde von Freischmidt (2011) untersucht und zeigte eine geringe aber signifikante Aktivität. Es reduzierte die Expression von ICAM-1 auf 83%. Ein weiter getesteter Phase-II-Metabolit war Catechol-glucuronid **9**, welcher wie das hier gezeigte Catechol-sulfat **12**, im Gegensatz zum sehr aktiven Aglykon Catechol keine Aktivität im Assay zeigte (Knuth 2013). Die Testung weiterer Phase-II-Metaboliten, darunter sulfatierte, sowie mono- und diglucuronidierte Verbindungen des Kämpferols zeigten ebenfalls keine Aktivität (Bücherl 2014).

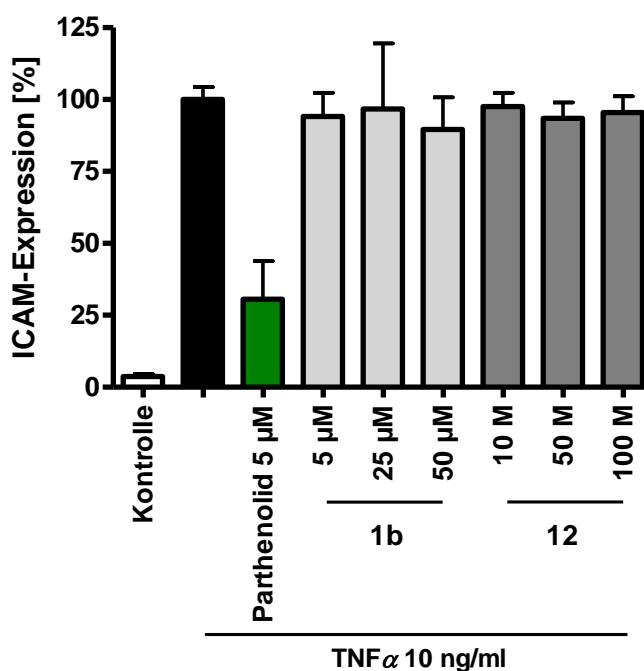


Abb. 25 TNF α induzierte ICAM-1 Expressionshemmung von Naringenin-7-O- β -D-glucuronid (**1b**) (je 5, 25, 50 μ M) und Catechol-sulfat (**12**) (10, 50, 100 μ M) auf HMEC-1 Zellen nach 24 h Inkubation; Parthenolid (5 μ M) diente als Positivkontrolle und die ICAM-1 Expression nur mit TNF α behandelter Zellen als 100% Wert; n=3 in Duplikaten, MW \pm StabW.

Die Konjugation mit Sulfat oder Glucuronsäure führt zu einer höheren Polarität der Phase-II-Metaboliten im Vergleich zu ihren Aglyka. Der Verteilungskoeffizient ändert sich durch die Konjugation erheblich und der Metabolit kann nicht mehr passiv durch die Zellmembran diffundieren (Williamson et al. 2005; Sies und Packer 2005). Da die TNF α induzierte ICAM-1 Expression von Flavonoiden über intrazelluläre Targets gehemmt wird, könnte der Effekt deshalb ausbleiben (Kobuchi et al. 1999; Chen et al. 2004). Aufgrund der fehlenden Aktivität ist eine Spaltung der Phase-II-Metaboliten durch Enzyme der HMEC-1 Zellen unter diesen Versuchsbedingungen also vermutlich auszuschließen.

4.2.2 Strukturabhängige Dekonjugation von Flavonoid-glucuroniden durch humane β -Glucuronidase

4.2.2.1 Entwicklung eines Deglucuronidierungsassays

Um das Dekonjugationsverhalten der β -Glucuronidase gegenüber 14 Polyphenol-glucuroniden (**Abb. 27**) zu untersuchen, wurde eine humane Monozyten-Zelllinie, die Mono Mac 6 Zellen (MM6) gewählt. Diese zeigt die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften reifer Monozyten (Ziegler-Heitbrock et al. 1988). MM6-Zellen zeigten nach $\text{TNF}\alpha$ -Stimulierung neben einer erhöhten Phagozytoserate auch eine Wachstumsretardierung. Außerdem erzielte eine $\text{TNF}\alpha$ Stimulierung eine moderate Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen (Weber et al. 1993).

In dieser Arbeit wurden MM6-Zellen nach Kultivierung in 24 Well Platten für 48 h stichprobenartig gezählt und durch Zentrifugation vom Überstand getrennt. Der Zellüberstand wurde mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 4-5 eingestellt, da die β -Glucuronidase hier ihr pH-Optimum aufweist (Bartholomé et al. 2010). Die für die Assayentwicklung genutzten Substanzen 4-Methylumbelliferon- β -D-glucuronid **18** und Baicalin **26** (je 50 μM) wurden dem Überstand zugesetzt und für 0, 2, 4, 6 und 8 h bei 37 °C im Inkubator gelagert. Nach Fällung der Proteine mit Methanol und Justierung des pH-Werts auf 7 wurden die Proben an der HPLC analysiert. Nach Integration wurde der Mittelwert der jeweils zum Zeitpunkt 0 h ermittelten Flächen als 100% gesetzt. Die ermittelten Flächen zu den Zeitpunkten 2, 4, 6 und 8 h wurden prozentual dazu ausgedrückt. Stabilitätskontrollen der Substanzen im Zellmedium wurden zu jeder Zeit mitgeführt und dienten als Vergleich. Hierbei wurde eine Umsetzung der Substanzen **18** und **26** zu ihren Aglyka beobachtet (**Abb. 26**). Eine Steigerung der Umsetzung in Anwesenheit eines proinflammatorischen Pathogens (LPS) wurde in der Literatur für Rattenplasma beschrieben (O'Leary et al. 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde $\text{TNF}\alpha$ als proinflammatorisches Stimulanz nach 24 h Kultivierung der Zellen zugesetzt. Eine Steigerung der Umsetzung der glucuronidierten Verbindungen zu ihren korrespondierenden Aglyka konnte hierbei nur marginal beobachtet werden, was eine konstitutive Sezernierung der β -Glucuronidase durch MM6-Zellen impliziert (Ishisaka et al. 2013). Shimoi et al. (2001) beobachteten jedoch einen signifikanten Anstieg der β -Glucuronidase-Aktivität im Plasma LPS-behandelter Ratten. Eine leichte, wenn auch statistisch nicht signifikante Steigerung der Umsetzung nach $\text{TNF}\alpha$ -Stimulierung (**Abb. 26**) motivierte zur Durchführung aller weiteren Experimente unter $\text{TNF}\alpha$ -Zusatz (110 U/ml). Um eine unspezifische Spaltung durch Esterasen auszuschließen, wurde **26** im Versuchsansatz exemplarisch zusätzlich mit dem spezifischen β -Glucuronidase-Inhibitor D-Saccharolacton (10 μM) versetzt (Levy 1952). Dadurch konnte eine

vollständige Inhibierung der β -Glucuronidase-Aktivität erzielt werden (**Abb. 26**). Die hier entwickelten optimalen Assayparameter sind den von Ishisaka et al. (2013) für Makrophagen beschriebenen Bedingungen sehr ähnlich.

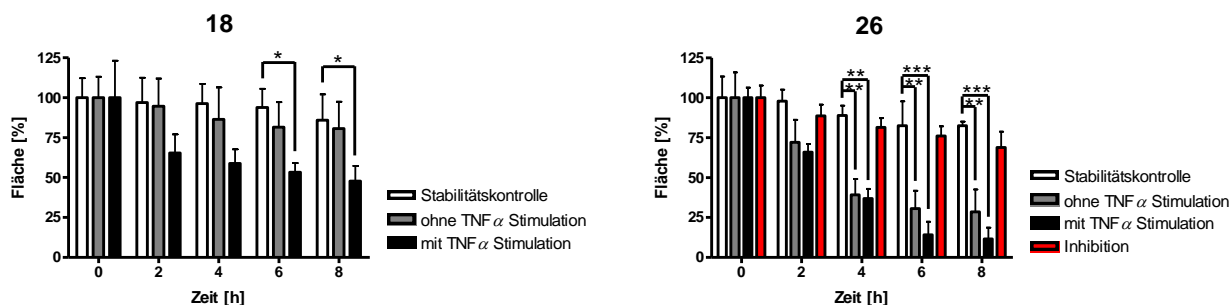


Abb. 26 Verbindungen **18** und **26** (je 50 μ M) wurden dem Deglucuronidierungsassay unterzogen, welcher mit oder ohne $\text{TNF } \alpha$ Stimulierung oder mit Zusatz des spezifischen β -Glucuronidase Inhibitors D-Saccharolacton (10 μ M) durchgeführt wurde; es wurden mindestens drei unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt; Daten aller Graphen sind als $\text{MW} \pm \text{StabW}$ dargestellt, sie wurden einer zweifachen ANOVA mit einem Bonferroni Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.2.2.2 Testung von Polyphenol-glucuroniden im Deglucuronidierungsassay

Es wurden 14 Polyphenol-glucuronide hinsichtlich ihrer Dekonjugation durch β -Glucuronidase untersucht (**Abb. 27**). Darunter befanden sich Naringenin-7-O- β -D-glucuronid **1b** und Catechol-glucuronid **9**, welche als Phase-II-Metaboliten von Naringenin und Catechol - zwei wichtige Bestandteile des Weidenrindenextrakts - identifiziert wurden (**Kapitel 3**). Das in der Literatur meist untersuchte Flavonoid-glucuronid Quercetin-3-O- β -D-glucuronid **19** wurde durch die im MM6-Zellüberstand befindliche β -Glucuronidase gespalten. Durch HPLC Analyse konnte gezeigt werden, dass innerhalb von 0-8 h **19** sukzessive zum korrespondierenden Aglykon Quercetin **Q** abgebaut wird (**Abb. 28**). Eine Auftragung der Flächen der Zeitpunkte 2-8 h, bezogen auf die Fläche zum Zeitpunkt 0 h zeigte, dass nur die Polyphenol-glucuronide **18**, **19**, **21-28** signifikant gespalten wurden. Eine Übersicht hierzu findet sich in **Abb. 29**.

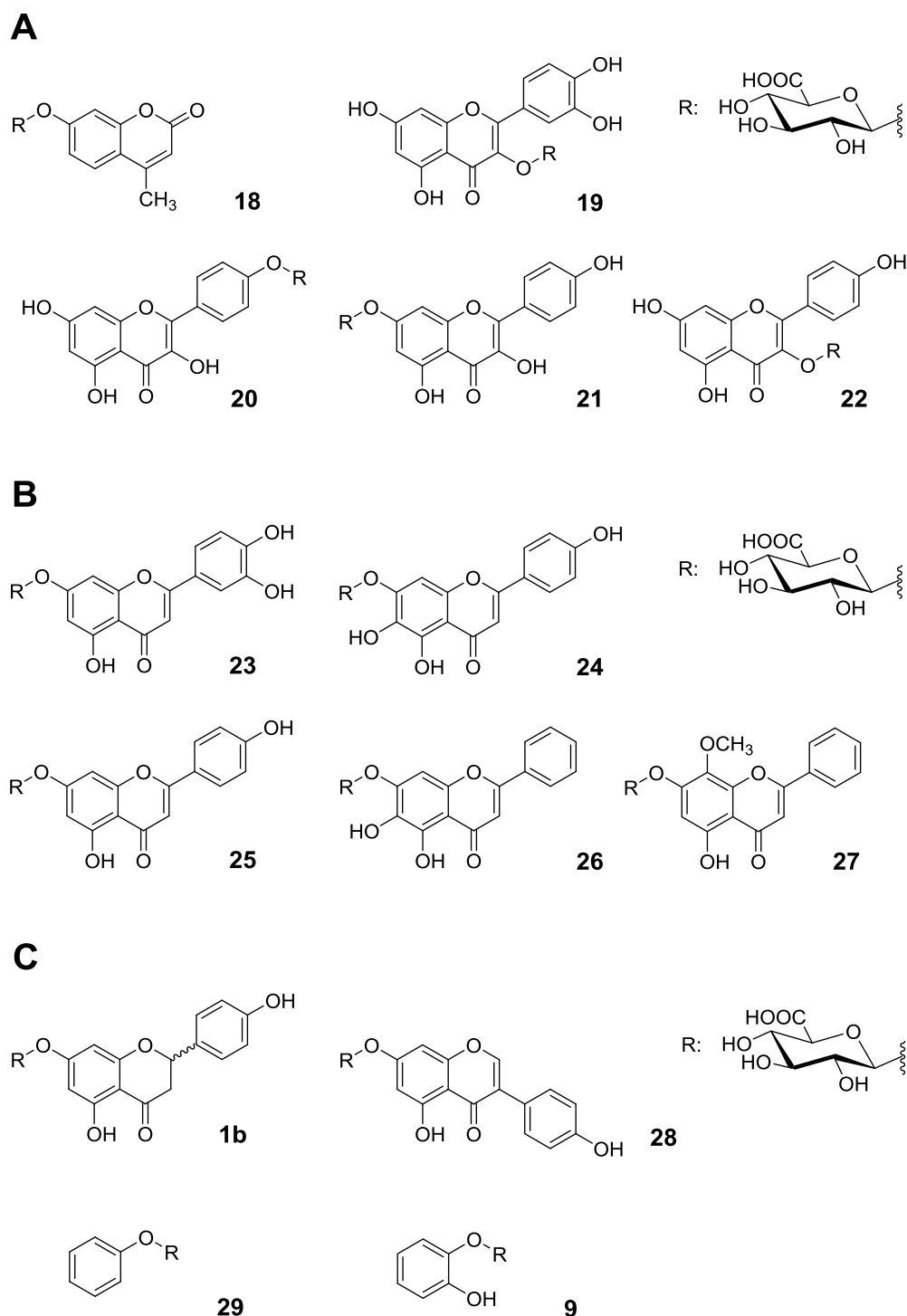


Abb. 27 Hinsichtlich der Dekonjugation durch humane β -Glucuronidase untersuchte Flavonoid- (**1b** und **19-28**) und Phenol-glucuronide (**18**, **29**, **9**); **A**: 4-Methylumbelliferon- β -D-glucuronid (**18**) und die Flavonole Quercetin-3-O- β -D-glucuronid (**19**), Kämpferol-4'-O- β -D-glucuronid (**20**), Kämpferol-7-O- β -D-glucuronid (**21**) und Kämpferol-3-O- β -D-glucuronid (**22**), **B**: Flavone Luteolin-7-O- β -D-glucuronid (**23**), Scutellarein-7-O- β -D-glucuronid (**24**), Apigenin-7-O- β -D-glucuronid (**25**), Baicalin (**26**) und Wogonin-7-O- β -D-glucuronid (**27**), **C**: weitere Flavonoide und Phenole Naringenin-7-O- β -D-glucuronid (**1b**), Genistein-7-O- β -D-glucuronid (**28**), Phenol-O- β -D-glucuronid (**29**) und Catechol-O- β -D-glucuronid (**9**).

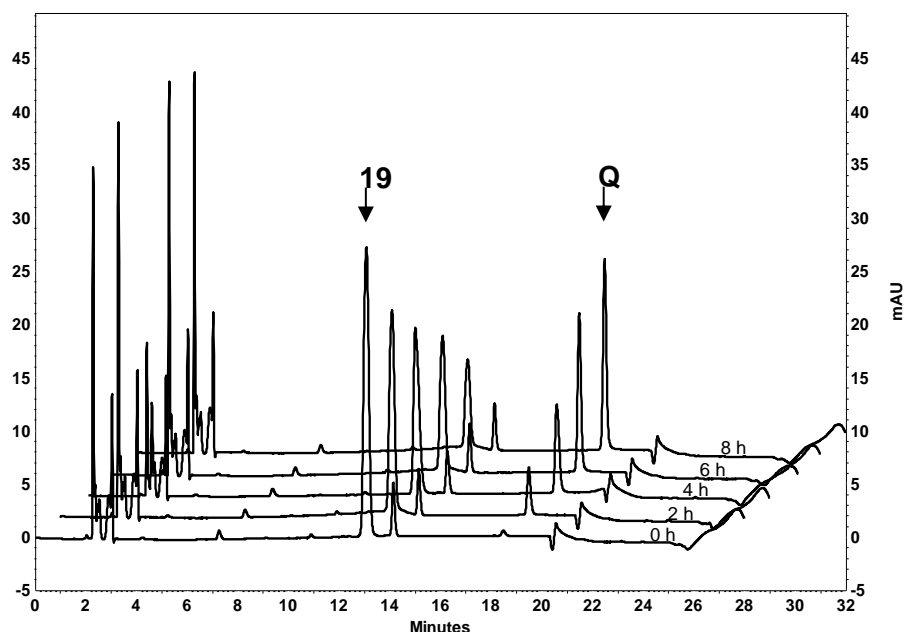


Abb. 28 HPLC Chromatogramm des MM6-Zellüberstands nach 0-8 h Inkubation mit Quercetin-3-O- β -D-glucuronid **19** (50 μ M); die Glucuronsäure wurde abgespalten und das korrespondierende Aglykon Quercetin (**Q**) entstand; Gradient DG2 (370 nm).

Zu jedem dieser Glucuronide konnte die Entstehung des korrespondierenden Aglykons HPLC-chromatographisch beobachtet werden. Eine genauere Betrachtung unter Berücksichtigung der für alle Experimente parallel durchgeführten Stabilitätskontrolle ergab eine signifikante Umsetzung der Substanzen **18**, **19**, **22-28** (**Abb. 30**). Hierbei wurde ersichtlich, dass Substanz **19** erst nach 6-8 h und **21** nicht signifikant gespalten wurde. Eine strenge Stabilitätskontrolle war daher für die Deglucuronidierungsversuche unabdingbar. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass sich die Glucuronide über den Zeitraum von 8 h unterschiedlich schnell spalten ließen (**Abb. 29**). So waren nach 8 h Inkubation von **22** nur noch 17%, von **24** noch 9%, von **26** noch 12% und von **27** noch 20% der Ausgangsmenge vorhanden. Von Substanz **18**, **19**, **23**, **25** lagen nach 8 h noch 37-52% des untersuchten Phase-II-Metaboliten vor. Von **28** wurden nach 8 h noch 81% detektiert. Im Gegensatz hierzu wurde von **1b**, **9**, **20**, **21** und **29** keine Deglucuronidierung von 0-8 h beobachtet. Diese unterschiedlichen Dekonjugationsverhalten der Polyphenol-glucuronide wurden daher genauer untersucht.

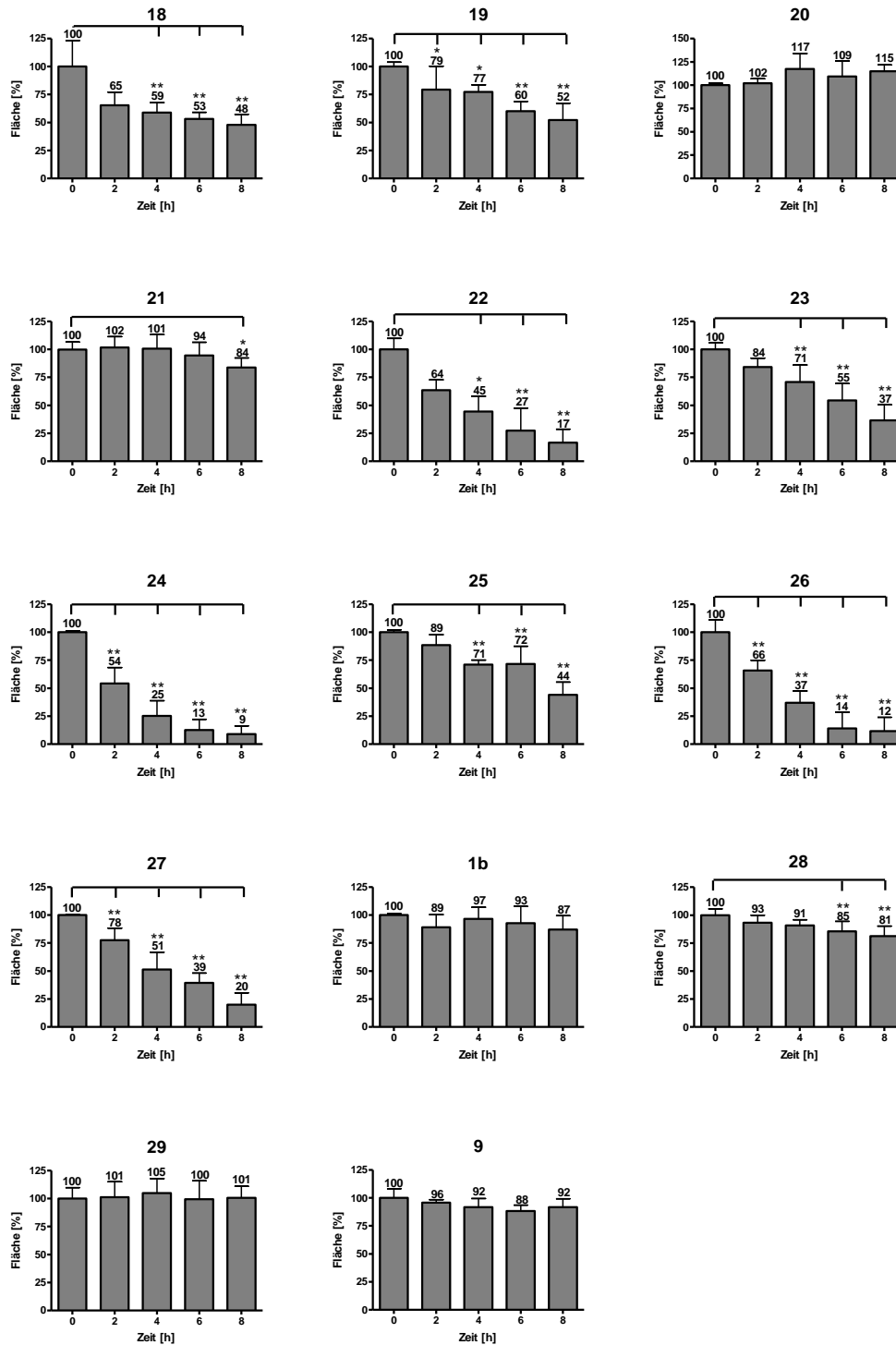


Abb. 29 Ausmaß der Dekonjugation der Substanzen **1b**, **9**, **18-29** (je 50 μ M, außer **9** und **29** 100 μ M; Bezifferung analog **Abb. 27**, **S.118**), getestet im Deglucuronidierungsassay; die Versuche wurden mit TNF α Stimulation durchgeführt; es wurden mindestens drei unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt; Daten aller Graphen sind als MW \pm StabW dargestellt, sie wurden einer ANOVA mit einem Dunnetts Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

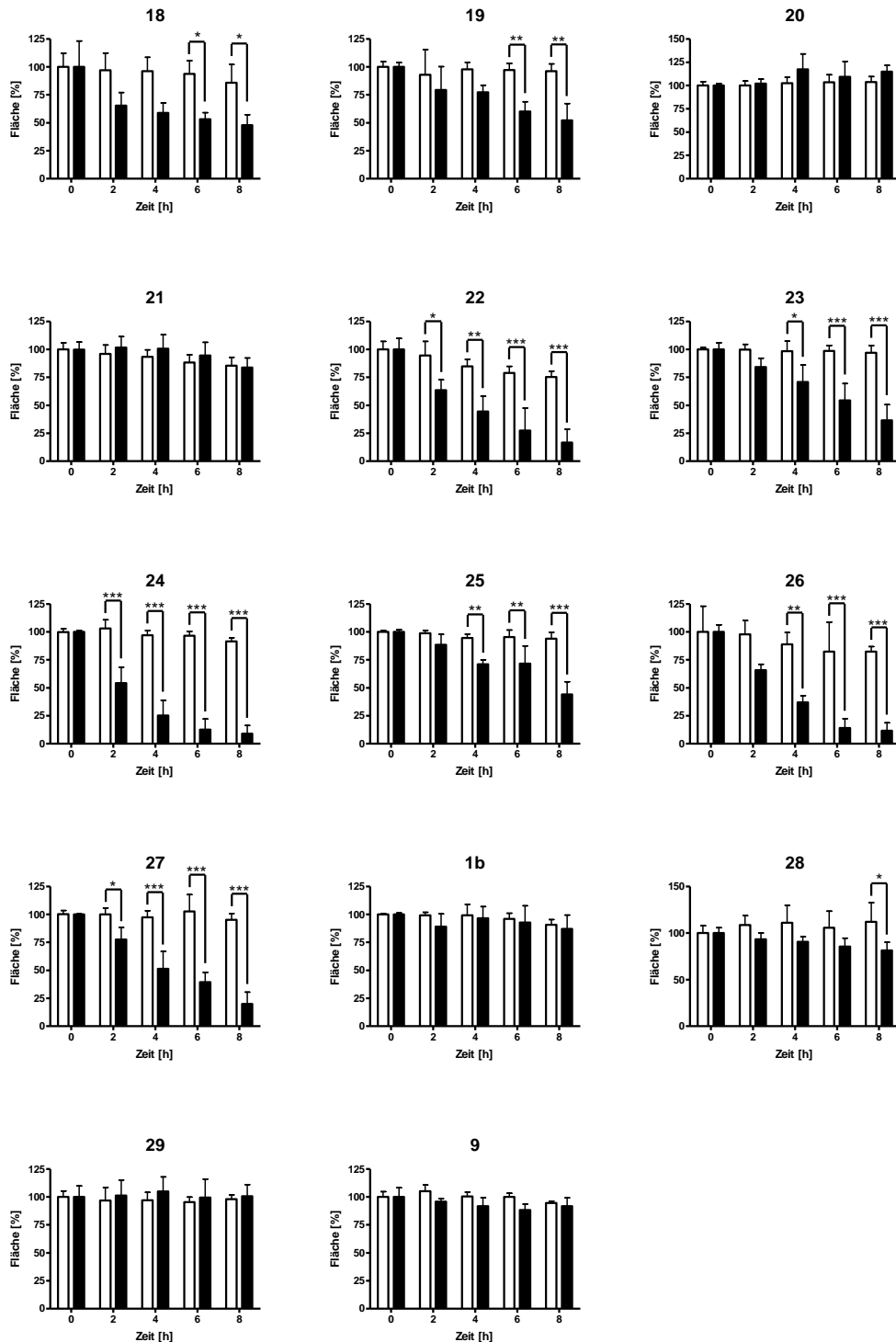


Abb. 30 Ausmaß der Dekonjugation von **1b**, **9**, **18-29** (je 50 μ M, außer **9** und **29** 100 μ M; Bezifferung analog **Abb. 27**, **S.118**) im Deglucuronidierungssassay (schwarz) mit Stabilitätskontrolle (weiß); die Versuche wurden mit TNF α Stimulierung durchgeführt; es wurden mindestens drei unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt; Daten aller Graphen sind als MW \pm StabW dargestellt, sie wurden einer zweifach ANOVA mit einem Bonferroni Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001).

4.2.2.3 Einfluss der Substratstruktur auf die Dekonjugation durch β -Glucuronidase aus MM6-Zellen

Betrachtet man die Umsetzung der Polyphenol-glucuronide durch die β -Glucuronidase unter Berücksichtigung der Substratstruktur, so wird deutlich, dass die Glucuronidierungsposition der Kämpferol-glucuronide Einfluss auf die Enzymaktivität nimmt. So war das 3-O-Glucuronid **22** Substrat der β -Glucuronidase, das 4'-O-Glucuronid **20** und das 7-O-Glucuronid **21** jedoch nicht (**Abb. 31A**). Somit kann eine Abhängigkeit der Deglucuronidierung durch β -Glucuronidase von der Glucuronidierungsposition postuliert werden. Da von Bartholomé et al. (2010) und O'Leary et al. (2001) für die verschiedenen Quercetin-glucuronide keine Unterschiede bezüglich der Umsetzungskinetik festgestellt wurden, gilt dies anscheinend nur für die Kämpferol-glucuronide und kann nicht allgemein für Flavonole angenommen werden.

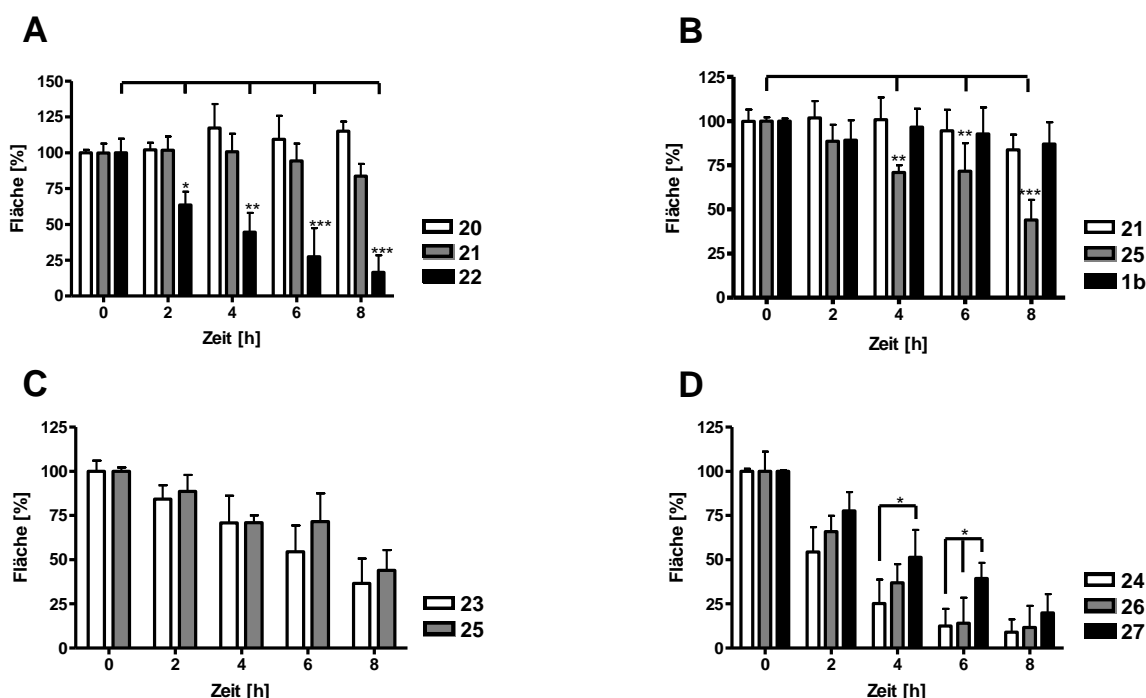


Abb. 31 Vergleich der im Deglucuronidierungsassay untersuchten Substanzen (je 50 μ M; Bezifferung analog **Abb. 27**, **S.118**); **A**: Substanzen **20**, **21** und **22** mit unterschiedlichen Glucuronidierungspositionen, **B**: Substanzen **21**, **25** und **1b** mit unterschiedlichem Hydroxyierungs- und Sättigungsgrad des C-Rings, **C**: Flavone **23** und **25** mit unterschiedlichem Hydroxyierungsprofil am B-Ring, **D**: Substanzen **24**, **26** und **27** mit unterschiedlicher A-Ring Substitution; es wurden mindestens drei unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt; Daten aller Graphen sind als MW \pm StabW dargestellt, sie wurden einer zweifach ANOVA mit einem Bonferroni Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Der Vergleich des Ausmaßes der Dekonjugation eines Flavonol-, Flavon- und eines Flavanon-7-O-glucuronids (**21**, **25** und **1b**) zeigte Unterschiede in der Umsetzung. Verbindungen **21** und **1b** wurden durch die β -Glucuronidase nicht gespalten, wohingegen das Flavon **25** ein Substrat darstellte (**Abb. 31B**). Da sich die hier untersuchten Flavonoide nur an der C-Ring-Hydroxylierung und -Sättigung unterscheiden, kann ein positiver Effekt der Doppelbindung zwischen C2/C3 und ein negativer Einfluss der Hydroxylierung am C3 auf die Spaltung des Substrats angenommen werden. Um den Einfluss der C-Ring-Variationen von Flavonoiden zu vervollständigen, wurde das Isoflavonoid-7-O-glucuronid **28** untersucht, welches ein Konstitutionsisomer von **25** darstellt. Beide getesteten 7-O-Glucuronide **28** und **25** waren Substrate des Enzyms, wie ebenfalls von O'Leary et al. (2001) beobachtet. Jedoch ergab sich aus den experimentellen Daten eine etwas bessere Umsetzung von **25**, was eventuell auf eine bessere Stabilisierung des Flavons in der Bindungstasche des Enzyms hinweisen könnte (**Abb. 32**). Ein weiterer, struktureller Aspekt war der Einfluss des Hydroxyierungsgrads am B-Ring. Es wurden die Flavon-7-O-glucuronide **23** und **25**, sowie die Flavonol-3-O-glucuronide **19** und **22**, welche entweder eine oder zwei Hydroxygruppen am B-Ring besitzen, verglichen. Exemplarisch ist in **Abb. 31C** der Vergleich von **23** und **25** gezeigt. Für **19** und **22** ergab sich ein signifikanter Unterschied nach 4-8 h Inkubationszeit, jedoch war dieser der Instabilität von **22** geschuldet. Alle diese Flavonoid-glucuronide erwiesen sich als Substrate des Enzyms. Somit konnten hier keine Unterschiede im Dekonjugationsverhalten festgestellt werden. Folglich scheint der Hydroxyierungsgrad von Flavonen und Flavonolen des B-Rings keinen Einfluss auf die Enzymkinetik zu besitzen, was den Untersuchungen von O'Leary et al. (2001) zu **19** und **22** entspricht. Unter den getesteten Flavon-7-O-glucuroniden **24**, **26** und **27** konnte ein quantitativer Unterschied im Dekonjugationsverhalten beobachtet werden, da **27** im Gegensatz zu **24** zu einem geringeren Anteil umgesetzt wurde (**Abb. 31D**). Dies lässt auf einen eventuellen Einfluss der A-Ring-Substitution schließen, zumal ein Einfluss der B-Ring-Hydroxylierung von **24** und **26** abermals zu keinem Unterschied der Kinetik führte (**Abb. 31D**). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu dem für die Assayentwicklung genutzten und in der Literatur oft als Positivkontrolle beschriebenen Cumarin **18**, die einfachen Phenole **9** und **29** nicht durch β -Glucuronidase gespalten wurden. Dieser Sachverhalt lässt vermuten, dass Substrate der β -Glucuronidase mehr als einen phenolischen Ring besitzen müssen, oder dass einfache Phenole nur sehr langsam gespalten werden. Da für 4-Nitrophenyl- β -D-glucuronid, einem weiteren einfachen Phenol-glucuronid, viel höhere K_m Werte und eine niedrigere Wechselzahl ($K_m \sim 1400 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} \sim 0,7 \text{ s}^{-1}$) im Gegensatz zu Flavonol-glucuroniden ($K_m \sim 200 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} \sim 1,5 \text{ s}^{-1}$) beschrieben wurden, wird eine geringere Affinität der einfachen Phenol-glucuronide zum Enzym diskutiert (O'Leary et al. 2001).

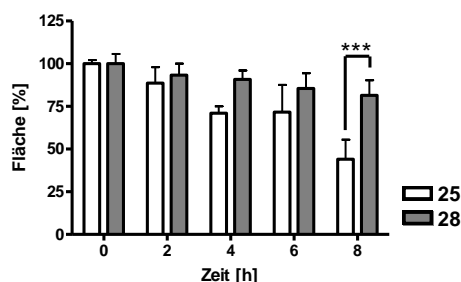


Abb. 32 Vergleich der Dekonjugation im Deglucuronidierungsassay von **25** und **28** (je 50 μ M; Bezifferung analog **Abb. 27**, **S.118**); die Versuche erfolgten mit TNF α -Stimulierung; es wurden mindestens drei unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt; Daten aller Graphen sind als MWt \pm StabW dargestellt, sie wurden einer zweifach ANOVA mit einem Bonferroni Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4.2.3 *In silico* Untersuchungen zur strukturabhängigen Dekonjugation durch humane β -Glucuronidase

Alle *in silico* Analysen wurden am Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie II der Universität Regensburg von Frau PD Dr. Andrea Strasser und Herrn Dr. Hans-Joachim Wittmann durchgeführt.

4.2.3.1 Lage und Stabilisierung verschiedener Flavonoid-glucuronide im Aktiven Zentrum des Enzyms

Ein stabiler Bindungsmodus konnte für **19**, welches für die *in silico* Untersuchungen als Modellsubstanz verwendet wurde, durch Molekulardynamik-Simulation erreicht werden. Die Glucuronsäure-untereinheit ist in einer tiefen Tasche des aktiven Zentrums, welche von Tyr⁵⁰⁴, Glu⁵⁴⁰, Arg⁶⁰⁰ und Lys⁶⁰⁶ gebildet wird, gebunden (**Abb. 33A,B**). Dort interagiert die Carboxylat Funktion des Substrats elektrostatisch mit Arg⁶⁰⁰ und Lys⁶⁰⁶. Der restliche Teil des Substrats befindet sich an der Oberfläche des Enzyms und ist durch Tyr⁵⁰⁴ und Tyr⁵⁰⁸ stabilisiert (**Abb. 33B,C**). Hierbei stabilisiert Tyr⁵⁰⁸ die 3',4'-Dihydroxyphenyl-Untereinheit (B-Ring) des Substrats durch hydrophobe und aromatische Wechselwirkungen (**Abb. 33B**). Die Hydroxygruppe an C4' des B-Rings bildet eine Wasserstoffbrücke zur Seitenkette von Asn⁴⁸⁴, wohingegen die Hydroxygruppe am C3' eine Wasserstoffbrücke zum NH des Tyr⁵⁰⁴ ausbildet. Die Abwesenheit dieser Hydroxygruppe in **22** kann in einer leichten Konformationsänderung des B-Rings resultieren. Da der B-Ring und das aktive Zentrum (besonders Glu⁵⁴⁰ und Glu⁴⁵¹) benachbart sind, kann ein Einfluss auf die Dekonjugationskinetik nicht ausgeschlossen werden, obwohl keine Unterschiede zwischen **19** und **22** oder zwischen **23** und **25** während der *in vitro* Testung beobachtet werden

konnten. Die *in vitro* Testung von Myricetin-3-O- β -D-glucuronid, welches eine dritte Hydroxygruppe am C5' des B-Rings trägt, wäre ein interessanter Aspekt für zukünftige Untersuchungen. Da eine Interaktion der zusätzlichen Hydroxygruppe mit GluH⁵⁴¹ des aktiven Zentrums zu erwarten ist, würde der Abstand zum aktiven Zentrum größer und so wären die Protonendonatoreigenschaften von GluH⁴⁵¹ limitiert.

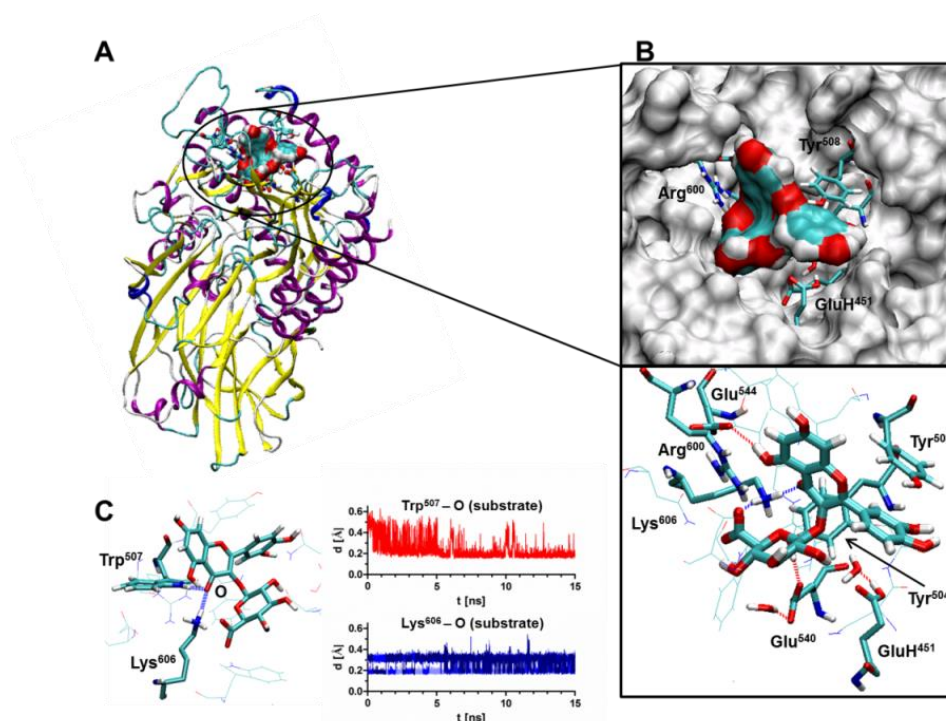


Abb. 33 A: Modell der humanen β -Glucuronidase mit Quercetin-3-O- β -D-glucuronid **19** gebunden an das aktive Zentrum; **B:** Momentaufnahme der Molekulardynamik-Simulation von **19** im aktiven Zentrum; **C:** Stabilisierung der Substratkonformation durch die Interaktion des Sauerstoffs (O) mit Trp⁵⁰⁷ und Lys⁶⁰⁶.

Zusätzlich ergab die Molekulardynamik-Simulation eine mögliche Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxygruppe an C5 und Glu⁵⁴⁴ (**Abb. 33B**). Deshalb kann vermutet werden, dass die Abwesenheit dieser Hydroxygruppe am C5 anderer Flavonoid-3-O-glucuronide zu einer leicht veränderten Bindungskonformation führt und dadurch die Dekonjugationskinetik beeinflusst werden könnte. Flavonoide kommen aufgrund der Flavonoidbiosynthese und der daraus resultierenden Phloroglucinol-Partialstruktur jedoch selten ohne Hydroxygruppe an C5 vor. Die Untersuchungen ergaben außerdem Interaktionen zwischen Trp⁵⁰⁷ und Lys⁶⁰⁶ mit dem Sauerstoff der Carbonylfunktion, welche die 3-O-Glucuronide im aktiven Zentrum zusätzlich stabilisieren können (**Abb. 33C**).

4.2.3.2 Einfluss der Glucuronidierungsposition

Der mögliche Bindungsmodus der Derivate **19** und **22** (3-O-Glucuronide), **20** (4'-O-Glucuronid) und **1b**, **21**, **23-27** (7-O-Glucuronide) ist in **Abb. 34** dargestellt. Die Glucuronsäureuntereinheit ist in der Hauptbindungstasche lokalisiert (**Abb. 34A**, Pfeil 1). Die verschiedenen x-O-Glucuronid Liganden besetzen verschiedene Seitentaschen (**Abb. 34A, B**, Pfeil 2 und 3). Die 3-O-Glucuronide binden in der Seitentasche (2), wie oben für **19** beschrieben. Im Gegensatz dazu besetzen die 4'-O-Glucuronide weder die Seitentasche (2) noch (3). Die 7-O-Glucuronide dagegen binden zusätzlich in der Seitentasche (3). Eine detaillierte Analyse des Substrats **1b**, welches als Diastereomer *in vitro* untersucht wurde, zeigte, dass das (2*R*)-konfigurierte Flavanon wie alle anderen 7-O-Glucuronide in die Bindungstasche passt. Im Gegensatz dazu fügt sich der B-Ring des (2*S*)-konfigurierten Flavanons, welches die aus der Biosynthese entstehende genuine Konfiguration aufweist, nicht passgenau in die Tasche bzw. das Bindungsverhalten ist anders als das des (2*R*)-konfigurierten Flavanons. Deshalb wäre eine unterschiedliche Kinetik der Dekonjugation der beiden Diastereomere zu erwarten, was Gegenstand zukünftiger *in vitro* Untersuchungen sein könnte.

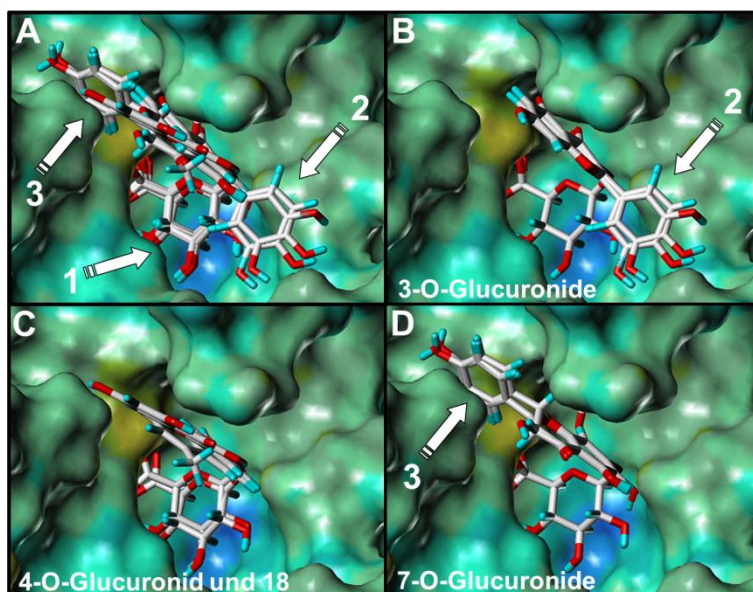


Abb. 34 Vorgesichlagene Bindung der Flavonoide **19**, **22** (3-O-Glucuronide), **20** (4'-O-Glucuronid), **1b**, **21**, **23-27** (7-O-Glucuronide) und **18** am aktiven Zentrum der humanen β -Glucuronidase; die Flavonoide **1b**, **20-27** wurden, basierend auf dem Bindungsmodus von **19**, welcher durch Molekulardynamik-Simulation erhalten wurde, in das Zentrum gedockt; **A**: Overlay der vorgeschlagenen Bindungen von **1b**, **19-27**, Pfeil 1: Bindungstasche der Glucuronsäureuntereinheit von **1b**, **19-27**, Pfeil 2: zusätzliche Bindungstasche, welche von der Hydroxyphenyl-Untereinheit der 3-O-Glucuronide besetzt wird, Pfeil 3: weitere Bindungstasche, welche von der (Hydroxy)phenyl-Untereinheit der 7-O-Glucuronide besetzt wird; **B**: Overlay von **19** und **22**; **C**: Overlay von **18** und **20**; **D**: Overlay von **1b**, **21**, **23-27**.

4.2.3.3 Einfluss der aktiven Zentren der tetrameren β -Glucuronidase

Die β -Glucuronidase wird als Tetramer beschrieben (Hassan et al. 2013). Jedoch befinden sich nur zwei aktive Zentren zweier Monomere in unmittelbarer Nähe (Hassan et al. 2013). Um den gegenseitigen Einfluss der beiden Bindungstaschen zu untersuchen, wurden zwei Baicalin (**26**) Moleküle in die aktiven Zentren des Modells der dimeren β -Glucuronidase gedockt (**Abb. 35**). Dieses Modell schlug einen Kontakt des Pro⁵⁹⁸ des Monomer 1 mit **26** gedockt an Monomer 2 und vice versa vor. Somit lässt dies auf eine mögliche Interaktion der beiden Monomere mit gebundenen Substraten schließen.

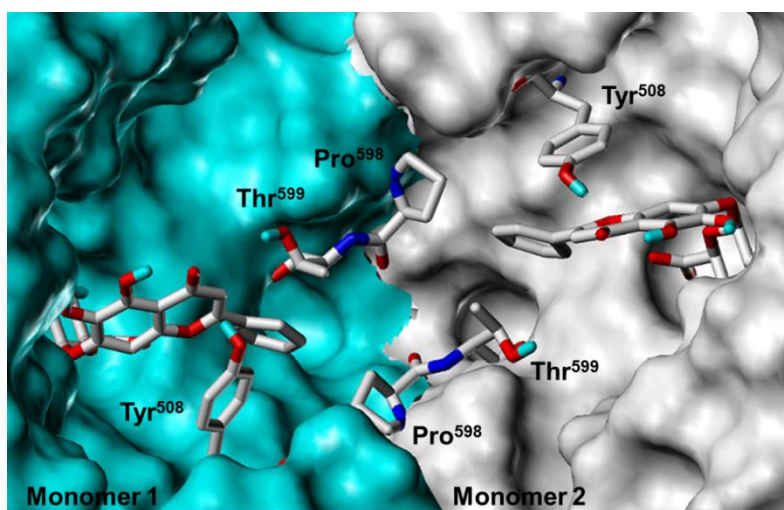


Abb. 35 Benachbarte Bindungstaschen des Monomer 1 und 2 der humanen β -Glucuronidase; Baicalin **26** ist an das aktive Zentrum beider Monomere gebunden.

4.2.3.4 Vergleich humaner mit boviner β -Glucuronidase

Da in der Analytik, besonders der quantitativen Untersuchung von Phase-II-Metaboliten, die bovine β -Glucuronidase standardmäßig zum Spalten der Glucuronide zum Einsatz kommt, wurden die bovine mit der humanen β -Glucuronidase *in vitro* und *in silico* verglichen (Santos-Buelga et al. 2012). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der humanen und der bovinen β -Glucuronidase (h β G und b β G) zeigte, dass die für die Bindung des Substrats verantwortlichen Aminosäuren beider Spezies identisch sind (**Abb. 36**, grüne Boxen). Jedoch ist Thr⁵⁹⁹ der h β G dem Substrat **26** direkt benachbart (**Abb. 35**), und bei der b β G ist an dieser Stelle ein Valin vorhanden (**Abb. 36**, rote Buchstaben). Aufgrund dieser unterschiedlichen Seitenketten ist ein Einfluss auf die Bindungskonformation des Substrates und deshalb auch ein Einfluss auf die Kinetik-eigenschaften denkbar. Zusätzlich könnte bei Substraten mit Hydroxygruppen am B-Ring eine Wasserstoffbrücke zum Thr⁵⁹⁹ der h β G ausgebildet werden. Die b β G besitzt außerdem an Position 544 ein Aspartat

(Abb. 36, rote Buchstaben). Wegen der im Vergleich zum Glutamat der h β G reduzierten Kettenlänge des Aspartats könnte die Interaktion der Position 544 mit den Hydroxygruppen des Substrats verändert sein und somit in einer unterschiedlichen Kinetik der humanen und bovinen β -Glucuronidase resultieren. Diese Hypothese müsste jedoch durch ortsgerichtete Mutageneseuntersuchungen überprüft werden. Substanz **26** wurde daraufhin zusätzlich im bovinen β -Glucuronidase Assay untersucht. Hierzu wurde **26** (50 μ M) mit 20 U/ml b β G in einem Natriumacetatpuffer (pH=4,7) über einen Zeitraum von 0-8 h inkubiert. Ein Vergleich dieser Daten mit der Stabilitätskontrolle und den Daten des Deglucuronidierungsassays mit h β G zeigte Unterschiede im Dekonjugationsverhalten (Abb. 37). So wurde **26** mit h β G nach 4-8 h signifikant gespalten, mit b β G jedoch nicht. Ein Grund dafür könnten auch die verschiedenen Assayparameter sein. So war die Enzymmenge im bovinen β -Glucuronidase Assay bekannt, im humanen Deglucuronidierungsassay jedoch aufgrund des Zellsystems nicht. Nichtsdestotrotz könnten die oben beschriebenen Speziesunterschiede dafür verantwortlich sein.

```

hβG  MARGSAVAWAALGPLLWGCALGLQGGML-YPQESPSRECKELDGLWSFRADFSNRRRGFEQWYRRPLWESGPTVDMFVPS-81
bβG  MLRGSAGAWAVLGPLLWGCGLSLLQGGMLYPRESRSRERKELDGLWSFRADFSNRRRGFEQWYRAPLRESGPTLDMFVPS-82

hβG  SFNDISQDWRLRHFGVWVYEREVILPERWTQDLRTRVVLRIGSAHSYAIVWVNGVDLTLEHEGGYLPFEADISNLVQVGPLP-163
bβG  SFNDVGQDGLRSFVGWVYEREITLPQRWTEDLGTRVVLRIGSAHYAIVWVNGVHVLEHEGGHLPFEADISKLVQSGPLS-164

hβG  SRLRITIAINNTLTPTTLPPGTIQYLTDTSKYPKGYFVQNTYFDFNYAGLQRSVLLYTTPTTYIDDTVTTSVEQDSGLVN-245
bβG  SCRITIAINNTLSPHT-LPPGTITLYKTDPSMYPKGYFVQNTKFDFFNYAGLHRSVLLYTTPTTYIDDTVTDMQDGLVN-245

hβG  YQISVKGSNLFKLEVRLLDAENKVVANGTGTQGQLKVPVSLWVWPYLMHERPAYLYSLEVQLTAQTSLGPVSDFYTLFVGIR-327
bβG  YQIIVQGSDFQVDVSLLEDEGKVMAGAGAGQLQVPSAHLWWPYLMHEHPAYLYSLEVKLTAQTAVGPVSDFYTLFVGIR-327

hβG  TVAVTKSQFLINGKPFYFHGVNKHEDADIRGKGFDWPLLVKDFNLLRWLGANAFRTSHYPYAEVVMQCDRYGIVVIDECPG-409
bβG  TVAVTKSQFLINGKPFYFRGVNKHEDADIRGKGFDWPLLVKDFNLLRWLGANAFRTSHYPYSEEVQLCDRYGIVVIDESPG-409

hβG  VGLALPQFFNNVSLHHMQVMEEVRRDKNHPAVVMWSVANEFASHLESAGYYLKMVIAHTKSLDPSRPVTFVSNISNYAADK-491
bβG  VGIVLVESFSNVSLLQHHLEVMEEMIRRDKNHPAVVMWSLANEFASFLKPAGYYFKTLIAHTKALDPSRPVTFVTNTNYEADL-491

hβG  GAPYVDVICLNSYSWHDYGHLELIQLQLATQFENWYKKYQKPIIQSEYGAETIAGFHQDPPLMTEEYQKSLEQYHLGL-573
bβG  GAPYVDIICVNSYSWHDYGHMEVIQLQLATQFENWYKAYQKPMIQSEYGAETIAGFHQDPPLMTEEYQKGLLQYHVVL-573

hβG  DQKRRKYVVGELIWNFADFMTQSPTEVLGNKGIFTRQRQPKSAAFLLRERYWKIANETRYPHSVAKSQCLENSLFT-651
bβG  DQKRKEYVVGELIWNFADFMTNQSPTEVLGNKGIFTRQRQPKSAAFLLRERYWKLANETRYQRSVTSQCVGSGLFTV-652

```

Abb. 36 Vergleich der Aminosäuresequenz der humanen (h β G) und der bovinen (b β G) β -Glucuronidase; Aminosäuresequenzen wurden von www.uniprot.org bezogen, UniProtKB Zugangscode: h β G: P08236, b β G: A3KMY8; graue Boxen: Aminosäuren nahe dem Aktivem Zentrum, grüne Boxen: Aminosäuren, die an der Bindung des Substrats beteiligt sind, blaue Boxen: Aminosäuren, die an der Dekonjugation des Substrats beteiligt sind, gelbe Boxen: Aminosäuren, welche an der Substratbindung des Dimers beteiligt sind, rote Buchstaben: Aminosäuren, welche aufgrund ihrer Nähe zum aktiven Zentrum vermutlich für den Speziesunterschied zwischen h β G und b β G verantwortlich sind.

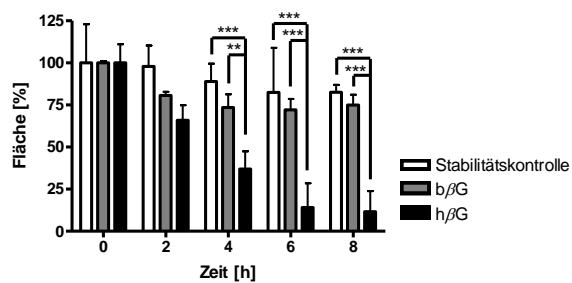


Abb. 37 Ausmaß der Dekonjugation von **26** (50 μ M) getestet im bov. Glucuronidase Assay (b β G) und im Deglucuronidierungsassay (h β G) im Vergleich zur Stabilitätskontrolle; es wurden mindestens drei unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt; Daten aller Graphen sind als MW \pm StabW dargestellt, sie wurden einer zweifach ANOVA mit einem Bonferroni Posttest unterzogen (Signifikanzlevel: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

4.3.1 ICAM-1 Expressionshemmung von Phase-II-Metaboliten

Die Metaboliten Naringenin-7-O- β -D-glucuronid **1b** und Catechol-sulfat **12** der klinischen Studie wurden exemplarisch im ICAM-1 Assay auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der TNF α induzierten ICAM-1 Expression untersucht. Weder das getestete Glucuronid **1b** noch das Sulfat **12** zeigten im gemessenen Konzentrationsbereich (5, 25, 50 μ M für **1b**; 10, 50 und 100 μ M für **12**) eine signifikante Aktivität. Dieses Ergebnis korreliert mit den für Catechol-glucuronid, sowie für verschiedene Kämpferol-glucuronide und -sulfate ermittelten Werten (Knuth 2013; Bücherl 2014). Alle getesteten Verbindungen zeigten keine Aktivität. Diese *in vitro* Inaktivität der Phase-II-Metaboliten wurde oft in der Literatur beschrieben. So scheinen die Phase-II-Metaboliten in anti-inflammatorischen *in vitro* Testsystemen nicht aktiv oder weniger aktiv als ihre korrespondierenden Aglyka zu sein (Kroon et al. 2004; Williamson et al. 2005; Tribolo et al. 2008).

Für die Monozyten, welche im Entzündungsgeschehen eine wichtige Rolle spielen und die Vorläuferzellen der Makrophagen darstellen, konnte mit Hilfe der humanen Zelllinie MM6 eine konstitutive β -Glucuronidase Aktivität nachgewiesen werden. Eine Stimulierung mit TNF α führte zu einer leichten aber nicht signifikant gesteigerten Freisetzung des Enzyms. Die β -Glucuronidase Aktivität konnte durch einen spezifischen Enzyminhibitor unterdrückt werden, wodurch eine Dekonjugation durch UDP-Glucuronyltransferase ausgeschlossen werden konnte (Levy 1952; Peters et al. 1986). Das hier entwickelte Testsystem wurde verwendet, um das Dekonjugationsverhalten von Polyphenol-glucuroniden zu untersuchen. Im Gegensatz zu der postulierten breiten Substratspezifität der β -Glucuronidase konnte gezeigt werden, dass das Enzym gegenüber bestimmten Polyphenolen eine signifikante Spezifität besitzt (O'Leary et al. 2001; Bartholomé et al. 2010). Unter den getesteten Flavonolen mit Kämpferol als Grundkörper und unterschiedlichen Glucuronidierungspositionen wurde nur das 3-O- β -Glucuronid gespalten. Aufgrund dieser Tatsache scheint die Glucuronidierungsstelle hier einen Einfluss auf die Enzymkinetik zu haben. Auch andere Strukturelemente des Aglykons können die Kinetik beeinflussen. Die Untersuchung von 7-O-Glucuroniden der verschiedenen Flavonoidunterklassen zeigte auch einen Einfluss des Oxidationsgrades des C-Rings auf die Kinetik. So scheint das Vorhandensein einer Doppelbindung zwischen C2 und C3 des C-Rings ein Vorteil und eine Hydroxylierung an C3 von Nachteil für eine Spaltung durch die β -Glucuronidase zu sein. Der Vergleich der Position des B-Rings (Flavon oder Isoflavon) ergab keinen signifikanten Unterschied

im kinetischen Verhalten. Die Untersuchung des Hydroxylierungsgrades des B-Rings von Flavon-7-O-glucuroniden und Flavonol-3-O-glucuroniden ergab keinen Einfluss auf die Enzymkinetik. Zusätzlich wurden alle Flavon-7-O-glucuronide unabhängig von der A- oder B-Ring Substitution in annähernd gleichen Raten gespalten, so dass nur ein leichter Einfluss der A-Ring Substitution vermutet werden kann. Nur die 7-O-Glucuronide des getesteten Flavanons **1b** und des Flavonols **21** wurden nicht hydrolysiert.

Die zusätzlich durchgeführten *in silico* Analysen lieferten Informationen zur Bindung der Flavonoid-glucuronide am Enzym. Es konnte gezeigt werden dass die Glucuronsäure-Untereinheit in der Haupttasche des Enzyms bindet, die x-O-Glucuronide aber verschiedene Seitentaschen belegen. Deshalb kann postuliert werden, dass der Übergangszustand des Enzym-Substrat-Komplexes von der Substratstruktur abhängig ist. Experimente zur genauen Bestimmung der Enzymkinetik der Substrate wären deshalb wichtig und werden Gegenstand zukünftiger Projekte sein. Die weiteren *in vitro* Ergebnisse können nur teilweise mit den Molecular Modelling Ergebnissen zu einer genauen Deckung gebracht werden. Die *in vivo* Wechselwirkungen von Substrat und Enzym sind sehr komplex und sollten genauer untersucht werden, um die Deglucuronidierung der Polyphenole zu verstehen. Im Gegensatz zum Mechanismus der Resorption, der Metabolisierung und der Eliminierung der Flavonoide, sind die Bioverfügbarkeit und die Konzentration der Metaboliten am Entzündungsgeschehen nur wenig untersucht. Das Prinzip der *in situ* Aktivierung durch die β -Glucuronidase während eines entzündlichen Vorgangs könnte eine Erklärung für die anti-inflammatorischen Eigenschaften der Flavonoide sein (Perez-Vizcaino et al. 2012; Ishisaka et al. 2013). Jedoch müssen der pH-Wert und wie hier gezeigt, die Substratspezifität der β -Glucuronidase in Betracht gezogen werden. Außerdem sind im humanen Plasma diglucuronidierte, sulfatierte oder gemischt sulfatierte und glucuronidierte Flavonoide zu finden. Die Möglichkeiten zur Dekonjugation dieser Metaboliten sollte in Zukunft ebenfalls untersucht werden. Es sind eine Reihe an Sulfatasen bekannt, dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit und bisher durch andere Arbeitsgruppen keine Spaltung der sulfatierten Metaboliten zu ihren Aglyka beobachtet werden (Ishisaka et al. 2013).

4.4 Experimenteller Teil

Für die folgenden Versuche wurde ausschließlich Reinstwasser und für die Chromatographie geeigneter Methanol und Acetonitril verwendet.

4.4.1 Zellkultur

Alle Zellkulturversuche wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Außerdem wurden alle Reagenzien und Medien auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Für die Testung mittels ICAM-1 Assay wurden immortalisierte, humane, mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1 Zellen) verwendet, welche dankenswerter Weise von Dr. E. Ades und F.J. Candel (CDC, USA) und Dr. T. Lawley (Emory University, USA) zur Verfügung gestellt wurden (Ades et al. 1992). Für die Dekonjugation mittels β -Glucuronidase wurde eine humane Monozyten-Zelllinie (Mono Mac 6 (MM6)) verwendet, welche aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter monoblastischer Leukämie isoliert wurden (Ziegler-Heitbrock et al. 1988). Die Zelllinie wurde vom Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen (DSMZ-Nummer: ACC 124).

4.4.1.1 Passagieren und Kultivieren

HMEC-1 Zellen

Nach Entfernen des ECGM-Mediums (Endothelial Cell Growth Medium versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem FKS (Fetales Kälber Serum), 23,5 ml Supplement Mix und 3,5 ml Antibiotika) wurden die konfluent gewachsenen Zellen zweimal mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen, mit 4 ml Trypsin/EDTA Lösung (1:10 mit PBS verdünnt) versetzt und 5 min im Inkubator (37 °C, 5% CO₂) inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden sofort mit 50 ml Abstopppmedium (M199 Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FKS) verdünnt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nachdem das Abstopppmedium entfernt war, wurde der Zellkuchen in ECGM-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden, je nach Wachstum bis 1:12 gesplittet, in eine mit Kollagen-Lösung (0,25% Kollagen G in PBS) gecoatete Kulturflasche (75 cm²) gegeben und mit ECGM-Medium zu 25 ml verdünnt. Das Passagieren wurde alle 3-4 Tage durchgeführt. Für den ICAM-1 Assay wurden HMEC-1 Zellen bis Passage 12 verwendet.

Mono Mac 6 Zellen (MM6)

MM6-Zellen wurden in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Medium, versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamat, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat und 9 µg/ml humanem Insulin, kultiviert. Sie wurden alle 2 Tage passagiert. Hierbei wurde die Zellzahl von höchstens $1,2 \cdot 10^6$ Zellen/ml immer auf $0,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml reduziert. Da es sich bei MM6-Zellen um Suspensionszellen handelt, wurden die Zellen in der Kulturflasche vor dem Passagieren aufsuspendiert, ein Aliquot zur Zellzahlbestimmung entnommen und der Rest bei 700 rpm 5 min zentrifugiert. Der nach dem Entfernen des Mediums entstandene Zellkuchen wurde entsprechend einer Zellzahl von $0,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml verdünnt und in eine Kulturflasche (25 cm²) gegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert. Für den Deglucuronidierungsassay wurden Passagen von 3-15 verwendet.

4.4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Aus der Zellsuspension wurden 50 µl entnommen und mit 50 µl Medium verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurden 10 µl mit 10 µl Trypanblau-Lösung (0,4% Trypanblau in PBS, steril filtriert) versetzt. 10 µl hiervon in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und alle vier Felder ausgezählt. Die Zellzahl/ml ergab sich aus der Summe der vier ausgezählten Felder mal 10000.

4.4.1.3 ICAM-1 Assay

Nach dem Passagieren einer konfluenten Zellschicht wurden 1:3 gesplittete Zellen (3 ml Zellsuspension auf 10 ml ECGM-Medium) in 24-Well-Platten (500 µl pro Well) ausgesät, für 48 h bis zur Konfluenz inkubiert, das Medium am Versuchstag entfernt und mit PBS gewaschen. Als Negativkontrolle diente 0,1% DMSO in ECGM-Medium, welches gleichzeitig die höchste verwendete DMSO-Konzentration darstellte. 500 µl davon wurden in zwei Wells gegeben, welche auch im weiteren Versuchsablauf nicht mit TNFα stimuliert wurden, um einen Wert für die natürliche ICAM-1 Expression der HMEC-1 Zellen zu erhalten. Alle anderen Wells wurden mit TNFα ($c_{\text{end}}=10$ ng/ml) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde Parthenolid (5 µM in ECGM-Medium, 500 µl) verwendet. Medium (500 µl) mit Testsubstanzen in der zu untersuchenden Konzentration wurde in die freien Wells pipettiert. Zwei weitere Wells wurden mit 500 µl ECGM-Medium versetzt und mit TNFα stimuliert, um einen Wert für die maximale ICAM-1 Expression zu erhalten, welcher für die Auswertung als 100% gesetzt wurde. Die Stimulation mit TNFα erfolgte immer 30 min nach Aufgabe der Testsubstanzen der Positiv- und Negativkontrolle. Es wurden 5 µl TNFα-Lösung (1 µg/ml TNFα in ECGM-Medium) zu den jeweils vorgelegten 500 µl in den Wells pipettiert. Nach 24 h

wurden die Zellüberstände entfernt, mit PBS gewaschen, jedes Well mit 200 µl Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Um das Ablösen der Zellen zu beschleunigen wurde die Trypsin-Zell-Mischung mehrmals mit der Pipette schnell aufgezogen und ausgestoßen und danach in FACS-Röhrchen, welche 100 µl Formaldehydlösung enthielten, überführt. Zur Zellfixierung wurde diese Mischung geschüttelt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min und Abdekantieren des Überstands wurde zum Zellkuchen mit anheftendem Restvolumen 5 µl eines fluoreszenzmarkierten ICAM-1 Antikörper gegeben und mit dem Vortex geschüttelt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurden 1000 µl PBS zugegeben, mit dem Vortex geschüttelt und bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert, um den nicht an ICAM-1 gebundenen Antikörper zu entfernen. Der Überstand wurde wiederum durch Abdekantieren entfernt und 400 µl PBS zum Zellkuchen gegeben. Diese Lösung wurde mittels Durchflusszytometrie vermessen. Die Bestimmung der ICAM-1 Expression erfolgte für die Testsubstanzen, Negativ- und Positivkontrollen immer in Duplikaten und in drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Zellpassagen.

4.4.1.4 Deglucuronidierungsassay

MM6-Zellen wurden in 24-Well Versuchsplatten ausgesät ($0,3 \times 10^6$ Zellen/Well, 500 µl pro Well) und für 48 h kultiviert. 5 µl TNF α ($c_{\text{end}}=110$ U/ml) wurde optional 24 h nach der Aussaat zugegeben. Nach 48 h wurde mindestens 1 Well pro Platte auf die Zellzahl überprüft und nach Bestimmung der Zellzahl verworfen. Die Zellzahl betrug nach 48 h immer $0,6-1,2 \times 10^6$ Zellen/ml. Die Zellsuspension jedes Wells wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und um die Zellen zu entfernen bzw. den Zellüberstand zu gewinnen bei 14000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Vom Zellüberstand wurden 400 µl abgenommen und mit 0,5 µl Essigsäure versetzt, um einen pH-Wert von 4-5 des Zellüberstands zu erreichen (pH-Kontrolle erfolgte sporadisch mit Universalindikator bzw. visuell durch Farbumschlag nach gelb des im Kulturmedium enthaltenen Indikators Phenolrot). Die Stammlösungen der Testsubstanzen wurden in DMSO zu 50 mM bzw. für Catechol-O- β -D-glucuronid **9** und Phenol-O- β -D-glucuronid **29** zu 100 mM hergestellt. Nach 1:10 Verdünnung mit Kulturmedium wurden 4 µl der Testsubstanzen zu 400 µl des Zellüberstands gegeben. Im Falle von Inhibierungsexperimenten wurden an dieser Stelle zusätzlich 8 µl einer D-Saccharolacton-Lösung (500 µM in DMSO 5%) zum Versuchsansatz gegeben ($c_{\text{end}}=10$ µM). Dieser Zellüberstand wurde mit den Testsubstanzen (c_{end} immer 50 µM, außer für **9** und **29** 100 µM) über einen Zeitraum von 0, 2, 4, 6 und 8 h bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen und Proteine zu fällen wurden 400 µl eiskalter Methanol zugegeben, für 10 min bei 4 °C geschüttelt und danach 10 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde über einen Spritzenvorsatzfilter in ein

HPLC-Vial filtriert und an der analytischen HPLC vermessen (siehe **4.4.2.**) Die Bestimmung der Dekonjugation durch β -Glucuronidase aus dem Zellüberstand erfolgte immer in Duplikaten und in drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Zellpassagen.

4.4.1.5 Boviner β -Glucuronidase Assay

Ein Natriumacetatpuffer (2 M, pH=4,7) wurde hergestellt, mit Essigsäure auf den genauen pH-Wert eingestellt und sterilfiltriert. Bovine β -Glucuronidase wurde in diesem Natriumacetatpuffer zu 10100 U/ml gelöst. Nach einer 1:50 Verdünnung im Natriumacetatpuffer wurden 4 μ l der Enzym-Pufferlösung zu 400 μ l Natriumacetatpuffer pipettiert ($c_{\text{end}}=20,2$ U/ml), welcher weiter mit 4 μ l Testsubstanz ($c_{\text{end}}= 50$ μ M) versetzt wurde. Die Reaktionsmischung wurde im Inkubator bei 37 °C über einen Zeitraum von 0, 2, 4, 6 und 8 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 400 μ l eiskaltem Methanol gestoppt. Weiter wurde analog zu **4.4.1.4** verfahren. Die Bestimmung der Dekonjugation durch bovine β -Glucuronidase erfolgte immer in Duplikaten und in drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Zellpassagen.

4.4.2 HPLC-Methoden

Folgende Geräteparameter (**Tab. 34**) und folgende Gradienten (**Tab. 35**) wurden für die Analyse der Zellüberstände hinsichtlich Dekonjugation durch β -Glucuronidase und für die Stabilitätskontrolle verwendet. Der Gradient DG1 diente zur Analyse von **24**, **26** und **27**, der Gradient DG2 für **18** und **19**, der Gradient DG3 für **20-23** und **25**, der Gradient DG4 für **9** und **29** sowie der Gradient DG5 für **1b** (DG1-DG5 in **Tab. 35**). Jeder Gradient wurde mit einem Waschschrift (5 min 100% B) und einer anschließenden Equilibrierungsphase (5 min Anfangsbedingungen) beendet.

Tab. 34 Gewählte Geräteparameter der analytischen HPLC für die Untersuchung der Zellüberstände und korrespondierenden Stabilitätskontrollen.

Parameter	Spezifikation	Hersteller
Säule	Hibar [®] RT 250-4 cartridge with Purospher [®] Star-RP-18e (5 µm)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Vorsäule	Purospher [®] Star RP-8e (5 µm)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Injektionsvolumen	20 µl	
Ofentemperatur	20 °C	
Autosampler-temperatur	10 °C	
Detektionswellenlänge	315 nm (18), 370 nm (19), 366 nm (20-22), 348 nm (23), 333 nm (24), 336 nm (25), 276 nm (26), 273 nm (27), 289 nm (1b), 259 nm (28), 264 nm (29) und 272 nm (9)	
Fließmittel A	0,1% Ameisensäure in Wasser	
Fließmittel B	95% Acetonitril in Wasser	

Tab. 35 Übersicht der Gradienten DG1-5 der Analyse der Zellüberstände, Stabilitätskontrollen und Reinheitsprüfungen; G: Gradient, A/B: Fließmittelzusammensetzung (V/V), t: Zeit (min), flow (ml/min).

G	t	A/B	flow
DG1	0-17	70/30→39/61	1,00
DG2	0-17	90/10→55/45	1,00
DG3	0-17	90/10→45/55	1,00
DG4	0-17	95/5→70/30	1,00
DG5	0-17	80/20→40/60	1,00

4.4.3 Reinheitsbestimmung der Testverbindungen

Die im Deglucuronidierungsassay getesteten Substanzen **1b**, **9** und **20-22** sind synthetisierte Polyphenol-glucuronide und wurden auf ihre Reinheit mittels HPLC-DAD analysiert (Knuth 2013; Bücherl 2014; Untergehrer et al. 2015). Auch die isolierte Verbindung **19**, welche von Frau Prof. Dr. Irmgard Merfort (Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Freiburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, und Verbindung **12** welche im ICAM-1 Assay getestet wurde, wurden auf ihre Reinheit überprüft. Hierfür wurden die Substanzen aus ihren 50 mM (100 mM für **9** und **12**)

Stammlösungen in DMSO je zu 50 μM (100 μM für **9** und **12**) in 0,1% Ameisensäure in Wasser/Acetonitril 95% (50/50, V/V) verdünnt und mit dem Gradienten DG5 für **1b**, DG4 für **9**, DG2 für **12** und **19** und DG3 für **20-22** analysiert (alle **Tab. 35**). Für alle verwendeten Testsubstanzen konnte unter diesen Bedingungen eine Reinheit von $\geq 95\%$ bestätigt werden. Die genauen Angaben zur Reinheit sind **Tab. 38**, **S.141** zu entnehmen. Die während einer Bachelorarbeit synthetisierten Verbindungen **12** und **1b** wurden zusätzlich hinsichtlich ihrer Reinheit und Identität mittels ^1H NMR (**12**) bzw. ^1H und ^{13}C NMR (**1b**) und ESI-MS (**12** $m/z_{\text{exp.}}$ 188,9873 $[\text{M-H}]^-$, $m/z_{\text{theoretisch}}$ 188,9863 $[\text{M-H}]^-$; **1b** $m/z_{\text{exp.}}$ 447,0941 $[\text{M-H}]^-$, $m/z_{\text{theoretisch}}$ 447,0927 $[\text{M-H}]^-$) untersucht. Die NMR Daten der Verbindungen **12** und **1b** sind in **8.3.2**, **S.184** bzw. **0**, **S.185** abgebildet und wurden mit der Software Topspin 2.1 (Bruker) ausgewertet.

4.4.4 Durchflusszytometrie

Zur Ermittlung der ICAM-1 Expression der Zellen wurden die Analysen mittels FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) vermessen. Es erfolgte eine durchflusszytometrische Auftrennung der Zellen und der Zellfragmente nach Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC) und Granularität (Seitenstreulicht, SSC). Durch den an das Oberflächenprotein ICAM-1 der intakten Zellpopulation gebundenen, fluoreszenzmarkierten Antikörper wurde die ICAM-1 Expression als Fluoreszenzintensität bestimmt. Pro Well wurden 5000 Zellen per FACS analysiert. Die entsprechenden Geräteeinstellungen sind in **Tab. 36** wiedergegeben. Nachdem die Daten mit der Software Cell Quest Pro (Becton Dickinson) prozessiert wurden, erfolgte eine Auswertung der Fluoreszenz mit der Software WinMDI 2.9 (Windows Multiple Documents Interface for Flow Cytometry). Hierbei wurde die auszuwertende Zellpopulation im Densityplot ein weiteres Mal festgelegt. Der Mittelwert der Fluoreszenzintensität der unbehandelten aber mit $\text{TNF}\alpha$ stimulierten Zellen wurden als 100% Wert gewählt, alle anderen Ergebnisse als prozentuale ICAM-1 Expression auf diesen Wert bezogen.

Tab. 36 Gewählte Geräteeinstellungen des FACS.

Parameter	Einstellung
Fluss	60 µl/min
Anregungswellenlänge	495 nm
Emissionswellenlänge	519 nm
FSC	0,1 V
SSC	320 V
Spannung FL1	500 V

4.4.5 *In silico* Analysen

Alle *in silico* Analysen wurden am Lehrstuhl für Pharmazeutische/Medizinische Chemie II der Universität Regensburg von Frau PD Dr. Andrea Strasser und Herrn Dr. Hans-Joachim Wittmann durchgeführt. Die experimentell verwendeten Methoden des Modellings der humanen β -Glucuronidase sowie der Molekulardynamik-Simulationen sind der Literatur (Untergehrer et al. 2015) zu entnehmen.

4.4.6 Statistik

Die Ergebnisse wurden als MW \pm StabW angegeben und beziehen sich auf den Mittelwert der Flächen zum Zeitpunkt t=0, welche als 100% gesetzt wurden. Es wurden wenigstens drei unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt, und die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism 4 Software (GraphPad Software Inc.). Die Daten der Versuche mit β -Glucuronidase wurden entweder einer zweifachen ANOVA gefolgt von einem Bonferroni Posttest oder einer einfachen ANOVA mit Dunnetts Posttest unterzogen. Die Daten des ICAM-1 Assays wurden über eine einfache ANOVA mit Dunnetts Posttest ausgewertet (Signifikanzlevel: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4.4.7 Geräte und Chemikalien

Die im Kapitel „*in vitro* und *in silico* Analysen zu polyphenolischen Phase-II-Metaboliten“ verwendeten Geräte und Chemikalien sind in **Tab. 37** und **Tab. 38** zusammengefasst.

Tab. 37 Auflistung der verwendeten Geräte und Materialien im **Kapitel 4**.

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Analysenwaage	R 160 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklaven	Melag Autoklav 23	Melag Medizintechnik, Berlin, Deutschland
	Varioklav 500	HP Medizintechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Durchflusszytometer	Becton Dickinson FacsCalibur [™] , Software: CellQuestPro	Becton Dickinson, Franklin, USA
Einmalspritzen (sterile)	Norm-Ject, Tuberculin, 1 ml	Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Deutschland
FACS Röhrchen	5 ml Polystyren Round Bottom Tube	Becton Dickinson, Franklin, USA
HPLC-DAD, analytisch	Elite LaChrom, Autosampler L2200, Pumpe L2130, Säulenofen L2350, Dioden-Array-Detektor L2444; Software: EZChrom Elite 3.1.7	Hitachi, Tokio, Japan; Vertrieb: VWR, Darmstadt, Deutschland
HPLC-DAD-MS, analytisch	Agilent, Binary Pump G4220A, HiP Sampler G4226A, Column Comp. G1316C, DAD G4212A,	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
HPLC-Vial	11 mm CrimpSnap-Vial, braun, 2 ml	Wicom, Heppenheim, Deutschland
HPLC-Vial Insert	Micro Insert, 300 µl, l=30 mm, ø=6 mm, für 11 mm Snap Crimp-Vial	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Inkubator	AutoFlow IR Direct Heat, NU-5500 E T=37 °C, CO ₂ =5%	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Kulturflaschen	25/75 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Massenspektrometer	Agilent MS Q-TOF 6540 UHD, Ionenquelle: AJS ESI G6540A	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
NMR	Avance 300 Avance III 600 kryo	Bruker Corporation, Billerica, MA, USA
Oberschalenwaage	MC 1, Laboratory LC 6200 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Fortsetzung Tab. 37.

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Pasteurpipetten	230 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland
pH-Meter	inoLab pH Level 1, Elektrode SenTix Mic	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten	2,5 Research (0,1-2,5 µl) 10 Reference (2,5-10 µl) 100 Reference (10-100 µl) 1000 Reference (100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten, serologische	5, 10, 25 ml, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	0,5 µl, 10 µl 100 µl, 1000 µl	Kinesis, Lengenfeld, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß	Eppendorf Tubes 3810X, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß-Zentrifuge	Jouan BR4i multifunction centrifuge	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Reinstwasseranlage	Astacus LS	MembraPure, Berlin, Deutschland
Schüttler	Vortex mixer VV3	VWR, Darmstadt, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	Perfect-Flow RC membrane (0,2 µm)	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Thoma-Zählkammer, Neubauer Improved	0,100 mm Tiefe, 0,0025 m ²	LO-Laboroptik, Lancing, UK
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner	VWR, Darmstadt, Deutschland
Vial-Verschlusskappe	PP Schnappkappe, blau, für 11 mm Snap Crimp-Vial, mit Teflon/Silikon-Septum	Wicom, Heppenheim, Deutschland
Wasserbad	WB 22	Memmert, Schwabach, Deutschland
Werkbank, steril	HeraSafe KS	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Zellkulturtestplatte	24-well Platte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 R Sepatech	Thermo Scientific, Langenselbold, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	15/50 ml, steril für die Zellkultur	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

Tab. 38 Auflistung der verwendeten Referenzsubstanzen und Chemikalien im **Kapitel 4**.

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
4-Methylumbelliferyl- <i>O</i> - β -D-glucuronid (18)	$\geq 98\%$ (HPLC)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aceton-d ₆	$\geq 99,8\%$	Deuterio GmbH, Kastellaun, Deutschland
Acetonitril LiChrosolv®	Reag. Ph. Eur., gradient grade for liquid chromatography	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ameisensäure	98-99%, p.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Antibiotika für (ECGM)	3,5 ml	Provitro, Berlin, Deutschland
Apigenin-7- <i>O</i> - β -D-glucuronid (25)	$\geq 95\%$ (HPLC)	Phytolab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Baicalin (26)	$\geq 99\%$ (HPLC)	Extrasynthese, Lyon, Frankreich
Catechol-sulfat (12)	$\geq 99\%$ (HPLC)	Synthetisiert im Rahmen einer Bachelorarbeit von S. Pitzl
Catechol- <i>O</i> - β -D-glucuronid (9)	$\geq 97\%$ (HPLC)	Synthetisiert im Rahmen einer Doktorarbeit (Knuth 2013)
DMSO	p.A., 99%	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMSO-d ₆	$\geq 99,8\%$	Deuterio GmbH, Kastellaun, Deutschland
D-Saccharolacton (D-saccharic acid 1,4-lactone)	Monohydrat, $\geq 98\%$ (HPLC)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)	500 ml	Provitro, Berlin, Deutschland
Essigsäure	Eisessig 99%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	FKS Superior, hitzeinaktiviert	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
FITC-markierter Antikörper (ICAM-1)	FITC-markierter Mausantikörper (Fluorescein-Isothiocyanat) IgG1 gegen CD54 (ICAM-1)	Biozol, Eching, Deutschland
Formaldehydlösung	Formaldehydlösung 10%, phosphatgepuffert	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Genistein-7- <i>O</i> - β -D-glucuronid (28)	$\geq 95\%$ (HPLC)	Extrasynthese, Lyon, Frankreich
Insulin, rekombinant, human	$\geq 27,5$ U/mg	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kämpferol-3- <i>O</i> - β -D-glucuronid (22)	$\geq 97\%$ (HPLC)	Synthetisiert im Rahmen einer Doktorarbeit (Bücherl 2014)

Fortsetzung Tab. 38.

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Kämpferol-4'-O- β -D-glucuronid (20)	$\geq 97\%$ (HPLC)	Synthetisiert im Rahmen einer Doktorarbeit (Bücherl 2014)
Kämpferol-7-O- β -D-glucuronid (21)	$\geq 98\%$ (HPLC)	Synthetisiert im Rahmen einer Doktorarbeit (Bücherl 2014)
Kollagen G	Kollagen G aus bovinem Kälberserum 4 mg/ml	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamat	200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Luteolin-7-O- β -D-glucuronid (23)	$\geq 95\%$ (HPLC)	Phytolab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, Deutschland
M199	Medium 199	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Methanol LiChrosolv [®]	Reag. Ph. Eur., gradient grade for liquid chromatography	Merck, Darmstadt, Deutschland
Naringenin-7-O- β -D-glucuronid (1b)	$\geq 95\%$ (HPLC)	Synthetisiert im Rahmen einer Bachelorarbeit von S. Pitzl
Natriumacetat	p.A., wasserfrei, $\geq 99,0\%$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	100 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren	(100x)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Parthenolid	$\geq 97\%$	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
PBS	Dulbecco's phosphate buffered saline	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phenyl-O- β -D-glucuronid (29)	$\geq 99\%$ (HPLC)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Quercetin-3-O- β -D-glucuronid (19)	$\geq 95,0\%$ (HPLC)	Zur Verfügung gestellt von Fr. Prof. Dr. I. Merfort (Universität Freiburg)
RPMI 1640	2,0 g/l NaHCO ₃ , ohne Glutamat, low endotoxin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Scutellarein-7-O- β -D-glucuronid (24)	$\geq 95\%$ (HPLC)	Phytolab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, Deutschland
Supplement Mix für ECGM	23,5 ml	Provitro, Berlin, Deutschland
Trypanblau	37%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA	Trypsin/EDTA Solution 0,5%/0,2% in 10x PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Fortsetzung **Tab. 38.**

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF α)	$\geq 97\%$, rekombinant, human, <i>E. coli</i>	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Wogonin-7-O- β -D-glucuronid (26)	$\geq 95\%$ (HPLC)	Phytolab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, Deutschland
β -Glucuronidase	Type B-10, aus boviner Leber, 10100 U/mg	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die anti-inflammatorische Wirkung der Weidenrinde wird über das Zusammenspiel vieler Inhaltsstoffe und Inhaltsstoffgruppen erklärt. Neben dem aus den Salicylalkoholderivaten entstehenden Salicin, welches *in vivo* zur Salicylsäure metabolisiert wird, tragen die Flavonoide und auch die Gerbstoffe zur Wirkung bei. Die Bedeutung des aus der 1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonyl Untereinheit einiger Salicylalkoholderivate entstehenden *in vitro* anti-inflammatorisch aktiven Catechols wurde kürzlich als weiteres wirksames Prinzip der Weidenrinde beschrieben (Knuth et al. 2013). Auch für die Flavanon-aglyka Naringenin und Eriodictyol, welche in der Droge glucosidisch gebunden vorkommen, konnte *in vitro* eine anti-inflammatorische Wirkung gezeigt werden (Bodet et al. 2008; Freischmidt et al. 2012).

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Gehaltsbestimmungsmethoden zur Erfassung des Gesamt-catechol- und des Gesamt-flavanon-gehalts entwickelt. Die Bestimmung der HCC-Untereinheit und des genuin enthaltenen Catechols als Gesamt-catechol konnte durch eine enzymatische Esterhydrolyse und anschließende Oxidation durch Luftsauerstoff erreicht werden. Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC-DAD Analyse. Der Hauptvertreter der Salicylalkoholderivate und gleichzeitig die Vorstufe des Catechols und Salicins, das Salicortin, wurde als Standardsubstanz verwendet. Neben weiteren Validierungsparametern dienten die Wiederfindungen des entstehenden Salicins und Catechols sowie die Stabilität des bereits im genuinen Extrakt enthaltenen Catechols, als Kontrolle. Es konnte in dem für die Etablierung und Validierung verwendeten Weidenrindenextrakt ein Gesamt-catecholgehalt von 3,33% bestimmt werden.

Die simultane Quantifizierung von Flavanon-glucosiden, Chalkon-glucosiden sowie von cumaroylierten Flavanon-glucosiden basierte auf der von Freischmidt (2011) entwickelten Methode, welche um die Bestimmung der Eriodictyolderivate erweitert wurde. Durch die kombinierte saure Hydrolyse mit nachfolgendem enzymatischen β -Glucosidase-Verdau konnten unter Entwicklung eines geeigneten HPLC-DAD Gradienten die oben genannten Verbindungen als Naringenin und Eriodictyol quantifiziert werden. Für den STW-Weidenrindenextrakt ließ sich so ein Flavanon-gesamtgehalt von 8,66% ermitteln, welcher sich aus 8,12% Gesamt-naringenin und 0,54% Gesamt-eriodictyol zusammensetzte. Mit den beiden in der vorliegenden Arbeit entwickelten und validierten Gehaltsbestimmungsmethoden können nun neben den Salicylalkoholderivaten, welche nach der Arzneibuchmethode als Salicin quantifiziert werden, mit den Flavanonen und den

potentiell Catechol-liefernden Strukturen zwei weitere Inhaltsstoffgruppen quantifiziert werden, welche zur Wirksamkeit der Weidenrinde beitragen können.

Die mit Weidenrinde verabreichten polyphenolischen Verbindungen, besonders die Flavanonglucoside, wurden hinsichtlich ihrer Metabolisierung im Gegensatz zur Metabolisierung des Salicins und der HCC-Untereinheit, noch nicht untersucht. Deshalb war ein Ziel der Arbeit auch die Identifizierung polyphenolischer Metaboliten in humanem Serum zu realisieren. Im Rahmen einer klinischen Studie wurde einer Gruppe von zehn gesunden Probanden am Prüftag die Tagesmaximaldosis eines Weidenrindenpräparats (Optovit® ActiFLEX) verabreicht. Es erfolgten 11 Blutentnahmen (Blutentnahme nüchtern bis 24 h nach Applikation). Zwei der zehn Probanden nahmen keinen Extrakt ein und dienten als Kontrollgruppe. Ab 19 h vor Applikation wurde eine strenge polyphenolfreie Diät eingehalten. Am Prüftag nahmen die Probanden an standardisierten polyphenolfreien Mahlzeiten teil. Nach qualitativer und quantitativer Untersuchung der Prüfmedikation hinsichtlich polyphenolischer Inhaltsstoffe wurde eine Datenbank über mögliche Phase-II-Metaboliten der Inhaltstoffe erstellt.

Mittels HPLC-MS und HPLC-MS/MS Analyse der Serumproben sowie Abgleich mit der Datenbank und Vergleich mit Referenzsubstanzen nach enzymatischer Aufarbeitung mit β -Glucuronidase und Sulfatase einiger Analysen, konnten 17 Metaboliten identifiziert werden. Darunter waren acht überwiegend sulfatierte als auch glucuronidierte neben gemischten glucuronidiert-sulfatierten Flavonoid Phase-II-Metaboliten. Die Massen einzelner Metaboliten wurden teils zu mehreren Retentionszeiten detektiert. Eine Verbindung konnte als Naringenin-7-O- β -D-glucuronid bestätigt werden. Des Weiteren konnten zwei mögliche Ringspaltprodukte der Flavonoide ermittelt werden. Die bereits für Salicylalkoholderivate bekannten Metaboliten Salicylsäure, Salicylursäure, Catecholsulfat und -glucuronid konnten ebenfalls detektiert werden und waren nur geringfügigen interindividuellen Schwankungen unterlegen. Ebenso waren Phase-II-Metaboliten des Saligenins und der Salicylsäure im Serum präsent, welche bisher noch nicht beschrieben wurden. Eine differenzierte Analyse der einzelnen Probanden zu den einzelnen Zeitpunkten ergab, dass das Vorkommen aller entstehenden Phase-II-Metaboliten der Flavonoide starken interindividuellen Schwankungen unterlag. Sie waren bereits nach 0,5 h im Serum detektierbar, jedoch sanken sie maximal 8 h nach Applikation der Prüfmedikation wieder unter das Detektionslimit. Aufgrund der ermittelten t_{\max} Werte von 0,5-2 h für die Phase-II-Metabolite der Flavonoide ist eine Resorption im oberen GIT wahrscheinlich. Zudem konnten Unterschiede in der Geschwindigkeit der Entstehung der einzelnen Metaboliten beobachtet werden. So hatten z.B. die einfach konjugierten nach 0,5-1 h, die zweifach konjugierten erst nach 2 h ihr t_{\max} erreicht. Die potenziellen Ringspaltprodukte waren

ebenfalls nach 0,5 h detektierbar. Dies spricht gegen einen Ursprung aus der mikrobiellen Flavonoid-metabolisierung des Kolons. Jedoch waren sie bis zu 24 h im Serum präsent, was im hinteren Zeitverlauf für eine Entstehung durch die Metabolisierung im Kolon sprechen würde. Die hier durchgeführte Identifizierung der *in vivo* entstandenen polyphenolischen Metaboliten liefert einen Überblick über die relevanten humanen Phase-II-Metaboliten und kann so einen Beitrag zur Aufklärung des wirksamen Prinzips der Weidenrinde leisten.

Die Tatsache, dass im Gegensatz zur Salicylsäure kein freies, *in vitro* aktives Catechol oder freie Flavonoide oder Ringspaltprodukte im Serum humaner Probanden detektiert wurden, war Anlass für *in vitro* Testungen mit Phase-II-Metaboliten. Die Diskrepanz für die pharmakologische Aktivität der *in vivo* ermittelten polyphenolischen Phase-II-Metaboliten, welche meist im *in vitro* Modell „inaktiv“ sind und ihrer „aktiven“ korrespondierenden Aglyka, wird über eine *in vivo* Dekonjugation durch β -Glucuronidase erklärt. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Inaktivität *in vitro* von zwei im anti-inflammatorischen ICAM-1 Assay getesteten Phase-II-Metaboliten (Naringenin-7-O- β -D-glucuronid und Catechol-sulfat) beobachtet werden. Die Entwicklung eines Dekonjugations-Testsystems an für im Entzündungsgeschehen wichtige Monozyten wurde mit Hilfe einer monozytischen humanen Zelllinie realisiert. Diese Zelllinie besitzt konstitutive β -Glucuronidase Aktivität, welche durch einen spezifischen Inhibitor unterdrückt werden konnte. Das Testsystem mit anschließender HPLC-DAD Analyse wurde verwendet um das Dekonjugationsverhalten von 14 Polyphenol-glucuroniden zu untersuchen. Im Gegensatz zu der postulierten breiten Substratspezifität der β -Glucuronidase konnte gezeigt werden, dass das Enzym gegenüber bestimmten Polyphenolen eine Substratspezifität besitzt. So war die Glucuronidierungsposition der Kämpferol-glucuronide ausschlaggebend für eine Dekonjugation. Auch ein Einfluss der Doppelbindung zwischen C2 und C3 von 7-O-Glucuroniden konnte gezeigt werden. Der Hydroxylierungsgrad des B-Rings scheint dagegen keinen Einfluss auf die Spaltung durch β -Glucuronidase zu haben. Die Ergebnisse des *in vitro* Testsystems wurden von *in silico* Analysen begleitet, welche teilweise kongruent waren. Desweiteren lieferten die *in silico* Analysen Informationen zur Bindungsweise der Flavonoid-glucuronide am Enzym. Es konnte gezeigt werden, dass die Glucuronsäure-Untereinheit in der Haupttasche des Enzyms bindet, die x-O-Glucuronide aber verschiedene Seitentaschen belegen. Deshalb kann postuliert werden, dass der Übergangszustand des Enzym-Substrat-Komplexes von der Substratstruktur abhängig ist und die Geschwindigkeit der Dekonjugation beeinflusst.

Das komplexe Zusammenspiel der Metabolisierung von Polyphenolen und der *in vivo* Dekonjugation am Entzündungsort ist von vielen Faktoren abhängig und noch nicht aufgeklärt. Die

vorliegende Arbeit liefert durch die Identifizierung der relevanten polyphenolischen Phase-II-Metaboliten aus *Salix* und der gleichzeitigen Ermittlung potentiell aktiver Substanzen hierzu einen Beitrag. Die Ergebnisse sind nicht nur für die *in vivo* Metabolisierung und Wirksamkeit der polyphenolischen Inhaltsstoffe der Weidenrinde von Bedeutung, sondern ebenfalls für flavonoidhaltige Drogen oder Nahrungsmittel wertvoll.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
2-HCH	2-Hydroxy-3-cyclohexenon
6-HCH	6-Hydroxy-2-cyclohexenon
Abb.	Abbildung
AJS	Agilent Jet Stream
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
Arg	Arginin
AUC	Area Under the serum concentration Curve
b	y-Achsenabschnitt
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
bβG	bovine β-Glucuronidase
Caco-2	Caucasian Colon Adenocarcinoma-2
C _{end}	Endkonzentration
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
comp.	compartment (Abteil)
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COX	Cyclooxygenase
csv	comma separated values
CYP	Cytochrom
CβG	Cytosolic β-glucuronidase
d	Duplett
Da	Dalton
DAD	Dioden-Array-Detektor
dd	Duplett vom Duplett
DEV	Droge-Extrakt-Verhältnis
DIDS	4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

e	endcapped
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIC	Extracted Ion chromatogram
EMA	European Medicines Agency
ESCOP	European Scientific Cooperative on Phytotherapy
ESI	Electrospray Ionization
EudraCT	European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials
eV	Elektronenvolt
exp.	experimentell
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälber Serum
FSC	Forward-Scattered Light (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GIT	Gastrointestinaltrakt
Glu	Glutaminsäure
GluH	protonierte Glutaminsäure
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GSH	Glutathion
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCC	1-Hydroxy-6-oxo-2-cyclohexen-1-carbonyl
HLE	Human Leucocyte Elastase
HMEC-1	Human Microvascular Endothelial Cells-1
HMPC	Committee on Herbal Medicinal Products
HO-1	Heme Oxygenase-1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
Hz	Hertz
h β G	humane β -Glucuronidase
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
ICH	International Conference on Harmonization
IKK	I κ B Komplex
IL	Interleukin

Inc.	Incorporated
IS	Interner Standard
I κ B	Inhibition of κ B
K	Kelvin
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
k _{cat}	Wechselzahl
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K _m	Michaelis Menten Konstante
l	Liter
LFA1	Lymphocyte Function-Associated Antigen 1
LOD	Limit of Detection (Detektionslimit)
LOQ	Limit of Quantification (Quantifizierungslimit)
LOX	Lipoxygenase
LPH	Lactase Phloridzin Hydrolase
LPS	Lipopolysaccharid
Lys	Lysin
M	Molar
m	Multiplett
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
m ²	Quadratmeter
MAPK	Mitogen Activated Protein-Kinase
mAU	Milliabsorptionunits
MeQ	methyliertes Quercetin
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MM6	Mono Mac 6
mol	Mol
MRP2/3	Multidrug Resistance-Associated Protein 2/3
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n. E. H.	nach enzymatischer Hydrolyse
n.d.	nicht detektiert
n.q.	nicht quantifizierbar
n.u.	nicht untersucht
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat

NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NF-κB	Nuklear Factor kappa B
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernresonanzspektroskopie)
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	Non Steroidal Anti-Inflammatory Drug
<i>o</i> -	<i>ortho</i> -
p	Signifikanzwert
<i>p</i> -	<i>para</i> -
p.A.	pro analysis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PG	Prostaglandin
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
Pro	Prolin
psig	pound/square inch
PTFE	Polytetrafluorethylen
PZN	Pharmazentralnummer
Q	Quercetin
Q-Glu	Quercetin-glucuronid
Q-TOF	Quadrupole-Time of Flight
r ²	Bestimmtheitsmaß
RP18	Reversed Phase 18
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S	Steigung
SGLT2	Sodium dependent Glucose Transporter 2
spc	simple point charge
Spec.	Species
SSC	Side-Scattered Light (Seitenstreulicht)
St.	Stück
StabW	Standardabweichung
STW	Steigerwald
SULT	Sulfotransferase
Tab.	Tabelle
TCC	Total Compound Chromatogram
TFA	Trifluoressigsäure

Thr	Threonin
TIC	Total Ion Chromatogram
t_{\max}	Zeitpunkt der maximalen Peakfläche
TNF α	Tumor Necrosis Factor α
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Unit
u.a.	unter anderen
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
UHD	Ultra High Definition
UV	Ultraviolet
V	Volt
V/V	Volumen/Volumen (%), Volumenprozent
VCAM-1	Vascular Cell-Adhesion Molecule-1
vgl.	vergleiche
V_k	Variationskoeffizient
VLA4	Very Late Antigen 4
WHO	World Health Organisation
WinMDI	Windows Multiple Documents Interface for Flow Cytometry
Zul. Nr.	Zulassungsnummer
β -Glu	β -Glucuronidase
λ_{\max}	Wellenlänge mit maximaler Absorption
σ	Reststandardabweichung

7 LITERATURVERZEICHNIS

A

Ades, E. W.; Candal, F. J.; Swerlick, R. A.; George, V. G.; Summers, S.; Bosse, D. C.; Lawley, T. L. **1992**: HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.* 99, 683–690.

Agnolet, S.; Wiese, S.; Verpoorte, R.; Staerk, D. **2012**: Comprehensive analysis of commercial willow bark extracts by new technology platform: combined use of metabolomics, high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance spectroscopy and high-resolution radical scavenging assay. *J. Chromatogr. A* 1262, 130–137.

Akao, T.; Yoshino, T.; Kobashi, K.; Hattori, M. **2002**: Evaluation of salicin as an antipyretic prodrug that does not cause gastric injury. *Planta Med.* 68, 714–718.

Amann, R.; Peskar, B. A. **2002**: Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. *Eur. J. Pharmacol.* 447, 1–9.

Aura, A.-M. **2008**: Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochem. Rev.* 7, 407–429.

B

Bartholomé, R.; Haenen, G.; Hollman, P. C. H.; Bast, A.; Dagnelie, P. C.; Roos, D.; Keijer, J.; Kroon, P. A.; Needs, P. W.; Arts, I. C. W. **2010**: Deconjugation kinetics of glucuronidated phase II flavonoid metabolites by β -glucuronidase from neutrophils. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 25, 379–387.

Beer, A.-M.; Wegener, T. **2008**: Willow bark extract (*Salicis cortex*) for gonarthrosis and coxarthrosis-results of a cohort study with a control group. *Phytomedicine* 15, 907–913.

Biegert, C.; Wagner, I.; Lüdtke, R.; Kotter, I.; Lohmüller, C.; Günaydin, I.; Taxis, K.; Heide, L. **2004**: Efficacy and safety of willow bark extract in the treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: results of 2 randomized double-blind controlled trials. *J. Rheumatol.* 31, 2121–2130.

Bodet, C.; La, V. D.; Epifano, F.; Grenier, D. **2008**: Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and *ex vivo* human whole-blood models. *J. Periodont. Res.* 43, 400–407.

Boeckler, G. A.; Gershenzon, J.; Unsicker, S. B. **2011**: Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry* 72, 1497–1509.

- Bonaterra, G. A.; Heinrich, E. U.; Kelber, O.; Weiser, D.; Metz, J.; Kinscherf, R. **2010**: Anti-inflammatory effects of the willow bark extract STW 33-I (Proaktiv[®]) in LPS-activated human monocytes and differentiated macrophages. *Phytomedicine* 17, 1106–1113.
- Bosslet, K.; Straub, R.; Blumrich, M.; Czech, J.; Gerken, M.; Sperker, B.; Kroemer, H. K.; Gesson, J. P.; Koch, M.; Monneret, C. **1998**: Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. *Cancer Res.* 58, 1195–1201.
- Bracher, F.; Heisig, P.; Langguth, P.; Mutschler, E.; Rücker, G.; Schirmeister, T.; Scriba, G. K. E.; Stahl-Biskup, E.; Troschütz, R. (Hrsg.) **2015**: Arzneibuch-Kommentar. 1., Aufl. inkl. 50. Akt.lfg. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Bredsdorff, L.; Nielsen, I. L. F.; Rasmussen, S. E.; Cornett, C.; Barron, D.; Bouisset, F.; Offord, E.; Williamson, G. **2010**: Absorption, conjugation and excretion of the flavanones, naringenin and hesperetin from α -rhamnosidase-treated orange juice in human subjects. *Br. J. Nutr.* 103, 1602–1609.
- Breinholt, V. M.; Offord, E. A.; Brouwer, C.; Nielsen, S. E.; Brosen, K.; Friedberg, T. **2002**: *In vitro* investigation of cytochrome P450-mediated metabolism of dietary flavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 40, 609–616.
- Brett, G. M.; Hollands, W.; Needs, P. W.; Teucher, B.; Dainty, J. R.; Davis, B. D.; Brodbelt, J. S.; Kroon, P. A. **2009**: Absorption, metabolism and excretion of flavanones from single portions of orange fruit and juice and effects of anthropometric variables and contraceptive pill use on flavanone excretion. *Br. J. Nutr.* 101, 664–675.
- Bridle, P.; Stott, K. G.; Timberlake, C. F. **1970**: Anthocyanins in *Salix* species. *Phytochemistry* 9, 1097–1098.
- Bücherl, D. **2014**: Isolation of kaempferol glycosides from *Ginkgo biloba* leaves and synthesis, identification and quantification of their major *in vivo* metabolites. Dissertation, Universität Regensburg.
- Bugianesi, R.; Catasta, G.; Spigno, P.; D'Uva, A.; Maiani, G. **2002**: Naringenin from cooked tomato paste is bioavailable in men. *Eur. J. Nutr.* 132, 3349–3352.

C

- Calis, I.; Barbic, M.; Jürgenliemk, G. **2008**: Bioactive cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus elongatus*. *Z. Naturforsch. C* 63, 813–820.

Chavakis, E.; Choi, E. Y.; Chavakis, T. **2009**: Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. *Thromb. Haemost.* 102, 191–197.

Chen, C.-C.; Chow, M.-P.; Huang, W.-C.; Lin, Y.-C.; Chang, Y.-J. **2004**: Flavonoids inhibit tumor necrosis factor- α -induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappa B: structure-activity relationships. *Mol. Pharmacol.* 66, 683–693.

Chmelar, J.; Meusel, W. **1976**: Die Weiden Europas. Wittenberg Lutherstadt: Die neue Brehm-Bücherei.

Chrubasik, J. E.; Roufogalis, B. D.; Chrubasik, S. **2007**: Evidence of effectiveness of herbal antiinflammatory drugs in the treatment of painful osteoarthritis and chronic low back pain. *Phytother. Res.* 21, 675–683.

Chrubasik, S.; Eisenberg, E.; Balan, E.; Weinberger, T.; Luzzati, R.; Conradt, C. **2000**: Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study. *Am. J. Med.* 109, 9–14.

Chrubasik, S.; Künzel, O.; Black, A.; Conradt, C.; Kerschbaumer, F. **2001a**: Potential economic impact of using a proprietary willow bark extract in outpatient treatment of low back pain: an open non-randomized study. *Phytomedicine* 8, 241–251.

Chrubasik, S.; Künzel, O.; Model, A.; Conradt, C.; Black, A. **2001b**: Treatment of low back pain with a herbal or synthetic anti-rheumatic: a randomized controlled study. Willow bark extract for low back pain. *Rheumatology* 40, 1388–1393.

Clausen, T. P.; Reichardt, P. B.; Bryant, J. P.; Werner, R. A.; Post, K.; Frisby, K. **1989**: Chemical model for short-term induction in quaking aspen (*Populus tremuloides*) foliage against herbivores. *J. Chem. Ecol.* 15, 2335–2346.

Cronstein, B. N.; Weissmann, G. **1993**: The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum.* 36, 147–157.

D

Dall'Asta, M.; Derlindati, E.; Curella, V.; Mena, P.; Calani, L.; Ray, S.; Zavaroni, I.; Brighenti, F.; Del Rio, D. **2013**: Effects of naringenin and its phase II metabolites on *in vitro* human macrophage gene expression. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 64, 843–849.

- Day, A. J.; Bao, Y.; Morgan, M. R. A.; Williamson, G. **2000**: Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biol. Med.* 29, 1234–1243.
- de Boer, V. C. J.; Dihal, A. A.; van der Woude, H.; Arts, I. C. W.; Wolffram, S.; Alink, G. M.; Rietjens, I. M. C. M.; Keijer, J.; Hollman, P. C. H. **2005**: Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *Eur. J. Nutr.* 135, 1718–1725.
- Del Rio, D.; Calani, L.; Cordero, C.; Salvatore, S.; Pellegrini, N.; Brighenti, F. **2010**: Bioavailability and catabolism of green tea flavan-3-ols in humans. *Nutrition* 26, 1110–1116.
- Dirsch, V. M.; Keiss, H.-P.; Vollmar, A. M. **2004**: Garlic metabolites fail to inhibit the activation of the transcription factor NF-kappa B and subsequent expression of the adhesion molecule E-selectin in human endothelial cells. *Eur. J. Nutr.* 43, 55–59.
- Dombrowski, K.; Alftermann, A. W. **1993**: Salicylsäure - Das Universalpharmakon der Human- und Phytomedizin? Neue Erkenntnisse zur physiologischen Funktion der Salicylsäure bei Pflanzen. *Pharm. Unserer Zeit* 22, 275–285.
- Donovan, J. L.; Manach, C.; Faulks, R. M.; Kroon, P. A. **2006**: Absorption and metabolism of dietary plant secondary metabolites; In: Plant secondary metabolites. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 303–351.
- Du, Q.; Jerz, G.; Winterhalter, P. **2009**: Preparation of three flavonoids from the bark of *Salix alba* by high-speed countercurrent chromatographic separation. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 27, 3257–3264.

E

- E/S/C/O/P monographs **2003**: The scientific foundation for herbal medicinal products. 2. Aufl., European Scientific Cooperative on Phytotherapy. New York: Thieme.
- Ekabo, O. A.; Farnsworth, N. R.; Santisuk, T.; Reutrakul, V. **1993**: A phytochemical investigation of *Homalium ceylanicum*. *J. Nat. Prod.* 56, 699–707.
- El-Shemy, H. A.; Aboul-Enein, A. M.; Aboul-Enein, K. M.; Fujita, K. **2007**: Willow leaves' extracts contain anti-tumor agents effective against three cell types. *PLoS ONE* 2, e178.
- Erlund, I.; Meririnne, E.; Alfthan, G.; Aro, A. **2001**: Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J. Nutr.* 131, 235–241.

Esatbeyoglu, T.; Wray, V.; Winterhalter, P. **2010**: Dimeric procyanidins: screening for B1 to B8 and semisynthetic preparation of B3, B4, B6, And B8 from a polymeric procyanidin fraction of white willow bark (*Salix alba*). *J. Agric. Food Chem.* 58, 7820–7830.

F

Fiebich, B. L.; Chrubasik, S. **2004**: Effects of an ethanolic *Salix* extract on the release of selected inflammatory mediators *in vitro*. *Phytomedicine* 11, 135–138.

Fötsch, G.; Pfeifer, S.; Bartoszek, M.; Franke, P.; Hiller, K. **1989**: Biotransformation of phenolglycosides leiocarposide and salicin. *Pharmazie* 44, 555–558.

Freischmidt, A. **2011**: Phytochemische, analytische und pharmakologische *in vitro* Untersuchungen zu den phenolischen Inhaltsstoffen eines standardisierten Weidenrindenextraktes. Dissertation, Universität Regensburg.

Freischmidt, A.; Jürgenliemk, G.; Kraus, B.; Okpanyi, S. N.; Müller, J.; Kelber, O.; Weiser, D.; Heilmann, J. **2012**: Contribution of flavonoids and catechol to the reduction of ICAM-1 expression in endothelial cells by a standardised willow bark extract. *Phytomedicine* 19, 245–252.

Fürst, R.; Blumenthal, S. B.; Kiemer, A. K.; Zahler, S.; Vollmar, A. M. **2006**: Nuclear factor-kappa B-independent anti-inflammatory action of salicylate in human endothelial cells: induction of heme oxygenase-1 by the c-jun N-terminal kinase/activator protein-1 pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 389–394.

G

Galindo, P.; Rodriguez-Gomez, I.; Gonzalez-Manzano, S.; Duenas, M.; Jimenez, R.; Menendez, C.; Vargas, F.; Tamargo, J.; Santos-Buelga, C.; Perez-Vizcaino, F.; Duarte, J. **2012**: Glucuronidated quercetin lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via deconjugation. *PLoS ONE* 7, e32673.

Germann, I. D. **2005**: Charakterisierung der radikalfangenden Eigenschaften pflanzlicher Entzündungshemmer. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Ghahremaninejad, F.; Khalili, Z.; Maassoumi, A. A.; Mirzaie-Nodoushan, H.; Riahi, M. **2012**: Leaf epidermal features of *Salix* species (Salicaceae) and their systematic significance. *Am. J. Bot.* 99, 769–777.

Gopalan, V.; Pastuszyn, A.; Galey, W. R. Jr.; Glew, R. H. **1992**: Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic β -glucosidase. *J. Biol. Chem.* 267, 14027–14032.

H

Haruta, M.; Pedersen, J. A.; Constabel, C. P. **2001**: Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expression, and potential substrates. *Physiol. Plant.* 112, 552–558.

Hassan, I.; Waheed, A.; Grubb, J. H.; Klei, H. E.; Korolev, S.; Sly, W. S. **2013**: High resolution crystal structure of human β -glucuronidase reveals structural basis of lysosome targeting. *PLoS ONE* 8, e79687.

Hedner, T.; Everts, B. **1998**: The early clinical history of salicylates in rheumatology and pain. *Clinical rheumatology* 17, 17–25.

Hehner, S. P.; Hofmann, T. G.; Dröge, W.; Schmitz, M. L. **1999**: The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex. *J. Immunol.* 163, 5617–5623.

Heilmann, J.; Merfort, I. **1998**: Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden II.; Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. *Pharm. Unserer Zeit* 27, 173–183.

HMPC **2009**: Community Herbal Monograph on *Salix*, cortex. London: Committee on herbal medicinal products. Online verfügbar unter http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_Community_herbal_monograph/2009/12/WC500018256.pdf.

Hollman, P. C. H. **2004**: Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharm. Biol.* 42, 74–83.

Hsu, F.-L.; Nonaka, G.-I.; Nishioka, I. **1985**: Acylated flavanols and procyanidins from *Salix sieboldiana*. *Phytochemistry* 24, 2089–2092.

Hugh, D.; Grennan, A.; All Abugila, M.; Weinkove, C. **1987**: Ascorbic acid as an antioxidant in measurements of catecholamines in plasma. *Clin. Chem.* 33, 569–571.

I

ICH **2005**: ICH harmonised tripartite guideline: Q 2 (R1) validation of analytical procedures: text and methodology. Geneva: International Conference on Harmonisation.

Ishikado, A.; Sono, Y.; Matsumoto, M.; Robida-Stubbs, S.; Okuno, A.; Goto, M.; King, G. L.; Blackwell, T. K.; Makino, T. **2013**: Willow bark extract increases antioxidant enzymes and reduces

oxidative stress through activation of Nrf2 in vascular endothelial cells and *Caenorhabditis elegans*. *Free Radical Biol. Med.* 65, 1506–1515.

Ishisaka, A.; Kawabata, K.; Miki, S.; Shiba, Y.; Minekawa, S.; Nishikawa, T.; Mukai, R.; Terao, J.; Kawai, Y. **2013**: Mitochondrial dysfunction leads to deconjugation of quercetin glucuronides in inflammatory macrophages. *PLoS ONE* 8, 1–17.

Ishisaka, A.; Mukai, R.; Terao, J.; Shibata, N.; Kawai, Y. **2014**: Specific localization of quercetin-3-O-glucuronide in human brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 557, 11–17.

Isman, F.; Palomaki, G. E.; Natowicz, M. R. **2005**: Lysosomal enzymes in human peripheral blood mononuclear cells and granulocytes. *Clin. Chem.* 51, 646–649.

J

Jäggi, R.; Büter, B.; Grandjean, F.; Berger Büter, K.; Kelber, O.; Bidlingmaier, B.; Weiser, D. **2003**: Osteoarthritis and inflammation: multiple target inhibition with the willow bark extract STW-I *in vitro*. *Osteoarthritis Cartilage* 11, S46-P126.

Jarrett, J. M.; Williams, A. H. **1967**: The flavonoid glycosides of *Salix purpurea*. *Phytochemistry* 6, 1585–1586.

Julkunen-Tiitto, R.; Meier, B. **1992**: The enzymatic decomposition of salicin and its derivatives obtained from Salicaceae species. *J. Nat. Prod.* 55, 1204–1212.

Julkunen-Tiitto, R.; Sorsa, S. **2001**: Testing the effects of drying methods on willow flavonoids, tannins, and salicylates. *J. Chem. Ecol.* 27, 779–789.

Jürgenliemk, G.; Petereit, F.; Nahrstedt, A. **2007**: Flavan-3-ols and procyanidins from the bark of *Salix purpurea* L.. *Pharmazie* 62, 231–234.

K

Kammerer, B.; Kahlich, R.; Biegert, C.; Gleiter, C. H.; Heide, L. **2005**: HPLC-MS/MS analysis of willow bark extracts contained in pharmaceutical preparations. *Phytochem. Anal.* 16, 470–478.

Kanaze, F. I.; Bounartzi, M. I.; Georgarakis, M.; Niopas, I. **2007**: Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 61, 472–477.

Kawai, Y.; Nishikawa, T.; Shiba, Y.; Saito, S.; Murota, K.; Shibata, N.; Kobayashi, M.; Kanayama, M.; Uchida, K.; Terao, J. **2008**: Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human

atherosclerotic arteries: Implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J. Biol. Chem.* 283, 9424–9434.

Khayyal, M. T.; El-Ghazaly, M. A.; Abdallah, D. M.; Okpanyi, S. N.; Kelber, O.; Weiser, D. **2005**: Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of a standardized willow bark extract. *Drug Res.* 55, 677–687.

Khayyal, M. T.; El-Ghazaly, M. A.; Kelber, O.; Okpanyi, S. N.; Weiser, D. **2003**: The anti-inflammatory, antipyretic and analgesic effect of willow bark extract, STW-I, can not be explained solely on the basis of its salicin content. *Osteoarthritis Cartilage* 11, S69-P192.

Knuth, S. **2013**: Pharmakologische und pharmakokinetische Untersuchungen zu Salicylalkoholderivaten aus Salicis cortex. Dissertation, Universität Regensburg.

Knuth, S.; Abdelsalam, R. M.; Khayyal, M. T.; Schweda, F.; Heilmann, J.; Kees, M. G.; Mair, G.; Kees, F.; Jürgenliemk, G. **2013**: Catechol conjugates are *in vivo* metabolites of Salicis cortex. *Planta Med.* 79, 1489–1494.

Knuth, S.; Schübel, H.; Hellemann, M.; Jürgenliemk, G. **2011**: Catechol, a bioactive degradation product of salicortin, reduces TNF- α induced ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Planta Med.* 77, 1024–1026.

Kobuchi, H.; Roy, S.; Sen, C. K.; Nguyen, H. G.; Packer, L. **1999**: Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. *Am. J. Physiol.* 277, C403-11.

Kolbe, H. **1874**: Über eine neue Darstellungsmethode und einige bemerkenswerte Eigenschaften der Salicylsäure. *Journal für praktische Chemie* 10, 89–112.

Kolodziej, H. **1990**: Oligomeric flavan-3-ols from medicinal willow bark. *Phytochemistry* 29, 955–960.

Krauze-Baranowska, M.; Poblocka-Olech, L.; Glod, D.; Wiwart, M.; Zielinski, J.; Migas, P. **2013**: HPLC of flavanones and chalcones in different species and clones of *Salix*. *Acta Pol. Pharm.* 70, 27–34.

Krivoy, N.; Pavlotzky, E.; Chrubasik, S.; Eisenberg, E.; Brook, G. **2001**: Effect of Salicis cortex extract on human platelet aggregation. *Planta Med.* 67, 209–212.

Kromidas, S. **1999**: Validierung in der Analytik; Die Praxis der instrumentellen Analytik. Weinheim: Wiley-VCH.

Kroon, P. A.; Clifford, M. N.; Crozier, A.; Day, A. J.; Donovan, J. L.; Manach, C.; Williamson, G. **2004**: How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols *in vitro*? *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 15–21.

Kumar, S.; Pandey, A. K. **2007**: Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. *Sci. World J.* 73, 637–670.

L

Levy, G. A. **1952**: The preparation and properties of β -glucuronidase. Inhibition by sugar acids and their lactones. *Biochem. J.* 52, 464–472.

Ley, K.; Laudanna, C.; Cybulsky, M. I.; Nourshargh, S. **2007**: Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689.

Liang, J.; Xu, F.; Zhang, Y.-Z.; Zang, X.-Y.; Wang, D.; Shang, M.-Y.; Wang, X.; Chui, D.-H.; Cai, S.-Q. **2014**: The profiling and identification of the metabolites of (+)-catechin and study on their distribution in rats by HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS(n) technique. *Biomed. Chromatogr.* 28, 401–411.

Lindroth, R. L.; Pajutee, M. S. **1987**: Chemical analysis of phenolic glycosides: art, facts, and artifacts. *Oecol.* 74, 144–148.

Lu, Q.-Y.; Zhang, L.; Eibl, G.; Go, V.-L. W. **2014**: Overestimation of flavonoid aglycones as a result of the *ex vivo* deconjugation of glucuronides by the tissue β -glucuronidase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 88, 364–369.

M

MacLagan, T. **1876**: The treatment of acute rheumatism by salicin. *The Lancet* 108, 601–604.

Mahdi, J. G.; Mahdi, A. J.; Mahdi, A. J.; Bowen, I. D. **2006**: The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential. *Cell Prolif.* 39, 147–155.

Manach, C.; Morand, C.; Gil-Izquierdo, A.; Bouteloup-Demange, C.; Remesy, C. **2003**: Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 235–242.

Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Remesy, C. **2005**: Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 230S–242S.

Marshall, T.; Shult, P.; Busse, W. W. **1988**: Release of lysosomal enzyme β -glucuronidase from isolated human eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 82, 550–555.

Mattes, B. R.; Clausen, T. P.; Reichardt, P. B. **1987**: Volatile constituents of balsam poplar: The phenol glycoside connection. *Phytochemistry* 26, 1361–1366.

Meier, B.; Julkunen-Tiitto, R.; Tahvanainen, J.; Sticher, O. **1988**: Comparative high-performance liquid and gas-liquid chromatographic determination of phenolic glucosides in Salicaceae species. *J. Chromatogr. A* 442, 175–186.

Meier, B.; Meier-Liebi, M. **2007**: Monographie *Salix*; In: Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen. 6. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 469–496.

Menendez, C.; Duenas, M.; Galindo, P.; Gonzalez-Manzano, S.; Jimenez, R.; Moreno, L.; Zarzuelo, M. J.; Rodriguez-Gomez, I.; Duarte, J.; Santos-Buelga, C.; Perez-Vizcaino, F. **2011**: Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed? *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 1780–1790.

Miyake, Y.; Shimoi, K.; Kumazawa, S.; Yamamoto, K.; Kinae, N.; Osawa, T. **2000**: Identification and antioxidant activity of flavonoid metabolites in plasma and urine of eriocitrin-treated rats. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3217–3224.

Mullen, W.; Archeveque, M.-A.; Edwards, C. A.; Matsumoto, H.; Crozier, A. **2008**: Bioavailability and metabolism of orange juice flavanones in humans: impact of a full-fat yogurt. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11157–11164.

Mullen, W.; Edwards, C. A.; Crozier, A. **2006**: Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *Br. J. Nutr.* 96, 107–116.

N

Nahrstedt, A.; Schmidt, M.; Jäggi, R.; Metz, J.; Khayyal, M. T. **2007**: Willow bark extract: the contribution of polyphenols to the overall effect. *Wien. Med. Wochenschr.* 157, 348–351.

Nemeth, K.; Plumb, G. W.; Berrin, J.-G.; Juge, N.; Jacob, R.; Naim, H. Y.; Williamson, G.; Swallow, D. M.; Kroon, P. A. **2003**: Deglycosylation by small intestinal epithelial cell β -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur. J. Nutr.* 42, 29–42.

Nijveldt, R. J.; van Nood, E.; van Hoorn, D. E.C.; Boelens, P. G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P. AM. **2001**: Flavonoids: A review of probable mechanism of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418–425.

Nyman, T.; Julkunen-Tiitto, R. **2000**: Manipulation of the phenolic chemistry of willows by gall-inducing sawflies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13184–13187.

O

Oeckinghaus, A.; Hayden, M. S.; Ghosh, S. **2011**: Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12, 695–708.

O'Leary, K. A.; Day, A. J.; Needs, P. W.; Mellon, F. A.; O'Brien, N. M.; Williamson, G. **2003**: Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an *in vitro* hepatic model: the role of human β -glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochem. Pharmacol.* 65, 479–491.

O'Leary, K. A.; Day, A. J.; Needs, P. W.; Sly, W. S.; O'Brien, N. M.; Williamson, G. **2001**: Flavonoid glucuronides are substrates for human liver β -glucuronidase. *FEBS Lett.* 503, 103–106.

Orrego-Lagaron, N.; Martinez-Huelamo, M.; Vallverdu-Queralt, A.; Lamuela-Raventos, R. M.; Escribano-Ferrer, E. **2015**: High gastrointestinal permeability and local metabolism of naringenin: influence of antibiotic treatment on absorption and metabolism. *Br. J. Nutr.*, 1–12.

P

Palo, R. T. **1984**: Distribution of birch (*Betula* SPP.), willow (*Salix* SPP.), and poplar (*Populus* SPP.) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores. *J. Chem. Ecol.* 10, 499–520.

Pearl, I. A.; Darling, S. F. **1962**: Studies on the barks of the family Salicaceae. V.¹ Grandidentatin, a new glucoside from the bark of *Populus grandidentata*. *J. Org. Chem.* 27, 1806–1809.

Pearl, I. A.; Darling, S. F. **1970**: Purpurein, a new glucoside from the bark of *Salix purpurea*. *Phytochemistry* 9, 853–856.

Pearl, I. A.; Darling, S. F. **1971**: The structures of salicortin and tremulacin. *Phytochemistry* 10, 3161–3166.

Pereira-Caro, G.; Borges, G.; van der Hooft, J.; Clifford, M. N.; Del Rio, D.; Lean, M. E. J.; Roberts, S. A.; Kellerhals, M. B.; Crozier, A. **2014**: Orange juice (poly)phenols are highly bioavailable in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 100, 1378–1384.

Perez-Vizcaino, F.; Duarte, J.; Santos-Buelga, C. **2012**: The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *J. Sci. Food Agric.* 92, 1822–1825.

Peters, W. H.; Jansen, P. L.; Cuypers, H. T.; de Abreu, R. A.; Nauta, H. **1986**: Deconjugation of glucuronides catalysed by UDP-glucuronyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 873, 252–259.

Pharmacopoea Europaea (Ph. Eur.) **2015**. 1. Nachtrag, 8. Ausgabe. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag.

Piazzon, A.; Vrhovsek, U.; Masuero, D.; Mattivi, F.; Mandoj, F.; Nardini, M. **2012**: Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid. *J. Agric. Food Chem.* 60, 12312–12323.

Pirker, R.; Huck, C. W.; Popp, M.; Bonn, G. K. **2004**: Simultaneous determination of gentisic, salicyluric and salicylic acid in human plasma using solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 809, 257–264.

Poblocka-Olech, L.; Krauze-Baranowska, M.; Glód, D.; Kawiak, A.; Lojkowska, E. **2010**: Chromatographic analysis of simple phenols in some species from the genus *Salix*. *Phytochem. Anal.* 21, 463–469.

Poblocka-Olech, L.; van Nederkassel, A.-M.; Vander Heyden, Y.; Krauze-Baranowska, M.; Glód, D.; Baczek, T. **2007**: Chromatographic analysis of salicylic compounds in different species of the genus *Salix*. *J. Sep. Sci.* 30, 2958–2966.

R

Rasmussen, B.; Nkurunziza, A.-J.; Witt, M.; Oketch-Rabah, H. A.; Jaroszewski, J. W.; Staerk, D. **2006**: Dovyalicin-type spermidine alkaloids from *Dovyalis* species. *J. Nat. Prod.* 69, 1300–1304.

Rechner, A. R.; Kuhnle, G.; Bremner, P.; Hubbard, G. P.; Moore, K. P.; Rice-Evans, C. A. **2002**: The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biol. Med.* 33, 220–235.

Rechner, A. R.; Smith, M. A.; Kuhnle, G.; Gibson, G. R.; Debnam, E. S.; Srai, S. K. S.; Moore, K. P.; Rice-Evans, C. A. **2004**: Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 212–225.

Roebuck, K. A.; Finnegan, A. **1999**: Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 66, 876–888.

Roowi, S.; Mullen, W.; Edwards, C. A.; Crozier, A. **2009**: Yoghurt impacts on the excretion of phenolic acids derived from colonic breakdown of orange juice flavanones in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, S68-75.

Ruuhola, T.; Julkunen-Tiitto, R.; Vainiotalo, P. **2003**: *In vitro* degradation of willow salicylates. *J. Chem. Ecol.* 29, 1083–1097.

S

Santos-Buelga, C.; Gonzalez-Manzano, S.; Duenas, M.; Gonzalez-Paramas, M. **2012**: Analysis and characterisation of flavonoid phase II metabolites; In: Recent advances in polyphenol research. 3. Aufl. Chichester, West Sussex: Wiley-Blackwell, 249–286.

Scalbert, A.; Morand, C.; Manach, C.; Remesy, C. **2002**: Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed. Pharmacother.* 56, 276–282.

Scalbert, A.; Williamson, G. **2000**: Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130, 2073S-85S.

Schmid, B.; Kötter, I.; Heide, L. **2001a**: Pharmacokinetics of salicin after oral administration of a standardised willow bark extract. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 57, 387–391.

Schmid, B.; Lüdtke, R.; Selbmann, H. K.; Kötter, I.; Tschirdewahn, B.; Schaffner, W.; Heide, L. **2000**: Effectiveness and tolerance of standardized willow bark extract in arthrosis patients. Randomized, placebo-controlled double blind study. *Z. Rheumatol.* 59, 314–320.

Schmid, B.; Lüdtke, R.; Selbmann, H. K.; Kötter, I.; Tschirdewahn, B.; Schaffner, W.; Heide, L. **2001b**: Efficacy and tolerability of a standardized willow bark extract in patients with osteoarthritis: randomized placebo-controlled, double blind clinical trial. *Phytother. Res.* 15, 344–350.

Shara, M.; Stohs, S. J. **2015**: Efficacy and safety of white willow bark (*Salix alba*) extracts. *Phytother. Res.* 29, 1112–1116.

Shimoi, K.; Saka, N.; Nozawa, R.; Sato, M.; Amano, I.; Nakayama, T.; Kinae, N. **2001**: Deglucuronidation of a flavonoid, luteolin monoglucuronide, during inflammation. *Drug Metab. Dispos.* 29, 1521–1524.

Sies, H.; Packer, L. (Hg.) **2005**: Methods in enzymology; Phase II conjugation enzymes & transport systems. 400. Aufl. London: Academic Press.

Stalmach, A.; Mullen, W.; Pecorari, M.; Serafini, M.; Crozier, A. **2009**: Bioavailability of C-linked dihydrochalcone and flavanone glucosides in humans following ingestion of unfermented and fermented rooibos teas. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7104–7111.

Steinegger, E.; Hovel, H. **1972**: Analytic and biologic studies on Salicaceae substances, especially on salicin. II. Biological study. *Pharm. Acta Helv.* 47, 222–234.

Stevens, P. F. **2012**: Angiosperm Phylogeny website. 12. Aufl. Online verfügbar unter <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.

Stone, E. **1763**: An Account of the success of the bark of willow in the cure of agues. *Philos. Trans.* 53, 195–200.

T

Tak, P. P.; Firestein, G. S. **2001**: NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J. Clin. Invest.* 107, 7–11.

Tegelberg, R.; Julkunen-Tiitto, R. **2001**: Quantitative changes in secondary metabolites of dark-leaved willow (*Salix myrsinifolia*) exposed to enhanced ultraviolet-B radiation. *Physiol. Plant.* 113, 541–547.

Tomas-Barberan, F. A.; Clifford, M. N. **2000**: Flavanones, chalcones and dihydrochalcones - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1073–1080.

Tribolo, S.; Lodi, F.; Connor, C.; Suri, S.; Wilson, V. G.; Taylor, M. A.; Needs, P. W.; Kroon, P. A.; Hughes, D. A. **2008**: Comparative effects of quercetin and its predominant human metabolites on adhesion molecule expression in activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 197, 50–56.

U

Uehleke, B.; Müller, J.; Stange, R.; Kelber, O.; Melzer, J. **2013**: Willow bark extract STW 33-I in the long-term treatment of outpatients with rheumatic pain mainly osteoarthritis or back pain. *Phytomedicine* 20, 980–984.

Untergehrer, M.; Bücherl, D.; Wittmann, H.-J.; Strasser, A.; Heilmann, J.; Jürgenliemk, G. **2015**: Structure-dependent deconjugation of flavonoid glucuronides by human β -glucuronidase - *in vitro* and *in silico* analyses. *Planta Med.* 81, 1182–1189.

V

Vacek, J.; Papouskova, B.; Kosina, P.; Vrba, J.; Kren, V.; Ulrichova, J. **2012**: Biotransformation of flavonols and taxifolin in hepatocyte *in vitro* systems as determined by liquid chromatography with various stationary phases and electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 899, 109–115.

van Duynhoven, J.; Vaughan, E. E.; Jacobs, D. M.; Kemperman, R. A.; van Velzen, Ewoud J J; Gross, G.; Roger, L. C.; Possemiers, S.; Smilde, A. K.; Dore, J.; Westerhuis, J. A.; Van de Wiele, Tom **2011**: Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4531S–4538S.

Vlachoianis, J. E.; Cameron, M.; Chrubasik, S. **2009**: A systematic review on the effectiveness of willow bark for musculoskeletal pain. *Phytother. Res.* 23, 897–900.

W

Wagner, I.; Biegert, C.; Heide, L. **2003**: Phytoanalgetika, aktuelle Forschungsergebnisse zur Weidenrinde. *Pharm. Ztg.* 13, 1153–1164.

Walle, T. **2004**: Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* 36, 829–837.

Walle, T.; Browning, A. M.; Steed, L. L.; Reed, S. G.; Walle, U. K. **2005**: Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. *J. Nutr.* 135, 48–52.

Weber, C.; Aepfelbacher, M.; Haag, H.; Ziegler-Heitbrock, H. W.; Weber, P. C. **1993**: Tumor necrosis factor induces enhanced responses to platelet-activating factor and differentiation in human monocytic Mono Mac 6 cells. *Eur. J. Immunol.* 23, 852–859.

WHO **2009**: Monographs on selected medicinal plants. Genf: World Health Organisation.

Wichtl, M. **2002**: Teedrogen und Phytopharmaka; Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage. 4. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

Wiesneth, S.; Petereit, F.; Jürgenliemk, G. **2015**: *Salix daphnoides*: A screening for oligomeric and polymeric proanthocyanidins. *Molecules* 20, 13764–13779.

Williamson, G.; Barron, D.; Shimoi, K.; Terao, J. **2005**: *In vitro* biological properties of flavonoid conjugates found *in vivo*. *Free Rad. Res.* 39, 457–469.

Wu, B.; Basu, S.; Meng, S.; Wang, X.; Zhang, S.; Hu, M. **2011**: Regioselective sulfation and glucuronidation of phenolics: insights into the structural basis. *Curr. Drug Metab.* 12, 900–916.

X

Xia, B.; Zhou, Q.; Zheng, Z.; Ye, L.; Hu, M.; Liu, Z. **2012**: A novel local recycling mechanism that enhances enteric bioavailability of flavonoids and prolongs their residence time in the gut. *Mol. Pharm.* 9, 3246–3258.

Yanez, J. A.; Remsberg, C. M.; Miranda, N. D.; Vega-Villa, K. R.; Andrews, P. K.; Davies, N. M. **2008**: Pharmacokinetics of selected chiral flavonoids: hesperetin, naringenin and eriodictyol in rats and their content in fruit juices. *Biopharm. Drug Dispos.* 29, 63–82.

Y

Yang, H.; Lee, S. H.; Sung, S. H.; Kim, J.; Kim, Y. C. **2013**: Neuroprotective compounds from *Salix pseudo-lasiogyne* twigs and their anti-amnesic effects on scopolamine-induced memory deficit in mice. *Planta Med.* 79, 78–82.

Yin, M. J.; Yamamoto, Y.; Gaynor, R. B. **1998**: The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I(kappa)B kinase-beta. *Nature* 396, 77–80.

Z

Zapesochaya, G. G.; Kurkin, V. A.; Braslavskii, V. B.; Filatova, N. V. **2002**: Phenolic compounds of *Salix acutifolia* bark. *Chem. Nat. Compd.* 38, 314–318.

Zhang, J.; Brodbelt, J. S. **2004**: Screening flavonoid metabolites of naringin and narirutin in urine after human consumption of grapefruit juice by LC-MS and LC-MS/MS. *Analyst* 129, 1227–1233.

Zhao, L.; Liu, L.; Li, J. **2014**: Qualitative and quantitative analysis of five bioactive flavonoids in *Salix bordensis* Turcz. by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. *Am. J. Anal. Chem.* 5, 851–860.

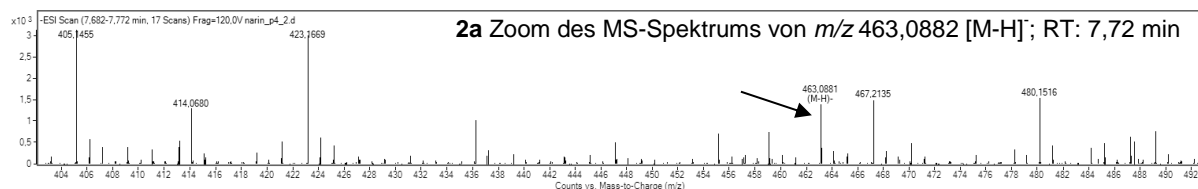
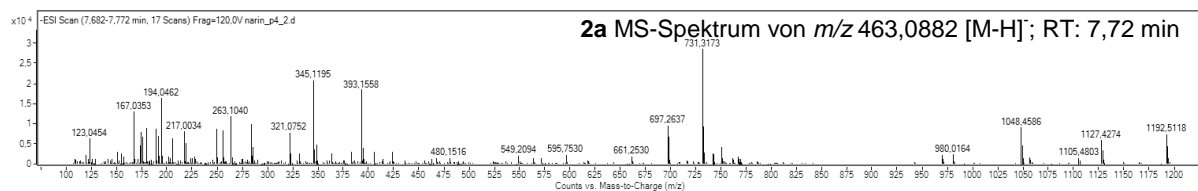
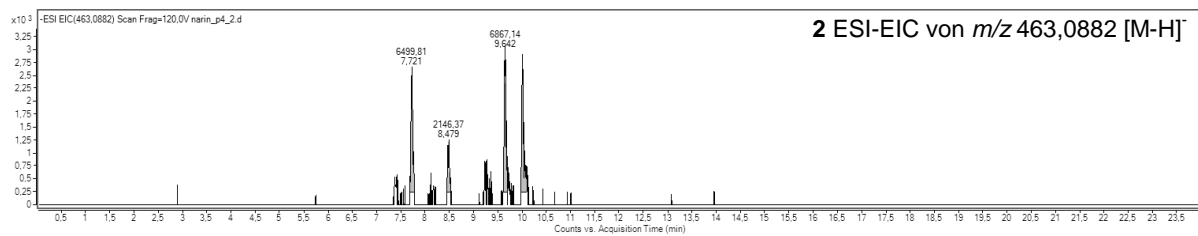
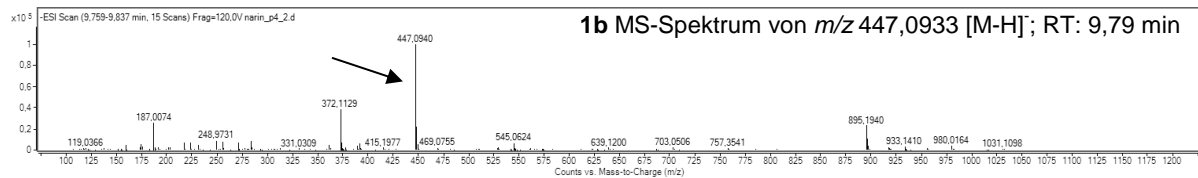
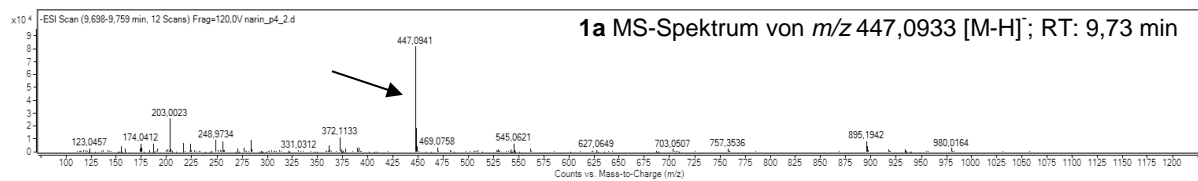
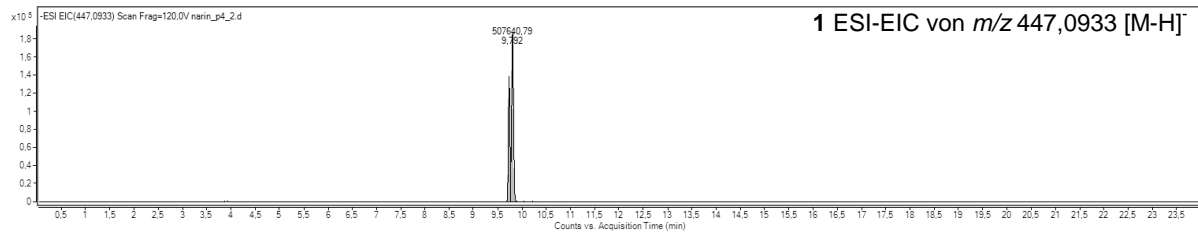
Zheng, L. T.; Ryu, G.-M.; Kwon, B.-M.; Lee, W.-H.; Suk, K. **2008**: Anti-inflammatory effects of catechols in lipopolysaccharide-stimulated microglia cells: inhibition of microglial neurotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.* 588, 106–113.

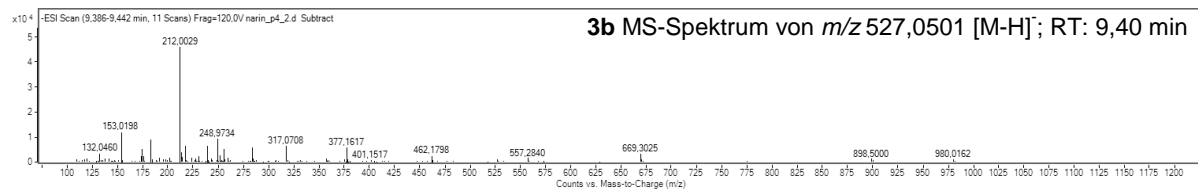
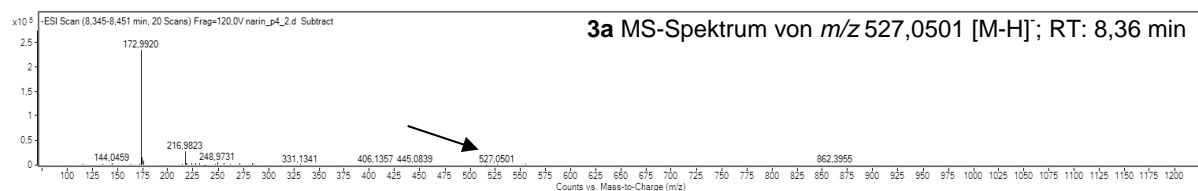
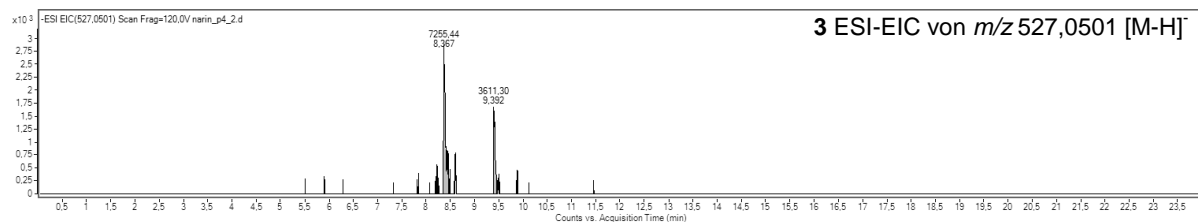
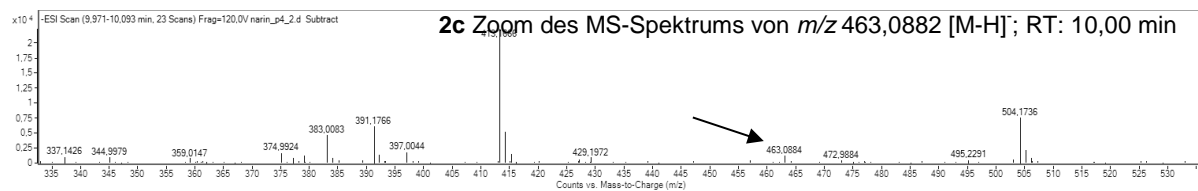
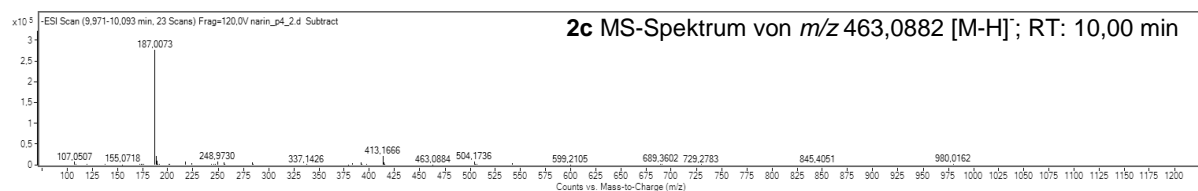
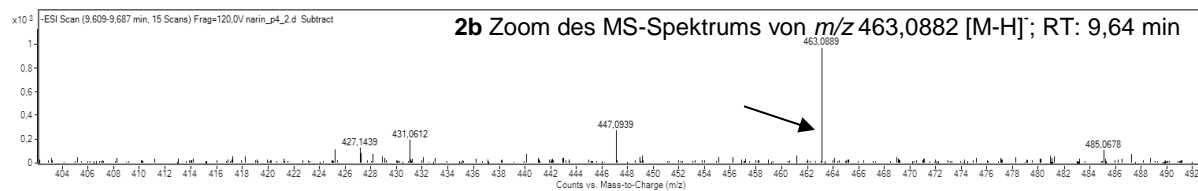
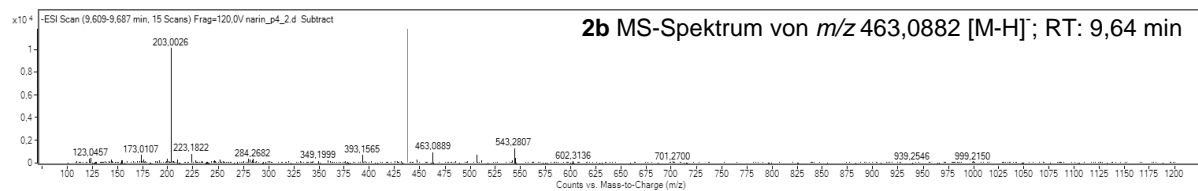
Ziegler-Heitbrock, H. W.; Thiel, E.; Fütterer, A.; Herzog, V.; Wirtz, A.; Riethmüller, G. **1988**: Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J. Cancer* 41, 456–461.

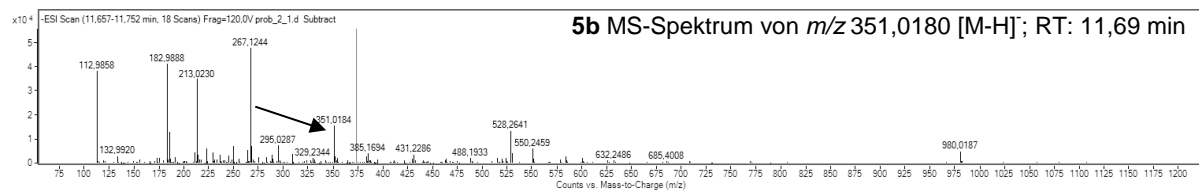
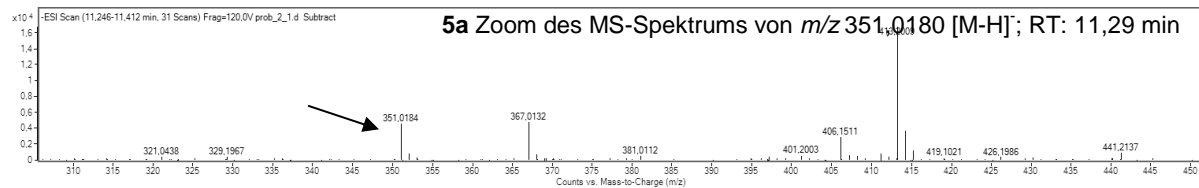
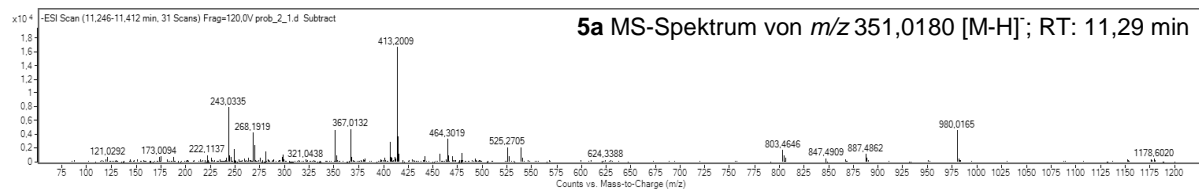
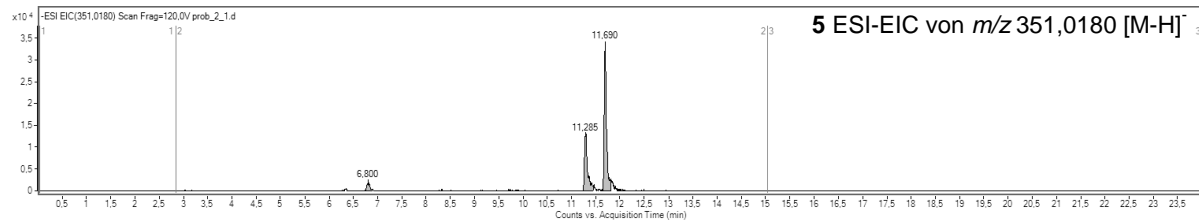
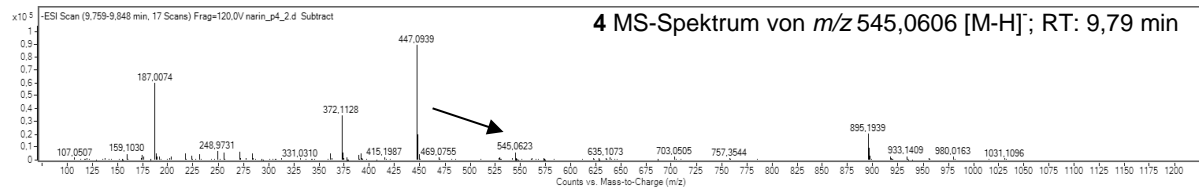
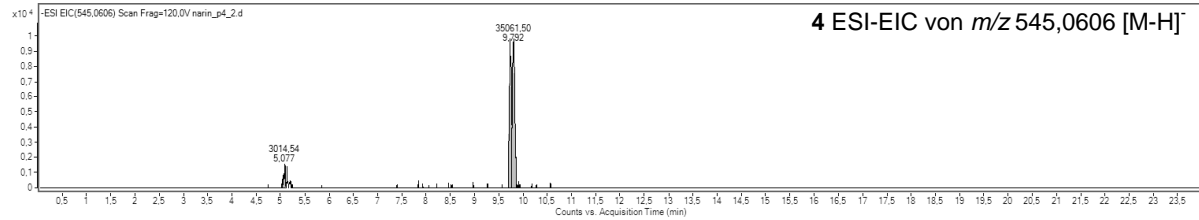
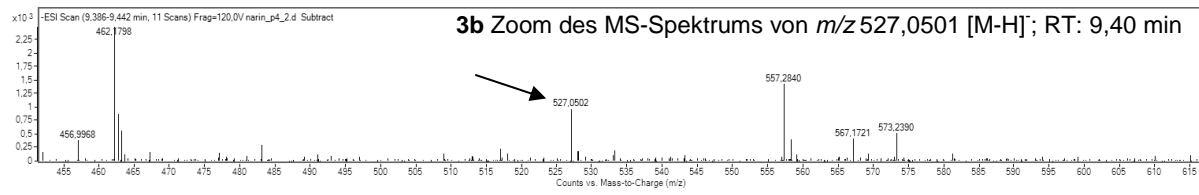
8 ANHANG: EIC, MS, MS/MS UND NMR-SPEKTREN

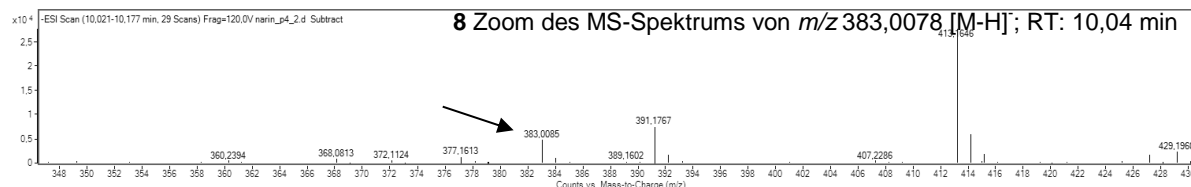
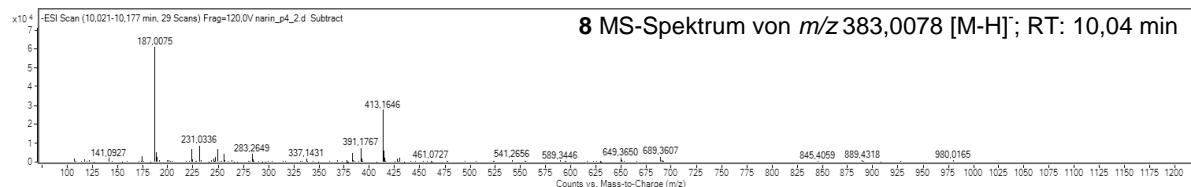
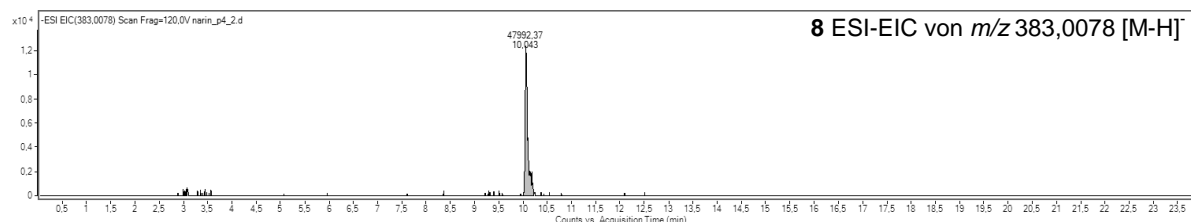
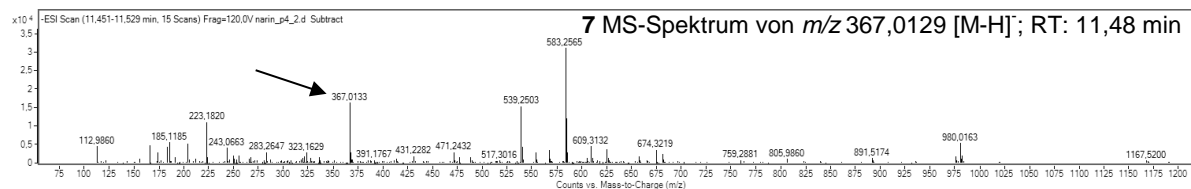
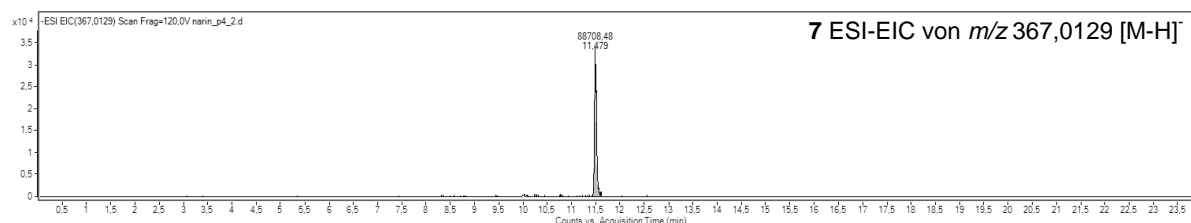
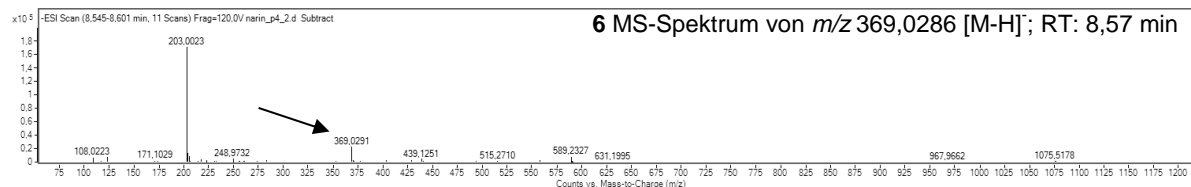
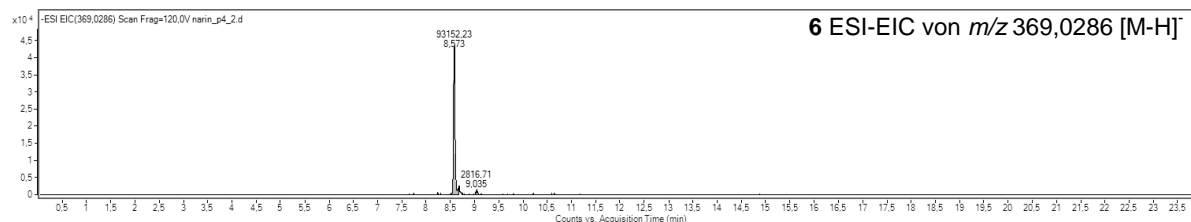
8.1 EIC und MS Spektren

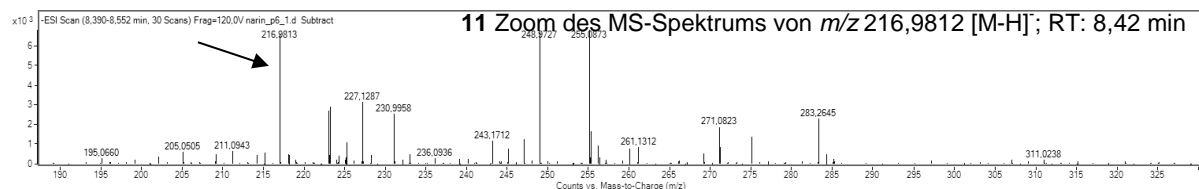
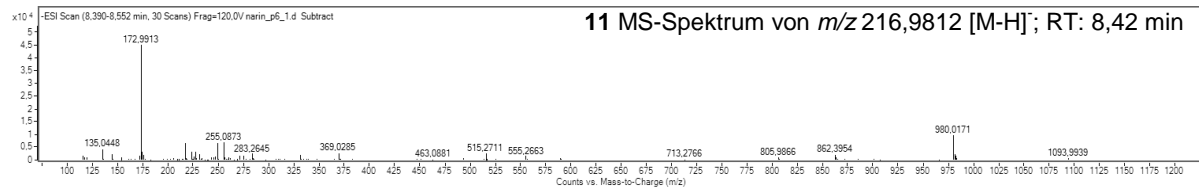
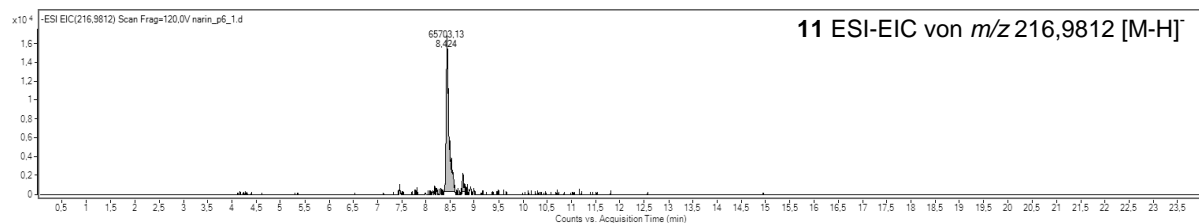
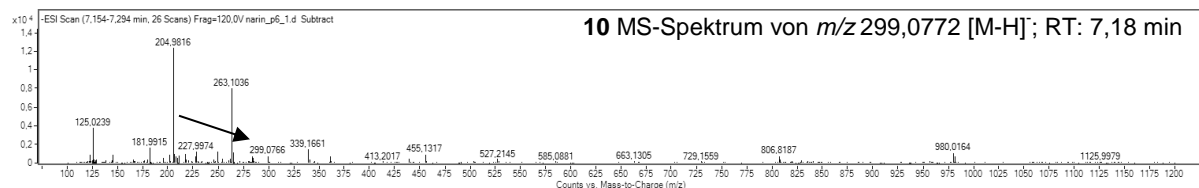
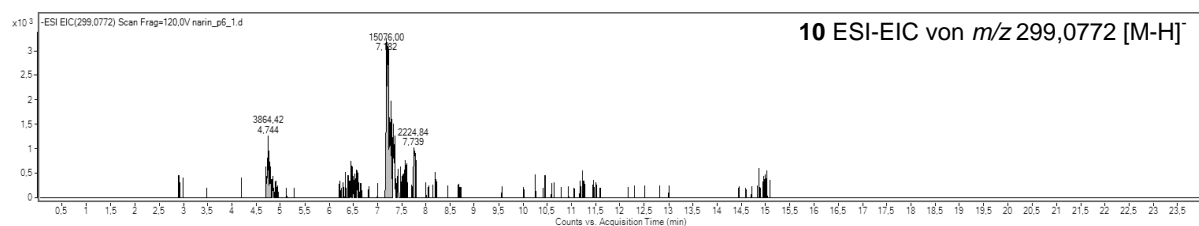
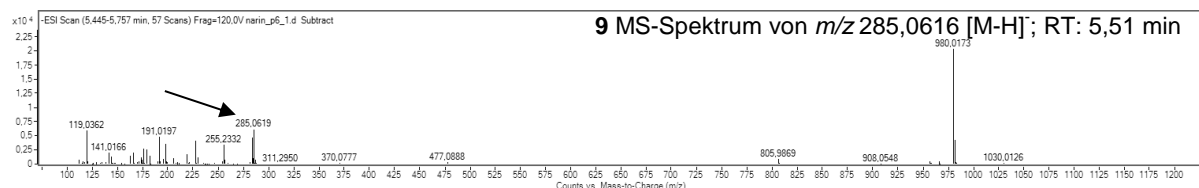
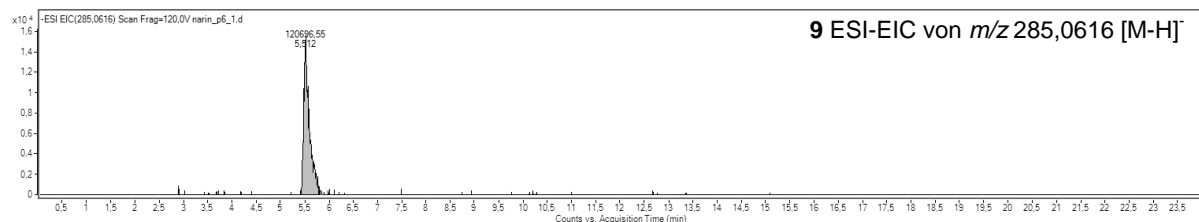
Die Bezifferung der gezeigten extrahierten ESI-Ionenchromatogramme (ESI-EIC) und die zugehörigen MS Spektren beziehen sich auf **Tab. 18** und **Tab. 19**.

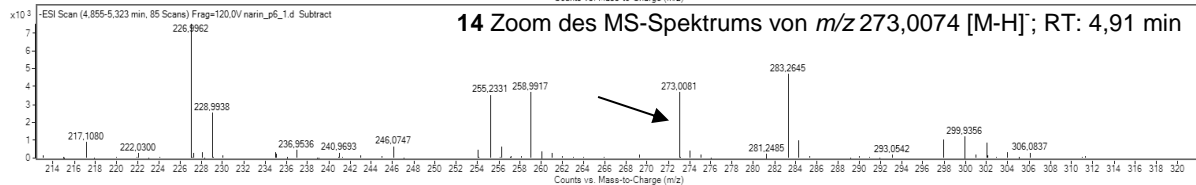
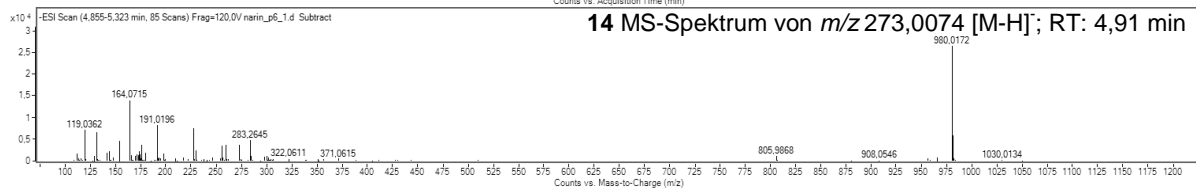
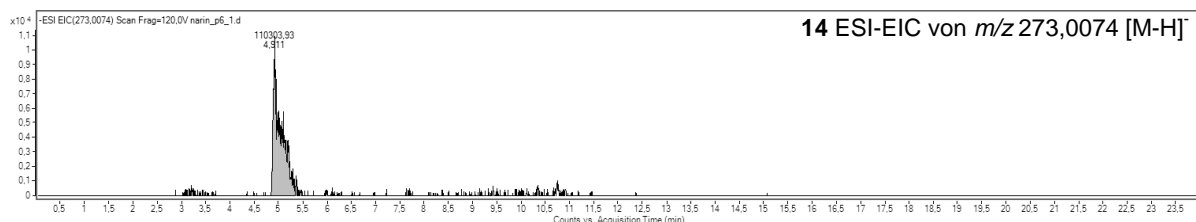
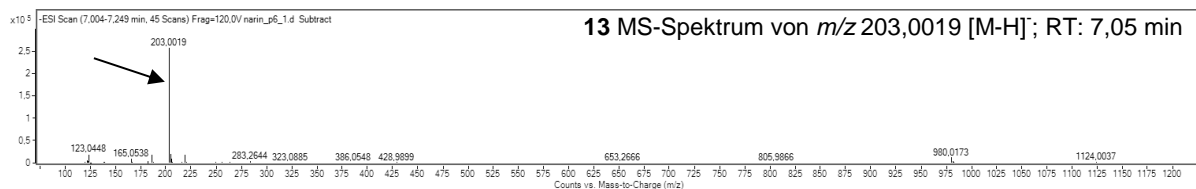
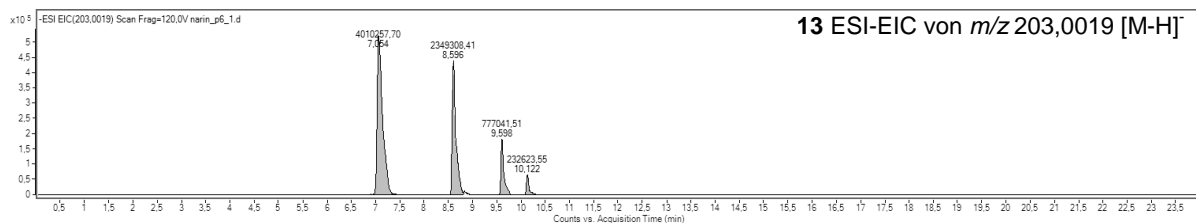
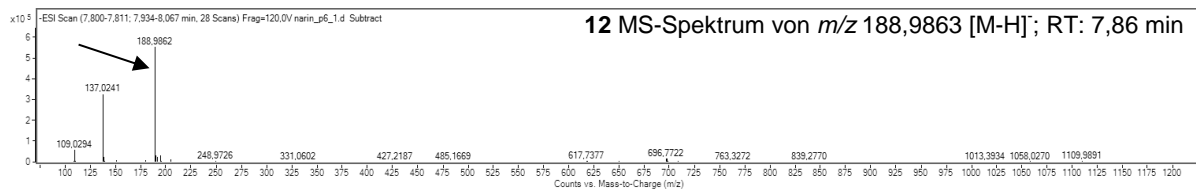
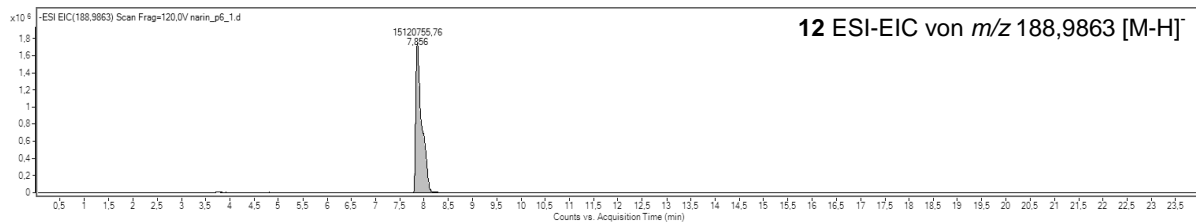


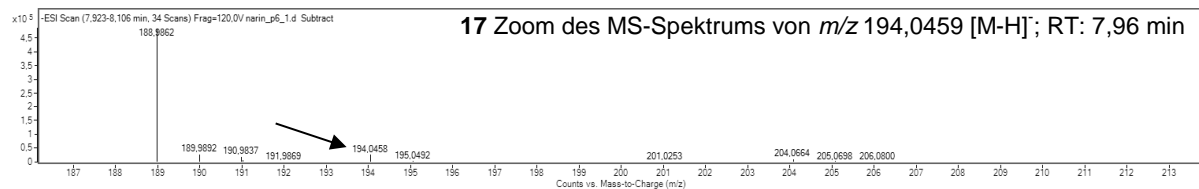
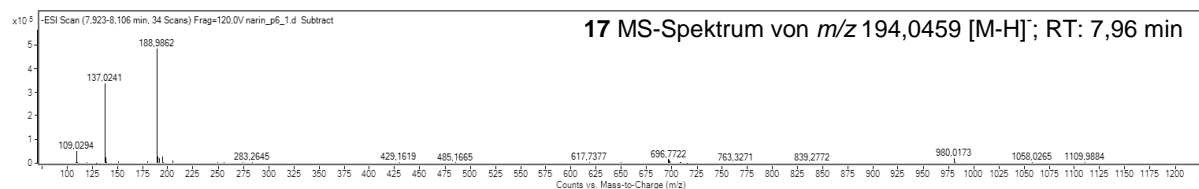
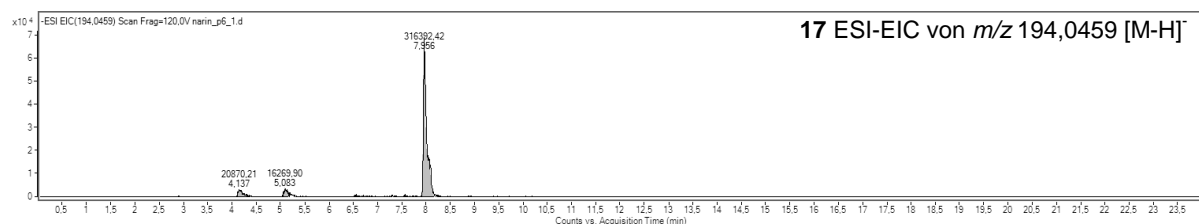
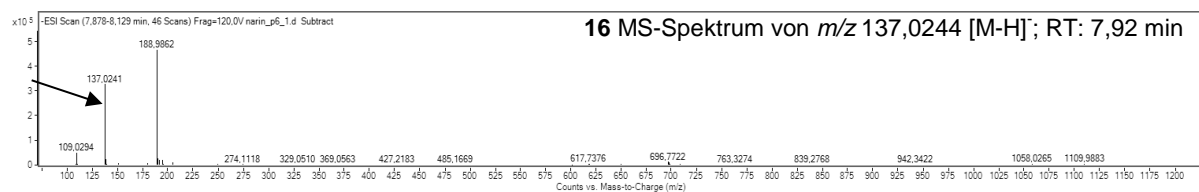
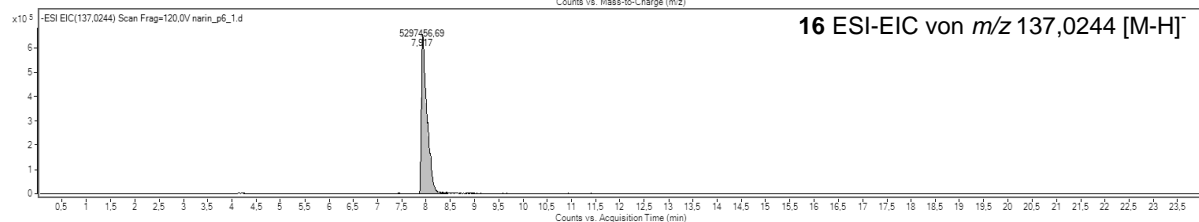
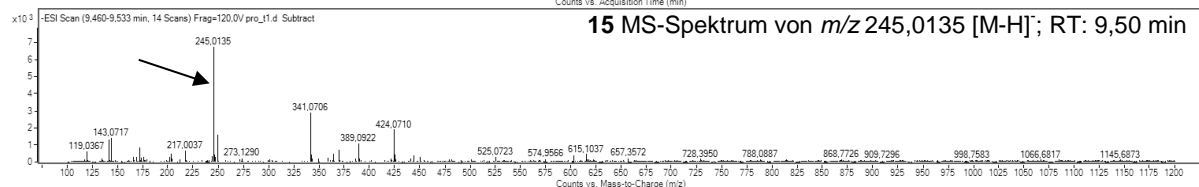
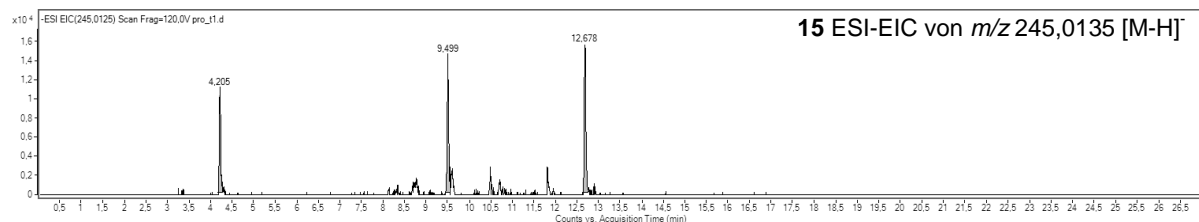






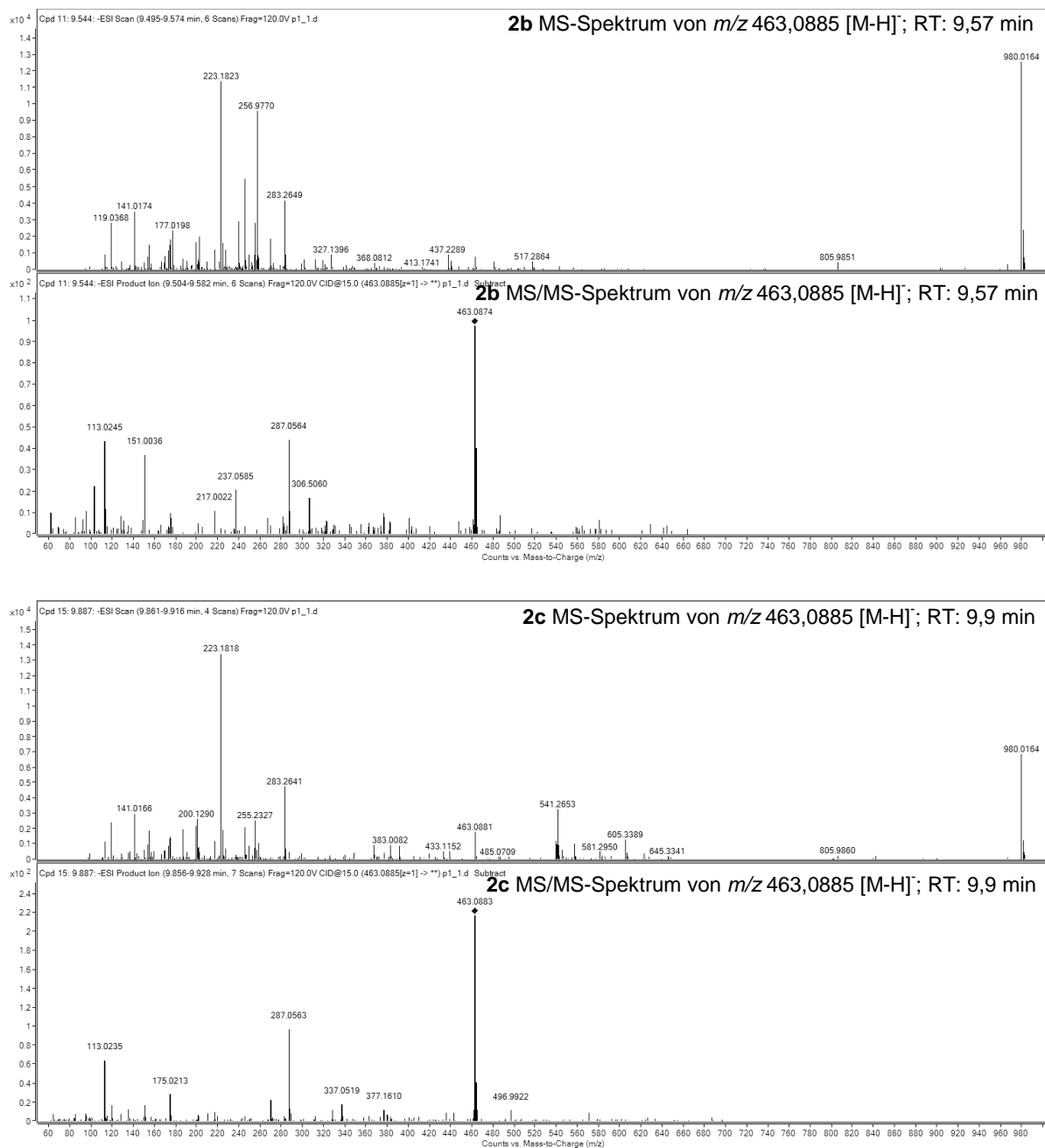


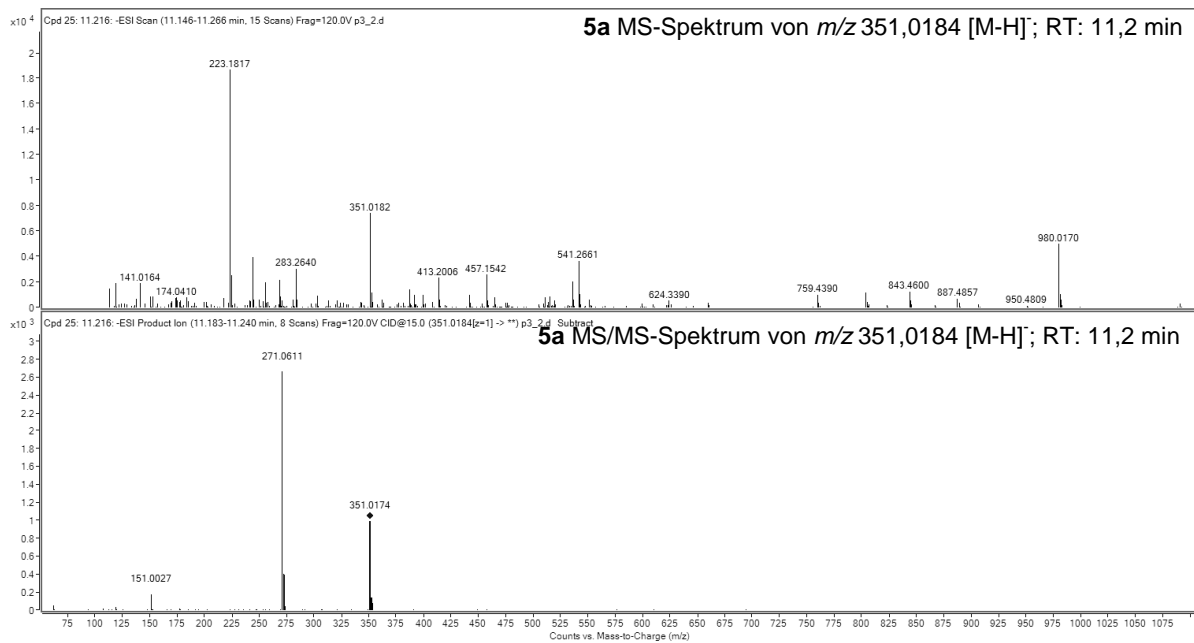
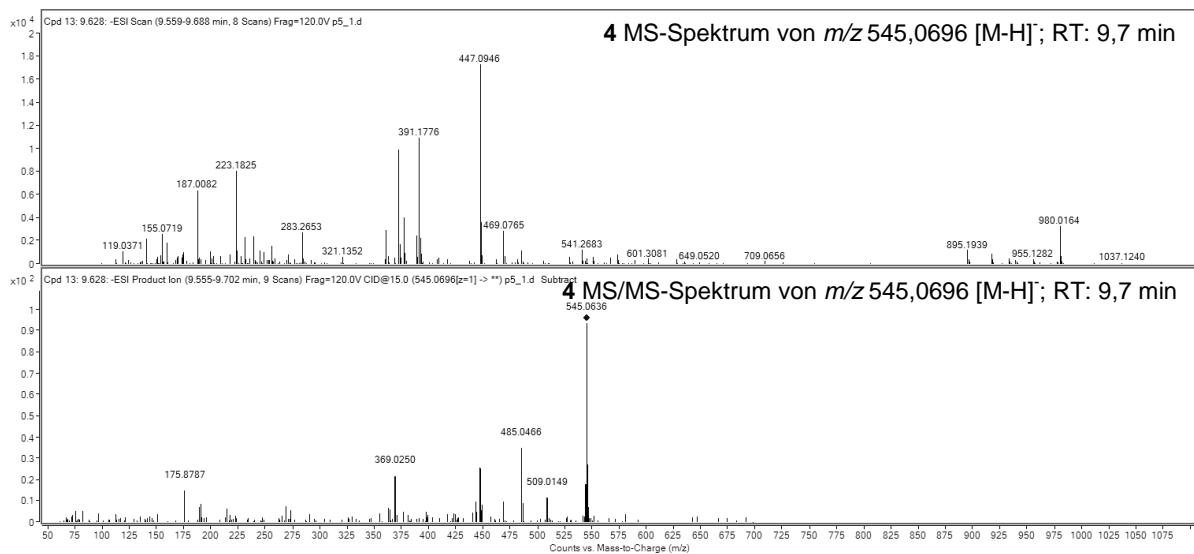


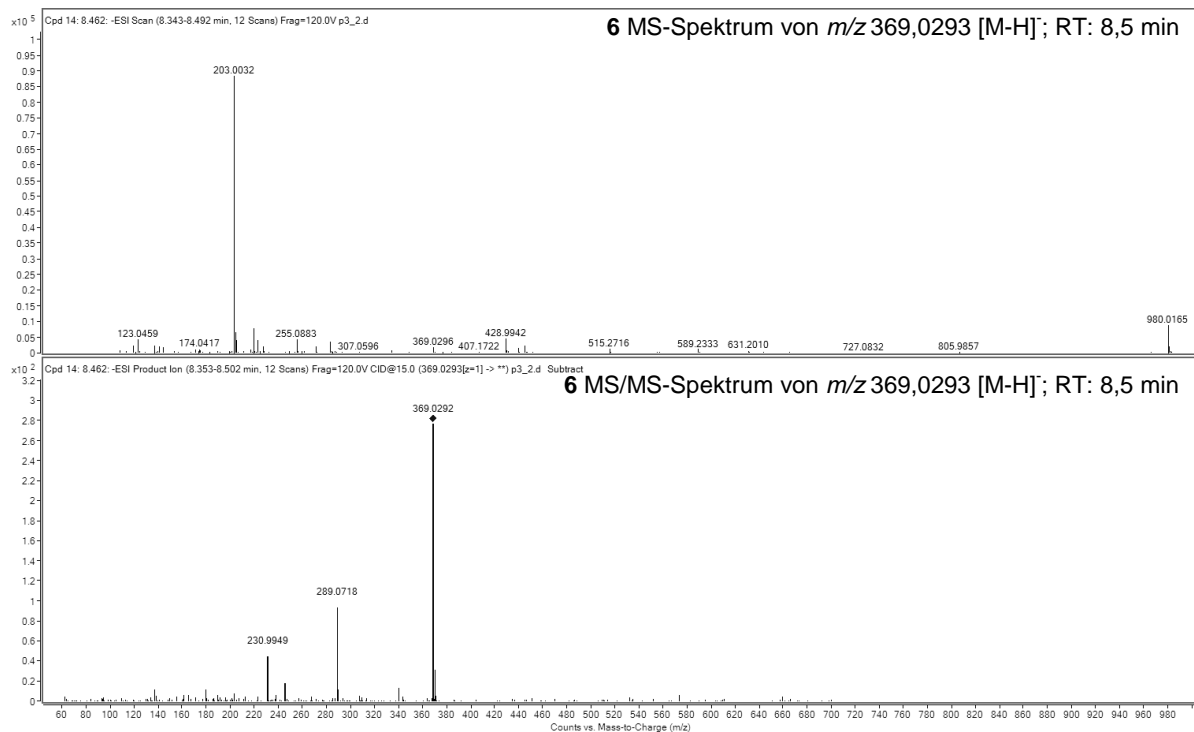
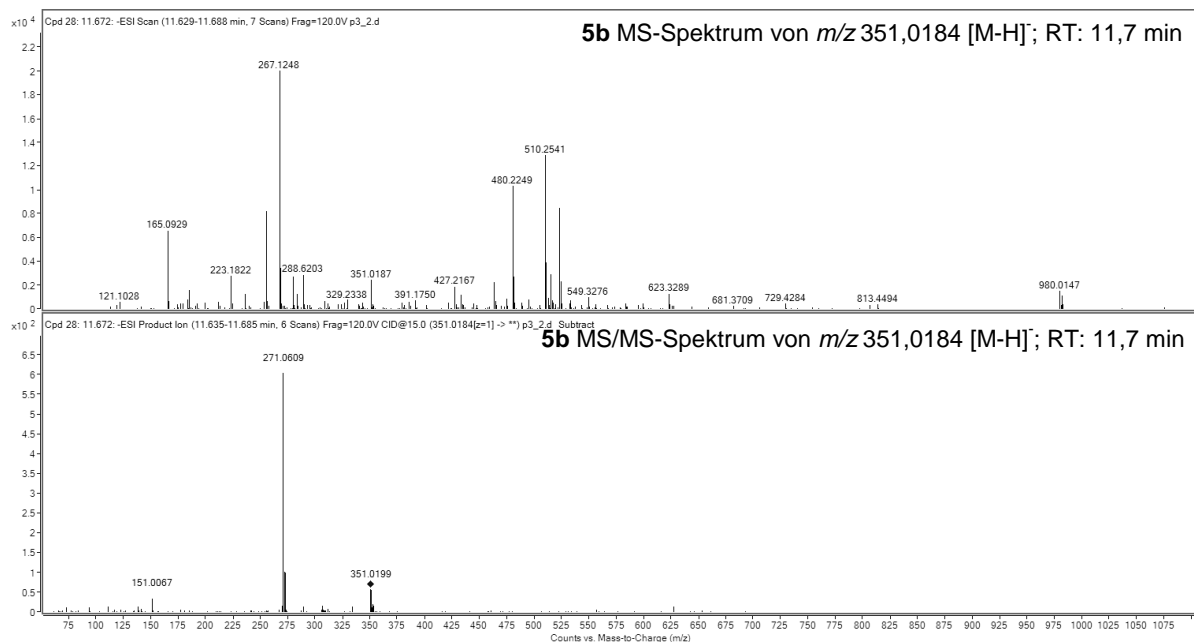


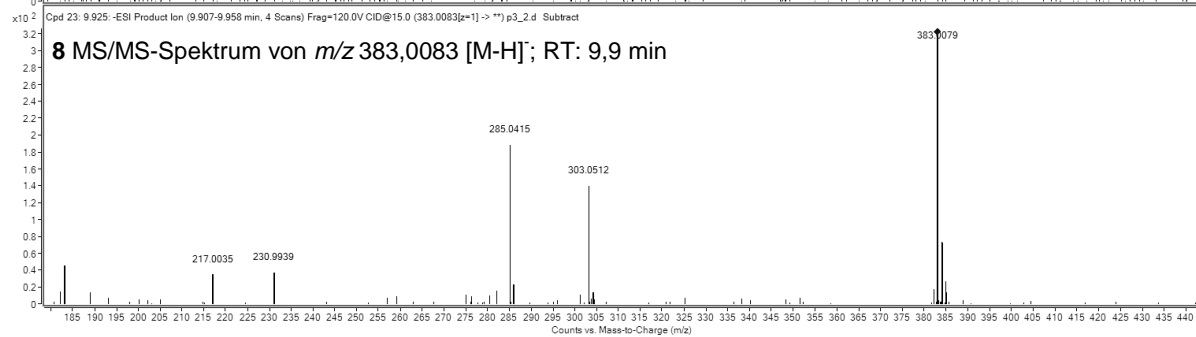
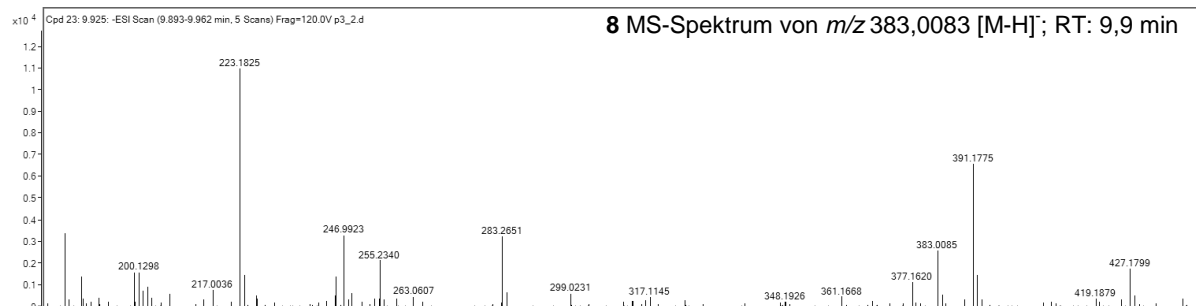
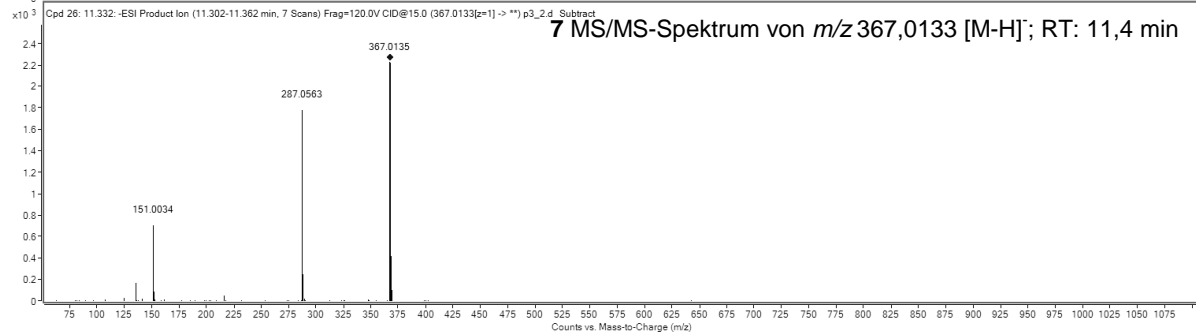
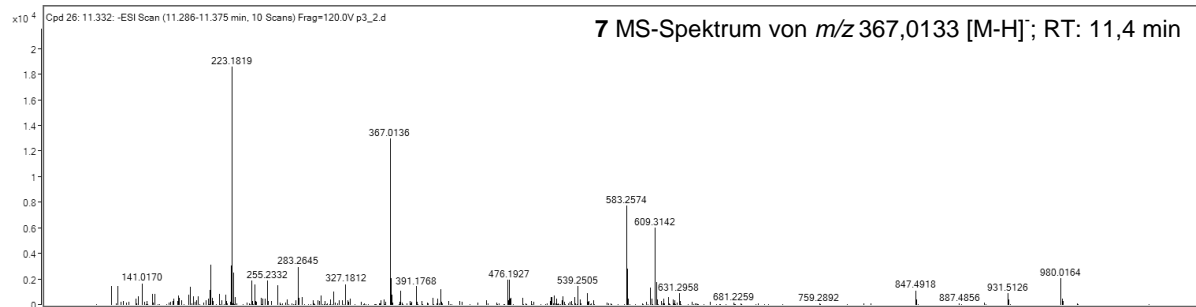
8.2 MS/MS Spektren

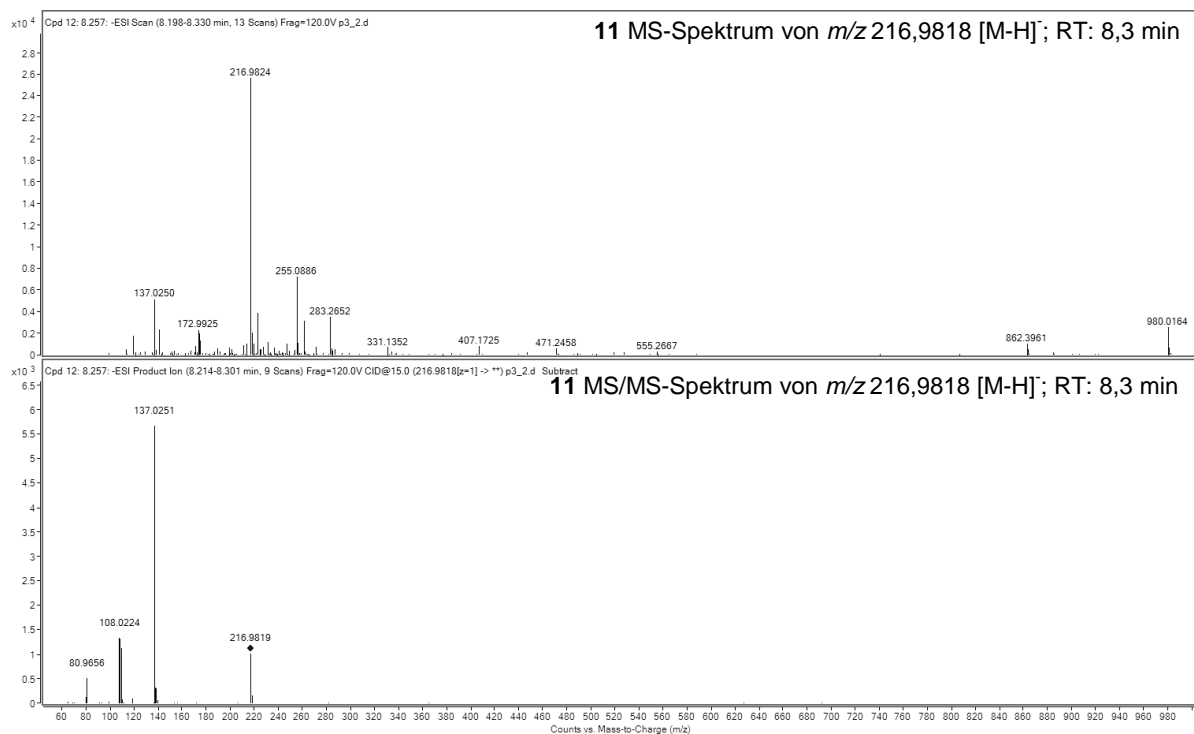
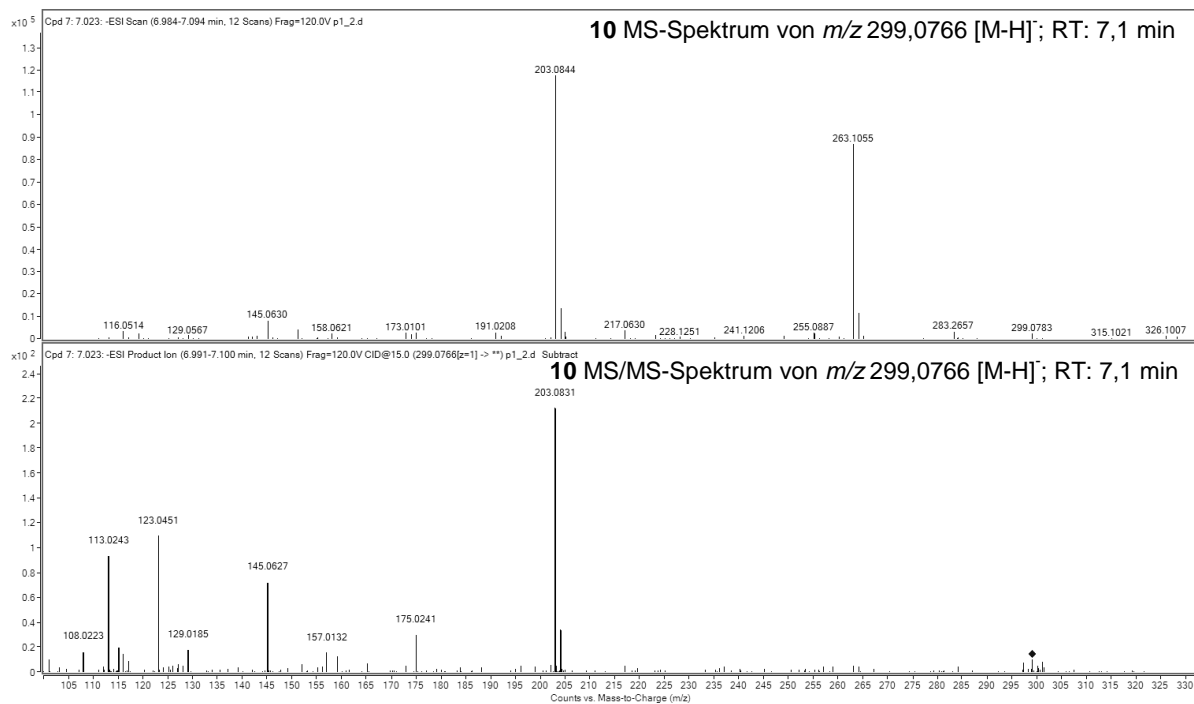
Die Bezifferung der gezeigten MS/MS Spektren beziehen sich auf **Tab. 17** und **Tab. 18**.

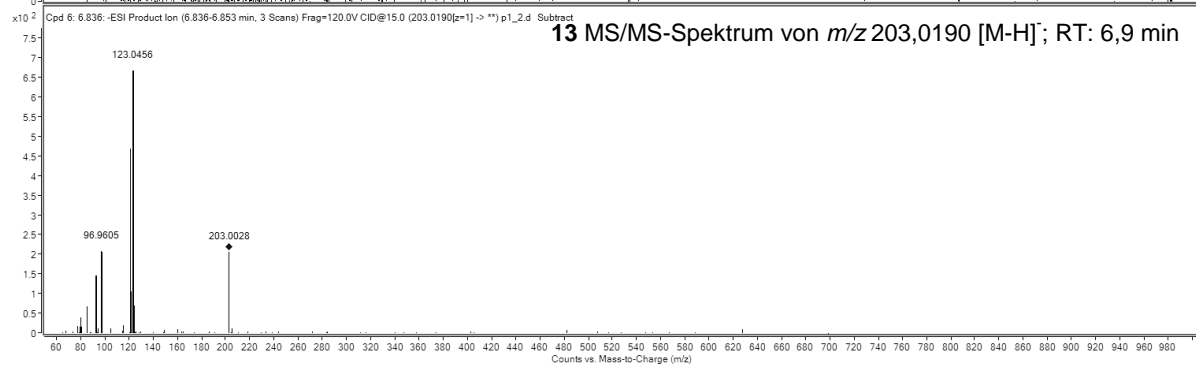
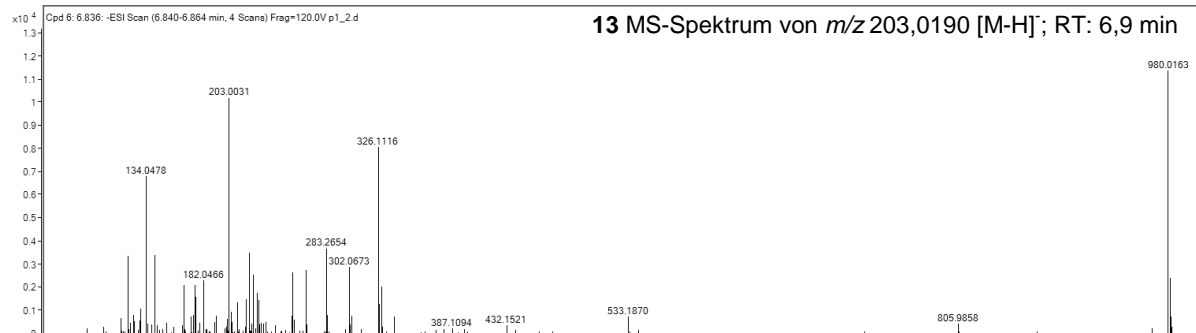
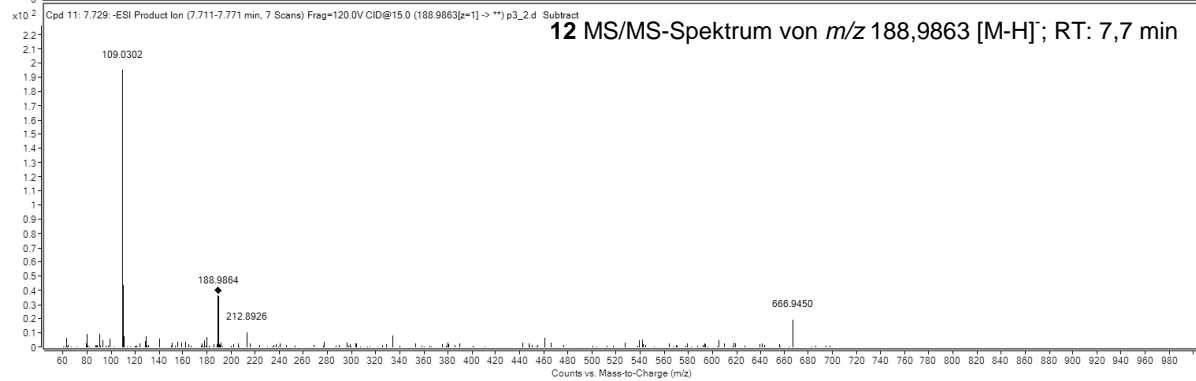
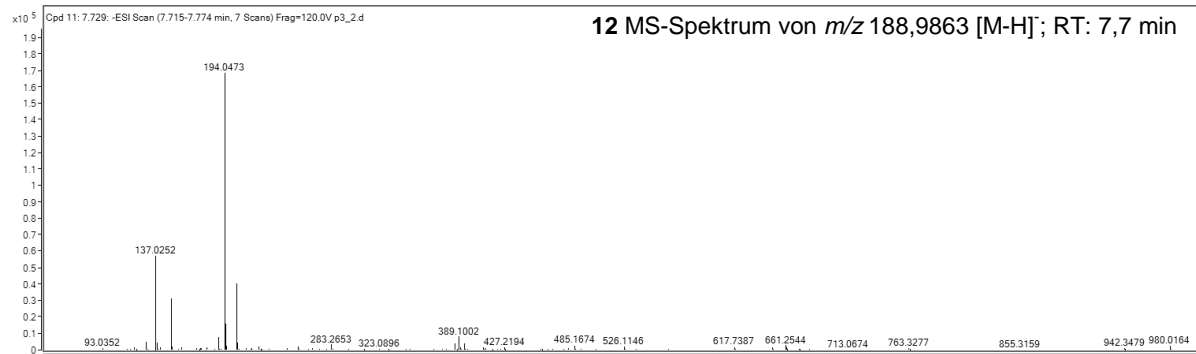


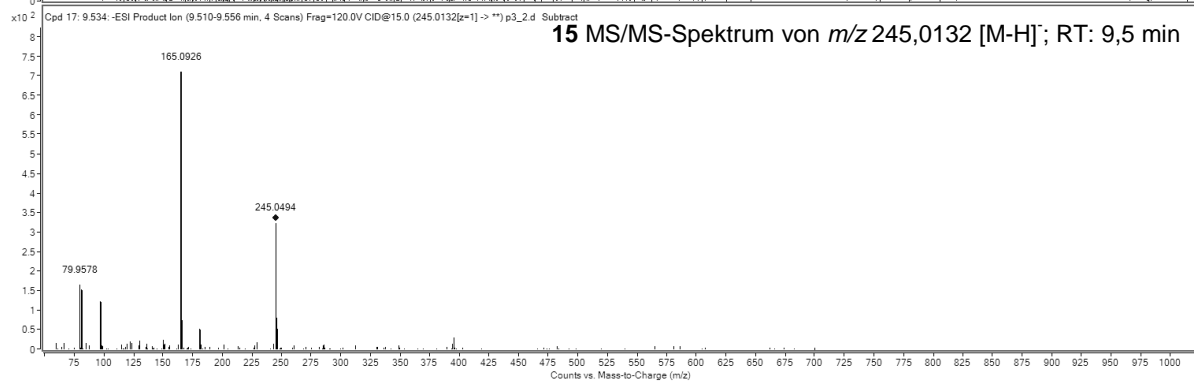
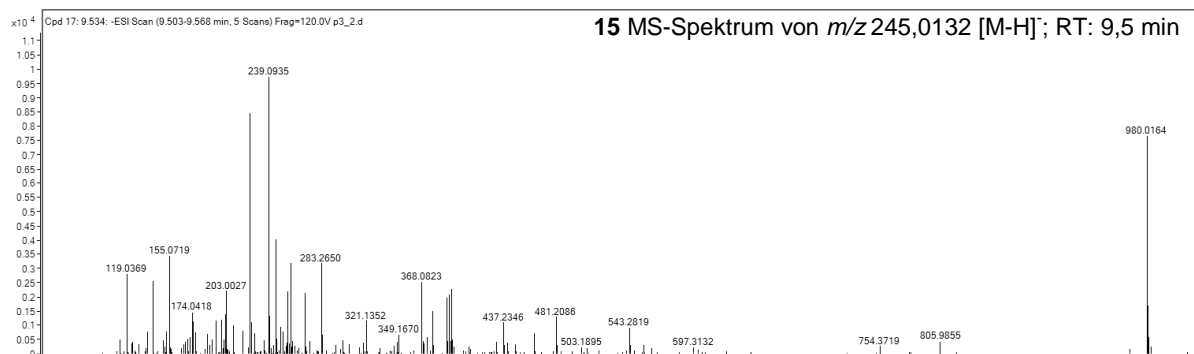
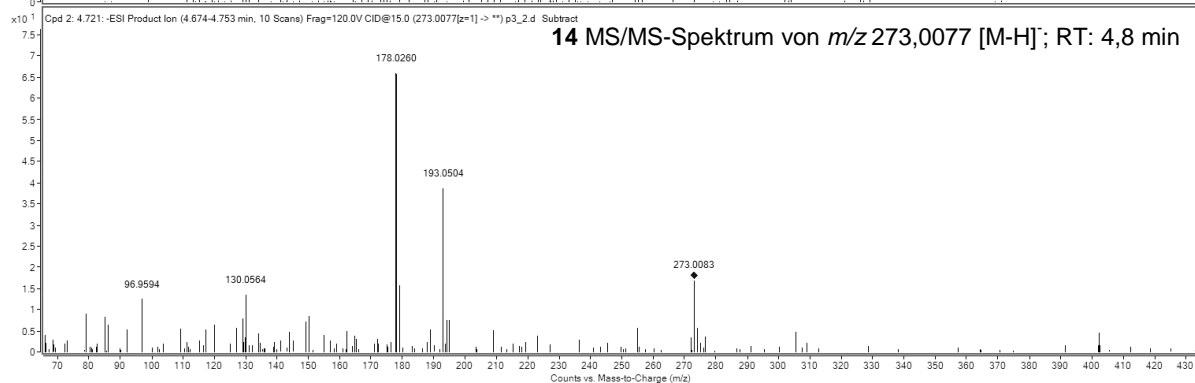
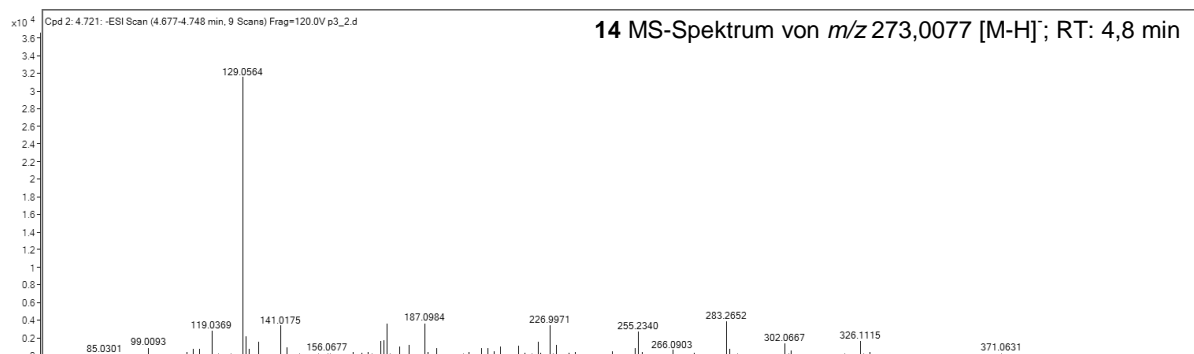








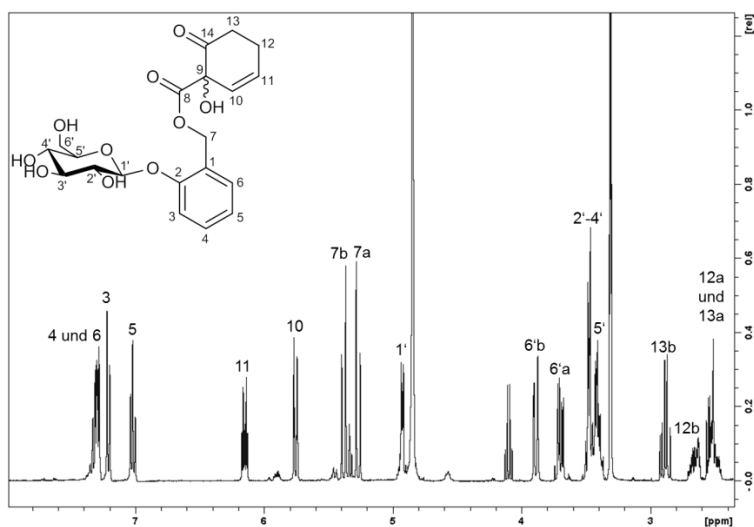




8.3 NMR Daten

8.3.1 Salicortin

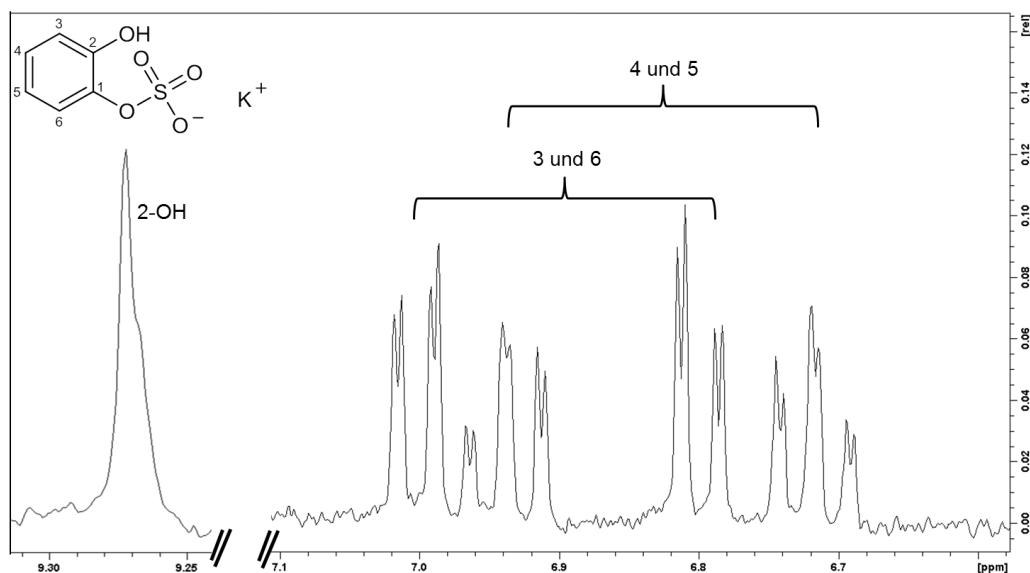
^1H NMR Spektrum, Signalzuweisung und Vergleich mit den Literaturdaten von Salicortin (in Methanol- d_4 , 400 MHz, 298 K).



	Ermittelte Werte	Literaturwerte von Knuth (2013)
^1H	δ [ppm], Signalaufspaltung, (J [Hz])	δ [ppm], Signalaufspaltung, (J [Hz])
1'	4,93; d (7,6)	4,92; d (7,7)
2'	3,47; m	3,47; m
3'	3,47; m	3,47; m
4'	3,47; m	3,47; m
5'	3,41; m	3,39; m
6'a	3,70; dd (5,2; 12,0)	3,69; dd (5,5; 12,1)
6'b	3,89; dd (2,0; 12,0)	3,88; dd (2,2; 12,1)
3	7,21; d (7,9)	7,20; d (8,0)
4	7,33; m	7,31; m
5	7,02; m	7,01; m
6	7,30; m	7,28; m
7a	5,27; d (12,4)	5,26; d (12,3)
7b	5,38; d (12,4)	5,37; d (12,3)
10	5,75; m	5,75; m
11	6,15; m	6,14; m
12a	2,51; m	2,49; m
12b	2,66; m	2,65; m
13a	2,51; m	2,53; m
13b	2,88; m	2,88; m

8.3.2 Catechol-sulfat

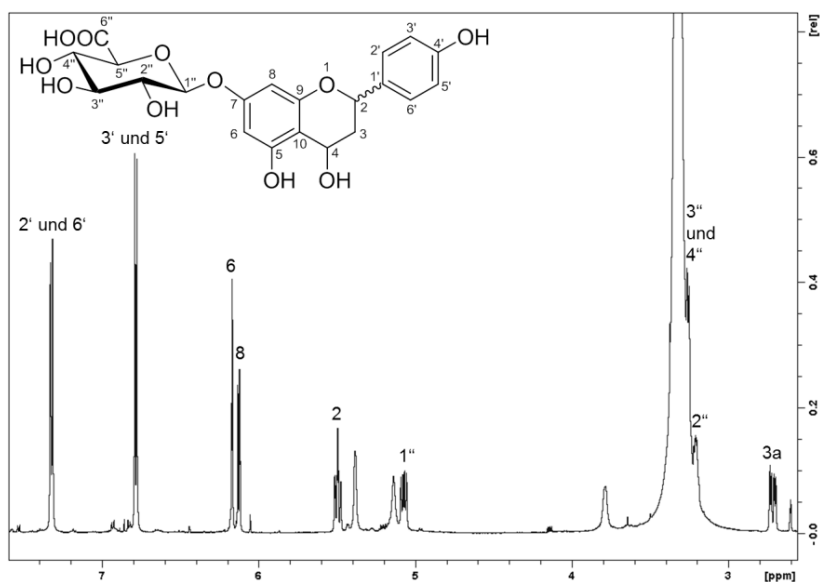
^1H NMR Spektrum und Signalzuweisung von Catechol-sulfat **12** (in Aceton- d_6 , 300 MHz, 298 K).



^1H	δ [ppm], Signalaufspaltung, (J [Hz])
3 und 6	6,80; dd (1,6; 8,0) 7,00; dd (1,6; 7,9)
4 und 5	6,94; dt (1,6; 7,7) 6,72; dt (1,6; 7,6)
2-OH	9,27; s

8.3.3 Naringenin-7-O- β -D-glucuronid

^1H und ^{13}C NMR Daten und Signalzuweisung von Naringenin-7-O- β -D-glucuronid **1b** (in DMSO- d_6 , 600/150 MHz, 298 K); n.d.: nicht detektiert.



	^1H	^{13}C
	δ [ppm], Signalaufspaltung, (J [Hz])	δ [ppm]
2	5,49; dd (12,9; 2,9)	78,7
3a	2,73; dd (3,0; 6,3)	42,0
3b	3,31; dd (n.d.)	42,0
4		197,3
5		162,9
6	6,17; dd (n.d.)	95,3
7		164,0
8	6,12; dd (7,4; 2,2)	96,4
9		162,8
10		103,3
1'		128,6
2' 6'	7,32; d (8,4)	128,5
3' 5'	6,78; d (8,5)	115,2
4'		157,8
1''	5,07; dd (14,1; 7,5)	99,1
2''	3,21; m	72,7
3''	3,26; m	75,8
4''	3,26; m	71,4
5''	3,79; m	74,6
6''	n.d.	n.d.

9 ERKLÄRUNG ZUR EIGENSTÄNDIGKEIT

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche gekennzeichnet.

Regensburg, den

Unterschrift