

**IN VITRO METABOLISIERUNG UND RESORPTION VON
FLAVONOID C-GLYKOSIDEN UND BIFLAVONOIDEN**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Martina Tremmel

aus Altheim

2021

**IN VITRO METABOLISIERUNG UND RESORPTION VON
FLAVONOID C-GLYKOSIDEN UND BIFLAVONOIDEN**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Martina Tremmel

aus Altheim

2021

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum Oktober 2017 bis April 2021 unter der Anleitung von Prof. Dr. Jörg Heilmann am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Regensburg angefertigt.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

Datum der mündlichen Prüfung: 17.11.2021

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. Pierre Koch	(Vorsitzender)
	Prof. Dr. Jörg Heilmann	(Erstgutachter)
	Prof. Dr. Frank-Michael Matysik	(Zweitgutachter)
	Prof. Dr. Joachim Wegener	(Drittprüfer)

Danksagung

Mein Dank richtet sich zuerst an Prof. Dr. Jörg Heilmann für die Vergabe dieses großartigen Promotionsthemas. Vielen Dank für dein Vertrauen in mich bei jeder neuen Idee, für die Freiheit bei der Durchführung und für vier schöne und lehrreiche Jahre.

Darüber hinaus danke ich PD Dr. Guido Jürgenliemk. Lieber Guido, danke, dass deine Tür immer für Fragen offenstand, für viele fachliche Gespräche und dafür, dass du deine kulinarischen Insider-Tipps selbstlos geteilt hast.

Ein besonderer Dank geht an die massenspektrometrische Abteilung der Universität Regensburg, insbesondere an Josef Kiermaier für unzählige fachliche Gespräche und Diskussionen, für die Messung all meiner MS-Spektren und für die freundliche und humorvolle Beherbergung während vieler Stunden des Auswertens.

Vielen Dank an Dr. Christian Paetz und die Abteilung für Biosynthese/NMR vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena für die Messung und Aufklärung meiner isolierten Metaboliten.

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

Weiterhin gilt mein Dank PD Dr. Birgit Kraus für die Betreuung während der Masterarbeit und der Bestärkung zur Promotion. Liebe Birgit, danke, dass du schon damals die Liebe für die Zellkultur in mir geweckt hast und mich bereit für PB1 gemacht hast.

Ein großes Dankeschön geht an Gabriele Brunner, die all ihr Zellkultur Knowhow an mich weitergegeben hat. Liebe Gabi, danke für die vielen interessanten Stunden in der Zellkultur, für dein offenes Ohr und dass du immer den Überblick über alles behalten hast.

Lieben Dank an Anne Grashuber für die große Hilfe beim PB1 Praktikum und für die alljährliche Bereitstellung von Eis und Krapfen als Nervennahrung.

Frau Ohli sei herzlich gedankt für die Hilfe bei Verwaltungsfragen, fürs Teilen ihrer astrologischen Kenntnisse und für ihre aufgeweckte Art.

Vielen Dank an meine Forschungspraktikanten Barbara Gaim, Deniz Buchholz und Antonia Schuster für die tatkräftige Unterstützung bei meinen Versuchen. Außerdem sei den ehemaligen PJlern Martin Hartmann, Carola Aumer, Lucia Kastner, Alexander Ernst und Leonie Kayser für ihre Mitarbeit am Lehrstuhl gedankt.

Bei allen ehemaligen Kollegen und Kolleginnen der ersten Generation möchte ich mich herzlich bedanken:

Dr. Monika Schwindl, Dr. Eva Wolfgarten, Dr. Ilya Volkov, Dr. Filip Sibul, Dr. Sebastian Schmidt, Sina Malenke und Dr. Stefan Wiesneth, danke für die nette und unkomplizierte Aufnahme am Lehrstuhl.

Dr. Marcel Flemming sei für die Betreuung der Masterarbeit und für die Weitergabe allen Wissens über ‚Furcht und Samen‘ gedankt.

Danke an Dr. Christian Zeh fürs Beibringen des Caco-Versuchs. Lieber Gunthi, danke für viele lustige Gespräche bei dem ein oder anderen Bierchen und dafür, dass wir im Crossfit die Team-WODs rocken.

Dr. Julianna Max und Dr. Katharina Schiller sei für die schönen Mädels Abende gedankt. Liebe Kathonki, danke für deine mauzige und weihnachtliche Verbundenheit und die schöne Zeit im PB1 Praktikum. Liebe Julinka, danke, dass du immer noch die Vorliebe für Trash-TV und Gossip jeder Art mit mir teilst und für die unvergesslichen Gesangseinlagen in der Zellkultur.

Ein großes Dankeschön geht an meine jetzigen KollegInnen, die mich während meiner Promotion begleitet haben:

Lieber Peter Bürkel, lieber Bernhard Kram, danke für die tolle gemeinsame Zeit im Labor und dafür, dass wir denselben Humor teilen und immer einen Riesen-Spaß zusammen hatten. Pöpl, danke fürs Teilen der Teamsport-Mentalität, für dein überdurchschnittliches Namensgedächtnis in PB1 und für deine unterhaltsamen Wochenend-Stories. Börnsta Cream, danke für all deine Post-it Kunstwerke, für die vielen Unterhaltungen via Google-Translator und für deine hilfsbereite Art in allen Lebenslagen.

Katrin Kuck und Thomas Gruber, danke für die wunderschönen gemeinsamen Jahre am Lehrstuhl, für die Gründung des A-Teams und für die vielen feuchtfröhlichen Abende bei Gruberts. Liebe Käs, danke für dein offenes Ohr bei unzähligen fachlichen und privaten Problemen, fürs Korrekturlesen meiner Arbeit und dafür, dass du nicht nur mein Schreibraum-Buddy, sondern auch eine Freundin geworden bist. O-love, Grubi oder auch Gschafftigruber, danke für deine fachliche Kompetenz (v.a. als Parka und Postbote), deine selbstlose Art und deine täglichen Besuche im Schreibraum.

Danke Mirjam Abu Salah (oder auch Abul, Salat, Abu Sarah, Abu Salsa,...), Verbündete im Kampf gegen die Caco-Zellen. Liebe Miri, danke für deine Seelsorge, wenn mal was nicht so gut lief, für unzählige schöne Abende zur Erweiterung unseres Gin-Horizonts und dafür, dass du die beste Partnerin im Erste-Hilfe-Kurs warst. Ohne dich wäre die Zeit am Lehrstuhl nur halb so schön gewesen.

Lieber Dr. Sebastian Schwind(e)l, danke für die lustige Zeit im PB1 Praktikum (,i kann nimma, kannst du no?'). Lieber Sebi, danke, dass du mir seit vielen Jahren mit Rat und Tat zur Seite stehst, für meinen neuen Spitznamen ‚Trabämbel‘ und dafür, dass wir im Kampf gegen Cuticularr, Phlöms und monokotyle Würfel immer ein gutes Team waren.

Außerdem ein Dankeschön an meine neusten Kolleginnen Julia Brunner und Anna Unterholzner für den frischen Wind und das nette Arbeitsklima.

Ein großes Dankeschön an Sabrina Zölch, die mehr als geeignet ist mein Projekt weiterzuführen. Liebe Zabrina, ich hoffe du hast genauso viel Spaß an dem Thema, wie ich es hatte.

Meinen lieben Freunden und meinen Handball-Mädels danke ich für langjährige Freundschaft und die willkommene Ablenkung außerhalb des Labors. Ohne es zu wissen habt ihr mir immer neue Motivation gegeben und meinen Blick zurück aufs Wesentliche gerichtet.

Ein großes Dankeschön richtet sich an meine Mutter für ihre Unterstützung während meiner kompletten Ausbildung, ohne die ich nicht so weit gekommen wäre.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Markus bedanken, der immer für mich da war und an mich geglaubt hat. Magge, danke für deine ruhige, geduldige Art, deine grenzenlose Liebe und für jeden einzelnen schönen Moment.

Publikationsliste

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Tremmel, M.; Kiermaier, J.; Heilmann, J. In Vitro Metabolism of Six C-Glycosidic Flavonoids from *Passiflora incarnata* L. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 6566.

Tremmel, M.; Paetz, C.; Heilmann, J. In Vitro Liver Metabolism of Six Flavonoid C-Glycosides. *Molecules* 2021, 26, 6632.

Posterpräsentationen:

12th World Congress on Polyphenols Applications, 16.-18. September 2018, Bonn, Deutschland

Tremmel M., Juergenliemk G., Heilmann J. Permeability of the C-glycoside schaftoside through a Caco-2 cell monolayer.

5. Young Researcher Meeting, 22.-23. März 2019, Münster, Deutschland

Tremmel M., Juergenliemk G., Heilmann J. Metabolisierung von Orientin, Isoorientin, Schaftosid und Isoschaftosid durch humane Lebermikrosomen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Biosynthese von Flavonoiden.....	1
1.1.1	Flavonoid C-Glykoside	2
1.1.2	Biflavonoide	4
1.2	Überblick über Resorption und Metabolisierung im Körper	7
1.3	Absorption und Metabolisierung von Flavonoiden	9
1.3.1	Resorption der Flavonoide	10
1.3.2	Metabolisierung in Dünndarmepithel und Leber	11
1.3.3	Bakterielle Zersetzung im Dickdarm	13
1.4	Sampling und Analytik bei Metabolom Studien	14
1.4.1	Probenentnahme, Probenvorbereitung und Lagerung	15
1.4.2	Massenspektrometrische Analytik zur Metabolit Identifizierung	18
1.5	Zielsetzung	21
2	MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1	Zellbiologische Testung	22
2.1.1	Verwendete Zelllinien	22
2.1.2	Allgemeine Zellbiologische Methoden	23
2.1.2.1	Kryokonservierung und In-Kulturnahme der Zellen.....	23
2.1.2.2	Kultivierung der Zellen.....	23
2.1.2.3	Subkultivierung der Zellen (Passagieren)	23
2.1.2.4	Bestimmung der Zellzahl.....	24
2.1.2.5	Herstellung der Untersuchungslösungen.....	24
2.1.3	MTT-Assay.....	24
2.1.3.1	Grundlage	24
2.1.3.2	Etablierter MTT-Assay.....	26
2.1.3.3	Modifizierter MTT-Assay	26
2.1.4	Caco-2-Resorptionsversuch und Inhibition von Effluxtransportern.....	27
2.1.4.1	Kultivierung der Zellen auf Transwell®-Einsätzen	28
2.1.4.2	Ermittlung des transepithelialen elektrischen Widerstandes	28

2.1.4.3	Durchführung der Resorptionsversuche (A→B).....	28
2.1.4.4	Durchführung der Resorptionsversuche (B→A).....	29
2.1.4.5	Transportversuche mit Inhibition von Effluxtransportern	30
2.1.4.6	HPLC-DAD Analytik	30
2.1.4.7	Fluorimetrie	32
2.1.4.8	Berechnungen.....	32
2.1.4.8.1	Scheinbarer Permeabilitätskoeffizient	32
2.1.4.8.2	Prozentualer Transport	33
2.1.5	Caco-2-Metabolisierungsversuch	34
2.1.5.1	Kultivierung der Zellen.....	34
2.1.5.2	Ermittlung des transepithelialen elektrischen Widerstandes	35
2.1.5.3	Durchführung der Metabolisierungsversuche	35
2.1.5.4	Zelllyse.....	36
2.1.5.5	Sulfatase- und β -Glucuronidasespaltung.....	36
2.1.5.6	Stabilitätsmessungen im Testpuffer.....	36
2.1.5.7	UHPLC-DAD-MS Analytik	39
2.1.5.7.1	Probenvorbereitung.....	39
2.1.5.7.2	UHPLC-DAD-MS Methode.....	39
2.1.5.7.3	UHPLC-DAD-MS/MS Methode	41
2.1.5.7.4	Datenverarbeitung	42
2.1.6	Statistische Auswertung	43
2.2	<i>In vitro</i> Lebermetabolisierung	44
2.2.1	Humane Lebermikrosomen	44
2.2.1.1	Herstellung der Versuchslösungen.....	44
2.2.1.2	Inkubationssysteme	45
2.2.2	Humane Leber S9 Fraktion	46
2.2.2.1	Herstellung der Versuchslösungen.....	47
2.2.2.2	Inkubationssysteme	47
2.2.3	HPLC-DAD Analytik	49
2.2.4	UHPLC-DAD-MS Analytik	50
2.2.4.1	UHPLC-DAD-MS Methode.....	50
2.2.4.2	UHPLC-DAD-MS/MS Methode.....	53
2.3	Isolierung und Identifizierung von mikrosomalen Metaboliten.....	53
2.3.1	Hochskalierung und Optimierung des mikrosomalen Systems	54

2.3.2	Festphasenextraktion	55
2.3.3	Isolierung mittels analytischer HPLC-DAD	55
2.3.4	NMR-Spektroskopie	56
2.4	Vergleich von Hauptmetaboliten.....	57
2.4.1	UHPLC-DAD-MS Analytik	57
2.4.1.1	UHPLC-DAD-MS Methode	57
2.5	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Kulturmedien	59
2.5.1	Chemikalien und Referenzsubstanzen	59
2.5.2	Geräte und Software	61
2.5.3	Verbrauchsmaterialien	64
2.5.4	Kulturmedien und sonstige Lösungen	65
3	AUSWERTUNG UND DISKUSSION	68
3.1	Absorption und Metabolisierung von Flavonoid C-Glykosiden.....	68
3.1.1	Zellbiologische Testung am Caco-2-Monolayer Modell	68
3.1.1.1	Vorversuche	68
3.1.1.1.1	Zellviabilität von Caco-2-Zellen	68
3.1.1.1.2	Stabilitätsversuche	70
3.1.1.2	Caco-2-Monolayer Modell	71
3.1.1.3	Bestimmung der Resorption und Rolle von Effluxtransportern.....	73
3.1.1.3.1	Kontrollsubstanzen	74
3.1.1.3.2	Kalibriergeraden.....	74
3.1.1.3.3	Bestimmung der Permeabilitätskoeffizienten.....	75
3.1.1.3.4	Auswirkung der Effluxtransporter auf die Absorption	78
3.1.1.4	Metabolisierung im Dünndarmepithel	80
3.1.1.4.1	Metabolit Identifizierung via UHPLC-DAD-MS.....	81
3.1.1.4.2	MS/MS-Fragmentierung der Phase II Metaboliten.....	94
3.1.1.4.3	Aglyka Verifizierung durch Sulfatase- und Glucuronidasespaltung.....	98
3.1.1.5	Zusammenfassung und Diskussion der zellbiologischen Ergebnisse	99
3.1.2	<i>In vitro</i> Metabolisierung in subzellulären Leberfraktionen	106
3.1.2.1	Vorversuche	106
3.1.2.1.1	Zellviabilität von HepG2 Zellen.....	106
3.1.2.2	Leber Metabolisierungssysteme und ihre Anwendung.....	108
3.1.2.3	Metabolisierung durch humane Lebermikrosomen	110

3.1.2.3.1	7-Ethoxycumarin als Kontrollsubstanz	111
3.1.2.3.2	Identifizierung von mikrosomalen Phase I und II Metaboliten	113
3.1.2.3.3	MS/MS Fragmentierung	118
3.1.2.3.4	Strukturaufklärung von IO und zwei mikrosomalen Hauptmetaboliten	122
3.1.2.4	Metabolisierung durch humane Leber S9 Fraktion	128
3.1.2.4.1	7-Ethoxycumarin als Kontrollsubstanz	128
3.1.2.4.2	Identifizierung von Phase I und II Metaboliten in der S9 Fraktion	130
3.1.2.4.3	MS/MS Fragmentierung	139
3.1.2.5	Zusammenfassung und Diskussion	144
3.1.3	Vergleich der Hauptmetaboliten entstanden in Darmepithel und Leber	147
3.1.3.1	Vergleich der LC-MS Retentionszeiten und HPLC-Chromatogramme	147
3.1.3.2	UV-Maxima	152
3.1.3.3	Zusammenfassung und Diskussion	154
3.1.4	Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext und Ausblick	157
3.2	Metabolisierung von Biflavonoiden	163
3.2.1	Vorversuche	163
3.2.1.1	Zellviabilität von Caco-2-Zellen	163
3.2.1.2	Stabilitätsversuche	165
3.2.2	Metabolisierung im Dünndarmepithel durch das Caco-2 Monolayer Modell...	165
3.2.2.1	Metabolit Identifizierung via UHPLC-DAD-MS	167
3.2.2.2	MS/MS Fragmentierung der Phase II Metaboliten	172
3.2.3	Zusammenfassung und Diskussion	174
4	ZUSAMMENFASSUNG	179
5	SUMMARY	181
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	183
7	LITERATUR.....	187
8	ANHANG	211
9	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	233

1 EINLEITUNG

1.1 Biosynthese von Flavonoiden

Flavonoide kommen fast ubiquitär in höheren Pflanzen vor und gehören zu den am besten untersuchten sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Das Grundgerüst der Flavonoide besteht aus drei Ringen (C6-C3-C6) und kann durch vielfältige strukturelle Modifikationen diversifiziert werden. Aus diesem Grund werden Flavonoide in strukturelle Unterklassen unterteilt, welche sich durch die Substitution und Oxidation am C-Ring unterscheiden. Neben den Chalkonen, Flavanonen, Flavanonolen, Flavonen und Flavonolen können im weiteren Sinne auch Isoflavone, Anthocyane und Flavane zu den Flavonoiden gezählt werden. In den verschiedenen Unterklassen wird jeweils eine große Vielfalt an Verbindungen durch die unterschiedlichen Substitutionsmuster am A- bzw. B-Ring gefunden.¹⁻³

In Pflanzen wird das Flavonoidgrundgerüst durch die Kondensation von zwei Vorprodukten aus zwei verschiedenen biosynthetischen Stoffwechselwegen synthetisiert (**Abbildung 1**). Zum einen wird aus dem im Shikimat-Weg produzierten Phenylalanin in drei enzymkatalysierten Schritten Cumaroyl-CoA gebildet.⁴ Zum anderen werden drei Einheiten Malonyl-CoA benötigt, die durch eine ATP-abhängige Carboxylierung von Acetyl-CoA entstanden sind.⁵ Diese aktivierten Moleküle reagieren anschließend unter Beteiligung der Chalkonsynthase zu einem Chalkon, das über die Chalkonisomerase in ein Flavanon umgewandelt werden kann. Durch Dehydrierung entstehen über die Flavonsynthase I/II aus den Flavanonen die Flavone. Ausgehend von den Flavanonen können auch alle weiteren Unterklassen der Flavonoide enzymkatalysiert gebildet werden.^{1,2,6}

Flavonoide können als Aglyka oder bevorzugt als O- oder C-Glykoside (= Glykosyle) vorkommen. Daneben treten auch Biflavonoide auf. Zusätzlich kann das Grundgerüst durch Methylierung, Prenylierung, Acetylierung oder Hydroxylierung weiter modifiziert werden, um nur einige Möglichkeiten der Strukturweiterung zu nennen.² Aufgrund der Relevanz von C-glykosidierten Flavonen (= Flavonglykosyle) und Biflavonoiden für die vorliegende Arbeit, wird im Folgenden der Fokus auf die Biosynthese dieser beiden Klassen gelegt.

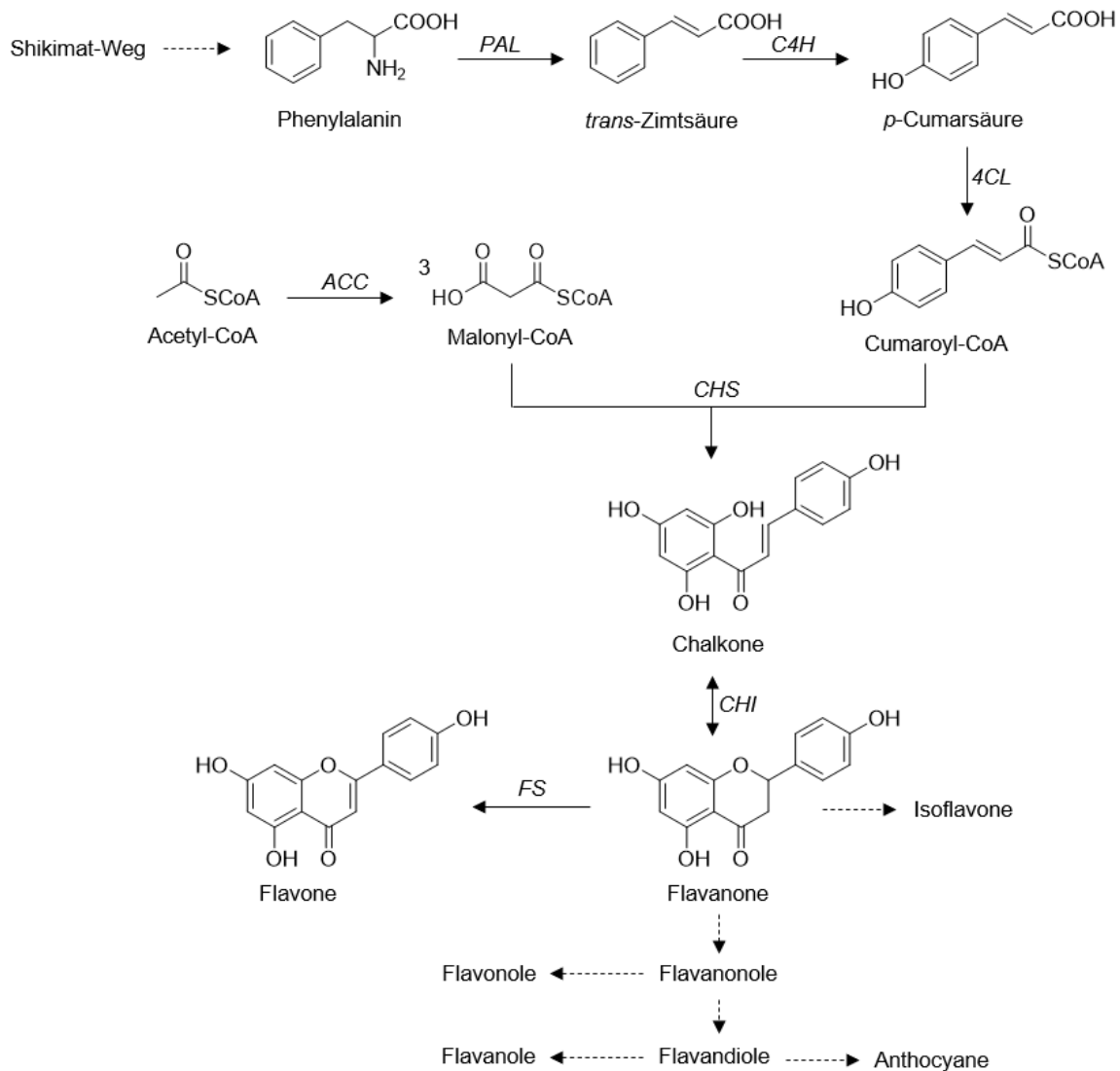


Abbildung 1: Übersicht zur Biosynthese der einzelnen Flavonoidunterklassen ausgehend von Malonyl-CoA und Phenylalanin. Abkürzung der aktiven Enzyme: **PAL**: Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, **C4H**: Zimtsäure-4-Hydroxylase, **4CL**: Hydroxyzimtsäure-CoA-Ligase, **CHS**: Chalkonsynthase, **CHI**: Chalkon-Flavanon-Isomerase, **FS**: Flavonsynthase, **ACC**: Acetyl-CoA-Carboxylase.^{1,2}

1.1.1 Flavonoid C-Glykoside

C-glykosidierte Flavone sind in der Natur weit verbreitet und finden sich in natürlichen Rohstoffen wie Reis, Weizen und Mais⁷⁻⁹. Sie finden sich aber auch in der Passionsblume, im Enzian oder im Bambus¹⁰⁻¹². Dabei werden hauptsächlich Mono-Glucoside wie Orientin, Isoorientin, Vitexin und Isovitexin, aber auch Di-Glucoside wie Schaftosid und Isoschaftosid gefunden, die sich biosynthetisch alle vom Naringenin ableiten lassen⁸.

Die Biosynthese von Flavon C-Glykosiden wurde erstmals in Getreide untersucht⁸. Dabei wurde etwas überraschend herausgefunden, dass ein 2-Hydroxyflavon Zwischenprodukt als Substrat der C-Glycosyltransferasen agieren kann (**Abbildung 2**)^{8,13,14}. Das 2-Hydroxyflavon

wird durch die Flavon-2-Hydroxylase, welche zur CYP93 Enzymfamilie gehört, aus Naringenin gebildet und liegt in einem Gleichgewicht aus offener Chalkon-Diketon- und geschlossener Flavanon-Form vor¹⁵. Das offene Chalkon-Diketon kann nun mithilfe von UDP-Glucose und einer C-Glycosyltransferase glykosyliert werden. Die Hydroxy-Gruppe an Position 2 wird anschließend nach erneutem Ringschluss durch eine Dehydratase abgespalten, was in einer Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 und somit in den bekannten Mono-Glucosiden von Flavonen resultiert^{8,14,15}.

Mittlerweile konnte noch ein zweiter Biosyntheseweg für Flavon C-Glykoside identifiziert werden, bei dem Flavone als direkte Substrate der C-Glycosyltransferasen detektiert werden konnten (**Abbildung 2**). Sasaki et al. konnten die C-Glycosyltransferase GtUF6CGT1 aus *Gentiana triflora* isolieren, welche die direkte C-Glykosylierung von Flavonen, wie Apigenin oder Luteolin, katalysiert¹⁶. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die beiden Biosynthesewege in *Saccharomyces cerevisiae* rekonstruiert und auf ihre Spezifität getestet¹⁷. Dabei konnte herausgefunden werden, dass bei der indirekten Route über das 2-Hydroxyflavon das 6C-Glucosid zu etwa gleichen Teilen wie das 8C-Glucosid gebildet wird, während bei der direkten Glykosylierung mit GtUF6CGT1 fast ausschließlich das 6C-Glucosid gefunden wurde. Zum einen ist diese Spezifität der erste Schritt zur industriellen Produktion von Flavon C-Glykosiden durch Fermentation mit Hefe, zum anderen zeigen die Ergebnisse, dass aufgrund der gefundenen Mono-Glycosyle in Pflanzen die indirekte Biosynthese Route überwiegt.¹⁷

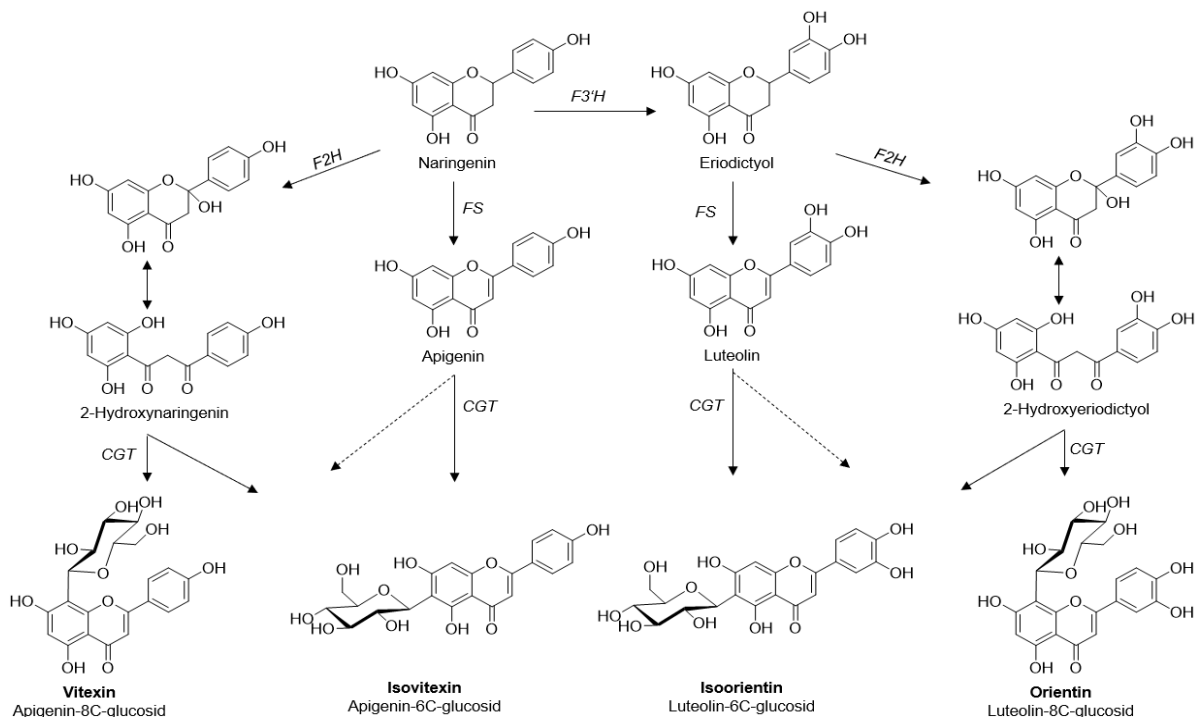


Abbildung 2: Postulierte Biosynthese von Flavon C-Glykosiden ausgehend von Naringenin. Abkürzung der aktiven Enzyme: **F3'H:** Flavon-3'-Hydroxylase, **FS:** Flavonsynthase, **F2'H:** Flavon-2-Hydroxylase, **CGT:** C-Glycosyltransferase.¹⁷

Für die Di-glykosylierten Flavone ist im Vergleich zu den Mono-Glykosylen bisher nur ein Biosyntheseweg ausgehend von Naringenin beschrieben (**Abbildung 3**). Dabei wird auch hier zuerst das 2-Hydroxyflavon durch die Flavon-2-Hydroxylase gebildet. Dieses reagiert weiter, katalysiert durch die C-Glycosyltransferase, mithilfe von UDP-Glucose zum jeweiligen 6C- oder 8C-Glucosid (z.B. 2-Hydroxyvitexin und 2-Hydroxyisovitexin). Nachfolgende Glykosylierung der Mono-Glykosyle mithilfe von UDP-Galaktose, UDP-Arabinose oder UDP-Glucose führt dann zu den jeweiligen Di-C-Glykosiden.^{18–20}

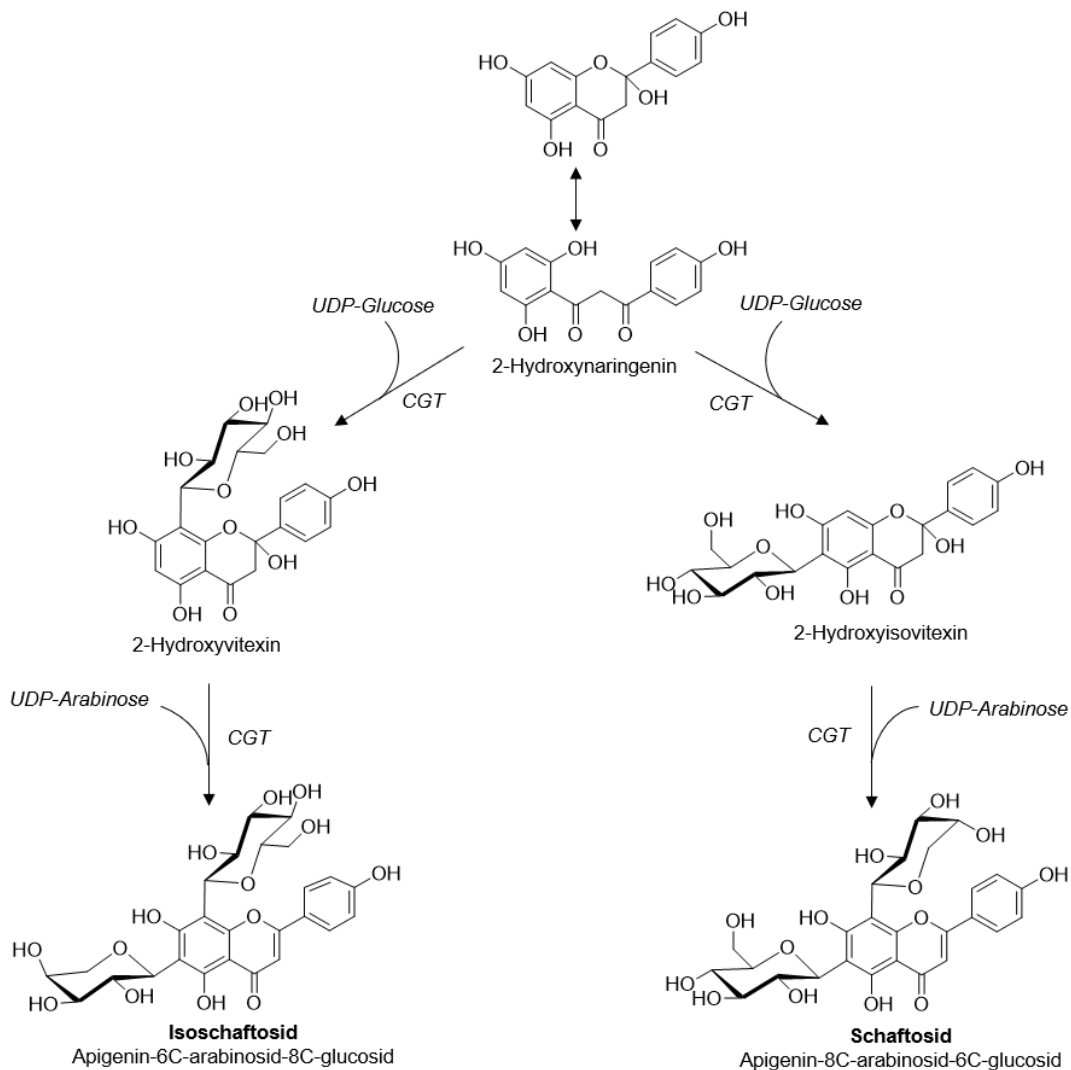


Abbildung 3: Postulierte Biosynthese von Flavon-di-C-glykosiden ausgehend vom Zwischenprodukt 2-Hydroxynaringenin. Abkürzung der aktiven Enzyme: **CGT**: C-Glycosyltransferase.²⁰

1.1.2 Biflavonoide

Biflavonoide stellen eine Unterklasse der Flavonoide dar, die aus Flavonoid-Dimeren bestehen und durch kovalente Bindung (C-C oder C-O-C) zweier Monomere entstehen. Sie zählen zu den sekundären Pflanzenmetaboliten und können aufgrund ihres eingeschränkten Vorkommens in Pflanzen als chemotaxonomische Marker einiger Gattungen dienen^{21–23}.

Biflavonoide werden beispielsweise im Ginkgo oder im Johanniskraut gefunden^{24–26}. In diesen Pflanzen ist mit den oligomeren Proanthocyanidinen (PAs) noch eine zweite Klasse von oligomeren Flavonoid-Abkömmlingen zu finden. Diese beiden Klassen unterscheiden sich dadurch, dass Biflavonoide immer eine Carbonyl-Funktion in Position 4 haben, während bei oligomeren PAs immer eine interflavonoide Bindung an Position 4 zum terminierenden Flavan-3-ol zu finden ist^{27–29}. Natürliche Kreuzprodukte dieser beiden Klassen, wie Flavan-3-ole, die an C-4 mit einem Flavanon gebunden sind, konnten eher selten detektiert werden. Larixinol, ein Kondensationsprodukt von Dihydrokämpferol und (-)-Epiafzelechin, ist als einer der ersten Vertreter dieser gemischten Flavanon-Flavan-3-ol Biflavonoide gefunden worden³⁰. Auch in Weidenrinde konnte schon 1988 ein gemischtes Biflavonoid aus einem Flavan-3-ol und einem Dihydroflavonol gefunden werden, das über den B-Ring verknüpft ist³¹.

Da es sich bei beiden Substanzunterklassen um oligomere Flavonoide handelt, die sogar in Mischformen vorliegen können, liegt die Vermutung nahe, dass die Oligomerisierung biosynthetisch einem ähnlichen Mechanismus folgt. Weder für Biflavonoide, noch für oligomere PAs konnte bisher eine vollständige Biosyntheseroute veröffentlicht werden. Viele Modelle zur Proanthocyanidin Biosynthese geben an, dass die elektrophile C-4 Position der Flavan-3,4-diole (Extensionseinheit) mit dem nucleophilen C-8 oder C-6 von Flavan-3-ol kondensiert^{32–34}. Dabei wird allerdings vernachlässigt, dass enzymatisch gebildete Flavan-3,4-diole stereospezifisch als 2,3-*trans* Formen gebildet werden, während in Pflanzen auch Extensionseinheiten in 2,3-*cis* zu finden sind³⁵. Zur Lösung dieses Problems wurden einige spekulative Mechanismen postuliert. Ein vorgeschlagener Biosyntheseweg besagt, dass 2R,3S,4S-Leucocyanidine zuerst in die 2R,3S-Chinonmethide umgewandelt werden, die dann als 2R,3S-Extensionseinheiten verwendet werden können (vgl. **Abbildung 4**). Unterdessen können sie über das Flavan-3-en-3-ol Zwischenprodukt in das 2R,3R-Chinonmethid umgewandelt werden, dass direkt als 2R,3R-Extensionseinheit kondensiert werden kann³⁶. Außerdem können diese *trans*- und *cis*-Chinonmethide in ihr korrespondierendes Carbokation konvertiert werden, welches direkt von Flavan-3-olen angegriffen werden kann und so Proanthocyanidine bildet³⁶.

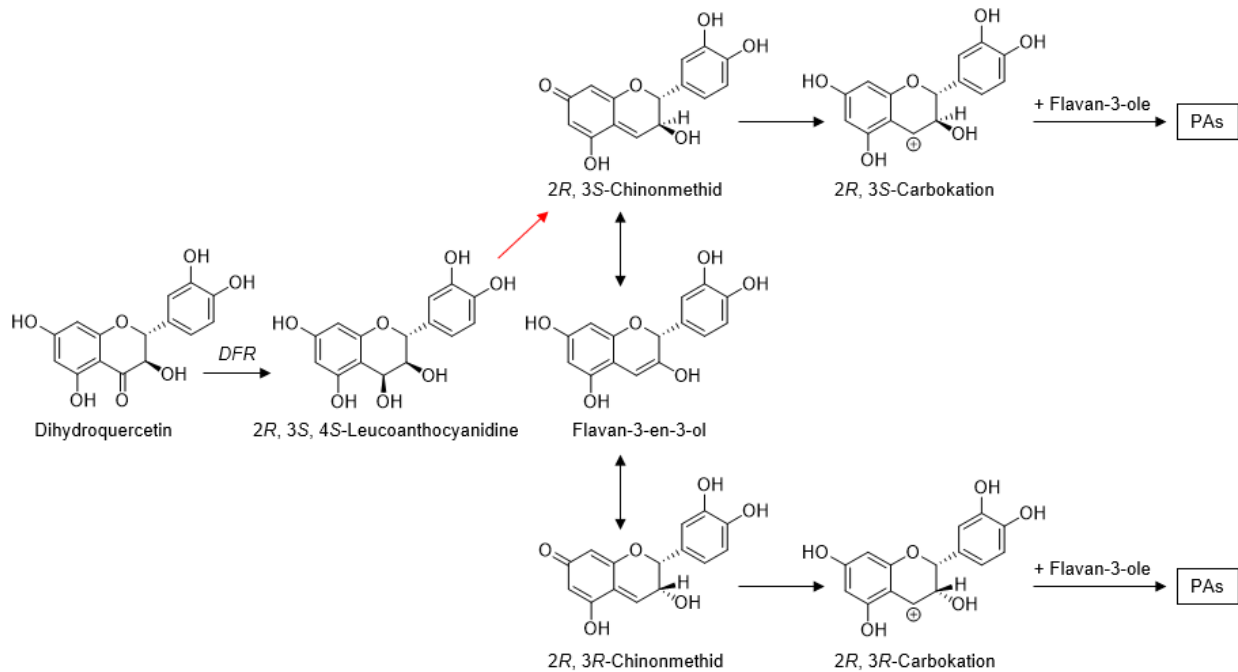


Abbildung 4: Postulierte Bildung von Chinonmethiden oder Carbokationen aus Flavan-3,4-diolen. **DFR:** Dihydroflavonol-4-Reduktase.³⁶

Ein anderer postulierter Biosyntheseweg besagt, dass Flavan-3-ole durch die Polyphenoloxidase (PPO) zu ihren korrespondierenden Chinonmethiden katalysiert werden. Diese können entweder über das Flavan-3-en-3-ol Intermediat oder durch gekoppelte nicht-enzymatische Oxidation in das Carbokation umgewandelt werden, dass dann zu oligomeren PAs reagieren kann³⁷. All diese biosynthetischen Routen beziehen sich allerdings auf eine 4,8- bzw. 4,6-Kopplung, die für Biflavonoide bisher nicht beobachtet worden sind. Biflavonoiden ist gemeinsam, dass sie eine Carbonyl-Einheit in Position 4 haben, die eine Kopplung an dieser Position verhindert. Ansonsten sind unzählige verschiedene Kopplungsvarianten für Biflavonoide beschrieben²⁹. Aufgrund dieser Variabilität liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen radikalischen Mechanismus handelt. Bisher ist lediglich beschrieben, dass Biflavonoide biosynthetisch durch oxidative Kopplung der Monomere entstehen³⁸. Weiterhin wurde herausgefunden, dass CYP158A2 die oxidative C-C-Kopplung von Flaviolin zu Biflaviolin katalysiert^{39–41}. Dies könnte auch bei Biflavonoiden für eine enzymkatalysierte oxidative Kopplung sprechen. Auch wenn der genaue Mechanismus noch nicht final erforscht werden konnte, scheint er sich von dem Biosyntheseweg der oligomeren PAs zu unterscheiden. Durch welchen Biosynthesemechanismus dann allerdings die gemischten Biflavonoide der beiden Unterklassen entstehen, ist eine interessante Frage, die bisher nicht beantwortet werden konnte.

1.2 Überblick über Resorption und Metabolisierung im Körper

Damit Phytopharmaka ihre Wirkung im Körper entfalten können, ist es wichtig, wie diese zugeführt werden. Arzneistoffe können auf unterschiedliche Weise verabreicht werden, wobei die orale Applikation am häufigsten ist. An diese schließt sich ein Resorptionsprozess an, der die Bioverfügbarkeit der Arzneistoffe wesentlich beeinflusst. Der Großteil der oral applizierten Arzneistoffe wird im Dünndarm resorbiert. Dieser kann in drei Abschnitte (Duodenum, Jejunum und Ileum) unterteilt werden und ist durch eine Darmschleimhaut (Mukosa) ausgekleidet, die sich aus Epithelzellen, Bindegewebe und einer Muskelschicht zusammensetzt. Zusammen mit der Submukosa bildet die Mukosa Kerckring-Falten, die die Darmoberfläche um den Faktor 3 vergrößert. Durch zusätzliche Bildung von Zotten (Villi) und Mikrovilli (Bürstensaum) kann die Oberfläche des Dünndarms auf etwa 200 m² vergrößert werden. Der Bürstensaum dient allerdings nicht nur der Oberflächenvergrößerung, sondern enthält auch eine spezialisierte Ausstattung mit Rezeptoren, Enzymen und Transportern. Als apikale Membran wird die funktionelle Außenseite, also die dem Darmlumen zugewandte Seite bezeichnet, während die basolaterale Membran, die dem Blut zugewandte Seite beschreibt.^{42,43}

Der Transport durch das Dünndarmepithel kann dabei auf verschiedenste Art erfolgen. Der Großteil der Arzneistoffe wird über passive Diffusion resorbiert. Bei der passiven Diffusion wird der Arzneistoff ohne Aufwendung von Energie entlang eines Konzentrationsgefälles durch die entsprechende Zellmembran aufgenommen und bewegt sich somit aus einer Lösung mit hoher Konzentration (Magen-Darm-Kanal) in einen Raum mit niedriger Stoffkonzentration (Blut). Um über die passive transzelluläre Route die Zellschicht zu überwinden, benötigen Moleküle bestimmte Voraussetzungen, die erstmal 1997 durch die ‚Rule of five‘ postuliert wurden. Moleküle sollen für die passive Permeabilität ein Molekulargewicht unter 500 g/mol, einen Log P-Wert (Octanol-Wasser-Koeffizient) unter 5, bis zu fünf H-Brücken-Donatoren und bis zu 10 H-Brücken-Akzeptoren haben, wobei höchstens eine dieser Regeln verletzt werden darf⁴⁴. Diese Regeln wurden im Laufe der Zeit durch den Ghose Filter oder Veber’s Rule weiter verändert und angepasst^{45,46}. Eine weitere Möglichkeit stellt der parazelluläre Transport dar. Dabei werden Moleküle über Schlussleistenkomplexe und den Interzellularspalt ins Blut resorbiert. Es werden allerdings nur sehr kleine, gelöste Moleküle und Wasser bis zu einem gewissen Grad auf diese Weise aufgenommen. Zusätzlich können Substanzen auch durch Transporter, Carrier oder Kanäle aufgenommen werden. Beim passiven Transport durch Carrier wird der Arzneistoff mit Hilfe eines Trägermoleküls durch Bildung eines Komplexes leichter durch die Membran geschleust, während durch Ionenkanäle Ionen einer bestimmten Spezifität passiv durch Membranen transportiert werden können. Beim aktiven transzellulären Transport werden Moleküle unter Verbrauch von Energie (meist ATP) resorbiert. Im Gegensatz zum Transport durch Kanäle oder Carrier, kann der aktive Transport Substanzen auch entgegen ihres Konzentrationsgefälles und somit aus der Zelle hinaustransportieren

(Efflux), wodurch die Resorption herabgesetzt wird. Die prominentesten am Efflux von Arzneistoffen beteiligten Transporter sind ABC-Transporter wie P-GP (P-Glycoprotein), MRP (Multidrug-Resistance-associated Protein) und BCRP (Breast Cancer Resistance Protein), die alle u.a. auf der apikalen Membran von Enterozyten im Dünndarm und Colon exprimiert werden.^{43,47,48}

Nach Aufnahme in die Zellen der Darmschleimhaut kann dort bereits eine metabolische Umwandlung der Arzneistoffe erfolgen (intestinaler First-Pass-Effekt). Enterozyten weisen nahezu alle Enzymsysteme auf, die auch in der Leber zu finden sind. Dazu gehören die Cytochrom P450 (CYP) Isoenzyme, die Phase I Reaktionen (Funktionalisierungsreaktionen) katalysieren, aber auch Catechol-O-Methyltransferasen (COMT), Glutathion-S-Transferasen (GST), Glucuronosyltransferasen (UGT) und Sulfotransferasen (SULT), die Phase II Reaktionen (Konjugationsreaktionen) katalysieren. Nach der intestinalen Resorption und Metabolisierung werden die Substanzen entweder direkt in den Darm zurück oder durch das Blut über die Leber in die systemische Zirkulation transportiert. Die Leber stellt den Hauptort der Metabolisierung dar, wo ein Teil der resorbierten Substanzen durch den hepatischen First-Pass-Effekt bereits beim ersten Kontakt metabolisiert und eliminiert werden können. Das bedeutet, dass nach oraler Gabe resorbierte Arzneistoffe zuerst Enterozyten und Leber durchqueren müssen, um ihre Zielstruktur im Körper zu erreichen (**Abbildung 5**).^{42,43}

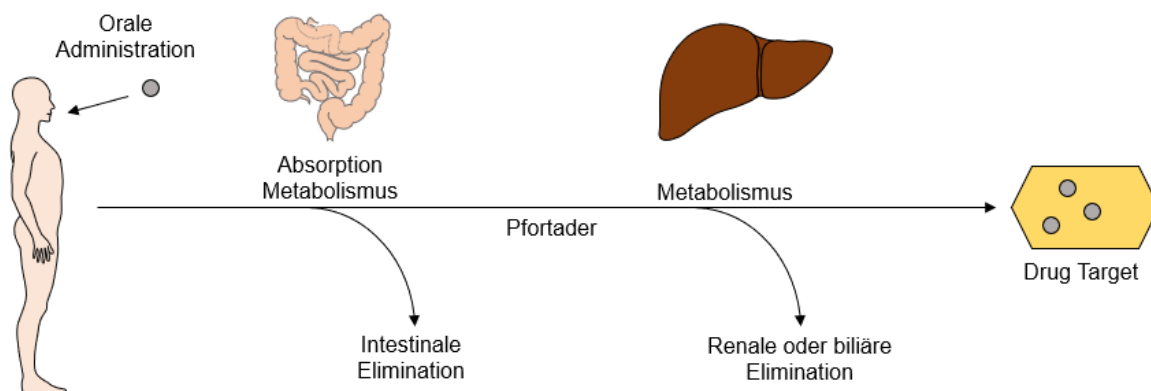


Abbildung 5: Schematische Übersicht über die Resorption und Metabolisierung im Körper nach oraler Applikation.

Nach Resorption und Metabolisierung können die Substanzen renal, biliär oder intestinal ausgeschieden werden. Die renale Elimination ist für Arzneistoffe und deren Metaboliten der wichtigste Ausscheideweg. Die so ausgeschiedenen Stoffe können dann im Urin identifiziert werden. Die Ausscheidung über die Fäzes kann in die biliäre und intestinale Ausscheidung unterteilt werden. Bei der biliären Elimination werden Arzneistoffe unverändert oder metabolisiert über die Galle in den Dünndarm abgegeben und von da aus mit den Fäzes

ausgeschieden. Werden die in den Darm abgegebenen Stoffe erneut resorbiert, spricht man vom enterohepatischen Kreislauf. Bei der intestinalen Ausscheidung werden Stoffe direkt wieder durch die Darmschleimhaut, beispielsweise durch Transporter, in den Darm ausgeschieden. Die ausgeschiedenen Stoffe können dann weiter durch die Darm Mikroflora in noch kleinere Moleküle zerlegt und dann mit den Fäzes ausgeschieden werden.^{42,43}

1.3 Absorption und Metabolisierung von Flavonoiden

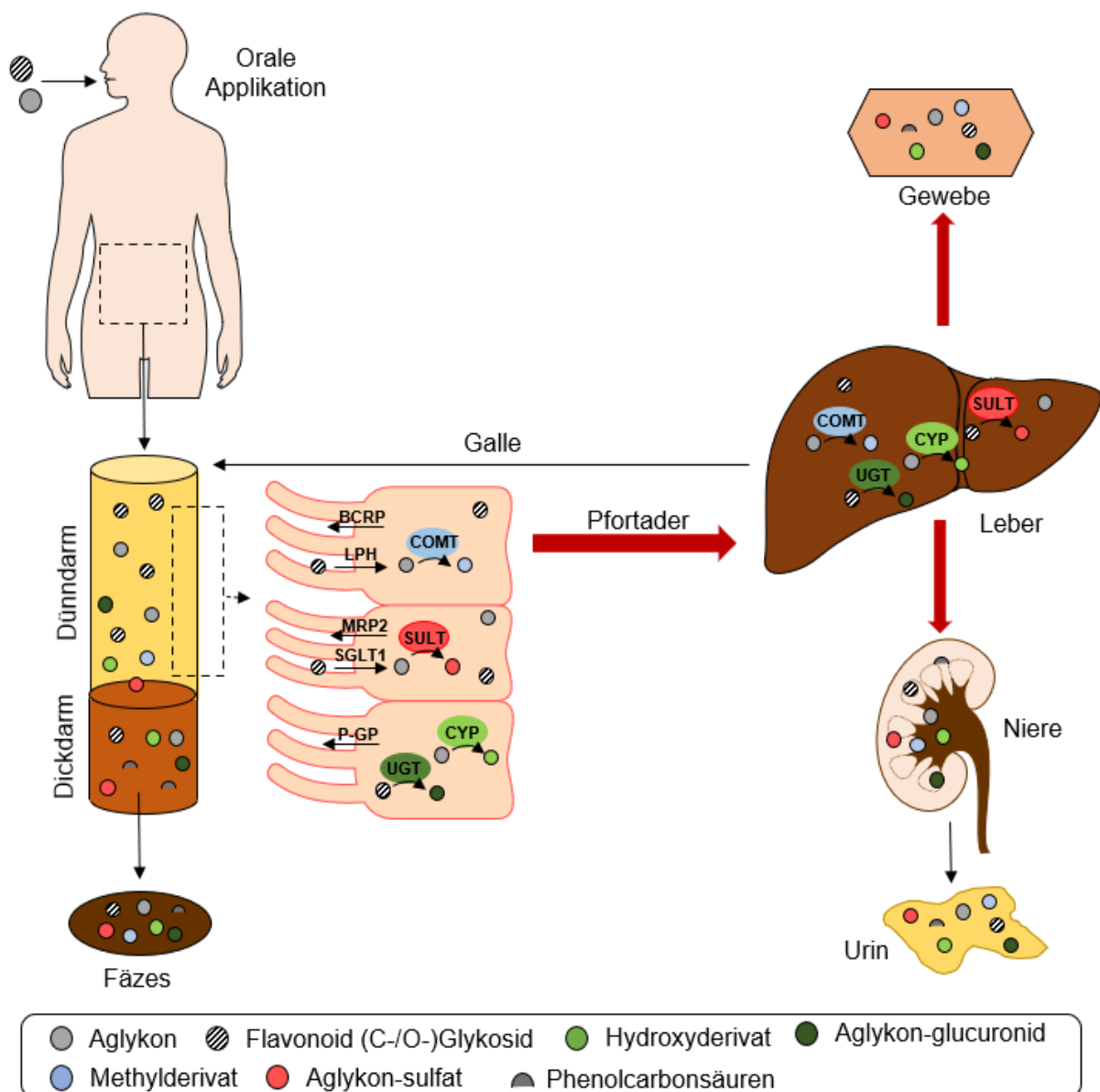


Abbildung 6: Schematische Übersicht der Resorption und Metabolisierung von Flavonoiden nach oraler Applikation. **LPH:** Lactase-Phlorizin Hydrolase, **SGLT1:** Na⁺/Glucose-abhängiger Transporter, **COMT:** Catechol-O-Methyltransferase, **UGT:** UDP-Glucuronosyltransferase, **SULT:** Sulfotransferase, **CYP:** Cytochrom P450 Isoenzym.⁴⁹

Die bereits besprochenen Resorptions- und Metabolisierungsprozesse spielen auch für Flavonoide eine wichtige Rolle, wobei Aglyka, O-Glykoside und C-Glykoside unterschiedlich verstoffwechselt werden. Eine Übersicht der bei Flavonoiden ablaufenden Prozesse im Körper ist in **Abbildung 6** dargestellt. In den nachfolgenden Kapiteln sollen die einzelnen Schritte genauer erläutert werden.

1.3.1 Resorption der Flavonoide

Die Resorption von Flavonoiden hängt stark von der Form ab, in der diese vorliegen. Während Aglyka lipophil genug sind, um im Dünndarm über passive Diffusion in die Blutbahn zu gelangen, gehören Flavonoidglykoside zu den Substanzen, die zwar eine hohe Löslichkeit, jedoch eine geringe Permeabilität besitzen⁵⁰. In Nahrungsmitteln liegen die meisten Flavonoide als O-Glykoside vor, bei denen der Zuckersubstituent über eine O-glykosidische Bindung mit dem Aglykon verknüpft ist. Allerdings stellen die Flavonoid C-Glykoside eine andere wichtige Unterklasse dar, bei denen Zucker und Aglykon über eine C-C-Bindung verknüpft sind.

Sowohl Aglyka als auch Glykoside scheinen größtenteils resistent gegen die saure Hydrolyse im Magen zu sein und kommen deshalb intakt im Duodenum an⁵¹. Im Dünndarm können nun die Aglyka über passive Diffusion aufgenommen werden⁵². O-Glykoside sind allerdings zu hydrophil, um durch die Zellmembran zu diffundieren, weswegen für die Absorption entweder ein spezifischer aktiver Transport oder die Hydrolyse des Zuckersubstituenten nötig ist^{53,54}. Hollman et al. haben postuliert, dass O-Glykoside aktiv über den SGLT1-Transporter in die Enterozyten transportiert und dort anschließend von der cytosolischen β -Glycosidase hydrolysiert werden^{55,56}. Ein anderer Resorptionsweg beinhaltet das Enzym Lactase-Phlorizin Hydrolase (LPH), eine in der Bürstensaum-Membran lokalisierte β -Glycosidase, die die extrazelluläre Hydrolyse von zahlreichen Glykosiden katalysiert⁵⁷. Dem so entstehenden Aglykon ist es anschließend möglich passiv durch die Darmwand zu diffundieren. Vermutlich sind beide Enzyme bei der Resorption von Glykosiden involviert, jedoch ist ihr relativer Beitrag zur Umsetzung der vielen verschiedenen Glykoside noch unklar. So wird Quercetin-3-O-glucosid durch LPH hydrolysiert, da es kein Substrat der cytosolischen β -Glycosidase ist, während Quercetin-4'-O-glucosid wahrscheinlich von beiden Enzymen umgesetzt wird^{58,59}. Da allerdings sowohl der aktive Transport durch SGLT1, als auch die Hydrolyse durch β -Glycosidasen auf Flavonoid O-Glykoside mit β -D-Glucose Substituenten beschränkt ist, werden viele Flavonoide mit anderen Zuckersubstituenten weiter ins Kolon transportiert, wo diese von der Darmmikroflora in ihre Aglyka überführt werden können^{60–62}. Aufgrund der geringeren Absorptionskapazität des Dickdarms, kann dort allerdings im Vergleich zum Dünndarm nur ein Bruchteil aufgenommen werden⁶³. Außerdem erscheinen Aglyka, die erst

im Kolon aufgenommen werden und deren Metaboliten dementsprechend zeitlich versetzt im Blutplasma⁶⁴. So wurde herausgefunden, dass die Bioverfügbarkeit von Quercetin-3-O- β -rutinosid bei lediglich 20% im Vergleich zu Quercetin-4'-O- β -glucosid liegt, da es weder ein Substrat von LPH noch von SGLT1 im Dünndarm ist⁶⁵.

Im Vergleich zu Flavonoid O-Glykosiden sind C-Glykoside deutlich stabiler und können deshalb nicht von hydrolytischen Enzymen zu ihren Aglyka deglykosyliert werden. Deshalb werden C-Glykoside oft als intakte Konjugate im Dünndarm aufgenommen⁶⁶. Wenngleich sie bis zum Erreichen des Dickdarms intakt bleiben, können sie dort durch Bakterien zu ihren Aglyka hydrolysiert und anschließend aufgenommen werden^{67,68}. Als Konsequenz daraus, dass sie bis zum Dickdarm nicht hydrolysiert werden, sind die Plasmaspiegel von Flavonoid C-Glykosiden oft sehr niedrig, weswegen nur wenige Metaboliten in Blut und Urin detektiert werden können^{69,70}.

1.3.2 Metabolisierung in Dünndarmepithel und Leber

Nachdem die Flavonoide entweder als Aglyka oder intakt als C-Glykoside ins Darmepithel aufgenommen wurden, unterliegen sie einem umfangreichen Metabolismus vermittelt durch zahlreiche Phase I und II Enzyme. Durch UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs), Sulfotransferasen (SULTs), Catechol-O-Methyltransferasen (COMTs) oder Cytochrom P450 Isoenzyme (CYPs) kommt es in den Enterozyten oder in der Leber zum sogenannten First-Pass-Effekt (**Abbildung 6**).⁷¹

Zu den für Flavonoide wichtigen Phase I Reaktionen oder auch Funktionalisierungsreaktionen zählt neben der bereits erwähnten Hydrolyse durch Glycosidasen die Oxidation durch CYPs. Auch wenn der Phase I Metabolismus im Vergleich zu den Phase II Reaktionen eher eine untergeordnete Rolle spielt, sind sie bei der Funktionalisierung einiger Flavonoide von Bedeutung. Die CYP-vermittelte Oxidation von Flavonoiden beinhaltet sowohl Hydroxylierung als auch Demethylierung. Die CYP Superfamilie ist eine große Gruppe von verschiedenen Isoenzymen, die überall im Körper vorkommen, wobei ihre Expression in Leber und Dünndarm am höchsten ist^{72,73}. Für den Metabolismus von Flavonoiden ist hauptsächlich die CYP1A Subfamilie verantwortlich, wobei die Hydroxylierung von Flavononen, Flavonolen und Flavonen fast ausschließlich durch CYP1A2 katalysiert wird⁷⁴. CYP1A2 wird größtenteils in der Leber exprimiert und katalysiert die 3'-Hydroxylierung bzw. die 4'-Demethylierung im B-Ring der Flavonoide⁷⁵. Allerdings können nach oraler Administration bei Mensch und Tier die meisten durch CYPs gebildeten Metaboliten gar nicht oder nur in geringen Konzentrationen detektiert werden, weswegen man davon ausgeht, dass Flavonoide *in vivo* eher durch Phase II Enzyme wie UGTs, SULTs oder COMTs metabolisiert werden, als von CYPs.⁷¹

Aufgrund der vielen phenolischen Hydroxy-Gruppen werden Flavonoide am häufigsten durch UGTs umgesetzt, gefolgt von SULTs und COMTs. UGTs katalysieren die Übertragung einer Glucuronsäure vom Cofaktor UDPGA auf die als Substrat fungierenden Flavonoide, wodurch diese hydrophiler werden und über Galle oder Urin ausgeschieden werden können⁷⁶. UGTs gehören zu den membrangebundenen Enzymen und werden hauptsächlich im Dünndarm und der Leber exprimiert, wobei in den verschiedenen Organen unterschiedliche Isoformen identifiziert werden konnten⁷⁷. Bei der Glucuronidierung von Flavonoiden *in vivo* konnten die Subfamilie UGT1A und die Isoform UGT2B7 als Haupt-Katalysatoren detektiert werden⁷⁸. Allerdings besitzen UGT Isoformen überlappende Substrat-Profile, weswegen auch mehrere Isoformen für die Konjugation eines Flavonoids verantwortlich sein können⁷⁹. Dadurch, dass fast jede Hydroxy-Gruppe in Flavonoiden durch UGTs konjugiert werden kann, konkurrieren sie mit anderen Phase II Enzymen wie SULTs und COMTs.

Neben UGTs gehören SULTs zu den für Flavonoide wichtigsten Phase II Enzymen. Für Quercetin konnten so in einem *in situ* Rattenmodell 64% glucuronidierte und 36% sulfatierte Metaboliten detektiert werden⁸⁰. Sulfate sind genauso wie Glucuronide hydrophiler als ihre Aglyka und können deswegen leichter eliminiert werden⁸¹. Sie werden durch Übertragung einer Sulfat-Gruppe des Cofaktors PAPS auf das jeweilige Flavonoid gebildet. SULTs können entweder membrangebunden sein oder im Cytosol vorkommen und in vier Subfamilien unterteilt werden⁸¹. Bei der Umsetzung von Flavonoiden spielen hauptsächlich die cytosolischen SULT1 Isoformen eine Rolle, die fast ausschließlich in der Leber und im Dünndarm exprimiert werden^{82,83}. Aufgrund dieser hohen Expressionsrate konnte für einige Flavonoide, wie Eriodictyol, Hesperetin oder Catechin, eine Sulfatierung durch SULT1A1 oder SULT1A3 im Menschen beobachtet werden^{84,85}. Obwohl SULTs eine gewisse Regioselektivität zur Sulfatierung der Hydroxygruppen an Position 7 bzw. 4' von Flavonoiden aufweisen⁸², konkurrieren sie mit der Glucuronidierung durch UGTs. Aufgrund der ähnlichen Verteilung im Körper und der spezifischen Erkennung von phenolischen Hydroxygruppen der Flavonoide, entsteht ein kompetitiver Metabolismus zwischen Glucuronidierung und Sulfatierung, vor allem in den Enterozyten und Hepatozyten. Aufgrund der hohen Substrataffinität der SULTs scheint die Sulfatierung bei geringer Substratkonzentration zu dominieren, während durch die hohe Kapazität der UGTs eine Glucuronidierung bei höheren Konzentrationen überwiegt⁸⁴. *In vivo* wird deshalb oft eine Mischung aus Sulfaten und Glucuroniden detektiert, wobei aufgrund der schnellen Sättigung der SULT Systeme größere Mengen glucuronidierte Flavonoide gefunden werden konnten.⁷¹

Das dritte für die Metabolisierung von Flavonoiden wichtige Phase II Enzym ist die COMT^{86–88}. Anders als glucuronidierte und sulfatierte Metaboliten, sind methylierte Konjugate lipophiler und werden deshalb *in vivo* akkumuliert. COMTs katalysieren die Methylierung von exogenen Substanzen mit Catechol-Struktur, u.a. auch von Flavonoiden^{86,87}. Genauso wie bei

SULTs, können COMTs membrangebunden oder im Cytosol vorkommen und werden vor allem in der Leber und auch im Dünndarm exprimiert^{89,90}. Für die Methylierung von Flavonoiden spielt hauptsächlich die cytosolische COMT (S-COMT) eine Rolle, wobei immer eine Konjugation der Hydroxy-Gruppen innerhalb der Catechol-Struktur (3'- und 4'-Hydroxyl) zu beobachten ist⁸⁹. Dadurch, dass auch die COMT mit einigen phenolischen Hydroxy-Gruppen der Flavonoide reagiert, entsteht auch hier ein kompetitiver Metabolismus zwischen der Methylierung und der Konjugation durch UGTs/SULTs. Allerdings können bereits methylierte Flavonoide aufgrund der anderen Hydroxy-Gruppen trotzdem noch glucuronidiert oder sulfatiert werden, während bei Verlust der Catechol-Struktur durch Konjugation eine Methylierung durch COMTs ausgeschlossen werden kann.⁷¹

Wie bereits beschrieben bleiben methylierte Metaboliten vermehrt im Körper, während sulfatierte und glucuronidierte Konjugate hydrophiler sind und deshalb zu großen Teilen eliminiert werden. Analog zu den Flavonoidglykosiden, sind Glucuronide und Sulfate zu hydrophil, um passiv durch die Zellmembran zu diffundieren, weswegen angenommen wird, dass aktive Transporter bei der Exkretion von Phase II Metaboliten *in vivo* beteiligt sind. Es ist beschrieben, dass die im Dünndarmepithel gebildeten Phase II Konjugate durch ABC-Transporter wie Multidrug-Resistance-associated Protein 2 (MRP2), P-Glykoprotein (P-GP) oder das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) zurück in das Dünndarlumen exportiert oder über MRP3 in die Blutbahn transportiert werden können^{91–93}. Auch organische Anionentransporter (OATs) oder SLC-Transporter können bei der Aufnahme von Flavonoid Konjugaten beteiligt sein⁹⁴. Aufgrund des substrat- und konzentrationsabhängigen Effluxes stellen aktive Transporter ein Kontrollsystem bei der Produktion von Phase II Metaboliten durch UGTs und SULTs dar. So kann bei Sättigung der Transporter durch hohe Konjugationsraten eine Akkumulation von Metaboliten in der Zelle beobachtet werden, weswegen die Produktion der Konjugate reduziert wird⁹⁵. Die über die Galle oder Efflux-Transporter ins Darmlumen zurücktransportierten Metaboliten können nun entweder erneut im Dünndarm resorbiert und metabolisiert oder weiter in den Dickdarm transportiert werden. Viele Konjugate werden jedoch aufgrund ihrer polaren Gruppen auch über den Urin ausgeschieden⁹³.

1.3.3 Bakterielle Zersetzung im Dickdarm

Glucuronidierte und sulfatierte Metaboliten, die über biliäre oder intestinale Exkretion zurück in den Dünndarm transportiert wurden, aber auch Flavonoidglykoside, die im Vorfeld nicht aufgenommen werden konnten, gelangen schlussendlich ins Kolon. Die intestinale Mikroflora besteht je nach Person aus bis zu 400 verschiedenen, strikt anaeroben Bakterien Spezies, die sich im Kolon konzentrieren⁹⁶. Diese Dickdarmbakterien exprimieren verschiedene

Glykosidasen, die in der Lage sind alle Arten von Flavonoidglykosiden zu spalten, aber auch Glucuronidasen und Sulfatasen^{61,97}. Selbst für Flavonoid C-Glykoside, wie Vitexin, Isoorientin oder Orientin, konnte festgestellt werden, dass zuerst die C-C-Bindung zu den Zuckersubstituenten gespalten wird, wenngleich dieser Prozess deutlich länger dauert als bei den korrespondierenden O-Glykosiden^{98–100}. Die so entstehenden Aglyka können nun durch Spaltung des C-Rings weiter in C₆-C₁-, C₆-C₂- oder C₆-C₃-Körper zerlegt werden^{101–104}. Diese Ringspaltung kann sich innerhalb der Flavonoid Unterklassen unterscheiden⁵². Für Flavonole konnten hauptsächlich Phenylelessigsäuren, wie 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylelessigsäure oder 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure und einige Phenylpropionsäuren gefunden werden^{63,105}. Bei Flavanonen und Flavonen, wie Apigenin oder Luteolin, konnten als Hauptmetaboliten 4-Hydroxyphenylpropionsäure, 4-Hydroxyzimtsäure und 4-Hydroxybenzoesäure nachgewiesen werden^{100,106}. Die so entstandenen Spaltprodukte und Aglyka können anschließend aus dem Dickdarm in den Körper aufgenommen werden, da sie sowohl im Plasma als auch im Urin nachgewiesen werden konnten^{105,107}. Dort können sie, vor allem in der Leber, durch Sulfatierung, Glucuronidierung, Methylierung oder Oxidation weiter zu neuen Metaboliten umgesetzt werden^{52,60,107}. Schlussendlich werden die Abbauprodukte und deren Metaboliten vor allem über den Urin, aber auch über die Fäzes ausgeschieden (**Abbildung 6**).

1.4 Sampling und Analytik bei Metabolom Studien

Metabolomik bezeichnet die High-Throughput Quantifizierung und Identifizierung von Metaboliten in Geweben oder Bioflüssigkeiten, die sich in Abhängigkeit von diversen Stimuli verändern können. Dabei ist es in den Biowissenschaften ein wichtiges Instrument zur Erforschung der Komplexität von biologischen Systemen geworden¹⁰⁸. Biochemische Profile sind dabei stark abhängig von diversen Faktoren wie Genotyp, Umweltfaktoren, Ernährung oder Darmmikrobiom. Die Untersuchung von Metaboliten deckt zahlreiche Anwendungsgebiete ab, wozu vor allem auch die Identifizierung von Wirkmechanismen für pharmazeutische Arzneimittel zählt¹⁰⁹. Es gibt einige Fehlerquellen bei metabolischen Studien, von denen einige im direkten Zusammenhang mit der Probenentnahme, -vorbereitung oder Lagerung stehen. Um die Zuverlässigkeit der erhaltenen Proben zu garantieren, ist es wichtig den permanenten Metabolismus zu stoppen, Metabolite zu stabilisieren und die Integrität der Proben zu erhalten. Aus diesem Grund wurden für einige oft verwendete biologische Matrices, wie Urin, Fäzes, Blut, Gewebe oder Zellen, Standardarbeitsanweisungen (SOPs) entwickelt, die für die Durchführung von repräsentativen Metabolit-Studien unerlässlich sind. Aber auch die Wahl der geeigneten analytischen Plattform ist von großer Bedeutung, da je nach Fragestellung die Analyse hauptsächlich mithilfe von (chromatographie-gekoppelter) Massenspektrometrie oder NMR Spektroskopie durchgeführt wird. Im Folgenden wird ein

kurzer Überblick über die wichtigsten Verfahren zur Probennahme und Lagerung von Urin, Fäzes, Blut, Gewebe bzw. Zellen gegeben. Außerdem sollen die wichtigsten Analyseverfahren kurz erläutert werden. Obwohl Tagesrhythmus und Ernährung einen großen Einfluss auf das Metabolit-Profil beim Menschen haben können, stehen im Folgenden andere Fragestellungen im Fokus.¹¹⁰

1.4.1 Probenentnahme, Probenvorbereitung und Lagerung

Es gibt verschiedene Probenverarbeitungsstrategien, die zur Aufarbeitung von Metabolit-Proben verwendet werden, wobei man annimmt, dass einheitliche Gesamtverfahren Einfluss auf den metabolischen Fingerprint haben könnten. Wenngleich es noch keine einvernehmlichen Verfahren gibt, wurden einige Standardarbeitsanweisungen (SOPs) in Abhängigkeit der biologischen Matrix und der analytischen Plattform vorgeschlagen^{111–116}. Eine Zusammenfassung der wichtigsten zu beachtenden Faktoren bei der Probennahme, -verarbeitung oder Lagerung von Metabolit-Proben ist in **Abbildung 7** zusammengefasst.

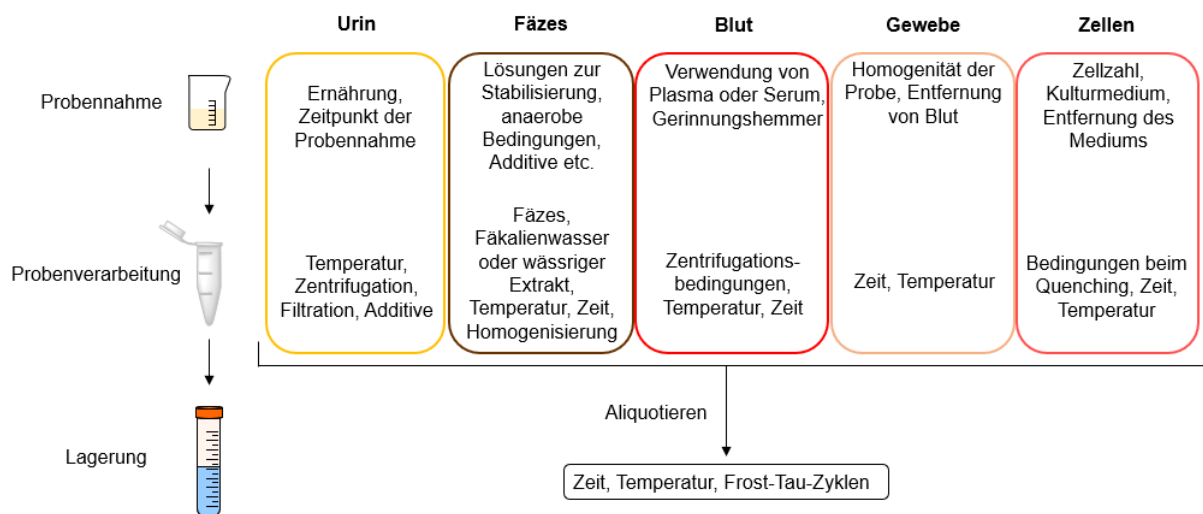


Abbildung 7: Zusammenfassung der prä-analytischen Faktoren der wichtigsten biologischen Matrices, die das Metabolit-Profil beeinflussen können.¹¹⁰

Urin ist eine Bioflüssigkeit, die aufgrund ihrer nicht-invasiven Probennahme oft für Metabolit-Studien an Mensch und Tier verwendet wird. Aufgrund des reduzierten Proteingehalts und der geringen physikochemischen Komplexität ist für Urin eine relativ simple Vorgehensweise beschrieben^{111,117}. Die meisten Methoden zur Konservierung von Metaboliten beinhalten eine Kombination aus Zentrifugation, Filtration und die Zugabe von Bakteriostatika. Ein typisches unspezifisches Protokoll, das oftmals bei klinischen und toxikologischen Studien verwendet

wird, ist die ‚Dilute and Shoot‘ Strategie^{118,119}. Sie beinhaltet ein sofortiges Einfrieren der Proben, um Enzymreaktionen zu stoppen und eine Zersetzung zu verhindern, gefolgt von einem milden Zentrifugationsschritt um Blut, Mineralkristalle und Mikroorganismen abzutrennen. Anschließend wird es im für die verwendete Analytik geeigneten Lösungsmittel verdünnt. Da sich Volumen und Konzentration der Metaboliten aufgrund physiologischer Faktoren bei jedem Individuum unterscheiden, können Normalisierungsmethoden, wie Kreatin-basierte oder Osmolarität-basierte Methoden, verwendet werden¹¹⁷. Urinproben können bis zu 48 h bei 4 °C gelagert werden ohne ihre Integrität zu verlieren¹²⁰. Anschließend können sie für bis zu 6 Monate in Aliquote bei -20 bis -80 °C gelagert werden, wobei sie in dieser Zeit bis zu dreimal aufgetaut werden können ohne ihr metabolisches Profil zu verändern^{120,121}.

Metabolit-Studien mit Fäzes erfahren gesteigertes Interesse, da ihr metabolisches Profil das Zusammenspiel zwischen dem Wirt und den Darmbakterien reflektiert¹²². Es wurde gezeigt, dass das fäkale Metabolom zu großen Teilen die Darmbakterienkomposition im Menschen und somit die Funktion des Mikrobioms widerspiegelt¹²³. Trotz der zunehmenden Popularität von fäkalen Metabolom-Studien, konnten bisher noch keine standardisierten Prozesse für die Probennahme und die Analyse entwickelt werden. Während anfangs hauptsächlich die flüchtigen organischen Verbindungen untersucht wurden, weiß man heute, dass der Großteil an fäkalen Metaboliten nicht flüchtig zu sein scheint¹²⁴. Aus diesem Grund unterscheidet man drei verschiedene Probenarten zur Analyse von Fäzes Proben. Zum einen können die intakten Fäzes untersucht werden, wobei es hierbei um die Analytik der volatilen Verbindungen geht. Zum anderen kann das Fäkalienwasser oder ein wässriger Extrakt der Fäzes zur Identifizierung von nicht volatilen Verbindungen verwendet werden. Da Stuhlproben sehr heterogen sind, ist manchmal eine vermehrte Probennahme mit anschließender Homogenisierung empfohlen, um eine höhere Reproduzierbarkeit zu garantieren^{124,125}. Auch die Stabilität der fäkalen Proben stellt eine Herausforderung dar, da aerobe Bedingungen und Raumtemperatur das fäkale Metabolom aufgrund mikrobieller Fermentation schnell verändern können. Deshalb verwenden einige Forscher eine anaerobe Kammer direkt nach Probennahme, was allerdings bei eigenständiger Probennahme der Testpersonen zu Hause nicht realisierbar ist^{126,127}. Da der Effekt der Probenveränderung bei fäkalen Proben im Vergleich zu anderen biologischen Matrizen am höchsten ist, werden die Proben möglichst ohne Zeitverzögerung gekühlt. Grundsätzlich wird allerdings eine sofortige Messung der frischen Proben empfohlen, da nach Lagerung bei -80°C und einmaligem auftauen bereits nur noch 33% der Metaboliten detektiert werden konnten¹²⁸. Aufgrund der zahlreichen Variablen bei fäkalen Metabolit-Studien konnte bisher weder für die Probennahme noch für die Lagerung eine einheitliche Vorgehensweise beschrieben werden.¹¹⁰

Im Vergleich zu Studien mit Urin und Fäzes sind Blutproben invasiver und weisen ein sich unterscheidendes, aber komplementäres metabolisches Profil zu Urinproben auf. Blut besteht im Wesentlichen aus zwei Hauptkomponenten, Blutplasma und Serum, welche sich bedingt durch ihre biochemische Gewinnungsmethode voneinander unterscheiden^{111,112,129,130}. Serum wird durch standardisiertes Koagulieren von Blut gewonnen, während beim Blutplasma das Gerinnen des Blutes durch Gerinnungshemmer verhindert wird. Einige Studien haben sich in letzter Zeit mit dem direkten Vergleich von Plasma und Serum beschäftigt, wobei festgestellt wurde, dass beide Matrices mit nur geringfügigen Unterschieden kompatibel für Metabolom-Studien sind und somit keine Präferenz gefunden werden konnte^{131–133}. Die Verwendung von Plasma ist allerdings aufgrund gut untersuchter, strikter SOPs empfohlen, während es für Serum aufgrund unkontrollierbarer Gerinnungsprozesse schwierig ist einer einheitlichen Anleitung zu folgen^{132,133}. Sowohl für Plasma als auch für Serum werden häufig Verfahren beschrieben, die eine Lösungsmittlextraktion gefolgt von Zentrifugation zur Abtrennung von Proteinen und Makromolekülen beinhalten, wobei die Extraktionsmethode einerseits von den zu untersuchenden Faktoren und andererseits von der analytischen Messmethode und somit vom Lösungsmittel abhängt^{129,134}. Außerdem ist bei der Aufbereitung von Plasmaproben die Wahl des Gerinnungshemmers in Abhängigkeit der analytischen Plattform essenziell. So konnte bei den Gerinnungshemmern Citrat oder EDTA eine Beeinträchtigung des Ionisationsprozesses bei massenspektrometrischen Analysen beobachtet werden, während Heparin keine Störungen verursachte¹³⁵. Auch bei Analysen mit NMR Spektroskopie wird Heparin empfohlen, da EDTA und Citrat zu vielen zusätzlichen Signalen im Spektrum führen¹³⁶. Nach der Probennahme wird eine Abtrennung der Blutzellen innerhalb der ersten 30 min empfohlen, um weitere Metabolisierungen oder Transportvorgänge zu unterbinden. Analog zu Urinproben, können Blutproben in Aliquote bei -80 °C mehrere Monate gelagert werden, wobei Frost-Tau-Zyklen vermieden werden sollten^{110,137–139}.

Auch wenn die meisten Metabolom-Studien auf nicht invasiven Methoden der Probennahme beruhen, wie bei Urin oder Fäzes, sind invasive Analysen von Geweben unerlässlich, da das Gewebe den Ort repräsentiert, wo die metabolischen Veränderungen, die dann zu Krankheiten führen, stattfinden. Da die Gewebe innerhalb von Organen sehr heterogen sind und metabolische Studien an nahezu jedem Gewebe durchgeführt werden, ist es nicht möglich eine einheitliche Vorgehensweise zu beschreiben¹⁴⁰. Metabolom-Studien an Geweben beinhalten meistens einen Spülschritt, um Blut zu entfernen, gefolgt von schnellem Stoppen der Enzymreaktionen, Gewebehomogenisierung und zuletzt Extraktion der Metaboliten¹³⁹. Die so erhaltenen Proben sollten entweder sofort analysiert oder mit flüssigem Stickstoff schockgefroren werden, um weiteren Metabolismus zu vermeiden¹⁴¹. Zusätzlich werden Organe meistens in kleine Stücke zerteilt und so schnell wie möglich einzeln eingefroren, um Frost-Tau-Zyklen vorzubeugen.¹¹⁰

Zusätzlich zu den bereits erwähnten Metabolit-Proben aus lebenden Individuen, können metabolische Analysen in der Zellkultur durchgeführt werden, welche eine Momentaufnahme des ablaufenden zellulären Metabolismus bieten. Die größten Herausforderungen bei der Probenvorbereitung von metabolischen Proben aus Zellen stellen das effektive Sampling, Quenching und die Metabolit Extraktion dar¹⁴². Dabei ist es wichtig die geeignete Zellzahl zu wählen, um ausreichend Signal in NMR oder MS Analysen zu bekommen und auch niedrig-konzentrierte Metaboliten detektieren zu können, da auch Metaboliten in niedrigen Konzentrationen ausschlaggebend für biologische Prozesse sein können¹¹⁰. Außerdem ist die Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien ausschlaggebend, da diese störende Anionen enthalten können, die zur Unterdrückung von ESI Signalen oder zur Detektion von zusätzlichen Signalen im NMR Spektrum führen können¹⁴³. Deshalb ist es sinnvoll die Zellen vor der Analyse durch einen geeigneten Waschschrift vom Medium abzutrennen. Ein weiterer wichtiger Schritt zur Erhöhung der Qualität dieser Metabolit-Proben ist das Quenching. Dieses Verfahren dient dem Abstoppen des zellulären Metabolismus, um die weitere Umsetzung von Metaboliten zu verhindern und bestehende Metabolit Konzentrationen zu erhalten. Verwendet werden dafür meistens Lösungsmittel wie Methanol oder Acetonitril, die mit Wasser oder angesäuertem Wasser supplementiert werden^{144,145}. Anschließend werden Zellextrakte meistens in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Auch hier sollten Frost-Tau-Zyklen vermieden werden.^{110,139}

In den letzten Jahren wurden einige SOPs für die gängigen biologischen Matrices entwickelt und veröffentlicht. Grundsätzlich sollte jedoch anerkannt werden, dass keine Methode es alleinig möglich macht alle Metaboliten aus einer biologischen Matrix zu identifizieren. Deshalb sollte im Vorfeld jeder Studie entschieden werden, welche Fragestellungen beantwortet und durch welche analytische Plattform die Metaboliten anschließend detektiert werden sollen, um eine geeignete Vorgehensweise zu wählen.

1.4.2 Massenspektrometrische Analytik zur Metabolit Identifizierung

Zur Identifizierung der bereits beschriebenen Metabolit-Proben können verschiedene analytische Plattformen verwendet werden. Am häufigsten werden GC-MS, NMR-basierte oder LC-MS Methoden verwendet. Da keine Technologie alleine die Analyse des kompletten Metabolit Profils eines lebenden Systems abdecken kann, wird die Verwendung von verschiedenen analytischen Plattformen empfohlen¹¹². Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit verwendeten massenspektrometrischen Methoden, wird im Folgenden gezielt auf die Metabolom Analytik mithilfe von Massenspektrometrie eingegangen. Eine Übersicht über den Aufbau eines Massenspektrometers ist in **Abbildung 8** dargestellt.

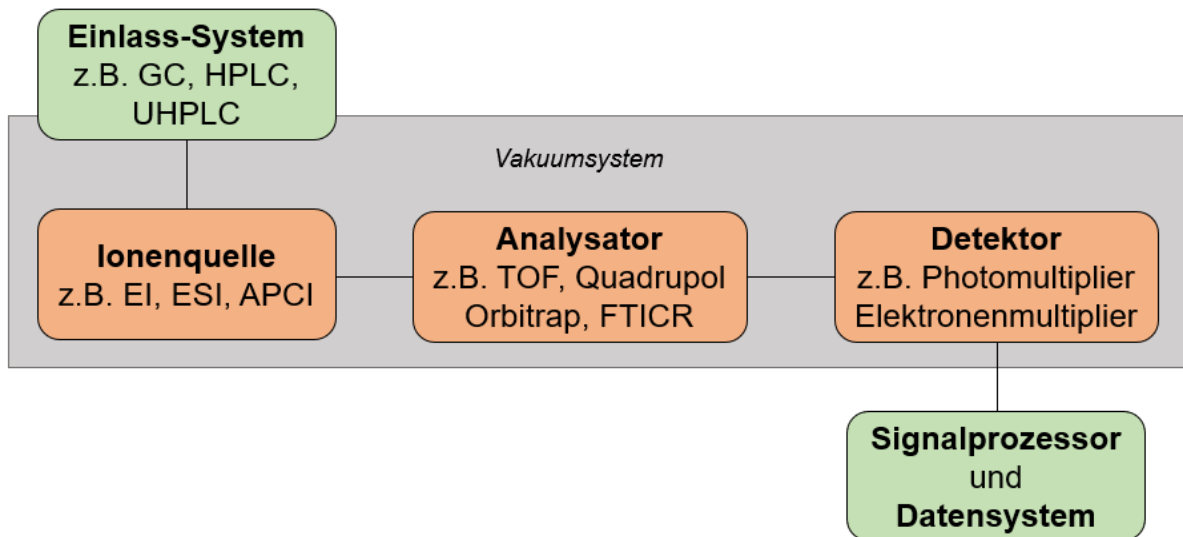


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers.

Im Vergleich zu anderen analytischen Plattformen hat die Massenspektrometrie die Vorteile, dass es eine hohe Sensitivität, Selektivität und Spezifität aufweist¹⁴⁶. Für metabolische Studien wird häufig ein gekoppeltes System aus MS und Chromatographie oder Elektrophorese verwendet, welches neben der Trennung als zusätzliche Charakterisierungsdimension die Retentionszeit aufweist. Unter den zahlreichen gekoppelten Methoden war die GC-MS die erste, die zur Messung von metabolischen Proben verwendet wurde. Sie ermöglicht die Identifizierung von kleinen, flüchtigen Molekülen, zu denen nach Derivatisierung auch die Fettsäuren, Aminosäuren oder organische Säuren zählen¹¹². Durch die jahrelange Verwendung der GC-MS Methoden, konnten gut etablierte Protokolle und Datenbanken entwickelt werden. Jedoch können durch GC-MS lediglich volatile und wärmebeständige Verbindungen vermessen werden, weswegen diese Methode stark eingeschränkt ist^{112,147}. Heutzutage ist LC-MS unter Verwendung von chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) die meistgenutzte Plattform zur unspezifischen Messung von Metaboliten. Dabei wird selbst zur Messung von sehr polaren Verbindungen in Metabolit-Studien oft die Umkehrphase verwendet¹⁴⁸. Eine weitere Methode, um die schnelle Messung von labilen Metaboliten zu garantieren und die technischen Nachteile der gekoppelten Methoden zu umgehen, ist die direkte Injektion in das Massenspektrometer (direct introduction mass spectrometry, DIMS) ohne vorherige chromatographische Auftrennung^{149,150}. DIMS wird häufig mit einer Elektrospray-Ionisations (ESI) Technik an einem HRMS-Gerät verwendet. Auch wenn durch die fehlende chromatographische Auftrennung Informationen verloren gehen können, stellt DIMS eine effiziente Methode zur ersten Analyse von komplexen biologischen Proben dar.^{139,151}

Zur Messung von metabolischen Proben am Massenspektrometer stehen eine Reihe verschiedener Ionenquellen zur Verfügung. Ionisationsprozesse in der Gasphase wie Elektronen Ionisation (EI), chemische Ionisation (CI) oder chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) werden für flüchtige/thermostabilere Proben verwendet, während für thermisch labile Proben Desorptionsmethoden wie DESI oder MALDI (matrix-assisted laser desorption ionization) verwendet werden. Für viele Messungen von Metabolit-Proben wird ein GC-MS System mit EI als Ionenquelle verwendet, da es eine hohe Reproduzierbarkeit aufweist. Von den API Techniken (APCI, ESI) wird am häufigsten ESI als Ionisationsmethode, sowohl bei DIMS als auch LC-MS Verfahren, verwendet¹⁵². ESI kann gut für polare Metaboliten verwendet werden und weist eine geringe ‚in-source‘ Fragmentierung auf, weswegen es einen großen Bereich der Molekularmassen von Metaboliten abdecken kann.^{139,151}

Da die akkurate Messung der m/z Werte einen kritischen Schritt bei der Metabolit Identifizierung darstellt, ist die Wahl des geeigneten Analysators von großer Bedeutung. Die Leistung des Analysators wird hauptsächlich durch das Auflösungsvermögen der Masse, die Richtigkeit (Accuracy) der Messungen und den Dynamikbereich des Gerätes bestimmt. Hybrid Q-TOF Instrumente gekoppelt an eine UHPLC waren aufgrund ihres hohen Auflösungsvermögens, ihrer Richtigkeit und der hohen Messgeschwindigkeit lange Zeit weit verbreitet für metabolische Analysen. Heute erregt die Fourier-Transform MS (FTMS) durch ihre hohe Leistung großes Aufsehen¹⁵³. Das Prinzip der FTMS unter Verwendung von Orbitrap-basierten oder FTICR-basierten (Fourier-Transform Ionenzyklotronresonanz) Geräten wurde in den vergangenen Jahren oft beschrieben^{149,152,154,155}. Die Vorteile bei Verwendung von FTMS sind die hohe Auflösung der Peaks, der höchste verfügbare Dynamikbereich und Abdeckung eines hohen Metabolitbereiches (bis zu m/z 20000). FTMS ermöglicht außerdem die Bestimmung von Isotopen Feinstrukturen, was nützlich bei der eindeutigen Identifizierung von Verbindungen ist.^{139,151}

Natürlich ist die Validierung der besprochenen Methoden unabdingbar für die Datenerhebung mithilfe von Massenspektrometrie. Deshalb wurden bereits einige Richtlinien zur Generierung von Metabolit-Daten ermittelt und validiert^{112–117}. Die hier beschriebenen Methoden stellen nur einen Bruchteil der Möglichkeiten zur Analyse von Metabolit-Proben dar, weswegen es nötig ist für jeden Probensatz spezifisch die geeignete analytische Plattform und Methode zu wählen.

1.5 Zielsetzung

Flavonoid C-Glykoside stellen eine wichtige Unterklasse der Flavonoide dar, die sich aufgrund ihrer hydrolytischen Stabilität im Vergleich zu O-Glykosiden immer größerer Aufmerksamkeit erfreuen. Da die Datenlage zur *in vitro* und *in vivo* Metabolisierung von Flavonoid C-Glykosiden bisher noch unzureichend ist, sollte die Metabolisierung von sechs prominenten Vertretern dieser Stoffklasse untersucht werden. Deshalb sollten in dieser Arbeit Metabolit-Profile von vier mono-glucosidischen, namentlich Orientin, Isoorientin, Vitexin und Isovitexin, und zwei diglycosidischen Flavonoiden, Schaftosid und Isoschaftosid, ermittelt werden. Es sollte die Resorption, der Einfluss von ABC-Transportern auf die Absorption und die Metabolisierung dieser Testsubstanzen im Dünndarm durch ein etabliertes Caco-2-Monolayer Modell mithilfe von LC-MS Analytik getestet werden. Zusätzlich sollte die *in vitro* Metabolisierung in der Leber unter Verwendung von zwei subzellulären Leberfraktionen untersucht werden.

Da auch eine weitere Unterklasse der Flavonoide, die Biflavonoide, zunehmend pharmakologisch und metabolisch untersucht wird, sollte in einem weiteren Teil dieser Arbeit die *in vitro* Metabolisierung von drei Biflavonoiden im Dünndarmepithel analysiert werden. Dafür wurden Metabolit-Profile von Amentoflavin, I3, I18-Biapigenin und Hinokiflavin unter Verwendung des Caco-2-Monolayer Modells generiert und miteinander verglichen.

2 MATRERIAL UND METHODEN

2.1 Zellbiologische Testung

2.1.1 Verwendete Zelllinien

Für die zellbiologische Testung und zur Überprüfung der potenziellen Auswirkung der Testsubstanzen auf die Zellviabilität kamen zwei verschiedene, adhärent wachsende Zelllinien zum Einsatz. Jede verwendete Zelllinie wurde vor der Verwendung einer Testung auf Mykoplasmen unterzogen, die für alle ein negatives Ergebnis lieferte (Mycoplasmacheck, GTAC Biotech, Konstanz, DE).

Caco-2-Zellen

Die humane Colon-Adenokarzinom-Zelllinie Caco-2 (vgl. **Tabelle 1**) (American Type Culture Collection, ATCC® HTB-37™) wurde für die intestinalen Resorptions- und Metabolisierungsversuche, den Effluxtransporter Inhibitionsversuch und den zugehörigen MTT-Assays verwendet. Die Zellen wurden ursprünglich vom Institut für Virologie des Helmholtz Zentrums München (DE) zur Verfügung gestellt. Die Besonderheit dieser Zelllinie ist, dass sich Caco-2-Zellen spontan zu einer heterogenen Mischung intestinaler Epithelzellen ausdifferenzieren und somit als einschichtiges Dünndarm Modell in der Zellkultur verwendet werden können¹⁵⁶.

Tabelle 1: Charakterisierung der verwendeten Caco-2-Zellen.

Zelllinie	Gewebe	Charakterisierung	Herkunft	Zellbank	Nummer
Caco-2	Colon	Adenokarzinom	Mensch	ATCC®	HTB-37™

HepG2-Zellen

Der MTT-Assay mit der menschlichen Hepatom Zelllinie HepG2 (vgl. **Tabelle 2**) (DSMZ GmbH, ACC 180) wurde als Vorversuch für die *in vitro* Leber Metabolisierung verwendet. Die Zellen wurden über das Leibnitz-Institut (DE) bezogen. HepG2-Zellen gelten als etabliertes *in vitro* Modellsystem für polarisierte menschliche Hepatozyten, die eine robuste morphologische und funktionale Differenzierung aufweisen.

Tabelle 2: Charakterisierung der verwendeten HepG2-Zellen.

Zelllinie	Gewebe	Charakterisierung	Herkunft	Zellbank	Nummer
HepG2	Leber	Hepatom	Mensch	DSMZ	ACC180

2.1.2 Allgemeine Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit zellbiologischem Material wurden unter keimfreien Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle dafür verwendeten Verbrauchsmaterialien und Glasgeräte wurden entweder im Vorfeld steril erworben, autoklaviert (121 °C, 1 bar, 120 min) oder in einem Trockenschrank hitzesterilisiert (180 °C, 3 h). Kulturmedien und sonstige Lösungen wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C temperiert.

2.1.2.1 Kryokonservierung und In-Kulturnahme der Zellen

Um Zellen dauerhaft lagern zu können, müssen regelmäßig kleine Aliquote mit einer gewissen Zellzahl kryokonserviert werden. Hierfür wurden möglichst Zellen einer geringen Passage eingefroren.

Sowohl Caco2-, als auch HepG2-Zellen wurden für die Kryokonservierung zunächst subkultiviert (vgl. **2.1.2.3**) und die Zellzahl der Suspension wurde bestimmt (vgl. **2.1.2.4**). Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, in der entsprechenden Menge Wegfriermedium aufgenommen und in Kryovials mit etwa $1,5 \times 10^6$ Zellen/Vial aliquotiert. Die Vials wurden über 24 h in einer Styroporbox bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde der Inhalt des Kryovials möglichst schnell bei 37 °C aufgetaut und mit 8 mL Kulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurde die Lösung zentrifugiert (3 min und 700 U/min) und der Überstand verworfen, um das Wegfriermedium zu entfernen. Das Zellpellet wurde anschließend in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche (75 cm²) überführt. Das Endvolumen in der Kulturflasche betrug für beide Zelllinien 20 mL. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt.

2.1.2.2 Kultivierung der Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden im Inkubator unter Standardbedingungen (37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Der Zustand der Zellen und deren Wachstum wurden regelmäßig mikroskopisch kontrolliert.

2.1.2.3 Subkultivierung der Zellen (Passagieren)

Bei konfluent gewachsenen Zellen wurde zunächst das verbrauchte Medium vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit 10 mL PBS gewaschen. Nach Entfernen

des Puffers sollten die adhärennten Zellen durch Zugabe einer verdünnten Trypsin/EDTA-Lösung (2 mL) und Inaktivierung im Inkubator (5 min) durch leichtes Klopfen vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Um die Konzentration an Trypsin zu verdünnen, wurden 8 mL Medium hinzugefügt, die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (3 min, 700 U/min). Nach Entfernen des Überstandes, wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Je nach Wachstum wurde ein Aliquot der Zellsuspension (meist: 1 mL aus 5 mL Zellsuspension → Splittverhältnis 1:5) in eine neue Kulturflasche (75 cm²) mit vorgelegtem Medium (19 mL) überführt und im Inkubator aufbewahrt. Dieser Vorgang wurde je nach Konfluenz zwei- bis dreimal pro Woche wiederholt.

2.1.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µL Zellsuspension mit 10 µL Trypanblau Lösung versetzt. Der anionische Diazofarbstoff wird nur von toten oder perforierten Zellen aufgenommen, wodurch diese Zellen blau erscheinen¹⁵⁷. Anschließend wurden 10 µL der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und alle 4 Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl/mL wurde nach folgender Formel berechnet:

Formel 1: Berechnung der Zellzahl pro mL.

$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{mL}} = \frac{\text{Zellen der 4 Großquadrate}}{4} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
--

2.1.2.5 Herstellung der Untersuchungslösungen

Für die zellbiologische Testung wurden Stammlösungen der zu testenden Substanzen mit DMSO in einer Konzentration von 20 mM angefertigt und bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Stammlösungen entweder mit Kulturmedium oder für den Versuch verwendeten Puffer zu den gewünschten Konzentrationen verdünnt. Es wurde darauf geachtet, dass die DMSO-Konzentration sowohl für Caco-2-, als auch für HepG2-Zellen nie über 0,5% lag.

2.1.3 MTT-Assay

2.1.3.1 Grundlage

Der MTT-Assay dient zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen, die häufig stark mit der Zellviabilität korreliert. Dabei sollen Rückschlüsse auf die toxischen Einflüsse der verwendeten Substanzen im Testsystem gezogen werden. Als Grundlage für den Versuch

dient das eingesetzte gelbe Tetrazoliumsalz 3-[4,5-Dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT), das wasserlöslich ist und von den Zellen aufgenommen werden kann. Dieses Tetrazoliumsalz kann nun von Dehydrogenasen (die insbesondere in den Mitochondrien lokalisiert) mithilfe von NADPH bzw. NADH zum blau gefärbten, wasserunlöslichen Formazan reduziert werden, das sich in den Zellen anreichert (**Abbildung 9**). Durch Zugabe von SDS können anschließend die Zellen aufgelöst werden, das Formazan geht in Lösung und kann somit photometrisch bei 560 nm vermessen werden. Da das Tetrazoliumsalz nur von lebenden, metabolisch aktiven Zellen aufgenommen und anschließend reduziert wird, geht man davon aus, dass der Assay die Zahl der lebenden bzw. mitochondrial aktiven Zellen widerspiegelt. Bei der Aus- und Bewertung der Daten sollte jedoch berücksichtigt werden, dass dieser Assay nicht direkt die Anzahl lebensfähiger Zellen wiedergibt, sondern vielmehr die Gesamtheit der Enzymaktivität¹⁵⁸.

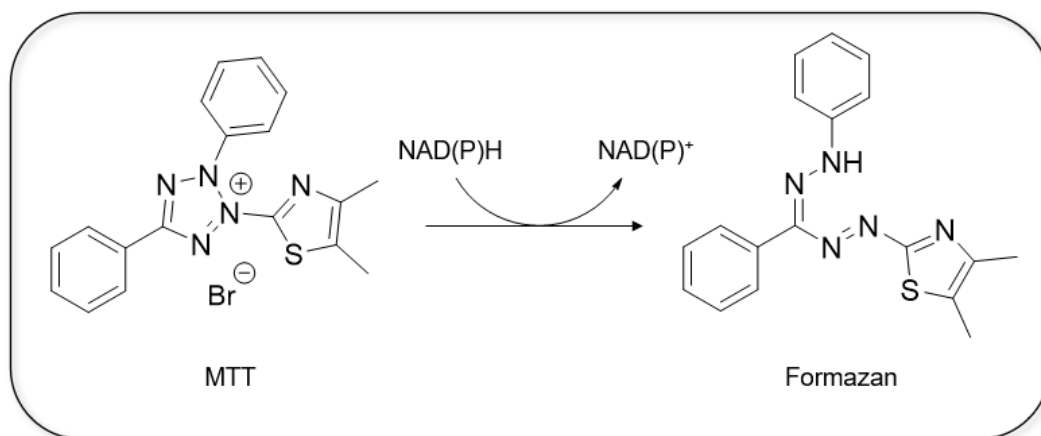


Abbildung 9: Reduktion des gelb gefärbten Tetrazoliumsalzes MTT zum blau gefärbten Formazan.

Dieser Assay sollte als Grundlage zur Bestimmung der Substanzkonzentrationen für nachfolgende Testsysteme (Caco-2-Resorption und -Metabolisierung, *in vitro* Leber Metabolisierung) dienen und somit durch Toxizität der Substanzen verursachte falsche Ergebnisse vermeiden. Für die Flavonoid C-Glykoside wurde sowohl der etablierte (Caco-2- und HepG2-Zellen), als auch der modifizierte (nur Caco-2-Zellen) MTT-Assay durchgeführt, während für die Biflavonoide aufgrund von Löslichkeitsproblemen lediglich der modifizierte MTT-Assay mit Caco-2-Zellen als Grundlage für die Metabolisierungsversuche verwendet wurde.

2.1.3.2 Etablierter MTT-Assay

Der etablierte MTT-Assay wurde in einer modifizierten Vorgehensweise nach Mosmann durchgeführt¹⁵⁹. Für den Assay wurden Zellen in einer Kulturflasche kultiviert (vgl. **2.1.2.2**), bei 90% Konfluenz geerntet und die Zellzahl bestimmt (vgl. **2.1.2.4**). Für Caco-2-Zellen wurde eine Suspension mit 3×10^5 Zellen/mL, für HepG2-Zellen eine mit $3,5 \times 10^5$ Zellen/mL hergestellt. 3 bzw. $3,5 \times 10^4$ Zellen (100 μ L) wurden in die Wells einer 96-Well-Platte ausgesät und über Nacht (24 h) inkubiert (37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchte). Die außenliegenden Wells wurden dabei mit PBS-Puffer befüllt, um Ungleichmäßigkeiten und Randeffekte zu vermeiden. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und durch 100 μ L der Testsubstanz in verschiedenen Verdünnungen ersetzt. Hierfür wurden Konzentrationen von 100, 75, 50, 25 und 10 μ M aus einer 20 mM Stammlösung in dem jeweiligen Medium hergestellt.

Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank mit den Testsubstanzen wurden die Überstände abgesaugt und durch 100 μ L einer frisch zubereiteten 10%igen (V/V) MTT-Lösung in Kulturmedium (0,4 mg/mL) ersetzt. Nach weiteren 3 h Inkubation wurde die Lösung erneut vorsichtig abgesaugt und durch 100 μ L einer 10%igen SDS-Lösung ausgetauscht.

Nach Lagerung der Platte über Nacht unter Lichtausschluss und bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 560 nm am Plattenlesegerät photometrisch bestimmt. Als 100%-Wert (Positivkontrolle) dienten unbehandelte Zellen, die nur in Kulturmedium inkubiert wurden. Die gemessene Absorption der behandelten Zellen wurde prozentual auf die Absorptionswerte der Positivkontrolle bezogen und in Prozent Viabilität angegeben. Als Lösungsmittelkontrolle wurden die Zellen aus fünf Wells mit der höchsten Konzentration an DMSO (hier 0,5% V/V) versetzt, um Lösungsmittelleffekte auszuschließen. Jede Konzentration und Kontrolle wurde in Pentaplikaten durchgeführt und an drei unabhängigen Tagen (n = 3) wiederholt.

2.1.3.3 Modifizierter MTT-Assay

Der modifizierte MTT-Assay wurde auf die Versuchsbedingungen der Caco-2-Resorptions- und -Metabolisierungsversuche angepasst und deshalb nur für Caco-2-Zellen durchgeführt. Wie bereits in **2.1.3.2** beschrieben, wurden 3×10^4 Zellen/Well ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 100 μ L der jeweiligen Verdünnung der Testsubstanzen in HBSS-Puffer ersetzt. Auch hier wurden die Konzentrationen 100, 75, 50, 25 und 10 μ M aus einer 20 mM Stammlösung hergestellt. Im Falle der Biflavonoide wurde zur Erhöhung der Löslichkeit zusätzlich Tween 80 (höchstens 0,25% V/V) zugegeben.

Nach Substanzaufnahme wurden die Zellen 3 bzw. 5 h, analog zu den Caco-2-Versuchen, im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Überstände wieder abgesaugt, durch 10%ige MTT-Lösung in Kulturmedium (0,4 mg/mL) ersetzt und 3 h inkubiert. Danach wurde die Lösung

vorsichtig abgesaugt, durch 10%ige (V/V) SDS-Lösung ersetzt und nach Aufbewahrung über Nacht, im Dunkeln und bei Raumtemperatur photometrisch bei 560 nm vermessen. Als 100%-Wert (Positivkontrolle) dienen Zellen, die lediglich mit HBSS-Puffer inkubiert wurden. Die gemessene Absorption der behandelten Zellen wurde prozentual auf die Absorptionswerte der Positivkontrolle bezogen und in Prozent Viabilität angegeben. Als Lösungsmittelkontrolle dienen Zellen, der höchsten Lösungsmittelkonzentration (0,5% DMSO für C-Glykoside; 0,5% DMSO + Tween 80 bei Biflavonoiden) die mit HBSS-Puffer versetzt mit inkubiert wurden, um Lösungsmittelleffekte auszuschließen. Jede Konzentration und Kontrolle wurde in Pentaplikaten durchgeführt und an drei unabhängigen Tagen ($n = 3$) wiederholt.

2.1.4 Caco-2-Resorptionsversuch und Inhibition von Effluxtransportern

Der Caco-2-Resorptionsversuch wurde in abgewandelter Form nach der Methode von Hubatsch et al. durchgeführt¹⁶⁰. Bei den Resorptionsversuchen in Kombination mit der Inhibition von drei verschiedenen Effluxtransportern wurde sich am Protokoll von Liu et al. orientiert¹⁶¹. Die Berechnung aller Permeabilitätskoeffizienten erfolgte nach Artursson¹⁶². Der schematische Ablauf der Versuche ist in **Abbildung 10** gezeigt. Dabei sollte sowohl der Transport der Testsubstanzen vom Darmlumen in den Körper (und umgekehrt), als auch der Einfluss der drei Effluxtransporter P-GP, MDR2 und BCRP auf die Absorption untersucht werden.

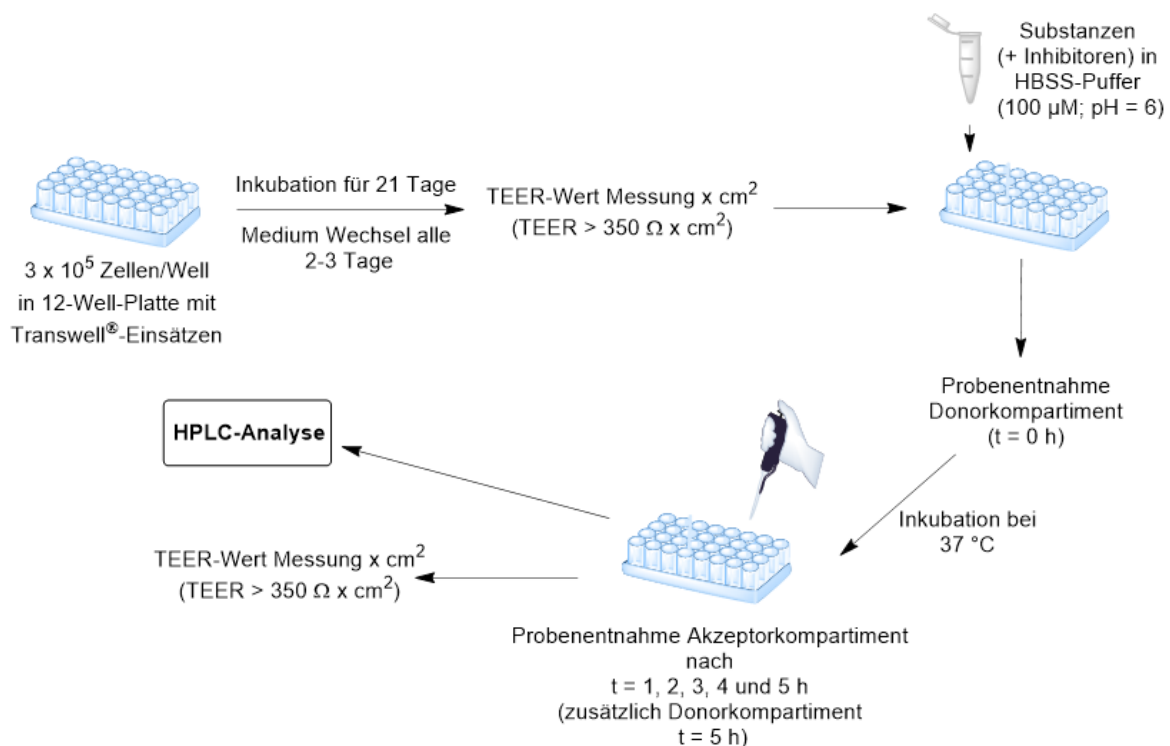


Abbildung 10: Schematischer Ablauf des Caco-2-Resorptionsversuchs unter Einbeziehung der Inhibition von Effluxtransportern.

2.1.4.1 Kultivierung der Zellen auf Transwell®-Einsätzen

Caco-2-Zellen wurden wie bereits beschrieben in einer Kulturflasche bis zu 90%iger Konfluenz kultiviert, geerntet und die Zellzahl bestimmt. Die 12-Well-Zellkulturplatte mit den 12-Well-Transwell®-Einsätzen (Polycarbonat-Membran; 0,4 µm) wurde unter sterilen Bedingungen geöffnet, jeder Filter mit 100 µL Versuchsmedium benetzt und durch Befüllen des basolateralen Kompartiments mit 1,5 mL Kulturmedium vorbereitet. Danach wurden 3×10^5 Zellen in je 0,5 mL pro Well aufgegeben. Die Platten wurden im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchte) inkubiert und nach 8-16 h der erste Mediumwechsel durchgeführt, um Multilayerbildung durch Entfernen der nicht-adhärenenten Zellen zu vermeiden. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Medium alle 2–3 Tage gewechselt. Dafür wurde das alte Medium im basolateralen Kompartiment mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Das Medium im apikalen Kompartiment wurde hingegen abdekantiert, um eine Verletzung des Zelllayers vorzubeugen. Frisches Medium wurde aufgegeben und die Zellen bis zum nächsten Mediumwechsel inkubiert. Auf diese Weise wurden die Zellen 21-28 Tage kultiviert.

2.1.4.2 Ermittlung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Am Tag des Experiments wurde wie bereits beschrieben das Medium apikal und basolateral entfernt. Beide Kompartimente wurden anschließend zweimal mit warmem HBSS-Puffer (37 °C) gewaschen, mit frischem HBSS-Puffer befüllt und für 15 min im Inkubator (37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchte) erwärmt. Währenddessen wurde die Ringelektrode des Volttohmmeters mit 70%igem Ethanol desinfiziert und mehrmals mit frischem HBSS-Puffer gewaschen. Die 12-Well-Platte wurde aus dem Inkubator genommen und 2,5 mL warmer HBSS-Puffer wurden aus dem basolateralen Kompartiment in das Volttohmmeter pipettiert. Anschließend wurde je ein Transwell®-Einsatz eingesetzt und der TEER-Wert sofort am Gerät abgelesen. Um einen Einfluss der Polycarbonat-Membran auf den TEER-Wert auszuschließen, wurde ebenfalls der TEER-Wert von einem ohne Zellen behandelten Transwell®-Einsatz bestimmt und als Leerwert berücksichtigt. Für den Versuch wurden ausschließlich Monolayer mit TEER-Werten $\geq 350 \Omega \times \text{cm}^2$ verwendet. Um eine Beschädigung des Zelllayers während des Versuchs auszuschließen, wurden die TEER-Werte nach dem Versuch erneut bestimmt.

2.1.4.3 Durchführung der Resorptionsversuche (A→B)

In diesen Resorptionsversuchen wurde die Permeabilität von Testsubstanzen vom apikalen zum basolateralen Kompartiment untersucht. Für die Resorptionsversuche wurden Caco-2-

Zellen mit den Passagen 33 bis 45 verwendet. Der letzte Mediumwechsel erfolgte 24 h vor dem Versuch, um die maximale Viabilität der Zellen sicher zu stellen. Am Versuchstag wurde wie unter **2.1.4.2** beschrieben der TEER-Wert der Polycarbonat-Membranen gemessen. Um den physiologischen pH-Wert des Dünndarms nachzustellen, wurde für die Resorptionsversuche der HBSS-Puffer des basolateralen Kompartiments mit 1 N HCl an einem pH-Meter unter Rühren auf pH = 7,4 und der des apikalen Kompartiments auf pH = 6 eingestellt. Beide Lösungen wurden vor dem Versuch sterilfiltriert. Die Stammlösungen der Testsubstanzen wurden wie unter **2.1.2.5** beschrieben hergestellt und für den Versuch auf 100 μ M in HBSS-Puffer (pH = 6) verdünnt. Der in den Transwell®-Einsätzen enthaltene HBSS-Puffer wurde vorsichtig abdekantiert und die Inserts wurden in eine neue 12-Well-Zellkulturplatte überführt, in der bereits 1,5 mL warmer HBSS-Puffer (pH = 7,4, 37 °C) pro Well vorgelegt war. 700 μ L der Testsubstanz-Lösung. wurden in das apikale Kompartiment aufgegeben und sofort wieder 200 μ L entfernt (t = 0 h), um die Verdünnung der Aufgabelösung durch den noch enthaltenen Puffer zu berücksichtigen. Zur Kontrolle der Experimente wurden zusätzlich zu den Testsubstanzen bei jedem Experiment eine Positivkontrolle (Propranolol, 100 μ M in HBSS, pH = 6) und eine Negativkontrolle (FITC-Dextran, 1 mM in HBSS, pH = 6) mitgeführt. Nun wurden die Platten im Brutschrank inkubiert und nach t = 1, 2, 3, 4 und 5 h wurden je 1 mL (FITC-Dextran: 500 μ L) aus dem basolateralen Kompartiment entnommen und sofort durch frischen, warmen HBSS-Puffer (pH = 6) ersetzt. Zum Zeitpunkt t = 5 h wurde zusätzlich eine Probe aus dem apikalen Kompartiment entnommen. Danach wurden die Monolayer mit frischem HBSS-Puffer gewaschen und wieder 20 min im Brutschrank inkubiert, um erneut den TEER-Wert zu messen und damit die Integrität der Zellschicht während des Versuchs zu überprüfen. Nach Versuchsdurchführung wurden alle Proben an der analytischen HPLC vermessen und die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten wie unter **2.1.4.8** berechnet.

2.1.4.4 Durchführung der Resorptionsversuche (B→A)

Zusätzlich zum zuvor beschriebenen Versuch (**2.1.4.3**), wurden auch Permeabilitätsversuche durchgeführt, bei denen die Permeabilitätskoeffizienten vom basolateralen zum apikalen Kompartiment ermittelt werden sollten. Dabei wurde analog der TEER-Wert gemessen und HBSS-Puffer mit zwei verschiedenen pH-Werten (pH = 6 und 7,4) hergestellt. Die Stammlösungen der Testsubstanzen wurden für diesen Versuch in HBSS-Puffer (pH = 7,4) auf 100 μ M verdünnt. Auch hier wurde der alte HBSS-Puffer in den Transwell®-Einsätzen abdekantiert, die Inserts wurden in eine neue 12-Well-Platte überführt und die apikalen Kompartimente wurden mit 0,5 mL warmem HBSS-Puffer (pH = 6) befüllt. 1700 μ L der Testsubstanz-Lösung. wurde in das basolaterale Kompartiment gegeben und sofort wieder

200 μL entfernt ($t = 0 \text{ h}$). Auch hier wurden zusätzlich zu den Testsubstanzen zwei Kontrollsubstanzen (Propranolol 100 μM und FITC-Dextran 1 mM, je in HBSS pH = 7,4) mitgeführt. Nun wurden die Platten im Brutschrank inkubiert und nach $t = 1, 2, 3, 4$ und 5 h wurden je 300 μL aus dem apikalen Kompartiment entnommen und sofort durch frischen, warmen HBSS-Puffer (pH = 7,4) ersetzt. Zum Zeitpunkt $t = 5 \text{ h}$ wurde zusätzlich eine Probe aus dem basolateralen Kompartiment entnommen. Danach wurden die Monolayer mit frischem HBSS-Puffer gewaschen und wieder 20 min im Brutschrank inkubiert, um erneut den TEER-Wert zu messen. Nach dem Versuch wurden alle Proben an der analytischen HPLC vermessen und die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten wie unter **2.1.4.8** berechnet.

2.1.4.5 Transportversuche mit Inhibition von Effluxtransportern

Die Versuche wurden wie unter **2.1.4.3** beschrieben durchgeführt. Zusätzlich zu den Testsubstanzen und Kontrollen wurden drei verschiedene Inhibitoren von Effluxtransportern aufgegeben, um deren Einfluss auf die Resorption der Testsubstanzen zu untersuchen. Da Flavonoide Substrate von pharmakologisch relevanten ABC-Transporter wie P-Glykoprotein (P-GP), Multidrug Resistance-Related Protein 2 (MRP2) und Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) sind¹⁶³, sollte durch Inhibition von jeweils einem dieser ABC-Transporter ihr Einfluss auf die Permeabilitätskoeffizienten untersucht werden.

Dabei wurde Verapamil als Inhibitor von P-GP, Probenecid als Inhibitor von MRP2 und Ko143 als Inhibitor von BCRP verwendet. Von den Inhibitoren wurden Stammlösungen in DMSO hergestellt (Verapamil 20 mM, Probenecid 120 mM, Ko143 2 mM), die für den Versuch weiter in HBSS-Puffer (pH = 6) verdünnt wurden. Dafür wurde zu den jeweiligen Testsubstanzen (100 μM) oder Kontrollen (Propranolol 100 μM , FITC-Dextran 1 mM) in HBSS-Puffer (pH = 6) die jeweilige Menge an Stammlösung der Inhibitoren gegeben. Als Endkonzentrationen wurden 100 μM Verapamil, 600 μM Probenecid oder 5 μM Ko143 eingesetzt. Die Lösungen mit Testsubstanz bzw. Kontrollen und jeweiligem Inhibitor wurden anschließend wie zuvor beschrieben apikal auf die Transwell®-Einsätze aufgegeben und inkubiert. Auch Probenentnahmen und TEER-Wert Messungen wurden analog durchgeführt.

2.1.4.6 HPLC-DAD Analytik

Für die Analytik der C-Glykoside Orientin (**O**), Isoorientin (**IO**), Vitexin (**V**), Isovitexin (**IV**), Schaftosid (**S**) und Isoschaftosid (**IS**) und für die Positivkontrolle Propranolol wurde Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie mit Diodenarray-Detektor (HPLC-DAD) (Elite LaChrom, Hitachi, Tokio, Japan) verwendet. Damit wurden Kalibriergeraden ermittelt, mit denen die jeweiligen Konzentrationen zu den einzelnen Zeitpunkten ermittelt werden konnten.

Flavonoid C-Glykoside

Zur Ermittlung der Kalibriergeraden (0,005 bis 0,5 µg/mL) und Messung der Testlösungen aller sechs C-Glykoside wurden folgende Geräteparameter (**Tabelle 3**) und folgender Gradient (**Tabelle 4**) verwendet.

Tabelle 3: Geräteparameter der HPLC-DAD Analytik von Flavonoid C-Glykosiden.

Parameter	Spezifikation
Säule	Kinetex® Biphenyl 250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å (Phenomenex Inc., Torrance, USA)
Injektionsvolumen	75 µL
Ofentemperatur	25 °C
Autosampler Temperatur	10 °C
Detektionswellenlänge	340 nm
Fließmittel A	H ₂ O + 0,1% TFA
Fließmittel B	MeCN + 0,1% TFA
Fluss	1,20 mL/min

Tabelle 4: Gradient für die HPLC-DAD Analytik von Flavonoid C-Glykosiden.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	90	10
2	90	10
10	0	100
11	90	10
15	90	10

Positivkontrolle Propranolol

Zur Ermittlung der Kalibriergeraden (0,125 bis 200 µg/mL) und Messung der Testlösungen von Propranolol wurden folgende Geräteparameter (**Tabelle 5**) und folgender Gradient (**Tabelle 6**) verwendet.

Tabelle 5: Geräteparameter der HPLC-DAD Analytik von Propranolol.

Parameter	Spezifikation
Säule	Purospher® STAR RP-18e 250 x 4,0 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt, DE)
Injektionsvolumen	75 µL
Ofentemperatur	30 °C
Autosampler Temperatur	8 °C
Detektionswellenlänge	290 nm
Fließmittel A	H ₂ O + 0,1% HCOOH
Fließmittel B	95% MeCN
Fluss	1,00 mL/min

Tabelle 6: Gradient für die HPLC-DAD Analytik von Propranolol.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	70	30
8	70	30
10	20	80
13	20	80
15	70	30
19	70	30

2.1.4.7 Fluorimetrie

Die Kalibrierung (0,02 bis 100 µg/mL) und Gehaltsbestimmung von FITC-Dextran erfolgte fluorimetrisch mit Hilfe eines TECAN-Plattenlesegeräts. Dafür wurden die während des Experiments unter Lichtausschluss gelagerten Proben in eine 96-Well-Platte pipettiert (je 150 µL, n = 3; Probe t = 0 h und 5 h, n = 1) und sofort vermessen (Anregungswellenlänge: 495 nm, Emissionswellenlänge: 519 nm).

2.1.4.8 Berechnungen

2.1.4.8.1 Scheinbarer Permeabilitätskoeffizient

Die Konzentrationen zum jeweiligen Entnahmzeitpunkt wurden durch die Kalibrierfunktionen ermittelt. Da die ermittelten Konzentrationen im Akzeptorkompartiment zum Zeitpunkt der Entnahmen um diejenige Substanzmenge vermindert waren, die der Bestimmung durch vorhergehende Probennahmen entzogen worden waren, erfolgte zunächst eine Berechnung

der theoretischen Konzentrationen zu den einzelnen Entnahmezeitpunkten. Dazu wurde die reale Konzentration im basolateralen Kompartiment zum Entnahmezeitpunkt errechnet und mit den zu vorherigen Zeitpunkten entnommenen absoluten Mengen addiert. Die ermittelte theoretische Konzentration wurde in einem Diagramm gegen die Zeit aufgetragen und Steigung der Geraden wurde mittels linearer Regression bestimmt. Der nun ablesbare Wert der Steigung entspricht dem Wert des zeitabhängigen Substanzflusses durch den Monolayer.

Anschließend wurden für alle Testsubstanzen und Kontrollen die scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten nach **Formel 2** berechnet¹⁶².

Formel 2: Formel zur Berechnung von scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten.

$$P_{app} = \frac{V_{AK}}{A \times c_0} \times \frac{dc}{dt}$$

- P_{app} : Scheinbarer Permeabilitätskoeffizient [cm/s]
 V_{AK} : Volumen des Akzeptorkompartiments [cm³]
 A : Oberfläche des Transwell®-Inserts [cm²]
 c_0 : Anfangskonzentration [μmol/cm³]
 dc/dt : Substanzfluss A→B bzw. B→A [μmol/cm³ x s]

2.1.4.8.2 Prozentualer Transport

Wie viel Prozent Substanz zu jedem Zeitpunkt transportiert wurde, wurde mit **Formel 3** ermittelt und anschließend in einem Diagramm veranschaulicht, um Hinweise auf mögliche Transportmechanismen zu bekommen.

Formel 3: Formel zur Berechnung des Prozentualen Transportes [%].

$$\text{Prozentualer Transport [\%]} = \frac{Q_B}{(c_S \times V_{DK})} \times 100$$

- Prozentualer Transport: transportierte Menge pro Zeit [%]
 V_{DK} : Volumen des Donorkompartiments [mL]
 Q_B : Substanzmenge im Akzeptorkompartiment [μmol]
 c_S : Konzentration im Donorkompartiment [μmol/mL]

2.1.5 Caco-2-Metabolisierungsversuch

Die Caco-2-Resorptionsversuche dienten als Basis zur Etablierung der Caco-2-Metabolisierungsversuche, bei denen statt der Absorption von Testsubstanzen vor allem deren Umsetzung zu potenziellen Phase I und II Metaboliten durch Enzyme im Dünndarmepithel im Vordergrund stand. Der Versuch wurde basierend auf der Arbeit von Luo et al. angepasst und erweitert¹⁶⁴. Eine schematische Übersicht der durchgeführten Versuche ist in **Abbildung 11** gezeigt.

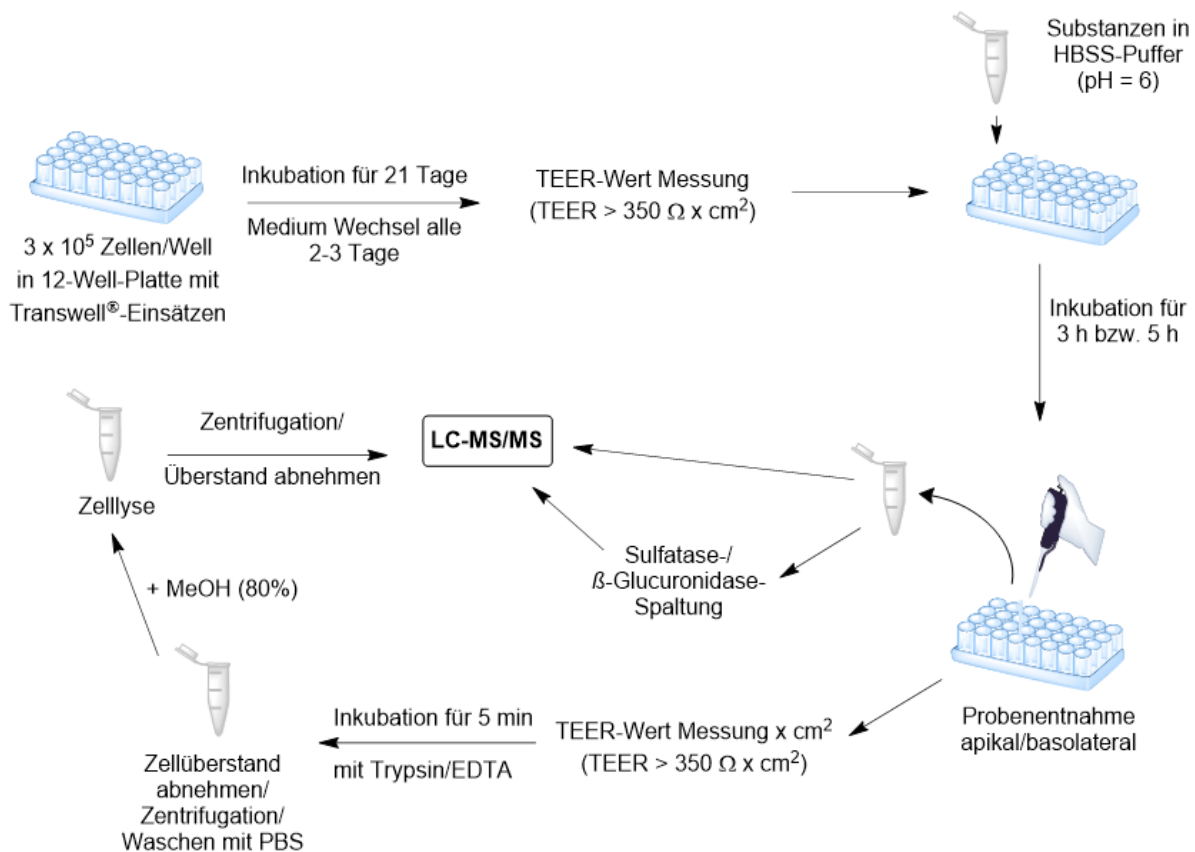


Abbildung 11: Schematischer Ablauf des Caco-2-Metabolisierungsversuchs unter Einbeziehung der Sulfatase/β-Glucuronidase-Spaltung mit anschließender Zelllyse.

2.1.5.1 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung für den Caco-2-Metabolisierungsversuch fand analog zu der Kultivierung im Caco-2-Resorptionsversuch statt (vgl. **2.1.4.1**). Auch hier wurden 3 x 10⁵ Zellen/Well ausgesät und insgesamt 21- 28 Tage inkubiert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

2.1.5.2 Ermittlung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Die TEER-Werte wurden analog zum Caco-2-Resorptionsversuch bestimmt (vgl. 2.1.4.2). Für den Versuch wurden auch hier ausschließlich Monolayer mit TEER-Werten $\geq 350 \Omega \times \text{cm}^2$ verwendet.

2.1.5.3 Durchführung der Metabolisierungsversuche

Für die Caco-2-Metabolisierungsversuche wurden Zellen der Passagen 28 bis 45 verwendet. Das Medium wurde 24 h vor dem Versuch ein letztes Mal gewechselt, um eine maximale Viabilität der Zellen sicher zu stellen. Am Versuchstag wurde zunächst der TEER-Wert ermittelt. Um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen, wurde HBSS-Puffer durch 1 N HCl auf zwei verschiedenen pH-Werte eingestellt (pH = 6 und 7,4) und anschließend sterilfiltriert. Durch Verdünnen der Stammlösungen (20 mM in DMSO) der Testsubstanzen in HBSS-Puffer (pH = 6) wiesen die Flavonoid C-Glykoside eine Endkonzentration von 10 bzw. 100 μM auf, während die Biflavonoide aufgrund der Ergebnisse des MTT-Assays mit einer Endkonzentration von 50 μM verwendet wurden. Um die Löslichkeit im wässrigen HBSS-Puffer zu erhöhen, wurden bei den Verdünnungen der Biflavonoide zusätzlich 0,125% (V/V) Tween 80 zugegeben. Der noch enthaltene HBSS-Puffer wurde vorsichtig abdekantiert und die Inserts wurden in eine neue 12-Well-Platte überführt, in der bereits 1,5 mL HBSS-Puffer in jedem basolateralen Kompartiment vorgelegt waren. Nun wurden 700 μL der Testlösungen apikal aufgegeben und sofort wieder 200 μL entfernt, um die Verdünnung durch den Rest an HBSS-Puffer im Well zu berücksichtigen. Anschließend wurden die Platten 3 bzw. 5 h (C-Glykoside: 3 und 5 h; Biflavonoide: 3 h) im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchte). Nach Beendigung des Versuchs wurden die Platten aus dem Inkubator genommen, die basolateralen bzw. apikalen Lösungen abgenommen und in Schnappdeckelgläser überführt. Danach wurden die jeweiligen Kompartimente zweimal mit HBSS-Puffer gewaschen und ebenfalls in die jeweiligen Schnappdeckelgläser gegeben. Die Lösungen wurden anschließend bei -80 °C eingefroren, lyophilisiert und bis zur Vermessung per UHPLC-DAD-MS bei -20 °C gelagert. Zur Ermittlung der TEER-Werte nach dem Versuch wurden beide Kompartimente erneut mit HBSS-Puffer versetzt und für 20 min in den Inkubator gegeben. Dann wurden die TEER-Werte wie bereits beschrieben gemessen, um die Integrität der Zell-Monolayer während der Versuche zu überprüfen. Als Kontrolle wurde pro Platte eine Blindprobe mitgeführt, die genauso behandelt wurde wie die Test-Inserts, nur keine Testsubstanzen enthielten. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass die Zellen eigenständig Stoffe exprimieren, die anschließend ein falsch positives Ergebnis bei der Suche nach Metaboliten liefern. Die Versuche wurden für jede Testsubstanz, Konzentration und Inkubationszeit an drei unabhängigen Tagen durchgeführt (n = 3).

2.1.5.4 Zellyse

Um potenzielle Metaboliten der Testsubstanzen innerhalb der Zelle nachweisen zu können, wurden die Zellen am Ende des Metabolisierungsversuchs lysiert. Dafür wurden die Zellschalen zweimal mit 500 µL PBS gewaschen und anschließend mit 200 µL Trypsin/EDTA für ca. 10 min inkubiert. Die Zellen wurden durch Auf- und Abpipettieren aus dem Well abgelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Danach wurden die Inserts zweimal mit 500 µL PBS gewaschen, um alle Zellen vollständig abzulösen und auch die Waschlösung wurde in die jeweiligen Reaktionsgefäße überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert (10000 U/min, 5 min) und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde mit 1 mL PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurden 400 µL 80%iges (V/V) MeOH auf das Zellpellet pipettiert und für 10 min in das Ultraschallbad gegeben. Die lysierten Zellen wurden anschließend noch einmal zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen, in HPLC-Vials überführt und unter Stickstoff getrocknet. Die Proben wurden bis zur Vermessung per UHPLC-DAD-MS bei -20 °C gelagert.

2.1.5.5 Sulfatase- und β -Glucuronidasespaltung

Zur Identifizierung und Verifizierung der Aglyka einiger beim Caco-2-Metabolisierungsversuch erhaltener Phase II Metaboliten der Flavonoid C-Glykoside wurde eine Spaltungsreaktion nach Anleitung von Untergehrer et al.¹⁶⁵ mithilfe von Sulfatase und β -Glucuronidase durchgeführt. Dafür wurden 1,2 mg Sulfatase zu 100 µL Metabolit-Probe gegeben und durch schütteln für ca. 5 min in einem Reaktionsgefäß gelöst. Dieser Lösung wurden 150 µL einer 2 M Natriumacetat Lösung, welche 10 mg/mL β -Glucuronidase enthielt und auf pH = 5 eingestellt war, zugesetzt. Der Versuchsansatz wurde auf 1 mL mit Natriumacetat-Essigsäure-Puffer aufgefüllt, enthielt somit final 35 U Sulfatase und 3050 U β -Glucuronidase und wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach 3 h wurde die Reaktion mit 1 mL eiskaltem EtOH gestoppt und 5 min gevortext. Danach wurde die Suspension zentrifugiert (14000 U/min, 5 min), der Überstand wurde abgenommen und im Stickstoff-Strom getrocknet. Die Proben wurden bis zur Vermessung an der UHPLC-DAD-MS bei -20 °C aufbewahrt und der Versuch wurde an drei unabhängigen Tagen mit neuen Metabolit-Proben durchgeführt (n = 3).

2.1.5.6 Stabilitätsmessungen im Testpuffer

Um die Stabilität aller Testsubstanzen während der Caco-2-Metabolisierungsversuche (und der Caco-2-Resorptionsversuche) sicher zu stellen, wurden diese über 5 h in Versuchspuffer (HBSS, pH = 6) im Brutschrank inkubiert. Dafür wurden die Stammlösungen (20 mM in DMSO) in HBSS-Puffer (pH = 6) auf eine Endkonzentration von 10 µM verdünnt. Dann wurden je 2 mL

der Testlösungen in eine frische 12-Well-Zellkulturplatte gegeben und sofort wieder 200 µL ($t_0 = 0$ h) entnommen und an der HPLC-DAD vermessen. Die Platte wurde nun für 5 h in den Inkubator gegeben, wobei jeweils zu den Zeitpunkten $t_x = 1, 2, 3, 4$ und 5 h ein Aliquot von 200 µL entnommen und sofort an der HPLC vermessen wurde. Zur Bestimmung der Stabilität, wurde die Fläche des jeweiligen Peaks zum Zeitpunkt t_0 als 100% definiert. Alle Peaks zu den Zeitpunkten t_x wurden gegen diese Fläche ins Verhältnis gesetzt. Damit konnte der relative prozentuale Gehalt zum jeweiligen Zeitpunkt mittels **Formel 4** ermittelt werden. Alle Messungen wurden dreimal an drei unabhängigen Tagen mit frischen Lösungen durchgeführt ($n = 3$). Die Peakflächen wurden durch manuelle Integration mit der Software EZChrom Elite 3.1.7 erhoben.

Formel 4: Formel zur Bestimmung des relativen prozentualen Gehalts bei der Stabilitätsmessung.

$$\text{Gehalt [\%]} = \frac{\text{Peakfläche}_{t=x}}{\text{Peakfläche}_{t=0}}$$

Zur Bestimmung der Peakflächen der jeweiligen Lösungen wurden folgende HPLC-DAD-Methoden verwendet:

Flavonoid C-Glykoside

Für die HPLC-DAD (Elite LaChrom, Hitachi, Tokio, Japan) Analytik der C-Glykoside wurden folgende Geräteparameter (**Tabelle 7**) und folgender Gradient (**Tabelle 8**) verwendet.

Tabelle 7: Geräteparameter der HPLC-DAD Analytik zur Stabilitätsmessung der Flavonoid C-Glykoside.

Parameter	Spezifikation
Säule	Kinetex® Biphenyl 250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å (Phenomenex Inc., Torrance, USA)
Injektionsvolumen	30 µL
Ofentemperatur	25 °C
Autosampler Temperatur	10 °C
Detektionswellenlänge	340 nm
Fließmittel A	H ₂ O + 0,1% TFA
Fließmittel B	MeCN + 0,1% TFA
Fluss	1,20 mL/min

Tabelle 8: Gradient der HPLC-DAD Analytik zur Stabilitätsmessung der Flavonoid C-Glykoside.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	90	10
2	90	10
10	0	100
11	90	10
15	90	10

Biflavonoide

Für die HPLC-DAD (Elite LaChrom, Hitachi, Tokio, Japan) Analytik der Biflavonoide wurden folgende Geräteparameter (**Tabelle 9**) und folgender Gradient (**Tabelle 10**) verwendet.

Tabelle 9: Geräteparameter der HPLC-DAD Analytik zur Stabilitätsmessung der Biflavonoide.

Parameter	Spezifikation
Säule	Kinetex® Biphenyl 250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å (Phenomenex Inc., Torrance, USA)
Injektionsvolumen	30 µL
Ofentemperatur	25 °C
Autosampler Temperatur	10 °C
Detektionswellenlänge	340 nm
Fließmittel A	H ₂ O + 0,1% TFA
Fließmittel B	MeCN + 0,1% TFA
Fluss	1,20 mL/min

Tabelle 10: Gradient für die HPLC-DAD Analytik zur Stabilitätsmessung der Biflavonoide.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	70	30
2	70	30
10	0	100
11	70	30
15	70	30

2.1.5.7 UHPLC-DAD-MS Analytik

Zur Identifizierung von potenziellen Phase I und II Metaboliten, wurden die Metabolit-Proben per UHPLC-DAD-MS analysiert und mit Datenbanken (vgl. 8. Anhang) verglichen, die alle möglichen Metaboliten und deren exakte Masse enthielten. Die detektierten Phase II Metaboliten wurden anschließend durch UHPLC-DAD-MS/MS Analytik überprüft.

2.1.5.7.1 Probenvorbereitung

Die apikalen und basolateralen Proben und die Zelllysate des Caco-2-Metabolisierungsversuchs wurden jeweils in 50%igem (V/V) MeOH (HPLC grade®) aufgenommen. Alle Probenlösungen wurden vor der Messung in Braunglasvials filtriert (0,2 µm) und anschließend vermessen.

2.1.5.7.2 UHPLC-DAD-MS Methode

Zur Messung der Metabolit-Proben per UHPLC-DAD-MS wurden folgende Methoden für die Analyse der Flavonoid C-Glykoside bzw. der Biflavonoide verwendet:

Flavonoid C-Glykoside

Für die UHPLC-DAD-MS (Agilent 1290 Infinity LC System mit Q-TOF 6540 UHD, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) Analytik der Flavonoid C-Glykoside wurden folgende Geräteparameter (vgl. **Tabelle 11** und **Tabelle 12**) und folgender Gradient (**Tabelle 13**) verwendet.

Tabelle 11: Geräteparameter der UHPLC-DAD-MS Analytik der Flavonoid C-Glykoside.

Parameter	Spezifikation
Säule	YMC Triart C18; 1,9 µm, 75 x 2 mm, 12 nm (YMC Europe, Dinslaken, DE)
Injektionsvolumen	1,0 µL
Ofentemperatur	50 °C
Autosampler Temperatur	10 °C
Detektionswellenlänge	190-640 nm
Fließmittel A	H ₂ O + 0,1% HCOOH
Fließmittel B	MeCN + 0,1% HCOOH
Fluss	0,6 mL/min

Tabelle 12: Übersicht der gewählten Massenspektrometer-Einstellungen für die Analytik der Metaboliten.

Parameter	Einstellungen
Aufnahmebereich	<i>m/z</i> 80-1200
Ionenpolarität	negativ
Scan Rate	3,00 Spektren/s
Gas-Temperatur	300 °C
Gas-Fluss	8 L/min
Nebulizer	40 psig
Hüllgas-Temperatur	300 °C
Hüllgas-Fluss	10 L/min

Tabelle 13: Gradient der UHPLC-DAD-MS Analytik der Flavonoid C-Glykoside.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	92	8
10	85	15
16	40	60
17	2	98
18	2	98
18,1	92	8
19,2	92	8

Biflavonoide

Für die UHPLC-DAD-MS (Agilent 1290 Infinity LC System mit Q-TOF 6540 UHD, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) Analytik der Biflavonoide wurden folgende Geräteparameter (vgl. **Tabelle 14** und **Tabelle 15**) und folgender Gradient (**Tabelle 16**) verwendet.

Tabelle 14: Geräteparameter der UHPLC-DAD-MS Analytik der Biflavonoide.

Parameter	Spezifikation
Säule	Luna Omega C18 50 x 2,1 mm, 1,6 µm, 100 Å (Phenomenex, Torrance, USA)
Injektionsvolumen	2,0 µL
Ofentemperatur	40 °C
Autosampler Temperatur	10 °C
Detektionswellenlänge	220-640 nm
Fließmittel A	H ₂ O + 0,1% HCOOH
Fließmittel B	MeCN + 0,1% HCOOH
Fluss	0,6 mL/min

Tabelle 15: Übersicht der gewählten Massenspektrometer-Einstellungen für die Analytik der Metaboliten.

Parameter	Einstellungen
Aufnahmebereich	<i>m/z</i> 80-1400
Ionenpolarität	negativ
Scan Rate	4,00 Spektren/s
Gas-Temperatur	300 °C
Gas-Fluss	8 L/min
Nebulizer	35 psig
Hüllgas-Temperatur	300 °C
Hüllgas-Fluss	8 L/min

Tabelle 16: Gradient der UHPLC-DAD-MS Analytik der Biflavonoide.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	95	5
8	50	50
9	2	98
10	2	98
10,1	95	5
11	95	5

2.1.5.7.3 UHPLC-DAD-MS/MS Methode

Um die gefundenen Phase II Metaboliten der eingesetzten Flavonoid C-Glykoside bzw. Biflavonoide zu überprüfen, wurden MS/MS-Spektren der relevanten Metabolit-Massen

erhoben. Dafür wurden einige der unter **2.1.5.7** bereits gemessenen Proben erneut mit den UHPLC-DAD Parametern wie in **Tabelle 11** und **Tabelle 13** für die Flavonoid C-Glykoside und in **Tabelle 14** und **Tabelle 16** für die Biflavonoide beschrieben, vermessen. In der MS-Software wurden die experimentell ermittelten Metabolit-Massen mit den jeweiligen Retentionszeiten hinterlegt, um von diesen MS/MS-Spektren anzufertigen. Für alle Massen wurden Spektren bei drei verschiedenen Stoßenergien (10, 20 und 40 eV) gemessen und Stickstoff als Stoßgas verwendet. Alle weiteren Einstellungen des Massenspektrometers sind **Tabelle 17** zu entnehmen.

Tabelle 17: Übersicht der gewählten Einstellungen des Massenspektrometers für die UHPLC-DAD-MS/MS Analytik.

Parameter	Einstellungen
Aufnahmebereich MS	<i>m/z</i> 80-1200
Ionenpolarität	negativ
Scan Rate MS	6,00 Spektren/s
Scan Rate MS/MS	8,00 Spektren/s
Gas-Temperatur	300 °C
Gas-Fluss	8 L/min
Nebulizer	40 psig
Hüllgas-Temperatur	300 °C
Hüllgas-Fluss	8 L/min

2.1.5.7.4 Datenverarbeitung

2.1.5.7.4.1 Metabolit-Datenbanken

Mögliche Metaboliten der Flavonoid C-Glykoside bzw. der Biflavonoide wurden zusammen mit den Ausgangssubstanzen in insgesamt sieben Datenbanken zusammengefasst. Dabei wurden sechs Datenbanken für die C-Glykoside (vgl. Anhang, **Tabelle 87** bis **Tabelle 92**) und nur eine für die Biflavonoide (vgl. Anhang, **Tabelle 93**) erstellt, da die drei Biflavonoide Amentoflavon, I3, II8-Biapigenin und Hinokiflavon identische Summenformel und Massen aufweisen. Die exakten Massen der jeweiligen Metaboliten wurden via ChemDraw Professional 17 bestimmt und in Microsoft Excel 2016 mit der zugehörigen Metabolit-Bezeichnung zu den jeweiligen Datenbanken zusammengetragen, welche in die Reportmethode der UHPLC-DAD-MS-Software (Masshunter B.08.00) eingepflegt wurde.

2.1.5.7.4.2 MS-Reportmethode

Die Auswertung der durch UHPLC-DAD-MS Analytik erhaltenen MS-Metabolit-Daten erfolgte mit der Software MassHunter Qualitative Analysis (B. 08.00, Agilent). Die erhaltenen MS-Rohdaten wurden zunächst mit einer Reportmethode ausgewertet (**Tabelle 18**). Dafür wurden die jeweiligen, als csv-Datei gespeicherten, Datenbanken (vgl. **2.1.5.7.4.1**) in die Reportmethode eingepflegt. Die Software errechnete dann aus den Rohdaten die „Compound Reports“, welche alle gefundenen Massen der jeweiligen Datenbank enthalten. Die bereits in den Kontrollen (ohne Testsubstanzen) gefundenen Massen wurden bei der Auswertung der Metabolit-Proben nicht berücksichtigt. Die Einstellungen wurden hierbei so gewählt, dass nur Substanzen erfasst wurden, die eine geringere Abweichung als 10 ppm gegenüber ihren errechneten Massen zeigten. Außerdem wurden nur Peaks extrahiert, deren Fläche für mehr als 1000 Counts integriert wurden.

Tabelle 18: Gewählte Einstellungen der MS-Reportmethode.

Parameter	Einstellung
MS Chromatogramm Peak Filter	≥ 1000 Counts, ≤ 10 ppm
Molecular Feature Extraktion: <i>m/z</i> Bereich	60-1600
Molecular Feature Extraktion: Ionenladung	negativ
Molecular Feature Extraktion: Zugelassene Ionen	$-H^+$, $+CH_3COO^-$

2.1.5.7.4.3 Auswertung der MS/MS-Daten

Zur Überprüfung der ermittelten Phase II Metaboliten wurden MS/MS-Spektren der relevanten Massen angefertigt. Diese Massen wurden der MS-Software mit relevanter Retentionszeit ($\pm 0,3$ min) angegeben. Als Stoßgas wurde Stickstoff verwendet und es wurden alle Stoßenergien (10, 20 und 40 eV) mit einbezogen. Die so identifizierten Peaks wurden integriert und das MS/MS-Spektrum davon extrahiert.

2.1.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Zelltests wurden zuerst mit Microsoft Excel ausgewertet. Hierfür wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung ermittelt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der IBM SPSS Statistics 25 Software. Die Daten wurden zuerst auf Normalverteilung getestet und anschließend wurden mittels ungepaarten t-Tests zwei unabhängige Mittelwerte miteinander verglichen. Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen einzelnen unabhängigen Mittelwerten und einem Kontrollwert wurde eine einfaktorielle

Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey-HSD post-hoc Test durchgeführt. P-Werte ≤ 0.05 wurden bei den Permeabilitätskoeffizienten als signifikant angesehen. Beim MTT-Assay wurden die Signifikanzlevel als signifikant $*p < 0,05$, sehr signifikant $**p < 0,01$ und hochsignifikant $***p < 0,001$ angegeben.

2.2 *In vitro* Lebermetabolisierung

Zur Untersuchung der *in vitro* Lebermetabolisierung von Flavonoid C-Glykosiden wurden zwei verschiedene subzelluläre Leberfraktionen verwendet. Die schematische Durchführung der Versuche ist dabei in **Abbildung 12** dargestellt.

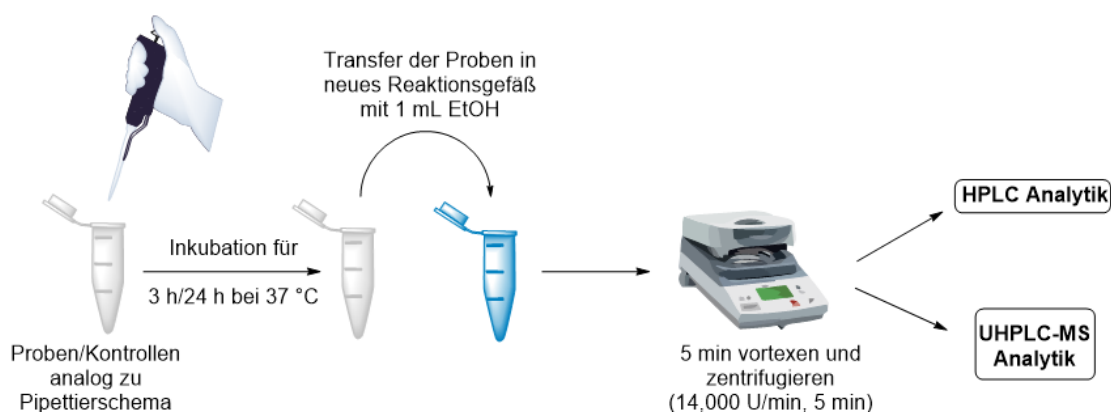


Abbildung 12: Schematischer Ablauf der *in vitro* Lebermetabolisierung durch humane Lebermikrosomen bzw. humaner Leber S9 Fraktion.

2.2.1 Humane Lebermikrosomen

Der Versuch wurde angelehnt an die bei Yan und Caldwell¹⁶⁶ beschriebene Prozedur durchgeführt und leicht verändert.

2.2.1.1 Herstellung der Versuchslösungen

Zur Metabolisierung durch humane Lebermikrosomen (HLM) wurden gemischte Mikrosomen-Proben (HMMCPL, 0,5 mL) von 50 verschiedenen erwachsenen Probanden beider Geschlechter verwendet, die eine Protein-Konzentration von insgesamt 20 mg/mL aufwiesen (ThermoFisher Scientific, Langenselbold, Deutschland). Diese wurden aliquotiert und portionsweise bei -80 °C gelagert, um Frost-Tau-Zyklen zu vermeiden.

Von allen anderen benötigten Reagenzien wurden Stammlösungen hergestellt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Stammlösungen von Glucose-6-Phosphat (110 mM, Glc-6-P), Magnesiumchlorid (110 mM, MgCl₂), Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (43 mM, NADP) und Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure (40 mM, UDPGA) wurden in PBS-Puffer hergestellt. Die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Glc-6-PDH) wurde in 5 mM Natrium-Citrat-Lösung zu einer Konzentration von 40 U/mL verdünnt. Das porenbildende Peptid Alamethicin (Ala) wurde in MeOH gelöst und in Reinstwasser (2% MeOH, V/V) weiter auf eine Endkonzentration von 0,5 mg/mL eingestellt. Die Positivkontrolle 7-Ethoxycumarin (7-EC) wurde in MeOH gelöst (100 mM). Von allen Testsubstanzen wurde eine Stammlösung in DMSO (20 mM) vorbereitet.

2.2.1.2 Inkubationssysteme

Zur Identifizierung eines möglichst breiten Spektrums an Metaboliten, wurden verschiedene Inkubationssysteme verwendet, um sowohl Phase I, als auch Phase II Reaktionen zu untersuchen. Im Falle der HLM sind die Phase II Reaktionen auf UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs) beschränkt, da nur Membran gebundene Enzyme in der microsomalen Fraktion zu finden sind. Phase I und II Reaktionen (Ph I, Ph II) können entweder separat, durch Zugabe von NADP (Ph I) bzw. UDPGA (Ph II), untersucht werden oder in Kombination (Ph I+II) durch Koaktivierung der UGTs und der Phase I Enzyme¹⁶⁶. Zusätzlich wurden zwei Negativkontrollen, ohne HLM (w/o HLM) oder ohne Cofaktoren (w/o Cof), mit jedem Probensatz mitgeführt, um falsche positive Ergebnisse aufgrund unspezifischer Reaktionen zu vermeiden. Außerdem wurde mit jedem Probensatz eine Stabilitätskontrolle (Stabi) der jeweiligen Testsubstanz und eine Matrixkontrolle (Matrix) mitgeführt. Zur Überprüfung der Inkubationssysteme und Enzymaktivitäten wurden diese im Vorfeld durch die Positivkontrolle 7-Ethoxycumarin (7-EC) auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. 7-EC gilt als weit verbreitete Kontrollsubstanz für *in vitro* Metabolisierungsstudien, da sowohl oxidativer Metabolismus (Hydroxylierung, Deethylierung), als auch enzymatische Konjugation mit Glucuronsäure beschrieben ist¹⁶⁷.

Das Pipettierschema aller Inkubationssysteme ist in **Tabelle 19** dargestellt. Zur Durchführung der Phase I Metabolisierung wurde ein NADPH Regenerationssystem benutzt, das aus 3,3 mM MgCl₂, 3,3 mM Glc-6-P, 0,4 U/mL Glc-6-PDH und 1,3 mM NADP besteht. Zur Aktivierung der UGTs, wurde für die Phase II Metabolisierung zusätzlich 2 mM UDPGA zugegeben. Außerdem wurden zur Vereinfachung der Glucuronidierungsreaktion der Porenbildner Ala (25 µg/mL) zugesetzt, welcher es dem Substrat ermöglicht bis zum aktiven Zentrum des Enzyms vorzudringen, um dort umgesetzt zu werden. Für die Positivkontrolle

7-EC wurde in den Inkubationssystemen eine Endkonzentration von 250 μM verwendet, während von den Testsubstanzen je 100 μM eingesetzt wurden.

Tabelle 19: Pipettierschema für alle verwendeten Inkubationssysteme; Volumina in μL .

	Matrix	Stabi	w/o HLM	w/o Cof	Ph I	Ph II	Ph I+II
PBS	775	990	790	845	865	835	765
MgCl₂	30	-	30	30	30	30	30
Glc-6-P	30	-	30	30	30	-	30
Glc-6-PDH	10	-	10	10	10	-	10
Ala	50	-	50	50	-	50	50
HLM	25	-	-	25	25	25	25
[Stock]	-	10	10	10	10	10	10
NADP	30	-	30	-	30	-	30
UDPGA	50	-	50	-	-	50	50

Alle Reagenzien wurden schonend aufgetaut und während des Experiments auf Eis gelagert. Zuerst wurde die jeweilige Menge vorgewärmter (Raumtemperatur) PBS-Puffer in 2 mL Reaktionsgefäße gegeben. Alle Versuchslösungen wurden nach **Tabelle 19** in absteigender Reihenfolge pipettiert. Nach Zugabe der HLM wurde die Suspension leicht gevortext und anschließend für 5 min in das auf 37 °C vorgeheizte Wasserbad gegeben. Danach wurden die Testsubstanzen zugegeben und nochmal leicht gemischt. Durch Zugabe der Cofaktoren, NADP und/oder UDPGA, wurde die Reaktion gestartet. Die Proben wurden 3 h bzw. 24 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zum Beenden der Reaktion, wurden die Proben aus dem Wasserbad genommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 1 mL eiskalter EtOH im Fall der Testsubstanzen oder 200 μL 5%ige (V/V) HCl im Fall von 7-EC vorgelegt war. Danach wurden alle Proben für 5 min gevortext und anschließend zentrifugiert (14000 U/min). Der Überstand wurde in HPLC-Vials überführt und bis zur HPLC-DAD bzw. UHPLC-DAD-MS Analyse bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Humane Leber S9 Fraktion

Die Metabolisierung durch humane Leber S9 Fraktion (S9F) wurde in leicht abgewandelter Form zu **2.2.1** durchgeführt^{166,168}.

2.2.2.1 Herstellung der Versuchslösungen

Zur Metabolisierung durch humane Leber S9 Fraktion (S9F) wurden gemischte S9F-Proben (HMS9PL, 1,0 mL) von verschiedenen erwachsenen Probanden beider Geschlechter verwendet, die eine Protein-Konzentration von insgesamt 20 mg/mL aufwiesen (ThermoFisher Scientific, Langenselbold, Deutschland). Diese wurden aliquotiert und portionsweise bei -80 °C gelagert, um Frost-Tau-Zyklen zu vermeiden.

Von allen anderen benötigten Reagenzien wurden Stammlösungen hergestellt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Stammlösungen von Glc-6-P, MgCl_2 , NADP, UDPGA, Ala, Glc-6-PDH und 7-EC wurden analog zu **2.2.1.1** hergestellt. Die Lösung von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (2 mM, PAPS) wurde ebenfalls in PBS-Puffer hergestellt.

2.2.2.2 Inkubationssysteme

Die Inkubationssysteme wurden gemäß der unter **2.2.1.2** für HLM beschriebenen Systeme entwickelt. Auch hier sollten sowohl Phase I, als auch Phase II Reaktionen untersucht werden. Da bei den HLM die Phase II Reaktionen jedoch auf die UGTs beschränkt sind, sollte mit der Leber S9 Fraktion ein größeres Spektrum an Phase II Enzymen abgedeckt werden. Zusätzlich zu den Membran-gebundenen Enzymen können in der S9F auch cytosolische Enzyme, wie die Sulfotransferasen (SULTs), gefunden werden. Auch hier werden die Phase I und II Reaktionen (Ph I, Ph II) getrennt, durch Zugabe von NADP (Ph I) oder UDPGA und PAPS (Ph II) oder gemeinsam (Ph I+II) durch Koaktivierung von Phase I und II Enzymen untersucht. Zusätzlich werden die Glucuronidierungsreaktionen durch UGTs (Ph II [UGT]) und die Sulfatierungsreaktionen durch SULTs (Ph II [SULT]) nochmal getrennt voneinander durch Zugabe von UDPGA (Ph II [UGT]) bzw. PAPS (Ph II [SULT]) betrachtet. Außerdem wurden zwei Negativkontrollen, ohne S9F (w/o S9F) oder ohne Cofaktoren (w/o Cof), mit jedem Probensatz mitgeführt, um falsch positive Ergebnisse aufgrund unspezifischer Reaktionen zu vermeiden. Zudem wurde mit jedem Probensatz eine Stabilitätskontrolle (Stabi) der jeweiligen Testsubstanz und eine Matrixkontrolle (Matrix) mitgeführt. Zur Überprüfung der Inkubationssysteme und Enzymaktivitäten wurden diese, analog zu den HLM, im Vorfeld durch die Positivkontrolle 7-Ethoxycumarin (7-EC) auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. 7-EC gilt als weit verbreitete Kontrollsubstanz für *in vitro* Metabolisierungsstudien, da sowohl oxidativer Metabolismus (Hydroxylierung, Deethylierung), als auch enzymatische Konjugation mit Glucuronsäure und Sulfat beschrieben ist¹⁶⁸.

Das Pipettierschema der verwendeten Inkubationssysteme ist in **Tabelle 20** dargestellt. Zur Durchführung der Phase I Metabolisierung wurde wie auch bei den HLM (vgl. **2.2.1.2**) ein Inkubationssystem aus 3,3 mM MgCl_2 , 3,3 mM Glc-6-P, 0,4 U/mL Glc-6-PDH und 1,3 mM

NADP verwendet. Zur Aktivierung der UGTs bzw. SULTs, wurden für die Phase II Metabolisierung zusätzlich 2 mM UDPGA bzw. 2 mM PAPS zugegeben. Zur Vereinfachung der Glucuronidierungsreaktion, wurde auch hier der Porenbildner Ala (25 µg/mL) zugesetzt. Für die Positivkontrolle wurde in den Inkubationssystemen eine Endkonzentration von 250 µM verwendet, während von den Testsubstanzen je 100 µM eingesetzt wurden.

Tabelle 20: Pipettierschema für alle verwendeten Inkubationssysteme; Volumen in µL.

	Matrix	Stabi	w/o S9F	w/o Cof	Ph I	Ph II [UGT]	Ph II [SULT]	Ph II	Ph I+II
PBS	700	990	740	820	840	810	810	760	690
MgCl₂	30	-	30	30	30	30	30	30	30
Glc-6-P	30	-	30	30	30	-	-	-	30
Glc-6-PDH	10	-	10	10	10	-	-	-	10
Ala	50	-	50	50	-	50	50	50	50
S9F	50	-	-	50	50	50	50	50	50
[Stock]	-	10	10	10	10	10	10	10	10
NADP	30	-	30	-	30	-	-	-	30
UDPGA	50	-	50	-	-	50	-	50	50
PAPS	50	-	50	-	-	-	50	50	50

Alle Reagenzien wurden schonend aufgetaut und während des Experiments auf Eis gelagert. Zuerst wurde die jeweilige Menge vorgewärmter (RT) PBS-Puffer in 2 mL Reaktionsgefäße gegeben. Alle Versuchslösungen wurden nach **Tabelle 20** in absteigender Reihenfolge pipettiert. Nach Zugabe der S9F wurde die Suspension leicht gevortext und anschließend für 5 min in das auf 37 °C vorgeheizte Wasserbad gegeben. Danach wurden die Testsubstanzen zugesetzt und nochmal leicht gemischt. Durch Zugabe der Cofaktoren, NADP bzw. UDPGA bzw. PAPS, wurde die Reaktion gestartet. Die Proben wurden 3 h bzw. 24 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zum Beenden der Reaktion, wurden die Proben aus dem Wasserbad genommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 1 mL eiskalter EtOH im Fall der Testsubstanzen oder 200 µL 5%ige (V/V) HCl im Fall von 7-EC vorgelegt war. Danach wurden alle Proben für 5 min gevortext und anschließend zentrifugiert (14000 U/min). Der Überstand wurde in HPLC-Vials überführt und bis zur HPLC-DAD bzw. UHPLC-DAD-MS Analytik bei -20 °C gelagert.

2.2.3 HPLC-DAD Analytik

Die durch HLM und S9F metabolisierten Proben der Testsubstanzen und der Positivkontrolle 7-EC wurden via HPLC-DAD analysiert.

7-Ethoxycumarin

Für die HPLC-DAD (Elite LaChrom, Hitachi, Japan) Analytik von 7-EC wurden folgende Geräteparameter (vgl. **Tabelle 21**) und folgender Gradient (vgl. **Tabelle 22**) verwendet.

Tabelle 21: Geräteparameter der HPLC-DAD Analytik von 7-EC.

Parameter	Spezifikation
Säule	Purospher® STAR RP-18e 250 x 4,0 mm, 5 µm (Merck, Darmstadt, DE)
Injektionsvolumen	30 µL
Ofentemperatur	40 °C
Autosampler Temperatur	8 °C
Detektionswellenlänge	320 nm
Fließmittel A	H ₂ O + 0,1% HCOOH
Fließmittel B	95% MeCN
Fluss	1,00 mL/min

Tabelle 22: Gradient der HPLC-DAD Analytik von 7-EC.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	90	10
20	40	60
22	40	60
25	90	10
30	90	10

Flavonoid C-Glykoside

Zur Untersuchung der metabolisierten Proben der Flavonoid C-Glykoside wurden folgende Geräteparameter (vgl. **Tabelle 23**) und folgender Gradient (vgl. **Tabelle 24**) verwendet.

Tabelle 23: Geräteparameter HPLC-DAD Analytik der Flavonoid C-Glykoside.

Parameter	Spezifikation
Säule	Kinetex® Biphenyl 250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å (Phenomenex Inc., Torrance, USA)
Injektionsvolumen	20 µL
Ofentemperatur	25 °C
Autosampler Temperatur	10 °C
Detektionswellenlänge	340 nm
Fließmittel A	H ₂ O + 0,1% TFA
Fließmittel B	MeCN + 0,1% TFA
Fluss	1,20 mL/min

Tabelle 24: Gradient der HPLC-DAD Analytik der Flavonoid C-Glykoside.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	90	10
2	90	10
15	30	70
16	90	10
20	90	10

2.2.4 UHPLC-DAD-MS Analytik

Zur Identifizierung von potenziellen durch *in vitro* Lebermetabolisierung (HLM bzw. S9F) erhaltenen Phase I und Phase II Metaboliten der Positivkontrolle und der Flavonoid C-Glykoside, wurden die Metabolit-Proben per UHPLC-DAD-MS analysiert. Die detektierten Phase II Metaboliten wurden anschließend per UHPLC-DAD-MS/MS Analytik überprüft. Die Messungen wurden von Mitarbeitern der Zentralen Analytik (Fakultät Chemie und Pharmazie) durchgeführt.

2.2.4.1 UHPLC-DAD-MS Methode

7-Ethoxycumarin

Für die UHPLC-DAD-MS (Agilent 1290 Infinity LC System mit Q-TOF 6540 UHD, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) Analytik von 7-EC wurden folgende Geräteparameter (vgl. **Tabelle 25** und **Tabelle 26**) und folgender Gradient (vgl. **Tabelle 27**) verwendet.

Tabelle 25: Geräteparameter der UHPLC-DAD-MS Analytik von 7-EC.

Parameter	Spezifikation
Säule	Luna Omega Polar C18 50 x 2,1 mm, 1,6 µm, 100 Å (Phenomenex, Torrance, USA)
Injektionsvolumen	0,6 µL
Ofentemperatur	40 °C
Autosampler Temperatur	10 °C
Detektionswellenlänge	190-640 nm
Fließmittel A	H ₂ O + 0,1% HCOOH
Fließmittel B	MeCN + 0,1% HCOOH
Fluss	0,6 mL/min

Tabelle 26: Übersicht der gewählten Massenspektrometer-Einstellungen für die Analytik der Metaboliten.

Parameter	Einstellungen
Aufnahmebereich	<i>m/z</i> 80-1100
Ionenpolarität	negativ und positiv
Scan Rate	4,00 Spektren/s
Gas-Temperatur	300 °C
Gas-Fluss	8 L/min
Nebulizer	35 psig
Hüllgas-Temperatur	300 °C
Hüllgas-Fluss	10 L/min

Tabelle 27: Gradient der UHPLC-DAD-MS Analytik von 7-EC.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	100	0
1	100	0
6	2	98
7	2	98
7	100	0
8	100	0

Flavonoid C-Glykoside

Für die UHPLC-DAD-MS (Agilent 1290 Infinity LC System mit Q-TOF 6540 UHD, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) Analytik der Flavonoid C-Glykoside wurden folgende

Geräteparameter (vgl. **Tabelle 28** und **Tabelle 29**) und folgender Gradient (**Tabelle 30**) verwendet.

Tabelle 28: Geräteparameter der UHPLC-DAD-MS Analytik der Flavonoid C-Glykoside.

Parameter	Spezifikation
Säule	Kinetex® Biphenyl 100 x 2,1 mm, 1,7 µm, 100 Å (Phenomenex, Torrance, Kalifornien, USA)
Injektionsvolumen	0,2 µL
Ofentemperatur	25 °C
Autosampler Temperatur	10 °C
Detektionswellenlänge	190-640 nm
Fließmittel A	H ₂ O + 0,1% HCOOH
Fließmittel B	MeCN + 0,1% HCOOH
Fluss	0,4 mL/min

Tabelle 29: Übersicht der gewählten Massenspektrometer-Einstellungen für die Analytik der Metaboliten.

Parameter	Einstellungen
Aufnahmebereich	<i>m/z</i> 80-1400
Ionenpolarität	negativ
Scan Rate	4,00 Spektren/s
Gas-Temperatur	300 °C
Gas-Fluss	8 L/min
Nebulizer	35 psig
Hüllgas-Temperatur	300 °C
Hüllgas-Fluss	10 L/min

Tabelle 30: Gradient der UHPLC-DAD-MS Analytik der Flavonoid C-Glykoside.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	95	5
2	95	5
15	80	20
16	2	98
17	2	98
17,1	95	5
18,1	95	5

2.2.4.2 UHPLC-DAD-MS/MS Methode

Um die gefundenen Phase II Metaboliten der eingesetzten Flavonoid C-Glykoside zu überprüfen, wurden MS/MS-Spektren der relevanten Metabolit-Massen erhoben. Dafür wurden einige der unter **2.2.4.1** bereits gemessenen Proben erneut mit den UHPLC-DAD Parametern in **Tabelle 28** und **Tabelle 30** vermessen. In der MS-Software wurden die experimentell ermittelten Metabolit-Massen mit den jeweiligen Retentionszeiten hinterlegt, um von diesen MS/MS-Spektren anzufertigen. Für alle Massen wurden Spektren bei drei verschiedenen Stoßenergien (10, 20 und 40 eV) gemessen und als Stoßgas Stickstoff verwendet. Alle weiteren Einstellungen des Massenspektrometers sind **Tabelle 31** zu entnehmen.

Tabelle 31: Übersicht der gewählten Einstellungen des Massenspektrometers für die UHPLC-DAD-MS/MS Analytik.

Parameter	Einstellungen
Aufnahmebereich MS	<i>m/z</i> 80-1200
Ionenpolarität	negativ
Scan Rate MS	6,00 Spektren/s
Scan Rate MS/MS	8,00 Spektren/s
Gas-Temperatur	300 °C
Gas-Fluss	8 L/min
Nebulizer	40 psig
Hüllgas-Temperatur	300 °C
Hüllgas-Fluss	8 L/min

2.3 Isolierung und Identifizierung von mikrosomalen Metaboliten

Zur Identifizierung der Glucuronidierungsposition mikrosomaler Metaboliten, sollten zuerst die unter **2.2.1.2** beschriebenen Inkubationssysteme optimiert und daraus entsprechende monoglucuronidierte Metaboliten isoliert werden. Der schematische Ablauf ist in **Abbildung 13** zu sehen. Die Optimierungsversuche wurden für **O**, **IO**, **V** und **IV** durchgeführt, werden aber hier nicht abgebildet. Da lediglich Metaboliten von Isoorientin isoliert werden konnten, wird hier ausschließlich auf die Optimierung und Isolierung dieser Metaboliten eingegangen.

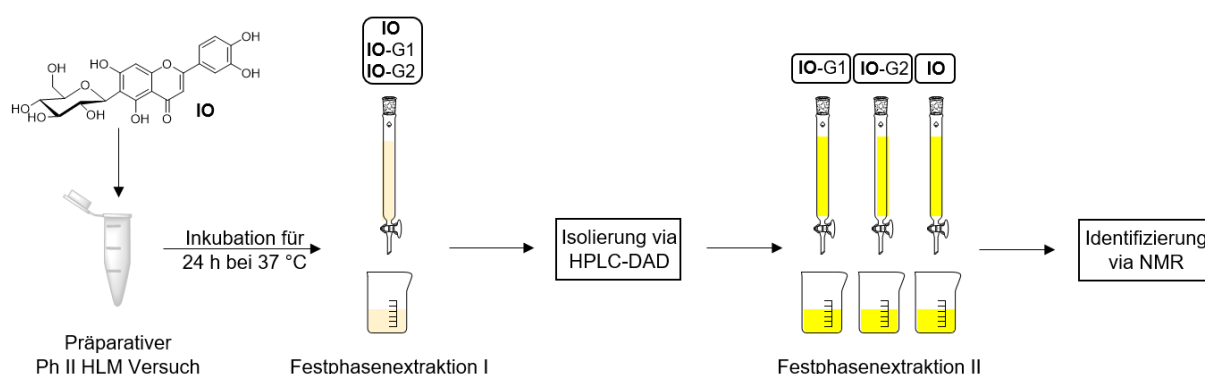


Abbildung 13: Schematischer Ablauf der Isolierung mikrosomaler Metaboliten von Isoorientin; **IO:** Isoorientin, **IO-G1:** Isoorientin-glucuronid 1, **IO-G2:** Isoorientin-glucuronid 2.

2.3.1 Hochskalierung und Optimierung des mikrosomalen Systems

Zur Optimierung wurden verschiedene Faktoren im Phase II Inkubationssystem variiert und danach analog zu **2.2.3** via HPLC-DAD vermessen. Dabei wurde die Enzymkonzentration, die Konzentration des Cofaktors UDPGA und die Inkubationszeit variiert. Letztendlich wurden die Enzymkonzentration und die Konzentration von UDPGA verdoppelt und eine Inkubationszeit von 24 h festgelegt. Das finale Inkubationssystem bestand also aus PBS, MgCl_2 (3,3 mM), Ala (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), UDPGA (4 mM, davor 2 mM), HLM (1 mg, davor 0,5 mg Protein) und Isoorientin (100 μM).

Zur Isolierung der mono-glucuronidierten Metaboliten, wurde das Inkubationssystem anschließend hochskaliert. Dafür wurde der komplette Reaktionsansatz auf 2 mL verdoppelt (vgl. **Tabelle 32**) und in 8 Reaktionsgefäßen parallel durchgeführt (insgesamt 16-facher Ansatz).

Tabelle 32: Hochskaliertes und optimiertes Inkubationssystem Ph II; Volumina in μL .

	Ph II
PBS	1470
MgCl₂	60
Ala	100
HLM	100
Isoorientin	20
UDPGA	200

Nach 24 h wurden die Proben aus dem Wasserbad genommen und durch eine Festphasenextraktion von den wasserlöslichen Reaktionsbestandteilen getrennt.

2.3.2 Festphasenextraktion

Im Verlauf der Isolierung von mikrosomalen Metaboliten, wurden zwei Festphasenextraktionen nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Die Erste wurde nach der unter **2.3.1** beschriebenen Enzymreaktion durchgeführt, die Zweite zur Abtrennung von TFA nach der Isolierung via HPLC-DAD (vgl. **2.3.3**).

Als feste Phase wurde die Festphasenkartusche Chromabond® HR-X (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) mit einer Füllmenge von 200 mg verwendet. Zur Aktivierung der Säule wurde diese zuerst mit zwei Säulenvolumen (ein Säulenvolumen = 3 mL) MeOH (HPLC-grade) gewaschen. Anschließend wurden zwei Säulenvolumen Reinstwasser durch die Säule durchlaufen gelassen bis der Meniskus direkt über dem Säulenbett lag. Dann wurde die Metabolitlösung nach und nach aufgegeben. Zum Abtrennen aller wässrigen Bestandteile (Enzyme, TFA, etc.) wurde die Säule mit einem weiteren Säulenvolumen Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurde das Säulenbett im Luftstrom getrocknet und festgedrückt. Daraufhin wurden die Metaboliten mit zweimal 1 mL MeOH vom Säulenmaterial eluiert, in einem Schnappdeckelglas aufgefangen und im Stickstoffstrom getrocknet.

2.3.3 Isolierung mittels analytischer HPLC-DAD

Zur Isolierung der mikrosomalen Metaboliten von Isoorientin, wurde der nach der Festphasenextraktion erhaltene Metabolit-Rückstand möglichst konzentriert in MeOH gelöst (10 mg/mL). Danach wurden zwei Metaboliten und die Ausgangssubstanz mit folgenden Geräteparametern (**Tabelle 33**) und folgendem Gradient (**Tabelle 34**) per HPLC-DAD (Elite LaChrom, Hitachi, Japan) isoliert.

Tabelle 33: Geräteparameter der HPLC-DAD Analytik zur Isolierung mikrosomaler Metaboliten von **IO**.

Parameter	Spezifikation
Säule	Kinetex® Biphenyl 250 x 4,6 mm, 5 µm, 100 Å (Phenomenex, Torrance, USA)
Injektionsvolumen	20 µL
Ofentemperatur	25 °C
Autosampler Temperatur	10 °C
Detektionswellenlänge	340 nm
Fließmittel A	H ₂ O + 0,1% TFA
Fließmittel B	MeCN + 0,1% TFA
Fluss	1,20 mL/min

Tabelle 34: Gradient der HPLC-DAD Analytik zur Isolierung von mikrosomalen Metaboliten von **IO**.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	90	10
2	90	10
15	30	70
16	90	10
20	90	10

Es wurden insgesamt 43 Läufe durchgeführt, bei denen jeweils drei Peaks unter Berücksichtigung des Totvolumens gesammelt wurden. Dabei wurden zwei Metabolit-Peaks bei 6,85 bzw. 7,86 min und der Peak der Ausgangssubstanz **IO** bei 8,4 min gesammelt und anschließend mittels Festphasenextraktion (**2.3.2**) von TFA befreit. Danach wurden die Proben getrocknet und bis zur Messung bei -20 °C gelagert.

2.3.4 NMR-Spektroskopie

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie sollten die Isolate anhand von 1D- (¹H, ¹³C), als auch mit 2D-Verfahren ([¹H-¹H]-COSY, [¹H-¹³C]-HSQC, [¹H-¹³C]-HMBC, [¹H-¹H]-ROESY) identifiziert werden. Dazu wurden **IO** und beide isolierte Metabolite in 0,6 ml DMSO-*d*₆ gelöst und mit Hilfe eines Avance III 600 bzw. 700 NMR-Spektrometers (Bruker, USA) vermessen. Chemische Verschiebungen (δ_H und δ_C) werden in ppm und Kopplungskonstanten *J* in Hz in tabellarischer Form angegeben. Die Messungen am Avance III 600 wurden von den Mitarbeitern der Zentralen Analytik (Fakultät Chemie und Pharmazie) durchgeführt, während die Messungen am Avance III HD 700 in der Forschungsgruppe für Biosynthese/NMR am Max-Planck-Institut

in Jena durchgeführt und ausgewertet wurden. Die NMR Daten wurden mit der Software Topspin 2.1 (Bruker, Billerica, USA) ausgewertet.

2.4 Vergleich von Hauptmetaboliten

Die durch die Caco-2-Metabolisierungsversuche und *in vitro* Lebermetabolisierung (HLM und S9F) identifizierten Hauptmetaboliten sollten mithilfe von Retentionszeiten, HPLC-Chromatogrammen und UV-Spektren verglichen werden (vgl. **Abbildung 14**). Zum Vergleich mittels Retentionszeiten wurden alle Proben mit einer einheitlichen Methode via UHPLC-DAD-MS Analytik vermessen. Die UV-Spektren wurden aus den jeweiligen HPLC-Chromatogrammen extrahiert, weswegen hier keine separate Methode aufgeführt wird (Methode vgl. **2.2.3**).

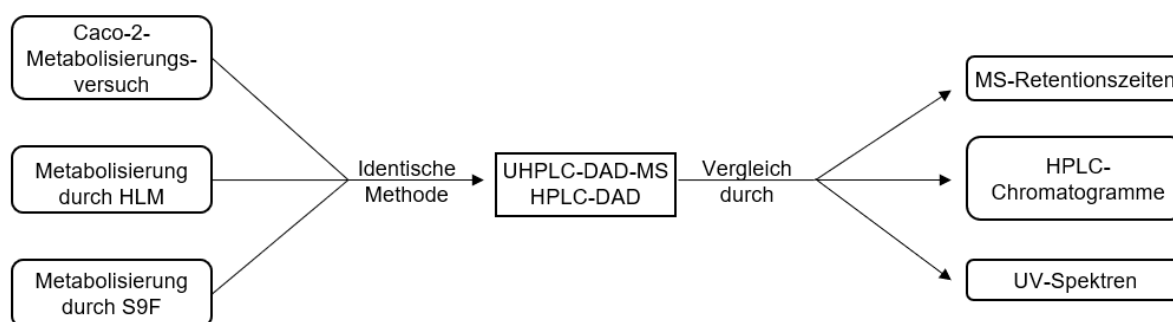


Abbildung 14: Schema zum Vergleich der Hauptmetaboliten der Caco-2-Metabolisierungsversuche und aus der Metabolisierung durch HLM bzw. S9F.

2.4.1 UHPLC-DAD-MS Analytik

Die Retentionszeiten der erhaltenen Hauptmetabolite sollten via UHPLC-DAD-MS verglichen werden.

2.4.1.1 UHPLC-DAD-MS Methode

Für die UHPLC-DAD-MS (Agilent 1290 Infinity LC System mit Q-TOF 6540 UHD, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) Analytik der Metabolitproben wurden folgende Geräteparameter (**Tabelle 35** und **Tabelle 36**) und folgender Gradient (**Tabelle 37**) verwendet.

Tabelle 35: Geräteparameter der UHPLC-DAD-MS Analytik zum Vergleich der Hauptmetabolite.

Parameter	Spezifikation
Säule	Kinetex® Biphenyl 100 x 2,1 mm, 1,7 µm, 100 Å (Phenomenex Inc., Torrance, Kalifornien, USA)
Injektionsvolumen	0,2 µL
Ofentemperatur	25 °C
Autosampler Temperatur	10 °C
Detektionswellenlänge	190-640 nm
Fließmittel A	H ₂ O + 0,1% HCOOH
Fließmittel B	MeCN + 0,1% HCOOH
Fluss	0,4 mL/min

Tabelle 36: Übersicht der gewählten Massenspektrometer-Einstellungen für die Analytik der Metabolite.

Parameter	Einstellungen
Aufnahmebereich	<i>m/z</i> 80-1400
Ionenpolarität	negativ
Scan Rate	4,00 Spektren/s
Gas-Temperatur	300 °C
Gas-Fluss	8 L/min
Nebulizer	35 psig
Hüllgas-Temperatur	300 °C
Hüllgas-Fluss	10 L/min

Tabelle 37: Gradient der UHPLC-DAD-MS Analytik zum Vergleich der Hauptmetabolite.

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	95	5
2	95	5
15	80	20
16	2	98
17	2	98
17,1	95	5
18,1	95	5

2.5 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Kulturmedien

2.5.1 Chemikalien und Referenzsubstanzen

Tabelle 38: Verwendete Chemikalien und Referenzsubstanzen (angegebene Dezimale jeweils nach Spezifikation des Herstellers).

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Acetonitril LiChrosolv® (MeCN)	Reag, Ph. Eur., gradient grade for liquid chromatography	Merck, Darmstadt, DE
Alamethicin	Aus <i>Trichoderma viride</i> , ≥ 98,00% (Art. Nr. A4665)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Ameisensäure (HCOOH)	98-99% p.A.	Merck, Darmstadt, DE
Amentoflavon	≥ 90,00% (Art. Nr. 1057S)	Extrasynthese, Genay Cedex, FR
DMSO, deuteriert	DMSO- <i>d</i> ₆ , 99,8%	Deutero, Kastellaun, DE
Ethanol	Ethanol (p.A.) absolute ≥ 99,8%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
FITC-Dextran	M _r ≈ 4000 g/mol (Art. Nr. 46944)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Glucose-6-Phosphat	≥ 98,00% (Art. Nr. G7250)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	250 UN, (Art. Nr. G7877)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
β-Glucuronidase	Type B-10, aus boviner Leber, 10100 U/mg	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
HCl	1 N	VWR, Darmstadt, DE
Hinokiflavon	≥ 95,00% (Art. Nr. 1017)	Extrasynthese, Genay Cedex, FR
I3, I18-Biapigenin	≥ 98,00% (Art. Nr. 89166)	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, DE
Isoorientin	≥ 95,00% (Art. Nr. 89709)	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, DE
Isoschaftoside	≥ 95,00% (Art. Nr. 83324)	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, DE
Isovitexin	≥ 95,00% (Art. Nr. 89233)	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, DE

Fortsetzung **Tabelle 38**

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Ko143	≥ 98,00% (Art. Nr. K2144)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Luteolin	≥ 99,00%	Extrasynthese, Genay Cedex, FR
Magnesiumchlorid	≥ 98,00% (Art. Nr. M8266)	Merck, Darmstadt, DE
Methanol LiChrosolv® (MeOH)	Reag, Ph. Eur., gradient grade for liquid chromatography	Merck, Darmstadt, DE
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid ≥ 97.5% (Art. Nr. M5655)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
NADP	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphorsäure Hydrat; ≥ 95,00% (Art. Nr. N5755)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Natriumacetat	p.A., wasserfrei, ≥ 99,0%	Merck, Darmstadt, DE
Natriumcitrat	≥ 95,00%	Merck, Darmstadt, DE
Orientin	≥ 95,00% (Art. Nr. 89746)	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, DE
Probenecid	≥ 98,00% (Art. Nr. P8761)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Propanolol	≥ 98,00% (Art. Nr. P0884)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Quercetin	≥ 99,00%	Extrasynthese, Genay Cedex, FR
Schaftosid	≥ 95,00% (Art. Nr. 83325)	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, DE
SDS	Natriumdodecylsulfat, 92,5 – 100%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Sulfatase	Aus <i>Helix pomatia</i> , Type H-1, lyophilisiert, ≥ 10000 U/g	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Trifluoressigsäure	ReagentPlus®, 99%	Merck, Darmstadt, DE
Trypanblau	0,04 g in 10 mL PBS (Art. Nr. T0887)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE

Fortsetzung **Tabelle 38**

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
Tween® 80	(Art. Nr. P4780)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
UDPGA	Uridin-5'- diphosphoglucuronsäure ≥ 98,00% (Art. Nr. U6751)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Reinstwasser	Entionisiert	Universität Regensburg, Regensburg, DE
Verapamil	≥ 99,00% (Art. Nr. V4629)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Vitexin	≥ 95,00% (Art. Nr. 89290)	PhytoLab, Vestenbergsgreuth, DE

2.5.2 Geräte und Software

Tabelle 39: Verwendete Geräte und Software.

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Analysenwaage	MC 1, Laboratory LC 6200 S	Sartorius, Göttingen, DE
Autoklaven	Melag Autoklav 23	Melag Medizintechnik, Berlin, DE
	SysTec VE-120	SysTec, Ingolstadt, DE
Gefrierschrank (T = -80 °C)	Modell 995	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Gefriertrocknung	P10-85	Dieter Piatkowski- Forschungsgeräte, München, DE
HPLC-DAD, analytisch	Autosampler L-2200 Pumpe L-2130 Säulenofen L-2350 Diode Array Detector L-2455 EZChrom Elite 3.1.7 (Software)	Hitachi, Tokio, JP

Fortsetzung **Tabelle 39**

Bezeichnung	Modell	Hersteller
HPLC Säulen	Purospher® Star RP-18e (5 µm), Hibar® RT-250-4 (No. 027442), mit Vorsäule	Merck, Darmstadt, DE
	Kinetex® Biphenyl (5 µm), 250 x 4,6 mm mit Vorsäule (S/No. H15-168734, B/No. 5627-0019)	Phenomenex Inc., Torrance, USA
Inkubatoren	AutoFlow IR Direct Heat, NU-5500 E	Integra Biosciences, Fernwald, DE
Massenspektrometer	Agilent MS Q-TOF 6540 UHD, Ionenquelle: AJS ESI G6540A	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Mikroskop	Olympus CKX41	Olympus, Tokyo, JP
Objektive	UPlanFLN 4x/0.13/PhP [∞] /-/FN22	
	CAchN 10x/0.25/ PhP [∞] /-/FN22	
	LCAchN 20x/0.40/ PhP [∞] /-/FN22	
	LCAchNx/0.55/ PhP [∞] /-/FN22	
NMR-Röhrchen	507-HP-8	Norell, Landsville, USA
NMR-Software	Topspin® 3.2	Bruker Corporation, Billerica, USA
NMR-Spektrometer	Avance III 600 NMR mit Bruker 5 mm TCI Cryoprobe	Bruker Corporation, Billerica, USA
	Avance III HD 700 NMR	
pH-Meter	inoLab pH Level 1, Elektrode Sentix Mic	WTW, Weilheim, DE

Fortsetzung **Tabelle 39**

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Pipetten	2,5 Reference (0,1 – 2,5 µL)	Eppendorf, Hamburg, DE
	10 Reference (2,5 - 10 µL)	
	100 Reference (10 - 100 µL)	
	1000 Reference (100 - 1000 µL)	
	100 Reference, 12-Kanal (10 - 100 µL)	
Pipettierhelfer	Accu-jet® pro	Brand, Wertheim, DE
Plattenlesegerät	Spectra FluorPlus	Tecan, Crailsheim, DE
	Xfluor V 4.40 (Software)	
Reaktionsgefäß- Zentrifugen	Jouan BR4i multifunction centrifuge	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
	Sigma 1-14	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, DE
Reinstwasseranlage	Astacus LS	MembraPure, Berlin, DE
Schüttler	Vortex Genie 2™	VWR, Darmstadt, DE
Software	GraphPad Prism 5.03	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
	Microsoft Office Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
	IBM SPSS Statistics 25	IBM, Ehningen, DE
	ChemDraw Professional 17.0	PerkinElmer, Waltham, USA
Thoma-Zählkammer, Neubauer Improved	0,100 mm Tiefe, 0,0025 m ²	LO-Laboroptik, Lancing, UK
Trockenschrank	771 364	Memmert, Schwabach, DE
UHPLC-DAD-MS, analytisch	Agilent, Binary Pump G4220A, HiP Sampler G4226A, Column Comp. G1316C, DAD G4212A MassHunter Qualitative Analysis (B. 08.00) (Software)	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Fortsetzung **Tabelle 39**

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Ultraschallbad	Ultrasonic cleaner	VWR, Darmstadt, DE
Voltohmmeter	Evohm2 mit Endohm-12 Ringelektrode und Calicell-12	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Wasserbad	WB 22	Memmert, Schwabach, DE
Werkbank, steril	HeraSafe KS	Thermo Scientific, Langenselbold, DE
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific, Langenselbold DE

2.5.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 40: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Einmalspritzen (steril)	Norm-Ject, Tuberculin, 1 mL	HenkeSass Wolf, Tuttlingen, DE
HPLC-Vial Inserts	Micro Insert, 300 µL, 5,5 mm passend für 11 mm CrimpSnap®- Flaschen	Wicom, Heppenheim, DE
HPLC-Vial mit Verschlusskappe	11 mm CrimpSnap-Vial, braun, 2 mL, PP Schnappkappe mit PTFE/Silikon-Septum	Wicom, Heppenheim, DE
Kanüle	Serican® 1,20 x 40 mm BC/SB 18 Gx 1 ½	B.Braun Melsung, Melsungen, DE
Kryovials	Cryo.S™ vials, 2 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Kulturflaschen	25/75 cm ²	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Pasteurpipetten	230 mm	VWR, Darmstadt, DE
Pipetten, serologisch	5, 10, 25 mL, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

Fortsetzung **Tabelle 40**

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Pipettenspitzen	10, 100, 1000 µL	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, DE
Reaktionsgefäße	1,5 und 2 mL	VWR, Darmstadt, DE
Schnappdeckelgläser mit Deckel	5 und 10 mL	VWR, Darmstadt, DE
Spritzenvorsatzfilter	Perfect-Flow RC membrane (0,2 µm)	Wicom, Heppenheim, DE
Zellkulturplatte	12 well Polystyrene Plates, Ref. 3512	Corning Incorporated, Kennebunk, USA
	96-well Platte	TPP, Transadingen, CH
Zellkulturplatte mit Einsätzen	Transwell® Permeable Supports, 12 mm Diameter Inserts, 12 well 0,4 µm Polycarbonate Membrane Tissue Culture Treated, Polystyrene Plates Ref. 3401	Corning Incorporated, Kennebunk, USA
Zentrifugenröhrchen	15/50 mL, steril für die Zellkultur	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

2.5.4 Kulturmedien und sonstige Lösungen

Tabelle 41: Verwendete Kulturmedien und sonstige Lösungen.

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium + g/L D-Glucose & 2 mM Glutamin (Best. Nr. 41965-039)	Gibco®, Paisley, UK
L-Glutamin	200 mM	
FKS_{hitzeinaktiviert}	Fetales Kälberserum Superior (Art. NR. S0615); 30 min im Wasserbad bei 56 °C hitzeinaktiviert	Biochrom AG, Berlin, DE

Fortsetzung **Tabelle 41**

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller
DMSO	Dimethylsulfoxid, ≥99,5% für Molekularbiologie (Art. Nr. 1.994.1)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, DE
HBSS	w/ Calcium, w/ Magnesium, w/ Sodium Bicarbonate, w/o phenol Red, sterilfiltriert (Art. Nr. L0612-500)	Biowest, Nuaille, FR
MTT-Reagenz	4 mg/mL MTT in PBS, sterilfiltriert	
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA)	100x (Art. Nr. K0293)	Biochrom AG, Berlin, DE
PBS	Dulbecco's phosphate buffer saline (Art. Nr. D8537-500ml)	Biochrom AG, Berlin, DE
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Penicillin 10000 u/mL, Streptomycin 10000 µg/mL	Biochrom AG, Berlin DE
SDS-Lösung	10% (m/V) SDS in Reinstwasser	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Trypanblau-Lösung	0,4% (m/V) Trypanblau in PBS, sterilfiltriert, gelagert bei 4 °C	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Trypsin/EDTA	0,5%/0,2% in 10xPBS (Art. Nr. L2153), verwendet als 10% (V/V) in PBS	Biochrom, Berlin, DE

Tabelle 42: Kulturmedien für die verwendeten Zelllinien.

Kulturmedium für	Bestandteile	Volumen(anteile)
Caco-2-Zellen	DMEM	500 mL
	FKS _{hitzeinaktiviert}	50 mL
	NEAs	5 mL
	Pen/Strep	5 mL
HepG2-Zellen	RPMI 1640	500 mL
	FKS _{hitzeinaktiviert}	50 mL
	L-Glutamin 200 mM	5 mL
Wegfriermedium (Caco-2- und HepG2-Zellen)	DMEM bzw. RPMI 1640	70% (V/V)
	DMSO	10% (V/V)
	FKS _{hitzeinaktiviert}	20% (V/V)

3 AUSWERTUNG UND DISKUSSION

3.1 Absorption und Metabolisierung von Flavonoid C-Glykosiden

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Flavonoid C-Glykoside bei Verwendung von verschiedenen *in vitro* Testsystemen dargestellt werden. Dabei kamen die sechs Flavonoide Orientin (**O**), Isoorientin (**IO**), Vitexin (**V**), Isovitexin (**IV**), Schaftoside (**S**) und Isoschaftosid (**IS**) zum Einsatz (**Abbildung 15**). Es wurden Erkenntnisse zur Resorption und Metabolisierung im Dünndarm, und zur Metabolisierung in der Leber erlangt. Anschließend werden die Ergebnisse diskutiert und mit Literaturdaten verglichen.

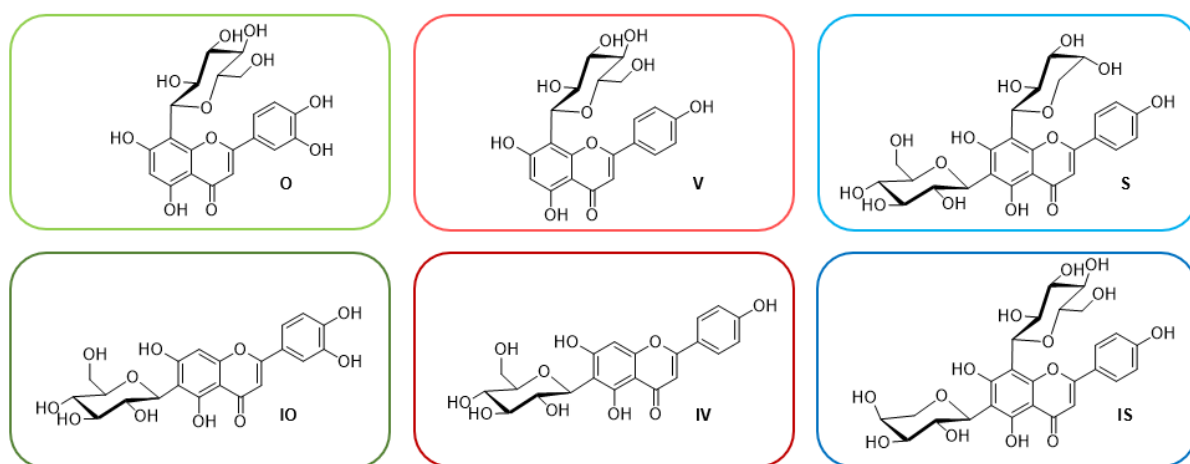


Abbildung 15: Strukturen der sechs getesteten Flavonoid C-Glykoside: Orientin (**O**), Isoorientin (**IO**), Vitexin (**V**), Isovitexin (**IV**), Schaftoside (**S**) und Isoschaftosid (**IS**).

3.1.1 Zellbiologische Testung am Caco-2-Monolayer Modell

Bei der zellbiologischen Testung wurde die *in vitro* Resorption und Metabolisierung von sechs Testsubstanzen (**O**, **IO**, **V**, **IV**, **S**, **IS**) im Dünndarmepithel durch das etablierte Caco-2 Monolayer Modell untersucht. In Vorversuchen wurden die substanzabhängige Zellviabilität an Caco-2-Zellen und die Stabilität der Testsubstanzen unter Versuchsbedingungen geprüft.

3.1.1.1 Vorversuche

3.1.1.1.1 Zellviabilität von Caco-2-Zellen

Um die Konzentrationen für die nachfolgenden Caco-2-Testungen festzulegen, wurde für alle sechs C-Glykoside sowohl ein etablierter MTT-Assay als auch ein den Versuchsbedingungen angepasster Assay (Caco-2-Resorptions- bzw. Metabolisierungsversuch) durchgeführt. Dabei

sollte festgestellt werden, ob die Testsubstanzen die Viabilität der Caco-2-Zellen beeinflussen. Viabilitäten > 90% wurden hierbei nicht als zytotoxisch angesehen und für die Versuche akzeptiert. Alle Werte wurden auf die Kontrollgruppe (100%), die unbehandelte Zellen enthielt, bezogen und in Prozent angegeben. Durch die Lösungsmittelkontrollen wurde außerdem der Einfluss von DMSO in der höchsten verwendeten Konzentration (0,5%) auf die Zellviabilität betrachtet.

Der Effekt der sechs C-Glykoside auf die Zellviabilität beim etablierten MTT-Assay ist in **Abbildung 16** dargestellt. Die Substanzen **O**, **IO**, **V** und **IV** zeigen im getesteten Konzentrationsbereich keine signifikante Reduktion der Viabilität und alle Werte liegen über 90%. Lediglich **S** und **IS** verringern bei 75 und 100 μM die Bildung des Formazans signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe auf $89,3 \pm 1,4\%$ (75 μM) und $86,4 \pm 1,6\%$ (100 μM) bzw. $89,5 \pm 1,3\%$ (75 μM) und $87,4 \pm 2,8\%$ (100 μM) und zeigen damit geringfügig toxische Effekte (**Abbildung 16**). Da der toxische Effekt der Lösungsmittelkontrolle mit $87,2 \pm 4,7\%$ in einer ähnlichen Größenordnung liegt, ist der Effekt bei **S** und **IS** vermutlich darauf zurückzuführen.

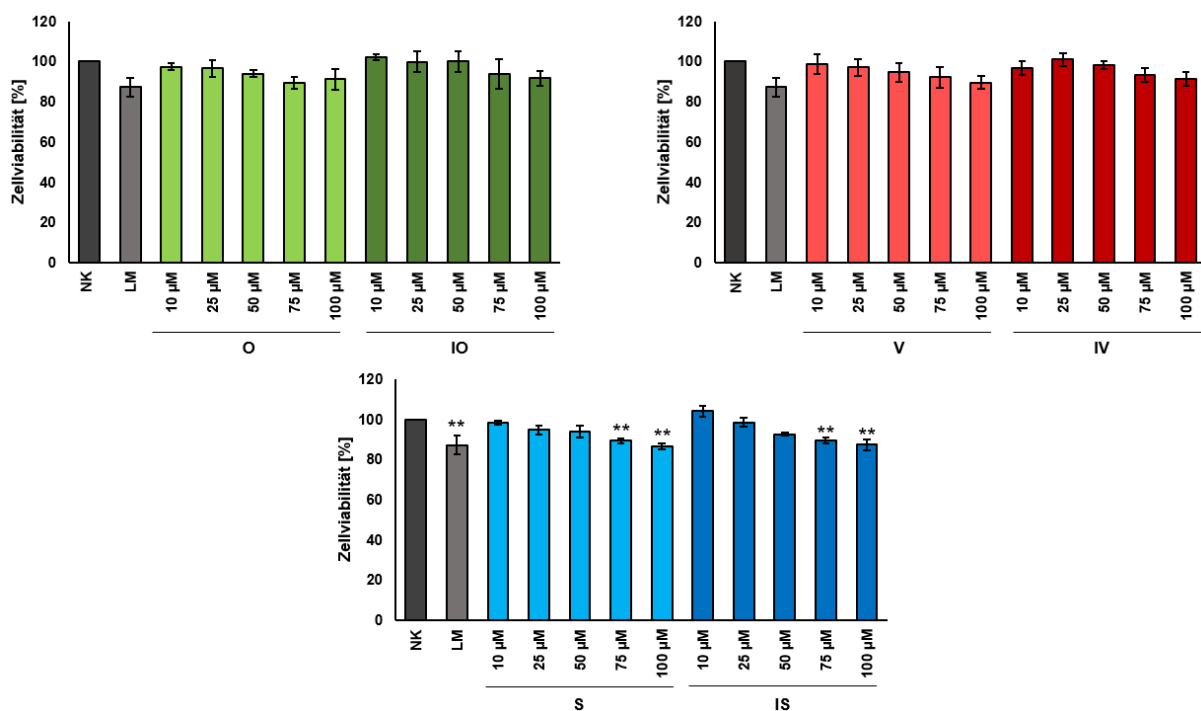


Abbildung 16: Viabilität der Caco-2-Zellen ermittelt durch den etablierten MTT-Assay in Abhängigkeit der Konzentrationen 10, 25, 50, 75 und 100 μM der Substanzen **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS**; es wurden drei unabhängige Experimente in Pentaplikaten durchgeführt; Daten sind dargestellt als MW $\pm$ StabW ($n = 3$), sie wurden einer einfachen ANOVA mit Tukey-HSD Post-hoc-Test unterzogen, NK: Negativkontrolle (Medium), LM: Lösungsmittelkontrolle (0,5% (V/V) DMSO); Signifikanzniveaus: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

Zusätzlich zum etablierten MTT-Assay wurde ein MTT-Assay unter Versuchsbedingungen durchgeführt, um mögliche toxische Effekte der Substanzen **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** während

der Caco-2-Resorptions- bzw. Metabolisierungsversuche ausschließen zu können. In **Abbildung 17** ist der Einfluss der Testsubstanzen auf die Viabilität der Caco-2-Zellen unter Assay-Bedingungen gezeigt. Dabei ist für keine der getesteten Substanzen in keiner der eingesetzten Konzentrationen eine signifikante Verringerung der Reduktase-Aktivität zu erkennen und alle Werte liegen über 90%. Auch die Lösungsmittelkontrolle und **S** bzw. **IS** in den höchsten Konzentrationen zeigen hier im Vergleich zum etablierten MTT-Assay keine Reduktion der Zellviabilität.

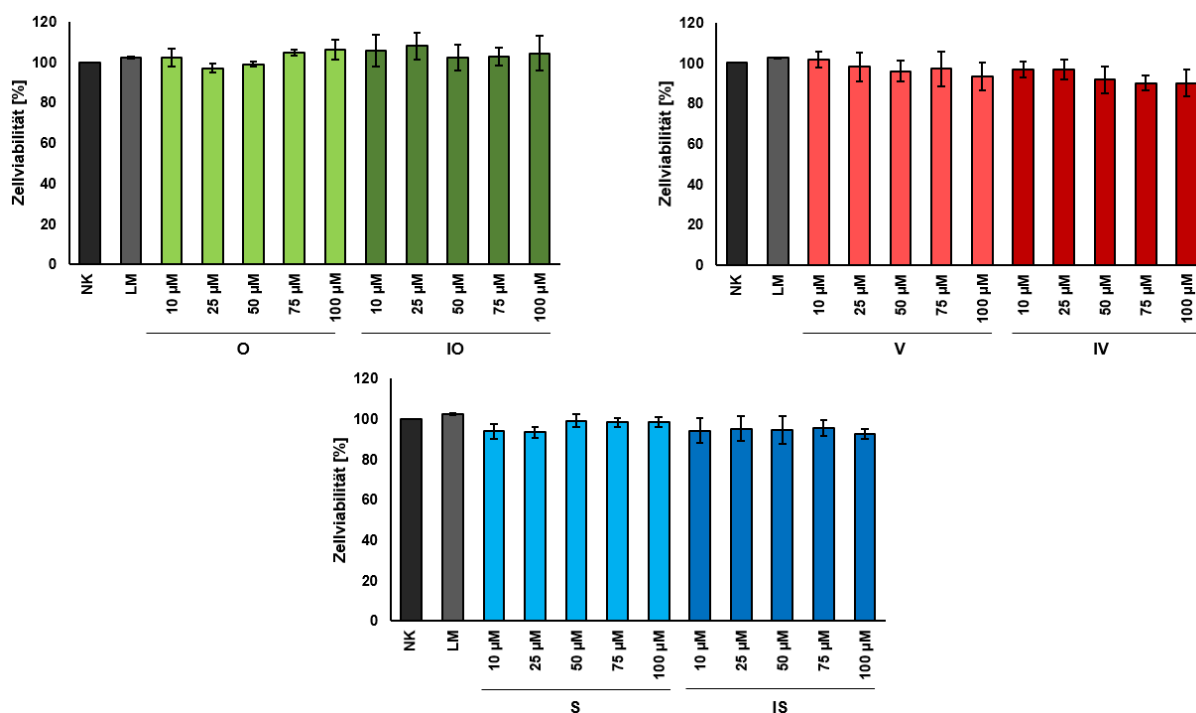


Abbildung 17: Viabilität der Caco-2-Zellen unter Versuchsbedingungen in Abhängigkeit der Konzentrationen 10, 25, 50, 75 und 100 µM der Substanzen **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS**; es wurden drei unabhängige Experimente in Pentaplikaten durchgeführt; Daten sind dargestellt als MW ± StabW (n = 3), sie wurden einer einfachen ANOVA mit Tukey-HSD Post-hoc-Test unterzogen, NK: Negativkontrolle (Medium), LM: Lösungsmittelkontrolle (0,5% (V/V) DMSO); Signifikanzniveaus: p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***).

Trotz des leicht toxischen Effekts von **S** und **IS** im etablierten MTT-Assay, wurde für alle sechs Testsubstanzen eine Konzentration von 100 µM für die Resorptions- bzw. Metabolisierungsversuche verwendet, da unter Versuchsbedingungen kein Einfluss auf die Zellviabilität zu erkennen war.

3.1.1.1.2 Stabilitätsversuche

Als Vorversuche zu den Caco-2-Versuchen wurde eine Stabilitäts-Testung der sechs Flavonoid C-Glykoside **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** durchgeführt. Dabei sollte festgestellt werden, ob unter Versuchsbedingungen die Stabilität der Testsubstanzen zeitabhängig beeinträchtigt

ist. Alle Werte wurden als Prozent-Werte bezogen auf den Gehalt zum Zeitpunkt t_0 (100%) angegeben.

In **Abbildung 18** sind die Daten der Stabilitätsuntersuchung aufgeführt. Dabei ist zu erkennen, dass bei den Substanzen **O**, **S** und **IS** weder eine Erhöhung noch eine Abnahme des Gehalts über den Zeitraum der 5 h zu verzeichnen sind. Bei den Testsubstanzen **IO** und **V** ist ein leichter Anstieg des Gehalts über den untersuchten Zeitraum zu erkennen, was möglicherweise mit einer unzureichenden Durchmischung der Lösung während des Versuchs zusammenhängen könnte. Bei **IV** ist nach 3 h eine leichte Abnahme des Gehalts auf $93,91 \pm 12,57\%$ zu verzeichnen, bei 5 h stieg dieser jedoch wieder auf $103,29 \pm 3,27\%$. Aufgrund der hohen Schwankung beim 3 h-Wert von **IV** wird von der Stabilität über den Zeitraum von 5 h ausgegangen. Als Experimentdauer für die Caco-2-Resorptions- bzw. Metabolisierungsversuche wurde deshalb höchstens 5 h festgelegt.

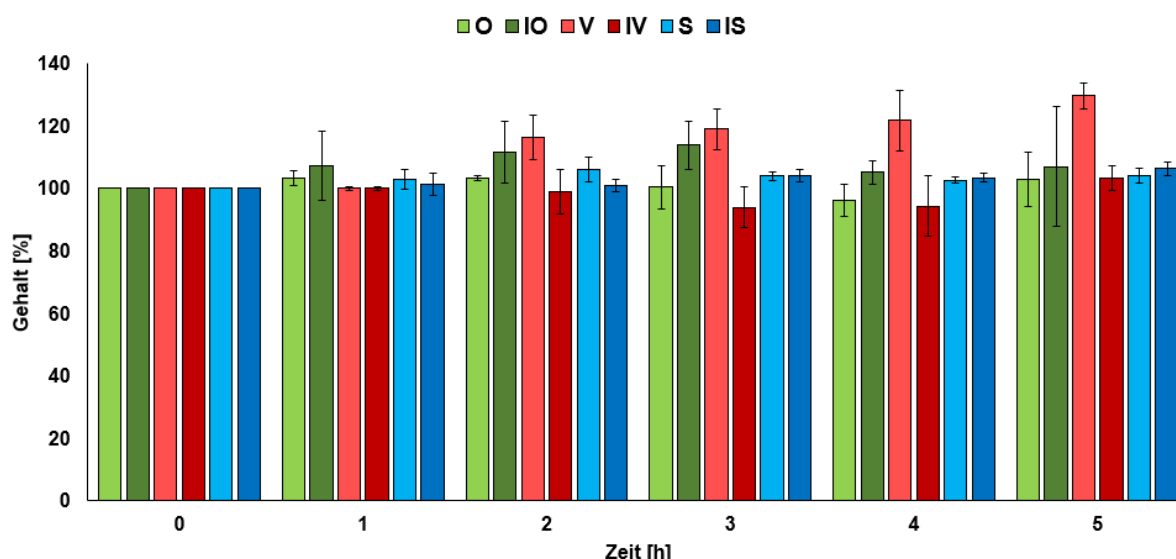


Abbildung 18: Stabilität der Flavonoid C-Glykoside **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** in HBSS (pH = 6,0) unter Versuchsbedingungen (37 °C, 5% CO₂) zu sechs Zeitpunkten (t = 0, 1, 2, 3, 4 und 5 h). Der Gehalt wurde durch eine HPLC-DAD Methode bestimmt und bezogen auf t_0 in Prozent [%] angegeben. Daten sind dargestellt als MW $\pm$ StabW, n = 3.

3.1.1.2 Caco-2-Monolayer Modell

Die Absorption und Metabolisierung von Testsubstanzen im Dünndarmepithel stellt einen wichtigen Schritt bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe dar. Das Caco-2-Monolayer Modell kommt dabei als weit verbreitetes *in vitro* Testsystem zur Bestimmung der epithelialen Resorption und der Metabolisierung im Dünndarmepithel oft zum Einsatz¹⁶⁰. Erstmals konnte die Caco-2-Zelllinie 1974 von Fogh et. al aus dem Kolonkarzinom eines 72-jährigen

Kaukasiers gewonnen werden und bereits in den 1990er Jahren wurden Transportstudien mittels dieser Zelllinie etabliert^{162,169,170}. Inzwischen ist die Bestimmung der Permeationsgeschwindigkeit von Arzneistoffen über das Caco-2-Monolayer Modell ein von der FDA anerkanntes System.

Trotz seines Ursprungs aus dem Kolon verfügt der Caco-2-Monolayer über ähnliche funktionale und morphologische Eigenschaften wie die Enterozyten des Dünndarms^{169–171}. Nach etwa sieben Tagen bilden die Caco-2-Zellen auf einer Polycarbonatmembran einen konfluenten Monolayer aus (vgl. **Abbildung 19**), welcher in Kultur eine spontane Differenzierung erfährt, die nach etwa 20 Tagen abgeschlossen ist^{172,173}. Die polarisierten Zellen bilden auf der apikalen Seite (A) einen gut differenzierten Bürstensaum, welcher durch typische Mikrovilli und Nährstofftransporter gekennzeichnet ist. Ähnlich wie bei den Enterozyten im Dünndarm, werden zwischen den Caco-2-Zellen Tight Junctions gebildet^{174,175}.

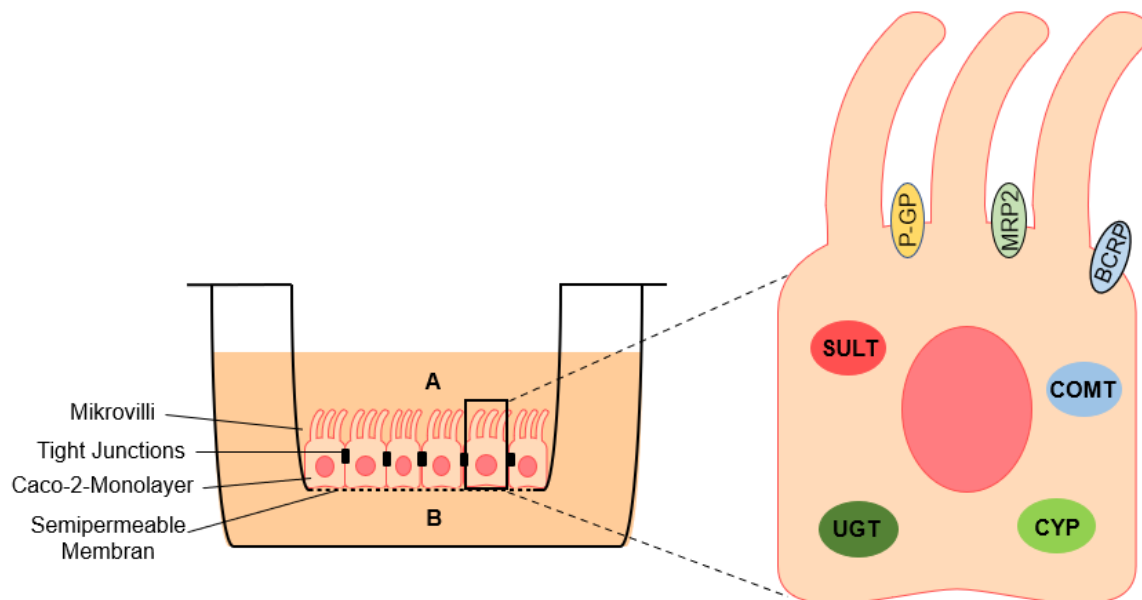


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Caco-2-Monolayer Modells. Die apikale Seite (A) entspricht der Dünndarmseite mit der typischen Bürstensaummembran. Die basolaterale Seite (B) ist die dem Blut zugewandte Seite. In einer vergrößerten Zelle sind beispielhaft die Enzyme SULT, COMT, UGT und CYP, und drei Effluxtransporter P-GP, MRP2 und BCRP eingezeichnet.

Die metabolische Aktivität weist durch Enzyme wie Sulfotransferasen (SULTs)¹⁷⁶, UDP-Glucuronosyltransferasen (UGTs)^{177,178}, Cytochrom P450 Isoenzyme (CYPs)^{73,179} und Catechol-O-methyltransferasen (COMTs)⁸⁹ eine große Ähnlichkeit zur *in vivo* Situation in Enterozyten auf¹⁸⁰. Dadurch kann das Caco-2-Monolayer Modell auch für *in vitro* Metabolisierungsversuche genutzt werden. Zu beachten ist lediglich, dass die CYP-Isoenzyme im Gegensatz zu den humanen Darmenterozyten in den Caco-2-Zellen etwas unterexprimiert sind¹⁸¹.

Neben der vielfältigen Enzymausstattung exprimieren Caco-2-Zellen eine Reihe von Transportern, die entweder der Aufnahme von Substanzen dienen oder auch als Effluxtransporter agieren können. Dazu zählen Transporterproteine der ABC-Familie, wie P-Glykoprotein (P-GP)¹⁸², Multidrug Resistance-assoziiertes Protein 2 (MRP2)¹⁸³ und Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)¹⁸⁴, aber auch verschiedene Ionentransporter¹⁸⁰. Das Ausmaß der Expression der Transporter ist stark von den Kulturbedingungen abhängig¹⁸⁵ und auch die fehlende Mucosaschicht oder die bakterielle Darmflora müssen bei der Interpretation von Ergebnissen berücksichtigt werden¹⁷⁵. Trotzdem stellt das Caco-2-Monolayer Modell ein aussagefähiges Testsystem zur Untersuchung von Resorption und Metabolisierung im Dünndarm dar.

3.1.1.3 Bestimmung der Resorption und Rolle von Effluxtransportern

Zur Untersuchung der Resorption und des Einflusses der Effluxtransporter auf die Aufnahme der Testsubstanzen wurde das unter **3.1.1.2** beschriebene Caco-2-Monolayer Modell verwendet. Zur Bestimmung der Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) wurde die Fähigkeit der Caco-2-Zellen ausgenutzt zu einem konfluenten Monolayer auszudifferenzieren, der in seinen Eigenschaften große Ähnlichkeit zu den Darmenterozyten aufweist^{169,170}. In Caco-2-Zellen werden außerdem Transporterproteine der ABC-Familie, wie P-GP¹⁸², MRP2¹⁸³ und BCRP¹⁸⁴ exprimiert, die potentielle Effluxtransporter für Flavonoide darstellen⁷¹. Dadurch sollte durch Inhibierung dieser Effluxtransporter der Einfluss auf die Resorption der Flavonoid C-Glykoside untersucht werden.

Der Caco-2-Monolayer mit zugehörigen Effluxtransportern P-GP, MRP2 und BCRP und deren Inhibitoren Verapamil, Probenecid und Ko143 ist in **Abbildung 20** dargestellt. Die Permeabilitätskoeffizienten der sechs Flavonoid C-Glykoside **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** sollten von der apikalen Seite (A) zur basolateralen (B) und *vice versa* bestimmt werden. Zusätzlich wurden die Permeabilitätskoeffizienten von A nach B bei Inhibierung von jeweils einem der drei Effluxtransporter P-GP, MRP2 und BCRP bestimmt. Dafür wurden die Testsubstanzen in einer Konzentration von 100 μM auf der apikalen oder basolateralen Seite des Caco-2-Versuchs aufgegeben und für insgesamt 5 h inkubiert (vgl. **2.1.4.3** und **2.1.4.4**). Zur Inhibierung der Effluxtransporter wurden zusätzlich Verapamil (100 μM), Probenecid (600 μM) oder Ko143 (5 μM) zu den Testsubstanzen gegeben. Zu den fünf bestimmten Zeitpunkten wurden apikal bzw. basolateral Aliquote entnommen. Die so erhaltenen apikalen und basolateralen Proben wurden via HPLC-DAD vermessen und die Peakflächen bestimmt. Mithilfe der vorher ermittelten Kalibriergeraden konnten daraus die Permeabilitätskoeffizienten errechnet werden.

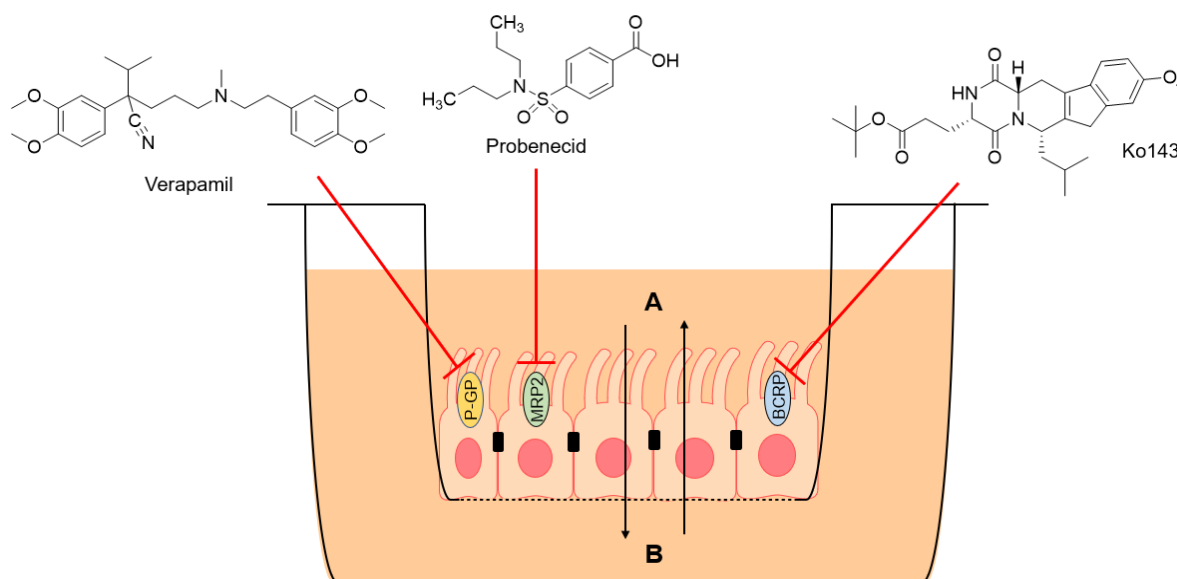


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Caco-2-Resorptionsversuche mit Effluxtransporter Inhibition unter Verwendung des Caco-2-Monolayer Modells. Dargestellt sind die drei Effluxtransporter P-GP, MRP2 und BCRP mit ihren zugehörigen Inhibitoren Verapamil, Probenecid und Ko143. Außerdem ist der Transport von der apikalen Seite (A) zur basolateralen (B) und vice versa skizziert.

3.1.1.3.1 Kontrollsubstanzen

Bei jedem Caco-2-Resorptionsversuch und auch bei den Versuchen mit Inhibition der Effluxtransporter wurden zwei Kontrollen mitgeführt. Zur Charakterisierung des parazellulären Transports und somit in diesem Fall als Negativkontrolle kam FITC-Dextran zum Einsatz. Zur Bestimmung des passiv transzellulären Transports und als Positivkontrolle wurde der β -Blocker Propranolol verwendet. Die beiden Substanzen sollten als zusätzliche Kontrolle und zur Charakterisierung des Caco-2-Resorptionsmodells dienen und somit zur Vergleichbarkeit der ermittelten Ergebnisse beitragen.

3.1.1.3.2 Kalibriergeraden

Die Kalibriergerade von FITC-Dextran wurde fluorimetrisch im Bereich zwischen 0,02-100 $\mu\text{g/mL}$ bestimmt (vgl. 2.1.4.7). Die restlichen Kalibrierungen wurden per HPLC-DAD Analytik durchgeführt (vgl. 2.1.4.6). Für Propranolol wurde von 0,125-200 $\mu\text{g/mL}$ kalibriert, wohingegen für die sechs C-Glykoside deutlich niedrigere Konzentrationen von 0,005-0,5 $\mu\text{g/mL}$ vermessen wurden. Alle Analyten wurden anhand der Peakflächen ausgewertet. In **Tabelle 43** sind die ermittelten Geradengleichungen mit dem dazugehörigen Bestimmtheitsmaß zusammengefasst.

Tabelle 43: Kalibriergeraden für die Caco-2-Resorptionsversuche.

Analyt	Bereich	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß
FITC-Dextran	0,02-100 µg/mL	$y = 348x + 167$	$R^2 = 0,9996$
Propranolol	0,125-100 µg/mL	$y = 331625x + 33332$	$R^2 = 0,9999$
Orientin	0,005-0,5 µg/mL	$y = 150097x + 6$	$R^2 = 0,9994$
Isoorientin	0,005-0,5 µg/mL	$y = 334667x + 2287$	$R^2 = 0,9994$
Vitexin	0,005-0,5 µg/mL	$y = 193749x + 2325$	$R^2 = 0,9962$
Isovitexin	0,005-0,5 µg/mL	$y = 512638x + 455$	$R^2 = 0,9991$
Schaftosid	0,005-0,5 µg/mL	$y = 460727x + 588$	$R^2 = 1,0000$
Isoschaftosid	0,005-0,5 µg/mL	$y = 500127x + 1632$	$R^2 = 0,9998$

3.1.1.3.3 Bestimmung der Permeabilitätskoeffizienten

Die bidirektionalen scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) von **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S**, **IS** und den beiden Kontrollsubstanzen Propranolol und FITC-Dextran wurden wie unter **2.1.4.3** und **2.1.4.4** beschrieben ermittelt und berechnet (vgl. **2.1.4.8**). Zusätzlich wurde für die Testsubstanzen der prozentuale Transport dargestellt, um eine Aussage über mögliche Transportmechanismen zu treffen.

3.1.1.3.3.1 Permeabilitätskoeffizienten der Kontrollsubstanzen

Für das gut resorbierbare Propranolol wurde ein scheinbarer Permeabilitätskoeffizient von $21,03 \pm 2,10 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ bestimmt. Der ermittelte Wert steht im Einklang mit den in der Literatur für Propranolol zu findenden Permeabilitätskoeffizienten (u.a. $23,4 \pm 2,8 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^{186}$, $41,90 \pm 4,31 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^{171}$, $14,4 \pm 1,2 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^{161}$).

Für die schlecht resorbierbare Substanz FITC-Dextran konnte ein scheinbarer Permeabilitätskoeffizient von $0,03 \pm 0,03 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ermittelt werden. Auch dies steht im Einklang mit Werten, die in der Literatur zu finden sind (u.a. $0,07 \pm 0,01 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^{187}$, $0,01 \pm 0,01 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^{188}$).

3.1.1.3.3.2 Permeabilitätskoeffizienten und prozentualer Transport der Testsubstanzen

Die Absorptionsfähigkeit der sechs Flavonoid C-Glykoside **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** wurde mithilfe des Caco-2-Resorptionsmodells ermittelt (vgl. **2.1.4.3** und **2.1.4.4**). Der Transport vom apikalen (A) zum basolateralen (B) Kompartiment und *vice versa* wurde über einem Zeitraum von 5 h bei einer Konzentration von 100 µM beobachtet. Die bidirektionalen scheinbaren

Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) und das dazugehörige Verhältnis von $P_{app} A \rightarrow B / P_{app} B \rightarrow A$ aller sechs Testsubstanzen sind in **Tabelle 44** zusammengefasst.

Tabelle 44: Bidirektionale scheinbare Permeabilitätskoeffizienten der sechs Testsubstanzen und das Verhältnis der beiden Permeabilitätskoeffizienten. Alle Daten sind als MW $\pm$ StabW dargestellt (n = 3); P_{app} : Scheinbarer Permeabilitätskoeffizient.

Analyt	$P_{app} A \rightarrow B$	$P_{app} B \rightarrow A$	P_{app} (Verhältnis)
	($\times 10^{-6}$ cm/s)	($\times 10^{-6}$ cm/s)	$P_{app} A \rightarrow B / P_{app} B \rightarrow A$
Orientin	0,54 $\pm$ 0,07	0,69 $\pm$ 0,08	0,78
Isoorientin	0,26 $\pm$ 0,21	0,24 $\pm$ 0,03	1,08
Vitexin	0,26 $\pm$ 0,14	0,67 $\pm$ 0,16	0,39
Isovitexin	0,09 $\pm$ 0,02	3,11 $\pm$ 0,02	0,03
Schaftosid	0,06 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,31	0,15
Isoschaftosid	0,06 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02	1

Bei den Permeabilitätskoeffizienten von A nach B ist auffällig, dass alle Werte unter 1×10^{-6} cm/s liegen, was grundsätzlich auf eine moderate bis schlechte Absorption hinweist. Vor allem im Fall von **IV**, **S** und **IS** wurden Werte im Bereich der Negativkontrolle FITC-Dextran ermittelt, was dafürspricht, dass diese schlecht absorbierbar sind. **O** hingegen scheint von allen getesteten Substanzen am besten aufgenommen zu werden.

Auch bei den Permeabilitätskoeffizienten von B nach A sind hauptsächlich Werte unter 1×10^{-6} cm/s zu beobachten, wobei **IV** mit einem Wert von $3,11 \pm 0,02 \times 10^{-6}$ cm/s deutlich hervorsticht. Dies weist darauf hin, dass die Geschwindigkeit von B nach A deutlich höher ist als von A nach B.

Bei Betrachtung der Verhältnisse des jeweiligen bidirektionalen Transports fällt auf, dass für **IO** und **IS** Werte im Bereich von 1 ermittelt wurden, während die Werte der anderen vier Testsubstanzen teilweise deutlich unter 0,8 liegen. Dies bedeutet, dass **IO** und **IS** wahrscheinlich hauptsächlich durch passive Diffusion ohne Beteiligung von Transportern absorbiert werden. Die Verhältnisse von $P_{app} A \rightarrow B / P_{app} B \rightarrow A$ unter 0,8 der vier Flavonoid C-Glykoside **O**, **V**, **IV** und **S** weisen darauf hin, dass bei der Absorption dieser Substanzen zusätzlich zur passiven Diffusion Transporter vermittelter Efflux eine Rolle spielen könnte.

Zusätzlich zu den scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten wurde der prozentuale Transport in Abhängigkeit der Zeit ermittelt und in **Abbildung 21** dargestellt. Grundsätzlich ist ein linearer Verlauf ein Anzeichen dafür, dass die Substanzen über passive Diffusion aufgenommen werden, während ein nicht-linearer Verlauf eine aktive Beteiligung von Transportern vermuten lässt. Bei Betrachtung der Kurven von **O**, **V** und **S** wird durch den nicht-linearen Verlauf der

Werte von A→B die Annahme verstärkt, dass Effluxtransporter bei der Resorption beteiligt sind. Der lineare Verlauf des prozentualen Transports von **IO** untermauert die Aussage, dass **IO** hauptsächlich durch passive Diffusion absorbiert wird. Im Fall von **IV** ist ein linearer Transport in beide Richtungen zu erkennen, wobei der prozentuale Transport von B→A deutlich höher ist. Dies deutet darauf hin, dass wie auch schon bei den scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten (vgl. **Tabelle 44**) ersichtlich, deutlich mehr **IV** in das Darmlumen zurück gelangt, als absorbiert wird, durch den linearen Verlauf jedoch keine Hinweise auf die Beteiligung von Effluxtransportern ermittelt werden konnten. Bei **IS** verlaufen beide Kurven nicht ganz linear, aber parallel, was dafürspricht, dass der Transport in beide Richtungen gleichermaßen geschieht, wobei Transporter beteiligt sein könnten.

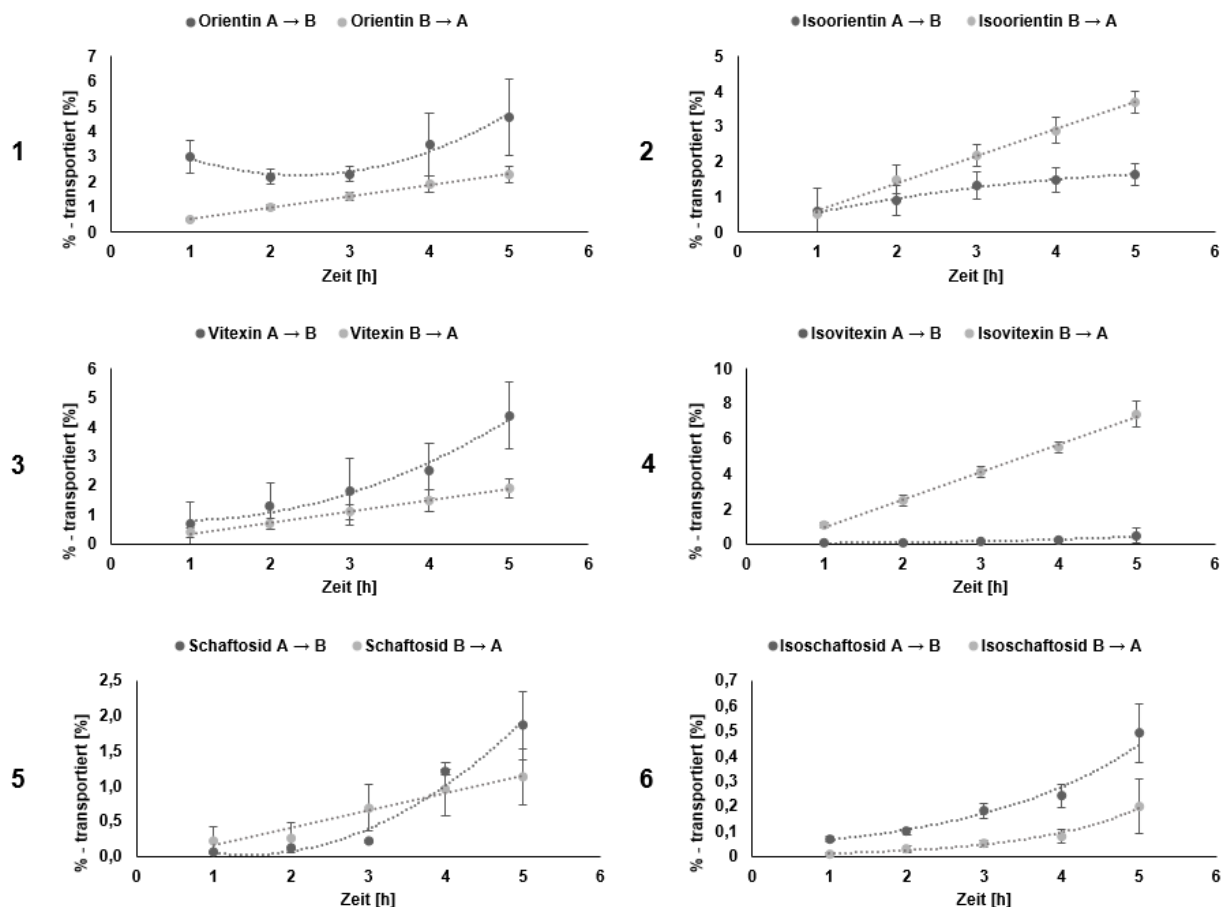


Abbildung 21: Prozentualer Transport [%] von Orientin (1), Isoorientin (2), Vitexin (3), Isovitexin (4), Schaftosid (5) und Isoschaftosid (6) als eine Funktion der Zeit bei 100 µM. Daten aller Graphen sind als MW ± Stabw mit Trendlinie (lineare oder exponentielle Regression) dargestellt (n = 3).

Bei der Bestimmung der scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten vom basolateralen zum apikalen Kompartiment ($P_{app} B \rightarrow A$) der Testsubstanzen **O** und **IO** war außerdem auffällig, dass zusätzlich zur Ausgangssubstanz weitere Peaks detektiert werden konnten, die vermutlich

Konjugaten der jeweiligen Substanzen zugeordnet werden können (**Abbildung 22**). Dies könnte zu einer Verfälschung der ermittelten scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten (vgl. **Tabelle 44**) geführt haben, da somit deutlich mehr Substanz, als Reinsubstanz und in Form von Konjugaten, zurück in das Darmlumen transportiert wird, als hier ermittelt worden ist. Bei den anderen vier Testsubstanzen **V**, **IV**, **S** und **IS** konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

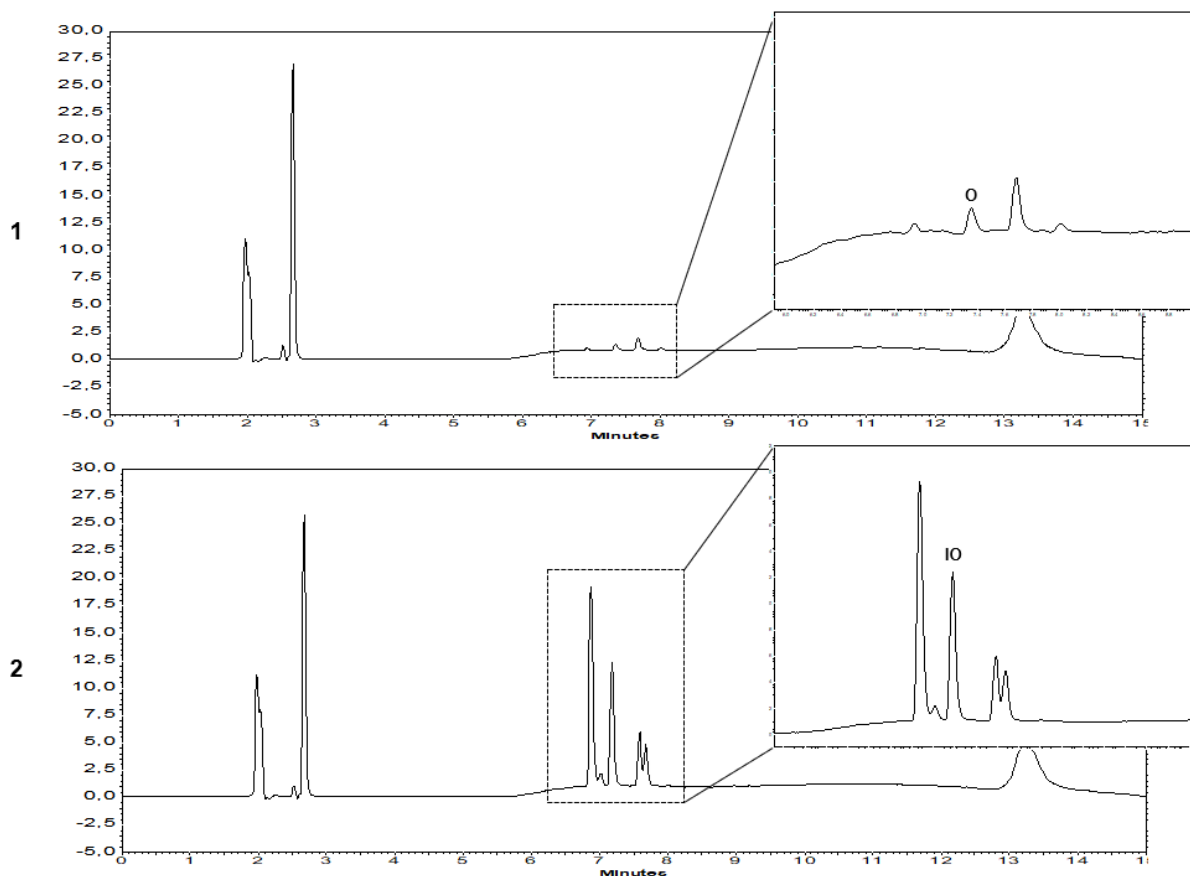


Abbildung 22: HPLC-Chromatogramme der Proben aus dem basolateralen Kompartiment von **O** (1) und **IO** (2) bei Bestimmung der $P_{app} B \rightarrow A$ nach einer Inkubation von 5 h.

3.1.1.3.4 Auswirkung der Effluxtransporter auf die Absorption

Die Abhängigkeit der Absorption der sechs Flavonoid C-Glykoside **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** von den drei Effluxtransportern P-GP, MRP2 und BCRP wurde mithilfe des Caco-2-Resorptionsmodells unter Zusatz von spezifischen Inhibitoren ermittelt (vgl. **2.1.4.5**). Der Transport vom apikalen (A) zum basolateralen (B) Kompartiment mit zusätzlicher Inhibition von P-GP durch Verapamil, MRP2 durch Probenecid bzw. BCRP durch Ko143 wurde je über einen Zeitraum von 5 h detektiert. Die ermittelten scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten bei Hemmung von P-GP ($P_{app} A(V) \rightarrow B$), MRP2 ($P_{app} A(P) \rightarrow B$), BCRP ($P_{app} A(P) \rightarrow B$) und die bereits im Vorfeld bestimmten bidirektionalen Permeabilitätskoeffizienten ($P_{app} A \rightarrow B$ und $P_{app} B \rightarrow A$; vgl. **3.1.1.3.3.2**) sind in **Tabelle 45** dargestellt.

Tabelle 45: Bidirektionale scheinbare Permeabilitätskoeffizienten der sechs Testsubstanzen und die Permeabilitätskoeffizienten bei Hemmung von P-GP durch Verapamil ($P_{app} A(V) \rightarrow B$), von MRP2 durch Probenecid ($P_{app} A(P) \rightarrow B$) bzw. von BCRP durch Ko143 ($P_{app} A(K) \rightarrow B$). Alle Daten sind als MW $\pm$ StabW dargestellt (n = 3), sie wurden einer ANOVA mit Tukey Post-hoc Test unterzogen (Signifikanzlevel zum jeweiligen $P_{app} A \rightarrow B$ Wert: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$); P_{app} : Scheinbarer Permeabilitätskoeffizient.

Analyt	$P_{app} A \rightarrow B$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)	$P_{app} B \rightarrow A$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)	$P_{app} A(V) \rightarrow B$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)	$P_{app} A(P) \rightarrow B$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)	$P_{app} A(K) \rightarrow B$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)
Orientin	0,54 $\pm$ 0,07	0,69 $\pm$ 0,08*	1,88 $\pm$ 2,20*	0,12 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,01*
Isoorientin	0,26 $\pm$ 0,21	0,24 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,12	0,13 $\pm$ 0,01*	0,13 $\pm$ 0,05*
Vitexin	0,26 $\pm$ 0,14	0,67 $\pm$ 0,16*	0,26 $\pm$ 0,08	0,29 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,05
Isovitexin	0,09 $\pm$ 0,02	3,11 $\pm$ 0,02**	0,09 $\pm$ 0,04	0,11 $\pm$ 0,06	0,05 $\pm$ 0,01
Schaftosid	0,06 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,31**	0,15 $\pm$ 0,08*	0,08 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01
Isoschaftosid	0,06 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,02	0,09 $\pm$ 0,07	0,07 $\pm$ 0,07	0,09 $\pm$ 0,07

Durch die bereits ermittelten bidirektionalen scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten wurde bereits postuliert, dass bei den Testsubstanzen **O**, **V**, **IV** und **S** zusätzlich zur passiven Diffusion Transporter vermittelter Efflux eine Rolle bei der Absorption spielen könnte, da $P_{app} B \rightarrow A$ in diesen Fällen signifikant höher ist als $P_{app} A \rightarrow B$. Auch der nicht-lineare Verlauf des prozentualen Transportes von **O**, **V** und **S** deutet auf die Partizipation von Transportern hin (vgl. **Abbildung 21**). Für **IO** und **IS** hingegen wurde aufgrund des $P_{app} A \rightarrow B / P_{app} B \rightarrow A$ Verhältnisses von etwa 1 keine Beteiligung von Effluxtransportern und somit alleinig passive Diffusion als Absorptionsmechanismus angenommen.

In **Tabelle 45** sind die detektierten scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten der sechs Testsubstanzen bei zusätzlicher Zugabe von Verapamil, Probenecid bzw. Ko143 aufgelistet. Bei den Substanzen **O** und **S** ist ein signifikanter Anstieg der P_{app} Werte bei Transport mit Verapamil zu erkennen, während durch Probenecid und Ko143 keine Erhöhung der Absorption erkennbar war. Daraus kann geschlossen werden, dass sowohl **O** als auch **S** Substrate von P-GP sind und somit zusätzlich zur passiven Diffusion auch aktiv aus der Zelle transportiert werden. Für die anderen vier Testsubstanzen **IO**, **V**, **IV** und **IS** ist bei keinem der drei Inhibitoren ein Anstieg der Permeabilitätskoeffizienten zu erkennen, was für **IO** und **IS** auch durch das Verhältnis der bidirektionalen P_{app} von etwa 1 erwartet wurde. Bei **V** und **IV** hingegen wurde aufgrund der signifikant höheren Werte der $P_{app} B \rightarrow A$ eine Beteiligung von Transportern angenommen, was sich hier zumindest für P-GP, MRP2 und BCRP nicht bestätigen ließ. Eine mögliche Erklärung wäre beispielsweise die Partizipation von mehreren Transportern, da in diesem Experiment jeweils nur einer separat inhibiert wurde. Außerdem könnten noch andere, hier nicht untersuchte, Transporter am Absorptionsmechanismus der Testsubstanzen beteiligt sein.

3.1.1.4 Metabolisierung im Dünndarmepithel

Zur Untersuchung der Metabolisierung von Flavonoid C-Glykosiden im Dünndarm wurde das unter **3.1.1.2** beschriebene Caco-2-Monolayer Modell verwendet. Dabei wurde die vielfältige Enzymausstattung der Caco-2-Zellen genutzt, die große Ähnlichkeit zu der *in vivo* Situation in den Enterozyten zeigt¹⁸⁰. Durch Enzyme wie UGTs^{177,178}, SULTs¹⁷⁶, COMTs⁸⁹ und CYPs^{73,179} sollte eine vielfältige Untersuchung von Phase I und II Metaboliten durchgeführt werden.

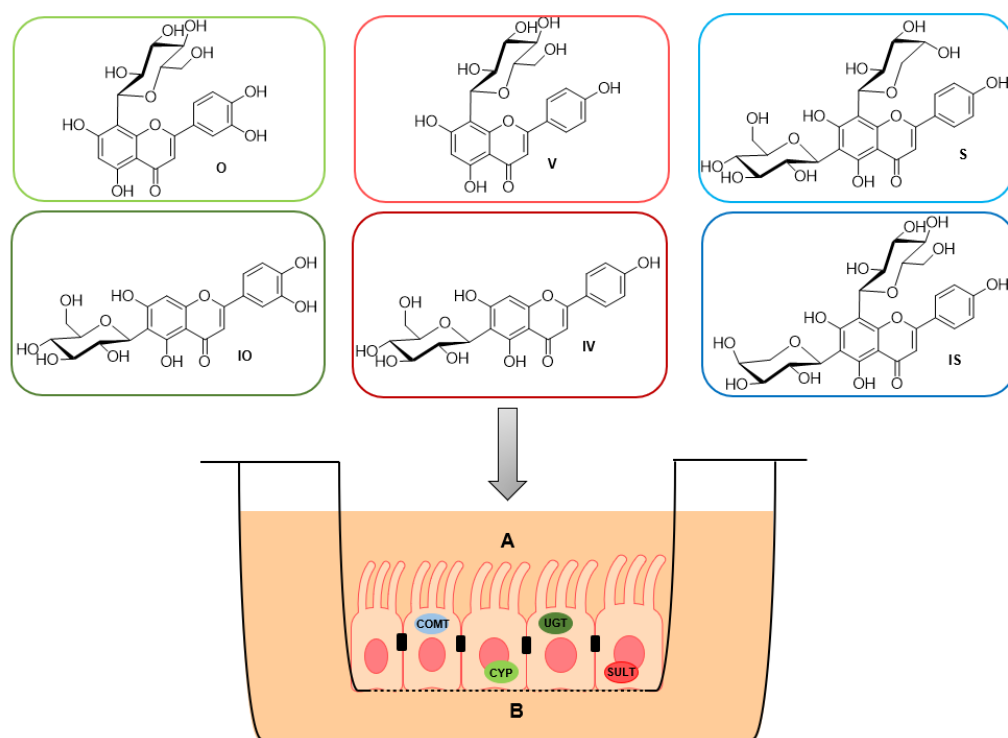


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Caco-2-Metabolisierungsversuche mit Hilfe des Caco-2-Monolayer Modells. Abgebildet sind die sechs Testsubstanzen **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** und der Caco-2-Monolayer mit den Enzymen UGT, SULT, COMT und CYP. **A:** apikale Seite, **B:** basolaterale Seite.

Die Metabolisierung der sechs C-Glykoside **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** durch das Caco-2-Monolayer Modell ist schematisch in **Abbildung 23** dargestellt. Dafür wurden diese mit einer Konzentration von 10 bzw. 100 μM auf der apikalen Seite des Caco-2-Versuchs aufgegeben und für 3 bzw. 5 h inkubiert (vgl. **2.1.5.3**). Die so erhaltenen apikalen und basolateralen Proben, und die Proben der Zelllyse wurden via UHPLC-DAD-MS analysiert. Da im Caco-2-Monolayer eine vielfältige Ausstattung an Phase I und II Enzymen zu finden ist¹⁸⁰, wurde eine Datenbank (siehe Anhang, **Tabelle 93**) mit plausiblen Metaboliten angelegt. Zu den vermuteten Verbindungen zählten sulfatierte, glucuronidierte, methylierte und hydroxylierte Verbindungen sowie gemischte Konjugate. Außerdem wurden einige Flavonoidspaltprodukte mit in die Datenbank einbezogen. Die Verbindungen wurden mithilfe der MS-Software, in die die Datenbank eingepflegt war, ausgewertet. Dabei wurden nur Metaboliten mit einem Score > 80 berücksichtigt. Die gefundenen Phase II Metaboliten wurden anschließend via UHPLC-DAD-

MS/MS verifiziert. Metabolite, die ebenfalls in der Kontrollgruppe zu finden waren, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

3.1.1.4.1 Metabolit Identifizierung via UHPLC-DAD-MS

Bei den *in vitro* Caco-2-Metabolisierungsversuchen kamen die sechs Flavonoid C-Glykoside **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** zum Einsatz. Diese setzen sich aus einem Luteolin- (für **O** und **IO**) bzw. Apigenin-Grundgerüst (für **V**, **IV**, **S** und **IS**) und einem bzw. zwei C-C-verknüpften Zuckern an C-6 und/oder C-8 (vgl. **3.1.1**, **Abbildung 15**) zusammen. In **Tabelle 46** sind die eingesetzten Verbindungen, deren Retentionszeiten in der UHPLC-DAD-MS-Methode, deren experimentell ermittelte und kalkulierte Masse $[M-H]^-$ und deren Summenformel angegeben. Dabei sollte ermittelt werden, ob unterschiedliche Inkubationszeiten (3 bzw. 5 h) oder Konzentrationen (10 bzw. 100 μM) einen Einfluss auf die *in vitro* Metabolisierung der sechs Testsubstanzen im Dünndarmepithel haben. Außerdem sollte versucht werden eine Beziehung zwischen den verschiedenen Strukturen und den Metabolisierungsreaktionen herzustellen.

Tabelle 46: Übersicht der eingesetzten C-Glykoside im Caco-2-Metabolisierungsversuch unter Angabe der Inkubationszeit (**IZ**), Retentionszeit (**RT**), der berechneten (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelten Massen $[M-H]^-$ und deren Summenformel aus der UHPLC-DAD-MS Analytik; **Abk:** Abkürzung der Substanzbezeichnung.

Abk.	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	Summenformel	Bezeichnung
		exp.	kalk.		
O	6,034	447,0938	447,0933	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	Orientin
IO	6,198	447,0934	447,0933	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	Isoorientin
V	7,096	431,0987	431,0984	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	Vitexin
IV	8,024	431,0991	431,0984	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$	Isovitexin
S	6,353	563,1407	563,1406	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	Schaftosid
IS	7,691	563,1405	563,1406	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{14}$	Isoschaftosid

In **Tabelle 47** und **Tabelle 48** sind die gefundenen Phase I und II Metaboliten von **O** bei einer eingesetzten Konzentration von 10 bzw. 100 μM und den Inkubationszeiten von 3 und 5 h dargestellt. Für die Metaboliten ist das Kompartiment (K), in dem diese gefunden wurden, die Inkubationszeit (IZ), die Retentionszeit (RT), die experimentell (exp.) ermittelte und kalkulierte (kalk.) Masse $[M-H]^-$, die Summenformel und der mögliche Metabolit angegeben.

Bei einer Anfangskonzentration von 10 μM **O** (vgl. **Tabelle 47**) ist zu erkennen, dass nach einer Inkubationszeit von 3 h deutlich mehr Metabolite identifiziert werden konnten als nach 5 h. So konnte für **O** nach 3 h ein mono-sulfatiertes und ein methyliertes Konjugat detektiert

werden. Außerdem wurde ein kombinierter methylierter und hydroxylierter Metabolit detektiert. **O**-sulfat und Hydroxymethoxy-**O** konnten sowohl im apikalen als auch im basolateralen Kompartiment detektiert werden, während Methoxy-**O** nur apikal identifiziert werden konnte. Nach einer Inkubationszeit von 5 h konnte für **O** lediglich ein mono-sulfatierter und ein methylierter Metabolit detektiert werden, beide nur im apikalen Kompartiment.

Tabelle 47: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **O** bei einer Konzentration von 10 μM , verifiziert durch UHPLC-DAD-MS ($n = 3$) mit Inkubationszeit (**IZ**), detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[\text{M-H}]^-$ und Summenformel; **K**: Kompartiment, **A**: Apikal, **B**: Basolateral, **Z**: Zelllysate.

K	IZ [h]	RT [min]	[M-H]⁻ (m/z) exp.	[M-H]⁻ (m/z) kalk.	Summenformel	Potenzieller Metabolit
A	3	3,146	527,0494	527,0501	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{14}\text{S}$	O -sulfat
A	5	3,007	527,0507	527,0501	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{14}\text{S}$	O -sulfat
B	3	3,209	527,0500	527,0501	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{14}\text{S}$	O -sulfat
A	3	8,516	477,1035	477,1038	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	Hydroxymethoxy- O
B	3	8,539	477,1035	477,1038	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	Hydroxymethoxy- O
A	3	9,597	461,1086	461,1089	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Methoxy- O
A	5	9,459	461,1091	461,1089	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Methoxy- O

In **Tabelle 48** sind die gefundenen Metaboliten von **O** bei einer Anfangskonzentration von 100 μM aufgelistet. Analog zu den Ergebnissen bei 10 μM sind auch hier nach 3 h mehr Konjugate detektiert worden als nach 5 h Inkubationszeit. Nach 3 h konnte ein mono-sulfatiertes, ein hydroxyliertes, ein methyliertes und ein kombiniertes Hydroxymethoxy-**O** identifiziert werden. Außerdem wurden zwei Konjugate von Luteolin-Derivaten, Hydroxyluteolin-glucuronid und Methoxy-luteolin, gefunden (vgl. auch **3.1.1.4.3**). Die meisten dieser Verbindungen konnten nur im apikalen Kompartiment nachgewiesen werden, lediglich **O**-sulfat wurde zusätzlich basolateral gefunden. Nach einer Inkubationszeit von 5 h konnte für **O** ebenfalls der sulfatierte, hydroxylierte, methylierte und der kombiniert hydroxyliert und methylierte Metabolit identifiziert werden, alle davon hauptsächlich im apikalen Kompartiment. Nur Methoxy-**O** konnte zusätzlich noch im Zelllysate detektiert werden.

Für **O** sind bei 100 μM mehr Metaboliten detektiert worden als bei 10 μM , wobei kein Unterschied bei der Art der Metabolisierungsreaktionen festgestellt werden konnte. Lediglich die Metaboliten von Luteolin konnten nur bei 100 μM identifiziert werden, was aber auch daran liegen könnte, dass bei 10 μM die Metaboliten in so geringer Menge produziert werden, dass sie unter der Detektionsgrenze liegen. Bei Betrachtung der verschiedenen Inkubationszeiten fällt auf, dass nach 3 h einige Konjugate auch im basolateralen Kompartiment gefunden

werden können, während nach 5 h Metaboliten hauptsächlich im apikalen Kompartiment detektiert werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Konjugate aktiv von Transportern zurück in das Darmlumen transportiert werden.

Tabelle 48: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **O** bei einer Konzentration von 100 μM , verifiziert durch UHPLC-DAD-MS ($n = 3$) mit Inkubationszeit (**IZ**), detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[\text{M-H}]^-$ und Summenformel; **K**: Kompartiment, **A**: Apikal, **B**: Basolateral, **Z**: Zelllysat.

K	IZ [h]	RT [min]	[M-H]⁻ (m/z) exp.	[M-H]⁻ (m/z) kalk.	Summenformel	Potenzieller Metabolit
A	3	3,204	527,0499	527,0501	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{14}\text{S}$	O-sulfat
A	5	3,001	527,0499	527,0501	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{14}\text{S}$	O-sulfat
B	3	3,162	527,0493	527,0501	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{14}\text{S}$	O-sulfat
A	3	4,402	463,0870	463,0882	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	Hydroxy- O
A	5	4,184	463,0870	463,0882	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	Hydroxy- O
A	3	5,134	477,0675	477,0675	$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{13}$	Hydroxy-luteolin-glucuronid
A	3	6,073	299,0559	299,0561	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	Methoxy-luteolin
A	3	8,497	477,1034	477,1038	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	Hydroxymethoxy- O
A	5	8,340	477,1034	477,1038	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{12}$	Hydroxymethoxy- O
A	3	9,578	461,1089	461,1089	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Methoxy- O
A	5	9,450	461,1089	461,1089	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Methoxy- O
Z	5	9,382	461,1089	461,1089	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Methoxy- O

In **Tabelle 49** und **Tabelle 50** sind die gefundenen Phase I und II Metaboliten von **IO** bei einer eingesetzten Konzentration von 10 bzw. 100 μM und den Inkubationszeiten von 3 und 5 h dargestellt. Für die Metaboliten ist das Kompartiment (**K**), in dem diese gefunden wurden, die Inkubationszeit (**IZ**), die Retentionszeit (**RT**), die experimentell (**exp.**) ermittelte und kalkulierte (**kalk.**) Masse $[\text{M-H}]^-$, die Summenformel und der mögliche Metabolit angegeben.

Bei 10 μM eingesetztem **IO** ist zur erkennen, dass auch hier nach 3 h mehr Konjugate detektiert werden konnten als nach 5 h (vgl. **Tabelle 49**). Nach einer Inkubationszeit von 3 h wurden zwei mono-sulfatierte, ein hydroxylierter, ein kombiniert methylierter und hydroxylierter und zwei methylierte Metaboliten gefunden. Außerdem konnte ein Luteolin-glucuronid und ein Hydroxy-luteolin-glucuronid identifiziert werden. Die meisten Konjugate konnten ausschließlich apikal detektiert werden, lediglich einer der beiden **IO**-sulfate und Hydroxymethoxy-**IO** wurde zusätzlich basolateral gefunden. Nach 5 h wurden ebenfalls ein

Hydroxymethoxy-**IO**, zwei sulfatierte und zwei methylierte Konjugate erkannt, alle ausschließlich im apikalen Kompartiment.

Tabelle 49: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **IO** bei einer Konzentration von 10 µM, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS (n = 3) mit Inkubationszeit (IZ), detektierter Retentionszeit (RT), kalkulierter (kalk.) und experimentell (exp.) ermittelter Masse [M-H]⁻ und Summenformel; K: Kompartiment, A: Apikal, B: Basolateral, Z: Zelllysat.

K	IZ [h]	RT [min]	[M-H] ⁻ (m/z) exp.	[M-H] ⁻ (m/z) kalk.	Summenformel	Potenzieller Metabolit
A	3	2,514	527,0500	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO -sulfat (1)
A	3	5,107	527,0497	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO -sulfat (2)
A	5	2,332	527,0500	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO -sulfat (1)
A	5	4,673	527,0497	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO -sulfat (2)
B	3	2,439	527,0500	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO -sulfat (1)
A	3	4,044	463,0880	463,0882	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Hydroxy- IO
A	3	5,476	461,0723	461,0725	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Luteolin-glucuronid
A	3	5,467	477,0672	477,0675	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	Hydroxy-luteolin- glucuronid
A	5	6,221	477,1034	477,1038	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	Hydroxymethoxy- IO
A	3	8,290	477,1034	477,1038	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	Hydroxymethoxy- IO
B	3	8,284	477,1046	477,1038	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	Hydroxymethoxy- IO
A	3	9,890	461,1089	461,1089	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	Methoxy- IO
A	3	10,479	461,1089	461,1089	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	Methoxy- IO
A	5	9,474	461,1089	461,1089	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	Methoxy- IO
A	5	10,079	461,1089	461,1089	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	Methoxy- IO

In **Tabelle 50** sind alle Metaboliten von **IO** bei einer Ausgangskonzentration von 100 µM zu sehen, wobei kaum Unterschiede zwischen den Metabolitspektren nach 3 bzw. 5 h erkennbar sind. Nach 3 h konnten zwei mono-sulfatierte, zwei gemischt methylierte und sulfatierte, ein hydroxylierter, ein gemischt hydroxylierter und methylierter und zwei methylierte Metaboliten von **IO** detektiert werden. Außerdem wurden ein Luteolin-glucuronid, ein Hydroxy-luteolin-glucuronid und ein Methoxy-luteolin erkannt. Dabei wurden alle genannten Metaboliten im apikalen Kompartiment gefunden. **IO**-sulfat und Methoxy-**IO** konnten zusätzlich im basolateralen Kompartiment und im Zelllysat nachgewiesen werden und Hydroxymethoxy-**IO** wurde zusätzlich basolateral detektiert. Nach 5 h konnten mit Ausnahme von Hydroxymethoxy-**IO** und Methoxy-luteolin alle bereits nach 3 h detektierten Metaboliten, ebenfalls in denselben Kompartimenten identifiziert werden.

Tabelle 50: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **IO** bei einer Konzentration von 100 µM, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS (n = 3) mit Inkubationszeit (**IZ**), detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse [M-H]⁻ und Summenformel; **K**: Kompartiment, **A**: Apikal, **B**: Basolateral, **Z**: Zelllysat.

K	IZ [h]	RT [min]	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>) exp.	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>) kalk.	Summenformel	Potenzieller Metabolit
A	3	2,494	527,0501	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO-sulfat (1)
A	3	5,069	527,0505	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO-sulfat (2)
A	5	2,308	527,0501	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO-sulfat (1)
A	5	4,644	527,0505	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO-sulfat (2)
B	3	2,491	527,0498	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO-sulfat (1)
B	3	5,008	527,0499	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO-sulfat (2)
B	5	2,296	527,0498	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO-sulfat (1)
B	5	4,682	527,0499	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO-sulfat (2)
Z	3	5,116	527,0495	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO-sulfat (2)
Z	5	4,692	527,0495	527,0501	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₄ S	IO-sulfat (2)
A	3	4,031	463,0883	463,0882	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Hydroxy-IO
A	5	4,178	463,0883	463,0882	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	Hydroxy-IO
A	3	5,739	541,0654	541,0657	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₄ S	Methoxy- IO-sulfat (1)
A	3	6,503	541,0655	541,0657	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₄ S	Methoxy- IO-sulfat (2)
A	5	5,206	541,0654	541,0657	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₄ S	Methoxy- IO-sulfat (1)
A	5	5,972	541,0655	541,0657	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₄ S	Methoxy- IO-sulfat (2)
A	3	5,393	461,0723	461,0725	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Luteolin-glucuronid
A	5	5,181	461,0723	461,0725	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	Luteolin-glucuronid
A	3	5,427	477,0674	477,0675	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	Hydroxy-luteolin-glucuronid
A	5	5,232	477,0674	477,0675	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	Hydroxy-luteolin-glucuronid
A	3	6,204	299,0550	299,0561	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Methoxy-luteolin
A	3	8,232	477,1040	477,1038	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	Hydroxymethoxy-IO
B	3	8,252	477,1042	477,1038	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	Hydroxymethoxy-IO
A	3	9,843	461,1087	461,1089	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	Methoxy-IO
A	3	10,457	461,1088	461,1089	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	Methoxy-IO
B	3	10,441	461,1089	461,1089	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	Methoxy-IO
Z	3	10,566	461,1084	461,1089	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	Methoxy-IO
A	5	9,496	461,1088	461,1089	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	Methoxy-IO
A	5	10,106	461,1089	461,1089	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	Methoxy-IO
Z	5	10,178	461,1084	461,1089	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁	Methoxy-IO

Auch für **IO** sind bei 100 μM mehr Metaboliten detektiert worden als bei 10 μM , wobei kaum Unterschiede bei den Metabolisierungsreaktionen beobachtet werden konnten. Mit Ausnahme von Methoxy-**IO**-sulfat und Methoxy-luteolin, die nur bei 100 μM detektiert wurden, konnten bei eingesetzter Substanzmenge von 10 μM dieselben Metaboliten identifiziert werden wie bei 100 μM , allerdings ist ein deutlicher Unterschied bei der Verteilung der Metaboliten in den Kompartimenten zu erkennen. So wurden bei 10 μM sowohl nach 3 h als auch nach 5 h hauptsächlich Konjugate apikal detektiert, während bei 100 μM und einer Inkubationszeit von 3 h auch einige der Metaboliten im basolateralen Kompartiment oder im Zelllysate gefunden werden konnten. Nach 5 h waren auch bei 100 μM lediglich **IO**-sulfat und Methoxy-**IO** basolateral oder im Zelllysate zu finden. Analog zu **O** könnte dies auch bei **IO** ein Hinweis auf die mögliche Beteiligung von Effluxtransportern sein, die aktiv Konjugate zurück in das apikale Kompartiment befördern. Die Tatsache, dass Konjugate des Aglykons von **O** und **IO**, also Luteolin, gefunden wurden deutet darauf hin, dass Caco-2-Zellen möglicherweise C-C-Bindungen spalten können, was bisher noch nicht in der Literatur beschrieben ist.

In **Tabelle 51** sind die gefundenen Phase I und II Metaboliten von **V** bei einer eingesetzten Konzentration von 100 μM und den Inkubationszeiten von 3 und 5 h dargestellt. Für die Metaboliten ist das Kompartiment (K), in dem dieser gefunden wurde, die Inkubationszeit (IZ), die Retentionszeit (RT), die experimentell (exp.) ermittelte und kalkulierte (kalk.) Masse $[\text{M-H}]^-$, die Summenformel und der mögliche Metabolit angegeben. Bei einer eingesetzten **V** Konzentration von 10 μM konnten keine Metaboliten detektiert werden.

Bei 100 μM konnte lediglich ein gemischt hydroxylierter und methylierter Metabolit nach 3 h und ein hydroxylierter nach 5 h detektiert werden. Während Hydroxy-**V** nur apikal gefunden wurde, konnte Hydroxymethoxy-**V** auch im basolateralen Kompartiment nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass das Hydroxymethoxy-**V** möglicherweise zu Hydroxy-**V** umgewandelt und in das apikale Kompartiment transportiert wird. Grundsätzlich ist erkennbar, dass **V** kein reaktives Substrat von Phase II Enzymen ist, da weder sulfatierte, noch glucuronidierte Konjugate gefunden werden konnten.

Tabelle 51: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **V** bei einer Konzentration von 100 μM , verifiziert durch UHPLC-DAD-MS ($n = 3$) mit Inkubationszeit (**IZ**), detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[\text{M-H}]^-$ und Summenformel; **K**: Kompartiment, **A**: Apikal, **B**: Basolateral, **Z**: Zelllysate.

K	IZ [h]	RT [min]	[M-H]⁻ (m/z) exp.	[M-H]⁻ (m/z) kalk.	Summenformel	Potenzieller Metabolit
A	3	9,615	461,1091	461,1089	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Hydroxymethoxy- V
B	3	9,646	461,1092	461,1089	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Hydroxymethoxy- V
A	5	5,695	447,0934	447,0933	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	Hydroxy- V

In **Tabelle 52** und **Tabelle 53** sind die gefundenen Phase I und II Metaboliten von **IV** bei einer eingesetzten Konzentration von 10 bzw. 100 μM und den Inkubationszeiten von 3 und 5 h dargestellt. Für die Metaboliten ist das Kompartiment (K), in dem diese gefunden wurden, die Inkubationszeit (IZ), die Retentionszeit (RT), die experimentell (exp.) ermittelte und kalkulierte (kalk.) Masse $[\text{M-H}]^-$, die Summenformel und der mögliche Metabolit angegeben.

Bei 10 μM eingesetztem **IV** ist zu erkennen, dass nach 3 h ähnliche Konjugate detektierbar waren wie nach 5 h (vgl. **Tabelle 52**). Nach 3 h Inkubationszeit wurde ein hydroxylierter, ein methylierter und ein kombiniert hydroxylierter und methylierter Metabolit von **IV** gefunden. Außerdem konnten einige Konjugate des Aglykons von **IV**, Apigenin, identifiziert werden, u.a. Hydroxy-apigenin-sulfat, Hydroxymethoxy-apigenin-sulfat und Hydroxymethoxy-apigenin. Alle diese Metaboliten wurden ausschließlich im apikalen Kompartiment gefunden. Nach 5 h wurden ein hydroxylierter, ein gemischt hydroxylierter und methylierter und ein hydroxylierter und zweifach methylierter Metabolit von **IV** detektiert. Zusätzlich konnten wie nach 3 h Hydroxy-apigenin-sulfat und Hydroxymethoxy-apigenin-sulfat gefunden werden. Auch diese Konjugate wurden ausschließlich im apikalen Kompartiment detektiert.

Tabelle 52: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **IV** bei einer Konzentration von 10 μM , verifiziert durch UHPLC-DAD-MS ($n = 3$) mit Inkubationszeit (**IZ**), detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[\text{M-H}]^-$ und Summenformel; **K**: Kompartiment, **A**: Apikal.

K	IZ [h]	RT [min]	[M-H]⁻ (m/z) exp.	[M-H]⁻ (m/z) kalk.	Summen- formel	Potenzieller Metabolit
A	3	8,491	447,0934	447,0933	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	Hydroxy- IV
A	5	8,569	447,0937	447,0933	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	Hydroxy- IV
A	3	8,912	445,1140	445,1140	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	Methoxy- IV
A	3	9,468	461,1093	461,1089	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Hydroxymethoxy- IV
A	5	9,564	461,1093	461,1089	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Hydroxymethoxy- IV
A	5	11,681	475,1248	475,1246	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	Hydroxydimethoxy- IV
A	3	11,658	364,9978	364,9973	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_9\text{S}$	Hydroxy-apigenin-sulfat
A	5	11,702	364,9973	364,9973	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_9\text{S}$	Hydroxy-apigenin-sulfat
A	3	11,909	379,0133	379,0129	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_9\text{S}$	Hydroxymethoxy-apigenin-sulfat
A	5	11,953	379,0133	379,0129	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_9\text{S}$	Hydroxymethoxy-apigenin-sulfat
A	3	11,910	299,0564	299,0561	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	Hydroxymethoxy-apigenin

In **Tabelle 53** sind alle Metaboliten von **IV** bei einer Ausgangskonzentration von 100 μM zusammengefasst, wobei kaum Unterschiede zwischen den Metaboliten nach 3 bzw. 5 h erkennbar sind. Nach einer Inkubationszeit von 3 h konnten ein hydroxylierter, ein methylierter, ein gemischt hydroxylierter und methylierter und ein gemischt hydroxylierter und zweifach methylierter Metabolit gefunden werden. Außerdem wurden verschiedene Konjugate von Apigenin detektiert, wie beispielsweise Hydroxy-apigenin-sulfat, Hydroxymethoxy-apigenin und Hydroxymethoxy-apigenin-sulfat (vgl. auch **3.1.1.4.3**). Nahezu alle nach 3 h identifizierten Metaboliten wurden nur im apikalen Kompartiment gefunden. Nach 5 h konnten alle Konjugate erneut detektiert werden, die bereits nach 3 h ermittelt worden waren. Auch diese wurden hauptsächlich im apikalen Kompartiment gefunden, lediglich Hydroxymethoxy-apigenin-sulfat konnte nach 3 und 5 h Inkubation auch im basolateralen Kompartiment nachgewiesen werden.

Für **IV** konnte bei 10 und 100 μM ein ähnliches Metabolitspektrum detektiert werden. Auch zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten sind kaum Unterschiede bei den gefundenen Metaboliten zu erkennen. Auffällig war allerdings, dass hauptsächlich methylierte oder hydroxylierte Konjugate von **IV** gefunden wurden, während keine sulfatierten oder glucuronidierten Metaboliten detektiert werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass **IV** kein Substrat der SULTs und UGTs im Darmepithel ist und somit nicht umgesetzt wird. Allerdings konnten einige Konjugate von Apigenin, des Aglykons von **IV**, identifiziert werden, was ähnlich wie bei **O** und **IO** darauf hinweist, dass Enzyme in den Caco-2-Zellen möglicherweise für die Spaltung der C-C-Bindung zwischen Aglykon und Zuckersubstituent verantwortlich sind. Für Apigenin konnten Methylierungs-, Hydroxylierungs- und Sulfatierungsreaktionen beobachtet werden, jedoch ebenfalls keine Glucuronidierung. Unabhängig von Inkubationszeit und Anfangskonzentration wurden nahezu alle Metaboliten im apikalen Kompartiment gefunden, was auch hier darauf hinweist, dass Effluxtransporter involviert sein könnten, die die Metaboliten aktiv wieder zurück in das Darmlumen transportieren.

In **Tabelle 54** und **Tabelle 55** sind die gefundenen Phase I und II Metaboliten von **S** bei einer eingesetzten Konzentration von 10 bzw. 100 μM und den Inkubationszeiten von 3 und 5 h dargestellt. Für die Metaboliten ist das Kompartiment (K), in dem diese gefunden wurden, die Inkubationszeit (IZ), die Retentionszeit (RT), die experimentell (exp.) ermittelte und kalkulierte (kalk.) Masse $[\text{M-H}]^-$, die Summenformel und der mögliche Metabolit angegeben.

Tabelle 53: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **IV** bei einer Konzentration von 100 μM , verifiziert durch UHPLC-DAD-MS ($n = 3$) mit Inkubationszeit (**IZ**), detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[\text{M-H}]^-$ und Summenformel; **K**: Kompartiment, **A**: Apikal, **B**: Basolateral.

K	IZ [h]	RT [min]	[M-H]⁻ (m/z) exp.	[M-H]⁻ (m/z) kalk.	Summenformel	Potenzieller Metabolit
A	3	8,501	447,0928	447,0933	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	Hydroxy- IV
A	5	8,514	447,0932	447,0933	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	Hydroxy- IV
A	3	8,905	445,1144	445,1140	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	Methoxy- IV
A	5	8,951	445,1145	445,1140	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$	Methoxy- IV
A	3	9,451	461,1098	461,1089	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Hydroxymethoxy- IV
A	5	9,478	461,1099	461,1089	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Hydroxymethoxy- IV
A	3	11,648	364,9978	364,9973	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_9\text{S}$	Hydroxy-apigenin-sulfat
A	5	11,655	364,9984	364,9973	$\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_9\text{S}$	Hydroxy-apigenin-sulfat
A	3	11,651	475,1251	475,1246	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	Hydroxydimethoxy- IV
A	5	11,656	475,1252	475,1246	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$	Hydroxydimethoxy- IV
A	3	11,900	299,0562	299,0561	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	Hydroxymethoxy-apigenin
A	5	11,906	299,0566	299,0561	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$	Hydroxymethoxy-apigenin
A	3	11,957	379,0135	379,0129	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_9\text{S}$	Hydroxymethoxy-apigenin-sulfat
B	3	11,903	379,0131	379,0129	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_9\text{S}$	Hydroxymethoxy-apigenin-sulfat
A	5	11,960	379,0131	379,0129	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_9\text{S}$	Hydroxymethoxy-apigenin-sulfat
B	5	11,908	379,0132	379,0129	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_9\text{S}$	Hydroxymethoxy-apigenin-sulfat

Bei einer Ausgangskonzentration von 10 μM **S** konnten kaum Metaboliten detektiert werden (vgl. **Tabelle 54**). Sowohl nach 3 h als auch nach 5 h konnte lediglich ein kombiniert hydroxylierter und methylierter Metabolit ausschließlich apikal gefunden werden.

Tabelle 54: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **S** bei einer Konzentration von 10 μM , verifiziert durch UHPLC-DAD-MS ($n = 3$) mit Inkubationszeit (**IZ**), detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[\text{M-H}]^-$ und Summenformel; **K**: Kompartiment, **A**: Apikal.

K	IZ [h]	RT [min]	[M-H]⁻ (m/z) exp.	[M-H]⁻ (m/z) kalk.	Summenformel	Potenzieller Metabolit
A	3	7,732	593,1509	593,1512	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	Hydroxymethoxy- S
A	5	7,383	593,1513	593,1512	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	Hydroxymethoxy- S

In **Tabelle 55** sind alle Konjugate von **S** bei einer Konzentration von 100 μM aufgelistet. Ähnlich wie bei 10 μM konnten auch hier kaum Konjugate identifiziert werden. Sowohl nach 3 h als auch nach 5 h konnten lediglich ein hydroxyliertes und ein kombiniert hydroxyliertes und methyliertes **S** ermittelt werden. Alle Konjugate wurden hauptsächlich im apikalen Kompartiment gefunden. Nach 3 h konnte zusätzlich das Hydroxymethoxy-**S** im basolateralen Kompartiment gefunden werden.

Unabhängig von Inkubationszeit und Ausgangskonzentration konnten für **S** ausschließlich hydroxylierte oder methylierte Metaboliten identifiziert werden. Phase II Reaktionen wie Sulfatierungen oder Glucuronidierungen konnten nicht festgestellt werden. Dies bedeutet, dass **S** unter den gewählten Bedingungen kein Substrat der SULTs und UGTs darstellt. Die gefundenen Metaboliten wurden fast ausschließlich im apikalen Kompartiment detektiert, was auch hier darauf hindeutet, dass Effluxtransporter beteiligt sein könnten.

Tabelle 55: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **S** bei einer Konzentration von 100 μM , verifiziert durch UHPLC-DAD-MS ($n = 3$) mit Inkubationszeit (**IZ**), detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[\text{M-H}]^-$ und Summenformel; **K**: Kompartiment, **A**: Apikal, **B**: Basolateral.

K	IZ [h]	RT [min]	[M-H]⁻ (m/z) exp.	[M-H]⁻ (m/z) kalk.	Summenformel	Potenzieller Metabolit
A	3	5,804	579,1350	579,1355	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$	Hydroxy- S
A	5	5,524	579,1349	579,1355	$\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$	Hydroxy- S
A	3	7,716	593,1506	593,1512	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	Hydroxymethoxy- S
A	5	7,549	593,1512	593,1512	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	Hydroxymethoxy- S
B	3	7,744	593,1507	593,1512	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	Hydroxymethoxy- S

In **Tabelle 56** und **Tabelle 57** sind die gefundenen Phase I und II Metaboliten von **IS** bei einer eingesetzten Konzentration von 10 bzw. 100 μM und den Inkubationszeiten von 3 und 5 h dargestellt. Dabei ist für die Metaboliten das Kompartiment (**K**), in dem dieser gefunden

wurde, die Inkubationszeit (IZ), die Retentionszeit (RT), die experimentell (exp.) ermittelte und kalkulierte (kalk.) Masse $[M-H]^-$, die Summenformel und der mögliche Metabolit angegeben.

Analog zu **S**, konnte auch für **IS** bei einer Konzentration von 10 μM lediglich der hydroxyliert und methylierte Metabolit detektiert werden und nur bei einer Inkubationszeit von 3 h. Nach 5 h konnte bei 10 μM kein Konjugat erkannt werden.

Tabelle 56: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **IS** bei einer Konzentration von 10 μM , verifiziert durch UHPLC-DAD-MS ($n = 3$) mit Inkubationszeit (**IZ**), detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel; **K**: Kompartiment, **A**: Apikal.

K	IZ	RT	$[M-H]^-$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	Summenformel	Potenzieller
	[h]	[min]	exp.	kalk.		Metabolit
A	3	8,720	593,1511	593,1512	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	Hydroxymethoxy- IS

Die gefundenen Metaboliten von **IS** bei einer Ausgangskonzentration von 100 μM sind in **Tabelle 57** aufgelistet. Nach 3 h wurde ein methyliertes **IS**, ein Hydroxymethoxy-**IS** und ein Hydroxydimethoxy-**IS** gefunden. Alle drei Konjugate wurden apikal gefunden und das Hydroxymethoxy-**IS** zusätzlich auch im basolateralen Kompartiment. Nach 5 h wurden dieselben drei Metaboliten gefunden, allerdings alle nur im apikalen Kompartiment.

Auch für **IS** konnten, genauso wie für **S**, unabhängig von Inkubationszeit und Ausgangskonzentration nur Hydroxylierungs- und Methylierungsreaktionen beobachtet werden. Sulfatierte oder glucuronidierte Konjugate konnten nicht detektiert werden. Die meisten Metaboliten konnten nur im apikalen Kompartiment gefunden werden.

Tabelle 57: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **IS** bei einer Konzentration von 100 μM , verifiziert durch UHPLC-DAD-MS ($n = 3$) mit Inkubationszeit (**IZ**), detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel; **K**: Kompartiment, **A**: Apikal.

K	IZ	RT	$[M-H]^-$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	Summenformel	Potenzieller
	[h]	[min]	exp.	kalk.		Metabolit
A	3	8,705	593,1499	593,1512	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	Hydroxymethoxy- IS
B	3	8,710	593,1513	593,1512	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	Hydroxymethoxy- IS
A	5	8,469	593,1456	593,1512	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$	Hydroxymethoxy- IS
A	3	10,712	577,1565	577,1563	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{14}$	Methoxy- IS
A	3	11,597	607,1668	607,1668	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	Hydroxydimethoxy- IS
A	5	11,464	607,1668	607,1668	$\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$	Hydroxydimethoxy- IS

Eine graphische Übersicht aller detektierten Phase I und II Metaboliten von **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** bei 10 μM eingesetzter Substanz und einer Inkubationszeit von 3 bzw. 5 h ist in **Abbildung 24** dargestellt. Es ist zu erkennen, dass im Fall von **O**, **IO** und **IV** viele verschiedene Phase I und II Metaboliten detektiert werden konnten, während bei **V**, **S** und **IS** kaum Konjugate gefunden werden. Für **S** und **IS** sind lediglich Hydroxylierungs- und Methylierungsreaktionen beobachtet worden, während bei **V** gar kein Metabolit gefunden werden konnte. Bei **IO** und **IV** konnten zusätzlich zu den zahlreichen Phase I und II Konjugaten der Ausgangssubstanzen auch Metaboliten der zugehörigen Aglyka, Luteolin bzw. Apigenin, identifiziert werden, so dass Enzyme im Caco-2-Monolayer möglicherweise die Fähigkeit besitzen C-C-Bindungen zu spalten. Ein Großteil der Metaboliten ist im apikalen Kompartiment zu finden, was darauf hindeutet, dass aktiver Transport dabei eine Rolle spielen könnte.

		O		IO		V		IV		S		IS	
		3h	5h	3h	5h	3h	5h	3h	5h	3h	5h	3h	5h
[FL]	A												
	B												
	Z												
Methoxy-[FL]	A												
	B												
	Z												
Hydroxy-[FL]	A												
	B												
	Z												
Hydroxymethoxy-[FL]	A												
	B												
	Z												
Hydroxydimethoxy-[FL]	A												
	B												
	Z												
[FL]-sulfat	A												
	B												
	Z												
Hydroxymethoxy-Aglykon	A												
	B												
	Z												
Hydroxy-Aglykon-glucuronid	A												
	B												
	Z												
Hydroxy-Aglykon-sulfat	A												
	B												
	Z												
Hydroxymethoxy-Aglykon-sulfat	A												
	B												
	Z												
Aglykon-glucuronid	A												
	B												
	Z												

   Eine Verbindung

  Zwei Verbindungen

Abbildung 24: Übersicht aller gebildeten Phase I und II Metaboliten von **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** beim Caco-2-Metabolisierungsversuch verifiziert durch Messung an der UHPLC-MS bei 10 μM eingesetzter Substanz und einer Inkubationszeit von 3 bzw. 5 h (n = 3); [FL]: Flavonoid C-Glykosid, A: Apikal, B: Basolateral, Z: Zellysat.

In **Abbildung 25** ist eine graphische Übersicht der durch Phase I und II Reaktionen gebildeten Metabolite von **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** bei 100 µM eingesetzter Ausgangssubstanz zu erkennen. Analog zu 10 µM Ausgangssubstanz ist auch hier auffällig, dass bei **O**, **IO** und **IV** ein breites Spektrum an Phase I und II Metaboliten detektiert wurde, während für **V**, **S** und **IS** lediglich hydroxylierte bzw. methylierte Konjugate identifiziert werden konnten. Zusätzlich zu den Konjugaten der Ausgangssubstanzen konnten für **O**, **IO** und **IV** bei 100 µM auch Metaboliten ihrer Aglyka gefunden werden, was bedeutet, dass Caco-2-Zellen potenziell C-C-Bindungen spalten können.

		O		IO		V		IV		S		IS	
		3h	5h	3h	5h	3h	5h	3h	5h	3h	5h	3h	5h
[FL]	A												
	B												
	Z												
Methoxy-[FL]	A												
	B												
	Z												
Hydroxy-[FL]	A												
	B												
	Z												
Hydroxymethoxy-[FL]	A												
	B												
	Z												
Hydroxydimethoxy-[FL]	A												
	B												
	Z												
[FL]-sulfat	A												
	B												
	Z												
Methoxy-[FL]-sulfat	A												
	B												
	Z												
Methoxy-Aglykon	A												
	B												
	Z												
Hydroxymethoxy-Aglykon	A												
	B												
	Z												
Hydroxy-Aglykon-glucuronid	A												
	B												
	Z												
Hydroxy-Aglykon-sulfat	A												
	B												
	Z												
Hydroxymethoxy-Aglykon-sulfat	A												
	B												
	Z												
Aglykon-glucuronid	A												
	B												
	Z												

■ ■ ■ ■ Eine Verbindung

■ ■ ■ ■ Zwei Verbindungen

Abbildung 25: Übersicht aller gebildeten Phase I und II Metaboliten von **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** beim Caco-2-Metabolisierungsversuch verifiziert durch Messung an der UHPLC-MS bei 100 µM eingesetzter Substanz und einer Inkubationszeit von 3 bzw. 5 h (n = 3); [FL]: Flavonoid C-Glykosid, A: Apikal, B: Basolateral, Z: Zellysat.

Beim Vergleich der gefundenen Phase I und II Metaboliten und deren Verteilung ist, in Abhängigkeit von der Konzentration der Ausgangssubstanz, zu erkennen, dass bei 100 μM (vgl. **Abbildung 25**) mehr Konjugate identifiziert werden konnten als bei 10 μM (vgl. **Abbildung 24**). Bei 10 μM sind fast alle Metaboliten ausschließlich apikal zu finden, während mit steigender Konzentration deutlich mehr Konjugate zusätzlich auch im basolateralen Kompartiment oder im Zelllysate gefunden werden konnten. Dies könnte daran liegen, dass bei 10 μM einige Konjugate in so geringer Menge vorhanden sind, dass sie unter der Detektionsgrenze liegen und somit nicht erkannt werden.

Bei Betrachtung der identifizierten Metaboliten nach den verschiedenen Inkubationszeiten ist zu erkennen, dass es kaum Unterschiede bei den zu beobachtenden Metabolisierungsreaktionen an sich gibt. Jedoch werden nach 3 h deutlich mehr Konjugate zusätzlich zum apikalen Kompartiment auch im Zelllysate oder im basolateralen Kompartiment gefunden, während nach 5 h sehr viele dieser Konjugate nur noch apikal nachgewiesen werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass Transporter vermittelter Efflux eine Rolle bei der Absorption der gebildeten Konjugate spielen könnte, was durch die Verwendung der zwei verschiedenen Inkubationszeiten gut nachvollzogen werden kann.

3.1.1.4.2 MS/MS-Fragmentierung der Phase II Metaboliten

Zur zweifelsfreien Identifizierung der unter **3.1.1.4.1** beschriebenen Phase II Metaboliten der eingesetzten Flavonoid C-Glykoside wurde neben der hochauflösenden Masse zusätzlich eine MS/MS-Fragmentierung durchgeführt. Dafür wurden die relevanten Fragmente der Konjugate von **O**, **IO** und **IV** auf Basis ihrer Retentionszeiten (vgl. **Tabelle 47** bis **Tabelle 50** für **O** und **IO**, **Tabelle 52** und **Tabelle 53** für **IV**) extrahiert und mittels Tandem-MS analysiert. Für **S**, **IS** und **V** wurde keine MS/MS-Messung durchgeführt, da nur methylierte bzw. hydroxylierte Metaboliten gefunden wurden. In **Tabelle 58** sind die erhaltenen Fragmentationen der Verbindungen beispielhaft für das apikale Kompartiment, eine Inkubationszeit und bei einer Konzentration von 100 μM aufgelistet.

Bei allen sulfatierten Konjugaten von **O** und **IO** konnte eine Abspaltung der Sulfat-Einheit durch Neutralverlust von 80 Da beobachtet werden (**Abbildung 26** und **Abbildung 27**). Bei Methoxy-**IO**-sulfat (2) konnte zusätzlich noch der Verlust der Methyl-Einheit ermittelt und somit in allen Fällen die Bildung des Fragmentions von **O** bzw. **IO** beobachtet werden. Für Methoxy-**IO**-sulfat (1) konnten keine Fragmentierungsreaktionen detektiert werden.

Außerdem konnte für alle glucuronidierten Metaboliten des Aglykons von **O** und **IO** ein Neutralverlust von 176 Da und damit der Glucuronyl-Einheit und bei Hydroxy-luteolin-

glucuronid zusätzlich der Verlust der Hydroxy-Einheit detektiert werden (**Abbildung 26** und **Abbildung 27**). Dadurch wurde in allen drei Fällen das Fragmentation von Luteolin identifiziert.

Bei den beiden sulfatierten Konjugaten von Apigenin, des Aglykons von **IV**, konnte ebenfalls der Neutralverlust von 80 Da und somit der Abgang der Sulfat-Einheit detektiert werden (**Abbildung 28**). Außerdem wurde im Fall von Hydroxymethoxy-apigenin-sulfat zusätzlich noch der Abgang der Hydroxy-Einheit beobachtet und somit die Bildung des Fragmentations von Methoxy-apigenin.

Tabelle 58: Bestimmung der gebildeten Metaboliten im Caco-2-Metabolisierungsversuch der Verbindungen **O**, **IO** und **IV** durch Extrahierung deren Massen zur jeweiligen Retentionszeit (RT) mittels MS/MS-Fragmentierung; **ZF**: Zuckerfragment, **GlucA**: Glucuronyl-, **SO₃**: Sulfat-, **CH₃**: Methoxy-, **OH**: Hydroxy-, **Eing. Substanz**: Eingesetzte Substanz, **IZ**: Inkubationszeit.

IZ [h]	RT [min]	[M-H]⁻ (m/z)	Fragmentionen (m/z)	Potenzieller Metabolit	Eing. Substanz
3	3,140	527,0502	407,0072 [M-H-ZF] ⁻ 327,0510 [M-H-ZF- SO ₃] ⁻	O -sulfat	O
5	2,276	527,0501	447,0929 [M-H-SO ₃] ⁻	IO -sulfat (1)	IO
5	4,644	527,0488	447,0929 [M-H-SO ₃] ⁻	IO -sulfat (2)	IO
3	5,891	541,0656	461,1072 [M-H-SO ₃] ⁻ , 447,0909 [M-H-SO ₃ - CH ₃] ⁻	Methoxy- IO -sulfat (2)	IO
3	5,126	477,0651	300,7669 [M-H-GlucA] ⁻ , 285,0412 [M-H-SO ₃ - OH] ⁻ ,	Hydroxy-Luteolin- glucuronid	O
3	5,245	477,1034	300,7669 [M-H-GlucA] ⁻ , 285,0412 [M-H-SO ₃ - OH] ⁻ ,	Hydroxy-Luteolin- glucuronid	IO
3	5,515	461,8565	285,7282 [M-H-GlucA] ⁻	Luteolin-glucuronid	IO
5	11,674	364,9973	285,0404 [M-H-SO ₃] ⁻	Hydroxy-apigenin- sulfat	IV
5	11,919	379,0135	299,0556 [M-H-SO ₃] ⁻ , 284,0325 [M-H-SO ₃ - OH] ⁻	Hydroxymethoxy- apigenin-sulfat	IV

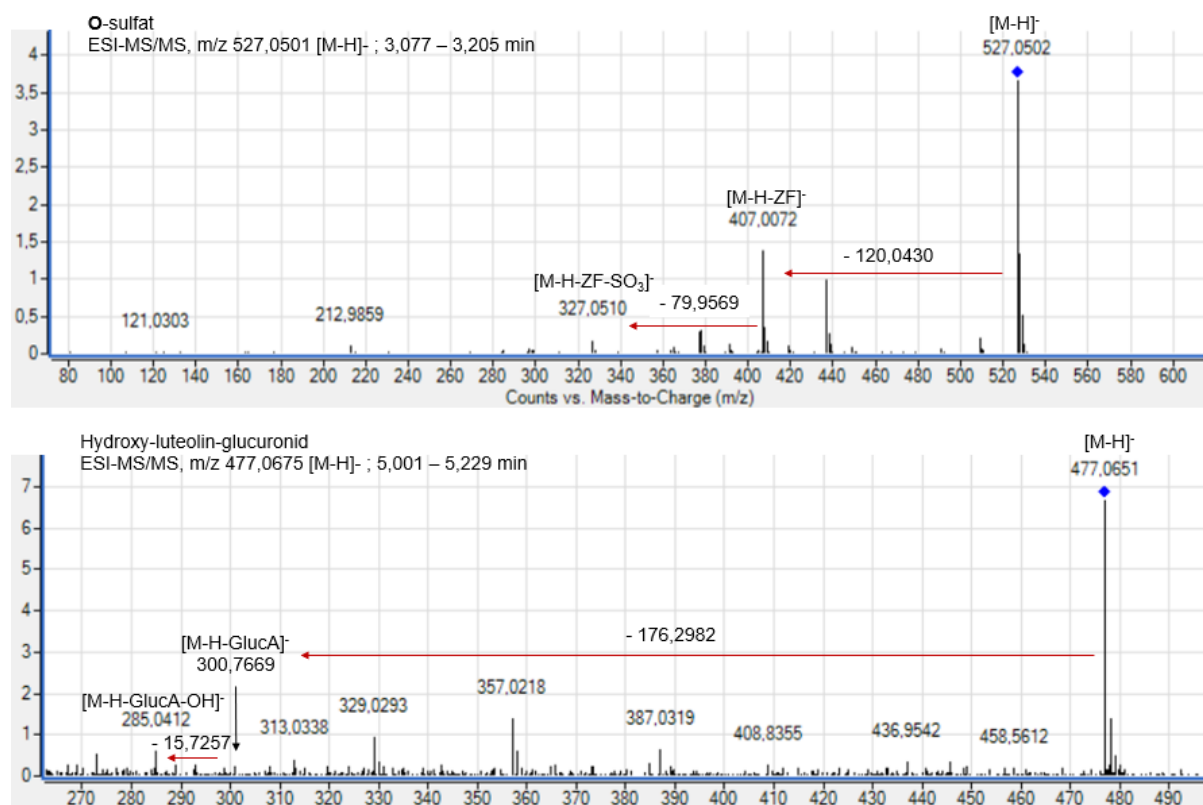


Abbildung 26: Identifizierung der gebildeten Phase II Metaboliten von **O** mittels UHPLC-DAD-MS/MS; abgebildet sind die jeweiligen MS/MS-Spektren der extrahierten Massen der Metaboliten zur jeweiligen Retentionszeit; Neutralverlust (inkl. Masse): rote Pfeile, **GlucA**: Glucuronyl-, **ZF**: Zuckerfragment, **SO₃**: Sulfat-.

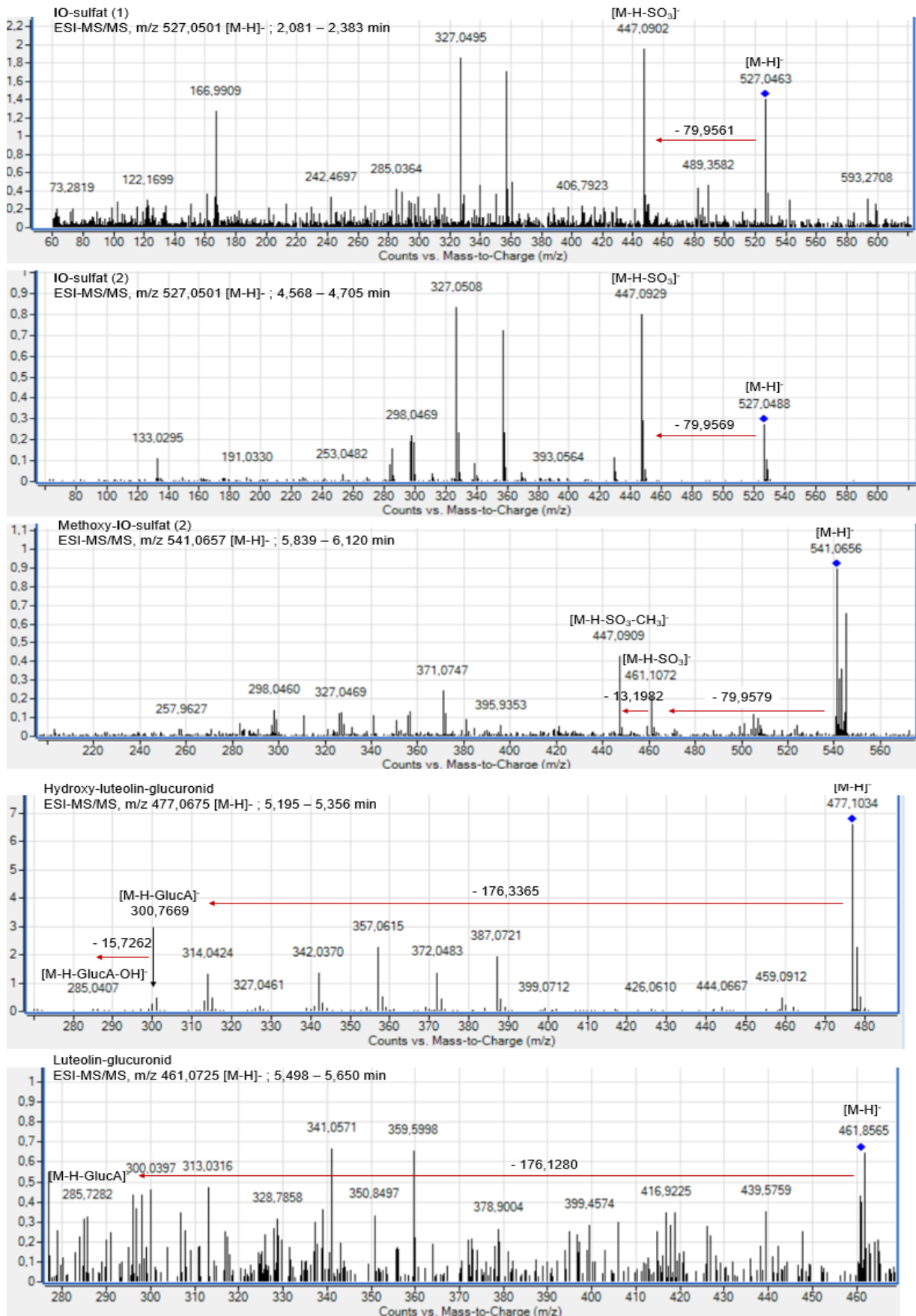


Abbildung 27: Identifizierung der gebildeten Phase II Metaboliten von **IO** mittels UHPLC-DAD-MS/MS; abgebildet sind die jeweiligen MS/MS-Spektren der extrahierten Massen der Metaboliten zur jeweiligen Retentionszeit; Neutralverlust (inkl. Masse): rote Pfeile, **GlucA**: Glucuronyl-, **ZF**: Zuckerfragment, **SO₃**: Sulfat-, **CH₃**: Methoxy-, **OH**: Hydroxy-.

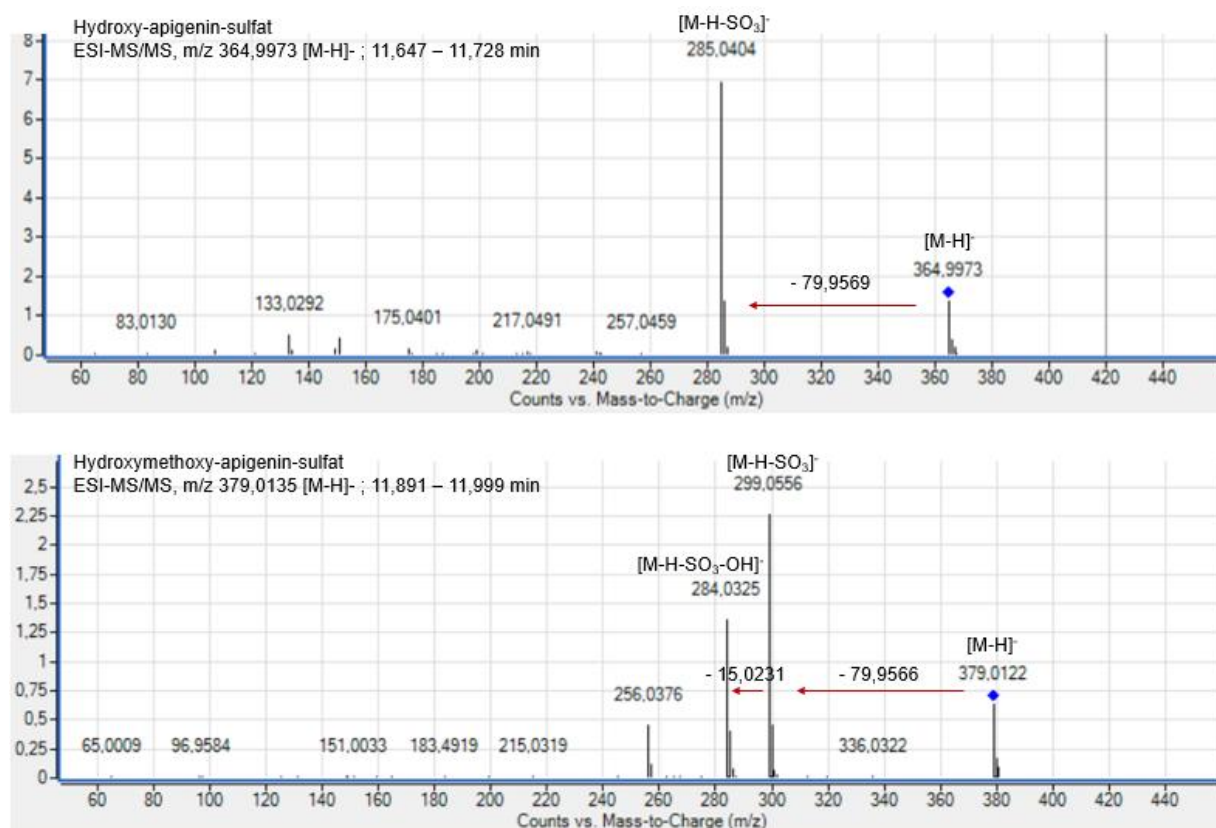


Abbildung 28: Identifizierung der gebildeten Phase II Metaboliten von **IV** mittels UHPLC-DAD-MS/MS; abgebildet sind die jeweiligen MS/MS-Spektren der extrahierten Massen der Metaboliten zur jeweiligen Retentionszeit; Neutralverlust (inkl. Masse): rote Pfeile, **SO₃**: Sulfat-, **OH**: Hydroxy-.

3.1.1.4.3 Aglyka Verifizierung durch Sulfatase- und Glucuronidasespaltung

Zur Identifizierung der Aglyka von einigen sulfatierten und glucuronidierten Metaboliten (vgl. 3.1.1.4.1) und um verschiedene, aber massengleiche Verbindungen voneinander zu unterscheiden, wurden die Sulfat- bzw. Glucuronid-Reste dieser Konjugate mit Sulfatase bzw. β -Glucuronidase abgespalten. Die Aglyka wurden dann per UHPLC-DAD-MS vermessen und die Retentionszeiten mit denen der Referenzsubstanzen verglichen. Dabei sollte verifiziert werden, ob es sich bei Hydroxy-apigenin-Konjugaten um Luteolin(= 3'-Hydroxy-apigenin)-Konjugate bzw. bei den Hydroxy-luteolin-Konjugaten um Quercetin(= 3-Hydroxy-luteolin)-Konjugate handelt.

In **Tabelle 59** sind die Ergebnisse des Experiments aufgelistet. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei Hydroxy-luteolin-glucuronid, einem Metaboliten von **O** bzw. **IO**, tatsächlich um Quercetin-glucuronid handelt. Außerdem konnten Hydroxy-apigenin-sulfat und Hydroxymethoxy-apigenin-sulfat als Luteolin-sulfat bzw. Methoxy-luteolin-sulfat identifiziert werden. Dies steht im Einklang mit der Literatur, in der Luteolin als Hauptmetabolit nach Hydroxylierung von Apigenin identifiziert wurde¹⁸⁹. Diese Erkenntnis spielt eine wichtige Rolle bei Betrachtung der Struktur-Metabolit-Beziehung, da dadurch beispielsweise festgestellt

werden konnte, dass nur Substanzen mit einer 3',4'-Dihydroxy-Struktur mono-sulfatierte Konjugate bilden.

Tabelle 59: Identifizierung von Phase II Metaboliten durch UHPLC-DAD-MS/MS Fragmentierung und Vergleich der Retentionszeiten (RT) mit den Referenzsubstanzen (R. S.) nach enzymatischer Hydrolyse (n. e. H.); n. d.: nicht detektiert; n. u.: nicht untersucht; exp.: experimentell, Eing. Subst.: Eingesetzte Substanz.

RT [min]	[M-H] ⁻ exp. (m/z)	Fragmentionen (m/z)	RT [min] Aglykon n. e. H.	RT [min] Aglykon R. S.	Möglicher Metabolit	Eing. Subst.
5,134	477,0674	301,0300 [M-H-GlucA] ⁻ , 176,0107 [M-H-Quercetin] ⁻	12,402	12,342	Quercetin-glucuronid	O, IO
5,476	461,0724	285,7282 [M-H-GlucA] ⁻	12,437	12,425	Luteolin-glucuronid	IO
6,204	299,0550	284,0352 [M-H-CH ₃] ⁻	n. u.	n. u.	Methoxy-Luteolin	IV
11,658	364,9978	285,0403 [M-H-SO ₃] ⁻	12,437	12,425	Luteolin-sulfat	IV
11,909	379,0135	299,0566 [M-H-SO ₃] ⁻ , 285,0350 [M-H-SO ₃ -CH ₃] ⁻	n. u.	n. u.	Methoxy-luteolin-sulfat	IV

3.1.1.5 Zusammenfassung und Diskussion der zellbiologischen Ergebnisse

Durch das *in vitro* Caco-2-Modell wurde der bidirektionale Permeabilitätskoeffizient (vgl. 3.1.1.3.3), der Einfluss von drei ABC-Transportern auf die Absorption (vgl. 3.1.1.3.4) und die Metabolisierung der sechs Flavonoid C-Glykoside O, IO, V, IV, S und IS im Dünndarmepithel untersucht (vgl. 3.1.1.4).

Bei Betrachtung der scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten vom apikalen zum basolateralen Kompartiment (A→B) fällt auf, dass O, IO und V mit $0,54 \pm 0,07 \times 10^{-6}$ cm/s, $0,26 \pm 0,21 \times 10^{-6}$ cm/s und $0,26 \pm 0,14 \times 10^{-6}$ cm/s unter den gewählten Bedingungen am besten resorbiert werden, während IV, S und IS mit $0,09 \pm 0,02 \times 10^{-6}$ cm/s, $0,06 \pm 0,02 \times 10^{-6}$ cm/s und $0,09 \pm 0,02 \times 10^{-6}$ cm/s nur knapp über dem Wert der Negativkontrolle FITC-Dextran ($0,03 \pm 0,03 \times 10^{-6}$ cm/s) liegen. Jedoch sprechen auch die Werte von O, IO und V für eine moderate bis schlechte Resorption, da in der Literatur von verschiedenen Arbeitsgruppen ein scheinbarer Permeabilitätskoeffizient von 10×10^{-6} cm/s als Grenzwert für eine 70-100%ige Resorption beschrieben wird¹⁹⁰. Da alle sechs Substanzen unter diesem Grenzwert liegen,

scheinen diese nicht vollständig im Dünndarmepithel resorbiert zu werden. Die wahrscheinlichste Ursache dafür sind die C-C-verknüpften Zuckersubstituenten, die zum einen die Molekülgröße, zum anderen die Polarität deutlich erhöhen. Durch die C-C-Bindung werden sie, anders als O-Glykoside, als Ganzes mit dem Zuckersubstituenten resorbiert, während O-Glykoside hauptsächlich als Aglyka aufgenommen werden und somit sowohl geringere Molekülmassen aufweisen als auch lipophiler sind.

Zur Ermittlung des Effluxverhältnisses ($P_{app} A \rightarrow B / P_{app} B \rightarrow A$) wurde zusätzlich zum $P_{app} A \rightarrow B$ noch der Permeabilitätskoeffizient aller Testsubstanzen vom basolateralen zum apikalen Kompartiment ($P_{app} B \rightarrow A$) bestimmt. Dabei wurde für **IO** und **IS** $P_{app} B \rightarrow A$ von $0,24 \pm 0,03 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ und $0,06 \pm 0,02 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ und somit Effluxverhältnisse von etwa 1 ermittelt. Dies deutet darauf hin, dass der Transport dieser beiden Substanzen hauptsächlich durch passive Diffusion geschieht, ohne Beteiligung von Transportern. Für die anderen vier Testsubstanzen waren die $P_{app} B \rightarrow A$ Werte signifikant höher als die Permeabilitätskoeffizienten $A \rightarrow B$ (vgl. **Tabelle 45**), wodurch ein Effluxverhältnis von unter 0,8 ermittelt werden konnte. Es wird also weniger absorbiert als zurück in das Darmlumen gelangt. Dies deutet darauf hin, dass zusätzlich zur passiven Diffusion Transporter vermittelter Efflux eine Rolle beim Absorptionsmechanismus dieser vier Flavonoid C-Glykoside spielen könnte. Auch der nicht-lineare Verlauf des prozentualen Transports bei **O**, **V** und **S** (vgl. **Abbildung 21**) ist ein Indiz dafür, dass die Substanzen aktiv transportiert werden.

Beim Vergleich der ermittelten Permeabilitätskoeffizienten mit Literaturdaten fällt auf, dass allgemein eine Heterogenität bei den Versuchsergebnissen vorherrscht. Für **O** wurden beispielsweise $P_{app} (A \rightarrow B)$ zwischen $0,75 \pm 0,05 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^{161}$ und $10,10 \pm 2,32 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^{70}$ beobachtet, wobei der von Liu et al.¹⁶¹ ermittelte Wert mit dem hier ermittelten Wert im Einklang steht. Für **IO** und **V** konnten Vergleichswerte von $2,25 \pm 0,45 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^{70}$ bzw. $2,26 \pm 0,37 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^{161}$ gefunden werden, welche etwas höher sind, als die in dieser Arbeit beobachteten Werte. Auch für **IV** liegen heterogene Ergebnisse in der Literatur vor. So sind Permeabilitätskoeffizienten zwischen $0,63 \pm 0,26 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^{191}$ und $5,81 \pm 0,28 \times 10^{-6} \text{ cm/s}^{192}$ beschrieben, wobei alle Werte höher sind, als der hier ermittelte¹⁹³. Zum Permeabilitätskoeffizienten von **S** und **IS** konnte lediglich eine Literaturquelle gefunden werden, in der Werte von $2,69 \pm 0,08 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ (**S**) bzw. $1,32 \pm 0,07 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ (**IS**) ermittelt wurden¹⁹⁴. Auch hier fällt auf, dass, wie bereits für die anderen vier Testsubstanzen beobachtet, die Werte in der Literatur deutlich höher sind als die der hier detektierten Permeabilitätskoeffizienten (vgl. auch **Tabelle 60**). In einigen Veröffentlichungen wurden zusätzlich zu den P_{app} der Einzelsubstanzen auch die Permeabilitätskoeffizienten in äquimolaren Mischungen mit anderen Flavonoiden untersucht. Liu et al. konnten dabei beispielsweise feststellen, dass der P_{app} von **O** in der Mischung mit **V**, isoswertisin, isoswertiajaponin und drei weiteren Derivaten von diesen signifikant erhöht war¹⁶¹. Auch für

IS konnte eine Verbesserung der Absorption innerhalb der Flavonoid-Mischung mit **S** und Vicenin-3 detektiert werden¹⁹⁴. Dies deutet darauf hin, dass im Fall der Flavonoid C-Glykoside der sogenannte kooperative Effekt zum Tragen kommen könnte. Möglicherweise führt die Zufuhr einer Flavonoid-Mischung dazu, dass potenzielle Effluxtransporter schneller mit Substraten gesättigt sind und somit die restlichen Substanzen besser bzw. schneller resorbiert werden können.

Tabelle 60: Vergleich der ermittelten bidirektionalen Permeabilitätskoeffizienten mit Literaturdaten.

Analyt	P_{app} A→B (x 10⁻⁶ cm/s)	P_{app} B→A (x 10⁻⁶ cm/s)	Literaturwerte P_{app} A→B (x 10⁻⁶ cm/s)
Orientin	0,54 ± 0,07	0,69 ± 0,08	0,75 ± 0,05 ¹⁶¹ 10,10 ± 2,32 ⁷⁰
Isoorientin	0,26 ± 0,21	0,24 ± 0,03	2,25 ± 0,45 ⁷⁰
Vitexin	0,26 ± 0,14	0,67 ± 0,16	2,26 ± 0,37 ¹⁶¹
Isovitexin	0,09 ± 0,02	3,11 ± 0,02	0,63 ± 0,26 ¹⁹¹ 5,81 ± 0,28 ¹⁹²
Schaftosid	0,06 ± 0,02	0,39 ± 0,31	2,69 ± 0,08 ¹⁹⁴
Isoschaftosid	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,02	1,32 ± 0,07 ¹⁹⁴

Bei zusätzlicher Betrachtung der bidirektionalen Permeabilitätskoeffizienten bzw. der Effluxverhältnisse bestätigt sich die in der Literatur vorherrschende Heterogenität von Versuchsergebnissen. In dieser Arbeit wurde für **IO** und **IS** ein Effluxverhältnis von etwa 1 bestimmt, was nicht mit der Literatur übereinstimmt, in der nur Verhältnisse von unter 0,8 beschrieben sind^{70,194}. Für die anderen vier C-Glykoside waren P_{app} A→B/P_{app} B→A Verhältnisse von unter 0,8 bestimmt worden, was teilweise vergleichbar mit der Literatur ist. Für **V** und **S** sind Effluxverhältnisse von 0,67 bzw. 0,70 beschrieben^{161,194}, während für **O** und **IV** sowohl Werte von etwa 1^{70,192} als auch welche unter 0,8^{161,191} ermittelt wurden. Die heterogenen Ergebnisse lassen zu diesem Zeitpunkt keine eindeutige Interpretation möglicher Transportmechanismen der getesteten Substanzen zu, wobei die Beteiligung von aktivem Transport bei der Resorption in den meisten Fällen plausibel erscheint. Auch beim Effluxverhältnis konnten Liu et al. einen signifikanten Unterschied zwischen Einzelsubstanzen und Flavonoid-Mischung feststellen. So wurde für **O** und **V** ein Verhältnis von 0,66 bzw. 0,67 für die Einzelsubstanzen ermittelt, wohingegen die Werte in der Mischung bei 1,3 bzw. 1,6 lagen¹⁶¹. Auch dies deutet wie bereits vorher beschrieben auf einen kooperativen Effekt der Flavonoid C-Glykoside hin, was allerdings weiter untersucht werden sollte.

Aufgrund der möglichen Beteiligung von Transportern bei der Resorption der sechs Flavonoid C-Glykoside wurden zusätzlich Caco-2-Resorptionsversuche mit Inhibition von je einem der drei ABC-Transporter P-GP, MRP2 oder BCRP durchgeführt. Dabei konnte für **O** und **S** eine signifikante Erhöhung des scheinbaren Permeabilitätskoeffizienten mit Zugabe von Verapamil, dem Inhibitor von P-GP, beobachtet werden. Bei den anderen vier Substanzen wurde keine Veränderung durch Inhibition von P-GP beobachtet. Außerdem konnte für alle Testsubstanzen keine Beteiligung von MRP2 oder BCRP detektiert werden. Zusammenfassend kann hier also für **O** und **S** eine passive Diffusion mit zusätzlichem Transporter vermitteltem Efflux als Resorptionsmechanismus postuliert werden. Für **IO** und **IS** wird aufgrund des bereits beschriebenen Effluxverhältnisses von etwa 1 keine Beteiligung von Transportern vermutet, was durch die Transporter Inhibition bestätigt werden konnte. Bei **V** und **IV** wurden widersprüchliche Ergebnisse ermittelt, da beide keine Substrate der drei Transporter zu sein scheinen, jedoch ein Effluxverhältnis von deutlich unter 0,8 detektiert wurde. Eine mögliche Erklärung wäre die Beteiligung von mehreren Effluxtransportern am Transport, da in dieser Arbeit nur je einer der ABC-Transporter inhibiert wurde. Außerdem ist auch die Beteiligung von anderen, hier nicht untersuchten Transportern oder Transportmechanismen denkbar. Zusätzlich könnte es zu Schwankungen in den Ergebnissen durch heterogene Transporter-Expression gekommen sein, da diese im Vorfeld nicht überprüft wurde.

In der Literatur sind für die fünf untersuchten C-Glykoside **O**, **V**, **IV**, **S** und **IS** verschiedene Transportmechanismen postuliert worden, lediglich für **IO** konnte zum jetzigen Zeitpunkt keine Veröffentlichung gefunden werden. Liu et al. stellten die Vermutung auf, dass **O** und **V** Substrate von P-GP, aber nicht von MRP2 sind und dass es sich bei beiden Substanzen um eine Kombination aus passiver Diffusion und aktivem Transport durch P-GP handelt¹⁶¹. Für **O** stimmt dies mit den hier ermittelten Ergebnissen überein, während für **V** keine Beteiligung von P-GP nachweisbar ist. Song et al. haben erst kürzlich den Einfluss von ABC-Transportern, Organo-Anionen-Transportern (OATP) und Monocarboxylat-Transportern (MCT) auf den parazellulären Transport von **IV** untersucht¹⁹². Dabei wurde postuliert, dass **IV** ein Substrat von P-GP, MRP1, MRP2 und MCT ist, während keine Beteiligung von OATPs und BCRP festgestellt werden konnte. Außerdem konnte der bidirektionale Permeabilitätskoeffizient von **IV** durch Zugabe von Cytochalasin D, einer Substanz, die Tight Junctions öffnet, signifikant erhöht werden, was bedeutet, dass parazellulärer Transport auch eine Rolle bei der Absorption spielt. Schlussendlich wurde also für **IV** eine Kombination aus aktivem, passivem und parazellulärem Transport postuliert, was von den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen abweicht. Auch für **S** und **IS** konnte von Shen et al. eine Kombination aus aktivem, passivem und parazellulärem Transport beobachtet werden¹⁹⁴. Dabei deuten die Ergebnisse darauf hin, dass **S** und **IS** Substrate von MRP Transportern und P-GP sind und mit Erhöhung der parazellulären Permeabilität bei Zugabe von EDTA-Na₂ auch eine Erhöhung der

Permeabilitätskoeffizienten einhergeht. Diese Erkenntnisse stimmen nur teilweise mit den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen überein. So konnte ebenfalls eine Beteiligung von P-GP beim Transport von **S** detektiert werden, wobei kein Zusammenhang zwischen den Permeabilitätskoeffizienten von **S** und **IS** und MRP2 ermittelt werden konnte. Der parazelluläre Transport wurde in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, könnte aber ein wichtiger nächster Schritt zum vollständigen Verständnis der Absorptionsmechanismen von Flavonoid C-Glykosiden sein.

Da sich die für die bidirektionalen Permeabilitätskoeffizienten beschriebene Heterogenität in der Literatur auch bei den Ergebnissen zu den intestinalen Transportmechanismen fortsetzt, sollen an dieser Stelle einige Gründe diskutiert werden. Zum einen werden verschiedene Caco-2-Zelllinien, wie der Caco-2-Klon TC-7 für die Experimente eingesetzt^{164,195}. Außerdem divergiert die benutzte Passagenzahl zwischen den Experimenten sehr stark, weswegen in der Literatur Versuche zwischen Passage 25 und 80 zu finden sind^{186,191}. Mit den verschiedenen Passagenzahlen gehen Unterschiede bei der Expression von Transportern und Enzymen einher, die zu starken Schwankungen der Ergebnisse führen können. Zusätzlich unterscheiden sich viele Experimente bei der Inkubationszeit^{70,192}, dem pH-Wert der Pufferlösungen¹⁹⁶ und der Detektionsmethode^{70,194}. Die Inkubationszeit spielt beispielsweise eine große Rolle bei der Beteiligung von Effluxtransportern, da eine zu kurze Inkubationszeit den Effekt möglicherweise verfälscht. Außerdem ist die Messmethode ein wichtiger Parameter für die Sensitivität der Experimente, da sowohl die Kalibrierung als auch die Ermittlung der P_{app} abhängig von der detektierten Peakfläche sind, die je nach Methode stark schwanken können.

Zusätzlich zu den bidirektionalen Permeabilitätskoeffizienten und den Untersuchungen zur möglichen Beteiligung von Effluxtransportern sollte ein Metabolit-Profil der sechs C-Glykoside erstellt werden (vgl. **3.1.1.4.1**). Dafür wurden die Testsubstanzen im Caco-2-Modell bei zwei verschiedenen Inkubationszeiten (3 und 5 h) und zwei Konzentrationen (10 und 100 μ M) getestet. Es wurde untersucht, ob eine Veränderung der Versuchsparameter das Metabolit-Profil beeinflusst und die Metabolisierungsreaktionen verändert.

Beim Vergleich der Metabolisierungsrate der sechs getesteten Substanzen fällt auf, dass **O**, **IO** und **IV** viele verschiedene Phase I und II Metaboliten bilden, während für **V**, **S** und **IS** kaum Konjugate gefunden werden konnten (vgl. **Abbildung 24** und **Abbildung 25**). Für **O**, **IO** und **IV** wurden eine Reihe methylierter, hydroxylierter und kombinierter Konjugate gefunden. Außerdem konnten für alle drei Testsubstanzen Phase I und II Konjugate der zugehörigen Aglyka, also Luteolin und Apigenin, detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass Caco-2-Zellen wahrscheinlich die Fähigkeit besitzen C-C-Bindungen zu spalten, was bisher noch nicht in der Literatur beschrieben wurde. Zusätzlich konnten nur für **O** und **IO** mono-sulfatierte Metaboliten identifiziert werden, was möglicherweise an der 3'/4'-Dihydroxy-Struktur liegt, die

nur bei diesen beiden Substanzen zu finden ist. Glucuronidierte Metaboliten konnten lediglich für das Aglykon von **O** und **IO**, Luteolin, gefunden werden. Für **V**, **S** und **IS** konnten nur einige methylierte, hydroxylierte und kombinierte Konjugate detektiert werden, es wurden jedoch keine sulfatierten oder glucuronidierten Metaboliten identifiziert. Bei **S** und **IS** könnte dies daran liegen, dass beide Testsubstanzen die einzigen mit zwei Zuckersubstituenten sind, was zu sterischen Hinderungen und Problemen beim Binden an mögliche Enzyme führen könnte. Außerdem könnte die fehlende Catechol-Struktur von **V**, **IV**, **S** und **IS** dafür verantwortlich sein, dass keine sulfatierten Konjugate dieser C-Glykoside zu finden sind. Dass keine Glucuronide der C-Glykoside detektiert wurden, könnte mit der schlechten Absorption dieser Verbindungen zusammenhängen, da Sulfatierung bei niedrigen Substratkonzentrationen zu dominieren scheinen, während Glucuronidierung die bevorzugte Metabolisierungsreaktion bei höheren Konzentrationen darstellt⁸⁴. Die Tatsache, dass nur für **O**, **IO** und **IV** eine Abspaltung der C-C-gebundenen Zuckersubstituenten beobachtet werden konnte, ist an dieser Stelle nicht zu erklären und muss weiter erforscht werden.

Durch den Einsatz von verschiedenen Ausgangskonzentrationen sollte der Einfluss dieser auf die Metabolisierungsreaktionen untersucht werden. Ausgangspunkt dafür ist der kompetitive Metabolismus zwischen UGTs und SULTs, da diese Enzyme gleichermaßen im Darm exprimiert werden und beide die OH-Gruppen von Flavonoiden erkennen⁷¹. Huang et al. haben darüber hinaus postuliert, dass beispielsweise bei niedrigeren Konzentrationen vermehrt Sulfate detektiert werden können, während Glucuronidierungen eher bei hoher Substratkonzentration stattfinden⁸⁴. Dies konnte in dieser Arbeit für die eingesetzten Konzentrationen nicht bestätigt werden. Es konnten bei beiden Konzentrationen lediglich sulfatierte Konjugate von **O** und **IO** identifiziert werden, was aber damit zu erklären ist, dass diese nur moderat bis schlecht von den Zellen aufgenommen werden und somit die Konzentration innerhalb der Zelle auch bei 100 µM noch zu gering für Glucuronidierungen ist, da die SULTs noch nicht gesättigt sind. Auch bei den Phase II Metaboliten der Aglyka von **O**, **IO** und **IV** konnte keine Veränderung der Metabolisierungsreaktionen mit steigender Konzentration festgestellt werden. Die durch Umsetzung mit β -Glucuronidase verifizierten Quercetin-glucuronide stehen im Einklang mit der Literatur, in der einige sulfatierte und glucuronidierte Konjugate von Quercetin gefunden werden konnten¹⁹⁷. Wieso jedoch auch bei geringerer Konzentration keine sulfatierten Metaboliten von Quercetin identifiziert werden konnten, ist bisher nicht endgültig geklärt. Die bei der Metabolisierung von **IO** und **IV** gefundenen Luteolin-glucuronide und -sulfate sind ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben¹⁹⁸, jedoch konnte auch hier keine konzentrationsabhängige Veränderung des Metabolit-Musters identifiziert werden. Die Bildung der Aglyka durch die Spaltung der C-C-Bindung zwischen Aglykon und Zuckersubstituenten, ist bisher noch nicht in der Literatur beschrieben und konnte hier das erste Mal detektiert werden. In der Literatur ist lediglich eine

C-C-Spaltung bei C-Glykosiden im Dickdarm durch bestimmte Bakterien beschrieben¹⁰⁰, für Caco-2-Zellen konnte dies bis zu diesem Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden. Um eine falsch positive Identifizierung von Aglyka auszuschließen, wurden im Vorfeld Stabilitätsmessungen durchgeführt, die sowohl das Vorhandensein von Aglyka in den Ausgangssubstanzen als auch die Entstehung durch die Versuchsbedingungen ausschließen konnten (vgl. 3.1.1.1.2). Zusammenfassend konnte kein Zusammenhang zwischen Metabolit-Muster und Konzentration erkannt werden.

Außerdem wurde der Metabolisierungsversuch mit zwei verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt, um den Einfluss der Reaktionsdauer auf die Metabolisierungsreaktionen zu testen. Beim Vergleich der Metaboliten nach 3 bzw. 5 h können keine bedeutenden Veränderungen festgestellt werden. Es ist allerdings auffällig, dass nach 3 h einige Konjugate apikal und basolateral gefunden werden können, während nach 5 h die meisten Metaboliten nur noch im apikalen Kompartiment detektiert wurden. Eine mögliche Erklärung wäre die für Flavonoide bereits beschriebene Beteiligung von Effluxtransportern im Dünndarmepithel⁷¹. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für **O** und **S** die Beteiligung von P-GP bei der Absorption nachgewiesen werden. Auch für die anderen vier C-Glykoside sind, wie im Vorfeld beschrieben, einige Transportmechanismen in der Literatur postuliert worden^{161,192,194}. Es wäre vorstellbar, dass diese Mechanismen ebenfalls für die jeweiligen Konjugate der Testsubstanzen zutreffend sind. Da dies aber noch nicht abschließend nachgewiesen wurde, müssten weitere Versuche zum Transport der Metaboliten durchgeführt werden.

Zusammenfassend konnte also in dieser Arbeit gezeigt werden, dass weder Inkubationszeit noch Anfangskonzentration einen grundlegenden Einfluss auf das Metabolit-Muster haben. Mit steigender Inkubationszeit konnte jedoch eine Anhäufung der Metaboliten im apikalen Kompartiment detektiert werden. Für **O**, **IO** und **IV** konnten zahlreiche Phase I und II Konjugate identifiziert werden, außerdem konnten erstmals Metaboliten der zugehörigen Aglyka gefunden werden, was bedeutet, dass Caco-2-Zellen möglicherweise fähig sind C-C-Bindungen zu spalten.

3.1.2 *In vitro* Metabolisierung in subzellulären Leberfraktionen

Die *in vitro* Metabolisierung der sechs Flavonoid C-Glykoside **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** in der Leber wurde mithilfe von zwei als Lebertestsysteme etablierten subzellulären Leberfraktionen, namentlich humane Lebermikrosomen (HLM) und Leber S9 Fraktion (S9F), untersucht. Als Vorversuch wurde die substanzabhängige Zellviabilität der Testsubstanzen an HepG2- Zellen geprüft.

3.1.2.1 Vorversuche

3.1.2.1.1 Zellviabilität von HepG2 Zellen

Um einen möglichen toxischen Effekt auf die verwendeten Zellen bei der *in vitro* Lebermetabolisierung auszuschließen, wurde für die sechs Flavonoid C-Glykoside ein MTT-Assay durchgeführt. Dabei sollte der Einfluss verschiedener Konzentrationen der Testsubstanzen auf die Zellviabilität, der aus einem Leberzellkarzinom entstandenen Zelllinie HepG2, ermittelt werden. Viabilitäten > 90% wurden hierbei nicht als zytotoxisch angesehen und für die Versuche akzeptiert. Alle Werte wurden als Prozent-Werte, bezogen auf den Kontrollansatz mit unbehandelten Zellen (100%), angegeben. Durch die Lösungsmittelkontrollen wurde der Einfluss von DMSO in der höchsten verwendeten Konzentration (0,5%) auf die Zellviabilität betrachtet.

Wie in **Abbildung 29** dargestellt, haben die sechs getesteten Substanzen **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** keinen Einfluss auf die Viabilität von HepG2-Zellen. Alle Testsubstanzen zeigen in den eingesetzten Konzentrationen eine Viabilität von > 90%. Auch die Lösungsmittelkontrolle beeinflusst die Reduktase-Aktivität nicht. Da keine toxischen Effekte festgestellt werden konnten, wurde für alle Testsubstanzen die höchste Konzentration (100 µM) bei der *in vitro* Lebermetabolisierung eingesetzt.

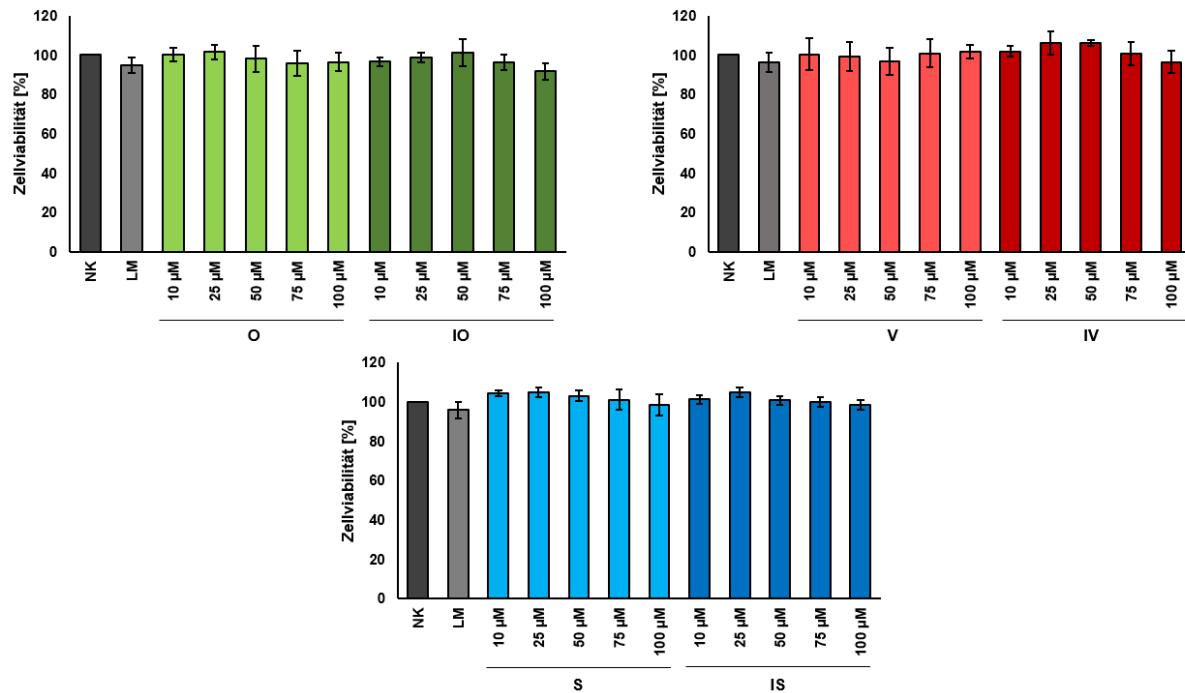


Abbildung 29: Viabilität der HepG2-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen 10, 25, 50, 75 und 100 µM der Substanzen **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS**; es wurden drei unabhängige Experimente in Pentaplikaten durchgeführt; Daten sind dargestellt als MW ± StabW (n = 3), sie wurden einer einfachen ANOVA mit Tukey-HSD Post-hoc-Test unterzogen, **NK**: Negativkontrolle, **LM**: Lösungsmittelkontrolle; Signifikanzniveaus: p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***).

3.1.2.2 Leber Metabolisierungssysteme und ihre Anwendung

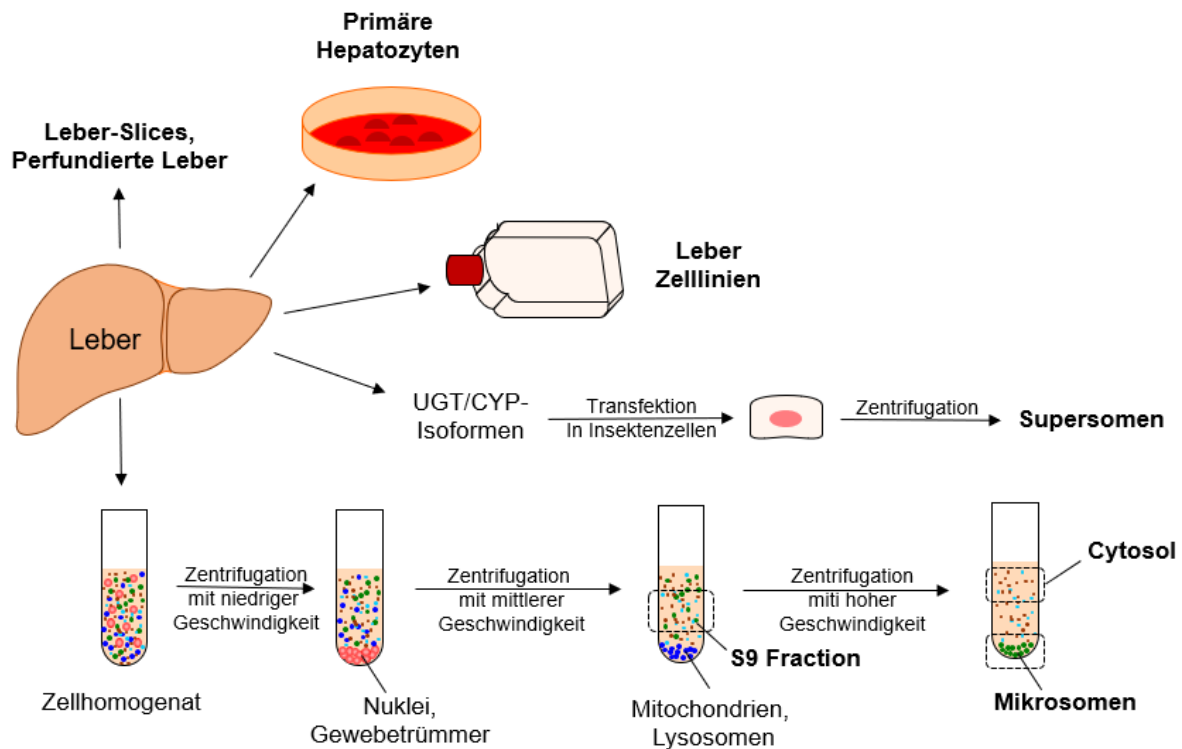


Abbildung 30: Übersicht zu beschriebenen *in vitro* Leber Metabolisierungssystemen und deren Gewinnung.^{199–201}

Zur Untersuchung der *in vitro* Metabolisierung in der Leber sind in der Literatur verschiedene Systeme beschrieben. Eine Übersicht dazu ist in **Abbildung 30** dargestellt. Da jedes dieser Systeme seine Vor- und Nachteile hat und verschiedene experimentelle Fragen adressiert, soll hier ein kurzer Überblick über die unterschiedlichen Metabolisierungssysteme und ihre Anwendung gegeben werden (vgl. **Abbildung 31**). Unter anderem soll kurz auf Supersomen, subzelluläre Leberfraktionen, wie humane Lebermikrosomen (HLM), Cytosol und S9 Fraktion (S9F), Leberzelllinien, primäre Hepatozyten und Gewebe-Kulturen eingegangen werden. Grundsätzlich werden *in vitro* Metabolisierungstechniken zum Screening und zur Charakterisierung von Arzneistoff-Metaboliten und zur Aufklärung von Stoffwechselwegen verwendet. Außerdem sind sie ein wichtiges Tool zur Vorhersage von Arzneistoff-Wechselwirkungen, Enzym-Inhibition oder Induktion.²⁰²

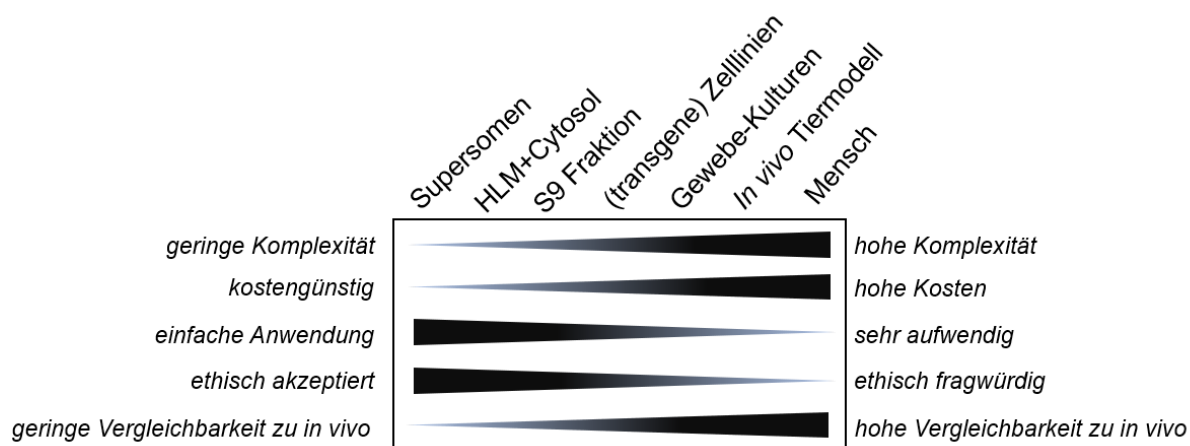


Abbildung 31: Im Rahmen der Arzneistoffentwicklung verwendete *in vitro* und *in vivo* Modelle zur Metabolisierung.

Supersomen sind Mikrosomen, welche aus Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums der Hepatocyten bestehen. Sie werden aus mit humanen CYP- oder UGT-Isoformen transfizierten Insektenzellen gewonnen. Dadurch, dass spezielle humane CYP- oder UGT-Isoformen in Supersomen exprimiert werden, kann der Beitrag eines einzelnen Enzyms auf den gesamten Stoffwechselweg erforscht werden. Zusätzlich werden sie auch zur Untersuchung des Einflusses von Enzym polymorphismen auf den Stoffwechsel und zur Ermittlung von Arzneistoff-Wechselwirkungen verwendet²⁰³. Die *in vivo* Korrelation ist bei diesem Modell aufgrund der nicht-physiologischen Bedingungen allerdings eher gering.

Subzelluläre Leberfraktionen, wie HLM, Cytosol und S9F, gehören zu den gängigen und gut charakterisierten Leber Metabolisierungssystemen. Diese Fraktionen werden aus Lebergewebe durch differentielle Zentrifugation in mehreren Schritten gewonnen²⁰⁴. Für alle drei Leberfraktionen ist die Zugabe von Cofaktoren erforderlich.^{199,202}

Die cytosolische Fraktion enthält nur wasserlösliche Phase II Enzyme, wie SULTs, NATs und GSTs. Abhängig von den zugesetzten Cofaktoren ist die Untersuchung der Metabolisierung von Einzelenzymen oder aller Enzyme in Kombination möglich. Jedoch kann aufgrund der fehlenden Phase I Enzyme kein komplettes Metabolit-Profil erhalten werden.^{199,202}

HLM sind das wohl am besten etablierte und günstigste *in vitro* Modell zum metabolischen Screening. Mikrosomen können von Einzelpersonen, geschlechts-spezifisch oder als gepoolte Proben kommerziell erworben werden. Dies erweitert die Anwendungsmöglichkeiten und steigert die Reproduzierbarkeit. HLM werden beispielsweise zur Evaluation von Phase I Oxidationen bzw. Glucuronidierung durch Zugabe von NADP bzw. UDPGA als Cofaktor verwendet. Außerdem werden sie zum Vergleich der Metabolit-Profile von verschiedenen Spezies und zur Bewertung der metabolischen Stabilität benutzt²⁰⁵. Allerdings beinhalten

Mikrosomen lediglich membrangebundene Enzyme (UGT, CYP) und können deshalb auch nicht das komplette Metabolit-Spektrum abdecken.^{199,202}

Die Leber S9 Fraktion beinhaltet sowohl cytosolische als auch membrangebundene Phase I und II Enzyme und kann deshalb zur Erstellung von Metabolit-Profilen unter Verwendung von individuellen, spezies- oder geschlechts-spezifischen Proben verwendet werden. Jedoch ist die Enzymaktivität in S9F geringer als in HLM oder cytosolischen Proben, was dazu führen kann, dass einige Metaboliten aufgrund zu geringer Konzentrationen nicht detektiert werden können.^{199,202}

Auf zellulärer Ebene werden sowohl Zelllinien als auch primäre Hepatozyten verwendet. HepG2 ist die meist verwendete Hepatokarzinom Zelllinie²⁰⁶. Grundsätzlich sind solche Zelllinien leicht zu kultivieren, werden jedoch aufgrund der geringen Expression von metabolisierenden Enzymen und den damit einhergehenden Detektionsproblemen in der Regel nur zur Untersuchung der Zytotoxizität verwendet.^{199,202}

Primäre Hepatozyten sind aufgrund ihrer starken Ähnlichkeit zu humanen *in vivo* Testung ein populäres *in vitro* System zur Untersuchung der Biotransformation von Arzneistoffen^{207,208}. Hepatozyten decken die gesamte Bandbreite an metabolisierenden Enzymen und spezifischen Transportern ab und können somit vielfältig eingesetzt werden. Die Gewinnung der primären Hepatozyten ist allerdings ziemlich komplex, außerdem kommt es in herkömmlichen Zellkulturen zum Verlust von Enzym- und Transporter-Aktivität. Durch Verwendung von Kryokonservierung und spezifischen Kultur-Methoden können primäre Hepatozyten aber kommerziell vertrieben und die Enzymaktivität erhalten werden^{209,210}.

Gewebekulturen und Studien an isolierter perfundierter Leber sind aufgrund der dreidimensionalen Strukturen und den Zell-Zell-Interaktionen die *ex vivo* Modelle mit der besten *in vivo* Korrelation. Allerdings sind für solche Studien keine humanen Leberproben verfügbar, weswegen auf Tierleber zurückgegriffen wird. Diese sind allerdings nicht immer das korrekte Modell zur Untersuchung der humanen Biotransformation. Außerdem sind Versuche mit perfundierter Leber sehr arbeitsintensiv, haben nur geringe Reproduzierbarkeit und die funktionale Integrität ist auf 3 h limitiert.^{199,199,202}

3.1.2.3 Metabolisierung durch humane Lebermikrosomen

Aufgrund der Reproduzierbarkeit und zusätzlich einfachen und günstigen Anwendung, wurden zunächst die humanen Lebermikrosomen (HLM) als *in vitro* Testsystem gewählt. Dabei sollte die *in vitro* Metabolisierung der sechs Flavonoide **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** ermittelt werden. Da HLM nur membrangebundene Enzyme beinhalten, wurde der Fokus auf die Hydroxylierungs- und Glucuronidierungsreaktionen gelegt (**Abbildung 32**).

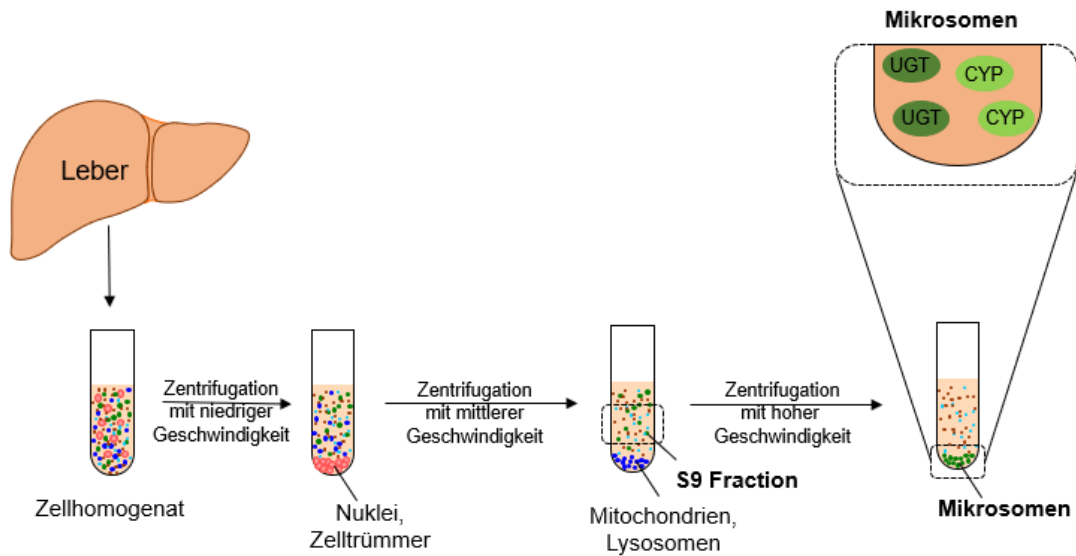


Abbildung 32: Übersicht über die Gewinnung der subzellulären Fraktionen und den in HLM enthaltenen Enzymen.

3.1.2.3.1 7-Ethoxycumarin als Kontrollsubstanz

Zur Etablierung und Kontrolle des mikrosomalen Inkubationssystem wurde 7-Ethoxycumarin (7-EC), eine häufig genutzte und günstige Kontrollsubstanz, für die Untersuchung der Glucuronidierung und des Phase I Metabolismus verwendet (vgl. 2.2.1.2).

Die Metabolisierung von 7-EC ist gut erforscht, weswegen es häufig als Positivkontrolle für verschiedene Inkubationssysteme (vgl. auch 3.1.2.4.1) genutzt wird. Dabei werden die gebildeten Metaboliten, mit denen aus der Literatur verglichen. Für 7-EC sind eine oxidative Deethylierung durch CYP1A2/CYP2E1 und eine Hydroxylierung durch ein bisher unbekanntes CYP Enzym als Phase I Reaktionen beschrieben. Die entstandenen Phase I Metaboliten, 7-Hydroxycumarin (7-HC. **M1**) bzw. der an Position 3 hydroxylierte Metabolit von 7-EC (**M2**), reagieren nachfolgend durch bisher unbekannte UGTs zu den jeweils glucuronidierten Metaboliten **M3** und **M4** (Abbildung 33).^{167,211}

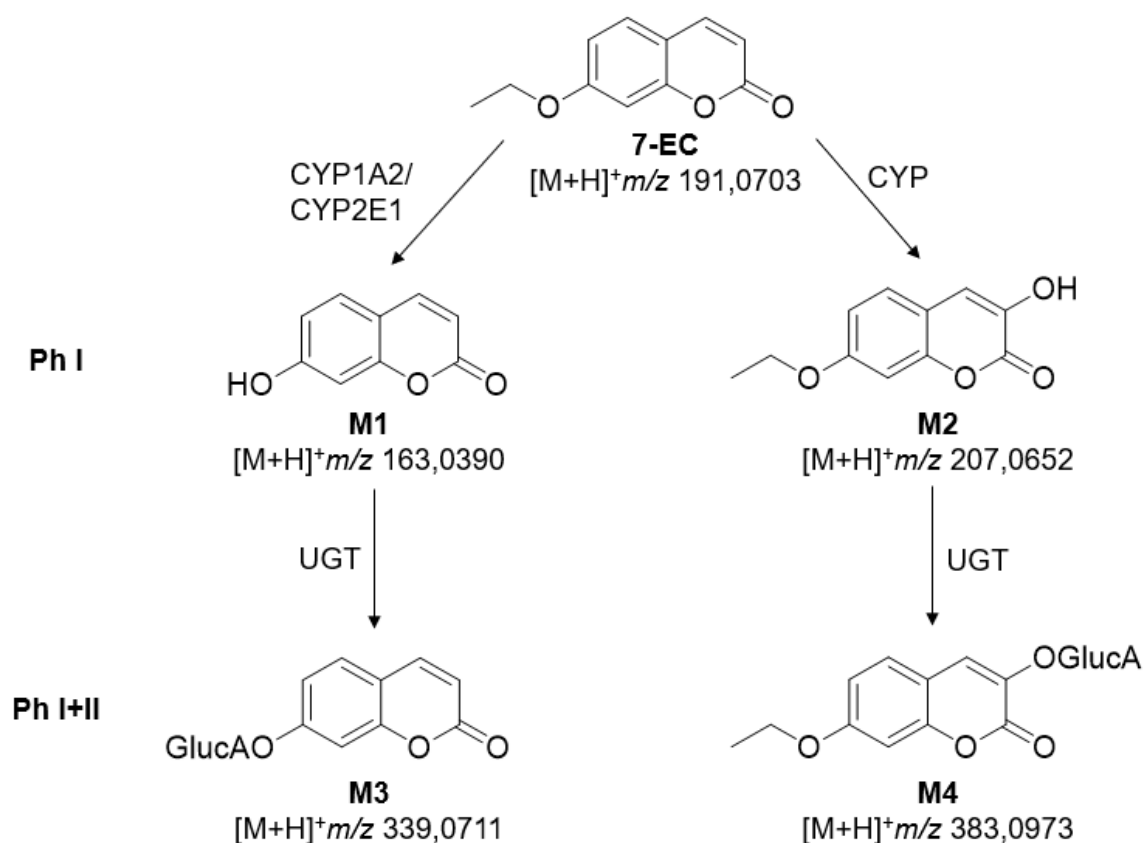


Abbildung 33: Schema der zu erwartenden Metaboliten (**M1-4**) von 7-EC mit zugehörigen kalkulierten Massen bei positiver Ionisation $[M+H]^+$.^{167,211}

In **Tabelle 61** sind die durch LC-MS detektierten Metaboliten von 7-EC aufgelistet. Es konnten alle erwarteten Konjugate auch in den verwendeten Inkubationssystemen mit HLM identifiziert werden. Im Phase I Inkubationssystem konnte sowohl der deethylierte (**M1**) als auch der hydroxylierte Metabolit (**M2**) detektiert werden. Wie beschrieben, wurden beim Versuch mit ausschließlich Phase II Reaktionen keine Metaboliten gefunden, da 7-EC keine freie OH-Gruppe und somit keinen Angriffspunkt für UGTs besitzt. Beim kombinierten Inkubationssystem mit aktivierten Phase I und II Enzymen konnten die Masse von **M1** und das zugehörige Glucuronid (**M3**) gefunden werden. Außerdem wurde das monoglucuronidierte Konjugat von **M2**, also **M4**, gefunden. **M2** konnte im Phase I und II Inkubationssystem nicht mehr nachgewiesen werden und scheint vollständig zu **M4** reagiert zu haben. Es konnten also alle in der Literatur beschriebenen Konjugate auch im hier verwendeten Versuchsaufbau verifiziert werden, weswegen dieser geeignet zur Ermittlung von Metabolit-Profilen von weiteren Testsubstanzen ist.

Tabelle 61: Für 7-EC im HLM Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS bei positiver Ionisation ($n = 3$) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M+H]^+$ und Summenformel.

	Metabolit	RT [min]	$[M+H]^+ (m/z)$	$[M+H]^+ (m/z)$	Summenformel
			exp.	kalk.	
7-EC	-	3,754	191,0702	191,0703	$C_{11}H_{10}O_3$
Ph I	M1	2,772	163,0389	163,0390	$C_9H_6O_3$
	M2	3,549	207,0651	207,0652	$C_{11}H_{10}O_4$
Ph II	-	-	-	-	-
Ph I+II	M3	2,261	339,0713	339,0711	$C_{15}H_{14}O_9$
	M1	2,769	163,0389	163,0390	$C_9H_6O_3$
	M4	2,919	383,0976	383,0973	$C_{15}H_{14}O_9$

3.1.2.3.2 Identifizierung von mikrosomalen Phase I und II Metaboliten

Zur Identifizierung von möglichen Metaboliten der sechs Flavonoide **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** in der Leber wurde eine *in vitro* Metabolisierung an HLM mit einer Inkubationszeit von 3 h für **O**, **IO**, **S** und **IS** bzw. 24 h für **V** und **IV** durchgeführt. Mit jedem Probensatz wurden zwei Negativkontrollen ohne HLM (w/o HLM) bzw. ohne Cofaktoren (w/o Cof), eine Matrixkontrolle (Matrix) und eine Stabilitätskontrolle (Stabi) mitgeführt, um Stabilitätsprobleme oder unspezifische Reaktionen auszuschließen. Zur Generierung eines Metabolit-Profiles wurde jeweils der Phase I (Ph I), Phase II (Ph II) und der kombinierte Phase I und II (Ph I+II) Metabolismus untersucht (vgl. 2.2.1.2). Die erhaltenen Proben wurden zuerst an der HPLC-DAD (vgl. 2.2.3) und anschließend via UHPLC-DAD-MS (vgl. 2.2.4) bei negativer Ionisation vermessen.

In **Tabelle 62** sind die für **O** identifizierten Metaboliten aufgelistet. Es konnten keine Phase I Metaboliten detektiert werden. Beim Phase II Metabolismus konnten zwei mono-glucuronidierte Konjugate mit den Retentionszeiten 8,007 bzw. 9,495 min nachgewiesen werden. Auch beim kombinierten Phase I und II Metabolismus konnten lediglich die zwei in Phase II bereits detektierten Glucuronide (**O-G1** und **O-G2**) identifiziert werden. Ein Schema der stattfindenden Reaktionen ist in **Abbildung 34** dargestellt. Aufgrund der vielen möglichen Reaktionsstellen kann zu diesem Zeitpunkt keine Aussage zur Metabolisierungsposition getroffen werden.

Tabelle 62: Für **O** im HLM Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS bei negativer Ionisation ($n = 3$) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel.

	Metabolit	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z) exp.	$[M-H]^-$ (m/z) kalk.	Summenformel
O	-	10,229	447,0934	447,9333	$C_{21}H_{20}O_{11}$
Ph I	-	-	-	-	-
Ph II	O-G1	8,007	623,1247	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	O-G2	9,495	623,1249	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
Ph I+II	O-G1	8,062	623,1256	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	O-G2	9,563	623,1255	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$

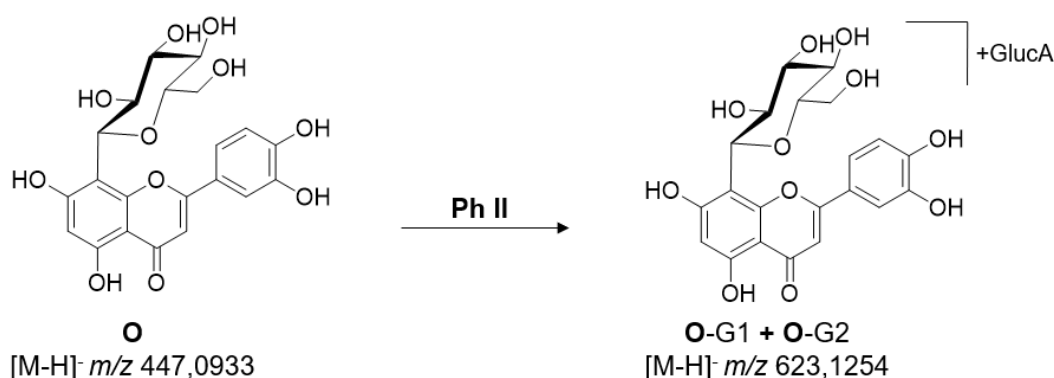


Abbildung 34: In verschiedenen Inkubationssystemen mit HLM durch LC-MS detektierte Metaboliten von **O**; **GlucA**: Glucuronyl-.

Für **IO** konnte ein hydroxylierter Phase I Metabolit (**IO-OH**) mit bei einer Retentionszeit von 9,224 min identifiziert werden (**Tabelle 63**). Außerdem konnten drei mono-glucuronidierte Phase II Konjugate (**IO-G1/IO-G2/IO-G3**) detektiert werden, wobei auch hier die Metabolisierungspositionen nicht identifiziert werden konnten. Im kombinierten Phase I und II Metabolismus wurden lediglich die bereits identifizierten hydroxylierten bzw. glucuronidierten Konjugate gefunden (**Abbildung 35**). Es ist allerdings zu einem späteren Zeitpunkt gelungen zwei der gefundenen drei Glucuronide zu isolieren und mittels NMR Spektroskopie aufzuklären (vgl. **3.1.2.3.4**). Ein mögliches Schema der stattfindenden Phase I und II Metabolisierungsreaktionen von **IO** ist in **Abbildung 35** dargestellt.

Tabelle 63: Für **IO** im HLM Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS bei negativer Ionisation ($n = 3$) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel.

	Metabolit	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z) exp.	$[M-H]^-$ (m/z) kalk.	Summenformel
IO	-	9,655	447,0945	447,9333	$C_{21}H_{20}O_{11}$
Ph I	IO-OH	9,224	463,0891	463,0882	$C_{21}H_{20}O_{12}$
Ph II	O-G1	6,584	623,1265	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	O-G2	8,441	623,1258	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	O-G3	9,108	623,1263	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
Ph I+II	O-G1	6,587	623,1261	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	O-G2	8,435	623,1261	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	O-G3	9,090	623,1261	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$

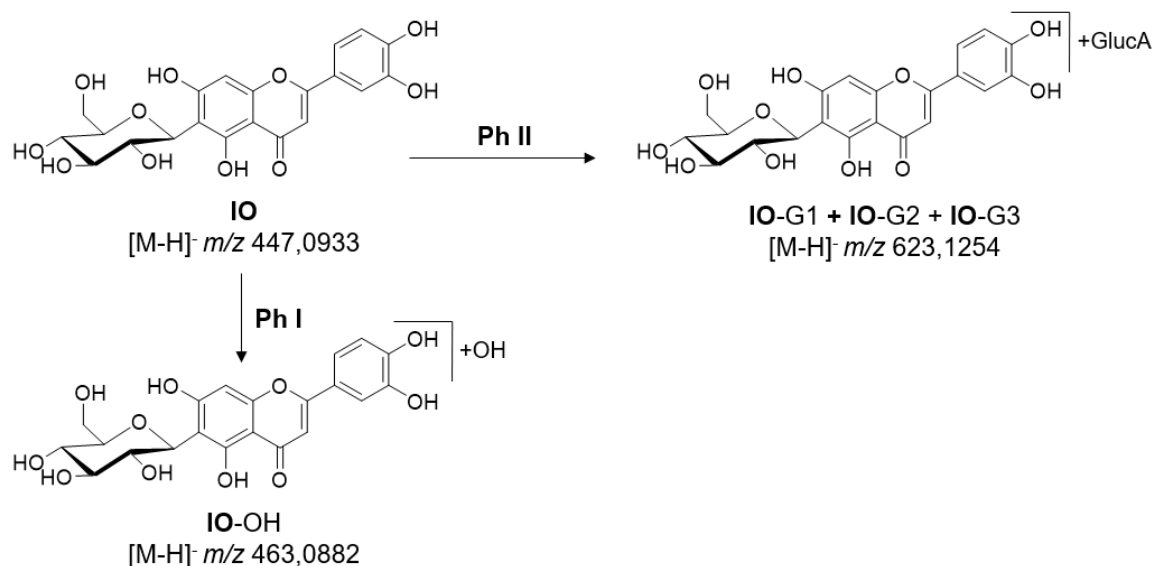


Abbildung 35: In verschiedenen Inkubationssystemen mit HLM durch LC-MS detektierte Metaboliten von **IO**; **GlucA**: Glucuronyl-, **OH**: Hydroxy-.

Die für **V** gefundenen Metaboliten mit zugehörigen Retentionszeiten sind in **Tabelle 64** dargestellt. Es konnten keine Phase I Metaboliten von **V** gefunden werden. Die drei Glucuronide, **V-G1**, **V-G2** und **V-G3**, konnten sowohl beim Phase II als auch beim kombinierten Metabolismus als einzige Konjugate identifiziert werden, wobei keine Aussage zur Konjugationsposition getroffen werden kann (**Abbildung 36**).

Tabelle 64: Für **V** im HLM Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS bei negativer Ionisation ($n = 3$) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel.

	Metabolit	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z) exp.	$[M-H]^-$ (m/z) kalk.	Summenformel
V	-	11,525	431,0989	431,0984	$C_{21}H_{20}O_{10}$
Ph I	-	-	-	-	-
Ph II	V-G1	4,590	607,1298	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	V-G2	8,072	607,1303	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	V-G3	10,899	607,1302	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
Ph I+II	V-G1	4,590	607,1304	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	V-G2	8,097	607,1300	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	V-G3	10,845	607,1295	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$

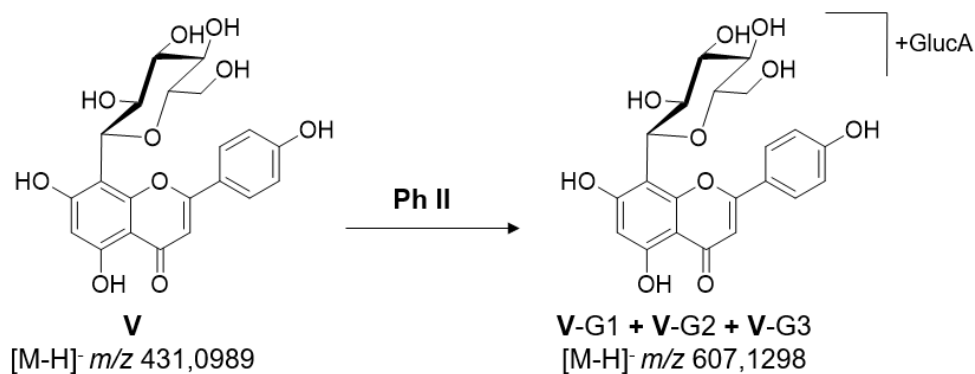


Abbildung 36: In verschiedenen Inkubationssystemen mit HLM durch LC-MS detektierte Metaboliten von **V**; GlucA: Glucuronyl-.

In **Tabelle 65** sind die für **IV** gefundenen Metaboliten dargestellt. Analog zu **V**, konnten auch für **IV** keine Phase I Metaboliten identifiziert werden. Es wurden jedoch auch drei monoglucuronidierte Phase II Metaboliten (**IV-G1/IV-G2/IV-G3**) nach 6,864 min, 9,435 min bzw. 10,342 min detektiert, die ebenfalls im kombinierten Phase I und II Metabolismus nachgewiesen werden konnten (**Abbildung 37**).

Tabelle 65: Für **IV** im HLM Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS bei negativer Ionisation ($n = 3$) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel.

	Metabolit	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z) exp.	$[M-H]^-$ (m/z) kalk.	Summenformel
IV	-	11,509	431,0992	431,0984	$C_{21}H_{20}O_{10}$
Ph I	-	-	-	-	-
Ph II	IV-G1	6,841	607,1317	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IV-G2	9,416	607,1310	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IV-G3	10,288	607,1303	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
Ph I+II	IV-G1	6,864	607,1307	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IV-G2	9,435	607,1301	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	V-G3	10,342	607,1301	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$

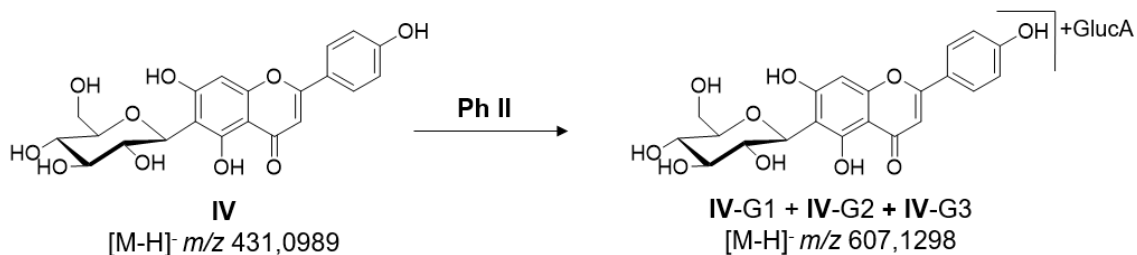


Abbildung 37: In verschiedenen Inkubationssystemen mit HLM durch LC-MS detektierte Metaboliten von **IV**; GlucA: Glucuronyl-.

Für **S** und **IS** konnten weder Phase I noch Phase II Konjugate identifiziert werden (**Tabelle 66** und **Tabelle 67**). In allen Inkubationssystemen wurden lediglich die Ausgangssubstanzen detektiert.

Tabelle 66: Für **S** im HLM Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS bei negativer Ionisation ($n = 3$) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel.

	Metabolit	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	Summenformel
			exp.	kalk.	
S	-	9,925	563,1415	563,1406	$C_{26}H_{28}O_{15}$
Ph I	-	-	-	-	-
Ph II	-	-	-	-	-
Ph I+II	-	-	-	-	-

Tabelle 67: Für **IS** im HLM Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS bei negativer Ionisation ($n = 3$) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel.

	Metabolit	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	Summenformel
			exp.	kalk.	
IS	-	10,728	563,1425	563,1406	$C_{26}H_{28}O_{15}$
Ph I	-	-	-	-	-
Ph II	-	-	-	-	-
Ph I+II	-	-	-	-	-

Es konnten bei der *in vitro* Leber Metabolisierung lediglich für **O**, **IO**, **V** und **IV** Metaboliten detektiert werden, während **S** und **IS** nicht umgesetzt wurden. Für **IO**, **V** und **IV** konnten drei glucuronidierte Konjugate gefunden werden, während für **O** nur zwei Glucuronide identifiziert werden konnten. Phase I Metaboliten konnten nur für **IO** nachgewiesen werden, welches einen hydroxylierten Metaboliten gebildet hat. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen der Metabolisierung und der Anzahl der Zuckersubstituenten gibt.

3.1.2.3.3 MS/MS Fragmentierung

Zur Überprüfung der unter **3.1.2.3.2** beschriebenen mikrosomalen Phase II Metaboliten der eingesetzten Flavonoid C-Glykoside wurde neben der hochauflösenden Masse zusätzlich eine MS/MS-Fragmentierung durchgeführt. Dafür wurden die relevanten Fragmente der Konjugate von **O**, **IO**, **V** und **IV** auf Basis ihrer Retentionszeiten (vgl. **Tabelle 62** bis **Tabelle 65**) extrahiert und mittels Tandem-MS analysiert. In **Tabelle 68** sind die erhaltenen Fragmentationen der Verbindungen beispielhaft für das Phase II Inkubationssystem aufgelistet.

Für alle hier detektierten Metaboliten von **O** und **IO** konnte der Abgang einer Glucuronyl-Einheit durch Neutralverlust von 176 Da beobachtet werden (**Abbildung 38**). Von den sechs im

Vorfeld identifizierten glucuronidierten Metaboliten von **V** und **IV** konnte lediglich für vier der Abgang der Glucuronyl-Einheit verifiziert werden (**Abbildung 39**). Da die beiden Glucuronide, die nicht per LC-MS/MS detektiert werden konnten im Vorfeld nur in sehr geringen Mengen gefunden worden waren, könnte es sein, dass sie hier unter dem Detektionslimit liegen.

Tabelle 68: Verifizierung der gebildeten Metaboliten von **O**, **IO**, **V** und **IV** der *in vitro* Metabolisierung mit HLM durch Extrahierung deren Massen zur jeweiligen Retentionszeit (RT) mittels MS/MS-Fragmentierung; **GlucA**:Glucuronyl-**n. d.**: nicht detektiert.

RT [min]	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmentationen (m/z)	Potenzieller Metabolit
8,007	623,1259	447,0934 [M-H-GlucA] ⁻	O-G1
9,495	623,1260	447,0935 [M-H-GlucA] ⁻	O-G2
6,584	623,1263	447,0942 [M-H-GlucA] ⁻	IO-G1
8,441	623,1258	447,0937 [M-H-GlucA] ⁻	IO-G2
9,108	623,1271	447,0944 [M-H-GlucA] ⁻	IO-G3
4,590	607,1298	n. d.	V-G1
8,072	607,1305	431,0981 [M-H-GlucA] ⁻	V-G2
10,899	607,1303	431,0984 [M-H-GlucA] ⁻	V-G3
6,841	607,1307	431,0987 [M-H-GlucA] ⁻	IV-G1
9,435	607,1301	n. d.	IV-G2
10,288	607,1304	431,0985 [M-H-GlucA] ⁻	IV-G3

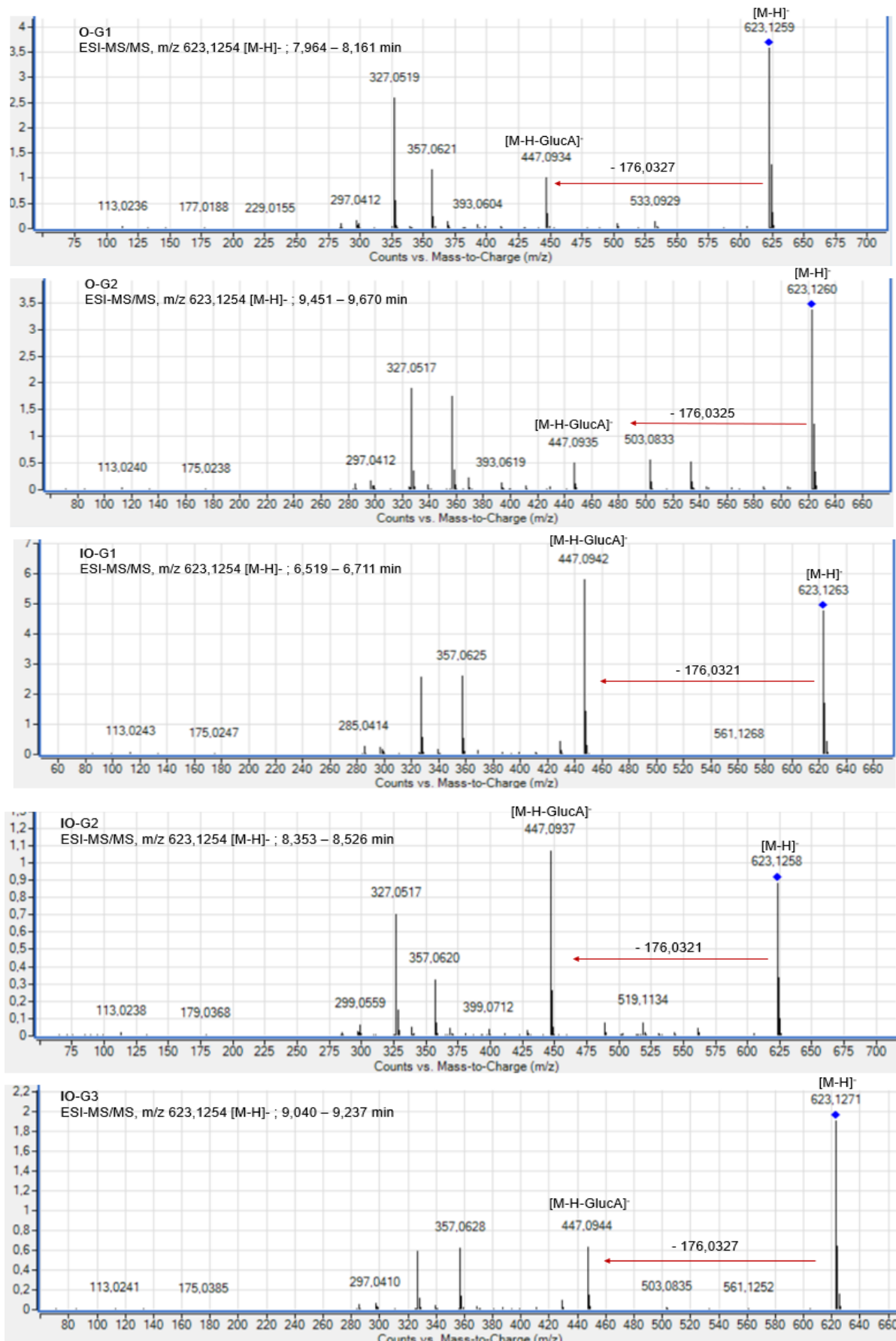


Abbildung 38: Identifizierung der gebildeten Phase II Metaboliten von **O** und **IO** mittels UHPLC-DAD-MS/MS gebildet durch HLM; abgebildet sind die jeweiligen MS/MS-Spektren der extrahierten Massen zur jeweiligen Retentionszeit; **Neutralverlust** (inkl. Masse): rote Pfeile, **GlucA**: Glucuronyl-.

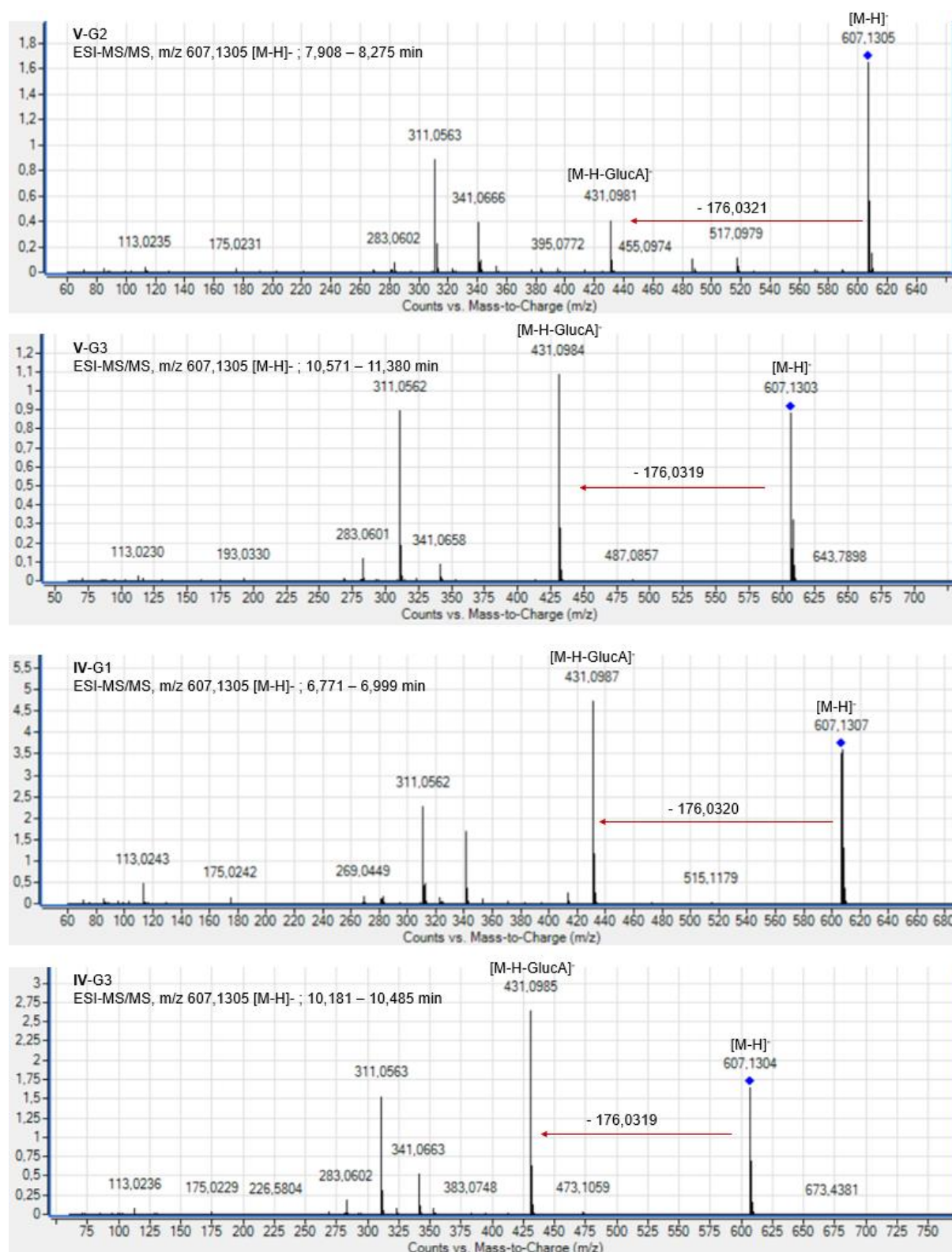


Abbildung 39: Identifizierung der gebildeten Phase II Metaboliten von **V** und **IV** mittels UHPLC-DAD-MS/MS gebildet durch HLM; abgebildet sind die jeweiligen MS/MS-Spektren der extrahierten Massen zur jeweiligen Retentionszeit; **Neutralverlust** (inkl. Masse): rote Pfeile, **GlucA**: Glucuronyl-.

3.1.2.3.4 Strukturaufklärung von IO und zwei mikrosomalen Hauptmetaboliten

Zur Isolierung von mikrosomalen Metaboliten von **IO**, das nach Optimierung der Versuchsbedingungen als einzige Testsubstanz eine zur Isolierung ausreichende Quantität an Metaboliten aufwies, wurde wie unter **2.3** beschrieben vorgegangen. Durch Hochskalierung des mikrosomalen Phase II Inkubationssystems (**2.3.1**) und anschließender Aufreinigung durch eine Festphasenextraktion (**2.3.2**) konnte ein Gemisch aus **IO**, **IO-G1** und **IO-G3** erhalten werden (**Abbildung 40**). Diese drei Substanzen wurden anschließend semipräparativ an der analytischen HPLC getrennt (**2.3.3**), isoliert und mit einer weiteren Festphasenextraktion aufgereinigt. Dabei wurde **IO-G1**, **IO-G3** und **IO** bei den Retentionszeiten 6,85 min, 7,86 min bzw. 8,40 min gesammelt. Die Messungen und Aufklärung der NMR Spektren wurden entweder in der Forschungsgruppe für Biosynthese/NMR am Max-Planck-Institut in Jena oder in der Zentralen Analytik (Universität Regensburg) durchgeführt. Zur Aufklärung wurden ein- und zweidimensionale (^1H , ^1H , ^1H -COSY, ^1H , ^1H -NOESY, ^1H , ^{13}C -HSQC, ^1H , ^{13}C -HMBC) Experimente verwendet.

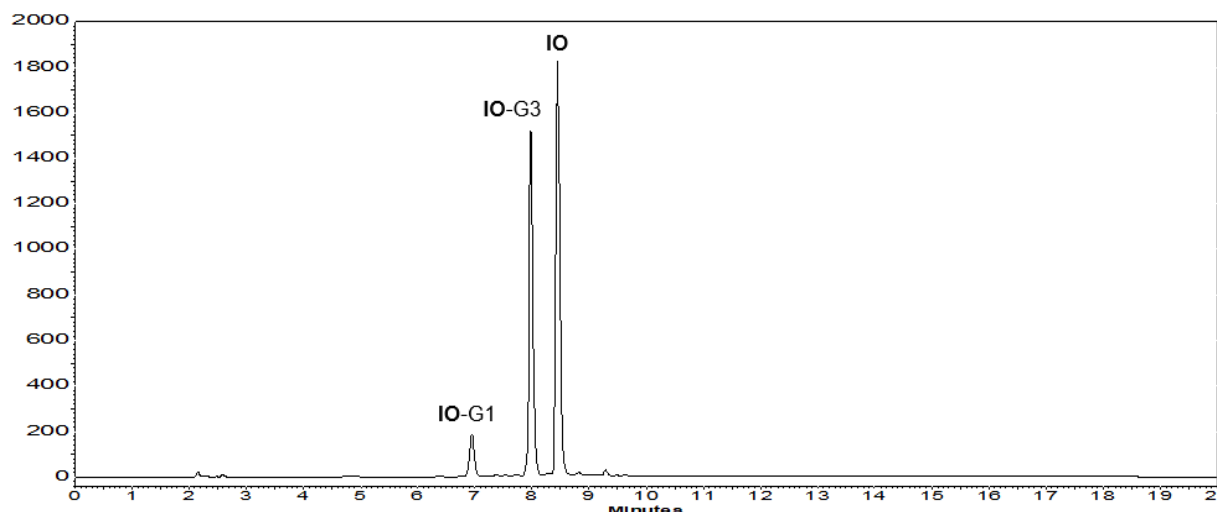


Abbildung 40: HPLC-Chromatogramm von **IO** und seinen beiden glucuronidierten Hauptmetaboliten bei 340 nm (vgl. **2.3.3**).

3.1.2.3.4.1 Isoorientin

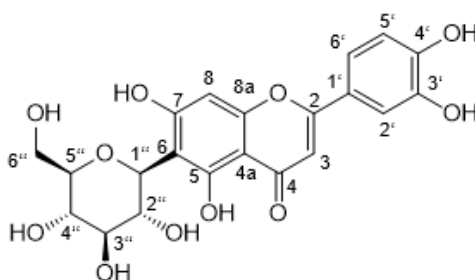
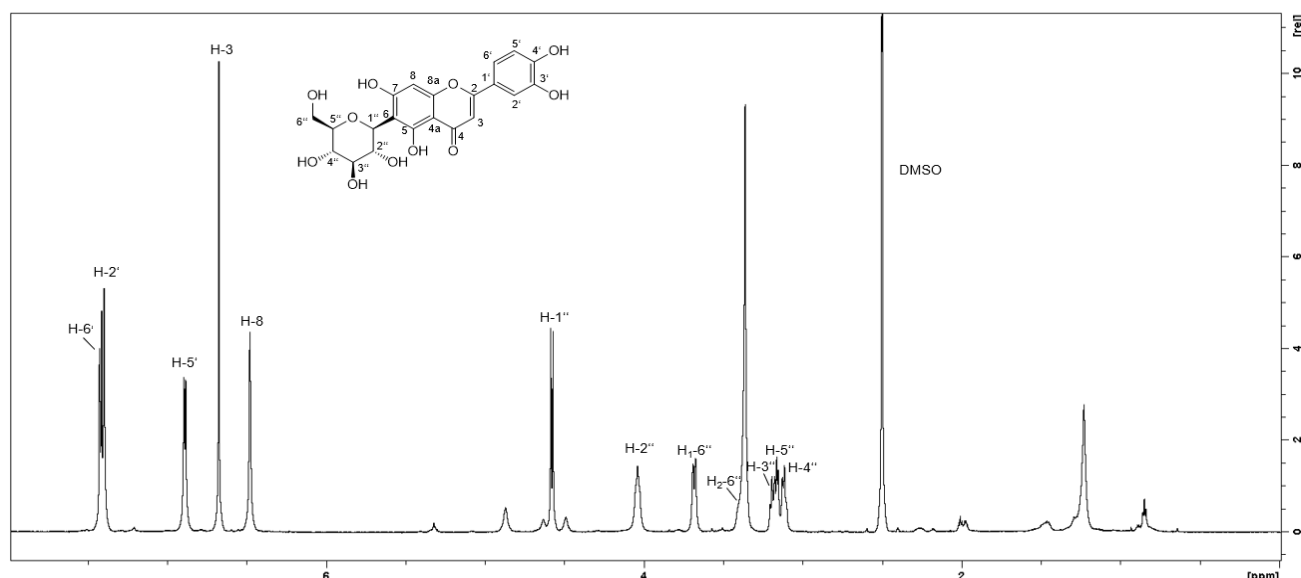


Abbildung 41: Struktur von Isoorientin.

Isoorientin (> 95%, Referenzsubstanz) wurde bei Phytolab (Vestenbergsgreuth, DE) als gelbes Pulver mit der Summenformel $C_{21}H_{20}O_{11}$ erworben (**Abbildung 41**). Die ^{13}C NMR Daten zeigen die Resonanzen von 21 Kohlenstoffen, wobei 15 dem Aglykon Luteolin und 6 der Glucose zugeordnet werden können. Bei den 15 Kohlenstoffen des Aglykons handelt es sich um einen Carbonyl-Kohlenstoff (δ_{C} 181,8 (C-4)), fünf aromatische Methin-Kohlenstoffe (δ_{C} 102,5 (C-3); 93,3 (C-8); 113,2 (C-2'); 115,9 (C-5'); 118,8 (C-6')) und neun quartäre C-Atome (δ_{C} 163,7 (C-2), 103,4 (C-4a), 159,9 (C-5), 108,5 (C-6), 163,2 (C-7), 156,0 (C-8a), 121,3 (C-1'), 145,3 (C-3'), 149,3 (C-4')). Die sechs Kohlenstoffe der Glucose-Einheit beinhalten Resonanzen bei δ_{C} 72,9 (C-1''); 70,0 (C-2''); 78,8 (C-3''); 70,5 (C-4''); 81,4 (C-5''). Die Protonen des Aglykons kommen bei δ_{H} 6,67 ppm (s, H-3), 6,48 ppm (s, H-8), 7,40 ppm (s, H-2'), 6,89 ppm (s, H-5') und 7,42 ppm (s, H-6') zur Resonanz. Bei den Protonen des Zuckers handelt es sich um ein sp^3 Methylen (δ_{H} 3,40 (m, H-6''); δ_{C} 61,3) und fünf sp^3 Methine (δ_{H} 4,58 (d, H-1''), 4,04 (m, H-2''), 3,19 (dd, H-3''), 3,12 (dd, H-4''), 3,16 (m, H-5''). Das zugehörige ^1H -Spektrum ist in **Abbildung 42** dargestellt und die NMR-Signale in **Tabelle 69** aufgeführt.

Abbildung 42: ^1H -NMR-Spektrum von IO bei 298 K in $\text{DMSO}-d_6$ gemessen am Avance III 700 NMR-Spektrometer.

3.1.2.3.4.2 Isoorientin-3'-O-glucuronid

Isoorientin-3'-O-glucuronid (**IO**-G3, 0,4 mg) wurde als leicht gelbliches Pulver mit einer durch HRESIMS (m/z 623,1263 $[M-H]^-$; kalk. m/z 623,1254) ermittelten Summenformel von $C_{27}H_{28}O_{17}$ isoliert. Das ^{13}C NMR Spektrum zeigt die Resonanzen von 27 Kohlenstoffen, wobei 21 davon dem Isoorientin (**3.1.2.3.4.1**) und sechs der Glucuronsäure²¹² zugeordnet werden können. Die sechs Kohlenstoffe der Glucuronsäure beinhalten einen Carbonyl-Kohlenstoff (δ_C 169,9 (C-6''')) und fünf sp^3 Methine (δ_C 100,4 (C-1'''); 72,8 (C-2'''); 75,2 (C-3'''); 71,2 (C-4'''); 74,9 (C-5'''). Der Protonen der Glucuronsäure kommen bei δ_H 5,17 (s, H-1'''), 3,36 (m, H-2'''), 3,35 (m, H-3'''), 3,42 (m, H-4'''), 3,98 (m, H-5''') zur Resonanz. Die chemischen Verschiebungen der übrigen 21 Kohlenstoffe sind größtenteils vergleichbar mit den bereits beschriebenen Verschiebungen für **IO**. Die einzigen Abweichungen sind bei den ^1H und ^{13}C Resonanzen der Position 3 (δ_H (6,85 (H-3), δ_C 102,9), Position 2' (δ_H 7,71 (H-2'), δ_C 113,8) und Position 6' (δ_H 7,65 (H-6'), δ_C 121,6) zu erkennen (vgl. **Tabelle 69**). Die veränderte Verschiebung an diesen drei Positionen ist mit der zusätzlichen Substitution an Position 3' durch die Glucuronyl-Einheit zu erklären. Zusätzlich konnte die Glucuronidierung an Position 3' durch NOESY Signale zwischen H-3 und H-2' bzw. H-2' und H-1''' verifiziert werden (**Abbildung 43**). Im Vergleich dazu wurde kein NOESY Signal von der Position H-1''' zu H-5' oder H-6' detektiert. Das zugehörige ^1H -Spektrum ist in **Abbildung 44** dargestellt.

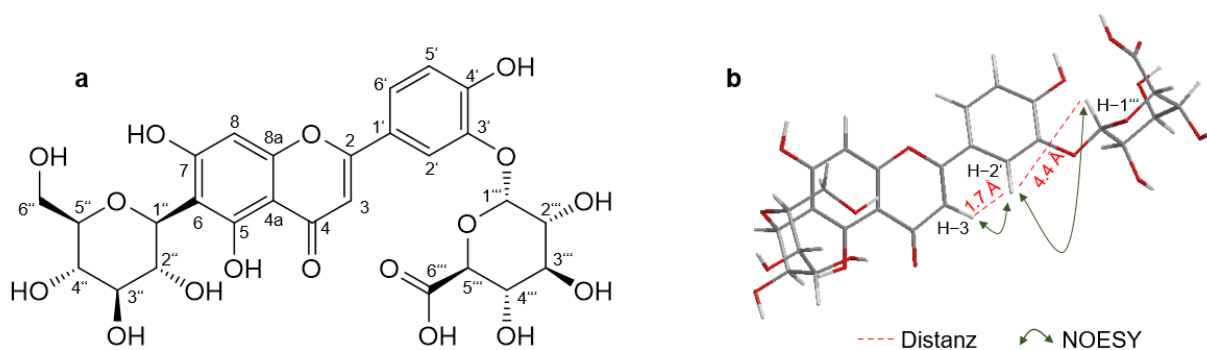


Abbildung 43: Chemische Struktur von **IO**-3'-O-glucuronid (a) und ausschlaggebende NOESY Korrelationen (b).

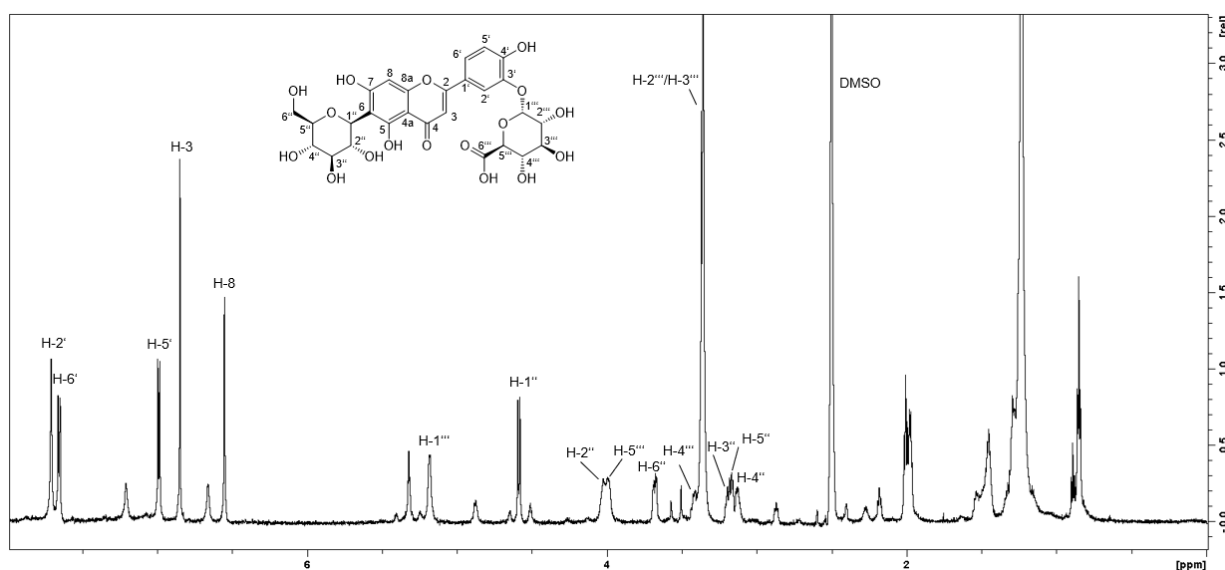


Abbildung 44: ^1H -NMR-Spektrum von **IO-3'-O-glucuronid** bei 298 K in $\text{DMSO-}d_6$ gemessen am Avance III 700 NMR-Spektrometer (700,25 MHz).

3.1.2.3.4.3 Isoorientin-4'-O-glucuronid

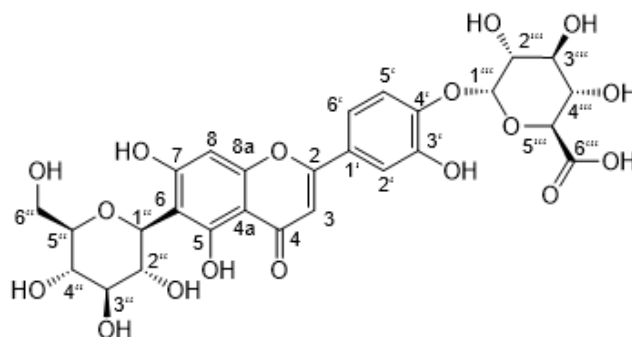


Abbildung 45: Struktur von **IO-4'-O-glucuronid**.

Isoorientin-4'-O-glucuronid (**IO-G1**, 0,15 mg) wurde ebenfalls als leicht gelbliches Pulver mit einer durch HRESIMS ermittelten Summenformel $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{17}$ (m/z 623,1264 $[\text{M-H}]^-$; kalk. m/z 623,1254) isoliert. Basierend auf der Summenformel ist es ein Strukturisomer zu dem bereits beschriebenen **IO-3'-O-glucuronid** (**3.1.2.3.4.2**), welches sich allerdings durch die Glucuronidierungsposition unterscheiden. Die Glucuronyl-Einheit könnte entweder in Position 7, 4' oder am Zucker-Substituenten gebunden zu sein, da eine Reaktion mit der Hydroxygruppe an Position 5 aufgrund der Wasserstoffbrücke zum Keton an Position 4 eher unwahrscheinlich ist. Aufgrund der sehr geringen isolierten Menge konnte lediglich ein ^1H -Spektrum aufgenommen werden, welches große Analogien zum Spektrum von

IO-3'-O-glucuronid zeigt. Basierend auf den veränderten chemischen Verschiebungen für H-5' (δ_H 6,82), H-2' (δ_H 7,68) und H-6' (δ_H 7,49) wird eine Glucuronidierung an Position 4' angenommen (**Abbildung 46**). Die Verschiebung für H-8 (δ_H 6,52) zeigte hingegen keine signifikante Veränderung, weswegen eine Glucuronidierung an Position 7 ausgeschlossen wurde (vgl. **Tabelle 69**).

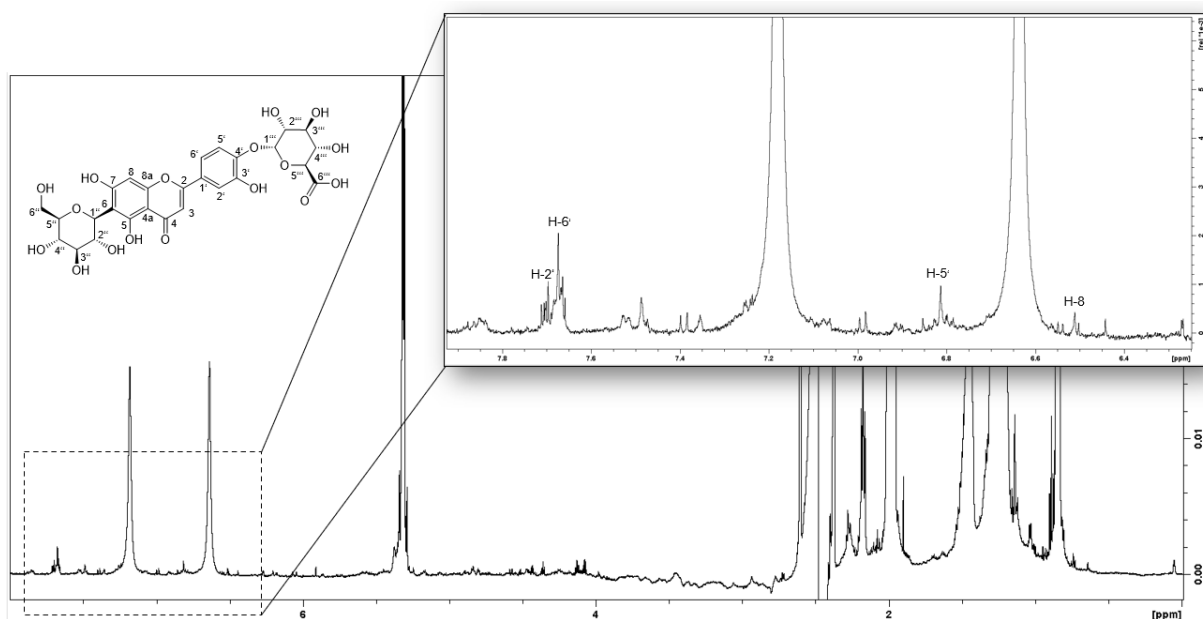


Abbildung 46: ^1H -NMR-Spektrum von **IO-4'-O-glucuronid** bei 298 K in $\text{DMSO-}d_6$ gemessen am Avance III 600 NMR-Spektrometer mit 5 mm TCI CryoProbe (600,25 MHz).

Tabelle 69: ^1H und ^{13}C NMR Signale (700, 600 und 175 MHz; DMSO- d_6 , δ in ppm, J in Hz) von **IO**, **IO-3'-O-glucuronid** und **IO-4'-O-glucuronid**; s: Singulett, d: Duplett, br: breit, m: Multipllett.

	Pos.	Isoorientin		Isoorientin-3'-O-glucuronid		Isoorientin-4'-O-glucuronid
		δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
Aglykon	2		163,7		162,9	
	3	6,67 (1H, s)	102,5	6,85 (1H, s)	102,9	
	4		181,8		181,8	
	4a		103,4		103,1	
	5		159,9		160,4	
	6		108,5		108,5	
	7		163,2		163,1	
	8	6,48 (1H, s)	93,3	6,55 (1H, s)	93,6	6,52 (1H, s)
	8a		156,0		156,0	
	1'		121,3		121,3	
	2'	7,40 (1H, s)	113,2	7,71(1H, s)	113,8	7,68 (1H, s)
	3'		145,3		145,0	
	4'		149,3		150,6	
	5'	6,89 (1H, d, 8,1)	115,9	6,99 (1H, d, 8,2)	116,4	6,82 (1H, m)
	6'	7,42 (1H, dd, 2,0, 8,1)	118,8	7,65 (1H, dd, 2,0, 8,2)	121,6	7,49 (1H, m)
Glucose	1''	4,58 (1H, d, 9,8)	72,9	4,59 (1H, d, ,9,5)	72,8	
	2''	4,04 (1H, m)	70,0	4,02 (1H, m)	70,1	
	3''	3,19 (1H, dd, 9,0, 9,0)	78,8	3,20 (1H, m)	78,6	
	4''	3,12 (1H, dd, 9,0, 9,0)	70,5	3,13 (1H, m)	70,3	
	5''	3,16 (1H, m)	81,4	3,17 (1H, m)	81,4	
	6''	3,40 (1H, m)	61,3	3,41 (1H, m)	61,3	
Glucuronsäure	1'''			5,17 (1H, s)	100,4	
	2'''			3,36 (1H, m)	72,8	
	3'''			3,35 (1H, m)	75,2	
	4'''			3,42 (1H, m)	71,2	
	5'''			3,98 (1H, m)	74,9	
	6'''				169,9	

3.1.2.4 Metabolisierung durch humane Leber S9 Fraktion

Nachdem die *in vitro* Metabolisierung der sechs C-Glykoside **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** bereits am mikrosomalen Testsystem, das lediglich mit membrangebundenen Enzymen ausgestattet ist, durchgeführt wurde, sollten die Testsubstanzen zusätzlich mithilfe der Leber S9F metabolisiert werden. Diese verfügt über ein größeres Spektrum an Enzymen, weswegen genauere Aussagen über das Metabolit-Profil der Substanzen getroffen werden können. Ein Schema der enthaltenen Enzyme und der Gewinnung der S9F ist in **Abbildung 47** dargestellt.

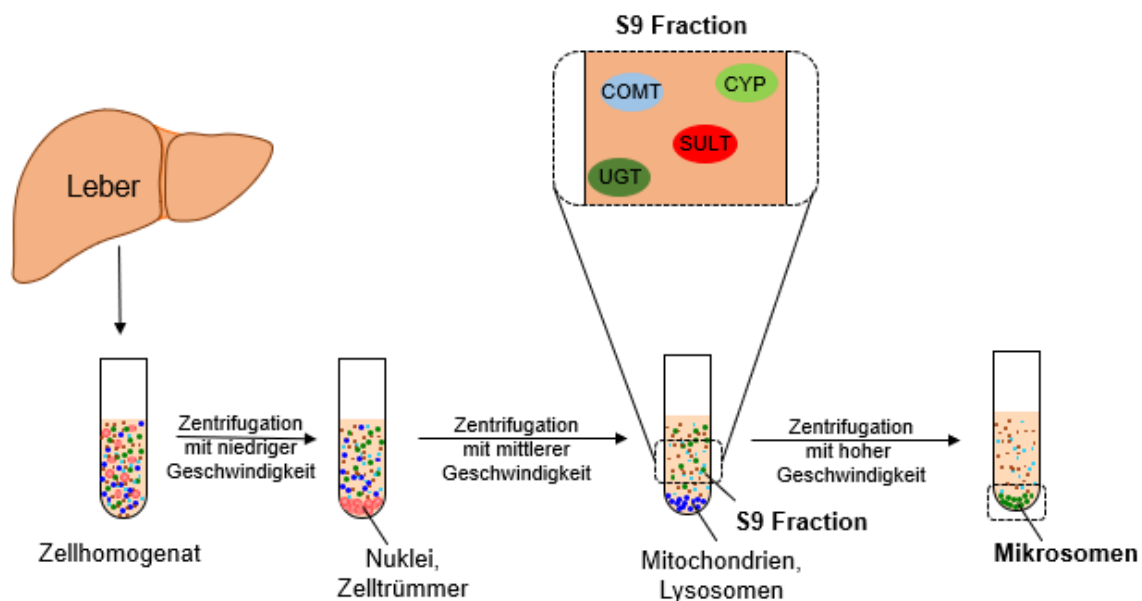


Abbildung 47: Übersicht über die Gewinnung der subzellulären Fraktionen und den in der S9F enthaltenen Enzymen.

3.1.2.4.1 7-Ethoxycumarin als Kontrollsubstanz

Auch zur Überprüfung und Etablierung des Inkubationssystems mit humaner Leber S9 Fraktion wurde 7-Ethoxycumarin (7-EC), eine häufig genutzte Kontrollsubstanz, zur Untersuchung des Phase I und II Metabolismus verwendet (vgl. **2.2.2.2**). Da der Metabolismus von 7-EC gut erforscht ist, wird es häufig als Positivkontrolle verwendet, indem die gebildeten Metaboliten, mit denen aus der Literatur verglichen werden.

Wie bereits unter **3.1.2.3.1** beschrieben, ist für den Phase I Metabolismus von 7-EC eine oxidative Deethylierung zu 7-HC (**M1**) und eine Hydroxylierung an Position 3 (**M2**) beschrieben. Diese beiden Phase I Metaboliten werden nun entweder zu **M3** und **M4** glucuronidiert oder reagieren durch eine bisher unbekannte SULT zu den beiden sulfatierten Konjugaten **M5** und **M6** (**Abbildung 48**).^{167,168,211}

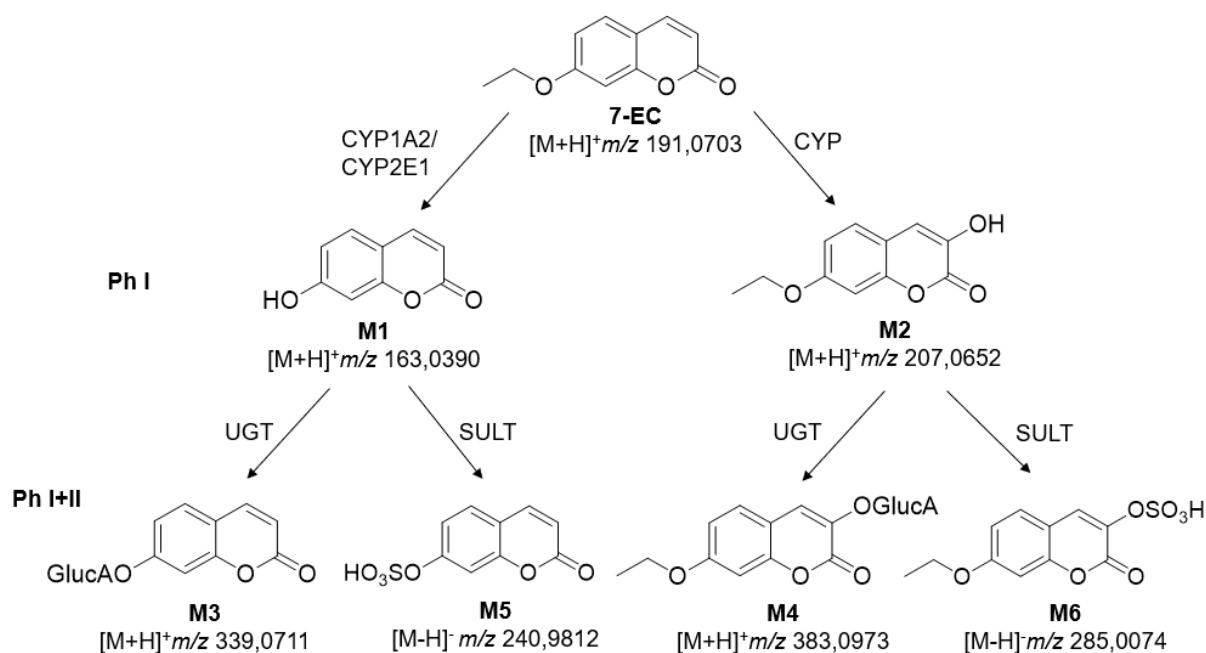


Abbildung 48: Schema der zu erwartende Metaboliten (**M1-6**) von 7-EC mit zugehörigen kalkulierten Massen bei positiver Ionisation $[M+H]^+$ für 7-EC und **M1-4** und bei negativer Ionisation $[M-H]^-$ für **M5-6**.^{167,168,211}

Die durch LC-MS detektierten Metaboliten von 7-EC sind in **Tabelle 70** aufgelistet. Es konnten alle erwarteten Metaboliten auch in den verwendeten Inkubationssystemen mit S9F identifiziert werden. Der deethylierte (**M1**) und der hydroxylierte (**M2**) Phase I Metabolit konnten im zugehörigen Inkubationssystem (Ph I) detektiert werden. Im Phase II Inkubationssystem konnten wie erwartet keine Konjugate identifiziert werden. Beim kombinierten Inkubationssystem mit aktivierten Phase I und II Enzymen konnten bei positiver Ionisation lediglich die beiden glucuronidierten Konjugate (**M3** und **M4**) und der sulfatierte Metabolit von **M2**, also **M6**, detektiert werden (**Tabelle 70**). Bei negativer Ionisation wurde dann auch der mono-sulfatierte Metabolit von **M1** (**M5**) identifiziert. **M1** und **M2** konnten im Phase I und II Inkubationssystem nicht mehr nachgewiesen werden und scheinen somit vollständig reagiert zu haben. Dadurch, dass alle in der Literatur beschriebenen Metaboliten auch in den hier verwendeten Inkubationssystemen identifiziert wurden, ist der Versuchsansatz geeignet für die *in vitro* Metabolisierung der Testsubstanzen.

Tabelle 70: Für 7-EC im S9F Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS ($n = 3$) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M+H]^+$ oder $[M-H]^-$ und Summenformel.

	Meta- bolit	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z) exp.	$[M-H]^-$ (m/z) kalk.	$[M+H]^+$ (m/z) exp.	$[M+H]^+$ (m/z) kalk.	Summen- formel
7-EC	-	3,746	-	189,0557	191,0707	191,0703	$C_{11}H_{10}O_3$
Ph I	M1	2,772	161,0248	161,0244	163,0387	163,0390	$C_9H_6O_3$
	M2	3,538	205,0507	205,0506	207,0654	207,0652	$C_{11}H_{10}O_4$
Ph II	-	-	-	-	-	-	-
Ph I+II	M3	2,259	337,0571	337,0565	339,0710	339,0711	$C_{15}H_{14}O_9$
	M5	2,402	240,9814	240,9812	-	-	$C_9H_6O_6S$
	M4	2,917	381,0830	381,0827	383,0968	383,0973	$C_{15}H_{14}O_9$
	M6	3,108	285,0080	285,0074	287,0232	287,0220	$C_{11}H_{10}O_7S$

3.1.2.4.2 Identifizierung von Phase I und II Metaboliten in der S9 Fraktion

Zur weiteren Identifizierung von möglichen Metaboliten der sechs Flavonoide **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** in der Leber wurde eine *in vitro* Metabolisierung an der subzellulären S9F mit einer Inkubationszeit von 3 h durchgeführt. Mit jedem Probensatz wurden, analog zu den Versuchen mit HLM, zwei Negativkontrollen ohne S9F (w/o S9F) bzw. ohne Cofaktoren (w/o Cof), eine Matrixkontrolle (Matrix) und eine Stabilitätskontrolle (Stabi) mitgeführt, um Stabilitätsprobleme oder unspezifische Reaktionen auszuschließen. Zur Generierung eines Metabolit-Profiles wurde jeweils der Phase I (Ph I), Phase II (Ph II) und der kombinierte Phase I und II (Ph I+II) Metabolismus untersucht (vgl. 2.2.1.2). Außerdem sollten die Glucuronidierungs- und Sulfatierungsreaktionen nochmals getrennt voneinander untersucht werden, weswegen im Inkubationssystem Ph II [UGT] nur der Cofaktor UDPGA und in Ph II [SULT] nur PAPS zugegeben wurde. Dadurch sollte ermittelt werden, ob auch gemischte Phase II Metaboliten der Testsubstanzen gefunden werden können. Die erhaltenen Proben wurden dann zuerst an der HPLC-DAD (vgl. 2.2.3) und anschließend via UHPLC-DAD-MS (vgl. 2.2.4) bei negativer Ionisation vermessen. Die HPLC-Chromatogramme wurden zum Vergleich der Hauptmetaboliten verwendet (vgl. 3.1.3.1), während die LC-MS Spektren zur Identifizierung der Metaboliten dienten.

Die für **O** detektierten Metaboliten sind in **Tabelle 71** dargestellt. Es konnten zwei hydroxylierte Phase I Metabolite (**O-OH1** und **O-OH2**) mit den Retentionszeiten 7,975 min und 8,489 min identifiziert werden. Im auf UGTs beschränkten Phase II Metabolismus konnten analog zu den Ergebnissen mit HLM zwei mono-glucuronidierte Konjugate (**O-G1** und **O-G2**) detektiert werden (vgl. **Tabelle 62**, 3.1.2.3.2). Im Inkubationssystem mit aktivierten SULTs wurden drei verschiedene Sulfate (**O-S1/O-S2/O-S3**) von **O** identifiziert. Bei Untersuchung der kompletten

Phase II Metabolisierung wurden lediglich die bereits nachgewiesenen sulfatierten und glucuronidierten Konjugate detektiert, jedoch keine gemischten Metaboliten. Auch im kombinierten Phase I und II Metabolismus konnten nur die bereits erkannten hydroxylierten, glucuronidierten und sulfatierten Metaboliten detektiert werden. Ein Schema der Metabolisierungsreaktionen von **O** ist in **Abbildung 49** dargestellt.

Tabelle 71: Für **O** im S9F Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS bei negativer Ionisation ($n = 3$) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel.

	Metabolit	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z) exp.	$[M-H]^-$ (m/z) kalk.	Summenformel
O	-	10,229	447,0934	447,9333	$C_{21}H_{20}O_{11}$
Ph I	O-OH1	7,975	463,0881	463,0882	$C_{21}H_{20}O_{12}$
	O-OH2	8,489	463,0878	463,0882	$C_{21}H_{20}O_{12}$
Ph II [UGT]	O-G1	8,007	623,1247	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	O-G2	9,495	623,1249	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
Ph II [SULT]	O-S1	7,692	527,0498	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
	O-S2	8,614	527,0502	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
	O-S3	9,369	527,0512	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
Ph II	O-G1	8,050	623,1256	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	O-G2	9,551	623,1257	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	O-S1	7,692	527,0498	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
	O-S2	8,593	527,0504	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
	O-S3	9,364	527,0510	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
Ph I+II	O-OH1	7,972	463,0877	463,0882	$C_{21}H_{20}O_{12}$
	O-OH2	8,482	463,0877	463,0882	$C_{21}H_{20}O_{12}$
	O-S1	7,695	527,0498	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
	O-S2	8,635	527,0504	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
	O-S3	9,365	527,0502	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
	O-G1	8,062	623,1256	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	O-G2	9,563	623,1255	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$

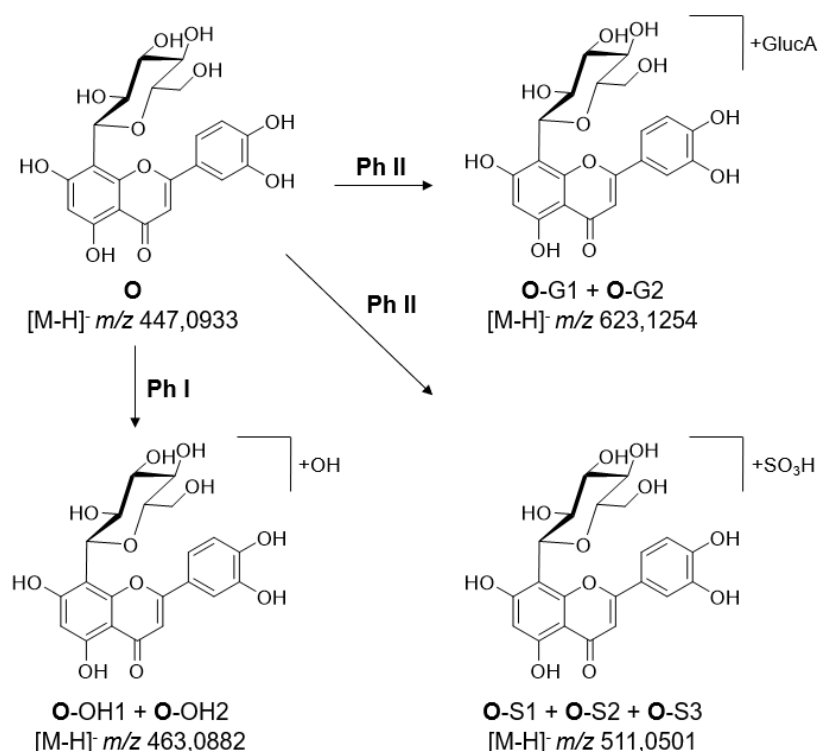


Abbildung 49: In verschiedenen Inkubationssystemen mit S9F durch LC-MS detektierte Metaboliten von **O**; GlucA: Glucuronyl-, OH: Hydroxy-, SO₃H: Sulfat-.

In **Tabelle 72** sind die für **IO** gefundenen Konjugate aufgelistet. Analog zu **O** konnten zwei hydroxylierte Phase I Metaboliten (**IO-OH1** und **IO-OH2**) detektiert werden. Außerdem konnten bei Aktivierung der UGTs drei mono-glucuronidierte Konjugate (**IO-G1/IO-G2/IO-G3**) gefunden werden, die mit ähnlichen Retentionszeiten bereits im Inkubationssystem mit HLM nachgewiesen werden konnten (vgl. **Tabelle 63**, **3.1.2.3.2**). Im auf SULTs beschränkten Phase II Metabolismus konnten drei sulfatierte Metaboliten von **IO** (**IO-S1/IO-S2/IO-S3**) mit den Retentionszeiten 6,404 min, 7,851 min und 8,593 min detektiert werden. Die drei Glucuronide und die drei Sulfate wurden ebenfalls im Inkubationssystem für Phase II Metabolismus gefunden. Auch hier konnten keine gemischten Konjugate erkannt werden. Im kombinierten Phase I und II Inkubationssystem konnten wieder nur die bereits beschriebenen hydroxylierten, glucuronidierten und sulfatierten Metaboliten detektiert werden. Eine Zusammenfassung der Reaktionen ist in **Abbildung 50** dargestellt.

Tabelle 72: Für **IO** im S9F Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS bei negativer Ionisation (n = 3) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel.

	Metabolit	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z) exp.	$[M-H]^-$ (m/z) kalk.	Summenformel
IO	-	9,655	447,0945	447,9333	$C_{21}H_{20}O_{11}$
Ph I	IO-OH1	7,533	463,0888	463,0882	$C_{21}H_{20}O_{12}$
	IO-OH2	9,224	463,0891	463,0882	$C_{21}H_{20}O_{12}$
Ph II [UGT]	IO-G1	6,611	623,1261	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IO-G2	8,476	623,1252	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IO-G3	9,127	623,1263	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
Ph II [SULT]	IO-S1	6,404	527,0502	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
	IO-S2	7,851	527,0509	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
	IO-S3	8,593	527,0515	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
Ph II	IO-G1	6,582	623,1261	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IO-G2	8,455	623,1250	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IO-G3	9,118	623,1262	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IO-S1	6,377	527,0501	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
	IO-S2	7,867	527,0509	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
	IO-S3	8,596	527,0515	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
Ph I+II	IO-OH1	7,523	463,0888	463,0882	$C_{21}H_{20}O_{12}$
	IO-OH2	9,223	463,0891	463,0882	$C_{21}H_{20}O_{12}$
	O-G1	6,587	623,1261	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	O-G2	8,435	623,1261	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	O-G3	9,090	623,1261	623,1254	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IO-S1	6,377	527,0502	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
	IO-S2	7,851	527,0506	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$
	IO-S3	8,576	527,0515	527,0501	$C_{21}H_{20}O_{14}S$

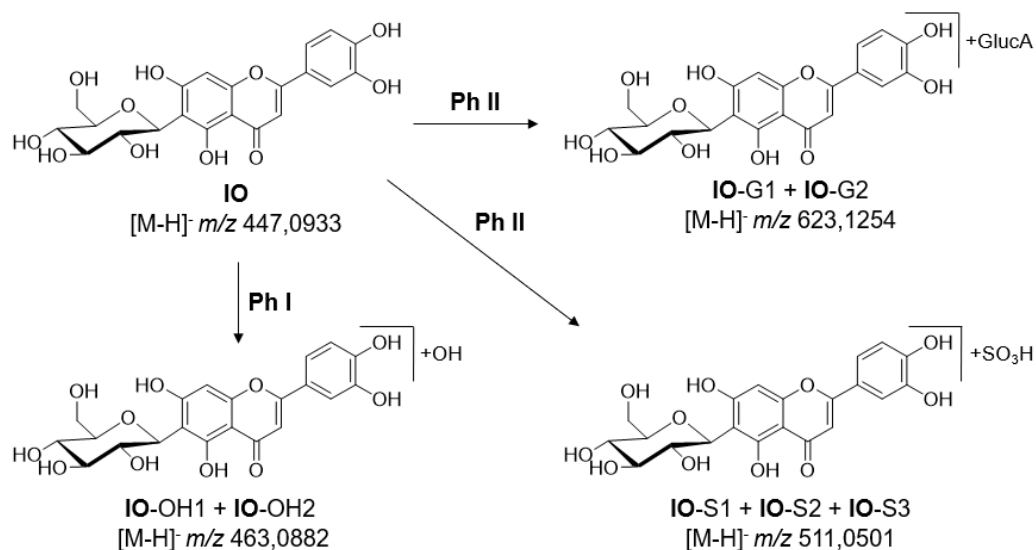


Abbildung 50: In verschiedenen Inkubationssystemen mit S9F durch LC-MS detektierte Metaboliten von **IO**; GlucA: Glucuronyl-, OH: Hydroxy-, SO₃H: Sulfat-.

Wie bereits bei **O** und **IO**, konnten auch für **V** zwei hydroxylierte Phase I Metaboliten gefunden werden (**Tabelle 73**). Zusätzlich konnten im Inkubationssystem mit aktivierten UGTs und im Phase II Metabolismus lediglich die drei glucuronidierten Metaboliten (**V-G1/V-G2/V-G3**) detektiert werden, die bereits im Versuch mit HLM identifiziert wurden (**Tabelle 64, 3.1.2.3.2**). Auch bei den kombinierten Phase I und II Reaktionen konnten lediglich die bereits detektierten hydroxylierten und glucuronidierten Konjugate gefunden werden. Es wurden keine gemischten Metaboliten detektiert. Eine Zusammenfassung der Reaktionen ist in **Abbildung 51** dargestellt.

Tabelle 73: Für **V** im S9F Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS bei negativer Ionisation ($n = 3$) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel.

	Metabolit	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	Summenformel
			exp.	kalk.	
V	-	11,542	431,0990	431,0984	$C_{21}H_{20}O_{10}$
Ph I	V-OH1	9,068	447,0927	447,0933	$C_{21}H_{20}O_{11}$
	V-OH2	10,966	447,0934	447,0933	$C_{21}H_{20}O_{11}$
Ph II [UGT]	V-G1	4,592	607,1304	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	V-G2	8,089	607,1305	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	V-G3	10,962	607,1307	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
Ph II [SULT]	-	-	-	-	-
Ph II	V-G1	4,590	607,1303	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	V-G2	8,095	607,1304	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	V-G3	10,789	607,1307	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
Ph I+II	V-OH1	9,104	447,0927	447,0933	$C_{21}H_{20}O_{11}$
	V-OH2	10,969	447,0930	447,0933	$C_{21}H_{20}O_{11}$
	V-G1	4,586	607,1304	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	V-G2	8,097	607,1300	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	V-G3	10,845	607,1295	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$

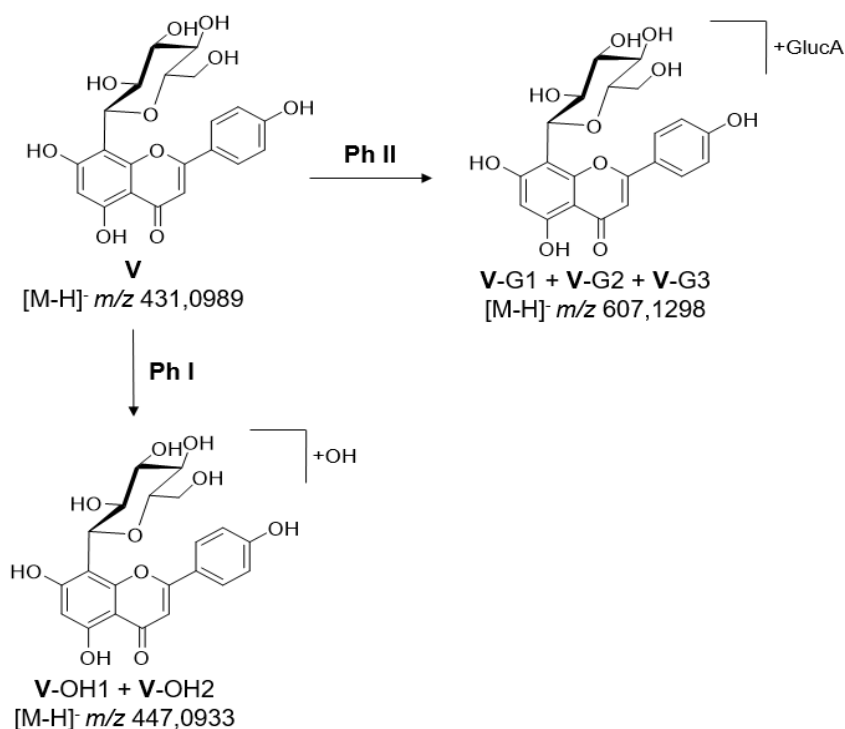


Abbildung 51: In verschiedenen Inkubationssystemen mit S9F durch LC-MS detektierte Metaboliten von **V**; GlucA: Glucuronyl-, OH: Hydroxy-.

In **Tabelle 74** sind die gefundenen Metaboliten von **IV** aufgelistet. Für **IV** konnten weder Phase I Reaktionen noch Sulfatierungen durch SULTs beobachtet werden. In den restlichen Inkubationssystemen wurden lediglich die drei mono-glucuronidierten Konjugate (**IV-G1/IV-G2/IV-G3**) detektiert, die bereits im Versuch mit HLM gefunden werden konnten (vgl. **Tabelle 65, 3.1.2.3.2**). In **Abbildung 52** sind die für **IV** ermittelten Reaktionen dargestellt.

Tabelle 74: Für **IV** im S9F Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS bei negativer Ionisation ($n = 3$) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel.

	Metabolit	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z) exp.	$[M-H]^-$ (m/z) kalk.	Summenformel
IV	-	11,545	431,0994	431,0984	$C_{21}H_{20}O_{10}$
Ph I	-	-	-	-	-
Ph II [UGT]	IV-G1	6,830	607,1317	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IV-G2	9,416	607,1310	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IV-G3	10,294	607,1307	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
Ph II [SULT]	-	-	-	-	-
Ph II	IV-G1	6,841	607,1317	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IV-G2	9,416	607,1310	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IV-G3	10,288	607,1303	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
Ph I+II	IV-G1	6,864	607,1307	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	IV-G2	9,435	607,1301	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$
	V-G3	10,342	607,1301	607,1305	$C_{27}H_{28}O_{17}$

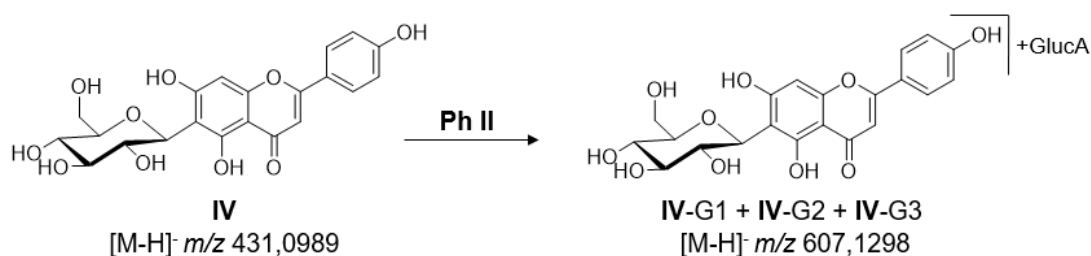


Abbildung 52: In verschiedenen Inkubationssystemen mit S9F durch LC-MS detektierte Metaboliten von **IV**; GlucA: Glucuronyl-.

Die für **S** ermittelten Metaboliten sind in **Tabelle 75** dargestellt. Im Phase I und im kombinierten Phase I und II Inkubationssystem konnten drei hydroxylierte Phase I Metaboliten (**S-OH1/S-OH2/S-OH3**) detektiert werden. Es konnten keine Phase II Metaboliten nachgewiesen werden. Die Phase I Reaktion ist in **Abbildung 53** dargestellt.

Tabelle 75: Für **S** im S9F Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS bei negativer Ionisation ($n = 3$) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel.

	Metabolit	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z) exp.	$[M-H]^-$ (m/z) kalk.	Summenformel
S	-	9,925	563,1415	563,1406	$C_{26}H_{28}O_{15}$
Ph I	S-OH1	8,019	579,1254	579,1355	$C_{26}H_{28}O_{16}$
	S-OH2	8,848	579,1353	579,1355	$C_{26}H_{28}O_{16}$
	S-OH3	9,660	579,1352	579,1355	$C_{26}H_{28}O_{16}$
Ph II [UGT]	-	-	-	-	-
Ph II [SULT]	-	-	-	-	-
Ph II	-	-	-	-	-
Ph I+II	S-OH1	7,945	579,1350	579,1355	$C_{26}H_{28}O_{16}$
	S-OH2	8,874	579,1349	579,1355	$C_{26}H_{28}O_{16}$
	S-OH3	9,670	579,1352	579,1355	$C_{26}H_{28}O_{16}$

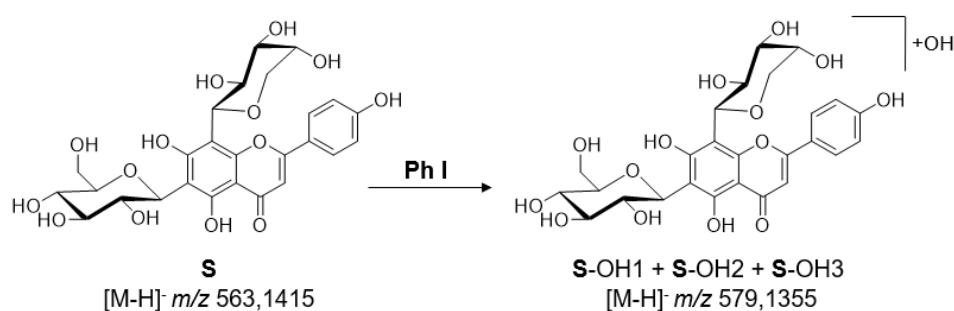


Abbildung 53: In verschiedenen Inkubationssystemen mit S9F durch LC-MS detektierte Metaboliten von **S**; OH: Hydroxy-.

Analog zu **S**, konnten auch für **IS** lediglich drei hydroxylierte Phase I Metaboliten (**IS-OH1/IS-OH2/IS-OH3**) gefunden werden (**Tabelle 76**). Auch für **IS** konnten keine Phase II Konjugate detektiert werden. Die ermittelte Phase I Reaktion ist in **Abbildung 54** dargestellt.

Tabelle 76: Für **IS** im S9F Inkubationssystem gefundene Metaboliten, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS bei negativer Ionisation ($n = 3$) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel.

	Metabolit	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z) exp.	$[M-H]^-$ (m/z) kalk.	Summenformel
S	-	10,728	563,1423	563,1406	$C_{26}H_{28}O_{15}$
Ph I	IS-OH1	8,387	579,1259	579,1355	$C_{26}H_{28}O_{16}$
	IS-OH2	9,240	579,1358	579,1355	$C_{26}H_{28}O_{16}$
	IS-OH3	10,223	579,1362	579,1355	$C_{26}H_{28}O_{16}$
Ph II [UGT]	-	-	-	-	-
Ph II [SULT]	-	-	-	-	-
Ph II	-	-	-	-	-
Ph I+II	IS-OH1	8,359	579,1361	579,1355	$C_{26}H_{28}O_{16}$
	IS-OH2	9,250	579,1359	579,1355	$C_{26}H_{28}O_{16}$
	IS-OH3	10,158	579,1359	579,1355	$C_{26}H_{28}O_{16}$

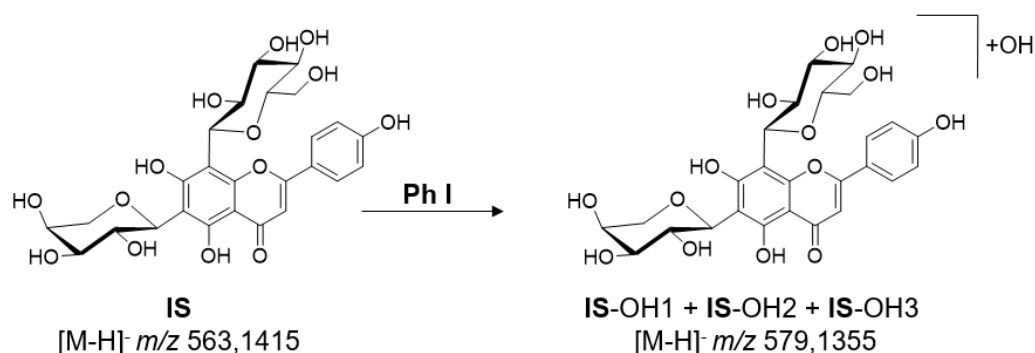


Abbildung 54: In verschiedenen Inkubationssystemen mit S9F durch LC-MS detektierte Metaboliten von **IS**; OH: Hydroxy-.

Bei der *in vitro* Metabolisierung durch die Leber S9 Fraktion konnten für alle sechs Testsubstanzen Metaboliten gefunden werden. Für **S** und **IS** wurden lediglich jeweils drei hydroxylierte Phase I Metaboliten detektiert. Glucuronide konnten für **O**, **IO**, **V** und **IV** identifiziert werden, wobei für **IO**, **V** und **IV** drei und für **O** zwei verschiedene glucuronidierte Konjugate erkannt wurden. Sulfatierte Metaboliten wurden nur für **O** und **IO** detektiert, wobei jeweils drei verschiedene Sulfate gefunden werden konnten. Diese Ergebnisse zeigen, dass bestimmte Strukturmerkmale der Testsubstanzen verschiedene Metabolisierungswege begünstigen.

3.1.2.4.3 MS/MS Fragmentierung

Zur Überprüfung der unter **3.1.2.4.2** beschriebenen Phase II Metaboliten der eingesetzten Flavonoid C-Glykoside wurde neben der hochauflösenden Masse zusätzlich eine MS/MS-Fragmentierung durchgeführt. Dafür wurden die relevanten Fragmente der Konjugate von **O**, **IO**, **V** und **IV** auf Basis ihrer Retentionszeiten (vgl. **Tabelle 71** bis **Tabelle 74**) extrahiert und mittels Tandem-MS analysiert. Für **S** und **IS** im Versuch mit S9F keine Phase II Metaboliten gefunden werden. In **Tabelle 77** sind die erhaltenen Fragmentationen der Verbindungen beispielhaft für das Phase II Inkubationssystem aufgelistet.

Bei allen glucuronidierten Metaboliten von **O** und **IO** konnte ein Neutralverlust von 176 Da detektiert werden, der charakteristisch für die Glucuronyl-Einheit ist (**Abbildung 55** und **Abbildung 56**). Für die sulfatierten Konjugate von **O** und **IO** konnte in fünf Fällen ein Abgang der Sulfateinheit durch Neutralverlust von 80 Da beobachtet werden. Lediglich für einen sulfatierten Metaboliten von **IO**, **IO-S1**, konnte keine Fragmentierung detektiert werden.

Für vier der sechs Glucuronide von **V** bzw. **IV** konnte ebenfalls der Abgang der Glucuronyl-Einheit durch die Bildung der Aglykon Fragmentationen erfasst werden (**Abbildung 57** und **Abbildung 58**). Bei zwei glucuronidierten Konjugaten konnte aufgrund geringer Metabolit-Mengen keine Fragmentierung beobachtet werden.

Tabelle 77: Verifizierung der gebildeten Metaboliten von **O**, **IO**, **V** und **IV** der *in vitro* Metabolisierung mit S9F durch Extrahierung der Massen zur jeweiligen Retentionszeit (RT) mittels MS/MS-Fragmentierung; **GlucA**: Glucuronyl-, **SO₃**: Sulfat-, **n. d.**: nicht detektiert.

RT [min]	[M-H] ⁻ (m/z)	Fragmentationen (m/z)	Möglicher Metabolit
8,050	623,1244	447,0931 [M-H-GlucA] ⁻	O-G1
9,551	623,1259	447,0918 [M-H-GlucA] ⁻	O-G2
7,692	527,0479	447,0930 [M-H-SO ₃] ⁻	O-S1
8,593	527,0479	447,0930 [M-H-SO ₃] ⁻	O-S2
9,364	527,0500	447,0930 [M-H-SO ₃] ⁻	O-S3
6,582	623,1255	447,0933 [M-H-GlucA] ⁻	IO-G1
8,455	623,1233	447,0926 [M-H-GlucA] ⁻	IO-G2
9,118	623,1254	447,0932 [M-H-GlucA] ⁻	IO-G3
6,377	623,1261	n. d.	IO-S1
7,867	527,0492	447,0924 [M-H-SO ₃] ⁻	IO-S2
8,596	527,0502	447,0936 [M-H-SO ₃] ⁻	IO-S3
4,590	607,1303	n. d.	V-G1
8,072	607,1303	431,0959 [M-H-GlucA] ⁻	V-G2
10,899	607,1291	431,0972 [M-H-GlucA] ⁻	V-G3
6,841	607,1305	431,0982 [M-H-GlucA] ⁻	IV-G1
9,416	607,1310	n. d.	IV-G2
10,288	607,1304	431,0982 [M-H-GlucA] ⁻	IV-G3

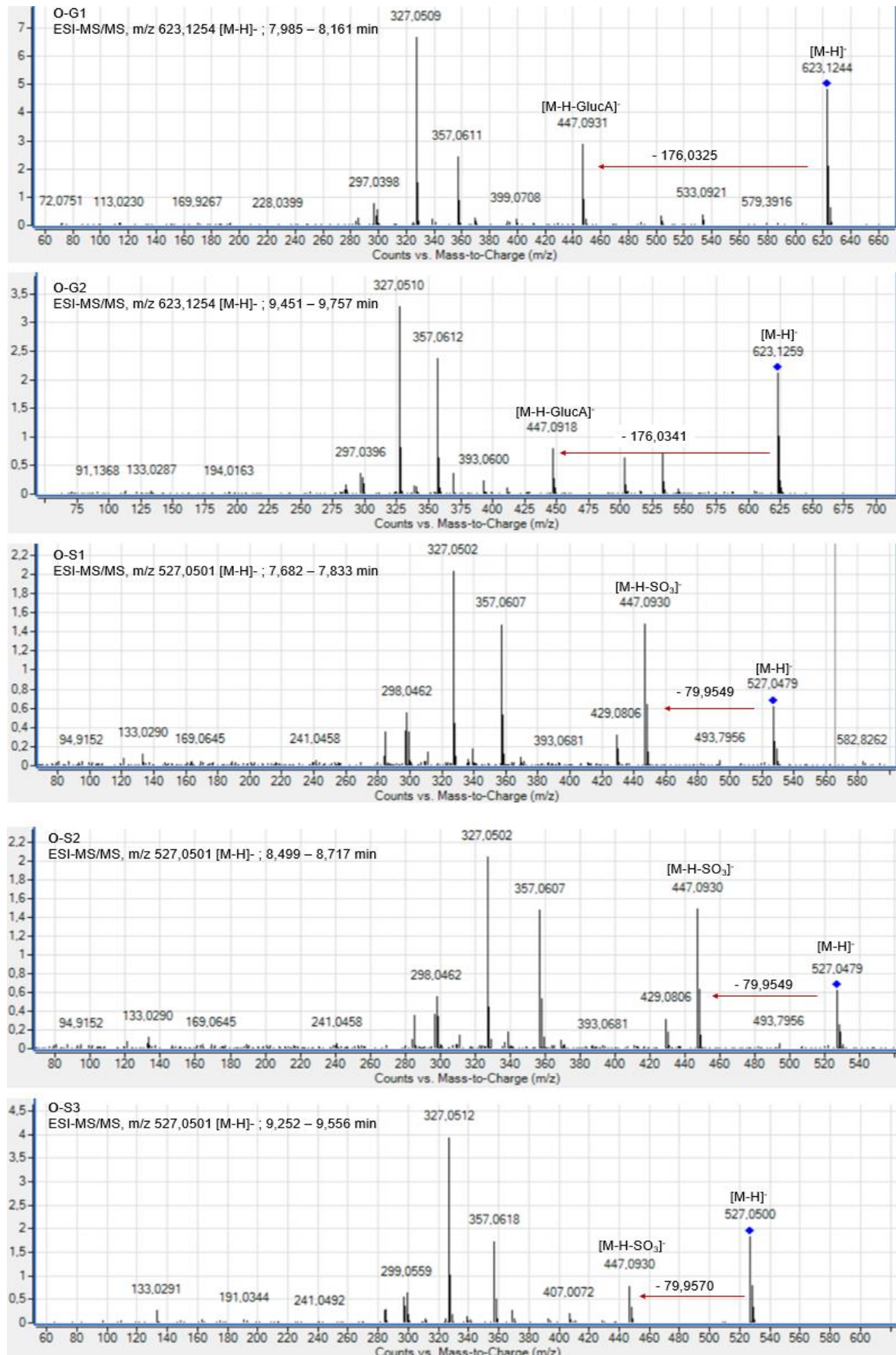


Abbildung 55: Identifizierung der gebildeten Phase II Metaboliten von **O** mittels UHPLC-DAD-MS/MS gebildet durch S9F; abgebildet sind die jeweiligen MS/MS-Spektren der extrahierten Massen zur jeweiligen Retentionszeit; **Neutralverlust** (inkl. Masse): rote Pfeile, **GlucA**: Glucuronyl-, **SO₃**: Sulfat-.

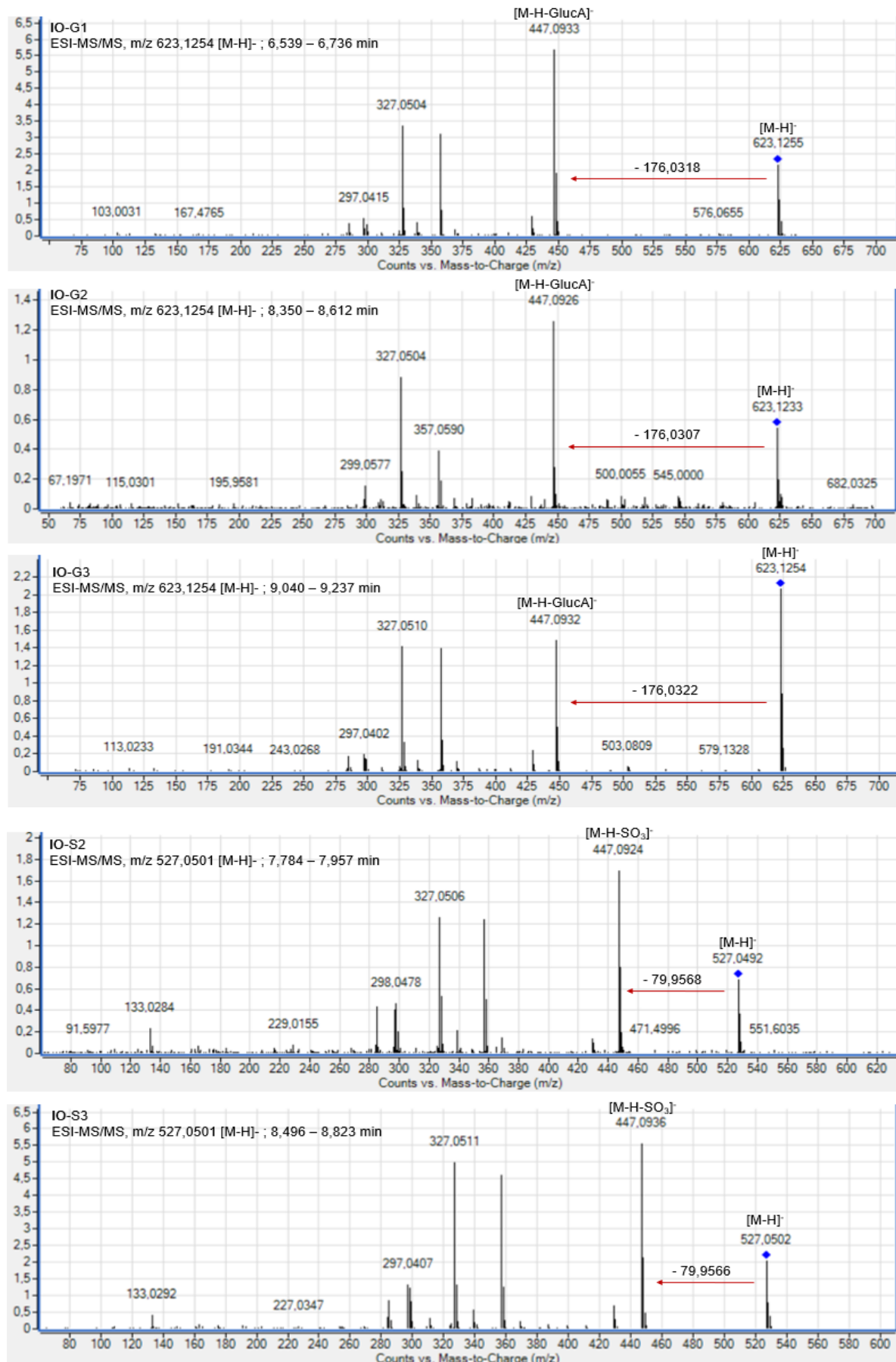


Abbildung 56: Identifizierung der gebildeten Phase II Metaboliten von **IO** mittels UHPLC-DAD-MS/MS gebildet durch S9F; abgebildet sind die jeweiligen MS/MS-Spektren der extrahierten Massen zur jeweiligen Retentionszeit; **Neutralverlust** (inkl. Masse): rote Pfeile, **GlucA**: Glucuronyl-, **SO₃**: Sulfat-.

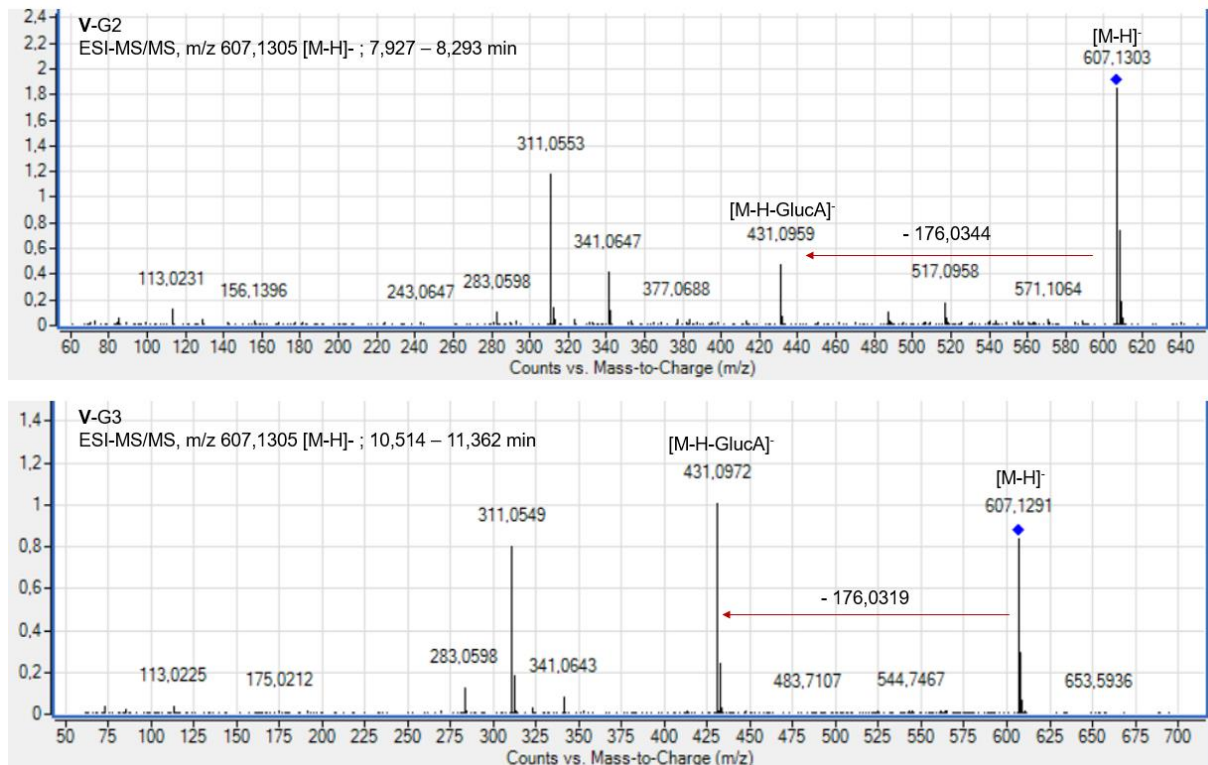


Abbildung 57: Identifizierung der gebildeten Phase II Metaboliten von **V** mittels UHPLC-DAD-MS/MS gebildet durch S9F; abgebildet sind die jeweiligen MS/MS-Spektren der extrahierten Massen zur jeweiligen Retentionszeit; **Neutralverlust** (inkl. Masse): rote Pfeile, **GlucA**: Glucuronyl-.

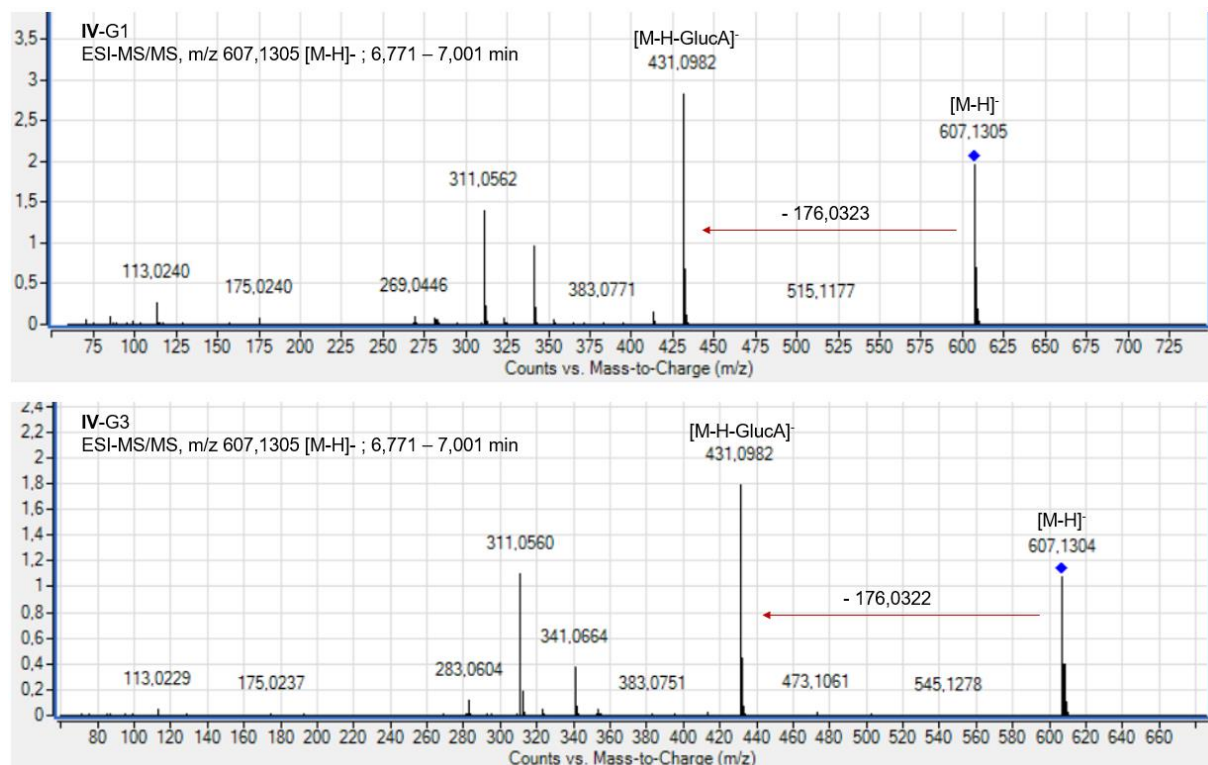


Abbildung 58: Identifizierung der gebildeten Phase II Metaboliten von **IV** mittels UHPLC-DAD-MS/MS gebildet durch S9F; abgebildet sind die jeweiligen MS/MS-Spektren der extrahierten Massen zur jeweiligen Retentionszeit; **Neutralverlust** (inkl. Masse): rote Pfeile, **GlucA**: Glucuronyl-.

3.1.2.5 Zusammenfassung und Diskussion

Die Metabolisierung der sechs Testsubstanzen **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** wurde in zwei verschiedenen subzellulären Leber Inkubationssystemen untersucht. Um ein möglichst aussagekräftiges Metabolit-Profil zu generieren, wurde neben den gängigen HLM, die nur membrangebundene Enzyme beinhalten, auch die Leber S9 Fraktion verwendet, die sowohl lösliche als auch membrangebundene Enzyme, enthält. Außerdem konnten zwei mono-glucuronidierte Metaboliten von **IO**, die im HLM Inkubationssystems entstanden sind, isoliert und aufgeklärt werden.

Nach Metabolisierung mit HLM konnten für **O**, **IO**, **V** und **IV** mono-glucuronidierte Konjugate detektiert werden, während für **S** und **IS** keine Metaboliten gefunden werden konnten. Dabei konnten für **IO**, **V** und **IV** drei und für **O** zwei verschiedene Glucuronide identifiziert werden (vgl. 3.1.2.3.2).

Im Versuch mit der Leber S9F konnten für **O** und **IO** glucuronidierte, sulfatierte und hydroxylierte Konjugate gefunden werden. Dabei wurden zwei bzw. drei Glucuronide, jeweils drei Sulfate und zwei hydroxylierte Verbindungen detektiert. Bei **V** und **IV** konnten je drei mono-glucuronidierte Konjugate erfasst werden, außerdem wurden für **V** zwei hydroxylierte Metaboliten gefunden. Für **S** und **IS** konnten nur je drei hydroxylierte Metaboliten identifiziert, Phase II Metaboliten jedoch nicht gefunden werden (vgl. 3.1.2.4). Bei der Metabolisierung durch die Leber S9 Fraktion konnten alle mono-glucuronidierten Konjugate, die bereits bei Inkubation mit HLM erfasst wurden, erneut detektiert und somit verifiziert werden. Deshalb wird im Folgenden hauptsächlich die Metabolisierung an Leber S9F diskutiert, da dort ein breiteres Spektrum an Enzymreaktionen erfasst wurde.

Die sechs getesteten Verbindungen unterscheiden sich strukturell durch die Anzahl der C-C-verknüpften Zuckersubstituenten und durch die Hydroxy-Gruppen am B-Ring des Aglykons. Während **S** und **IS** je zwei Zuckersubstituenten haben, weisen **O**, **IO**, **V** und **IV** je nur eine C-C-verknüpfte Glucose auf. Bei **O** und **IO** ist eine 3'/4'-Dihydroxy-Struktur am B-Ring zu finden, während **V**, **IV**, **S** und **IS** nur eine Hydroxygruppe an Position 4' besitzen. Auffällig ist nun, dass bei der *in vitro* Metabolisierung mit Leber S9F mono-glucuronidierte Konjugate von **O**, **IO**, **V** und **IV** gefunden werden, bei **S** und **IS** allerdings nur Phase I Metaboliten detektiert werden konnten. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die Anzahl der Zuckersubstituenten ausschlaggebend für die Metabolisierung durch UGTs ist (**Abbildung 59**). Dies könnte einerseits mit der steigenden Polarität, andererseits aber auch mit der zunehmenden sterischen Hinderung durch den zusätzlichen C-C-verknüpften Zucker zusammenhängen. Hervorgehoben werden soll außerdem, dass bei den Versuchen lediglich für **O** und **IO** mono-sulfatierte Metaboliten detektiert werden konnten. Da diese als einzige der sechs Testsubstanzen eine Dihydroxy-Struktur im B-Ring aufweisen, liegt es nahe, dass dies das

entscheidende Strukturmerkmal bei der Umsetzung durch SULTs darstellt (**Abbildung 59**). Hydroxylierte Metaboliten konnten bei allen Testverbindungen, außer bei **IV**, gefunden werden. Eine Erklärung dafür ist, dass bei **IV** bereits in der Kontrolle Massen der hydroxylierten Verbindung gefunden wurden, weswegen diese bei der Auswertung nicht mehr berücksichtigt werden konnten. Dies schließt jedoch nicht aus, dass **IV** auch durch Inkubation mit subzellulären Leberfraktionen hydroxyliert wird.

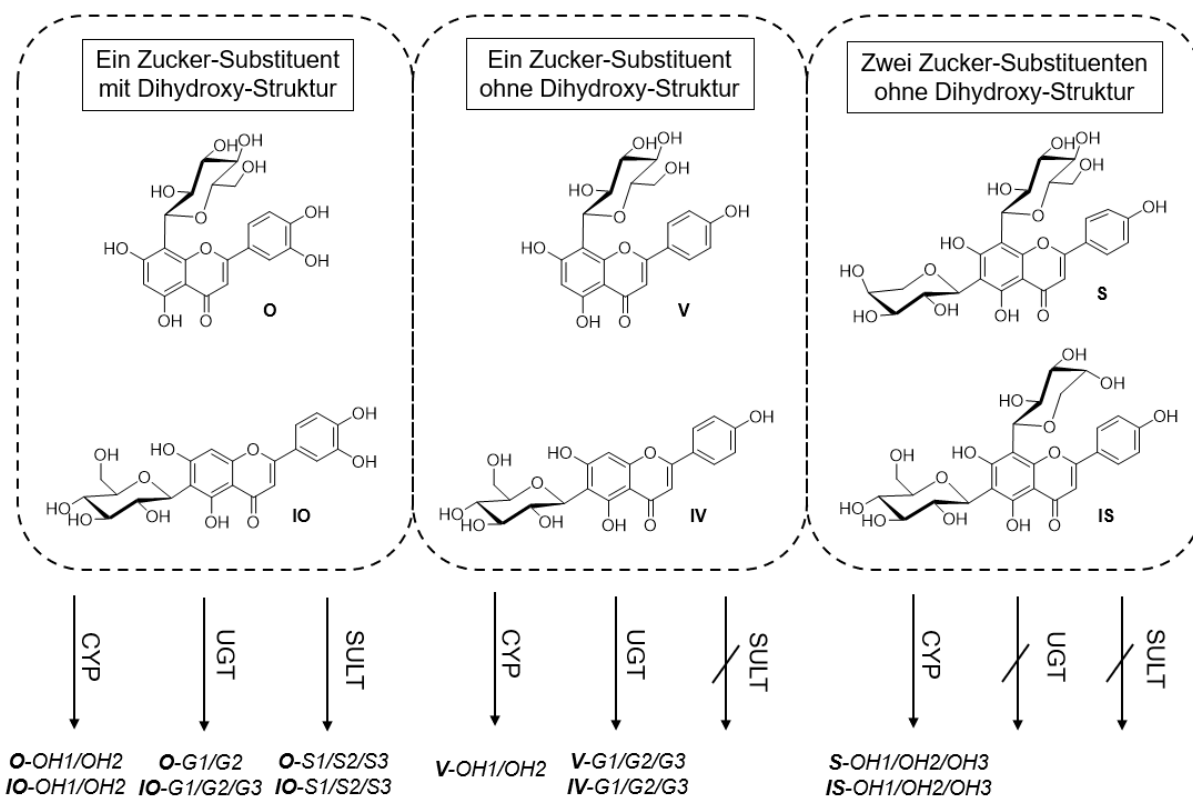


Abbildung 59: Schema der Struktur-Metabolit-Beziehung der sechs getesteten Flavonoide **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** beobachtet nach *in vitro* Leber Metabolisierung.

In der Literatur ist die *in vitro* Metabolisierung von Flavonoid C-Glykosiden in subzellulären Leberfraktionen bisher kaum beschrieben. Shi et al. haben die Metabolisierung von **O** und **IO** an HLM untersucht und konnten für beide Substanzen zwei mono-glucuronidierte Metaboliten identifizieren⁷⁰. Dies steht im Einklang mit den hier identifizierten Konjugaten, wobei für **IO** zusätzlich ein drittes Glucuronid detektiert werden konnte.

Mangels weiterer Literaturangaben zur *in vitro* Leber Metabolisierung der Testsubstanzen, werden zusätzlich die Reaktionen der zugehörigen Aglyka, Luteolin und Apigenin, betrachtet. Gradolatto et al. haben die Leber Metabolisierung von Apigenin und Luteolin *in vitro* und *ex vivo* mit subzellulären Leberfraktionen der Ratte bzw. perfundierter Rattenleber untersucht¹⁸⁹. Dabei wurden für Apigenin *in vitro* drei glucuronidierte, ein sulfatierter und drei hydroxylierte

Metaboliten gefunden, für Luteolin konnten sogar vier Glucuronide und zwei Sulfate detektiert werden. *Ex vivo* wurden für Apigenin zusätzlich noch Diglucuronide und kombinierte sulfatierte und glucuronidierte Konjugate gefunden.^{189,213} Cai et al. konnten hingegen bei Untersuchung von Apigenin in murinen subzellulären Leberfraktionen lediglich je einen sulfatierten, glucuronidierten und hydroxylierten Metaboliten identifizieren²¹⁴. Apigenin und Luteolin unterscheiden sich, analog zu **O** und **V** bzw. **IO** und **IV**, nur durch eine Hydroxy-Gruppe am B-Ring, weswegen dieses Strukturmerkmal signifikant für die unterschiedlichen Metabolisierungsreaktionen ist. Allerdings unterscheiden sich Apigenin und Luteolin nur durch die Anzahl der gebildeten Metaboliten, jedoch nicht in den Reaktionen. Da auch für Apigenin Sulfate generiert wurden, scheint nicht allein die Dihydroxy-Struktur ausschlaggebend für die Umsetzung durch SULTs zu sein. Möglicherweise ist bei der Metabolisierung von **O** und **IO** die Kombination von C-C-verknüpftem Zucker und Dihydroxy-Struktur am B-Ring maßgeblich für die Reaktion mit den SULTs.

In dieser Arbeit konnten nur wenige Aussagen hinsichtlich der Konjugationspositionen der gefundenen glucuronidierten und sulfatierten Metaboliten getroffen werden, da eine Auswertung der UV-Spektren und der Vergleich mit anderen Hauptmetaboliten im Dünndarm erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte (vgl. **3.1.3**). Es ist beschrieben, dass Glucuronidierungen von Flavonoiden an allen freien OH-Gruppen mit Ausnahme von Position 5 möglich sind²¹³. Die Hydroxygruppe in Position 5 kann aufgrund der intramolekularen Wasserstoffbrücke zur Keton-Gruppe in Position 4 nur schwer konjugiert werden²¹⁵. In dieser Arbeit ist es gelungen zwei mono-glucuronidierte Metaboliten von **IO** zu isolieren und somit deren Konjugationspositionen zu belegen. Als Hauptmetabolit (**IO**-G3) konnte Isoorientin-3'-O-glucuronid verifiziert werden, als Nebenmetabolit (**IO**-G1) wurde Isoorientin-4'-O-glucuronid identifiziert. Ob die Konjugationspositionen von **IO** auf andere Metaboliten übertragen werden können, wird zu einem späteren Zeitpunkt diskutiert (**3.1.3**). Auch für die Sulfatierung von anderen Flavonoiden sind hauptsächlich die Hydroxy-Gruppen in Position 7, 3' und 4' beschrieben⁷¹. Ob diese Erkenntnisse auch übertragbar auf C-glykosylierte Flavonoide sind, ist bisher unklar und sollte in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden. Die finale Untersuchung der Konjugationspositionen ist unerlässlich, da diese über die weitere Verstoffwechslung *in vivo* entscheiden.

3.1.3 Vergleich der Hauptmetaboliten entstanden in Darmepithel und Leber

Durch die *in vitro* Metabolisierung an Caco-2-Zellen und in subzellulären Leberfraktionen konnten einige Phase II Metaboliten von **O**, **IO**, **V** und **IV** ermittelt werden. Für **S** und **IS** konnten keine Phase II Konjugate identifiziert werden. Um die detektierten Hauptmetaboliten der einzelnen Testsysteme vergleichen zu können, wurden die Fraktionen mit einer einheitlichen Methode an der HPLC-DAD bzw. UHPLC-DAD-MS vermessen. Die so erhaltenen Retentionszeiten, Chromatogramme und UV-Spektren sollen hier gegenübergestellt und diskutiert werden.

3.1.3.1 Vergleich der LC-MS Retentionszeiten und HPLC-Chromatogramme

Zum Vergleich der durch *in vitro* Metabolisierung im Caco-2-Modell oder in subzellulären Leberfraktionen erhaltenen Phase II Metaboliten der vier Testsubstanzen **O**, **IO**, **V** und **IV**, wurden die Fraktionen an der UHPLC-DAD-MS (LC-MS) bzw. HPLC-DAD mit derselben Methode vermessen (vgl. 2.2.3 und 2.4.1).

In **Abbildung 60** sind die detektierten Phase II Metaboliten von **O** schematisch mit zugehörigen Retentionszeiten dargestellt. Dabei fällt auf, dass die beim Versuch mit HLM ermittelten zwei Glucuronide genau denen entsprechen, die auch bei Inkubation mit der S9F detektiert werden konnten. Außerdem scheint der durch das Caco-2-Modell entdeckte monosulfatierte Metabolit dem **O**-S1 aus der Leber S9F zu entsprechen.

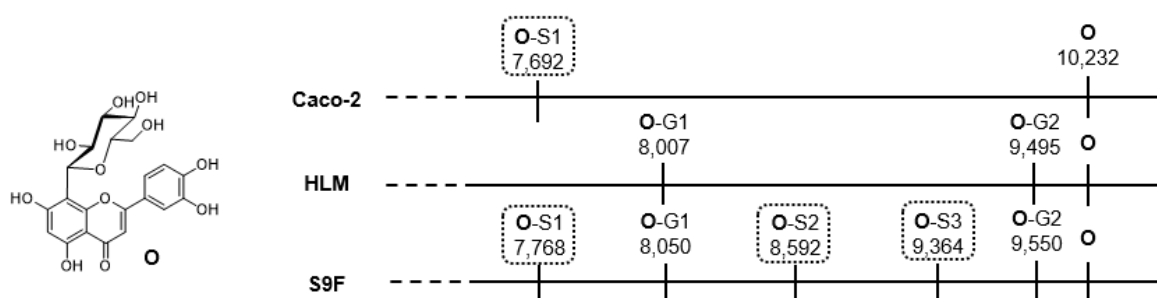


Abbildung 60: Schematischer Vergleich der LC-MS Retentionszeiten (RT) der von **O** durch *in vitro* Metabolisierung mithilfe von Caco-2-Zellen, HLM oder S9F ermittelten Phase II Metaboliten; RT in min, Rahmen zur Visualisierung der gefundenen Sulfate.

Ein Überblick über die detektierten Phase II Metaboliten von **IO** ist in **Abbildung 61** dargestellt. Auch hier ist zu erkennen, dass in den Versuchen mit HLM und S9F je drei mono-glucuronidierte Konjugate mit nahezu identischen Retentionszeiten detektiert werden konnten, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei um dieselben drei

Glucuronide handelt. Die zwei durch die *in vitro* Metabolisierung mit Caco-2-Zellen identifizierten sulfatierten Metaboliten entsprechen beim Vergleich der Retentionszeiten den zwei der im Leber S9F Ansatz ermittelten Sulfate, **IO-S1** und **IO-S3**. Der dritte sulfatierte Metabolit scheint durch die Caco-2-Zellen nicht gebildet zu werden.

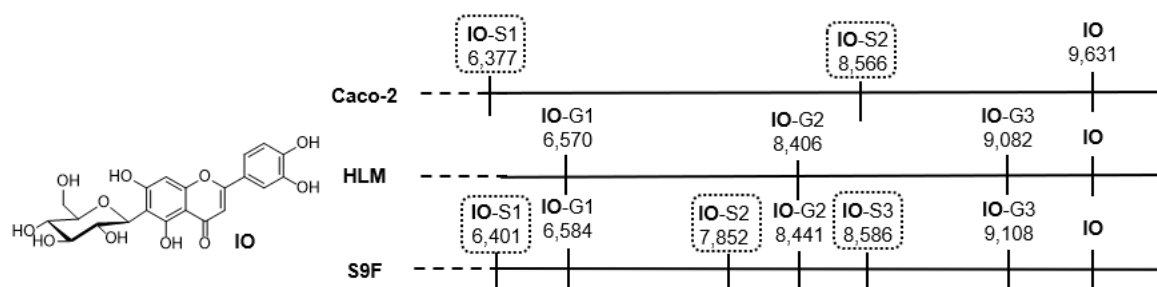


Abbildung 61: Schematischer Vergleich der LC-MS Retentionszeiten (RT) der von **IO** durch *in vitro* Metabolisierung mithilfe von Caco-2-Zellen, HLM oder S9F ermittelten Phase II Metaboliten; RT in min, Rahmen zur Visualisierung der gefundenen Sulfate.

Ein Schema der für **V** gefundenen Phase II Metaboliten ist in **Abbildung 62** präsentiert, wobei keine Phase II Konjugate im Caco-2-Modell erkannt werden konnten. Im Versuch mit HLM und S9F konnten die drei gleichen mono-glucuronidierten Metaboliten mit nahezu identischen Retentionszeiten detektiert werden.

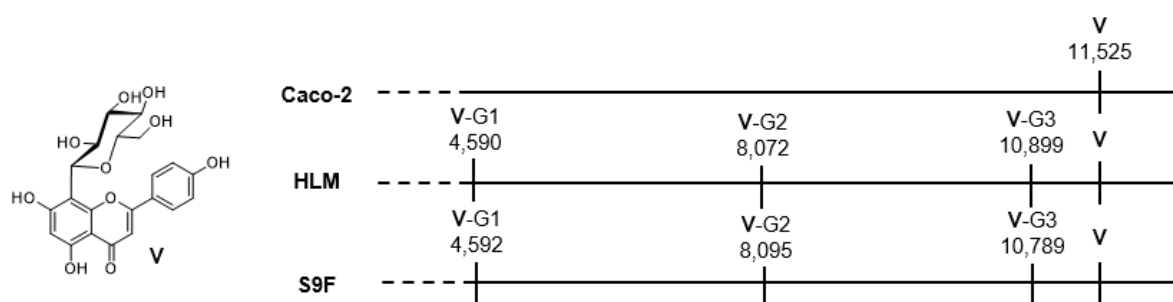


Abbildung 62: Schematischer Vergleich der LC-MS Retentionszeiten (RT) der von **V** durch *in vitro* Metabolisierung mithilfe von Caco-2-Zellen, HLM oder S9F ermittelten Phase II Metaboliten; RT in min.

In **Abbildung 63** sind die für **IV** gefundenen Metaboliten dargestellt. Analog zu **V** können auch hier für den Versuch mit HLM dieselben drei Glucuronide wie bei Inkubation mit S9F identifiziert werden.

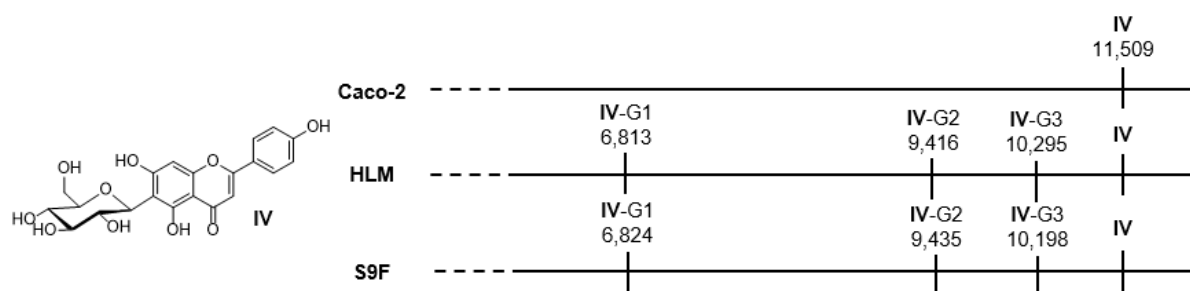


Abbildung 63: Schematischer Vergleich der LC-MS Retentionszeiten (RT) der von **IV** durch *in vitro* Metabolisierung mithilfe von Caco-2-Zellen, HLM oder S9F ermittelten Phase II Metaboliten; RT in min.

Um weitere Rückschlüsse auf die Hauptmetaboliten der *in vitro* Metabolisierung im Dünndarm bzw. in der Leber ziehen zu können, wurden die Proben zusätzlich noch an der HPLC-DAD vermessen. Aufgrund der geringen Metabolit Mengen im Caco-2-Modell, konnten von diesem Versuch keine aussagekräftigen Chromatogramme erhalten werden. Die Peakflächen der Metaboliten in den HPLC-Chromatogrammen wurden für eine Einschätzung der Metabolit Verteilung herangezogen.

In **Abbildung 64** sind beispielhaft Chromatogramme der HLM und S9F Proben abgebildet. Dafür wurden die HLM Proben des Phase II Inkubationssystems und die S9F Proben des Phase II [SULT] Inkubationssystem verwendet. Für **O** ist zu erkennen, dass die beiden glucuronidierten Metaboliten eine ähnliche Peakfläche aufweisen, weswegen nicht eindeutig ein Hauptmetabolit bestimmt werden kann, da **O** im gleichen Maß in beide Konjugate umgesetzt wurde. Bei den drei Sulfaten sticht **O-S3** eindeutig mit der größten Peakfläche heraus und scheint somit der Hauptmetabolit von **O** in der Leber zu sein. Da bei der Metabolisierung in Caco-2-Zellen lediglich **O-S1** gefunden werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass dieses Sulfat der Hauptmetabolit im Dünndarmepithel ist (vgl. **Abbildung 60**). Diese Ergebnisse zeigen, dass im Dünndarm und in der Leber wahrscheinlich unterschiedliche sulfatierte Hauptmetaboliten gebildet werden, was an der unterschiedlichen Expression von SULT Isoformen liegen könnte.

Für **IO** konnte sowohl für die mono-glucuronidierten als auch für die mono-sulfatierten Konjugate ein eindeutiger Hauptmetabolit bestimmt werden. **IO-G3** bzw. **IO-S3** weisen die größten Peakflächen auf, während die anderen Konjugate eher als Minorkomponenten detektiert worden sind. **IO-G3** konnte im Vorfeld isoliert und als **IO-3'-O-glucuronid** identifiziert werden (vgl. **3.1.2.3.4**). Im Caco-2-Modell konnten für **IO** zwei Sulfate gefunden werden, wobei das Konjugat mit der Retentionszeit von 8,566 min (vgl. **Abbildung 61**) als Hauptmetabolit erkannt wurde (Daten nicht dargestellt). Dies entspricht auch dem durch HLM gebildeten Hauptmetabolit **IO-S3**, so dass **IO** im Dünndarmepithel und in der Leber wahrscheinlich ähnlich von den SULTs umgesetzt wird.

Für **V** und **IV** ist kein eindeutiger Hauptmetabolit bestimmbar. Von den drei gefundenen monoglucuronidierten Metaboliten von **V** wurden **V-G2** und **V-G3** gleichermaßen gebildet, während **V-G1** lediglich als Minor-Metabolit vorkommt. Bei **IV** liegen **IV-G1** und **IV-G3** mit ähnlicher Peakfläche vor, während **IV-G2** nur in sehr geringen Mengen vorkommt. Im Caco-2-Modell konnten keine Phase II Metaboliten detektiert werden, weswegen keine Rückschlüsse auf die Metabolisierung im Dünndarmepithel möglich sind.

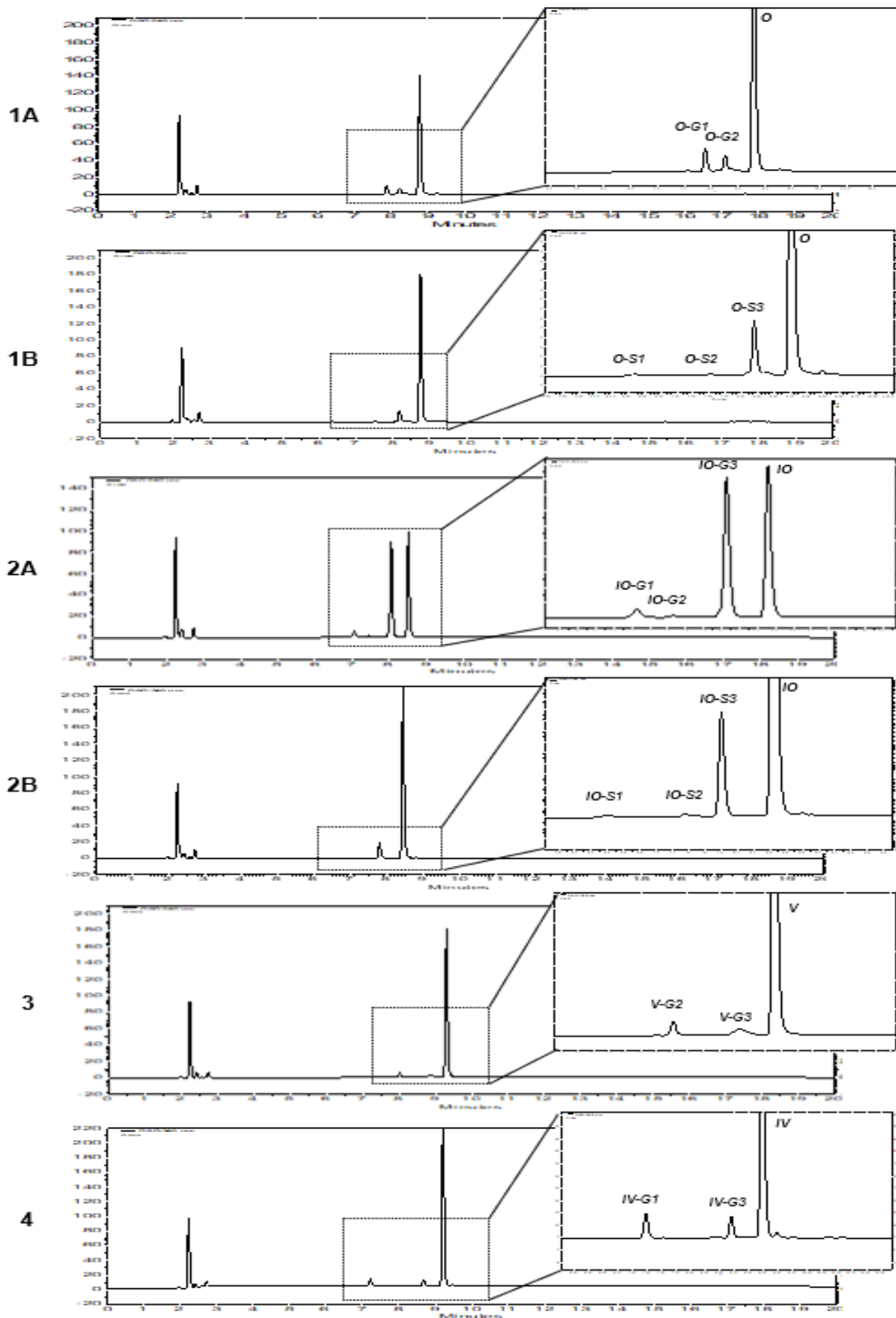


Abbildung 64: HPLC Chromatogramme der vier C-Glykoside **O**, **IO**, **V** und **IV** und ihrer Phase II Metaboliten bei 340 nm: **(1A)** **O** und seine Metaboliten (**O-G1/G2**) gebildet durch HLM, **(1B)** **O** und seine Metaboliten (**O-S1/S2/S3**) gebildet durch S9F, **(2A)** **IO** und seine Metaboliten (**IO-G1/G2/G3**) gebildet durch HLM, **(2B)** **IO** und seine Metaboliten (**IO-S1/S2/S3**) gebildet durch S9F, **(3)** **V** und seine Metaboliten (**V-G1/G2/G3**) gebildet durch HLM, **(4)** **IV** und seine Metaboliten (**IV-G1/G2/G3**) gebildet durch HLM.

3.1.3.2 UV-Maxima

Um mehr Erkenntnisse hinsichtlich der Konjugationspositionen der Hauptmetaboliten zu erlangen, wurden die UV-Spektren der Testsubstanzen und der gefundenen Phase II Metaboliten aus den jeweiligen HPLC-DAD Läufen extrahiert und ausgewertet.

Die UV-Maxima von **O** und die UV-Shifts der identifizierten Metaboliten im Vergleich zu **O** sind in **Tabelle 78** aufgelistet. Dabei fällt auf, dass **O-G1** und **O-S2** bzw. **O-G2** und **O-S3** ähnliche UV-Maxima aufweisen, was darauf hinweist, dass sie an derselben Position konjugiert sein könnten.

Tabelle 78: UV-Maxima und -Shifts von **O** und seinen identifizierten Phase II Metaboliten mit Retentionszeit (RT); **n.d.:** nicht detektiert, **Eing. Substanz:** Eingesetzte Substanz.

Eing. Substanz	Metabolit	RT [min]	Bande II	Bande I
O		10,232	267 nm	350 nm
	O-G1	8,007	-9	±0
	O-G2	9,495	±0	-8
	O-S1	7,692	n.d.	n.d.
	O-S2	8,593	-7	±0
	O-S3	9,364	±0	-8

In **Tabelle 79** sind die UV-Maxima von **IO** und seinen durch HLM und S9F detektierten Metaboliten eingetragen. Für **IO-G1** und **IO-G3** ist eine hypsochrome Verschiebung der Bande I ermittelt worden, während für **IO-G2** ein hypsochromer Shift bei Bande II zu beobachten ist. Auch bei **IO-S3** konnte eine hypsochrome Verschiebung der Bande I um 12 nm erkannt werden, während sich bei **IO-S2** das UV-Maximum bei Bande II um 8 nm hypsochrom verschoben hat. Für **IO-S1** konnte leider aufgrund zu geringer Metabolit-Mengen kein UV-Spektrum erhalten werden. **IO-G3** und **IO-G1** konnten im Vorfeld schon als **IO-3'-O-glucuronid** bzw. **IO-4'-O-glucuronid** verifiziert werden (vgl. **3.1.2.3.4.2** und **3.1.2.3.4.3**). Dies legt zum einen den Schluss nahe, dass es sich bei **IO-S3** auch um ein Konjugat in Position in 3' bzw. 4' handelt, wobei aufgrund der ähnlichen Retentionszeit zu **IO-4'-O-glucuronid** eher eine Konjugation in Position 4' vermutet werden kann. Zum anderen wird aufgrund der UV-Verschiebungen von **IO-G2** bzw. **IO-S2** eine Verknüpfung an Position 7 angenommen, da diese beiden Metaboliten ähnliche UV-Maxima aufweisen und für Flavonoide als Konjugationspositionen hauptsächlich 3', 4' und 7 beschrieben sind⁷¹.

Aufgrund der ähnlichen Struktur von **O** und **IO** ist es wahrscheinlich, dass es sich bei **O-G2**, **O-S1** und **O-S3** aufgrund der Verschiebung von Bande I um Metaboliten mit Konjugation in

Position 3' oder 4' handelt. Bei **O-G1** und **O-S2** könnte es sich dann nach Vergleich mit **IO** um Konjugate in Position 7 handeln.

Tabelle 79: UV-Maxima und -Shifts von **IO** und seinen identifizierten Phase II Metaboliten mit Retentionszeit (RT); **n.d.:** nicht detektiert, **Eing. Substanz:** Eingesetzte Substanz.

Eing. Substanz	Metabolit	RT [min]	Bande II	Bande I
IO		9,631	269 nm	350 nm
	IO-G1	6,584	±0	-12
	IO-G2	8,441	-10	±0
	IO-G3	9,108	±0	-8
	IO-S1	6,377	n.d.	n.d.
	IO-S2	7,852	-9	±0
	IO-S3	8,566	±0	-12

Die UV-Maxima und Verschiebungen von **V** und seinen glucuronidierten Metaboliten ist in **Tabelle 80** aufgelistet. Aufgrund zu geringer Mengen, konnte von **V-G1** kein UV-Spektrum extrahiert werden. **V-G2** weist eine hypsochrome Verschiebung des UV-Maximums bei Bande I um 8 nm auf, während Bande II im Vergleich zu **V** unverändert ist. Bei **V-G3** wird das Maximum bei Bande II um 7 nm hypsochrom verschoben, während bei Bande I eine bathochrome Verschiebung um 10 nm zu beobachten ist. Eine genaue Aussage zu den Konjugationspositionen kann an dieser Stelle nicht getroffen werden. Es liegt allerdings, beim Vergleich mit **O** und **IO**, die Vermutung nahe, dass es sich bei **V-G2** aufgrund der UV-Shifts um eine Konjugation in Position 4' handeln könnte.

Tabelle 80: UV-Maxima und -Shifts von **V** und seinen identifizierten Phase II Metaboliten mit Retentionszeit (RT), **n.d.:** nicht detektiert, **Eing. Substanz:** Eingesetzte Substanz.

Eing. Substanz	Metabolit	RT [min]	Bande II	Bande I
V		11,525	267 nm	338 nm
	V-G1	4,590	n.d.	n.d.
	V-G2	8,072	±0	-8
	V-G3	10,198	-7	+10

In **Tabelle 81** sind die UV-Maxima und Verschiebungen von **IV** und seinen Glucuroniden eingetragen. Bei **IV-G1** ist eine hypsochrome Verschiebung des UV-Maximums bei Bande I um 8 nm zu erkennen, während Bande II im Vergleich zu **IV** unverändert ist. Eine bathochrome

Verschiebung von Bande I um 15 nm und eine hypsochrome Verschiebung von Bande II um 8 nm ist bei **IV**-G3 zu erkennen. Für **IV**-G2 konnte kein UV-Spektrum ermittelt werden. Auch hier kann keine fundierte Aussage zur Konjugation der einzelnen Metaboliten getroffen werden, jedoch wird für **IV**-G1 aufgrund der UV-Shifts eine Konjugation in Position 4' vermutet.

Tabelle 81: UV-Maxima und -Shifts von **IV** und seinen identifizierten Phase II Metaboliten mit Retentionszeit (RT), **n.d.:** nicht detektiert, **Eing. Substanz:** Eingesetzte Substanz.

Eing. Substanz	Metabolit	RT [min]	Bande II	Bande I
IV		11,509	270 nm	337 nm
	IV -G1	4,590	±0	-8
	IV -G2	8,072	n.d.	n.d.
	IV -G3	10,198	-8	+15

Durch die Interpretation der UV-Maxima können nur begründete Vermutungen zu den Konjugationspositionen der einzelnen Phase II Metaboliten der Testsubstanzen gemacht werden, eine fundierte Verifizierung ist dadurch jedoch nicht zu ersetzen.

3.1.3.3 Zusammenfassung und Diskussion

Zur Identifizierung von Hauptmetaboliten der Testsubstanzen **O**, **IO**, **V** und **IV** im Dünndarmepithel und in der Leber wurden die Retentionszeiten, die HPLC-Chromatogramme und die UV-Maxima der Metaboliten, der im Caco-2-Metabolisierungsversuch oder durch Inkubation mit subzellulären Leberfraktionen generierten Proben, verglichen.

Bei den glucuronidierten Konjugaten von **O** konnte kein Hauptmetabolit identifiziert werden, da beide Glucuronide zu etwa gleichen Teilen in den Leberfraktionen generiert wurden. Von den drei identifizierten mono-sulfatierten Konjugaten bei Inkubation mit S9F wurde **O**-S3 eindeutig als Hauptmetabolit erkannt. Im Caco-2-Modell konnte allerdings nur **O**-S1 detektiert werden, so dass im Dünndarmepithel und in der Leber andere Hauptmetaboliten gebildet werden. Dies könnte an der unterschiedlichen Expression der einzelnen SULT Isoformen liegen. So sind einige Isoformen, die im Darm exprimiert werden, in der Leber nicht zu finden. Außerdem kann sich auch der Anteil der jeweiligen Isoformen in den einzelnen Organen stark unterscheiden⁸³.

Für **IO** konnten **IO**-G3 und **IO**-S3 eindeutig als Hauptmetaboliten in der Leber identifiziert werden. Im Caco-2-Modell konnte ebenfalls das zweite Sulfat, das dem **IO**-S3 in der Leber entspricht, als Hauptkomponente detektiert werden. Dies bedeutet zum einen, dass im Fall

von **IO** eine ähnliche Metabolisierung im Dünndarmepithel und in der Leber zu erwarten ist. Zum anderen scheint für **IO** eine Konjugationsposition bevorzugt zu sein. SULT Isoformen weisen eine starke Präferenz zu bestimmten Konjugationspositionen auf. So werden beispielsweise Flavonoide durch SULT1A1 und 2A1 hauptsächlich in Position 7 sulfatiert⁸². Des Weiteren scheinen **O** und **IO** Substrate von unterschiedlichen SULT und UGT Isoformen zu sein, da sich sowohl die Quantität der gebildeten Metaboliten als auch die Verteilung der Hauptmetaboliten voneinander unterscheidet.

Für **V** und **IV** konnten keine eindeutigen Hauptmetaboliten in der Leber identifiziert werden. **V-G2** und **V-G3** bzw. **IV-G1** und **IV-G3** wiesen jeweils ungefähr dieselben Peakflächen auf und wurden somit zu fast gleichen Teilen gebildet. **V-G1** und **IV-G2** konnten nur in Spuren nachgewiesen werden und stellen daher nur Minor-Komponenten dar. Bei der *in vitro* Metabolisierung im Caco-2-Modell konnten keine Phase II Metaboliten von **V** oder **IV** nachgewiesen werden, was allerdings daran liegen könnte, dass die Expression der UGTs in Caco-2-Zellen relativ gering ist im Vergleich zum TC-7 Klon¹⁷⁵. Aus diesem Grund kann kein Vergleich zwischen der Metabolisierung im Dünndarmepithel und der Leber stattfinden.

Durch zusätzliche Gegenüberstellung der UV-Spektren der identifizierten Hauptmetaboliten sollten weitere Rückschlüsse auf die Konjugationspositionen gezogen werden. Dabei fällt auf, dass für **O-G2**, **O-S3**, **IO-G1**, **IO-G3**, **IO-S3**, **V-G2** und **IV-G1** eine hypsochrome Verschiebung des UV-Maximums bei Bande I zu erkennen ist, während für **O-G1**, **O-S2**, **IO-G2**, **IO-S2**, **V-G3** und **IV-G3** eine hypsochrome Verschiebung bei Bande II zu sehen ist (vgl. 3.1.3.2). Für **O-S1**, **IO-S1**, **V-G1** und **IV-G2** konnte aufgrund von zu geringen Metabolit-Mengen kein UV-Spektrum erhalten werden. **IO-G1** und **IO-G3** wurden im Rahmen dieser Arbeit isoliert und als **IO-4'-O-glucuronid** und **IO-3'-O-glucuronid** identifiziert. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Metaboliten der Flavonoid C-Glykoside mit hypsochromem UV-Shift von Bande I vermutlich auch an Position 3' bzw. 4' konjugiert sind. Eine hypsochrome Verschiebung des Maximums bei Bande II würde also auf eine Konjugation an Position 5, 7 oder am Zucker hinweisen. Da allerdings die Hydroxy-Gruppe an Position 5 durch die Wasserstoffbrücke zum Keton in Position 4 wenig reaktiv ist, wird eher von einer Konjugation in Position 7 oder am Zucker ausgegangen²¹⁵. Singh et al. postulierten beim Vergleich der UV-Spektren von glucuronidierten Quercetin und Kämpferol Konjugaten, dass es bei Konjugation an Position 4' zu einem hypsochromen UV-Shift von Bande I kommt, während bei Position 7 kaum Veränderungen im UV-Spektrum zu erkennen waren²¹⁶. Auch bei Untersuchung der UV-Maxima von sulfatierten Flavonoiden konnte ein größerer UV-Shift von Bande I bei Konjugation in Position 3' bzw. 4' im Vergleich zu Position 7 festgestellt werden²¹⁷. Dies steht zum einen im Einklang mit den isolierten Konjugaten von **IO** und deren UV-Spektren, zum anderen untermauert dies die Vermutung, dass die hypsochrome Verschiebung von Bande I des UV-Spektrums ein Hinweis auf Konjugation in Position 3' bzw. 4' ist. Ob die

Untersuchungen der UV-Spektren von Flavonoiden auf C-glykosylierte Flavonoide übertragbar sind, kann nicht eindeutig beantwortet werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

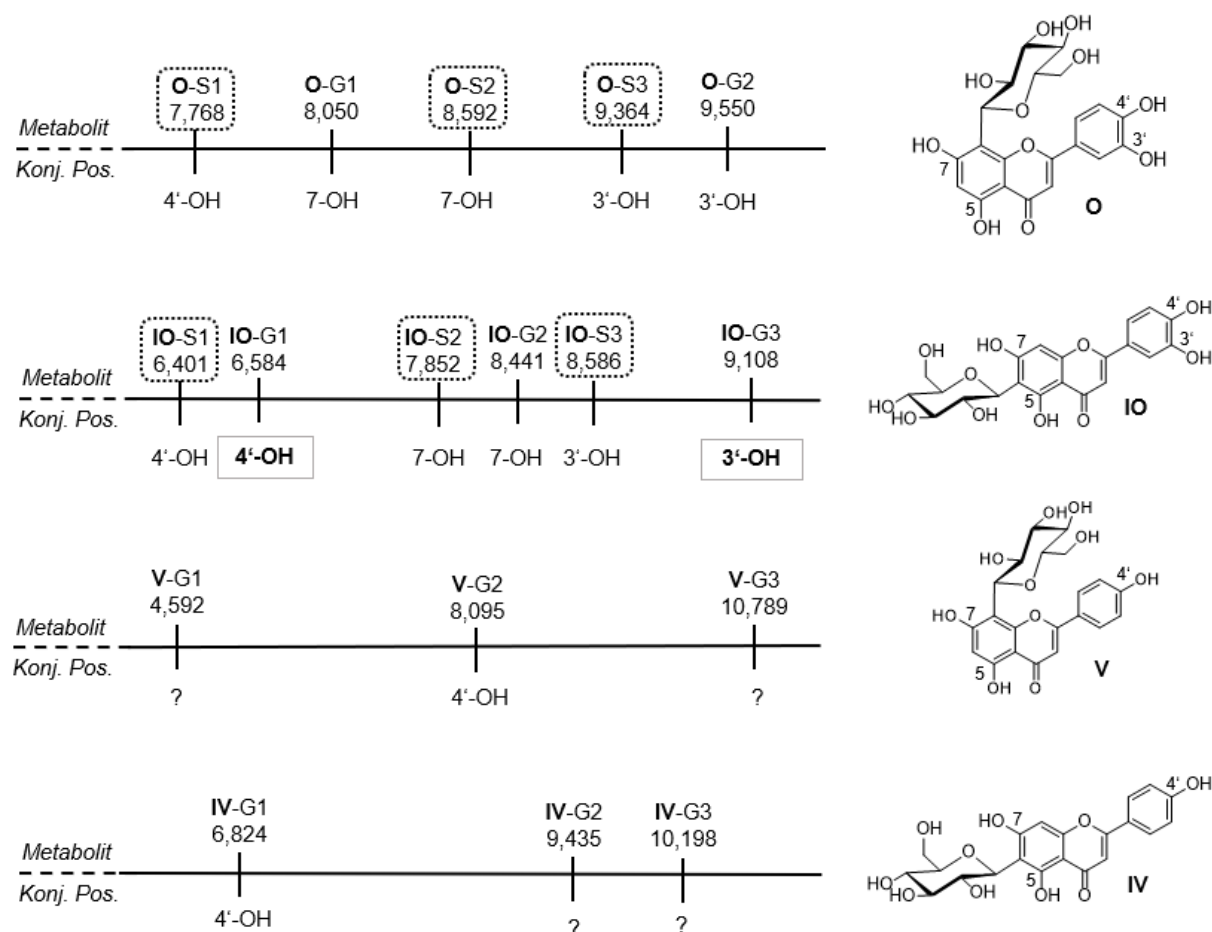


Abbildung 65: Gebildete Phase II Metaboliten von **O**, **IO**, **V** und **IV** mit zugehörigen Retentionszeiten (in min) und die jeweiligen postulierten Konjugationspositionen (Konj. Pos.).

Durch Vergleich und Interpretation von Retentionszeiten und UV-Spektren der detektierten Metaboliten, konnten Aussagen zu den Hauptmetaboliten und deren Konjugationspositionen postuliert werden. In **Abbildung 65** sind die gefundenen Metaboliten und die vermuteten Konjugationspositionen zusammengefasst. Für **IO-G1** und **IO-G3** konnte bereits die Konjugation in Position 4' bzw. 3' verifiziert werden. Da **O** sehr große strukturelle Ähnlichkeit zu **IO** aufweist, wird aufgrund der Retentionszeiten und UV-Spektren bei den Metaboliten **O-S1** und **IO-S1** ebenfalls von einer Konjugation in Position 4' und bei **O-G2**, **O-S3** und **IO-S3** von einer Konjugation in Position 3' ausgegangen. Auch die Veränderungen der UV-Maxima von **V-G2** und **IV-G1** weisen auf eine Glucuronidierung in Position 4' hin. Für einige SULTs ist eine hohe Regioselektivität bei der Sulfatierung von Flavonoiden beschrieben, außerdem sind viele SULT Isoformen identifiziert worden, die hauptsächlich Konjugationen in Position 7 oder 4' katalysieren⁸². Aus diesem Grund wird für **O-S2** und **IO-S2** und bei Vergleich der

Retentionszeiten und UV-Spektren auch für **O**-G1 bzw. **IO**-G2 von einer Konjugation in Position 7 ausgegangen. Eine Sulfatierung oder Glucuronidierung am Zucker kann jedoch aufgrund von fehlenden Daten und Literaturquellen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Für **V**-G1, **V**-G3, **IV**-G2 und **IV**-G3 kann an dieser Stelle keine Aussage zu den Konjugationspositionen getroffen werden. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass die vier Glucuronide entweder an Position 7 oder am Zucker substituiert sind. Zur vollständigen Verifizierung der postulierten Konjugationspositionen der Phase II Metaboliten sind allerdings noch weitreichendere Untersuchungen und Erkenntnisse zur Metabolisierung von Flavonoid C-Glykosiden und deren UV-Spektren nötig.

3.1.4 Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext und Ausblick

Um die Bioverfügbarkeit und Metabolisierung von C-glykosylierten Flavonoiden besser zu verstehen, wurden die sechs Flavonoid C-Glykoside **O**, **IO**, **V**, **IV**, **S** und **IS** in verschiedenen Testsystemen untersucht. Zum einen wurden die bidirektionalen Permeabilitätskoeffizienten, die damit zusammenhängenden Transportmechanismen und die Metabolisierung der Testsubstanzen im Dünndarmepithel mithilfe des Caco-2-Monolayer Modells ermittelt. Zum anderen sollten durch Verwendung von subzellulären Leberfraktionen Rückschlüsse auf die Metabolisierung in der Leber getroffen werden. Zum Schluss wurden die gefundenen Metaboliten im Dünndarmepithel und in der Leber verglichen und mithilfe von zwei isolierten glucuronidierten Metaboliten Konjugationspositionen für die identifizierten Hauptmetaboliten postuliert.

Für die sechs Testsubstanzen wurden P_{app} (A→B) zwischen $0,06 \times 10^{-6}$ cm/s (**S**, **IS**) und $0,54 \times 10^{-6}$ cm/s (**O**) ermittelt (vgl. **3.1.1.3.3.2**). Damit gelten alle getesteten Flavonoide als eher schlecht absorbierbar, da bei Betrachtung verschiedener Postulate in der Literatur einvernehmlich der scheinbare Permeabilitätskoeffizient von 10×10^{-6} cm/s als Grenzwert für eine 70-100%ige Resorption beschrieben wird und alle hier ermittelten Werte unter diesem Grenzwert liegen¹⁹⁰. Ren und Lien haben allerdings den Zusammenhang zwischen Permeabilitätskoeffizienten und Absorption weiter untersucht und herausgefunden, dass auch Substanzen mit P_{app} unter 1×10^{-6} cm/s abhängig von ihrer Struktur bis zu 100% absorbiert werden können²¹⁸.

Die Absorption hängt mit der Polarität der Strukturen und den zugehörigen Octanol/Wasser-Koeffizienten (Log P-Wert) zusammen. Aufgrund der C-C-gebundenen Zucker weisen alle Testsubstanzen eine hohe Polarität auf. Für **O**, **V** und **IV** sind Log P-Werte zwischen -1,11 und 0,01 beschrieben, während für die zugehörigen Aglyka, Luteolin und Apigenin, Log P-Werte zwischen 2 und 3 bestimmt wurden^{191,219,220}. Dabei gelten Substanzen mit Log-P Werten von

1 bis 3 als am besten absorbierbar¹⁶¹. Dies steht im Einklang mit der Literatur, in der für **IV** ein P_{app} (A→B) von $0,63 \pm 0,26 \times 10^{-6}$ cm/s mit einem Log P-Wert von 0,01 beschrieben wird, während für Apigenin, dem Aglykon von **IV**, ein P_{app} (A→B) von $10,90 \pm 0,9 \times 10^{-6}$ cm/s bei einem Log P-Wert von 2,92 ermittelt wurde^{191,220}. Alle hier verwendeten Testsubstanzen sind folglich aufgrund der hohen Polarität durch die C-C-gebundenen Zuckersubstituenten eher schlecht absorbierbar im Dünndarm.

Bei Betrachtung von Literaturdaten zur *in vitro* Absorption von Flavon C-Glykosiden ist eine Heterogenität der ermittelten Ergebnisse zu erkennen (vgl. **3.1.1.5**). Es werden Permeabilitätskoeffizienten von **O** zwischen $0,75 \times 10^{-6}$ cm/s und $10,1 \times 10^{-6}$ cm/s beschrieben^{70,161}. Auch für **IV** sind Werte von $0,63 \times 10^{-6}$ cm/s bis $5,81 \times 10^{-6}$ cm/s veröffentlicht worden^{191,192}. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse stehen also nur zum Teil im Einklang mit der Literatur, wobei in den meisten Veröffentlichungen eine Einigkeit darüber herrscht, dass Flavonoid C-glykoside, im Gegensatz zu ihren Aglya, *in vitro* eher schlecht absorbiert zu werden scheinen. Dagegen ist für einige andere C-Glykoside wie Aspalathin, das im Caco-2-Monolayer Modell komplett absorbiert zu werden scheint, eine bessere Bioverfügbarkeit postuliert²²¹. Eine Verbesserung der *in vitro* Bioverfügbarkeit von **V** konnte außerdem durch Phospholipid Nanokomplexe erreicht werden^{222–224}. Die *in vitro* Resorption von **S** und **IS** wurde verglichen mit der *in situ* Absorption durch Perfusion des Gastrointestinaltrakts von Ratten und lieferte für beide Versuche ähnliche Ergebnisse¹⁹⁴. Auch bei *in vivo* Versuchen an Ratten konnte für einige Flavonoid C-Glykoside eine schlechte Bioverfügbarkeit beobachtet werden. Zhang et al. haben herausgefunden, dass **O**, **IO**, **V** und **IV** im Gastrointestinaltrakt von Ratten kaum resorbiert werden und in großen Mengen das Kolon erreichen, wo sie durch Bakterien weiter metabolisiert werden⁶⁹. Auch Want et al. konnten für **V** nach oraler Administration nur einen sehr niedrigen Plasmaspiegel detektierten^{225,226}. Zusätzlich konnten Ma et al. von den in Ratten applizierten **V** Derivaten nur weniger als 1% in den Urinausscheidungen wiederfinden, was darauf hindeutet, dass diese schlecht absorbiert oder metabolisiert werden^{227,228}. Ähnliche Ergebnisse konnten auch beim Menschen nach oraler Administration von **O**, **IO**, **V** und **IV** ermittelt werden, wo Stalmach et al. nur sehr geringe Mengen an Substanz und Metaboliten im Blut und Urin nachweisen konnten⁶⁶.

Zum besseren Verständnis des Absorptionsprozesses, müssen die Transportmechanismen, die für die Aufnahme der C-Glykoside im Dünndarmepithel verantwortlich sind, näher betrachtet werden. Zusätzlich zur hohen Polarität der Flavonoid C-Glykoside, scheinen Effluxtransporter der ABC-Familie eine signifikante Rolle bei der Bioverfügbarkeit zu spielen. In dieser Arbeit wurde für **O**, **V**, **IV** und **S** eine Beteiligung von Transportern postuliert, wobei für **O** und **S** der Efflux durch P-GP nachgewiesen wurde (vgl. **3.1.1.3.4**). Grundsätzlich spielen vor allem Transporter der ABC-Familie, wie P-GP, BCRP oder MRP2, eine Rolle bei der Aufnahme von Flavonoiden und deren Metaboliten⁷¹. Aber auch parazellulärer Transporter oder andere

Transportsysteme können bei der Translokation beteiligt sein. Die ermittelten Ergebnisse stehen zum Teil im Einklang mit den in der Literatur zu findenden Postulaten, wobei dort auch eine größere Bandbreite an Transportmechanismen untersucht wurden, während hier der Fokus auf ABC-Transporter gelegt wurde. In der Literatur wird für **S** und **IS** zusätzlich zum passiven und parazellulären Transport die Beteiligung von P-GP und MRP Transportern beim Versuch am Caco-2-Modell beschrieben¹⁹⁴. Auch für **IV** konnte eine Mischung aus passivem, parazellulären und ABC-Transporter vermittelten Transport erkannt werden¹⁹². Liu et al. konnten feststellen, dass **O** und **V** Substrate von P-GP sind, während MRP2 keinen Einfluss auf den Transport der Substanzen *in vitro* zu haben scheint¹⁶¹. Die Beteiligung von Effluxtransportern konnte ebenfalls bei Mischungen von Flavonoid C-Glykosiden festgestellt werden. Für **S**, **IS**, **V** und **O** konnte eine verbesserte Absorption in der Mischung im Vergleich zur Einzelsubstanz detektiert werden^{161,192}. Dieser sogenannte Kooperative Effekt kann dafür sorgen, dass Effluxtransporter aufgrund kompetitiver Inhibition durch mehrere Substrate schneller gesättigt werden und somit eine bessere Absorption der Substanzen erfolgen kann¹⁶³. Dies ist der Grund, weswegen Flavonoide als Substrate von ABC-Transportern auch gezielt als Inhibitoren oder Stimulatoren derselben eingesetzt werden¹⁶³. So kann die ATPase Aktivität dieser Transporter durch Flavonoide wie Quercetin oder Genistein inhibiert oder von Glabridin stimuliert werden^{229,230}. Dieser Effekt könnte auch für Flavonoid C-Glykoside interessant sein, da diese offensichtlich auch zu den Substraten der ABC-Transporter zählen. *In vivo* Untersuchungen zur Beteiligung von Effluxtransportern sind kaum bekannt. Bei oraler Administration von **V** in Ratten konnte keine Beteiligung von P-GP beobachtet werden²³¹. Für das C-Glykosid Vicenin-2 wurde allerdings eine Beteiligung von Effluxtransportern *in vivo* postuliert²³².

Effluxtransporter spielen jedoch nicht nur bei der Absorption der Ausgangssubstanzen, sondern auch bei deren intestinal oder hepatisch gebildeten Metaboliten eine Rolle. In Caco-2-Zellen wurde nicht nur die Sekretion von Quercetin, Epicatechin und Apigenin durch den MRP2 Transporter gezeigt, sondern auch der Transport ihrer glucuronidierten und sulfatierten Konjugate^{196,233,234}. Außerdem wurde für die sulfatierten Metaboliten von Resveratrol der aktive Transport in das apikale Kompartiment im Caco-2-Modell beobachtet²³⁵. Auch die in dieser Arbeit durch das Caco-2-Modell gebildeten Metaboliten der Flavonoid C-Glykoside konnten hauptsächlich im apikalen Kompartiment gefunden werden, was darauf hindeutet, dass auch bei der Sekretion dieser Konjugate Effluxtransporter eine Rolle spielen. Auch beim *in vivo* Versuch mit Ratten wurde der MRP2 vermittelte Efflux als Grund für die schlechte Resorption von Scutellarein-glucuronid postuliert²³⁶. Die Datenlage zur Sekretion von Metaboliten *in vivo* ist allerdings lückenhaft, vor allem in Bezug auf Flavonoid C-Glykoside.

Durch die Untersuchung der *in vitro* Metabolisierung im Dünndarmepithel und in der Leber konnten einige Metaboliten der Flavonoid C-Glykoside identifiziert werden. Für **O** und **IO**

wurden im Caco-2-Modell hauptsächlich sulfatierte Phase II Metaboliten detektiert, während in der Leber sulfatierte und glucuronidierte Konjugate erfasst werden konnten. Bei **V** und **IV** wurden lediglich in der Leber glucuronidierte Phase II Metabolite gebildet, für **S** und **IS** konnten hingegen keine Metabolite detektiert werden. Hydroxylierte und methylierte Konjugate konnten für alle sechs Testsubstanzen detektiert werden. Zusätzlich konnte für **O**, **IO** und **IV** erstmalig eine Abspaltung der C-C-gebundenen Zucker und eine Phase II Metabolisierung der daraus resultierenden Aglyka im Caco-2-Monolayer Modell nachgewiesen werden (vgl. **3.1.1.4**, **3.1.2.3** und **3.1.2.4**). Die Datenlage zur Metabolisierung von Flavonoid C-Glykosiden ist lückenhaft, weswegen an dieser Stelle auch die Literatur zur Metabolisierung von anderen Flavonoiden herangezogen werden muss. Für **O** und **IO** wurde die Bildung von jeweils zwei mono-glucuronidierten Metaboliten durch HLM beschrieben⁷⁰, was die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse bekräftigt. Auch für die Aglyka der C-Glykoside, Luteolin und Apigenin, konnten mehrere Glucuronide und Sulfate bei Verwendung von subzellulären Leberfraktionen gefunden werden^{213,214}. Brand et al. haben für Hesperetin einen sulfatierten und einen glucuronidierten Metaboliten im Caco-2-Modell detektiert²³⁷. Für Chrysin konnte sowohl in Caco-2- als auch in HepG2-Zellen ein sulfatiertes und glucuronidiertes Konjugat gefunden werden²³⁸. Liu et al. konnten in Caco-2-Zellen und bei *in situ* Testung mit perfundiertem Gastrointestinaltrakt von Ratten glucuronidierte Metaboliten von Apigenin identifizieren²³⁹. Bei Testung in perfundierter Rattenleber konnten für Apigenin glucuronidierte, sulfatierte, diglucuronidierte und sogar gemischte glucuronidierte und sulfatierte Konjugate detektiert werden¹⁸⁹. Für das auch in dieser Arbeit getestete **IO** konnte durch *in vivo* Testung in Ratten ein sulfatierter und zwei methylierte Konjugate detektiert werden²⁴⁰. Hayasaka et al. haben bei *in vivo* Testung von Luteolin in Ratten und im Menschen einige sulfatierte, glucuronidierte und auch gemischte oder mehrfach konjugierte Metaboliten detektieren können²⁴¹. Diese Ergebnisse zeigen, dass Flavonoide einen starken First-Pass-Metabolismus aufweisen und schnell zu ihren Phase II Metaboliten umgewandelt werden. Für Flavonoid C-Glykoside mit einem Zuckersubstituenten konnte dies in dieser Arbeit bestätigt werden, für C-Glykoside mit zwei Zuckersubstituenten ist die Datenlage noch unzureichend, um fundierte Aussagen zu treffen.

Einige im Körper gebildeten Metaboliten werden nicht nur ausgeschieden, sondern können auch biologische Aktivität am Zielort zeigen. Obwohl viele biologische Effekte mit den Hydroxy-Gruppen von Flavonoiden verbunden sind, die durch Konjugation verringert werden, können auch die Metaboliten eine signifikante Rolle spielen²⁴². Dabei gibt es zwei Möglichkeiten wie Flavonoid Konjugate *in vivo* wirken können. Einerseits können sie als Prodrugs agieren, die durch β -Glucuronidasen, Sulfatasen oder CYPs in den menschlichen Geweben in ihre jeweiligen Aglyka gespalten werden^{243,244}. Für die Glucuronide von Quercetin, Isorhamnetin und Tamarixetin ist beschrieben, dass sie durch Dekonjugation die EpRE vermittelte

Genexpression stimulieren können²⁴⁵. Außerdem wurde postuliert, dass die antiproliferative Aktivität von Diosmetin in MCF-7- und HepG2-Zellen durch Demethylierung aktiviert werden kann^{246,247}. Andererseits können aber auch die Konjugate selbst mit intrazellulären Makromolekülen interagieren und damit biologische Effekte zeigen^{248–250}. Für Glucuronide von Quercetin wurde gezeigt, dass sie die Xanthinoxidase und die Lipoxygenase hemmen, Apoptose induzieren und kardiovaskuläre Krankheiten verhindern können^{249,251,252}. Zusätzlich konnte für Quercetin-3'-sulfat nachgewiesen werden, dass es endotheliale Dysfunktion vorbeugen kann²⁴⁸. Auch für die methylierten Konjugate von Luteolin und Quercetin konnten zahlreiche biologische Effekte gezeigt werden^{253–255}. Für Flavonoid C-Glykoside sind keine Daten zur Aktivität der Metaboliten bekannt, es ist allerdings vorstellbar, dass auch die Konjugate von C-glycosylierten Flavonoiden einen biologischen Effekt im menschlichen Körper haben.⁷¹

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei mono-glucuronidierte Metaboliten von **IO** isoliert und somit ihre Konjugationsposition verifiziert werden. Die beiden Hauptmetaboliten wurden als **IO**-3'-O-glucuronid und **IO**-4'-O-glucuronid identifiziert (vgl. **3.1.2.3.4**). Shi et al. konnten nach oraler Administration von **IO** in Ratten eine Sulfatierung in Position 3' oder 4' detektieren. Zusätzlich konnten an 3' und 4' methylierte Metaboliten von **IO** detektiert werden²⁴⁰. Ansonsten sind kaum Studien zu den Konjugationspositionen von Flavonoid C-Glykosiden zu finden, nicht zuletzt, weil auch die Datenlage zur Metabolisierung noch sehr gering ist. Grundsätzlich bieten Flavonoide durch ihre Hydroxy-Gruppen viele Angriffsstellen für metabolische Enzyme im Körper. Welche Hydroxy-Gruppe letztendlich konjugiert wird, hängt von der Regioselektivität der einzelnen Enzymfamilien und Isoformen ab. Von Xiao und Hoggars wurde für einige Subklassen von Flavonoiden die Selektivität von UGTs bei der Glucuronidierung zusammengefasst²¹³. So werden Flavone in Position 6, 7, 3' oder 4' glucuronidiert, während Flavonole am 7-, 3-, 3' oder 4'-Hydroxyl konjugiert werden. Die Hydroxy-Gruppe in Position 5 reagiert hingegen aufgrund der Wasserstoffbrücke zu dem Keton in Position 4 kaum²¹⁵. Wu et al. konnten bei Inkubation von Luteolin mit UGT1A1 und 1A10 eine Präferenz zur Konjugation an 3'-Hydroxy erkennen⁸². Außerdem wurde herausgefunden, dass Flavonole von der UGT1A Subfamilie hauptsächlich in Position 3 und 7 glucuronidiert werden, wobei UGT1A7, 1A8, 1A9 und 1A10 Position 3 bzw. UGT1A1 und 1A3 Position 7 präferieren⁷⁹. Shi et al. fanden heraus, dass **O** und **IO** hauptsächlich durch UGT1A1, 1A8 und 1A10 glucuronidiert werden, wobei keine Konjugationspositionen ermittelt wurden⁷⁰. Aufgrund der in dieser Arbeit identifizierten Hauptmetaboliten von **IO**, ist eine Präferenz zum 3'- und 4'-Hydroxyl jedoch wahrscheinlich. Bei der Sulfatierung durch SULTs ist eine striktere Regioselektivität im Vergleich zu den UGTs erkennbar. Für Chrysin und Galangin konnten beispielsweise nur Sulfatierungen in Position 7 beobachtet werden⁸². Außerdem ist beschrieben, dass die SULT Isoformen SULT1A1, 1E1 und 2A1 Isoflavone in Position 7 sulfatieren, während SULT1A3 ausschließlich das 4'-Hydroxyl

konjugiert⁸². Auch für COMTs ist eine strikte Präferenz zu bestimmten Hydroxy-Gruppen erkennbar, da hauptsächlich die die Catechol-Struktur bildenden Hydroxy-Gruppen (also 3'- und 4'-OH) methyliert werden. Dabei wurde gezeigt, dass beide COMT Isoformen eine Methylierung in meta- der para-Position vorziehen⁸⁹.

Vor allem bei UGTs und SULTs sind einige Unterschiede zwischen der Expression von Enzym Isoformen in den einzelnen Organen erkennbar. Im menschlichen Darm sind fast alle UGT Isoformen zu finden, während in der Leber UGT1A5, 1A7 und 1A8 nicht exprimiert werden^{76,256}. Für die Glucuronidierung von Flavonoiden sind hauptsächlich die UGT1A Subfamilie und UGT2B7 verantwortlich⁷⁸. Auch zwischen den SULT Isoformen sind Unterschiede bei der Verteilung innerhalb des Körpers erkennbar. Während im Darm hauptsächlich SULT1A1, 2A1, 1B1 und 1E1 exprimiert werden, ist in der Leber zusätzlich die Isoform SULT1A3 in großen Anteilen zu finden^{79,83}. Eine Sulfatierung von Flavonoiden ist dabei hauptsächlich für die SULT1A1 und 1A3 Isoformen beschrieben^{84,85}. Aufgrund der Abweichungen bei der Expression von Isoformen in der Leber und im Darm, können auch Unterschiede in der Metabolit-Bildung entstehen. In dieser Arbeit konnten, bei der *in vitro* Metabolisierung von **O** unterschiedlich sulfatierte Hauptmetaboliten in Darm und Leber identifiziert werden (vgl. **3.1.3**), was vermutlich auf unterschiedliche SULT Isoformen zurückzuführen ist.⁷¹

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse stehen zum Großteil im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen zu Flavonoid C-Glykosiden. Allerdings ergeben sich aus den erhaltenen Ergebnissen eine Vielzahl von Fragestellungen, die weiter erforscht werden müssen. Untersuchungen zur besseren Bioverfügbarkeit von Flavonoid C-Glykosiden durch Nanokomplexe oder durch Flavonoidmischungen und dem damit entstehenden Kooperativen Effekt sollten weiter vorangetrieben werden. Außerdem sollten die Forschung zum Metabolit-Profil auch auf *ex vivo* oder *in vivo* Versuche ausgeweitet werden, um festzustellen, ob *in vitro* gefundene Metaboliten auch im Menschen eine Rolle spielen. Die genaue Bestimmung der Konjugationsposition der gefundenen Phase II Metaboliten ist unerlässlich, um die Zusammenhänge im *in vitro* Metabolismus genauer zu verstehen und Rückschlüsse zur Metabolisierung *in vivo* ziehen zu können. Zusätzlich sollten die identifizierten Metaboliten auf ihre pharmakologische Relevanz und biologische Aktivität *in vitro* und *in vivo* getestet werden. Die Identifizierung der beteiligten SULT und UGT Isoformen und ihre Lokalisierung wäre zum besseren Verständnis der Enzymreaktionen im Körper von großem Interesse.

3.2 Metabolisierung von Biflavonoiden

Im Folgenden sollen die Ergebnisse von drei Biflavonoiden im Caco-2-Metabolisierungsversuch dargestellt werden. Dabei wurden Amentoflavon (**AF**), 13,118-Biapigenin (**BA**), und Hinokiflavon (**HF**) untersucht (**Abbildung 66**), die Ergebnisse anschließend diskutiert und mit Daten aus der Literatur verglichen.

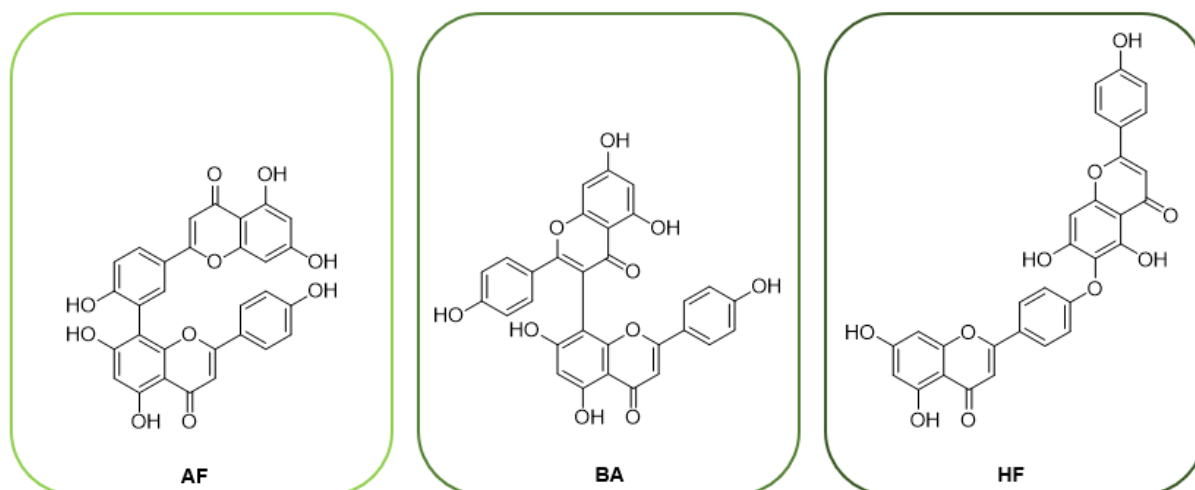


Abbildung 66: Strukturen der drei getesteten Biflavonoide Amentoflavon (**AF**), 13, 118-Biapigenin (**BA**) und Hinokiflavon (**HF**).

Die *in vitro* Metabolisierung im Dünndarmepithel wurde durch das etablierte Caco-2 Monolayer Modell untersucht. Als Vorversuch wurde die substanzabhängige Zellviabilität an Caco-2-Zellen und die Stabilität der Testsubstanzen unter Versuchsbedingungen geprüft.

3.2.1 Vorversuche

3.2.1.1 Zellviabilität von Caco-2-Zellen

Um die Konzentrationen für die nachfolgenden Caco-2-Metabolisierungsversuche festzulegen, wurde für alle Biflavonoide ein MTT-Assay unter Versuchsbedingungen durchgeführt. Dabei sollte festgestellt werden, ob die Testsubstanzen die Viabilität der Caco-2-Zellen beeinflussen. Viabilitäten > 90% wurden hierbei als nicht zytotoxisch angesehen und für die Versuche akzeptiert. Alle Werte wurden als Prozent-Werte bezogen auf die Kontrollgruppe (NK, 100%), die unbehandelte Zellen enthielt, angegeben. Durch die Lösungsmittelkontrollen wurde der Einfluss von DMSO (LM 1, 0,5% (V/V)) bzw. DMSO und Tween 80 (LM 2) in der höchsten verwendeten Konzentration (0,5% (V/V) DMSO und 0,25% (V/V) Tween 80) auf die Zellviabilität betrachtet.

Bei allen drei Testsubstanzen ist in den beiden höchsten Konzentrationen (75 und 100 μM) ein signifikanter Anstieg der Werte auf $148,9 \pm 8,5\%$ (100 μM , **AF**), $152,5 \pm 3,4\%$ (100 μM , **BA**) und $134,0 \pm 8,0\%$ (100 μM , **HF**) zu erkennen (**Abbildung 67**). Auch die Lösungsmittelkontrolle 2 (mit DMSO und Tween 80) zeigt eine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität auf $159,1 \pm 6,4\%$, was darauf hinweist, dass Tween 80 in höheren Konzentrationen für den Effekt verantwortlich ist. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist die Hochregulierung des Zellstoffwechsels durch den toxischen Effekt von Tween 80, da die Zellen beim Überlebenskampf mehr MTT pro Zeit umsetzen. Es ist auch möglich, dass Tween 80 selbst zur Reduktion des Formazans beiträgt und damit die Absorptionswerte nach oben treibt.

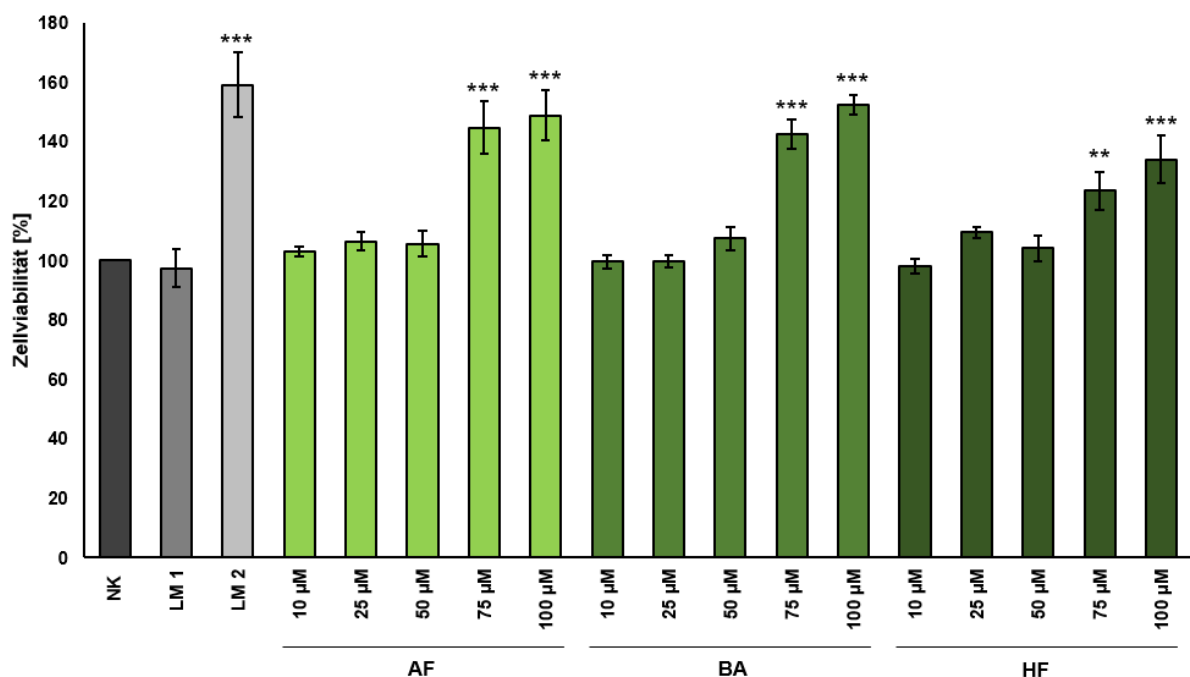


Abbildung 67: Viabilität der Caco-2-Zellen in Abhängigkeit der Konzentrationen 10, 25, 50, 75 und 100 μM der Substanzen **AF**, **BA** und **HF**; es wurden drei unabhängige Experimente in Pentaplikaten durchgeführt; NK: Negativkontrolle (Medium), LM 1: 0,5% DMSO, LM 2: 0,5% DMSO und 0,25% Tween 80. Daten sind dargestellt als MW $\pm$ StabW ($n = 3$), sie wurden einer einfachen ANOVA mit Tukey-HSD Post-hoc-Test unterzogen; Signifikanzniveaus: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***).

Bei den Caco-2-Metabolisierungsversuchen wurden für alle drei Biflavonoide **AF**, **BA** und **HF** nur Konzentrationen bis 50 μM verwendet. Die beiden höheren Konzentrationen (75 und 100 μM) wurden nicht für die Versuche benutzt, da der Stoffwechsel der Zellen unter den gewählten Bedingungen durch Tween 80 signifikant beeinflusst wird.

3.2.1.2 Stabilitätsversuche

Um die Stabilität der drei Biflavonoide **AF**, **BA** und **HF** während des Caco-2-Metabolisierungsversuchs zu untersuchen, wurde im Vorfeld Stabilitätsversuche in HBSS Puffer (pH = 6) durchgeführt und via HPLC-DAD vermessen. Dabei sollte festgestellt werden, ob unter Versuchsbedingungen die Stabilität der Testsubstanzen beeinträchtigt ist. Alle Werte wurden als Prozent-Werte bezogen auf den Gehalt zum Zeitpunkt t_0 (100%) angegeben.

Für alle drei Testsubstanzen ist keine Abnahme des Gehalts über den Zeitraum von 5 h zu erkennen (**Abbildung 68**). Da die Zellviabilität unter Versuchsbedingungen (vgl. **3.2.1.1**) jedoch nur für einen Zeitraum von 3 h getestet wurde, wurde die Experimentdauer der Caco-2-Metabolisierungsversuche auf 3 h festgelegt, um sowohl die Stabilität der Testsubstanzen, als auch die Viabilität der Caco-2-Zellen zu garantieren.

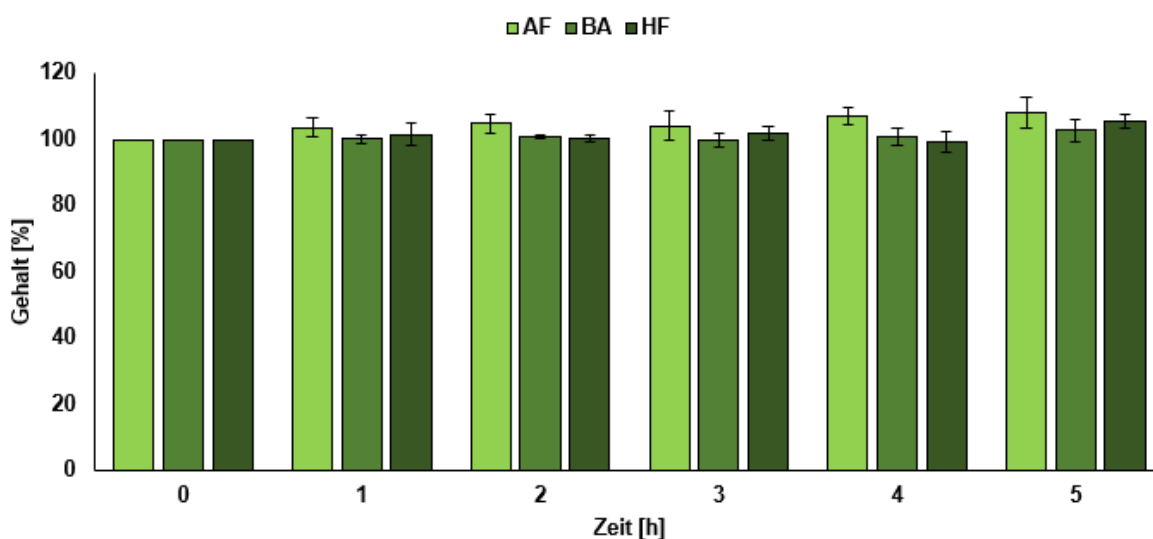


Abbildung 68: Stabilität der Biflavonoide **AF**, **BA** und **HF** in HBSS (pH = 6,0) unter Versuchsbedingungen (37 °C, 5% CO₂) zu sechs Zeitpunkten (t = 0, 1, 2, 3, 4 und 5 h). Der Gehalt wurde durch eine HPLC-DAD Methode bestimmt und gegen t_0 in Prozent [%] angegeben. Daten sind dargestellt als MW $\pm$ StabW, n = 3.

3.2.2 Metabolisierung im Dünndarmepithel durch das Caco-2 Monolayer Modell

Das unter **3.1.1.2** beschriebene Caco-2-Monolayer Modell wurde ebenfalls zur Untersuchung der *in vitro* Metabolisierungsreaktionen von Biflavonoiden im Dünndarmepithel verwendet. Auch hierbei wurde die Ausdifferenzierung der Caco-2-Zellen zu einem konfluenten Monolayer ausgenutzt, der über ähnliche Eigenschaften wie das Dünndarmepithel verfügt^{172,173}. Da im Caco-2-Monolayer Enzyme wie UGTs^{177,178}, SULTs¹⁷⁶, COMTs⁸⁹ und CYPs^{73,179} exprimiert werden, kommt die Enzymausstattung der *in vivo* Situation nahe¹⁸⁰. Durch die Ähnlichkeit mit

den Epithelzellen des Dünndarms steht mit dem Caco-2-Modell ein *in vitro* Testsystem zur Verfügung, welches die Untersuchung der Metabolisierung von Biflavonoiden ermöglicht.

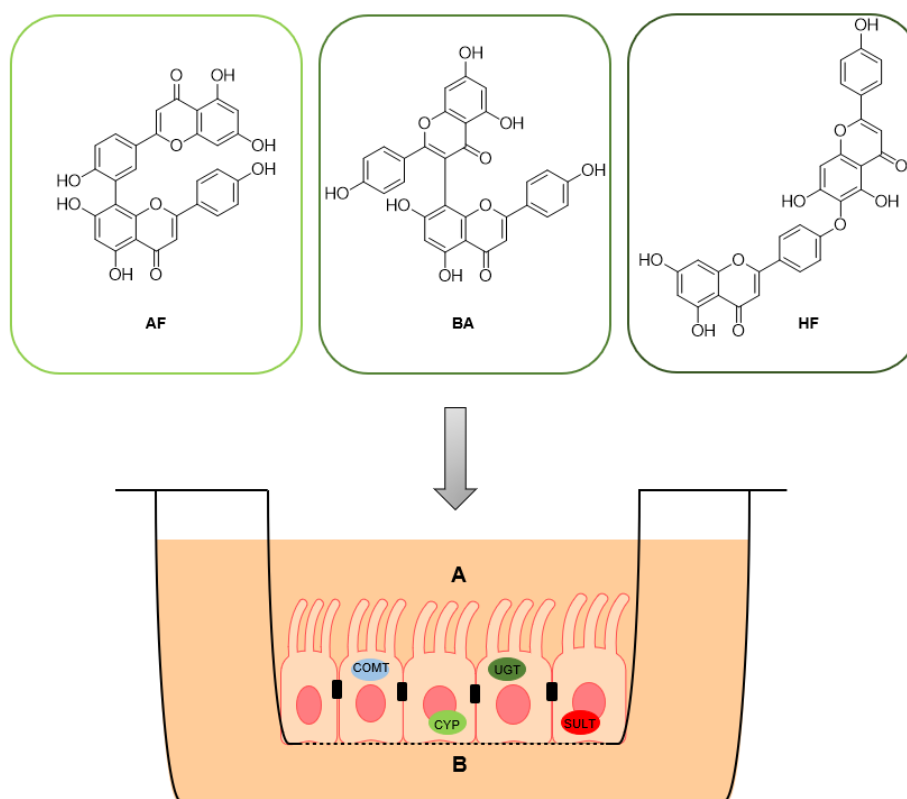


Abbildung 69: Schematische Darstellung der Caco-2-Metabolisierungsversuche mit Hilfe des Caco-2-Monolayer Modells. Abgebildet sind die drei Testsubstanzen **AF**, **BA** und **HF** und der Caco-2-Monolayer mit den Enzymen UGT, SULT, COMT und CYP. **A:** apikale Seite, **B:** basolaterale Seite.

Die Metabolisierung der drei Biflavonoide **AF**, **BA** und **HF** im Caco-2-Monolayer Modell ist schematisch in **Abbildung 69** dargestellt. Dafür wurden diese mit einer Konzentration von 50 μM auf der apikalen Seite des Caco-2-Versuchs aufgegeben und für 3 h inkubiert (vgl. **2.1.5.3**). Die so erhaltenen apikalen und basolateralen Proben und die Proben der Zellyse wurden via UHPLC-DAD-MS analysiert. Da im Caco-2 Monolayer eine vielfältige Ausstattung an Phase I und Phase II Enzymen zu finden ist¹⁸⁰, wurde eine Datenbank (siehe Anhang, **Tabelle 93**) mit denkbaren Metaboliten angelegt. Zu den vermuteten Verbindungen zählten einfach bzw. mehrfach reduzierte, sulfatierte, glucuronidierte, methylierte und hydroxylierte Verbindungen sowie gemischte Metaboliten. Außerdem wurden einige Flavonoidspaltprodukte mit in die Datenbank einbezogen. Die Verbindungen wurden mithilfe der MS-Software, in die die Datenbank eingepflegt war, ausgewertet. Dabei wurden nur Metaboliten mit einem Score > 80 berücksichtigt. Die gefundenen Phase II Metaboliten wurden anschließend via UHPLC-DAD-MS/MS verifiziert. Metaboliten, die ebenfalls in der Kontrollgruppe gefunden worden waren, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

3.2.2.1 Metabolit Identifizierung via UHPLC-DAD-MS

Die untersuchten Biflavonoide bestehen jeweils aus zwei Apigenin-Einheiten, die via C-C-Verknüpfung (bei **AF** und **BA**) oder durch eine C-O-Bindung (bei **HF**) miteinander verbunden sind (**Abbildung 66**). In **Tabelle 82** sind die eingesetzten Verbindungen, deren Retentionszeiten in der UHPLC-DAD-MS-Methode, deren experimentell ermittelte und kalkulierte Masse $[M-H]^-$ und deren Summenformel angegeben. Durch diese Experimente sollte ermittelt werden, ob die Verknüpfung der Biflavonoide einen Einfluss auf deren *in vitro* Metabolisierung im Dünndarmepithel hat.

Tabelle 82: Übersicht der eingesetzten Biflavonoide im Caco-2-Metabolisierungsversuch unter Angabe ihrer Retentionszeiten (RT), der berechneten (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelten Massen $[M-H]^-$ und deren Summenformel aus der UHPLC-DAD-MS Analytik; **Abk.**: Abkürzung der Substanzbezeichnung.

Abk.	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z) exp.	$[M-H]^-$ (m/z) kalk.	Summenformel	Bezeichnung
AF	6,121	537,0821	537,0827	$C_{30}H_{18}O_{10}$	Amentoflavon
BA	5,694	537,0827	537,0827	$C_{30}H_{18}O_{10}$	I3, I18-Biapigenin
HF	7,620	537,0827	537,0827	$C_{30}H_{18}O_{10}$	Hinokiflavon

In **Tabelle 83**, **Tabelle 84** bzw. **Tabelle 85** sind die gefundenen Phase I und II Metaboliten von **AF**, **BA** bzw. **HF** dargestellt. Dabei ist für jeden Metaboliten das Kompartiment (K), in dem dieser gefunden wurde, die Retentionszeit (RT), die experimentell (exp.) ermittelte und kalkulierte (kalk.) Masse $[M-H]^-$, die Summenformel und die Bezeichnung der möglichen Metaboliten angegeben.

Für **AF** konnten zwei verschiedene einfach hydroxylierte bzw. methylierte Metaboliten mit unterschiedlichen Retentionszeiten und ein gemischt methylierter und hydroxylierter Metabolit identifiziert werden. Außerdem wurde **AF** mit einer hydrierten Doppelbindung detektiert. Als einziger mono-sulfatierter Metabolit wurde das zusätzlich noch methylierte **AF** ermittelt. Im Falle von **AF** scheinen keine Glucuronidierungen statt zu finden. Alle gefundenen Metaboliten konnten im apikalen Kompartiment (A) detektiert werden, während im basolateralen Kompartiment (B) und im Zelllysate (Z) ausschließlich die Ausgangssubstanz gefunden wurde.

Tabelle 83: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **AF**, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS (n = 3) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel; **K**: Kompartiment, **A**: Apikal, **B**: Basolateral, **Z**: Zelllysat.

K	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z) exp.	$[M-H]^-$ (m/z) kalk.	Summenformel	Möglicher Metabolit
A	5,648	553,0764	553,0776	$C_{30}H_{18}O_{11}$	Hydroxy- AF
A	5,914	553,0774	553,0776	$C_{30}H_{18}O_{11}$	Hydroxy- AF
A	6,086	539,0983	539,0984	$C_{30}H_{20}O_{10}$	Dihydro- AF
A	6,350	567,0930	567,0933	$C_{31}H_{20}O_{11}$	Hydroxymethoxy- AF
A	7,440	551,0982	551,0984	$C_{31}H_{20}O_{10}$	Methoxy- AF
A	7,490	631,0559	631,0552	$C_{31}H_{20}O_{13}S$	Methoxy- AF -sulfat
A	8,546	551,0987	551,0984	$C_{31}H_{20}O_{10}$	Methoxy- AF

Es wurde für **BA** lediglich ein hydrierter und zwei zusätzlich noch mono-glucuronidierte Metaboliten gefunden. Im Falle von **BA** scheinen weder Methylierungen und Hydroxylierungen noch Sulfatierungen statt zu finden. Auch hier wurden alle Metabolite ausschließlich im apikalen Kompartiment detektiert. Im basolateralen Kompartiment und im Zelllysat konnte lediglich **BA** selbst identifiziert werden.

Tabelle 84: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **BA**, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS (n = 3) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel; **K**: Kompartiment, **A**: Apikal, **B**: Basolateral, **Z**: Zelllysat.

K	RT [min]	$[M-H]^-$ (m/z) exp.	$[M-H]^-$ (m/z) kalk.	Summenformel	Möglicher Metabolit
A	5,570	539,0986	539,0984	$C_{30}H_{20}O_{10}$	Dihydro- BA
A	6,262	715,1301	715,1305	$C_{36}H_{28}O_{16}$	Dihydro- BA -glucuronid
A	6,370	715,1298	715,1305	$C_{36}H_{28}O_{16}$	Dihydro- BA -glucuronid

Für **HF** konnten ein hydroxylierter, fünf einfach methylierte und drei kombinierte methylierte und hydroxylierte Metaboliten detektiert werden. Außerdem konnten zwei verschiedene mono-glucuronidierte und ein mono-sulfatiertes **HF** identifiziert werden. Zusätzlich konnte noch das mono-sulfatierte Hydroxymethoxy-**HF** gefunden werden. Damit wurden für **HF** fast alle möglichen Phase I und II Reaktionsprodukte detektiert, lediglich eine Hydrierung scheint nicht statt zu finden. Die meisten Metaboliten wurden auch hier im apikalen Kompartiment gefunden.

Je ein mono-glucuronidierter und ein mono-sulfatierter Metabolit konnten jedoch zusätzlich auch im basolateralen Kompartiment und im Zelllysats nachgewiesen werden.

Tabelle 85: Im Caco-2-Metabolisierungsversuch gebildete Phase I und II Metaboliten von **HF**, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS (n = 3) mit detektierter Retentionszeit (**RT**), kalkulierter (**kalk.**) und experimentell (**exp.**) ermittelter Masse $[M-H]^-$ und Summenformel; **K**: Kompartiment, **A**: Apikal, **B**: Basolateral, **Z**: Zelllysats.

K	RT [min]	[M-H]⁻ (m/z) exp.	[M-H]⁻ (m/z) kalk.	Summen- formel	Möglicher Metabolit
A	6,108	713,1147	713,1148	C ₃₆ H ₂₆ O ₁₆	HF -glucuronid (1)
B	6,105	713,1140	713,1148	C ₃₆ H ₂₆ O ₁₆	HF -glucuronid (1)
Z	6,110	713,1132	713,1148	C ₃₆ H ₂₆ O ₁₆	HF -glucuronid (1)
A	6,251	713,1139	713,1148	C ₃₆ H ₂₆ O ₁₆	HF -glucuronid (2)
A	6,675	617,0394	617,0395	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₃ S	HF -sulfat
B	6,687	617,0390	617,0395	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₃ S	HF -sulfat
Z	6,689	617,0397	617,0395	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₃ S	HF -sulfat
A	6,792	647,0503	647,0501	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₄ S	Hydroxymethoxy- HF - sulfat
A	7,082	553,0767	553,0776	C ₃₀ H ₁₈ O ₁₁	Hydroxy- HF
A	7,140	551,0977	551,0984	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₀	Methoxy- HF
A	7,352	551,0980	551,0984	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₀	Methoxy- HF
A	7,439	551,0984	551,0984	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₀	Methoxy- HF
A	7,793	551,0982	551,0984	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₀	Methoxy- HF
A	8,545	551,0975	551,0984	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₀	Methoxy- HF
A	7,592	567,0927	567,0933	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₁	Hydroxymethoxy- HF
A	7,768	567,0931	567,0933	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₁	Hydroxymethoxy- HF
A	7,964	567,0928	567,0933	C ₃₁ H ₂₀ O ₁₁	Hydroxymethoxy- HF

Da beim Betrachten der UHPLC-DAD Chromatogramme der Metabolisierungsproben von **HF** eine ungewöhnlich hohe Umsetzungsrate festgestellt werden konnte, wurden exemplarisch je eine apikale und eine basolaterale Probe und ein Zelllysats via HPLC-DAD mit der unter **2.1.5.6** beschriebenen Methode vermessen. Die dabei erhaltenen Chromatogramme sind in **Abbildung 70** dargestellt. Dabei ist im apikalen Kompartiment ein deutlicher Peak der Ausgangssubstanz, aber auch des mono-sulfatierten Metaboliten zu erkennen. Diese beiden Peaks konnten auch im basolateralen Kompartiment und im Zelllysats identifiziert werden. Dies zeigt, dass **HF**-sulfat der Hauptmetabolit von **HF** bei der *in vitro* Metabolisierung im Dünndarm ist. Außerdem ist zu erkennen, dass die Menge an **HF** und Metabolit im apikalen Kompartiment am größten ist, während im basolateralen Kompartiment kaum noch Substanzen gefunden

werden konnte. Selbst im Vergleich zum Zelllysats konnte im basolateralen Kompartiment deutlich weniger **HF** und **HF-sulfat** detektiert werden. Dies könnte zum einen an der geringen Resorption von **HF** liegen, aber auch an dem gezielten Efflux durch Transporter auf der apikalen Seite der Caco-2-Zellen. Da für Transportproteine der ABC-Familie der Efflux von bestimmten Flavonoiden beschrieben ist⁷¹, wäre auch denkbar, dass Biflavonoide durch diese Effluxtransporter aus dem Darmepithel zurück in das Darmlumen transportiert werden können.

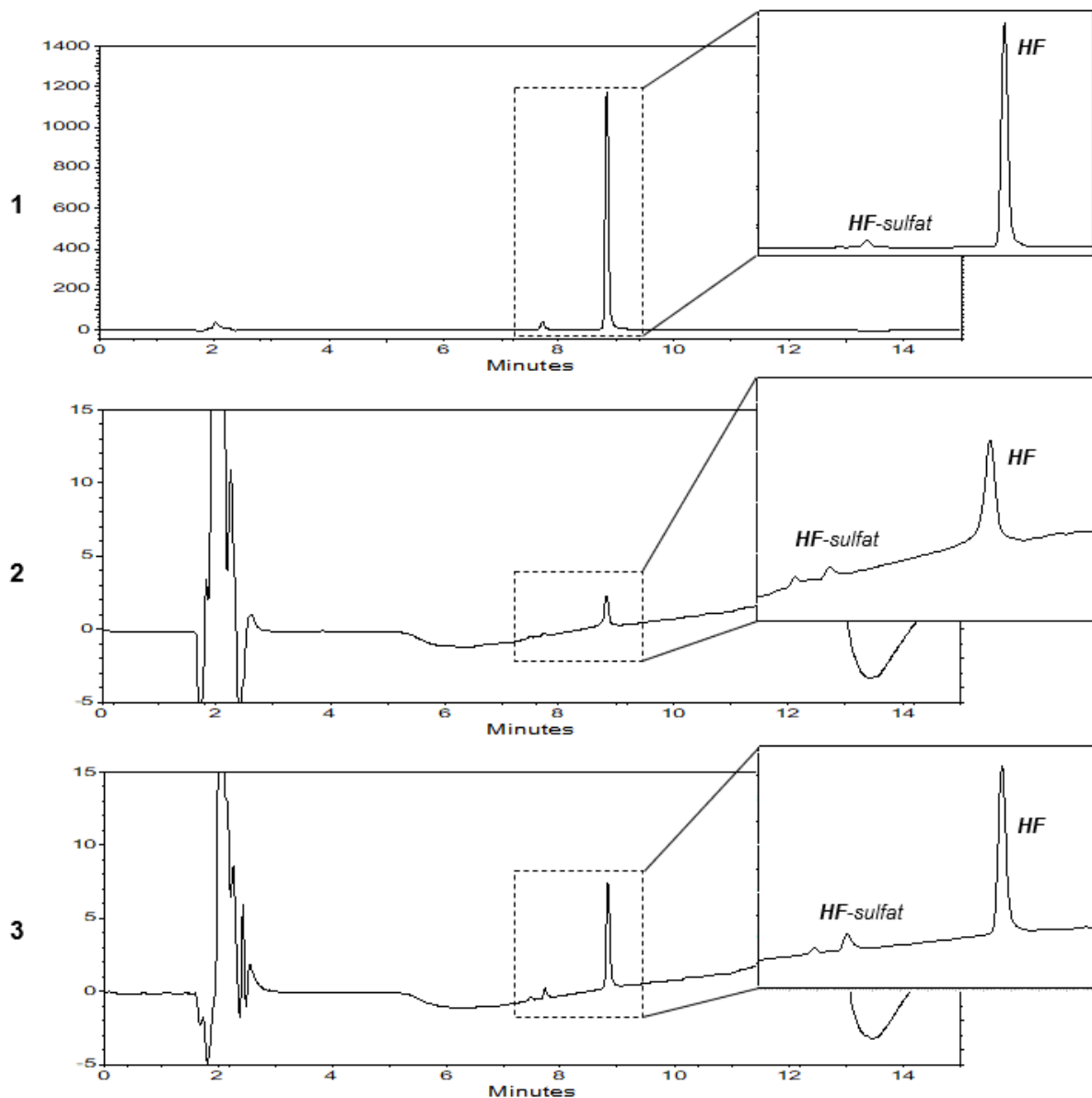


Abbildung 70: HPLC-DAD Chromatogramme der apikalen (1) und basolateralen (2) Probe und des Zelllysats (3) des Caco-2-Metabolisierungsversuchs von **HF**.

Eine graphische Übersicht aller gebildeten Metaboliten von **AF**, **BA** und **HF** ist in **Abbildung 71** zu sehen. Es ist zu erkennen, dass vor allem im Fall von **HF** sehr viele verschiedene Phase I und II Metabolite detektiert werden konnten. Auch **AF** scheint im Dünndarmepithel

stark metabolisiert zu werden, wobei es sich hier hauptsächlich um Methylierungs- und Hydroxylierungsreaktionen handelt. **BA** scheint im Vergleich zu den anderen beiden Biflavonoiden eher weniger metabolisiert zu werden. Spaltprodukte konnten im Gegensatz zu den untersuchten C-Glykosiden (**3.1.1.4**) bei keinem der drei Biflavonoide nachgewiesen werden.

Im Fall von **AF** und **BA** konnten alle Metaboliten ausschließlich im apikalen Kompartiment identifiziert werden. Lediglich die Ausgangsverbindung und die mono-glucuronidierten und mono-sulfatierten Metaboliten von **HF** konnten auch im basolateralen Kompartiment und im Zelllysats detektiert werden.

		AF	BA	HF
[BF]	A			
	B			
	Z			
Hydroxy-[BF]	A			
	B			
	Z			
Methoxy-[BF]	A			
	B			
	Z			
Hydroxymethoxy-[BF]	A			
	B			
	Z			
Dehydro-[BF]	A			
	B			
	Z			
[BF]-sulfat	A			
	B			
	Z			
Methoxy-[BF]-sulfat	A			
	B			
	Z			
Hydroxymethoxy-[BF]-sulfat	A			
	B			
	Z			
[BF]-glucuronid	A			
	B			
	Z			
Dehydro-[BF]-glucuronid	A			
	B			
	Z			

Eine Verbindung
 Zwei Verbindungen
 Drei Verbindungen
 Vier Verbindungen
 Fünf Verbindungen

Abbildung 71: Übersicht der gebildeten Phase I und II Metaboliten der eingesetzten Biflavonoide im jeweiligen Kompartiment des Caco-2-Metabolisierungsversuchs, verifiziert durch UHPLC-DAD-MS (n = 3); A: Apikal, B: Basolateral, Z: Zelllysats

3.2.2.2 MS/MS Fragmentierung der Phase II Metaboliten

Zur Überprüfung der unter **3.2.2.1** beschriebenen Phase II Metabolite der getesteten Biflavonoide, wurde neben der hochauflösenden Masse zusätzlich eine MS/MS-Fragmentierung durchgeführt. Dafür wurden die relevanten Fragmente der Metaboliten von **AF**, **BA** und **HF** auf Basis ihrer Retentionszeiten (vgl. **Tabelle 83** bis **Tabelle 85**) extrahiert und mittels Tandem-MS analysiert. In **Tabelle 86** sind die erhaltenen Fragmentationen der Verbindungen aufgelistet.

Bei allen sulfatierten Metaboliten der Verbindungen **AF** und **HF** konnte ein Abgang der Sulfateinheit durch Neutralverlust von 80 Da beobachtet werden (**Abbildung 72**). Außerdem konnte für alle glucuronidierten Metaboliten von **HF** der Neutralverlust von 176 Da und damit der Glucuronyl-Einheit detektiert werden. Von allen in **Tabelle 86** aufgelisteten Metaboliten konnte zusätzlich das Fragmentation der jeweiligen Ausgangssubstanz **AF** bzw. **HF** nachgewiesen werden. Für den Metaboliten von **BA** konnten keine Fragmentierungsreaktionen beobachtet werden.

Tabelle 86: Bestimmung der gebildeten Metaboliten im Caco-2-Metabolisierungsversuch der Verbindungen **AF** und **HF** durch Extrahierung derer Massen zur jeweiligen Retentionszeit (RT) mittels MS/MS-Fragmentierung; **K**: Kompartiment, **GlucA**: Glucuronyl-, **SO₃**: Sulfat-, **CH₃**: Methoxy-, **OH**: Hydroxy-.

K	RT [min]	[M-H]⁻ (m/z)	Fragmentationen (m/z)	Möglicher Metabolit
A	7,490	631,0559	551,0998 [M-H-SO ₃] ⁻ ; 537,0886 [M-H-SO ₃ -CH ₃] ⁻	Methoxy- AF -sulfat
A	6,792	647,0503	567,0925 [M-H-SO ₃] ⁻ ; 537,0763 [M-H-SO ₃ -CH ₃ -OH] ⁻	Hydroxymethoxy- HF -sulfat
A	6,108	713,1147	537,0827 [M-H-GlucA] ⁻	HF -glucuronid (1)
A	6,251	713,1139	537,0823 [M-H-GlucA] ⁻	HF -glucuronid (2)
B	6,105	713,1147	537,0790 [M-H-GlucA] ⁻	HF -glucuronid (1)
Z	6,110	713,1147	537,0808 [M-H-GlucA] ⁻	HF -glucuronid (1)
A	6,675	617,0394	537,0823 [M-H-SO ₃] ⁻	HF -sulfat
B	6,687	617,0390	537,0822 [M-H-SO ₃] ⁻	HF -sulfat
Z	6,689	617,0397	537,0827 [M-H-SO ₃] ⁻	HF -sulfat

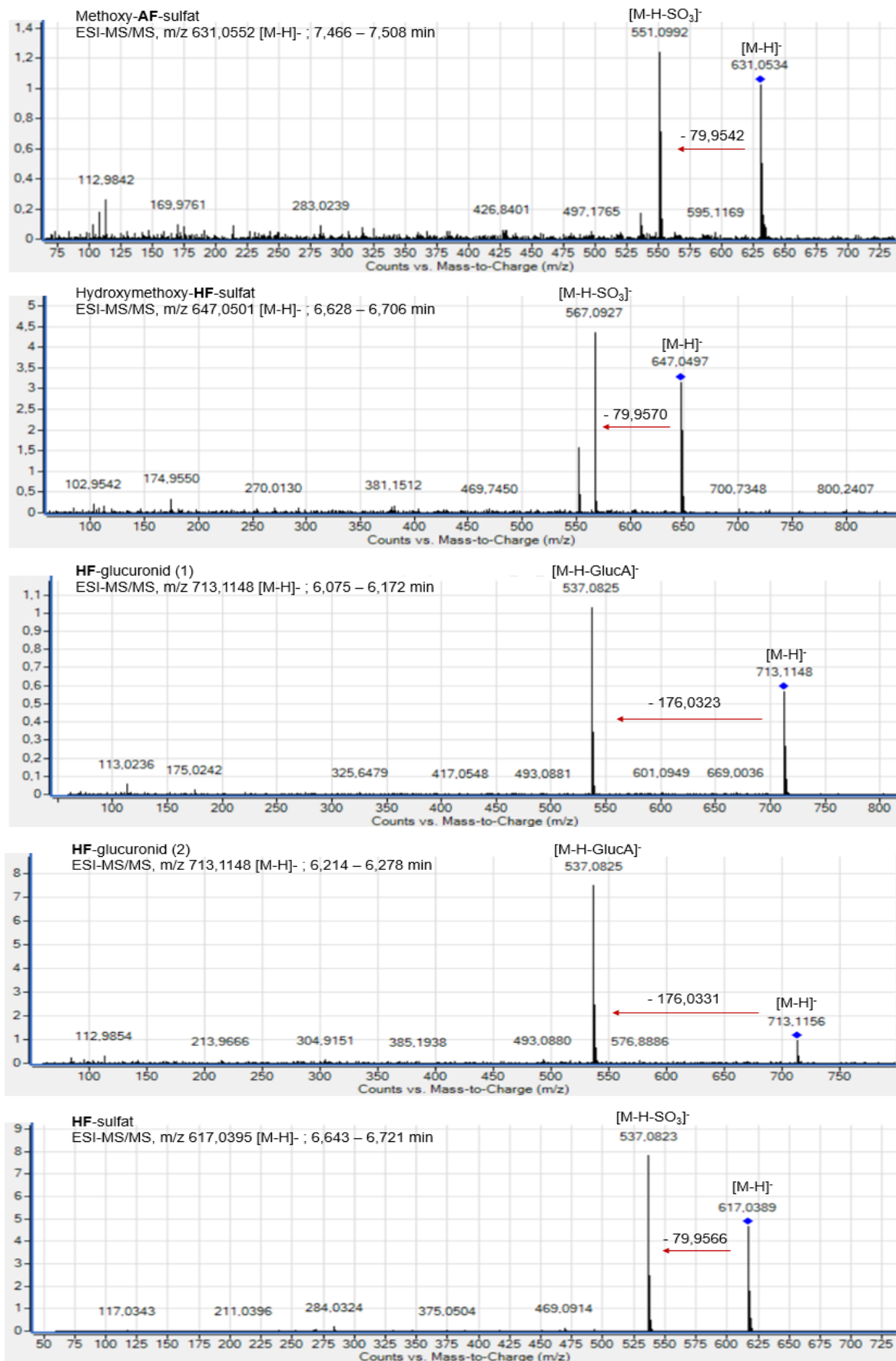


Abbildung 72: Identifizierung der gebildeten Phase II Metaboliten der Biflavonoide AF und HF mittels UHPLC-DAD-MS/MS; abgebildet sind die jeweiligen MS/MS-Spektren der extrahierten Massen der Metaboliten zur jeweiligen Retentionszeit; **Neutralverlust** (inkl. Masse): rote Pfeile, **GlucA:** Glucuronyl-, **SO₃:** Sulfat-.

3.2.3 Zusammenfassung und Diskussion

Die drei Biflavonoide **AF**, **BA** und **HF** zeigten im *in vitro* Caco-2-Metabolisierungsversuch signifikante Unterschiede in Bezug auf Metabolisierungsraten und -reaktionen. Während **AF** und **HF** sehr stark von verschiedenen Phase I und II Enzymen umgesetzt wurden, konnten für **BA** kaum Metaboliten detektiert werden. Die Strukturen aller drei Biflavonoide bestehen aus zwei Apigenin-Einheiten, die im Fall von **AF** und **BA** an Position 3' und 8'' bzw. 3 und 8'' C-C-verknüpft und bei **HF** an Position 4' und 6'' C-O-verknüpft sind (**Abbildung 73**).

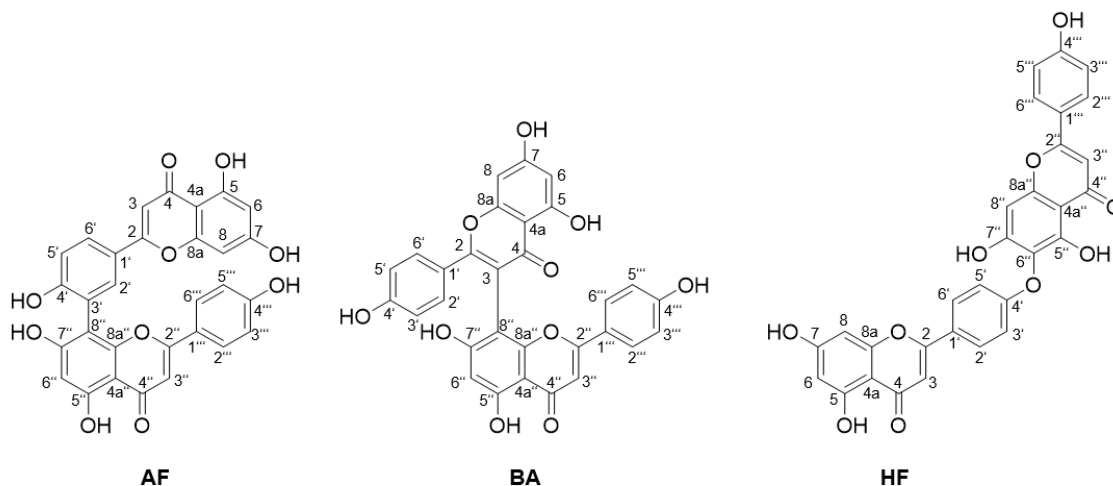


Abbildung 73: Strukturen und Bezifferung von **AF**, **BA** und **HF**.

Beim Vergleich von **AF** und **BA** lässt sich feststellen, dass für **AF** einige hydroxylierte, hydrierte, methylierte oder sulfatierte Metaboliten identifiziert werden konnten, während für **BA** lediglich ein hydrierter und zwei hydrierte Mono-glucuronide detektiert werden konnten. Obwohl beide aus denselben Untereinheiten aufgebaut sind, scheint die Position der C-C-Verknüpfung großen Einfluss auf die Metabolisierung der Substanzen zu haben. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die unterschiedliche Drehbarkeit der C-C-Bindung zwischen den beiden Apigenin-Einheiten und die damit verbundenen sterischen Unterschiede der beiden Verbindungen. Während die C3'-C8''-Bindung bei **AF** frei drehbar scheint, behindern sich die Apigenin-Einheiten bei **BA** so, dass keine vollständige Drehung möglich ist (vgl. **Abbildung 74**). **HF**, das im Vergleich zu den anderen beiden Verbindungen aus zwei C-O-verknüpften Apigenin Molekülen besteht, scheint am stärksten metabolisiert zu werden. Neben vielen hydroxylierten und methylierten Metaboliten, konnten für **HF** auch zwei mono-glucuronidierte und ein mono-sulfatierter Metaboliten detektiert werden. **HF** scheint im Vergleich zu **AF** und **BA** keinerlei sterische Hinderung zu erfahren und kann somit ohne Probleme von Phase I und II Enzymen aufgenommen und umgesetzt werden.

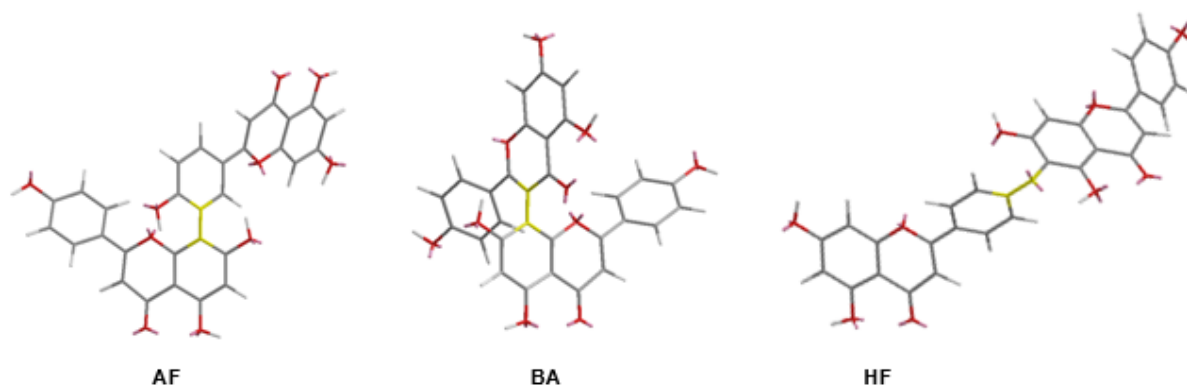


Abbildung 74: 3D Strukturen von AF, BA und HF berechnet mit Chem3D 17.0.

Für **AF** konnten zwei unterschiedliche hydroxylierte, zwei methylierte und ein gemischt hydroxylierter und methylierter Metabolit identifiziert werden. Außerdem wurde ein hydrierter und ein mono-sulfatiertes Methoxy-**AF** detektiert. Wang et al. konnten im Caco-2-Monolayer Modell insgesamt 8 Metabolite von **AF** identifizieren²⁵⁷, von denen einige mit den oben beschriebenen Metaboliten übereinstimmen. Lediglich das sulfatierte Methoxy-**AF** wurde nicht gefunden, dafür konnte ein weiteres hydroxyliertes und ein mono-glucuronidiertes **AF** detektiert werden²⁵⁷. Auch bei Gan et al. konnte ein mono-glucuronidiertes **AF** erfasst werden²⁵⁸, welches hier nicht als Metabolit identifiziert werden konnte. Bei **BA** konnte lediglich ein hydrierter sowie zwei hydrierte und zusätzlich noch mono-glucuronidierte Metaboliten detektiert werden. Für **BA** liegen nach Literaturrecherche bisher in Bezug auf den Metabolismus in Caco-2-Zellen keine Erkenntnisse vor, was möglicherweise der geringen Metabolisierungsrate geschuldet ist. Für das Biflavonoid **HF** konnten ein hydroxylierter und fünf methylierte **HF** mit unterschiedlichen Retentionszeiten detektiert werden. Außerdem wurden drei gemischte Hydroxymethoxy-**HF**, ein mono-sulfatierter und zwei mono-glucuronidierte Metaboliten identifiziert. Nach Literaturrecherche liegen für die gefundenen Metaboliten von **HF** keine Erkenntnisse in Bezug auf die *in vitro* Caco-2-Metabolisierung vor. Chen et al. haben lediglich die *in vitro* Metabolisierung von **HF** in Lebermikrosomen von Ratten getestet, bei der auch 5 unterschiedliche methylierte, hydroxylierte und ein mono-glucuronidiertes **HF** identifiziert wurden²⁵⁹. Zusätzlich konnten noch diverse Spaltprodukte und Apigenin-Konjugate detektiert werden, die bei der *in vitro* Caco-2-Metabolisierung in dieser Arbeit nicht erfasst werden konnten.

Da alle drei getesteten Biflavonoide aus zwei verknüpften Apigenin Molekülen bestehen, sollten die durch Caco-2-Metabolisierung erhaltenen Ergebnisse von **AF**, **BA** und **HF** mit den für Apigenin beschriebenen Metaboliten verglichen werden. Für Apigenin konnten in früheren Arbeiten Apigenin-sulfate und Apigenin-glucuronide im Caco-2-Modell gefunden werden^{234,260}. Ansonsten ist die Datenlage zur Metabolisierung von Apigenin im Caco-2-Monolayer Modell

gering, lediglich zur *in vitro* Metabolisierung in subzellulären Leberfraktionen wurde eine Arbeit von Gradolatto et al. veröffentlicht¹⁸⁹. Dabei konnten drei hydroxylierte, drei monoglucuronidierte und ein mono-sulfatierter Metabolit von Apigenin identifiziert werden. Apigenin scheint eine hohe Metabolisierungsrate zu haben und Substrat vieler Phase I und II Enzyme zu sein. Bei der Metabolisierung in Caco-2-Zellen von **AF** und **BA** ist kaum Übereinstimmung zu der Umsetzung von Apigenin zu erkennen. Lediglich **HF** scheint ein ähnliches Metabolit-Profil wie Apigenin aufzuweisen. Eine mögliche Erklärung dafür ist die gestreckte Struktur von **HF**, die dazu führen könnte, dass es ähnlich wie Apigenin in den aktiven Zentren der Enzyme binden kann und somit wie Apigenin umgesetzt wird.

Der Großteil der Metaboliten von **AF**, **BA** und **HF** wurde im apikalen Kompartiment detektiert. Lediglich die Testsubstanzen selbst und zwei Phase II Metaboliten von **HF**, ein Mono-Sulfat und ein Mono-Glucuronid, wurden auch im basolateralen Kompartiment und im Zelllysat nachgewiesen. Da für Flavonoide bereits eine Beteiligung von Effluxtransportern im Dünndarmepithel beschrieben ist⁷¹, wäre denkbar, dass auch Biflavonoide und deren Metaboliten vom Zellinneren zurück in das Darmlumen transportiert werden. Für Apigenin, dem Monomer, der hier untersuchten Biflavonoide, ist beschrieben, dass Caco-2-Zellen glucuronidierte und sulfatierte Metaboliten mittels MRPs und organischen Anionentransportern (OATs) ausscheiden²³⁴. Apigenin selbst scheint nicht aktiv durch Transportmechanismen ausgeschieden zu werden, sondern durch reine Diffusion absorbiert zu werden²⁶¹. Von Wang et al. wurde erst kürzlich veröffentlicht, dass auch beim Transport von **AF** keinerlei Beteiligung von P-GP, MRPs und BCRP festgestellt werden konnte²⁵⁷. Es wurde stattdessen passive Diffusion in Kombination mit Clathrin-vermittelter Endozytose als Transportmechanismus postuliert. Dies lässt darauf schließen, dass die Biflavonoide vermutlich durch passive Diffusion transportiert werden, während bei den hydrophilen Konjugaten der Testsubstanzen eine Beteiligung von Effluxtransportern wahrscheinlich ist.

In **Abbildung 70** (siehe **3.2.2.1**) ist deutlich zu erkennen, dass sowohl **HF** als auch das mono-sulfatierte **HF** in durch HPLC-DAD detektierbaren Mengen in allen drei Kompartimenten des Caco-2-Modells zu finden sind. Huang et al. haben postuliert, dass Sulfatierung bei niedrigeren Substratkonzentrationen dominiert, wobei Glucuronidierung die bevorzugte Metabolisierungsreaktion bei hohen Konzentrationen darstellt⁸⁴. Zu erklären ist dies damit, dass UGTs und SULTs gleichermaßen in Leber und Darm exprimiert werden und beide die Hydroxy-Gruppen von Flavonoiden erkennen. Dadurch entsteht ein kompetitiver Metabolismus wenn Flavonoide in die Enterozyten oder Hepatozyten gelangen⁷¹. Da SULTs normalerweise hohe Substrataffinitäten aufweisen (kleiner K_m -Wert, kleine V_{max}), während UGTs hohe Kapazitäten haben (hoher K_m -Wert, hohe V_{max}), werden Substrate zuerst zu Sulfaten umgesetzt, bis die SULTs gesättigt sind⁸⁴. Damit ist zu erklären, dass das mono-sulfatierte **HF** hier als Hauptmetabolit detektiert werden konnte. Auffällig ist auch, dass der

sulfatierte Metabolit hauptsächlich im apikalen Kompartiment gefunden wurde, während im basolateralen Kompartiment die geringste Menge zu finden war. Hu et. al konnten zeigen, dass bei niedrigen Apigeninkonzentrationen (bis 40 μM) vermehrt sulfatiertes Apigenin auf der apikalen Seite ausgeschieden wird. Bei höheren apikal applizierten Konzentrationen wurden vermehrt Glucuronidierungen und eine Sättigung des MRP2 durch die Sulfate beobachtet. Dies wiederum führte zum Transport in das basolaterale Kompartiment sowohl für glucuronidiertes als auch für sulfatiertes Apigenin.²³⁴ Dies ist auch eine mögliche Erklärung dafür, dass sowohl mono-sulfatiertes als auch mono-glucuronidiertes **HF** in allen drei Kompartimenten gefunden wurde, wobei das Sulfat in deutlich höherer Konzentration detektiert wurde. Vermutlich ist **HF**-sulfat bis zur Sättigung gebildet worden, um anschließend über Transporter aus den Caco-2-Zellen transportiert zu werden. Daraufhin wurde auch **HF**-glucuronid gebildet, so dass sowohl sulfatierte als auch glucuronidierte Metaboliten basolateral detektiert werden konnten. Die Sättigung des SULT-Systems bei höheren Flavonoidkonzentrationen ist vermutlich auch die Erklärung dafür, dass im Blut mehr Glucuronide als Sulfate gefunden werden⁶³.

Aussagen zur Konjugationsposition der detektierten Metaboliten können in dieser Arbeit nur wenige getroffen werden, da lediglich vom mono-sulfatierten **HF** eine ausreichende Menge enthalten war, um ein UV-Spektrum zu erhalten. Im Vergleich zum **HF** ist eine geringe bathochrome Verschiebung von Bande I um 2 nm von 337 nm auf 339 nm zu erkennen. Barron et al. haben bei Sulfatierung von Apigenin in Position 4' (hier auch 4'') eine deutlich größere bathochrome Verschiebung von Bande I detektiert als in Position 7 (hier auch 7'')²¹⁷. Da es sich hier nur um eine sehr geringe Verschiebung des UV-Maximums handelt, ist es wahrscheinlicher, dass die Sulfat-Einheit in Position 7 oder 7'' von **HF** konjugiert ist. Außerdem scheint nach Wu et al. für Flavone die Sulfatierung in Position 7 deutlich häufiger zu sein als in Position 4' ⁸². Die fünf verschiedenen methylierten **HF** sind vermutlich an je eine der fünf freien Hydroxy-Gruppen von **HF** gebunden, können aber nicht exakt zugeordnet werden. Zu den anderen Konjugaten von **HF** konnte leider keine Aussage getroffen werden. Auch Chen et al. konnten trotz ausführlicher MS/MS-Fragmentierungsmuster keine genaue Aussage zu den Konjugationspositionen treffen²⁵⁹. Auch für **AF** und **BA** konnten hier keine Metabolisierungspositionen postuliert werden. Wang et al. haben jedoch erst kürzlich durch das Caco-2-Modell gebildete Konjugate von **AF** mit zugehörigen Konjugationspositionen auf der Grundlage von MS/MS-Fragmentierungsmustern veröffentlicht. Dabei wurden drei hydroxylierte **AF** in Position 3', 3 oder 5', ein gemischtes Hydroxymethoxy-**AF** mit OH-Gruppe in Position 5' und Methoxy-Gruppe in Position 4' und zwei mono-methylierte Konjugate mit Methoxy-Gruppe in Position 7'' oder 4' identifiziert. Außerdem wurde ein 2,3-dehydro-**AF** und ein mono-glucuronidierter Metabolit detektiert, wobei bei dem Glucuronid keine Konjugationsposition bestimmt werden konnte.²⁵⁷ Da die gefundenen Konjugate von Wang et

al. große Übereinstimmung zu den hier gefundenen Metaboliten haben, könnten auch die Konjugationspositionen übereinstimmen.

Betrachtet man die Kenntnisse zum Metabolismus von Flavonoiden *in vivo*, lässt sich zusammenfassen, dass bei monomeren Flavonoiden hauptsächlich Glucuronide eine Rolle spielen, da diese sowohl in Ratten²⁶² als auch bei Menschen^{263–265} vielfältig im Plasma nachgewiesen werden konnten. Sulfate scheinen hingegen bereits frühzeitig zurück in das Dünndarmlumen transportiert und anschließend über den Fäces ausgeschieden zu werden. Die Datenlage zur *in vivo* Metabolisierung von Biflavonoiden ist im Vergleich dazu lückenhaft. Von Wang et al. wurde erst kürzlich eine Studie veröffentlicht, bei der Konjugate von **AF** im Plasma, Urin, Fäces und in der Galle von Ratten identifiziert wurden. Dabei wurden in der Galle hauptsächlich Sulfate und Glucuronide, aber auch gemischte Glucuronid-Sulfate und Glucose-Konjugate gefunden. Im Fäces wurden überwiegend hydroxylierte oder methylierte Konjugate identifiziert, während im Plasma keine Metaboliten detektiert werden konnten. Im Urin wurden die meisten Metaboliten gefunden, wobei es sich hier hauptsächlich um Spaltprodukte von **AF** oder das Monomer Apigenin handelte, die anschließend durch weitere Metabolisierungsreaktionen konjugiert wurden.²⁶⁶ Auch von Chen et al. wurden für **HF** ähnliche Daten zur *in vivo* Metabolisierung in Ratten veröffentlicht. Dabei wurden Metabolite von **HF** im Plasma, Urin, Fäces und in der Galle via UHPLC-MS/MS detektiert. Wie bereits für **AF** beschrieben, wurden im Fäces überwiegend hydroxylierte und methylierte Konjugate gefunden. In Plasma, Urin und Galle konnte hingegen hauptsächlich Phase I und II Metabolite des bei der C-O-Bindung zwischen C-6“ und O-4‘ gespaltenen **HF** beobachtet werden. Glucuronidiertes **HF** wurde in keiner der vier Proben detektiert.²⁶⁰ Entgegen der für monomere Flavonoide beschriebenen *in vivo* Metabolisierung, können bei Biflavonoiden kaum Konjugate im Plasma nachgewiesen werden. Außerdem spielen Glucuronide eine eher untergeordnete Rolle, während viele konjugierte Monomere bzw. Spaltprodukte detektiert werden können. Da bisher aber nur sehr wenige Studien zur *in vivo* Metabolisierung von Biflavonoiden veröffentlicht wurden, sind die Ergebnisse kritisch zu betrachten und sollten weitergehend untersucht werden.

Sowohl die Datenlage zur *in vitro* als auch zur *in vivo* Metabolisierung von Biflavonoiden ist noch sehr gering, weswegen noch keine endgültigen Aussagen zum Metabolitprofil von **AF**, **BA** und **HF** getroffen werden können. Unterschiede zu vergangenen oder zukünftigen Arbeiten können eine Vielzahl von Gründen haben. Dazu zählen beispielsweise die Verwendung von unterschiedlichen Caco-2-Klonen, wie dem Caco-2 TC-7 Klon, oder von verschiedenen Passagenzahlen der Zellen. Außerdem spielt die Inkubationszeit und der pH-Wert der eingesetzten Pufferlösung für die Umsetzungsrate der Enzyme eine entscheidende Rolle.

4 ZUSAMMENFASSUNG

Flavonoide kommen in vielen Pflanzengattungen vor und gehören zu den am besten untersuchten sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Durch zahlreiche Modifikationen des Grundgerüsts können Flavonoide in Pflanzen als Aglyka, O- oder C-glykosylierte Derivate oder Biflavonoide vorkommen. Flavonoid C-Glykoside stellen eine wichtige Unterklasse der Flavonoide dar, die sich aufgrund ihrer hydrolytischen Stabilität im Vergleich zu den strukturverwandten O-Glykosiden unterscheiden und aktuell immer größere Aufmerksamkeit erfahren. Die Datenlage zur Absorption und Metabolisierung ist bisher unzureichend und sollte deshalb in dieser Arbeit für sechs prominente Vertreter dieser Stoffklasse untersucht werden. Außerdem sollte ergänzend die Metabolisierung von drei Biflavonoiden erforscht werden.

Zur Ermittlung der Bioverfügbarkeit wurden die sechs C-Glykoside Orientin, Isoorientin, Vitexin, Isovitexin, Schaftosid und Isoschaftosid in einem Caco-2 Assay hinsichtlich ihrer Permeabilität untersucht. Die bidirektionalen Permeabilitätskoeffizienten wurden bestimmt und zeigten für alle Testsubstanzen eine moderate bis geringe Absorption. Da die Werte einen Transport der Substanzen aus der Zelle in das Darmlumen suggerierten, wurde zusätzlich der Einfluss von ABC-Transportern auf die Absorption untersucht. Dabei konnte für Orientin und Schaftosid ein durch P-GP vermittelter Efflux verifiziert werden.

Zusätzlich wurden dieselben sechs C-Glykoside in einem Caco-2 Assay unter Verwendung von zwei Inkubationszeiten und Konzentrationen hinsichtlich ihrer *in vitro* Metabolisierung im Dünndarmepithel in einem UHPLC-DAD-MS Screening untersucht. Für Orientin, Isoorientin und Isovitexin konnte eine große Bandbreite an Phase I und II Metaboliten identifiziert werden, während für Vitexin, Schaftosid und Isoschaftosid lediglich einige Phase I Metabolite detektiert wurden. Außerdem konnten erstmals auch Metaboliten der zugehörigen Aglyka von Orientin, Isoorientin und Isovitexin identifiziert werden, was ein Hinweis darauf ist, dass Caco-2-Zellen die Fähigkeit besitzen C-C-Bindungen zu spalten. Sowohl die Inkubationszeit als auch die Konzentration hatte nur geringfügigen Einfluss auf das Metabolit-Profil der Testsubstanzen.

Ergänzend sollte zusätzlich die *in vitro* Metabolisierung in der Leber unter Verwendung von zwei subzellulären Leberfraktionen ermittelt werden. Beim Versuch mit HLM konnten für Orientin, Isoorientin, Vitexin und Isovitexin zahlreiche mono-glucuronidierte Konjugate detektiert werden, während für Schaftosid und Isoschaftosid keine Metabolite gefunden wurden. Dieselben Glucuronide konnten ebenfalls beim Versuch mit humaner S9F detektiert werden. Zusätzlich konnten für alle Testsubstanzen mit Ausnahme von Vitexin hydroxylierte und für Orientin und Isoorientin sogar sulfatierte Metaboliten identifiziert werden.

Zwei der glucuronidierten Metaboliten von Isoorientin konnten durch Optimierung und Upscaling des HLM Versuchs isoliert und mittels NMR Spektroskopie aufgeklärt werden.

Darauf basierend konnten mithilfe von UV-Maxima und Retentionszeiten Aussagen zu den Konjugationspositionen der Hauptmetaboliten postuliert werden.

Analog zu den Flavonoid C-Glykosiden, wurde auch die *in vitro* Metabolisierung von drei Biflavonoiden in einem Caco-2 Assay untersucht. Während für I3,I18-Biapigenin kaum Metabolite detektiert wurden, konnte für Amentoflavon und vor allem für Hinokiflavon ein breites Spektrum an Phase I und II Metaboliten identifiziert werden.

5 SUMMARY

Flavonoids occur in many plants species and are some of the best-studied secondary plant ingredients. Through numerous modifications of the basic structure, flavonoids can be found in plants as aglyca, O- or C-glycosylated derivatives or biflavonoids. Flavonoid C-glycosides represent an important subclass of the flavonoids, which differ from the structurally related O-glycosides due to their hydrolytic stability and are currently receiving more and more attention. The available data on absorption and metabolism are so far inadequate and should therefore be examined in this work for six prominent representatives of this substance class. In addition, the metabolism of three biflavonoids should be investigated.

To determine the bioavailability, the six C-glycosides orientin, isoorientin, vitexin, isovitexin, schaftoside and isoschaftoside were examined in a Caco-2 model with regard to their permeability. The bidirectional permeability coefficient was determined and showed moderate to poor absorption for all test substances. Since the values suggested a transport of the substances from the cell into the intestinal lumen, the influence of ABC transporters on the absorption was also investigated. An efflux mediated by P-GP could be verified for orientin and schaftoside.

In addition, the same six C-glycosides were examined in a Caco-2 assay using two incubation times and concentrations with regard to their *in vitro* metabolism in the small intestinal epithelium in an UHPLC-DAD-MS screening. A wide range of phase I and II metabolites could be identified for orientin, isoorientin and isovitexin, while only a few phase I metabolites could be detected for vitexin, schaftoside and isoschaftoside. Furthermore, metabolites of the associated aglyca of orientin, isoorientin and isovitexin could also be identified for the first time, which is an indication that Caco-2 cells have the ability to cleave C-C bonds. Both the incubation time and the concentration had only a minor influence on the metabolite profile of the test substances.

Additionally, the *in vitro* metabolism in the liver should be determined using two subcellular liver fractions. In the HLM experiment, numerous mono-glucuronidated conjugates were detected for orientin, isoorientin, vitexin and isovitexin, while no metabolites were found for schaftoside and isoschaftoside. The same glucuronides could also be detected in the experiment with human S9F. In addition, hydroxylated metabolites were identified for all test substances with the exception of vitexin and even sulfated metabolites could be found for orientin and isoorientin.

Two of the glucuronidated metabolites of isoorientin could be isolated by optimizing and upscaling the HLM experiment and structure elucidation could be performed applying NMR

spectroscopy. Based on this, statements about the conjugation positions of the main metabolites were postulated with additional use of UV maxima and retention times.

Analogous to the flavonoid C-glycosides, the *in vitro* metabolism of three biflavonoids was also investigated in a Caco-2 assay. While hardly any metabolites were detected for I3,I18-biapigenin, a broad spectrum of phase I and II metabolites was identified for amentoflavone and especially for hinokiflavone.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
%	Prozent
1D	Ein-dimensional
¹ H	Wasserstoff-Isotop mit einem Neutron
¹³ C	Kohlenstoff-Isotop mit 13 Neutronen
2D	Zwei-Dimensional
7-EC	7-Ethoxycumarin
7-HC	7-Hydroxycumarin
δ	Chemische Verschiebung
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
Å	Ångström
A	apikal
ABC	ATP-bindende Kasette
AF	Amentoflavon
Ala	Alamethicin
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
API	Atmospheric Pressure Ionization
ATCC	American Type Culture Collection
B	Basolateral
BA	I3,I18-Biapigenin
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
bzw.	beziehungsweise
Caco-2	Human Caucasian Colon Adenocarcinoma Cell Line-2
CH	Schweiz
CI	Chemische Ionisierung
Cof	Cofaktoren
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
COSY	Correlated Spectroscopy
CYP(450)	Cytochrom P450 Enzyme
d	Dublett
DAD	Diodenarray-Detektor

dd	Dublett vom Dublett
DE	Deutschland
cm	Zentimeter
DIMS	Direct Injection Mass Spectrometry
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronen Ionisation
ESI	Electrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FM	Fließmittel
FR	Frankreich
FTICR	Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry
FTMS	Fourier-Transform Mas Spectrometry
g	Gramm
(O-)G	Glucuronid
Glc-6P	Glucose-6-phosphat
Glc-6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GlucA	Glucuronsäure
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCOOH	Ameisensäure
HF	Hinokiflavon
HLM	Humane Lebermikrosomen
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IO	Isoorientin
IS	Isoschaftosid
IV	Isovitexin
IZ	Inkubationszeit
J	Kopplungskonstante
JP	Japan

K	Kelvin
Konj. Pos.	Konjugationsposition
L	Liter
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LM	Lösungsmittelkontrolle
M	Molar
m	Multiplett
m/V	Masse/Volumen
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
Matrix	Matrixkontrolle
mAU	Milli Absorption Units
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
mL	Milliliter
MRP2	Multidrug Resistance-associated Protein 2
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
n.d.	nicht detektiert
n.u.	nicht untersucht
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAT	Noradrenalin-Transporter
NEA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement/Effect
O	Orientin
OAT	Organo-Anionen-Transporter
p.a.	pro analysis
P_{app}	Scheinbarer Permeabilitätskoeffizient
PAs	Proanthocyanidine
PBS	Phosphatpuffer
P-GP	P-Glykoprotein

Ph I	Phase I
Ph II	Phase II
ppm	parts per million
RP-18	Umkehrphase; Kieselgel modifiziert mit Octadecylgruppen
RT	Retentionszeit
Q	Quadrupol
Q-TOF	Quadrupol-Time of flight
s	Singulett
S	Schaftosid
(O-)S	Sulfat
S9F	Leber S9 Fraktion
StabW	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Stabi	Stabilitätskontrolle
SULT	Sulfotransferase
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time of flight
U/min	Umdrehungen pro Minute
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UDPGA	Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure
UGT	UDP Glucuronosyltransferase
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
UK	Vereinigtes Königreich
UV	Ultraviolett
V	Vitexin
w/o	without
Z	Zellysat

7 LITERATUR

- (1) Sticher, O.; Heilmann, J.; Zündorf, I. *Pharmakognosie - Phytopharmazie*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart, 2015.
- (2) Andersen, Ø. M.; Markham, K. R. *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*; CRC Taylor & Francis: Boca Raton, Fla., 2006.
- (3) Kumar, S.; Pandey, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids. An overview. *The Scientific World Journal* **2013**, 162750.
- (4) Maeda, H.; Dudareva, N. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology* **2012**, 63, 73–105.
- (5) Nikolau, B. J.; Ohlrogge, J. B.; Wurtele, E. S. Plant biotin-containing carboxylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2003**, 414, 211–222.
- (6) Winkel-Shirley, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **2001**, 126, 485–493.
- (7) Casas, M. I.; Duarte, S.; Doseff, A. I.; Grotewold, E. Flavone-rich maize. An opportunity to improve the nutritional value of an important commodity crop. *Frontiers in plant science* **2014**, 5, 440, 1-11.
- (8) Brazier-Hicks, M.; Evans, K. M.; Gershater, M. C.; Puschmann, H.; Steel, P. G.; Edwards, R. The C-glycosylation of flavonoids in cereals. *The Journal of Biological Chemistry* **2009**, 284, 17926–17934.
- (9) Cavaliere, C.; Foglia, P.; Pastorini, E.; Samperi, R.; Laganà, A. Identification and mass spectrometric characterization of glycosylated flavonoids in *Triticum durum* plants by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, 19, 3143–3158.
- (10) Wang, J.; Yue, Y.-d.; Jiang, H.; Tang, F. Rapid screening for flavone C-glycosides in the leaves of different species of bamboo and simultaneous quantitation of four marker compounds by HPLC-UV/DAD. *International Journal of Analytical Chemistry* **2012**, 2012, 205101.
- (11) Xu, Y.; Li, Y.; Maffucci, K. G.; Huang, L.; Zeng, R. Analytical methods of phytochemicals from the genus *Gentiana*. *Molecules* **2017**, 22, 2080.
- (12) Zeraik, M. L.; Yariwake, J. H.; Wauters, J.-N.; Tits, M.; Angenot, L. Analysis of passion fruit rinds (*Passiflora edulis*). Isoorientin quantification by HPTLC and evaluation of antioxidant (radical scavenging) capacity. *Química Nova* **2012**, 35, 541–545.
- (13) Hirade, Y.; Kotoku, N.; Terasaka, K.; Saijo-Hamano, Y.; Fukumoto, A.; Mizukami, H. Identification and functional analysis of 2-hydroxyflavanone C-glucosyltransferase in soybean (*Glycine max*). *FEBS Letters* **2015**, 589, 1778–1786.
- (14) Nagatomo, Y.; Usui, S.; Ito, T.; Kato, A.; Shimosaka, M.; Taguchi, G. Purification, molecular cloning and functional characterization of flavonoid C-glucosyltransferases from

- Fagopyrum esculentum* M. (buckwheat) cotyledon. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* **2014**, 80, 437–448.
- (15) Du, Y.; Chu, H.; Chu, I. K.; Lo, C. CYP93G2 is a flavanone 2-hydroxylase required for C-glycosylflavone biosynthesis in rice. *Plant Physiology* **2010**, 154, 324–333.
- (16) Sasaki, N.; Nishizaki, Y.; Yamada, E.; Tatsuzawa, F.; Nakatsuka, T.; Takahashi, H.; Nishihara, M. Identification of the glucosyltransferase that mediates direct flavone C-glucosylation in *Gentiana triflora*. *FEBS Letters* **2015**, 589, 182–187.
- (17) Vanegas, K. G.; Larsen, A. B.; Eichenberger, M.; Fischer, D.; Mortensen, U. H.; Naesby, M. Indirect and direct routes to C-glycosylated flavones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories* **2018**, 17, 107.
- (18) Hao, B.; Caulfield, J. C.; Hamilton, M. L.; Pickett, J. A.; Midega, C. A. O.; Khan, Z. R.; Wang, J. R.; Hooper, A. M. The biosynthesis of allelopathic di-C-glycosylflavones from the roots of *Desmodium incanum* (G. Mey.) DC. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2015**, 13, 11663–11673.
- (19) Hamilton, M. L.; Caulfield, J. C.; Pickett, J. A.; Hooper, A. M. C-Glucosylflavonoid biosynthesis from 2-hydroxynaringenin by *Desmodium uncinatum* (Jacq.) (Fabaceae). *Tetrahedron Letters* **2009**, 50, 5656–5659.
- (20) Hao, B.; Caulfield, J. C.; Hamilton, M. L.; Pickett, J. A.; Midega, C. A. O.; Khan, Z. R.; Wang, J.; Hooper, A. M. Biosynthesis of natural and novel C-glycosylflavones utilising recombinant *Oryza sativa* C-glycosyltransferase (OsCGT) and *Desmodium incanum* root proteins. *Phytochemistry* **2016**, 125, 73–87.
- (21) Gontijo, V. S.; Dos Santos, M. H.; Viegas, C. Biological and chemical aspects of natural biflavonoids from plants. A brief review. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2017**, 17, 834–862.
- (22) Gontijo, V. S.; Souza, T. C. de; Rosa, I. A.; Soares, M. G.; da Silva, M. A.; Vilegas, W.; Viegas, C.; Dos Santos, M. H. Isolation and evaluation of the antioxidant activity of phenolic constituents of the *Garcinia brasiliensis* epicarp. *Food Chemistry* **2012**, 132, 1230–1235.
- (23) Tabares-Guevara, J. H.; Lara-Guzmán, O. J.; Londoño-Londoño, J. A.; Sierra, J. A.; León-Varela, Y. M.; Álvarez-Quintero, R. M.; Osorio, E. J.; Ramirez-Pineda, J. R. Natural biflavonoids modulate macrophage-oxidized LDL interaction in vitro and promote atheroprotection in vivo. *Frontiers in Immunology* **2017**, 8, 923.
- (24) Singh, B.; Kaur, P.; Gopichand; Singh, R. D.; Ahuja, P. S. Biology and chemistry of *Ginkgo biloba*. *Fitoterapia* **2008**, 79, 401–418.
- (25) Siddiqui, J. A.; Swarnkar, G.; Sharan, K.; Chakravarti, B.; Sharma, G.; Rawat, P.; Kumar, M.; Khan, F. M.; Pierroz, D.; Maurya, R.; Chattopadhyay, N. 8,8"-Biapigeninyl stimulates osteoblast functions and inhibits osteoclast and adipocyte functions. Osteoprotective action

- of 8,8"-biapigeninyl in ovariectomized mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* **2010**, 323, 256–267.
- (26) Weniger, B.; Vonthron-Sénécheau, C.; Kaiser, M.; Brun, R.; Anton, R. Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and antitrypanosomal activities of several biflavonoids. *Phytomedicine* **2006**, 13, 176–180.
- (27) Harborne, J. B.; Marby, H.; Marby, T. J. *The Flavonoids*; Springer: New York, NY, 2013.
- (28) Rowe, J. W. *Natural Products of Woody Plants. Chemicals Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1989.
- (29) Harborne, J. B.; Mabry, T. J., Eds. *The Flavonoids. Advances in Research*; Springer US: Boston, MA, s.l., 1982.
- (30) Shen, Z.; Falshaw, C. P.; Haslam, E.; Begley, M. J. A novel spiro-biflavonoid from *Larix gmelini*. *Journal of the Chemical Society* **1985**, 1135.
- (31) Kolodziej, H. 2',2'-(+)-Catechin-(+)-taxifolin, prototype of a novel biflavonoid class and oligomeric proyanidins from commercial willow bark. *Planta Medica* **1988**, 54, 558–559.
- (32) Botha, J. J.; Ferreira, D.; Roux, D. G. Synthesis of condensed tannins. Part 4. A direct biomimetic approach to [4,6]- and [4,8]-biflavanoids. *Journal of the Chemical Society* **1981**, 1235–1245.
- (33) Delcour, J. A.; Ferreira, D.; Roux, D. G. Synthesis of condensed tannins. Part 9. The condensation sequence of leucocyanidin with (+)-catechin and with the resultant procyanidins. *Journal of the Chemical Society* **1983**, 1711–1717.
- (34) He, F.; Pan, Q.-H.; Shi, Y.; Duan, C.-Q. Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. *Molecules* **2008**, 13, 2674–2703.
- (35) Petit, P.; Granier, T.; d'Estaintot, B. L.; Manigand, C.; Bathany, K.; Schmitter, J.-M.; Lauvergeat, V.; Hamdi, S.; Gallois, B. Crystal structure of grape dihydroflavonol 4-reductase, a key enzyme in flavonoid biosynthesis. *Journal of Molecular Biology* **2007**, 368, 1345–1357.
- (36) Hemingway, R. W.; Laks, P. E. Condensed tannins. A proposed route to 2R,3R-(2,3-cis)-proanthocyanidins. *Journal of the Chemical Society* **1985**, 746–747.
- (37) Dixon, R. A.; Xie, D.-Y.; Sharma, S. B. Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research? *The New Phytologist* **2005**, 165, 9–28.
- (38) Barton, D., Ed. *Comprehensive natural products chemistry*; Elsevier: Amsterdam u.a., 1999.
- (39) Zhao, B. *Structure/Function studies of cytochrome P450 158A1 from Streptomyces Coelicolor A3(2)*, 2007.
- (40) Zhao, B.; Bellamine, A.; Lei, L.; Waterman, M. R. The role of Ile87 of CYP158A2 in oxidative coupling reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2012**, 518, 127–132.

- (41) Zhao, B.; Guengerich, F. P.; Voehler, M.; Waterman, M. R. Role of active site water molecules and substrate hydroxyl groups in oxygen activation by cytochrome P450 15A2. A new mechanism of proton transfer. *The Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 42188–42197.
- (42) Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Menzel, S. *Mutschler Arzneimittelwirkungen. Pharmakologie - Klinische Pharmakologie - Toxikologie mit 316 Tabellen und ca. 1400 Strukturformeln*, 2020.
- (43) Derendorf, H. *Pharmakokinetik kompakt. Grundlagen und Praxisrelevanz mit 29 Tabellen*; Wiss. Verl.-Ges: Stuttgart, 2011.
- (44) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *23*, 3–25.
- (45) Ghose, A. K.; Viswanadhan, V. N.; Wendoloski, J. J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of Combinatorial Chemistry* **1999**, *1*, 55–68.
- (46) Veber, D. F.; Johnson, S. R.; Cheng, H.-Y.; Smith, B. R.; Ward, K. W.; Kopple, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 2615–2623.
- (47) Brandes, R.; Lang, F.; Schmidt, R. F. *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*, 2019.
- (48) Ernst, B.; Vögtli, A. *Moderne Pharmakokinetik*; John Wiley & Sons: Hoboken, 2012.
- (49) Perez-Vizcaino, F.; Duarte, J.; Santos-Buelga, C. The flavonoid paradox. Conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2012**, *92*, 1822–1825.
- (50) van de Waterbeemd, H. The fundamental variables of the biopharmaceutics classification system (BCS). A commentary. *European journal of Pharmaceutical Sciences* **1998**, *7*, 1–3.
- (51) Gee, J. M.; DuPont, M. S.; Rhodes, M. J.; Johnson, I. T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radical Biology & Medicine* **1998**, *25*, 19–25.
- (52) Hollman, P.C.H. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Archives of Physiology and Biochemistry* **2004**, *42*, 74–83.
- (53) Kottra, G.; Daniel, H. Flavonoid glycosides are not transported by the human Na⁺/glucose transporter when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, but effectively inhibit electrogenic glucose uptake. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2007**, *322*, 829–835.

- (54) Chen, Y.; Wang, J.; Jia, X.; Tan, X.; Hu, M. Role of intestinal hydrolase in the absorption of prenylated flavonoids present in Yinyanghuo. *Molecules* **2011**, *16*, 1336–1348.
- (55) Hollman, P. C.; Vries, J. H. de; van Leeuwen, S. D.; Mengelers, M. J.; Katan, M. B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition* **1995**, *62*, 1276–1282.
- (56) Day, A. J.; DuPont, M. S.; Ridley, S.; Rhodes, M.; Rhodes, M. J.; Morgan, M. R.; Williamson, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Letters* **1998**, *436*, 71–75.
- (57) Day, A. J.; Cañada, F. J.; Díaz, J. C.; Kroon, P. A.; Mclauchlan, R.; Faulds, C. B.; Plumb, G. W.; Morgan, M. R.; Williamson, G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Letters* **2000**, *468*, 166–170.
- (58) Sesink, A. L. A.; Arts, I. C. W.; Faassen-Peters, M.; Hollman, P. C. H. Intestinal uptake of quercetin-3-glucoside in rats involves hydrolysis by lactase phlorizin hydrolase. *The Journal of Nutrition* **2003**, *133*, 773–776.
- (59) Day, A. J.; Gee, J. M.; DuPont, M. S.; Johnson, I. T.; Williamson, G. Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine. The role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical Pharmacology* **2003**, *65*, 1199–1206.
- (60) Aura, A.-M. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews* **2008**, *7*, 407–429.
- (61) Bokkenheuser, V. D.; Shackleton, C. H.; Winter, J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. *The Biochemical Journal* **1987**, *248*, 953–956.
- (62) 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. Colonic metabolism of dietary polyphenols. Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology & Medicine* **2004**, *36*, 212–225.
- (63) Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols. Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2004**, *79*, 727–747.
- (64) Erlund, I.; Kosonen, T.; Alfthan, G.; Mäenpää, J.; Perttunen, K.; Kenraali, J.; Parantainen, J.; Aro, A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology* **2000**, *56*, 545–553.
- (65) Hollman, P. C.; Bijsman, M. N.; van Gameren, Y.; Cnossen, E. P.; Vries, J. H. de; Katan, M. B. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radical Research* **1999**, *31*, 569–573.

- (66) Stalmach, A.; Mullen, W.; Pecorari, M.; Serafini, M.; Crozier, A. Bioavailability of C-linked dihydrochalcone and flavanone glucosides in humans following ingestion of unfermented and fermented rooibos teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 7104–7111.
- (67) Braune, A.; Blaut, M. Intestinal bacterium *eubacterium cellulosolvens* deglycosylates flavonoid C- and O-glucosides. *Applied and Environmental Microbiology* **2012**, *78*, 8151–8153.
- (68) Nakamura, K.; Nishihata, T.; Jin, J.-S.; Ma, C.-M.; Komatsu, K.; Iwashima, M.; Hattori, M. The C-glucosyl bond of puerarin was cleaved hydrolytically by a human intestinal bacterium strain PUE to yield its aglycone daidzein and an intact glucose. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **2011**, *59*, 23–27.
- (69) Zhang, Y.; Tie, X.; Bao, B.; Wu, X.; Zhang, Y. Metabolism of flavone C-glucosides and p-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats. *The British Journal of Nutrition* **2007**, *97*, 484–494.
- (70) Shi, J.; Zhu, L.; Li, Y.; Zheng, H.; Yu, J.; Lu, L.; Liu, Z. In vitro study of UGT metabolism and permeability of orientin and isoorientin, two active flavonoid C-glycosides. *Drug Metabolism Letters* **2016**, *10*, 101–110.
- (71) Chen, Z.; Zheng, S.; Li, L.; Jiang, H. Metabolism of flavonoids in human. A comprehensive review. *Current Drug Metabolism* **2014**, *15*, 48–61.
- (72) Wilkinson, G. R. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *The New England Journal of Medicine* **2005**, *352*, 2211–2221.
- (73) Paine, M. F.; Hart, H. L.; Ludington, S. S.; Haining, R. L.; Rettie, A. E.; Zeldin, D. C. The human intestinal cytochrome P450 “pie”. *Drug Metabolism and Disposition* **2006**, *34*, 880–886.
- (74) Androutsopoulos, V. P.; Papakyriakou, A.; Vourloumis, D.; Tsatsakis, A. M.; Spandidos, D. A. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention. Substrates and inhibitors of cytochrome P450 CYP1 enzymes. *Pharmacology & Therapeutics* **2010**, *126*, 9–20.
- (75) Jeong, E. J.; Jia, X.; Hu, M. Disposition of formononetin via enteric recycling. Metabolism and excretion in mouse intestinal perfusion and Caco-2 cell models. *Molecular Pharmaceutics* **2005**, *2*, 319–328.
- (76) Rowland, A.; Miners, J. O.; Mackenzie, P. I. The UDP-glucuronosyltransferases. Their role in drug metabolism and detoxification. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2013**, *45*, 1121–1132.
- (77) Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition* **2000**, *130*, 2073–85.

- (78) Singh, R.; Wu, B.; Tang, L.; Hu, M. Uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform-dependent regiospecificity of glucuronidation of flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 7452–7464.
- (79) Wu, B.; Xu, B.; Hu, M. Regioselective glucuronidation of flavonols by six human UGT1A isoforms. *Pharmaceutical Research* **2011**, *28*, 1905–1918.
- (80) Crespy, V.; Morand, C.; Manach, C.; Besson, C.; Demigne, C.; Remesy, C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *The American Journal of Physiology* **1999**, *277*, 120-6.
- (81) Gamage, N.; Barnett, A.; Hempel, N.; Duggleby, R. G.; Windmill, K. F.; Martin, J. L.; McManus, M. E. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicological Sciences* **2006**, *90*, 5–22.
- (82) Wu, B.; Basu, S.; Meng, S.; Wang, X.; Hu, M. Regioselective sulfation and glucuronidation of phenolics. Insights into the structural basis. *Current Drug Metabolism* **2011**, *12*, 900–916.
- (83) Riches, Z.; Stanley, E. L.; Bloomer, J. C.; Coughtrie, M. W. H. Quantitative evaluation of the expression and activity of five major sulfotransferases (SULTs) in human tissues. The SULT “pie”. *Drug Metabolism and Disposition* **2009**, *37*, 2255–2261.
- (84) Huang, C.; Chen, Y.; Zhou, T.; Chen, G. Sulfation of dietary flavonoids by human sulfotransferases. *Xenobiotica* **2009**, *39*, 312–322.
- (85) Vaidyanathan, J. B.; Walle, T. Glucuronidation and sulfation of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human and rat enzymes. *Drug Metabolism and Disposition* **2002**, *30*, 897–903.
- (86) Wright, B.; Gibson, T.; Spencer, J.; Lovegrove, J. A.; Gibbins, J. M. Platelet-mediated metabolism of the common dietary flavonoid, quercetin. *PloS One* **2010**, *5*, 9673.
- (87) Chen, Z.-J.; Dai, Y.-Q.; Kong, S.-S.; Song, F.-F.; Li, L.-P.; Ye, J.-F.; Wang, R.-W.; Zeng, S.; Zhou, H.; Jiang, H.-D. Luteolin is a rare substrate of human catechol-O-methyltransferase favoring a para-methylation. *Molecular Nutrition & Food Research* **2013**, *57*, 877–885.
- (88) Chen, Z.; Chen, M.; Pan, H.; Sun, S.; Li, L.; Zeng, S.; Jiang, H. Role of catechol-O-methyltransferase in the disposition of luteolin in rats. *Drug Metabolism and Disposition* **2011**, *39*, 667–674.
- (89) Männistö, P. T.; Kaakkola, S. Catechol-O-methyltransferase (COMT). Biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacological Reviews* **1999**, *51*, 593–628.
- (90) Tunbridge, E. M.; Lane, T. A.; Harrison, P. J. Expression of multiple catechol-o-methyltransferase (COMT) mRNA variants in human brain. *American Journal of Medical Genetics* **2007**, *144B*, 834–839.

- (91) Walle, T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine* **2004**, 36, 829–837.
- (92) Yang, Z.; Zhu, W.; Gao, S.; Yin, T.; Jiang, W.; Hu, M. Breast cancer resistance protein (ABCG2) determines distribution of genistein phase II metabolites. Reevaluation of the roles of ABCG2 in the disposition of genistein. *Drug Metabolism and Disposition* **2012**, 40, 1883–1893.
- (93) Scalbert, A.; Morand, C.; Manach, C.; Rémésy, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2002**, 56, 276–282.
- (94) Wong, C. C.; Botting, N. P.; Orfila, C.; Al-Maharik, N.; Williamson, G. Flavonoid conjugates interact with organic anion transporters (OATs) and attenuate cytotoxicity of adefovir mediated by organic anion transporter 1 (OAT1/SLC22A6). *Biochemical Pharmacology* **2011**, 81, 942–949.
- (95) Wei, Y.; Wu, B.; Jiang, W.; Yin, T.; Jia, X.; Basu, S.; Yang, G.; Hu, M. Revolving door action of breast cancer resistance protein (BCRP) facilitates or controls the efflux of flavone glucuronides from UGT1A9-overexpressing HeLa cells. *Molecular Pharmaceutics* **2013**, 10, 1736–1750.
- (96) Lee, J. E.; Lee, S.; Sung, J.; Ko, G. Analysis of human and animal fecal microbiota for microbial source tracking. *The ISME Journal* **2011**, 5, 362–365.
- (97) Scheline, R. R. Metabolism of foreign compounds by gastrointestinal microorganisms. *Pharmacological Reviews* **1973**, 25, 451–523.
- (98) Hattori, M.; Shu, Y. Z.; el-Sedawy, A. I.; Namba, T.; Kobashi, K.; Tomimori, T. Metabolism of homoorientin by human intestinal bacteria. *Journal of Natural Products* **1988**, 51, 874–878.
- (99) Xu, X.; Li, X.; Liang, X. Application of ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry in identification of three isoflavone glycosides and their corresponding metabolites. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2018**, 32, 262–268.
- (100) Vollmer, M.; Esders, S.; Farquharson, F. M.; Neugart, S.; Duncan, S. H.; Schreiner, M.; Louis, P.; Maul, R.; Rohn, S. Mutual interaction of phenolic compounds and microbiota. Metabolism of complex phenolic apigenin-C- and kaempferol-O-derivatives by human fecal samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, 66, 485–497.
- (101) Hanske, L.; Loh, G.; Sczesny, S.; Blaut, M.; Braune, A. The bioavailability of apigenin-7-glucoside is influenced by human intestinal microbiota in rats. *The Journal of Nutrition* **2009**, 139, 1095–1102.
- (102) Braune, A.; Gütschow, M.; Engst, W.; Blaut, M. Degradation of quercetin and luteolin by eubacterium ramulus. *Applied and Environmental Microbiology* **2001**, 67, 5558–5567.

- (103) Kim, D. H.; Jung, E. A.; Sohng, I. S.; Han, J. A.; Kim, T. H.; Han, M. J. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Archives of Pharmacal Research* **1998**, *21*, 17–23.
- (104) Simons, A. L.; Renouf, M.; Hendrich, S.; Murphy, P. A. Metabolism of glycitein (7,4'-dihydroxy-6-methoxy-isoflavone) by human gut microflora. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 8519–8525.
- (105) Olthof, M. R.; Hollman, P. C. H.; Buijsman, M. N. C. P.; van Amelsvoort, J. M. M.; Katan, M. B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *The Journal of Nutrition* **2003**, *133*, 1806–1814.
- (106) Heilmann, J.; Merfort, I. Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. *Pharmazie in unserer Zeit* **1998**, *27*, 173–183.
- (107) Rechner, A. R.; Kuhnle, G.; Bremner, P.; Hubbard, G. P.; Moore, K. P.; Rice-Evans, C. A. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. *Free Radical Biology & Medicine* **2002**, *33*, 220–235.
- (108) Estes, C.; Razavi, H.; Loomba, R.; Younossi, Z.; Sanyal, A. J. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology* **2018**, *67*, 123–133.
- (109) Yip, L. Y.; Aw, C. C.; Lee, S. H.; Hong, Y. S.; Ku, H. C.; Xu, W. H.; Chan, J. M. X.; Cheong, E. J. Y.; Chng, K. R.; Ng, A. H. Q.; Nagarajan, N.; Mahendran, R.; Lee, Y. K.; Browne, E. R.; Chan, E. C. Y. The liver-gut microbiota axis modulates hepatotoxicity of tacrine in the rat. *Hepatology* **2018**, *67*, 282–295.
- (110) Smith, L.; Villaret-Cazadamont, J.; Claus, S. P.; Canlet, C.; Guillou, H.; Cabaton, N. J.; Ellero-Simatos, S. Important considerations for sample collection in metabolomics studies with a special focus on applications to liver functions. *Metabolites* **2020**, *10*, 104.
- (111) Vuckovic, D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2012**, *403*, 1523–1548.
- (112) Dunn, W. B.; Broadhurst, D.; Begley, P.; Zelena, E.; Francis-McIntyre, S.; Anderson, N.; Brown, M.; Knowles, J. D.; Halsall, A.; Haselden, J. N.; Nicholls, A. W.; Wilson, I. D.; Kell, D. B.; Goodacre, R. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols* **2011**, *6*, 1060–1083.
- (113) Want, E. J.; Wilson, I. D.; Gika, H.; Theodoridis, G.; Plumb, R. S.; Shockcor, J.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. *Nature Protocols* **2010**, *5*, 1005–1018.

- (114) Dudzik, D.; Barbas-Bernardos, C.; García, A.; Barbas, C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2018**, *147*, 149–173.
- (115) Broadhurst, D.; Goodacre, R.; Reinke, S. N.; Kuligowski, J.; Wilson, I. D.; Lewis, M. R.; Dunn, W. B. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics Official Journal of the Metabolomic Society* **2018**, *14*, 72.
- (116) Begou, O.; Gika, H. G.; Theodoridis, G. A.; Wilson, I. D. Quality Control and Validation Issues in LC-MS Metabolomics. *Methods in Molecular Biology* **2018**, *1738*, 15–26.
- (117) Fernández-Peralbo, M. A.; Luque de Castro, M. D. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **2012**, *41*, 75–85.
- (118) Esposito, S.; Bracacel, E.; Nibbio, M.; Speziale, R.; Orsatti, L.; Veneziano, M.; Monteagudo, E.; Bonelli, F. Use of 'dilute-and-shoot' liquid chromatography-high resolution mass spectrometry in preclinical research. Application to a DMPK study of perhexiline in mouse plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, *118*, 70–80.
- (119) Deventer, K.; Pozo, O. J.; Verstraete, A. G.; van Eenoo, P. Dilute-and-shoot-liquid chromatography-mass spectrometry for urine analysis in doping control and analytical toxicology. *Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *55*, 1–13.
- (120) Gika, H. G.; Theodoridis, G. A.; Wilson, I. D. Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry fingerprinting of human urine. Sample stability under different handling and storage conditions for metabonomics studies. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1189*, 314–322.
- (121) Trivedi, D. K.; Jones, H.; Shah, A.; K Iles, R. Development of zwitterionic hydrophilic liquid chromatography (ZIC®HILIC-MS) metabolomics method for shotgun analysis of human urine. *Journal of Chromatography & Separation Techniques* **2012**, *03*, 144.
- (122) Schroeder, B. O.; Bäckhed, F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature Medicine* **2016**, *22*, 1079–1089.
- (123) Zierer, J.; Jackson, M. A.; Kastenmüller, G.; Mangino, M.; Long, T.; Telenti, A.; Mohn, R. P.; Small, K. S.; Bell, J. T.; Steves, C. J.; Valdes, A. M.; Spector, T. D.; Menni, C. The fecal metabolome as a functional readout of the gut microbiome. *Nature Genetics* **2018**, *50*, 790–795.
- (124) Karu, N.; Deng, L.; Slæ, M.; Guo, A. C.; Sajed, T.; Huynh, H.; Wine, E.; Wishart, D. S. A review on human fecal metabolomics. Methods, applications and the human fecal metabolome database. *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1030*, 1–24.

- (125) Bezabeh, T.; Somorjai, R. L.; Smith, I. C. P. MR metabolomics of fecal extracts. Applications in the study of bowel diseases. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2009**, *47 Suppl 1*, 54-61.
- (126) Yen, S.; McDonald, J. A. K.; Schroeter, K.; Oliphant, K.; Sokolenko, S.; Blondeel, E. J. M.; Allen-Vercoe, E.; Aucoin, M. G. Metabolomic analysis of human fecal microbiota. A comparison of feces-derived communities and defined mixed communities. *Journal of Proteome Research* **2015**, *14*, 1472–1482.
- (127) Couch, R. D.; Navarro, K.; Sikaroodi, M.; Gillevet, P.; Forsyth, C. B.; Mutlu, E.; Engen, P. A.; Keshavarzian, A. The approach to sample acquisition and its impact on the derived human fecal microbiome and VOC metabolome. *PloS One* **2013**, *8*, e81163.
- (128) Phua, L. C.; Koh, P. K.; Cheah, P. Y.; Ho, H. K.; Chan, E. C. Y. Global gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry (GC/TOFMS)-based metabonomic profiling of lyophilized human feces. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2013**, *937*, 103–113.
- (129) Polson, C.; Sarkar, P.; Incledon, B.; Raguvaran, V.; Grant, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2003**, *785*, 263–275.
- (130) Wawrzyniak, R.; Kosnowska, A.; Macioszek, S.; Bartoszewski, R.; Jan Markuszewski, M. New plasma preparation approach to enrich metabolome coverage in untargeted metabolomics. Plasma protein bound hydrophobic metabolite release with proteinase K. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 9541.
- (131) Stevens, V. L.; Hoover, E.; Wang, Y.; Zanetti, K. A. Pre-analytical factors that affect metabolite stability in human urine, plasma, and serum. A review. *Metabolites* **2019**, *9*, 156.
- (132) Liu, X.; Hoene, M.; Wang, X.; Yin, P.; Häring, H.-U.; Xu, G.; Lehmann, R. Serum or plasma, what is the difference? Investigations to facilitate the sample material selection decision making process for metabolomics studies and beyond. *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1037*, 293–300.
- (133) Yu, Z.; Kastenmüller, G.; He, Y.; Belcredi, P.; Möller, G.; Prehn, C.; Mendes, J.; Wahl, S.; Roemisch-Margl, W.; Ceglarek, U.; Polonikov, A.; Dahmen, N.; Prokisch, H.; Xie, L.; Li, Y.; Wichmann, H.-E.; Peters, A.; Kronenberg, F.; Suhre, K.; Adamski, J.; Illig, T.; Wang-Sattler, R. Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PloS One* **2011**, *6*, e21230.
- (134) Want, E. J.; O'Maille, G.; Smith, C. A.; Brandon, T. R.; Uritboonthai, W.; Qin, C.; Trauger, S. A.; Siuzdak, G. Solvent-dependent metabolite distribution, clustering, and protein extraction for serum profiling with mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 743–752.

- (135) Barri, T.; Dragsted, L. O. UPLC-ESI-QTOF/MS and multivariate data analysis for blood plasma and serum metabolomics. Effect of experimental artefacts and anticoagulant. *Analytica Chimica Acta* **2013**, 768, 118–128.
- (136) Beckonert, O.; Keun, H. C.; Ebbels, T. M. D.; Bundy, J.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols* **2007**, 2, 2692–2703.
- (137) Mitchell, B. L.; Yasui, Y.; Li, C. I.; Fitzpatrick, A. L.; Lampe, P. D. Impact of freeze-thaw cycles and storage time on plasma samples used in mass spectrometry based biomarker discovery projects. *Cancer Informatics* **2005**, 1, 98–104.
- (138) Hernandez, V. V.; Barbas, C.; Dudzik, D. A review of blood sample handling and pre-processing for metabolomics studies. *Electrophoresis* **2017**, 38, 2232–2241.
- (139) Alves, S.; Paris, A.; Rathahao-Paris, E. Mass spectrometry-based metabolomics for an in-depth questioning of human health. *Advances in Clinical Chemistry* **2020**, 99, 147–191.
- (140) Want, E. J.; Masson, P.; Michopoulos, F.; Wilson, I. D.; Theodoridis, G.; Plumb, R. S.; Shockcor, J.; Loftus, N.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nature Protocols* **2013**, 8, 17–32.
- (141) Zhou, L.; Zhang, W.; Xie, W.; Chen, H.; Yu, W.; Li, H.; Shen, G. Tributyl phosphate impairs the urea cycle and alters liver pathology and metabolism in mice after short-term exposure based on a metabonomics study. *The Science of the Total Environment* **2017**, 603-604, 77–85.
- (142) Kapoore, R. V.; Coyle, R.; Staton, C. A.; Brown, N. J.; Vaidyanathan, S. Influence of washing and quenching in profiling the metabolome of adherent mammalian cells. A case study with the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *The Analyst* **2017**, 142, 2038–2049.
- (143) Lorenz, M. A.; Burant, C. F.; Kennedy, R. T. Reducing time and increasing sensitivity in sample preparation for adherent mammalian cell metabolomics. *Analytical Chemistry* **2011**, 83, 3406–3414.
- (144) León, Z.; García-Cañaveras, J. C.; Donato, M. T.; Lahoz, A. Mammalian cell metabolomics. Experimental design and sample preparation. *Electrophoresis* **2013**, 34, 2762–2775.
- (145) Dettmer, K.; Nürnberger, N.; Kaspar, H.; Gruber, M. A.; Almstetter, M. F.; Oefner, P. J. Metabolite extraction from adherently growing mammalian cells for metabolomics studies. Optimization of harvesting and extraction protocols. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 399, 1127–1139.
- (146) Hoffmann, E. de; Stroobant, V. *Mass spectrometry. Principles and applications*; Wiley: Chichester, 2011.

- (147) Fiehn, O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Current Protocols in Molecular Biology* **2016**, 114, 30.4.1-30.4.32.
- (148) Rainville, P. D.; Theodoridis, G.; Plumb, R. S.; Wilson, I. D. Advances in liquid chromatography coupled to mass spectrometry for metabolic phenotyping. *Trends in Analytical Chemistry* **2014**, 61, 181–191.
- (149) Habchi, B.; Alves, S.; Paris, A.; Rutledge, D. N.; Rathahao-Paris, E. How to really perform high throughput metabolomic analyses efficiently? *Trends in Analytical Chemistry* **2016**, 85, 128–139.
- (150) Draper, J.; Lloyd, A. J.; Goodacre, R.; Beckmann, M. Flow infusion electrospray ionisation mass spectrometry for high throughput, non-targeted metabolite fingerprinting. A review. *Metabolomics Official Journal of the Metabolomic Society* **2013**, 9, 4–29.
- (151) Dettmer, K.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, 26, 51–78.
- (152) Covey, T. R.; Thomson, B. A.; Schneider, B. B. Atmospheric pressure ion sources. *Mass Spectrometry Reviews* **2009**, 28, 870–897.
- (153) Junot, C.; Madalinski, G.; Tabet, J.-C.; Ezan, E. Fourier transform mass spectrometry for metabolome analysis. *The Analyst* **2010**, 135, 2203–2219.
- (154) Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R. The Orbitrap. A new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, 40, 430–443.
- (155) Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.; Jackson, G. S. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. A primer. *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, 17, 1–35.
- (156) Swiatecka, D.; Mackie, A.; Kleiveland, C.; Wichers, H.; López-Expósito, I.; Verhoeckx, K.; Cotter, P.; Requena, T.; Lea, T. *The Impact of Food Bioactives on Health. In Vitro and Ex Vivo Models*; Springer: s.l., 2015.
- (157) Boxberger, H. J. *Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur. Einführung in Grundlagen und Techniken*; WILEY-VCH Verlag GmbH: Weinheim, 2007.
- (158) Berridge, M. V.; Herst, P. M.; Tan, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology. New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review* **2005**, 11, 127–152.
- (159) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **1983**, 65, 55–63.
- (160) Hubatsch, I.; Ragnarsson, E. G. E.; Artursson, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols* **2007**, 2, 2111–2119.
- (161) Liu, L.; Guo, L.; Zhao, C.; Wu, X.; Wang, R.; Liu, C. Characterization of the intestinal absorption of seven flavonoids from the flowers of *Trollius chinensis* using the Caco-2 cell monolayer model. *PloS One* **2015**, 10, e0119263.

- (162) Artursson, P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I. A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1990**, 79, 476–482.
- (163) Alvarez, A. I.; Real, R.; Pérez, M.; Mendoza, G.; Prieto, J. G.; Merino, G. Modulation of the activity of ABC transporters (P-glycoprotein, MRP2, BCRP) by flavonoids and drug response. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, 99, 598–617.
- (164) Luo, Z.; Morgan, M. R. A.; Day, A. J. Transport of trans-tiliroside (kaempferol-3- β -D-(6"-p-coumaroyl-glucopyranoside) and related flavonoids across Caco-2 cells, as a model of absorption and metabolism in the small intestine. *Xenobiotica* **2015**, 45, 722–730.
- (165) Untergehrer, M.; Kiermaier, J.; Reintjes, S.; Heilmann, J.; Jürgenliemk, G. Identification of phase-II metabolites from human serum samples after oral intake of a willow bark extract. *Phytomedicine International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* **2019**, 57, 396–402.
- (166) Yan, Z.; Caldwell, G. W. Metabolic assessment in liver microsomes by co-activating cytochrome P450s and UDP-glycosyltransferases. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2003**, 28, 223–232.
- (167) Fisher, M. B.; Jackson, D.; Kaerner, A.; Wrighton, S. A.; Borel, A. G. Characterization by liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry of two coupled oxidative-conjugative metabolic pathways for 7-ethoxycoumarin in human liver microsomes treated with alamethicin. *Drug Metabolism and Disposition* **2002**, 30, 270–275.
- (168) Richardson, S. J.; Bai, A.; Kulkarni, A. A.; Moghaddam, M. F. Efficiency in drug discovery. Liver S9 fraction assay as a screen for metabolic stability. *Drug Metabolism Letters* **2016**, 10, 83–90.
- (169) Hidalgo, I. J.; Raub, T. J.; Borchardt, R. T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **1989**, 96, 736–749.
- (170) Hilgers, A. R.; Conradi, R. A.; Burton, P. S. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmaceutical Research* **1990**, 7, 902–910.
- (171) Artursson, P.; Karlsson, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, 175, 880–885.
- (172) Hidalgo, I. J., Raub, T. J., and Borchardt, R. T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability, *Gastroenterology*, 96, 736-749, 1989--the backstory. *The AAPS journal* **2011**, 13, 323–327.

- (173) Fogh, J.; Wright, W. C.; Loveless, J. D. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of the National Cancer Institute* **1977**, *58*, 209–214.
- (174) Jumarie, C.; Malo, C. Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *Journal of Cellular Physiology* **1991**, *149*, 24–33.
- (175) Meunier, V.; Bourrié, M.; Berger, Y.; Fabre, G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biology and Toxicology* **1995**, *11*, 187–194.
- (176) Baranczyk-Kuzma, A.; Garren, J. A.; Hidalgo, I. J.; Borchardt, R. T. Substrate specificity and some properties of phenol sulfotransferase from human intestinal Caco-2 cells. *Life Sciences* **1991**, *49*, 1197–1206.
- (177) Galijatovic, A.; Otake, Y.; Walle, U. K.; Walle, T. Induction of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by the flavonoid chrysin in Caco-2 cells—potential role in carcinogen bioinactivation. *Pharmaceutical Research* **2001**, *18*, 374–379.
- (178) Abid, A.; Bouchon, I.; Siest, G.; Sabolovic, N. Glucuronidation in the caco-2 human intestinal cell line. Induction of UDP-glucuronosyltransferase 1*6. *Biochemical Pharmacology* **1995**, *50*, 557–561.
- (179) Küblbeck, J.; Hakkarainen, J. J.; Petsalo, A.; Vellonen, K.-S.; Tolonen, A.; Reponen, P.; Forsberg, M. M.; Honkakoski, P. Genetically modified Caco-2 Cells with improved cytochrome P450 metabolic capacity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *105*, 941–949.
- (180) Sun, H.; Chow, E. C.; Liu, S.; Du, Y.; Pang, K. S. The Caco-2 cell monolayer. Usefulness and limitations. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2008**, *4*, 395–411.
- (181) van Breemen, R. B.; Li, Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2005**, *1*, 175–185.
- (182) Hunter, J.; Jepson, M. A.; Tsuruo, T.; Simmons, N. L.; Hirst, B. H. Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. Kinetics of vinblastine secretion and interaction with modulators. *The Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268*, 14991–14997.
- (183) Gutmann, H.; Fricker, G.; Török, M.; Michael, S.; Beglinger, C.; Drewe, J. Evidence for different ABC-transporters in Caco-2 cells modulating drug uptake. *Pharmaceutical Research* **1999**, *16*, 402–407.
- (184) Xia, C. Q.; Liu, N.; Yang, D.; Miwa, G.; Gan, L.-S. Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells. *Drug Metabolism and Disposition* **2005**, *33*, 637–643.

- (185) Li, Q.; Sai, Y.; Kato, Y.; Tamai, I.; Tsuji, A. Influence of drugs and nutrients on transporter gene expression levels in Caco-2 and LS180 intestinal epithelial cell lines. *Pharmaceutical Research* **2003**, *20*, 1119–1124.
- (186) Walgren, R. A.; Walle, U.K.; Walle, T. Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochemical Pharmacology* **1998**, *55*, 1721–1727.
- (187) Takahashi, Y.; Kondo, H.; Yasuda, T.; Watanabe, T.; Kobayashi, S.-I.; Yokohama, S. Common solubilizers to estimate the Caco-2 transport of poorly water-soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, *246*, 85–94.
- (188) Leonard, M.; Creed, E.; Brayden, D.; Baird, A. W. Evaluation of the Caco-2 monolayer as a model epithelium for iontophoretic transport. *Pharmaceutical Research* **2000**, *17*, 1181–1188.
- (189) Gradolatto, A.; Canivenc-Lavier, M.-C.; Basly, J.-P.; Siess, M.-H.; Teyssier, C. Metabolism of apigenin by rat liver phase I and phase ii enzymes and by isolated perfused rat liver. *Drug Metabolism and Disposition* **2004**, *32*, 58–65.
- (190) Ehrhardt, C.; Kim, K.-J. *Drug Absorption Studies. In Situ, In Vitro and In Silico Models*; Springer-Verlag: s.l., 2008.
- (191) Tian, X.-J.; Yang, X.-W.; Yang, X.; Wang, K. Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *367*, 58–64.
- (192) Song, P.; Xiao, S.; Zhang, Y.; Xie, J.; Cui, X. Mechanism of the intestinal absorption of six flavonoids from zizyphi spinosi semen across Caco-2 cell monolayer model. *Current Drug Metabolism* **2020**, *21*, 633–645.
- (193) Hithamani, G.; Kizhakayil, D.; Srinivasan, K. Uptake of phenolic compounds from plant foods in human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Biosciences* **2017**, *42*, 603–611.
- (194) Shen, W.; Hu, X.; Niu, Y.; Lu, Y.; Wang, B.; Wang, H. Bioaccessibility and absorption of flavonoid C-glycosides from *Abrus mollis* using simulated digestion, Caco-2 Cell, and in situ single-pass perfusion models. *Planta Medica* **2021**, *87*, 570–580.
- (195) Chen, J.; Lin, H.; Hu, M. Absorption and metabolism of genistein and its five isoflavone analogs in the human intestinal Caco-2 model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2005**, *55*, 159–169.
- (196) Vaidyanathan, J. B.; Walle, T. Transport and metabolism of the tea flavonoid (-)-epicatechin by the human intestinal cell line Caco-2. *Pharmaceutical Research* **2001**, *18*, 1420–1425.
- (197) Ikeno, A.; Hashimoto, K.; Shimizu Makoto; Terao, J.; Kumazawa, S.; Nakayama, T. Absorption and metabolism of quercetin in Caco-2 cells. *Food Science and Technology Research* **1999**, *5*, 90–92.

- (198) Ng, S. P.; Wong, K. Y.; Zhang, L.; Zuo, Z.; Lin, G. Evaluation of the first-pass glucuronidation of selected flavones in gut by Caco-2 monolayer model. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* **2004**, *8*, 1–9.
- (199) Brandon, E. F. A.; Raap, C. D.; Meijerman, I.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. M. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research. Pros and cons. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2003**, *189*, 233–246.
- (200) Asha, S.; Vidyavathi, M. Role of human liver microsomes in in vitro metabolism of drugs-a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2010**, *160*, 1699–1722.
- (201) Jia, L.; Liu, X. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II). In vitro experiments. *Current Drug Metabolism* **2007**, *8*, 822–829.
- (202) Li, A. P. Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties. *Drug discovery today. Technologies* **2005**, *2*, 179–185.
- (203) Yao, C.; Kunze, K. L.; Kharasch, E. D.; Wang, Y.; Trager, W. F.; Ragueneau, I.; Levy, R. H. Fluvoxamine-theophylline interaction. Gap between in vitro and in vivo inhibition constants toward cytochrome P4501A2. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **2001**, *70*, 415–424.
- (204) Pelkonen, O.; Kaltiala, E. H.; Larmi, T. K.; Kärki, N. T. Cytochrome P-450-linked monooxygenase system and drug-induced spectral interactions in human liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions* **1974**, *9*, 205–216.
- (205) Iwatsubo, T.; Hirota, N.; Ooie, T.; Suzuki, H.; Shimada, N.; Chiba, K.; Ishizaki, T.; Green, C. E.; Tyson, C. A.; Sugiyama, Y. Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacology & Therapeutics* **1997**, *73*, 147–171.
- (206) Doostdar, H.; Duthie, S. J.; Burke, M. D.; Melvin, W. T.; Grant, M. H. The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line. *FEBS Letters* **1988**, *241*, 15–18.
- (207) Berry, M. N.; Halls, H. J.; Grivell, M. B. Techniques for pharmacological and toxicological studies with isolated hepatocyte suspensions. *Life Sciences* **1992**, *51*, 1–16.
- (208) Bayliss, M. K.; Bell, J. A.; Jenner, W. N.; Park, G. R.; Wilson, K. Utility of hepatocytes to model species differences in the metabolism of loxidine and to predict pharmacokinetic parameters in rat, dog and man. *Xenobiotica* **1999**, *29*, 253–268.
- (209) Annaert, P. P.; Turncliff, R. Z.; Booth, C. L.; Thakker, D. R.; Brouwer, K. L. P-glycoprotein-mediated in vitro biliary excretion in sandwich-cultured rat hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* **2001**, *29*, 1277–1283.
- (210) Silva, J. M.; Day, S. H.; Nicoll-Griffith, D. A. Induction of cytochrome-P450 in cryopreserved rat and human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* **1999**, *121*, 49–63.

- (211) Yamazaki, H.; Inoue, K.; Mimura, M.; Oda, Y.; Guengerich, F. P.; Shimada, T. 7-Ethoxycoumarin O-deethylation catalyzed by cytochromes P450 1A2 and 2E1 in human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology* **1996**, *51*, 313–319.
- (212) Wishart, D. S.; Knox, C.; Guo, A. C.; Eisner, R.; Young, N.; Gautam, B.; Hau, D. D.; Psychogios, N.; Dong, E.; Bouatra, S.; Mandal, R.; Sinelnikov, I.; Xia, J.; Jia, L.; Cruz, J. A.; Lim, E.; Sobsey, C. A.; Shrivastava, S.; Huang, P.; Liu, P.; Fang, L.; Peng, J.; Fradette, R.; Cheng, D.; Tzur, D.; Clements, M.; Lewis, A.; Souza, A. de; Zuniga, A.; Dawe, M.; Xiong, Y.; Clive, D.; Greiner, R.; Nazyrova, A.; Shaykhutdinov, R.; Li, L.; Vogel, H. J.; Forsythe, I. HMDB. A knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*, 603–10.
- (213) Xiao, J.; Högger, P. Metabolism of dietary flavonoids in liver microsomes. *Current Drug Metabolism* **2013**, *14*, 381–391.
- (214) Cai, H.; Boocock, D. J.; Steward, W. P.; Gescher, A. J. Tissue distribution in mice and metabolism in murine and human liver of apigenin and tricetin, flavones with putative cancer chemopreventive properties. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **2007**, *60*, 257–266.
- (215) Tang, L.; Ye, L.; Singh, R.; Wu, B.; Lv, C.; Zhao, J.; Liu, Z.; Hu, M. Use of glucuronidation fingerprinting to describe and predict mono- and dihydroxyflavone metabolism by recombinant UGT isoforms and human intestinal and liver microsomes. *Molecular Pharmaceutics* **2010**, *7*, 664–679.
- (216) Singh, R.; Wu, B.; Tang, L.; Liu, Z.; Hu, M. Identification of the position of mono-O-glucuronide of flavones and flavonols by analyzing shift in online UV spectrum (lambda_{max}) generated from an online diode array detector. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 9384–9395.
- (217) Barron, D.; Varin, L.; Ibrahim, R. K.; Harborne, J. B.; Williams, C. A. Sulphated flavonoids—an update. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2375–2395.
- (218) Ren, S.; Lien, E. J. Caco-2 cell permeability vs human gastrointestinal absorption. QSPR analysis. *Progress in Drug Research* **2000**, *54*, 1–23.
- (219) Gonzales, G. B.; van Camp, J.; Zotti, M.; Kobayashi, V.; Grootaert, C.; Raes, K.; Smagghe, G. Two- and three-dimensional quantitative structure–permeability relationship of flavonoids in Caco-2 cells using stepwise multiple linear regression (SMLR), partial least squares regression (PLSR), and pharmacophore (GALAHAD)-based comparative molecular similarity index analysis (COMSIA). *Medicinal Chemistry Research* **2015**, *24*, 1696–1706.
- (220) Rothwell, J. A.; Day, A. J.; Morgan, M. R. A. Experimental determination of octanol-water partition coefficients of quercetin and related flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 4355–4360.

- (221) Huang, M.; Du Plessis, J.; Du Preez, J.; Hamman, J.; Viljoen, A. Transport of aspalathin, a Rooibos tea flavonoid, across the skin and intestinal epithelium. *Phytotherapy Research* **2008**, *22*, 699–704.
- (222) Gu, C.; Liu, Z.; Yuan, X.; Li, W.; Zu, Y.; Fu, Y. Preparation of vitexin nanoparticles by combining the antisolvent precipitation and high pressure homogenization approaches followed by lyophilization for dissolution rate enhancement. *Molecules* **2017**, *22*, 2038.
- (223) Luo, Y.; Wang, Z.; Shi, D.; Luo, Z.; Yu, N. Preparation, characterization, and physicochemical properties of vitexin-phospholipid nano-complex. *Nanoscience and Nanotechnology Letters* **2017**, *9*, 2067–2075.
- (224) Peng, Y.; Gan, R.; Li, H.; Yang, M.; McClements, D. J.; Gao, R.; Sun, Q. Absorption, metabolism, and bioactivity of vitexin. Recent advances in understanding the efficacy of an important nutraceutical. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2021**, *61*, 1049–1064.
- (225) Wang, Y. Pharmacokinetics of vitexin in rats after intravenous and oral administration. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2012**, *6*, 2368–2373.
- (226) Xiao, J.; Capanoglu, E.; Jassbi, A. R.; Miron, A. Advance on the flavonoid C-glycosides and health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2016**, *56 Suppl 1*, 29–45.
- (227) Ma, L. Y.; Liu, R. H.; Xu, X. D.; Yu, M. Q.; Zhang, Q.; Liu, H. L. The pharmacokinetics of C-glycosyl flavones of Hawthorn leaf flavonoids in rat after single dose oral administration. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 640–645.
- (228) Hostetler, G. L.; Ralston, R. A.; Schwartz, S. J. Flavones. Food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. *Advances in Nutrition* **2017**, *8*, 423–435.
- (229) Cao, J.; Chen, X.; Liang, J.; Yu, X.-Q.; Xu, A.-L.; Chan, E.; Wei, D.; Huang, M.; Wen, J.-Y.; Yu, X.-Y.; Li, X.-T.; Sheu, F.-S.; Zhou, S.-F. Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption of glabridin, an active flavonoid from the root of *Glycyrrhiza glabra*. *Drug Metabolism and Disposition* **2007**, *35*, 539–553.
- (230) Pulido, M. M.; Molina, A. J.; Merino, G.; Mendoza, G.; Prieto, J. G.; Alvarez, A. I. Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). Influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **2006**, *29*, 279–287.
- (231) Xue, H.-F.; Ying, Z.-M.; Zhang, W.-J.; Meng, Y.-H.; Ying, X.-X.; Kang, T.-G. Hepatic, gastric, and intestinal first-pass effects of vitexin in rats. *Pharmaceutical Biology* **2014**, *52*, 967–971.
- (232) Buqui, G. A.; Sy, S. K.B.; Merino-Sanjuán, M.; Gouvea, D. R.; Nixdorf, S. L.; Kimura, E.; Derendorf, H.; Lopes, N. P.; Diniz, A. Characterization of intestinal absorption of C -

- glycoside flavonoid vicenin-2 from *Lychnophora ericoides* leaves in rats by nonlinear mixed effects modeling. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2015**, 25, 212–218.
- (233) Walgren, R. A.; Karnaky, K. J.; Lindenmayer, G. E.; Walle, T. Efflux of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside across human intestinal Caco-2 cell monolayers by apical multidrug resistance-associated protein-2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2000**, 294, 830–836.
- (234) Hu, M.; Chen, J.; Lin, H. Metabolism of flavonoids via enteric recycling. Mechanistic studies of disposition of apigenin in the Caco-2 cell culture model. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003**, 307, 314–321.
- (235) Kaldas, M. I.; Walle, U. K.; Walle, T. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2003**, 55, 307–312.
- (236) Cao, F.; Zhang, H.; Guo, J.; Ping, Q. Mrp2-related efflux of scutellarin in the intestinal absorption in rats. *Die Pharmazie* **2008**, 63, 75–80.
- (237) Brand, W.; van der Wel, P. A. I.; Rein, M. J.; Barron, D.; Williamson, G.; van Bladeren, P. J.; Rietjens, I. M. C. M. Metabolism and transport of the citrus flavonoid hesperetin in Caco-2 cell monolayers. *Drug Metabolism and Disposition* **2008**, 36, 1794–1802.
- (238) Galijatovic, A.; Otake, Y.; Walle, U. K.; Walle, T. Extensive metabolism of the flavonoid chrysin by human Caco-2 and Hep G2 cells. *Xenobiotica* **1999**, 29, 1241–1256.
- (239) Liu, Y.; Hu, M. Absorption and metabolism of flavonoids in the caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model. *Drug Metabolism and Disposition* **2002**, 30, 370–377.
- (240) Shi, P.; Lin, X.; Yao, H. Metabolism and plasma pharmacokinetics of isoorientin, a natural active ingredient, in Sprague-Dawley male rats after oral and intravenous administration. *Xenobiotica* **2015**, 45, 999–1008.
- (241) Hayasaka, N.; Shimizu, N.; Komoda, T.; Mohri, S.; Tsushida, T.; Eitsuka, T.; Miyazawa, T.; Nakagawa, K. Absorption and metabolism of luteolin in rats and humans in relation to in vitro anti-inflammatory effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2018**, 66, 11320–11329.
- (242) Stachulski, A. V.; Meng, X. Glucuronides from metabolites to medicines. A survey of the in vivo generation, chemical synthesis and properties of glucuronides. *Natural Product Reports* **2013**, 30, 806–848.
- (243) Naz, H.; Islam, A.; Waheed, A.; Sly, W. S.; Ahmad, F.; Hassan, I. Human β -glucuronidase. Structure, function, and application in enzyme replacement therapy. *Rejuvenation Research* **2013**, 16, 352–363.
- (244) Bartholomé, R.; Haenen, G.; Hollman, C. H.; Bast, A.; Dagnelie, P. C.; Roos, D.; Keijer, J.; Kroon, P. A.; Needs, P. W.; Arts, I. C. W. Deconjugation kinetics of glucuronidated phase II flavonoid metabolites by beta-glucuronidase from neutrophils. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **2010**, 25, 379–387.

- (245) Lee-Hilz, Y. Y.; Stolaki, M.; van Berkel, W. J. H.; Aarts, J. M. M. J. G.; Rietjens, I. M. C. M. Activation of EpRE-mediated gene transcription by quercetin glucuronides depends on their deconjugation. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, *46*, 2128–2134.
- (246) Androutsopoulos, V.; Wilsher, N.; Arroo, R. R. J.; Potter, G. A. Bioactivation of the phytoestrogen diosmetin by CYP1 cytochromes P450. *Cancer Letters* **2009**, *274*, 54–60.
- (247) Androutsopoulos, V. P.; Spandidos, D. A. The flavonoids diosmetin and luteolin exert synergistic cytostatic effects in human hepatoma HepG2 cells via CYP1A-catalyzed metabolism, activation of JNK and ERK and P53/P21 up-regulation. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **2013**, *24*, 496–504.
- (248) Lodi, F.; Jimenez, R.; Moreno, L.; Kroon, P. A.; Needs, P. W.; Hughes, D. A.; Santos-Buelga, C.; Gonzalez-Paramas, A.; Cogolludo, A.; Lopez-Sepulveda, R.; Duarte, J.; Perez-Vizcaino, F. Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis* **2009**, *204*, 34–39.
- (249) Smolarz, H. D.; Budzianowski, J.; Bogucka-Kocka, A.; Kocki, J.; Mendyk, E. Flavonoid glucuronides with anti-leukaemic activity from *Polygonum amphibium* L. *Phytochemical Analysis* **2008**, *19*, 506–513.
- (250) Williamson, G.; Aeberli, I.; Miguet, L.; Zhang, Z.; Sanchez, M.-B.; Crespy, V.; Barron, D.; Needs, P.; Kroon, P. A.; Glavinas, H.; Krajcsi, P.; Grigorov, M. Interaction of positional isomers of quercetin glucuronides with the transporter ABCC2 (cMOAT, MRP2). *Drug Metabolism and Disposition* **2007**, *35*, 1262–1268.
- (251) Day, A. J.; Bao, Y.; Morgan, M. R.; Williamson, G. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biology & Medicine* **2000**, *29*, 1234–1243.
- (252) Kawai, Y.; Nishikawa, T.; Shiba, Y.; Saito, S.; Murota, K.; Shibata, N.; Kobayashi, M.; Kanayama, M.; Uchida, K.; Terao, J. Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries. Implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *The Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, 9424–9434.
- (253) Chan, B. C. L.; Ip, M.; Gong, H.; Lui, S. L.; See, R. H.; Jolival, C.; Fung, K. P.; Leung, P. C.; Reiner, N. E.; Lau, C. B. S. Synergistic effects of diosmetin with erythromycin against ABC transporter over-expressed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) RN4220/pUL5054 and inhibition of MRSA pyruvate kinase. *Phytomedicine* **2013**, *20*, 611–614.
- (254) Ku, S.-K.; Kim, T. H.; Bae, J.-S. Anticoagulant activities of persicarin and isorhamnetin. *Vascular Pharmacology* **2013**, *58*, 272–279.
- (255) Yang, Y.; Zhou, X.; Xiao, M.; Hong, Z.; Gong, Q.; Jiang, L.; Zhou, J. Discovery of chrysoeriol, a PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitor with potent antitumor activity against

- human multiple myeloma cells in vitro. *Journal of Huazhong University of Science and Technology* **2010**, 30, 734–740.
- (256) Court, M. H.; Zhang, X.; Ding, X.; Yee, K. K.; Hesse, L. M.; Finel, M. Quantitative distribution of mRNAs encoding the 19 human UDP-glucuronosyltransferase enzymes in 26 adult and 3 fetal tissues. *Xenobiotica* **2012**, 42, 266–277.
- (257) Wang, B.; Lu, Y.; Wang, R.; Liu, S.; Hu, X.; Wang, H. Transport and metabolic profiling studies of amentoflavone in Caco-2 cells by UHPLC-ESI-MS/MS and UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2020**, 189, 113441.
- (258) Gan, L.; Ma, J.; You, G.; Mai, J.; Wang, Z.; Yang, R.; Xie, C.; Fei, J.; Tang, L.; Zhao, J.; Cai, Z.; Ye, L. Glucuronidation and its effect on the bioactivity of amentoflavone, a biflavonoid from Ginkgo biloba leaves. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2020**, 72, 1840–1853.
- (259) Chen, Y.; Feng, X.; Li, L.; Zhang, X.; Song, K.; Diao, X.; Sun, Y.; Zhang, L. UHPLC-Q-TOF-MS/MS method based on four-step strategy for metabolites of hinokiflavone in vivo and in vitro. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2019**, 169, 19–29.
- (260) Chen, J.; Lin, H.; Hu, M. Metabolism of flavonoids via enteric recycling. Role of intestinal disposition. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2003**, 304, 1228–1235.
- (261) Zulkifli, M.; Ismail, A.; Su Peng, L.; Jailani, F.; Kassim Nur, K. Intestinal permeability and transport of apigenin across caco-2 cell monolayers. *Journal of Food Bioactives* **2019**, 7, 48–55.
- (262) Mullen, W.; Graf, B. A.; Caldwell, S. T.; Hartley, R. C.; Duthie, G. G.; Edwards, C. A.; Lean, M. E. J.; Crozier, A. Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of 2-(14)Cquercetin-4'-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 6902–6909.
- (263) Manach, C.; Morand, C.; Crespy, V.; Demigné, C.; Texier, O.; Régéat, F.; Rémésy, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Letters* **1998**, 426, 331–336.
- (264) Mullen, W.; Edwards, C. A.; Crozier, A. Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. *The British Journal of Nutrition* **2006**, 96, 107–116.
- (265) Sesink, A. L.; O'Leary, K. A.; Hollman, P. C. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. *The Journal of Nutrition* **2001**, 131, 1938–1941.

- (266) Wang, B.; Lu, Y.; Hu, X.; Feng, J.; Shen, W.; Wang, R.; Wang, H. Systematic strategy for metabolites of amentoflavone in vivo and in vitro based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2020**, 68, 14808–14823.

8 ANHANG

Tabelle 87: Datenbank der möglichen Metabolite von Orientin.

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,1006	Orientin
$C_{15}H_{10}O_6$	286,0477	Luteolin
$C_7H_8O_2$	124,0524	Dihydroxytoluol
$C_7H_6O_3$	138,0317	Hydroxybenzoesäure
$C_8H_8O_3$	152,0473	Hydroxyphenylelessigsäure
$C_8H_8O_4$	168,0423	Dihydroxyphenylelessigsäure
$C_9H_{10}O_4$	182,0579	Hydroxymethoxyphenylelessigsäure
$C_6H_6O_3$	126,0317	Phloroglucin
$C_6H_6O_6S$	205,9885	Phloroglucinol-sulfat
$C_{12}H_{14}O_9$	302,0638	Phloroglucinol-glucuronid
$C_7H_8O_3$	140,0473	Methylphloroglucin
$C_8H_8O_6S$	232,0042	Hydroxyphenylelessigsäure-sulfat
$C_{14}H_{16}O_9$	328,0794	Hydroxyphenylelessigsäure-glucuronid
$C_{10}H_{11}NO_4$	209,0688	Hydroxyphenylelessigsäure-glycinkonjugat
$C_{11}H_{11}NO_4$	223,0845	Hydroxyphenylpropionsäure-glycinkonjugat
$C_9H_{10}O_6S$	246,0198	Hydroxyphenylpropionsäure-sulfat
$C_{15}H_{18}O_9$	342,0951	Hydroxyphenylpropionsäure-glucuronid
$C_{15}H_{16}O_9$	340,0794	Hydroxyzimtsäure-glucuronid
$C_9H_8O_6S$	244,0042	Hydroxyzimtsäure-sulfat
$C_9H_8O_4$	180,0423	Kaffeesäure
$C_9H_8O_7S$	259,9991	Kaffeesäure-sulfat
$C_{15}H_{16}O_{10}$	356,0743	Kaffeesäure-glucuronid
$C_{10}H_{10}O_4$	194,0579	Ferulasäure
$C_{10}H_{10}O_7S$	274,0147	Ferulasäure-sulfat
$C_{16}H_{18}O_{10}$	370,0900	Ferulasäure-glucuronid
$C_9H_{10}O_4$	182,0597	Dihydroxyphenylpropionsäure
$C_9H_{10}O_3$	166,0630	Hydroxyphenylpropionsäure
$C_9H_8O_3$	164,0473	Hydroxyphenylacrylsäure
$C_{10}H_{12}O_4$	196,0736	Hydroxymethoxyphenylpropionsäure
$C_{16}H_{12}O_6$	300,0634	Methoxyluteolin
$C_{15}H_{10}O_7$	302,0427	Hydroxyluteolin
$C_{16}H_{12}O_7$	316,0583	Hydroxymethoxyluteolin
$C_{17}H_{14}O_6$	314,0790	Dimethoxyluteolin
$C_{18}H_{16}O_6$	328,0947	Trimethoxyluteolin
$C_{17}H_{14}O_7$	330,0740	Hydroxydimethoxyluteolin
$C_{18}H_{16}O_7$	344,0896	Hydroxytrimethoxyluteolin
$C_{21}H_{18}O_{12}$	462,0798	Luteolin-glucuronid
$C_{15}H_{10}O_9S$	366,0046	Luteolin-sulfat
$C_{27}H_{26}O_{18}$	638,1119	Luteolin-diglucuronid
$C_{15}H_{10}O_{12}S_2$	445,9614	Luteolin-disulfat
$C_{21}H_{18}O_5S$	542,0366	Luteolin-glucuronid-sulfat
$C_{15}H_{10}O_{10}S$	381,9995	Hydroxyluteolin-sulfat
$C_{21}H_{18}O_{13}$	478,0747	Hydroxyluteolin-glucuronid

Fortsetzung **Tabelle 87**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C₂₂H₂₀O₁₃	492,0904	Hydroxymethoxyluteolin-glucuronid
C₂₇H₂₆O₁₉	654,1068	Hydroxyluteolin-diglucuronid
C₂₁H₁₀O₁₃S₂	461,9563	Hydroxyluteolin-disulfat
C₂₁H₁₈O₁₆S	558,0316	Hydroxyluteolin-glucuronid-sulfat
C₁₆H₁₂O₁₀S	396,0151	Hydroxymethoxyluteolin-sulfat
C₁₆H₁₂O₉S	380,0202	Methoxyluteolin-sulfat
C₂₂H₂₀O₁₂	476,1955	Methoxyluteolin-glucuronid
C₂₁H₂₀O₁₂	464,0955	Hydroxyorientin
C₂₂H₂₂O₁₂	478,1111	Hydroxymethoxyorientin
C₂₂H₂₂O₁₁	462,1162	Methoxyorientin
C₂₁H₂₀O₁₄S	528,0574	Orientin-sulfat
C₂₁H₂₀O₁₅S	544,0523	Hydroxyorientin-sulfat
C₂₇H₂₈O₁₈	640,1276	Hydroxyorientin-glucuronid
C₂₇H₂₈O₁₇	624,1326	Orientin-glucuronid
C₂₂H₂₂O₁₄S	542,0730	Methoxyorientin-sulfat
C₂₈H₃₀O₁₇	638,1483	Methoxyorientin-glucuronid
C₂₈H₃₀O₁₈	654,1432	Hydroxymethoxyorientin-glucuronid
C₂₂H₂₂O₁₅S	558,0679	Hydroxymethoxyorientin-sulfat
C₂₇H₂₈O₂₁S	720,0844	Hydroxyorientin-glucuronid-sulfat
C₂₇H₂₈O₂₀S	704,0895	Orientin-glucuronid-sulfat
C₃₃H₃₆O₂₃	800,1647	Orientin-diglucuronid
C₂₁H₂₀O₁₇S₂	608,0142	Orientin-disulfat
C₃₃H₃₆O₂₄	816,1597	Hydroxyorientin-diglucuronid
C₂₁H₂₀ O₁₈S₂	624,0091	Hydroxyorientin-disulfat

Tabelle 88: Datenbank der möglichen Metabolite von Isoorientin.

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,1006	Isoorientin
$C_{15}H_{10}O_6$	286,0477	Luteolin
$C_7H_8O_2$	124,0524	Dihydroxytoluol
$C_7H_6O_3$	138,0317	Hydroxybenzoesäure
$C_8H_8O_3$	152,0473	Hydroxyphenylelessigsäure
$C_8H_8O_4$	168,0423	Dihydroxyphenylelessigsäure
$C_9H_{10}O_4$	182,0579	Hydroxymethoxyphenylelessigsäure
$C_6H_6O_3$	126,0317	Phloroglucin
$C_6H_6O_6S$	205,9885	Phloroglucinol-sulfat
$C_{12}H_{14}O_9$	302,0638	Phloroglucinol-glucuronid
$C_7H_8O_3$	140,0473	Methylphloroglucin
$C_8H_8O_6S$	232,0042	Hydroxyphenylelessigsäure-sulfat
$C_{14}H_{16}O_9$	328,0794	Hydroxyphenylelessigsäure-glucuronid
$C_{10}H_{11}NO_4$	209,0688	Hydroxyphenylelessigsäure-glycinkonjugat
$C_{11}H_{11}NO_4$	223,0845	Hydroxyphenylpropionsäure-glycinkonjugat
$C_9H_{10}O_6S$	246,0198	Hydroxyphenylpropionsäure-sulfat
$C_{15}H_{18}O_9$	342,0951	Hydroxyphenylpropionsäure-glucuronid
$C_{15}H_{16}O_9$	340,0794	Hydroxyzimtsäure-glucuronid
$C_9H_8O_6S$	244,0042	Hydroxyzimtsäure-sulfat
$C_9H_8O_4$	180,0423	Kaffeesäure
$C_9H_8O_7S$	259,9991	Kaffeesäure-sulfat
$C_{15}H_{16}O_{10}$	356,0743	Kaffeesäure-glucuronid
$C_{10}H_{10}O_4$	194,0579	Ferulasäure
$C_{10}H_{10}O_7S$	274,0147	Ferulasäure-sulfat
$C_{16}H_{18}O_{10}$	370,0900	Ferulasäure-glucuronid
$C_9H_{10}O_4$	182,0597	Dihydroxyphenylpropionsäure
$C_9H_{10}O_3$	166,0630	Hydroxyphenylpropionsäure
$C_9H_8O_3$	164,0473	Hydroxyphenylacrylsäure
$C_{10}H_{12}O_4$	196,0736	Hydroxymethoxyphenylpropionsäure
$C_{16}H_{12}O_6$	300,0634	Methoxyluteolin
$C_{15}H_{10}O_7$	302,0427	Hydroxyluteolin
$C_{16}H_{12}O_7$	316,0583	Hydroxymethoxyluteolin
$C_{17}H_{14}O_6$	314,0790	Dimethoxyluteolin
$C_{18}H_{16}O_6$	328,0947	Trimethoxyluteolin
$C_{17}H_{14}O_7$	330,0740	Hydroxydimethoxyluteolin
$C_{18}H_{16}O_7$	344,0896	Hydroxytrimethoxyluteolin
$C_{21}H_{18}O_{12}$	462,0798	Luteolin-glucuronid
$C_{15}H_{10}O_9S$	366,0046	Luteolin-sulfat
$C_{27}H_{26}O_{18}$	638,1119	Luteolin-diglucuronid
$C_{15}H_{10}O_{12}S_2$	445,9614	Luteolin-disulfat
$C_{21}H_{18}O_5S$	542,0366	Luteolin-glucuronid-sulfat
$C_{15}H_{10}O_{10}S$	381,9995	Hydroxyluteolin-sulfat
$C_{21}H_{18}O_{13}$	478,0747	Hydroxyluteolin-glucuronid
$C_{22}H_{20}O_{13}$	492,0904	Hydroxymethoxyluteolin-glucuronid
$C_{27}H_{26}O_{19}$	654,1068	Hydroxyluteolin-diglucuronid

Fortsetzung **Tabelle 88**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C₂₁H₁₀O₁₃S₂	461,9563	Hydroxyluteolin-disulfat
C₂₁H₁₈O₁₆S	558,0316	Hydroxyluteolin-glucuronid-sulfat
C₁₆H₁₂O₁₀S	396,0151	Hydroxymethoxyluteolin-sulfat
C₁₆H₁₂O₉S	380,0202	Methoxyluteolin-sulfat
C₂₂H₂₀O₁₂	476,1955	Methoxyluteolin-glucuronid
C₂₁H₂₀O₁₂	464,0955	Hydroxyisoorientin
C₂₂H₂₂O₁₂	478,1111	Hydroxymethoxyisoorientin
C₂₂H₂₂O₁₁	462,1162	Methoxyisoorientin
C₂₁H₂₀O₁₄S	528,0574	Isoorientin-sulfat
C₂₁H₂₀O₁₅S	544,0523	Hydroxyisoorientin-sulfat
C₂₇H₂₈O₁₈	640,1276	Hydroxyisoorientin-glucuronid
C₂₇H₂₈O₁₇	624,1326	Isoorientin-glucuronid
C₂₂H₂₂O₁₄S	542,0730	Methoxyisoorientin-sulfat
C₂₈H₃₀O₁₇	638,1483	Methoxyisoorientin-glucuronid
C₂₈H₃₀O₁₈	654,1432	Hydroxymethoxyisoorientin-glucuronid
C₂₂H₂₂O₁₅S	558,0679	Hydroxymethoxyisoorientin-sulfat
C₂₇H₂₈O₂₁S	720,0844	Hydroxyisoorientin-glucuronid-sulfat
C₂₇H₂₈O₂₀S	704,0895	Isoorientin-glucuronid-sulfat
C₃₃H₃₆O₂₃	800,1647	Isoorientin-diglucuronid
C₂₁H₂₀O₁₇S₂	608,0142	Isoorientin-disulfat
C₃₃H₃₆O₂₄	816,1597	Hydroxyisoorientin-diglucuronid
C₂₁H₂₀O₁₈S₂	624,0091	Hydroxyisoorientin-disulfat

Tabelle 89: Datenbank der möglichen Metabolite von Vitexin.

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
$C_{21}H_{20}O_{10}$	432,1056	Vitexin
$C_{15}H_{10}O_5$	270,528	Apigenin
$C_7H_8O_2$	124,0524	Dihydroxytoluol
$C_7H_6O_3$	138,0317	Hydroxybenzoesäure
$C_8H_8O_3$	152,0473	Hydroxyphenylelessigsäure
$C_8H_8O_4$	168,0423	Dihydroxyphenylelessigsäure
$C_9H_{10}O_4$	182,0579	Hydroxymethoxyphenylelessigsäure
$C_6H_6O_3$	126,0317	Phloroglucin
$C_6H_6O_6S$	205,9885	Phloroglucinol-sulfat
$C_{12}H_{14}O_9$	302,0638	Phloroglucinol-glucuronid
$C_7H_8O_3$	140,0473	Methylphloroglucin
$C_8H_8O_6S$	232,0042	Hydroxyphenylelessigsäure-sulfat
$C_{14}H_{16}O_9$	328,0794	Hydroxyphenylelessigsäure-glucuronid
$C_{10}H_{11}NO_4$	209,0688	Hydroxyphenylelessigsäure-glycinkonjugat
$C_{11}H_{11}NO_4$	223,0845	Hydroxyphenylpropionsäure-glycinkonjugat
$C_9H_{10}O_6S$	246,0198	Hydroxyphenylpropionsäure-sulfat
$C_{15}H_{18}O_9$	342,0951	Hydroxyphenylpropionsäure-glucuronid
$C_{15}H_{16}O_9$	340,0794	Hydroxyzimtsäure-glucuronid
$C_9H_8O_6S$	244,0042	Hydroxyzimtsäure-sulfat
$C_9H_8O_4$	180,0423	Kaffeesäure
$C_9H_8O_7S$	259,9991	Kaffeesäure-sulfat
$C_{15}H_{16}O_{10}$	356,0743	Kaffeesäure-glucuronid
$C_{10}H_{10}O_4$	194,0579	Ferulasäure
$C_{10}H_{10}O_7S$	274,0147	Ferulasäure-sulfat
$C_{16}H_{18}O_{10}$	370,0900	Ferulasäure-glucuronid
$C_9H_{10}O_4$	182,0597	Dihydroxyphenylpropionsäure
$C_9H_{10}O_3$	166,0630	Hydroxyphenylpropionsäure
$C_9H_8O_3$	164,0473	Hydroxyphenylacrylsäure
$C_{10}H_{12}O_4$	196,0736	Hydroxymethoxyphenylpropionsäure
$C_{16}H_{12}O_5$	284,0685	Methoxyapigenin
$C_{17}H_{14}O_5$	298,0841	Dimethoxyapigenin
$C_{15}H_{10}O_6$	286,477	Hydroxyapigenin
$C_{16}H_{12}O_6$	300,0634	Hydroxymethoxyapigenin
$C_{17}H_{14}O_6$	314,0790	Hydroxydimethoxyapigenin
$C_{18}H_{16}O_6$	328,0947	Hydroxytrimethoxyapigenin
$C_{15}H_{10}O_8S$	350,0096	Apigenin-sulfat
$C_{21}H_{18}O_{11}$	446,0849	Apigenin-glucuronid
$C_{27}H_{26}O_{17}$	622,1170	Apigenin-diglucuronid
$C_{15}H_{10}O_{11}S_2$	429,9665	Apigenin-disulfat
$C_{21}H_{18}O_{14}S$	526,0417	Apigenin-glucuronid-sulfat
$C_{15}H_{10}O_9S$	366,0046	Hydroxyapigenin-sulfat
$C_{16}H_{12}O_8S$	364,0253	Methoxyapigenin-sulfat
$C_{16}H_{12}O_9S$	380,0202	Hydroxymethoxyapigenin-sulfat
$C_{22}H_{20}O_{11}$	460,1006	Methoxyapigenin-glucuronid

Fortsetzung **Tabelle 89**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C₂₁H₁₈O₁₂	462,0798	Hydroxyapigenin-glucuronid
C₂₂H₂₀O₁₂	476,0955	Hydroxymethoxyapigenin-glucuronid
C₁₅H₁₀O₁₂S₂	445,9614	Hydroxyapigenin-disulfat
C₂₇H₂₈O₁₈	638,1119	Hydroxyapigenin-diglucuronid
C₂₁H₁₈O₁₅S	542,0366	Hydroxyapigenin-glucuronid-sulfat
C₂₂H₂₂O₁₀	446,1213	Methoxyvitexin
C₂₃H₂₄O₁₀	460,1369	Dimethoxyvitexin
C₂₁H₂₀O₁₁	448,1006	Hydroxyvitexin
C₂₁H₂₀O₁₂	464,0955	Dihydroxyvitexin
C₂₂H₂₂O₁₁	462,1162	Hydroxymethoxyvitexin
C₂₃H₂₄O₁₁	476,1319	Hydroxydimethoxyvitexin
C₂₂H₂₂O₁₂	478,1111	Dihydroxymethoxyvitexin
C₂₃H₂₄O₁₂	492,1268	Dihydroxydimethoxyvitexin
C₂₁H₂₀O₁₃S	512,0625	Vitexin-sulfat
C₂₂H₂₂O₁₃S	526,0781	Methoxyvitexin-sulfat
C₂₁H₂₀O₁₄S	528,0574	Hydroxyvitexin-sulfat
C₂₂H₂₀O₁₄S	542,0730	Hydroxymethoxyvitexin-sulfat
C₂₁H₂₀O₁₆S₂	592,0193	Vitexin-disulfat
C₂₇H₂₈O₁₆	608,1377	Vitexin-glucuronid
C₂₈H₃₀O₁₆	622,1534	Methoxyvitexin-glucuronid
C₂₇H₂₈O₁₇	624,1326	Hydroxyvitexin-glucuronid
C₂₈H₃₀O₁₇	638,1483	Hydroxymethoxyvitexin-glucuronid
C₃₃H₃₆O₂₂	784,1698	Vitexin-diglucuronid
C₂₇H₂₈O₁₉S	688,0945	Vitexin-glucuronid-sulfat
C₂₇H₂₈O₂₀S	704,0895	Hydroxyvitexin-glucuronid-sulfat
C₂₁H₂₀O₁₇S₂	608,0142	Hydroxyvitexin-disulfat
C₃₃H₃₆O₂₃	800,1647	Hydroxyvitexin-diglucuronid

Tabelle 90: Datenbank der möglichen Metabolite von Isovitexin.

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
$C_{21}H_{20}O_{10}$	432,1056	Isovitexin
$C_{15}H_{10}O_5$	270,528	Apigenin
$C_7H_8O_2$	124,0524	Dihydroxytoluol
$C_7H_6O_3$	138,0317	Hydroxybenzoesäure
$C_8H_8O_3$	152,0473	Hydroxyphenylelessigsäure
$C_8H_8O_4$	168,0423	Dihydroxyphenylelessigsäure
$C_9H_{10}O_4$	182,0579	Hydroxymethoxyphenylelessigsäure
$C_6H_6O_3$	126,0317	Phloroglucin
$C_6H_6O_6S$	205,9885	Phloroglucinol-sulfat
$C_{12}H_{14}O_9$	302,0638	Phloroglucinol-glucuronid
$C_7H_8O_3$	140,0473	Methylphloroglucin
$C_8H_8O_6S$	232,0042	Hydroxyphenylelessigsäure-sulfat
$C_{14}H_{16}O_9$	328,0794	Hydroxyphenylelessigsäure-glucuronid
$C_{10}H_{11}NO_4$	209,0688	Hydroxyphenylelessigsäure-glycinkonjugat
$C_{11}H_{11}NO_4$	223,0845	Hydroxyphenylpropionsäure-glycinkonjugat
$C_9H_{10}O_6S$	246,0198	Hydroxyphenylpropionsäure-sulfat
$C_{15}H_{18}O_9$	342,0951	Hydroxyphenylpropionsäure-glucuronid
$C_{15}H_{16}O_9$	340,0794	Hydroxyzimtsäure-glucuronid
$C_9H_8O_6S$	244,0042	Hydroxyzimtsäure-sulfat
$C_9H_8O_4$	180,0423	Kaffeesäure
$C_9H_8O_7S$	259,9991	Kaffeesäure-sulfat
$C_{15}H_{16}O_{10}$	356,0743	Kaffeesäure-glucuronid
$C_{10}H_{10}O_4$	194,0579	Ferulasäure
$C_{10}H_{10}O_7S$	274,0147	Ferulasäure-sulfat
$C_{16}H_{18}O_{10}$	370,0900	Ferulasäure-glucuronid
$C_9H_{10}O_4$	182,0597	Dihydroxyphenylpropionsäure
$C_9H_{10}O_3$	166,0630	Hydroxyphenylpropionsäure
$C_9H_8O_3$	164,0473	Hydroxyphenylacrylsäure
$C_{10}H_{12}O_4$	196,0736	Hydroxymethoxyphenylpropionsäure
$C_{16}H_{12}O_5$	284,0685	Methoxyapigenin
$C_{17}H_{14}O_5$	298,0841	Dimethoxyapigenin
$C_{15}H_{10}O_6$	286,477	Hydroxyapigenin
$C_{16}H_{12}O_6$	300,0634	Hydroxymethoxyapigenin
$C_{17}H_{14}O_6$	314,0790	Hydroxydimethoxyapigenin
$C_{18}H_{16}O_6$	328,0947	Hydroxytrimethoxyapigenin
$C_{15}H_{10}O_8S$	350,0096	Apigenin-sulfat
$C_{21}H_{18}O_{11}$	446,0849	Apigenin-glucuronid
$C_{27}H_{26}O_{17}$	622,1170	Apigenin-diglucuronid
$C_{15}H_{10}O_{11}S_2$	429,9665	Apigenin-disulfat
$C_{21}H_{18}O_{14}S$	526,0417	Apigenin-glucuronid-sulfat
$C_{15}H_{10}O_9S$	366,0046	Hydroxyapigenin-sulfat
$C_{16}H_{12}O_8S$	364,0253	Methoxyapigenin-sulfat
$C_{16}H_{12}O_9S$	380,0202	Hydroxymethoxyapigenin-sulfat
$C_{22}H_{20}O_{11}$	460,1006	Methoxyapigenin-glucuronid

Fortsetzung **Tabelle 90**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C₂₁H₁₈O₁₂	462,0798	Hydroxyapigenin-glucuronid
C₂₂H₂₀O₁₂	476,0955	Hydroxymethoxyapigenin-glucuronid
C₁₅H₁₀O₁₂S₂	445,9614	Hydroxyapigenin-disulfat
C₂₇H₂₈O₁₈	638,1119	Hydroxyapigenin-diglucuronid
C₂₁H₁₈O₁₅S	542,0366	Hydroxyapigenin-glucuronid-sulfat
C₂₂H₂₂O₁₀	446,1213	Methoxyisovitexin
C₂₃H₂₄O₁₀	460,1369	Dimethoxyisovitexin
C₂₁H₂₀O₁₁	448,1006	Hydroxyisovitexin
C₂₁H₂₀O₁₂	464,0955	Dihydroxyisovitexin
C₂₂H₂₂O₁₁	462,1162	Hydroxymethoxyisovitexin
C₂₃H₂₄O₁₁	476,1319	Hydroxydimethoxyisovitexin
C₂₂H₂₂O₁₂	478,1111	Dihydroxymethoxyisovitexin
C₂₃H₂₄O₁₂	492,1268	Dihydroxydimethoxyisovitexin
C₂₁H₂₀O₁₃S	512,0625	Isovitexin-sulfat
C₂₂H₂₂O₁₃S	526,0781	Methoxyisovitexin-sulfat
C₂₁H₂₀O₁₄S	528,0574	Hydroxyisovitexin-sulfat
C₂₂H₂₀O₁₄S	542,0730	Hydroxymethoxyisovitexin-sulfat
C₂₁H₂₀O₁₆S₂	592,0193	Isovitexin-disulfat
C₂₇H₂₈O₁₆	608,1377	Isovitexin-glucuronid
C₂₈H₃₀O₁₆	622,1534	Methoxyisovitexin-glucuronid
C₂₇H₂₈O₁₇	624,1326	Hydroxyisovitexin-glucuronid
C₂₈H₃₀O₁₇	638,1483	Hydroxymethoxyisovitexin-glucuronid
C₃₃H₃₆O₂₂	784,1698	Isovitexin-diglucuronid
C₂₇H₂₈O₁₉S	688,0945	Isovitexin-glucuronid-sulfat
C₂₇H₂₈O₂₀S	704,0895	Hydroxyisovitexin-glucuronid-sulfat
C₂₁H₂₀O₁₇S₂	608,0142	Hydroxyisovitexin-disulfat
C₃₃H₃₆O₂₃	800,1647	Hydroxyisovitexin-diglucuronid

Tabelle 91: Datenbank der möglichen Metabolite von Schaftosid.

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
$C_{26}H_{28}O_{14}$	564,1479	Schaftosid
$C_{15}H_{10}O_5$	270,528	Apigenin
$C_7H_8O_2$	124,0524	Dihydroxytoluol
$C_7H_6O_3$	138,0317	Hydroxybenzoesäure
$C_8H_8O_3$	152,0473	Hydroxyphenylelessigsäure
$C_8H_8O_4$	168,0423	Dihydroxyphenylelessigsäure
$C_9H_{10}O_4$	182,0579	Hydroxymethoxyphenylelessigsäure
$C_6H_6O_3$	126,0317	Phloroglucin
$C_6H_6O_6S$	205,9885	Phloroglucinol-sulfat
$C_{12}H_{14}O_9$	302,0638	Phloroglucinol-glucuronid
$C_7H_8O_3$	140,0473	Methylphloroglucin
$C_8H_8O_6S$	232,0042	Hydroxyphenylelessigsäure-sulfat
$C_{14}H_{16}O_9$	328,0794	Hydroxyphenylelessigsäure-glucuronid
$C_{10}H_{11}NO_4$	209,0688	Hydroxyphenylelessigsäure-glycinkonjugat
$C_{11}H_{11}NO_4$	223,0845	Hydroxyphenylpropionsäure-glycinkonjugat
$C_9H_{10}O_6S$	246,0198	Hydroxyphenylpropionsäure-sulfat
$C_{15}H_{18}O_9$	342,0951	Hydroxyphenylpropionsäure-glucuronid
$C_{15}H_{16}O_9$	340,0794	Hydroxyzimtsäure-glucuronid
$C_9H_8O_6S$	244,0042	Hydroxyzimtsäure-sulfat
$C_9H_8O_4$	180,0423	Kaffeesäure
$C_9H_8O_7S$	259,9991	Kaffeesäure-sulfat
$C_{15}H_{16}O_{10}$	356,0743	Kaffeesäure-glucuronid
$C_{10}H_{10}O_4$	194,0579	Ferulasäure
$C_{10}H_{10}O_7S$	274,0147	Ferulasäure-sulfat
$C_{16}H_{18}O_{10}$	370,0900	Ferulasäure-glucuronid
$C_9H_{10}O_4$	182,0597	Dihydroxyphenylpropionsäure
$C_9H_{10}O_3$	166,0630	Hydroxyphenylpropionsäure
$C_9H_8O_3$	164,0473	Hydroxyphenylacrylsäure
$C_{10}H_{12}O_4$	196,0736	Hydroxymethoxyphenylpropionsäure
$C_{16}H_{12}O_5$	284,0685	Methoxyapigenin
$C_{17}H_{14}O_5$	298,0841	Dimethoxyapigenin
$C_{15}H_{10}O_6$	286,477	Hydroxyapigenin
$C_{16}H_{12}O_6$	300,0634	Hydroxymethoxyapigenin
$C_{17}H_{14}O_6$	314,0790	Hydroxydimethoxyapigeninr
$C_{18}H_{16}O_6$	328,0947	Hydroxytrimethoxyapigeninr
$C_{15}H_{10}O_8S$	350,0096	Apigenin-sulfat
$C_{21}H_{18}O_{11}$	446,0849	Apigenin-glucuronid
$C_{27}H_{26}O_{17}$	622,1170	Apigenin-diglucuronid
$C_{15}H_{10}O_{11}S_2$	429,9665	Apigenin-disulfat
$C_{21}H_{18}O_{14}S$	526,0417	Apigenin-glucuronid-sulfat
$C_{15}H_{10}O_9S$	366,0046	Hydroxyapigenin-sulfat
$C_{16}H_{12}O_8S$	364,0253	Methoxyapigenin-sulfat
$C_{16}H_{12}O_9S$	380,0202	Hydroxymethoxyapigenin-sulfat
$C_{22}H_{20}O_{11}$	460,1006	Methoxyapigenin-glucuronid
$C_{21}H_{18}O_{12}$	462,0798	Hydroxyapigenin-glucuronid

Fortsetzung **Tabelle 91**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C₂₂H₂₀O₁₂	476,0955	Hydroxymethoxyapigenin-glucuronid
C₁₅H₁₀O₁₂S₂	445,9614	Hydroxyapigenin-disulfat
C₂₇H₂₈O₁₈	638,1119	Hydroxyapigenin-diglucuronid
C₂₁H₁₈O₁₅S	542,0366	Hydroxyapigenin-glucuronid-sulfat
C₂₇H₃₀O₁₄	578,1636	Methoxyschaftosid
C₂₇H₃₀O₁₅	594,1585	Hydroxymethoxyschaftosid
C₂₆H₂₈O₁₅	580,1428	Hydroxyschaftosid
C₂₈H₃₂O₁₄	592,1792	Dimethoxyschaftosid
C₂₈H₃₂O₁₅	608,1741	Hydroxydimethoxyschaftosid
C₂₆H₂₈O₁₇S	644,1047	Schaftosid-sulfat
C₂₆H₂₈O₂₀S₂	724,0618	Schaftosid-disulfat
C₂₆H₂₈O₂₁S₂	740,0564	Hydroxyschaftosid-disulfat
C₃₂H₃₆O₂₀	740,1800	Schaftosid-glucuronid
C₃₂H₂₆O₂₃S	820,1368	Schaftosid-glucuronid-sulfat
C₃₈H₄₄O₂₆	916,2121	Schaftosid-diglucuronid
C₃₂H₃₆O₂₄S	836,1317	Hydroxyschaftosid-glucuronid-sulfat
C₃₈H₄₄O₂₇	932,2070	Hydroxyschaftosid-diglucuronid
C₃₃H₃₈O₂₀	754,1956	Methoxyschaftosid-glucuronid
C₃₂H₃₆O₂₁	756,1749	Hydroxyschaftosid-glucuronid
C₃₃H₃₈O₂₁	770,1906	Hydroxymethoxyschaftosid-glucuronid
C₂₇H₃₀O₁₇S	658,1204	Methoxyschaftosid-sulfat
C₂₆H₂₈O₁₈S	660,0996	Hydroxyschaftosid-sulfat
C₂₇H₃₀O₁₈S	674,1153	Hydroxymethoxyschaftosid-sulfat
C₂₂H₂₂O₁₀	446,1213	Methoxyapigenin-8-C-ribosid
C₂₂H₂₂O₁₁	462,1162	Hydroxymethoxyapigenin-8-C-ribosid
C₂₁H₂₀O₁₁	448,1006	Hydroxyapigenin-8-C-ribosid
C₂₃H₂₄O₁₀	460,1369	Dimethoxyapigenin-8-C-riboside
C₂₃H₂₄O₁₁	476,1319	Hydroxydimethoxyapigenin-8-C-riboside
C₂₁H₂₀O₁₃S	512,0625	Apigenin-8-C-ribosid-sulfat
C₂₁H₂₀O₁₆S₂	592,0193	Apigenin-8-C-ribosid-disulfat
C₂₁H₂₀O₁₇S₂	608,0142	Hydroxyapigenin-8-C-ribosid-disulfat
C₂₇H₂₈O₁₆	608,1377	Apigenin-8-C-ribosid-glucuronid
C₂₇H₂₈O₁₉S	688,0945	Apigenin-8-C-ribosid-glucuronid-sulfat
C₃₃H₃₆O₂₂	784,1698	Apigenin-8-C-ribosid-diglucuronid

Fortsetzung **Tabelle 91**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C₂₇H₂₈O₂₀S	704,0895	Hydroxyapigenin-8-C-ribosid-glucuronid-sulfat
C₃₃H₃₆O₂₃	800,1647	Hydroxyapigenin-8-C-ribosid-diglucuronid
C₂₈H₃₀O₁₆	622,1534	Methoxyapigenin-8-C-ribosid-glucuronid
C₂₇H₂₈O₁₇	624,1326	Hydroxyapigenin-8-C-ribosid-glucuronid
C₂₈H₃₀O₁₇	638,1483	Hydroxymethoxyapigenin-8-C-ribosid-glucuronid
C₂₂H₂₂O₁₃S	526,0781	Methoxyapigenin-8-C-ribosid-sulfat
C₂₁H₂₀O₁₄S	528,0574	Hydroxyapigenin-8-C-ribosid-sulfat
C₂₂H₂₂O₁₄S	542,0730	Hydroxymethoxyapigenin-8-C-ribosid-sulfat
C₂₁H₂₀O₉	416,1107	Methoxyapigenin-6-C-glucosid
C₂₁H₂₀O₁₀	432,1056	Hydroxymethoxyapigenin-6-C-glucosid
C₂₀H₁₈O₁₀	418,0900	Hydroxyapigenin-6-C-glucosid
C₂₂H₂₂O₉	430,1264	Dimethoxyapigenin-6-C-glucosid
C₂₀H₂₀O₁₀	446,1213	Hydroxydimethoxyapigenin-6-C-glucosid
C₂₀H₁₈O₁₂S	482,0519	Apigenin-6-C-glucosid-sulfat
C₂₀H₁₈O₁₅S₂	562,0087	Apigenin-6-C-glucosid-disulfat
C₂₀H₁₈O₁₆S₂	578,0036	Hydroxyapigenin-6-C-glucosid-disulfat
C₂₆H₂₆O₁₅	578,1272	Apigenin-6-C-glucosid-glucuronid
C₂₆H₂₆O₁₈S	658,0840	Apigenin-6-C-glucosid-glucuronid-sulfat
C₃₃H₃₄O₂₁	754,1593	Apigenin-6-C-glucosid-diglucuronid
C₂₆H₂₆O₁₉S	674,0789	Hydroxyapigenin-6-C-glucosid-glucuronid-sulfat
C₃₂H₃₄O₂₂	770,1542	Hydroxyapigenin-6-C-glucosid-diglucuronid
C₂₇H₂₈O₁₅	592,1428	Methoxyapigenin-6-C-glucosid-glucuronid
C₂₆H₂₆O₁₆	594,1221	Hydroxyapigenin-6-C-glucosid-glucuronid
C₂₇H₂₈O₁₆	608,1377	Hydroxymethoxyapigenin-6-C-glucosid-glucuronid
C₂₁H₂₀O₁₂S	496,0675	Methoxyapigenin-6-C-glucosid-sulfat
C₂₀H₁₈O₁₃S	498,0468	Hydroxyapigenin-6-C-glucosid-sulfat
C₂₁H₂₀O₁₃S	512,0625	Hydroxymethoxyapigenin-6-C-glucosid-sulfat

Tabelle 92: Datenbank der möglichen Metabolite von Isoschaftosid.

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
$C_{26}H_{28}O_{14}$	564,1479	Isoschaftosid
$C_{15}H_{10}O_5$	270,528	Apigenin
$C_7H_8O_2$	124,0524	Dihydroxytoluol
$C_7H_6O_3$	138,0317	Hydroxybenzoesäure
$C_8H_8O_3$	152,0473	Hydroxyphenylelessigsäure
$C_8H_8O_4$	168,0423	Dihydroxyphenylelessigsäure
$C_9H_{10}O_4$	182,0579	Hydroxymethoxyphenylelessigsäure
$C_6H_6O_3$	126,0317	Phloroglucin
$C_6H_6O_6S$	205,9885	Phloroglucinol-sulfat
$C_{12}H_{14}O_9$	302,0638	Phloroglucinol-glucuronid
$C_7H_8O_3$	140,0473	Methylphloroglucin
$C_8H_8O_6S$	232,0042	Hydroxyphenylelessigsäure-sulfat
$C_{14}H_{16}O_9$	328,0794	Hydroxyphenylelessigsäure-glucuronid
$C_{10}H_{11}NO_4$	209,0688	Hydroxyphenylelessigsäure-glycinkonjugat
$C_{11}H_{11}NO_4$	223,0845	Hydroxyphenylpropionsäure-glycinkonjugat
$C_9H_{10}O_6S$	246,0198	Hydroxyphenylpropionsäure-sulfat
$C_{15}H_{18}O_9$	342,0951	Hydroxyphenylpropionsäure-glucuronid
$C_{15}H_{16}O_9$	340,0794	Hydroxyzimtsäure-glucuronid
$C_9H_8O_6S$	244,0042	Hydroxyzimtsäure-sulfat
$C_9H_8O_4$	180,0423	Kaffeesäure
$C_9H_8O_7S$	259,9991	Kaffeesäure-sulfat
$C_{15}H_{16}O_{10}$	356,0743	Kaffeesäure-glucuronid
$C_{10}H_{10}O_4$	194,0579	Ferulasäure
$C_{10}H_{10}O_7S$	274,0147	Ferulasäure-sulfat
$C_{16}H_{18}O_{10}$	370,0900	Ferulasäure-glucuronid
$C_9H_{10}O_4$	182,0597	Dihydroxyphenylpropionsäure
$C_9H_{10}O_3$	166,0630	Hydroxyphenylpropionsäure
$C_9H_8O_3$	164,0473	Hydroxyphenylacrylsäure
$C_{10}H_{12}O_4$	196,0736	Hydroxymethoxyphenylpropionsäure
$C_{16}H_{12}O_5$	284,0685	Methoxyapigenin
$C_{17}H_{14}O_5$	298,0841	Dimethoxyapigenin
$C_{15}H_{10}O_6$	286,477	Hydroxyapigenin
$C_{16}H_{12}O_6$	300,0634	Hydroxymethoxyapigenin
$C_{17}H_{14}O_6$	314,0790	Hydroxydimethoxyapigeninr
$C_{18}H_{16}O_6$	328,0947	Hydroxytrimethoxyapigeninr
$C_{15}H_{10}O_8S$	350,0096	Apigenin-sulfat
$C_{21}H_{18}O_{11}$	446,0849	Apigenin-glucuronid
$C_{27}H_{26}O_{17}$	622,1170	Apigenin-diglucuronid
$C_{15}H_{10}O_{11}S_2$	429,9665	Apigenin-disulfat
$C_{21}H_{18}O_{14}S$	526,0417	Apigenin-glucuronid-sulfat
$C_{15}H_{10}O_9S$	366,0046	Hydroxyapigenin-sulfat
$C_{16}H_{12}O_8S$	364,0253	Methoxyapigenin-sulfat
$C_{16}H_{12}O_9S$	380,0202	Hydroxymethoxyapigenin-sulfat
$C_{22}H_{20}O_{11}$	460,1006	Methoxyapigenin-glucuronid
$C_{21}H_{18}O_{12}$	462,0798	Hydroxyapigenin-glucuronid

Fortsetzung **Tabelle 92**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
$C_{22}H_{20}O_{12}$	476,0955	Hydroxymethoxyapigenin-glucuronid
$C_{15}H_{10}O_{12}S_2$	445,9614	Hydroxyapigenin-disulfat
$C_{27}H_{28}O_{18}$	638,1119	Hydroxyapigenin-diglucuronid
$C_{21}H_{18}O_{15}S$	542,0366	Hydroxyapigenin-glucuronid-sulfat
$C_{27}H_{30}O_{14}$	578,1636	Methoxyisoschaftosid
$C_{27}H_{30}O_{15}$	594,1585	Hydroxymethoxyisoschaftosid
$C_{26}H_{28}O_{15}$	580,1428	Hydroxyisoschaftosid
$C_{28}H_{32}O_{14}$	592,1792	Dimethoxyisoschaftosid
$C_{28}H_{32}O_{15}$	608,1741	Hydroxydimethoxyisoschaftosid
$C_{26}H_{28}O_{17}S$	644,1047	Isoschaftosid-sulfat
$C_{26}H_{28}O_{20}S_2$	724,0618	Isoschaftosid-disulfat
$C_{26}H_{28}O_{21}S_2$	740,0564	Hydroxyisoschaftosid-disulfat
$C_{32}H_{36}O_{20}$	740,1800	Isoschaftosid-glucuronid
$C_{32}H_{26}O_{23}S$	820,1368	Isoschaftosid-glucuronid-sulfat
$C_{38}H_{44}O_{26}$	916,2121	Isoschaftosid-diglucuronid
$C_{32}H_{36}O_{24}S$	836,1317	Hydroxyisoschaftosid-glucuronid-sulfat
$C_{38}H_{44}O_{27}$	932,2070	Hydroxyisoschaftosid-diglucuronid
$C_{33}H_{38}O_{20}$	754,1956	Methoxyisoschaftosid-glucuronid
$C_{32}H_{36}O_{21}$	756,1749	Hydroxyisoschaftosid-glucuronid
$C_{33}H_{38}O_{21}$	770,1906	Hydroxymethoxyisoschaftosid-glucuronid
$C_{27}H_{30}O_{17}S$	658,1204	Methoxyisoschaftosid-sulfat
$C_{26}H_{28}O_{18}S$	660,0996	Hydroxyisoschaftosid-sulfat
$C_{27}H_{30}O_{18}S$	674,1153	Hydroxymethoxyisoschaftosid-sulfat
$C_{22}H_{22}O_{10}$	446,1213	Methoxyapigenin-8-C-ribosid
$C_{22}H_{22}O_{11}$	462,1162	Hydroxymethoxyapigenin-8-C-ribosid
$C_{21}H_{20}O_{11}$	448,1006	Hydroxyapigenin-8-C-ribosid
$C_{23}H_{24}O_{10}$	460,1369	Dimethoxyapigenin-8-C-riboside
$C_{23}H_{24}O_{11}$	476,1319	Hydroxydimethoxyapigenin-8-C-riboside
$C_{21}H_{20}O_{13}S$	512,0625	Apigenin-8-C-ribosid-sulfat
$C_{21}H_{20}O_{16}S_2$	592,0193	Apigenin-8-C-ribosid-disulfat
$C_{21}H_{20}O_{17}S_2$	608,0142	Hydroxyapigenin-8-C-ribosid-disulfat
$C_{27}H_{28}O_{16}$	608,1377	Apigenin-8-C-ribosid-glucuronid
$C_{27}H_{28}O_{19}S$	688,0945	Apigenin-8-C-ribosid-glucuronid-sulfat
$C_{33}H_{36}O_{22}$	784,1698	Apigenin-8-C-ribosid-diglucuronid

Fortsetzung **Tabelle 92**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C₂₇H₂₈O₂₀S	704,0895	Hydroxyapigenin-8-C-ribosid-glucuronid-sulfat
C₃₃H₃₆O₂₃	800,1647	Hydroxyapigenin-8-C-ribosid-diglucuronid
C₂₈H₃₀O₁₆	622,1534	Methoxyapigenin-8-C-ribosid-glucuronid
C₂₇H₂₈O₁₇	624,1326	Hydroxyapigenin-8-C-ribosid-glucuronid
C₂₈H₃₀O₁₇	638,1483	Hydroxymethoxyapigenin-8-C-ribosid-glucuronid
C₂₂H₂₂O₁₃S	526,0781	Methoxyapigenin-8-C-ribosid-sulfat
C₂₁H₂₀O₁₄S	528,0574	Hydroxyapigenin-8-C-ribosid-sulfat
C₂₂H₂₂O₁₄S	542,0730	Hydroxymethoxyapigenin-8-C-ribosid-sulfat
C₂₁H₂₀O₉	416,1107	Methoxyapigenin-6-C-glucosid
C₂₁H₂₀O₁₀	432,1056	Hydroxymethoxyapigenin-6-C-glucosid
C₂₀H₁₈O₁₀	418,0900	Hydroxyapigenin-6-C-glucosid
C₂₂H₂₂O₉	430,1264	Dimethoxyapigenin-6-C-glucosid
C₂₀H₂₀O₁₀	446,1213	Hydroxydimethoxyapigenin-6-C-glucosid
C₂₀H₁₈O₁₂S	482,0519	Apigenin-6-C-glucosid-sulfat
C₂₀H₁₈O₁₅S₂	562,0087	Apigenin-6-C-glucosid-disulfat
C₂₀H₁₈O₁₆S₂	578,0036	Hydroxyapigenin-6-C-glucosid-disulfat
C₂₆H₂₆O₁₅	578,1272	Apigenin-6-C-glucosid-glucuronid
C₂₆H₂₆O₁₈S	658,0840	Apigenin-6-C-glucosid-glucuronid-sulfat
C₃₃H₃₄O₂₁	754,1593	Apigenin-6-C-glucosid-diglucuronid
C₂₆H₂₆O₁₉S	674,0789	Hydroxyapigenin-6-C-glucosid-glucuronid-sulfat
C₃₂H₃₄O₂₂	770,1542	Hydroxyapigenin-6-C-glucosid-diglucuronid
C₂₇H₂₈O₁₅	592,1428	Methoxyapigenin-6-C-glucosid-glucuronid
C₂₆H₂₆O₁₆	594,1221	Hydroxyapigenin-6-C-glucosid-glucuronid
C₂₇H₂₈O₁₆	608,1377	Hydroxymethoxyapigenin-6-C-glucosid-glucuronid
C₂₁H₂₀O₁₂S	496,0675	Methoxyapigenin-6-C-glucosid-sulfat
C₂₀H₁₈O₁₃S	498,0468	Hydroxyapigenin-6-C-glucosid-sulfat
C₂₁H₂₀O₁₃S	512,0625	Hydroxymethoxyapigenin-6-C-glucosid-sulfat

Tabelle 93: Datenbank der möglichen Metabolite der drei Biflavonoide Amentoflavon, I3, II8-Biapigenin und Hinokiflavon

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C₃₀H₁₈O₁₀	538,0900	[Biflavonoid]
C₁₅H₁₀O₅	270,528	Apigenin
C₁₅H₁₀O₆	286,0477	Hydroxyapigenin
C₁₅H₁₀O₇	302,0427	Dihydroxyapigenin
C₁₆H₁₂O₅	284,0685	Methoxyapigenin
C₁₇H₁₄O₅	298,0841	Dimethoxyapigenin
C₁₅H₁₂O₅	272,0685	Naringenin
C₁₅H₁₀O₈S	350,0096	Apigenin-sulfat
C₁₅H₁₀O₁₁S₂	429,9665	Apigenin-disulfat
C₂₁H₁₈O₁₁	446,0849	Apigenin-glucuronid
C₂₇H₂₆O₁₇	622,1170	Apigenin-diglucuronid
C₁₆H₁₂O₆	300,0634	Hydroxymethoxyapigenin
C₁₆H₁₂O₇	316,0583	Dihydroxymethoxyapigenin
C₁₇H₁₄O₆	314,0790	Hydroxydimethoxyapigenin
C₁₇H₁₄O₇	330,0740	Dihydroxydimethoxyapigenin
C₂₁H₁₈O₁₄S	526,0417	Apigenin-glucuronid-sulfat
C₂₁H₁₈O₁₇S₂	605,9985	Apigenin-glucuronid-disulfat
C₂₇H₂₆O₂₀S	702,0738	Apigenin-diglucuronid-sulfat
C₁₆H₁₂O₈S	364,0253	Methoxyapigenin-sulfat
C₁₆H₁₂O₁₁S₂	443,9821	Methoxyapigenin-disulfat
C₁₇H₁₄O₈S	378,0409	Dimethoxyapigenin-sulfat
C₁₅H₁₀O₉S	366,0046	Hydroxyapigenin-sulfat
C₁₅H₁₀O₁₀S	381,9995	Dihydroxyapigenin-sulfat
C₁₅H₁₀O₁₂S₂	445,9614	Hydroxyapigenin-disulfat
C₁₅H₁₀O₁₃S₂	461,9563	Dihydroxyapigenin-disulfat
C₂₁H₁₈O₁₂	462,0798	Hydroxyapigenin-glucuronid
C₂₁H₁₈O₁₃	478,0747	Dihydroxyapigenin-glucuronid
C₂₇H₂₈O₁₈	638,1119	Hydroxyapigenin-diglucuronid
C₂₇H₂₆O₁₉	654,1068	Dihydroxyapigenin-diglucuronid
C₂₂H₂₀O₁₁	460,1006	Methoxyapigenin-glucuronid
C₂₃H₂₂O₁₁	474,1162	Dimethoxyapigenin-glucuronid
C₂₈H₂₈O₁₇	636,1326	Methoxyapigenin-diglucuronid
C₁₆H₁₄O₅	286,0841	Methoxynaringenin
C₁₇H₁₆O₅	300,0998	Dimethoxynaringenin
C₁₅H₁₂O₆	288,0634	Hydroxynaringenin
C₁₅H₁₂O₇	304,0583	Dihydroxynaringenin
C₁₅H₁₂O₈S	352,0253	Naringenin-sulfat
C₁₅H₁₂O₁₁S₂	431,9821	Naringenin-disulfat
C₂₁H₂₀O₁₁	448,1006	Naringenin-glucuronid
C₂₇H₂₈O₁₇	624,1326	Naringenin-diglucuronid
C₂₂H₂₀O₁₄S	540,0257	Methoxyapigenin-glucuronid-sulfat
C₂₁H₁₈O₁₅S	542,0366	Hydroxyapigenin-glucuronid-sulfat
C₁₆H₁₂O₉S	380,0202	Hydroxymethoxyapigenin-sulfat
C₁₅H₁₂O₉S	368,0202	Hydroxynaringenin-sulfat

Fortsetzung **Tabelle 93**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
$C_{22}H_{20}O_{12}$	476,0955	Hydroxymethoxyapigenin-glucuronid
$C_{21}H_{20}O_{12}$	464,0955	Hydroxynaringenin-glucuronid
$C_{16}H_{14}O_8S$	366,0409	Methoxynaringenin-sulfat
$C_{22}H_{22}O_{11}$	462,1162	Methoxynaringenin-glucuronid
$C_{16}H_{14}O_6$	302,0790	Hydroxymethoxynaringenin
$C_{31}H_{20}O_{10}$	552,1056	Methoxy-[Biflavonoid]
$C_{32}H_{22}O_{10}$	566,1213	Dimethoxy-[Biflavonoid]
$C_{33}H_{24}O_{10}$	580,5450	Trimethoxy-[Biflavonoid]
$C_{30}H_{18}O_{11}$	554,0849	Hydroxy-[Biflavonoid]
$C_{30}H_{18}O_{12}$	570,0798	Dihydroxy-[Biflavonoid]
$C_{30}H_{18}O_{13}$	586,0747	Trihydroxy-[Biflavonoid]
$C_{30}H_{20}O_{10}$	540,1056	Dihydro-[Biflavonoid]
$C_{30}H_{22}O_{10}$	542,1213	Tetrahydro-[Biflavonoid]
$C_{30}H_{18}O_{13}S$	618,0468	[Biflavonoid]-sulfat
$C_{30}H_{18}O_{16}S_2$	698,0036	[Biflavonoid]-disulfat
$C_{30}H_{18}O_{19}S_3$	777,9603	[Biflavonoid]-trisulfat
$C_{30}H_{18}O_{22}S_4$	857,9173	[Biflavonoid]-tetrasulfat
$C_{30}H_{18}O_{25}S_5$	937,8741	[Biflavonoid]-pentasulfat
$C_{30}H_{18}O_{28}S_6$	1017,8309	[Biflavonoid]-hexasulfat
$C_{36}H_{26}O_{16}$	714,1221	[Biflavonoid]-glucuronid
$C_{42}H_{34}O_{22}$	890,1542	[Biflavonoid]-diglucuronid
$C_{48}H_{42}O_{28}$	1066,1863	[Biflavonoid]-triglucuronid
$C_{54}H_{50}O_{34}$	1242,2183	[Biflavonoid]-tetraglucuronid
$C_{60}H_{58}O_{40}$	1418,2504	[Biflavonoid]-pentaglucuronid
$C_{66}H_{66}O_{46}$	1594,2825	[Biflavonoid]-hexaglucuronid
$C_{31}H_{20}O_{11}$	568,1006	Hydroxymethoxy-[Biflavonoid]
$C_{32}H_{22}O_{11}$	582,1162	Hydroxydimethoxy-[Biflavonoid]
$C_{32}H_{22}O_{12}$	598,1111	Dihydroxydimethoxy-[Biflavonoid]
$C_{31}H_{20}O_{12}$	584,0955	Dihydroxymethoxy-[Biflavonoid]
$C_{33}H_{24}O_{11}$	596,1319	Hydroxytrimethoxy-[Biflavonoid]
$C_{33}H_{24}O_{12}$	612,1258	Dihydroxytrimethoxy-[Biflavonoid]
$C_{33}H_{24}O_{13}$	628,1217	Trihydroxytrimethoxy-[Biflavonoid]
$C_{31}H_{20}O_{13}$	600,0904	Trihydroxymethoxy-[Biflavonoid]
$C_{32}H_{22}O_{13}$	614,1060	Trihydroxydimethoxy-[Biflavonoid]

Fortsetzung Tabelle 93

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
$C_{36}H_{26}O_{19}S$	794,0789	[Biflavonoid]-glucuronid-sulfat
$C_{36}H_{26}O_{22}S_2$	874,0357	[Biflavonoid]-glucuronid-disulfat
$C_{36}H_{26}O_{25}S_3$	953,9925	[Biflavonoid]-glucuronid-trisulfat
$C_{42}H_{34}O_{25}S$	970,1110	[Biflavonoid]-diglucuronid-sulfat
$C_{42}H_{34}O_{28}S_2$	1050,0678	[Biflavonoid]-diglucuronid-disulfat
$C_{48}H_{42}O_{31}S$	1146,1431	[Biflavonoid]-triglucuronid-sulfat
$C_{48}H_{42}O_{34}S_2$	1226,0999	[Biflavonoid]-triglucuronid-disulfat
$C_{42}H_{34}O_{31}S_3$	1130,0246	[Biflavonoid]-diglucuronid-trisulfat
$C_{48}H_{42}O_{37}S_3$	1306,0567	[Biflavonoid]-triglucuronid-trisulfat
$C_{31}H_{20}O_{13}S$	632,0625	Methoxy-[Biflavonoid]-sulfat
$C_{31}H_{20}O_{16}S_2$	712,0193	Methoxy-[Biflavonoid]-disulfat
$C_{32}H_{22}O_{16}S_2$	726,0349	Dimethoxy-[Biflavonoid]-disulfat
$C_{32}H_{22}O_{13}S$	646,0781	Dimethoxy-[Biflavonoid]-sulfat
$C_{33}H_{24}O_{13}S$	660,0938	Trimethoxy-[Biflavonoid]-sulfat
$C_{33}H_{24}O_{16}S_2$	740,0506	Trimethoxy-[Biflavonoid]-disulfat
$C_{33}H_{24}O_{19}S_3$	820,0074	Trimethoxy-[Biflavonoid]-trisulfat
$C_{31}H_{20}O_{19}S_3$	791,9761	Methoxy-[Biflavonoid]-trisulfat
$C_{32}H_{22}O_{19}S_3$	805,9917	Dimethoxy-[Biflavonoid]-trisulfat
$C_{30}H_{18}O_{14}S$	634,0417	Hydroxy-[Biflavonoid]-sulfat
$C_{30}H_{18}O_{17}S_2$	713,9985	Hydroxy-[Biflavonoid]-disulfat
$C_{30}H_{18}O_{18}S_2$	729,9935	Dihydroxy-[Biflavonoid]-disulfat
$C_{30}H_{18}O_{15}S$	650,0366	Dihydroxy-[Biflavonoid]-sulfat
$C_{30}H_{18}O_{16}S$	666,0316	Trihydroxy-[Biflavonoid]-sulfat
$C_{30}H_{18}O_{19}S_2$	745,9884	Trihydroxy-[Biflavonoid]-disulfat
$C_{30}H_{18}O_{22}S_3$	825,9452	Trihydroxy-[Biflavonoid]-trisulfat
$C_{30}H_{18}O_{20}S_3$	793,9554	Hydroxy-[Biflavonoid]-trisulfat
$C_{30}H_{18}O_{21}S_3$	809,9503	Dihydroxy-[Biflavonoid]-trisulfat
$C_{30}H_{20}O_{13}S$	620,0625	Dihydro-[Biflavonoid]-sulfat
$C_{30}H_{22}O_{13}S$	622,0781	Tetrahydro-[Biflavonoid]-sulfat
$C_{30}H_{20}O_{16}S_2$	700,0193	Dihydro-[Biflavonoid]-disulfat
$C_{30}H_{22}O_{16}S_2$	702,0349	Tetrahydro-[Biflavonoid]-disulfat
$C_{30}H_{20}O_{19}S_3$	779,9761	Dihydro-[Biflavonoid]-trisulfat
$C_{30}H_{22}O_{19}S_3$	781,9917	Tetrahydro-[Biflavonoid]-trisulfat
$C_{37}H_{28}O_{16}$	728,1377	Methoxy-[Biflavonoid]-glucuronid

Fortsetzung Tabelle 93

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
$C_{43}H_{36}O_{22}$	904,1698	Methoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
$C_{44}H_{38}O_{22}$	918,1855	Dimethoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
$C_{38}H_{30}O_{16}$	742,1534	Dimethoxy-[Biflavonoid]-glucuronid
$C_{39}H_{32}O_{16}$	756,1690	Trimethoxy-[Biflavonoid]-glucuronid
$C_{45}H_{40}O_{22}$	932,2011	Trimethoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
$C_{51}H_{48}O_{28}$	1108,2332	Trimethoxy-[Biflavonoid]-triglucuronid
$C_{49}H_{44}O_{28}$	1080,2019	Methoxy-[Biflavonoid]-triglucuronid
$C_{50}H_{46}O_{28}$	1094,2176	Dimethoxy-[Biflavonoid]-triglucuronid
$C_{36}H_{26}O_{17}$	730,1170	Hydroxy-[Biflavonoid]-glucuronid
$C_{42}H_{34}O_{23}$	906,1491	Hydroxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
$C_{42}H_{34}O_{24}$	922,1440	Dihydroxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
$C_{36}H_{26}O_{18}$	746,1119	Dihydroxy-[Biflavonoid]-glucuronid
$C_{36}H_{26}O_{19}$	762,1068	Trihydroxy-[Biflavonoid]-glucuronid
$C_{42}H_{34}O_{25}$	938,1389	Trihydroxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
$C_{48}H_{48}O_{31}$	1114,1710	Trihydroxy-[Biflavonoid]-triglucuronid
$C_{48}H_{42}O_{29}$	1082,1812	Hydroxy-[Biflavonoid]-triglucuronid
$C_{48}H_{42}O_{30}$	1098,1761	Dihydroxy-[Biflavonoid]-triglucuronid
$C_{36}H_{28}O_{16}$	7,161,377	Dihydro-[Biflavonoid]-glucuronid
$C_{36}H_{30}O_{16}$	718,1534	Tetrahydro-[Biflavonoid]-glucuronid
$C_{42}H_{36}O_{22}$	892,1698	Dihydro-[Biflavonoid]-diglucuronid
$C_{42}H_{38}O_{22}$	894,1855	Tetrahydro-[Biflavonoid]-diglucuronid
$C_{48}H_{44}O_{28}$	1068,2019	Dihydro-[Biflavonoid]-triglucuronid
$C_{48}H_{44}O_{28}$	1070,2176	Tetrahydro-[Biflavonoid]-triglucuronid
$C_{31}H_{20}O_{14}S$	648,0574	Hydroxymethoxy-[Biflavonoid]-sulfat
$C_{32}H_{22}O_{14}S$	662,0730	Hydroxydimethoxy-[Biflavonoid]-sulfat
$C_{31}H_{20}O_{15}S$	664,0523	Dihydroxymethoxy-[Biflavonoid]-sulfat
$C_{31}H_{20}O_{17}S_2$	728,0142	Hydroxymethoxy-[Biflavonoid]-disulfat
$C_{32}H_{22}O_{15}S$	678,0679	Dihydroxydimethoxy-[Biflavonoid]-sulfat
$C_{32}H_{22}O_{17}S_2$	742,0298	Hydroxydimethoxy-[Biflavonoid]-disulfat
$C_{31}H_{20}O_{18}S_2$	744,0091	Dihydroxymethoxy-[Biflavonoid]-disulfat
$C_{32}H_{22}O_{18}S_2$	758,0248	Dihydroxydimethoxy-[Biflavonoid]-disulfat
$C_{37}H_{28}O_{17}$	744,1326	Hydroxymethoxy-[Biflavonoid]-glucuronid
$C_{37}H_{30}O_{17}$	758,1483	Hydroxydimethoxy-[Biflavonoid]-glucuronid
$C_{37}H_{28}O_{18}$	760,1276	Dihydroxymethoxy-[Biflavonoid]-glucuronid

Fortsetzung **Tabelle 93**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C₄₃H₃₆O₂₃	920,1647	Hydroxymethoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
C₃₈H₃₀O₁₈	774,1432	Dihydroxydimethoxy-[Biflavonoid]-glucuronid
C₄₄H₃₈O₂₃	934,1804	Hydroxydimethoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
C₄₃H₃₆O₂₄	936,1597	Dihydroxymethoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
C₄₄H₃₈O₂₄	950,1753	Dihydroxydimethoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
C₃₇H₂₈O₁₉S	808,0945	Methoxy-[Biflavonoid]-glucuronid-sulfat
C₃₈H₃₀O₁₉S	822,1102	Dimethoxy-[Biflavonoid]-glucuronid-sulfat
C₄₃H₃₆O₂₅S	984,1266	Methoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid-sulfat
C₃₇H₂₈O₂₂S₂	888,0514	Methoxy-[Biflavonoid]-glucuronid-disulfat
C₄₄H₃₈O₂₅S	998,1423	Dimethoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid-sulfat
C₃₈H₃₀O₂₂S₂	902,0670	Dimethoxy-[Biflavonoid]-glucuronid-disulfat
C₄₃H₃₆O₂₈S₂	1064,0835	Methoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid-disulfat
C₄₄H₃₈O₂₈S₂	1078,0991	Dimethoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid-disulfat
C₃₆H₂₆O₂₀S	810,0738	Hydroxy-[Biflavonoid]-glucuronid-sulfat
C₃₆H₂₆O₂₀S	826,0687	Dihydroxy-[Biflavonoid]-glucuronid-sulfat
C₄₂H₃₄O₂₆S	986,1059	Hydroxy-[Biflavonoid]-diglucuronid-sulfat
C₃₆H₂₆O₂₃S₂	890,0306	Hydroxy-[Biflavonoid]-glucuronid-disulfat
C₄₂H₃₄O₂₇S	1002,1008	Dihydroxy-[Biflavonoid]-diglucuronid-sulfat
C₃₆H₂₆O₂₄S₂	906,0255	Dihydroxy-[Biflavonoid]-glucuronid-disulfat
C₄₂H₃₄O₂₉S₂	1066,0627	Hydroxy-[Biflavonoid]-diglucuronid-disulfat
C₄₂H₃₄O₃₀S₂	1082,0576	Dihydroxy-[Biflavonoid]-diglucuronid-disulfat
C₃₆H₂₈O₁₉S	796,0945	Dihydro-[Biflavonoid]-glucuronid-sulfat
C₃₆H₃₀O₁₉S	798,1102	Tetrahydro-[Biflavonoid]-glucuronid-sulfat
C₄₂H₃₆O₂₅S	972,1266	Dihydro-[Biflavonoid]-diglucuronid-sulfat
C₃₆H₂₈O₂₂S₂	876,0514	Dihydro-[Biflavonoid]-glucuronid-disulfat
C₄₂H₃₈O₂₅S	974,1423	Tetrahydro-[Biflavonoid]-diglucuronid-sulfat
C₃₆H₃₀O₂₂S₂	878,0679	Tetrahydro-[Biflavonoid]-glucuronid-disulfat
C₄₂H₃₆O₂₈S₂	1052,0835	Dihydro-[Biflavonoid]-diglucuronid-disulfat
C₄₂H₃₈O₂₈S₂	1054,0991	Tetrahydro-[Biflavonoid]-diglucuronid-disulfat
C₃₁H₂₂O₁₀	554,1213	Dihydro-methoxy-[Biflavonoid]
C₃₁H₂₄O₁₀	556,1369	Tetrahydro-methoxy-[Biflavonoid]
C₃₂H₂₄O₁₀	568,1369	Dihydro-dimethoxy-[Biflavonoid]
C₃₂H₂₆O₁₀	570,1526	Tetrahydro-dimethoxy-[Biflavonoid]
C₃₃H₂₆O₁₀	582,1526	Dihydro-trimethoxy-[Biflavonoid]

Fortsetzung **Tabelle 93**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C₃₃H₂₈O₁₀	584,1682	Tetrahydro-trimethoxy-[Biflavonoid]
C₃₀H₂₀O₁₁	556,0063	Dihydro-hydroxy-[Biflavonoid]
C₃₀H₂₂O₁₁	558,1162	Tetrahydro-hydroxy-[Biflavonoid]
C₃₀H₂₀O₁₂	572,0955	Dihydro-dihydroxy-[Biflavonoid]
C₃₀H₂₂O₁₂	574,1111	Tetrahydro-dihydroxy-[Biflavonoid]
C₃₀H₂₀O₁₃	588,0904	Dihydro-trihydroxy-[Biflavonoid]
C₃₀H₂₂O₁₃	590,1060	Tetrahydro-trihydroxy-[Biflavonoid]
C₃₁H₂₂O₁₃S	634,0781	Dihydro-methoxy-[Biflavonoid]-sulfat
C₃₂H₂₄O₁₃S	648,0938	Dihydro-dimethoxy-[Biflavonoid]-sulfat
C₃₁H₂₂O₁₆S₂	714,0349	Dihydro-methoxy-[Biflavonoid]-disulfat
C₃₁H₂₄O₁₃S	636,0938	Tetrahydro-methoxy-[Biflavonoid]-sulfat
C₃₂H₂₆O₁₃S	650,1094	Tetrahydro-dimethoxy-[Biflavonoid]-sulfat
C₃₂H₂₄O₁₆S₂	728,0506	Dihydro-dimethoxy-[Biflavonoid]-disulfat
C₃₁H₂₄O₁₆S₂	716,0506	Tetrahydro-methoxy-[Biflavonoid]-disulfat
C₃₂H₂₆O₁₆S₂	730,0662	Tetrahydro-dimethoxy-[Biflavonoid]-disulfat
C₃₀H₂₀O₁₄S	636,0574	Dihydro-hydroxy-[Biflavonoid]-sulfat
C₃₀H₂₀O₁₅S	652,0523	Dihydro-dihydroxy-[Biflavonoid]-sulfat
C₃₀H₂₀O₁₇S₂	716,0142	Dihydro-hydroxy-[Biflavonoid]-disulfat
C₃₀H₂₂O₁₄S	638,0730	Tetrahydro-dydroxy-[Biflavonoid]-sulfat
C₃₀H₂₂O₁₅S	654,0679	Tetrahydro-dihydroxy-[Biflavonoid]-sulfat
C₃₀H₂₀O₁₈S₂	732,0091	Dihydro-dihydroxy-[Biflavonoid]-disulfat
C₃₀H₂₂O₁₇S₂	718,0298	Tetrahydro-hydroxy-[Biflavonoid]-disulfat
C₃₀H₂₂O₁₈S₂	734,0248	Tetrahydro-dihydroxy-[Biflavonoid]-disulfat
C₃₇H₃₀O₁₆	730,1534	Dihydro-methoxy-[Biflavonoid]-glucuronid
C₃₈H₃₂O₁₆	744,1690	Dihydro-dimethoxy-[Biflavonoid]-glucuronid
C₄₃H₄₀O₂₂	908,2011	Tetrahydro-methoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
C₃₇H₃₂O₁₆	732,1690	Tetrahydro-methoxy-[Biflavonoid]-glucuronid
C₄₄H₄₀O₂₂	920,2011	Dihydro-dimethoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
C₃₈H₃₄O₁₆	746,1847	Tetrahydro-dimethoxy-[Biflavonoid]-glucuronid
C₄₄H₄₂O₂₂	922,2468	Tetrahydro-dimethoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
C₄₃H₃₈O₂₂	906,1855	Dihydro-methoxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
C₃₆H₂₈O₁₇	732,1326	Dihydro-hydroxy-[Biflavonoid]-glucuronid
C₃₆H₂₈O₁₈	748,1276	Dihydro-dihydroxy-[Biflavonoid]-glucuronid
C₄₂H₃₈O₂₃	910,1804	Tetrahydro-hydroxy-[Biflavonoid]-diglucuronid

Fortsetzung **Tabelle 93**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C₃₆H₃₀O₁₇	734,1483	Tetrahydro-hydroxy-[Biflavonoid]-glucuronid
C₄₂H₃₆O₂₄	924,1597	Dihydro-dihydroxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
C₃₆H₃₀O₁₈	750,1432	Tetrahydro-dihydroxy-[Biflavonoid]-glucuronid
C₄₂H₃₈O₂₄	926,1753	Tetrahydro-dihydroxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
C₄₂H₃₆O₂₃	908,1647	Dihydro-hydroxy-[Biflavonoid]-diglucuronid
C₃₁H₂₂O₁₁	570,1162	Dihydro-hydroxymethoxy-[Biflavonoid]
C₃₁H₂₂O₁₂	586,1111	Dihydro-dihydroxymethoxy-[Biflavonoid]
C₃₂H₂₆O₁₁	586,1475	Tetrahydro-hydroxydimethoxy-[Biflavonoid]
C₃₁H₂₄O₁₁	572,1319	Tetrahydro-hydroxymethoxy-[Biflavonoid]
C₃₂H₂₄O₁₂	600,1268	Dihydro-dihydroxydimethoxy-[Biflavonoid]
C₃₁H₂₄O₁₂	588,1268	Tetrahydro-dihydroxymethoxy-[Biflavonoid]
C₄₂H₂₆O₁₂	602,1424	Tetrahydro-dihydroxydimethoxy-[Biflavonoid]
C₃₂H₂₄O₁₁	584,1319	Dihydro-hydroxydimethoxy-[Biflavonoid]
C₃₇H₃₀O₂₀S	826,1051	Dihydro-hydroxymethoxy-[Biflavonoid]-glucuronid-sulfat
C₃₆H₂₈O₂₀S	812,0895	Dihydro-hydroxy-[Biflavonoid]-glucuronid-sulfat
C₃₇H₃₀O₁₉S	810,1102	Dihydro-methoxy-[Biflavonoid]-glucuronid-sulfat
C₃₇H₃₀O₁₇	746,1483	Dihydro-hydroxymethoxy-[Biflavonoid]-glucuronid
C₃₁H₂₂O₁₄S	650,0730	Dihydro-hydroxymethoxy-[Biflavonoid]-sulfat
C₃₇H₂₈O₂₀S	824,0895	Hydroxymethoxy-[Biflavonoid]-glucuronid-sulfat
C₇H₈O₂	124,0524	Dihydroxytoluol
C₇H₆O₃	138,0317	Hydroxybenzoesäure
C₈H₈O₃	152,0473	Hydroxyphenylelessigsäure
C₈H₈O₄	168,0423	Dihydroxyphenylelessigsäure
C₉H₁₀O₄	182,0579	Hydroxymethoxyphenylelessigsäure
C₆H₆O₃	126,0317	Phloroglucin
C₆H₆O₆S	205,9885	Phloroglucinol-sulfat
C₁₂H₁₄O₉	302,0638	Phloroglucinol-glucuronid
C₇H₈O₃	140,0473	Methylphloroglucin
C₈H₈O₆S	232,0042	Hydroxyphenylelessigsäure-sulfat
C₁₄H₁₆O₉	328,0794	Hydroxyphenylelessigsäure-glucuronid
C₁₀H₁₁NO₄	209,0688	Hydroxyphenylelessigsäure-glycinkonjugat
C₁₁H₁₁NO₄	223,0845	Hydroxyphenylpropionsäure-glycinkonjugat
C₉H₁₀O₆S	246,0198	Hydroxyphenylpropionsäure-sulfat

Fortsetzung **Tabelle 93**

Summenformel	Exakte Masse	Verbindung
C₁₅H₁₈O₉	342,0951	Hydroxyphenylpropionsäure-glucuronid
C₁₅H₁₆O₉	340,0794	Hydroxyzimtsäure-glucuronid
C₉H₈O₆S	244,0042	Hydroxyzimtsäure-sulfat
C₉H₈O₄	180,0423	Kaffeesäure
C₉H₈O₇S	259,9991	Kaffeesäure-sulfat
C₁₅H₁₆O₁₀	356,0743	Kaffeesäure-glucuronid
C₁₀H₁₀O₄	194,0579	Ferulasäure
C₁₀H₁₀O₇S	274,0147	Ferulasäure-sulfat
C₁₆H₁₈O₁₀	370,0900	Ferulasäure-glucuronid
C₉H₁₀O₄	182,0597	Dihydroxyphenylpropionsäure
C₉H₁₀O₃	166,0630	Hydroxyphenylpropionsäure
C₉H₈O₃	164,0473	Hydroxyphenylacrylsäure
C₁₀H₁₂O₄	196,0736	Hydroxymethoxyphenylpropionsäure
C₂₁H₁₄O₈	394,0689	Apigenin-C-Phloroglucin
C₁₅H₁₂O₆	288,0634	Hydroxyzimtsäure-C-Phloroglucin
C₁₅H₁₄O₆	290,0790	Hydroxyphenylpropionsäure-C-Phloroglucin
C₂₄H₁₆O₈	432,0845	Apigenin-8-C-Hydroxyzimtsäure
C₂₄H₁₈O₈	434,1002	Apigenin-8-C-Hydroxyphenylpropionsäure
C₁₄H₁₂O₄	244,0736	Phloroglucin-hydroxyphenyl
C₂₃H₁₆O₆	388,0947	Apigenin-8-C-Hydroxyphenyl

9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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