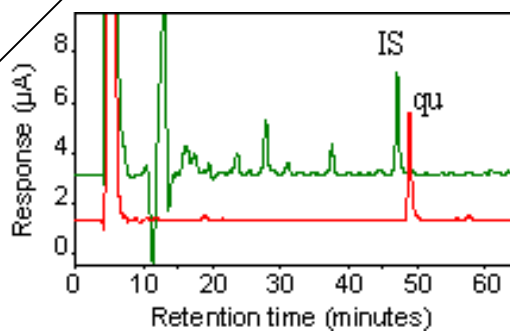
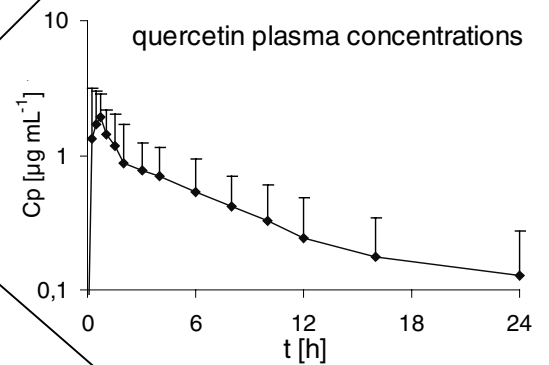
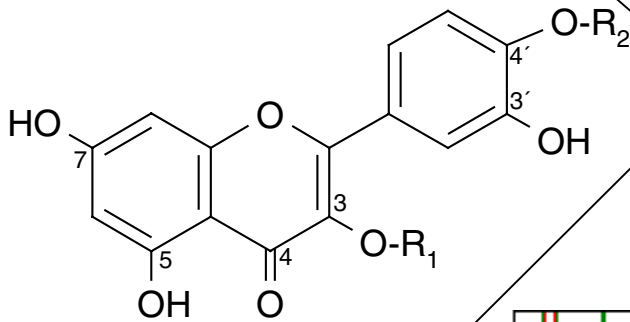


Eva Ulrike Gräfe

# Relative Systemische Verfügbarkeit und Pharmakokinetik von Quercetin und Quercetinglykosiden (Quercetin-4'-*O*-glucosid und Quercetin-3-*O*-rhamnoglucosid) im Menschen



**Relative Systemische Verfügbarkeit und Pharmakokinetik  
von Quercetin und Quercetinglykosiden (Quercetin-4'-*O*-  
glucosid und Quercetin-3-*O*-rhamnoglucosid) im Menschen**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**EVA ULRIKE GRÄFE**

aus Siegen

Würzburg 2000

Eingereicht am: 15.11.2000

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Goebel

Gutachter: PD Dr. M. Veit

Gutachter: Prof. Dr. H. Derendorf

Tag des Promotionskolloquiums: 21.03.2001

Doktorurkunde ausgehändigt am:

**Meiner Familie**



## Danksagungen

Die Unterstützung und die wissenschaftlichen Anregungen von Herrn Privatdozent Dr. Markus Veit, Herrn Prof. Dr. Hartmut Derendorf, unseren Kooperationspartnern, Kollegen und Freunden haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte mich deshalb herzlich bedanken bei

meinem Doktorvater Dr. Markus Veit, dessen großem Engagement ich es verdanke, dass ich diese praxisnahe Dissertation anfertigen konnte. Er setzte viel Vertrauen in mich, ermöglichte mir selbstständiges und eigenverantwortliches Arbeiten und war zur Stelle, wenn Unterstützung und Förderung notwendig waren. Über den üblichen Rahmen einer Promotion hinaus habe ich viel bei ihm gelernt.

meinem Co-Betreuer Prof. Dr. Hartmut Derendorf für seine wissenschaftliche und persönliche Unterstützung, für die wiederholte Aufnahme in seinen Arbeitskreis an der University of Florida und die Weiterbildung, die er mir dort ermöglichte. Auf die große Hilfsbereitschaft seines Arbeitskreises, insbesondere von Dr. Amparo de la Peña, Dr. Sriram Krishnaswami und Dr. Raj Nagaraja konnte ich darüber hinaus stets zählen. Die fachlichen und persönlichen Erfahrungen, die ich in der Zusammenarbeit und dem Zusammenleben mit den gators in Florida machen konnte, haben mich sehr bereichert.

Prof. Dr. Franz-Christian Czygan für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut, seine Diskussionsbereitschaft und seine steten Bemühungen, unseren Horizont auch über das Fachliche hinaus zu erweitern.

meinen Kollegen Claudia Kohlert und Jörg Wittig, die maßgeblich dazu beitrugen, dass die Promotionszeit trotz aller Höhen und Tiefen zu einer sehr schönen und lustigen Zeit wurde. Auf beide konnte ich mich wissenschaftlich und persönlich immer verlassen, und die gemeinsamen Erlebnisse und Erinnerungen an die Doktorarbeiten, Semesterbetreuungen und Kongresse sind sehr wertvoll. Ohne ihre Hilfe bis hin zum persönlichen Einsatz als Probanden, ohne ihre Kritik, Toleranz und Solidarität wäre diese Dissertation nicht durchführbar gewesen.

Bei unseren Diplomandinnen Ingrid Wittig-Leipolz, Kerstin Teltscher, Brigitte Andrew und Andrea Ruf möchte ich mich sehr herzlich für ihre Mitarbeit an den einzelnen Projekten bedanken. Cornelia Beckert, Dr. Irmgard van Rensen, Christoph Schneider und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts sowie des Zentralinstituts Arzneimittelforschung GmbH danke ich für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Bernd Drewelow, PD Dr. Anne-Katrin Riethling, Dr. Silke Müller und den weiteren Mitarbeiterinnen der Klinischen Pharmakologie der Universität Rostock für ihr Interesse und ihre Unterstützung dieses Projektes. Sie haben durch ihren großen Einsatz das Zustandekommen der klinischen Studien ermöglicht und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Gisela Jacobasch und Holger Pforte vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Potsdam für die gute Kooperation in den gemeinsam geplanten und durchgeführten Projekten. Holger Pforte danke ich insbesondere für seine Zusammenarbeit, Hilfsbereitschaft und unermüdliche Geduld bei der Analytik der Plasmaproben.

PD Dr. Markus Herderich und Jörg Wittig für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg.

PD Dr. Andreas Hensel und Meike Herrmann vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Erlangen für ihre Unterstützung bei den *In-vitro* Resorptionsversuchen.

Dr. Bruno Frank von den Kneipp-Werken Würzburg, dessen persönlichem Einsatz für dieses Projekt wir die finanzielle Unterstützung durch die Firma Kneipp und somit das Zustandekommen dieser Dissertation verdanken, und der uns auch darüber hinaus stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Des Weiteren bedanke ich mich bei den Firmen SmithKline Beecham GmbH & Co. KG, Lichtwer Pharma AG, H. Finzelberg`s Nachf. GmbH & Co. KG, Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG, Bionorica Arzneimittel GmbH, Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co., Boehringer Ingelheim GmbH, Dr. Poehlmann GmbH & Co. für die finanzielle Unterstützung der klinischen Studien sowie die fachlichen Diskussionen und Anregungen.

Kathrin Dausmann, Julian Glos, Ina Veit und besonders Karsten Mody für die persönliche Betreuung der Doktorandin, für ihre Diskussionsbereitschaft, Toleranz und Unterstützung, und nicht zuletzt für die Korrektur dieser Arbeit.

meiner Familie für die vielen fachlichen Diskussionen und Hilfestellungen während der Arbeit und ihre liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einführung und Zielsetzung der Untersuchungen.....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Pharmakokinetik von Quercetin nach intravenöser Applikation.....</i>	<i>3</i>
1.2	<i>Resorption, Metabolismus und Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation .....</i>	<i>6</i>
1.2.1	<i>Intestinaler Metabolismus .....</i>	<i>6</i>
1.2.2	<i>In-vitro- und In-situ-Versuche zur Resorption von Quercetin(glykosiden).....</i>	<i>8</i>
1.2.3	<i>Mucosaler und hepatischer First-Pass Effekt.....</i>	<i>9</i>
1.2.4	<i>Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation im Menschen .....</i>	<i>11</i>
1.3	<i>Pharmakokinetisch-pharmakodynamische Beziehungen.....</i>	<i>19</i>
1.4	<i>Methoden und Analytik .....</i>	<i>20</i>
1.5	<i>In-vitro-Resorptionsversuche am Schweinedarmmodell .....</i>	<i>22</i>
1.6	<i>Aufgabenstellung und Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen.....</i>	<i>23</i>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
2.1	<i>Chemikalien.....</i>	<i>24</i>
2.2	<i>Weitere Materialien und Geräte .....</i>	<i>25</i>
2.3	<i>Pilotstudie zur systemischen Verfügbarkeit von Quercetin und Quercetin-glykosiden.....</i>	<i>27</i>
2.3.1	<i>Studienplan (Kurzübersicht).....</i>	<i>27</i>
2.3.2	<i>Ergänzung I. zur Pilotstudie .....</i>	<i>28</i>
2.3.3	<i>Ergänzung II. zur Pilotstudie .....</i>	<i>28</i>
2.3.4	<i>Klinische Prüfung.....</i>	<i>28</i>
2.4	<i>Prüfpräparate der Pilotstudie .....</i>	<i>29</i>
2.4.1	<i>Herstellung der Prüfformulierung .....</i>	<i>29</i>
2.4.2	<i>Applikation von Quercetin .....</i>	<i>29</i>
2.4.3	<i>Applikation von Quercetin-3-O-rutinosid in Form von Buchweizenkraut-teepulver.....</i>	<i>29</i>
2.4.4	<i>Applikation von Quercetinglucosiden in Form von gebratenen Zwiebeln.....</i>	<i>30</i>
2.5	<i>Probenvorbereitung und Analytik der Plasma- und Urinproben in der Pilotstudie..</i>	<i>31</i>
2.5.1	<i>Extraktion von Quercetin und Quercetinmetaboliten aus Humanplasma der Pilotstudie .....</i>	<i>31</i>
2.5.2	<i>Bestimmung von Quercetin und seinen Metaboliten in Humanplasma mittels HPLC-PDA .....</i>	<i>31</i>
2.5.3	<i>Extraktion von Quercetin und Quercetinmetaboliten aus Humanurin der Pilotstudie.....</i>	<i>33</i>

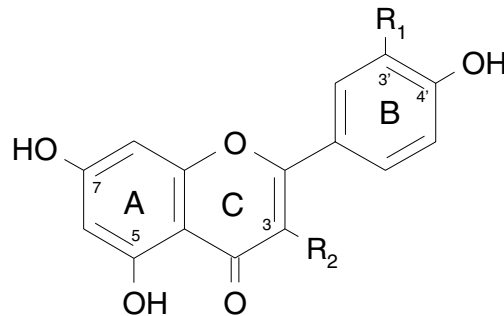
2.6	<i>Hauptstudie zur systemischen Verfügbarkeit und Pharmakokinetik von Quercetin-4'-O-glucosid und Quercetin-3-O-rhamnoglucosid</i> .....	34
2.6.1	Studienplan (Kurzübersicht).....	34
2.6.2	Klinische Prüfung.....	35
2.6.3	Probandenauswahl.....	35
2.6.4	Diätplan.....	36
2.6.5	Probenkodierung.....	37
2.7	<i>Prüfpräparate der Hauptstudie</i> .....	37
2.7.1	Applikation von Quercetinglucosiden in Form von gedünsteten Zwiebeln.....	37
2.7.1.1	Extraktion der Flavonoidglykoside aus Zwiebeln.....	38
2.7.1.2	Trennung und Detektion der Flavonoide im Pflanzenextrakt.....	38
2.7.1.3	Kalibrierung und Quantifizierung der Flavonoidglykoside aus Zwiebeln.....	39
2.7.2	Applikation von aus Zwiebeln isoliertem Quercetin-4'-O-glucosid (Spiraeosid) ..	41
2.7.2.1	Isolierung von Quercetin-4'-O-glucosid (Spiraeosid) aus den Schalen der Küchenzwiebel ( <i>Allium cepa</i> L., c.v.) ..	42
2.7.2.2	Herstellung der Prüfformulierung.....	44
2.7.3	Applikation von Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin) in Form von Buchweizenkraut-teepulver.....	44
2.7.4	Applikation von Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin).....	44
2.8	<i>Probenvorbereitung und Analytik der Urinproben mittels HPLC und Photodiodenarraydetektion</i> .....	44
2.8.1	Extraktion von Quercetin und seinen Metaboliten aus Urin.....	44
2.8.2	Wiederholpräzision und Vergleichspräzision.....	45
2.8.3	Trennung und Detektion von Quercetin und seinen Metaboliten im Urin.....	45
2.8.4	Kalibrierung und Quantifizierung von Quercetin und seinen Metaboliten im Urin ..	47
2.9	<i>Probenvorbereitung und Analytik der Plasmaproben mittels HPLC und coulometrischer Arraydetektion</i> .....	48
2.9.1	Extraktion von Quercetin und seinen Metaboliten aus Humanplasma.....	48
2.9.2	Wiederholpräzision und Vergleichspräzision.....	48
2.9.3	Trennung und Detektion von Quercetin und seinen Metaboliten im Plasma mittels coulometrischer Arraydetektion ..	50
2.9.3.1	Spezifität ..	51
2.9.4	Kalibrierung und Quantifizierung von Quercetin und seinen Metaboliten im Plasma ..	52
2.9.4.1	Linearität und Arbeitsbereich ..	52
2.9.5	Richtigkeit und Präzision.....	53
2.10	<i>Stabilität der Plasmaproben</i> .....	53
2.11	<i>Untersuchungen zur In-vitro-Resorption am Schweinedarmmodell</i> .....	54
2.11.1	Herstellung der Untersuchungslösungen ..	55
2.11.2	Präparation des Schweinedarms ..	55
2.11.3	<i>In-vitro</i> -Resorptionsmodell ..	56
2.11.4	Versuchsdurchführung.....	57

2.11.4.1	Vitalitätsüberprüfungen des Darmgewebes.....	57
2.11.5	Probenaufarbeitung .....	59
2.11.5.1	Mucosaler Überstand .....	59
2.11.5.2	Darm und Resorbat.....	59
2.11.6	Trennung und Detektion .....	59
2.11.7	Kalibrierung und Quantifizierung.....	60
2.12	<i>Pharmakokinetische und statistische Analysen</i> .....	62
2.12.1	Nichtkompartiment-Analyse .....	62
2.12.2	Kompartiment-Analyse.....	62
2.12.3	Statistik.....	63
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>64</b>
3.1	<i>Analytik der Plasmaproben vor und nach enzymatischer Spaltung der Konjugate</i> .....	64
3.1.1	Detektion mittels LC-MS/MS .....	64
3.1.2	Detektion mittels coulometrischer Arraydetektion.....	64
3.2	<i>Ergebnisse der Pilotstudie</i> .....	67
3.2.1	Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetinglucosiden in Form von Zwiebeln .....	68
3.2.2	Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetin als Reinsubstanz in den Dosierungen 200 mg und 1000 mg.....	68
3.2.3	Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetin-3-O-rutinosid in Form von Buchweizenkrauttee .....	68
3.2.4	Einfluss von Fett auf die Resorption von Quercetinglucosiden aus der Zwiebelzubereitung (Ergänzung I. zur Pilotstudie) .....	70
3.2.5	Einfluss der Zwiebelmatrix auf die Resorption von Quercetin als Reinsubstanz (Ergänzung II. zur Pilotstudie).....	70
3.2.6	Renale Elimination von Quercetin und seinen Metaboliten .....	71
3.3	<i>Ergebnisse der Hauptstudie</i> .....	75
3.3.1	Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetin-4'-O-glucosid in Form von Zwiebeln.....	75
3.3.2	Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetin-4'-O-glucosid .....	77
3.3.3	Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetin-3-O-rutinosid in Form von Buchweizenkrauttee .....	79
3.3.4	Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetin-3-O-rutinosid.....	81
3.3.5	Plasmakonzentrationen des Metaboliten 3'-O-Methylquercetin (Isorhamnetin) ..	83
3.3.6	Weitere Metabolite im Plasma .....	85
3.3.7	Renale Elimination von Quercetin und seinen Metaboliten .....	86

3.4	<i>Pharmakokinetische Auswertung der Quercetinkonzentrationen im Plasma nach Hydrolyse der Quercetinkonjugate</i> .....	91
3.4.1	Pharmakokinetik in Nichtkompartiment-Modellen.....	91
3.4.2	Pharmakokinetik in Kompartiment-Modellen .....	94
3.5	<i>Pharmakokinetische Auswertung der Quercetinkonzentrationen im Urin nach Hydrolyse der Quercetinkonjugate</i> .....	96
3.6	<i>Biostatistische Betrachtung der Ergebnisse</i> .....	99
3.6.1	Vergleich von $t_{\max}$ .....	99
3.6.2	Vergleich von $c_{\max}$ .....	99
3.6.3	Vergleich von $t_{1/2}$ .....	100
3.6.4	Vergleich von $AUC_{0-t}$ .....	101
3.6.5	Vergleich von MRT .....	102
3.6.6	Vergleich der renal eliminierten Quercetinmenge in % der applizierten Dosis..	102
3.7	<i>Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen am Schweinedarmmodell</i> .....	103
3.7.1	Resorption und Metabolismus von Quercetin und Quercetinglykosiden.....	103
3.7.2	Resorption und Metabolismus von Kämpferol und Kämpferolglucosiden .....	111
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>115</b>
4.1	<i>Humanstudien zur Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von Quercetin und Quercetinglykosiden im Menschen</i> .....	115
	Prüfformulierung .....	116
	Analytische Methoden.....	116
	Pilotstudie .....	117
	Ergänzungen zur Pilotstudie .....	119
	Hauptstudie .....	120
	Interindividuelle Variabilität .....	124
	Resorptionsmechanismus.....	124
	Metabolismus.....	127
	Beurteilung der potentiellen Wirksamkeit der Metabolite .....	129
4.2	<i>In-vitro Resorptionsversuche am Schweinedarmmodell</i> .....	130
	Metabolismus.....	131
	Resorption .....	133
	In-vitro / In-vivo Korrelation .....	134
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>136</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>140</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>144</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>153</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>202</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>206</b>
<b>11</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>210</b>

## 1 Einführung und Zielsetzung der Untersuchungen

Flavonoide sind pflanzliche Polyphenole, die ubiquitär in höheren Pflanzen verbreitet und somit ein Bestandteil unserer täglichen Nahrung sind. Das Flavonoidgrundgerüst, ein 2-Phenylbenzo- $\gamma$ -pyron, wird durch verschiedene Substitutionsmuster modifiziert (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1** Struktur von Flavonolen und Flavonen: Flavonole:  $R_2=OH$  (Quercetin:  $R_1=OH$ ,  $R_2=OH$ ; Kaempferol:  $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ; Isorhamnetin:  $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=OH$ ; Rutin:  $R_1=OH$ ,  $R_2=O$ -rutinosid); Flavone:  $R_2=H$  (Apigenin:  $R_1=H$ ).

Mehr als 4000 Flavonoidglykoside sind bislang beschrieben worden, die sich von einer geringen Zahl verschiedener Aglykone ableiten und durch vielfältige Kombinationsmöglichkeiten der Zuckerkomponente entstehen. Glykoside des Flavonols Quercetin (5, 7, 3', 4'-Hydroxyflavonol) sind die häufigsten Nahrungsflavonoide mit hohen Gehalten in Zwiebeln, Äpfeln und Tee (de Vries et al. 1998, Hertog et al. 1992, Justesen et al. 1997). Die tägliche Flavonidaufnahme wurde in verschiedenen Ländern auf etwa 3 mg bis 70 mg (berechnet als Aglykon) geschätzt, und kann diese Werte in Regionen mit hohem Tee- und Gemüseverzehr weit übersteigen (de Vries et al. 1998, Hertog et al. 1993b, Justesen et al. 1997).

In den letzten Jahren stieg das wissenschaftliche Interesse an Flavonoiden und insbesondere an Quercetin stark an, da diese Substanzen aufgrund ihrer potentiell gesundheitsfördernden Wirkung die Aufmerksamkeit der Medizin erregten. In verschiedenen, wenn auch nicht allen epidemiologischen Studien zeigte sich eine negative Korrelation zwischen Flavonidaufnahme und der Inzidenz koronarer Herzerkrankungen (Hertog et al. 1993a, Keli et al. 1996, Knekt et al. 2000, Knekt et al. 1996, Le Marchand et al. 2000, Rimm et al. 1996, Yochum et al. 1999). Antikarzinogene und antiproliferative Effekte wurden vermutet, konnten allerdings nicht immer bestätigt werden (Ames und Gold 1995, Block et al. 1992, Hertog 1996, Hertog und Hollman 1996, Hertog et al. 1995, Hollman et al. 1996a, Steinmetz und Potter 1991). In der Phytomedizin werden darüber hinaus in einigen Ländern quercetinhaltige Teezubereitungen und Pflanzenextrakte (z.B. Buchweizenkraut) therapeutisch zur Behandlung von chronischer Veneninsuffizienz eingesetzt (Ihme et al. 1996, Kiesewetter et al. 2000). Flavonoidglykoside werden auch als wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe in verschiedenen Phytotherapeutika angesehen, welche in westeuropäischen Ländern häufig zur Behandlung von Harnwegsinfektionen eingesetzt werden (De Smet und Brouwers 1997). In der Phytotherapie gewinnen die Flavonoide zunehmend an Bedeutung und werden bereits auch in anderen Arzneidrogen wie

Johanniskraut (*Hypericum perforatum*) als potentielle Wirkstoffe intensiv untersucht (Butterweck et al. 2000).

Basierend auf den Ergebnissen der epidemiologischen Untersuchungen und klinischen Studien mit flavonoidhaltigen Phytopharmaka setzten intensive Bemühungen ein, die zugrunde liegenden Wirkmechanismen zu klären. Dabei wurde vor allem das Flavonol Quercetin in unterschiedlichen *In-vitro*-Testsystemen untersucht. Neben anderen *In-vitro*-Wirkungen zeigte Quercetin dabei starke antioxidative und Radikalfänger-Eigenschaften, was als Grund für die mögliche Verhinderung von Atherosklerose angesehen wurde (Formica und Regelson 1995, Keli et al. 1996, Knekt et al. 1996, Middleton und Kandaswami 1993, Pace-Asciak et al. 1995, Rice-Evans et al. 1997). Verschiedene weitere Wirkungsmechanismen für die potentiellen Effekte der Flavonoide auf die Etiologie vaskulärer Erkrankungen wurden diskutiert (Schramm und German 1998).

Um die vorbeugenden und möglicherweise kurativen Eigenschaften von Quercetin und seinen Glykosiden zu erklären, werden häufig *In-vitro*-Wirkungen auf Wirksamkeiten *in vivo* extrapoliert. So werden Quercetintabletten und -kapseln in den USA und im Internet aufgrund ihrer antioxidativen *In-vitro*-Wirkung bereits als Antioxidans angeboten und sind dort als Nahrungsergänzungsmittel („dietary supplements“) erhältlich. Antimutagene und antiproliferative Eigenschaften gegen verschiedene Krebszelllinien wurden beschrieben, was Quercetin zu einem vielversprechenden Kandidaten für eine Phase-I-Studie in Krebspatienten machte (Ferry et al. 1996). Eine solche Extrapolation von *In-vitro*-Daten ist aber erst dann zulässig, wenn sichergestellt werden kann, dass die *in vitro* getesteten Substanzen auch *in vivo* unverändert an das Zielorgan oder das getestete Enzymsystem gelangen. Die Bioverfügbarkeit der Testsubstanzen stellt daher den zentralen „missing link“ zwischen *In-vitro*-Experimenten und ihrer *In-vivo*-Bedeutung dar.

Trotz des steigenden Interesses an der Thematik sind nur wenige Daten zur Bioverfügbarkeit, Pharmakokinetik und Metabolismus von Quercetin im Menschen verfügbar. Dies ist teilweise dadurch begründet, dass Humanstudien nicht leicht durchzuführen sind, da die Probanden sich einer strengen flavonoidfreien Diät zu unterziehen haben, um Interferenzen mit Nahrungsflavonoiden zu vermeiden. Im Folgenden soll der Kenntnisstand zu Resorption, Bioverfügbarkeit, Metabolismus, Elimination und Pharmakokinetik von Quercetin und Quercetinglykosiden zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen dargelegt werden.

Die zahlreichen Tierexperimente zum Metabolismus von Quercetin sollen an dieser Stelle nicht berücksichtigt werden. Da die Zusammensetzung der Mikroflora des Darmes eine entscheidende Rolle im intestinalen Abbauprozess hat, können Ergebnisse aus Tierexperimenten nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden. Die verschiedenen Daten zu Tierexperimenten wurden in einem Übersichtsartikel zusammengefasst (Scheline 1991).



### 1.1 Pharmakokinetik von Quercetin nach intravenöser Applikation

Grundlegende pharmakokinetische Parameter (Halbwertszeit, Verteilungsvolumen, Clearance) lassen sich am Besten aus den Plasmakonzentrations-Zeit-Profilen nach intravenöser Applikation bestimmen. Bezüglich Quercetin wurden zwei Humanstudien mit intravenöser Applikation zur Ermittlung der pharmakokinetischen Eigenschaften durchgeführt. Diese zwei Studien kommen in Bezug auf Halbwertszeit und Verteilungsvolumen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen.

In der ersten Studie untersuchten GUGLER et al. die Verfügbarkeit von Quercetin im Menschen nach einmaliger oraler und intravenöser Applikation (Gugler et al. 1975). Sechs gesunde Probanden erhielten 100 mg Quercetin intravenös, und vier von ihnen zu einem anderen Zeitpunkt 1 g oral nach nächtlichem Fasten. Blutproben wurden vor und bis zu 24 h nach Applikation genommen, Urin wurde fraktioniert bis 24 h nach Applikation gesammelt. Zusätzlich wurden Faezesproben bis zu 72 h gesammelt. Die Quercetinkonzentrationen wurden fluorimetrisch nach chemischer Reaktion mit Tetraphenyldiboroxid bestimmt, die Nachweisgrenze in biologischer Matrix lag bei  $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $0,3 \mu\text{M}$ ). Quercetinkonjugate im Plasma wurden nicht gespalten, so dass nur freies Quercetin gemessen wurde. Quercetinglucuronide und -sulfate im Urin wurden dagegen enzymatisch gespalten, und sowohl der freie als auch der konjugierte Anteil wurden bestimmt. Aufgrund der mangelnden Empfindlichkeit der verwendeten analytischen Methode konnten die Konzentrations-Zeit-Profile teilweise nur bis zu 160 min verfolgt werden. Die Daten jedes Probanden wurden an ein Zweikompartimentmodell zur Bestimmung der daraus resultierenden pharmakokinetischen Parameter angepasst.

**Tab. 1.1** Pharmakokinetische Parameter zur Verfügbarkeit von Quercetin nach intravenöser Applikation von 100 mg Quercetin. Die Daten von 6 Probanden wurden an ein Zweikompartimentmodell angepasst. A=y-Achsenabschnitt der Verteilungsphase,  $\alpha$ =Makrokonstante der Verteilungsrate, B=y-Achsenabschnitt der Eliminationsphase,  $\beta$ =Makrokonstante der Eliminationsrate,  $k_{10}$ =Eliminationsratenkonstante vom zentralen Kompartiment (im Originalartikel als  $k_{el}$  bezeichnet),  $t_{1/2\alpha}$ =Verteilungshalbwertszeit,  $t_{1/2\beta}$ =Eliminationshalbwertszeit,  $V_c$ =Volumen des zentralen Kompartiments,  $Cl_{tot}$ =Gesamtkörperclearance,  $Cl_{ren}$ =renale Clearance. Originaldaten von GUGLER et al. 1975.

	A	$\alpha$	B	$\beta$	$k_{10}$	$t_{1/2\alpha}$	$t_{1/2\beta}$	$V_c$	$Cl_{tot}$	$Cl_{ren}$
	$[\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$	$[\text{h}^{-1}]$	$[\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}]$	$[\text{h}^{-1}]$	$[\text{h}^{-1}]$	$[\text{h}]$	$[\text{h}]$	$[\text{L}]$	$[\text{L}\cdot\text{h}^{-1}]$	$[\text{L}\cdot\text{h}^{-1}]$
MW	3,66	5,19	0,79	0,307	1,469	0,147	2,4	24,4	34,6	0,276
SD	1,45	1,66	0,48	0,096	0,511	0,052	0,6	8,1	13,4	0,186

Die renale Clearance war niedrig mit  $4,6\pm 3,1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Innerhalb der ersten 9 Stunden wurden  $7,44\pm 1,20 \%$  der applizierten Dosis in Form von Quercetinkonjugaten eliminiert und  $0,65\pm 0,14 \%$  unverändert als freies Quercetin. Bei der renalen Elimination zeigten sich große interindividuelle Schwankungen. Die Plasmaproteinbindung wurde mittels Gelfiltration bestimmt und überstieg 98 %. Diese starke Bindung wurde kürzlich in einer anderen Studie bestätigt, in der mittels Ultrazentrifugationstechnik eine Plasmaproteinbindung von Quercetin von  $99,4\pm 0,1 \%$  ermittelt wurde (Boulton et al. 1998). Die publizierten Plasmadaten wurden

mittels nichtkompartimenteller Analyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit reanalysiert, um zusätzliche Informationen zur Pharmakokinetik zu erhalten (Tab. 1.2).

**Tab. 1.2** Reanalyse der von GUGLER et al. (1975) publizierten Daten mittels nichtkompartimenteller Analyse.  $t_{1/2}$ =Halbwertszeit,  $V_{d_{ss}}$ =Verteilungsvolumen im Steady-State,  $V_{d_{area}}$ =Verteilungsvolumen während der Eliminationsphase,  $Cl_{tot}$ =Gesamtkörperclearance,  $Cl_{int}$ =intrinsische Clearance,  $E$ =Extraktionsrate.

	$t_{1/2}$ [h]	$V_{d_{ss}}$ [L]	$V_{d_{area}}$ [L]	$Cl_{tot}$ [L·h <sup>-1</sup> ]	$Cl_{int}$ [L·h <sup>-1</sup> ]	E
MW	2,5	92,6	127,3	34,6	9202	0,38
SD	0,8	37,4	66,8	13,5	2477	0,14

Die Werte für die Halbwertszeit und Gesamtkörperclearance der Nichtkompartiment-Analyse entsprechen den publizierten Daten im Zweikompartimentmodell. Mit nichtkompartimenteller Analyse wird jedoch generell eher das Verteilungsvolumen im Steady-State  $V_{d_{ss}}$  sowie während der Eliminationsphase  $V_{d_{area}}$  als das Verteilungsvolumen im zentralen Kompartiment  $V_c$  bestimmt, wobei die Beziehung  $V_c < V_{d_{ss}} < V_{d_{area}}$  gilt (Gibaldi und Perrier 1982). In dem vorliegenden Fall konnte die intrinsische Clearance  $Cl_{int}$  mit Hilfe der Wilkinson-Shand Gleichung bestimmt werden, da die Gesamtkörperclearance sowie der nichtgebundene Anteil im Plasma  $f_u$  bekannt waren und der Leber-Blutfluss  $Q_H$  auf 1,5 mL·min<sup>-1</sup> festgesetzt werden konnte (Derendorf und Garrett 1987):

$$Cl_{tot} = \frac{f_u \cdot Cl_{int} \cdot Q_H}{f_u \cdot Cl_{int} + Q_H}$$

Die Werte, die so für die intrinsische Clearance jedes einzelnen Probanden erhalten wurden, reichten von etwa 4000 bis fast 20000 L·h<sup>-1</sup> mit Mittelwerten von 9202±2477 L·h<sup>-1</sup> (MW±SD). Diese Werte deuteten auf die große Kapazität der Leber hin, Quercetin zu eliminieren. Offenbar schützte die hohe Proteinbindung die Substanz jedoch vor der raschen Metabolisierung bei der Leberpassage, da nur der frei vorliegende Anteil metabolisiert werden konnte. Die Extraktionsrate E, berechnet aus  $E = Cl_{tot}/Q_H$ , lag bei 0,38±0,14 (MW±SD). Die Verteilungsvolumina  $V_{d_{ss}}$  und  $V_{d_{area}}$  im Vergleich zu  $V_c$  deuteten darauf hin, dass trotz der hohen Plasmaeiweißbindung aufgrund einer hohen Gewebsbindung auch eine intensive Verteilung in die Gewebe stattfand. Diese Tatsache ist vor allem dann von Bedeutung, wenn der Zielort der pharmakodynamischen Wirkung im Gewebe lokalisiert ist. Die Studie war sehr gut konzipiert. Unglücklicherweise erlaubten die analytischen Möglichkeiten zum damaligen Zeitpunkt keine Bestimmung der Plasmakonzentrationen über die ersten sechs bis neun Stunden hinaus. Deshalb wurden die Daten kritisiert und spekuliert, dass die Autoren die Verteilungsphase irrtümlicherweise für die Eliminationsphase gehalten hatten (Hollman et al. 1997a). Darüber hinaus wurde die verwendete Analysenmethode als nicht-spezifisch für Quercetin angesehen und vermutet, dass auch andere Komponenten zu den gemessenen Plasma- und Urinkonzentrationen beigetragen haben könnten (Hollman et al. 1996c).

In der zweiten Studie wurde Quercetin aufgrund seiner antiproliferativen *In-vitro*-Wirkungen im Rahmen einer klinischen Phase-I-Studie an 51 Krebspatienten getestet (Ferry et al. 1996). Die intravenös applizierten Dosen reichten von  $60 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  (etwa 100 mg) bis zu  $2000 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  (etwa 3340 mg), bis dosislimitierende Nephrotoxizität beobachtet wurde. Plasmaproben wurden in regelmäßigen Abständen nach Applikation entnommen (Zeitpunkte sowie Gesamtprobenzeitraum nicht angegeben). Quercetin wurde aus Plasma unter Verwendung einer Festphasenextraktionsmethode extrahiert und anschließend mittels HPLC-PDA analysiert. Die Nachweisgrenze lag bei  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $0,3 \mu\text{M}$ ). Die Daten von 11 Patienten wurden an ein Zweikompartimentmodell angepasst. AUC,  $t_{1/2\alpha}$ ,  $t_{1/2\beta}$ , Gesamtkörperclearance und Steady-State Verteilungsvolumen (Einheiten für Clearance und  $V_{d_{ss}}$  sollten  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  und  $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}$  heißen statt der angegebenen  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  und L) wurden für 14 Patienten angegeben (Tab. 1.3).

**Tab. 1.3** Pharmakokinetische Parameter von Quercetin erhalten nach Anpassung der Plasmakonzentrations-Zeit-Profile an ein Zweikompartimentmodell. Die Werte setzen sich aus den Daten von 11 Patienten zusammen, die verschiedene Quercetindosen intravenös erhalten hatten. Legende siehe Tab. 1.2. Daten entnommen von FERRY et al. 1996.

	$t_{1/2\alpha}$ [h]	$t_{1/2\beta}$ [h]	$Cl_{\text{tot}}$ [ $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ]	$Cl_{\text{tot}}$ [ $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ ]	$V_{d_{ss}}$ [ $\text{L}\cdot\text{m}^{-2}$ ]	$V_{d_{ss}}$ [L]
Median	0,1	0,7	0,28	28,1	3,7	6,2
Range	0,01-0,13	0,06-1,43	0,23-0,84	23,1-84,2		

Die Quercetinkonzentrationen wurden bei 8 Patienten auch im 24h-Urin in 14 Urinproben bestimmt. Sieben Patienten erhielten eine Dosis von  $945 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  und ein Patient  $1400 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$  einmalig und in weiteren vier Durchgängen ebenfalls  $945 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-2}$ . Durchschnittlich wurden  $1,97\pm 0,66\%$  unverändert renal eliminiert mit einem Range von 0,03-7,6 %, was große interindividuelle Variabilität aufzeigt. Konjugate im Urin wurden vor Analyse nicht gespalten. Betrachtete man den renal eliminierten Anteil an freiem Quercetin, so entsprachen diese Ergebnisse denen der ersten Studie. Die Verteilungshalbwertszeit sowie die Gesamtkörperclearance lagen in beiden Studien in einer vergleichbaren Größenordnung. Die Werte für  $t_{1/2\beta}$  und das Verteilungsvolumen variierten jedoch um das 3fache bzw. 15fache zwischen den beiden Studien. Bewertete man die Daten der zweiten Studie, so deutete das kleine Verteilungsvolumen von  $3,7 \text{ L}\cdot\text{m}^{-2}$  darauf hin, dass Quercetin hauptsächlich im Plasma vorzufinden war, und dass fast kein Quercetin ins Gewebe gelangte. Das würde bedeuten, dass nur wenig Quercetin ins Gewebe gelangt, selbst wenn beträchtliche Quercetin-Plasmakonzentrationen erreicht würden. Damit ließen sich keine pharmakodynamischen Effekte in tieferen Kompartimenten erklären.

Auch zu dieser Studie sind die gleichen Kritikpunkte bezüglich der Dauer der Plasmamessungen angebracht. Die bei FERRY et al. (1996) abgebildeten Graphen zeigen den Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf nur bis 200 min. Dabei wird nicht deutlich, ob zu einem späteren Zeitpunkt noch Blutentnahmen stattfanden. Es wurde zwar eine spezifischere Analysenmethode zur Bestimmung der Quercetinkonzentrationen verwendet, die Empfindlichkeit der Detektionsmethode konnte jedoch nicht verbessert werden. Dies

dürfte der Grund dafür gewesen sein, dass wieder keine Plasmakonzentrationen über 200 min hinaus bestimmt wurden.

## **1.2 Resorption, Metabolismus und Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation**

Eine grundlegende Voraussetzung für die Extrapolation von *In-vitro*-Wirkungen auf Wirksamkeiten *in vivo* ist die Kenntnis der Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit der betreffenden Substanzen nach oraler Applikation. Das Ausmaß der Resorption und die systemische Verfügbarkeit von Quercetin ist abhängig von seiner chemischen Stabilität vom Zeitpunkt der Einnahme bis zum Ort der Resorption, seinem Abbau durch die intestinale Mikroflora, dem Resorptionsmechanismus sowie dem first-pass Effekt.

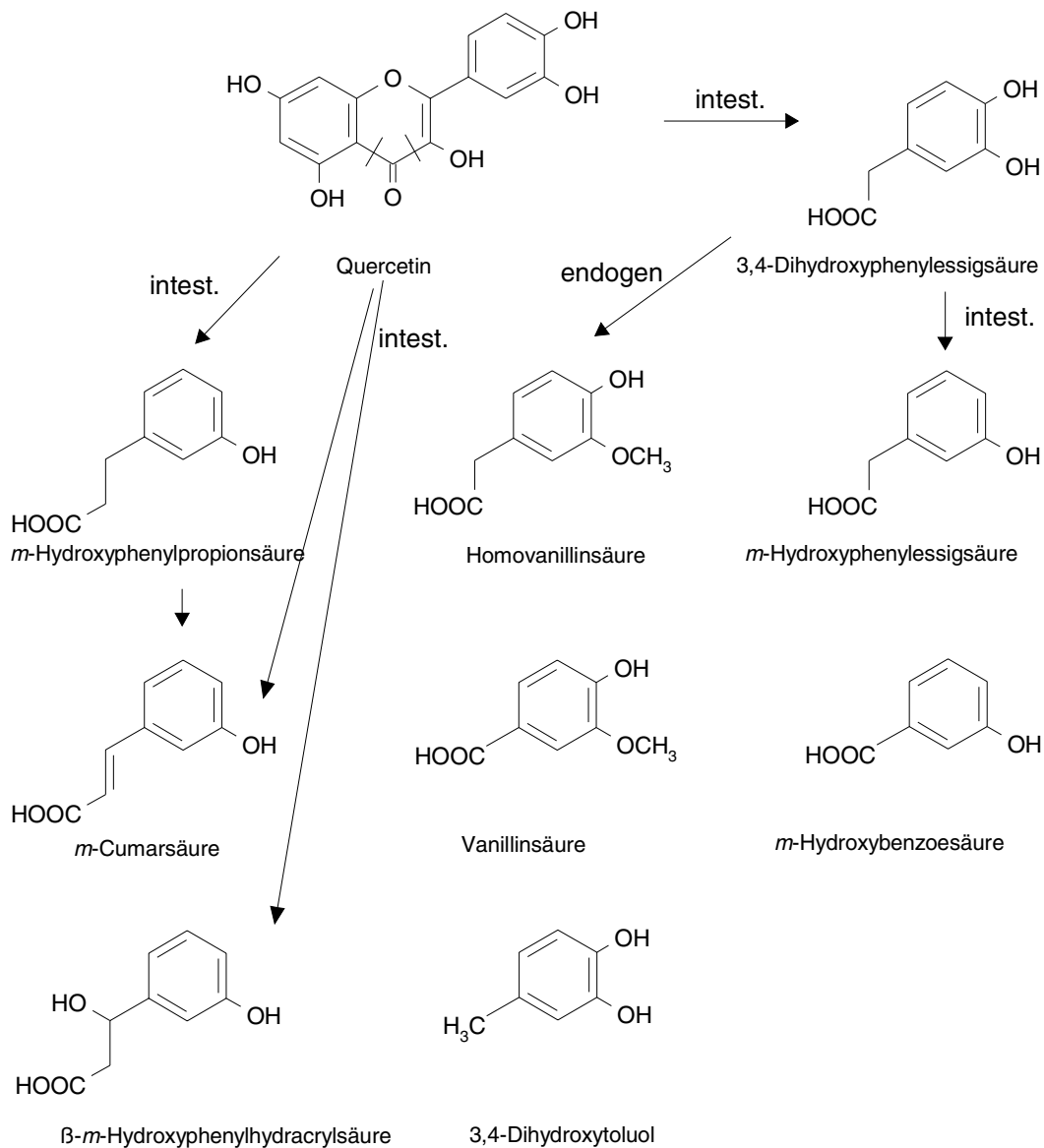
Da Katechole wie Quercetin bekanntermaßen in alkalischen Medien instabil sind, kann es im Dünndarm bei pH-Werten von bis zu 8,2 unter Umständen zu einem chemischen Abbau und/oder Oxidationen kommen (Hatcher und Bryan 1985). Da hoher Verzehr von Gemüse den pH-Wert der verdauten Nahrung erhöht, könnte auch dies einen negativen Einfluss auf die Stabilität von Quercetin haben.

### **1.2.1 Intestinaler Metabolismus**

Die Resorption von Quercetin nach oraler Applikation wurde lange Zeit als vernachlässigbar betrachtet. Dabei war allgemein akzeptiert, dass nur Aglykone die Darmwand passieren konnten, was eine Spaltung der Glykoside vor der Resorption erforderlich machte. Bis vor kurzem wurde angenommen, dass es keine körpereigenen Enzyme gab, die  $\beta$ -glykosidische Bindungen spalten konnten. Verschiedene Mikroorganismen im Kolon waren jedoch bekannt dafür, dass sie Flavonoidglykoside hydrolysierten (Bokkenheuser et al. 1987, Kim et al. 1998, Schneider und Blaut 2000). Daher wurde eine Resorption ausschließlich im Kolon vermutet, wo allerdings ein weiterer Abbau durch intestinale Mikroorganismen ebenfalls wahrscheinlich war. Der mikrobielle, intestinale Metabolismus von Substanzen mit freien Hydroxygruppen in Position 4, 5 und 7 fand unter Spaltung des C-Rings statt, wobei verschiedene Phenylelessigsäure- und Phenylpropionsäurederivate entstanden (Heilmann und Merfort 1998, Scheline 1991). Diese Metabolite konnten anschließend resorbiert und im menschlichen Körper weitergehend metabolisiert werden (Booth und Williams 1963, Scheline 1968, Winter et al. 1989). Über das Schicksal des A-Rings im Menschen war wenig bekannt, aber Daten aus Tierexperimenten ließen vermuten, dass es zur Bildung von Phloroglucinol, Phloroglucinol-Carboxylsäure oder vollständigem Abbau zu  $\text{CO}_2$  kam (Ueno et al. 1983). Im Menschen wurden nach oraler Applikation von Rutin als Hauptmetabolite Homovanillinsäure (HVA), 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DHPAA), 3-Hydroxyphenylelessigsäure (mHPAA), Dihydroxytoluol (DHT) und  $\beta$ -m-Hydroxyphenylhydracrylsäure neben einem komplexen Spektrum anderer polyphenolischer Komponenten im Plasma und Urin beschrieben (Baba et al. 1981, Sawai et al. 1987, Scheline 1991) (Abb. 1.2).

Diese Abbauprozesse wurden in einigen neueren Untersuchungen berücksichtigt, in denen statt Quercetin die Metabolite in *In-vitro*-Assays auf ihre pharmakodynamische Aktivität hin

getestet wurden (Kim et al. 1998, Merfort et al. 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die Abbauprodukte DHPAA sowie 4-Hydroxyphenylelessigsäure (pHPAA) die Blutplättchenaggregation *in vitro* effektiver hemmten als Quercetin und Rutin (Kim et al. 1998). Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die beobachteten *In-vivo*-Wirkungen auch von Quercetinmetaboliten verursacht werden konnten. Auch wenn Quercetin *in vivo* nicht vollständig abgebaut wurde, so musste doch der Einfluss der intestinalen Metabolisierung auf das Ausmaß der Quercetinresorption mit berücksichtigt werden.



**Abb. 1.2** Mikrobielle (intestinale) und endogene (mucosale und/oder hepatische) Metabolite von Quercetin. Die Pfeile deuten mögliche Abbauwege an. Für Komponenten ohne Pfeile ist der Abbauweg und –ort noch ungeklärt.

Einige dieser Metabolite, darunter auch DHPAA und HVA, entstehen auch endogen im Verlauf des Katecholaminstoffwechsels wie z.B. beim Abbau von Dopamin (Forth et al. 1992). Die endogenen Konzentrationen dieser Metabolite variieren in Abhängigkeit von der Katecholaminkonzentration. Daher muss bei Untersuchungen der Quercetinmetabolite

besonders darauf geachtet werden, dass die endogenen Konzentrationen dieser Metabolite von denen unterschieden werden können, die aufgrund der Applikation von Quercetin entstehen.

### 1.2.2 *In-vitro*- und *In-situ*-Versuche zur Resorption von Quercetin(glykosiden)

Die zunächst als einzigen Resorptionsweg erkannte Spaltung der Glykoside im Kolon mit anschließender Resorption des Aglykons hätte zwangsläufig zur Folge, dass die Quercetinkonjugate zeitverzögert im Blut anfluteten. Untersuchungen von HOLLMAN et al. (1996b) (siehe Absatz 1.2.4) zur Resorption von Quercetinglykosiden aus Zwiebeln, in denen ein sehr schnelles Anfluten von Quercetinkonjugaten im Plasma beobachtet wurde, ließen erste Zweifel an diesem Resorptionsmechanismus aufkommen. Die Bedeutung des Dünndarms bei der Resorption der intakten Flavonoide stieg. Zur Klärung von Resorptionsmechanismen an der Darmwand konnten *In-vitro*- und *In-situ*-Studien wertvolle Informationen liefern.

Der Transport durch die menschliche Epithelzelllinie Caco-2 (colon adenocarcinoma cells) stellte ein gut etabliertes Modell für die menschliche Resorption im Darm dar. In diesem Modell wurde Quercetin in zwei Studien gut resorbiert (Noteborn et al. 1997, Walgren et al. 1998). Quercetin war jedoch ebenfalls ein Substrat für eine Efflux-Pumpe. Die Autoren vermuteten, dass ein Teil des in die Zellen aufgenommenen Quercetins wieder in das Darmlumen abgegeben würde und somit erneut chemischen und mikrobiellen Abbauprozessen ausgesetzt wäre (Walgren et al. 1998). Caco-2 Zelllinien schienen Quercetin nicht zu metabolisieren. Die Resorption von Quercetin-4'-*O*-glucosid, -3,4'-*O*-diglucosid, -3-*O*-glucosid und -3-*O*-rhamnosid war sehr gering, was die Hypothese einer Resorption von Quercetin in Form seiner Glykoside nicht unterstützte (Noteborn et al. 1997, Walgren et al. 1998).

In einem *In-situ*-Experiment wurden die Quercetinkonzentrationen an der serosalen Seite von lebenden Jejunumsegmenten der Ratte nach zweistündiger Perfusion mit 10 µM Quercetin bzw. verschiedenen Glykosiden gemessen. Für Quercetin konnten nur 0,3-0,4 % der Dosis im Resorbat detektiert werden, bei den Glykosiden war der Prozentsatz noch geringer. Überraschenderweise trat nur Rutin besser ins Resorbat über als das Aglykon (1,3-2,3 % der Dosis). Ein ausgeprägter, schneller Metabolismus zeigte sich nur im Falle der Quercetinperfusion (Noteborn et al. 1997). Diese Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit neueren *In-situ*-Untersuchungen in Ratten. In diesen Untersuchungen wurde der Dünndarm für 30 min mit einem physiologischen Puffer und darin enthaltenem Quercetin oder Rutin (15 µM) bei einer Flussrate von 1 mL·min<sup>-1</sup> perfundiert. Die Rutinkonzentrationen zu Beginn des Jejunums und am Ende des Ileums waren nicht signifikant verschieden. Im Gegensatz dazu wurden etwa 2/3 des Quercetins resorbiert und im Enterocyten an Glucuronsäure konjugiert. Die Hälfte des konjugierten Quercetins wurde allerdings anschließend wieder ins Darmlumen sekretiert. Diese Sekretion könnte erklären, warum die Netto-Resorption von Quercetin durch die Darmwand nur etwa 30 % betrug. Quercetin konnte im Plasma nach Hydrolyse der Konjugate detektiert werden (Crespy et al. 1999).

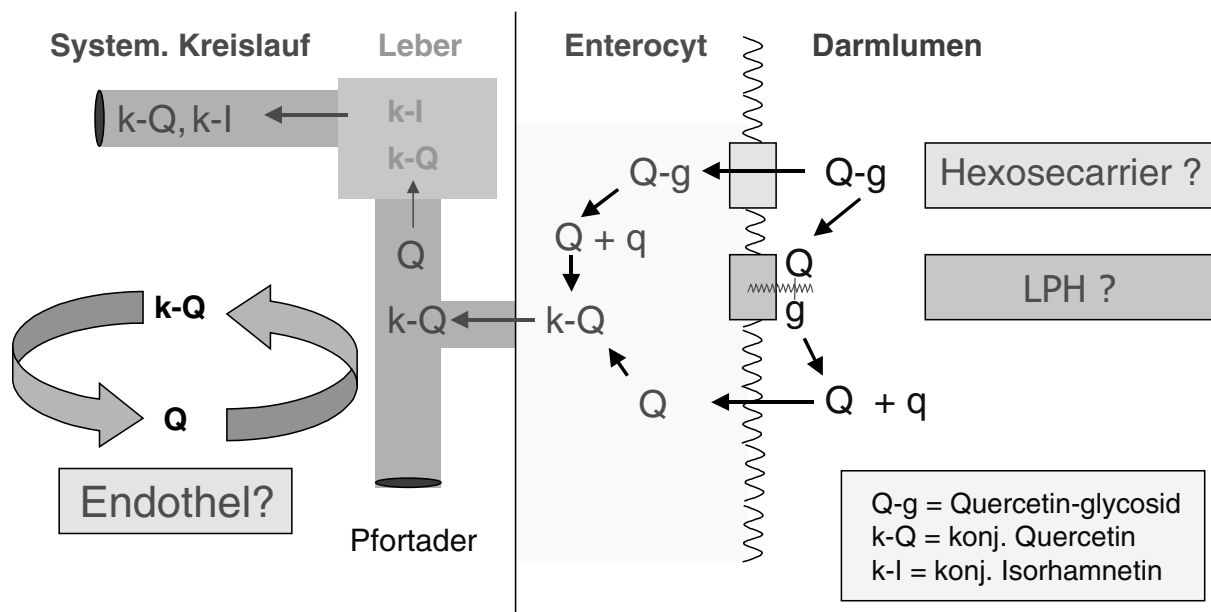
Seit Beginn der vorliegenden Arbeit wurden von verschiedenen Arbeitskreisen parallel zu den eigenen *In-vivo*-Studien weitere *In-vitro*-Versuche zur Klärung der Resorptionsmechanismen in oberen Dünndarmabschnitten durchgeführt. Die in den letzten drei Jahren erzielten Ergebnisse lieferten erste Hinweise auf die zugrunde liegenden Vorgänge. Da diese Erkenntnisse aber zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht vorlagen, sollen diese Untersuchungen hier nur kurz erwähnt werden. Sie werden aufgrund der zeitgleichen und wechselseitigen Entwicklung mit den eigenen Untersuchungen ausführlich unter Absatz 4.1 und 4.2 vorgestellt und diskutiert.

DAY et al. konnten zeigen, dass die Fähigkeit zur enzymatischen Spaltung der  $\beta$ -glykosidischen Bindung nicht auf bakterielle Enzymsysteme beschränkt war. Vor kurzem wurde eine cytosolische  $\beta$ -Glucosidase in der Leber, Niere und auch im Dünndarm des Menschen gefunden (Day et al. 1998). Dies führte zu der Überlegung, ob Quercetinglykoside möglicherweise erst in den Enterocyten der oberen Darmabschnitte gespalten würden. Der Transport der Quercetinglykoside über die Darmwand in die Enterocyten blieb aber unklar. Möglicherweise war an der Aufnahme ein Hexose-Transporter beteiligt (Gee et al. 1998)(Abb. 1.3). Hinweise dafür lieferten Interaktionen von Quercetin mit Natrium-abhängigen sowie Natrium-unabhängigen Glucosetransportern (Park 1999, Park und Levine 2000). DAY et al. (2000) gaben allerdings zu bedenken, dass eine Interaktion mit diesen Glucosetransportern nicht zwangsläufig mit einem Transport der Quercetinglykoside gekoppelt sein müsste. Aufgrund der Größe und Struktur der untersuchten Quercetinglykoside erschien ein Transport über die Membran sogar eher unwahrscheinlich (Day et al. 2000). Die Autoren vermuteten, dass Quercetinglykoside von der membranständigen Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH) bereits an der luminalen Seite der Darmwand hydrolysiert wurden und anschließend das freiwerdende Aglykon resorbiert wurde (Day et al. 2000) (Abb. 1.3).

### 1.2.3 Mucosaler und hepatischer First-Pass Effekt

Bezüglich des hepatischen First-Pass-Effektes gab es deutliche Hinweise darauf, dass Quercetin in der Leber weitgehend metabolisiert wurde. Menschliche Hepatocyten der Zelllinie HepG2 metabolisierten Quercetin unter Bildung von Isorhamnetin (3'-O-Methylquercetin, siehe Abb. 1.1) als einzigen Metaboliten (Boulton et al. 1998, Walle et al. 1998). In Ratten wurde Isorhamnetin zuvor bereits als biliärer und renaler Metabolit nach oraler Applikation von Quercetin detektiert (Brown und Griffiths 1983, Peter et al. 1966, Ueno et al. 1983). Kürzlich zeigten Plasmaanalysen von Ratten, dass etwa 80 % des resorbierten Quercetins nach Applikation hoher Dosen an Ratten zu Isorhamnetin umgesetzt wurden (Manach et al. 1997). Im Menschen war der methylierte Anteil deutlich geringer. Es wurde vermutet, dass der Methylierungsprozess nur dann eine tragende Rolle spielte, wenn relativ hohe Quercetinkonzentrationen im Plasma zirkulierten (Manach et al. 1998). Sowohl Quercetin als auch Isorhamnetin waren im Plasma vollständig konjugiert, was auf einen sehr hohen First-Pass-Effekt des Aglykons hinwies.

Die Bedeutung der Darmwand als metabolisierendes Organ wurde erst in späteren Untersuchungen erkannt. Die Metabolisierung von Quercetin zu Quercetinkonjugaten schien in Tierexperimenten bereits weitgehend im Enterocyten statt zu finden. Für das Isoflavon Genistein konnte gezeigt werden, dass die Glucuronidierung hauptsächlich in der Dünndarmwand und nicht in der Leber stattfand (Sfakianos et al. 1997). Dieses Ergebnis wurde durch Perfusionsexperimente mit Rattendünndarm unterstützt. In diesen Versuchen wurden Quercetin und Quercetinglucoside rasch in den Enterocyten aufgenommen und dort konjugiert (Crespy et al. 1999, Spencer et al. 1999) (Abb. 1.3). Die entstandenen Glucuronide und Sulfate wurden teilweise wieder ins Darmlumen abgegeben. *In vivo* würden diese Konjugate höchstwahrscheinlich einem enterohepatischen Kreislauf unterliegen. Ergebnisse aus *In-vivo*-Versuchen mit Schweinen wiesen ebenfalls auf einen überwiegenden Metabolismus in der Darmwand hin. Nach intravenöser und oraler Applikation von Quercetin an Schweine zeigte sich ein unterschiedliches Metabolitenmuster, was wahrscheinlich machte, dass eine Konjugation vorzugsweise bereits im Enterocyten stattfand (Ader et al. 2000).



**Abb. 1.3** Hypothetischer Resorptionsmechanismus und Metabolismus von Quercetinglykosiden vom Darmlumen bis zum systemischen Kreislauf. Die im Blut zirkulierenden Quercetinkonjugate könnten möglicherweise am Endothel = Wirkort aufgrund der dort nachweisbaren Glucuronidase-Aktivität wieder hydrolysiert werden und so Quercetin freisetzen. LPH=Lactase-Phlorizin-Hydrolase. Modifiziert nach CRESPIY et al. (1999).



### 1.2.4 Bioverfügbarkeit nach oraler Applikation im Menschen

Ebenso wie die *In-vitro*-Daten und tierexperimentellen Untersuchungen zum Resorptionsmechanismus kamen auch die *In-vivo*-Studien zur Bioverfügbarkeit von Quercetin im Menschen zu äußerst widersprüchlichen Ergebnissen. Eine Übersicht über die durchgeführten Studien und den Kenntnisstand zu Beginn der vorliegenden Arbeit liefert Tab. 1.4. Die in den letzten drei Jahren zeitgleich zu den eigenen Untersuchungen durchgeführten Studien sind in Tab. 1.5 aufgeführt und stellen den aktuellen Kenntnisstand dar.

HOLLMAN et al. führten verschiedene Humanstudien zur Resorption und Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen Nahrungsmitteln durch. Neun Probanden erhielten gebratene Zwiebeln entsprechend  $225 \pm 43 \mu\text{mol}$  ( $69 \pm 13 \text{ mg}$ ) ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ ) berechnet als Aglykon, eine Apfelzubereitung entsprechend  $325 \pm 7 \mu\text{mol}$  ( $98 \pm 2 \text{ mg}$ ) oder Kapseln mit  $331 \mu\text{mol}$  ( $200 \text{ mg}$ ) Quercetin-3-*O*-rutinosid in einer randomisierten Cross-over-Studie (Hollman et al. 1997a). In Zwiebeln lag Quercetin als Quercetin-4'-*O*-glucosid vor, wogegen Quercetin-3-*O*-glucosid in Äpfeln vorkam. Kochmethoden (z.B. Erwärmen der Zwiebeln) führten zu keiner signifikanten Änderung der Quercetinglykoside (Price et al. 1997). Blutproben wurden in Intervallen bis zu 36 h nach Einnahme genommen und der 24 h-Urin gesammelt. In einer vorangehenden Pilotstudie erhielten 2 Probanden gebratene Zwiebeln entsprechend  $64,2 \text{ mg}$  ( $212 \mu\text{mol}$ ) Quercetin Aglykon, und Blutentnahmen fanden bis zu 48 h nach Einnahme statt (Hollman et al. 1996b). Quercetin, Quercetinglykoside, -glucuronide und -sulfate wurden gleichzeitig extrahiert und durch saure Hydrolyse zum Aglykon hydrolysiert. Die Proben wurden mittels HPLC analysiert. Quercetin wurde nach Nachsäulenderivatisierung mit Aluminiumnitrat als Aluminiumkomplex mittels Fluoreszenzdetektion bestimmt. Die Nachweisgrenze für Quercetin lag bei  $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $7 \text{ nM}$ ). Die Gesamtquercetinkonzentrationen wurden an ein Zweikompartmentmodell angepasst und damit Absorptions-, Verteilungs- und Eliminationsparameter bestimmt. Der höchste  $c_{\text{max}}$ -Wert ( $224 \pm 44 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $\text{MW} \pm \text{SD}$ )) und kürzeste  $t_{\text{max}}$ -Wert ( $0,7 \pm 1,08 \text{ h}$ ) wurde nach Einnahme der Zwiebelzubereitung beobachtet, gefolgt von der Apfelzubereitung ( $c_{\text{max}}$   $92 \pm 19 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  bei  $t_{\text{max}}$   $2,51 \pm 0,72 \text{ h}$ ) und den Rutin-Kapseln ( $c_{\text{max}}$   $90 \pm 93 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  bei  $t_{\text{max}}$   $9,3 \pm 1,8 \text{ h}$ ). Die Halbwertszeit in der Verteilungsphase wurde für Zwiebeln mit  $4,4 \pm 4,3 \text{ h}$  und für Äpfel mit  $2,4 \pm 3,7 \text{ h}$  angegeben. Die Eliminationshalbwertszeit war  $28 \pm 92 \text{ h}$  für Zwiebeln und  $23 \pm 32 \text{ h}$  für Äpfel. Aufgrund der Resorptionsverzögerungszeit im Falle von Rutin waren zu wenige Datenpunkte für eine kompartmentelle Analyse vorhanden. Innerhalb von 24 h wurden nur  $1,39 \pm 0,49 \%$  der Dosis nach Einnahme der Zwiebeln renal eliminiert,  $0,44 \pm 0,22 \%$  nach Einnahme der Äpfel und  $0,35 \pm 0,41 \%$  bei Rutin. Für eine pharmakokinetische Auswertung der Daten war eine vorangehende Hydrolyse der Plasmaproben allerdings nicht ganz unproblematisch, da sowohl der (Leber-) Metabolismus als auch die Exkretion zur Elimination eines Arzneistoffes aus dem Körper beitragen. Daher zählten die Phase-II-Metabolite, Quercetinglucuronide und -sulfate, bereits zu den Eliminationsprodukten der resorbierten Ausgangssubstanz Quercetin. Wie von den Autoren erwähnt wurde, setzten sich die Daten daher sowohl aus den Geschwindigkeitskonstanten der Absorptions-, Verteilungs- und Eliminationsprozesse des Ausgangsstoffes als auch den Entstehungs-, Verteilungs- und Eliminationsprozessen der Metabolite zusammen. Folglich

waren die Verteilungs- und Eliminationshalbwertszeiten, die in dieser Studie ermittelt wurden, deutlich länger als bei der reinen Bestimmung des Ausgangsstoffes (Ferry et al. 1996, Gugler et al. 1975). Dies musste bedacht werden, wenn im Folgenden die Daten von den Autoren als „pharmakokinetische Parameter von Quercetin“ bezeichnet wurden.

Die Autoren schlussfolgerten, dass die verschiedenen Zuckerkomponenten in den drei Zubereitungen möglicherweise für die beobachteten Unterschiede verantwortlich waren. Daher hatte entweder die Position der Bindung oder die Art des Zuckers einen großen Einfluss auf die Resorption *in vivo*. Die vorliegende Arbeit sollte einen wesentlichen Beitrag zur Klärung dieser Fragen leisten.

Die gleiche Arbeitsgruppe bestimmte ebenfalls die Absorption von Quercetinglykosiden aus Zwiebeln, Rutin und Quercetin Aglykon an gesunden Ileostomiepatienten (Hollman et al. 1995). Die Absorption wurde als der Unterschied zwischen eingenommener Menge und Wiederfindung in Darmflüssigkeit sowie Urin definiert. Aufgrund des fehlenden Kolons konnte eine Absorption nur im Dünndarm stattfinden. Im Urin wurden innerhalb von 13 h nach Einnahme des jeweiligen Präparates  $0,31 \pm 0,14$  % bei Zwiebeln,  $0,07 \pm 0,19$  % bei Rutin und  $0,12 \pm 0,08$  % bei Quercetin wiedergefunden. Diese Werte umfassten bereits eliminiertes Quercetin, Glykoside sowie Konjugate. Plasmakonzentrationen wurden in dieser Studie nicht bestimmt, um eine zusätzliche Belastung der Patienten zu vermeiden. Die Quercetinresorption reichte auf der Grundlage dieser Berechnungen von  $52 \pm 15$  %,  $17 \pm 15$  % sowie  $24 \pm 9$  % für Zwiebel, Rutin und Quercetin. Die Urindaten ließen eine intensive biliäre Ausscheidung oder Metabolismus von Quercetin im Körper nach Absorption vermuten, unter Bildung von anderen Metaboliten als Quercetinderivaten, die somit nicht detektiert werden konnten. Die Definition von Absorption als Differenz von Einnahme und Wiederfindung bei dieser Studie wurde jedoch sehr kontrovers diskutiert.

Methylierte und konjugierte Quercetinderivate wurden kürzlich in Humanplasma nachgewiesen und bestätigten die zuvor in Rattenexperimenten erhaltenen Ergebnisse (Manach et al. 1998, Manach et al. 1997, Manach et al. 1995). Zehn Probanden erhielten eine flavonoidreiche Diät entsprechend 87 mg (288 mol) Quercetin nach 24 h flavonoidfreier Ernährung. Blutproben wurden 2 h vor und 3, 7 und 20 h nach Einnahme der Mahlzeit abgenommen. Nach enzymatischer Hydrolyse wurden Quercetin und Quercetinderivate mittels HPLC und elektrochemischer Detektion bestimmt. Die Nachweisgrenze für Quercetin und Isorhamnetin betrug  $1,5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  (5 nM) beziehungsweise  $3 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  (10 nM). Vor der Mahlzeit lagen die Quercetinkonzentrationen im hydrolysierten Plasma bei 8,5 bis  $43 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  (28 bis 142 nM) und stiegen signifikant auf Durchschnittswerte von  $104 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  (344 nM) an. Die Quercetinkonzentrationen sanken nach 7 h und erreichten die Ausgangswerte nach 20 h.

In einer Humanstudie zur Untersuchung des Metabolismus der *Ginkgo biloba*-Flavonole - hauptsächlich Quercetin, Kämpferol und Isorhamnetin – konnte ebenfalls Quercetin in Plasma und Urin nach oraler Applikation von 400 mg eines standardisierten *Ginkgo biloba* Extraktes detektiert werden (Drieu et al. 1985). Mittels HPLC und elektrochemischer Detektion wurden die Aglykone im Blut und Urin mit einer Nachweisgrenze von  $0,5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  ( $1,6 \text{ } \mu\text{M}$ ) detektiert. Plasmakonzentrationen an Kämpferol, Quercetin und Isorhamnetin konnten im Plasma nachgewiesen werden, die erreichten Konzentrationen wurden allerdings nicht angegeben. Das renale Eliminationsprofil von Quercetin erreichte bei etwa 5 h ein

Maximum, nach 20 h war die Ausscheidung nahezu abgeschlossen. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Applikation von 50, 100 und 300 mg *Ginkgo biloba*-Extrakt an zwei Probanden erhalten (Nieder 1991). Quercetin wurde im Plasma mittels HPLC-UV detektiert, und geringe Konzentrationen bis zu  $0,6 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  (2 nM) wurden fluorimetrisch nach Derivatisierung mit Aluminiumsalzen wie zuvor beschrieben bestimmt (Hollman et al. 1996c). Maximale Plasmakonzentrationen von etwa  $150 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $0,5 \mu\text{M}$ ) Gesamtflavonole wurden 2 bis 3 h nach Applikation erreicht, die Halbwertszeiten reichten von 2 bis 4 h, und die Elimination war dosisunabhängig nach 24 h abgeschlossen.

Kürzlich wurde eine GC/MS und LC/MS Methode zur Bestimmung von Quercetin und Kämpferol mit Nachweisgrenzen von 20 pg bzw. 10 pg auf der Säule entwickelt. Mit dieser Methode konnten Quercetin und Kämpferol in einer Urinprobe nach Einnahme von 16 *Ginkgo biloba*-Tabletten (je 12,5 mg Flavonoide), eingenommen über einen Zeitraum von 48 h, bestimmt werden (Watson und Pitt 1998).

Eine Bioverfügbarkeitsstudie mit verschiedenen Rutinformulierungen wurde von MURGU et al. durchgeführt (Murgu et al. 1978). Nach methanolischer Extraktion aus dem Plasma wurde Rutin photometrisch als Aluminiumchlorid-Komplex bei 480 nm ohne vorhergehende Trennung bestimmt. Diese Methode war jedoch nicht spezifisch für Rutin, was sich in den hohen Serumkonzentrationen widerspiegelte ( $20,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  -  $33 \mu\text{M}$  - nach einer oralen Dosis von 200 mg Rutin). Die Autoren hatten anschließend Schwierigkeiten, die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Resultate zu interpretieren. Dies könnte auf der Tatsache beruhen, dass der verwendete Assay nicht zwischen Flavonoiden, ihren Metaboliten und Matrixkomponenten differenzieren konnte, also wenig selektiv war.

Die Identifizierung von Flavonoiden als Glykoside in Humanplasma wurde von PAGANGA et al. berichtet (Paganga und Rice Evans 1997). Plasmaproben wurden mittels HPLC-PDA bei Detektionswellenlängen von 280 nm und 350 nm analysiert. Peaks wurden anhand ihrer relativen Retentionszeiten, bezogen auf einen Internen Standard und ihrer Spektren im Vergleich zu Referenzstandards, identifiziert. Rutin wurde in Konzentrationen von etwa  $0,74 \mu\text{M}$  detektiert, weitere Quercetinglykoside in Konzentrationen von 0,4 bis  $1,34 \mu\text{M}$  (berechnet als Quercetin-3-O-glucosid). Diese Ergebnisse wurden kürzlich in einer Studie bestätigt, in der verschiedene Quercetin- und Isorhamnetinglucoside in Humanplasma und Urin nach Einnahme von Zwiebeln detektiert wurden (Aziz et al. 1998). Aufgrund der verwendeten analytischen Messmethoden sind allerdings beide Studien sehr kritisch zu bewerten (siehe Absatz 4.1).

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Studien konnte in verschiedenen anderen Untersuchungen kein Quercetin Aglykon oder Glykosid in Plasma und Urin nach oraler Applikation quercetinhaltiger Formulierungen detektiert werden. GUGLER et al. (1975) verabreichten 4 g Quercetin oral an vier Probanden und konnten kein freies Quercetin im Plasma nachweisen. Unglücklicherweise wurden Konjugate nicht zusätzlich gespalten, so dass der Gesamtquercetiningehalt nicht bestimmt wurde. Im Urin wurde sowohl der freie als auch konjugierte Anteil nach enzymatischer Hydrolyse bestimmt, aber es konnte weder freies noch konjugiertes Quercetin bestimmt werden. Hingegen wurden  $53\pm 5\%$  der Dosis im

Faezes wiedergefunden. Die Autoren folgerten daher, dass die Resorption des Quercetins weniger als 1 % betrug, da die Sensitivität der Methode eine Mengenbestimmung von mehr als 1 % der oralen Dosis im Urin zugelassen hätte. Jedoch werden Quercetinkonjugate aufgrund des größeren Molekulargewichtes vermutlich bevorzugt biliär eliminiert, was bei Ratten bereits gezeigt werden konnte (Griffiths 1982). Daher ist die Bestimmung des freien Anteils im Plasma unzureichend, und es ist davon auszugehen, dass die Bestimmung des Gesamtquercetinsgehalts nach Hydrolyse eine höhere Resorption vermuten ließe.

Baba et al. führten die ersten Untersuchungen zur Identifizierung der intestinalen Metabolite von Rutin im Menschen durch (Baba et al. 1981). In dieser Studie wurden DHPAA, mHPAA, DHT, HVA und  $\beta$ -m-Hydroxyphenylhydracrylsäure mittels GC/MS als Rutinmetabolite identifiziert, nachdem zwei Probanden jeweils 10 mg deuterium-markiertes Rutin-d/kg KG oral eingenommen hatten. Alle 5 Komponenten waren im Urin auch als endogene Metabolite vorhanden. Quercetin konnte im Urin nicht nachgewiesen werden. Die Rutinausscheidung im Urin nach oraler Applikation von 50 mg/kg nichtmarkierten Rutins wurde mittels TLC analysiert und war unterhalb der Nachweisgrenze ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

In einer anderen Studie wurden ebenfalls DHPAA, mHPAA, DHT und HVA in Humanplasma und Urin nach oraler Applikation von 75 mg Rutin an zehn Probanden nachgewiesen (Sawai et al. 1987). Die Analysen wurden mit GC/MS unter Verwendung der entsprechenden deuterium-markierten Substanzen als Interne Standards durchgeführt. Maximale Konzentrationen wurden im Blut 8 bis 12 h nach Einnahme beobachtet und fielen innerhalb von 20 bis 35 h langsam wieder auf die endogenen Ausgangsspiegel ab. Eliminationshalbwertszeiten betragen für DHPAA und HVA 3,2 h bzw. 4,4 h, für DHT und mHPAA 14,5 h bzw. 8,0 h. Die renal eliminierte Gesamtmenge aller 4 Komponenten betrug 50,5 % der Dosis.

Gross et al. berichteten von der Entwicklung einer HPLC-PDA Analysenmethode für die Quantifizierung von Flavonol-Metaboliten in Humanurin (Gross et al. 1996). Bei zwei normalernährten Probanden lagen die durchschnittlichen Konzentrationen für DHPAA, mHPAA und HVA etwa bei 0,7, 4,8 sowie  $2,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Die Peakidentität wurde durch LC/MS und GC/MS Messungen bestätigt. Es wurde jedoch nicht geklärt, inwieweit diese Konzentrationen dem endogenen Katecholamin-Stoffwechsel zuzuordnen waren oder aus dem Flavonolmetabolismus hervorgingen.

Interessanterweise war der Gesamtgehalt an renal eliminiertem DHPAA und HVA nach oraler Applikation von 100 mg Rutin-Tabletten 3xtäglich über einen Zeitraum von 3 Tagen geringer verglichen mit der gleichen Rutinmenge als Buchweizenkrauttee-Zubereitung (Schilcher und Hagels 1996). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Rutin eine 40fach bessere Löslichkeit in einer wässrigen Buchweizenkrauttee-Zubereitung hatte als in Wasser. Dies deutete darauf hin, dass die Formulierung im Hinblick auf lösliche Pflanzeninhaltsstoffe einen großen Einfluss auf den Metabolismus und die Resorption von Quercetin und/oder seinen Metaboliten haben kann. Auch im aufkonzentrierten Urin konnte allerdings selbst nach Gabe von 300 mg Rutin 3xtäglich in Form der Teezubereitung kein Quercetin nachgewiesen werden (LOD für Quercetin:  $45 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} = 150 \mu\text{M}$ , entsprechend  $1,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Urin). Diese

Ergebnisse wurden in einer neueren Studie zur Resorption und Exkretion von Flavonoiden nach Einnahme einer Broccoli-Mahlzeit bestätigt (Nielsen et al. 1997). Broccoli enthält hohe Gehalte an den Flavonoiden Kämpferol (2,5 mg/100 g Frischgewicht) und Quercetin (1,8 mg/100 g Frischgewicht). Hydrolysierte Urinproben wurden mittels HPLC-UV und LC/MS analysiert, doch konnte nur Kämpferol und kein Quercetin detektiert werden.

Unterschiede im Flavonoidmetabolismus zwischen Mensch und Ratte wurden von PIETTA et al. beobachtet (Pietta et al. 1997). Sechs Probanden erhielten eine orale Dosis von 4 g *Ginkgo biloba*-Extrakt (standardisiert auf 24 % Flavonolglykoside). Im Gegensatz zu den bereits erwähnten Untersuchungen bezüglich des Metabolismus der *Ginkgo*-Flavonoide wurden in dieser Studie keine Flavonoide detektiert. Die Summe der im Urin gefundenen Metabolite kam für weniger als 30 % der Dosis auf. DHPAA, mHPAA und HVA sowie Propionsäure und Benzoesäure konnte bei Ratten detektiert werden. Im Humanurin konnten jedoch keine Phenyllessigsäure- oder Phenylpropionsäure-Derivate mittels HPLC-PDA Detektion nachgewiesen werden. Stattdessen konnten Benzoesäure-Derivate detektiert werden, was darauf hinwies, dass im Menschen ein weitergehender Metabolismus stattfand. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in einer Studie zum Metabolismus der *Equisetum arvense*-Flavonoide gemacht. Im Urin von elf Probanden wurde nach Einnahme von 5 g/Tag einer Schachtelhalmtee-Zubereitung ein komplexes Metabolitenspektrum phenolischer Säuren nachgewiesen (Graefe und Veit 1999). Neben Quercetin und anderen Flavonolen enthält Schachtelhalmkraut auch Hydroxyzimtsäuren, deren Metabolismus im Menschen bislang kaum untersucht wurde. Unveränderte oder konjugierte Flavonole konnten nach HPLC-PDA Analyse bei einer Nachweisgrenze von  $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  nicht gefunden werden. Benzoesäure-Derivate wie z.B. Hippursäure waren die Hauptmetaboliten, wohingegen die endogenen HVA-Konzentrationen im Laufe der Einnahme über mehrere Tage nicht signifikant anstiegen. Aus den zur Verfügung stehenden Daten ging nicht klar hervor, inwieweit das abweichende Metabolitenspektrum auf Inhaltsstoffe der Pflanzenextrakte zurückzuführen war, oder ob andere Faktoren den Metabolismus von Quercetin im Menschen im Vergleich zu Ratten beeinflussten.

Diese Studien legten eine sehr geringe Verfügbarkeit von Quercetin und/oder seinen Glykosiden nach oraler Applikation nahe und konzentrierten sich stattdessen auf die Metabolite als potentiell aktives Prinzip.

Ein weiterer Faktor, der häufig vernachlässigt wurde, war die Löslichkeit der verabreichten Substanzen. Quercetin und Rutin waren beide schlecht löslich in wässrigen Medien, wurden aber in Humanstudien oft in Tabletten- oder Kapselform verabreicht. In Ratten wurde gezeigt, dass das Ausmaß und die Geschwindigkeit der Resorption teilweise von der Löslichkeit in der verwendeten Formulierung abhingen. Je  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  der Substanz wurden in Propylenglycol, Propylenglycol/Wasser oder Wasser gelöst. In den Glycol und Glycol/Wasser-Gruppen wurden maximale Gesamtquercetinkonzentrationen von  $70,3 \text{ }\mu\text{M}$  und  $15,5 \text{ }\mu\text{M}$  innerhalb von 0,5 h nach Applikation gemessen. In der Wasser-Gruppe stiegen dagegen die Quercetinkonzentrationen im Plasma während des Experiments kontinuierlich an und erreichten  $5,5 \text{ }\mu\text{M}$  am Ende des Versuches nach 8 h (Piskula und Terao 1998b).

Daher könnte die verzögerte Resorption, die in Humanstudien nach Applikation von Rutinkapseln beobachtet wurde, auch auf eine geringe Löslichkeit zurückzuführen sein. Der Einfluss der Löslichkeit wurde auch in einer Humanstudie deutlich nach Applikation von Rutin als Kapseln oder Tee (siehe oben) (Schilcher und Hagels 1996). Quercetinglykoside in Nahrungsmitteln könnten möglicherweise generell besser resorbierbar sein aufgrund von löslichkeitsvermittelnden Faktoren in komplexen Pflanzenmatrices. Darüber hinaus unterstützte die Tatsache, dass reine Lösungen von Quercetin-4'-*O*-glucosid und Quercetin-3-*O*-glucosid gleichermaßen resorbiert wurden unabhängig von der Position der Zuckerkomponente die Bedeutung der Löslichkeit (Olthof et al. 2000). Daher wird die Verwendung gleicher Formulierungen und Zubereitungen bei zukünftigen Untersuchungen verschiedener Komponenten empfohlen, um durch eine unterschiedliche Biopharmazie der Arzneiformen hervorgerufene Effekte auszuschließen.

Die zu Beginn der vorliegenden Arbeit publizierten Untersuchungen kamen somit bezüglich der Resorption von Quercetin und seinen Glykosiden sowohl in *In-vitro*- und *In-situ*-Resorptionsversuchen als auch nach oraler Applikation im Menschen zu widersprüchlichen Ergebnissen. Dies konnte nur zum Teil mit der Verwendung von unterschiedlichen analytischen Methoden begründet werden. Die Ursachen für das unterschiedliche Resorptionsverhalten verschiedener Quercetinglykoside waren nicht bekannt. Unter anderem war unklar, welchen Einfluss die verschiedenen Zuckerkomponenten der Glykoside auf die Resorption hatten. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen sollten daher Erkenntnisse über Geschwindigkeit und Ausmaß der Resorption verschiedener Quercetinglykoside nach oraler Applikation im Menschen gewonnen werden. Die erhaltenen pharmakokinetischen Parameter sollten wiederum Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Resorptionsmechanismen zulassen.

**Tab. 1.4** Übersicht über die zu Beginn der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien zur Resorption und Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen quercetinhaltigen Prüfpräparaten. n=Probandenzahl; \* =detektiert nach Hydrolyse der Konjugate, n.d.=nicht detektiert, n.b.=nicht bestimm, n.a.=nicht angegeben, PCD=Nachsäulenderivatisierung,  $C_{max}$ =maximale Plasmakonzentration,  $t_{max}$ =Zeit bis  $C_{max}$ ,  $t_{1/2}$   $\beta$ =Eliminationshalbwertszeit; Angaben als  $MW \pm SD$ .

Erstautor	Jahr	n	Prüfpräparat	Dosis (entspr. Quercetin)	detekt. Substanzen*	$C_{max}$ [ng·mL <sup>-1</sup> ]	$t_{max}$ [h]	$t_{1/2}$ $\beta$ [h]	renale Elimin. [% Dosis]	Detektion
Gugler	1975	4	Quercetin	4000 mg	Quercetin	n.d.				PCD mit Fluoreszenz
Murgu	1978	n.a.	Rutin	30-100 mg	Quercetin*	15000-20000	0,5	n.a.	n.b.	photometr.
Baba	1981	2	Rutin-d	10 mg Rutin-d/kg KG	DHPAA, DHT mHPAA, HVA				im Urin nachgewiesen	GC/MS
Drieu	1985	3	Ginkgo biloba-Extrakt	400 mg Extrakt	Quercetin* Kämpferol*	detektiert, aber n.a. detektiert, aber n.a.	n.a. 0,5	3 3	n.a. n.a.	ECD
Sawai	1987	10	Rutin	75 mg Rutin	DHPAA, DHT mHPAA, HVA	70 pmol·mL <sup>-1</sup> 90 pmol·mL <sup>-1</sup> 60 pmol·mL <sup>-1</sup> 140 pmol·mL <sup>-1</sup>	8 8 12 8	3,2 14,5 8,0 4,4	10,6±6,3 7,7±8,5 13,2±11,1 18,9±8,35	GC/MS
Nieder	1991	2	Ginkgo biloba-Extrakt	50 mg Extrakt 100 mg Extrakt 300 mg Extrakt	Gesamtflavonole*	2-2,5	30 55 140	2-4	n.b.	UV und PCD mit Fluoreszenz
Hollman	1995	9	Zwiebeln Rutin Quercetin	89 mg 100 mg 100 mg	Quercetin*	n.b.	n.b.	n.b.	0,3±0,1 0,1±0,2 0,1±0,1	PCD mit Fluoreszenz
Hollman	1996	2	Zwiebeln	64,2 mg	Quercetin*	196	2,9 h	16,8	n.b.	PCD mit Fluoreszenz
Schlicher	1996	10	Rutin Buchweizenkrauttee	100 mg Rutin 3xtgl. entspr. 100 bzw. 300 mg Rutin 3xtgl.	Quercetin DHPAA, DHT mHPAA, HVA	n.b.	n.b.	n.b.	n.d. im Urin nachgewiesen	UV
Hollman	1997a	9	Zwiebeln Apfel Rutin	69 mg 98 mg 100 mg	Quercetin*	224±44 92±19 90±93	0,7±1,1 2,5±0,7 9,3±1,8	28±92 23±32 n.b.	1,4±0,5 0,4±0,2 0,4±0,4	PCD mit Fluoreszenz
Pietta	1997	6	Ginkgo biloba-Extrakt	4000 mg Extrakt	Flavonole* intest. Metabolite	n.b.	n.b.	n.b.	n.d. im Urin nachg.	PDA
Paganga	1997	n.a.	Normaldiät	n.b.	Quercetinglykoside	450-820	n.b.	n.b.	n.b.	PDA
Graefe	1999	11	Schachtelhalm extrakt	1000 mg Extrakt 5xtgl.	Flavonole DHPAA, DHT, HVA mHPAA, Benzoestre	n.b.	n.b.	n.b.	n.d. im Urin nachgewiesen	PDA

**Tab. 1.5** Übersicht über die seit Beginn der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien zur Resorption und Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen quercetinhaltigen Prüfpräparaten. n=Probandenzahl; \* =detektiert nach Hydrolyse der Konjugate, n.d.=nicht detektierbar, n.b.=nicht bestimmt, n.a.=nicht angegeben, PCD=Nachsäulenderivatisierung,  $C_{max}$ =maximale Plasmakonzentration,  $t_{max}$ =Zeit bis  $C_{max}$ ,  $t_{1/2}$ ,  $\beta$ =Eliminationshalbwertszeit; Angaben als  $MW \pm SD$ .

Erstautor	Jahr	n	Prüfpräparat	Dosis (entspr. Quercetin)	detekt. Substanzen*	$C_{max}$ [ng·mL <sup>-1</sup> ]	$t_{max}$ [h]	$t_{1/2}$ , $\beta$ [h]	renale Elimin. [% Dosis]	Detektion
Watson	1998	1	Ginkgo biloba-Extrakt	200 mg Gesamtflavonoide	Quercetin Kämpferol	n.b.	n.b.	n.b.	im Urin nachgewiesen	GC/MS LC/MS
Manach	1998	10	flavonoidreiche Mahlzeit	87 mg	Quercetin*	104±28 (nach 3 h)	3 h	n.b.	n.b.	ECD
Aziz	1998	5	Zwiebeln	250 mg	Quercetinkonjugate Quercetin-4'-gluc.	452±100 45±11	1,9±0,6 1,3±0,2	n.b.	n.b.	PCD mit Fluoreszenz
Janssen	1998	18	Zwiebeln	114 mg	Quercetin*	447±117	1,5	n.b.	n.b.	PCD mit Fluoreszenz
Olthof	2000	9	Qu-3-O-gluc. Qu-4'-O-gluc.	100 mg 100 mg	Quercetin*	1530±940 1350±640	0,6±0,6 0,5±0,2	18,5±0,8 17,7±0,9	3,0±1,0 2,6±1,2	PCD mit Fluoreszenz



### 1.3 *Pharmakokinetisch-pharmakodynamische Beziehungen*

In einer kürzlich durchgeführten Untersuchung wurden die Plasmakonzentrationen von Quercetin und Apigenin sowie ihr Einfluss auf die Hämostase in gesunden Probanden gemessen (Janssen et al. 1998). 18 Probanden nahmen an einer randomisierten, placebokontrollierten, dreifach Cross-over Studie teil und erhielten flavonoidreiche Nahrungsergänzungszubereitungen (Zwiebeln, Petersilie) oder eine flavonoidarme Zubereitung (als „Placebo“) jeweils für eine Woche. Die tägliche Zwiebelzubereitung enthielt  $114 \pm 3$  mg ( $377 \pm 10$   $\mu$ mol) berechnet als Quercetin Aglykon, die Petersilienzubereitung  $84 \pm 6$  mg ( $311 \pm 22$   $\mu$ mol) und das Placebo  $0,015 \pm 0,004$  mg ( $0,05 \pm 0,01$   $\mu$ mol). Blutproben wurden am Ende jeder Untersuchungswoche abgenommen. Die Quercetinkonzentrationen wurden nach Hydrolyse der Konjugate fluorimetrisch nach Nachsäulenderivatisierung bestimmt. In einem parallelen *In-vitro*-Experiment wurden die Wirkungen von Quercetin, Quercetin-3-*O*-glucosid, Catechin und Apigenin auf die Plättchenaggregation gemessen. Obwohl maximale Quercetinkonzentrationen von  $447 \pm 117$  ng·mL<sup>-1</sup> ( $1,5 \pm 0,4$   $\mu$ M, MW $\pm$ SD) 90 min nach Einnahme der Zwiebeln beobachtet wurden, zeigten sich keine Effekte auf kollageninduzierte Aggregation in Vollblut und Plasma, auf die Thromboxanproduktion oder auf andere Hämostasefaktoren. In einer ähnlichen Studie erhielten 27 Probanden hohe Flavoniddosen (1,0 g Quercetin/Tag, außerdem 1,0 g Bioflavonoide/Tag, 200 mg Rutin/Tag und 200 mg Bromelain/Tag) über einen Zeitraum von 28 Tagen (Conquer et al. 1998). Plasmaproben wurden an Tag 28 nach 10stündigem Fasten entnommen. Die Proben wurden enzymatisch und durch saure Hydrolyse gespalten und mittels HPLC-UV analysiert. Die Gesamtplasmakonzentrationen stiegen 14fach an (von  $0,10 \pm 0,09$  auf  $1,5 \pm 0,3$   $\mu$ M, bzw. von  $27,7 \pm 25,7$  auf  $427,1 \pm 89,2$  ng·mL<sup>-1</sup>), aber es wurden keine Änderungen verschiedener Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (unter anderem Cholesterol, Triglyceride, Blutdruck, Plättchenaggregation und Thromboxan B2-Produktion) beobachtet. In beiden Studien wurde jedoch der Gesamtquercetiningehalt nach Hydrolyse der Konjugate bestimmt. Wenn allerdings in den entsprechenden *In-vitro*-Tests Quercetin Aglykon als der potentielle Wirkstoff getestet wird, so sollte folglich auch die freie Quercetinkonzentration *in vivo* bestimmt werden. Ohne die Bestimmung des Verhältnisses von freiem zu konjugiertem Anteil können keine Aussagen zu den tatsächlichen freien Quercetinkonzentrationen gemacht werden. Das erschwert eine Korrelation der *in vitro* effektiven Quercetinkonzentrationen zu den Gesamtquercetinkonzentrationen im Plasma, da die korrespondierenden freien Quercetinkonzentrationen höchstwahrscheinlich sehr viel geringer sein werden. In anderen Studien waren die freien Quercetinkonzentrationen zu gering für einen Nachweis, obwohl sehr empfindliche Messmethoden eingesetzt wurden (Manach et al. 1998). Das antioxidative Potential der Konjugate ist außerdem deutlich geringer als das des Aglykons (Manach et al. 1998). Bedenkt man darüber hinaus die hohe Plasmaeiweißbindung des freien Quercetins, so erscheint es kaum wahrscheinlich, dass die verbleibende ungebundene, freie Quercetinkonzentration *in vivo* einen pharmakodynamischen Effekt auslöst.

#### 1.4 Methoden und Analytik

Hinsichtlich der Probenvorbereitung wurden in allen bisher veröffentlichten Arbeiten zur Bestimmung von pflanzlichen Phenolen (Flavonoide oder Catechine) in Plasma und Urin die Konjugate vor Analyse gespalten. Dies hatte zunächst überwiegend analytische Gründe, da

- die verschiedenen Konjugate (überwiegend Glucuronide) gar nicht oder nicht in ausreichender Menge und Reinheit als Referenzsubstanzen zur Verfügung standen.
- die Konjugate sowohl bei UV- als auch elektrochemischer Detektion einen schlechteren Responsefaktor als die freien Phenole hatten und somit die Empfindlichkeit geringer war. Dies war besonders bei der Analytik von Plasma- und Urinproben nach Applikation von Phytopharmaka von entscheidender Bedeutung, da die zu erwartenden Konzentrationen aufgrund der geringen Dosis im unteren Nanogramm pro Milliliter -Bereich lagen.
- nach Applikation von quercetinhalten Zubereitungen sowohl verschiedene Quercetin- als auch Isorhamnetinglucuronide gebildet wurden, und diese voneinander mittels UV- oder elektrochemischer Detektion nicht differenzierbar waren.
- die Konjugate abhängig von ihrer Bindungsstelle nicht zugänglich waren für eine Derivatisierung mit Aluminiumchlorid und anschließender Fluoreszenzdetektion - eine Methode, die aufgrund ihrer hohen Sensitivität häufig eingesetzt wurde.

Der im Plasma und Urin frei vorliegende Anteil an Flavonoiden oder Catechinen wurde hingegen nur in wenigen Arbeiten gleichzeitig bestimmt. Trotz empfindlicher Nachweismethoden konnte kein freies Quercetin im Plasma gefunden werden, so dass gefolgert wurde, dass Quercetin nur in Form seiner Glucuronide im Plasma zirkuliert (Manach et al. 1998). Unter Verwendung eines Glucuronyltransferase-Assays konnten bislang *in vitro* 4 verschiedene Quercetinglucuronide synthetisiert werden (Manach et al. 1998, Oliveira und Watson 2000).

Bei der Interpretation der publizierten Daten auf Grundlage des nach Hydrolyse bestimmten Gesamtquercetiningehaltes war aber bislang Vorsicht geboten. Der Zusammenhang zwischen den tatsächlich vorliegenden Quercetinkonjugaten und dem Gesamtquercetiningehalt war zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen noch nicht geklärt und sollte unter anderem Gegenstand dieser Arbeit sein (siehe Absatz 3.1). Darüber hinaus wurde häufig in der Interpretation und Diskussion der Ergebnisse nicht mehr erwähnt, dass sich die Daten nicht auf freies Quercetin bezogen, sondern auf der Grundlage der Quercetinkonjugate erhoben wurden. Dadurch wurde oft der Eindruck vermittelt, dass freies Quercetin im Menschen nachweisbar war und es sich um die pharmakokinetischen Daten von freiem Quercetin handelte. Dies spiegelte sich auch in der Tatsache wider, dass nach wie vor versucht wurde, die *in vitro* effektiven Quercetinkonzentrationen mit dem *in vivo* bestimmten Gesamtquercetiningehalt hinsichtlich einer pharmakodynamischen Wirkung zu korrelieren.

Bezüglich der Analytik und Detektion fiel bei den meisten bisher veröffentlichten Studien der fehlende Nachweis der Methodenspezifität besonders ins Gewicht. Durch Spiken von Plasmaproben mit Referenzstandards und Verwendung von Leerproben ließ sich in der Regel die Selektivität einer Methode gut bestimmen. Die Applikation von Quercetin und

seinen Glykosiden brachte jedoch auch möglicherweise interferierende Metabolite hervor, die einer hohen intra- und interindividuellen Variabilität unterlagen. Da diese Bedingungen während der Methodenentwicklung nicht simuliert werden konnten, konnte die Spezifität der Methode im Experiment nicht vorhergesehen werden. Dies galt im Besonderen für die Analytik von Urinproben. Daher ist die Verwendung von selektiven Detektionsmethoden bei zukünftigen pharmakokinetischen Studien von zentraler Bedeutung.

Die selektivste bisher verwendete Detektionsmethode in Verbindung mit HPLC war die Massenspektrometrie. Sie wurde jedoch bislang nicht zur quantitativen Analyse von Quercetin in pharmakokinetischen Studien eingesetzt. Bei der Verwendung von HPLC/MS waren mit stabilen Isotopen markierte Referenzstandards zur Quantifizierung vonnöten. Aufgrund des H/D-Austausches im Flavonoidmolekül konnte Deuterium kaum zur Markierung verwendet werden. C13-markierte Substanzen könnten synthetisiert werden, was allerdings als ein schwieriger Ansatz angesehen wurde (Deprez et al. 1997). Die Methode der Wahl ist heutzutage die Verwendung von Tandemmassenspektrometrie (HPLC/MS-MS) zur Detektion, was durch Verwendung von „Multiple Reaction Monitoring“ Techniken eine Quantifizierung im  $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Konzentrationsbereich ermöglicht.

Bezüglich der Sensitivität mussten Konzentrationen im oberen Pikogramm- oder unterem Nanogramm-Bereich noch bestimmbar sein. Die meisten verwendeten Methoden waren jedoch weniger sensitiv oder arbeiteten nahe an der Nachweisgrenze. Bei der Analyse von Plasmaproben hinsichtlich Quercetin und seinen möglichen Metaboliten mittels HPLC-PDA konnten nur Konzentrationen bis maximal  $20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  noch bestimmt werden (Graefe und Veit 1999). Die On-line UV-Spektren konnten zur Überprüfung der Peakidentität verwendet werden. Man musste jedoch beachten, dass die Spektren von Quercetinglykosiden und –glucuroniden nicht unterscheidbar waren.

Eine beträchtliche Erhöhung der Sensitivität konnte durch Nachsäulenderivatisierung mit Borsäurederivaten oder Aluminiumsalzen und anschließender fluorimetrischer Detektion erzielt werden. Solche Methoden hatten Nachweisgrenzen im unteren  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  Konzentrationsbereich (Hollman et al. 1996c). Unglücklicherweise waren die Methoden, die zur Erhöhung der Sensitivität eine Nachsäulenderivatisierung verwendeten, häufig nicht zugänglich für eine nachfolgende massenselektive Detektion.

Ein Schwerpunkt bei der Methodenentwicklung im Rahmen der vorliegenden Arbeit lag auf der simultanen Extraktion und Detektion von Quercetinderivaten und intestinalen Metaboliten. Die bereits publizierten Methoden konzentrierten sich diesbezüglich entweder auf die intestinalen Metabolite oder ausschließlich auf Quercetinderivate.

Ein zentraler Punkt bei den bisherigen Untersuchungen war das Fehlen einer validierten Analytik mit ausreichend sensitiven und selektiven Detektionsmethoden. Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag daher auf der Entwicklung und Validierung einer ausreichend selektiven und sensitiven Detektionsmethode für sowohl intestinale als auch endogene Quercetinmetabolite. Dafür boten sich elektrochemische Detektionsmethoden an, die bezüglich ihrer Sensitivität vergleichbar mit der Nachsäulenderivatisierung waren

(Manach et al. 1998). Erst seit wenigen Jahren steht ein elektrochemisches Mehrkanal-detektionsverfahren (häufig auch als „coulometrische Arraydetektion“ bezeichnet) zur Verfügung. Dieses neue Detektionsverfahren eignet sich aufgrund der hohen Sensitivität und auch Selektivität besonders für die Plasmaanalytik und wird in Zukunft noch stark an Bedeutung zunehmen.

### **1.5 In-vitro-Resorptionsversuche am Schweinedarmmodell**

Die orale Bioverfügbarkeit wird am besten *in vivo* im Tierversuch oder am Menschen selbst ermittelt. Das Bestreben, die orale Resorption von Substanzen *ex vivo* vorherzusagen und gezielt beeinflussen zu können, führte zur Entwicklung verschiedener Resorptionsmodelle. Bei den *In-vitro*-Resorptionsmodellen mit Darmsegmenten fanden verschiedene Techniken wie Perfusion, „everted sacs“, Inkubation oder die Ussing-Kammer Anwendung. Einen Überblick über die Vor- und Nachteile der verschiedenen Modelle verschafften HILLGREN et al. (Hillgren et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Resorption von verschiedenen Flavonolen und ihren Glykosiden in einem Inkubationsmodell (Franz-Diffusionszelle) unter Verwendung von Schweinedarmsegmenten untersucht werden. Bei der modifizierten Franz-Zelle handelte es sich um ein statisches Resorptionsmodell, in dem die serosale Darmseite nicht ständig mit frischem Medium umspült wurde, wie dies *in vivo* und in Perfusionsmodellen der Fall war. Folglich wurden resorbierte Substanzen nicht sofort abtransportiert, sondern reichert sich an der basalen Seite an.

Charakteristisch für dieses Modell war eine geringe Permeabilität von Testsubstanzen in das Resorbat. Selbst Substanzen wie Testosteron, das aufgrund seiner guten Permeabilität häufig als Markersubstanz in anderen Resorptionsmodellen (z.B. Caco-2 Zellen) eingesetzt wurde, wurde in einem vergleichbaren Resorptionsmodell (Boehringer Mannheim-Ringmodell) nur mittelmäßig resorbiert (Nolte 1998). Ursache hierfür war einerseits der hydrophile Schleim, der eine Permeation durch den Mucus behinderte (Larhed et al. 1998). Zusätzlich hemmte die Muskelschicht, die nicht vollständig entfernt werden konnte, die Transportrate durch die Darmwand (Wolfe et al. 1973). Dadurch bedingt war die gemessene *In-vitro*-Resorption in der Franz-Zelle und in vergleichbaren Resorptionsmodellen generell häufig geringer als die *in vivo* ermittelte (Nolte 1998). Für eine *In-vitro* / *In-vivo* Korrelation eignete sich daher der Vergleich absoluter Resorptionswerte nur bedingt. Klassifizierte man die untersuchten Substanzen hingegen in „gut“, „mittelmäßig“ und „schlecht“ resorbierbar, so konnte im Boehringer Mannheim-Ringmodell für verschiedene Substanzen gezeigt werden, dass eine gute *In-vitro* / *In-vivo* Korrelation bestand (Nolte 1998).

Die Charakterisierung eines mit der Franz-Zelle vergleichbaren statischen Resorptionsmodells (des Boehringer Mannheim-Ringmodells) wurde im Rahmen einer Dissertation anhand von verschiedenen Arzneistoffen durchgeführt (Nolte 1998). Zu den Vorteilen dieses Modells gehörten unter anderem die leichte Handhabbarkeit und gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

### **1.6 Aufgabenstellung und Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bioverfügbarkeit, Pharmakokinetik und den Metabolismus von Quercetin und verschiedenen Quercetinglykosiden im Menschen zu untersuchen. Insbesondere sollte der Einfluss der Glykoside im Vergleich zum Aglykon sowie der Pflanzenmatrix auf Resorption, Metabolismus und Elimination charakterisiert werden. Dabei sollten erstmals sowohl intestinale als auch endogene Quercetinmetabolite in Plasma und Urin erfasst werden.

Als Voraussetzung für eine pharmakokinetische Analyse auf der Basis des Gesamtquercetiningehalts sollte darüber hinaus der Zusammenhang zwischen den in Plasma und Urin vorliegenden Quercetinkonjugaten und dem nach Hydrolyse der Konjugate bestimmten Gesamtquercetiningehalt geklärt werden.

Für diese Untersuchungen war zunächst die Entwicklung einer Probenvorbereitungsmethode zur gleichzeitigen Extraktion der intestinalen wie endogenen Quercetinmetabolite aus Plasma und Urin erforderlich. Zur quantitativen Bestimmung dieser Metabolite musste des Weiteren eine ausreichend selektive und sensitive analytische Messmethode erarbeitet werden.

Die in den Humanstudien verwendeten pflanzlichen Zubereitungen sollten bezüglich ihrer Zusammensetzung und des Gehaltes an Quercetinglykosiden charakterisiert werden. Für die Applikation von Reinsubstanzen war die Isolierung des Quercetin-4'-*O*-glucosids aus Zwiebeln erforderlich. Zur Applikation der Prüfpräparate sollte eine einheitliche Prüfformulierung entwickelt werden, mit der ein resorptionsfördernder Effekt durch Lösungsvermittler weitgehend vermieden werden sollte.

Parallel zu der Humanstudie sollte der Einfluss der Zuckerkomponente und der Pflanzenmatrix auf die Resorption der Flavonolglykoside in einem *In-vitro*-Resorptionsmodell (Franz-Diffusionszelle) unter Verwendung von Schweinedarmsegmenten untersucht werden. Abschließend sollte festgestellt werden, inwieweit sich die Ergebnisse der *In-vivo*-Versuche mit den erhaltenen *In-vitro*-Resultaten korrelieren ließen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DHPAA)	Fluka 37860
3,4-Dihydroxytoluol (4-Methylcatechol) (DHT)	Fluka 53480
4-Hydroxyphenylelessigsäure (pHPAA)	Fluka 56140
3-Hydroxyphenylelessigsäure (mHPAA)	Fluka 56130
Hippursäure (HA)	Fluka 53280
Homovanillinsäure (HVA)	Sigma H 1252
Isorhamnetin (Isorh.)	Extrasynthese 1120 S
Kämpferol	Fluka 60010
Kämpferol-3- <i>O</i> -glucosid	GEIGER <sup>1)</sup>
Kämpferol-7- <i>O</i> -glucosid	GEIGER <sup>1)</sup>
Kämpferol-3,7- <i>O</i> -diglucosid	GEIGER <sup>1)</sup>
Naringenin (Nar.)	Sigma N 5893
Quercetin x 2H <sub>2</sub> O (Qu.)	Fluka 83370
Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid	GEIGER <sup>1)</sup>
Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid-7- <i>O</i> -glucosid	GEIGER <sup>1)</sup>
Rutin 3 x H <sub>2</sub> O (Rut.)	Roth 7176
Spiraeosid (Spir.)	Gräfe/Schneider/Veit
Aceton, LiChroSolv, für die Chromatographie	Merck, 100020
β-Hydroxypropylcyclodextrin	Wacker-Chemie GmbH 71P004
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, 2382315
Carbogengas (95% O <sub>2</sub> / 5% CO <sub>2</sub> )	Messer-Griesheim
Diethylether	Merck, 100921
Dimethylformamid für die Spektroskopie	Merck, 102937
Dimethylsulfoxid	Merck, 102952
Essigsäure (96%)	Merck, 56
Ethanol 96%	Apotheke
Ethylacetat	Merck, 109623
Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz	Sigma E 1644
Kaliumchlorid	Merck, 104936
Lactatdehydrogenase-L Reagenz	Sigma, 228-20
L(+)-Ascorbinsäure p.a.	Merck, 127
L-Glutamin	Merck, 289
Magnesiumchlorid	Merck, 105833
Methanol, LiChroSolv, für die Chromatographie	Merck, 6018
Natriumchlorid	Merck, 6400
Natriumhydrogencarbonat	Merck, 106329
Natrium- <i>di</i> -hydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, 106345

Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	Merck, 106579
Natriumhydroxidplättchen p.a.	Merck, 6495
<i>ortho</i> -Phosphorsäure (85%)	Merck, 573.
$\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase Typ HP-2S	Sigma, G-7017
Wasser, entmineralisiert	„Nanopur“ aus Reinstwasser-anlage

<sup>1)</sup> Diese Substanzen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Hans Geiger, Universität Saarbrücken, zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Weitere Materialien und Geräte

SepPak-C18-Kartuschen	Waters
Membranfilter, Spartan 30 / B; 0,45 $\mu$ m	Chromatographie Service
pH-Meter Typ 646	Knick
Waagen	Mettler AT200
	Mettler P1600
	Sartorius Micro MC 5
Ultraschallbad	Branson, 221
Vakuum Rotavapor	Büchi, 461
Vakuumzentrifuge	Savant, Speed Vac SC 110
Zentrifugen	Minifuge GL
	Heraeus Christ
Laborschüttler	Gerhardt
Laborinkubator	Liebisch, Typ 2099-DA
Wasserbad mit Pumpe	Haake
Magnetrührer	variomag, multipoint HP
Ultraturax	IKA Wek Janke&Kunkel KG, Typ TP18-10, 20000U/min
HPLC-Apparatur:	
Pumpen	Beckman Pumpenmodul 126, 116
Säulenofen	Gynkotek Säulentermostat
Injektion	Beckman Autosampler 502, 20 $\mu$ L- Probenschleife
Steuerung	Hochdruckseitige Gradienten- Steuerung (Beckman Gold Software Supports Version 7.0)
Detektor	Beckman Photodiodenarraydetektor 168

a) für die Pflanzenextraktanalyse:

Säule	Merck Superspher RP 18 (ec), 4 µm, 120 x 4 mm
Vorsäule	Lichrochart RP 18, 4 x 4 mm

b) für die Urinanalyse und die *In-vitro*-Resorptionsversuche:

Säule	Knauer Eurospher 100 C RP 18, 5 µm, 250 x 4mm, mit integrierter Vorsäule
-------	---

c) für die Plasmaanalytik (durchgeführt am Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Bergholz-Rehbrücke)

Säule	Macherey-Nagel Nucleosil RP 18, 5 µm, 250 x 4,6mm
Pumpen	Merck Hitachi L6200A
Degaser	Merck Hitachi ERC 3114
Injektion	Merck Hitachi AS 2000A, 100 µL Injektionsvolumen
Steuerung	Hochdruckseitige Gradienten- Steuerung (Interface Modul D 6000)
Detektor	ESA Inc., Elektrochemischer 12 Kanal CoulArray Detektor,

d) für die massenspektrometrischen Messungen (durchgeführt am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg in Kooperation mit PD Dr. M. Herderich), Methode bei WITTIG et al. (2000).

Säule	Macherey-Nagel Nucleosil RP 18, 5 µm, 125 x 2mm
Pumpe	Applied Biosystems, bai, Model 140B
Massenspektrometer	Finnigan MAT, TSQ 7000 (triple stage quadropole mass spectrometer



## **2.3 Pilotstudie zur systemischen Verfügbarkeit von Quercetin und Quercetinglykosiden**

### **2.3.1 Studienplan (Kurzübersicht)**

**Anzahl der Prüfzentren:** 1

**Anzahl der Probanden:** 3 weibliche gesunde Probandinnen

**Anzahl der Prüfpräparate:** 4

- a.) Quercetin entspr. 200mg Quercetin als Suspension
- b.) Buchweizenkraut entspr.200mg Quercetin als Suspension
- c.) Zwiebeln gehackt und angebraten entspr. 200mg Quercetin
- d.) Quercetin entspr. 1000mg Quercetin als Suspension

**Studiendesign:** vierarmiges Cross-over design

**Studiendauer:** 8 Tage

**Studienablauf:** Flavonoidfreie Ernährung mit 3tägiger Run-in-phase und eintägiger wash-out Phase, am Tag 3 Eingangsuntersuchung, Applikation der Prüfpräparate an den Tagen 4, 5, 6, 7

**Blutentnahmen:** t = 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, h

**Urinsammlung:** 24h Sammelurin

**Faecesproben:** 1x täglich

### 2.3.2 Ergänzung I. zur Pilotstudie

Um einen durch die Verwendung von Butter zum Anbraten der Zwiebeln hervorgerufenen, resorptionsfördernden Effekt auszuschließen, wurde dieser Versuch von einer der Probandinnen wiederholt. Dafür wurden 850 g rohe Zwiebeln in einem geschlossenen Topf in etwas Wasser schonend gedünstet und anschließend püriert. Nach einer 3tägigen flavonoidfreien run-in-Phase erfolgte analog zum Studiendesign der Pilotstudie morgens nüchtern die Einnahme der Zwiebelzubereitung. Die Blutentnahmen erfolgten zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 3, 4 und 5 h. Der Urin wurde fraktioniert gesammelt in den Intervallen 0h, 0-3h, 3-6h und 6-12h. Im Folgenden werden die Proben, die in diesem Ergänzungsversuch erhalten wurden, als **Proband 1 oF** bezeichnet (Proband 1 Zwiebelzubereitung ohne Fett).

### 2.3.3 Ergänzung II. zur Pilotstudie

In einem weiteren Ergänzungsversuch sollte der Einfluss der Zwiebelmatrix auf die Resorption von Quercetin untersucht werden. Dafür wurde eine Formulierung mit 200 mg Quercetin wie unter Absatz 2.4.2 beschrieben hergestellt und unter die Zwiebelzubereitung (wie unter Absatz 2.3.2 beschrieben zubereitet) untergerührt. Nach einer 3tägigen flavonoidfreien run-in-Phase nahmen analog zum Studiendesign der Pilotstudie 3 Probanden morgens nüchtern die Zwiebel-Quercetin-Zubereitung ein. Die Blutentnahmen erfolgten entsprechend dem Studiendesign der Pilotstudie zu den Zeitpunkten 0, 0,5, 1, 2, 3 und 5 h. Es wurde der 0-Wert Urin sowie der 24 h Urin nach Einnahme der Zwiebelzubereitung gesammelt. Im Folgenden werden die Proben, die in diesem Ergänzungsversuch erhalten wurden, als **Proband X ZQ** bezeichnet (Proband X Zwiebelzubereitung mit Quercetin).

### 2.3.4 Klinische Prüfung

Die klinische Prüfung der Pilot- und der Hauptstudie wurde monozentrisch am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Klinische Pharmakologie, der Universität Rostock unter Leitung von Prof. Dr. med. Bernd Drewelow und Dozentin Dr. med. Anne-Kathrin Riethling durchgeführt. Die Pilotstudie wurde unter Anlegen der gleichen Kriterien wie bei der Hauptstudie durchgeführt. Nähere Einzelheiten zur Probandenwahl sowie zu den Ernährungsvorschriften sind unter den Absätzen 2.6.2 bis 2.6.4 gegeben.

## **2.4 Prüfpräparate der Pilotstudie**

### **2.4.1 Herstellung der Prüfformulierung**

Die Formulierung für die sowohl in der Pilot- als auch der Hauptstudie verwendeten Prüfpräparate (ausgenommenen der Zwiebelzubereitungen) wurde von Herrn Apotheker Jörg Wittig am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg entwickelt. Das Prüfpräparat entsprechend 100 bzw. 200 mg Quercetin wurde in einem 200 mL Becherglas mit geeignetem Rührfisch vorgelegt, Ethanol 96 % wurde zugewogen, und unter Rühren zu einer homogenen Masse verrührt. Anschließend wurde Methocel®K4M – Schleim (0,5 % in Aqua purificata, keimfiltriert) zugewogen. Die Suspension ließ man 5 min zu einer homogenen Masse rühren. Der Ethanolgehalt der Formulierung betrug 15,4 % (*m/m*). Die Herstellung der Formulierung erfolgte unter Reinluftbedingungen. Die mikrobiologische Stabilität der Formulierung wurde entsprechend dem Europäischen Arzneibuch geprüft und entsprechend GCP freigegeben (siehe Anhang 8.25). Um einen Volumeneffekt bei der Resorption auszuschließen, wurde die Menge der verabreichten Formulierung, in der das jeweilige Prüfpräparat suspendiert war, konstant gehalten (52 g entsprechend etwa 50 mL). Die Formulierungen wurden innerhalb von 48 Stunden vor Applikation hergestellt und im Kühlschrank gelagert. Kurz vor Einnahme wurde die Suspension mehrere Minuten kräftig aufgeschüttelt und dann getrunken. Zum Nachspülen der Flaschen wurden ca. 10 mL Wasser verwendet und getrunken.

### **2.4.2 Applikation von Quercetin**

224 mg bzw. 1119 mg Quercetin-Dihydrat (Fluka) entsprechend 200 mg bzw. 1000 mg Aglykon wurde in einem 200 mL Becherglas mit geeignetem Rührfisch vorgelegt, Ethanol 96% zugewogen (Endkonzentration der Suspension jeweils 15,4 % (*m/m*)) und unter Rühren zu einer homogenen Masse verrührt. Anschließend wurde Methocel®K4M – Schleim (0,5 % (*m/m*) in Aqua purificata, keimfiltriert) zugewogen (Endkonzentration der Suspension 82,9 % bzw. 76,0 % (*m/m*)). Die Suspension ließ man ca. 5 min bis zur homogenen Masse rühren. Es entstand eine optisch homogene Suspension ohne Entmischung.

### **2.4.3 Applikation von Quercetin-3-O-rutinosid in Form von Buchweizenkrauttee-pulver**

Das in der Pilot- sowie der Hauptstudie verwendete Buchweizenkrautpulver (CH 98 08 000 10) wurde freundlicherweise von der Firma SmithKline Beecham, Herrenberg, zur Verfügung gestellt. Der Rutingehalt betrug laut Hersteller 5,6 % und konnte durch eigene Gehaltsbestimmungen bestätigt werden. Für die Pilotstudie sowie die Hauptstudie wurde jeweils 7,14 g Buchweizenkrauttee-pulver entsprechend 200 mg Quercetin verwendet.

Die Herstellung und Applikation der Formulierung erfolgte analog zu Absatz 2.4.2 und 2.4.2.

#### 2.4.4 Applikation von Quercetinglucosiden in Form von gebratenen Zwiebeln

Im Rahmen der Vorbereitungen der Pilotstudie wurden verschiedene Zwiebelsorten auf ihren Quercetinglykosid-Gehalt und –Zusammensetzung untersucht. Der Quercetingehalt in den handelsüblichen braunen Speisezwiebeln war mit durchschnittlich  $527 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  FG deutlich höher als der in der roten Varietät ( $88 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  FG), weshalb in der anschließenden Pilotstudie die erstgenannte Sorte verwendet wurde (Teltscher 1999). Zur Herstellung der in der Pilotstudie verwendeten Zwiebelzubereitung wurden 10 kg Zwiebeln gekauft und der durchschnittliche Gehalt ermittelt. Die Extraktion und Detektion erfolgte analog zu Absatz 2.7.1.1 bzw. 2.7.1.2. Da Spiraeosid zu diesem Zeitpunkt als Referenzsubstanz noch nicht zur Verfügung stand, wurden die anhand ihrer UV-On-line-Spektren identifizierten Quercetinglykoside als Rutin berechnet (Tab. 2.1) (Teltscher 1999).

**Tab. 2.1** Gehalt an Quercetinglykosiden in Zwiebeln (n=8). Angegeben ist der durchschnittliche Gehalt in mg und mmol mit der jeweiligen Standardabweichung.

Gehalt Quercetinglykoside berechnet als Rutin		Gehalt Quercetin	
[mg·kg <sup>-1</sup> FG]	[mmol·kg <sup>-1</sup> FG]	[mg·kg <sup>-1</sup> FG]	[mmol·kg <sup>-1</sup> FG]
471,76±119,11	0,7727±0,195	233,54±58,96	0,7727±0,195

Da der durchschnittliche Gehalt an Quercetin in einem Kilogramm frischem eßbarem Pflanzenmaterial dieser Charge 233,54 mg (berechnet als Rutin) ausmachte, sollten in der anschließenden Pilotstudie 860 g Zwiebeln (entspricht 200,84 mg bzw. 0,6645 mmol Quercetin) pro Proband verabreicht werden.

In der Pilotstudie wurden zur Überprüfung des Quercetingehaltes aus jeder 860 g -Portion als Stichprobe jeweils 10 g der kleingeschnittenen, gut durchmischten frischen Zwiebeln entnommen, bei -80°C eingefroren und anschließend mittels HPLC analysiert. Die verbleibenden 850 g Zwiebeln wurden anschließend mit etwas Butter angebraten und innerhalb von 20 min verzehrt. Die Menge an Quercetin, welche jeder Proband in Form von 850 g Zwiebeln konsumierte, ist in Tab. 2.2 angegeben.

**Tab. 2.2** Konsumierte Menge an Quercetin in der Pilotstudie sowie in den Ergänzungen.

Proband 1 Pilotstudie	Proband 2 Pilotstudie	Proband 3 Pilotstudie	Proband 1 oF Ergänzung I.	Proband X ZQ Ergänzung II.
248,01 mg bzw. 0,825 mmol	193,48 mg bzw. 0,64 mmol	221,07 mg bzw. 0,731 mmol	206,47 mg bzw. 0,683 mmol	204,58 mg bzw. 0,677 mmol

Die ermittelten Quercetingehalte der konsumierten Zwiebeln lagen – mit Ausnahme von Charge 1 (Abweichung 0,1979 mmol vom Mittelwert) – innerhalb der zuvor ermittelten Standardabweichung von 0,195 mmol (s. Tab. 2.1).

## **2.5 Probenvorbereitung und Analytik der Plasma- und Urinproben in der Pilotstudie**

### **2.5.1 Extraktion von Quercetin und Quercetinmetaboliten aus Humanplasma der Pilotstudie**

Im Rahmen einer Diplomarbeit, die am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg durchgeführt wurde, wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Extraktionsmethoden verglichen und weiterentwickelt (Teltscher 1999). In den Methodenvergleich einbezogen wurden unterschiedliche Festphasenextraktionsmethoden mit speziell für die Plasmamatrix entwickelten, stationären Phasen sowie Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethoden. Die Ergebnisse wurden auf verschiedenen Tagungen präsentiert (Teltscher et al. 1999a, Teltscher et al. 1999b). In Anlehnung an eine Extraktionsmethode von Manach et al. (1998) wurde eine Flüssigextraktionsmethode mit gleichzeitiger Proteinfällung entwickelt und validiert (Manach et al. 1998). Diese Methode entspricht im Wesentlichen dem 1. Teil der unter Absatz 2.9.1 beschriebenen Methode. Nach Acetonfällung und Abzentrifugieren der Proteine wurde der Überstand zur HPLC-PDA-Analyse verwendet. Nach Abschluss der Diplomarbeit zeigte sich in weiterführenden Untersuchungen und den vorläufigen Analysen der Plasmaproben der Pilotstudie, dass eine Aufkonzentrierung der Proben sowie empfindlichere Detektionsmethoden zur Verringerung der Nachweisgrenze vonnöten waren. Die Plasmaproben der Pilotstudie wurden daraufhin erneut mit der unter Absatz 2.9.1 beschriebenen Methode extrahiert und in Kooperation mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Bergholz-Rehbrücke, mittels coulometrischer Arraydetektion analysiert (s. Absatz 0).

### **2.5.2 Bestimmung von Quercetin und seinen Metaboliten in Humanplasma mittels HPLC-PDA**

#### Trennung und Detektion

Fließmittel:	A: o-Phosphorsäure (pH 2,0), 0,15%ig B: Methanol
Flussrate:	1mL·min <sup>-1</sup>
Säulenofentemperatur:	23°C
Detektionswellenlängen:	254nm; 280nm

**Tab. 2.3** Gradient zur Trennung von Flavonoiden und Metaboliten aus Humanplasma.

zum Zeitpunkt [min]	Fließmittel A [%]	
0,00	100	linear bis
1,21	77	isokratisch bis
3,60	77	linear bis
5,60	65	isokratisch bis
10,00	65	linear bis
12,00	50	isokratisch bis
20,00	50	linear bis
21,20	40	isokratisch bis
30,00	40	linear bis
35,00	15	isokratisch bis
38,00	15	linear bis
39,20	0	isokratisch bis
55,00	0	linear bis
56,20	100	isokratisch bis
65,00	100	Ende

Peakidentifizierung

Die Peakidentifizierung erfolgte durch einen Vergleich von UV-Spektren und Retentionszeiten mit Referenzchromatogrammen.

Kalibrierung und Quantifizierung

Die Flächenberechnung erfolgte über die Beckmann-Software (System Gold, Version 7,0). Nicht basisliniengetrennte Peaks wurden automatisch durch Fällen des Lots zur Basislinie getrennt.

Die Kalibrierlösungen wurden durch Zugabe von 8 verschiedenen Konzentrationen der Referenzstandards zu zum Zeitpunkt 0 h gewonnenem Plasma („blank“) und anschließender Extraktion des Plasmas hergestellt.

**Tab. 2.4** Kalibrierfunktionen für Flavonoide und Metabolite im Plasma.  $y$ =Flächenquotient des Referenzstandards und des Internen Standards Naringenin,  $x$ =Konzentration des Referenzstandards [ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ].

Substanz	Retentionszeit [min]	Kalibrierung bei [nm]	Kalibrierfunktion	Korrelationskoeffizient
3,4-DHPAA	9,3	280	$y = 9,424x + 0,0002$	0,9992
Hippursäure	10,8	254	$y = 6,469x + 0,0016$	0,9993
Homovanillinsäure	11,5	280	$y = 5,186x - 0,0018$	0,9996
4-HPAA	12,4	280	$y = 9,135x - 0,0031$	0,9995
3,4-DHT	14,1	280	$y = 12,674x - 0,0038$	0,9996
Rutin	21,0	254	$y = 21,567x - 0,0014$	0,9996
Naringenin	26,0	280	Interner Standard	
Quercetin	28,2	254	$y = 41,972x - 0,0025$	0,9996
Isorhamnetin	35,2	254	$y = 39,917x + 0,0009$	0,999

### 2.5.3 Extraktion von Quercetin und Quercetinmetaboliten aus Humanurin der Pilotstudie

Analog zur Entwicklung und Validierung einer Plasmaextraktionsmethode wurde ebenfalls im Rahmen einer Diplomarbeit eine Methode zur Extraktion von Quercetin und dessen Metaboliten aus Urin entwickelt und validiert (Andrew 1999). Es wurden einerseits unterschiedliche Festphasenextraktionsmethoden mit speziell für die Urinmatrix entwickelten, stationären Phasen sowie Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethoden verglichen. Die Ergebnisse wurden auf verschiedenen Tagungen präsentiert (Andrew et al. 1999, Teltscher et al. 1999b). Am besten geeignet erwies sich in diesen Untersuchungen folgende Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode:

Die zu untersuchende Urinprobe wurde in Zentrifugengläser überführt und 15 min bei  $7826 \times g$  zentrifugiert. Es wurden zweimal je 10,0 mL des Urinüberstandes abgenommen und diese Proben parallel aufgearbeitet. Ein Aliquot (Enzymassay-Probe) wurde einer enzymatischen Konjugatsspaltung unter Verwendung von  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase unterworfen. Dem anderen Aliquot (Blindwert-Probe) wurde kein Enzym zupipettiert. Die Blindwert-Probe diente zur Bestimmung des unkonjugiert vorliegenden Anteils an Quercetin und seinen Metaboliten.

Um im pH-Optimum des Enzyms zu arbeiten, wurden die Urinproben zunächst mit 1 M Natronlauge auf pH 5,0 eingestellt. Anschließend wurde der Enzymassay-Probe 120  $\mu\text{L}$  Enzymlösung (entspricht 1200 Units pro mL Urinlösung) zupipettiert. Beide Proben wurden nun für 30 Minuten im  $37^\circ\text{C}$  Wasserbad inkubiert. Die Enzymreaktion wurde nach der Inkubationszeit in beiden Ansätzen mit je 5,0 mL 100% Methanol gestoppt. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Internen Standardlösung [Kämpferol  $0,08912 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ] wurden die Proben 20 Minuten bei  $7826 \times g$  zentrifugiert. Hierbei konnten die gefällten Proteine abgetrennt und anschließend der Überstand vollständig in ein 50 mL Glasröhrchen (mit Schraubverschluss) überführt werden.

Nach Zugabe von 2,5 g NaCl wurde 30 min gegen 15,0 mL Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Abnehmen der organischen Phase wurde ein weiteres Mal gegen 15,0 mL Diethylether ausgeschüttelt. Die in einem Spitzkolben vereinigten organischen Phasen wurden anschließend am Rotationsverdampfer (35°C, 50-320 mbar) bis zur Trockne eingengt und der Rückstand in 1,0 mL DMSO aufgenommen. Die Lösung wurde membranfiltriert (0,45 µm) und bis zur HPLC-Analyse bei -80 °C aufbewahrt. Die Trennung, Detektion und Quantifizierung erfolgte des Weiteren wie unter Absatz 2.8 beschrieben.

Im Laufe der nachfolgenden Untersuchungen erwies sich diese Methode auch angesichts des großen Probenaufkommens in der Hauptstudie als wenig praktikabel und wurde daher entsprechend Absatz 2.8.1 weiterentwickelt.

## **2.6 Hauptstudie zur systemischen Verfügbarkeit und Pharmakokinetik von Quercetin-4'-O-glucosid und Quercetin-3-O-rhamnoglucosid**

### **2.6.1 Studienplan (Kurzübersicht)**

<b>Anzahl der Prüfzentren:</b>	1
<b>Anzahl der Probanden:</b>	12 gesunde Probanden
<b>Anzahl der Prüfpräparate:</b>	4
a.) Rutin entspr. 200mg Quercetin	
b.) Buchweizenkraut entspr. 200mg Quercetin	
c.) Quercetin-4'-glucosid isoliert aus Zwiebeln entspr. 100mg Quercetin	
d.) Zwiebeln gedünstet u. püriert entspr. 100mg Quercetin	
<b>Studiendesign:</b>	vierarmiges randomisiertes Cross-over design
<b>Studiendauer:</b>	11 Tage
<b>Studienablauf:</b>	Flavonoidfreie Ernährung mit 3tägiger run-in-phase und eintägiger wash-out Phase, am Tag 3 Eingangsuntersuchung, Applikation der Prüfpräparate an den Tagen 4, 6, 8 und 10
<b>Blutentnahmen:</b>	t = 0', 15', 30', 45', 60', 90', 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 16h, 24 h
<b>Urinsammlung:</b>	0-3h, 3-6h, 6-9h, 9-12h, 12-24h, 24-36h, 36-48h



## 2.6.2 Klinische Prüfung

Die klinische Prüfung der Pilot- und der Hauptstudie wurde monozentrisch am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Klinische Pharmakologie, der Universität Rostock unter Leitung von Prof. Dr. med. Bernd Drewelow und Dozentin Dr. med. Anne-Kathrin Riethling durchgeführt. Als Prüfarzte waren Dr. med. Silke Müller, Ines Brackmann sowie Yvonne Wukasch, Abteilung Klinische Pharmakologie, an der Studie beteiligt.

Die Anträge zur Durchführung der Pilot- sowie der Hauptstudie wurden bei der Ethikkommission der Universität Rostock eingereicht und genehmigt. Die Probanden wurden im Rahmen einer Probandeninformation ausführlich über Nutzen und mögliche Risiken der Untersuchungen aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte in Anlehnung der Good Clinical Practice. Es wurden die Deklaration von Helsinki sowie die Forderungen des Arzneimittelgesetzes eingehalten.

## 2.6.3 Probandenauswahl

Über die Einbeziehung der Probanden wurde anhand einer **Aufnahmeuntersuchung** entschieden. Sie umfasste:

- Anamnese
- Klinische Untersuchung (Ganzkörperuntersuchung, EKG, Messung von Blutdruck und Herzfrequenz, Körpergröße, Körpergewicht)
- Routinelabor (Blutbild, Elektrolyte, Kreatinin, Harnstoff, Transaminasen, Bilirubin,  $\gamma$ -GT, Glucose, Triglyceride, Cholesterin, LDH, Urinstatus, Hb, Eisen).

Die **Einschlusskriterien** umfassten weiterhin:

- Alter zwischen 18 und 40 Jahre,
- Klinische Untersuchung und Routinelabor ohne pathologische Befunde,
- Körpergewicht zwischen 40 und 80 kg, Body Mass Index > 15 und < 30 kg/m<sup>2</sup>,
- Schriftliche Einverständniserklärung des Probanden.

Als **Ausschlusskriterien** galten:

- Nichterfüllen der Einschlusskriterien,
- Akute Infektionen innerhalb der letzten 2 Wochen vor Studienbeginn,
- Anamnese mit: einer akuten oder chronischen gastrointestinalen Erkrankung, schweren Stoffwechselerkrankung, malignen Grunderkrankung, kardialen, renalen oder hepatischen Funktionsstörung oder Erkrankung, psychischen Störungen oder schweren allergischen Diathese,
- Schwangerschaft, Laktation,
- Teilnahme an einer klinischen Studie innerhalb der letzten 30 Tage oder gleichzeitige Teilnahme an einer anderen klinischen Prüfung,

- Alkoholiker, Medikamenten- oder Drogenabhängigkeit,
- Blutspende oder Blutverlust (einschließlich Plasmapherese) von mehr als 500 mL in den letzten 3 Monaten vor Studienbeginn,
- Hämoglobinwerte unter  $13 \text{ g}\cdot\text{dL}^{-1}$  und Eisenwerte unter  $100 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,
- Regelmäßige Einnahme anderer Medikamente innerhalb 8 Wochen vor Studienbeginn,
- Raucher.

An der Studie nahmen 12 freiwillige gesunde Probanden (9 Männer und 3 Frauen) im Alter von 23 bis 27 Jahren teil. Das Durchschnittsalter lag bei  $24,3\pm 1,4$  Jahren ( $\text{MW}\pm\text{SD}$ ) und der durchschnittliche Body Mass Index bei  $21,7\pm 2,4 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$ . Alle Probanden unterzeichneten entsprechend den Richtlinien von Helsinki und Good Clinical Practice eine schriftliche Einwilligungserklärung. Bei den Probanden handelte es sich um Medizinstudenten der Universität Rostock, die sehr interessiert und engagiert mitgewirkt haben. Das war bei dieser Humanstudie von besonderer Bedeutung, da die Ergebnisse wesentlich vom Einhalten der sehr restriktiven flavonoidfreien Diät während der 11tägigen Studiendauer abhingen. Alle 12 Probanden beendeten die Versuche, so dass die Studie ohne „drop outs“ abgeschlossen werden konnte.

#### 2.6.4 Diätplan

Um Interferenzen mit Nahrungsflavonoiden weitgehend zu vermeiden, wurden die Probanden während der Studiendauer von 11 Tagen flavonoidfrei ernährt. Es wurde daher auf pflanzliche Produkte und Zubereitungen weitgehend verzichtet, unter anderem auf Getränke wie Tee, Kaffee, Bier, Wein und Säfte. Weiterhin wurde jegliches Gemüse und Obst, Kräuter, Gewürze etc. vom Ernährungsplan ausgeschlossen. An den Studientagen 4, 6, 8 und 10, an denen die Probanden die Prüfmedikationen erhielten, befanden sie sich für 24 h unter stationärer Aufsicht und wurden mit einheitlicher flavonoidfreier Nahrung versorgt. An den anderen Tagen erhielten sie eine Liste mit zugelassenen Nahrungsmitteln. Dazu zählten:

- Getränke: Wasser, Milch, Buttermilch
- Nahrungsmittel: Weißbrot, Brötchen, Baguette  
Milchprodukte: Milch, Joghurt, Quark, Sahne (ohne Früchte), Käse (ohne Kräuter)  
Fleisch, Schinken etc. und Fisch (ungewürzt)  
Getreideprodukte: Reis (poliert), Nudeln  
Salz, Vitamin C

Die Probanden führten während der Studiendauer von 11 Tagen einen detaillierten Diätplan über Art und Menge der aufgenommenen Nahrung.

## 2.6.5 Probenkodierung

Die in der Hauptstudie erhaltenen Plasmaproben wurden folgendermaßen kodiert:

- Probandennummer (1 bis 12)
- Prüfpräparatebezeichnung (Z=Zwiebel, S=Spiraeosid, B=Buchweizenkraut, R=Rutin)
- Blutentnahmezeitpunkt (0=Nullwert, 1=15 min, 2=30 min, 3=45 min, 4=60 min, 5=90 min, 6=2 h, 7=3 h, 8=4 h, 9=6 h, 10=8 h, 11=10 h, 12=12 h, 13=18 h, 14=24 h, 15=48 h)

Im Folgenden werden daher die Proben z.B. mit 05Z3 (Proband 5 nach Applikation von Zwiebel, Blutentnahme bei 45 min) bezeichnet.

Bei den Urinproben folgte auf Probandennummer und Prüfpräparatebezeichnung das Zeitintervall der Sammelperiode (0, 0-3 h, 3-6 h, 6-9 h, 9-12 h, 12-24 h, 24-36 h, 36-48 h).

## 2.7 Prüfpräparate der Hauptstudie

### 2.7.1 Applikation von Quercetinglucosiden in Form von gedünsteten Zwiebeln

Die Zusammensetzung der Flavonoidglykoside in Zwiebeln ist bereits in verschiedenen Arbeiten gut untersucht worden (Aziz et al. 1998, Rhodes und Price 1996). Der höchste Gehalt an Quercetinglucosiden befindet sich eigenen dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen zufolge in den äußeren braunen Schalen der Küchenzwiebel. Zur Zubereitung des in der Humanstudie verwendeten Prüfpräparates wurden 3 kg Küchenzwiebeln von den äußersten braunen Schalen befreit, da diese ungenießbar waren. Die innerste, etwas weichere braune Schicht wurde aber zur Erhöhung des Quercetinglucosidgehaltes (und damit zur Verringerung der nötigen Gesamtzwiebelmenge zur Aufnahme von 100 mg Quercetin) belassen. Die Zwiebeln wurden anschließend für 30 min schonend in einem geschlossenen Kochtopf gedünstet und danach mit einem Pürierstab püriert. Somit konnte eine homogene Zubereitung sichergestellt werden. Die Zusammensetzung und der Gehalt der Flavonoidglykoside wurde durch die Art der Zubereitung nicht verändert (Price et al. 1997, Teltscher 1999). Anschließend wurde der Quercetinglucosidgehalt der Zwiebelmasse bestimmt.

Im Vergleich zur Zwiebelzubereitung der Pilotstudie konnte somit das Prüfpräparat in der Hauptstudie entscheidend verbessert werden. Die Verwendung einer Zwiebelcharge mit höherem Quercetinglykosid-Gehalt sowie das Belassen der inneren braunen Zwiebelschalen ermöglichten eine deutliche Verringerung der nötigen Zwiebelportion. Durch Pürieren statt Anbraten wurde eine homogene Zubereitung sichergestellt. Außerdem wurde der Quercetinglykosid-Gehalt der letztendlich verabreichten Studienzubereitung bestimmt, auf deren Grundlage die Aliquotierung in die einzelnen Portionen stattfand. Somit konnte auch bei diesem Prüfpräparat eine für alle Probanden einheitliche Zubereitung sichergestellt werden.

### 2.7.1.1 Extraktion der Flavonoidglykoside aus Zwiebeln

5,0 g Zwiebelmus wurden mit 10,0 mL Lösung des Internen Standards (Naringenin 0,25 mg·mL<sup>-1</sup> in Methanol) und 25,0 mL Methanol versetzt und unter Rückflußkühlung in einem Rundkolben kurz zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde durch einen Faltenfilter in einen weiteren Rundkolben filtriert. Der Faltenfilter wurde anschließend kleingeschnitten und zusammen mit dem Rückstand noch zwei weitere Male mit je 25,0 mL Methanol - ohne Zugabe von Internem Standard - in der oben beschriebenen Art extrahiert; das Filtrat wurde zwischenzeitlich jeweils am Rotationsverdampfer (35°C, 50-150 mbar) fast bis zur Trockne eingengt. Nach dem letzten Arbeitsgang wurde der Rückstand in 2,5 mL Methanol im Ultraschallbad wieder gelöst und anschließend mit 0,5 mL Wasser versetzt. Die so gewonnene Untersuchungslösung wurde membranfiltriert (0,45 µm) und über eine vorkonditionierte (1. Schritt: 3,0 mL Methanol; 2. Schritt: 3,0 mL Wasser) C<sub>18</sub> -SPE-Säule gegeben, wobei der Durchfluss aufgefangen wurde. Die Säule wurde anschließend mit 3,0 mL 90%igem Methanol (V/V) eluiert. Der Probenauftragsdurchfluss sowie das Eluat wurden vereinigt, gut durchmischt und anschließend mittels HPLC analysiert.

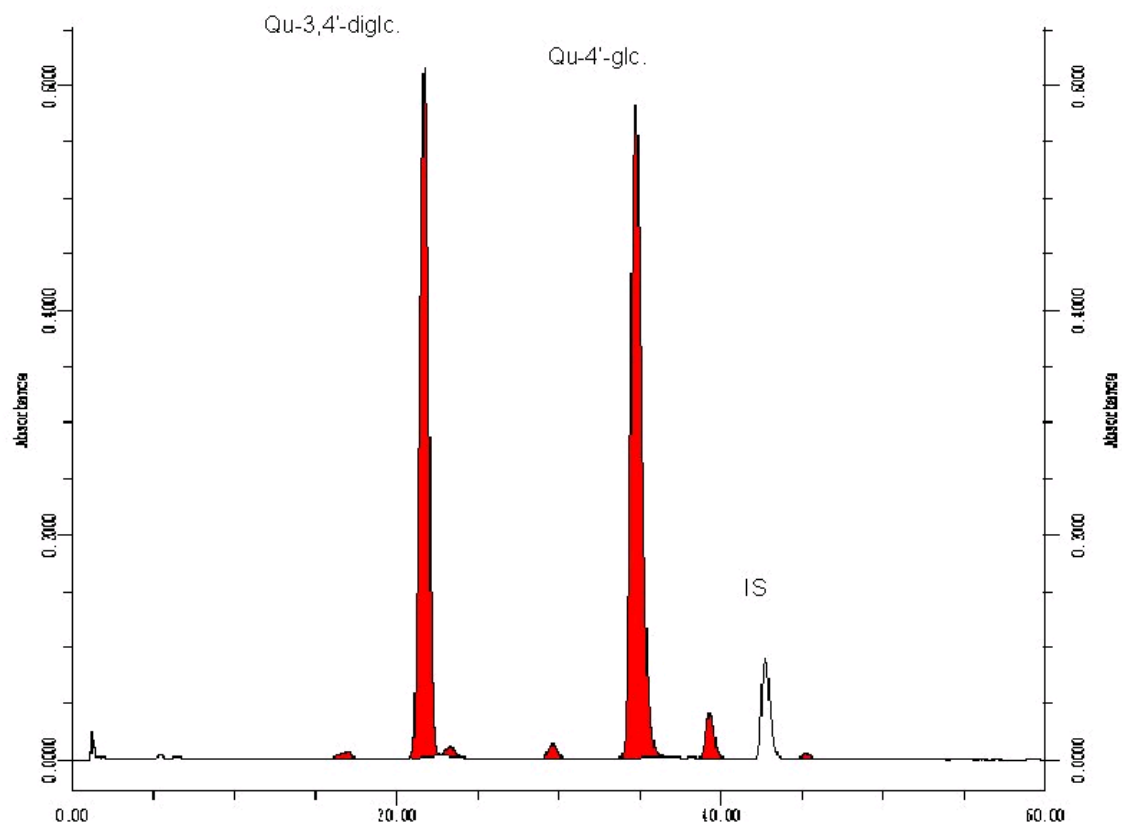
### 2.7.1.2 Trennung und Detektion der Flavonoide im Pflanzenextrakt

Für die Trennung und Detektion von Flavonoiden aus pflanzlichen Drogen wurde folgende HPLC-Methode zur Analyse des Extraktes verwendet:

Fließmittel:	A: <i>o</i> -Phosphorsäure, 0,15%ig (pH 2,0)
	B: Methanol
Flussrate:	1 mL min <sup>-1</sup>
Säulenofentemperatur:	15°C
Detektionswellenlängen:	330nm, 350nm

**Tab. 2.5** Gradient zur Trennung von Flavonoiden aus Pflanzenmaterial.

t [min]	Fließmittel A [%]	
0,00	77,0	isokratisch bis
3,60	77,0	linear bis
24,0	62,0	isokratisch bis
30,0	62,0	linear bis
60,0	40,0	isokratisch bis
66,0	40,0	linear bis
67,2	0,0	isokratisch bis
73,2	0,0	linear bis
74,4	77,0	isokratisch bis
99,0	77,0	Ende



**Abb. 2.1** HPLC-Chromatogramm des Zwiebelextraktes (350nm) mit Naringenin als Internem Standard (IS). Markierte Substanzen wurden aufgrund der UV-Spektren und, wenn vorhanden, mit Hilfe von Referenzsubstanzen als Flavonoidglykoside identifiziert.

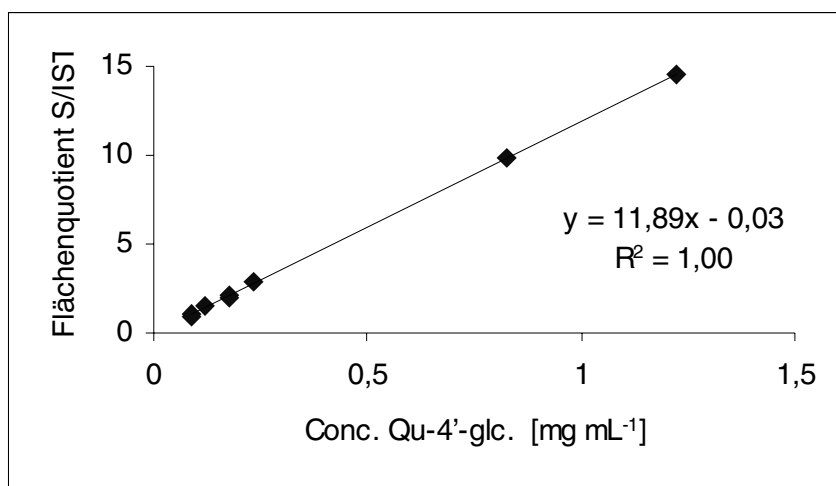
### 2.7.1.3 Kalibrierung und Quantifizierung der Flavonoidglykoside aus Zwiebeln

Wie aus dem Chromatogramm (Abb. 2.1) ersichtlich wird, sind die Hauptglucoside Quercetin-4'-O-glucosid (Abb. 2.3) sowie Quercetin-3,4'-O-diglucosid etwa zu gleichen Teilen enthalten. Zur Bestimmung des Quercetiningehaltes wurden alle Peakflächen der anhand der Spektren identifizierten Quercetinglucoside summiert und als Quercetin-4'-O-glucosid berechnet.

Die Kalibrierung erfolgte mit Quercetin-4'-O-glucosid, als Interner Standard wurde Naringenin verwendet.

**Tab. 2.6** Kalibrierdaten für Quercetin-4'-O-glucosid zur Quantifizierung des Quercetinglucosid-Gehaltes der Zwiebeln. Legende s. folgende Seite.

	C(S)E [mg mL <sup>-1</sup> ]	F(S)E 350nm	F(IST)E 330nm	C(IST)E [mg mL <sup>-1</sup> ]	S/IST
Qu-4'-glc1	1,224	1140,1	78,5	0,25	14,52
Qu-4'-glc2	0,827	755,3	77,1	0,25	9,80
Qu-4'-glc3	0,236	226,5	80,2	0,25	2,83
Qu-4'-glc4	0,176	162,7	78,2	0,25	2,08
Qu-4'-glc5	0,174	150,3	78,3	0,25	1,92
Qu-4'-glc6	0,118	113,7	78,4	0,25	1,45
Qu-4'-glc7	0,088	82,1	77,9	0,25	1,05
Qu-4'-glc8	0,087	75,4	78,5	0,25	0,96

**Abb. 2.2** Kalibrierfunktion für Quercetin-4'-O-glucosid, als Interner Standard wurde Naringenin verwendet.

Der Gehalt wurde anschließend nach folgender Formel berechnet (Veit 1990):

$$\text{Gehalt [\% FG]} = \frac{F(S)A \cdot F(IST)E \cdot M \cdot c(S)E \cdot c(IST)A}{F(IST)A \cdot F(S)E \cdot EW \cdot c(IST)E \cdot 10000}$$

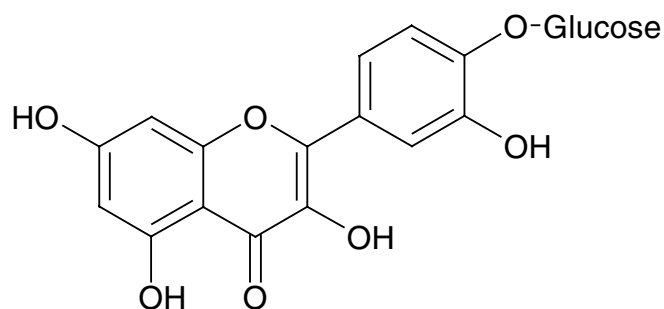
F(S)A	=gesamte Peakfläche Quercetinglykoside bei 350nm im Analysenchromatogramm
F(IST)E	=Peakfläche des Internen Standards in der Eichung bei 330nm
M	=Menge der zugesetzten Internen Standardlösung [mL]
c (S)E	=Konzentration Qu-4'-glc. in der Eichlösung [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ]
c (IST)A	=Konzentration des Internen Standards in der zugegebenen Internen Standardlösung [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ]
F(IST)A	=Peakfläche des Internen Standards im Analysenchromatogramm bei 330nm
F(S)E	=Peakfläche Qu-4'-glc. in der Eichung bei 330nm
EW	=Einwaage des Pflanzenmaterials [g]
c (IST)E	=Konzentration des Internen Standards in der Eichung [ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ]

Das Zwiebelmus hatte einen Quercetinglucosid-Gehalt von  $0,127 \pm 0,0013$  %, berechnet als Quercetin-4'-O-glucosid (n=6). Umgerechnet auf Quercetin entspricht das einem Gehalt von  $823,86 \pm 8,767$  mg Quercetin/KG Zwiebelmus. Zur Aufnahme von 100 mg Quercetin in Form von Zwiebelmus waren daher etwa 121 g Zwiebelmus notwendig. Das Zwiebelmus wurde anschließend in Portionen zu 121 g bis zur Applikation bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Vor der Applikation taute es über Nacht im Kühlschrank auf und wurde am nächsten Morgen eingenommen.

## 2.7.2 Applikation von aus Zwiebeln isoliertem Quercetin-4'-O-glucosid (Spiraeosid)

Das in der Hauptstudie als Prüfpräparat verwendete Quercetin-4'-O-glucosid wurde aus Zwiebelschalen der braunen Sorte der Küchenzwiebel im Rahmen der Vorbereitungen der Humanstudie nach einer modifizierten Vorschrift von Prof. Dr. H. Geiger, Universität Saarbrücken, isoliert. Die Identität und Reinheit der Substanz wurden anschließend im Zentralinstitut Arzneimittelforschung GmbH im Rahmen einer Zertifizierung der Substanz als Primärstandard bestimmt und validiert. Die Identitätsprüfung wurde anhand von Röntgenstrukturanalyse sowie  $^1\text{H-NMR}$ -,  $^{13}\text{C-NMR}$ -, Massen-, Infrarot- und Ultraviolett-spektren und Schmelzpunktbestimmung durchgeführt. Die Reinheit wurde mittels quantitativer NMR-Spektroskopie und HPLC (100 %-Peakflächenmethode) bestimmt und ergab einen Spiraeosidgehalt von mind. 94,3 %. Als Verunreinigung trat überwiegend ein weiteres Glykosid auf. Die durch Lösungsmittelrückstände hervorgerufenen Verunreinigungen lagen insgesamt bei 0,7 %. Die vollständige Dokumentation liegt im Zentralinstitut Arzneimittelforschung GmbH, Sinzig, vor.

### 2.7.2.1 Isolierung von Quercetin-4'-O-glucosid (Spiraeosid) aus den Schalen der Küchenzwiebel (*Allium cepa* L., c.v.)



**Abb. 2.3** Strukturformel von Quercetin-4'-O-glucosid (Spiraeosid). Molekulargewicht=464,39 g·Mol<sup>-1</sup>

#### I. Dünnschichtchromatographie

Schicht: Kieselgel 60, Fa. Merck

Fließmittel: Ethylacetat : Wasser : Ameisensäure, 8:1:1, (V/V/V)

Sichtbarmachen: Anisaldehyd-Schwefelsäure-Sprühreagenz DAB 10. Spiraeosid erscheint als rötlich-brauner Fleck und besitzt den R<sub>f</sub> - Wert 0,57.

#### II. Vorbereitung der Polyamidsäule

1400 mL (Schüttvolumen) MN Polyamid SC 6 Pulver für Säulen-Chromatographie wurden über Nacht in ca. 2,4 Liter Wasser eingeweicht. Eine Chromatographiesäule von ca. 1500 mL Inhalt (ca. 8 x 150 cm) wurde unten mit einem Bausch Perlonwatte abgeschlossen. Anschließend wurde ein Flüssigkeitsspiegel aus Nanopur-Wasser bis ca. 10 cm über die Watte gesetzt. In der Watte sollten nun keine größeren Luftblasen mehr vorhanden sein. Die Polyamidsuspension wurde gut durchgerührt und in einem Guss bei geöffnetem Hahn auf die Säule gegeben. Hierauf wurde die Säule mehrmals mit Nanopur-Wasser gespült, wobei das Wasser klar abtropfen sollte. Sobald sich das Polyamid abgesetzt hatte und sich der Flüssigkeitsspiegel bis auf ca. 5 cm über dem Polyamid gesenkt hatte, war die Säule gebrauchsfertig.

#### III. Vorbereitung der Sephadex LH 20 - Säule

60 g trockenes Sephadex LH 20 (quervernetztes und mit Hydroxypropylgruppen veräthertes Dextran) wurden über Nacht in 500 mL eines Gemisches von Aceton : Methanol : Wasser, 2:1:1, (V/V/V) eingeweicht. Eine Chromatographiesäule von 250 mL Inhalt (ca. 2,5 x 50 cm), die unten mit einer Glasfritte abschließt, wurde wie oben beschrieben mit der Gelsuspension beschickt.



#### IV. Ausführung

720 g getrocknete, in einem elektrischen Mixer zerkleinerte Zwiebelschalen wurden in einer Soxhlet-Apparatur in Chargen zu je 120 g extrahiert. Dazu waren pro Charge zwei Extraktionen nötig. Die erste Extraktion erfolgte mit 1,5 Litern Dichlormethan für ca. 6 Stunden, um lipophile Elemente abzutrennen. Nachdem die Zwiebelschalen über Nacht in der Soxhlethülse getrocknet worden waren, wurde am nächsten Tag mit 2 Litern Methanol ca. 8 Stunden in der Soxhlet-Apparatur zum zweitenmal extrahiert.

Die Methanol-Extrakte von 2 Chargen wurden anschließend vereinigt, im Vakuum am Rotationsverdampfer zur Sirupkonsistenz eingedampft und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Der Eindampfrückstand wurde in einem Gemisch aus je 50 mL Aceton und Wasser gelöst. Diese Lösung wurde unter dauerndem Umschwenken mit 300 mL Wasser versetzt und filtriert. Die filtrierte Lösung gab man unverzüglich auf die mit ca. 5 cm Seesand überschichtete vorbereitete Polyamidsäule. Sobald sich der Flüssigkeitsspiegel bis auf die Packung abgesenkt hatte, begann man mit dem Eluieren. Zunächst eluierte man mit 2 Litern Aceton:Wasser-Mischung von 1:9 (V/V). Das weitere Eluieren erfolgte nacheinander mit je einem Liter Aceton:Wasser-Mischungen in den Verhältnissen 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3 und 8:2, (V/V). Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 50 mL aufgefangen und dünnschichtchromatographisch untersucht.

Das Spiraeosid erscheint in den Fraktionen 80 - 100. Diese wurden vereinigt und im Vakuum am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde in 60 mL eines Aceton:Methanol:Wasser Gemisches 2:1:1 (V/V/V) gelöst.

Die weitere Trennung erfolgte mit Hilfe von Sephadex LH-20. Der Flüssigkeitsspiegel über der Sephadexsäule wurde bis auf das Gelbett gesenkt und mit Hilfe einer Tropfpipette wurden 20 mL des Extraktes vorsichtig an der Glaswand der Säule entlang aufgetragen. Jedes Aufwirbeln der Säulenpackung sollte vermieden werden. Der Kolben wurde mit 5 mL desselben Lösungsmittelgemisches nachgespült, wobei diese Lösung erst auf die Säule gegeben wurde, wenn die erste Portion eingesickert war. Schließlich wurde mit demselben Lösungsmittelgemisch eluiert.

Der Gang der Trennung ließ sich visuell verfolgen: Am schnellsten wanderte eine Zone von braunen, polymeren Verunreinigungen, unmittelbar danach folgte eine hellgelbe Zone von Spiraeosid. Kurz bevor dieses die Säule verließ, begann man das Eluat in Fraktionen von ca. 10 mL aufzufangen. Die einzelnen Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch untersucht.

Die Spiraeosid enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Rückstand wurde in 5 mL Ethanol heiß gelöst und filtriert. Zum Nachspülen verwendete man 2-3 mL Ethanol. Das Filtrat wurde mit 10 mL Wasser versetzt und zur Kristallisation im Kühlschrank aufbewahrt. Wenn nach 1 -2 Tagen die Kristallisation vollständig war, wurde über einen Glasfiltertiegel (Porosität 4) abfiltriert, mit 2-3 mL 30 % Ethanol (V/V) gewaschen und im Exsiccator getrocknet.

Die Ausbeute von 900 g Zwiebelschalen betrug ca. 3,0 g feine hellgelbe Nadelchen.

### 2.7.2.2 Herstellung der Prüfformulierung

154 mg Spiraeosid entsprechend 100 mg Quercetin wurde in einem 200 mL Becherglas mit geeignetem Rührfisch vorgelegt, die weitere Herstellung der Prüfformulierung wurde entsprechend Absatz 2.4.1 durchgeführt.

### 2.7.3 Applikation von Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin) in Form von Buchweizenkrauttee pulver

Das in der Pilot- sowie der Hauptstudie verwendete Buchweizenkrautpulver (CH 98 08 000 10) wurde freundlicherweise von der Firma SmithKline Beecham zur Verfügung gestellt. Der Rutingehalt betrug 5,6 %. Für die Pilotstudie sowie die Hauptstudie wurde jeweils 7,1 g Buchweizenkrauttee pulver entsprechend 200 mg Quercetin verwendet.

Die Herstellung und Applikation der Formulierung erfolgte analog zu Absatz 2.4.1.

### 2.7.4 Applikation von Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin)

Für die Herstellung der Rutin-Formulierung wurden Rutinion<sup>®</sup>-forte Tabletten der Firma biomo (CH 990809) mit einem Rutingehalt von 100 mg/Tablette verwendet. Als weitere Bestandteile werden Maisstärke, hochdisperses Siliciumdioxid, Carmellose-Calcium, Talkum und Magnesiumstearat angegeben. Die Tabletten wurden verrieben und zur Herstellung der Formulierung eine Pulvermenge entsprechend 200 mg Quercetin eingewogen. Die Herstellung und Applikation der Formulierung erfolgte des Weiteren analog zu Absatz 2.4.1.

## 2.8 Probenvorbereitung und Analytik der Urinproben mittels HPLC und Photodiodenarraydetektion

### 2.8.1 Extraktion von Quercetin und seinen Metaboliten aus Urin

Zur Stabilisierung der Phenole wurde dem Urin vor dem Einfrieren 1 g Ascorbinsäure auf 50 mL Urin als Antioxidans zugegeben. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Urinproben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

500  $\mu\text{L}$  des aufgetauten Urins wurden in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und 10  $\mu\text{L}$  einer 1% wässrigen Vitamin C-Lösung (*m/V*) zugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert mit 0,58 M Essigsäure auf pH 5,0 eingestellt. Nach Zugabe von 30  $\mu\text{L}$   $\beta$ -Glucuronidase und Vortexen für 1 min inkubierte der Enzymassay bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 60 min. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 600  $\mu\text{L}$  Aceton sowie 50  $\mu\text{L}$  Interner Standardlösung Naringenin ( $0,146 \text{ mg mL}^{-1}$  in Aceton). Der Ansatz wurde 1 min gevortext, 10 min geschüttelt, und anschließend für 10 min bei  $7826 \text{ g}$  zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  einer 1% Vitamin C-Lösung (*m/V*) in

der Vakuumzentrifuge bis fast zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde in 150 µL Dimethylformamid/ Wasser 2:1 (V/V) durch vortexen vollständig resuspendiert, für 10 min bei 7826 g zentrifugiert und der Überstand bis zur HPLC-Analytik bei –80°C aufbewahrt.

### 2.8.2 Wiederholpräzision und Vergleichspräzision

Zur Bestimmung der Präzision der Extraktionsmethode aus Urin wurde der Interne Standard herangezogen. Dafür wurden 6 Aliquots einer beliebigen Urinprobe nach Vorschrift mit Internem Standard Naringenin versetzt und aufgearbeitet.

**Tab. 2.7** Bestimmung der Wiederholpräzision der Extraktionsmethode aus Urin anhand des Internen Standards Naringenin. Die angegebenen Werte entsprechen den Peakflächen bei 280 nm.

Versuchs-Nr.	Naringenin (IST)
WU_60_1	50,7
WU_60_2	51,23
WU_60_3	49,3
WU_60_4	51,16
WU_60_5	50,51
WU_60_6	52,53
MW	50,91
SD	1,06
relSD	0,02
95 % CI	50,06-51,75

Die Wiederholpräzision der Extraktion der Referenzstandards ergibt sich aus der Linearität der Kalibrierfunktionen, da diese nach Extraktion der entsprechenden Standards aus Urin bzw. Wasser erstellt wurden (s. Absatz 2.8.4).

Zur Bestimmung der Vergleichspräzision wurden der Tag der Durchführung und der Bearbeiter variiert, der Variationskoeffizient lag dabei unter 3 %. Die gute Wiederholpräzision der Extraktionsmethode bestätigte sich auch nach Analyse der Urinproben der Hauptstudie. Die absoluten Peakflächen des Internen Standards lagen in allen Urinproben sehr konstant bei  $51,36 \pm 2,47$  bei  $n=320$  Extraktionen von Urinproben. Der Variationskoeffizient betrug dabei 4,81 %.

### 2.8.3 Trennung und Detektion von Quercetin und seinen Metaboliten im Urin

Fließmittel:	A: $\alpha$ -Phosphorsäure, 0,15%ig (pH 2,0) B: Methanol
Flussrate:	0,8 mL bzw. $1 \text{ mL min}^{-1}$ , siehe Gradient Tab. 2.8
Säulenofentemperatur:	20°C
Detektionswellenlängen:	280nm, 370nm

**Tab. 2.8** Trennung von Quercetin und seinen Metaboliten im Urin. Der vergleichsweise lange Gradient ermöglichte eine gleichzeitige Detektion von Quercetin sowie seinen renalen Metaboliten.

Zeit [min]	Flußrate [mL min <sup>-1</sup> ]	% B	Gradient
0,0	1,0	100	linear bis
39,0	1,0	86	hyperbolisch (Kurve 4) bis
74,0	1,0	70	isokratisch bis
75,0	1,0	70	linear bis
78,0	0,8	65	linear bis
88,0	0,8	60	isokratisch bis
96,0	1,0	60	linear bis
98,0	1,0	50	isokratisch bis
106,0	1,0	50	linear bis
108,5	1,0	40	isokratisch bis
114,0	1,0	40	linear bis
124,0	1,0	30	isokratisch bis
128,0	1,0	30	linear bis
130,0	1,0	0	isokratisch bis
145,0	1,0	0	linear bis
147,0	1,0	100	isokratisch bis
155,0	1,0	100	Ende

**Tab. 2.9** Retentionszeiten und Absorptionsmaxima der Referenzstandards bei der Urinanalytik.

Substanz	Retentionszeit [min]	Absorptionsmaxima [nm]
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DHPAA)	35,99	280
Hippursäure (HA)	43,44	228
3,4-Dihydroxytoluol (DHT)	48,69	281
4-Hydroxyphenylelessigsäure (pHPAA)	49,55	222; 275
3-Hydroxyphenylelessigsäure (mHPAA)	52,60	273
Homovanillinsäure (HVA)	63,73	279
Naringenin (IST)	110,0	289
Quercetin	112,5	254; 369
Isorhamnetin	120,0	255; 368

Quercetin und Isorhamnetin wurden bei 370 nm detektiert, der Interne Standard Naringenin sowie alle Metabolite bei 280 nm.

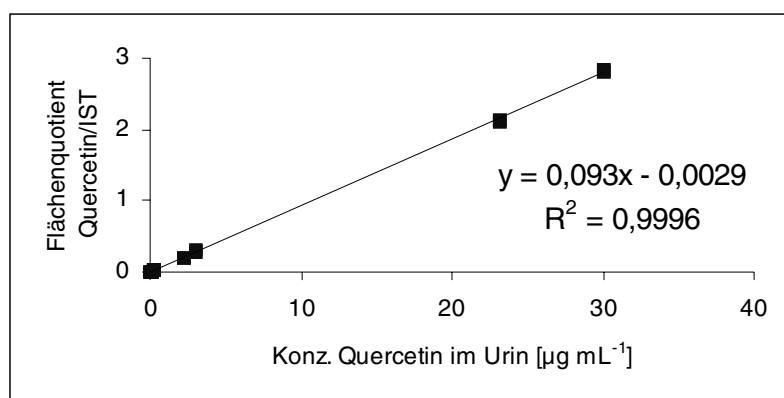
### 2.8.4 Kalibrierung und Quantifizierung von Quercetin und seinen Metaboliten im Urin

Zur Erstellung der Kalibrierfunktionen wurden jeweils 500  $\mu\text{L}$  einer Urinprobe von Tag 0 der Studie mit 8 verschiedenen Konzentrationen der Referenzstandards versetzt und analog zu den Urinproben wie unter Absatz 2.8.1 beschrieben aufgearbeitet. Auf diese Weise wurde ein Substanzverlust bei der Aufarbeitung auch in der Kalibrierung mitberücksichtigt und wirkte sich somit nicht auf die Quantifizierung der Analyten in den Proben aus.

Der verwendete Urin wurde zur Bestimmung der eventuell endogen vorhandenen Metabolitenkonzentrationen darüber hinaus ohne Zugabe von Referenzsubstanzen aufgearbeitet. Zur Bestimmung des Einflusses der Urinmatrix auf die Extraktion wurde die Aufarbeitung und Kalibrierung außerdem nach Zugabe derselben Konzentrationen an Referenzstandards zu 500  $\mu\text{L}$  Wasser durchgeführt. Von jeder Konzentration wurden Doppelbestimmungen gemacht. Es zeigte sich, dass die Urinmatrix keinen Einfluss auf das Extraktionsverhalten der Analyten im Vergleich zu Wasser als Matrix hatte. Da allerdings in dem verwendeten Urin die Metaboliten 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, 3-Hydroxyphenylelessigsäure und Homovanillinsäure bereits endogen vorhanden waren – sie stellen gleichzeitig Metabolite des Dopaminstoffwechsels dar – wurde der untere Messbereich aus der Extraktion mit Wasser als Matrix bestimmt (Tab. 2.10). Für Quercetin (Abb. 2.4) und Isorhamnetin war der Messbereich in beiden Fällen (Urin bzw. Wasser als Matrix) identisch.

**Tab. 2.10** Bestimmung der Linearität und des Arbeitsbereiches sowie der Kalibrierfunktionen für die verwendeten Referenzstandards.  $y$ =Flächenquotient des Referenzstandards und des Internen Standards Naringenin,  $x$ =Konzentration des Referenzstandards [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ]. Die mit \* markierten Konzentrationen wurden mit Wasser als Matrix bestimmt.

Referenzstandard	linearer Konzentrationsbereich [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ]	Kalibrierfunktion
DHPAA	0,19* - 37,46	$y=0,021x-0,0022$
mHPAA	0,15* - 29,43	$y=0,014x-0,0012$
HVA	0,15* - 29,23	$y=0,019x-0,0015$
Quercetin	0,023 - 30,01	$y=0,093x-0,0031$
Isorhamnetin	0,023 - 17,86	$y=0,094x-0,008$



**Abb. 2.4** Kalibrierfunktion von Quercetin nach Zusatz von 8 verschiedenen Konzentrationen zu Urin und anschließender Extraktion.

## **2.9 Probenvorbereitung und Analytik der Plasmaproben mittels HPLC und coulometrischer Arraydetektion**

### **2.9.1 Extraktion von Quercetin und seinen Metaboliten aus Humanplasma**

Im Rahmen der Humanstudie wurden pro Blutentnahmezeitpunkt etwa 9 mL Blut in EDTA-enthaltende Blutröhrchen (S-Monovetten der Firma Sarstedt, Art. Nr. 02.1066.001) entnommen und das Plasma durch Zentrifugieren bei 4696 g für 10 min von den Blutzellen getrennt. Das erhaltene Plasma wurde sofort in Eppendorf Reaktionsgefäße zu 500 µL aliquotiert, wobei jedem Aliquot 20 µL 0,58 M Essigsäure zur Stabilisierung der Phenole zugesetzt wurden. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Plasmaproben bei -20°C gelagert.

Zu 500 µL Plasma wurden 10 µL einer 0,5% wässrigen Vitamin C-Lösung (*m/V*) zugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert mit 50 µL 0,58 M Essigsäure auf pH 5,0 eingestellt. Nach Zugabe von 30 µL β-Glucuronidase und vortexen für 1 Minute inkubierte der Enzymassay bei 37°C für 60 min. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 600 µL Aceton sowie 50 µL Interner Standardlösung Naringenin (0,0342 mg·mL<sup>-1</sup> in Aceton). Der Ansatz wurde 1 min gevortext, 10 min geschüttelt, und anschließend für 10 min bei 7826 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 10 µL einer 0,5% Vitamin C-Lösung (*m/V*) in der Vakuumzentrifuge bis fast zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde in 150 µL Dimethylformamid/ Wasser 2:1 (*V/V*) durch vortexen vollständig resuspendiert, für 10 min bei 7826 g zentrifugiert und der Überstand bis zur HPLC-Analytik bei -80°C aufbewahrt.

### **2.9.2 Wiederholpräzision und Vergleichspräzision**

Bei der Bestimmung der Wiederholpräzision und Vergleichspräzision wurden verschiedene Überlegungen angestellt. Üblicherweise wird die Wiederholpräzision durch Zusatz von Referenzsubstanzen zur entsprechenden Matrix und anschließender Extraktion bestimmt. Im vorliegenden Fall ist allerdings zu bedenken, dass es sich im Plasma nicht um das frei vorliegende Quercetin, sondern um dessen Konjugate – etwa 4 verschiedene Glucuronide – handelt (siehe Absatz 3.1.1). Diese stehen aber als Referenzsubstanzen für eine Validierung nicht zur Verfügung. Weiterhin hat die Plasmaeiweißbindung von Quercetin, die laut Literaturangaben >99% beträgt (Boulton et al. 1998), einen großen Einfluß auf das Extraktionsverhalten, besonders beim Fällen der Plasmaproteine. Eigene Erfahrungen, die in der Diskussion mit anderen Arbeitsgruppen bestätigt wurden, lassen vermuten, dass sich das Proteinbindungsverhalten von extern zu Plasma zugegebenem Quercetin von dem endogen vorhandenen unterscheidet. Eine Validierung durch Zusetzen der freien Aglykone zu Plasma- bzw. Urinproben entspräche daher nur annäherungsweise dem tatsächlich mit den Humanproben durchgeführten Extraktionsprozess. Es erschien daher am Sinnvollsten, die Wiederhol- und Vergleichspräzision der Methode mit jeweils 6 Aliquots einer Plasmaprobe durchzuführen, die nach Aufnahme von 850g gedünsteten Zwiebeln erhalten wurde. Die in diesen Proben enthaltenen Quercetin- und Isorhamnetinkonzentrationen

konnten mittels Photodiodenarraydetektion bestimmt werden, so daß die Validierung der Extraktionsmethode sowohl für die Plasma- als auch die Urinaufarbeitung mittels HPLC-PDA durchgeführt werden konnte.

**Tab. 2.11** Wiederholpräzision nach Aufarbeitung einer Plasmaprobe (n=6). Die Werte entsprechen den Peakflächen gemessen bei 280 nm (Naringenin, Interner Standard) bzw. 370 nm (Quercetin und Isorhamnetin). Angegeben sind Mittelwerte, Standardabweichungen, relative Standardabweichungen sowie 95 % Konfidenzintervalle der einzelnen Substanzen.

Versuchs-Nr.	Naringenin (IST)	Quercetin	Isorhamnetin
43_1	13,30	18,13	2,47
43_2	13,26	18,25	2,48
43_3	14,14	18,53	2,51
43_4	13,29	18,03	2,47
43_5	13,28	17,52	2,37
43_6	13,89	18,18	2,47
MW	13,53	18,11	2,46
SD	0,387	0,333	0,048
relSD	0,029	0,018	0,019
95 % CI	13,22-13,84	17,84-18,38	2,42-2,50

Zur Bestimmung der Vergleichspräzision wurde die Extraktion mit 6 Aliquots derselben Plasmaprobe an einem anderen Tag von einer wissenschaftlichen Hilfskraft durchgeführt. Die Ergebnisse der Analysen dieser 6 Proben sind in Tab. 2.12 aufgeführt.

**Tab. 2.12** Bestimmung der Vergleichspräzision nach Aufarbeitung einer Plasmaprobe (n=6). Die Werte entsprechen den Peakflächen gemessen bei 280 nm (Naringenin, Interner Standard) bzw. 370 nm (Quercetin und Isorhamnetin). Angegeben sind Mittelwerte, Standardabweichungen, relative Standardabweichungen sowie 95 % Konfidenzintervalle der einzelnen Substanzen.

Versuchs-Nr.	Naringenin (IST)	Quercetin	Isorhamnetin
46_1	12,80	16,28	2,35
46_2	13,18	16,56	2,34
46_3	13,42	16,20	2,38
46_4	13,18	16,86	2,41
46_5	12,92	16,90	2,37
46_6	12,90	16,94	2,39
MW	13,07	16,62	2,37
SD	0,233	0,327	0,026
relSD	0,018	0,020	0,011
95 % CI	12,88-13,25	16,36-16,88	2,35-2,39

Betrachtet man die Ergebnisse beider Aufarbeitungen zusammen, so liegt der Variationskoeffizient für alle drei Komponenten unterhalb von 5 %.

### 2.9.3 Trennung und Detektion von Quercetin und seinen Metaboliten im Plasma mittels coulometrischer Arraydetektion

Die aufgearbeiteten Plasmaproben der Humanstudie wurden am Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Bergholz-Rehbrücke, analysiert. Die Entwicklung und Validierung der HPLC-Methode waren Bestandteil der Dissertationsarbeit von Herrn Holger Pforte am Deutschen Institut für Ernährungsforschung und können daher in dieser Arbeit nicht ausführlich dargestellt werden.

Fließmittel A:	0,1 M Natrium-Dihydrogenphosphatlg.: Wasser im Volumenverhältnis 1:4 ansetzen, mit <i>o</i> -Phosphorsäure auf pH 3,4 einstellen, steril filtrieren
Fließmittel B:	0,1 M Dihydrogenphosphatlg mit <i>o</i> -Phosphorsäure auf pH 1,4 einstellen, mit 4 Teilen Methanol auffüllen, steril filtrieren
Flussrate:	0,8 mL·min <sup>-1</sup>
Säulenofentemperatur:	22°C
Detektionsspannung:	von 0 mV bis 1825 mV in 75 mV Inkrementen

**Tab. 2.13** Gradient zur Trennung von Quercetin und seinen Metaboliten im Plasma.

t [min]	Fließmittel A [%]	
0,0	70,0	linear bis
40,0	20,0	linear bis
45,0	0,0	isokratisch bis
50,0	0,0	linear bis
52,0	70,0	isokratisch bis
65,0	70,0	Ende

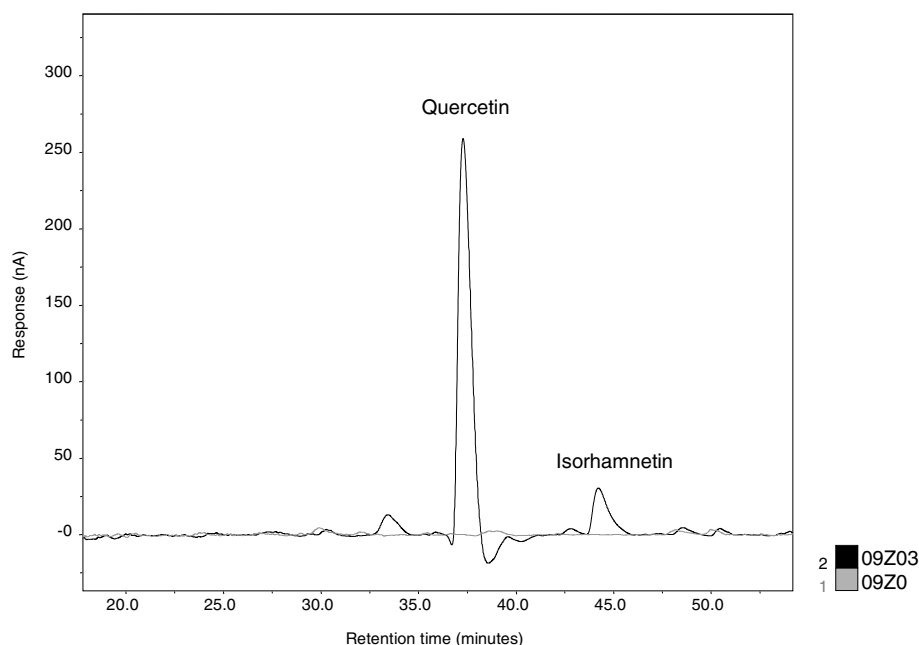


**Tab. 2.14** Retentionszeiten der Referenzstandards für die Plasmaanalytik

Substanz	Retentionszeit [min]	Detektionsspannung [mV]
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DHPAA)	8,80	225
Hippursäure (HA)	9,30	675
3-Hydroxyphenylelessigsäure (mHPAA)	10,20	525
4- Hydroxyphenylelessigsäure (pHPAA)	11,20	225
Dihydroxytoluol (DHT)	13,00	150
Homovanillinsäure (HVA)	13,50	525
Epicatechin	16,60	150
Naringenin (IST)	36	675
Quercetin	38	150
Isorhamnetin	44	150

### 2.9.3.1 Spezifität

Entsprechend den Richtlinien Q2A und Q2B der International Conference on Harmonisation (ICH) ist die Spezifität eines analytischen Verfahrens gegeben, wenn weder das verwendete Lösungsmittel, noch die mobile Phase, noch Bestandteile der Matrix oder Verunreinigungen das Ergebnis im Rahmen der gewünschten Genauigkeit verfälschen. Bei der Verwendung der coulometrischen Arraydetektion ermöglicht die Software einen permanenten Nullabgleich des durch die Gradientenelution hervorgerufenen Basisliniendriffs. Die Trennung der im Plasma detektierten Substanzen wurde dahingehend optimiert, dass Matrixbestandteile die Detektion und Quantifizierung von Quercetin und Isorhamnetin nicht verfälschten.



**Abb. 2.5** Repräsentative HPLC-Chromatogramme von Plasmaproben, entnommen vor („blank plasma“ 09Z0) und 0,75 h nach (09Z03) Einnahme der Zwiebelzubereitung. Die Detektion von Quercetin und Isorhamnetin wurde durch Matrixbestandteile nicht verfälscht.

## 2.9.4 Kalibrierung und Quantifizierung von Quercetin und seinen Metaboliten im Plasma

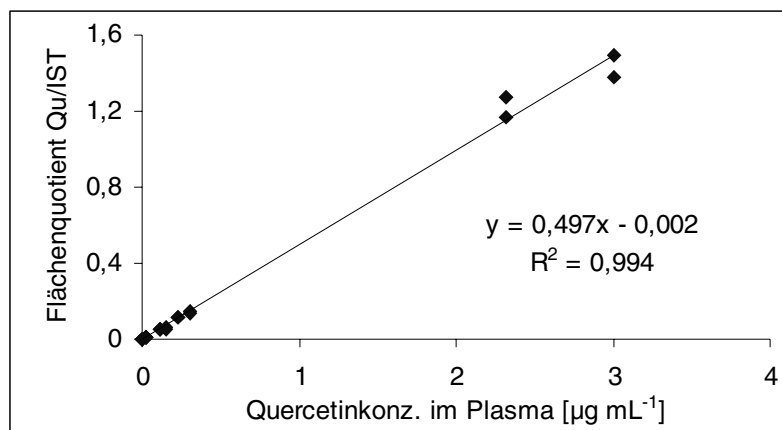
### 2.9.4.1 Linearität und Arbeitsbereich

Zur Erstellung der Kalibrierfunktionen wurden jeweils 500  $\mu\text{L}$  einer zum Zeitpunkt  $t=0$  gewonnenen Plasmaprobe mit 10 verschiedenen Konzentrationen der Referenzstandards versetzt und analog zu den Plasmaproben wie unter Absatz 2.9.1 beschrieben aufgearbeitet. Ein eventueller Substanzverlust während der Aufarbeitung ist daher bereits in der Kalibrierung berücksichtigt und hat keine Auswirkungen auf die Quantifizierung der Substanzgehalte in den Proben der Humanstudie.

Das verwendete Plasma wurde zur Bestimmung der eventuell endogen vorhandenen Metabolitenkonzentrationen darüber hinaus ohne Zugabe von Referenzsubstanzen aufgearbeitet. Zur Bestimmung des Einflusses der Plasmamatrix auf die Extraktion wurde die Aufarbeitung und Kalibrierung außerdem nach Zugabe derselben Konzentrationen an Referenzstandards zu 500  $\mu\text{L}$  Wasser durchgeführt. Von jeder Konzentration wurden Doppelbestimmungen gemacht. Es zeigte sich, dass die Plasmamatrix keinen Einfluss auf das Extraktionsverhalten der Analyten im Vergleich zu Wasser als Matrix hatte. Da allerdings in dem verwendeten Plasma die Phenylelessigsäure-Derivate und Homovanillinsäure als endogene Metabolite des Dopaminstoffwechsels bereits vorhanden waren, wurde der untere Messbereich aus der Extraktion mit Wasser als Matrix bestimmt (Tab. 2.15). Für Quercetin (Abb. 2.6) und Isorhamnetin war der Messbereich in beiden Fällen (Plasma bzw. Wasser als Matrix) identisch. Dies ist vor allem dadurch bedingt, dass diese Substanzen bei geringen Detektionsspannungen (150 mV) bestimmbar waren (bei denen sich nur wenige Substanzen detektieren lassen) und nicht endogen im Plasma vorhanden sind.

**Tab. 2.15** Bestimmung der Linearität und des Arbeitsbereiches sowie der Kalibrierfunktionen für die verwendeten Referenzstandards.  $y$ =Flächenquotient des Referenzstandards und des Internen Standards Naringenin,  $x$ =Konzentration des Referenzstandards [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ]. Die mit \* markierten Konzentrationen wurden mit Wasser als Matrix bestimmt.

Referenzstandard (Detektionsspannung)	linearer Konzentrations- bereich [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ]	Kalibrierfunktion
DHT (150 mV)	0,003* - 2,988	$y=1,5634+0,044$
MHPAA (525 mV)	0,038* - 3,768	$y=0,201x-0,001$
HVA (150 mV)	0,038* - 3,768	$y=1,085x-0,016$
Quercetin (150 mV)	0,002 - 23,141	$y=0,497x-0,002$
Isorhamnetin (150 mV)	0,002 - 1,786	$y=0,338x-0,001$



**Abb. 2.6** Kalibrierfunktion von Quercetin nach Zusatz von 10 verschiedenen Konzentrationen zu Plasma und anschließender Extraktion.

### 2.9.5 Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit und Präzision des analytischen Verfahrens wurde am Zentralinstitut für Arzneimittelforschung GmbH im Rahmen von Methodenentwicklungen und -validierungen an verschiedenen Modellsubstanzen belegt und dokumentiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Anlage nicht erneut validiert. Die Wiederhol- und Vergleichspräzision der Extraktionsmethode wurde bereits unter Absatz 2.8.2 dargelegt. Die Wiederholpräzision sowie die Vergleichspräzision der in dieser Arbeit untersuchten Analyten sind allerdings Voraussetzung für reproduzierbar lineare Kalibrierkurven, da diese nach Extraktion der Referenzstandards aus Plasma und anschließender Trennung und Detektion erstellt wurden. Die sich im Korrelationskoeffizient der Kalibrierfunktionen äußernde Präzision umfasst folglich bereits sowohl die Reproduzierbarkeit des Extraktionsverfahrens als auch des analytischen Verfahrens. Der Korrelationskoeffizient aller Kalibrierkurven betrug mindestens 0,99 (s. Abb. 2.6).

### 2.10 Stabilität der Plasmaproben

Zur Überprüfung der Stabilität der Plasmaproben wurden Aliquots von zum Zeitpunkt 0 h gewonnenen Plasma mit einer Stammlösung der Referenzsubstanzen versetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  sowie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Stabilität der untersuchten Referenzsubstanzen wurde über einen Zeitraum von 18 Wochen untersucht. Eine Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  limitierte den Substanzverlust bei allen Verbindungen auf weniger als 10 % (Tab. 2.17). Bei  $-20^{\circ}\text{C}$  erwiesen sich die Referenzsubstanzen als ähnlich stabil, mit Ausnahme von DHPAA (10 % Verlust) und DHT (18 % Verlust) (Tab. 2.16). Somit war eine Lagerung der Plasmaproben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  empfehlenswert, bei Aufarbeitung innerhalb von 2-3 Wochen jedoch nicht zwingend erforderlich. Darüber hinaus liegen die Referenzsubstanzen im Plasma der Humanstudien teilweise bis vollständig konjugiert vor, was die Stabilität im Vergleich zu den unkonjugierten Testsubstanzen erhöhen dürfte.

**Tab. 2.16** Stabilität der Referenzsubstanzen in Plasma bei -20°C. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten aus je zwei Proben, Gehalt in [%].

	Woche 0	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 18
<b>DHPAA</b>	100,00	100,35	101,42	89,78	90,94
<b>Hippursäure</b>	100,00	106,22	109,57	104,05	110,81
<b>4-HPAA</b>	100,00	99,34	99,91	96,19	100,54
<b>HVA</b>	100,00	99,94	101,04	95,30	99,67
<b>DHT</b>	100,00	98,27	97,43	90,48	82,00
<b>Rutin</b>	100,00	96,63	104,62	102,25	103,75
<b>Quercetin</b>	100,00	101,12	99,42	95,77	106,19
<b>Isorhamnetin</b>	100,00	98,63	96,60	92,80	94,92

**Tab. 2.17** Stabilität der Referenzsubstanzen in Plasma bei -80°C. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten aus je zwei Proben, Gehalt in [%].

	Woche 0	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 18
<b>DHPAA</b>	100,00	101,61	101,60	95,18	95,61
<b>Hippursäure</b>	100,00	105,60	107,72	108,12	110,67
<b>4-HPAA</b>	100,00	99,96	99,72	100,80	100,94
<b>HVA</b>	100,00	100,54	100,26	99,91	99,47
<b>DHT</b>	100,00	99,27	99,38	98,53	98,17
<b>Rutin</b>	100,00	96,30	100,25	100,72	98,65
<b>Quercetin</b>	100,00	100,09	101,04	100,62	109,40
<b>Isorhamnetin</b>	100,00	97,14	104,63	98,09	92,68

Da die Plasmaproben direkt nach Blutentnahme zu 500 µL aliquotiert wurden und pro Extraktion je ein Aliquot verwendet wurde, erübrigte sich eine Bestimmung der Stabilität in freeze-and-thaw Zyklen.

### **2.11 Untersuchungen zur In-vitro-Resorption am Schweinedarmmodell**

Die *In-vitro*-Resorptionsversuche wurden an Schweinedarmsegmenten in der Diffusionsapparatur nach Franz vorgenommen. Hinsichtlich seines Durchmessers, Struktur, Schleimzusammensetzung und Enzymausstattung ist Schweinedarm dem menschlichen Darm sehr ähnlich. Außerdem steht er in ausreichender Menge beim Schlachthof zur Verfügung, so dass für die Versuche keine Tiere zusätzlich getötet werden müssen. Die *In-vitro*-Resorptionsversuche am Schweinedarmmodell wurden mit verschiedenen Quercetin- und Kämpferolglykosiden sowie den in der Humanstudie verabreichten Pflanzenextrakten durchgeführt.

### 2.11.1 Herstellung der Untersuchungslösungen

Für die *In-vitro*-Versuche wurde ein isotoner Krebs Bicarbonatpuffer verwendet ( $\text{HCO}_3^-$ : 21 mM;  $\text{Ca}^{2+}$ : 1,2 mM;  $\text{Cl}^-$ : 121,4 mM;  $\text{K}^+$ : 5,4 mM;  $\text{Mg}^{2+}$ : 1,2 mM,  $\text{Na}^+$ : 113,6 mM;  $\text{HPO}_4^{2-}$ : 2,4 mM;  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ : 0,6 mM). Dem Puffer wurde zusätzlich 10 mM L-Glutamin zugesetzt, um das Darmgewebe mit Nährstoffen zu versorgen. Der Puffer wurde mit Carbogengas begast und auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt.

Die zu untersuchenden Substanzen und Extrakte wurden in Puffer im Ultraschallbad gelöst und die Lösung anschließend mittels HPLC analysiert. Bei in wässriger Lösung schwer löslichen **Reinsubstanzen** wie z.B. Quercetin wurde dem Puffer als Lösungsvermittler  $\beta$ -Hydroxypropylcyclodextrin 2% (*m/m*) zugesetzt.

10,3 mg **Buchweizenkrautpulver** (s. Absatz 2.7.3) mit einem Rutingehalt von 5,6 % wurde in 25 mL Puffer suspendiert und 20 min im Ultraschallbad extrahiert. Der Überstand wurde nach Zentrifugation (5 min 7826 *x g*) mittels HPLC analysiert und für die Versuche eingesetzt.

Zur Untersuchung der Resorption von Quercetinglucosiden aus **Zwiebelextrakt** wurde eine Küchenzwiebel (80,0 g) mit 50 mL Puffer versetzt, püriert, filtriert und zentrifugiert (5 min 7826 *x g*). Der Überstand wurde mittels HPLC analysiert und für die Versuche eingesetzt.

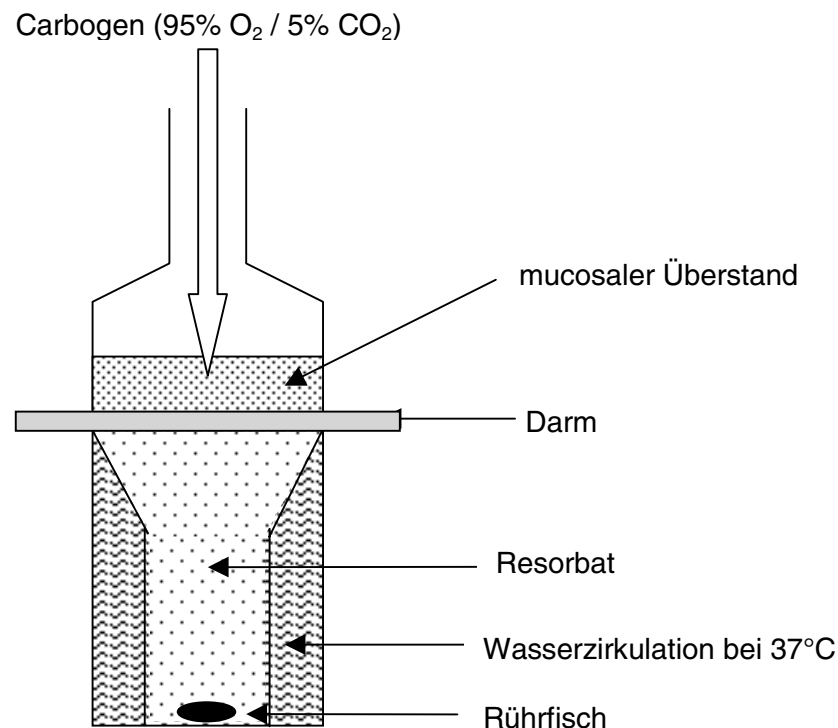
### 2.11.2 Präparation des Schweinedarms

Der Darm für die Resorptionsuntersuchungen wurde frisch, 20-30 min nach Tod der Tiere, vom Schlachthof geholt und in sauerstoffgesättigtem Krebscarbonatpuffer auf Eis transportiert. Für die Versuche wurden nur Darmstücke eingesetzt, die reichlich gelbe Schleimproduktion und deutliche rote Blutgefäße aufwiesen. Zu lange gelagerter Darm verkrampft, die Mucosa erscheint fahlgrau, die Blutgefäße sind violett bis bläulich und somit für die beschriebenen Experimente unbrauchbar.

Der Darm wird längs seiner mesenchymalen Naht aufgeschnitten und das Bindegewebe mittels zweier Pinzetten abgezogen. Bei Duodenum, Jejunum und Ileum wurde noch zusätzlich die Muscularis mucosae entfernt, um planare Darmstücke zu erhalten, die Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse sind. Es wurden ausschließlich Darmstücke ohne Peyersche Platten verwendet, um morphologisch und funktionell weitgehend identische Stücke zu erhalten.

### 2.11.3 *In-vitro*-Resorptionsmodell

Als Modell wurde eine modifizierte Franz-Zelle gewählt (Abb. 2.7).



**Abb. 2.7** Schematischer Aufbau der Franz-Zelle

Die Franzzelle besteht aus zwei Teilen, einem Donor- und einem Akzeptorkompartiment, zwischen die ein ca. 9 cm<sup>2</sup> großes Stück Darm (in der Regel Jejunum) mit nach oben gerichteter Mucosa eingespannt wurde. Die beiden Teile der Franzzelle wurden mit Hilfe einer Klammer zusammengehalten. Um annähernd eine Temperatur von 37°C zu gewährleisten, wurde das Akzeptorkompartiment mit erwärmten Wasser einer Wasserbadpumpe umspült. In das Donorkompartiment wurden 2 mL der jeweiligen Untersuchungslösung gegeben, im unteren Kompartiment befanden sich ca. 8 mL Krebscarbonatpuffer. Des weiteren enthielten die Akzeptorzellen einen Rührfisch, der die Ausbildung einer unphysiologischen ungerührten Wasserschicht (UWL) verhindern sollte (Hidalgo et al. 1992). Diese behindert Diffusionsvorgänge auf beiden Seiten von Epithel bzw. Membran. *In vivo* wird diese UWL durch den ständigen Abtransport mit dem Blut minimiert. Um *in vitro* die statischen Bedingungen zu minimieren, wurde das Resorbat durch den Magnetrührer in Bewegung gehalten.

### 2.11.4 Versuchsdurchführung

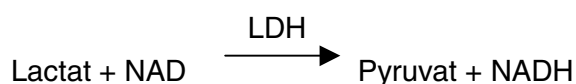
Die Inkubationszeit betrug 45 min. Während der gesamten Versuchsdauer wurde der Darm zur Sauerstoff-Versorgung der Enterocyten mit Carbogengas (95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Danach wurde der mucosale Überstand im Donorkompartiment quantitativ abpipettiert und das Volumen genau bestimmt. Der Darm wurde jeweils in 5 Waschgläsern mit je 2 mL Krebscarbonatpuffer geschwenkt und weiter aufgearbeitet. Das Resorbat wurde ebenfalls dem Akzeptorkompartiment entnommen und weiter verarbeitet.

Parallel zu jedem Resorptionsversuch befand sich in einer Franzzelle im Donorkompartiment nur Krebscarbonatpuffer. Diese Kontrollzelle diente zum einen der Bestimmung endogener Substanzen im HPLC-Chromatogramm, die nicht auf den Metabolismus der Testsubstanzen zurückzuführen waren. Andererseits wurde die Vitalität des Darmgewebes anhand eines LDH-Aktivitätstests überprüft (siehe Absatz 2.11.4.1).

Als Kontrolle wurden parallel zu jedem Darmversuch 5 mL der jeweiligen Untersuchungslösung im Wasserbad (37°C) 45 min inkubiert und mit Carbogengas begast. Bei der Instabilität der Testsubstanzen ist dies essentiell, um eine Aussage darüber machen zu können, ob der Metabolismus in der Franzzelle durch den Darm oder durch Faktoren wie Licht, Temperatur und Sauerstoff zustande kam .

#### 2.11.4.1 Vitalitätsüberprüfungen des Darmgewebes

Die Vitalität des Darmgewebes während des Versuchs wurde anhand des intrazellulären Enzyms Lactat-Dehydrogenase (LDH) als Marker für die Zellschädigung überprüft. Die Höhe der LDH-Aktivität steht dabei in direktem Zusammenhang zur Schädigung des Zellverbandes. LDH katalysiert die Oxidation von Lactat zu Pyruvat bei gleichzeitiger Reduktion von Nicotinamidadenindinucleotid (NAD). Die Bildung von reduziertem NAD (NADH) führt zu einem Absorptionsanstieg bei 340 nm. Der Grad des Absorptionsanstiegs bei 340 nm ist der LDH-Aktivität in der Probe direkt proportional.



Die LDH-Aktivität wurde direkt nach Erhalt des Darmes am Schlachthof sowie vor jeder Versuchsdurchführung bestimmt. Dafür wurde ein etwa 9 cm<sup>2</sup> großes Darmsegment in 2 mL Krebscarbonatpuffer (entsprechend der Versuchsdurchführung, siehe Absatz 2.11.3) geschwenkt und ein Aliquot von 50 µL zur Bestimmung der Enzymaktivität verwendet. Nach Beendigung der Versuchsdauer der Resorptionsversuche von 45 min wurde die LDH-Aktivität im mucosalen Überstand der Kontrollzelle bestimmt. Zur Durchführung des Enzymtests mussten die Proben 1:1 (V/V) mit Krebscarbonatpuffer verdünnt werden.

1 mL LDH-L Reagenz (50 mM Lactat, 7 mM NAD, 0,05% Natriumazid) wurde in einer Küvette auf 30°C erwärmt. 50 µL der verdünnten Probe wurden vorsichtig zugegeben und die Absorption bei 340 nm in 30 sec- Intervallen für 90 sec registriert.

Die Berechnung der LDH-Aktivität erfolgte anhand folgender Formel:

$$\text{LDH-Aktivität [U/L]} = \frac{\Delta A \text{ pro min} \times \text{TV} \times 1000 \times 2}{6,22 \times \text{SV} \times \text{LP}}$$

Δ A pro min	= Absorptionsänderung pro Minute bei 340 nm
TV	= Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches (1,05 mL)
1000	= Umrechnung der Einheiten pro mL in Einheiten pro Liter
2	= Verdünnungsfaktor
6,22	= millimolare Absorptionsfähigkeit von NADH bei 340 nm
SV	= Probenvolumen (0,05 mL)
LP	= Schichtdicke (1 cm)

An zwei Versuchstagen wurden parallel zur Bestimmung der Enzymaktivität histologische Schnitte des Darmgewebes angefertigt. Dafür wurden Darmproben direkt am Schlachthof, vor und nach dem Versuch sowie eine Stunde nach Beendigung des Versuches in Formalin eingelegt. Die weitere Aufarbeitung der Proben wurde freundlicherweise von Dr. V. Krenn, Pathologisches Institut der Universität Würzburg, durchgeführt.

Die Gewebeproben wurden in Paraffin eingebettet, mit dem Mikrotom in 8 mm dicke Schnitte geschnitten und in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Die Schnitte wurden dann 10 min mit Hämalun nach Mayer inkubiert, mit Leitungswasser 10 min gespült und anschließend mit 0,1 % wässrigem Eosin für 10 min gefärbt. Danach wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, der Alkohol über eine Xylolreihe entfernt und die Schnitte mit Entellan eingedeckt. Bei dieser sog. HE-Färbung werden die Zellkerne blau und das Cytoplasma rot gefärbt.

Die Untersuchungen zur Vitalität des Darmgewebes anhand des Lactatdehydrogenase-Aktivitätstests und der Histologie ergaben, dass das Darmgewebe bis zu einer Versuchsdauer von 45 min noch intakt war. Danach stiegen die LDH-Werte exponentiell an. Aus Erfahrungswerten anderer Arbeitsgruppen sowie in Einklang mit den histologischen Befunden wurde als Grenzwert für ein intaktes Darmgewebe nach Versuchsende eine 3fach erhöhte LDH-Aktivität gegenüber den direkt am Schlachthof ermittelten Werten angesetzt. Die Ergebnisse der Resorptionsversuche bestätigten zudem die Funktionsfähigkeit des Gewebes, da bei Zellschädigung des Darmgewebes mit einem vermehrten Substanzdurchtritt in das Resorbat gerechnet werden musste. Dies war aber nicht der Fall. Diese Untersuchungen waren Bestandteil einer Diplomarbeit, die von Frau Andrea Ruf am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg durchgeführt wurde.



## 2.11.5 Probenaufarbeitung

### 2.11.5.1 Mucosaler Überstand

0,6 mL des mucosalen Überstandes wurden mit 0,6 mL Methanol versetzt, 10 min geschüttelt und bei  $7826 \times g$  1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC und Photodiodenarray-Detektion analysiert.

### 2.11.5.2 Darm und Resorbat

Der gewaschene Darm wurde in 4 mL Methanol mit dem Ultraturrax zerkleinert, 7 min im Ultraschallbad extrahiert und zentrifugiert ( $4000 \times g$ , 10 min).

1,2 mL des Resorbats bzw. des Überstandes der Darmextraktion wurden mit 20  $\mu\text{L}$  10 % Vitamin C (*m/V*), 100  $\mu\text{L}$  Internen Standard Naringenin ( $50,46 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) und 180  $\mu\text{L}$  Aceton versetzt. Der Ansatz wurde 10 min geschüttelt, zentrifugiert ( $7826 \times g$ , 1 min) und der Überstand im Vakuumrotationsverdampfer (Speedvac) bis zur Trockne einrotiert. Der Trocknungsrückstand wurde in 120  $\mu\text{L}$  Dimethylsulfoxid im Ultraschallbad 5 min gelöst, kurz zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC analysiert.

## 2.11.6 Trennung und Detektion

Die Testsubstanzen wurden mittels HPLC getrennt und Photodiodenarraydetektor analysiert. Die Identifikation der Flavonole sowie deren Glykosiden und Metaboliten in den Untersuchungslösungen erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten und On-line-UV-Spektren mit Referenzsubstanzen.

Fließmittel:	A: <i>o</i> -Phosphorsäure, 0,15%ig (pH 2,0) B: Methanol
Flussrate:	1 mL min <sup>-1</sup>
Säulenofentemperatur:	20°C
Detektionswellenlängen:	254 nm, 346 nm

**Tab. 2.18** Gradient zur Trennung von Flavonol(glykosiden) und deren Metaboliten im mucosalen Überstand, Darm und Resorbat der *In-vitro*-Resorptionsversuche.

Zeit [min]	% B	Gradient
0,0	30	linear bis
20,0	100	isokratisch bis
24,0	100	linear bis
25,0	30	isokratisch bis
30,0	30	Ende

**Tab. 2.19** Retentionszeiten und Detektionswellenlängen der untersuchten Flavonole und deren Metaboliten im mucosalen Überstand, Darm und Resorbat der *In-vitro*-Resorptionsversuche.

Substanz	Retentionszeit [min]	Detektionswellenlänge [nm]
Quercetin	12,9	254
Quercetin-3-rha	11,1	254
Quercetin-3-rha-7-glc	9,2	254
Quercetin-3-rhaglc (Rutin)	10,4	254
Quercetin-4'-glc (Spiraeosid)	11,1	254
Kämpferol	13,9	346
Kämpferol-3-glc	11,2	346
Kämpferol-7-glc	10,5	346
Kämpferol-3,7-diglc	7,3	346
Naringenin (IST)	12,2	254

### 2.11.7 Kalibrierung und Quantifizierung

Zur Bestimmung der Linearität und des Arbeitsbereiches wurden mindestens 5 verschiedene Konzentrationen jedes Referenzstandards hergestellt und vermessen. Die Kalibrierfunktionen ergeben sich jeweils unter Einbeziehung des Internen Standards (Tab. 2.20).

**Tab. 2.20** Bestimmung der Linearität und des Arbeitsbereiches sowie der Kalibrierfunktionen für die verwendeten Referenzstandards.  $y$ =Flächenquotient des Referenzstandards und des Internen Standards Naringenin,  $x$ =Konzentration des Referenzstandards [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ].

Referenzstandard	Arbeitsbereich [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Kalibrierfunktion	Korrelations- koeffizient
Quercetin	0,059 - 59,33	$y=0,127x-0,0004$	1
Quercetin-3-rha	0,077 - 76,90	$y=0,087x-0,0192$	0,9994
Quercetin-3-rha-7-glc	0,073 - 72,60	$y=0,059x-0,0134$	0,9994
Quercetin-3-rhaglc	0,075 - 75,50	$y=0,060x-0,0095$	0,9994
Quercetin-4'-glc	0,119 - 119,0	$y=0,071x+0,0021$	1
Kämpferol	0,079 - 79,20	$y=0,079x+0,0063$	1
Kämpferol-3-glc	0,052 - 52,20	$y=0,055x-0,0037$	0,9999
Kämpferol-7-glc	0,048 - 48,40	$y=0,075x-0,0103$	0,9998
Kämpferol-3,7-diglc	0,071 - 71,0	$y=0,050x-0,0090$	0,9999

Die Berechnung der Gehalte erfolgte nach folgender Formel (Graefe 1997, Veit 1990):

$$\text{Gehalt } [\mu\text{g mL}^{-1}] = \frac{F(S)A \cdot M \cdot c(IST)A}{F(IST)A \cdot V \cdot c(IST)E \cdot a}$$

Dabei entspricht  $\frac{F(S)E}{F(IST)E \cdot c(S)E} = a$  der Steigung der Kalibrierfunktion.

F(S)A	Fläche der Substanz in der Analyse bei der jeweiligen Detektionswellenlänge
F(IST)E	Fläche des Internen Standards (IST) in der Kalibrierung bei 254 nm
M	Menge zugesetzter Interner Standardlösung [mL]
c(S)E	Konzentration der Substanz in der Kalibrierlösung [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
c(IST)A	Konzentration des IST in der zugegebenen Standardlösung [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
F(IST)A	Fläche des IST in der Analyse bei 254 nm
F(S)E	Fläche der Substanz in der Kalibrierung bei der jeweiligen Detektionswellenlänge
V	eingesetzte Flüssigkeitsmenge [mL]
c(IST)E	Konzentration des Internen Standards in der Kalibrierung [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]

Die Flächenberechnung erfolgte über die Beckmann-Software (System Gold, Version 7.0). Nicht basisliniengetrennte Peaks wurden automatisch durch Fällen des Lots zur Basislinie getrennt.

## 2.12 Pharmakokinetische und statistische Analysen

### 2.12.1 Nichtkompartiment-Analyse

Die nichtkompartimentelle Analyse wurde unter Verwendung von Microsoft® Excel 97 durchgeführt. Die erhaltenen pharmakokinetischen Parameter wurden wie folgt berechnet (Derendorf und Garrett 1987):

Die terminale Eliminationskonstante „ke“ wurde in der Regel aus einem semilogarithmischen Graph der Quercetin-Plasmakonzentrationen gegen die Zeit ermittelt. Durch lineare Regression durch die letzten 3 bis 5 Datenpunkte (siehe individuelle Graphen in Abb. 8.1 bis Abb. 8.8) ergibt sich ke aus der Beziehung  $ke = - \text{Steigung} \cdot 2,303$ .

$T_{1/2}$	(Eliminationshalbwertszeit)= $\ln 2/ke$
$AUC_{cum}$	(area under the curve) wurde aus dem Konzentrations-Zeit-Verlauf mit Hilfe der Trapezregel ermittelt von $t=0$ bis $t=t_{last}$ .
$AUC_{last}$	(terminale Flächenabschnitt) wurde berechnet aus $C_{last}/ke$
$AUC_{tot}$	ist die Summe von $AUC_{cum}$ und $AUC_{last}$
$\%AUC_{last}$	prozentuale Anteil des terminalen Flächenabschnitts an der Gesamtfläche
$AUMC_{cum}$	(area under the first moment curve) wurde aus dem Graph aus Produkt von Plasmakonzentration und Zeit gegen die Zeit mit Hilfe der Trapezregel ermittelt.
$AUMC_{last}$	berechnet aus $(C_{last} \cdot t_{last})/ke + C_{last}/ke^2$
$AUMC_{tot}$	ist die Summe von $AUMC_{cum}$ und $AUMC_{last}$
$MRT_{abs}$	(mean residence time after extravascular administration) ergibt sich aus $AUMC_{tot}/AUC_{tot}$
Ka	wurde erhalten aus der Beziehung $t_{max}=\ln(ka/ke)/(ka-ke)$ unter Verwendung der Excel Solver Funktion
MAT	(mean absorption time) ergibt sich durch $1/ka$
$MRT_{iv}$	(mean residence time after intravenous administration) ergibt sich aus $MRT_{iv}=MRT_{abs} - MAT - \text{lag time}$ (Resorptionsverzögerungszeit)
CL/f	(Clearance/bioverfügbarer Anteil) berechnet aus $CL/f=Dosis/AUC_{tot}$
$Vd_{ss}/f$	(Verteilungsvolumen im Steady-State-Zustand/ bioverfügbarer Anteil) berechnet aus $Vd_{ss}/f=(Dosis \cdot AUMC_{tot})/AUC^2 - Dosis/(AUC_{tot} \cdot ka)$
$Vd_{area}/f$	(Verteilungsvolumen im Pseudo- Steady-State-Zustand/ bioverfügbarer Anteil) berechnet aus $CL/f / ke$

### 2.12.2 Kompartiment-Analyse

Die kompartimentelle Analyse wurde unter Verwendung von Kinetica 2000® Version 3.0 (InnaPhase Corporation, Philadelphia, USA) durchgeführt. Die von der verwendeten Software vorgegebenen pharmakokinetischen Parameter sind wie folgt definiert (für die zugrunde liegenden Berechnungen siehe Tab. 8.20):

Ccalc	berechnete Konzentrationen
Residuals	Residuale
Weight	Wichtung
Weighted Res.	gewichtete Residuale
ka	Absorptionskonstante
Tlag	Resorptionsverzögerungszeit
Vc	Volumen im zentralen Kompartiment
ke	Eliminationskonstante vom zentralen Kompartiment
k <sub>12</sub>	Transferkonstante vom zentralen ins periphere Kompartiment
k <sub>21</sub>	Transferkonstante vom peripheren ins zentrale Kompartiment
AUC	Partielle Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve
AUMC	Partielle Fläche unter der Momentkurve
MRT	Mittlere Verweildauer
Lz	Kleinste (langsamste) Eliminationskonstante
C <sub>max</sub> calc	berechnete maximale Plasmakonzentration
t <sub>max</sub> calc	Zeitpunkt der berechneten maximale Plasmakonzentration
A	Koeffizient
Alpha	Exponent
B	Koeffizient
Beta	Exponent
Tab	Absorptionsdauer
t <sub>1/2</sub> ka	Absorptionshalbwertszeit
t <sub>1/2</sub> alpha	Eliminationshalbwertszeit von Alpha
t <sub>1/2</sub> beta	Eliminationshalbwertszeit von Beta
t <sub>1/2</sub> LZ	Eliminationshalbwertszeit assoziiert mit der terminalen Steigung
t <sub>1/2</sub> Ke	Eliminationshalbwertszeit von Ke
Vss	Apparentes Verteilungsvolumen im steady state
Vz	Apparentes Verteilungsvolumen während der terminalen Phase (Lz)
Cl	Gesamtclearance

### 2.12.3 Statistik

Für die statistische Analyse der Daten wurde SigmaStat® für Windows Version 2.0 verwendet. Entsprechend dem randomisierten Cross-over-Studiendesign wurden die Daten mittels Two-Way Analysis of Variance (ANOVA) ausgewertet. Als Faktoren galten Proband sowie Studienmedikation, als abhängige Variable wurden verschiedene pharmakokinetische Parameter der Nichtkompartiment-Analyse gewählt. Ergab sich in der ANOVA ein signifikanter Unterschied zwischen den vier Studienmedikationen, so wurde als post-hoc test ein Tukey-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau betrug  $\alpha=0,05$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Analytik der Plasmaproben vor und nach enzymatischer Spaltung der Konjugate

Wie unter Absatz 1.4 dargelegt, wird aus analytischen Gründen der Gesamtquercetingehalt nach Hydrolyse der Konjugate bestimmt. Dies ist aber nur dann gerechtfertigt, wenn die Beziehung zwischen tatsächlich im Plasma vorliegenden Konjugaten und gemessenen Gesamtquercetinkonzentrationen bekannt ist. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen lag daher auf dem Zusammenhang zwischen Quercetinkonjugaten und dem Gesamtquercetingehalt nach Hydrolyse. Dieser Bezug liefert die Basis für alle weiteren Aussagen, die auf der Grundlage des Gesamtquercetingehaltes erstellt werden.

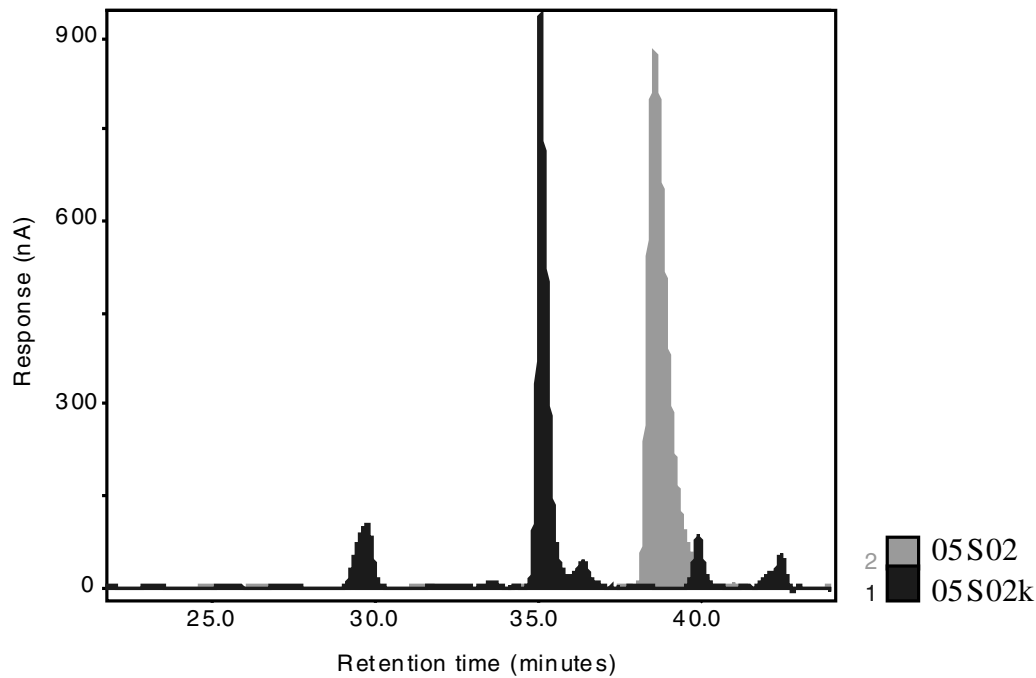
In eigenen Untersuchungen wurde Humanplasma nach Einnahme von 850 g gedünsteten Zwiebeln auf das Vorhandensein von Quercetinglucuroniden und freiem Quercetin vor und nach enzymatischer Spaltung der Konjugate untersucht.

##### 3.1.1 Detektion mittels LC-MS/MS

Die im Rahmen der Pilotstudie nach Einnahme von 850 g gedünsteten Zwiebeln erhaltenen Plasmaproben enthielten die höchsten Konzentrationen an Quercetinkonjugaten und wurden somit für die weiteren LC-MS/MS Analysen verwendet. Diese wurden von J. Wittig in Zusammenarbeit mit PD Dr. Markus Herderich am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, durchgeführt. Nach enzymatischer Spaltung der Konjugate wurde im 1h-Wert von Proband 1 eine freie Quercetinkonzentration von  $3,00 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  mittels HPLC-PDA gemessen. Trotz dieser hohen Plasmakonzentrationen konnte freies Quercetin in nichthydrolysierten Plasmaproben weder mittels HPLC-PDA noch LC-MS/MS nachgewiesen werden. Die LC-MS/MS Analyse zeigte jedoch das Vorhandensein von 5 verschiedenen Quercetinglucuroniden (Wittig et al. 2000).

##### 3.1.2 Detektion mittels coulometrischer Arraydetektion

Um im HPLC-Chromatogramm die Peaks zu identifizieren, die Quercetinkonjugaten zuzuordnen waren, wurden exemplarisch Plasmaproben (Proband 05) mit hohen Konzentrationen an Analyten nach Applikation des jeweiligen Prüfpräparates parallel mit bzw. ohne Zusatz von  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase aufgearbeitet und analysiert. Nach enzymatischer Hydrolyse verschwanden einige Substanzen im Chromatogramm, die somit Konjugaten zugeordnet werden konnten, während freies Quercetin und Isorhamnetin entstanden (Abb. 3.1). Freies Quercetin vor enzymatischer Spaltung der Konjugate konnte selbst in Proben mit hohen freien Quercetinkonzentrationen nach Konjugatspaltung nicht detektiert werden.

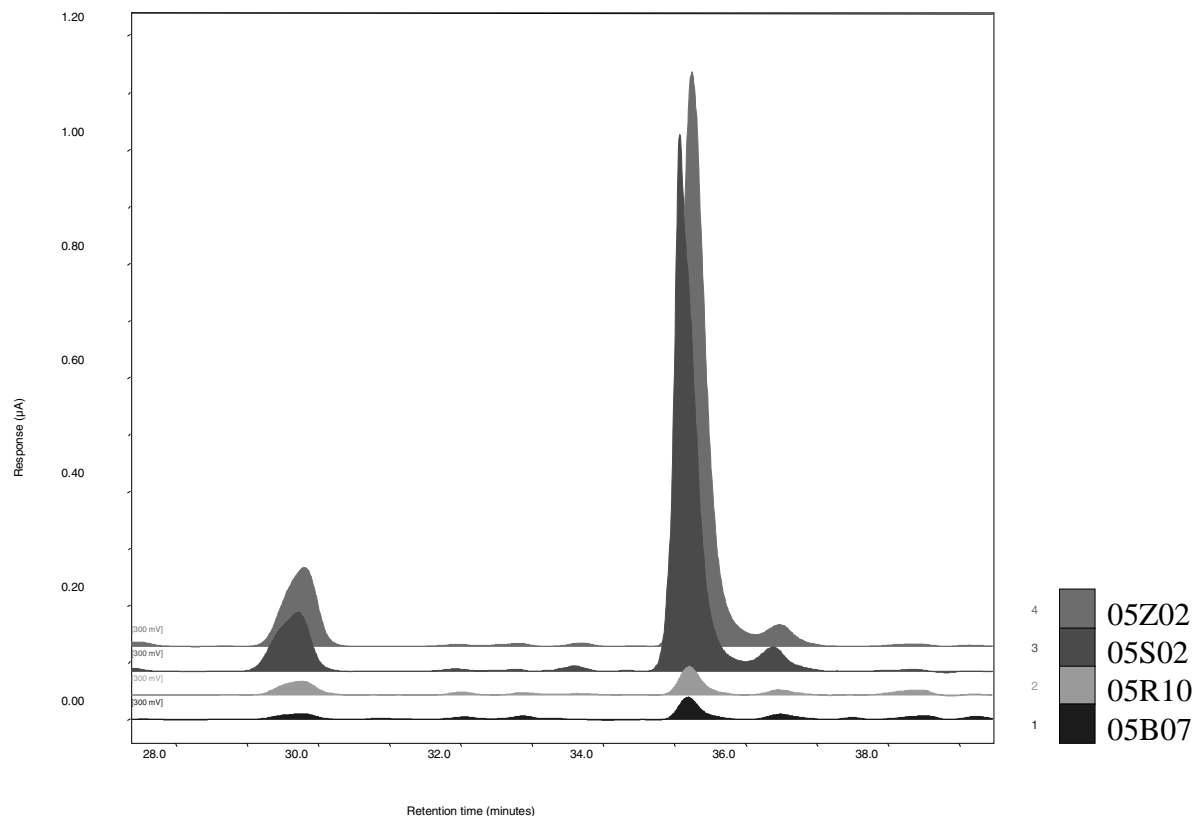


**Abb. 3.1** HPLC-Voltamogramm von Plasmaproben vor und nach enzymatischer Konjugatsspaltung. Zur Retentionszeit des freien Quercetins bei 39,0 min eluiert vor Konjugatsspaltung keine Substanz. 05S02=nach enzymatischer Spaltung (grün), 05S02k= vor enzymatischer Spaltung (blau).

Bei den Konjugaten konnte es sich sowohl um stellungsisomere Glucuronide als auch Sulfate handeln, wenngleich das Auftreten von Sulfaten eigenen massenspektrometrischen Untersuchungen nach sehr unwahrscheinlich war. Neben den Quercetinkonjugaten traten auch Isorhamnetinkonjugate auf. Eine eindeutige Peakzuordnung der Glucuronide war nicht möglich, da Referenzsubstanzen fehlten. Es wurden daher nur die Peaks als Quercetinkonjugate betrachtet, die von ihrer Peakfläche und dem kinetischen Verlauf mit dem nach Hydrolyse entstehenden Quercetinpeak korrelierten. Beim Anlegen dieser Kriterien kamen 3 bzw. 4 Substanzen in Betracht. Es zeigte sich, dass das Verhältnis dieser Konjugate zueinander, unabhängig von der Prüfmedikation, gleich war (Abb. 3.2).

Die genuinen Glykoside der Prüfmedikationen – Rutin und Spiraeosid – wurden in keiner Probe detektiert. Dies widerspricht einigen bisherigen Arbeiten, in denen ein Nachweis von Quercetinglykosiden im Plasma vorgestellt wurde, und unterstützt die Theorie von Crespy et al., dass Quercetin möglicherweise bereits im Enterocyten glucuronidiert wird (Aziz et al. 1998, Crespy et al. 1999, Paganga und Rice Evans 1997).

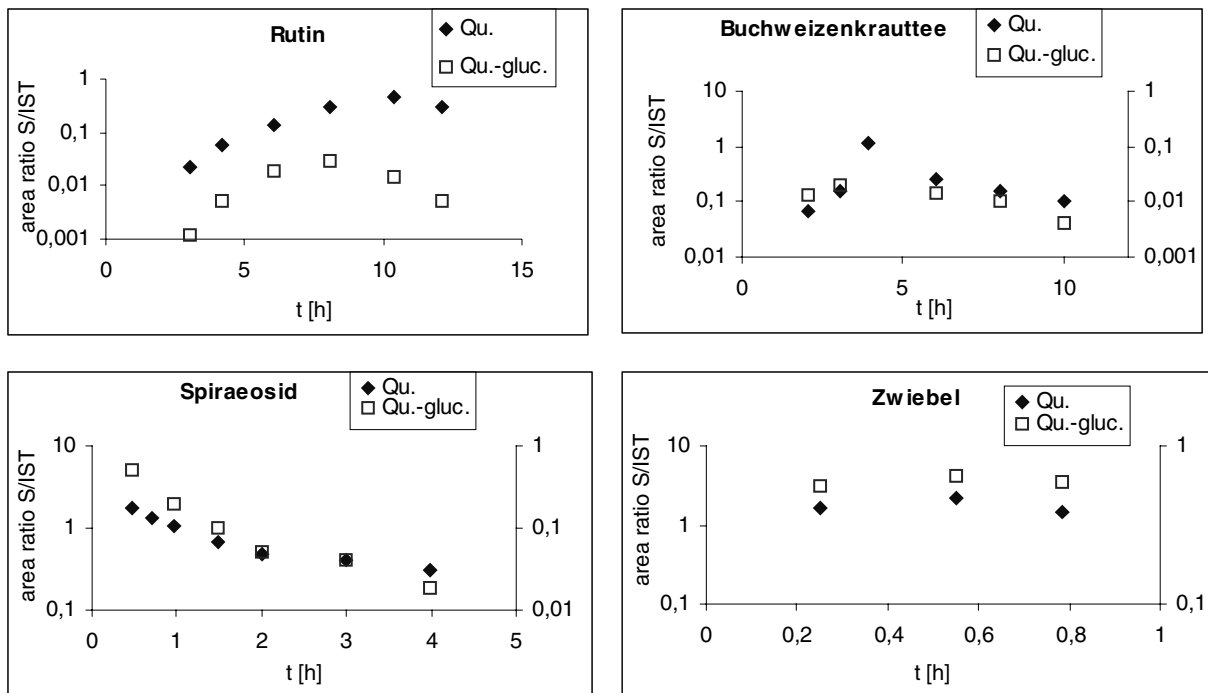
Weiterhin wurde deutlich, dass überwiegend ein Hauptmetabolit gebildet wird. Die LC-MS/MS-Untersuchungen zeigten, dass es sich dabei um ein Quercetinglucuronid handelt (Wittig et al. 2000). Die verschiedenen Konjugate zeigten untereinander einen parallelen kinetischen Verlauf. Betrachtete man den Hauptmetaboliten (Retentionszeit 35,2 min) im Vergleich zum Gesamtquercetin nach Hydrolyse, so zeigte sich erwartungsgemäß ebenfalls ein annähernd paralleler kinetischer Verlauf (Abb. 3.3). Dies war besonders für die pharmakokinetische Auswertung unter Verwendung des Gesamtquercetinsgehalts von Bedeutung (s. Kapitel 3.4).



**Abb. 3.2** HPLC-Voltamogramm von Plasmaproben vor enzymatischer Spaltung der Konjugate. Mögliche Quercetinkonjugate mit den Retentionszeiten 29,7 min, 35,2 min und 36,4 min zeigten sich in annähernd gleichen Verhältnissen zueinander nach Applikation aller vier Prüfpräparate.

Die in Abb. 3.3 dargestellten Abweichungen könnten u.a. dadurch bedingt sein, dass die Konjugate nicht im selben Kanal wie das freie Quercetin detektiert werden konnten (300 mV und 150 mV respektive). Die Daten sind daher nur als Flächenverhältnisse bezogen auf den Internen Standard Naringenin wiedergegeben. Ein Vergleich der Mengenverhältnisse von freiem Quercetin zu dem Hauptmetaboliten vor Hydrolyse ist daher nicht möglich, entscheidend ist allein der parallele kinetische Verlauf beider Substanzen.





**Abb. 3.3** Kinetischer Verlauf von Quercetin im Vergleich zum Hauptmetaboliten Quercetinglucuronid (sek. Achse) vor und nach enzymatischer Hydrolyse der gleichen Plasmaproben. Analysiert wurden ausgewählte Proben des Probanden 05.

### 3.2 Ergebnisse der Pilotstudie

Die Plasmaproben wurden zunächst mit der hierfür entwickelten und validierten Methode extrahiert und mittels HPLC-PDA Detektion analysiert (s. Absatz 2.5 und 2.5.2). Im Hinblick auf die Zielsetzung der Pilotstudie lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf der Applikation von Quercetin als Reinsubstanz in zwei verschiedenen Dosierungen.

Wider Erwarten zeigte sich, dass weder nach Applikation beider Quercetindosen noch der Buchweizenkrautformulierung Quercetin nach Hydrolyse im Plasma nachgewiesen werden konnte. Nach Aufnahme der Zwiebelzubereitung konnte hingegen Quercetin bei allen Probanden mit maximalen Plasmaspiegeln bis zu  $3,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  bestimmt werden.

Die Plasmaproben der Pilotstudie wurden daraufhin mit der weiterentwickelten Extraktionsmethode (s. Absatz 2.9.1) sowie empfindlicheren Detektionsmethoden (s. Absatz 2.8.3) erneut aufgearbeitet und analysiert. Dies ermöglichte eine Bestimmung der Quercetinkonzentrationen und seinen Metaboliten in allen Proben (s. Abb. 3.4).

### **3.2.1 Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetinglucosiden in Form von Zwiebeln**

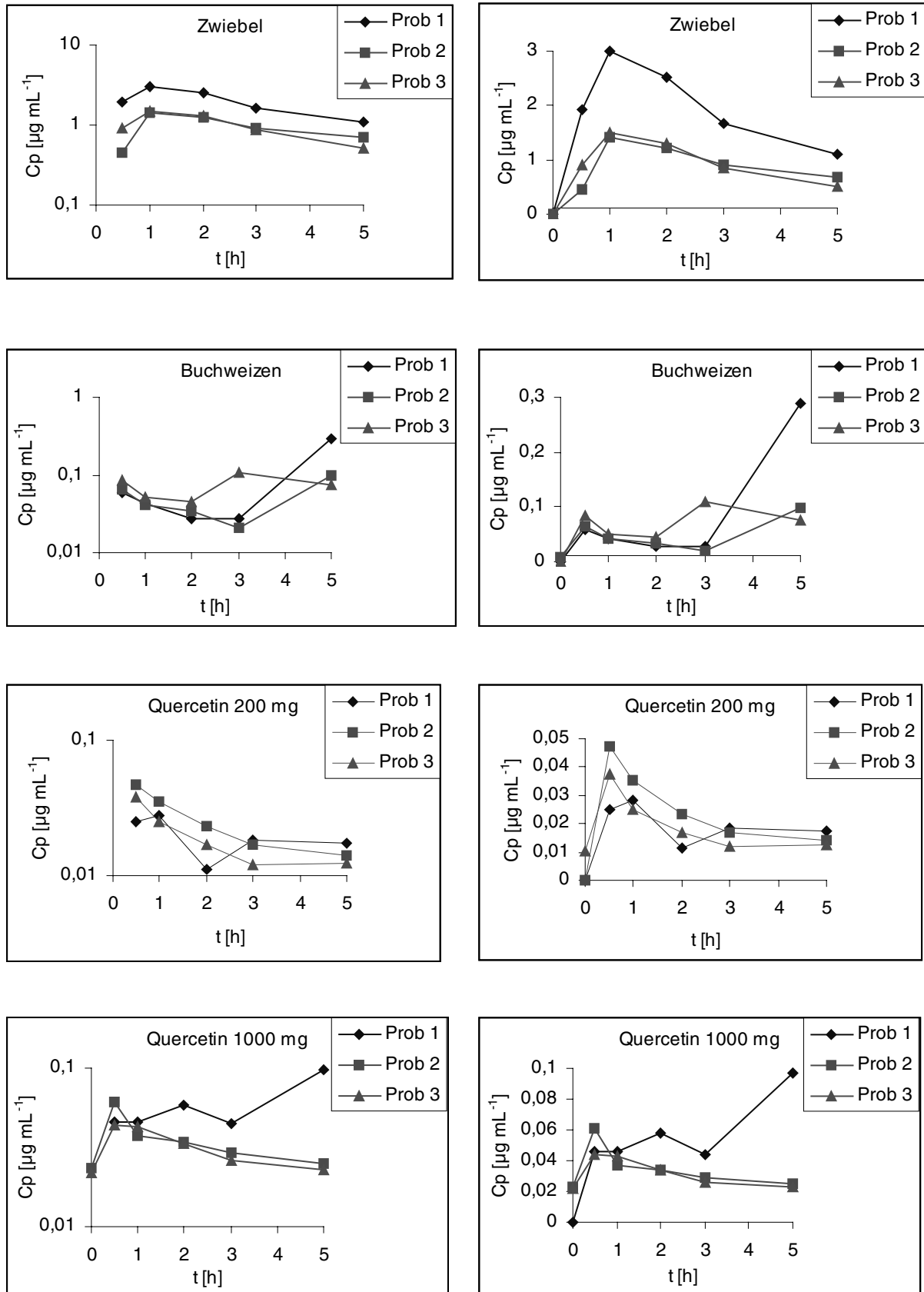
Die Resorption von Quercetin(konjugaten) erfolgte sehr schnell, bereits nach 30 min waren Quercetinkonjugate im Plasma nachweisbar und nach 60 min waren maximale Plasmaspiegel von 1,4 bis 3,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  erreicht (Tab. 3.1, Tab. 3.2 sowie Tab. 8.1). Wie in der halblogarithmischen Darstellung (linke Spalte in Abb. 3.4) gut zu erkennen ist, verlaufen die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven der drei Probandinnen nahezu parallel zueinander. Die sich aus den letzten drei Datenpunkten des terminalen, linearen Abschnitts der Kurve ergebende Halbwertszeit beträgt 2,3 h (Prob 3), 2,6 h (Prob 1) und 3,8 h (Prob 2). Aufgrund des kurzen Probenentnahmezeitraumes von 5 Stunden lässt sich allerdings nicht sagen, ob es sich bei diesem Wert um die Verteilungs- oder Eliminationshalbwertszeit handelt.

### **3.2.2 Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetin als Reinsubstanz in den Dosierungen 200 mg und 1000 mg**

Obwohl bezogen auf Quercetin die gleiche bzw. fünffache Dosis appliziert wurde, waren die Plasmakonzentrationen etwa um zwei Zehnerpotenzen niedriger (Abb. 3.4 und Tab. 8.2). Maximale Plasmakonzentrationen lagen im Bereich von 0,03 bis 0,06  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  und wurden zumeist bereits nach 30 min erreicht (Tab. 3.1 und Tab. 3.2). Die Resorption von Quercetin zeigte keine Dosisabhängigkeit, da die Konzentrationen nach Gabe von 1000 mg nur etwa doppelt so hoch waren wie nach Gabe von 200 mg.

### **3.2.3 Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetin-3-O-rutinosid in Form von Buchweizenkrauttee**

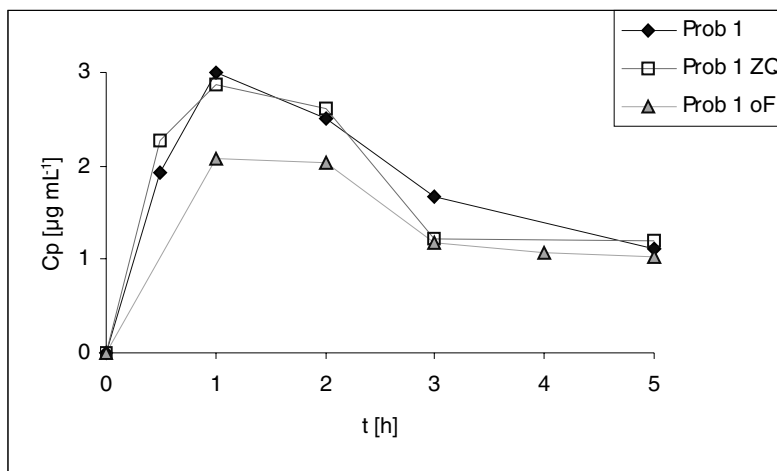
Der Plasmakonzentrationsverlauf von Quercetin nach Konjugatspaltung zeigte wieder innerhalb der ersten 30 min einen leichten Anstieg (Abb. 3.4 und Tab. 8.2). Bis etwa 3 h fallen die Plasmakonzentrationen leicht ab. Maximale Plasmaspiegel in diesem ersten Resorptionsabschnitt liegen zwischen 0,06 und 0,08  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  und somit etwas höher als nach Gabe beider Quercetindosen (Tab. 3.1 und Tab. 3.2). Der 5 h-Wert ist aber bei zwei Probandinnen stark erhöht. In Zusammenhang mit der renalen Elimination von Quercetin, die nach Applikation von Buchweizenkraut deutlich höher war als nach Quercetingabe, deuten die 5 h-Werte auf eine zweite Resorptionsphase hin (s. Abschnitt 3.2.6).



**Abb. 3.4** Quercetin-Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] nach Applikation der in der Pilotstudie untersuchten 4 Prüfpräparate. In der linken Spalte ist jeweils die halblogarithmische Darstellung der rechts nebenstehend abgebildeten Quercetin-Plasmakonzentrationen.

### 3.2.4 Einfluss von Fett auf die Resorption von Quercetinglucosiden aus der Zwiebelzubereitung (Ergänzung I. zur Pilotstudie)

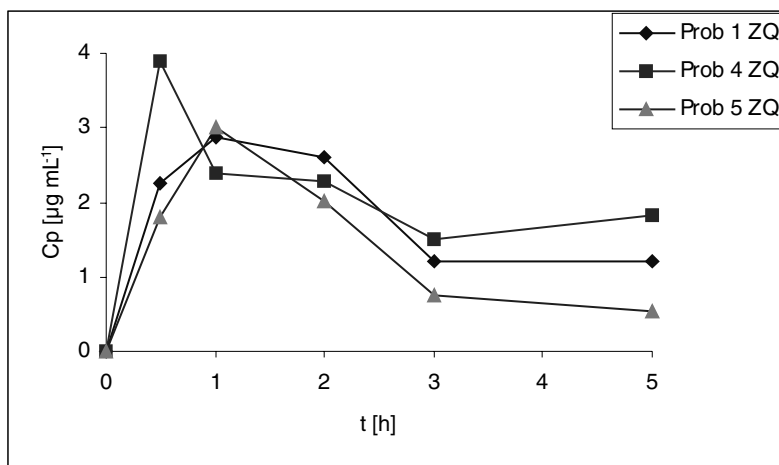
Bei der Interpretation der Ergebnisse der Pilotstudie stellte sich die Frage, ob das verwendete Fett zum Anbraten der Zwiebeln einen entscheidenden Effekt auf die Resorption der Quercetinglucoside haben könnte. Daher wurde der Versuch mit der gleichen Menge Zwiebeln wiederholt, diese jedoch gedünstet und anschließend püriert. Wie in Abb. 3.5 zu erkennen ist, wurden annähernd gleiche Plasmaspiegel erreicht (Tab. 8.1). Das Fett war somit nicht ausschlaggebend für die nach Aufnahme von Zwiebeln beobachtete vergleichsweise gute Resorption.



**Abb. 3.5** Quercetin-Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ] des Probanden 1 nach Applikation der Zwiebeln zubereitet mit (Prob 1) und ohne Fett (Prob 1 oF) sowie zusammen mit 100 mg Quercetin (Prob 1 ZQ).

### 3.2.5 Einfluss der Zwiebelmatrix auf die Resorption von Quercetin als Reinsubstanz (Ergänzung II. zur Pilotstudie)

Aus den Resultaten der Pilotstudie ergab sich weiterhin die Überlegung, ob die Zwiebelmatrix die Resorption von Quercetin entscheidend positiv beeinflusste. Es wurde daher von drei Probanden eine Kombination der bisherigen Zwiebelmenge (gedünstet und püriert) mit 200 mg Quercetin Aglykon (suspendiert in der Prüfformulierung) eingenommen. In Abb. 3.5 ist als 3. Kurve der Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf nach Einnahme dieser Kombination dargestellt. Wie deutlich zu erkennen ist, überstiegen die Plasmakonzentrationen nicht die nach Einnahme von Zwiebeln erreichten. Die Resorption von Quercetin ließ sich daher durch gleichzeitige Einnahme von Zwiebeln nicht fördern. In Abb. 3.6 sind die Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe der 3 Probanden, die an dem Versuch teilnahmen, dargestellt. Auch hier zeigten sich wieder maximale Plasmakonzentrationen nach 0,5 und 1 h (siehe Tab. 8.1).



**Abb. 3.6** Quercetin-Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ] der Probanden 1, 4 und 5 nach Applikation der Zwiebelzubereitung mit zusätzlich 100 mg Quercetin (Ergänzung II. der Pilotstudie).

**Tab. 3.1** Übersicht über die maximalen Plasmakonzentrationen  $c_{\text{max}}$  [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ] von Quercetin (detektiert und berechnet als Aglykon nach Hydrolyse der Phase-II.-Konjugate) in der Pilotstudie sowie Ergänzung I. und II. Die Werte in Klammern entsprechen einem ersten Maximum (siehe Abb. 3.4).

	Pilotstudie				Erg. I. Zwiebel gedünstet	Erg. II. Zwiebel+ Qu. 200
	Zwiebel	Buchweizen	Qu. 200	Qu. 1000		
Prob1	3,00	(0,059) 0,29	0,028	(0,058) 0,097	2,08	2,9
Prob2	1,43	(0,064) 0,098	0,047	0,061		
Prob3	1,51	(0,085) 0,109	0,038	0,044		
Prob4						3,9
Prob5						3,0

**Tab. 3.2** Übersicht über die Zeitpunkte  $t_{\text{max}}$  [h], an denen die maximalen Plasmakonzentrationen  $c_{\text{max}}$  von Quercetin in der Pilotstudie sowie Ergänzung I. und II erreicht wurden. Die Werte in Klammern entsprechen dem Zeitpunkt des ersten Konzentrationsmaximums (siehe Abb. 3.4).

	Pilotstudie				Erg. I. Zwiebel gedünstet	Erg. II. Zwiebel+ Qu. 200
	Zwiebel	Buchweizen	Qu. 200	Qu. 1000		
Prob1	1	(0,5) 5	1	(2) 5	1	1
Prob2	0,5	(0,5) 5	0,5	0,5		
Prob3	0,5	(0,5) 3	0,5	0,5		
Prob4						0,5
Prob5						1

### 3.2.6 Renale Elimination von Quercetin und seinen Metaboliten

Alle im folgenden angegebenen Substanzgehalte wurden nach enzymatischer Spaltung der Konjugate ermittelt.

Im Urin wurde nach Applikation der Zwiebelprüfpräparation und des Buchweizenkrautpulvers sowohl Quercetin als auch Isorhamnetin detektiert (siehe Tab. 3.3 und Tab. 3.4). Die renal

eliminierte Substanzmenge mit **intaktem Flavonoidgrundgerüst** betrug hierbei nach Applikation der Zwiebeln  $7,23 \pm 1,55\%$  der Dosis und nach Applikation des Buchweizenkrautpulvers  $0,09 \pm 0,03\%$  der Dosis. Diese Flavonoide mit intaktem Grundgerüst konnten weder im 0-Wert noch nach Applikation der suspendierten Reinsubstanz (200 mg Quercetin) nachgewiesen werden. Nach oraler Gabe von 1000 mg suspendiertem Quercetin wurde nur Quercetin ( $0,03 \pm 0,01\%$  der applizierten Dosis) aber nicht dessen methylierter Metabolit Isorhamnetin im Urin nach Hydrolyse der Konjugate gefunden. Da aber bereits die Quercetinkonzentrationen sehr gering waren, ist davon auszugehen, dass die Isorhamnetinkonzentrationen ausserhalb des Messbereichs der Methode lagen.

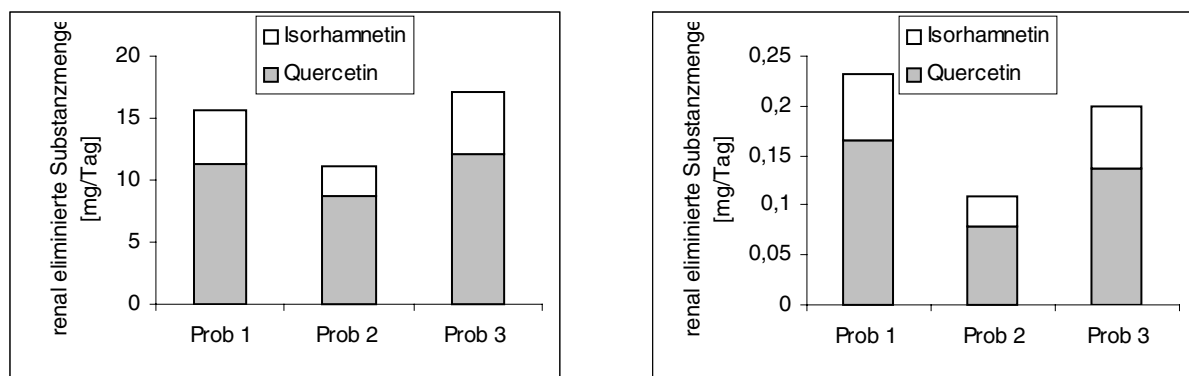
**Tab. 3.3** Renal eliminierte Quercetinmenge [mg] bzw. [% Tagesdosis] nach Applikation der jeweiligen Prüfpräparate der Pilotstudie sowie Ergänzungen I. und II. Im Nullwert und an Studientag 1 (200 mg Quercetin) konnte kein Quercetin nachgewiesen werden.

renal eliminierte Quercetinmenge [mg/Tag] bzw. [% der Tagesdosis]					
	Buchweizenkraut	Zwiebeln	1000 mg Quercetin	Erg. I. gedünstete Zw.	Erg. II Zw. + Qu.
Prob 1	0,17 (0,08%)	11,4 (5,7%)	0,04 (0,004%)	15,1 (7,6%)	14,0 (3,5%)
Prob 2	0,08 (0,04%)	8,7 (4,3%)	0,07 (0,007%)		
Prob 3	0,14 (0,07%)	12,1 (6,1%)	0,05 (0,005%)		
Prob 4					11,6 (2,9%)
Prob 5					24,4 (3,6)

**Tab. 3.4** Renal eliminierte Isorhamnetinmenge [mg] bzw. [% Tagesdosis] nach Applikation der jeweiligen Prüfpräparate der Pilotstudie sowie Ergänzungen I. und II. Im Nullwert, an Studientag 1 (200 mg Quercetin) und 4 (1000 mg Quercetin) konnte kein Quercetin nachgewiesen werden.

renal eliminierte Isorhamnetinmenge [mg/Tag] bzw. [% der Tagesdosis]					
	Buchweizenkraut	Zwiebeln	1000 mg Quercetin	Erg. I. gedünstete Zw.	Erg. II Zw. + Qu.
Prob 1	0,07 (0,03%)	4,3 (2,1%)	-	5,04 (3,1%)	4,7 (1,1%)
Prob 2	0,03 (0,02%)	2,4 (1,1%)	-		
Prob 3	0,06 (0,03%)	5,0 (2,4%)	-		
Prob 4					3,7 (0,9%)
Prob 5					6,2 (1,5%)

In der eliminierten Menge an Flavonoiden mit intaktem Grundkörper ergaben sich interindividuelle Unterschiede zwischen den drei Probandinnen in der Pilotstudie (Abb. 3.7). Im Verhältnis zur insgesamt ausgeschiedenen Flavonoidmenge liegt der Isorhamnetinanteil aber bei allen drei Personen sowohl nach Verabreichung der Zwiebeln als auch nach Applikation des Buchweizenkrautpulvers etwa bei 30 %. Zwischen den Probandinnen ist also kein quantitativer Unterschied in der Metabolisierung von Quercetin zu Isorhamnetin festzustellen.



a) nach Zwiebel- Applikation

b) nach Applikation von Buchweizenkrauttee

**Abb. 3.7** Renal eliminierte Quercetin- und Isorhamnetinmengen [mg/Tag] nach Applikation von Zwiebeln und Buchweizenkrauttee.

Die potentiellen **intestinalen Metabolite** Hippursäure, *m*-Hydroxyphenylelessigsäure, *p*-Hydroxyphenylelessigsäure, Homovanillinsäure und 3,4-Dihydroxytoluol wurden nach jeder der verschiedenen Applikationen detektiert. Da diese Metabolite auch endogen gebildet werden, wurde zunächst die eliminierte Substanzmenge von Tag 0 am Ende der Run-in-Phase vor Applikation der Prüfpräparate bestimmt.

**Tab. 3.5** Im Sammelurin der *run-in* Phase (0-Wert) eliminierte Substanzmengen.

Im 0-Wert renal eliminierte Substanzmengen [mg/Tag]					
	HA	DHT	<i>p</i> -HPAA	<i>m</i> -HPAA	HVA
Prob 1	267,7	6,5	18,7	2,1	6,7
Prob 2	265,2	3,8	18,8	1,6	7,4
Prob 3	162,4	10,6	14,1	1,9	6,4

Legt man diese endogenen Substanzmengen als Basiswerte den an den folgenden Studientagen eliminierten Substanzmengen zugrunde, so lässt sich auch für diese Metabolite eine quantitative Berechnung bezogen auf die Dosis durchführen. Dabei wird vereinfachend davon ausgegangen, dass die individuellen Basiswerte während der Studientage konstant blieben, da eine Differenzierung zwischen endogen entstandenen und als Folge der Flavonoidaufnahme gebildeten Metaboliten in diesem Versuch nicht möglich war. Die im Folgenden angegebenen Werte beziehen sich darüber hinaus lediglich auf Quercetin als Ausgangssubstanz. Es wurde nicht berücksichtigt, dass bei den Pflanzenpräparaten möglicherweise auch andere Substanzen zu diesen Metaboliten umgesetzt werden können. Die berechneten Werte können daher nur Anhaltspunkte darstellen (Tab. 3.6).

Eine verstärkte Ausscheidung von **Homovanillinsäure** konnte bei allen Probanden nach Applikation aller Prüfpräparationen beobachtet werden. Dabei wurde nach Verabreichung der pflanzlichen Prüfpräparationen (Zwiebeln bzw. Buchweizenkrautpulver) 12-17 % bzw. 9-20 % der Dosis renal als Homovanillinsäure eliminiert, nach Applikation der suspendierten

Reinsubstanzen aber nur jeweils ca. 6,5% der entsprechenden Dosis (Tab. 3.6). Eine erhöhte **m-HPAA** Ausscheidung war bei den drei Probanden nur nach Verabreichung der Zwiebel- und Buchweizenprüfpräparation zu beobachten. So wurde nach Applikation der Zwiebeln 5-31% der Dosis, nach Applikation des suspendierten Buchweizenkrautpulvers 13-21% der Dosis renal als **m-HPAA** ausgeschieden. Im Sammelurin der Probanden nach 1000 mg Quercetingabe wurden für **m-HPAA** Substanzgehalte von 0,5-12% der Dosis bestimmt. Die hohen Abweichungen ergaben sich durch die verminderte Ausscheidung der Substanz bei Proband 3 an allen vier Tagen im Vergleich zu den beiden anderen Probanden (Tab. 3.6). **3,4-Dihydroxytoluol** wurde im Besonderen nach der Buchweizenprüfpräparation als Metabolit im Urin aller drei Probanden nachgewiesen. 20-36% der im Buchweizen als Quercetin-3-*O*-glykosid vorhandenen Quercetindosis wurden hierbei als 3,4-Dihydroxytoluol ausgeschieden. Nach Verabreichung des Quercetin-4'-glucosid in den Zwiebeln konnte 3,4-Dihydroxytoluol nur bei Proband 2 BA als verstärkt eliminierte Substanz (15,9% der Dosis) ausgemacht werden. Hingegen wurden von Proband 1 und Proband 3 nur 2,51% bzw. 1,45% der Dosis im Urin als 3,4-Dihydroxytoluol eliminiert (Tab. 3.6). Die renal eliminierten Hippursäure- und *p*-HPAA-Mengen wurden nicht berücksichtigt, da sich die individuell ausgeschiedenen Substanzmengen bei diesen Metaboliten teilweise um mehr als das Doppelte unterschieden bzw. die endogen ausgeschiedenen Mengen deutlich höher als nach Applikation der Prüfpräparationen lagen.

**Tab. 3.6** Renal eliminierte Substanzmengen im 24 h-Urin in % der applizierten Quercetindosis an den jeweiligen Studientagen der Pilotstudie.

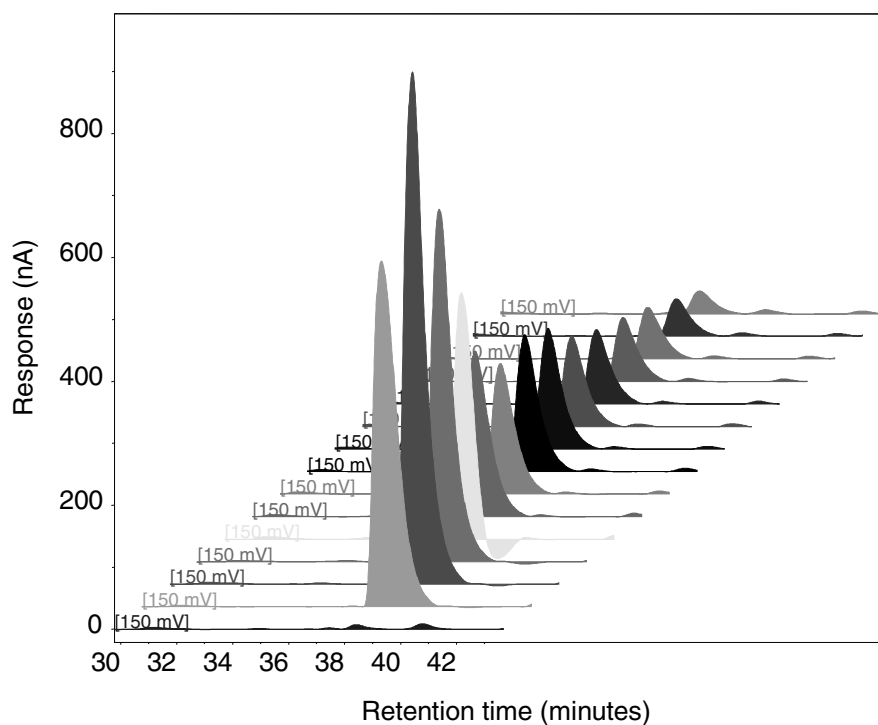
	Prob.	HVA		<i>m</i> -HPAA		DHT	
		[mg/Tag]	[% Dosis]	[mg/Tag]	[% Dosis]	[mg/Tag]	[% Dosis]
Studientag 1: <b>200 mg Quercetin</b>	1	15,5	12,9	1,6	1,6	0	0
	2	6,6	5,5	1,6	1,6	10,1	12,3
	3	5,9	4,9	0	0	1,5	1,8
Studientag 2: <b>Buchweizenkraut</b>	1	18,4	15,3	21,3	21,2	17,3	21,1
	2	10,6	8,7	17,9	17,8	16,52	20,1
	3	24,5	20,3	12,8	12,7	30,0	36,4
Studientag 3: <b>Zwiebel</b>	1	16,5	13,7	27,1	27,0	2,1	2,5
	2	14,5	12,1	30,9	30,8	13,0	15,9
	3	20,9	17,4	5,2	5,2	1,2	1,4
Studientag 4: <b>1000 mg Quercetin</b>	1	35,1	5,8	53,6	10,7	11,0	2,7
	2	33,6	5,6	57,6	11,5	0,6	0,1
	3	50,5	8,4	2,6	0,5	0	0



### 3.3 Ergebnisse der Hauptstudie

#### 3.3.1 Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetin-4'-O-glucosid in Form von Zwiebeln

Nach Aufnahme der gedünsteten Zwiebeln als Prüfmedikation wurde Quercetin bzw. dessen Konjugate (Glykoside und/oder Glucuronide) sehr schnell resorbiert. Quercetinglucuronide waren bereits nach 15 min im Plasma nachweisbar, maximale Plasmaspiegel ( $C_{max} = 2,3 \pm 1,46 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) wurden bereits nach 30 bis 45 min erreicht (Abb. 3.8).

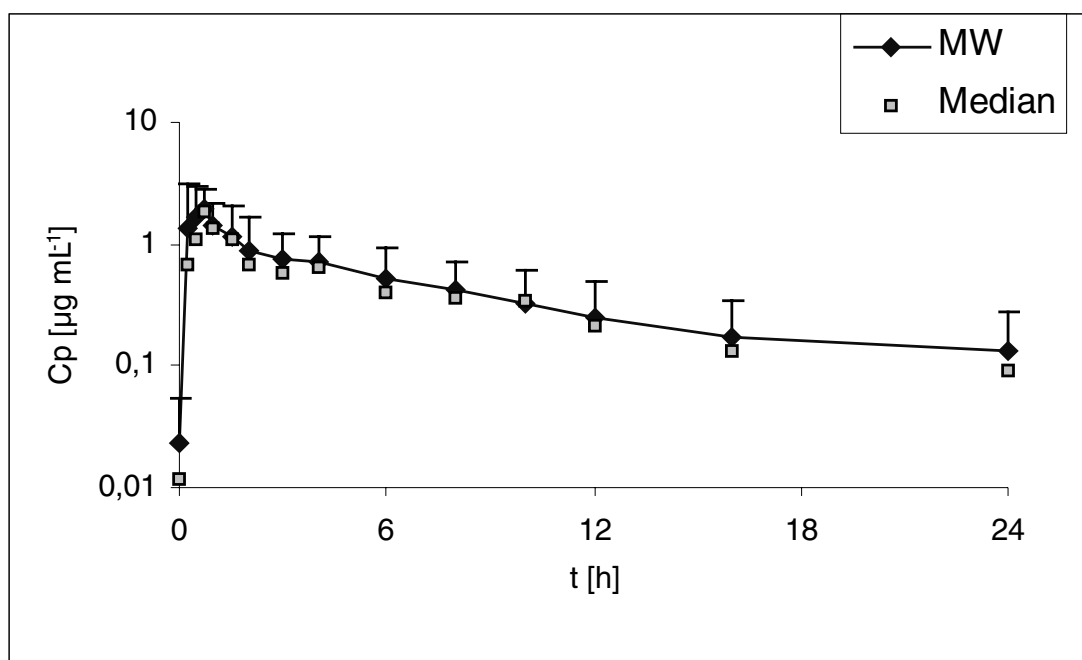


**Abb. 3.8** Repräsentative Voltamogramme des Verlaufs der Quercetin-Plasmakonzentrationen (nach Hydrolyse der Konjugate) nach Aufnahme von Zwiebeln. Dargestellt sind die Plasmaproben von Proband 05 gemessen in Kanal 3 (150 mV), beginnend vorne bei  $t=0\text{h}$  (blau) bis  $t=24\text{h}$  (grau).

Eine Übersicht über die einzelnen Plasmakonzentrationen zum jeweiligen Abnahmezeitpunkt ist in Tab. 3.7 gegeben. Die individuellen Daten jedes Probanden finden sich im Anhang in Tab. 8.3. Der kinetische Verlauf der Quercetinplasmakonzentrationen nach Hydrolyse der Konjugate war deutlich biphasisch, unterteilt in eine schnelle Verteilungs- und eine langsamere Eliminationsphase (Abb. 3.9).

**Tab. 3.7** Quercetin-Plasmakonzentrationen aller Probanden nach Applikation von Zwiebeln (Z). MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, Min=Minimalwert, Max=Maximalwert.

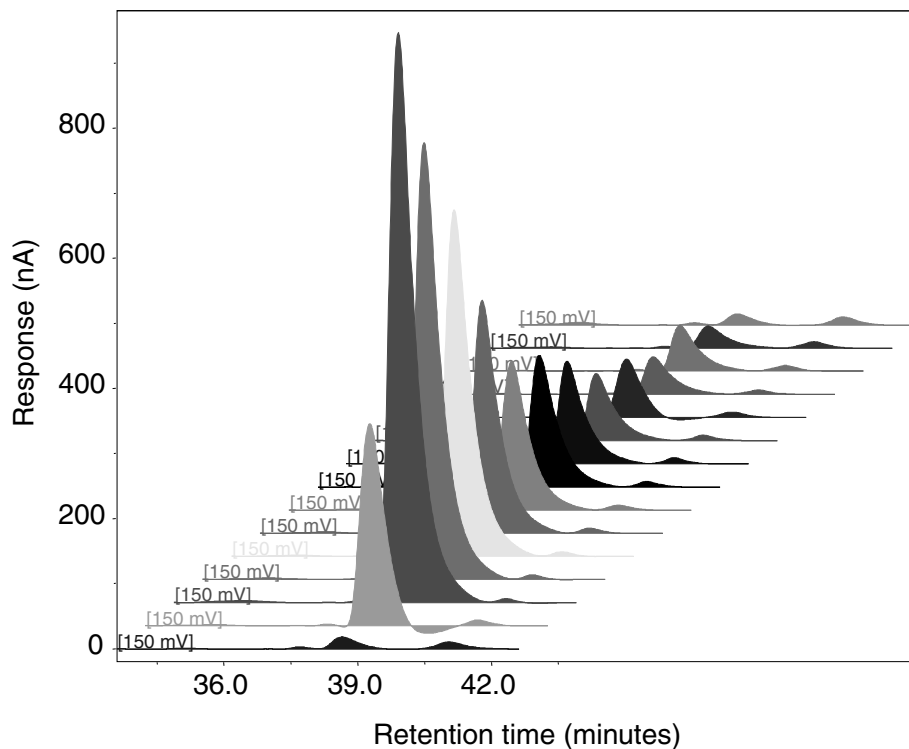
T [h]	Z MW Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Z SD Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Z Min Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Z Median Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Z Max Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
0	0,023	0,031	0,000	0,012	0,110
0,25	1,328	1,800	0,015	0,677	5,669
0,5	1,684	1,317	0,291	1,111	4,440
0,75	1,900	0,916	0,683	1,867	3,436
1	1,440	0,722	0,264	1,350	2,569
1,5	1,178	0,858	0,484	1,093	3,630
2	0,880	0,799	0,274	0,664	3,297
3	0,775	0,455	0,208	0,593	1,648
4	0,700	0,459	0,168	0,629	1,597
6	0,536	0,416	0,118	0,403	1,379
8	0,413	0,287	0,070	0,366	1,074
10	0,325	0,280	0,076	0,334	1,064
12	0,245	0,241	0,039	0,209	0,853
16	0,177	0,164	0,008	0,132	0,599
24	0,129	0,148	0,006	0,093	0,548



**Abb. 3.9** Graphische Darstellung der mittleren und medianen Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Einnahme von Zwiebeln. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

### 3.3.2 Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetin-4'-O-glucosid

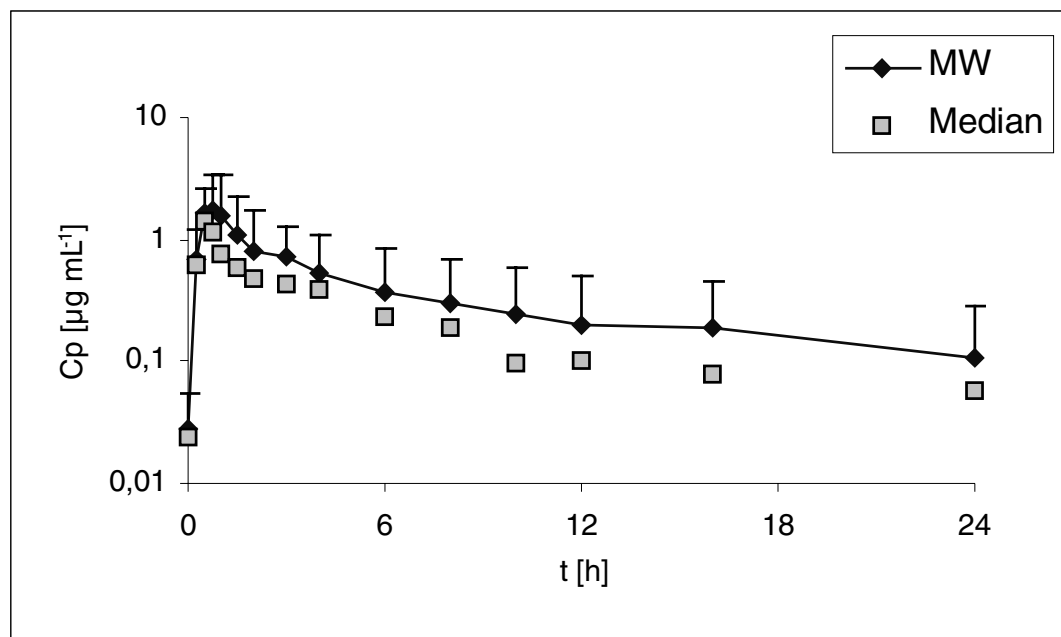
Der kinetische Verlauf der Quercetinplasmakonzentrationen nach Hydrolyse der Quercetinkonjugate verlief ähnlich wie nach Applikation von Zwiebeln. Die Resorption war teilweise etwas verzögerter, d.h. nach 15 min war noch nicht so viel resorbiert wie nach Aufnahme von Zwiebeln. Maximale Plasmaspiegel ( $c_{\max} = 2,1 \pm 1,69 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) wurden aber ebenfalls zwischen 30 min und 45 min erreicht und lagen im Durchschnitt etwas niedriger als nach Applikation von Zwiebeln (Abb. 3.10). Eine Übersicht über die einzelnen Plasmakonzentrationen zum jeweiligen Abnahmezeitpunkt ist in Tab. 3.8 gegeben. Die individuellen Daten jedes Probanden finden sich im Anhang in Tab. 8.4.



**Abb. 3.10** Repräsentative Voltamogramme des Verlaufs der Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Hydrolyse der Konjugate nach Aufnahme von Spiraeosid. Dargestellt sind die Plasmaproben von Proband 05 gemessen in Kanal 3 (150 mV), beginnend bei t=0h bis t=24h.

**Tab. 3.8** Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Applikation von Spiraeosid (S). MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, Min=Minimalwert, Max=Maximalwert.

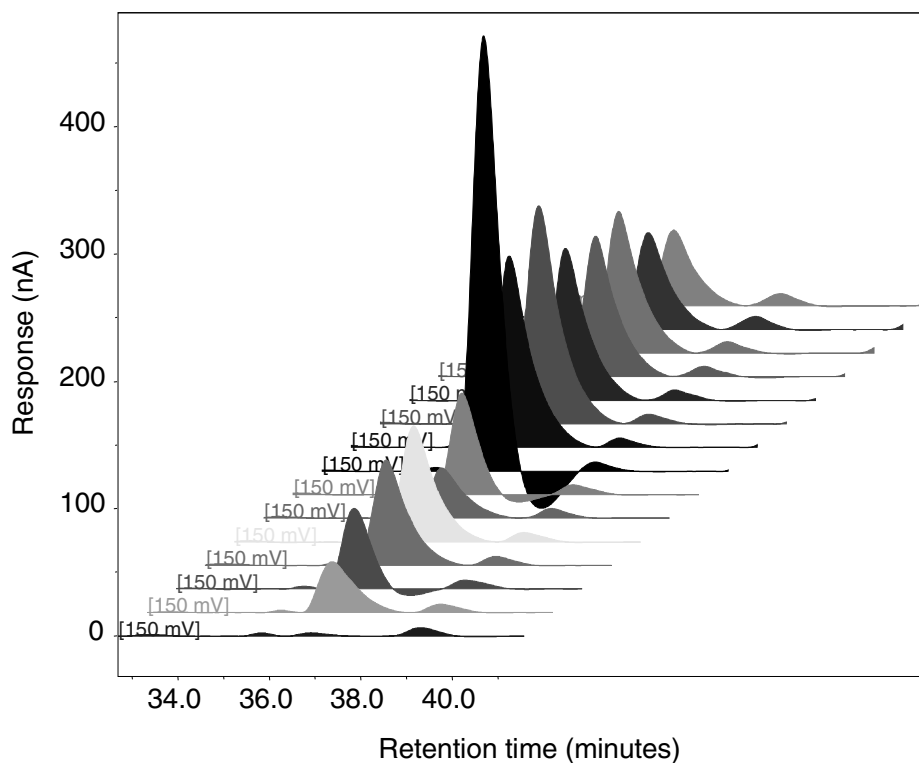
T [h]	S MW Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	S SD Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	S Min Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	S Median Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	S Max Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
0	0,028	0,028	0,000	0,024	0,072
0,25	0,694	0,519	0,049	0,627	1,552
0,5	1,612	0,956	0,553	1,387	3,602
0,75	1,757	1,554	0,305	1,174	5,875
1	1,528	1,777	0,421	0,770	6,597
1,5	1,064	1,139	0,311	0,596	4,465
2	0,804	0,888	0,238	0,471	3,467
3	0,707	0,587	0,110	0,434	1,887
4	0,523	0,569	0,140	0,388	2,183
6	0,366	0,473	0,049	0,228	1,669
8	0,308	0,391	0,040	0,187	1,453
10	0,239	0,356	0,071	0,099	1,293
12	0,195	0,317	0,027	0,101	1,124
16	0,186	0,261	0,022	0,077	0,800
24	0,109	0,183	0,018	0,057	0,677



**Abb. 3.11** Graphische Darstellung der mittleren und medianen Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Einnahme von Spiraeosid. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

### 3.3.3 Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetin-3-O-rutinosid in Form von Buchweizenkrauttee

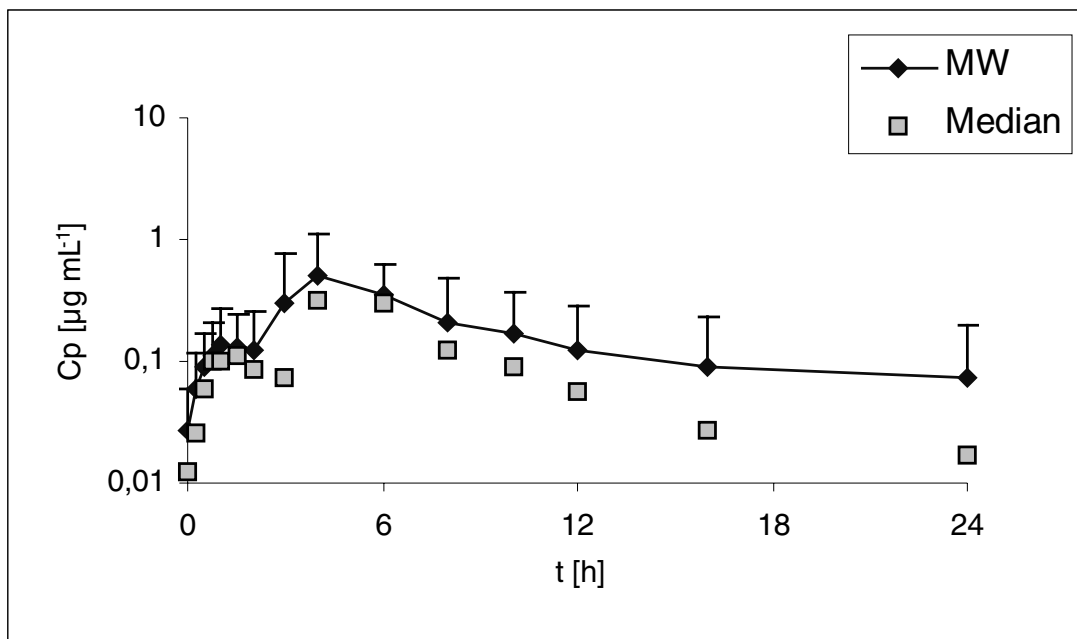
Generell erfolgte die Resorption von Quercetin(konjugaten) aus Buchweizenkraut langsamer im Vergleich zu Zwiebeln und Spiraeosid. Maximale Plasmaspiegel ( $c_{\max} = 0,6 \pm 0,67 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) wurden erst nach 4 h erreicht und lagen im Durchschnitt etwa ein Drittel niedriger. Dabei muss beachtet werden, dass Quercetin nicht in gleichen Mengen verabreicht wurde, sondern im Falle von Rutin und Buchweizenkrauttee die doppelte Quercetindosis gegeben wurde (siehe Absatz 2.6.1). Innerhalb der ersten 120 min war allerdings oft ein leichter Anstieg und Abfall der Plasmakonzentrationen zu beobachten, der in den nachstehenden Voltamogrammen gut zu verfolgen ist (Abb. 3.12). Diese Absorptionsphase war aber so schwach ausgeprägt, dass sie sich pharmakokinetisch nicht erfassen ließ. Eine Übersicht über die einzelnen Plasmakonzentrationen zum jeweiligen Abnahmezeitpunkt ist in Tab. 3.9 gegeben. Die individuellen Daten jedes Probanden finden sich im Anhang in Tab. 8.5.



**Abb. 3.12** Repräsentative Voltamogramme des Verlaufs der Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Hydrolyse der Konjugate nach Aufnahme von Buchweizenkrauttee. Dargestellt sind die Plasmaproben von Proband 06 gemessen in Kanal 3 (150 mV), beginnend bei  $t=0\text{h}$  bis  $t=24\text{h}$ .

**Tab. 3.9** Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Applikation von Buchweizenkraut (B).  
MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, Min=Minimalwert, Max=Maximalwert.

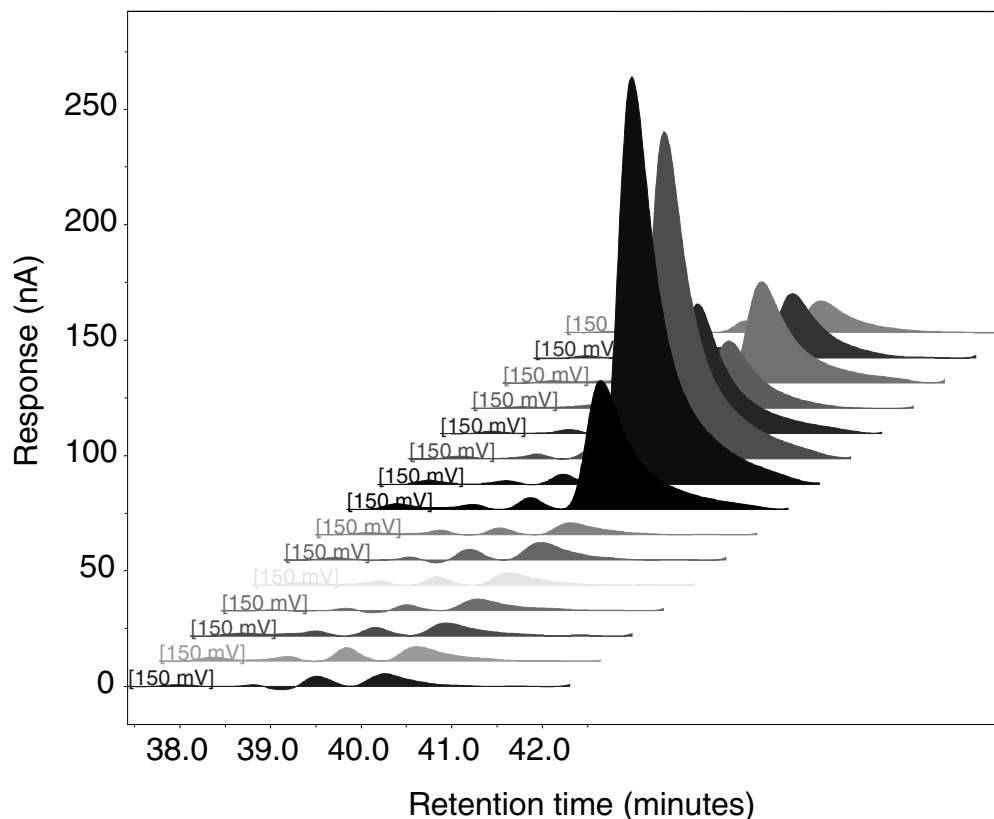
T [h]	B MW Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	B SD Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	B Min Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	B Median Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	B Max Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
0	0,027	0,034	0,000	0,013	0,101
0,25	0,059	0,060	0,000	0,026	0,179
0,5	0,089	0,076	0,016	0,060	0,266
0,75	0,109	0,102	0,023	0,102	0,378
1	0,138	0,131	0,016	0,099	0,396
1,5	0,132	0,113	0,024	0,113	0,401
2	0,125	0,125	0,006	0,087	0,414
3	0,299	0,459	0,027	0,075	1,395
4	0,506	0,631	0,015	0,312	2,237
6	0,342	0,277	0,022	0,299	0,788
8	0,211	0,262	0,014	0,122	0,900
10	0,165	0,207	0,014	0,088	0,694
12	0,126	0,159	0,016	0,058	0,475
16	0,090	0,143	0,008	0,026	0,454
24	0,075	0,122	0,006	0,016	0,393



**Abb. 3.13** Graphische Darstellung der mittleren und medianen Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Einnahme von Buchweizenkrauttee. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

### 3.3.4 Quercetin-Plasmakonzentrationen nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate nach Applikation von Quercetin-3-O-rutinosid

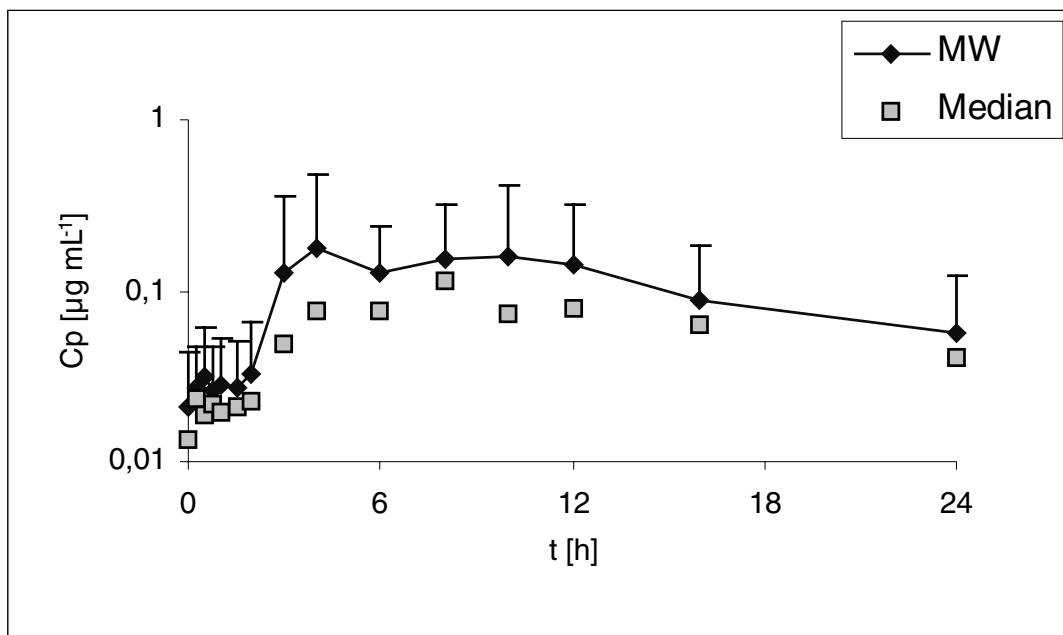
Nach Applikation von Rutin zeigte sich eine ausgeprägte Resorptionsverzögerungszeit (lag time) von teilweise bis zu 6h. Maximale Plasmaspiegel wurden nach 7h erreicht und lagen im Durchschnitt mit  $c_{\max} = 0,3 \pm 0,34 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  um die Hälfte niedriger als nach Applikation von Buchweizenkrauttee. Nach Applikation von Rutin war die interindividuelle Variabilität am Stärksten ausgeprägt, bei drei Probanden konnte fast überhaupt kein Quercetinglucuronid im Plasma nachgewiesen werden. Die bei Buchweizenkraut beobachtete frühe Absorptionsphase konnte bei Rutin nicht in gleichem Maße beobachtet werden. Grund dafür könnten aber auch die insgesamt geringeren Plasmakonzentrationen sein, so dass diese Absorptionsphase analytisch nicht mehr erfasst werden konnte. Eine Übersicht über die einzelnen Plasmakonzentrationen zum jeweiligen Abnahmezeitpunkt ist in Tab. 3.10 gegeben. Die individuellen Daten jedes Probanden finden sich im Anhang in Tab. 8.6.



**Abb. 3.14** Repräsentative Voltamogramme des Verlaufs der Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Hydrolyse der Konjugate nach Aufnahme von Buchweizenkrauttee. Dargestellt sind die Plasmaproben von Proband 02 gemessen in Kanal 3 (150 mV), beginnend bei  $t=0\text{h}$  bis  $t=24\text{h}$ .

**Tab. 3.10** Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Applikation von Rutin (R). MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, Min=Minimalwert, Max=Maximalwert.

T [h]	R MW Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	R SD Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	R Min Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	R Median Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	R Max Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
0	0,021	0,023	0,000	0,014	0,079
0,25	0,027	0,020	0,003	0,023	0,071
0,5	0,031	0,030	0,003	0,018	0,103
0,75	0,026	0,021	0,003	0,022	0,071
1	0,028	0,025	0,003	0,020	0,090
1,5	0,027	0,023	0,003	0,021	0,084
2	0,033	0,032	0,003	0,022	0,111
3	0,125	0,228	0,004	0,049	0,828
4	0,180	0,302	0,007	0,077	1,043
6	0,126	0,115	0,004	0,076	0,329
8	0,153	0,169	0,005	0,115	0,584
10	0,157	0,249	0,007	0,072	0,905
12	0,140	0,180	0,010	0,078	0,586
16	0,088	0,099	0,008	0,064	0,343
24	0,057	0,064	0,004	0,040	0,238



**Abb. 3.15** Graphische Darstellung der mittleren und medianen Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Einnahme von Rutin. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen vom Mittelwert dar.

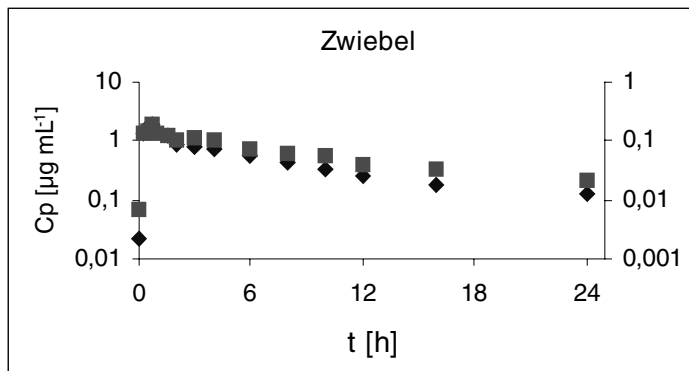


### 3.3.5 Plasmakonzentrationen des Metaboliten 3'-O-Methylquercetin (Isorhamnetin)

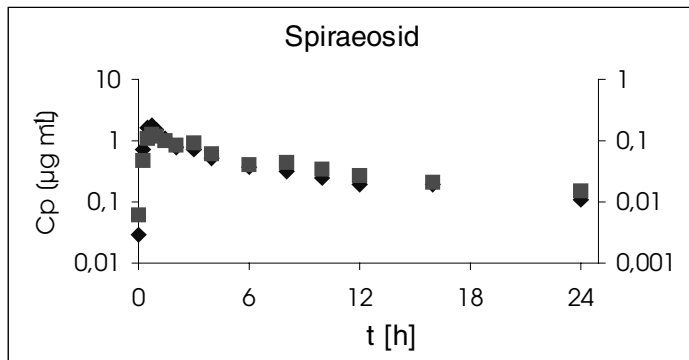
Isorhamnetin ist insofern wichtig, da es der einzige detektierbare Metabolit mit intaktem Flavonoidgrundgerüst ist. Isorhamnetin konnte wie auch Quercetin nicht in freier Form im Plasma nachgewiesen werden. Bei den angegebenen Plasmakonzentrationen handelt es sich daher ebenfalls um die nach enzymatischer Spaltung der Konjugate (höchstwahrscheinlich ebenfalls Glucuronide) erhaltenen Gesamtkonzentrationen.

Die Plasmakonzentrationen von Isorhamnetin waren etwa 10fach geringer als von Quercetin. Aufgrund dessen lagen die Isorhamnetinkonzentrationen nach Applikation von Buchweizenkrauttee bei Proband 04, nach Applikation von Rutin bei den Probanden 01, 04 und 06 unterhalb der Bestimmungsgrenze. Die Ergebnisse (Mittelwerte und Mediane) der quantitativen Bestimmung sind im Anhang zusammengefasst (Tab. 8.7, Tab. 8.8, Tab. 8.9, Tab. 8.10).

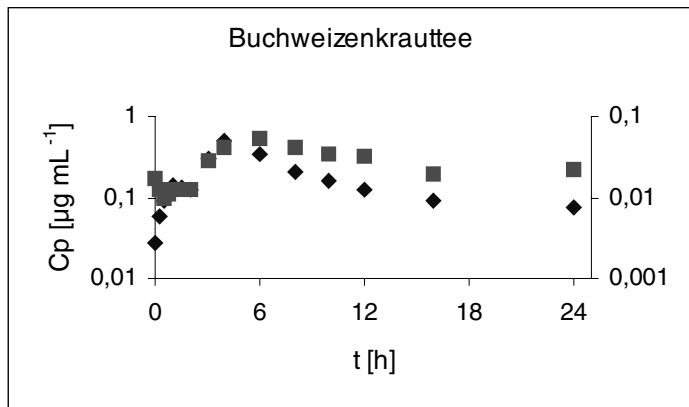
Der Plasmakonzentrations-Zeit-Verlauf von Isorhamnetin verlief sowohl in der Absorptions- als auch in der Eliminationsphase parallel zu dem des Quercetins, und zwar unabhängig von dem Prüfpräparat (Abb. 3.16, Abb. 3.17, Abb. 3.18, Abb. 3.19).



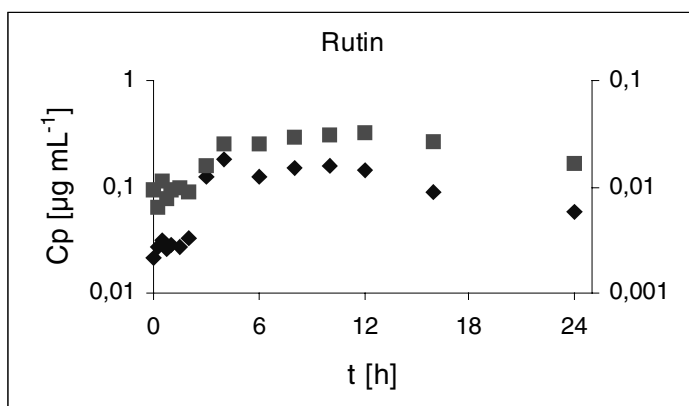
**Abb. 3.16** Gesamtplasmakonzentrationen (MW) von Quercetin (◆) und Isorhamnetin (■) (sek. Achse) nach Applikation von Zwiebeln.



**Abb. 3.17** Gesamtplasmakonzentrationen (MW) von Quercetin (◆) und Isorhamnetin (■) (sek. Achse) nach Applikation von Spiraeosid.



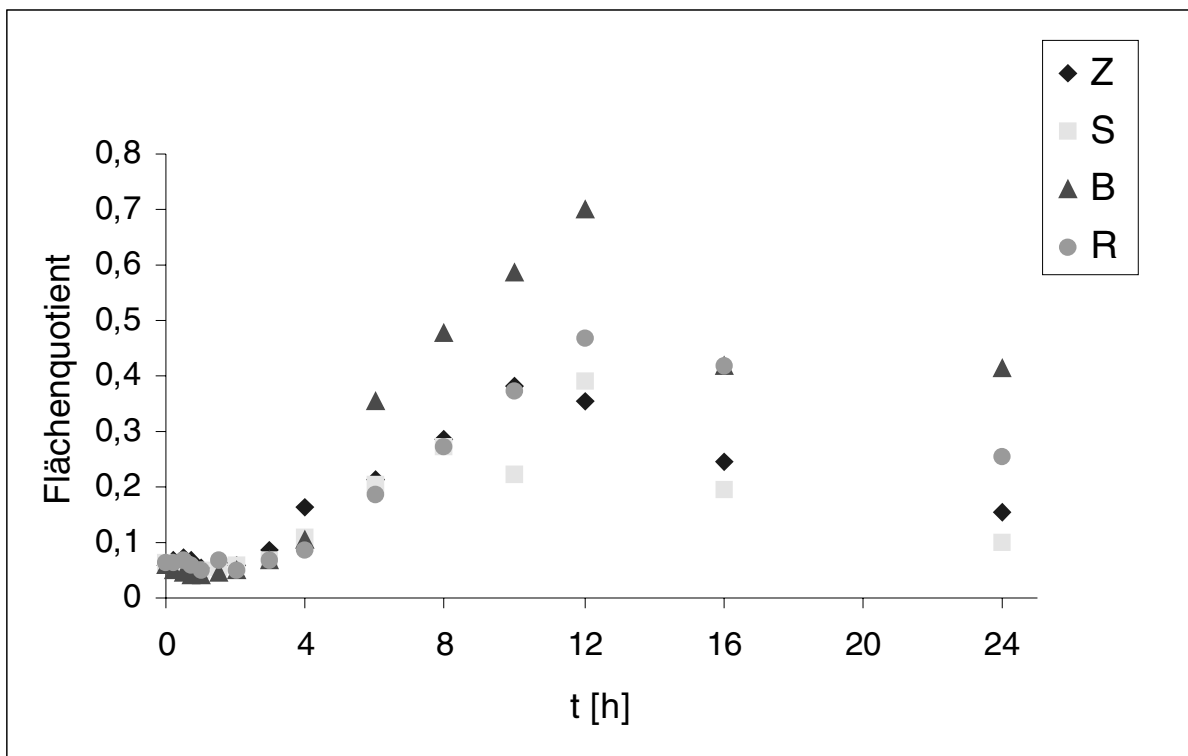
**Abb. 3.18** Gesamtplasmakonzentrationen (MW) von Quercetin (◆) und Isorhamnetin (■) (sek. Achse) nach Applikation von Buchweizenkrauttee.



**Abb. 3.19** Gesamtplasmakonzentrationen (MW) von Quercetin (◆) und Isorhamnetin (■) (sek. Achse) nach Applikation von Rutin.

### 3.3.6 Weitere Metabolite im Plasma

Zu den für den intestinalen Abbau des Quercetins und seinen Glykosiden beschriebenen Metaboliten zählen vor allem 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure, Homovanillinsäure, m-Hydroxyphenylelessigsäure und 3,4-Dihydroxytoluol. Diese zeigten im Konzentrations-Zeit-Verlauf der einzelnen Tagesläufe allerdings entweder keine Veränderungen oder konnten aufgrund sehr geringer Konzentrationen nicht eindeutig zugeordnet werden. Eine bislang nicht identifizierte Substanz zeigte allerdings eine deutliche Kinetik. Das Voltamogramm dieses Metaboliten entspricht dem des Quercetins mit einem Maximum bei 150 mV. Die Retentionszeit von 14 min deutet darauf hin, dass es sich um einen intestinalen Metaboliten handelt, da die Substanz im Bereich der anderen phenolischen Säuren eluiert (Tab. 2.14). Die Kinetik dieser Substanz war bei allen 4 Prüfpräparaten sehr ähnlich und zeigte ein Maximum bei 10 bis 12 Stunden (Abb. 3.20).



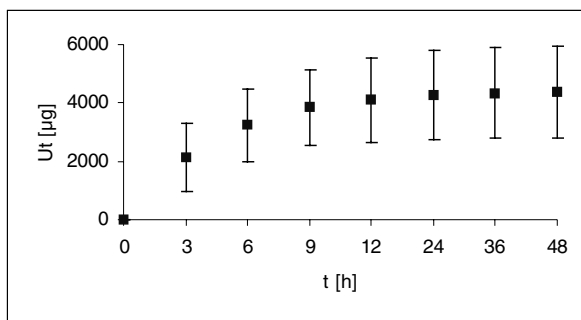
**Abb. 3.20** Kinetik des unbekannten Metaboliten (Retentionszeit 14 min) nach Applikation von Zwiebeln (Z), Spiraeosid (S), Buchweizenkraut (B) und Rutin (R). Die Werte sind dargestellt als Flächenquotienten des Metaboliten und des Internen Standards.

Die Resorptionsverzögerungszeit von etwa 4 Stunden könnte ein weiterer Hinweis auf einen intestinal gebildeten Metaboliten sein. Darüber hinaus sind die Konzentrationen nach Aufnahme von Buchweizenkraut und Rutin höher als nach Aufnahme von Zwiebeln und Spiraeosid. Dies entspricht den Erwartungen, wenn man die doppelte Quercetindosis im Falle von Buchweizenkraut und Rutin berücksichtigt. Zur Zeit wird versucht, die Identität des Metaboliten mittels Massenspektrometrie näher zu bestimmen.

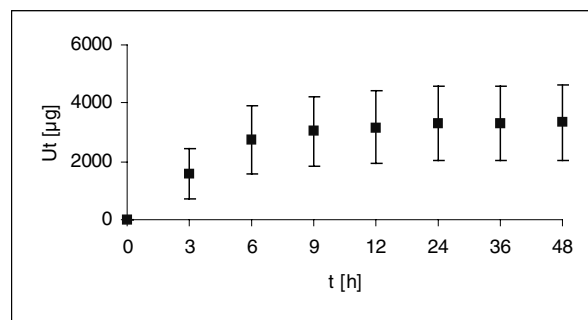
### 3.3.7 Renale Elimination von Quercetin und seinen Metaboliten

Zur Bestimmung des unkonjugierten Anteils an **Quercetin** wurden verschiedene Urinproben parallel mit und ohne enzymatischer Hydrolyse bestimmt. Dabei konnte nach Einnahme aller 4 Prüfpräparate jeweils nur in dem Urinsammelintervall mit dem höchsten Gesamt-Quercetiningehalt (nach enzymatischer Hydrolyse) freies Quercetin nachgewiesen werden. Der freie Anteil betrug durchschnittlich 5,2% (3,3% - 8,5%). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass im Verlauf der Probenaufarbeitung (z.B. durch den Einfluss von Wärme in der Vakuumzentrifuge) eine Konjugatspaltung eintritt. Ob es sich daher bei dem freien Quercetinanteil um ein Artefakt handelt, kann erst mit Gewissheit gesagt werden, wenn die verschiedenen Quercetinkonjugate als Referenzsubstanzen für eine Validierung zur Verfügung stehen.

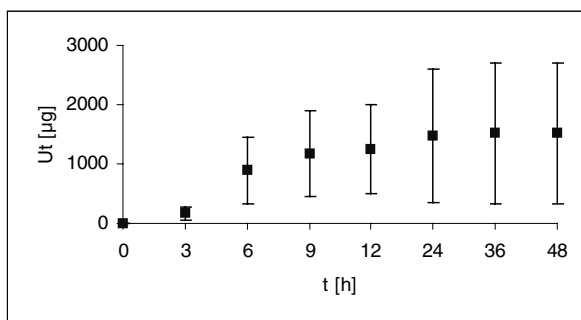
In dem überwiegenden Teil der Urinproben konnte Quercetin nur in konjugierter Form nachgewiesen werden. Die Detektion erfolgte daher wie unter Absatz 2.8 beschrieben nach enzymatischer Hydrolyse der Quercetinkonjugate und anschließender UV-Detektion des Quercetins bei 370nm. Bereits nach 24 h konnte Quercetin nicht mehr im Urin nachgewiesen werden. Nach Applikation von Zwiebeln und Spiraeosid wurde ein Großteil der renal eliminierten Menge bereits innerhalb der ersten 6 Stunden ausgeschieden (Abb. 3.21, Abb. 3.22). Nach Aufnahme von Buchweizenkrauttee und Rutin setzte die renale Elimination – entsprechend den Plasmaspiegeln – etwas verzögert ein, so dass der Hauptteil des renal eliminierten Quercetins in dem Intervall von 3 bis 9 Stunden ausgeschieden wurde (Abb. 3.23, Abb. 3.24).



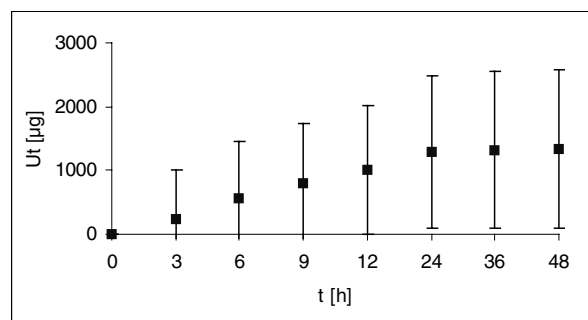
**Abb. 3.21** Kumulative Urinausscheidung (MW±SD) von Quercetin nach Applikation von Zwiebeln (Tab. 8.11).



**Abb. 3.22** Kumulative Urinausscheidung von Quercetin (MW±SD) nach Applikation von Spiraeosid (Tab. 8.12).



**Abb. 3.23** Kumulative Urinausscheidung von Quercetin (MW±SD) nach Applikation von Buchweizenkrauttee (Tab. 8.13).

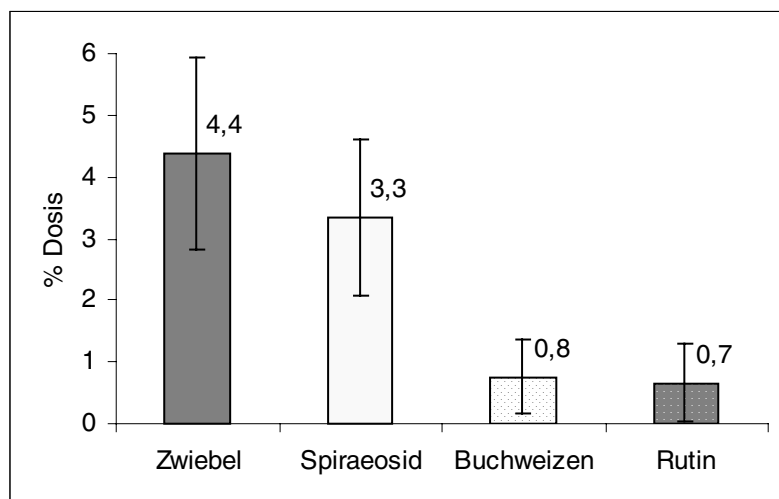


**Abb. 3.24** Kumulative Urinausscheidung von Quercetin (MW±SD) nach Applikation von Rutin (Tab. 8.14).

Da die renale Elimination von Quercetin in Form seiner Konjugate in allen Fällen innerhalb der Urinsammelperiode von 48h abgeschlossen war, konnte der renal eliminierte **prozentuale Anteil der applizierten Dosis** ermittelt werden. Wie bereits in der Pilotstudie und in anderen Arbeiten zu sehen war, ist der renal eliminierte prozentuale Anteil der Dosis mit unverändertem Quercetingrundgerüst vergleichsweise gering (Tab. 3.11). Es lässt sich aber ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) feststellen zwischen der Applikation des Glucosids (in Form von Zwiebeln und Spiraeosid) im Vergleich zu der des Rutinosids (in Form von Buchweizenkrauttee oder Rutin) (siehe Absatz 3.6.6). Die Variabilität innerhalb einer Gruppe war nach Applikation des Rutinosids bei beiden Prüfpräparaten deutlich größer als nach Applikation des Glucosids (Tab. 8.35).

**Tab. 3.11** Renale Elimination von Quercetin in Prozent der applizierten Dosis. Diese betrug im Falle von Zwiebeln (Z) und Spiraeosid (S) 100 mg Quercetin (331  $\mu$ Mol) in Form des Glucosids, im Falle von Buchweizenkrauttee (B) und Rutin (R) 200 mg Quercetin (662  $\mu$ Mol) in Form des Rutinosids.

Proband	Z	S	B	R
1	3,07	2,81	0,15	0,18
2	4,35	6,26	0,38	1,49
3	3,83	2,26	1,24	1,21
4	4,30	2,95	0,09	0,01
5	4,48	3,27	0,88	1,35
6	4,83	5,34	1,08	0,13
7	6,42	2,22	0,61	0,09
8	5,59	3,22	2,24	1,67
9	3,03	3,93	0,36	0,29
10	4,91	2,98	0,80	0,96
11	0,97	2,57	0,85	0,28
12	6,71	2,19	0,41	0,31
MW	4,37	3,33	0,76	0,66
SD	1,57	1,27	0,59	0,62
Min	0,97	2,19	0,09	0,01
Median	4,41	2,97	0,71	0,30
Max	6,71	6,26	2,24	1,67



**Abb. 3.25** Renale Elimination von Quercetin (bestimmt nach Hydrolyse der Konjugate) in Prozent der applizierten Quercetinmenge in dem jeweiligen Prüfpräparat Zwiebeln (Z), Spiraeosid (S), Buchweizenkrauttee (B) und Rutin (R). Daten sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

**Isorhamnetin** (3'-O-Methylquercetin) konnte im Urin nicht in freier Form nachgewiesen werden. Die folgenden Angaben beziehen sich daher ebenfalls stets auf den Gesamt-Isorhamnetingehalt nach enzymatischer Spaltung der Isorhamnetinkonjugate.

Die kumulative renale Elimination von Isorhamnetin zeigte entsprechend den parallelen Konzentrations-Zeit-Verläufen im Plasma einen parallelen Verlauf zu der des Quercetins. Wie aus Tab. 3.12 ersichtlich wird, war die renale Elimination zum Großteil bereits nach 6 bis 9 Stunden abgeschlossen.

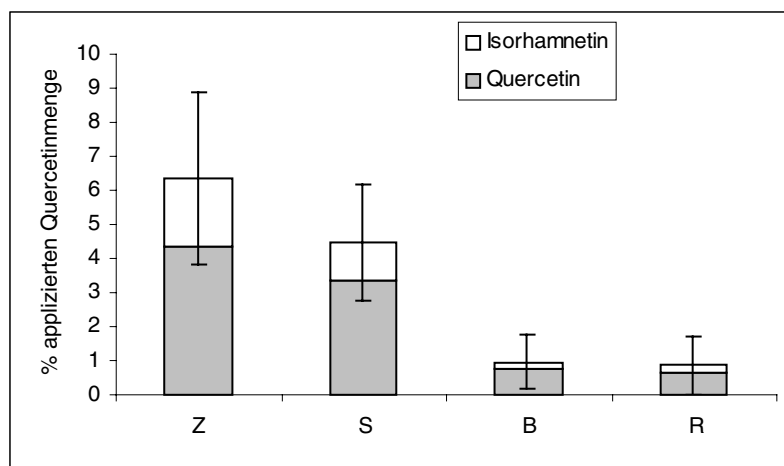
**Tab. 3.12** Kumulative renale Elimination von Isorhamnetin ( $U_t$  in  $[\mu\text{g}]$ ) nach Applikation von Zwiebeln (Z), Spiraeosid (S), Buchweizenkraut (B) und Rutin (R). Angegeben sind die Mittelwerte (MW) und die entsprechenden Standardabweichungen (SD).

t [h]	Z MW	Z SD	S MW	S SD	B MW	B SD	R MW	R SD
0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	766	530	0	1	40	41	65	220
6	1318	666	467	134	196	152	142	260
9	1526	730	903	440	303	219	216	306
12	1652	836	1076	451	322	230	286	346
24	1762	939	1149	486	411	413	393	452
36	1773	940	1179	509	421	443	404	473
48	1774	939	1181	510	421	443	407	479

Die renal eliminierte Isorhamnetinmenge berechnet als Prozent der applizierten Dosis ist in Tab. 3.13 angegeben. Die Summe aus Quercetin und Isorhamnetin (bestimmt nach Hydrolyse der Konjugate) entspricht dem renal eliminierten Anteil aller Metabolite mit intaktem Flavonoid-Grundgerüst. Nach Applikation der Zwiebeln wurden etwa 6,4 % der Dosis in Form von Quercetin- und Isorhamnetinkonjugaten eliminiert, bei Spiraeosid betrug der Anteil etwa 4,6 %, bei Buchweizenkraut etwa 1 % und bei Rutin etwa 0,9 % der Dosis (Tab. 3.13). Das Verhältnis von Quercetin- zu Isorhamnetinkonjugaten ist graphisch in Abb. 3.26 dargestellt.

**Tab. 3.13** Renale Elimination von Isorhamnetin (Iso) sowie der Summe aus Quercetin und Isorhamnetin (Qu+Iso) in Prozent der applizierten Dosis. Diese betrug im Falle von Zwiebeln (Z) und Spiraeosid (S) 100 mg Quercetin (331  $\mu$ Mol) in Form des Glucosids, im Falle von Buchweizenkrauttee (B) und Rutin (R) 200 mg Quercetin (662  $\mu$ Mol) in Form des Rutinosids.

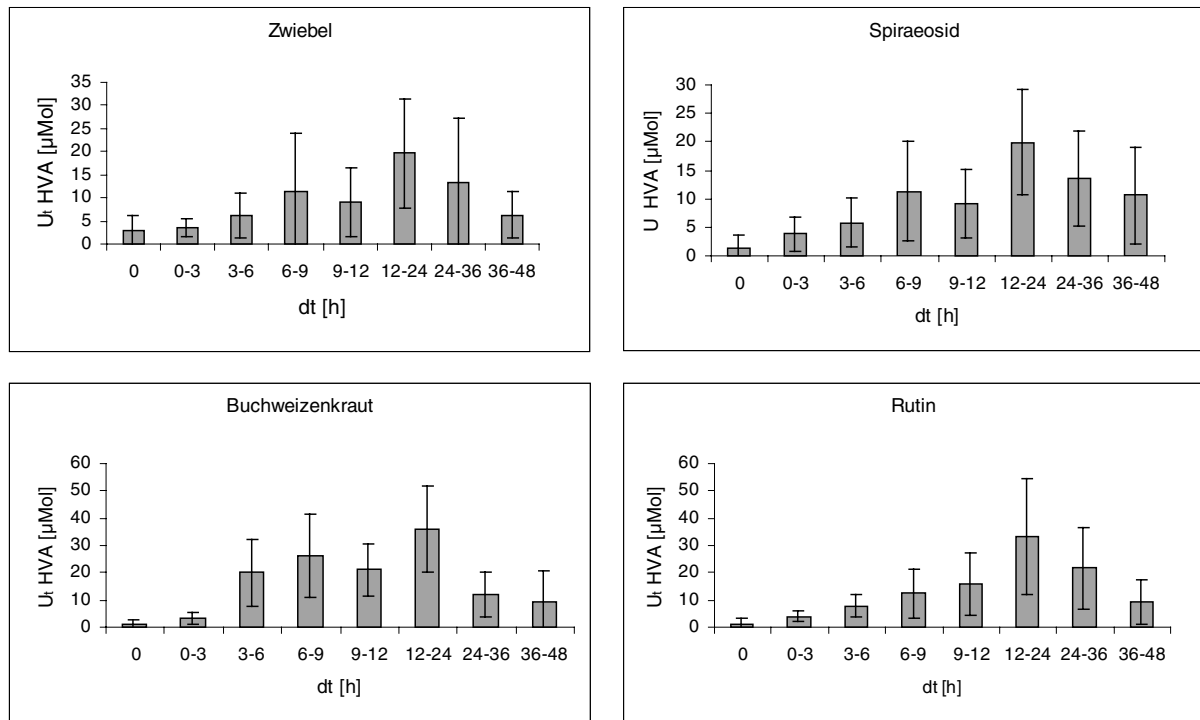
Proband	Zwiebel		Spiraeosid		Buchweizen		Rutin	
	Iso	Qu+Iso	Iso	Qu+Iso	Iso	Qu+Iso	Iso	Qu+Iso
1	0,96	4,03	0,71	3,52	0,01	0,16	0,03	0,21
2	1,81	6,16	2,40	8,67	0,09	0,47	0,49	1,98
3	1,49	5,31	0,68	2,93	0,37	1,60	0,34	1,55
4	1,78	6,08	1,37	4,32	0,01	0,11	0,00	0,01
5	1,94	6,42	1,16	4,44	0,21	1,09	0,51	1,86
6	1,42	6,25	1,44	6,78	0,26	1,34	0,00	0,13
7	3,47	9,89	0,82	3,04	0,19	0,80	0,02	0,11
8	3,30	8,89	1,18	4,40	0,78	3,03	0,62	2,29
9	1,04	4,06	1,09	5,02	0,07	0,43	0,07	0,36
10	4,91	9,82	0,75	3,73	0,10	0,90	0,15	1,11
11	0,38	1,35	0,70	3,26	0,22	1,07	0,04	0,32
12	1,22	7,93	1,27	3,45	0,10	0,51	0,07	0,38
MW	1,98	6,35	1,13	4,46	0,20	0,96	0,19	0,86
SD	1,29	2,53	0,49	1,70	0,21	0,80	0,23	0,85
Min	0,38	1,35	0,68	2,93	0,01	0,11	0,00	0,01
Median	1,63	6,21	1,13	4,03	0,15	0,85	0,07	0,37
Max	4,91	9,89	2,40	8,67	0,78	3,03	0,62	2,29



**Abb. 3.26** Renale Elimination von Quercetin und Isorhamnetin (bestimmt nach Hydrolyse der Konjugate) in Prozent der applizierten Quercetinmenge in dem jeweiligen Prüfpräparat Zwiebeln (Z), Spiraeosid (S), Buchweizenkrauttee (B) und Rutin (R). Daten sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Von den beschriebenen intestinalen Metaboliten des Quercetins (siehe Absatz 1.2) zeigte nur **Homovanillinsäure** bei allen Probanden einen deutlichen Verlauf nach Applikation der vier Prüfpräparate. In Abb. 3.27 sind die eliminierten Mengen an Homovanillinsäure pro Urinsammelintervall dargestellt. Aus den Abbildungen wird ersichtlich, dass nach Gabe aller vier Prüfpräparate am meisten HVA im Intervall 12 bis 24 Stunden ausgeschieden wurde.

Zumindest nach Applikation von Zwiebeln und Spiraeosid scheint auch nach 6 bis 9 Stunden vermehrt HVA eliminiert worden zu sein. Die Elimination von HVA nach Applikation von Zwiebel und Spiraeosid verlief darüber hinaus sehr ähnlich.



**Abb. 3.27** Renale Elimination von Homovanillinsäure [µMol] pro Urinsammelintervall dt [h] nach Applikation der vier Prüfpräparate. Daten sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Entsprechend der doppelten Quercetinosis im Falle von Buchweizenkraut und Rutin sind die renal eliminierten Mengen an HVA insgesamt deutlich höher im Vergleich zu Zwiebel und Spiraeosid (siehe auch Tab. 8.15). Der Verlauf der renalen Elimination von HVA lässt eindeutig den Schluss zu, dass es sich bei HVA um einen renalen Metaboliten von Quercetin handelt. Auch wenn, wie der Basiswert zu erkennen lässt, HVA endogen bereits im Urin vorhanden ist, so zeigt ein Vergleich des 12-24 h-Intervalls mit demselben Intervall 24 h später doch deutlich, dass es sich bei der beobachteten vermehrten Elimination von HVA nicht um endogene Prozesse gehandelt hat. Eine Quantifizierung von HVA bezogen auf Prozent der applizierten Dosis ist aber insofern schwierig, da zwischen endogenem und intestinal aus Quercetin hervorgegangenem HVA im Tagesverlauf nicht unterschieden werden kann. Da nicht grundsätzlich davon ausgegangen werden kann, dass der endogene 0-Wert im Verlauf des Tages konstant bleibt, ist eine Berechnung zu fehlerbehaftet. Eine Quantifizierung ist daher, wie bereits in Absatz 1.2 beschrieben, eindeutig nur mit markierten Ausgangssubstanzen durchführbar. Betrachtete man den Basiswert für eine grobe Abschätzung als konstant und zieht ihn von der pro Zeitintervall eliminierten HVA-Menge ab, so ergäben sich maximale Werte von etwa 15 % der Dosis im Falle von Zwiebeln und Rutin bis etwa 19 % der Dosis im Falle von Spiraeosid und Buchweizenkraut.



### **3.4 Pharmakokinetische Auswertung der Quercetinkonzentrationen im Plasma nach Hydrolyse der Quercetinkonjugate**

Basierend auf der Annahme, dass

- Quercetin im systemischen Kreislauf nur in Form von Konjugaten zirkuliert,
  - ein Quercetinglucuronid den Hauptmetaboliten darstellt,
  - die Konjugate untereinander denselben Konzentrations-Zeit-Verlauf zeigen,
- wurde der Gesamt-Quercetingehalt im Plasma zur pharmakokinetischen Auswertung benutzt.

In der Regel konnten Quercetin Plasmakonzentrationen bei allen Probanden über einen Zeitraum von 24h bestimmt werden. Während dieser Zeit befanden sich die Probanden unter Aufsicht, so dass das Einhalten der strikten Diät gesichert werden konnte. Die 48h Werte wurden generell von der pharmakokinetischen Analyse ausgeschlossen, da sie häufig unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen oder im Vergleich zum 24h Wert teilweise wieder leicht anstiegen. Dies wurde auf das Essverhalten der Probanden zurückgeführt, das in der Zeit von 24h bis 48h nur durch ein von den Probanden geführtes Ernährungsprotokoll kontrolliert werden konnte. Im Falle von Buchweizenkrauttee und Rutin konnte die terminale Eliminationskonstante „ $k_e$ “ nicht in allen Fällen aus dem Graphen ermittelt werden. Dies beruhte auf einer verzögert einsetzenden Absorptionsphase, woraus zu wenige Datenpunkte zur Ermittlung von „ $k_e$ “ resultierten. Da sich die terminale Eliminationskonstante zwischen den 4 verabreichten Formulierungen nicht signifikant voneinander unterschied, wurde in diesen Fällen der Mittelwert der drei anderen Formulierungen herangezogen.

Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Analysen sind zur Publikation angenommen (Graefe et al. 2000).

#### **3.4.1 Pharmakokinetik in Nichtkompartiment-Modellen**

Die pharmakokinetischen Parameter der Nichtkompartiment-Analyse sind für die Applikation von Zwiebeln und Spiraeosid in Tab. 3.14 zusammengefasst, für Buchweizenkrauttee sowie Rutin in Tab. 3.15. Die individuellen Plasmakonzentrations-Zeit-Profile sind im Anhang in den Abb. 8.1 bis Abb. 8.8, die Daten dazu sind in Tab. 8.16 bis Tab. 8.19 dargestellt.

**Tab. 3.14** Pharmakokinetische Parameter der Nichtkompartiment-Analyse nach Applikation von Zwiebeln (Z) und Spiraeosid (S). Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten (MW), Standardabweichungen (SD), Median und Range (Min bzw. Max) der 12 Probanden.

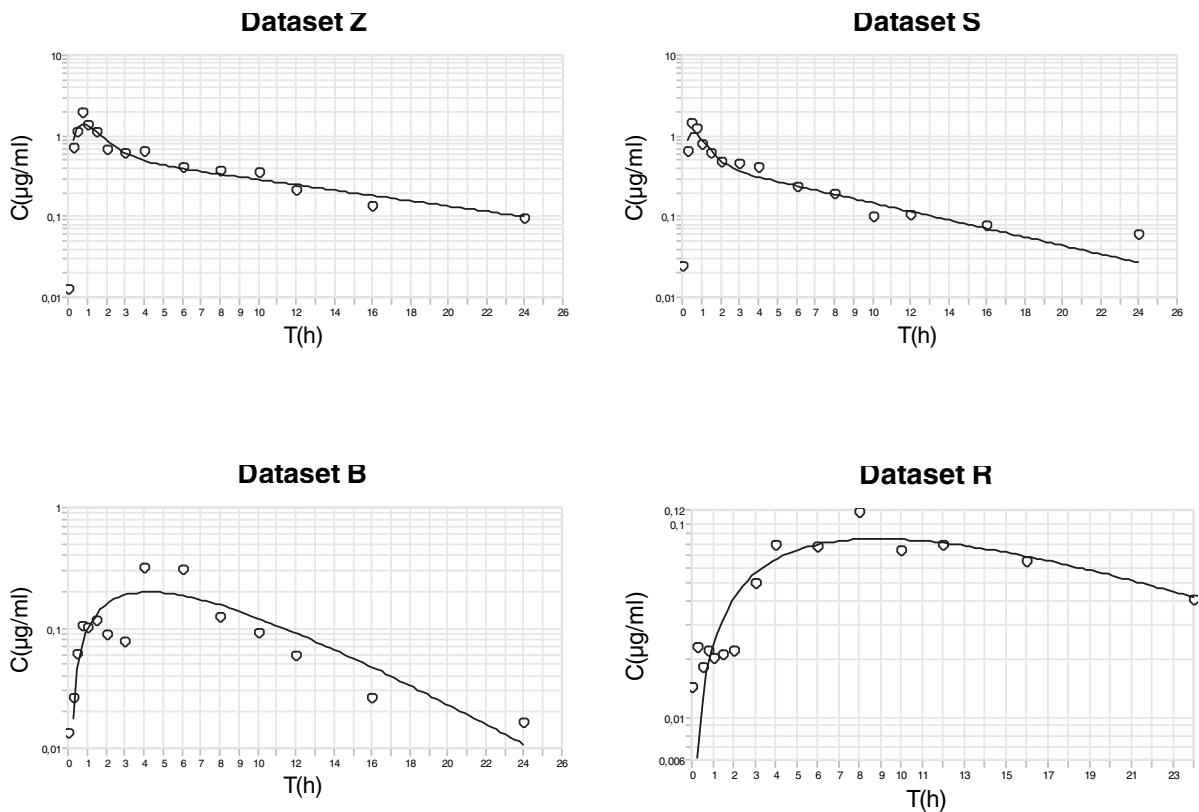
	Z MW	Z SD	Z Min	Z Median	Z Max	S MW	S SD	S Min	S Median	S Max
$C_{max}$	2,31	1,46	1,01	1,87	5,67	2,12	1,63	0,70	1,48	6,60
$T_{max}$	0,68	0,22	0,30	0,74	1,00	0,70	0,31	0,48	0,52	1,48
ke	0,073	0,030	0,03	0,070	0,14	0,06	0,02	0,04	0,064	0,09
$T_{1/2}$	10,9	4,1	5,0	10,0	20,3	11,9	4,0	7,4	10,8	19,4
$AUC_{cum}$	9,7	6,9	2,7	6,6	27,0	8,4	9,1	2,6	4,8	34,9
$AUC_{last}$	2,44	3,27	0,09	1,42	11,30	2,2	3,9	0,2	1,0	14,1
$AUC_{tot}$	12,1	10,0	2,9	8,6	38,3	10,6	12,9	2,8	5,6	49,0
% $AUC_{last}$	15,2	10,2	1,9	13,8	30,1	15,7	9,9	4,7	13,3	37,9
$AUMC_{cum}$	66,2	54,9	12,7	50,5	209,0	56,9	78,2	13,2	26,8	289,5
$AUMC_{last}$	106,9	151,5	3,6	56,0	497,3	99,1	177,4	6,5	42,6	637,2
$AUMC_{rot}$	173,2	202,1	19,9	117,0	706,2	156,0	252,7	20,2	71,3	926,7
$MRT_{abs}$	11,8	5,1	4,2	11,0	20,7	11,9	5,4	6,3	11,7	24,6
solver $t_{max}$	0,68	0,22	0,30	0,74	1,00	0,70	0,31	0,48	0,52	1,48
ka	8,2	4,7	3,3	6,5	20,1	8,1	3,4	2,5	9,6	12,1
MAT	0,15	0,07	0,05	0,15	0,30	0,16	0,10	0,08	0,10	0,40
$MRT_{iv}$	11,6	5,2	4,1	10,9	20,6	11,8	5,4	6,1	11,5	24,5
Dose	100					100				
$Cl_{tot}/f$	13,3	8,9	2,6	11,6	34,6	17,4	9,8	2,0	17,8	35,9
$Vd_{ss}/f$	127,5	66,3	48,1	107,1	241,1	181,3	119,1	38,1	163,8	498,9
$Vd_{area}/f$	189,1	120,7	53,9	145,1	431,6	272,5	143,8	42,5	272,6	570,3

**Tab. 3.15** Pharmakokinetische Parameter der Nichtkompartiment-Analyse nach Applikation von Buchweizenkrauttee (B) und Rutin (R). Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten (MW), Standardabweichungen (SD), Median und Range (Min bzw. Max) der 12 Probanden.

	B MW	B SD	B Min	B Median	B Max	R MW	R SD	R Min	R Median	R Max
$C_{\max}$	0,64	0,67	0,06	0,41	2,24	0,32	0,34	0,02	0,18	1,04
$T_{\max}$	4,32	1,83	1,52	3,98	8,00	6,98	2,94	3,00	7,02	12,10
ke	0,08	0,03	0,04	0,075	0,17	0,06	0,01	0,04	0,064	0,08
$T_{1/2}$	10,3	3,5	4,0	9,3	16,5	11,8	3,1	8,4	10,8	18,5
$AUC_{\text{cum}}$	3,8	3,9	0,4	2,4	11,0	2,5	2,2	0,2	1,9	7,3
$AUC_{\text{last}}$	1,4	2,5	0,1	0,3	8,0	1,0	1,1	0,1	0,7	4,3
$AUC_{\text{tot}}$	5,2	6,2	0,5	2,5	19,0	3,4	3,1	0,4	2,9	9,9
% $AUC_{\text{last}}$	18,5	11,4	1,9	15,6	41,9	28,4	12,3	12,7	23,5	46,6
$AUMC_{\text{cum}}$	33,9	42,3	3,7	16,4	133,6	27,0	27,3	2,3	20,4	85,5
$AUMC_{\text{last}}$	58,3	110,7	1,6	11,8	350,3	40,0	47,7	2,4	27,0	178,3
$AUMC_{\text{tot}}$	92,2	151,8	6,0	22,9	483,9	67,0	70,7	6,5	52,1	256,3
$MRT_{\text{abs}}$	14,0	5,4	6,9	12,6	25,5	19,5	5,4	11,3	17,0	27,3
Lag time	1,0	1,5	0,0	0,0	4,0	3,1	1,6	1,5	2,6	6,1
solver $t_{\max}$	3,4	1,0	1,5	3,1	5,0	3,9	2,7	0,9	2,6	8,5
ka	0,97	0,69	0,34	0,81	2,81	1,61	1,73	0,18	1,17	5,47
MAT	1,41	0,72	0,36	1,24	2,91	1,83	1,87	0,18	0,90	5,62
$MRT_{\text{iv}}$	11,6	5,4	4,0	10,3	20,6	14,7	5,9	8,6	13,3	25,1
Dose	200					200				
$Cl_{\text{tot}}/f$	130,5	134,2	10,5	79,4	430,4	158,6	184,2	20,3	68,6	553,0
$Vd_{\text{ss}}/f$	1653	1887	190	614	5000	2904,8	3745,1	238,1	1406,5	13258,2
$Vd_{\text{area}}/f$	1951	2065	214	830	5641	2789,7	3691,5	305,1	1278,7	12861,2

### 3.4.2 Pharmakokinetik in Kompartiment-Modellen

Die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven von Quercetin nach Applikation von Zwiebeln und Spiraeosid wurden an ein Zweikompartiment-Modell angepasst. Aufgrund der verzögerten Resorption von Quercetin(konjugaten) nach Aufnahme von Buchweizenkraut und Rutin wurde eine Resorptionsverzögerungszeit (lag time) eingeführt. Die Quercetinkonzentrationen nach Aufnahme von Buchweizenkraut und Rutin ließen sich nicht immer mit Zweikompartiment-Modellen beschreiben, vor allem in Fällen von sehr geringer Resorption. Die individuellen fits sind im Anhang in den Abb. 8.9 bis Abb. 8.12 dargestellt, die Ergebnisse dazu sind in Tab. 8.21 bis Tab. 8.24 zusammengefasst. Darüber hinaus wurden die medianen Plasmakonzentrationen innerhalb einer Applikationsgruppe an ein Kompartiment-Modell angepasst. Da nicht zu jedem Blutentnahmezeitpunkt Daten aller Probanden für alle Applikationen vorlagen, wurden für das fitting nicht die gemittelten, sondern die medianen Plasmakonzentrationen einer Applikation verwendet.



**Abb. 3.28** Graphische Darstellung des fittings der medianen Quercetin Plasmakonzentrationen nach Applikation von Zwiebeln (Z), Spiraeosid (S), Buchweizenkraut (B) und Rutin (R).

**Tab. 3.16** Pharmakokinetische Parameter der Kompartiment-Analyse nach Anpassung der Mediane an ein Zwei- bzw. Einkompartimentmodell.

Study	Unit	Z	S	B	R
Conc. Unit		$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
dose	mg	100	100	200	200
Ka	[1/h]	1,53	2,17	0,26	0,12
Tlag	[h]			0,10	0,00
Vc	[L]	29,8	37,0	403,8	915,3
Ke	[1/h]	0,352	0,552	0,217	0,107
k <sub>12</sub>	[1/h]	0,919	1,283		
k <sub>21</sub>	[1/h]	0,329	0,483		
AUC	[h· $\mu\text{g/mL}$ ]	9,54	4,90	2,28	2,04
AUMC	[h <sup>2</sup> · $\mu\text{g/mL}$ ]	109,0	34,7	19,3	36,4
MRT	[h]	10,78	6,63	4,50	9,36
Lz	[1/h]	0,076	0,121	0,217	0,107
C <sub>max</sub> calc	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	1,40	1,12	0,20	0,08
t <sub>max</sub> calc	[h]	0,78	0,54	4,31	8,88
A	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	2,77	2,23	0,50	0,22
Alpha	[1/h]	1,524	2,197	0,217	0,107
B	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	0,59	0,47		
Beta	[1/h]	0,076	0,121		
t <sub>1/2</sub> Ka	[h]	0,45	0,32	2,67	5,84
tabs	[h]	2,26	1,59	13,37	29,22
t <sub>1/2</sub> alpha	[h]	0,45	0,32	3,19	6,48
t <sub>1/2</sub> beta	[h]	9,12	5,71		
t <sub>1/2</sub> Lz	[h]	9,12	5,71	3,19	6,48
t <sub>1/2</sub> Ke	[h]	1,97	1,26	3,19	6,48
Vz	[L]	138,	168	404	915
Cl	[L/h]	10,5	20,4	87,8	97,8

### 3.5 Pharmakokinetische Auswertung der Quercetinkonzentrationen im Urin nach Hydrolyse der Quercetinkonjugate

Die Auswertung der Urinproben hat - wie unter Absatz 3.3.7 gezeigt - ergeben, dass der gesamte Urin so lange gesammelt wurde, bis kein Quercetin mehr im Urin nachgewiesen werden konnte. Dies ermöglicht die Berechnung verschiedener pharmakokinetischer Parameter aus den Urindaten. Da  $U_{\infty}$  bekannt ist, erhält man aus der Beziehung  $U_t = U_{\infty} \cdot (1 - e^{-k_e \cdot t})$  durch Umformen die folgende Gleichung (Derendorf und Garrett 1987):

$$\log(U_{\infty} - U_t) = \log U_{\infty} - \frac{k_e}{2,303} t$$

Die graphische Darstellung dieser Beziehung wird als „Sigma-Minus-Plot“ bezeichnet und ist in Abb. 8.13 bis Abb. 8.16 für die renale Elimination von Quercetin dargestellt. Der biphasische Verlauf der Plasmakonzentrationen spiegelt sich auch in der renalen Elimination wider. Die **terminale Halbwertszeit** wird daher analog zu den Plasmakonzentrations-Zeit-Plots aus der Steigung der Geraden während der terminalen Eliminationsphase ermittelt. Wie aus den Plots ersichtlich, lässt sich diese Phase aufgrund der zeitlich verzögert einsetzenden renalen Elimination nur dann ermitteln, wenn die Elimination über mindestens 24h verfolgt werden konnte. Konnte bereits nach 12 h oder weniger kein Quercetin mehr nachgewiesen werden (z.B. weil aufgrund großer Urinvolumina der Verdünnungseffekt zu groß war), so entspricht die ermittelte Halbwertszeit nicht der terminalen Halbwertszeit und wurde daher nicht in die statistischen Berechnungen mit einbezogen (Tab. 3.17).

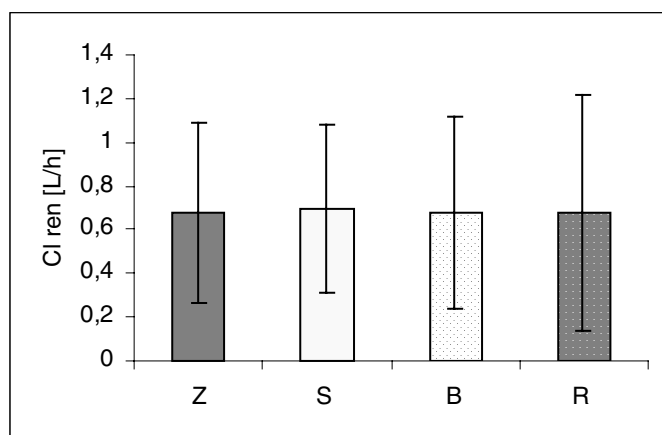
**Tab. 3.17** Bestimmung der Halbwertszeit von Quercetin aus den dazugehörigen Sigma-Minus-Plots. Bei den mit \* gekennzeichneten Daten handelt es sich nicht um die terminale Halbwertszeit, da aufgrund der geringen Konzentrationen nicht genügend Datenpunkte in der terminalen Eliminationsphase erhalten werden konnten. Diese Daten wurden daher nicht in die statistischen Berechnungen einbezogen.

Proband	$t_{1/2}$ [h]	Proband	$t_{1/2}$ [h]	Proband	$t_{1/2}$ [h]	Proband	$t_{1/2}$ [h]
01Z	9,79	01S*	1,61	01B	4,45	01R*	2,76
02Z	9,99	02S	9,12	02B*	2,02	02R	9,59
03Z	9,12	03S	7,09	03B	4,00	03R	5,59
04Z	6,61	04S	7,85	04B*	2,32	04R*	3,26
05Z	5,51	05S	9,82	05B	5,87	05R	3,25
06Z	10,44	06S	6,92	06B	7,41	06R	4,64
07Z	8,56	07S	9,24	07B	4,53	07R	4,59
08Z	7,37	08S*	3,18	08B	4,56	08R	5,17
09Z	5,37	09S*	2,28	09B	7,88	09R	3,57
10Z*	2,18	10S*	2,77	10B*	2,64	10R*	1,44
11Z	9,76	11S	8,45	11B*	5,34	11R*	1,80
12Z	8,36	12S	11,09	12B*	1,23	12R	11,38
Z MW	7,00	S MW	8,70	B MW	5,53	R MW	5,97
Z SD	2,46	S SD	1,41	B SD	1,56	R SD	2,93
Z Min	2,18	S Min	6,92	B Min	4,00	R Min	3,25
Z Median	8,46	S Median	8,79	B Median	4,56	R Median	4,91
Z Max	10,44	S Max	11,09	B Max	7,88	R Max	11,38

Zur Bestimmung der **renalen Clearance** wurde die kumulative Quercetinmenge im Urin ( $U_i$  cum) gegen die kumulative Fläche unter der Plasmaspiegelkurve bis zu demselben Zeitpunkt ( $AUC_i$  cum) aufgetragen. Die renale Clearance entspricht der Steigung der Geraden. Die individuellen Plots finden sich im Anhang in den Abb. 8.17 bis Abb. 8.20. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.18 sowie in Abb. 3.29 zusammengefasst. Da es sich bei den renal eliminierten Substanzen unabhängig von der Art des applizierten Glykosids um Quercetinglucuronide handelt, ist die renale Clearance für alle 4 Prüfpräparate erwartungsgemäß sehr ähnlich.

**Tab. 3.18** Bestimmung der renalen Clearance aus den Clearance-Plots ( $U_t$  cum vs.  $AUC_t$  cum) (siehe Abb. 8.17 bis Abb. 8.20).

Proband	Cl ren [L/h]	Proband	Cl ren [L/h]	Proband	Cl ren [L/h]	Proband	Cl ren [L/h]
01Z	0,84	01S	1,29	01B	0,91	01R	1,01
02Z	0,15	02S	0,57	02B	1,11	02R	1,36
03Z	0,40	03S	0,54	03B	0,66	03R	0,62
04Z	0,76	04S	0,53	04B	0,34	04R	0,16
05Z	0,32	05S	0,33	05B	0,24	05R	0,39
06Z	0,22	06S	0,19	06B	0,24	06R	0,16
07Z	0,68	07S	0,44	07B	0,37	07R	0,16
08Z	1,01	08S	1,14	08B	0,41	08R	0,52
09Z	1,20	09S	1,39	09B	1,70	09R	1,89
10Z	1,09	10S	0,83	10B	1,05	10R	0,99
11Z	0,19	11S	0,63	11B	0,67	11R	0,59
12Z	1,28	12S	0,51	12B	0,46	12R	0,28
Z MW	0,68	S MW	0,70	B MW	0,68	R MW	0,68
Z SD	0,41	S SD	0,38	B SD	0,44	R SD	0,54
Z Min	0,15	S Min	0,19	B Min	0,24	R Min	0,16
Z Median	0,72	S Median	0,55	B Median	0,56	R Median	0,56
Z Max	1,28	S Max	1,39	B Max	1,70	R Max	1,89

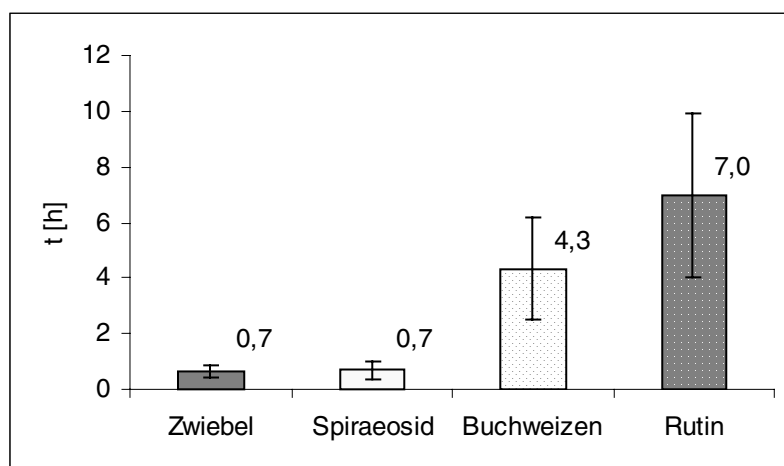
**Abb. 3.29** Renale Clearance [ $L \cdot h^{-1}$ ] von Quercetinkonjugaten (bestimmt als Quercetin nach Hydrolyse) nach Applikation von Zwiebeln (Z), Spiraeosid (S), Buchweizenkrauttee (B) und Rutin (R). Daten sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.



### 3.6 Biostatistische Betrachtung der Ergebnisse

#### 3.6.1 Vergleich von $t_{\max}$

Wie aus Abb. 3.30 ersichtlich wird, unterscheiden sich die mittleren  $t_{\max}$ -Werte nach Applikation von Zwiebeln und Spiraeosid nicht voneinander. Sie unterscheiden sich jedoch deutlich von den beiden anderen Applikationen. Die statistische Auswertung ergab, dass auch die nach Applikation von Buchweizenkrauttee und Rutin erhaltenen mittleren  $t_{\max}$ -Werte signifikant voneinander verschieden waren (Tab. 8.29).

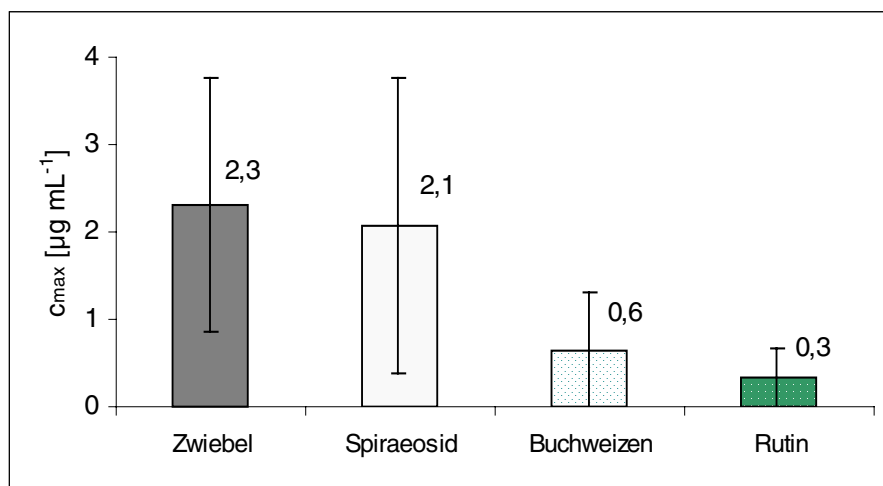


**Abb. 3.30** Vergleich von  $t_{\max}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen.

Für die Betrachtung von  $t_{\max}$  ergab sich ein signifikanter Unterschied in der ANOVA (Tab. 8.26). In Tab. 8.27 sind die Ergebnisse des Tukey-Tests dargestellt. Bis auf Zwiebel im Vergleich zu Spiraeosid unterschieden sich alle Prüfpräparate signifikant voneinander.

#### 3.6.2 Vergleich von $c_{\max}$

In Abb. 3.31 ist für  $c_{\max}$  mit Zwiebeln>Spiraeosid>>Buchweizen>Rutin ein Trend zu erkennen. Aufgrund der großen interindividuellen Schwankungen ist der Unterschied zwischen Zwiebel und Spiraeosid sowie zwischen Buchweizenkraut und Rutin allerdings nicht statistisch signifikant.

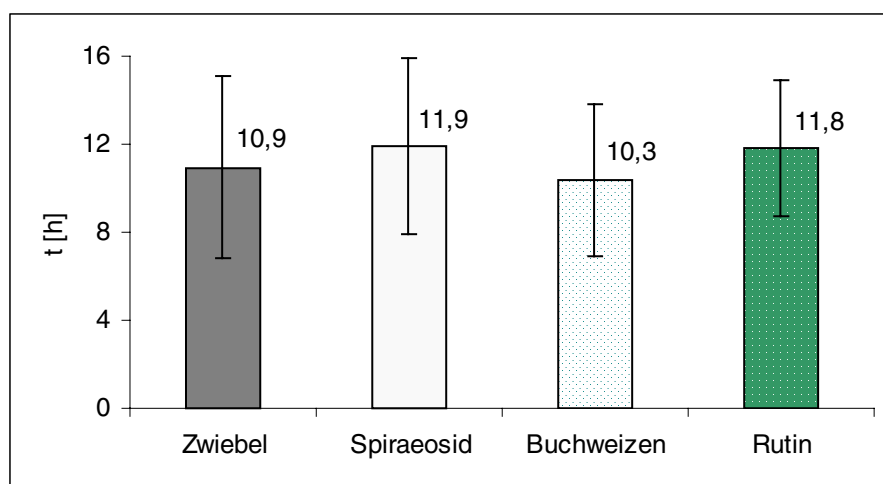


**Abb. 3.31** Vergleich von  $c_{\max}$  ( $MW \pm SD$ ).

Die maximalen Plasmakonzentrationen nach Applikationen von Zwiebeln waren sowohl im Vergleich zu  $c_{\max}$  nach Applikation von Buchweizenkraut wie auch Rutin signifikant höher. Gleiches gilt auch für Spiraeosid (s. Tab. 8.28 und Tab. 8.29).

### 3.6.3 Vergleich von $t_{1/2}$

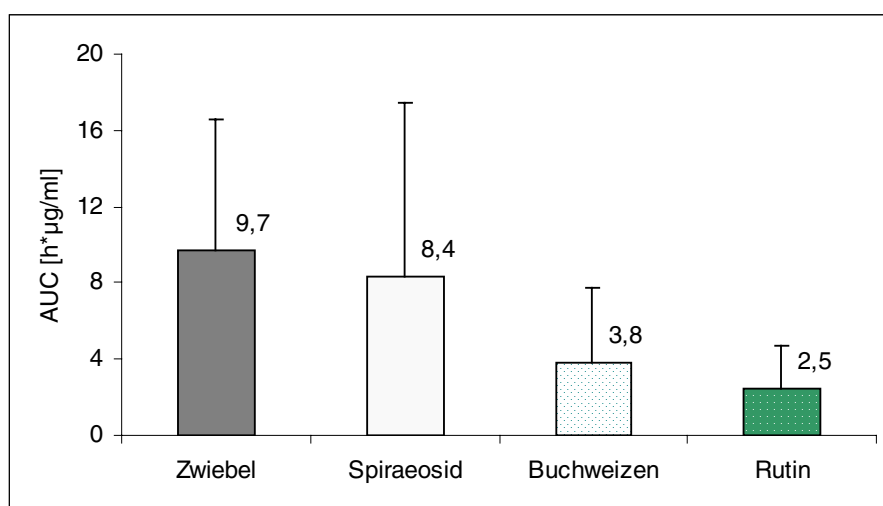
Unabhängig von der Art des applizierten Quercetinglycosids ergab sich bei allen vier Applikationen eine annähernd gleiche Eliminationshalbwertszeit der gebildeten Quercetinglucuronide im Plasma (Abb. 3.32 und Tab. 8.30).



**Abb. 3.32** Vergleich der terminalen Halbwertszeit der Quercetin-Plasmakonzentrationen ( $MW \pm SD$ ).

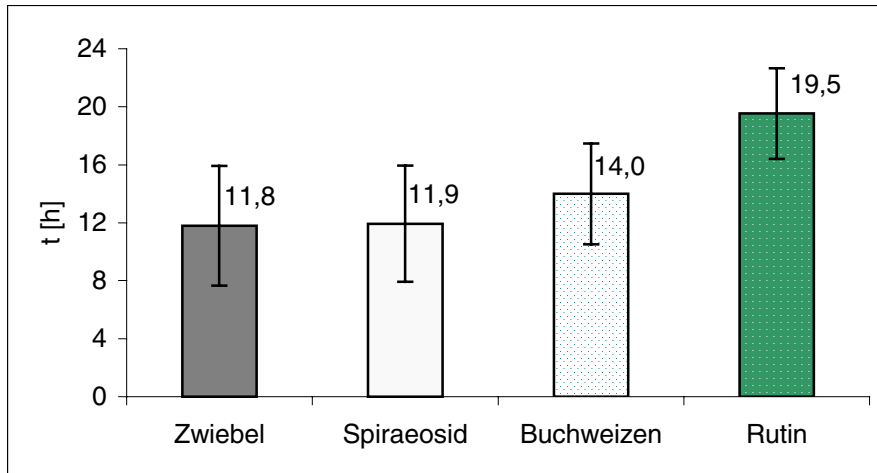
### 3.6.4 Vergleich von $AUC_{0-t}$

Zur Bestimmung der gesamten  $AUC_{inf}$  musste der terminale Abschnitt vom letzten gemessenen Datenpunkt  $t_{last}$  bis  $t_{inf}$  extrapoliert werden. Da dieser extrapolierte Abschnitt vor allem im Falle von Buchweizen und Rutin prozentual einen erheblichen Anteil an der Gesamt-AUC ausmachte (siehe Tab. 8.16 bis Tab. 8.19), wird zum Vergleich die  $AUC_{0-t}$  herangezogen, da diese den tatsächlich erhaltenen Werten entspricht. In Abb. 3.33 ist ähnlich wie bei  $c_{max}$  ein Trend zu erkennen mit Zwiebeln>Spiraeosid>>Buchweizen>Rutin. Aufgrund der großen interindividuellen Schwankungen ist der Unterschied zwischen Zwiebel und Spiraeosid sowie zwischen Buchweizenkraut und Rutin allerdings nicht statistisch signifikant. Berücksichtigt man allerdings, dass bei Applikation von Buchweizenkraut und Rutin die doppelte Quercetinosis im Vergleich zu Zwiebel und Spiraeosid gegeben wurde, so ist der beobachtete Unterschied doch als deutlich zu bewerten.



**Abb. 3.33** Vergleich von  $AUC_{0-t}$  (MW+SD). Hierbei muss die doppelte Quercetinosis bei Applikation von Buchweizenkraut und Rutin berücksichtigt werden.

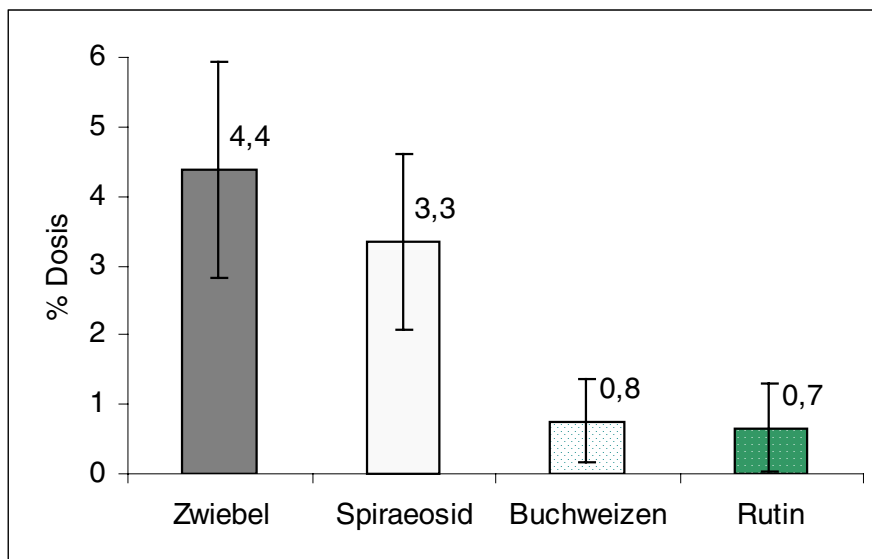
### 3.6.5 Vergleich von MRT



**Abb. 3.34** Vergleich der mittleren Verweildauer (MRT), angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Ein signifikanter Unterschied ergab sich nur zwischen Rutin gegenüber den drei anderen Applikationen (Tab. 8.33 und Tab. 8.34).

### 3.6.6 Vergleich der renal eliminierten Quercetinmenge in % der applizierten Dosis



**Abb. 3.35** Vergleich der prozentualen renalen Elimination von Quercetin [% der applizierten Dosis], angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD.

Wie aus Tab. 8.35 und Tab. 8.36 ersichtlich wird, ergab sich ein signifikanter Unterschied nur jeweils zwischen den verschiedenen Glykosiden. Aufgrund der großen interindividuellen Variabilität ist der Unterschied der renal eliminierten Quercetinmenge nach Applikation von Zwiebeln bzw. Spiraeosid nicht statistisch signifikant.

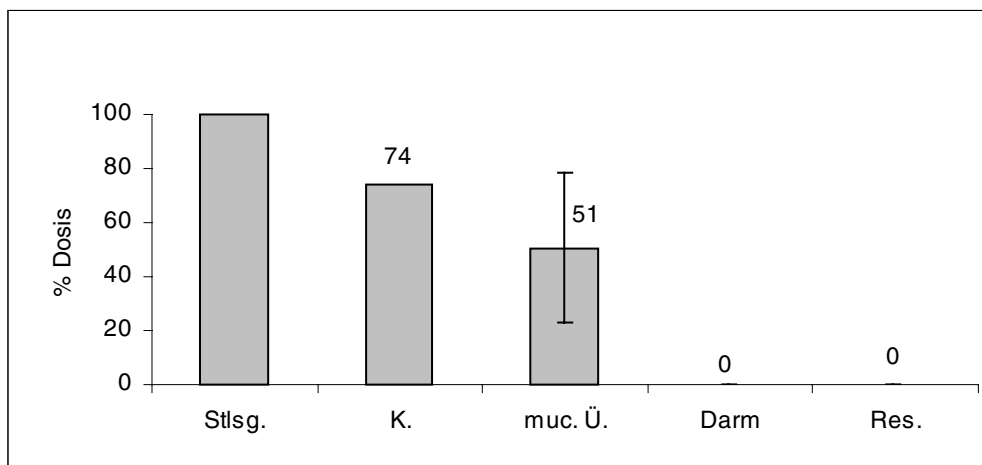
### 3.7 Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen am Schweinedarmmodell

#### 3.7.1 Resorption und Metabolismus von Quercetin und Quercetinglykosiden

Analysiert wurden jeweils die Substanzmengen in der Stammlösung, die zu Versuchsbeginn in das Donorkompartiment der Franz-Zellen eingefüllt wurde. In einem parallelen Kontrollansatz wurde die Stabilität der Substanzen unter Versuchsbedingungen, d.h. 45 min bei 37°C und Begasen mit Carbogengas (95 O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) aber ohne Kontakt zu Darmgewebe, ermittelt. Nach Versuchsende wurden die im mucosalen Überstand verbleibenden Substanzmengen, die ins Darmgewebe aufgenommenen sowie die ins Resorbat abgegebenen Substanzmengen bestimmt und auf die Ausgangsmenge zu Versuchsbeginn bezogen.

##### Quercetin

Quercetin wurde in Krebscarbonatpuffer unter Zusatz von  $\beta$ -Hydroxypropylcyclodextrin 2 % (*m/m*) in Lösung gebracht. Die Konzentration der Untersuchungslösung entsprach 42,6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (140,9  $\mu\text{M}$ ). Erwartungsgemäß erfolgte im Falle von Quercetin aufgrund der hohen Oxidationsempfindlichkeit bereits in der Kontrolllösung (37°C und begasen mit Carbogengas) ein chemischer Abbau (Tab. 3.19). Dieser war im Durchschnitt im mucosalen Überstand in den Versuchszellen mit einem ca. 50 %igem Substanzverlust noch deutlich höher als in der Kontrolllösung, zeigte aber auch eine hohe Variabilität innerhalb der Versuchsreihe (siehe minimale und maximale Werte in Tab. 3.19). Weder im Darm noch im Resorbat konnte Quercetin nachgewiesen werden (Abb. 3.36).



**Abb. 3.36** Wiederfindung von Quercetin in % der applizierten Quercetinmenge im Vergleich zur Stammlösung (Stlsg.). Angegeben sind die Quercetinmengen in der Kontrolllösung (K.), dem mucosalen Überstand der Versuchszellen (muc. Ü.), dem Darm und dem Resorbat (Res.). n=5.

**Tab. 3.19** Wiederfindung von Quercetin in % der applizierten Quercetinmenge. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung, sowie in Klammern darunter der minimale Wert/Median/maximale Wert. n=5.

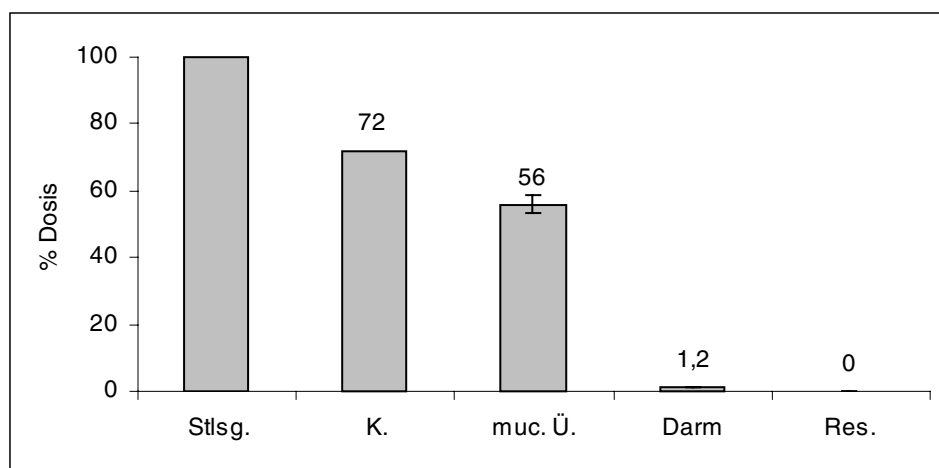
	Stammlsg. (140,9 $\mu\text{M}$ )	Kontrolle	mucosaler Überstand	Darm	Resorbat
Quercetin	100	74,3	50,6 $\pm$ 27,7 (17,8/64,1/78,5)	0	0

### Quercetin-3-O-rhamnosid

Die Quercetinglykoside waren ohne Zusatz von Cyclodextrin in Puffer löslich. Die Stammlösung von Quercetin-3-O-rhamnosid hatte eine Konzentration von 123,6  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (247,1  $\mu\text{M}$ ). Der Substanzverlust von etwa 30 % in der Kontrolllösung ist vergleichbar dem des freien Quercetins (Tab. 3.20). Der Abbau im mucosalen Überstand der Versuchszellen betrug ca. 45 % bei geringer Variabilität innerhalb der 5 Ansätze. 1,2 % konnten im Darm nachgewiesen werden, im Resorbat dagegen konnte kein Quercetin-3-rhamnosid detektiert werden. Freies Quercetin war nicht nachweisbar.

**Tab. 3.20** Wiederfindung von Quercetin-3-rhamnosid in % der applizierten Menge. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung, sowie in Klammern darunter der minimale Wert/Median/maximale Wert. n=5.

	Stammlsg. (247,1 $\mu\text{M}$ )	Kontrolle	mucosaler Überstand	Darm	Resorbat
Querc-3- rhamnosid	100	72,0	55,8 $\pm$ 2,7 (51,5/56,4/58,6)	1,2 $\pm$ 0,3 (0,8/1,2/1,4)	0



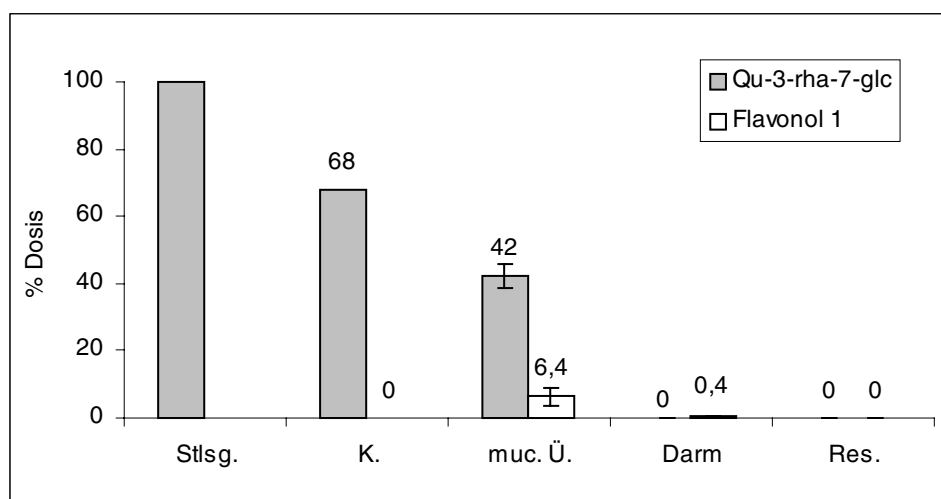
**Abb. 3.37** Wiederfindung von Quercetin-3-O-rhamnosid in % der applizierten Menge im Vergleich zur Stammlösung (Stlsg.). Angegeben sind die Quercetin-3-rhamnosidmengen in der Kontrolllösung (K.), dem mucosalen Überstand der Versuchszellen (muc. Ü.), dem Darm und dem Resorbat (Res.).n=5.

Quercetin-3-O-rhamnosid-7-O-glucosid

Bei Quercetin-3-O-rhamno-7-O-glucosid ( $123,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  bzw.  $140,9 \mu\text{M}$  gelöst in Krebs-carbonatpuffer) zeigte sich unter Versuchsbedingungen in der Kontrolllösung ein ähnlicher chemischer Abbau von etwa 30 % wie bei den zuvor untersuchten Substanzen (Tab. 3.21). Im mucosalen Überstand konnte eine bisher nicht näher identifizierte Substanz nachgewiesen werden, deren UV-Spektrum dem des Quercetin Aglykons entsprach (Maxima bei 254 und 369 nm) und die daher als Flavonol angesehen wurde. Diese Substanz eluierte bei 12,0 min später als alle untersuchten Quercetinglykoside, aber eher als das Aglykon (Tab. 2.19). Sie wird im folgenden als Flavonol 1 bezeichnet und wurde mit den Kalibrierdaten für Quercetin-3-glucosid berechnet. Durchschnittlich wurden 6,4 % der applizierten Quercetinmenge zu dieser Substanz im mucosalen Überstand umgesetzt. Quercetin-3-O-rhamnosid konnte nicht nachgewiesen werden. Flavonol 1 wurde - im Verhältnis zu Quercetin-3-O-rhamno-7-O-glucosid gesehen - bevorzugt in den Darm aufgenommen. Quercetin-3-O-rhamno-7-O-glucosid konnte nur in einem von fünf Ansätzen im Darm nachgewiesen werden (Tab. 3.21). Im Resorbat wurde keine der beiden Substanzen detektiert.

**Tab. 3.21** Wiederfindung und Metabolisierung von Quercetin-3-O-rhamno-7-O-glucosid in % der applizierten Menge. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung, sowie in Klammern darunter der minimale Wert/Median/maximale Wert. Quercetin-3-O-rhamno-7-O-glucosid konnte nur in einem Ansatz im Darm nachgewiesen werden, daher entfällt die Bildung eines Mittelwertes. n=5.

	Stammlsg. (140,9 $\mu\text{M}$ )	Kontrolle	mucosaler Überstand	Darm	Resorbat
Qu-3-rha- 7-glucosid	100	67,8	42,3 $\pm$ 3,6 (39,1/42,4/48,0)	- (0/0/0,17)	0
Flavonol 1	0	0	6,4 $\pm$ 2,6 (3,8/5,4/10,0)	0,43 $\pm$ 0,31 (0,31/0,38/1,07)	0



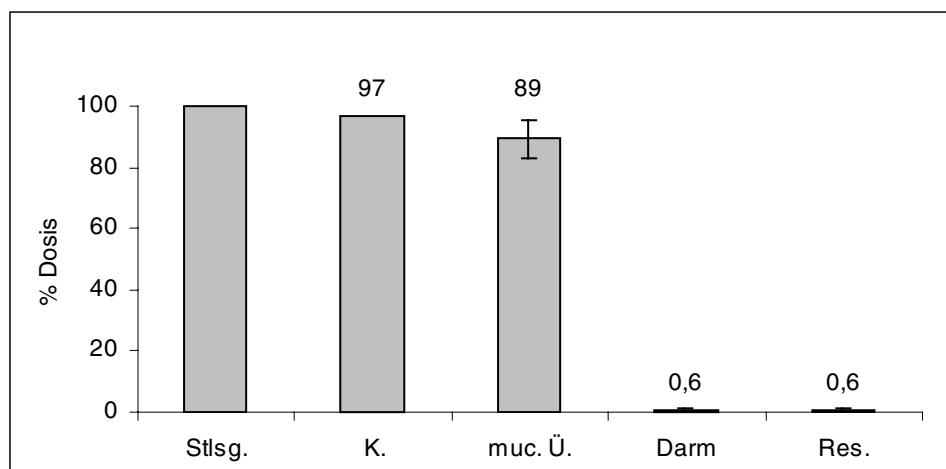
**Abb. 3.38** Wiederfindung und Metabolisierung von Quercetin-3-O-rhamno-7-O-glucosid in % der applizierten Menge im Vergleich zur Stammlösung (Stlsg.). Angegeben sind die jeweiligen Mengen in der Kontrolllösung (K.), dem mucosalen Überstand der Versuchszellen (muc. Ü.), dem Darm und dem Resorbat (Res.).n=5.

### Rutin

Quercetin-3-*O*-(6-*O*-rhamnosyl)-glucosid ( $35,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  bzw.  $58,6 \mu\text{M}$  gelöst in Krebs-carbonatpuffer) wurde auf Segmenten von Ileum ( $n=6$ ) und Jejunum ( $n=6$ ) getestet. Da mit den verschiedenen Darmsegmenten gleiche Resultate erzielt wurden, wurden die Ergebnisse zusammengefasst. Nur geringe Mengen Rutin (4-10 %) wurden unter Versuchsbedingungen, aber auch im mucosalen Überstand in den Zellen abgebaut (Tab. 3.22 und Abb. 3.39). Durchschnittlich etwa 0,6 % der Ausgangsmenge wurden sowohl im Darm als auch im Resorbat nachgewiesen, wobei in beiden Fällen die Variabilität innerhalb der 12 Ansätze relativ hoch war und nicht in allen Versuchsansätzen Rutin in Darm oder Resorbat detektiert werden konnte. Quercetin oder Quercetin-3-*O*-rhamnosid wurde nicht detektiert.

**Tab. 3.22** Wiederfindung von Rutin in % der applizierten Menge. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung, sowie in Klammern darunter der minimale Wert/Median/maximale Wert.  $n=12$ .

	Stammlsg. ( $58,6 \mu\text{M}$ )	Kontrolle	mucosaler Überstand	Darm	Resorbat
Rutin	100	96,8	$89,5 \pm 6,2$ (78,6/90,1/96,3)	$0,60 \pm 0,66$ (0/0,41/1,73)	$0,60 \pm 0,48$ (0/0,75/1,28)



**Abb. 3.39** Wiederfindung von Rutin in % der applizierten Menge im Vergleich zur Stammlösung (Stlsg.). Angegeben sind die jeweiligen Mengen in der Kontrolllösung (K.), dem mucosalen Überstand der Versuchszellen (muc. Ü.), dem Darm und dem Resorbat (Res.).  $n=12$ .

### Buchweizenkrautpulver

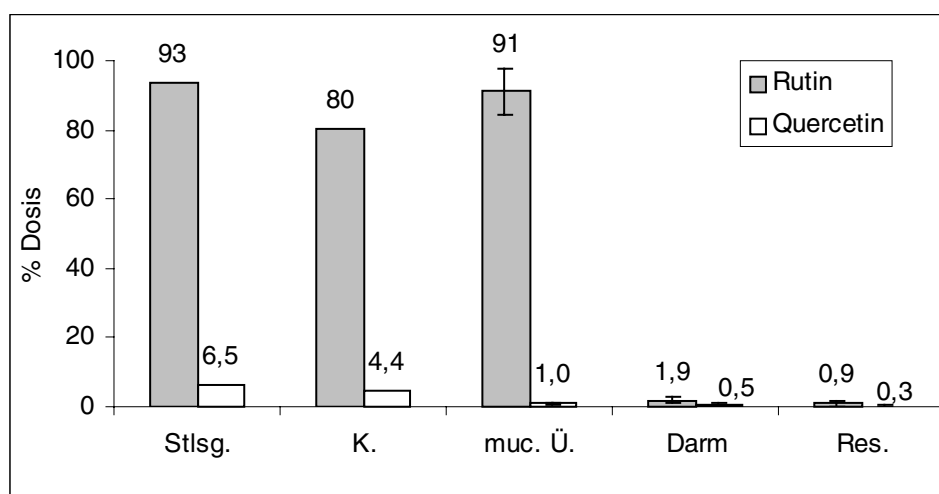
Das verwendete Buchweizenkrautpulver wies einen Rutingehalt von 5,6 % auf (siehe Absatz 2.7.3). Die Rutinkonzentration im eingesetzten Extrakt betrug  $32,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  ( $48,2 \mu\text{M}$ ) (Tab. 3.23). Im Extrakt war bereits freies Quercetin enthalten. Die eingesetzte Menge an Quercetinäquivalenten in der Stammlösung ergab sich daher aus der Summe von Rutin und Quercetin. Wie auch bei der Reinsubstanz erwies sich Rutin unter Versuchsbedingungen als relativ stabil. Im Darm und auch im Resorbat wurde aber bei der Untersuchung des



Pflanzenextraktes mehr Rutin nachgewiesen als bei der Untersuchung der Reinsubstanz (Abb. 3.40). Quercetin wurde ebenfalls sowohl im Darm als auch im Resorbat detektiert. Da Quercetin bereits in der Stammlösung vorhanden war, lässt sich nicht feststellen, ob das bereits frei vorliegende Quercetin oder das durch Spaltung von Rutin entstandene Quercetin in den Darm aufgenommen wurde.

**Tab. 3.23** Wiederfindung von Rutin und Quercetin in % der applizierten Gesamtmenge Quercetinäquivalente. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung, sowie in Klammern darunter der minimale Wert/Median/maximale Wert. n=5.

	Stammlsg.	Kontrolle	mucosaler Überstand	Darm	Resorbat
Rutin (48,2 µM)	93,5	80,5	91,1±6,8 (82,6/91,0/100,7)	1,9±0,8 (1,0/2,3/2,7)	0,9±0,7 (0,4/0,5/2,0)
Quercetin (3,4 µM)	6,5	4,4	1,0±0,2 (0,8/0,9/1,3)	0,5±0,4 (0,1/0,4/1,0)	0,3±0,2 (0/0,2/0,5)
Gesamt (51,6 µM)	100	84,9	92,0±7,0 (83,4/91,8/102,1)	2,4±1,1 (1,1/2,6/3,8)	1,1±0,7 (0,5/1,1/2,2)



**Abb. 3.40** Wiederfindung von Rutin und Quercetin in % der applizierten Gesamtmenge Quercetinäquivalente im Vergleich zur Stammlösung (Stlsg.). Angegeben sind die jeweiligen Mengen in der Kontrolllösung (K.), dem mucosalen Überstand der Versuchszellen (muc. Ü.), dem Darm und dem Resorbat (Res.). n=5.

#### Quercetin-4'-O-glucosid (Spiraeosid)

Da die *In-vivo*-Versuche ergaben, dass eine Resorption von Quercetin-4'-O-glucosid in oberen Darmabschnitten stattfinden muss, wurde die Resorption auf unterschiedlichen Darmsegmenten (Jejunum und Ileum) getestet. Die Ergebnisse sind in den Tab. 3.24 und Tab. 3.25 angegeben sowie graphisch in Abb. 3.41 dargestellt. Im mucosalen Überstand war nach Versuchsende in keinem Ansatz (n=11) noch Quercetin-4'-O-glucosid nachweisbar. Dies ist eindeutig auf Einwirkungen des Darmgewebes zurückzuführen, da unter Versuchsbedingungen ohne Darm in der Kontrolllösung nur ein etwa 10 %iger Abbau

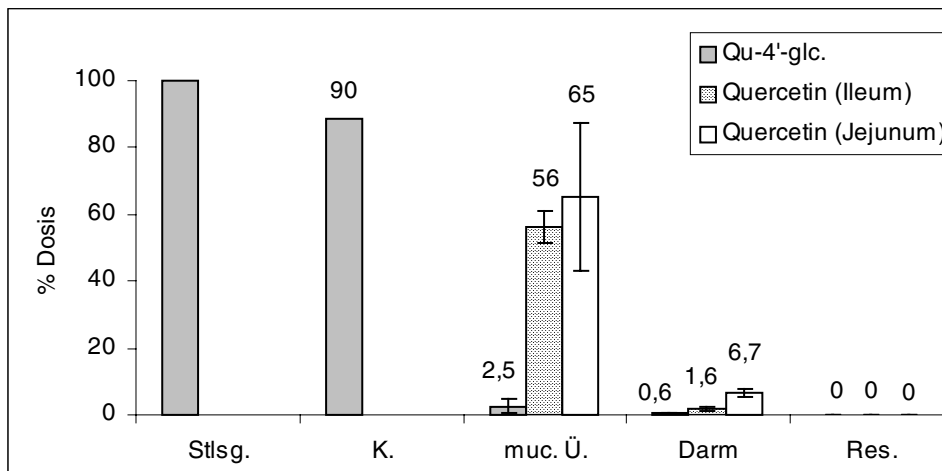
stattfand. Im Durchschnitt wurden etwa 60 % des Quercetin-4'-*O*-glucosids zu Quercetin metabolisiert. Ein deutlicher Unterschied ergab sich im Vergleich der beiden Darmsegmente nur in dem in Darmgeweben nachgewiesenen Anteil Quercetins: während sich im Jejunum durchschnittlich 6,7 % der Ausgangsmenge in Form von Quercetin befanden, lag der Anteil bei Ileumsegmenten nur bei 1,6 %. Geringe Mengen Quercetin-4'-*O*-glucosid konnten auch im Darmgewebe der Ileumsegmente detektiert werden, was unter Umständen auf die höhere Ausgangskonzentration zurückzuführen sein könnte. Im Resorbat konnte in 10 von 11 Versuchsdurchführungen weder Quercetin-4'-*O*-glucosid noch Quercetin nachgewiesen werden.

**Tab. 3.24** Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Quercetin-4-*O*-glucosid (Spiraeosid) unter Verwendung von Jejunumsegmenten. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung, sowie in Klammern darunter der minimale Wert/Median/maximale Wert. Im Resorbat konnte in 5 von 6 Ansätzen kein Quercetin nachgewiesen werden, daher entfällt der Mittelwert sowie Standardabweichung. n=6.

	Stammlsg. (48,1 µM)	Kontrolle	mucosaler Überstand	Darm	Resorbat
Qu-4'-glc.	100	88,6	0	0	0
Quercetin	0	0	65,4±22,0 (39,7/58,8/94,8)	6,7±1,3 (5,2/7,0/8,0)	- (0/0/2)

**Tab. 3.25** Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Quercetin-4-*O*-glucosid (Spiraeosid) unter Verwendung von Ileumsegmenten. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung, sowie in Klammern darunter der minimale Wert/Median/maximale Wert. n=5.

	Stammlsg. (89,3 µM)	Kontrolle	mucosaler Überstand	Darm	Resorbat
Qu-4'-glc.	100	90,1	2,5±2,0 (1,4/1,6/6,1)	0,6±0,1 (0,3/0,4/0,6)	0
Quercetin	0	0	56,3±4,6 (49,8/56,2/62,7)	1,6±0,5 (1,0/1,8/2,2)	0



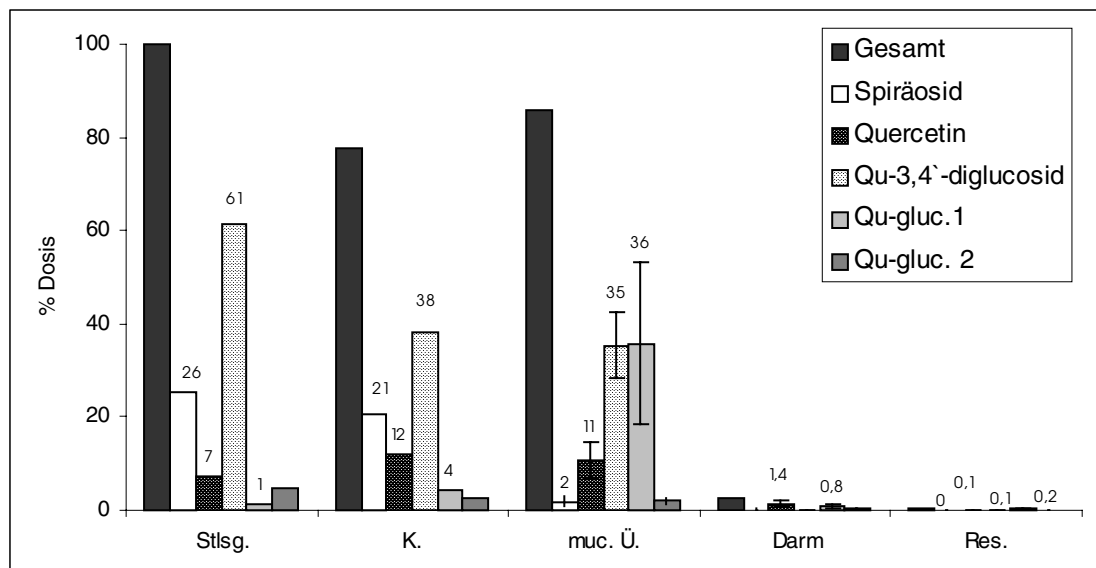
**Abb. 3.41** Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Quercetin-4'-O-glucosid (Spiraeosid) unter Verwendung von Jejunum- und Ileumsegmenten im Vergleich zur Stammlösung (Stlsg.). Angegeben sind die jeweiligen Mengen in der Kontrolllösung (K.), dem mucosalen Überstand der Versuchszellen (muc. Ü.), dem Darm und dem Resorbat (Res.).

### Zwiebel

Der aus einer frischen Zwiebel hergestellte Extrakt (siehe Absatz 2.11.4) wurde mittels HPLC-PDA analysiert und der Gehalt der einzelnen Flavonole bestimmt (siehe Absatz 2.7.1.3). Quercetin-3,4'-O-diglucosid stellte das Hauptglucosid dar (Tab. 3.26). Daneben konnte Quercetin-4'-O-glucosid, Quercetin sowie zwei weitere Substanzen bestimmt werden, die aufgrund von Literaturdaten, Retentionszeiten und ihren On-line-UV Spektren als Quercetinkonjugate 1 und 2 betrachtet wurden (Rhodes und Price 1996). Die Summe der im Extrakt vorhandenen Quercetinäquivalente stellte die Bezugsgröße für die anschließenden Berechnungen dar, da mit einer Metabolisierung und möglichen Umwandlung von einer Substanz in eine andere zu rechnen war. Die Resorptionsversuche wurden mit Jejunumsegmenten durchgeführt. Im Vergleich zur Kontrolllösung zeigte sich im mucosalen Überstand vor allem ein deutlicher Abbau von Quercetin-4'-glucosid und ein Anstieg von Quercetinkonjugat 1 (Abb. 3.42). Diese Substanz war nach Applikation der Reinsubstanz Quercetin-4'-glucosid nicht nachweisbar. Im Darm und auch im Resorbat konnten geringe Mengen der applizierten Substanzen nachgewiesen werden. Im Vergleich mit den Resorptionsversuchen der Reinsubstanz ist jedoch der Konzentrationsunterschied in den jeweiligen Ausgangslösungen zu berücksichtigen, so dass der Unterschied in der Resorption nicht unbedingt auf die Zwiebelmatrix zurückzuführen ist. Der im Darm und Resorbat detektierte Anteil der Gesamtmenge an Quercetinäquivalenten ist wie auch schon in den bereits beschriebenen Untersuchungen sehr gering.

**Tab. 3.26** Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Quercetin(glucosiden) im Zwiebelextrakt (Stlsg.) unter Verwendung von Jejunumsegmenten. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung, sowie in Klammern darunter der minimale Wert/Median/maximale Wert. n=5.

	Stammlsg.	Kontrolle	mucosaler Überstand	Darm	Resorbat
Qu-4'-glc. (134,0 µM)	25,5	20,5	1,9±1,0 (0,5/1,9/3,3)	0,1±0,1 (0/0,1/0,3)	0
Qu-3,4'-diglc. (321,5 µM)	61,3	38,2	35,3±7,2 (25,3/34,6/45,3)	0,08±0,07 (0,02/0,07/0,20)	0,07±0,09 (0/0,04/0,21)
Quercetin (38,4 µM)	7,3	12,2	10,7±4,1 (5,4/10,2/14,9)	1,4±0,7 (0,5/1,5/2,4)	0,09±0,07 (0/0,09/0,20)
Qu-konj.1 (6,47 µM)	1,2	4,2	35,8±17,3 (11,7/36,3/52,7)	0,8±0,4 (0,4/0,7/1,4)	0,24±0,16 (0,07/0,22/0,41)
Qu-konj.2 (24,3 µM)	4,6	2,6	2,0±0,8 (0,9/2,3/2,8)	0,3±0,1 (0,1/0,4/0,4)	0,02±0,03 (0/0/0,06)
Gesamt (524,7 µM)	100	77,7	85,8±18,8 (55,6/86,7/106,2)	2,7±1,2 (1,4/2,6/4,0)	0,4±0,3 (0,1/0,4/0,8)



**Abb. 3.42** Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Quercetin(glucosiden) im Zwiebelextrakt (Stlsg.) unter Verwendung von Jejunumsegmenten. Angegeben sind die jeweiligen Mengen in der Kontrolllösung (K.), dem mucosalen Überstand der Versuchszellen (muc. Ü.), dem Darm und dem Resorbat (Res.). n=5.

### 3.7.2 Resorption und Metabolismus von Kämpferol und Kämpferolglucosiden

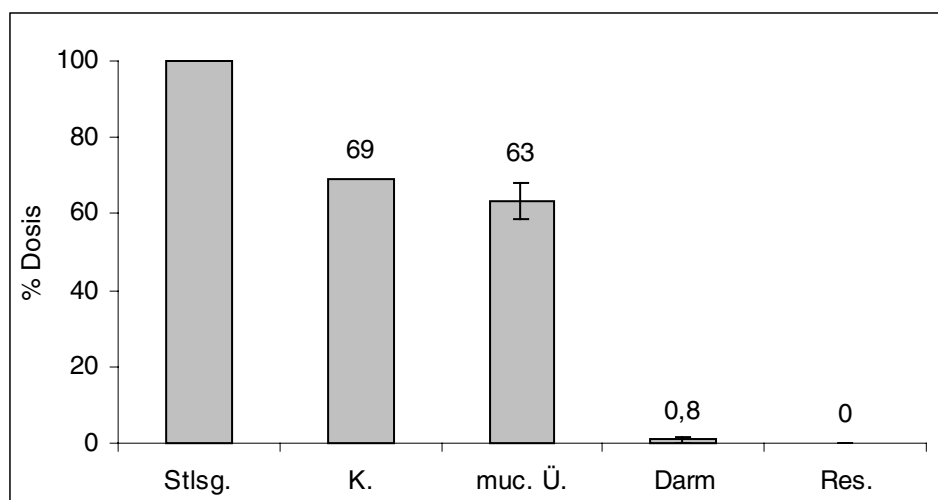
Neben Quercetin und dessen Glykosiden wurden ebenfalls Kämpferol und Kämpferolglucoside im *In-vitro*-Resorptionsmodell getestet. Kämpferol unterscheidet sich von Quercetin nur durch das Fehlen der Hydroxylgruppe in Position C-3' am B-Ring des Flavonolgrundkörpers.

#### Kämpferol

Kämpferol wurde in Krebscarbonatpuffer unter Zusatz von 2 %  $\beta$ -Hydroxypropylcyclodextrin gelöst (Konzentration der Untersuchungslösung  $38,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  bzw.  $134,9 \mu\text{M}$ ). Die im mucosalen Überstand detektierten Mengen Kämpferol waren etwa vergleichbar mit denen der Kontrolllösung (Tab. 3.27). Durchschnittlich 0,80 % der applizierten Menge konnten im Darm detektiert werden, im Resorbat hingegen wurde Kämpferol in keinem Versuchsansatz ( $n=6$ ) nachgewiesen (Abb. 3.43).

**Tab. 3.27** Wiederfindung [% Dosis] von Kämpferol. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung, sowie in Klammern darunter der minimale Wert/Median/maximale Wert.  $n=6$ .

	Stammlsg. (134,9 $\mu\text{M}$ )	Kontrolle	mucosaler Überstand	Darm	Resorbat
Kämpferol	100	69,1	63,3 $\pm$ 4,9 (58,5/62,6/71,1)	0,80 $\pm$ 0,82 (0,16/0,57/2,40)	0



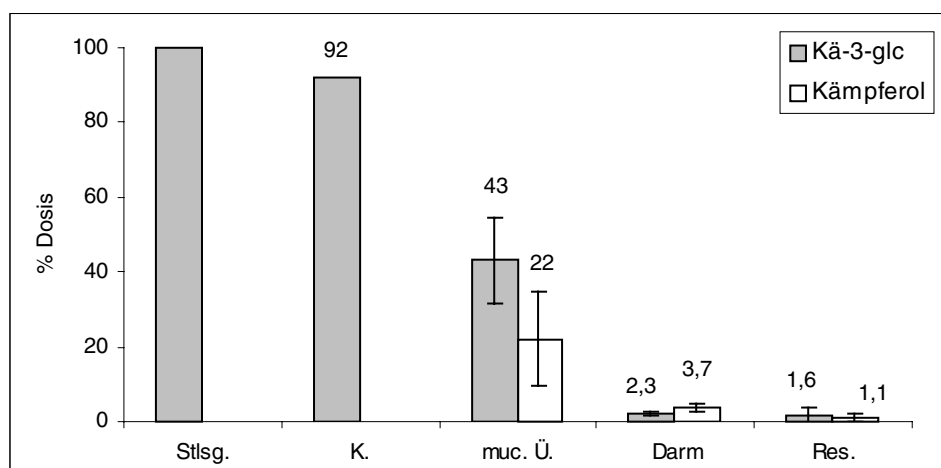
**Abb. 3.43** Wiederfindung [% Dosis] von Kämpferol bezogen auf die Stammlösung (Stlsg.). Angegeben sind die jeweiligen Mengen in der Kontrolllösung (K.), dem mucosalen Überstand der Versuchszellen (muc. Ü.), dem Darm und dem Resorbat (Res.).  $n=6$ .

Kämpferol-3-O-glucosid

Die Kämpferolglucoside wurden ohne Zusatz von Lösungsvermittlern in Krebscarbonatpuffer im Ultraschallbad gelöst. Die Konzentration der Untersuchungslösung von Kämpferol-3-O-glucosid entsprach  $69,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  bzw.  $153,8 \mu\text{M}$ . Erwartungsgemäß war das Glucosid unter Versuchsbedingungen stabiler als das Aglykon, so dass ein Substanzverlust von nur etwa 10 % beobachtet wurde (Tab. 3.28). Im mucosalen Überstand wurden durchschnittlich etwa 20 % der Dosis zu Kämpferol gespalten (Abb. 3.44). Sowohl Kämpferol-3-glucosid als auch Kämpferol konnten im Darm detektiert werden, wobei die Kämpferolmenge die des Glucosids etwa um ein Drittel überstieg. Im Resorbat konnten in vier Ansätzen beide Substanzen nachgewiesen werden, die Variabilität innerhalb der Versuchsreihe war jedoch besonders für Kämpferol-3-glucosid hoch.

**Tab. 3.28** Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Kämpferol-3-O-glucosid. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung, sowie darunter der minimale Wert/Median/maximale Wert in Klammern. n=5.

	Stammlsg. (153,8 $\mu\text{M}$ )	Kontrolle	mucosaler Überstand	Darm	Resorbat
Kä-3-glc	100	92,1	43,1 $\pm$ 11,7 (28,7/50,9/52,6)	2,3 $\pm$ 0,7 (1,5/2,2/3,2)	1,6 $\pm$ 2,2 (0/0,9/5,5)
Kämpferol	0	0	22,1 $\pm$ 12,4 (8,0/15,3/36,4)	3,7 $\pm$ 0,9 (2,7/4,0/4,9)	1,1 $\pm$ 0,9 (0/1,2/2,0)



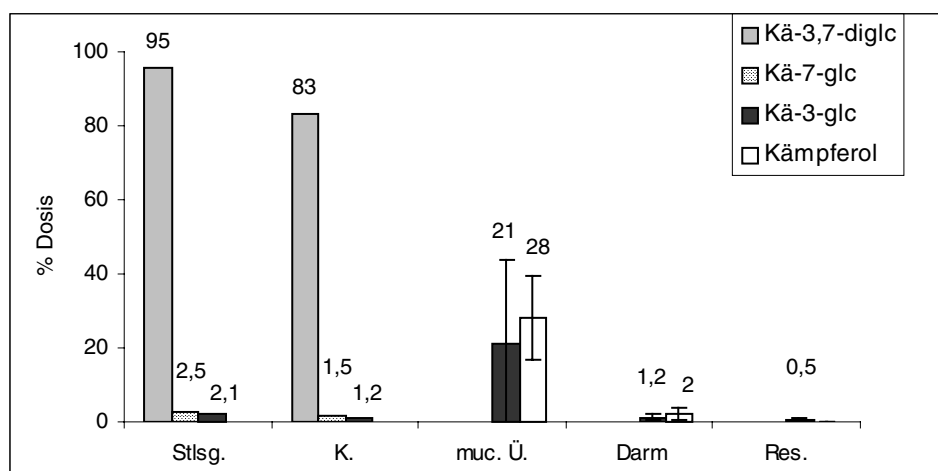
**Abb. 3.44** Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Kämpferol-3-O-glucosid bezogen auf die Stammlösung (Stlsg.). Angegeben sind die jeweiligen Mengen in der Kontrolllösung (K.), dem mucosalen Überstand der Versuchszellen (muc. Ü.), dem Darm und dem Resorbat (Res.). n=5.

Kämpferol-3,7-O-diglucosid

Das verwendete Kämpferol-3,7-O-diglucosid enthielt geringe Mengen Kämpferol-3-O-glucosid und Kämpferol-7-O-glucosid, die bei der Bestimmung der Ausgangsmenge an Kämpferoläquivalenten mit berücksichtigt wurden (Tab. 3.29). Bei Kämpferol-3,7-diglucosid wurde bevorzugt die Glucose an Position 7 gespalten. Unter Abspaltung der zweiten Glucose an Position 3 entstand des weiteren das Aglykon Kämpferol (ca. 30 % der ursprünglichen Menge)(Abb. 3.45). Während etwa 20 % als Kämpferol-3-O-glucosid nachweisbar waren, konnte Kämpferol-7-O-glucosid nicht detektiert werden. Insgesamt wurden durchschnittlich 3,5 % in das Darmgewebe aufgenommen, davon waren zwei Drittel als Kämpferol und ein Drittel als Kämpferol-3-glucosid nachweisbar. Im Resorbat konnten hingegen nur geringe Mengen des Glucosids detektiert werden.

**Tab. 3.29** Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Kämpferol-3,7-O-diglucosid. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung, sowie darunter der minimale Wert/Median/maximale Wert in Klammern. n=5.

	Stammlsg.	Kontrolle	mucosaler Überstand	Darm	Resorbat
Kä-3,7-diglc (122,3 µM)	95,5	83,3	0	0	0
Kä-7-glc (1,6 µM)	2,5	1,5	0	0	0
Kä-3-glc (1,5 µM)	2,1	1,2	21,3±22,2 (0,1/18,5/58,5)	1,2±0,8 (0/1,5/1,9)	0,5±0,3 (0,3/0,4/1,0)
Kämpferol	0	0	28,2±11,3 (11,2/28,4/42,4)	2,3±1,6 (1,0/1,5/4,7)	0
Gesamt (125,4 µM)	100	86	49,6±12,4 (38,1/44,9/69,7)	3,5±1,7 (2,3/2,9/6,4)	0,5±0,3 (0,3/0,4/1,0)



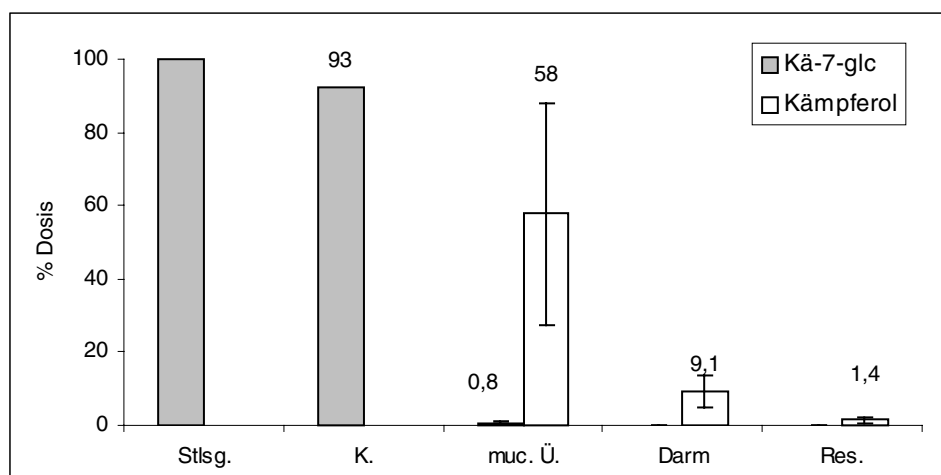
**Abb. 3.45** Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Kämpferol-3,7-O-diglucosid bezogen auf die Stammlösung (Stlsg.). Angegeben sind die jeweiligen Mengen in der Kontrolllösung (K.), dem mucosalen Überstand der Versuchszellen (muc. Ü.), dem Darm und dem Resorbat (Res.). n=5.

Kämpferol-7-O-glucosid

Kämpferol-7-O-glucosid ( $44,4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  bzw.  $99,1 \mu\text{M}$ ) war unter Kontrollbedingungen mit einem Substanzverlust von etwa 8 % relativ stabil und wurde vom Darmgewebe fast vollständig metabolisiert (Tab. 3.30). Überwiegend fand eine Spaltung zu Kämpferol statt (etwa 60-70 %) (Abb. 3.46). Im Vergleich zu den Resorptionsversuchen mit den bereits erwähnten Testsubstanzen wurde relativ viel Substanz (6-22 %) im Darmgewebe nachgewiesen, überwiegend als Kämpferol. Im Resorbat wurden insgesamt maximal 5 %, durchschnittlich etwa 2 % der Ausgangsmenge detektiert, überwiegend vorliegend als Kämpferol.

**Tab. 3.30** Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Kämpferol-7-O-glucosid. Angegeben sind der Mittelwert mit Standardabweichung, sowie darunter der minimale Wert/Median/maximale Wert in Klammern. Kämpferol-7-glucosid konnte in Darm und Resorbat nur in einem Ansatz nachgewiesen werden, daher entfällt die Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung. n=5.

	Stammlsg. (99,1 $\mu\text{M}$ )	Kontrolle	mucosaler Überstand	Darm	Resorbat
Kä-7-glc	100	92,5	0,8 $\pm$ 0,2 (0,5/0,8/0,9)	- (0/0/6,8)	- (0/0/2,3)
Kämpferol	0	0	57,7 $\pm$ 30,5 (21,5/70/89,8)	9,1 $\pm$ 4,4 (4,1/7,7/15,1)	1,4 $\pm$ 1,0 (0/1,5/2,8)



**Abb. 3.46** Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Kämpferol-7-O-glucosid bezogen auf die Stammlösung (Stlsg.). Angegeben sind die jeweiligen Mengen in der Kontrolllösung (K.), dem mucosalen Überstand der Versuchszellen (muc. Ü.), dem Darm und dem Resorbat (Res.). n=5.



## 4 Diskussion

### 4.1 Humanstudien zur Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von Quercetin und Quercetinglykosiden im Menschen

Seit Anfang der Neunziger Jahre sind Polyphenole und insbesondere das Flavonol Quercetin ins Zentrum des medizinischen und öffentlichen Interesses gerückt. Die *In-vitro*-Wirkungen von Quercetin in verschiedensten Testsystemen wurden seitdem intensiv erforscht. Die Datenlage zur Bioverfügbarkeit von Quercetin hingegen war zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen sehr widersprüchlich, und die Angaben reichten von 0 bis über 50 % der applizierten Dosis. Dieses uneinheitliche Bild ergab sich einerseits aus methodischen, andererseits aus analytischen Unterschieden zwischen den publizierten Studien. Da bis vor wenigen Jahren davon ausgegangen wurde, dass die in Pflanzen vorkommenden Quercetinglykoside vor ihrer Resorption zu dem Aglykon gespalten werden müssen, wurde Quercetin in unterschiedlichsten Zubereitungen verabreicht. Als Prüfmedikationen dienten z.B. Quercetin als Reinsubstanz in Tabletten oder Kapseln, Rutintabletten oder -kapseln oder aber pflanzliche quercetinreiche Zubereitungen wie Apfelmus oder Zwiebeln (siehe Absatz 1.2.4). Die Ergebnisse wurden jeweils nur auf die aufgenommene Quercetinmenge bezogen, ohne Berücksichtigung der Zuckerkomponente oder der Darreichungsform. Verschiedene seitdem veröffentlichte Untersuchungen deuteten aber darauf hin, dass die Resorption von Quercetin entscheidend von diesen beiden Faktoren abhängig ist, so dass die erhaltenen pharmakokinetischen Daten zunächst kritisch zu bewerten waren.

Zu Diskrepanzen aufgrund der analytischen Methoden führte vor allem die Tatsache, dass in einem Großteil der durchgeführten Studien die Extraktion von Quercetin an eine gleichzeitige Spaltung der eventuell vorliegenden Phase-II-Metabolite gekoppelt war. Die verwendete Fluoreszenzdetektionsmethode erlaubte nur die Bestimmung des Quercetin Aglykons, nicht aber von dessen Konjugaten, so dass eine Bestimmung des Gesamtquercetiningehaltes im hydrolysierten Plasma vorgenommen wurde. Der im Plasma ursprünglich frei vorliegende Anteil des Aglykons wurde dabei zumeist nicht bestimmt. Die aus der Bestimmung des Gesamtquercetiningehaltes resultierenden hohen Bioverfügbarkeiten wurden anschließend fälschlicherweise als kinetische Daten des freien Aglykons bezeichnet (Hollman et al. 1995). In Studien, in denen allerdings nur der im Plasma frei vorliegende Anteil des Quercetins bestimmt wurde, ergab sich dabei selbst nach Einnahme hoher Dosen von Quercetin eine Bioverfügbarkeit von 0 % (Gugler et al. 1975). Eine Studie, in der sowohl der frei vorliegende als auch der gebundene Anteil an Quercetin im Plasma untersucht wurde, lag zu Beginn der vorliegenden Untersuchungen nicht vor. Ebenso wenig war bekannt, in Form welcher Metabolite Quercetin tatsächlich im Plasma vorliegt.

Um die Widersprüche der bisher durchgeführten Untersuchungen zu klären, wurde im Rahmen der vorgestellten Untersuchungen eine Studie zur absoluten Bioverfügbarkeit von Quercetin geplant. In dieser Studie sollte im Cross-over Design das Aglykon Quercetin als Reinsubstanz intravenös und oral appliziert werden. Im Rahmen der Vorbereitungen dieser Studie wurde zunächst eine Pilotstudie durchgeführt.

### *Prüfformulierung*

Besonderer Wert wurde hierbei auf die Entwicklung einer geeigneten Prüfformulierung gelegt. Tabletten oder Kapseln erschienen wenig geeignet, da die Resorption des in Wasser sehr schwer löslichen Quercetins dann zu stark von der Biopharmazie der Arzneiform und der Löslichkeit der Substanz im Magen-Darm-Trakt beeinflusst werden könnte. Optimalerweise sollte Quercetin in gelöster Form appliziert werden. Der Einsatz vieler Lösungsvermittler schied aber wegen ihrer potentiell resorptionsfördernden Wirkung aus (Piskula und Terao 1998b). Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Prüfsubstanzen erwies sich in Vorversuchen selbst  $\beta$ -Hydroxypropylcyclodextrin als Lösungsvermittler, welches diese resorptionsfördernde Wirkung nicht aufweisen soll, als ungeeignet. Die Verwendung einer Suspension in Celluloseschleim mit 15 % Alkohol erschien daher ein optimaler Kompromiss zu sein. Die Ergebnisse der Pilot- und der Hauptstudie (z.B. im Vergleich Zwiebelzubereitung gegen Spiraeosid) belegten anschließend, dass die Prüfformulierung keinen erkennbaren resorptionsbeeinflussenden Effekt hatte und somit als Darreichungsform sehr gut geeignet war.

### *Analytische Methoden*

Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Entwicklung geeigneter analytischer Extraktions- und Detektionsverfahren. Anders als bei den bisher durchgeführten Untersuchungen sollte der freie und der gebunden vorliegende Quercetinanteil im Plasma und Urin parallel bestimmt werden und die auftretenden Metabolite detektierbar sein. Dafür waren ausreichend empfindliche und selektive Verfahren nötig, die auch eine Detektion der Phase-II-Konjugate erlaubten. In den meisten bisher publizierten Arbeiten wurde Quercetin in Plasma und Urin (vor und) nach Hydrolyse der Konjugate als Aluminiumkomplex fluoreszenzspektroskopisch bestimmt (Aziz et al. 1998, Hollman et al. 1996c). Diese Detektionsmethode war bisherigen UV-spektroskopischen Verfahren aufgrund der hohen Sensitivität überlegen, ermöglichte aber aufgrund der nötigen Komplexbildung keine direkte Bestimmung von konjugierten Substanzen. Durch die neuartige Entwicklung eines gradientenfähigen, elektrochemischen Mehrkanaldetektors wurden neue Möglichkeiten zur sensitiven und selektiven Detektion geschaffen. Neben einer mit der Fluoreszenzdetektion vergleichbaren Empfindlichkeit konnte nun anhand von Voltamogrammen – etwa vergleichbar mit UV-Spektren - eine Zuordnung der Substanzen erfolgen. Diese Detektionsmethode ermöglichte gekoppelt an HPLC die Trennung und Bestimmung der Phase-I- und Phase-II- Metabolite sowie eventuell auftretender weiterer Spaltprodukte. In Kooperation mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung in Bergholz-Rehbrücke konnten somit die Anforderungen an die Analytik erfüllt werden.

### *Pilotstudie*

Die Pilotstudie diente hauptsächlich der Dosisfindung (Quercetin als Reinsubstanz), der Überprüfung der ausgewählten Formulierung (Suspension in Celluloseschleim) und der für die Studie entwickelten Plasma- und Urinanalytik. Zusätzlich wurde Quercetin in Form von Buchweizenkraut und Zwiebeln appliziert, um zu überprüfen, inwieweit sich die von diesen Zubereitungen publizierten Ergebnisse in eigenen Untersuchungen reproduzieren ließen.

Die entwickelte Probenaufarbeitung erlaubte sowohl eine Bestimmung des frei vorliegenden Quercetinanteils als auch der Phase-II-Konjugate (über die Bestimmung des Gesamtgehaltes nach Konjugatspaltung). In der Pilotstudie zeigte sich, dass die Bioverfügbarkeit des freien Quercetins 0 % betrug. Damit war die Durchführung einer Humanstudie zur absoluten Bioverfügbarkeit hinfällig. Weiterhin war, basierend auf diesen Ergebnissen, eine direkte Übertragung von *In-vitro*-Effekten auf die Bedingungen *in vivo* sehr fraglich geworden.

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen des Gesamtquercetiningehalts nach Konjugatspaltung ergab aber interessanterweise, dass nach Einnahme von Zwiebeln etwa 20 bis 100fach höhere Plasmaspiegel erreicht wurden als nach Einnahme derselben Menge Quercetins in Reinform. Damit stellte sich zunächst die Frage nach der Identität der im Plasma vorliegenden Quercetinmetabolite. Dazu wurden mit nicht hydrolysierten Plasmaproben HPLC-Analysen gekoppelt an eine Photodiodenarray-, elektrochemische und massenselektive Detektion durchgeführt. Die aus diesen drei Detektionsmethoden resultierenden Chromatogramme bzw. Voltamogramme und Spektren ergaben übereinstimmend, dass Quercetin im Plasma in glucuronidierter Form zirkuliert. Es konnten vier bis fünf verschiedene Monoglucuronide identifiziert werden (Wittig et al. 2000). Einen Hinweis auf das Vorhandensein von Diglucuroniden oder Sulfaten gab es nicht. Dies entspricht den Ergebnissen von WATSON et al., die ebenfalls ausschließlich glucuronidiertes Quercetin nachweisen konnten (Watson und Oliveira 1999, Watson und Pitt 1998).

Als weiterer Phase-I-Metabolit trat an Position C 3' methyliertes Quercetin (Isorhamnetin) – ebenfalls ausschließlich konjugiert – im Plasma auf. Diese Ergebnisse wurden durch eine gleichzeitige Veröffentlichung einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (Manach et al. 1998). In den vorliegenden Untersuchungen konnte allerdings erstmals gezeigt werden, dass unabhängig von der verabreichten Quercetinzubereitung und der Zuckerkomponente die gleichen Glucuronide in ähnlicher Zusammensetzung entstanden. Nach Applikation der verschiedenen Prüfpräparate der im Rahmen dieser Untersuchungen durchgeführten Studien entstand jeweils ein Quercetinglucuronid als Hauptmetabolit, daneben traten in sehr viel geringeren Konzentrationen drei bis vier weitere Glucuronide auf. Die Plasmakonzentrationen der Isorhamnetinkonjugate lagen etwa 10fach unterhalb der Quercetinkonjugat-Konzentrationen. Eine potentielle Wirksamkeit bei vaskulären Erkrankungen könnte daher eher von den im Plasma tatsächlich vorliegenden Quercetinmetaboliten als vom Aglykon ausgehen. Tatsächlich zeigten die Quercetinglucuronide in *In-vitro*-Tests ebenfalls eine antioxidative Wirkung, diese war jedoch nur etwa halb so ausgeprägt wie die des freien Aglykons (Manach et al. 1998).

Die erreichten Plasmakonzentrationen dieser Quercetinmetabolite unterschieden sich allerdings sehr stark nach Applikation von Quercetin als Aglykon bzw. als Glykosid in Form von Zwiebeln und Buchweizenkraut. Die in der Pilotstudie erhaltenen Ergebnisse gaben erste Hinweise auf unterschiedliche Resorptionsmechanismen für das Aglykon und die verabreichten Quercetinglykoside. Der bisher vermutete Resorptionsmechanismus - intestinale Glykosidspaltung durch Bakterien in unteren Darmabschnitten und anschließende Aufnahme des Aglykons - erschien damit zunehmend unwahrscheinlich (Scheline 1991). Nach Einnahme von Zwiebeln, in denen Quercetin überwiegend als Quercetin-4'-*O*-glucosid und Quercetin-3,4'-*O*-diglucosid vorliegt (s. Absatz 2.7.1), waren maximale Plasmaspiegel der Quercetinmetabolite von bis zu  $3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (detektiert als freies Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate) bereits nach 1 h erreicht. In den obersten Dünndarmabschnitten, in denen die Resorption stattgefunden haben musste, ist aber der Einfluss der Mikroflora zu vernachlässigen (Hollman et al. 1995). Die Resorption von Quercetin-3-*O*-rutosid aus Buchweizenkraut zeigte einen biphasischen Verlauf. Nach etwa 1 h war ein relatives Maximum der Plasmakonzentrationen zu beobachten. Innerhalb von 3 h fielen die Konzentrationen bis fast auf die Ausgangswerte ab und stiegen nach 5 h stark an. Dieser Verlauf deutete bereits auf eine zweite, später einsetzende Resorptionsphase hin, die aufgrund der kurzen Blutabnahmezeitspanne von 5 h nicht vollständig erfasst wurde. Die nachfolgenden Untersuchungen bestätigten anschließend diese Vermutung. Nach Applikation der gleichen Menge des Aglykons als Reinsubstanz lagen die maximalen Plasmakonzentrationen etwa um 50 % niedriger. Die Resorption war darüber hinaus nicht dosisabhängig. Es könnte vermutet werden, dass auch im Falle von Quercetin eine zweite Resorptionsphase im Anschluss an die erfasste Zeitspanne von 5 h stattgefunden haben könnte. Die Analyse der Urinproben unterstützte eine solche Theorie allerdings nicht, denn die renale Elimination der Quercetinkonjugate stand in engem Zusammenhang zu den Plasmakonzentrationen.

Die renal eliminierten Mengen waren übereinstimmend mit publizierten Daten insgesamt sehr niedrig. So wurde nach Aufnahme von 225 bis 330  $\mu\text{mol}$  Quercetin in Form von Zwiebeln, Äpfeln oder Rutin ebenfalls nur 0,4 bis 1,4 % der aufgenommenen Quercetinmenge renal eliminiert (Hollman et al. 1997a). Zur Bioverfügbarkeit lassen sich allerdings basierend auf den renal eliminierten Mengen nur sehr unzureichende Aussagen machen, da nicht bekannt ist, in welchem Umfang Quercetinglucuronide auch biliär eliminiert werden. Bei einer biliären Exkretion ist darüber hinaus ein enterohepatischer Kreislauf wahrscheinlich.

Im Urin konnten darüber hinaus verschiedene intestinale Spaltprodukte - überwiegend durch Spaltung des C-Rings entstandene Phenylessigsäuren - detektiert werden. Vor allem die renal eliminierten Mengen an Homovanillinsäure stiegen nach Gabe aller vier Prüfpräparate an und waren somit tatsächlich auf die Einnahme von Quercetin zurückzuführen. Nach Applikation der pflanzlichen Zubereitungen wurden etwa 10 bis 20 % der eingenommenen Quercetinmenge in Form von Homovanillinsäure eliminiert, nach Einnahme der Reinsubstanzen nur jeweils etwa 6 %. Eine Bilanzierung bezogen auf die aufgenommene Quercetinmenge ist aber nur bedingt aussagekräftig, da diese Substanzen auch endogen gebildet werden (Baba et al. 1981). Daher kann ohne Markierung der Substanzen nicht zwischen endogen gebildeten und aus Quercetin entstandenen Metaboliten differenziert

werden. Durch die Bestimmung eines Urin-Nullwertes am Tag vor der Einnahme der Prüfpräparate konnten nur Anhaltspunkte für die renale Elimination endogen gebildeter Substanzen erhalten werden. An den Studientagen selbst konnte nicht überprüft werden, ob diese Mengen konstant blieben. An der deutlichen Zunahme der renal eliminierten Substanzmengen ließ sich zwar erkennen, dass es sich um Metabolite des Quercetins handelte, Angaben in Prozent der Dosis können aber nur grobe Anhaltspunkte darstellen.

### *Ergänzungen zur Pilotstudie*

Die Ergebnisse der Pilotstudie führten zu der Frage, welche Faktoren für die etwa 100fach höheren Plasmakonzentrationen der Quercetinglucuronide nach Aufnahme gleicher Mengen Quercetin in Form von Zwiebeln im Vergleich zu Buchweizenkraut und dem Aglykon verantwortlich waren. Zunächst wurden Faktoren untersucht, die nicht direkt mit den Flavonolglykosiden in Zusammenhang standen. Methodische Ursachen durch die Verwendung von Fett beim Anbraten der Zwiebeln wurden in Betracht gezogen. Die gut lipidlöslichen Flavonolglykoside könnten dadurch möglicherweise in gelöster Form am Resorptionsort vorliegen und somit besser resorbiert worden sein. In der 1. Ergänzung zur Pilotstudie wurde dieser Versuch von einer Probandin wiederholt. Auch wenn dieser Versuch wenig repräsentativ war, so reichte er jedoch aus, um zu zeigen, dass die Resorption nicht durch die Verwendung von Fett so stark gefördert wurde. Weiterhin wurden eventuell resorptionsfördernde Begleitstoffe in der Zwiebelmatrix untersucht. In der 2. Ergänzung wurde daher die bisherige Zwiebelzubereitung zusammen mit 200 mg Quercetin als Reinsubstanz eingenommen. Die Plasma- und Urinalysen gaben aber keinen Anhaltspunkt für eine verbesserte Aufnahme des Aglykons im Vergleich zu Studientag 1 der Pilotstudie (Applikation von 200 mg Quercetin Aglykon). Bemerkenswert war die gute individuelle Reproduzierbarkeit der Plasmakonzentrationen nach Aufnahme der gleichen Zwiebelzubereitung von Probandin 1 in den drei Versuchsreihen (Studientag 3 der Pilotstudie, Ergänzungen I. und II). Dies konnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass zwar die interindividuelle Variabilität hoch ist, die intraindividuelle Variabilität aber sehr gering zu sein schien.

Nachdem diese äußeren Faktoren weitgehend ausgeschlossen werden konnten, konzentrierten sich die Überlegungen auf die Quercetinglykoside selbst. In Betracht kamen dabei sowohl die Art der Zuckerkomponente (z.B. Glucosid oder andere Glykoside) als auch die Position der Bindungsstelle am Flavonoidgrundgerüst. Weiterhin war es möglich, dass andere Inhaltsstoffe der pflanzlichen Zubereitungen die Resorption der Glykoside förderten, z.B. durch eine Erhöhung der Löslichkeit (Hagels 1996), Verminderung des chemischen oder mikrobiellen Abbaus des Quercetinglykosids im Magen-Darm-Trakt oder durch Aktivierung von Resorptionsmechanismen.

### *Hauptstudie*

Gegenstand der nachfolgenden Untersuchungen war folglich die vergleichende Bioverfügbarkeit von Quercetinmetaboliten im Plasma und Urin nach Applikation von verschiedenen Quercetinglykosiden. Ausgewählt wurden für diese Untersuchungen Quercetin-3-*O*-rutinosid und Quercetin-4'-*O*-glucosid als Reinsubstanzen sowie die entsprechenden pflanzlichen Zubereitungen, die hohe Gehalte an diesen Quercetinglykosiden aufweisen, nämlich Buchweizenkraut und Zwiebeln. So konnte einerseits der Einfluss und die Stellung der Zuckerkomponente im Vergleich der beiden Reinsubstanzen zueinander untersucht werden und andererseits der Einfluss der Pflanzenmatrix auf die Resorption der Glykoside abgeschätzt werden. Da sich bei den bisher veröffentlichten Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit pflanzlicher Phenole stets eine hohe interindividuelle Variabilität ergab, wurde besonderer Wert auf das Studiendesign gelegt. Obwohl die Durchführung der Untersuchungen im Vierfach-Cross-over-Design aufgrund der strikten flavonoidfreien Diät eine große Belastung für die Probanden darstellte, konnte besonders angesichts der geringen Probandenzahl nicht darauf verzichtet werden. Die Ergebnisse der Pilotstudie zeigten darüber hinaus, dass eine 24stündige wash-out Phase nach jedem Studientag vonnöten war, um einen Carry-over-Effekt der Substanzen in Blut und Urin zu vermeiden. So ergab sich eine Mindeststudiendauer von 11 Tagen.

Nach Applikation aller 4 Prüfpräparate konnte Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate im Plasma und Urin in der Regel über einen Zeitraum von 24 bis 36 h nachgewiesen werden. Die eintägige wash-out-Phase war ausreichend, um einen Carry-over-Effekt sowohl im Plasma als auch im Urin zu vermeiden. Das Studiendesign war somit für die Untersuchung der zugrunde liegenden Fragestellungen geeignet.

Die Analysen des nicht-hydrolysierten Plasmas ergaben, dass die ursprünglich verabreichten Quercetinglykoside Spiraeosid und Rutin nicht unverändert im Plasma nachweisbar waren. Dies steht im Widerspruch zu zwei Untersuchungen, in denen Quercetinglykoside - unter anderem Quercetin-4'-*O*-glucosid nach Aufnahme von Zwiebeln - im Plasma nachweisbar waren (Aziz et al. 1998, Paganga und Rice Evans 1997). Es ist wahrscheinlich, dass dieser Widerspruch auf unzureichende Selektivität der bei diesen Untersuchungen verwendeten Analytik zurückzuführen ist. Beide Arbeiten wurden entweder mit HPLC-PDA oder Fluoreszenzdetektion nach Komplexierung mit Aluminiumnitrat durchgeführt. Nach den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit sowie anderer Untersuchungen mit selektiveren Messmethoden handelt es sich bei den im Plasma vorliegenden Konjugaten nicht um die applizierten Glykoside, sondern um verschiedene Glucuronide (Manach et al. 1998). In einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung wurde ebenfalls der Frage nachgegangen, ob Quercetinglucoside nach Aufnahme von Zwiebeln in Humanplasma nachweisbar waren (Moon et al. 2000). Auch diese Autoren konnten ausschließlich an Glucuronsäure und/oder Sulfat konjugiertes Quercetin nachweisen, nicht jedoch die aufgenommenen Glucoside. Eine Differenzierung zwischen Quercetinglykosiden und -glucuroniden ist häufig problematisch, da beide Konjugate ein sehr ähnliches Retentionsverhalten und fast identische UV-Spektren aufweisen. Beim Einsatz weniger selektiver Detektionsmethoden ist daher zumindest die Verwendung von sowohl Glykosiden als auch Glucuroniden als Referenzstandards zur

Überprüfung der Differenzierbarkeit zwischen beiden Konjugatgruppen unverzichtbar. Dies war allerdings bei beiden Arbeiten nicht der Fall. Daher wird das Vorhandensein von Quercetinglykosiden im Plasma bis zum Nachweis mit (vorzugsweise massen-)selektiven Detektionsmethoden weiterhin in Frage gestellt.

Auch in den Plasmaproben der Hauptstudie konnte kein freies Quercetin nachgewiesen werden, was die Ergebnisse der Pilotstudie bestätigte. Wiederum wurden unabhängig vom Prüfpräparat die bereits bekannten verschiedenen Quercetinglucuronide detektiert. Aufgrund der längeren Probenentnahmen zeigte sich nun, dass der Hauptmetabolit einen parallelen kinetischen Verlauf zum Gesamtquercetingehalt aufwies. Dies war besonders im Hinblick auf die Verwendung des Gesamtquercetingehalts für die anschließenden pharmakokinetischen Auswertungen von Bedeutung. Auch in den bereits publizierten Untersuchungen wurden die pharmakokinetischen Analysen stets auf Grundlage des Gesamtquercetingehalts nach Konjugatspaltung durchgeführt. Bislang fehlte aber die Legitimation für dieses Vorgehen, da über die tatsächlich vorhandenen Metabolite und deren kinetischen Verlauf im Plasma nichts bekannt war. Durch die Bestimmung des Quercetins nach Hydrolyse der Konjugate gehen Informationen zur Resorptionsgeschwindigkeit, Verteilung und Eliminationsgeschwindigkeit der einzelnen Phase-II-Konjugate sowie auch möglicherweise deren Umwandlung ineinander verloren. Eine pharmakokinetische Analyse dieser Summe von verschiedenen Substanzen wäre daher möglicherweise wenig aussagekräftig bzw. unzulässig geworden. Die Analyse der Phase-II-Konjugate zeigte jedoch erstens, dass unabhängig vom Prüfpräparat überwiegend ein Hauptglucuronid gebildet wurde und zweitens, dass der kinetische Verlauf aller Quercetinglucuronide parallel zueinander und somit auch parallel zum Gesamtquercetingehalt verlief. Die angegebenen pharmakokinetischen Parameter spiegelten somit hauptsächlich die des Hauptmetaboliten wider. Unter diesen Voraussetzungen war eine kinetische Analyse unter Verwendung des Gesamtquercetingehaltes möglich. Es muss allerdings stets darauf hingewiesen werden, dass es sich nicht um die Daten von im Plasma frei vorliegendem Quercetin handelt. Da dieser Hinweis in der Vergangenheit (absichtlich?) oft fehlte, kam es immer wieder zu der fälschlichen Annahme, dass Quercetin in freier Form im Plasma nachgewiesen wurde (Hollman und Katan 1997, Hollman et al. 1996b, Hollman et al. 1997a, Hollman et al. 1997b). Somit wurden wiederholt Quercetin-Plasmakonzentrationen (detektiert nach Hydrolyse der Konjugate) aus Humanstudien in direkten Bezug zu den in *In-vitro*-Tests eingesetzten freien Quercetinkonzentrationen gestellt (Janssen et al. 1998).

Die Tatsache, dass unabhängig von den applizierten Quercetinglykosiden die gleichen Quercetinglucuronide im Plasma zirkulierten, ist eine der zentralen Aussagen der vorliegenden Untersuchungen. Somit unterschied sich die Applikation von Quercetinglucosiden und -rutinosid nur in der Geschwindigkeit und im Ausmaß der Resorption und den sich daraus ergebenden pharmakokinetischen Parametern. Die potentiellen Wirkstoffe im Körper waren aber offensichtlich identisch. Die diesbezüglichen kinetischen Daten unterstützten diese Annahme. So war die Eliminationshalbwertszeit nach Applikation aller vier Prüfpräparate trotz der erheblichen Unterschiede der Absorptions- und Verteilungshalbwertszeiten gleich. Ebenso war die renale Clearance äußerst konstant. Beides legt nahe, dass es sich jeweils um die gleichen Substanzen handelte.

Die Resorption erfolgte nach Einnahme von Zwiebeln (Z) und Spiraeosid (S) sehr schnell, bereits nach 15 min war Quercetin im hydrolysierten Plasma nachweisbar. Diese Daten korrespondierten sehr gut mit den Ergebnissen einer kürzlich veröffentlichten Humanstudie, in der nach Einnahme von 100 mg Spiraeosid maximale Plasmakonzentrationen von durchschnittlich  $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  nach etwa 0,5 h beobachtet wurden (Olthof et al. 2000). In den vorliegenden Untersuchungen ergab sich zwischen der Einnahme von Quercetinglucosiden aus Zwiebeln oder als Reinsubstanz kein signifikanter Unterschied bezüglich Ausmaß und Geschwindigkeit der Resorption. Dies zeigte zum einen, dass die verwendete Formulierung keine die Resorption erkennbar beeinflussenden Eigenschaften hatte. Zum anderen wurde deutlich, dass die Zwiebelmatrix auch auf die Resorption der Quercetinglucoside offenbar keinen entscheidenden resorptionsfördernden Einfluss hatte (vgl. dazu Ergänzung II. der Pilotstudie). Es bleibt weiterhin zu bedenken, dass in der Zwiebel Quercetin-4'-*O*-glucosid und Quercetin-3,4'-*O*-diglucosid zu etwa gleichen Teilen vorlagen und daher das Diglucosid für etwa 50 % der applizierten Quercetinmenge aufkam. Die Plasmakonzentrationen lassen darauf schließen, dass die Resorption des Diglucosids vergleichbar mit der des Monoglucosids war. Das bedeutete, dass die Bindung einer Zuckerkomponente an der C-3-Position des Flavonoidgrundgerüsts nicht prinzipiell resorptionshemmend wirkte. Diese Erkenntnisse wurden anschließend durch die Veröffentlichung der bereits erwähnten Humanstudie einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt, in der die relative Bioverfügbarkeit von Quercetin-4'-glucosid und Quercetin-3-glucosid untersucht wurde (Olthof et al. 2000). In keinem der untersuchten pharmakokinetischen Parameter ergab sich zwischen den beiden Applikationen ein statistisch signifikanter Unterschied. Dies konnte als deutlicher Hinweis darauf gewertet werden, dass nicht die Position der Zuckerkomponente, sondern die Art des Glykosids entscheidend für Geschwindigkeit und Ausmaß der Resorption war, und unterstützte die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen.

Die Bioverfügbarkeit der Quercetinkonjugate war nach Aufnahme von Zwiebeln im Vergleich zu Spiraeosid etwas höher. So lagen die Werte für  $c_{\text{max}}$  und AUC etwas höher, wie auch der renal eliminierte Anteil von Quercetin und Isorhamnetin in % der aufgenommenen Quercetinmenge. Die Gesamtkörperclearance war unter Berücksichtigung des bioverfügbaren Anteils ( $\text{Cl}_{\text{tot}}/f$ ) nach Zwiebelaufnahme etwas geringer (13,3 gegenüber  $17,4 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Da es sich bei den zu eliminierenden Substanzen stets um die gleichen Quercetinglucuronide handelte, kann aus den Werten gefolgert werden, dass die Bioverfügbarkeit im Falle von Spiraeosid geringer war. Aufgrund der hohen interindividuellen Variabilität waren diese Unterschiede bei der relativ geringen Stichprobengröße aber nicht statistisch signifikant.

Nach Applikation des Quercetin-3-*O*-rutinosids in Form von Buchweizenkraut oder Rutin waren die Gesamtkörperclearance und das Verteilungsvolumen unter Berücksichtigung des bioverfügbaren Anteils etwa 10mal höher im Vergleich zur Applikation der Quercetinglucoside. Da im Körper die gleichen Quercetinglucuronide vorliegen, kann dies als Hinweis darauf gewertet werden, dass sich die Bioverfügbarkeit der Quercetinglucoside etwa um diesen Faktor von der des Rutins unterscheidet. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen HOLLMAN et al. (1999). In ihren Untersuchungen lag die relative Bioverfügbarkeit von Quercetin-3-*O*-rutinosid im Vergleich zu Quercetin-4'-*O*-glucosid bei 20 %.



Nach Applikation von Quercetin-3-*O*-rutosid setzte die Resorption signifikant später ein, und maximale Plasmaspiegel wurden erst etwa 4 h nach Einnahme von Buchweizenkraut bzw. 7 h nach Applikation von Rutin als Reinsubstanz erreicht. Diese Werte entsprachen den für Rutin zuvor ermittelten Werten von 9,3 h (Hollman et al. 1997a) (Tab. 1.4). Gebunden an Rutinose schien Quercetin daher den Resorptionsmechanismen in den obersten Darmabschnitten kaum zugänglich zu sein. Wie in den dargestellten Voltamogrammen nach Einnahme von Buchweizenkraut (Abb. 3.12) gut zu erkennen ist, fand innerhalb der ersten 3 bis 5 h eine erste Resorptions- und Eliminationsphase statt, die der entsprach, die bereits in der Pilotstudie beobachtet werden konnte. Wie der Anstieg der Plasmakonzentrationen in den 5 h-Werten in der Pilotstudie bereits vermuten ließ, setzte erst nach etwa 5 h die eigentliche Resorption ein. Der kinetische Verlauf der ersten, schwach ausgeprägten Phase entsprach in etwa dem nach Applikation der Quercetinglucoside. Daher konnte vermutet werden, dass an den Resorptionsorten der Quercetinglucoside nur sehr geringe Mengen des Rutosids aufgenommen werden konnten. Während dieser erste Anstieg und Abfall der Plasmakonzentrationen nach Applikation von Buchweizenkraut bei fast allen Probanden beobachtet werden konnte, zeigte sich dieser Verlauf nach Einnahme der Reinsubstanz Rutin kaum. Hier musste von einer echten Resorptionsverzögerungszeit (lag time) von durchschnittlich 3 h ausgegangen werden.

Diese später einsetzende Resorption von Rutin ist auch Grund für die insgesamt niedrigeren Plasmakonzentrationen der Quercetinkonjugate. Die erreichten maximalen Quercetinplasmaspiegel nach Applikation von Rutin liegen durchschnittlich um die Hälfte niedriger als nach Applikation von Buchweizenkraut. Der Unterschied ist allerdings aufgrund hoher interindividueller Variabilität nicht statistisch signifikant. Die Bioverfügbarkeit der Quercetinkonjugate ist folglich höher nach Applikation von Rutin in Form von Buchweizenkraut als der Reinsubstanz. Dafür sprechen auch die höhere Gesamtkörperclearance und das Verteilungsvolumen unter Berücksichtigung des bioverfügbaren Anteils nach Einnahme von Rutin im Vergleich zu Buchweizenkraut.

Offenbar erhöhen Co-Faktoren in der Pflanzenmatrix die Absorption von Rutin, möglicherweise durch Veränderung seiner Löslichkeit oder Stimulation von Resorptionsmechanismen. Solange aber nicht geklärt ist, in welcher Form Rutin resorbiert wird – ob als Glykosid oder nach intestinaler Glykosidspaltung als Aglykon – kann über den Einfluss der Pflanzenmatrix nur spekuliert werden.

Entsprechend den Ergebnissen der Pilotstudie war der renal eliminierte Anteil mit intaktem Quercetingrundgerüst sehr gering. Die in den vorliegenden Untersuchungen erzielten Ergebnisse wurden durch die Arbeiten von HOLLMAN et al. bestätigt. So wurden nach Aufnahme von etwa 100 mg Quercetin in Form von Quercetin-4'-*O*-glucosid oder Zwiebeln 1,4 bis 3,0 % der Dosis renal eliminiert (Hollman et al. 1997a, Olthof et al. 2000). Die Eliminationshalbwertszeiten im Plasma waren mit durchschnittlich 18 h vergleichbar (Olthof et al. 2000) (Tab. 1.5). Die zuvor angegebenen Werte von  $28 \pm 92$  h nach Aufnahme von Zwiebeln waren hingegen aufgrund der sehr großen interindividuellen Schwankungen als kritisch zu bewerten (Hollman et al. 1997a) (Tab. 1.4).

### *Interindividuelle Variabilität*

Die große interindividuelle Variabilität wurde bereits übereinstimmend in bisher publizierten Arbeiten festgestellt (Aziz et al. 1998, Hollman et al. 1995, Hollman et al. 1997a, Janssen et al. 1998, Olthof et al. 2000). In vielen Studien lagen die Standardabweichungen bei der Berechnung der pharmakokinetischen Parameter in der Größenordnung der Mittelwerte oder überstiegen diese noch um ein Vielfaches (Tab. 1.4 und Tab. 1.5). Diese Variabilität konnte trotz einheitlicher Ernährung und stationärer Aufnahme der Probanden auch in den vorliegenden Untersuchungen nicht verringert werden und war - bezogen auf die Prüfpräparate – sehr hoch. Da äußere Faktoren wie unterschiedliche Ernährung oder Bewegung in der vorliegenden Studie weitgehend ausgeschlossen werden konnten, war diese Variabilität offenbar auf individuelle Unterschiede in der Beschaffenheit der mikrobiellen und/oder körpereigenen (Enzym-)Systeme zurückzuführen. Betrachtete man jedoch jeden Probanden einzeln, so zeigte sich zumeist die gleiche Rangfolge der pharmakokinetischen Parameter der 4 Prüfpräparate. Ein Proband mit sehr hohen  $c_{\max}$ -Werten nach Aufnahme von Zwiebeln hatte demnach in der Reihenfolge Zwiebel  $\geq$  Spiraeosid  $\gg$  Buchweizenkraut  $>$  Rutin auch vergleichsweise hohe Plasmakonzentrationen nach Aufnahme von Rutin. Dieses Verhältnis der Prüfpräparate zueinander zeigte sich auch bei Probanden mit insgesamt sehr viel niedrigeren Plasmakonzentrationen nach Gabe aller 4 Prüfpräparate. Aus diesen unterschiedlichen Größenordnungen resultiert die hohe interindividuelle Variabilität. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse machen zukünftig ein Cross-over-Design bei der Untersuchung pflanzlicher Phenole im Menschen unerlässlich.

### *Resorptionsmechanismus*

Der Resorptionsmechanismus schien für Quercetinglucoside und Quercetinrutinosid unterschiedlich zu sein. Der schnelle Anstieg der Quercetinglucuronid-Plasmakonzentrationen nach Applikation des Glucosids lässt auf eine Resorption in den obersten Darmabschnitten schließen. Zum Resorptionsmechanismus selbst gibt es zwei verschiedene Erklärungsansätze.

Ein aktiver Transportmechanismus der intakten Quercetinglucoside in den Enterocyten wurde aufgrund von Perfusionsexperimenten vermutet, konnte bislang aber nicht bewiesen werden (Spencer et al. 1999). In diesem Zusammenhang wurde bereits die Rolle eines Natrium-abhängigen Glucosetransporters (SGLT1) diskutiert (Gee et al. 1998, Hollman et al. 1995, Wright et al. 1996). In *In-vitro*-Versuchen zeigten Quercetinglucoside einen stärker hemmenden Einfluß auf den Zuckertransport des Carriers als Rutin. Diese Interaktionen bedeuten aber nicht zwangsläufig, dass ein Transport der glucosidierten Phenole stattfand. So hemmte beispielsweise Phlorizin ebenfalls den SGLT1, ohne jedoch aufgrund seiner Molekülgröße und –struktur selbst transportiert zu werden (Hirayama et al. 1996). Da die Flavonoidglykoside eine ähnliche Größe aufweisen, ist ein Transport ebenfalls eher unwahrscheinlich.

Selbst die Aufnahme von Quercetinglucosiden in den Enterocyten unterstützt aber nicht zwangsläufig die Annahme, dass Quercetinglucoside im Plasma vorhanden sein müssen. Im Enterocyten wurden  $\beta$ -Glucosidasen nachgewiesen, die Quercetinglucoside spalten und so das Aglykon freisetzen können (Day et al. 1998). Das freie Aglykon kann anschließend direkt im Enterocyten an Glucuronsäure konjugiert werden. In der Darmmucosa wurde sowohl bei Menschen als auch bei Ratten das Enzym Uridine-5'-diphosphoglucuronosyltransferase (UDP-GT) gefunden (Piskula und Terao 1998a, Radomska-Pandya et al. 1998). Die Glucuronidierung von Quercetin in Caco-2 Zellen wurde ebenfalls bereits nachgewiesen (Ikeno et al. 1999). Daher ist es durchaus möglich, dass zwar Quercetinglucoside resorbiert werden, aber nur Glucuronide in den systemischen Kreislauf gelangen.

Ein zweiter in der Literatur diskutierter Erklärungsansatz geht von einer in einem ersten Schritt stattfindenden Spaltung und anschließender Resorption des Aglykons aus. In den obersten Darmabschnitten ist eine Glucosidspaltung durch intestinale Bakterien unwahrscheinlich. Kürzlich wurde aber gezeigt, dass die Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH; EC 3.2.1.62), eine membranständige  $\beta$ -Glycosidase im Dünndarm von Säugetieren, Quercetin-3-O-glucosid und Quercetin-4'-O-glucosid effektiv zum Aglykon hydrolysierte (Day et al. 2000). Die Spaltung fand also an der luminalen Seite der Darmwand statt. Die freiwerdende Glucose wurde schnell in den Enterocyten transportiert, was durch die räumliche Nähe des SGLT1 in der Darmwand ermöglicht wurde. Die Autoren vermuteten, dass die Freisetzung des nun stärker hydrophoben Aglykons zu erhöhten lokalen Quercetinkonzentrationen führte, welche eine Diffusion durch die Darmwand begünstigten. Da das Aglykon im Enterocyten schnell konjugiert würde, würde das Konzentrationsgefälle über die Darmwand erhalten bleiben. Anhaltspunkte für einen aktiven Cotransport von Glucose und Aglykon gibt es zur Zeit noch nicht. Dieser zweite Ansatz wurde kürzlich auf einer Fachtagung (XXth International Conference on Polyphenols, Freising-Weihenstephan, Sept. 2000) favorisiert. Falls es sich aber um reine Diffusionsprozesse handelt, ist es nicht einfach, zu erklären, warum das als Aglykon applizierte Quercetin so schlecht resorbiert wurde. Auch in diesem Fall würden bei einer hohen Dosis von 1000 mg lokal erhöhte Quercetinkonzentrationen an der Darmwand zu vermuten sein, die eine Diffusion in den Enterocyten zur Folge haben sollten.

Rutin hingegen schien in den unteren Dünndarmabschnitten und/oder dem Kolon resorbiert zu werden. Falls eine Resorption stattdessen auch in oberen Darmabschnitten stattfand, so kann das stark verzögerte Erscheinen der Quercetinglucuronide im systemischen Kreislauf nur durch sehr stark ausgeprägte Affinitätsunterschiede der beteiligten Enzyme erklärt werden. Der Resorptionsmechanismus ist allerdings ebenfalls unklar. Es wurde vermutet, dass Rutin vor der Resorption erst durch den Einfluss intestinaler Bakterien zum Aglykon hydrolysiert werden muss (Hollman et al. 1999). Falls tatsächlich nur das Aglykon in den Enterocyten gelangt (durch aktiven Transport oder Diffusion), so wäre denkbar, dass aufgrund der mangelnden Affinität der LPH gegenüber Rutin auf die Spaltung durch Darmbakterien in unteren Darmabschnitten „gewartet“ werden muss. Wiederum stellt sich aber die Frage, warum in diesem Falle ein deutlicher Unterschied zwischen der Applikation von Rutin oder dem Aglykon Quercetin zu beobachten war. Möglichweise sind weitere aktive

Resorptionsmechanismen für Rutin involviert. Es wäre allerdings ebenfalls denkbar, dass die Rutinose das Aglykon vor chemischem und/oder bakteriellem Abbau auf seiner Darmpassage schützt, und so die Verfügbarkeit von Quercetin am Resorptionsort erhöht wird.

Ein Aspekt, der bislang in keiner Untersuchung in Betracht gezogen wurde, ist der Einfluss der Mucuschicht auf die Resorption. Als Mucus bezeichnet man das von den Becherzellen im gesamten Gastrointestinaltrakt produzierte und sezernierte viskoelastische, wasserunlösliche Gel an der Mucosaoberfläche sowie die visköse, mobile Lösung im Lumen (Nolte 1998). An Mucusmodellen zur Untersuchung von intestinalen Absorptionsmechanismen konnte gezeigt werden, dass der Massenfluss einer Substanz durch den Schleim in Richtung Darmepithel von deren Lipophilie, Molmasse und ihrer Retention durch den Mucus abhängig war (Matthes et al. 1992). Dabei korrelierten hohe Lipophilie und Retention einer Substanz mit niedriger Mucusediffusion. Darüber hinaus konnte der Intestinalmucus als Molekularfilter mit einer Ausschlussgrenze der Molekülmasse (MM) von ca. 600-700 g·mol<sup>-1</sup> aufgefasst werden.

Führt man die in der Literatur beschriebenen und die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zusammen, so ergibt sich folgende Hypothese zum Resorptionsmechanismus von Quercetin und seinen Glykosiden:

In oberen Dünndarmabschnitten werden Quercetin-Monoglucoside aufgrund ihrer Hydrophilie und Molekülgröße von <500 g·mol<sup>-1</sup> offenbar gut durch den Mucus in Richtung Darmepithel transportiert. Das Aglykon Quercetin wird möglicherweise aufgrund seiner Lipophilie, Rutin aufgrund seiner Molekülgröße von >600 g·mol<sup>-1</sup> deutlich schlechter transportiert. Am Darmepithel angelangt, werden die Glykoside enzymatisch gespalten, wobei die beteiligten luminalen Enzyme (z.B. die Lactase-Phlorizin-Hydrolase) offenbar eine deutlich höhere Affinität zu den Monoglucosiden haben als zu Rutin. Das frei werdende Aglykon diffundiert dann wahrscheinlich passiv in die Enterocyten und wird dort sogleich konjugiert, so dass ein Konzentrationsgefälle über die Membran bestehen bleibt. Die Resorption von Rutin in diesen oberen Dünndarmabschnitten ist also aufgrund der Mucusbarriere und der Enzymaktivität benachteiligt. Erstere könnte durch den Einsatz von Buchweizenkraut verringert werden, da lösungsvermittelnde Co-Faktoren im Buchweizenkraut möglicherweise die Mucusviskosität herabsetzen. Dies würde die erste Resorptionsphase nach Applikation von Buchweizenkraut erklären, die bei Gabe der Reinsubstanz nicht zu beobachten ist.

In tieferen Darmabschnitten wird die Rutinose durch Einfluss von Darmbakterien gespalten. Möglicherweise wird zunächst nur die endständige Rhamnose gespalten, und das entstehende Quercetin-3-O-glucosid könnte somit wie zuvor beschrieben leichter den Mucus passieren, gespalten und anschließend als Quercetin resorbiert werden. Bei vollständiger Spaltung zum Aglykon im Dickdarm liegen dort lokal hohe Konzentrationen an freiem Quercetin vor, die einen passiven Transport durch Mucus und Darmepithel begünstigen würden. Die schlechte Resorption nach Applikation des Aglykons Quercetin könnte zudem in seiner chemischen Instabilität begründet liegen. Der Unterschied zwischen der Applikation des Aglykons zu der des Rutins bestünde darin, dass nach Applikation von Rutin erst im

Dickdarm freies Quercetin entstehen würde, wohingegen das applizierte Aglykon bereits in der Passage von Magen und Dünndarm verschiedenen ungünstigen Einflüssen wie neutralen bis alkalischen pH-Werten, kombiniert mit einer Temperatur von 37°C ausgesetzt wäre. Im Dickdarm hingegen ist der pH-Wert aufgrund der bakteriellen Stoffwechselprodukte bereits wieder saurer und würde so die chemische Stabilität des nach Spaltung freigesetzten Aglykons erhöhen. Der aufgrund seiner Lipophilie schlechtere Transport des freien Quercetins durch den Mucus im Dickdarm gegenüber dem der Glucoside im Dünndarm könnte wiederum erklären, warum bei der Applikation vergleichbarer Mengen Aglykon die Resorption nach Applikation von Quercetin oder Rutin deutlich geringer war. Dieser hypothetische Resorptionsmechanismus unter Berücksichtigung von Mucusbarriere, Enzymaktivität und Stabilität könnte die Ergebnisse der Humanstudien weitestgehend erklären. In Zukunft sollten Versuche zur Klärung der Resorptionsmechanismen vor allem den bislang wenig beachteten Einfluss des Mucus stärker mitberücksichtigen.

### *Metabolismus*

Nach der Resorption des intakten Flavonols in oberen Dünndarmabschnitten unterlag Quercetin einer endogenen Metabolisierung. Dabei schien die Glucuronidierung beim Menschen den bevorzugten Metabolismusweg darzustellen. Quercetinsulfate wurden zwar von MANACH et al. (1998) ebenfalls beschrieben, konnten aber weder von WATSON et al. (1998 und 1999) noch in den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen werden. In den letzten Jahren wurde bereits die Rolle der Darmwand als metabolisierendes Organ verschiedenster Arzneistoffe immer deutlicher. Im Falle von Quercetin deuten sowohl das vollständige Fehlen von freiem Quercetin als auch die parallelen Konzentrations-Zeit-Profile der verschiedenen Metabolite darauf hin, dass ein Großteil des Metabolismus bereits im Enterocyten stattfindet. Diese Vermutung wird durch *In-Situ*-Perfusionsexperimente am Rattenjejunum und -ileum unterstützt, in denen Quercetin im Enterocyten schnell und umfassend an Glucuronsäure und Sulfat konjugiert wurde (Crespy et al. 1999).

Auch die Methylierung zu Isorhamnetin findet möglicherweise bereits im Enterocyten statt. Darauf deuten Untersuchungen an Schweinen mit vergleichender intravenöser und oraler Applikation von Quercetin hin, in denen nach intravenöser Applikation (und somit Umgehung der Darmwand, nicht jedoch der Leber) ein sehr viel geringerer Isorhamnetinanteil beobachtet wurde (Ader et al. 2000). Bezüglich des Methylierungsgrades zeigen sich möglicherweise deutliche Unterschiede zwischen Mensch und Tier. In der vorliegenden Humanstudie betrifft das Verhältnis von Quercetin zu Isorhamnetin im Plasma etwa 10:1. Nach Gabe von hohen Quercetindosen an Ratten hingegen wurden etwa 80% des resorbierten Quercetins zu Isorhamnetin metabolisiert (Manach et al. 1997). In einer weiteren Humanstudie war der Prozentsatz dagegen ebenfalls deutlich geringer (Manach et al. 1998). Die Autoren dieser Studien führten diese Unterschiede auch teilweise auf die im Tierexperiment eingesetzten, sehr hohen Quercetindosen zurück.

Der in oberen Dünndarmabschnitten nicht resorbierte Anteil der Dosis gelangte in tiefere Darmabschnitte und unterlag dort mikrobiellen Abbauprozessen. Neben den Metaboliten mit intaktem Flavonoidgrundgerüst (Quercetin- und Isorhamnetinkonjugate) wurden auch

intestinale Metabolite in Plasma und Urin detektiert. Zu den als intestinale Abbauprodukte des Quercetins beschriebenen Metaboliten zählen vor allem 3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure, Homovanillinsäure, 3-Hydroxyphenyllessigsäure und 3,4-Dihydroxytoluol. Im Plasma konnten diese Substanzen, die teilweise durch den Abbau von Dopamin auch endogen entstehen, nicht eindeutig als Quercetinmetabolite nachgewiesen werden, da sie keine der Applikation der Prüfpräparate entsprechende Kinetik zeigten oder nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Teilweise war das mit der Selektivität der verwendeten Analysenmethode für diese Substanzen zu begründen. Der Schwerpunkt der Plasmaanalysen lag auf der Detektion von Quercetin und seinen Phase-I und -II Metaboliten. Der HPLC-Gradient wurde folglich im Hinblick auf die Trennung von Flavonolen im Plasma und nicht von den sehr polaren, intestinalen Metaboliten optimiert. Eine bisher nicht identifizierte Substanz zeigte allerdings eine deutliche, nach Applikation aller Prüfpräparate gleiche Kinetik. Maximale Plasmaspiegel wurden nach 10-12 h erreicht. Für den intestinalen Ursprung dieser Substanz gab es verschiedene Anhaltspunkte. Zum einen entsprach die Retentionszeit und das Voltamogramm anderen bekannten intestinalen Metaboliten. Zum anderen deuteten die Resorptionsverzögerungszeit von 4 h und  $t_{\max}$  von etwa 12 h auf eine Resorption in unteren Darmabschnitten hin, in denen die verabreichten Präparate bereits dem Einfluss der intestinalen Mikroflora ausgesetzt waren. Darüber hinaus waren die Plasmakonzentrationen nach Einnahme von Buchweizenkraut und Rutin entsprechend der doppelten Quercetindosis höher als nach Applikation von Zwiebeln und Spiraeosid. Im Rahmen der in Kooperation durchgeführten Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Quercetin am Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIFE) wurde diese Substanz ebenfalls in Humanplasma nach Einnahme quercetinhaltiger Zubereitungen detektiert. Die nähere Charakterisierung und mögliche Identifizierung der Substanz ist ein Bestandteil der Dissertationsarbeit von Holger Pforte vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung.

In den Urinproben konnten prinzipiell alle bekannten intestinalen Metabolite selektiv nachgewiesen werden, da die Methodenentwicklung auf eine gleichzeitige Detektion von intestinalen und endogenen Phase-I- und -II Metaboliten ausgerichtet war. In den meisten Urinproben waren die beschriebenen intestinalen Metabolite auch nachweisbar. Aufgrund der Datenmenge beschränkte sich die Auswertung aber auf die Substanzen, die aufgrund ihrer Eliminationskinetik eindeutig als Quercetinmetabolite zugeordnet werden konnten. Wie schon in der Pilotstudie zeigte überwiegend Homovanillinsäure eine deutliche Eliminationskinetik. Die Exkretionsrate ( $\mu\text{Mol}$  Homovanillinsäure im Urin pro Stunde) war in dem Intervall von 6-9 h nach Applikation von Zwiebeln, Spiraeosid und Buchweizen am höchsten. Nach Einnahme von Rutin verzögerte sich die Exkretion allerdings geringfügig und zeigte im Intervall 9-12 h die stärkste Ausscheidung pro Zeit. Obwohl von den einzelnen Probanden keine Leerwertsammlungen in Intervallen bis 48 h ohne Einnahme eines Prüfpräparates vorlagen, ließ sich trotzdem zeigen, dass es sich bei der erhöhten Ausscheidung nicht um endogene, circadiane Prozesse handelte. Verglich man etwa die Elimination im Intervall 12-24 h mit dem gleichen Intervall 24 h später (36-48 h), so zeigte sich deutlich, dass die Ausscheidungsmenge mit der Zeit sank. Wie unter Absatz 3.3.7 bereits dargestellt, entsprachen die renal eliminierten Mengen an Homovanillinsäure trotz der unterschiedlichen Dosierungen jeweils etwa maximal 15-20 % der applizierten Quercetinmenge. Selbst wenn von der renal eliminierten Homovanillinsäuremenge mehr

endogenen Ursprungs war, als mit Hilfe des Leerwerts berechnet wurde, so lag damit im Urin ein größerer Prozentsatz der Quercetindosis als Homovanillinsäure vor als als Quercetin- und Isorhamnetinkonjugate zusammengenommen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch SAWAI et al. (1987) bei der Untersuchung der intestinalen Metabolite von Rutin. Etwa 19 % der oral verabreichten Rutindosis wurden renal als Homovanillinsäure eliminiert (Tab. 1.4). Anders als bei Quercetin und Isorhamnetin, welche beide ausschließlich in konjugierter Form eliminiert wurden, lagen 85 % der Homovanillinsäure unkonjugiert vor. Insgesamt wurden etwa 50 % der Dosis in Form von intestinalen Metaboliten renal eliminiert (Sawai et al. 1987). Diese Ergebnisse unterstreichen die potentielle Bedeutung der intestinalen Metabolite im Hinblick auf einen pharmakologischen Effekt.

#### *Beurteilung der potentiellen Wirksamkeit der Metabolite*

Als Metabolite von Quercetin und Quercetinglykosiden sind bisher die Phase-I- und -II Metabolite des Quercetins (überwiegend Glucuronide von Quercetin und 3'-O-Methylquercetin) sowie intestinale Abbauprodukte im Plasma nachgewiesen worden. Nach dem bisherigen Kenntnisstand müsste also eine pharmakologische Wirkung *in vivo* nach Einnahme von quercetinhaltigen Zubereitungen auf diese Substanzen zurückzuführen sein. Die Eliminationshalbwertszeiten der Quercetinglucuronide von 11 h würden bei regelmäßiger Einnahme von quercetinhaltigen Zubereitungen zunächst zu einer Akkumulation und dann zu steady-state-Konzentrationen führen, die eine Wirksamkeit erklären könnten.

Bislang liegen nur wenige Untersuchungen zu den pharmakologischen Wirkungen dieser Metabolite vor. Obwohl gerade im Bereich der Phytopharmaka andere Wirkungen als die antioxidativen von größerer Bedeutung sind (z.B. der Beitrag zur antidepressiven Wirkung des Johanniskrauts, s. Butterweck et al. 2000), wurden bislang nur die antioxidativen Wirkungen untersucht. So wurde in verschiedenen Studien ein Anstieg der gesamten antioxidativen Kapazität des Plasmas nach Einnahme von flavonoidhaltigen Speisen beobachtet (McAnlis et al. 1997, McAnlis et al. 1999, Serafini et al. 1996, Serafini et al. 1998). Die Quercetinglucuronide als Reinsubstanzen zeigten *in vitro* einen antioxidativen Effekt auf die Kupferionen-induzierte LDL-Oxidation, der allerdings nur etwa halb so groß war wie der des Aglykons Quercetin (Manach et al. 1998). Die biologische Aktivität der Glucuronide war abhängig von der Bindungsstelle des Glucuronids, wobei die Quercetin-3'- und -4'-glucuronide die höchste Aktivität zeigten (Day et al. 2000). Dieser Effekt konnte allerdings mit Plasma, in dem nach Aufnahme von Zwiebeln hohe Glucuronidkonzentrationen nachgewiesen wurden, von verschiedenen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (McAnlis et al. 1999, Moon et al. 2000). Gleiches ergaben auch *In-vivo*-Studien nach Einnahme von Tee, in denen entgegen den Ergebnissen von *In-vitro*-Untersuchungen kein Oxidationsschutz von LDL beobachtet werden konnte (McAnlis et al. 1998, van het Hof et al. 1999). Grund dafür ist höchstwahrscheinlich die hohe Proteinbindung der Metabolite im Plasma. Für das Aglykon wurde eine Proteinbindung von über 99 % nachgewiesen (Boulton et al. 1998). Auch wenn die Bindungsrate der Glucuronide nicht bekannt ist, so ist demnach davon auszugehen, dass auch die Glucuronide weitgehend an Plasmaproteine gebunden vorliegen. Unterstützt wird diese Annahme auch durch die in dieser Studie ermittelten Daten

zur Kinetik der Quercetinglucuronide. Die renale Clearance von  $0,7 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$  ( $12 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ) deutet auf eine hohe Proteinbindung hin. Bei einer Bindungsrate von 90 % würde die renale Clearance etwa der glomerulären Filtrationsrate von  $125 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  entsprechen. Ob unter diesen Voraussetzungen mit einer nachweisbaren pharmakologischen Wirkung der Quercetinglucuronide gerechnet werden kann, ist fraglich.

Zu den Wirkungen der intestinalen Quercetinmetabolite gibt es bisher nur sehr wenige Untersuchungen (Merfort et al. 1996). In Kooperation mit Prof. Dr. R. Gebhardt, Universität Leipzig, wurden daher Untersuchungen zur *In-vitro*-Wirkung von intestinalen Quercetinmetaboliten durchgeführt. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch die intestinalen Metabolite starke antioxidative Eigenschaften zeigen. Die Bedeutung von Homovanillinsäure als potentielle wirksamkeitsmitbestimmende Komponente ist somit angesichts der hohen renalen Elimination nicht zu vernachlässigen.

Auf der Basis des aktuellen Kenntnisstandes kann die in epidemiologischen Untersuchungen und klinischen Studien (siehe Ihme et al. 1996, Kiesewetter et al. 2000) beobachtete Wirksamkeit nicht auf einzelne Substanzen oder Substanzgruppen der im Plasma nachweisbaren Metabolite zurückgeführt werden. Möglicherweise wirken die einzelnen Komponenten, dem phytotherapeutischen Wirkprinzip entsprechend, synergistisch. Ein anderer Ansatz, der zur Zeit im Rahmen einer Doktorarbeit am Zentralinstitut Arzneimittelforschung GmbH verfolgt wird, untersucht einen möglichen Turn-over der Glucuronide zu den Aglykonen am Venenendothel (siehe Abb. 1.3). Die dafür notwendige  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität wurde bereits in verschiedenen Geweben nachgewiesen (O'Leary et al. 2000, Shimoï et al. 2000, Wittig et al. 2000). Das frei werdende Quercetin könnte möglicherweise in die Zellen aufgenommen werden oder im Rahmen seiner antioxidativen Wirkung zu anderen Substanzen umgesetzt werden. Folglich wäre kein freies Quercetin im Plasma nachweisbar, die protektive Wirkung auf das Venenendothel aber trotzdem gegeben. Sollten sich die ersten Ergebnisse mit Modellsubstanzen auch für Quercetin bestätigen lassen, so wäre damit ein bedeutender „missing link“ zwischen Wirkungs- und Wirksamkeitsforschung hergestellt.

#### **4.2 In-vitro Resorptionsversuche am Schweinedarmmodell**

In den vorgestellten Untersuchungen sollte ermittelt werden, in wieweit ein *In-vitro*-Resorptionsmodell zur Charakterisierung von Resorptions- und Metabolismusvorgängen von Flavonoiden geeignet ist. Dafür wurden die Resorption und der Metabolismus von Quercetin und Quercetinglykosiden sowie Kämpferol und verschiedenen Kämpferolglucosiden untersucht. Darüber hinaus sollte anhand der in den Humanstudien applizierten Prüfpräparate überprüft werden, ob für diese Substanzen eine Korrelation zwischen der *In-vivo*- und *In-vitro*-Resorption besteht.

Die für die Resorptionsversuche verwendete modifizierte Franz-Zelle erwies sich in den eigenen Untersuchungen als ein schnelles, aussagekräftiges, wirtschaftliches und gut reproduzierbares Resorptionsmodell. Die Verwendung von frischem Schweinedarm vom Schlachthof wurde hinsichtlich Lebens- und Funktionsfähigkeit charakterisiert und erwies sich über eine Versuchsdauer von 45 min als geeignet.



## Metabolismus

Bei der Versuchsdurchführung erwies sich besonders die Durchführung paralleler Kontrollansätze als unverzichtbar. Die häufig sehr oxidationsempfindlichen Phenole sind unter den Versuchsbedingungen bei 37°C und Begasen mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>) teilweise chemisch nicht stabil. Ein Einfluss des Darmgewebes auf den Metabolismus der Testsubstanzen kann aber nur eingeschätzt werden, wenn der Einfluss externer Faktoren wie Licht, Sauerstoff, Temperatur und Medium bekannt ist. Angaben dazu fehlten allerdings in bisher durchgeführten Untersuchungen (Spencer et al. 1999).

Bei den vorgestellten Resorptionsversuchen mit Quercetin und Kämpferol sowie den jeweiligen Glykosiden war besonders die metabolisierende Kapazität des Darmes überraschend groß. Dabei spielten sowohl Art als auch Position des gebundenen Zuckers eine Rolle. Eine in Position C4' und C7 gebundene Glucose wurde nahezu vollständig abgespalten. Eine in Position C3 gebundene Glucose wurde hingegen nur zu etwa zwei Dritteln gespalten, und eine Rhamnose oder Rutinose in Position C3 schien gar nicht gespalten zu werden.

Beim Vergleich der Diglykoside ergab sich kein einheitliches Bild. Nach Applikation von Kämpferol-3,7-*O*-diglucosid auf den Darm wurde zwar, den Ergebnissen der Monoglucoside entsprechend, die Glucose an Position C7, nicht aber die an Position C3 gespalten. Bei zwei weiteren Versuchssubstanzen schien der Zucker in Position C3 allerdings die Spaltung anderer Zucker zu behindern. So wurde im Zwiebelextrakt zwar Quercetin-4'-glucosid fast vollständig gespalten, der Gehalt an Quercetin-3,4'-diglucosid änderte sich allerdings im Vergleich zum Kontrollansatz nicht. Bei Quercetin-3-*O*-rhamno-7-*O*-glucosid wurde die Glucose in Position C7 offenbar nicht vollständig abgespalten.

Die Versuche machten deutlich, dass vom Darmgewebe eine ausgeprägte Enzymaktivität ausging, die nicht auf die Versuchsbedingungen zurückzuführen war. Aufgrund der untersuchten Darmabschnitte (unter anderem oberste Dünndarmsegmente) und der Behandlung des Darmgewebes konnte davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um bakterielle Enzyme handelte. Über körpereigene  $\beta$ -Glykosidasen in der Darmwand ist bislang wenig bekannt. Die kürzlich vorgestellten Untersuchungen zur Lactase-Phlorizin-Hydrolase würden den eigenen Beobachtungen gut entsprechen (Day et al. 2000). Das Enzym spaltete an der mucosalen Darmwand Quercetinglucoside mit einer höheren Affinität zu Quercetin-4'-*O*-glucosid als Quercetin-3-*O*-glucosid. Zu anderen Quercetinglykosiden lagen noch keine Ergebnisse vor (Day et al. 2000). Weitere Kenntnisse beschränken sich auf intrazelluläre  $\beta$ -Glykosidasen im Enterocyten. Untersuchungen mit Rattendünndarm ergaben, dass die  $\beta$ -Glucosidase-Aktivität gegenüber Quercetinglykosiden in der Reihenfolge Quercetin-4'-glucosid  $\gg$  Quercetin-3-glucosid  $>$  Quercetin-7-glucosid  $>$  Quercetin-3-rutinosid abnahm (Ioku et al. 1998). In einer weiteren Studie wurden Quercetin-4'-glucosid und verschiedene (Iso)flavonoid-7-glucoside schnell von menschlichen  $\beta$ -Glucosidasen des Dünndarms gespalten. Quercetin-3,4'-diglucosid, Quercetin-3-glucosid, Kämpferol-3-glucosid und Quercetin-3-rutinosid wurden hingegen nicht gespalten (Day et al. 1998). Bezüglich einzelner Substanzen, z.B. Quercetin-3-glucosid, kommen diese Studien zwar zu unterschiedlichen Ergebnissen, die möglicherweise auf Speziesunterschiede

zurückzuführen sind. Dennoch sind deutliche Übereinstimmungen festzustellen. Quercetin-4'-glucosid wurde in allen untersuchten Enzymsystemen am schnellsten und intensivsten gespalten, Quercetin-3-rutinosid hingegen überhaupt nicht. Dies entsprach vollkommen den Ergebnissen der eigenen Untersuchungen.

In einem anderen Resorptionsmodell wurde an „everted rat gut sacs“ die Aufnahme und Metabolisierung von Quercetinglykosiden untersucht (Plumb et al. 2000). In diesem Modell wurden Quercetin-3-glucosid und -4'-glucosid von der mucosalen zur serosalen Seite transportiert. Der Transport erfolgte signifikant schneller als der des Aglykons Quercetin. Besonders die Tatsache, dass auch in diesem Modell Quercetin-3,4'-diglucosid schlechter transportiert wurde als die entsprechenden Monoglucoside, stimmte gut mit den eigenen Ergebnissen unter Verwendung der Franz-Zelle überein. In der serosalen Flüssigkeit konnten Quercetinglucuronide, nicht jedoch die getesteten Glucoside nachgewiesen werden, was deutlich auf die schnelle Deglykosidierung hinwies.

Die bestehenden Übereinstimmungen verschiedenster Untersuchungen führten zu der Frage, wo eine Spaltung der Glykoside stattgefunden haben könnte. Obwohl die Beobachtungen im mucosalen Überstand nahe legten, dass eine Spaltung an der luminalen Seite der Darmwand stattfand, gibt es dafür noch keine Belege. Es wäre ebenso denkbar, dass die Glykoside in den Enterocyten transportiert, dort von intrazellulären  $\beta$ -Glucosidasen gespalten und wieder sekretiert wurden. Für solche Sekretionsvorgänge in das Lumen gab es bereits verschiedene Anhaltspunkte. Im *In-Situ*-Perfusionsmodell mit Rattendünndarm wurden in der Zelle gebildete Quercetinglucuronide teilweise ins Lumen sezerniert (Crespy et al. 1999).

Untersuchungen mit Caco-2 Zellen führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Ein Transport von Quercetin oder Quercetinglykosiden zur basolateralen Seite wurde nicht beobachtet (Plumb et al. 2000, Walgren und Walle 1999). Allerdings wurden an der apikalen Seite verschiedene Quercetinglucuronide nachgewiesen, die auf eine Resorption und Metabolismus mit anschließender Sekretion an der apikalen Seite hindeuteten (Plumb et al. 2000). In einer anderen Untersuchung wurde Quercetin – und nicht die Glucuronide - mit Hilfe einer Efflux-Pumpe wieder aus den Zellen an der apikalen Seite an das Medium abgegeben. Dieser Effekt konnte allerdings unterbunden werden, wenn an der basolateralen Seite durch Verwendung von Blutplasma die Plasmaproteinbindung mit berücksichtigt wurde, so dass der Efflux *in vivo* offenbar keine Rolle spielt (Walgren und Walle 1999). In isolierten Zellsystemen und Modellen wie der Franz-Zelle sind solche Vorgänge aber offenbar zu beobachten.

Die Aussagekraft von diesen Untersuchungen mit Caco-2 Zellen für die *In-vivo*-Verhältnisse ist allerdings kritisch zu bewerten. Caco-2 Zellen fehlen häufig verschiedenste Enzymsysteme der intakten Gewebe. Die vorhandenen Daten legen aber die Beteiligung von luminalen Enzymen bei der Spaltung und Resorption von Quercetinglykosiden nahe. Solange diese Enzyme aber unbekannt sind (und damit auch unklar ist, ob die verwendeten Zelllinien diese Enzyme aufwiesen), scheint die Verwendung von Caco-2 Zelllinien wenig aussagekräftig zu sein. Die unterschiedliche Enzymausstattung der Caco-2 Zelllinien im Vergleich zu intakten Geweben sowie der Zelllinien untereinander könnte die widersprüchlichen Ergebnisse erklären.

Die Klärung der Lokalisation der Glucosidasen - intrazellulär oder membranständig an der luminalen Seite - ist eng verbunden mit der Frage, ob Quercetinglykoside oder nur das Aglykon über die Darmwand in den Enterocyten transportiert werden können. In den vorliegenden Untersuchungen wurden offensichtlich Flavonolglykoside teilweise sowohl im Darmgewebe als auch im Resorbat nachgewiesen, was für eine Aufnahme von Glykosiden sprechen würde. Zu einem ähnlichen Ergebnis führten Untersuchungen mit perfundiertem Rattendünndarm, in denen ein bedeutender Teil des untersuchten Quercetin-3-glucosids unverändert in den Zellen nachgewiesen wurde (Spencer et al. 1999). Es muss allerdings kritisch angemerkt werden, dass die Identifikation der Flavonolglykoside im Darm und Resorbat der eigenen Untersuchungen nur auf der Basis der Retentionszeiten und UV-Spektren erfolgte. Aufgrund des kurzen HPLC-Gradienten lagen dabei die Retentionszeiten ähnlicher Substanzen eng beieinander (Tab. 2.5). Da die entsprechenden Glucuronide als Referenzsubstanzen nicht zur Verfügung standen, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es sich möglicherweise ebenfalls um Glucuronide anstelle der Glykoside handelte.

### *Resorption*

In den verschiedenen Versuchsreihen konnten teilweise sowohl die applizierten Referenzsubstanzen als auch deren Metabolite im Darm und Resorbat nachgewiesen werden. Entsprachen die detektierten Substanzen in ihrer Retentionszeit und Spektren den eingesetzten Referenzsubstanzen, so wurden sie als identisch angesehen. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass eine Identifikation von Flavonolglykosiden anhand der Retentionszeiten und UV-Spektren zu Fehlinterpretationen führen kann. Der Schwerpunkt dieser Untersuchungen lag daher nicht darauf, zu entscheiden, ob Flavonolglykoside unverändert im Darm oder Resorbat nachgewiesen werden können. Vielmehr sollte gezeigt werden, welcher molare Anteil der Ausgangsmenge mit intaktem Flavonolgrundkörper in den einzelnen Kompartimenten nachweisbar war.

Die vorliegenden Ergebnisse lieferten einige Anhaltspunkte bezüglich eines möglichen Resorptionsmechanismus. So wurde Quercetin-4'-glucosid (Spiraeosid) nahezu vollständig gespalten, und 6,7 % der Dosis wurden als Quercetin im Darm nachgewiesen. Die Resorptionsversuche mit Kämpferol und Kämpferolglucosiden zeigten ähnliche Resultate wie die Versuche mit Quercetin(glykosiden). Die geringste Resorption zeigte sich wiederum bei dem Aglykon Kämpferol in der Untersuchungslösung. Überdurchschnittlich viel Substanz (über 9 %) wurde nach Applikation von Kämpferol-7-glucosid resorbiert, das vollständig zu Kämpferol gespalten wurde. Diese Resorptionsquoten waren in dem verwendeten statischen Modell als sehr hoch einzustufen (Nolte 1998).

Bei der Interpretation der beobachteten Resorptionsvorgänge musste allerdings beachtet werden, dass eine vollständige Entfernung der Mucusschicht bei der Präparation des Dünndarms nicht möglich war (Nolte 1998). Es wäre daher möglich, dass die unter Absatz 4.1 erwähnten Eigenschaften des Mucus die Resorption der Glykoside im *In-vitro*-Modell gleichermaßen beeinflussten. Demnach würde der verbliebene Mucus aufgrund ihrer Lipophilie eine Barriere für die Aglykone darstellen. Seine Ausschlussgrenze von 600-

700 g·mol<sup>-1</sup> würde den Diglykosiden mit ihren Molekülgrößen von >600 g·mol<sup>-1</sup> den Transport zum Darmepithel erschweren. Am Darmepithel würden die untersuchten Glykoside dann mit unterschiedlicher Affinität zu den einzelnen Bindungsstellen gespalten.

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass eine Spaltung der Quercetin- und Kämpferolglykoside an ihre Aufnahme in den Darm gekoppelt zu sein schien. Die in Position C4' und C7 gebundenen Glucoside, die nahezu vollständig gespalten wurden, wurden auch am besten resorbiert. Möglicherweise liegt ein Cotransport von Glucose und dem freiwerdenden Aglykon vor. Dem verwendeten Krebs-Carbonat-Puffer wurde absichtlich keine Glucose zugesetzt, um einen möglichen Einfluss der nach Spaltung freiwerdenden Glucose auf den Transport von Flavonoiden erkennen zu können. In zukünftigen Versuchen sollte deshalb gezielt Glucose zugesetzt werden, um zu überprüfen, ob sich dadurch die Resorption der Aglykone steigern lässt.

Analog zu den Ergebnissen der Humanstudie war auch im *In-vitro*-Modell ein deutlicher resorptionsfördernder Einfluss der Pflanzenmatrix des Buchweizenkrauts zu beobachten. In den Resorptionsversuchen mit Rutin und Buchweizenkraut wurde darauf geachtet, dass etwa äquimolare Mengen Rutin in beiden Versuchsreihen eingesetzt wurden. Nach Versuchsende unterschied sich die Rutinmenge im mucosalen Überstand nicht und betrug in beiden Versuchsreihen etwa 90 % der ursprünglich eingesetzten Menge. Aus Buchweizenkraut wurden jedoch insgesamt etwa dreimal so viele Quercetinäquivalente wie aus der vergleichbaren Menge Rutin resorbiert. Möglicherweise war die Ursache für eine erhöhte Resorption eine verbesserte Löslichkeit des Rutins im Buchweizenkrautextrakt im Vergleich zur Reinsubstanz Rutin in Pufferlösung (Hagels 1996). Diese lösungsvermittelnden Faktoren der Pflanzenmatrix könnten gleichzeitig durch Herabsetzen der Mucusviskosität den Transport von Rutin durch den Mucus erleichtern und so die Resorption erhöhen.

#### *In-vitro / In-vivo Korrelation*

Zwischen den Resorptionsversuchen *in vitro* und den Humanstudien zur relativen systemischen Verfügbarkeit von Quercetin und Quercetinglykosiden gab es verschiedene Übereinstimmungen:

- In beiden Untersuchungen wurde das Aglykon Quercetin am Schlechtesten resorbiert.
- Die Resorption konnte durch Applikation von Glykosiden anstelle des Aglykons deutlich erhöht werden.
- Von den applizierten Glykosiden wurde Quercetin-4'-O-glucosid am Besten resorbiert, Quercetin-3-O-rutinosid (Rutin) dagegen am Schlechtesten.
- Im Vergleich von Reinsubstanz mit Pflanzenextrakt zeigte sich im Falle von Rutin eine (etwa dreifach) höhere Resorption aus dem Extrakt.

Unterteilte man also die im Humanversuch applizierten Prüfpräparate auf der Basis ihrer relativen Bioverfügbarkeit *in vivo* in schlecht resorbierbar (= Quercetin), mäßig resorbierbar (= Rutin und Buchweizenkraut) und gut resorbierbar (= Spiraeosid), so lieferten die *In-vitro*-

Resorptionsversuche am Schweinedarmmodell die gleichen Resultate. Basierend auf diesen Ergebnissen zeigte sich für die untersuchten Quercetinglykoside eine gute *In-vitro* / *In-vivo* Korrelation. Das Modell schien daher für die Einschätzung der Resorption von Flavonolen und deren Glykosiden geeignet zu sein. Das Resorptionsverhalten anderer Flavonoide und Phenole wird zur Zeit im *In-vitro*-Resorptionsmodell überprüft. Bisher liegen aber zu wenige Daten zur systemischen Verfügbarkeit anderer Flavonoid-Aglykone und deren Glykoside im Menschen vor, die weitere Vergleiche mit dem *In-vitro*-Resorptionsmodell ermöglichen würden.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen der **Methodenentwicklung** wurde eine Extraktionsmethode für Plasma und Urin erarbeitet. Damit gelang erstmals die simultane Extraktion der intestinalen sowie der Phase-I- und Phase-II-Metabolite des Quercetins.

Zur **Analytik** von Quercetin sowie seiner Metabolite wurde eine HPLC-Methode mit einem neuartigen analytischen Detektionsverfahren entwickelt. Die coulometrische Array-Detektion ermöglichte erstmals eine ausreichend sensitive und selektive Detektion der systemisch verfügbaren Quercetinmetabolite in Plasma und Urin.

Die **systemische Verfügbarkeit und Pharmakokinetik von Quercetin sowie der Quercetinglykoside** Quercetin-3-O-(6-O-rhamnosyl)-glucosid (Rutin) und Quercetin-4'-O-glucosid (Spiraeosid) wurde im Rahmen von zwei klinischen Single-dose Studien in gesunden Probanden untersucht.

In einer ersten Pilotstudie wurde das Aglykon Quercetin in den Dosierungen 200 mg und 1000 mg verabreicht. Weiterhin wurden Rutin und Spiraeosid (entsprechend 200 mg Quercetin) in Form von pflanzlichen Zubereitungen aus Buchweizenkraut und Zwiebeln, die große Mengen der jeweiligen Glykoside enthielten, eingenommen.

In der Hauptstudie wurde die Bioverfügbarkeit der Glykoside aus der Pflanzenmatrix mit der von Reinsubstanzen verglichen. Für die Hauptstudie wurde ein Vierfach-Cross-over Design mit 2-tägiger run-in Phase bei flavonoidfreier Diät einem 24 h-wash-out Intervall nach jedem Studientag gewählt. An der Studie nahmen 12 gesunde Probanden teil. Als Prüfpräparate wurden Rutin und Buchweizenkraut (jeweils entsprechend 200 mg Quercetin) sowie Spiraeosid und eine Zwiebelzubereitung (jeweils entsprechend 100 mg Quercetin) verabreicht.

Die **systemische Verfügbarkeit von Quercetin** lag bei 0 %. Freies Quercetin konnte weder im Plasma noch im Urin oberhalb einer Bestimmungsgrenze von  $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  bzw.  $23 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  nachgewiesen werden.

Die **systemische Verfügbarkeit der applizierten Quercetinglykoside** war ebenfalls 0 %. Mittels HPLC-MS/MS konnte gezeigt werden, dass es sich bei den detektierten Quercetinkonjugaten im Plasma nicht um die genuinen Glykoside handelte.

Bei den **bioverfügbaren Quercetinmetaboliten** handelte es sich um Quercetinkonjugate. Der Metabolismus zu den verschiedenen Quercetinkonjugaten schien - unabhängig von der Art des applizierten Quercetinglykosids - identisch zu sein. Mittels HPLC-MS/MS wurden 4 bis 5 verschiedene Quercetin-Monoglucuronide identifiziert. Darunter befand sich ein Quercetinglucuronid als Hauptmetabolit mit parallelem kinetischem Verlauf zum Gesamtquercetiningehalt. Die Quantifizierung des Quercetins fand nach enzymatischer Hydrolyse und Bestimmung des Gesamtquercetiningehaltes statt. Aufgrund der parallelen Plasmakonzentrations-Zeit-Profile des Hauptmetaboliten und des Gesamtquercetiningehalts

nach Hydrolyse konnte die pharmakokinetische Auswertung der Konjugate anhand des Gesamtquercetingehalt durchgeführt werden.

Als einziger Phase-I-Metabolit mit intaktem Flavonoidgerüst konnte nach Hydrolyse Isorhamnetin (3'-O-Methylquercetin) nachgewiesen werden, dessen Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe sowohl in der Absorptions- als auch der Eliminationsphase parallel zu denen des Quercetins verliefen, wobei die Isorhamnetinkonzentrationen etwa 10fach geringer waren.

In der **Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik der Quercetinmetabolite** ergaben sich deutliche Unterschiede nach Applikation der Reinsubstanzen bzw. der pflanzlichen Zubereitungen. Nach Applikation des Aglykons Quercetin war die Resorption von Quercetin äußerst gering. Die systemische Verfügbarkeit der Quercetinglucuronide lag, gemessen an den maximalen Plasmaspiegeln und der renalen Elimination, etwa um das 10fache niedriger im Vergleich zur Applikation von Buchweizenkraut und etwa um das 100fache niedriger im Vergleich zur Applikation von Zwiebeln. Die Resorption von Quercetin nach Applikation von 200 mg und 1000 mg des Aglykons zeigte darüber hinaus keine Dosislinearität.

Nach Applikation von Quercetin-4'-O-glucosid in Form von Spiraeosid (S) und Zwiebeln (Z) erfolgte die Resorption sehr schnell. So war Quercetin bereits nach 15 min im hydrolysierten Plasma nachweisbar. Nach Einnahme von Zwiebeln waren maximale Plasmaspiegel [ $c_{\max}$ ] von  $2,3 \pm 1,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  nach  $0,7 \pm 0,2 \text{ h}$  [ $t_{\max}$ ](MW $\pm$ SD) erreicht, nach Spiraeosidapplikation entsprach  $c_{\max}$   $2,1 \pm 1,6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  zum Zeitpunkt  $t_{\max}$   $0,7 \pm 0,3 \text{ h}$ . In keinem der untersuchten pharmakokinetischen Parameter ergab sich zwischen den beiden Applikationen ein statistisch signifikanter Unterschied.

Die Quercetinkonzentrationen im Plasma zeigten nach Aufnahme von Zwiebeln und Spiraeosid einen deutlich biphasischen Verlauf, die terminale Eliminationsphase erfolgte erst in dem Zeitraum von 9 h bzw. 12 h bis 24 h. Dies unterstreicht die Bedeutung von ausreichend langen Blutentnahmezeiträumen kombiniert mit einer hochempfindlichen Analytik und erklärt die in der Literatur angegebenen, teilweise sehr kurzen Halbwertszeiten für Quercetin im Plasma.

Nach Applikation des Quercetin-3-O-rutinosids in Form von Buchweizenkraut (B) und Rutin (R) lagen die Werte für  $c_{\max}$  trotz doppelter Quercetindosis signifikant niedriger im Vergleich zum Quercetin-4'-O-glucosid (B:  $0,6 \pm 0,7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , R:  $0,3 \pm 0,3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Gleiches gilt für die  $\text{AUC}_{0-t}$  (MW für Z:  $9,7 \text{ h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , S:  $8,4 \text{ h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , B:  $3,8 \text{ h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , R:  $2,5 \text{ h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).  $T_{\max}$  wurde im Falle von Buchweizenkraut erst nach  $4,3 \pm 1,8 \text{ h}$  erreicht, bei Rutin nach  $7,0 \pm 2,9 \text{ h}$ . Im Vergleich von Buchweizenkraut zur Reinsubstanz Rutin zeigte sich nach Applikation von Rutin eine ausgeprägtere Resorptionsverzögerungszeit (lag time), verbunden mit einem späteren Erreichen maximaler Plasmaspiegel. Die erreichten maximalen Quercetinplasmaspiegel nach Applikation von Rutin lagen durchschnittlich um die Hälfte niedriger als nach Applikation von Buchweizenkraut. Der Unterschied war allerdings aufgrund hoher interindividueller Variabilität nicht statistisch signifikant.

Die **terminale Halbwertszeit** betrug nach Aufnahme aller 4 Prüfpräparate in der Hauptstudie etwa 11 h. Unterschiede ergaben sich demnach nur in Geschwindigkeit und Ausmaß der Resorption.

Ebenso war die **renale Elimination** der verschiedenen Quercetinkonjugate sehr ähnlich. Die renale Clearance betrug nach Applikation aller 4 Prüfpräparate etwa  $0,7 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ . Da es sich unabhängig vom Prüfpräparat um die Elimination der gleichen Quercetinkonjugate handelte, ergaben sich hierbei erwartungsgemäß keine Unterschiede zwischen den einzelnen Prüfpräparaten. Im Urin waren ebenfalls verschiedene Konjugate von Quercetin und Isorhamnetin nachweisbar. Bezogen auf die aufgenommene Quercetindosis (100 bzw. 200 mg) betrug die renal eliminierte Quercetinmenge in der Hauptstudie nach Aufnahme von Zwiebeln  $4,4\pm 1,6 \%$  der Dosis, von Spiraeosid  $3,3\pm 1,3 \%$ , von Buchweizenkraut  $0,8\pm 0,6 \%$  und von Rutin  $0,7\pm 0,6 \%$ .

Bezogen auf die Prüfpräparate war die **interindividuelle Variabilität** trotz einheitlicher Ernährung und stationärer Aufnahme der Probanden in der Hauptstudie sehr hoch. Betrachtete man jedoch jeden Probanden einzeln, so zeigte sich zumeist die gleiche Abfolge der pharmakokinetischen Parameter der 4 Prüfpräparate. Ein Proband mit sehr hohen  $c_{\max}$ -Werten nach Aufnahme von Zwiebeln hatte demnach in der Reihenfolge Zwiebel  $\geq$  Spiraeosid  $\gg$  Buchweizenkraut  $>$  Rutin auch vergleichsweise hohe Plasmakonzentrationen nach Aufnahme von Rutin. Dieses Verhältnis der Prüfpräparate zueinander zeigte sich auch bei Probanden mit insgesamt sehr viel niedrigeren Plasmakonzentrationen nach Gabe aller 4 Prüfpräparate. Aus diesen unterschiedlichen Größenordnungen resultierte die hohe interindividuelle Variabilität. Die hieraus gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass ein Cross-over-Design bei der Untersuchung pflanzlicher Phenole im Menschen unerlässlich ist.

Die Ergebnisse der **In-vitro-Resorptionsversuche** an Dünndarmsegmenten des Schweins in einer modifizierten Franz-Zelle zeigten große Übereinstimmungen mit den Resultaten der Humanstudien. Die Resorption der untersuchten Prüfpräparate nahm in der Reihenfolge Spiraeosid  $\geq$  Zwiebel  $>$  Buchweizenkraut  $>$  Rutin  $\gg$  Quercetin ab.

Quercetin- und Kämpferol-Monoglucoside mit in Position C4' oder C7 gebundener Glucose wurden vom Darmgewebe vollständig zum Aglykon gespalten. Bei in Position C3 gebundener Glucose fand eine teilweise Spaltung statt, Rhamnose oder Rutinose wurden nicht gespalten. Dies entspricht weitgehend den aus Literaturangaben bekannten Ergebnissen, die mit intrazellulären und membrangebundenen  $\beta$ -Glucosidasen des Dünndarms von Ratten und Menschen erzielt wurden.

Die Ergebnisse der Humanstudien und der *In-vitro*-Versuche zeigten für die untersuchten Prüfpräparate eine gute **In-vitro / In-vivo Korrelation**. Die verwendete modifizierte Franz-Zelle stellte somit ein schnelles, aussagekräftiges, wirtschaftliches und gut reproduzierbares *In-vitro*-Resorptionsmodell dar. Die Aussagekraft des Modells für die Einschätzung der Resorption anderer Flavonoide und Phenole muss in weiteren Untersuchungen überprüft werden.



Weitgehend ungeklärt ist der **Resorptionsmechanismus von Quercetin** bzw. seinen Glykosiden. Der im Rahmen dieser Arbeit postulierte Erklärungsansatz geht davon aus, dass die Spaltung der Quercetinglykoside an der luminalen Seite erfolgt, wobei die beteiligten Enzyme eine höhere Affinität zu Glucosiden als zu Rutinosid zu haben scheinen. Das freiwerdende Quercetin diffundiert offenbar passiv in den Enterocyten. Die Resorption des Rutins sowie des applizierten Aglykons wird möglicherweise durch den Mucus behindert, der den Transport des im Vergleich zu den Glykosiden lipophileren Quercetins durch die Mucusschicht zum Darmepithel und den von Rutin aufgrund seiner Molekülgröße erschwert. Das applizierte Aglykon ist zudem bei den im Dünndarm vorherrschenden pH- und Temperaturbedingungen chemisch instabil. In unteren Darmabschnitten wird die Rutinose unter Mitwirkung der Mikroflora gespalten. Durch die lokal erhöhten Konzentrationen und die günstigeren pH-Bedingungen im Dickdarm könnte das entstehende Quercetin teilweise resorbiert werden. Die Resorption aus Buchweizenkraut wird möglicherweise durch lösungsvermittelnde Co-Faktoren in der Pflanzenmatrix erhöht, die einerseits die Löslichkeit des Rutins verbessern und andererseits die Viskosität des Mucusschleims herabsetzen könnten.

Ebenso ungeklärt ist die **pharmakodynamische Wirkung** der nachgewiesenen Quercetinmetabolite. Aufgrund der hohen Plasmaproteinbindung scheinen die Quercetinglucuronide ihre Wirkungen, die sie in Enzymassays zeigten, *in vivo* nicht ausüben zu können. Auch die intestinal entstehenden Quercetinmetabolite zeigten *in vitro* eine antioxidative Wirkung, über ihr Wirkungspotential im Plasma ist aber noch sehr wenig bekannt. Die beobachtete klinische Wirksamkeit lässt sich daher auf der Basis des aktuellen Kenntnisstands nicht auf bestimmte Substanzgruppen zurückführen. Möglicherweise muss aber die pharmakodynamische Wirkung nicht allein von den im Plasma zirkulierenden Quercetinmetaboliten ausgehen. Zur Zeit wird untersucht, ob die zirkulierenden Glucuronide am Wirkort (z.B. dem Endothel) wieder zum Aglykon gespalten werden. Eine  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität wurde bereits in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Der Nachweis eines turnovers vom Glucuronid zum Aglykon am Wirkort würde einen bedeutenden „missing link“ zwischen Wirkungsforschung *in vitro* und *in vivo* herstellen. Zukünftige Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik pflanzlicher Phenole sollten daher Versuche zur Klärung der Resorptionsmechanismen und der Wirkungsmechanismen miteinbeziehen.

## 6 Summary

In the course of **method development** a sample preparation procedure for both plasma and urine samples was developed. For the first time this method enabled the simultaneous extraction of intestinal as well as phase-I and phase-II metabolites of quercetin.

For the **analysis** of quercetin and its metabolites an HPLC method combined with a new analytical detection method was developed. The coulometric array detection provided a sensitive and selective determination of systemically available metabolites in plasma and urine.

The **systemic availability and pharmacokinetics of quercetin and its glycosides** quercetin-3-*O*-rutinoside (rutin) and quercetin-4'-*O*-glucoside (spiraeoside) was investigated in two clinical single dose studies in healthy volunteers. In the pilot study the aglycone quercetin was administered at 200 mg and 1000 mg. Furthermore, rutin and spiraeoside were administered (both equivalent to 200 mg quercetin aglycone) in form of herbal preparations of buckwheat tea (*Fagopyrum esculentum*) and an onion supplement (*Allium cepa*), which contained large amounts of the corresponding glycosides.

In order to compare the bioavailability of the glycosides, the two glycosides were then administered both as pure compounds and in form of the equivalent herbal preparations. The design of the study was a randomized, four-way cross-over design with a 2day run-in phase on a flavonoid-free diet and a 24 h wash-out period between each application. 12 healthy volunteers participated in the study. Rutin and buckwheat tea were both administered at doses equivalent to 200 mg quercetin aglycone, spiraeoside and the onion supplement equivalent to 100 mg quercetin aglycone.

The **systemic availability of quercetin** was 0 %. No free quercetin could be detected in plasma above 2 ng·mL<sup>-1</sup> or urine above 23 ng·mL<sup>-1</sup>, respectively.

The **systemic availability of quercetin glycosides** was also 0 %. It could be shown by means of HPLC-MS/MS analysis that the genuine quercetin glycosides were not present in plasma.

The **bioavailable quercetin metabolites** were identified as quercetin conjugates. The metabolic pathways to various quercetin conjugates seemed to be identical and were independent of the administered glycoside. Four to five different quercetin monoglucuronides could be identified by HPLC-MS/MS. One of these glucuronides represented the main metabolite which showed a parallel concentration-time-profile compared to total quercetin concentrations. The quantification of quercetin was based on the total quercetin concentrations determined after hydrolysis of quercetin conjugates. Due to the parallel plasma concentration - time profiles of the main metabolite and the total quercetin content after hydrolysis, the pharmacokinetic analysis of quercetin glucuronides could be performed on the basis of the total quercetin concentrations. Isorhamnetin (3'-*O*-methylquercetin) was

the only phase-I metabolite with an intact flavonoid structure detectable after hydrolysis of plasma and urine samples. The plasma concentration-time profiles were parallel to those of quercetin both in the absorption and the elimination phase. Total isorhamnetin concentrations in plasma were about 10fold lower than the corresponding total quercetin concentrations.

The **bioavailability and pharmacokinetics of quercetin metabolites** were distinctly different after application of the isolated compounds and herbal preparations, respectively. The absorption of quercetin after administration of quercetin aglycone was extremely poor. Considering maximum plasma concentrations and renal elimination of quercetin glucuronides, the systemic availability of quercetin glucuronides was 10fold lower compared to buckwheat tea intake and 100fold lower compared to onions. Furthermore, the absorption of quercetin aglycone did not show any dose linearity after intake of 200 mg and 1000 mg quercetin.

The absorption of quercetin-4'-*O*-glucoside after administration of spiraeoside (S) and the onion supplement (Z) was extremely fast. Quercetin could already be detected in hydrolyzed plasma 15 min after administration. After intake of onions maximum plasma concentrations [ $c_{\max}$ ] of  $2.3 \pm 1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  were reached after  $0.7 \pm 0.2 \text{ h}$  [ $t_{\max}$ ](mean $\pm$ SD), after intake of spiraeoside  $c_{\max}$  was  $2.1 \pm 1.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  at time  $t_{\max}$   $0.7 \pm 0.3 \text{ h}$ . There was no statistically significant difference in any of the pharmacokinetic parameters between the two applications. After intake of onions and spiraeoside quercetin concentrations showed a biphasic profile, and the terminal elimination phase set in after 9 to 12 h. This emphasized the significance of long blood sampling periods combined with a highly sensitive detection method and explains short elimination half lives of quercetin in plasma as previously published.

Despite the double quercetin intake maximum plasma concentrations were significantly lower after administration of quercetin-3-*O*-rutoside in form of buckwheat tea (B) and rutin (R) compared to quercetin-4'-*O*-glucoside (B:  $0.6 \pm 0.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , R:  $0.3 \pm 0.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). The same accounts for the  $\text{AUC}_{0-t}$  (mean for Z:  $9.7 \text{ h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , S:  $8.4 \text{ h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , B:  $3.8 \text{ h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , R:  $2.5 \text{ h}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). After intake of buckwheat tea  $t_{\max}$  was reached after  $4.3 \pm 1.8 \text{ h}$ , and at  $7.0 \pm 2.9 \text{ h}$  after intake of rutin.

When comparing the buckwheat tea preparation to the pure compound rutin, a profound lag time was only observed after rutin administration which resulted in later time points for  $t_{\max}$ . Maximum plasma concentrations reached in average only about half of the values obtained after intake of buckwheat tea. However, due to high interindividual variability the difference was not statistically significant.

The **terminal elimination half life** was about 11 h after intake of all four preparations. Thus, differences could only be observed with regard to the rate and extent of absorption.

Furthermore, the **renal elimination** was similar for all 4 preparations and thus independent of the administered glycoside. Consequently, the renal clearance was very constant with  $0.7 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$  for all four preparations. Different conjugates of quercetin and isorhamnetin were also detected in urine. With regard to quercetin intake (100 mg and 200 mg, respectively) the renally eliminated amount of the dose was  $4.4\pm 1.6\%$  of the onion supplement,  $3.3\pm 1.3\%$  of spiraeoside,  $0.8\pm 0.6\%$  of buckwheat tea, and  $0.7\pm 0.6\%$  of rutin.

Despite the controlled diet of the hospitalized subjects the **interindividual variability** was considerably high. However, when regarding each subject individually, the pharmacokinetic parameters of the four treatments were often ranked alike. Thus, a subject with a high  $c_{\text{max}}$  concentration after intake of onions also had considerably high maximum plasma concentrations after intake of rutin, in the order of onions  $\geq$  spiraeoside  $\gg$  buckwheat tea  $>$  rutin. This ranking among the four preparations was also evident in subjects with overall very low plasma concentrations after intake of each of the four preparations. These differences in magnitude led to high interindividual variability. Consequently, a cross-over design is a prerequisite for further investigations of plant phenolics in humans.

The results from the ***in-vitro* model** using porcine small intestine in a modified Franz cell agreed well with the results from the human studies. The absorption of the investigated preparations in this model also decreased in the order of spiraeoside  $\geq$  onions  $>$  buckwheat tea  $>$  rutin  $\gg$  quercetin.

Quercetin- and kaempferol monoglucosides with a glucose in position C4' or C7 were completely cleaved to the aglycone by the intestine. The cleavage of a glucose bound at the C3-position was incomplete, a rhamnose or rutinose was not cleaved. This corresponded well with published results carried out with intracellular or membrane bound  $\beta$ -glucosidases in rat or human intestine.

The results from the human and *in-vitro* studies showed a good ***in-vitro/in-vivo* correlation** for the investigated preparations. Thus, the modified Franz cell represented a fast, meaningful, economical, and reproducible *in-vitro* absorption model. The significance of the model for the absorption of other flavonoids and phenolics has to be further evaluated.

The **mechanism of absorption** of quercetin or its glycosides is still unclear. A possible approach that has been postulated in the course of these investigations assumes that the cleavage of glycosides occurs at the luminal side. The enzymes involved seem to have a higher affinity for the glucosides than rutinose. Apparently, the released quercetin aglycone diffuses passively across the brush border. The absorption of rutin as well as the administered aglycone is possibly hindered by the intestinal mucus layer. The transport through the mucus towards the intestinal wall is thus more difficult for the lipophilic quercetin and also for rutin (due to its molecular weight) than for quercetin monoglucosides. Furthermore, the administered aglycone is chemically unstable in the pH- and temperature conditions of the small intestine. In the lower intestine, the rutinose is cleaved under the influence of bacterial microflora. This may result in increased local concentrations which stimulate diffusion through the mucus and across the brush border. The fact that the

released quercetin is more stable in the pH-environment of lower parts of the intestine may contribute to increased absorption. The absorption from a buckwheat tea preparation compared to the pure compound may be increased due to co-factors in the plant matrix which do not only increase the solubility of rutin but also decrease the viscosity of the mucus layer.

The **pharmacodynamic effect** of the detected quercetin metabolites is also still unclear. Whereas quercetin glucuronides retained about half of the antioxidant activity compared to quercetin in *in-vitro* assays, this capacity was no longer observed *in vivo*, most likely due to high plasma protein binding. The intestinal metabolites also showed considerable antioxidant effects. Yet little is known about their potential effectiveness *in vivo*. Based on our knowledge today, the observed clinical efficacy can not be related to specific (groups of) compounds. However, the pharmacodynamic effect is not necessarily exerted by those metabolites that can be detected in plasma. It is presently under investigation whether quercetin glucuronides are deglucuronidated at the site of action (e.g. the endothelium). Various tissues are known for having profound  $\beta$ -glucuronidase activity. A turnover of the glucuronide to the aglycone at the site of action would provide a significant link between *in-vitro* effects and *in-vivo* studies. Further studies on the bioavailability and pharmacokinetics of plant phenolics should thus also include investigations on the mechanisms of absorption and pharmacodynamic effects.

## 7 Literatur

- Ader, P., Wessmann, A. und Wolfram, S. (2000). Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radic Biol Med* 28: 1056-1067.
- Ames, B.N. und Gold, L.S. (1995). The causes and prevention of cancer: gaining perspective. *Environ Health Perspect* 105 (Suppl 4): 865-873.
- Andrew, B. (1999). Methodenentwicklung zur Extraktion von Quercetin und dessen renalen Metaboliten aus Urin - Humanstudie zur Pharmakokinetik von Urin. Diplomarbeit. Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Andrew, B., Teltscher, K., Graefe, E.U., Wittig, J. und Veit, M. (1999). Bestimmung von Quercetin und seinen Metaboliten in menschlichem Urin: Methodenentwicklung und Validierung. *Arch Pharm Pharm Med Chem* 331 (Suppl. 1): 72.
- Aziz, A.A., Edwards, C.A., Lean, M.E. und Crozier, A. (1998). Absorption and excretion of conjugated flavonols, including quercetin-4'-O-beta-glucoside and isorhamnetin-4'-O-beta-glucoside by human volunteers after the consumption of onions. *Free Radic Res* 29: 257-269.
- Baba, S., Furuta, T., Horie, M. und Nakagawa, H. (1981). Studies on drug metabolism by use of isotopes XXVI: Determination of urinary metabolites of rutin in humans. *J Pharm Sci* 70: 780-782.
- Block, G., Patterson, B. und Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr Cancer* 18: 1-29.
- Bokkenheuser, V.D., Winter, J., Cohen, B.I., O'Rourke, S. und Mosbach, E.H. (1987). Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal bacteroides from humans. *Biochem J* 248: 953-956.
- Booth, A.N. und Williams, R.T. (1963). Dehydroxylation of catechol acids by intestinal contents. *Biochem J* 88: 66-67.
- Boulton, D.W., Walle, U.K. und Walle, T. (1998). Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J Pharm Pharmacol* 50: 243-249.
- Brown, S. und Griffiths, L.A. (1983). New metabolites of the naturally-occurring mutagen, quercetin, the pro-mutagen, rutin and of taxifolin. *Experientia* 39: 198-200.
- Butterweck, V., Jurgenliemk, G., Nahrstedt, A. und Winterhoff, H. (2000). Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med* 66: 3-6.
- Conquer, J.A., Maiani, G., Azzini, E., Raguzzini, A. und Holub, B.J. (1998). Supplementation with quercetin markedly increases plasma quercetin concentration without effect on selected risk factors for heart disease in healthy subjects. *J Nutr* 128: 593-597.
- Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C. und Remesy, C. (1999). Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol* 277: 120-126.
- Day, A.J., Canada, F.J., Diaz, J.C., Kroon, P.A., McLauchlan, R., Faulds, C.B., Plumb, G.W., Morgan, M.R. und Williamson, G. (2000). Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 468: 166-170.

- Day, A.J., DuPont, M.S., Ridley, S., Rhodes, M., Rhodes, M.J., Morgan, M.R. und Williamson, G. (1998). Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity. *FEBS Lett* 436: 71-75.
- Day, A.J., Bao, Y., Plumb, G.W., Kroon, P.A., O'Leary, K.A., Morgan, M.R.A. und Williamson, G. (2000). Quercetin glucuronidation and effect of conjugation position on biological activity. In: Martens, S., Treuter, D., Forkman, G. (eds) *Polyphenols Communications 2000*: 403-404.
- De Smet, P.A. und Brouwers, J.R. (1997). Pharmacokinetic evaluation of herbal remedies. Basic introduction, applicability, current status and regulatory needs. *Clin Pharmacokinet* 32: 427-436.
- de Vries, J.H., Hollman, P.C., Meyboom, S., Buysman, M.N., Zock, P.L., van Staveren, W.A. und Katan, M.B. (1998). Plasma concentrations and urinary excretion of the antioxidant flavonols quercetin and kaempferol as biomarkers for dietary intake. *Am J Clin Nutr* 68: 60-65.
- Deprez, S., Buffnoir, S., Scalbert, A. und Rolando, C. (1997). Isotopic labelling of proanthocyanidins. *Analisis Magazine* 25: M 43-46.
- Derendorf, H. und Garrett, E.R. (1987). *Pharmakokinetik: Einf. in d. Theorie u. Relevanz für d. Arzneimitteltherapie*. Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft, Stuttgart.
- Drieu, K., Moreau, J.-P., Eck, C.-R., McCabe, J. und Skinner, S. (1985). Animal distribution and preliminary human kinetic studies of the flavonoid fraction of a standardized *Ginkgo biloba* extract (GBE 761). In: Farkas, L., Gabor, M., Kallay, F. (eds) *Flavonoids and Bioflavonoids*: 351-359.
- Ferry, D.R., Smith, A., Malkhandi, J., Fyfe, D.W., deTakats, P.G., Anderson, D., Baker, J. und Kerr, D.J. (1996). Phase I Clinical Trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. *Clin Cancer Res* 2: 659-668.
- Formica, J.V. und Regelson, W. (1995). Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 33: 1061-1080.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. und Starke, K. (1992). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. BI-Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.
- Gee, J.-M., Dupont, M.S., Rhodes, M.-J.C. und Johnson, I.-T. (1998). Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic Biol Med* 25: 19-25.
- Gibaldi, M. und Perrier, D. (1982). *Pharmacokinetics*. Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hongkong.
- Graefe, E.U. (1997). Renale Metabolite pflanzlicher Phenole modellhaft untersucht an Schachtelhalmkraut DAB 1996. Diplomarbeit. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Graefe, E.U. und Veit, M. (1999). Urinary metabolites of flavonoids and hydroxycinnamic acids in humans after application of a crude extract from *Equisetum arvense*. *Phytomedicine* 6: 239-246.
- Graefe, E.U., Wittig, J., Pforte, H., Jacobasch, G., Drewelow, B., Riethling, A., -K., Mueller, S., Derendorf, H. und Veit, M. (2000). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol* accepted.

- Griffiths, L.A. (1982). Mammalian metabolism of flavonoids. In: Harborne, J.B., Mabry, T.J. (eds) *The flavonoids: Advances in Research*. Chapman and Hall, London, New York.
- Gross, M., Pfeiffer, M., Martini, M., Campbell, D., Slavin, J. und Potter, J. (1996). The quantitation of metabolites of quercetin flavonols in human urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 711-720.
- Gugler, R., Leschik, M. und Dengler, H.J. (1975). Disposition of quercetin in man after single oral and intravenous doses. *Eur J Clin Pharmacol* 9: 229-234.
- Hagels, H. (1996). Analytische, pharmazeutische, phytochemische sowie inter- und intraindividuelle Untersuchungen zu *Fagopyrum*-Arten; Studie zur Pharmakokinetik des Rutins. Dissertation. Freie Universität Berlin.
- Hatcher, J.F. und Bryan, G.T. (1985). Factors affecting the mutagenic activity of quercetin for *Salmonella typhimurium* TA98: metal ions, antioxidants and pH. *Mutat Res* 148: 13-23.
- Heilmann, J. und Merfort, I. (1998). Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden: I. Resorption und Metabolismus von Flavonolen. *Pharmazie in unserer Zeit* 27: 58-65.
- Hertog, M.G. (1996a). Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proc Nutr Soc* 55: 385-397.
- Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B. und Kromhout, D. (1993a). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 342: 1007-1011.
- Hertog, M.G. und Hollman, P.C. (1996b). Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J Clin Nutr* 50: 63-71.
- Hertog, M.G., Hollman, P.C. und Katan, M.B. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 Vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 40: 2379-2383.
- Hertog, M.G., Hollman, P.C., Katan, M.B. und Kromhout, D. (1993b). Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 20: 21-29.
- Hertog, M.G., Kromhout, D., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., Jansen, A., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Pekkarinen, M., Simic, B.S., Toshima, H., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H. und Katan, M.B. (1995). Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Intern Med* 155: 381-386.
- Hidalgo, I.J., Grass, G.M., Hillgren, K.M. und Borchardt, R.T. (1992). A new side-by-side diffusion cell for studying transport across epithelial cell monolayers. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A: 578-580.
- Hillgren, K.M., Kato, A. und Borchardt, R.T. (1995). In vitro systems for studying intestinal drug absorptions. *Medicinal Research Reviews* 15: 83-109.
- Hirayama, B.A., Lostao, M.P., Panayotova-Heiermann, M., Loo, D.D., Turk, E. und Wright, E.M. (1996). Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters (SGLT-1). *Am J Physiol* 270: G919-926.



- Hollman, P., Buysman, M.P., van Gameren, Y., Crossen, E., de Vries, J. und Katan, M. (1999). The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Rad Res* 31: 569-573.
- Hollman, P.C., de Vries, J.H., van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J. und Katan, M.B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr* 62: 1276-1282.
- Hollman, P.C., Hertog, M.G. und Katan, M.B. (1996a). Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Biochem Soc Trans* 24: 785-789.
- Hollman, P.C., v.d. Gaag, M., Mengelers, M.J., van Trijp, J.M., de Vries, J.H. und Katan, M.B. (1996b). Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radic Biol Med* 21: 703-707.
- Hollman, P.C., van Trijp, J.M., Buysman, M.N., van der Gaag, M.S., Mengelers, M.J., de Vries, J.H. und Katan, M.B. (1997a). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Lett* 418: 152-156.
- Hollman, P.C.H., Van Trijp, J.M.P. und Buysman, M.N.C.P. (1996c). Fluorescence detection of flavonoids in HPLC by postcolumn chelation with aluminium. *Anal Chem* 68: 3511-3515.
- Hollman, P.C., van Trijp, J.M., Mengelers, M.J., de Vries, J.H. und Katan, M.B. (1997b). Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Letters* 114: 139-140.
- Ihme, N., Kieseewetter, H., Jung, F., Hoffmann, K.H., Birk, A., Muller, A. und Grutzner, K.I. (1996). Leg oedema protection from a buckwheat herb tea in patients with chronic venous insufficiency: a single-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur J Clin Pharmacol* 50: 443-447.
- Ikeno, A., Hashimoto, K., Shimizu, M., Terao, J., Kumazawa, S. und Nakayama, T. (1999). Absorption and metabolism of quercetin in caco-2 cells. *Food Sci Technol Res* 5: 90-92.
- Ioku, K., Pongpiriyadacha, Y., Konishi, Y., Takei, Y., Nakatani, N. und Terao, J. (1998). beta-Glucosidase activity in the rat small intestine toward quercetin monoglucosides. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 1428-1431.
- Janssen, K., Mensink, R.P., Cox, F.J., Harryvan, J.L., Hovenier, R., Hollman, P.C. und Katan, M.B. (1998). Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr* 67: 255-262.
- Justesen, U., Knuthsen, P. und Leth, T. (1997). Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Letters* 114: 165-167.
- Keli, S.O., Hertog, M.G., Feskens, E.J. und Kromhout, D. (1996). Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med* 156: 637-642.
- Kieseewetter, H., Koscielny, J., Kalus, U., Vix, J.M., Peil, H., Petrini, O., van Toor, B.S. und de Mey, C. (2000). Efficacy of orally administered extract of red vine leaf AS 195 (folia vitis viniferae) in chronic venous insufficiency (stages I-II). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arzneimittelforschung* 50: 109-117.

- Kim, D.H., Jung, E.A., Sohng, I.S., Han, J.A., Kim, T.H. und Han, M.J. (1998). Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. *Arch Pharm Res* 21: 17-23.
- Knekt, P., Isotupa, S., Rissanen, H., Heliovaara, M., Jarvinen, R., Hakkinen, S., Aromaa, A. und Reunanen, A. (2000). Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 54: 415-417.
- Knekt, P., Jarvinen, R., Reunanen, A. und Maatela, J. (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Brit Med J* 312: 478-481.
- Larhed, A.W., Artursson, P. und Bjork, E. (1998). The influence of intestinal mucus components on the diffusion of drugs. *Pharm Res* 15: 66-71.
- Le Marchand, L., Murphy, S.P., Hankin, J.H., Wilkens, L.R. und Kolonel, L.N. (2000). Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 92: 154-160.
- Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigne, C., Texier, O., Regerat, F. und Remesy, C. (1998). Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 426: 331-336.
- Manach, C., Morand, C., Demigne, C., Texier, O., Regerat, F. und Remesy, C. (1997). Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS Lett* 409: 12-16.
- Manach, C., Morand, C., Texier, O., Favier, M.L., Agullo, G., Demigne, C., Regerat, F. und Remesy, C. (1995). Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 125: 1911-1922.
- Matthes, I., Nimmerfall, F., Vonderscher, J. und Sucker, H. (1992). Mucusmodelle zur Untersuchung von intestinalen Absorptionsmechanismen: Vergleich des Mucusmodells mit Absorptionsmodellen *in vivo* und *in situ* zur Vorhersage intestinaler Wirkstoffabsorption. *Pharmazie* 47: 787-791.
- McAnlis, G.T., McEneny, J., Pearce, J. und Young, I.S. (1997). The effect of various dietary flavonoids on the susceptibility of low density lipoproteins to oxidation *in vitro* using both metallic and non-metallic oxidising agents. *Biochem Soc Trans* 25: 142.
- McAnlis, G.T., McEneny, J., Pearce, J. und Young, I.S. (1999). Absorption and antioxidant effects of quercetin from onions, in man. *Eur J Clin Nutr* 53: 92-96.
- McAnlis, G.T., McEneny, J., Pearce, J. und Young, I.Y. (1998). Black tea consumption does not protect low density lipoprotein from oxidative modification. *Eur J Clin Nutr* 52: 202-206.
- Merfort, I., Heilmann, J., Weiss, M., Pietta, P. und Gardana, C. (1996). Radical scavenger activity of three flavonoid metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNs. *Planta Med* 62: 289-292.
- Middleton, E. und Kandaswami, C. (1994). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In: *The Flavonoids: advances in research since 1986*. Harborne, J.B. (ed). Chapman & Hall, London, 619-652.
- Moon, J.H., Nakata, R., Oshima, S., Inakuma, T. und Terao, J. (2000). Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279: 461-467.

- Murgu, L., Dobrescu, D., Andronescu, S. und Iacobas, S. (1978). Study of the bioavailability in man of rutoside from some pharmaceutical products. *Farmacia Bucharest* 26: 149-154.
- Nieder, M. (1991). Pharmakokinetik der Ginkgo-Flavonoide im Plasma. *Münch Med Wochenschr* 133: S61-S62.
- Nielsen, S.E., Kall, M., Justesen, U., Schou, A. und Dragsted, L.O. (1997). Human absorption and excretion of flavonoids after broccoli consumption. *Cancer Lett* 114: 173-174.
- Nolte, K. (1998). Entwicklung eines reproduzierbaren *In-vitro* Resorptionsmodells mit Schweinedarm. Dissertation. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Noteborn, H.P.J.M., Jansen, E., Benito, S. und Mengelers, M.J.B. (1997). Oral absorption and metabolism of quercetin and sugar-conjugated derivatives in specific transport systems. *Cancer Lett* 114: 175-177.
- O'Leary, K.A., Day, A.J., O'Brien, N.M. und Williamson, G. (2000). The role of  $\beta$ -glucuronidases in flavonoid metabolism in humans. . In: Martens, S., Treuter, D., Forkman, G. (eds) *Polyphenols Communications 2000*: 405-406.
- Oliveira, E.J. und Watson, D.G. (2000). In vitro glucuronidation of kaempferol and quercetin by human UGT-1 microsomes. *FEBS Lett* 471: 1-6.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C., Vree, T.B. und Katan, M.B. (2000). Bioavailabilities of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside do not differ in humans. *J Nutr* 130: 1200-1203.
- Pace-Asciak, C.R., Hahn, S., Diamandis, E.P., Soleas, G. und Goldberg, D.M. (1995). The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 235: 207-219.
- Paganga, G. und Rice Evans, C.A. (1997). The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett* 401: 78-82.
- Park, J.B. (1999). Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 568-574.
- Park, J.B. und Levine, M. (2000). Intracellular accumulation of ascorbic acid is inhibited by flavonoids via blocking of dehydroascorbic acid and ascorbic acid uptakes in HL-60, U937 and Jurkat cells. *J Nutr* 130: 1297-1302.
- Peter, H., Fisel, J. und Weisser, W. (1966). [On the pharmacology of the active ingredients of Ginkgo biloba]. *Arzneimittelforschung* 16: 719-725.
- Pietta, P.G., Gardana, C. und Mauri, P.L. (1997). Identification of Ginkgo biloba flavonol metabolites after oral administration to humans. *J Chromatogr B* 693: 249-255.
- Piskula, M.K. und Terao, J. (1998a). Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *J Nutr* 128: 1172-1178.
- Piskula, M.K. und Terao, J. (1998b). Quercetin's solubility affects its accumulation in rat plasma after oral administration. *J Agric Food Chem* 46: 4313-4317.
- Plumb, G.W., McLauchlan, R., Kroon, P.A., Day, A., Faulds, C.B., Gee, J.M., Dupont, S. und Williamson, G. (2000). Uptake and metabolism of quercetin glycosides in Caco-2 cell

- cultures and everted rat gut sacs. In: Martens, S., Treuter, D., Forkman, G. (eds) Polyphenols Communications 2000: 401-402.
- Price, K.R., Bacon, J.R. und Rhodes, M.J.C. (1997). Effect of storage and domestic processing on the content and composition of flavonol glucosides in onion (*Allium cepa*). *J Agric Food Chem* 45: 938-942.
- Radomska-Pandya, A., Little, J.M., Pandya, J.T., Tephly, T., King, C.D., Barone, G.W. und Raufman, J.-P. (1998). UDP-glucuronosyl-transferases in human intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta* 1394: 199-208.
- Rhodes, M.J. und Price, K.R. (1996). Analytical problems in the study of flavonoid compounds in onions. *Food Chem* 57: 113-117.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. und Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Sci* 2: 152-159.
- Rimm, E.R., Katan, M.B., Ascherio, A., Stampfer, M.J. und Willett, W.C. (1996). Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Arch Intern Med* 125: 384-389.
- Sawai, Y., Kohsaka, K., Nishiyama, Y. und Ando, K. (1987). Serum concentrations of rutoside metabolites after oral administration of a rutoside formulation to humans. *Arzneimittelforschung* 37: 729-732.
- Scheline, R.R. (1968). Drug metabolism by intestinal microorganisms. *J Pharm Sci* 57: 2021-2037.
- Scheline, R.R. (1991). *CRC Handbook of mammalian metabolism of plant compounds*. CRC Press, Boca Raton.
- Schilcher, H. und Hagels, H. (1996). Zur Pharmakokinetik und zum Metabolismus von Flavonoiden. In: Loew, D., Rietbrock, N. (eds) *Phytopharmaka II: Forschung und klinische Anwendung*. Steinkopff Verlag Darmstadt, 55-62.
- Schneider, H. und Blaut, M. (2000). Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. *Arch Microbiol* 173: 71-75.
- Schramm, D.D. und German, J.B. (1998). Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. *J Nutr Biochem* 9: 560-566.
- Serafini, M., Ghiselli, A. und Ferro-Luzzi, A. (1996). In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur J Clin Nutr* 50: 28-32.
- Serafini, M., Maiani, G. und Ferro-Luzzi, A. (1998). Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *J Nutr* 128: 1003-1007.
- Sfakianos, J., Coward, L., Kirk, M. und Barnes, S. (1997). Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J Nutr* 127: 1260-1268.
- Shimoi, K., Saka, N., Kaji, K., Nnozawa, R. und Kinoshita, N. (2000). Deglucuronidation of flavonoids at inflammation site and its effect on vascular endothelial cells. In: Martens, S., Treuter, D., Forkman, G. (eds) *Polyphenols Communications 2000*: 297-298.
- Spencer, J.P., Chowrimootoo, G., Choudhury, R., Debnam, E.S., Srivastava, S.K. und Rice-Evans, C. (1999). The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS Lett* 458: 224-230.
- Steinmetz, K.A. und Potter, J.D. (1991). Vegetables, fruit and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Cause Control* 2: 325-357.

- Teltscher, K. (1999). Extraktion von Quercetin und seinen putativen Metaboliten aus Humanplasma - Pilotstudie zur Bioverfügbarkeit von Quercetin. Diplomarbeit. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Teltscher, K., Andrew, B., Graefe, E.U., Wittig, J. und Veit, M. (1999a). Bestimmung von Quercetin und seinen Metaboliten in Humanplasma mittels HPLC-PDA. Arch Pharm Pharm Med Chem 331 (Suppl. 1): 73.
- Teltscher, K., Andrew, B., Graefe, E.U., Wittig, J. und Veit, M. (1999b). Simultaneous extraction and determination of quercetin and its metabolites from human plasma and urine by HPLC-PDA. In: Luijendijk, T., de Graaf, P., Remmelzwaal, A., Verpoorte, R. (eds) 2000 Years of Natural Products Research - Past, Present and Future: 377.
- Ueno, I., Nakano, N. und Hirono, I. (1983). Metabolic fate of [ $^{14}\text{C}$ ] quercetin in the ACI rat. Jpn J Exp Med 53: 41-50.
- van het Hof, K.H., Wiseman, S.A., Yang, C.S. und Tijburg, L.B. (1999). Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. Proc Soc Exp Biol Med 220: 203-209.
- Veit, M. (1990). Untersuchungen zur Biologie sowie Akkumulation und Analytik von Sekundärstoffen der Equiseten unter besonderer Berücksichtigung von *Equisetum arvense*. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Walgren, R.A. und Walle, T. (1999). The influence of plasma binding on absorption/exsorption in the Caco-2 model of human intestinal absorption. J Pharm Pharmacol 51: 1037-1040.
- Walgren, R.A., Walle, U.K. und Walle, T. (1998a). Transepithelial absorption of quercetin and quercetin glucosides across the CACO-2 human intestinal cell line. Clin Pharmacol Ther 63: 212.
- Walgren, R.A., Walle, U.K. und Walle, T. (1998b). Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. Biochem Pharmacol 55: 1721-1727.
- Walle, T., Wilson, A.A. und Walle, U.K. (1998). Bioavailability of the chemopreventive agent resveratrol compared to quercetin using human cell models. Clin Pharmacol Ther 63: 149.
- Watson, D.G. und Oliveira, E.J. (1999). Solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in human urine after consumption of Ginkgo biloba tablets. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 723: 203-10.
- Watson, D.G. und Pitt, A.R. (1998). Analysis of flavonoids in tablets and urine by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 12: 153-156.
- Winter, J., Moore, L.H., Dowell, V.R., Jr. und Bokkenheuser, V.D. (1989). C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. Appl Environ Microbiol 55: 1203-1208.
- Wittig, J., Herderich, M., Graefe, E.U. und Veit, M. (2000). Identification of quercetin glucuronides in human plasma by HPLC-MS/MS. J Chromatogr B Biomed Sci Appl accepted.
- Wittig, J., Smolenski, A., Thalheimer, P. und Veit, M. (2000). Beta-glucuronidase activity of human endothelial tissues in an *in-vitro* model using primary monolayer cultures of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC. In: Martens, S., Treuter, D., Forkman, G. (eds) Polyphenols Communications 2000: 459-460.

- 
- Wolfe, D.L., Forland, S.C. und Benet, L.Z. (1973). Drug transfer across intact rat intestinal mucosa following surgical removal of serosa and muscularis externa. *J Pharm Sci* 62: 200-5.
- Wright, E.M., Loo, D.D., Turk, E. und Hirayama, B.A. (1996). Sodium cotransporters. *Curr Opin Cell Biol* 8: 468-473.
- Yochum, L., Kushi, L., Meyer, K. und Folsom, A. (1999). Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 149: 943-949.

## 8 Anhang

**Tab. 8.1** Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] von Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate nach Applikation von Zwiebeln (entsprechend 100 mg Quercetin) (Pilotstudie und Ergänzung I.) bzw. Zwiebeln und Quercetin (Ergänzung II.)

t in h	Pilotstudie			Ergänzung I.	Ergänzung II.		
	Prob 1	Prob 2	Prob 3	Prob 1 oF	Prob 1 ZQ	Prob 4 ZQ	Prob 5 ZQ
0	0,10	0,10	0,10	0,10	0,0	0,0	0,0
0,5	1,93	0,45	0,91		2,3	3,9	1,8
1	3,00	1,43	1,51	2,08	2,9	2,4	3,0
2	2,51	1,23	1,30	2,03	2,6	2,3	2,0
3	1,66	0,91	0,86	1,18	1,2	1,5	0,8
4				1,08			
5	1,11	0,69	0,51	1,04	1,2	1,8	0,5

**Tab. 8.2** Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] von Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate nach Applikation von Buchweizenkrauttee (entsprechend 200 mg Quercetin) sowie 200 mg und 1000 mg Quercetin jeweils als Suspension.

t in h	Buchweizenkraut			Quercetin 200 mg			Quercetin 1000 mg		
	Prob 1	Prob 2	Prob 3	Prob 1	Prob 2	Prob 3	Prob 1	Prob 2	Prob 3
0	0,000	0,009	0,000	0,000	0,000	0,010	0,000	0,023	0,022
0,5	0,059	0,064	0,085	0,025	0,047	0,038	0,046	0,061	0,044
1	0,043	0,041	0,052	0,028	0,035	0,025	0,046	0,037	0,043
2	0,027	0,034	0,044	0,011	0,023	0,017	0,058	0,034	0,034
3	0,027	0,021	0,109	0,018	0,017	0,012	0,044	0,029	0,026
5	0,290	0,098	0,075	0,017	0,014	0,012	0,097	0,025	0,023

**Tab. 8.3** Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] von Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate nach Applikation von Zwiebeln (entsprechend 100 mg Quercetin)

t [h] Soll	01Z		02Z		03Z		04Z		05Z		06Z	
	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp
0	0	0,01	0	0,05	0	0,02	0	0,01	0	0,02	0	0,11
0,25	0,23	0,76			0,27	0,47	0,25	0,68	0,25	3,29	0,3	5,67
0,5	0,5	1,21	0,45	2,82	0,53	0,29	0,5	1,61	0,55	4,44	0,62	3,44
0,75	0,75	1,53	0,78	2,35	0,83	2,20	0,75	2,38	0,78	3,00	0,82	3,44
1	1	0,95	1,03	1,90	1,08	2,09	1	0,26	1,03	2,25	1,07	2,57
1,5	1,5	0,67	1,53	1,23	1,57	1,43	1,5	1,22	1,47	1,56	1,58	3,63
2	2	0,43	2,03	0,83	2,07	0,83	2	0,62	2,05	1,21	2,08	3,30
3	2,92	0,56	3,03	1,57	3	0,45	3	0,74	3,03	1,20	3,08	1,65
4	4	0,28	4,03	1,60	4,07	0,58	4	0,58	4,05	1,07	4,08	1,40
6	5,97	0,14	6,07	0,77	6	1,38	6	0,29	6,03	0,87	6,07	1,17
8	8	0,15	8,03	0,55	8,07	0,59	8	0,28	8,03	0,73	8,07	1,07
10	10,02	0,08	9,95	0,46	9,98	0,40	9,98	0,17	10,02	0,54	10,05	1,06
12	11,97	0,04	12	0,32	12,05	0,27	12	0,14	12,02	0,43	12,12	0,85
16	16	0,04	15,83	0,26	16,05	0,19	15,67	0,12	15,7	0,30	15,75	0,60
24	23,42	0,05	23,5	0,21	23,5	0,11	23,42	0,08	23,52	0,19	23,38	0,55

t [h] Soll	07Z		08Z		09Z		10Z		11Z		12Z	
	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp
0	0	0,01	0	0,01	0	0,00	0	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
0,25	0,23	2,64	0,27	0,72	0,25	0,04	0,25	0,29	0,25	0,03	0,28	0,02
0,5	0,5	2,49	0,53	1,01	0,52	0,74	0,48	1,01	0,48	0,45	0,50	0,70
0,75	0,73	2,80	0,77	0,98	0,75	1,08	0,75	0,68	0,75	0,91	0,78	1,45
1	0,98	2,00	1,02	0,63	1	1,15	1	0,77	1,00	1,25	1,03	1,45
1,5	1,5	1,03	1,55	0,51	1,53	0,48	1,5	0,58	1,50	0,64	1,42	1,15
2	2,02	0,80	2,05	0,46	2,03	0,27	2	0,61	2,00	0,49	2,03	0,70
3	3,03	0,76	3,07	0,44	3,05	0,21	2,97	0,53	3,00	0,59	3,05	0,60
4	4,28	0,78	4	0,28	3,98	0,17	3,97	0,24	4,00	0,67	4,03	0,74
6	6,05	0,43	6,03	0,39	6	0,12	5,97	0,41	6,00	0,23	6,07	0,23
8	8,28	0,37	8	0,38	8,02	0,07	7,95	0,28	7,98	0,36	8,05	0,11
10	10,17	0,37	10,08	0,33	10	0,08	10	0,18	10,03	0,24	10,07	
12	12	0,32	12,08		12,22	0,04	12	0,15	12,05	0,14	12,05	
16	16	0,26	16,15	0,14	16,05	0,03	16	0,08	16,05	0,10	16,12	0,01
24	23,57	0,13	23,78	0,15	23,58	0,02	23,57	0,04	23,47	0,03	23,52	0,01



**Tab. 8.4** Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] von Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate nach Applikation von Spiraeosid (entsprechend 100 mg Quercetin)

t [h] Soll	01S		02S		03S		04S		05S		06S	
	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp
0	0	0,004	0	0,037	0	0,072	0	0,001	0	0,071	0	0,063
0,25	0,25	0,049	0,25	0,395	0,28	0,750	0,23	0,525	0,23	1,200	0,25	1,451
0,5	0,5	0,553	0,5	2,981	0,53	1,314	0,48	0,574	0,48	3,602	0,5	2,413
0,75	0,75	1,045	0,75	2,566	0,78	0,962	0,72	0,305	0,72	2,642	0,75	5,875
1	1	0,750	1	2,197	1,07	0,765	0,97	0,665	0,97	2,078	1	6,597
1,5	1,5	0,606	1,5	1,153	1,58	0,475	1,48	1,392	1,48	1,379	1,5	4,465
2	2	0,376	2	0,790	2,08	0,402	1,98	1,223	2	0,945	2,02	3,467
3	3	0,246	3,05	1,887	3	1,023	2,98	0,615	3	0,826	3,03	1,807
4	3,98	0,198	4,02		3,98	0,447	3,95	0,381	3,98	0,611	4,03	2,183
6	6	0,049	6,02		6,03	0,101	5,97	0,365	6	0,385	6,03	1,669
8	8	0,040	7,97	0,305	8,08	0,171	7,97	0,300	8	0,331	8,03	1,453
10	9,97	0,082	10	0,223	10,08	0,096	10	0,202	10,08	0,273	10,17	1,293
12	12	0,039	12,03		12,08	0,104	12	0,152	12,03	0,292	12,07	1,124
16	16	0,039	16,05	0,230	16,08	0,046	16	0,107	16,03	0,656	16,07	0,800
24	23,92	0,018	23,92	0,137	24	0,063	24,33	0,073	24,42	0,118	24,35	0,677

t [h] Soll	07S		08S		09S		10S		11S		12S	
	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp
0	0	0,000	0	0,005	0	0,002	0	0,021	0	0,027	0	0,035
0,25	0,23	1,059	0,23	0,264	0,25	0,236	0,28	0,119	0,25	1,552	0,25	0,729
0,5	0,48	1,460	0,48	0,702	0,52	1,224	0,52	1,130	0,48	1,823	0,48	1,562
0,75	0,73	1,931	0,73	0,675	0,77	0,936	0,98	1,217	0,80		0,75	1,174
1	1	0,879	1,05	0,421	1,08	0,770			1,02	0,953	1,00	0,733
1,5	1,5	1,051	1,5	0,335	1,55	0,527	1,52	0,311	1,50	0,491	1,50	0,587
2	2,03	0,600	2	0,238	2,03	0,283	2,02	0,381	2,05	0,540	2,02	0,401
3	2,97	0,356	3	0,110	3,03	0,343	3	0,402	3,02	0,437	3,02	0,431
4	3,98	0,512	4,02	0,190	4,07	0,140	3,98	0,410	4,00	0,293	4,02	0,388
6	6	0,257	6,03		6,07	0,168	6	0,198	6,03	0,111	6,05	0,357
8	7,97	0,218	8		8,03	0,144	8,03	0,115	8,02	0,120	7,98	0,187
10	10	0,076	9,97		10,02	0,099	10	0,071	10,17	0,086	10,00	0,134
12	12,02	0,068	12,05	0,101	12	0,027	12	0,047	12,32	0,108	11,92	0,078
16	15,88	0,028	15,83	0,086	14,2	0,022	15,92	0,069	15,83	0,088	16,00	0,061
24	23,25	0,028	23,5	0,067	23,58	0,022	23,5	0,018	23,57	0,050	23,40	0,037

**Tab. 8.5** Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] von Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate nach Applikation von Buchweizenkrauttee (entsprechend 200 mg Quercetin)

t [h] Soll	01B		02B		03B		04B		05B		06B	
	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp
0	0	0,004	0	0,015	0	0,013	0	0,022	0	0,034	0	0,012
0,25	0,25	0,013	0,28	0,051	0,23	0,022	0,25	0,015	0,42	0,092	0,25	0,179
0,5	0,5	0,016	0,53	0,067	0,5	0,040	0,5	0,059			0,5	0,266
0,75	0,75	0,023	0,78		0,92	0,044	0,75	0,055	0,75	0,107	0,75	0,378
1	1		1	0,035	1,2	0,115	1	0,088	1	0,099	1,03	0,396
1,5	1,48	0,024	1,52	0,071	1,58	0,109	1,5	0,080	1,58	0,301	1,5	0,157
2	2,28	0,006	2,03	0,040	1,98	0,414	2	0,080	2,03	0,133	2	0,337
3	3,17	0,058	3,17	0,039	3,08	1,106	3	0,121	3,05	0,323	3,02	1,395
4	4	0,026	4,03		3,98	0,778	3,92	0,048	3,93	2,237	4	0,719
6	6,03	0,022	6,17		6,03	0,191	6	0,029	6	0,528	6,03	0,783
8	8	0,014	8,08	0,049	8,03	0,121	8	0,023	8,03	0,309	8	0,510
10	10	0,014	10,02	0,069	10,05	0,104	10,95	0,017	10,03	0,208	9,98	0,461
12	12,07	0,027	12,03	0,041	12,12	0,082	12	0,021	11,97	0,188	12,03	0,475
16	16,03	0,012	15,98	0,017	16	0,044	16	0,008	15,88	0,111	15,92	0,315
24	23,67	0,006	23,75	0,014	23,75	0,042	23,25	0,010	23,3	0,069	23,25	0,255

t [h] Soll	07B		08B		09B		10B		11B		12B	
	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp
0	0	0,101	0	0,092	0	0,010	0	0,011	0		0	0,010
0,25	0,25	0,124	0,27	0,141	0,25	0,018	0,22	0,029	0,25	0,019	0,28	
0,5	0,5	0,178	0,53	0,144	0,52	0,029	0,47	0,060	0,50	0,063	0,55	0,054
0,75	0,75	0,160	0,78	0,129	0,77	0,023	0,72	0,032	0,75	0,102	0,78	0,146
1	1,03	0,393	1,03	0,127	1,02	0,016	0,97	0,048	1,00	0,107	1,03	0,093
1,5	1,5	0,401	1,53	0,133	1,52	0,031	1,47	0,030	1,52	0,116	1,55	0,136
2	1,98	0,135	2,02	0,113	2	0,027	1,97	0,040	2,00	0,092	2,07	0,082
3	3,07	0,066	3,02	0,083	3,05	0,027	2,97	0,044	3,13	0,288	3,00	0,042
4	3,93	0,348	4,02	0,297	4	0,015	3,97	0,224	4,02	0,563	4,05	0,312
6	6,08	0,510	6,08	0,788	6,02	0,068	5,97	0,305	6,02	0,241	6,07	0,299
8	7,97	0,258	8	0,900	8,07	0,028	8	0,046	8,03	0,152	8,07	0,123
10	9,95	0,162	9,98	0,694	10,02	0,019	9,8	0,056	9,80	0,106	9,83	0,073
12	11,97	0,076	12	0,429	12,05	0,016	12,17	0,039	12,33	0,069	12,25	0,047
16	15,92	0,030	15,97	0,454	16	0,012	16	0,024	16,05	0,023	16,00	0,029
24	23,55	0,059	23,7	0,393	23,77	0,008	23,5	0,015	23,38	0,009	23,67	0,018

**Tab. 8.6** Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] von Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate nach Applikation von Rutin (entsprechend 200 mg Quercetin)

t [h] Soll	01R		02R		03R		04R		05R		06R	
	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp
0	0	0,001	0	0,012	0	0,023	0		0	0,016	0	0,014
0,25	0,3	0,005	0,25	0,020	0,45	0,025	0,25	0,007	0,25	0,017	0,25	0,021
0,5	0,5	0,013	0,5	0,018			0,58	0,009	0,5	0,019	0,5	0,018
0,75	0,75	0,010	0,75	0,014	0,78	0,023	0,8	0,010	0,75	0,023	0,75	0,023
1	1	0,008	1	0,018	1,08	0,025	1,03	0,007	1,1	0,017	1	0,021
1,5	1,5	0,012	1,5	0,019	1,83		1,5	0,007	1,55	0,026	1,5	0,021
2	2	0,005	2	0,012	2,25	0,037	2,03	0,008	2	0,027	2	0,017
3	3	0,005	3,13	0,160	3,08	0,828	3	0,012	3,03	0,046	3	0,109
4	4	0,029	4	0,486	4,03	1,043	4,08	0,007	4,17	0,112	4	0,082
6	6	0,033	6,08	0,329	6,17	0,283	6,03	0,021	6,08	0,279	6,25	0,060
8	7,92	0,017	8,03	0,145	8	0,170	8,03	0,014	8,08	0,584	8	0,054
10	10	0,020	10,17	0,074	10,03	0,122	10	0,007	10,42	0,905	10,08	0,061
12	12,22	0,017	12,17	0,088	12,25	0,101	12	0,010	12,13	0,586	12,07	0,071
16	16	0,020	16,17	0,065	16,05	0,076	16	0,008	16,07	0,227	16,13	0,082
24	24,08	0,022	24,17	0,038	24,2	0,045	23,58	0,006	23,72	0,118	23,63	0,067

t [h] Soll	07R		08R		09R		10R		11R		12R	
	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp	t [h]	Cp
0	0	0,036	0	0,079	0	0,003	0	0,009	0		0	0,040
0,25	0,23	0,034	0,27	0,071	0,3	0,003	0,23	0,029	0,25	0,033	0,27	0,058
0,5	0,5	0,038	0,52	0,073	0,55	0,003	0,5	0,017	0,52	0,033	0,53	0,103
0,75	0,72	0,042	0,75	0,071	0,78	0,003	0,73	0,011	0,75	0,021	0,77	0,058
1	0,97	0,041	1,02	0,061	1,05	0,003	1	0,015	1,02	0,032	1,03	0,090
1,5	1,47	0,044	1,5	0,084	1,53	0,003	1,5	0,014	1,52	0,045	1,53	0,026
2	1,97	0,050	2	0,073	2,03	0,003	2	0,013	2,02	0,039	2,03	0,111
3	2,97	0,052	3,03	0,089	3	0,004	3,05	0,017	3,10	0,037	3,02	0,140
4	4	0,039	4,03	0,072	3,97	0,007	4	0,016	4,02	0,166	4,03	0,093
6	5,98	0,035	6,02	0,053	6,05	0,004	6	0,156	6,02	0,091	6,03	0,171
8	8	0,085	8,22	0,165	8,27	0,005	8	0,361	8,05	0,053	8,08	0,184
10	10	0,071	10,18	0,328	10,1	0,045	10	0,106	10,03	0,056	10,08	0,094
12	12	0,055	12,1	0,436	12,27	0,036	12	0,149	12,03	0,049	12,08	0,085
16	16,02	0,036	16,1	0,343	16,18	0,015	15,92	0,084	16,03	0,039	16,08	0,063
24	23,38	0,021	23,4	0,238	23,45	0,004	22,92	0,050	23,12	0,034	23,50	0,043

**Tab. 8.7** Isorhamnetin-Plasmakonzentrationen (nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate) nach Applikation von Zwiebeln (Z). n=12 Probanden. MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, Min/Max=Minimal-/Maximalwert.

T [h]	Z MW Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Z SD Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Z Min Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Z Median Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	Z Max Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
0	0,007	0,001	0,006	0,007	0,008
0,25	0,138	0,124	0,004	0,083	0,389
0,5	0,146	0,100	0,011	0,141	0,345
0,75	0,184	0,075	0,067	0,178	0,327
1	0,139	0,061	0,086	0,123	0,298
1,5	0,123	0,071	0,029	0,105	0,290
2	0,105	0,083	0,028	0,082	0,345
3	0,114	0,064	0,031	0,095	0,228
4	0,103	0,068	0,030	0,083	0,229
6	0,075	0,053	0,016	0,060	0,179
8	0,061	0,040	0,009	0,053	0,149
10	0,058	0,036	0,009	0,068	0,127
12	0,041	0,028	0,009	0,041	0,104
16	0,033	0,024	0,005	0,026	0,078
24	0,022	0,015	0,00	0,021	0,049

**Tab. 8.8** Isorhamnetin-Plasmakonzentrationen (nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate) nach Applikation von Spiraeosid (S). n=12 Probanden. MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, Min/Max=Minimal-/Maximalwert.

T [h]	S MW Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	S SD Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	S Min Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	S Median Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	S Max Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
0	0,006	0,008	0,000	0,004	0,023
0,25	0,047	0,032	0,017	0,038	0,100
0,5	0,113	0,080	0,030	0,085	0,271
0,75	0,129	0,102	0,027	0,091	0,328
1	0,114	0,092	0,034	0,072	0,323
1,5	0,099	0,085	0,019	0,064	0,328
2	0,086	0,066	0,018	0,059	0,239
3	0,092	0,076	0,025	0,063	0,246
4	0,063	0,049	0,024	0,045	0,194
6	0,041	0,034	0,017	0,029	0,129
8	0,044	0,031	0,018	0,032	0,114
10	0,036	0,035	0,011	0,022	0,127
12	0,026	0,033	0,004	0,015	0,110
16	0,021	0,019	0,003	0,015	0,054
24	0,015	0,012	0,002	0,011	0,035

**Tab. 8.9** Isorhamnetin-Plasmakonzentrationen (nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate) nach Applikation von Buchweizenkraut (B). n=11 Probanden. MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung, Min/Max=Minimal-/Maximalwert.

T [h]	B MW Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	B SD Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	B Min Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	B Median Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	B Max Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
0	0,017	0,004	0,013	0,019	0,020
0,25	0,012	0,011	0,002	0,011	0,025
0,5	0,010	0,007	0,002	0,009	0,019
0,75	0,011	0,008	0,002	0,010	0,022
1	0,013	0,010	0,002	0,013	0,030
1,5	0,012	0,006	0,003	0,013	0,020
2	0,012	0,007	0,003	0,015	0,020
3	0,028	0,025	0,003	0,017	0,072
4	0,041	0,041	0,000	0,035	0,144
6	0,052	0,036	0,008	0,049	0,104
8	0,042	0,040	0,007	0,021	0,120
10	0,033	0,031	0,005	0,018	0,089
12	0,033	0,025	0,004	0,024	0,084
16	0,020	0,022	0,004	0,010	0,070
24	0,022	0,017	0,009	0,013	0,051

**Tab. 8.10** Isorhamnetin-Plasmakonzentrationen (nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate) nach Applikation von Buchweizenkraut (B). n=9 Probanden

T [h]	R MW Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	R SD Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	R Min Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	R Median Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]	R Max Cp [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ]
0	0,009	0,007	0,004	0,007	0,020
0,25	0,006	0,003	0,004	0,006	0,009
0,5	0,011	0,006	0,007	0,010	0,018
0,75	0,008	0,005	0,003	0,008	0,013
1	0,009	0,006	0,002	0,012	0,015
1,5	0,010	0,007	0,003	0,010	0,016
2	0,009	0,006	0,004	0,008	0,016
3	0,015	0,016	0,002	0,008	0,051
4	0,025	0,028	0,008	0,015	0,088
6	0,026	0,023	0,007	0,012	0,065
8	0,029	0,022	0,006	0,029	0,075
10	0,031	0,044	0,004	0,018	0,144
12	0,032	0,036	0,004	0,021	0,112
16	0,027	0,022	0,006	0,017	0,064
24	0,017	0,018	0,003	0,010	0,046

**Tab. 8.11** Kumulative Urinausscheidung  $U_t$  [ $\mu\text{g}$ ] von Quercetin (detektiert nach Hydrolyse der Quercetinkonjugate) nach Applikation von Zwiebeln.

t [h]	01Z	02Z	03Z	04Z	05Z	06Z	07Z	08Z	09Z	10Z	11Z	12Z	MW	SD	Min	Median	Max
0	0,0	4,6	0,0	4,2	7,8	9,6	4,2	8,3	0,0	0,0	0,0	0	3,2	3,7	0,0	2,1	9,6
3	2560,3	1534,7	1656,6	3254,2	2629,5	3286,8	4048,0	2535,7	1895,0	1466,1	661,5	0,0	2127,4	1154,0	0,0	2215,3	4048,0
6	2853,2	3743,9	3264,6	3870,5	3267,0	3987,1	5364,4	3852,1	2559,4	3909,5	765,1	1317,4	3229,5	1242,4	765,1	3505,4	5364,4
9	2906,5	3930,9	3517,6	4016,6	3764,3	4257,8	5594,8	4600,8	2663,7	4587,4	824,4	5534,7	3849,9	1305,9	824,4	3973,7	5594,8
12	2921,9	4091,7	3600,7	4233,5	4098,9	4435,7	5854,6	5042,6	2902,6	4762,5	902,7	6443,5	4107,6	1456,1	902,7	4166,2	6443,5
24	3033,8	4236,2	3736,3	4258,2	4373,2	4637,5	6195,6	5417,7	2984,9	4910,9	971,0	6571,5	4277,2	1514,4	971,0	4315,7	6571,5
36	3041,8	4298,5	3788,9	4297,8	4460,9	4750,3	6334,3	5531,6	3026,9	4910,9	971,0	6673,4	4340,5	1549,7	971,0	4379,7	6673,4
48	3070,3	4346,8	3825,1	4297,8	4479,5	4830,6	6415,7	5588,5	3026,9	4910,9	971,0	6709,8	4372,7	1567,0	971,0	4413,1	6709,8

**Tab. 8.12** Kumulative Urinausscheidung  $U_t$  [ $\mu\text{g}$ ] von Quercetin (detektiert nach Hydrolyse der Quercetinkonjugate) nach Applikation von Spiraeosid.

t [h]	01S	02S	03S	04S	05S	06S	07S	08S	09S	10S	11S	12S	MW	SD	Min	Median	Max
0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,7	7,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	1,1	2,6	0,0	0,0	7,3
3	2335,6	692,4	1498,3	10,8	2083,8	3310,3	1228,7	1335,3	2186,7	1214,0	1830,1	944,59	1555,9	864,5	10,8	1416,8	3310,3
6	2642,5	5802,1	2077,8	1984,3	2650,0	4199,9	1726,3	1907,5	3303,5	2366,2	2317,9	2001,50	2748,3	1184,6	1726,3	2342,1	5802,1
9	2753,4	5962,7	2129,6	2357,7	2946,7	4618,6	1999,1	2598,6	3752,1	2744,8	2390,6	2055,99	3025,8	1193,9	1999,1	2671,7	5962,7
12	2753,4	6088,1	2182,8	2665,9	3110,5	5012,1	2062,0	2865,3	3830,0	2840,8	2428,3	2076,11	3159,6	1240,4	2062,0	2797,1	6088,1
24	2807,3	6207,4	2225,7	2806,4	3182,6	5253,0	2150,4	3211,6	3931,7	2977,5	2513,4	2129,31	3283,0	1269,9	2129,3	2892,4	6207,4
36	2807,3	6234,4	2249,2	2928,9	3243,2	5312,3	2219,5	3219,6	3931,7	2977,5	2564,7	2185,27	3322,8	1265,0	2185,3	2953,2	6234,4
48	2807,3	6262,5	2256,3	2953,6	3273,2	5339,9	2219,5	3219,6	3931,7	2977,5	2564,7	2185,27	3332,6	1273,4	2185,3	2965,6	6262,5

**Tab. 8.13** Kumulative Urinausscheidung  $U_t$  [ $\mu\text{g}$ ] von Quercetin (detektiert nach Hydrolyse der Quercetinkonjugate) nach Applikation von Buchweizenkrauttee.

t [h]	01B	02B	03B	04B	05B	06B	07B	08B	09B	10B	11B	12B	MW	SD	Min	Median	Max
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	97,8	100,0	438,8	115,6	94,5	308,5	158,8	117,3	86,4	123,2	279,9	122,7	170,3	111,4	86,4	120,0	438,8
6	199,9	618,4	2133,7	153,8	1043,2	1520,3	896,6	912,9	455,5	894,2	1262,2	665,6	896,4	559,0	153,8	895,4	2133,7
9	228,6	721,1	2350,1	166,2	1469,1	1752,7	1037,1	2353,2	618,9	1242,6	1457,2	777,3	1181,2	731,1	166,2	1139,9	2353,2
12	260,3	737,5	2410,6	179,5	1635,5	1917,6	1139,6	2353,2	653,4	1449,8	1503,0	811,6	1254,3	751,4	179,5	1294,7	2410,6
24	291,0	756,5	2464,7	183,6	1716,8	2062,1	1206,7	4255,3	687,9	1594,9	1694,2	816,7	1477,5	1123,5	183,6	1400,8	4255,3
36	298,3	756,5	2473,4	183,6	1759,6	2140,8	1226,5	4482,3	710,8	1594,9	1707,1	816,7	1512,5	1178,0	183,6	1410,7	4482,3
48	298,3	756,5	2473,4	183,6	1767,4	2152,4	1226,5	4482,3	710,8	1594,9	1707,1	816,7	1514,2	1178,7	183,6	1410,7	4482,3

**Tab. 8.14** Kumulative Urinausscheidung  $U_t$  [ $\mu\text{g}$ ] von Quercetin (detektiert nach Hydrolyse der Quercetinkonjugate) nach Applikation von Rutin.

t [h]	01R	02R	03R	04R	05R	06R	07R	08R	09R	10R	11R	12R	MW	SD	Min	Median	Max
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	24,2	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	7,0	0,0	0,0	24,2
3	9,5	2669,5	49,2	0,0	7,4	8,3	11,9	50,0	10,7	17,5	19,4	26,3	240,0	765,3	0,0	14,7	2669,5
6	237,6	2742,5	2116,8	8,7	229,4	58,8	17,1	77,8	177,5	376,4	463,6	144,2	554,2	896,7	8,7	203,4	2742,5
9	289,8	2889,0	2282,7	16,6	882,7	90,4	41,0	379,7	225,5	1477,5	522,6	358,6	788,0	941,9	16,6	369,1	2889,0
12	323,5	2945,5	2329,7	22,6	2146,0	119,4	137,3	774,0	421,5	1825,3	550,7	524,9	1010,0	1013,2	22,6	537,8	2945,5
24	357,7	2959,8	2404,6	26,4	2645,2	241,0	170,0	3000,0	560,5	1911,5	560,2	536,3	1281,1	1192,0	26,4	560,3	3000,0
36	357,7	2974,9	2424,2	26,4	2687,1	253,9	181,5	3244,3	578,2	1911,5	560,2	612,1	1317,7	1226,2	26,4	595,2	3244,3
48	357,7	2981,2	2426,8	26,4	2691,8	257,4	181,5	3347,3	578,2	1911,5	560,2	612,1	1327,7	1242,4	26,4	595,2	3347,3

**Tab. 8.15** Renale Elimination von Homovanillinsäure [ $\mu\text{Mol}$ ] pro Urinsammelintervall dt [h]

dt [h]	Z MW	Z SD	S MW	S SD	B MW	B SD	R MW	R SD
0	2,9	3,2	1,3	2,3	1,1	1,6	1,0	2,3
0-3	3,5	2,0	3,9	3,0	3,5	2,2	4,0	2,1
3-6	6,1	4,8	5,8	4,3	20,0	12,2	7,9	4,3
6-9	11,4	12,5	11,3	8,8	26,3	15,4	12,3	9,0
9-12	9,1	7,3	9,2	6,0	21,0	9,8	15,7	11,5
12-24	19,7	11,9	19,9	9,3	35,8	15,9	33,2	21,1
24-36	13,1	14,2	13,5	8,4	11,9	8,1	21,8	15,0
36-48	6,3	5,1	10,7	8,5	9,3	11,2	9,1	8,2
Summe	72,0	31,9	75,6	34,2	127,9	48,0	105,1	41,7



**Tab. 8.16** Pharmakokinetische Parameter der Nichtkompartiment-Analyse von Quercetin im Plasma nach Applikation von Zwiebeln

Subject	no.	01Z	02Z	03Z	04Z	05Z	06Z	07Z	08Z	09Z	10Z	11Z	12Z*
$C_{\max}$	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	1,53	2,82	2,20	2,38	4,44	5,67	2,80	1,01	1,15	1,01	1,25	1,45
$T_{\max}$	[h]	0,75	0,45	0,83	0,75	0,55	0,30	0,73	0,53	1,00	0,48	1,00	0,78
ke	[1/h]	0,051	0,034	0,078	0,053	0,071	0,049	0,072	0,057	0,080	0,122	0,138	0,069
$T_{1/2}$	[h]	13,7	20,3	8,9	13,2	9,8	14,3	9,6	12,2	8,7	5,7	5,0	10,1
$AUC_{\text{cum}}$	[h· $\mu\text{g/mL}$ ]	4,2	14,5	11,3	6,8	16,0	27,0	11,1	6,4	2,7	5,2	5,9	5,0
$AUC_{\text{last}}$	[h· $\mu\text{g/mL}$ ]	1,06	6,23	1,38	1,46	2,63	11,30	1,75	2,61	0,20	0,29	0,22	0,09
$AUC_{\text{tot}}$	[h· $\mu\text{g/mL}$ ]	5,2	20,7	12,6	8,3	18,7	38,3	12,9	9,0	2,9	5,5	6,1	5,1
% $AUC_{\text{last}}$		20,4	30,1	10,9	17,6	14,1	29,5	13,6	29,1	6,9	5,2	3,6	1,9
$AUMC_{\text{cum}}$	[h <sup>2</sup> · $\mu\text{g/mL}$ ]	20,6	99,5	79,6	42,3	106,8	209,0	76,5	58,7	12,7	33,8	37,7	17,9
$AUMC_{\text{last}}$	[h <sup>2</sup> · $\mu\text{g/mL}$ ]	45,9	328,8	50,2	61,8	99,0	497,3	65,5	108,0	7,2	9,1	6,7	3,6
$AUMC_{\text{tot}}$	[h <sup>2</sup> · $\mu\text{g/mL}$ ]	66,4	428,3	129,9	104,0	205,8	706,2	142,0	166,8	19,9	42,9	44,5	21,5
$MRT_{\text{abs}}$	[h]	12,7	20,7	10,3	12,6	11,0	18,4	11,0	18,5	6,9	7,8	7,3	4,2
solver $t_{\max}$	[h]	0,75	0,45	0,83	0,75	0,55	0,30	0,73	0,53	1,00	0,48	1,00	0,78
$k_a$	[1/h]	6,5	13,3	5,1	6,5	8,9	20,1	6,2	9,8	4,0	9,1	3,3	5,7
$MAT$	[h]	0,15	0,08	0,20	0,15	0,11	0,05	0,16	0,10	0,25	0,11	0,30	0,18
$MRT_{\text{iv}}$	[h]	12,6	20,6	10,1	12,4	10,9	18,4	10,9	18,4	6,6	7,7	7,0	4,1
Dose	[mg]	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
$Cl_{\text{tot/f}}$	[L/h]	19,2	4,8	7,9	12,1	5,4	2,6	7,8	11,1	34,6	18,2	16,4	19,7
$Vd_{\text{ss/f}}$	[L]	241,1	99,2	79,6	149,8	58,5	48,1	84,2	205,2	229,3	140,2	114,9	80,1
$Vd_{\text{area/f}}$	[L]	378,0	141,0	101,0	229,1	75,9	53,9	107,3	195,5	431,6	149,1	119,0	287,3

\* ke wurde als Mittelwert der Eliminationskonstanten der drei anderen Applikationen ermittelt

**Tab. 8.17** Pharmakokinetische Parameter der Nichtkompartiment-Analyse von Quercetin im Plasma nach Applikation von Spiraeosid

subject	no.	01S	02S	03S	04S	05S	06S	07S	08S	09S	10S	11S	12S
$C_{max}$	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	1,04	2,98	1,31	1,39	3,60	6,60	1,93	0,70	1,22	1,22	1,82	1,56
$T_{max}$	[h]	0,75	0,50	0,53	1,48	0,48	1,00	0,73	0,48	0,52	0,98	0,48	0,48
ke	[1/h]	0,092	0,037	0,058	0,068	0,063	0,048	0,081	0,036	0,074	0,093	0,050	0,066
$T_{1/2}$	[h]	7,6	18,9	12,0	10,2	11,1	14,4	8,6	19,4	9,3	7,4	13,8	10,5
$AUC_{cum}$	[h· $\mu\text{g/mL}$ ]	2,6	13,6	4,9	6,6	13,2	34,9	5,1	3,0	3,1	3,9	4,7	4,8
$AUC_{last}$	[h· $\mu\text{g/mL}$ ]	0,2	3,7	1,1	1,1	1,9	14,1	0,3	1,9	0,3	0,2	1,0	0,6
$AUC_{tot}$	[h· $\mu\text{g/mL}$ ]	2,8	17,3	6,0	7,6	15,1	49,0	5,5	4,9	3,4	4,1	5,7	5,4
% $AUC_{last}$		7,2	21,6	18,4	14,1	12,5	28,8	6,3	37,9	8,8	4,7	17,4	10,4
$AUMC_{cum}$	[h <sup>2</sup> · $\mu\text{g/mL}$ ]	13,2	58,9	27,5	44,0	113,6	289,5	22,2	24,8	14,6	21,3	26,6	27,0
$AUMC_{last}$	[h <sup>2</sup> · $\mu\text{g/mL}$ ]	7,0	191,3	45,1	41,9	76,0	637,2	12,4	96,0	10,9	6,5	43,3	21,6
$AUMC_{tot}$	[h <sup>2</sup> · $\mu\text{g/mL}$ ]	20,2	250,2	72,7	85,9	189,6	926,7	34,5	120,8	25,5	27,8	69,9	48,6
$MRT_{abs}$	[h]	7,2	14,5	12,2	11,3	12,6	18,9	6,3	24,6	7,6	6,8	12,2	9,0
solver $t_{max}$	[h]	0,75	0,50	0,53	1,48	0,48	1,00	0,73	0,48	0,52	0,98	0,48	0,48
ka	[1/h]	5,6	11,5	9,7	2,5	10,7	4,6	5,9	12,1	9,5	3,9	11,2	10,6
MAT	[h]	0,18	0,09	0,10	0,40	0,09	0,22	0,17	0,08	0,11	0,26	0,09	0,09
$MRT_{iv}$	[h]	7,1	14,4	12,1	10,9	12,5	18,7	6,1	24,5	7,5	6,6	12,1	8,9
Dose	[mg]	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
$Cl_{tot}/f$	[L/h]	35,9	5,8	16,8	13,1	6,6	2,0	18,3	20,4	29,8	24,7	17,4	18,5
$Vd_{ss}/f$	[L]	254,1	83,2	203,3	142,3	82,8	38,1	112,2	498,9	223,0	162,6	210,4	165,1
$Vd_{area}/f$	[L]	392,7	158,0	289,6	193,3	105,8	42,5	227,0	570,3	400,6	264,1	345,6	281,1

**Tab. 8.18** Pharmakokinetische Parameter der Nichtkompartiment-Analyse von Quercetin im Plasma nach Applikation von Buchweizenkrauttee.

subject	no.	01B	02B*	03B	04B	05B	06B	07B*	08B*	09B	10B	11B	12B
$C_{max}$	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	0,06	0,07	1,11	0,12	2,24	1,40	0,51	0,90	0,07	0,30	0,56	0,31
$T_{max}$	[h]	3,17	1,52	3,08	3,00	3,93	3,02	6,08	8,00	6,02	5,97	4,02	4,05
ke	[1/h]	0,089	0,042	0,071	0,061	0,086	0,049	0,079	0,049	0,055	0,081	0,174	0,080
$T_{1/2}$	[h]	7,8	16,5	9,7	11,4	8,0	14,1	8,8	14,1	12,6	8,5	4,0	8,6
$AUC_{cum}$	[h· $\mu\text{g/mL}$ ]	0,4	0,8	4,2	0,6	7,5	10,8	3,6	11,0	0,5	1,6	2,7	2,1
$AUC_{last}$	[h· $\mu\text{g/mL}$ ]	0,1	0,3	0,6	0,2	0,8	5,2	0,8	8,0	0,2	0,2	0,1	0,2
$AUC_{tot}$	[h· $\mu\text{g/mL}$ ]	0,5	1,2	4,8	0,8	8,3	15,9	4,4	19,0	0,6	1,8	2,8	2,3
% $AUC_{last}$		14,0	28,4	12,4	20,6	9,6	32,4	17,2	41,9	23,5	10,3	1,9	9,6
$AUMC_{cum}$	[h <sup>2</sup> · $\mu\text{g/mL}$ ]	3,7	6,7	26,1	4,3	52,6	103,0	27,2	133,6	4,4	12,1	17,4	15,4
$AUMC_{last}$	[h <sup>2</sup> · $\mu\text{g/mL}$ ]	2,3	15,6	22,4	6,6	27,8	224,8	27,4	350,3	6,3	6,6	1,6	8,0
$AUMC_{tot}$	[h <sup>2</sup> · $\mu\text{g/mL}$ ]	6,0	22,3	48,5	10,9	80,3	327,8	54,6	483,9	10,7	18,7	19,0	23,4
$MRT_{abs}$	[h]	12,9	19,3	10,1	13,5	9,7	20,6	12,4	25,5	16,6	10,4	6,9	10,1
lag time	[h]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	3,0	4,0	1,5	0,0	0,0
solver $t_{max}$	[h]	3,2	1,5	3,1	3,0	3,9	3,0	3,1	5,0	2,0	4,5	4,0	4,0
ka	[1/h]	0,77	2,81	0,89	0,99	0,56	1,07	0,85	0,52	1,78	0,47	0,34	0,56
MAT	[h]	1,30	0,36	1,12	1,01	1,78	0,94	1,17	1,92	0,56	2,11	2,91	1,79
$MRT_{iv}$	[h]	11,6	18,9	9,0	12,5	7,9	19,6	8,2	20,6	12,1	6,8	4,0	8,3
Dose	[mg]	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
$Cl_{tot}/f$	[L/h]	430,4	172,4	41,8	247,2	24,0	12,5	45,5	10,5	310,8	111,7	72,7	86,2
$Vd_{ss}/f$	[L]	4982,6	3258,7	377,4	3080,9	189,5	246,0	511,7	248,3	4999,9	929,1	289,9	716,7
$Vd_{area}/f$	[L]	4847,1	4091,8	587,5	4051,9	278,6	254,4	579,2	213,7	5641,0	1377,0	418,6	1072,3

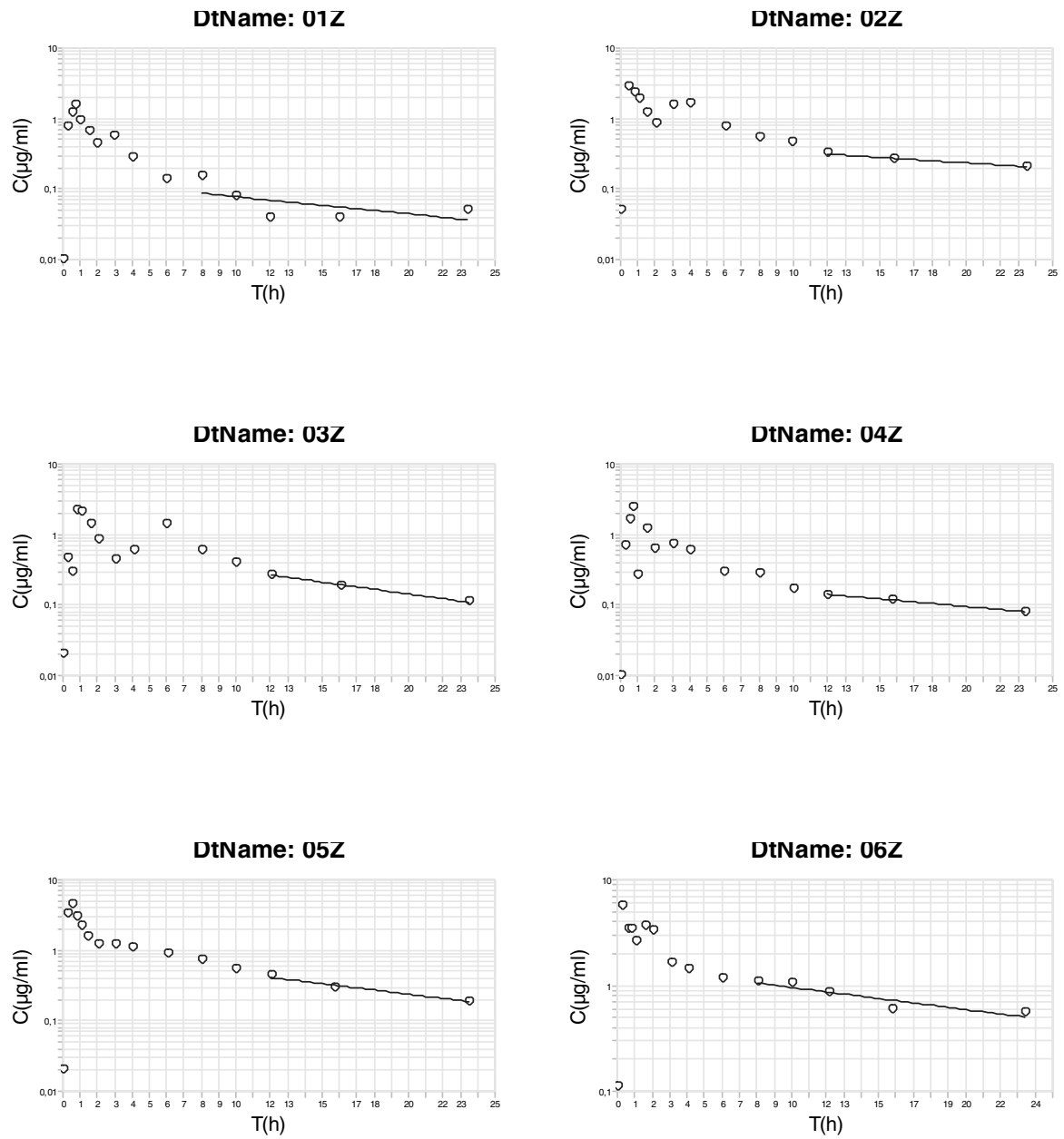
\* ke wurde als Mittelwert der Eliminationskonstanten der drei anderen Applikationen ermittelt

**Tab. 8.19** Pharmakokinetische Parameter der Nichtkompartiment-Analyse von Quercetin im Plasma nach Applikation von Rutin

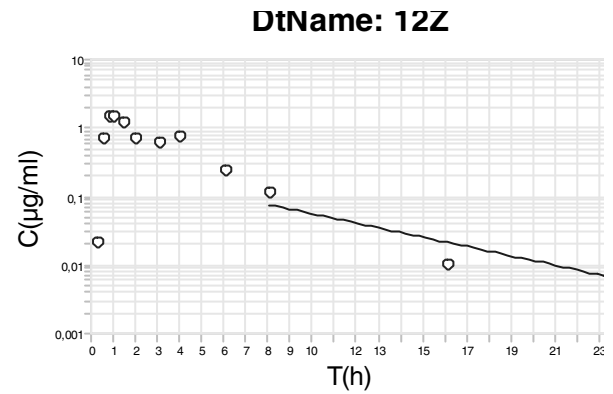
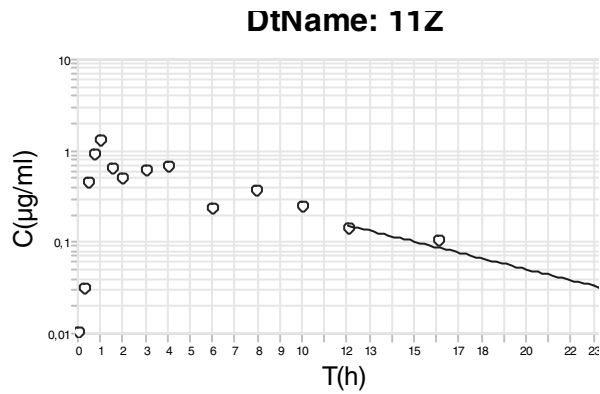
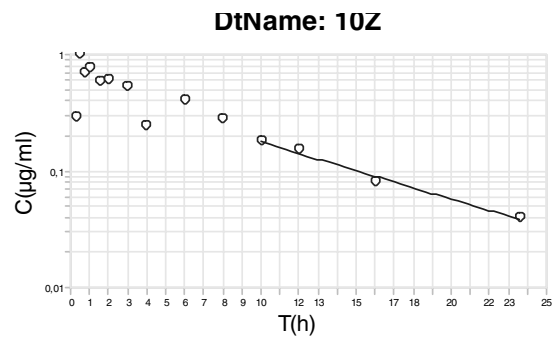
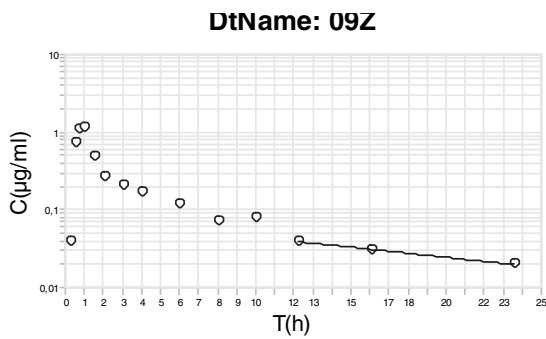
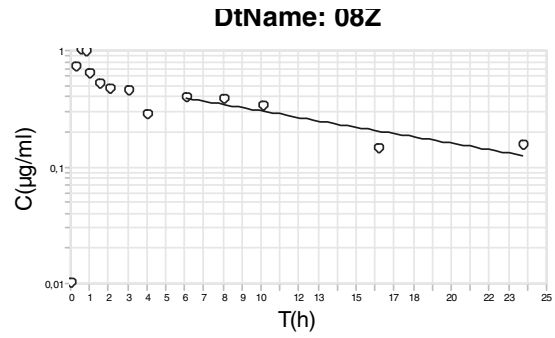
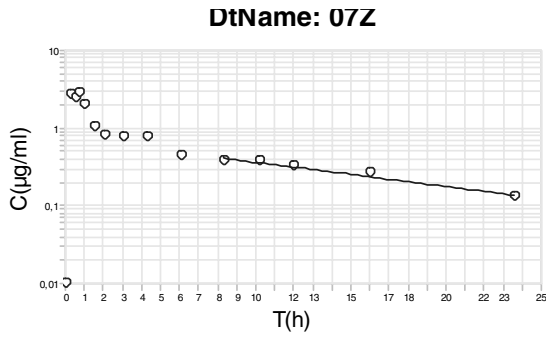
subject	no.	01R*	02R	03R	04R	05R*	06R*	07R	08R	09R*	10R	11R	12R
$C_{max}$	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	0,03	0,49	1,04	0,02	0,91	0,11	0,08	0,44	0,04	0,36	0,17	0,18
$T_{max}$	[h]	6,00	4,00	4,03	6,03	10,42	3,00	8,00	12,10	10,10	8,00	4,02	8,08
ke	[1/h]	0,077	0,056	0,069	0,043	0,073	0,049	0,083	0,055	0,070	0,073	0,038	0,060
$T_{1/2}$	[h]	9,0	12,5	10,0	16,1	9,5	14,3	8,4	12,5	9,9	9,5	18,5	11,6
$AUC_{cum}$	[h· $\mu\text{g/mL}$ ]	0,5	2,8	4,5	0,2	7,3	1,6	1,0	5,6	0,3	2,4	1,2	2,2
$AUC_{last}$	[h· $\mu\text{g/mL}$ ]	0,3	0,7	0,7	0,1	1,6	1,4	0,3	4,3	0,1	0,7	0,9	0,7
$AUC_{tot}$	[h· $\mu\text{g/mL}$ ]	0,8	3,5	5,2	0,4	9,0	3,0	1,3	9,9	0,4	3,1	2,1	2,9
% $AUC_{last}$		37,8	19,3	12,7	38,6	18,0	46,6	19,5	43,6	15,6	22,1	41,9	24,9
$AUMC_{cum}$	[h <sup>2</sup> · $\mu\text{g/mL}$ ]	5,9	24,5	33,0	2,3	85,5	20,0	10,8	78,0	4,2	26,5	12,2	20,8
$AUMC_{last}$	[h <sup>2</sup> · $\mu\text{g/mL}$ ]	10,5	28,5	25,5	6,5	60,3	61,1	9,0	178,3	2,4	24,8	44,8	28,7
$AUMC_{tot}$	[h <sup>2</sup> · $\mu\text{g/mL}$ ]	16,5	53,0	58,5	8,9	145,8	81,0	19,8	256,3	6,5	51,3	57,1	49,5
$MRT_{abs}$	[h]	21,9	15,1	11,3	24,5	16,3	27,3	15,2	26,0	16,2	16,7	26,6	17,3
lag time	[h]	3,0	2,0	1,8	4,0	1,9	2,0	6,0	6,1	2,1	4,0	3,1	1,5
solver $t_{max}$	[h]	3,0	2,0	2,2	2,1	8,5	1,0	2,0	6,0	8,0	4,0	0,9	6,5
$k_a$	[1/h]	0,89	1,79	1,45	1,88	0,18	4,60	1,55	0,37	0,20	0,60	5,47	0,31
MAT	[h]	1,12	0,56	0,69	0,53	5,62	0,22	0,65	2,68	4,91	1,67	0,18	3,20
$MRT_{iv}$	[h]	17,8	12,6	8,8	20,0	8,7	25,1	8,6	17,3	9,3	11,0	23,3	14,1
Dose	[mg]	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
$Cl_{tot}/f$	[L/h]	265,9	57,1	38,6	553,0	22,3	67,5	153,9	20,3	497,1	65,0	93,1	69,8
$Vd_{ss}/f$	[L]	5529,3	830,5	410,4	13258,2	238,1	1830,1	2240,5	472,3	5632,8	976,8	2455,6	982,9
$Vd_{area}/f$	[L]	3453,5	1026,3	560,0	12861,2	305,1	1388,3	1856,2	366,5	7118,2	889,7	2482,7	1169,1

\* ke wurde als Mittelwert der Eliminationskonstanten der drei anderen Applikationen ermittelt

**Abb. 8.1** Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Zwiebeln: Probanden 1 bis 6

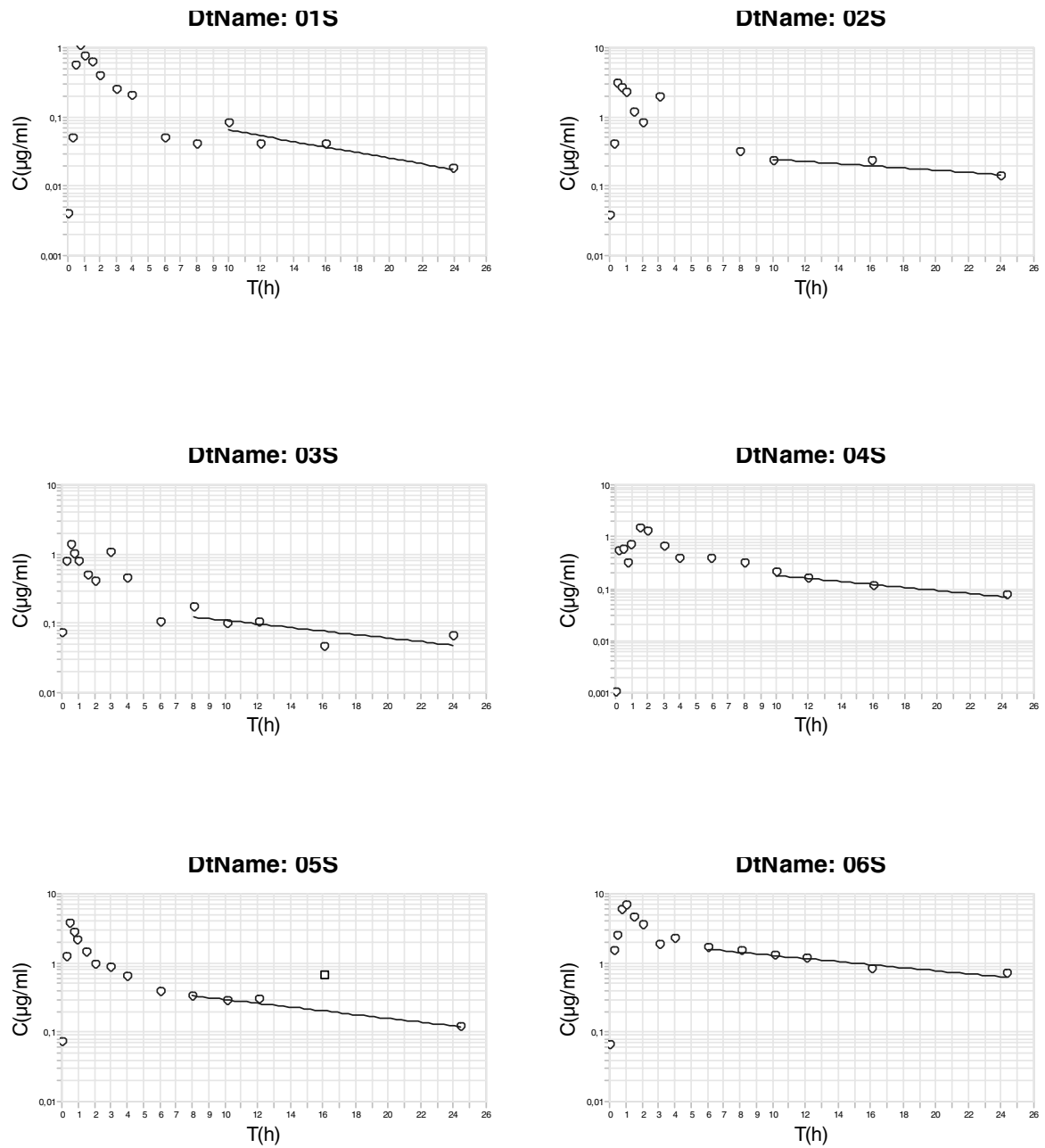


**Abb. 8.2** Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Zwiebeln: Probanden 7 bis 12

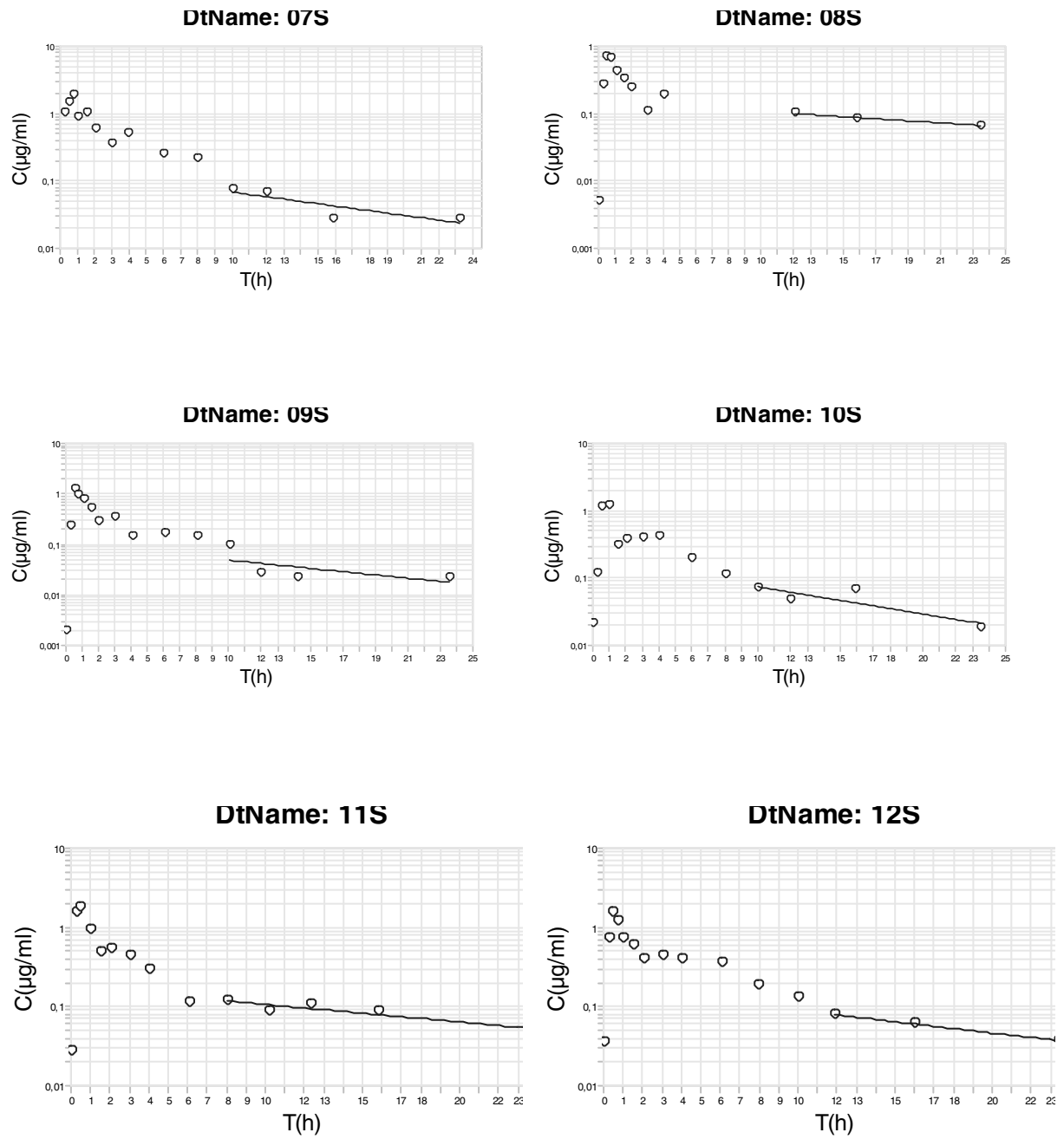


ke von 12Z wurde nicht aus diesem Graph, sondern aus dem Mittelwert der 3 anderen Applikationen ermittelt.

**Abb. 8.3** Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Spiraeosid: Probanden 1 bis 6

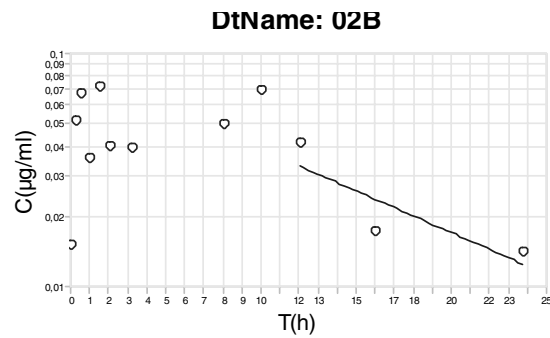
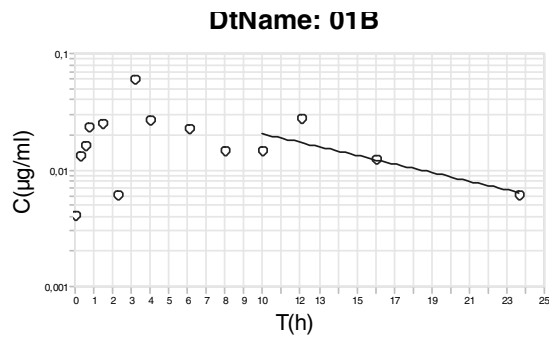


**Abb. 8.4** Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Spiraeosid: Probanden 7 bis 12

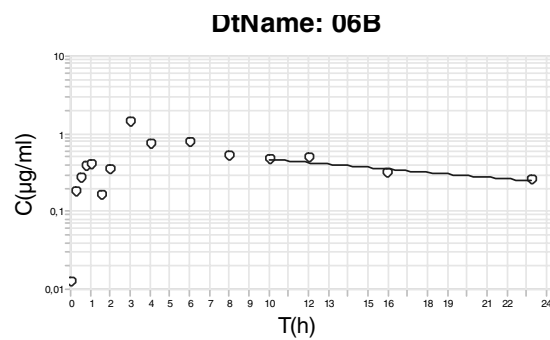
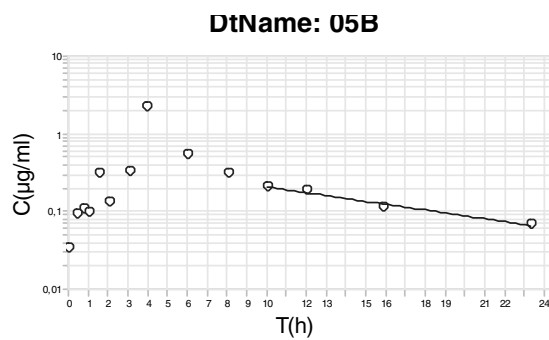
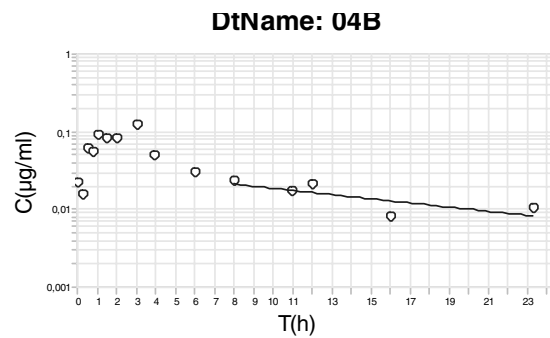
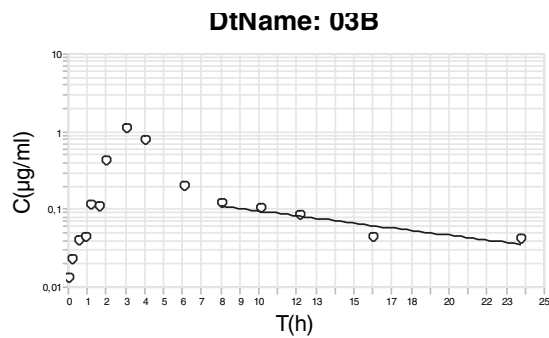




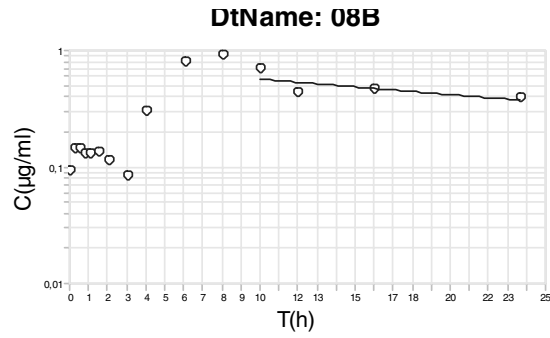
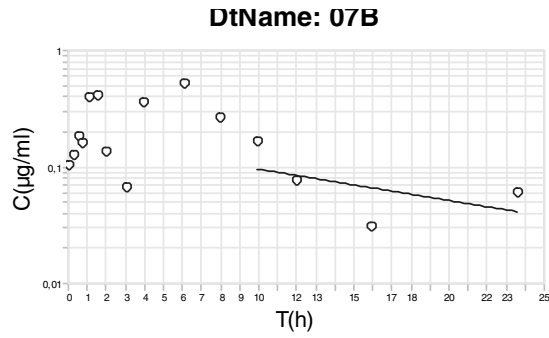
**Abb. 8.5** Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Buchweizenkrauttee: Probanden 1 bis 6



ke von 02B wurde nicht aus diesem Graph, sondern aus dem Mittelwert der 3 anderen Applikationen ermittelt.

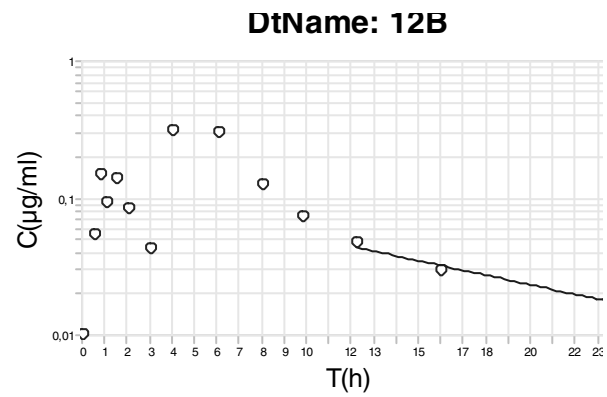
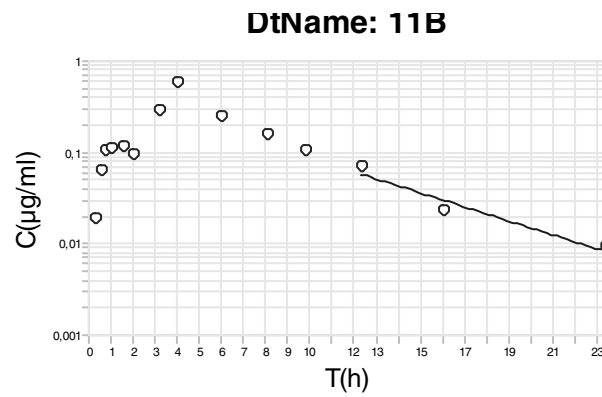
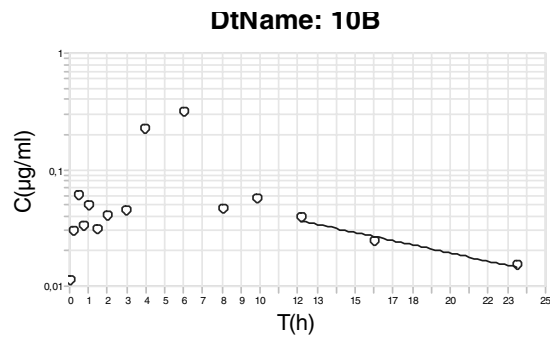
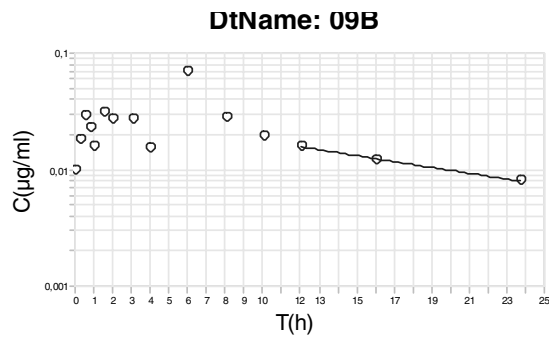


**Abb. 8.6** Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Buchweizenkrauttee: Probanden 7 bis 12

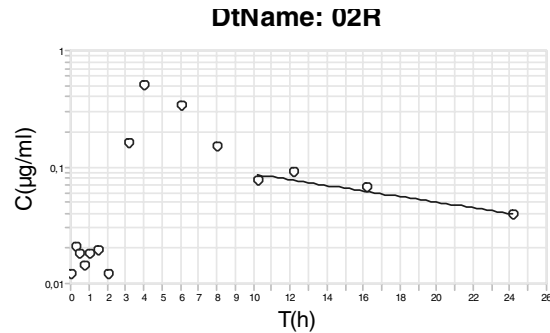
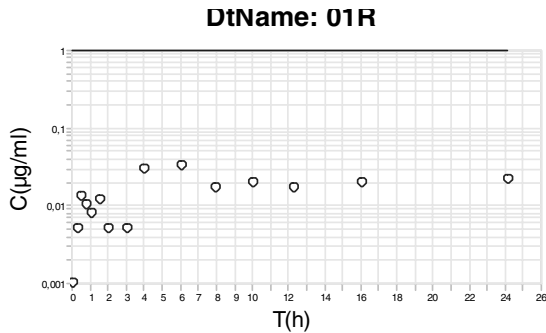


ke von 07B wurde nicht aus diesem Graph, sondern aus dem Mittelwert der 3 anderen Applikationen ermittelt.

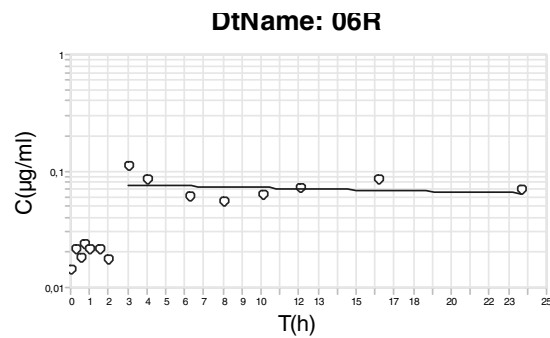
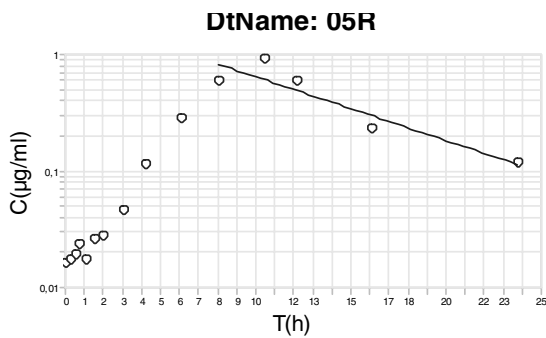
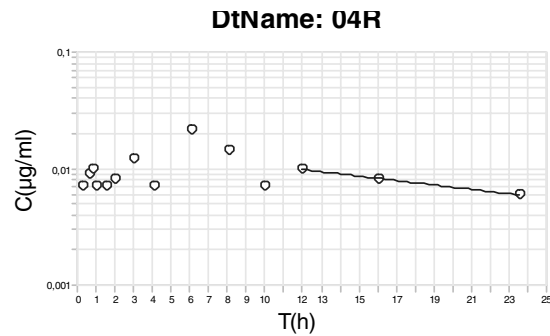
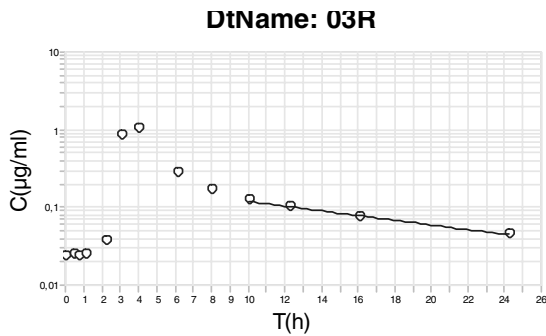
ke von 08B wurde nicht aus diesem Graph, sondern aus dem Mittelwert der 3 anderen Applikationen ermittelt.



**Abb. 8.7** Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Rutin: Probanden 1 bis 6



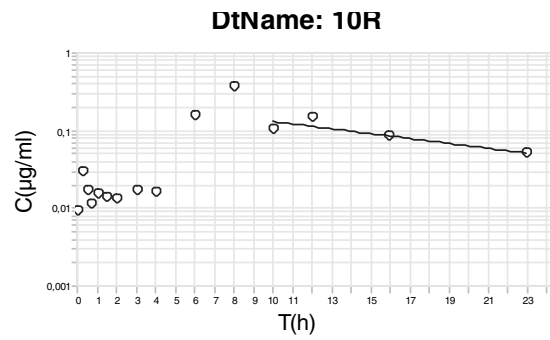
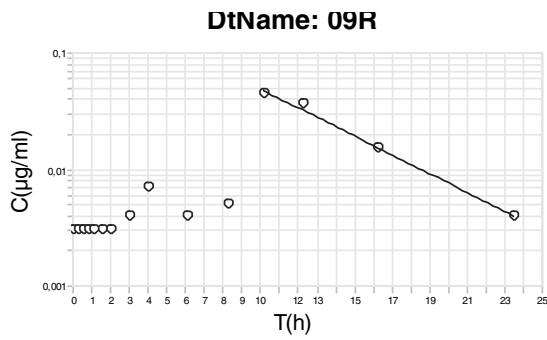
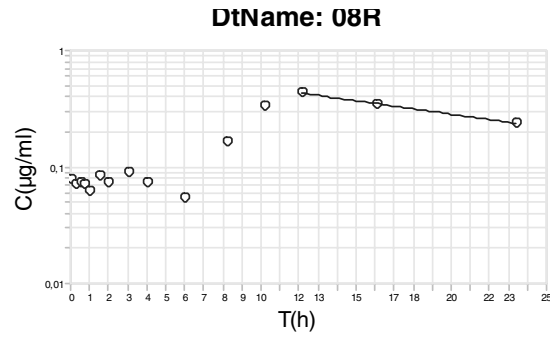
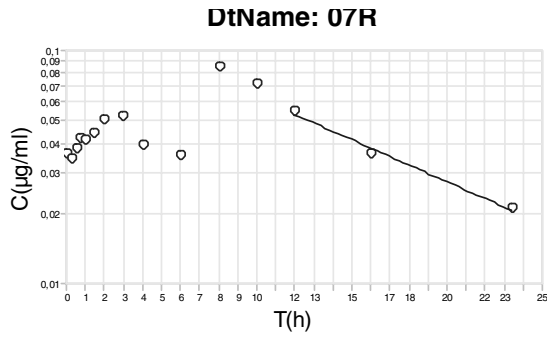
ke von 01R wurde nicht aus diesem Graph, sondern aus dem Mittelwert der 3 anderen Applikationen ermittelt.



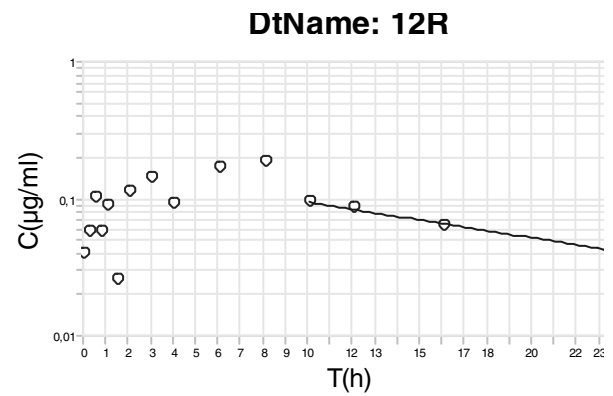
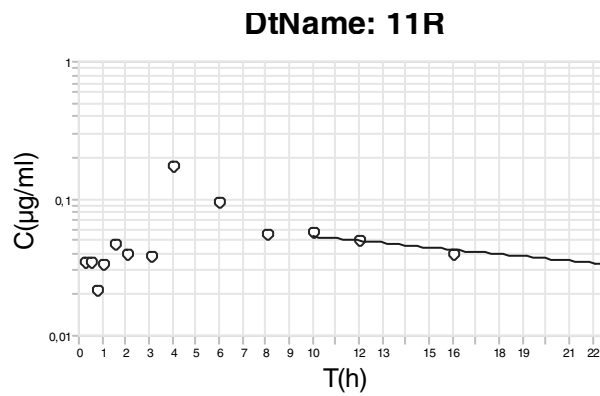
ke von 05R wurde nicht aus diesem Graph, sondern aus dem Mittelwert der 3 anderen Applikationen ermittelt.

ke von 06R wurde nicht aus diesem Graph, sondern aus dem Mittelwert der 3 anderen Applikationen ermittelt.

**Abb. 8.8** Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Rutin: Probanden 7 bis 12



ke von 09R wurde nicht aus diesem Graph, sondern aus dem Mittelwert der 3 anderen Applikationen ermittelt.



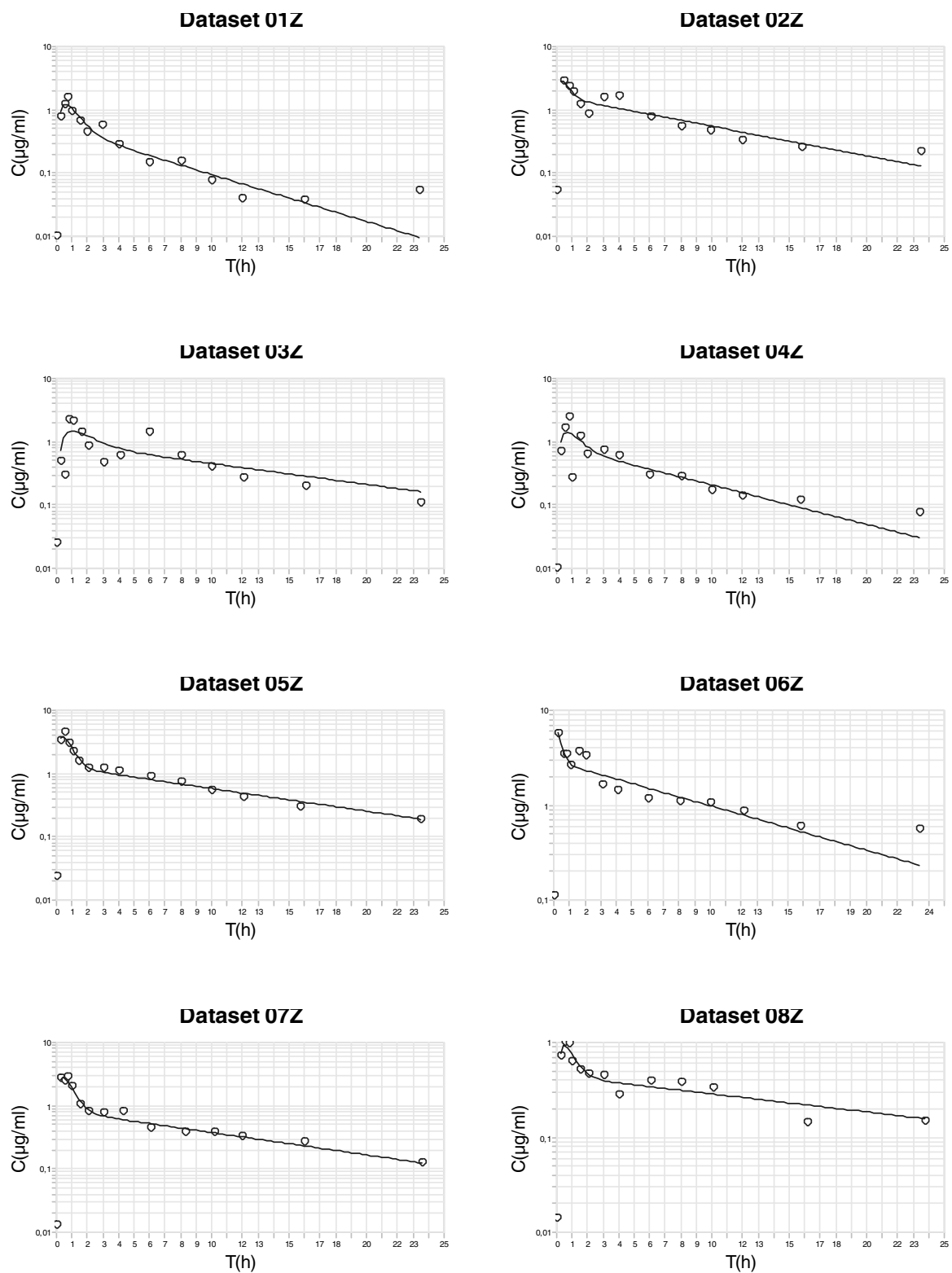
**Tab. 8.20** Berechnungsgrundlagen der in Kinetica® 2000 verwendeten pharmakokinetische Parameter für extravasculäre Applikation.

parameter	1 comp model	2 comp model
V <sub>c</sub>	$V_c = \frac{\text{Dose}}{A}$	$V_c = \frac{\text{Dose}}{A + B}$
AUC	$\text{AUC} = A \frac{k_a}{k_a - \alpha} \left( \frac{1}{\alpha} - \frac{1}{k_a} \right)$	$\text{AUC} = \left[ A \frac{k_a}{k_a - \alpha} \left( \frac{1}{\alpha} - \frac{1}{k_a} \right) + B \frac{k_a}{k_a - \beta} \left( \frac{1}{\beta} - \frac{1}{k_a} \right) \right]$
AUMC	$\text{AUC} = A \frac{k_a}{k_a - \alpha} \left( \frac{1}{\alpha^2} - \frac{1}{k_a^2} \right)$	$\text{AUC} = \left[ A \frac{k_a}{k_a - \alpha} \left( \frac{1}{\alpha^2} - \frac{1}{k_a^2} \right) + B \frac{k_a}{k_a - \beta} \left( \frac{1}{\beta^2} - \frac{1}{k_a^2} \right) \right]$
T <sub>1/2</sub>	$T_{1/2} \alpha = \frac{\ln 2}{\alpha}$	$T_{1/2} \beta = \frac{\ln 2}{\beta}$
MRT		$\text{MRT} = \frac{\text{AUMC}}{\text{AUC}} - \left( \text{lag} + \frac{1}{k_a} \right)$
Cl, V <sub>ss</sub> , V <sub>z</sub>	$\text{Cl} = \frac{\text{Dose}}{\text{AUC}}$	$V_{ss} = \text{Cl} \cdot \text{MRT} \quad V_z = \frac{\text{Cl}}{L_z}$
kel	$\text{kel} = L_z = \alpha$	$\text{kel} = \frac{\alpha \cdot \beta}{k_{21}}$
C <sub>0</sub>	$C_0 = A$	$C_0 = A + B$
K <sub>21</sub>		$k_{21} = \frac{A \cdot \beta + B \cdot \alpha}{C_0}$
K <sub>12</sub>		$k_{12} = \alpha + \beta - (k_{21} + \text{kel})$

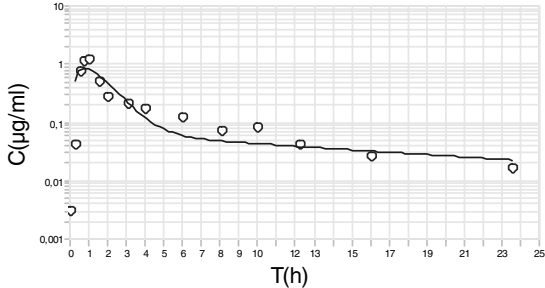
**Tab. 8.21** Tabellarische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zweikompartmentmodell nach Applikation von Zwiebeln

Study	Unit	01Z	02Z	03Z	04Z	05Z	06Z	07Z	08Z	09Z	10Z	11Z	12Z
Ka	[1/h]	2,371	3,579	1,354	1,977	2,824	5,510	2,651	2,438	1,236	1,300	0,902	0,983
Vc	[L]	39,09	14,07	33,79	31,38	10,07	6,66	13,65	45,28	42,74	43,09	46,66	37,97
Ke	[1/h]	0,621	0,445	0,214	0,465	0,533	0,532	0,584	0,207	0,756	0,403	0,329	0,514
K12	[1/h]	0,735	2,622	0,587	1,005	1,965	4,708	1,818	1,792	0,550	1,383	0,624	0,189
K21	[1/h]	0,451	0,949	0,400	0,593	0,442	1,324	0,376	0,525	0,085	0,603	0,421	0,364
AUC	[h·µg/mL]	4,12	15,97	13,82	6,86	18,62	28,22	12,55	10,68	3,09	5,76	6,51	5,13
AUMC	[h <sup>2</sup> ·µg/mL]	19,19	139,47	169,54	43,24	196,70	246,58	130,03	232,34	33,17	51,51	56,36	20,37
MRT	[h]	4,24	8,45	11,53	5,80	10,21	8,56	9,99	21,34	9,91	8,17	7,54	2,96
Lz	[1/h]	0,171	0,108	0,076	0,144	0,082	0,109	0,081	0,044	0,048	0,106	0,11	0,22
Cmax calc	[µg/mL]	1,24	2,97	1,45	1,41	3,99	5,95	2,90	0,94	0,84	0,78	0,82	1,16
Tmax calc	[h]	0,58	0,34	1,07	0,65	0,40	0,21	0,42	0,50	0,80	0,79	1,26	1,26
A	[µg/mL]	2,07	5,54	2,05	2,38	8,64	12,15	6,50	1,77	2,27	1,79	1,57	2,03
Alpha	[1/h]	1,64	3,91	1,12	1,92	2,86	6,45	2,70	2,48	1,34	2,28	1,26	0,84
B	[µg/mL]	0,49	1,57	0,91	0,81	1,29	2,88	0,83	0,44	0,07	0,53	0,58	0,60
Beta	[1/h]	0,17	0,11	0,08	0,14	0,08	0,11	0,08	0,04	0,05	0,11	0,11	0,22
T1/2 Ka	[h]	0,29	0,19	0,51	0,35	0,25	0,13	0,26	0,28	0,56	0,53	0,77	0,71
Tabs	[h]	1,46	0,97	2,56	1,75	1,23	0,63	1,31	1,42	2,81	2,67	3,84	3,53
T1/2 alpha	[h]	0,42	0,18	0,62	0,36	0,24	0,11	0,26	0,28	0,52	0,30	0,55	0,82
T1/2 beta	[h]	4,05	6,41	9,11	4,83	8,40	6,35	8,51	15,83	14,54	6,51	6,33	3,13
T1/2 Lz	[h]	4,05	6,41	9,11	4,83	8,40	6,35	8,51	15,83	14,54	6,51	6,33	3,13
T1/2 Ke	[h]	1,12	1,56	3,24	1,49	1,30	1,30	1,19	3,35	0,92	1,72	2,11	1,35
Vz	[L]	141,74	57,94	95,07	101,52	65,13	32,46	97,81	213,80	677,95	163,10	140,15	88,20
Cl	[L/h]	24,27	6,26	7,24	14,58	5,37	3,54	7,97	9,36	32,32	17,36	15,35	19,50

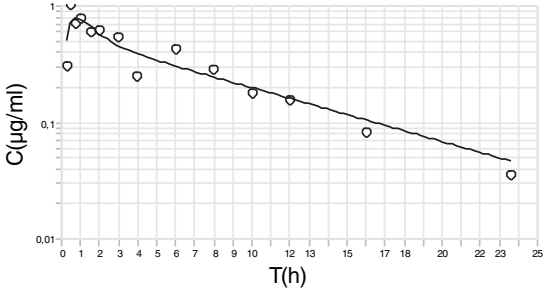
**Abb. 8.9** Graphische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zweikompartimentmodell nach Applikation von Zwiebeln. In den Abbildungen sind die erhaltenen (Punkte) und die berechneten (Linie) Plasmakonzentrationen dargestellt.



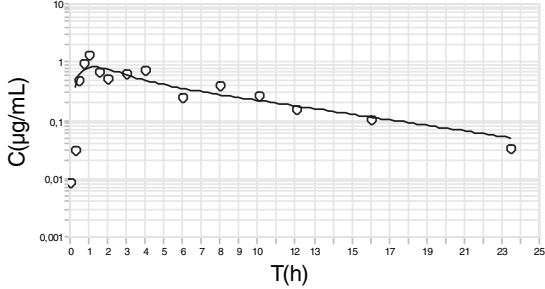
**Dataset 09Z**



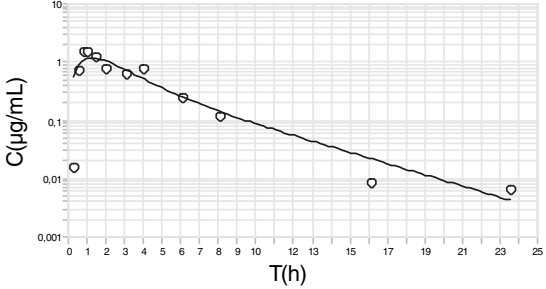
**Dataset 10Z**



**Dataset 11Z**



**Dataset 12Z**

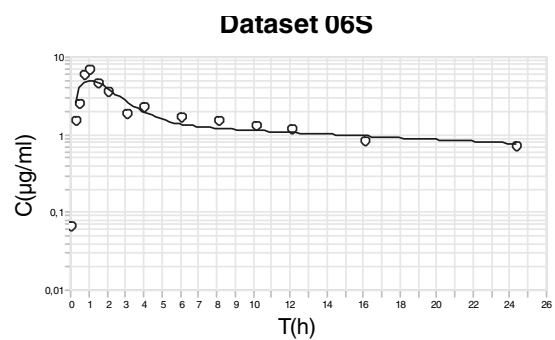
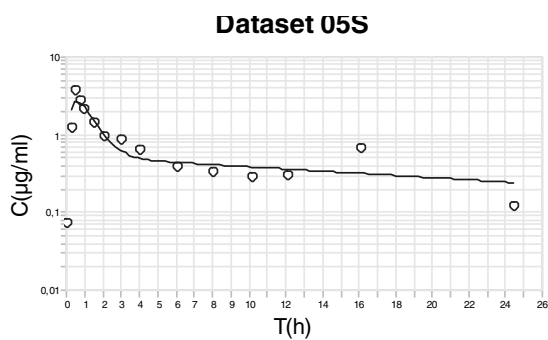
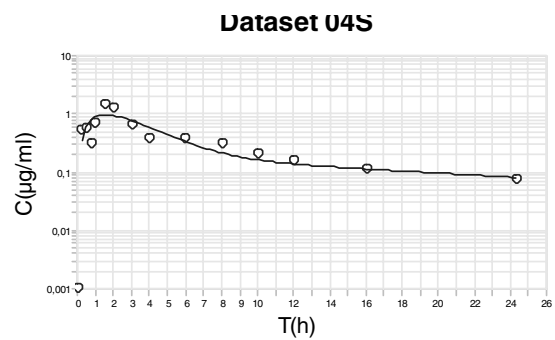
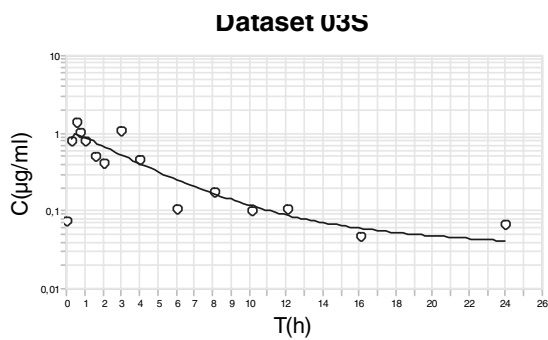
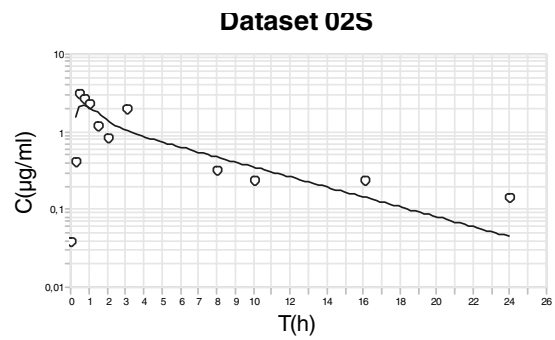
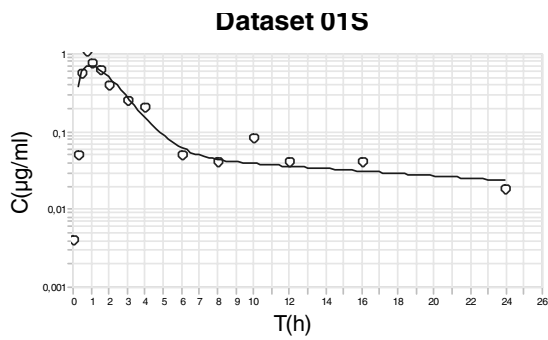




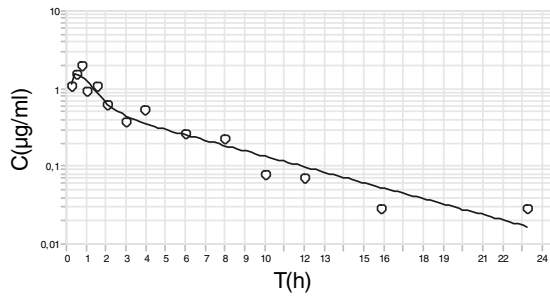
**Tab. 8.22** Tabellarische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zweikompartmentmodell nach Applikation von Spiraeosid

Study	Unit	01S	02S	03S	04S	05S	06S	07S	08S	09S	10S	11S	12S
Ka	[1/h]	1,244	2,150	6,645	0,651	2,349	1,087	2,163	1,888	1,830	1,772	60,764	2,683
Vc	[L]	58,87	23,25	90,16	39,51	17,46	8,23	27,91	67,97	48,59	53,97	56,70	37,35
Ke	[1/h]	0,529	0,375	0,170	0,299	0,291	0,190	0,670	0,232	0,598	0,476	0,310	0,504
K12	[1/h]	0,410	0,775	0,099	0,328	1,116	0,733	1,003	1,373	0,721	0,662	0,355	1,343
K21	[1/h]	0,065	0,650	0,043	0,090	0,172	0,148	0,465	0,165	0,231	0,387	0,102	0,483
AUC	[h·µg/mL]	3,21	11,46	6,51	8,47	19,68	64,10	5,35	6,34	3,44	3,89	5,68	5,32
AUMC	[h <sup>2</sup> ·µg/m]	47,15	72,31	127,88	144,48	513,44	2069,25	27,63	257,68	25,55	24,35	82,05	41,89
MRT	[h]	13,87	5,84	19,49	15,52	25,66	31,36	4,71	40,09	6,88	5,69	14,43	7,51
Lz	[1/h]	0,035	0,148	0,025	0,040	0,032	0,027	0,157	0,022	0,095	0,132	0,04	0,11
Cmax	[µg/mL]	0,72	2,19	0,97	0,96	2,70	4,96	1,53	0,60	0,90	0,86	1,68	1,21
Tmax	[h]	0,93	0,70	0,50	1,62	0,56	1,06	0,56	0,60	0,66	0,75	0,08	0,48
A	[µg/mL]	1,65	2,86	1,04	2,33	5,20	10,71	2,98	1,35	1,85	1,48	1,61	2,20
Alpha	[1/h]	0,97	1,65	0,29	0,68	1,55	1,04	1,98	1,75	1,46	1,39	0,72	2,22
B	[µg/mL]	0,05	1,44	0,07	0,20	0,53	1,45	0,61	0,12	0,21	0,37	0,15	0,47
Beta	[1/h]	0,04	0,15	0,03	0,04	0,03	0,03	0,16	0,02	0,10	0,13	0,04	0,11
T1/2 Ka	[h]	0,56	0,32	0,10	1,06	0,30	0,64	0,32	0,37	0,38	0,39	0,01	0,26
Tabs	[h]	2,79	1,61	0,52	5,32	1,48	3,19	1,60	1,84	1,89	1,96	0,06	1,29
T1/2	[h]	0,72	0,42	2,42	1,02	0,45	0,66	0,35	0,40	0,48	0,50	0,96	0,31
T1/2 beta	[h]	19,61	4,70	27,31	17,43	21,36	25,75	4,40	31,58	7,29	5,24	15,84	6,33
T1/2 Lz	[h]	19,61	4,70	27,31	17,43	21,36	25,75	4,40	31,58	7,29	5,24	15,84	6,33
T1/2 Ke	[h]	1,31	1,85	4,07	2,32	2,38	3,66	1,03	2,99	1,16	1,46	2,23	1,38
Vz	[L]	880,35	59,10	605,08	296,93	156,59	57,96	118,76	718,13	305,96	194,37	402,31	171,77
Cl	[L/h]	31,12	8,72	15,36	11,81	5,08	1,56	18,70	15,76	29,08	25,70	17,60	18,81

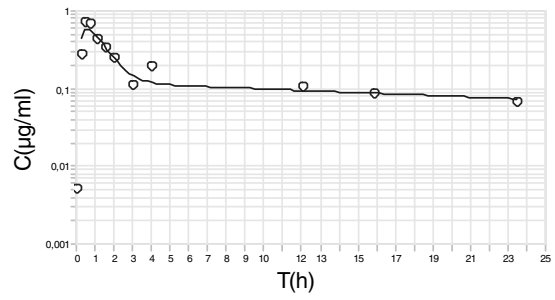
**Abb. 8.10** Graphische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zweikompartimentmodell nach Applikation von Spiraeosid. In den Abbildungen sind die erhaltenen (Punkte) und die berechneten (Linie) Plasmakonzentrationen dargestellt.



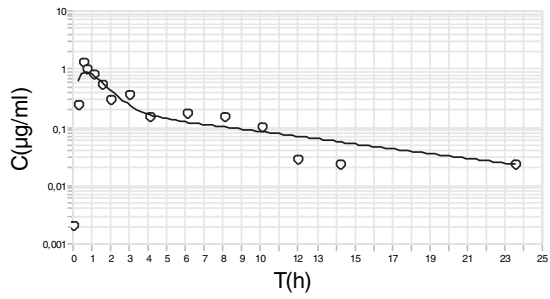
**Dataset 07S**



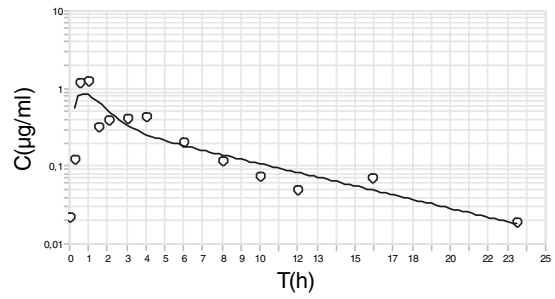
**Dataset 08S**



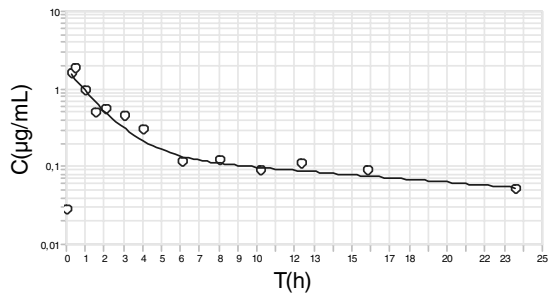
**Dataset 09S**



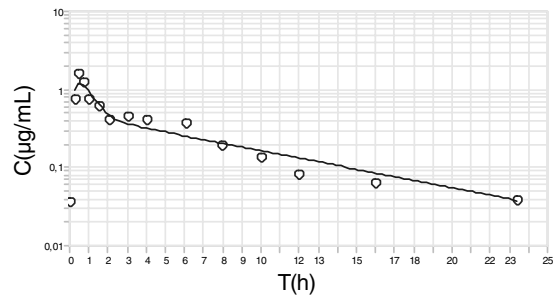
**Dataset 10S**



**Dataset 11S**



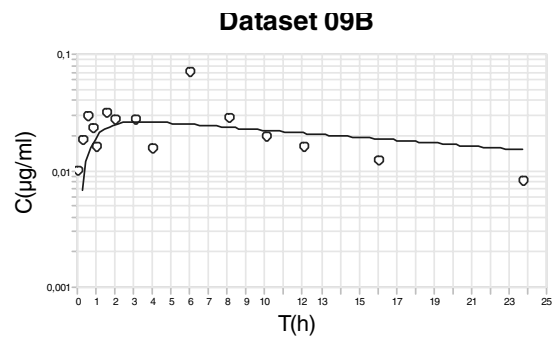
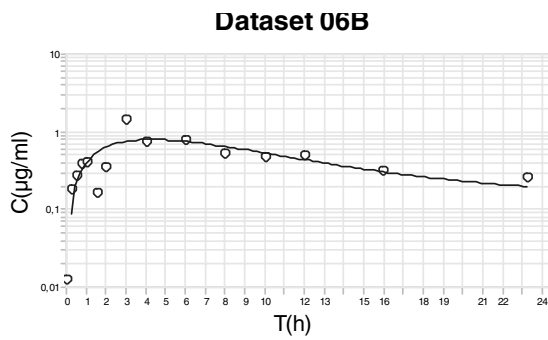
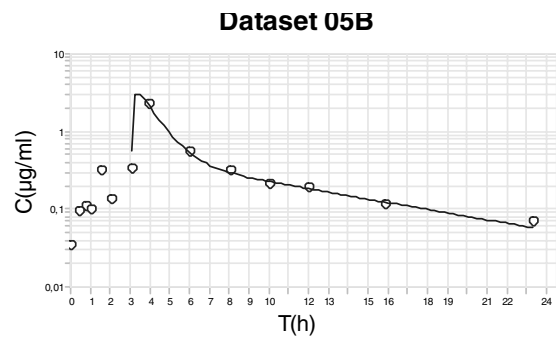
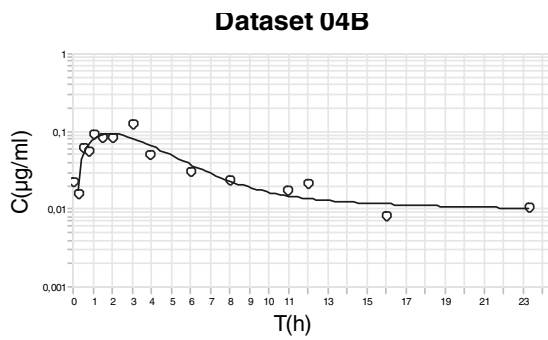
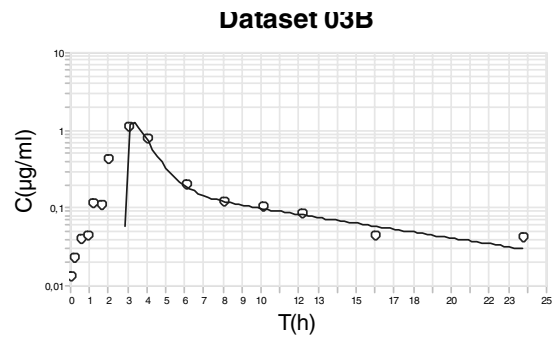
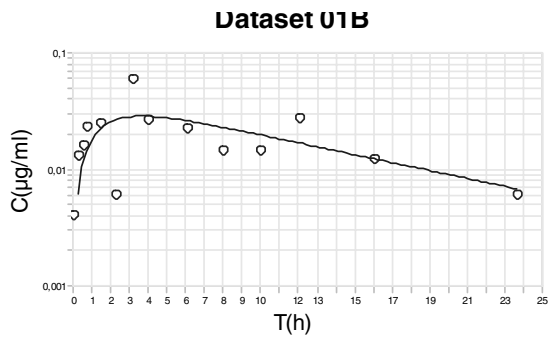
**Dataset 12S**



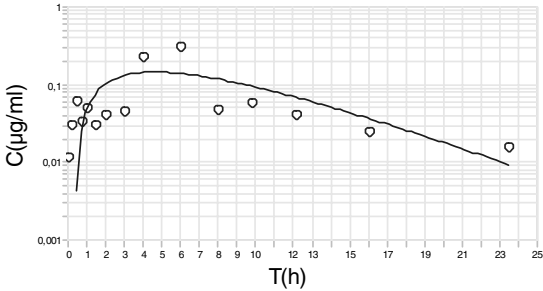
**Tab. 8.23** Tabellarische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zwei- bzw. Einkompartimentmodell nach Applikation von Buchweizenkraut.

Study	Unit	01B	02B	03B	04B	05B	06B	07B	08B	09B	10B	11B	12B
Ka	[1/h]	0.652		4.913	0.536	6.225	0.268			1.194	0.216	0.321	0.261
Tlag	[h]	0.00		2.87	0.10	3.04	0.06			0.00	0.43	0.46	0.00
Vc	[L]	3543,56		101,66	734,03	45,40	101,33			5547,11	457,36	258,30	426,88
Ke	[1/h]	0.116		0.554	0.211	0.544	0.102			0.048	0.261	0.27	0.21
K12	[1/h]	4.910		0.548	0.411	0.424	0.131						
K21	[1/h]	10,268		0.189	0.049	0.200	0.053						
AUC	[h·µg/mL]	0.49		3.55	1.29	8.10	19.34			0.76	1.68	2.84	2.21
AUMC	[h <sup>2</sup> ·µg/mL]	6.95		25.69	59.29	47.76	730.96			16.54	14.22	19.30	18.82
MRT	[h]	12,74		4.16	43,99	2.70	34,01			21,00	3.41	3.21	4.71
Lz	[1/h]	0.078		0.087	0.016	0.102	0.020			0.048	0.261	0.27	0.21
Cmax	[µg/mL]	0.03		1.28	0.09	3.14	0.80			0.03	0.15	0.31	0.19
Tmax	[h]	3.66		3.27	1.89	3.39	4.29			2.81	4.64	3.84	4.24
A	[µg/mL]	0.02		1.79	0.26	3.96	1.71			0.04	0.44	0.77	0.47
Alpha	[1/h]	15.22		1.20	0.66	1.07	0.27			0.05	0.26	0.27	0.21
B	[µg/mL]	0.04		0.18	0.01	0.45	0.26						
Beta	[1/h]	0.08		0.09	0.02	0.10	0.02						
T1/2 Ka	[h]	1.06		0.14	1.29	0.11	2.59			0.58	3.21	2.16	2.65
Tabs	[h]	5.31		0.71	6.47	0.56	12.94			2.90	16.07	10.81	13.26
T1/2	[h]	0.05		0.58	1.06	0.65	2.61			14.56	2.66	2.54	3.26
T1/2	[h]	8.86		7.96	43.53	6.79	34.11						
T1/2 Lz	[h]	8.86		7.96	43.53	6.79	34.11			14.56	2.66	2.54	3.26
T1/2 Ke	[h]	5.98		1.25	3.28	1.27	6.79			14.56	2.66	2.54	3.26
Vz	[L]	5251,10		646,55	9737,84	242,10	509,01			5547,11	457,36	258,30	426,88
Cl	[L/h]	410.99		56.32	155.04	24.70	10.34			264.12	119.20	70.36	90.68

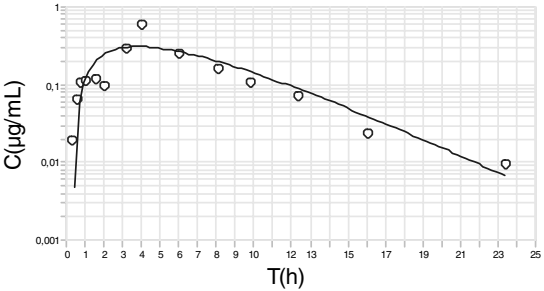
**Abb. 8.11** Graphische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zwei- bzw. Einkompartimentmodell nach Applikation von Buchweizenkraut. In den Abbildungen sind die erhaltenen (Punkte) und die berechneten (Linie) Plasmakonzentrationen dargestellt.



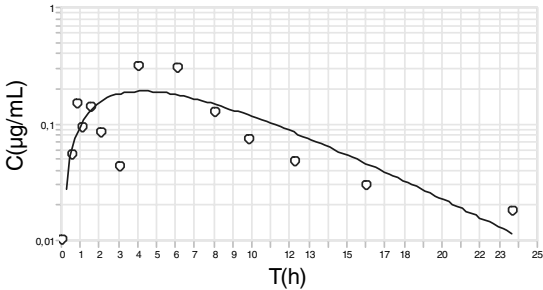
**Dataset 10B**



**Dataset 11B**



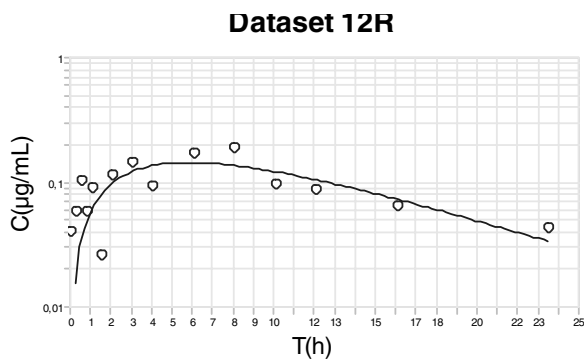
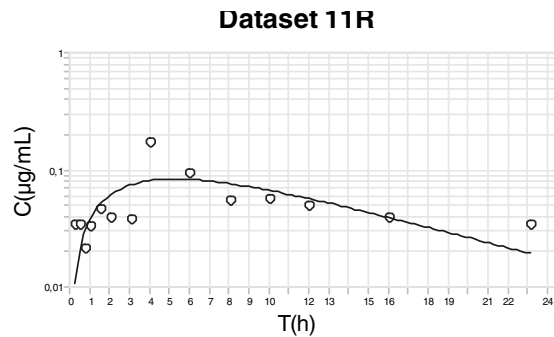
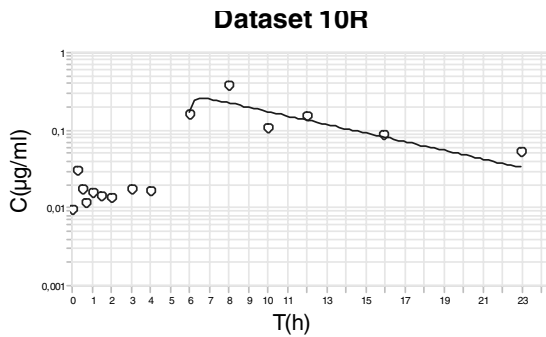
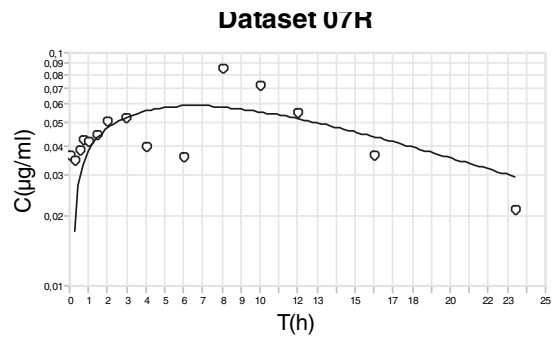
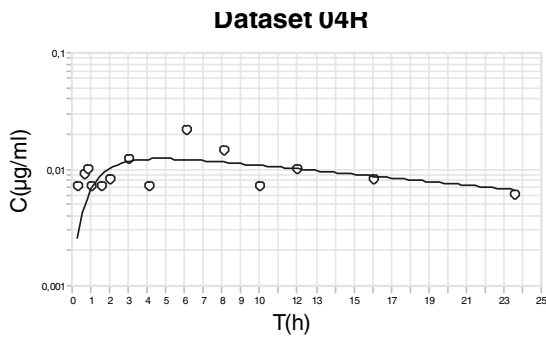
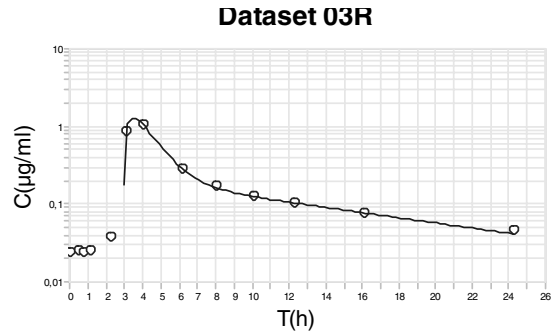
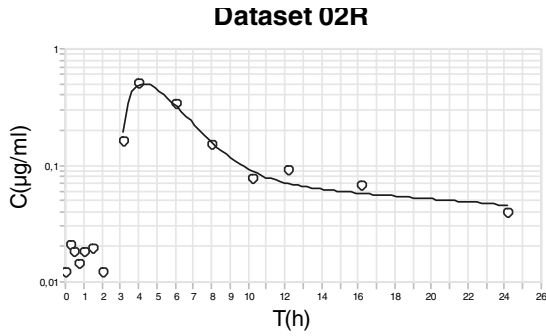
**Dataset 12B**



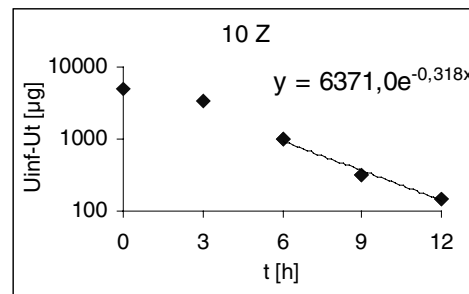
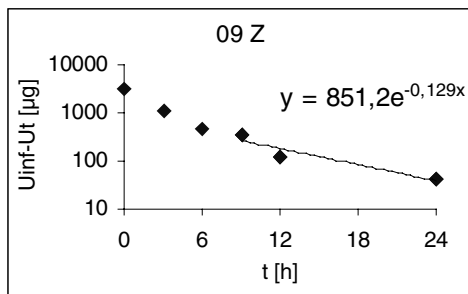
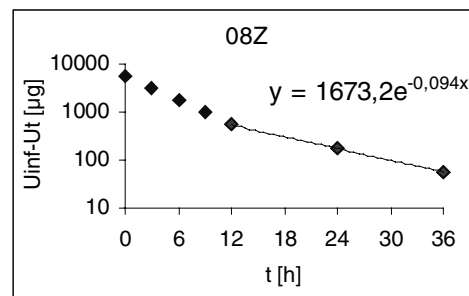
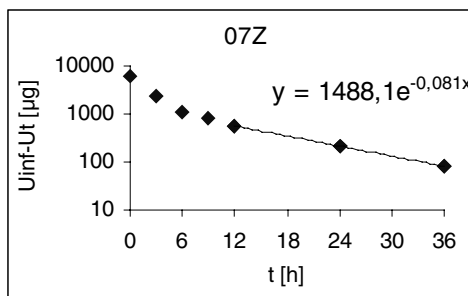
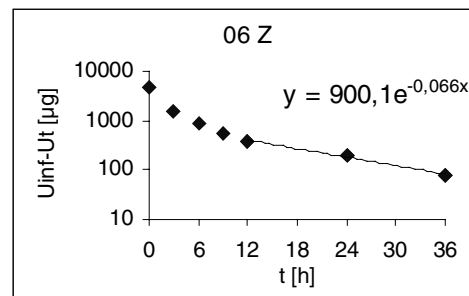
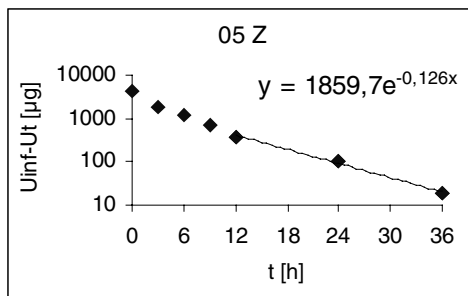
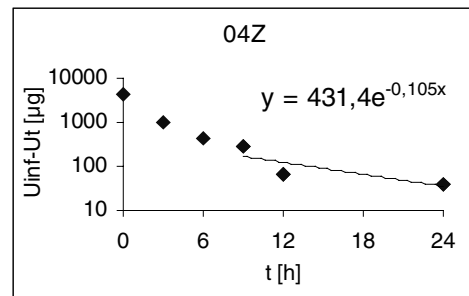
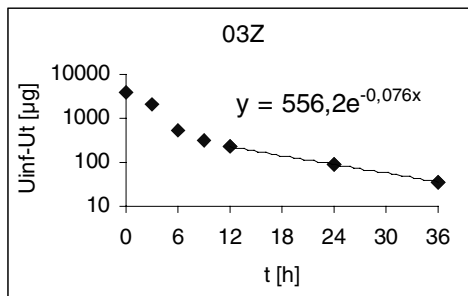
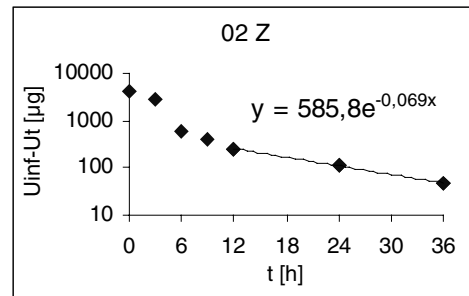
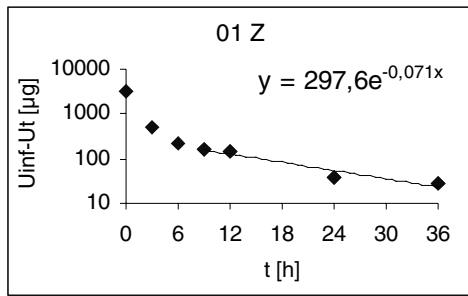
**Tab. 8.24** Tabellarische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zwei- bzw. Einkompartimentmodell nach Applikation von Rutin

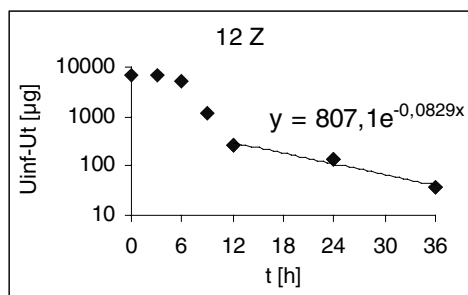
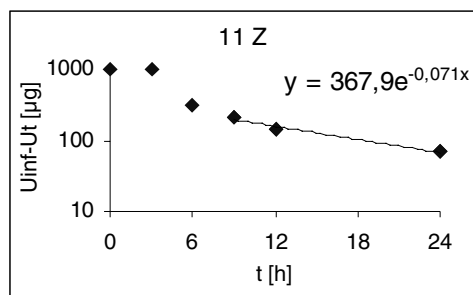
Study	Unit	01R	02R	03R	04R	05R	06R	07R	08R	09R	10R	11R	12R
Ka	[1/h]		0,830	3,169	0,642			0,212			0,264	0,32	0,24
Tlag	[L]		2,96	2,91	0,00			0,00			5,89	0,00	0,00
Vc	[1/h]		158,20	94,71	13727,00			448,63			31,54	1390,25	705,67
Ke	[1/h]		0,292	0,450	0,036			0,281			3,178	0,10	0,12
K12	[1/h]		0,438	0,419				1,962					
K21	[h·µg/mL]		0,077	0,161				0,591					
AUC	[h <sup>2</sup> ·µg/m]		4,33	4,70	0,41			1,59			2,00	1,39	2,44
AUMC	[h]		104,53	39,03	12,04			31,85			8,19	17,72	31,00
MRT	[1/h]		19,99	5,09	27,97			15,37			-5,57	9,63	8,60
Lz	[µg/mL]		0,029	0,076	0,036			0,060			3,178	0,10	0,12
Cmax	[h]		0,50	1,30	0,01			0,06			0,42	0,08	0,14
Tmax	[µg/mL]		4,28	3,48	4,76			6,48			6,74	5,23	5,82
A	[1/h]		1,18	1,91	0,01			0,36			6,34	0,14	0,28
Alpha	[µg/mL]		0,778	0,954	0,036			2,775			3,178	0,10	0,12
B	[1/h]		0,08	0,21				0,09					
Beta	[h]		0,029	0,076				0,060					
T1/2 Ka	[h]		0,84	0,22	1,08			3,28			2,63	2,18	2,85
Tabs	[h]		4,18	1,09	5,40			16,38			13,14	10,91	14,27
T1/2	[h]		0,89	0,73	19,39			0,25			0,22	6,68	5,96
T1/2 beta	[h]		24,04	9,11				11,57					
T1/2 Lz	[h]		24,04	9,11	19,39			11,57			0,22	6,68	5,96
T1/2 Ke	[L]		2,37	1,54	19,39			2,46			0,22	6,68	5,96
Vz	[L/h]		1602,74	560,16	13727,00			2106,68			31,54	1390,25	705,67
Cl			46,21	42,60	490,66			126,17			100,24	144,29	82,06

**Abb. 8.12** Graphische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zwei- bzw. Einkompartimentmodell nach Applikation von Rutin. In den Abbildungen sind die erhaltenen (Punkte) und die berechneten (Linie) Plasmakonzentrationen dargestellt.

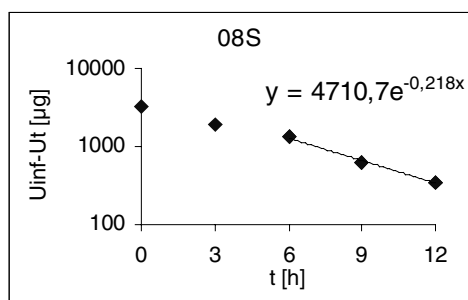
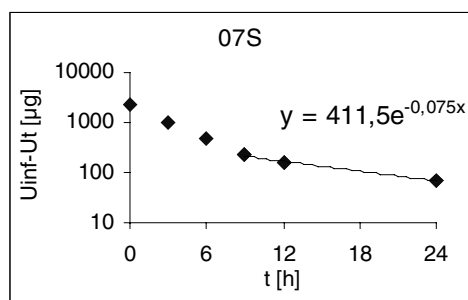
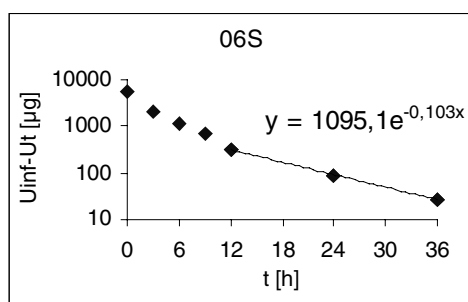
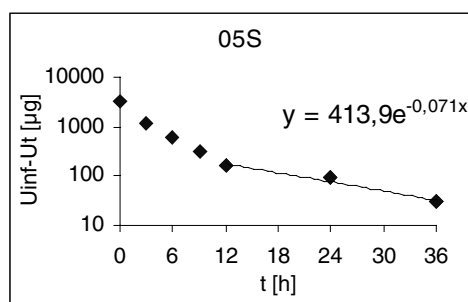
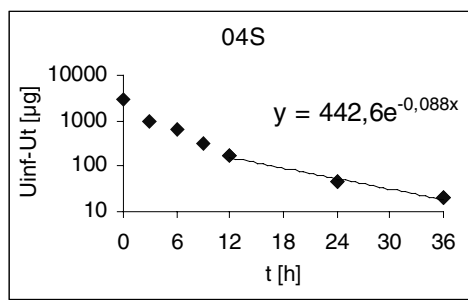
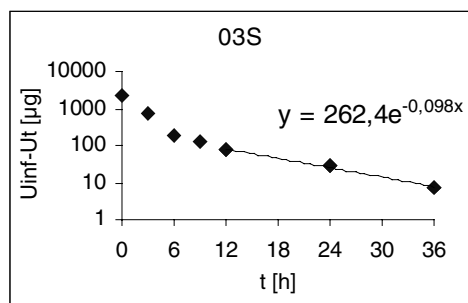
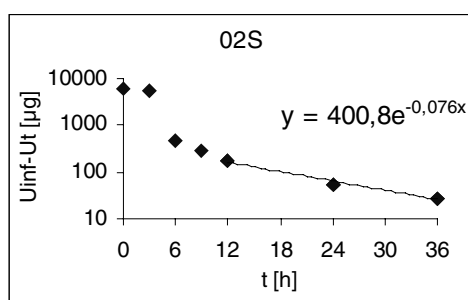
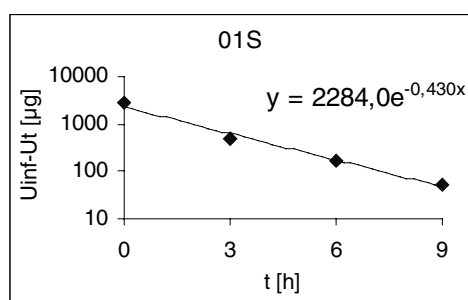


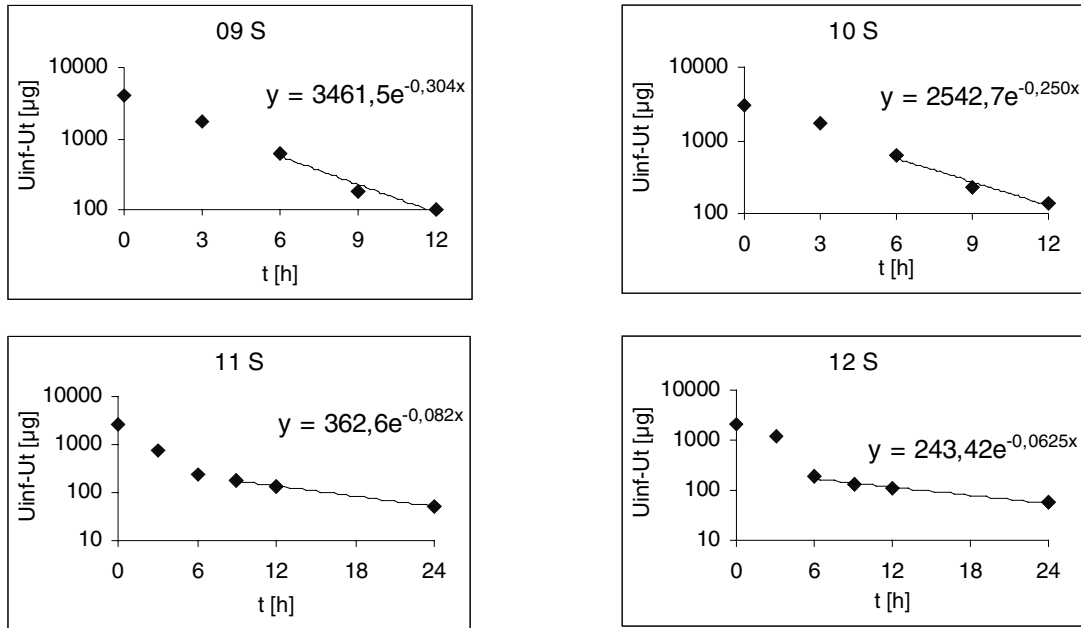


**Abb. 8.13** Sigma-Minus-Plot von Quercetin nach Applikation von Zwiebeln zur Ermittlung der Eliminationskonstante  $k_e$ .

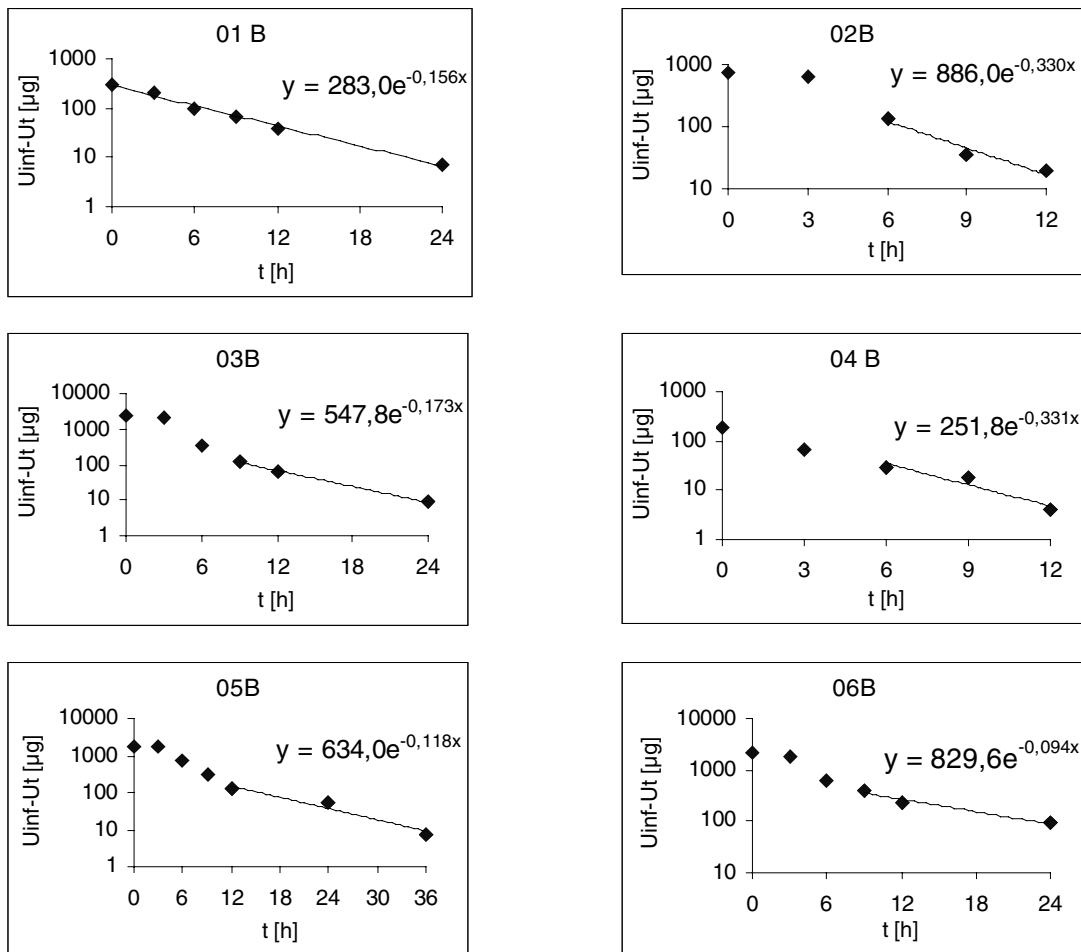


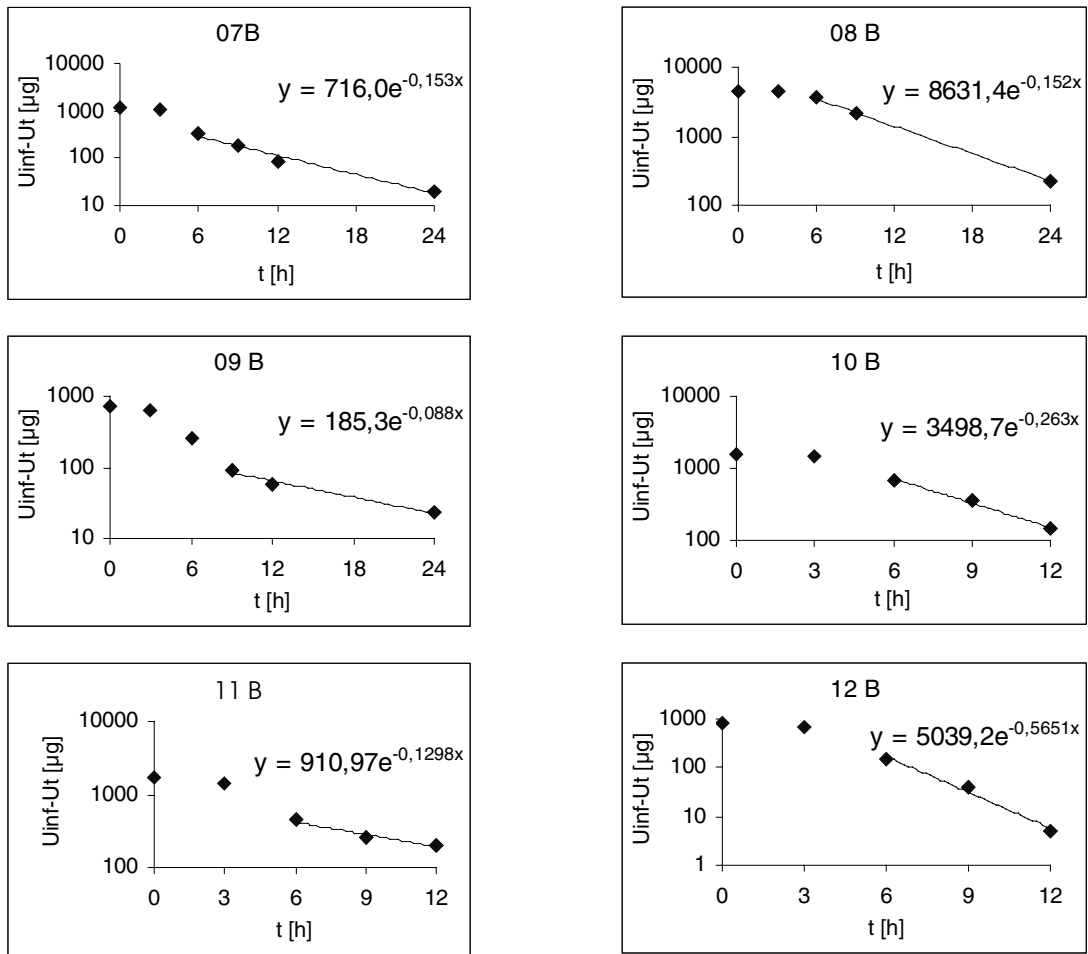
**Abb. 8.14** Sigma-Minus-Plot von Quercetin nach Applikation von Spiraeosid zur Ermittlung der Eliminationskonstante  $k_e$ .



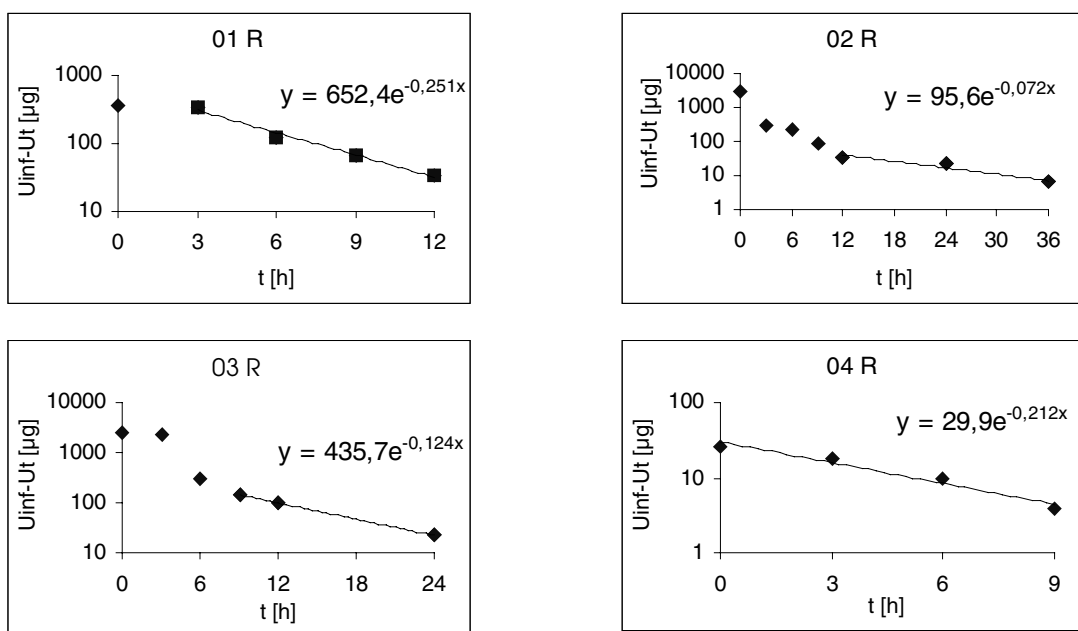


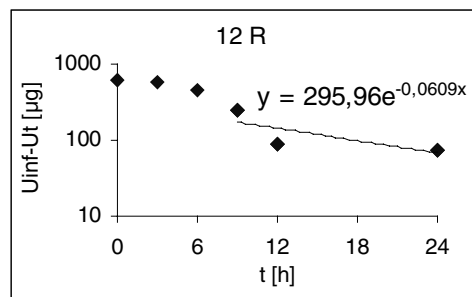
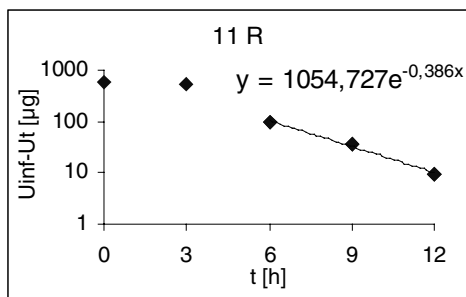
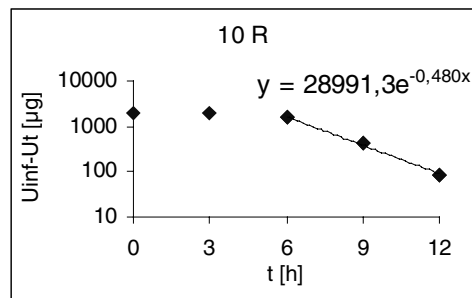
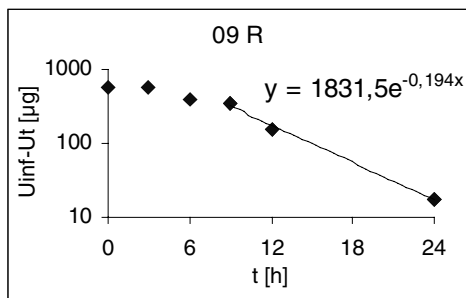
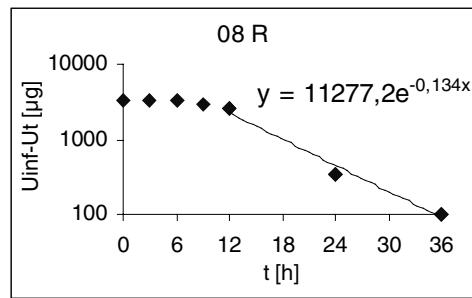
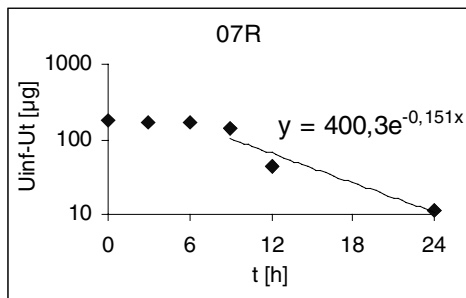
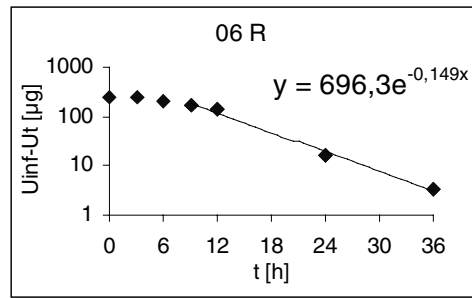
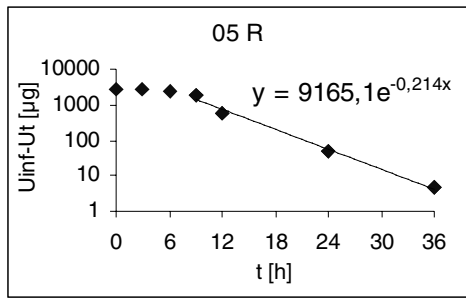
**Abb. 8.15** Sigma-Minus-Plot von Quercetin nach Applikation von Buchweizenkrauttee zur Ermittlung der Eliminationskonstante  $k_e$ .



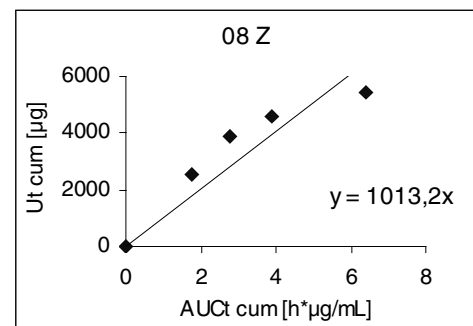
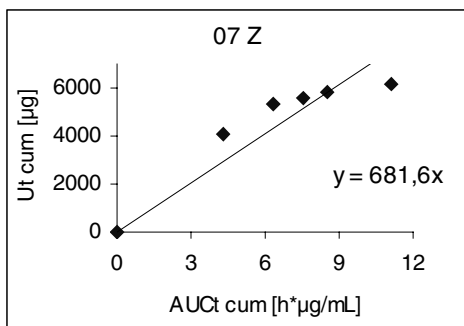
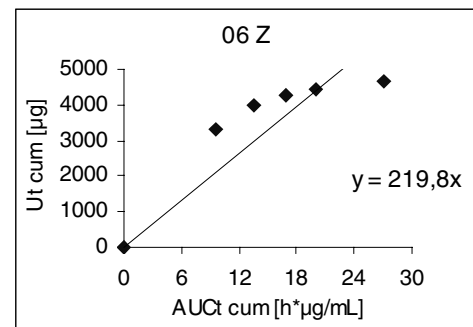
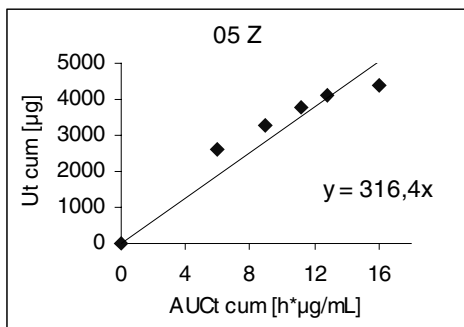
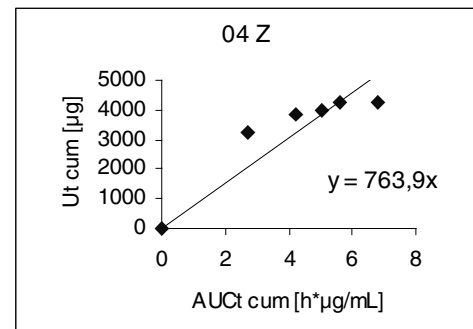
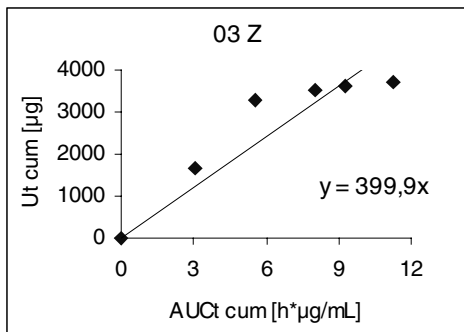
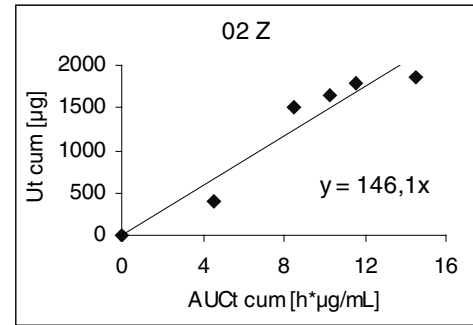
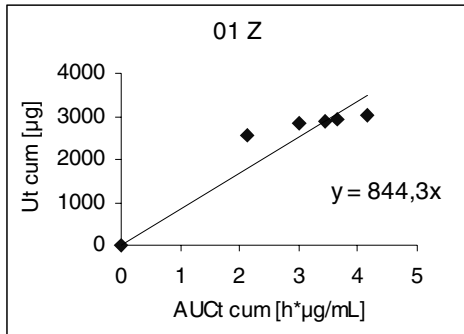


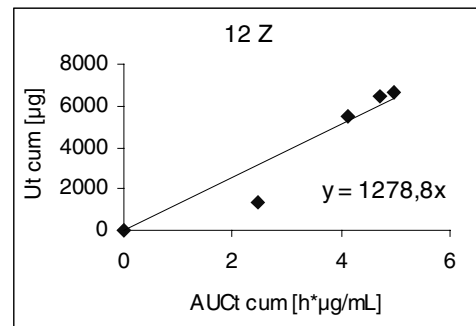
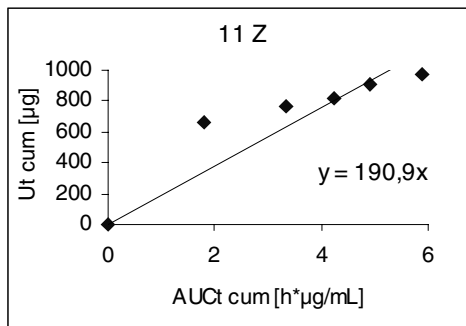
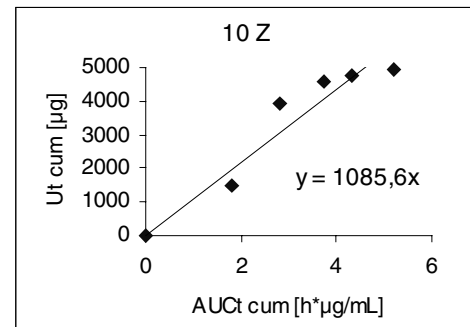
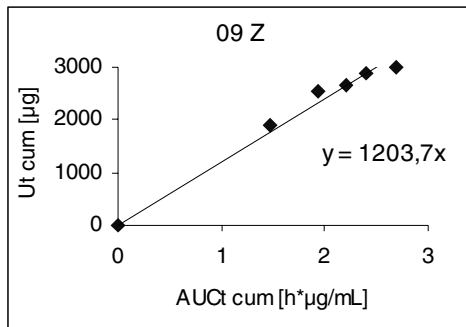
**Abb. 8.16** Sigma-Minus-Plot von Quercetin nach Applikation von Rutin zur Ermittlung der Eliminationskonstante  $k_e$ .



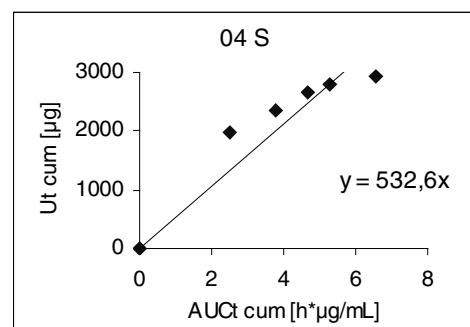
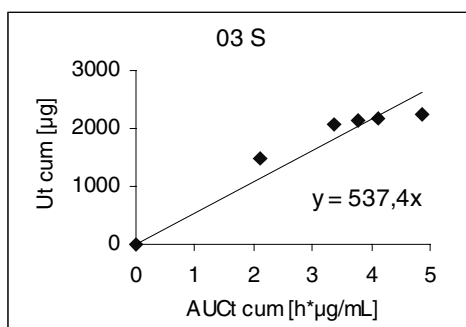
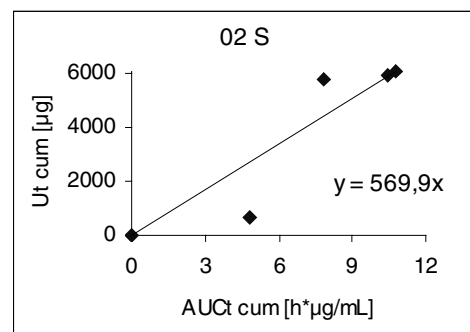
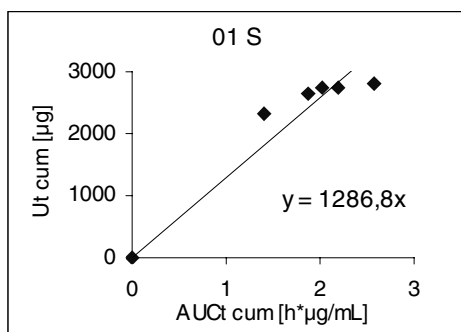


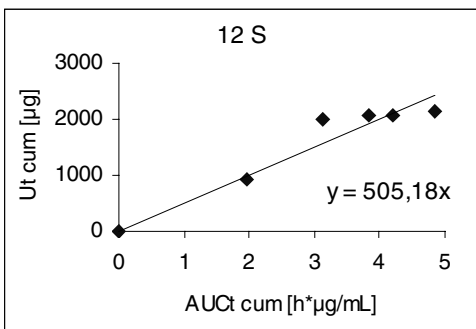
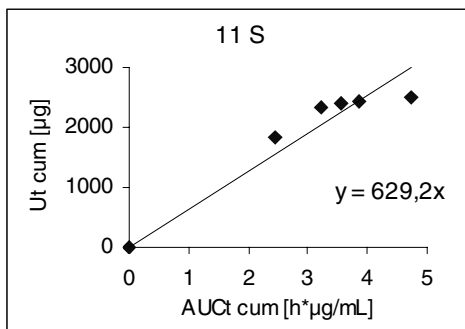
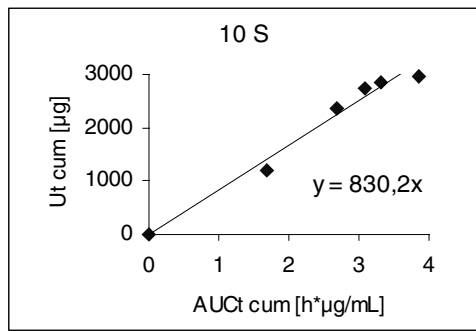
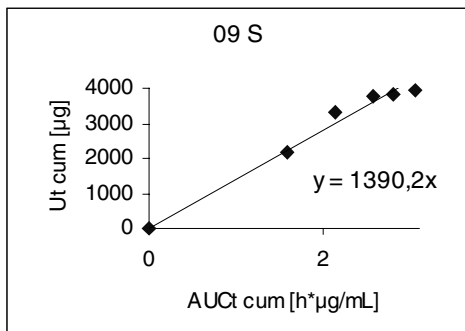
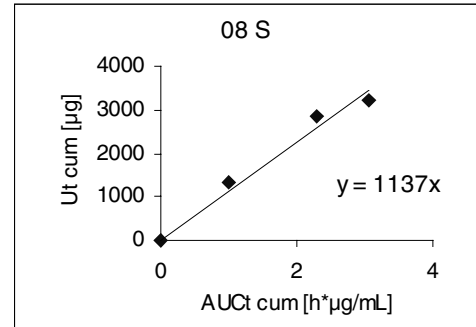
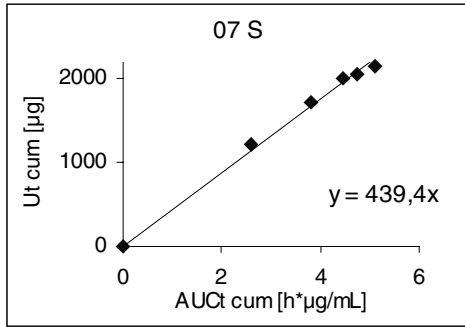
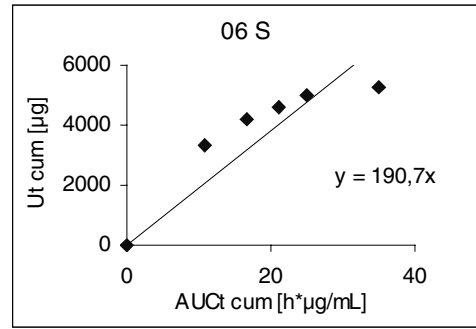
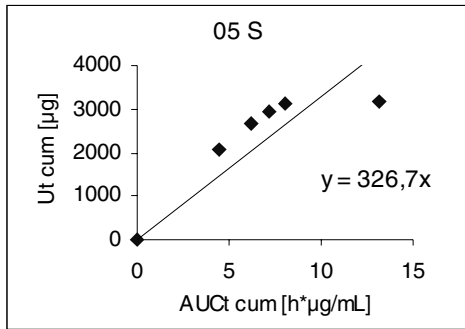
**Abb. 8.17** Renale Clearance-Plots ( $U_t$  gegen  $AUC_t$ ) für die Quercetinausscheidung nach Administration von Zwiebeln.





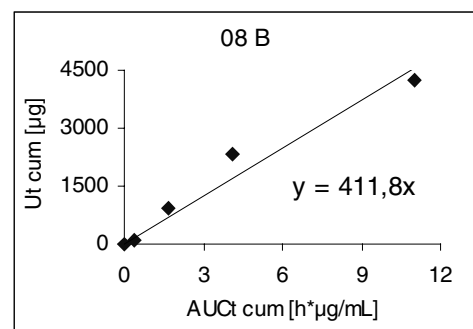
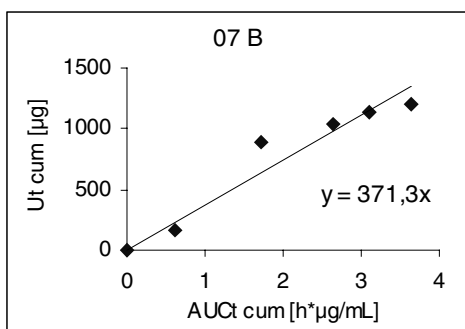
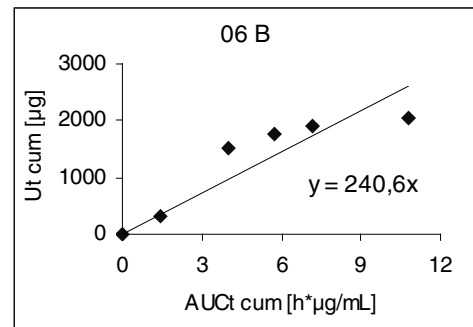
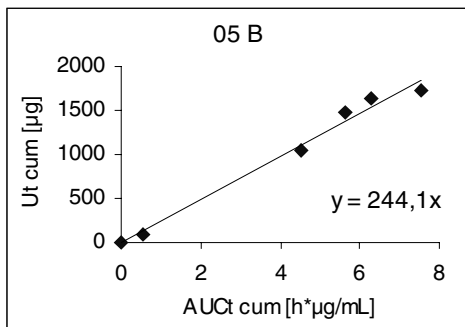
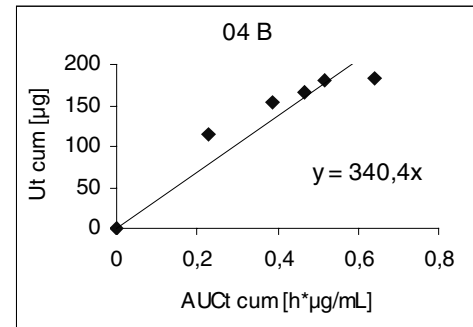
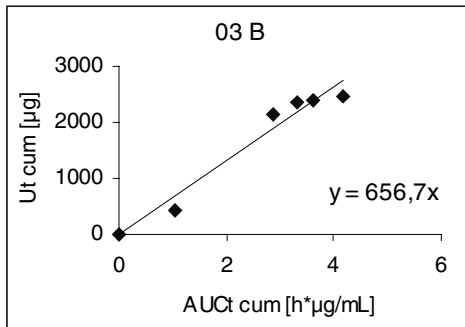
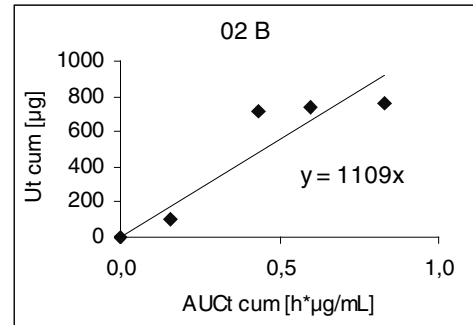
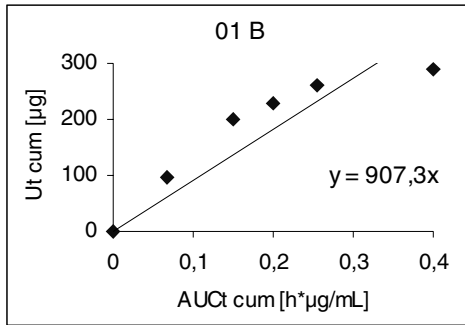
**Abb. 8.18** Renale Clearance-Plots ( $U_t$  gegen  $AUC_t$ ) für die Quercetinausscheidung nach Administration von Spiraeosid.

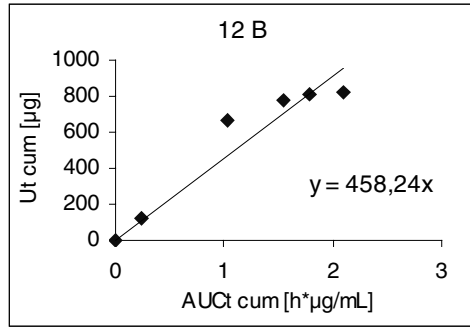
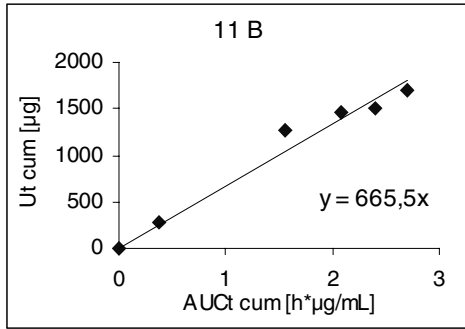
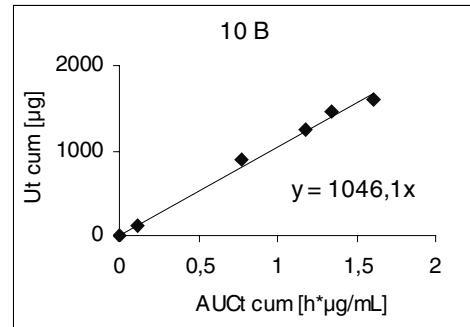
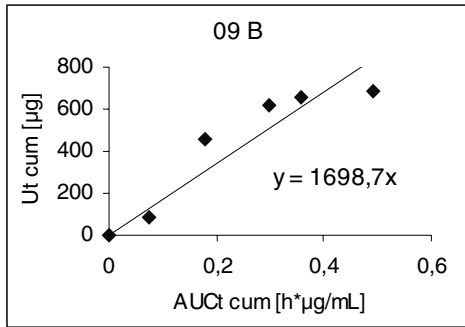




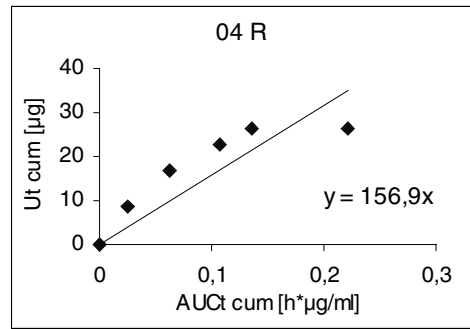
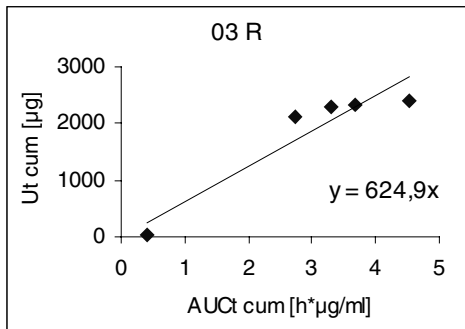
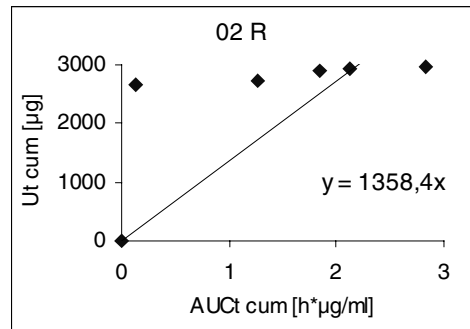
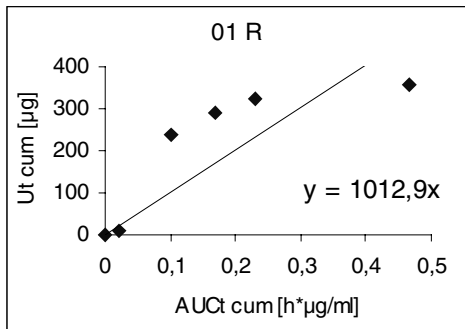


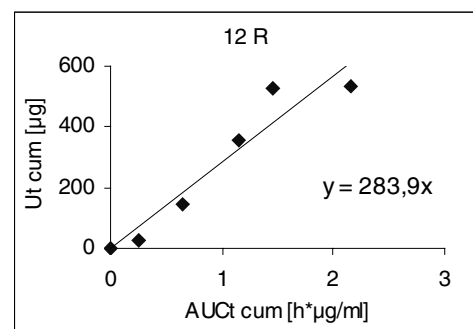
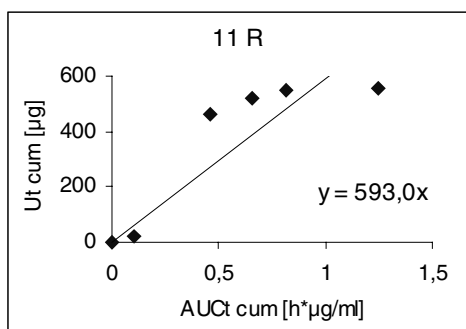
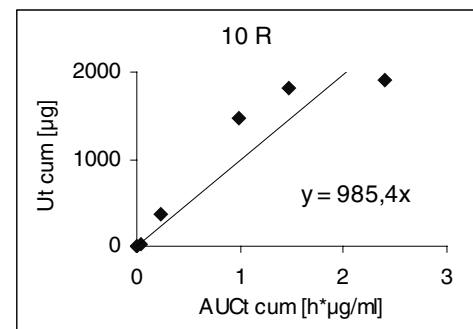
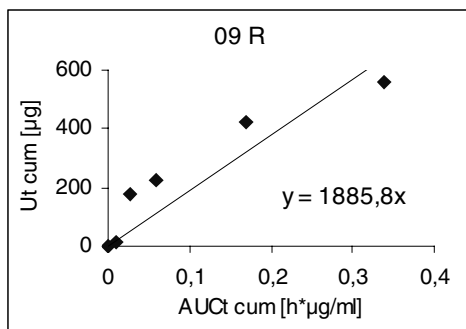
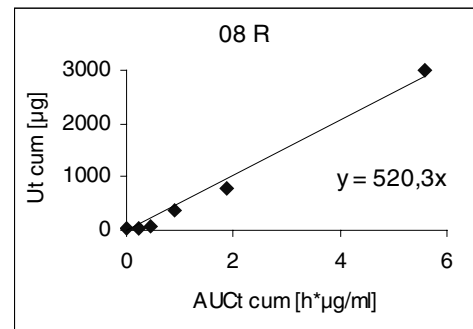
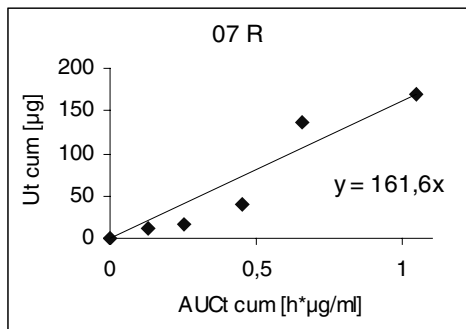
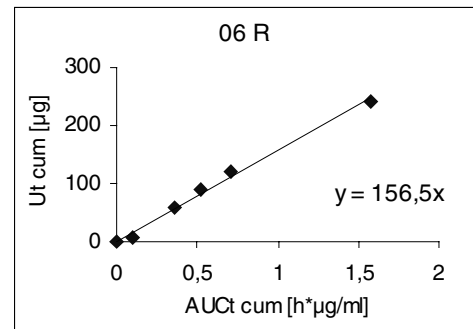
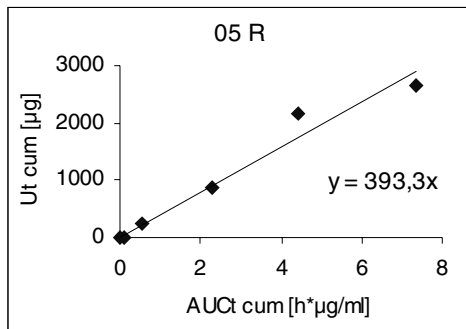
**Abb. 8.19** Renale Clearance-Plots ( $U_t$  gegen  $AUC_t$ ) für die Quercetinausscheidung nach Administration von Buchweizenkrauttee.





**Abb. 8.20** Renale Clearance-Plots ( $U_t$  gegen  $AUC_t$ ) für die Quercetinausscheidung nach Administration von Rutin.





## 8.25 Freigabe-Protokoll der Prüfformulierung am Beispiel von Quercetin 1000 mg

**HERST Prüfpräparat - Freigabe Nr.: 002**

Das Präparat: **Q1000**

mit der Zusammensetzung (Herstellungsprotokoll siehe Anhang):

Pos.	Chargen- Nummer	Rohstoffe	m/m [%]	EW [g]
1	JW/Schw.08 1098/01	Methocel® K4M – Schleim 0,5% in Aqua purificata (keimfiltriert)	76,01	76,03
2		Ethanol 96%	15,38	15,39
3	365657/1 12098	Quercetin - dihydrat (Fluka)	8,61	8,61

wurde geprüft auf:

- 1) Gehalt an Quercetin mittels HPLC (Methode Firma Schwabe intern).
- 2) Mikrobiologische Stabilität nach Europäischem Arzneibuch.

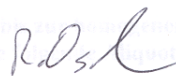
Ergebnis der Prüfungen:

- 1) Der Gehalt der oben angeführten Formulierung an Quercetindihydrat beträgt **8,7701 %**.
- 2) Die Prüfung auf mikrobiologische Stabilität entspricht dem Europäischem Arzneibuch.

**Die Formulierung entspricht hinsichtlich Quercetin-Gehalt und mikrobiologischer Stabilität den geforderten Spezifikationen.**


Die Formulierung wurde im Produktionsbereich Hygienezone (Raumklasse D) hergestellt bei

Abteilung Galenische Entwicklung  
Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel  
Willmar-Schwabe-Straße 4  
Postfach 41 09 25  
76209 Karlsruhe

  
.....  
Dr. Oschmann  
(Abteilungsleiter)

Die oben erwähnten Prüfungen wurden durchgeführt bei

Abteilung für analytische Entwicklung  
Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel  
Willmar-Schwabe-Straße 4  
Postfach 41 09 25  
76209 Karlsruhe

  
.....  
Dr. Lang  
(Kontroll-Leiter für klinische Muster)

**Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co.**  
Willmar-Schwabe-Str. 4, 76227 Karlsruhe  
Postfach 41 09 25, 76209 Karlsruhe

**Tab. 8.26** ANOVA-Tabelle für  $t_{\max}$ 

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
treatment	3	337,874	112,625	47,432	<0,001
subject	11	55,066	5,006	2,108	0,048
Residual	33	78,357	2,374		
Total	47	471,296	10,028		

Die Power des durchgeführten Tests mit  $\alpha = 0,05$  für den Vergleich der Studienmedikationen entsprach 1,0.

**Tab. 8.27** Ergebnisse des Tukey-Tests für den Vergleich von  $t_{\max}$ 

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
r vs. z	6,302	4	14,168	Yes
r vs. s	6,281	4	14,120	Yes
r vs. b	2,660	4	5,980	Yes
b vs. z	3,642	4	8,189	Yes
b vs. s	3,621	4	8,140	Yes
s vs. z	0,0217	4	0,0487	No

**Tab. 8.28** Anova-Tabelle für den Vergleich von  $c_{\max}$ 

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
treatment	3	36,801	12,267	16,891	<0,001
subject	11	35,250	3,205	4,412	<0,001
Residual	33	23,966	0,726		
Total	47	96,017	2,043		

Die Power des durchgeführten Tests mit  $\alpha = 0,05$  für den Vergleich der Studienmedikationen entsprach 1,0. In Tab. 8.29 sind die Ergebnisse des Tukey-Tests dargestellt.

**Tab. 8.29** Ergebnisse des Tukey-Tests für den Vergleich von  $c_{\max}$ 

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
z vs. r	1,986	4	8,074	Yes
z vs. b	1,671	4	6,794	Yes
z vs. s	0,195	4	0,791	No
s vs. r	1,792	4	7,283	Yes
s vs. b	1,477	4	6,002	Yes
b vs. r	0,315	4	1,280	No

**Tab. 8.30** ANOVA-Tabelle für den Vergleich der terminalen Halbwertszeit

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
treatment	3	20,571	6,857	0,835	0,484
subject	11	334,166	30,379	3,699	0,002
Residual	33	271,046	8,214		
Total	47	625,783	13,315		

**Tab. 8.31** ANOVA-Tabelle für den Vergleich von  $AUC_{0-t}$ 

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
treatment	3	433,691	144,564	7,158	<0,001
subject	11	994,109	90,374	4,475	<0,001
Residual	33	666,446	20,195		
Total	47	2094,245	44,558		

Die Power des durchgeführten Tests mit  $\alpha = 0,05$  für den Vergleich der Studienmedikationen betrug 0,948. In Tab. 8.32 sind die Ergebnisse des Tukey-Tests dargestellt.

**Tab. 8.32** Ergebnisse des Tukey-Tests für den Vergleich der  $AUC_{0-t}$ 

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
z vs. r	7,189	4	5,542	Yes
z vs. b	5,839	4	4,501	Yes
z vs. s	1,301	4	1,003	No
s vs. r	5,888	4	4,539	Yes
s vs. b	4,538	4	3,498	No
b vs. r	1,350	4	1,041	No

**Tab. 8.33** ANOVA-Tabelle für den Vergleich von MRT

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
subject	11	845,557	76,869	6,045	<0,001
treatment	3	472,942	157,647	12,397	<0,001
Residual	33	419,633	12,716		
Total	47	1738,132	36,982		

Die Power des durchgeführten Tests mit  $\alpha = 0,05$  für den Vergleich der Studienmedikationen entsprach 0,999. In Tab. 8.34 sind die Ergebnisse des Tukey-Tests dargestellt.

**Tab. 8.34** Ergebnisse des Tukey-Tests für den Vergleich von MRT

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
r vs. z	7,750	4	7,529	Yes
r vs. s	7,600	4	7,383	Yes
r vs. b	5,533	4	5,375	Yes
b vs. z	2,217	4	2,153	No
b vs. s	2,067	4	2,008	No
s vs. z	0,150	4	0,146	No

**Tab. 8.35** ANOVA-Tabelle für den Vergleich der renal eliminierten Menge [% der Dosis]

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
treatment	3	125,087	41,696	37,492	<0,001
subject	11	16,174	1,470	1,322	0,256
Residual	33	36,700	1,112		
Total	47	177,961	3,786		

Die Power des durchgeführten Tests mit  $\alpha = 0,05$  für den Vergleich der Studienmedikationen entsprach 1,0. In Tab. 8.36 sind die Ergebnisse des Tukey-Tests dargestellt.

**Tab. 8.36** Ergebnisse des Tukey Tests für den Vergleich von der renal eliminierten Quercetinmenge berechnet als Prozent der applizierten Quercetindosis.

Comparison	Diff of Means	p	q	P<0.05
z vs. r	3,710	4	12,187	Yes
z vs. b	3,617	4	11,880	Yes
z vs. s	1,041	4	3,419	No
s vs. r	2,669	4	8,768	Yes
s vs. b	2,576	4	8,461	Yes
b vs. r	0,0933	4	0,307	No

## 9 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1</b> Struktur von Flavonolen und Flavonen. ....	1
<b>Abb. 1.2</b> Mikrobielle (intestinale) und endogene (mucosale und/oder hepatische) Metabolite von Quercetin.....	7
<b>Abb. 1.3</b> Hypothetischer Resorptionsmechanismus und Metabolismus von Quercetinglykosiden vom Darmlumen bis zum systemischen Kreislauf. ....	10
<b>Abb. 2.1</b> HPLC-Chromatogramm des Zwiebelextraktes (350nm) mit Naringenin als Internem Standard (IS).....	39
<b>Abb. 2.2</b> Kalibrierfunktion für Quercetin-4'-O-glucosid, als Interner Standard wurde Naringenin verwendet. ....	40
<b>Abb. 2.3</b> Strukturformel von Quercetin-4'-O-glucosid (Spiraeosid). Molekulargewicht=464,39 g·Mol <sup>-1</sup> .....	42
<b>Abb. 2.4</b> Kalibrierfunktion von Quercetin nach Zusatz von 8 verschiedenen Konzentrationen zu Urin und anschließender Extraktion.....	47
<b>Abb. 2.5</b> Repräsentative HPLC-Chromatogramme von Plasmaproben, entnommen vor („blank plasma“ 09Z0) und 0,75 h nach (09Z03) Einnahme der Zwiebelzubereitung. ...	51
<b>Abb. 2.6</b> Kalibrierfunktion von Quercetin nach Zusatz von 10 verschiedenen Konzentrationen zu Plasma und anschließender Extraktion.....	53
<b>Abb. 2.7</b> Schematischer Aufbau der Franz-Zelle .....	56
<b>Abb. 3.1</b> HPLC-Voltamogramm von Plasmaproben vor und nach enzymatischer Konjugatspaltung. ....	65
<b>Abb. 3.2</b> HPLC-Voltamogramm von Plasmaproben vor enzymatischer Spaltung der Konjugate.....	66
<b>Abb. 3.3</b> Kinetischer Verlauf von Quercetin im Vergleich zum Hauptmetaboliten Quercetinglucuronid (sek. Achse) vor und nach enzymatischer Hydrolyse der gleichen Plasmaproben.....	67
<b>Abb. 3.4</b> Quercetin-Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ] nach Applikation der in der Pilotstudie untersuchten 4 Prüfpräparate.....	69
<b>Abb. 3.5</b> Quercetin-Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ] des Probanden 1 nach Applikation der Zwiebeln zubereitet mit (Prob 1) und ohne Fett (Prob 1 oF) sowie zusammen mit 100 mg Quercetin (Prob 1 ZQ). ....	70
<b>Abb. 3.6</b> Quercetin-Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ] der Probanden 1, 4 und 5 nach Applikation der Zwiebelzubereitung mit zusätzlich 100 mg Quercetin (Ergänzung II. der Pilotstudie). ....	71
<b>Abb. 3.7</b> Renal eliminierte Quercetin-und Isorhamnetinmengen [mg/Tag] nach Applikation von Zwiebeln und Buchweizenkrauttee. ....	73
<b>Abb. 3.8</b> Repräsentative Voltamogramme des Verlauf der Quercetin-Plasmakonzentrationen (nach Hydrolyse der Konjugate) nach Aufnahme von Zwiebeln.....	75
<b>Abb. 3.9</b> Graphische Darstellung der mittleren und medianen Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Einnahme von Zwiebeln.....	76
<b>Abb. 3.10</b> Repräsentative Voltamogramme des Verlauf der Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Hydrolyse der Konjugate nach Aufnahme von Spiraeosid. ....	77



<b>Abb. 3.11</b>	Graphische Darstellung der mittleren und medianen Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Einnahme von Spiraeosid.....	78
<b>Abb. 3.12</b>	Repräsentative Voltamogramme des Verlauf der Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Hydrolyse der Konjugate nach Aufnahme von Buchweizenkrauttee.....	79
<b>Abb. 3.13</b>	Graphische Darstellung der mittleren und medianen Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Einnahme von Buchweizenkrauttee.....	80
<b>Abb. 3.14</b>	Repräsentative Voltamogramme des Verlauf der Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Hydrolyse der Konjugate nach Aufnahme von Buchweizenkrauttee.....	81
<b>Abb. 3.15</b>	Graphische Darstellung der mittleren und medianen Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Einnahme von Rutin. ....	82
<b>Abb. 3.16</b>	Gesamtplasmakonzentrationen (MW) von Quercetin (◆) und Isorhamnetin (■) (sek. Achse) nach Applikation von Zwiebeln.....	84
<b>Abb. 3.17</b>	Gesamtplasmakonzentrationen (MW) von Quercetin (◆) und Isorhamnetin (■) (sek. Achse) nach Applikation von Spiraeosid.....	84
<b>Abb. 3.18</b>	Gesamtplasmakonzentrationen (MW) von Quercetin (◆) und Isorhamnetin (■) (sek. Achse) nach Applikation von Buchweizenkrauttee.....	84
<b>Abb. 3.19</b>	Gesamtplasmakonzentrationen (MW) von Quercetin (◆) und Isorhamnetin (■) (sek. Achse) nach Applikation von Rutin. ....	84
<b>Abb. 3.20</b>	Kinetik des unbekanntes Metaboliten (Retentionszeit 14 min) nach Applikation von Zwiebeln (Z), Spiraeosid (S), Buchweizenkraut (B) und Rutin (R). ....	85
<b>Abb. 3.21</b>	Kumulative Urinausscheidung (MW±SD) von Quercetin nach Applikation von Zwiebeln (Tab. 8.11). ....	86
<b>Abb. 3.22</b>	Kumulative Urinausscheidung von Quercetin (MW±SD) nach Applikation von Spiraeosid (Tab. 8.12). ....	86
<b>Abb. 3.23</b>	Kumulative Urinausscheidung von Quercetin (MW±SD) nach Applikation von Buchweizenkrauttee (Tab. 8.13). ....	86
<b>Abb. 3.24</b>	Kumulative Urinausscheidung von Quercetin (MW±SD) nach Applikation von Rutin (Tab. 8.14). ....	86
<b>Abb. 3.25</b>	Renale Elimination von Quercetin (bestimmt nach Hydrolyse der Konjugate) in Prozent der applizierten Quercetinmenge in dem jeweiligen Prüfpräparat Zwiebeln (Z), Spiraeosid (S), Buchweizenkrauttee (B) und Rutin (R). ....	88
<b>Abb. 3.26</b>	Renale Elimination von Quercetin und Isorhamnetin (bestimmt nach Hydrolyse der Konjugate) in Prozent der applizierten Quercetinmenge in dem jeweiligen Prüfpräparat Zwiebeln (Z), Spiraeosid (S), Buchweizenkrauttee (B) und Rutin (R). ....	89
<b>Abb. 3.27</b>	Renale Elimination von Homovanillinsäure [µMol] pro Urinsammelintervall dt [h] nach Applikation der vier Prüfpräparate.....	90
<b>Abb. 3.28</b>	Graphische Darstellung des fittings der medianen Quercetin Plasmakonzentrationen nach Applikation von Zwiebeln (Z), Spiraeosid (S), Buchweizenkraut (B) und Rutin (R). ....	94
<b>Abb. 3.29</b>	Renale Clearance [L·h <sup>-1</sup> ] von Quercetinkonjugaten (bestimmt als Quercetin nach Hydrolyse) nach Applikation von Zwiebeln (Z), Spiraeosid (S), Buchweizenkrauttee (B) und Rutin (R). ....	98

<b>Abb. 3.30</b> Vergleich von $t_{\max}$ .....	99
<b>Abb. 3.31</b> Vergleich von $c_{\max}$ (MW±SD).....	100
<b>Abb. 3.32</b> Vergleich der terminalen Halbwertszeit der Quercetin-Plasmakonzentrationen. ....	100
<b>Abb. 3.33</b> Vergleich von $AUC_{0-t}$ (MW+SD).....	101
<b>Abb. 3.34</b> Vergleich der mittleren Verweildauer (MRT), angegeben als Mittelwerte ± SD. .	102
<b>Abb. 3.35</b> Vergleich der prozentualen renalen Elimination von Quercetin [% der applizierten Dosis], angegeben als Mittelwerte ± SD.....	102
<b>Abb. 3.36</b> Wiederfindung von Quercetin in % der applizierten Quercetinmenge im Vergleich zur Stammlösung (Stlsg.).....	103
<b>Abb. 3.37</b> Wiederfindung von Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnosid in % der applizierten Menge im Vergleich zur Stammlösung (Stlsg.).....	104
<b>Abb. 3.38</b> Wiederfindung und Metabolisierung von Quercetin-3- <i>O</i> -rhamno-7- <i>O</i> -glucosid in % der applizierten Menge im Vergleich zur Stammlösung (Stlsg.).....	105
<b>Abb. 3.39</b> Wiederfindung von Rutin in % der applizierten Menge im Vergleich zur Stammlösung (Stlsg.).....	106
<b>Abb. 3.40</b> Wiederfindung von Rutin und Quercetin % der applizierten Gesamtmenge Quercetinäquivalente im Vergleich zur Stammlösung (Stlsg.).....	107
<b>Abb. 3.41</b> Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Quercetin-4'- <i>O</i> -glucosid (Spiraeosid) unter Verwendung von Jejunum- und Ileumsegmenten im Vergleich zur Stammlösung (Stlsg.).....	109
<b>Abb. 3.42</b> Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Quercetin(glucosiden) im Zwiebelextrakt (Stlsg.) unter Verwendung von Jejunumsegmenten.....	110
<b>Abb. 3.43</b> Wiederfindung [% Dosis] von Kämpferol bezogen auf die Stammlösung.....	111
<b>Abb. 3.44</b> Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Kämpferol-3- <i>O</i> -glucosid bezogen auf die Stammlösung (Stlsg.).....	112
<b>Abb. 3.45</b> Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Kämpferol-3,7- <i>O</i> -diglucosid bezogen auf die Stammlösung (Stlsg.).....	113
<b>Abb. 3.46</b> Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Kämpferol-7- <i>O</i> -glucosid bezogen auf die Stammlösung (Stlsg.).....	114
<b>Abb. 8.1</b> Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Zwiebeln: Probanden 1 bis 6 .....	167
<b>Abb. 8.2</b> Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Zwiebeln: Probanden 7 bis 12 .....	168
<b>Abb. 8.3</b> Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Spiraeosid: Probanden 1 bis 6.....	169
<b>Abb. 8.4</b> Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Spiraeosid: Probanden 7 bis 12.....	170
<b>Abb. 8.5</b> Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Buchweizenkrauttee: Probanden 1 bis 6.....	171
<b>Abb. 8.6</b> Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Buchweizenkrauttee: Probanden 7 bis 12.....	172
<b>Abb. 8.7</b> Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Rutin: Probanden 1 bis 6 .....	173

---

<b>Abb. 8.8</b> Graphische Darstellung der individuellen Quercetin Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe nach Applikation von Rutin: Probanden 7 bis 12 .....	174
<b>Abb. 8.9</b> Graphische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zweikompartimentmodell nach Applikation von Zwiebeln. ....	177
<b>Abb. 8.10</b> Graphische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zweikompartimentmodell nach Applikation von Spiraeosid. ....	180
<b>Abb. 8.11</b> Graphische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zwei- bzw. Einkompartimentmodell nach Applikation von Buchweizenkraut.....	183
<b>Abb. 8.12</b> Graphische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zwei- bzw. Einkompartimentmodell nach Applikation von Rutin .....	186
<b>Abb. 8.13</b> Sigma-Minus-Plot von Quercetin nach Applikation von Zwiebeln zur Ermittlung der Eliminationskonstante $k_e$ .....	187
<b>Abb. 8.14</b> Sigma-Minus-Plot von Quercetin nach Applikation von Spiraeosid zur Ermittlung der Eliminationskonstante $k_e$ .....	188
<b>Abb. 8.15</b> Sigma-Minus-Plot von Quercetin nach Applikation von Buchweizenkrauttee zur Ermittlung der Eliminationskonstante $k_e$ .....	189
<b>Abb. 8.16</b> Sigma-Minus-Plot von Quercetin nach Applikation von Rutin zur Ermittlung der Eliminationskonstante $k_e$ .....	190
<b>Abb. 8.17</b> Renale Clearance-Plots ( $U_t$ gegen $AUC_t$ ) für die Quercetinausscheidung nach Administration von Zwiebeln.....	192
<b>Abb. 8.18</b> Renale Clearance-Plots ( $U_t$ gegen $AUC_t$ ) für die Quercetinausscheidung nach Administration von Spiraeosid. ....	193
<b>Abb. 8.19</b> Renale Clearance-Plots ( $U_t$ gegen $AUC_t$ ) für die Quercetinausscheidung nach Administration von Buchweizenkrauttee.....	195
<b>Abb. 8.20</b> Renale Clearance-Plots ( $U_t$ gegen $AUC_t$ ) für die Quercetinausscheidung nach Administration von Rutin. ....	196

## 10 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1.1</b> Pharmakokinetische Parameter zur Verfügbarkeit von Quercetin nach intravenöser Applikation von 100 mg Quercetin.....	3
<b>Tab. 1.2</b> Reanalyse der von GUGLER et al. (1975) publizierten Daten mittels nichtkompartimenteller Analyse.....	4
<b>Tab. 1.3</b> Pharmakokinetische Parameter von Quercetin erhalten nach Anpassung der Plasmakonzentrations-Zeit-Profile an ein Zweikompartimentmodell.....	5
<b>Tab. 1.4</b> Übersicht über die zu Beginn der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien zur Resorption und Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen quercetinhaltigen Prüfpräparaten.....	17
<b>Tab. 1.5</b> Übersicht über die seit Beginn der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien zur Resorption und Bioverfügbarkeit von Quercetin aus verschiedenen quercetinhaltigen Prüfpräparaten.....	18
<b>Tab. 2.1</b> Gehalt an Quercetinglykosiden in Zwiebeln.....	30
<b>Tab. 2.2</b> Konsumierte Menge an Quercetin in der Pilotstudie sowie den Ergänzungen.....	30
<b>Tab. 2.3</b> Gradient zur Trennung von Flavonoiden und Metaboliten aus Humanplasma.....	32
<b>Tab. 2.4</b> Kalibrierfunktionen für Flavonoide und Metabolite im Plasma.....	33
<b>Tab. 2.5</b> Gradient zur Trennung von Flavonoiden aus Pflanzenmaterial.....	38
<b>Tab. 2.6</b> Kalibrierdaten für Quercetin-4'-O-glucosid zur Quantifizierung des Quercetinglucosid-Gehaltes der Zwiebeln.....	40
<b>Tab. 2.7</b> Bestimmung der Wiederholpräzision der Extraktionsmethode aus Urin anhand des Internen Standards Naringenin.....	45
<b>Tab. 2.8</b> Trennung von Quercetin und seinen Metaboliten im Urin.....	46
<b>Tab. 2.9</b> Retentionszeiten und Absorptionsmaxima der Referenzstandards bei der Urinanalytik.....	46
<b>Tab. 2.10</b> Bestimmung der Linearität und des Arbeitsbereiches sowie der Kalibrierfunktionen für die verwendeten Referenzstandards.....	47
<b>Tab. 2.11</b> Wiederholpräzision nach Aufarbeitung einer Plasmaprobe.....	49
<b>Tab. 2.12</b> Bestimmung der Vergleichspräzision nach Aufarbeitung einer Plasmaprobe.....	49
<b>Tab. 2.13</b> Gradient zur Trennung von Quercetin und seinen Metaboliten im Plasma.....	50
<b>Tab. 2.14</b> Retentionszeiten der Referenzstandards für die Plasmaanalytik.....	51
<b>Tab. 2.15</b> Bestimmung der Linearität und des Arbeitsbereiches sowie der Kalibrierfunktionen für die verwendeten Referenzstandards.....	52
<b>Tab. 2.16</b> Stabilität der Referenzsubstanzen in Plasma bei -20°C.....	54
<b>Tab. 2.17</b> Stabilität der Referenzsubstanzen in Plasma bei -80°C.....	54
<b>Tab. 2.18</b> Gradient zur Trennung von Flavonol(glykosiden) und deren Metaboliten im mucosalen Überstand, Darm und Resorbat der <i>In-vitro</i> -Resorptionsversuche.....	59
<b>Tab. 2.19</b> Retentionszeiten und Detektionswellenlängen der untersuchten Flavonole und deren Metaboliten im mucosalen Überstand, Darm und Resorbat der <i>In-vitro</i> -Resorptionsversuche.....	60
<b>Tab. 2.20</b> Bestimmung der Linearität und des Arbeitsbereiches sowie der Kalibrierfunktionen für die verwendeten Referenzstandards.....	60

<b>Tab. 3.1</b> Übersicht über die maximalen Plasmakonzentrationen $c_{\max}$ [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ] von Quercetin (detektiert und berechnet als Aglykon nach Hydrolyse der Phase-II.-Konjugate) in der Pilotstudie sowie Ergänzung I. und II.....	71
<b>Tab. 3.2</b> Übersicht über die Zeitpunkte $t_{\max}$ [h], an denen die maximalen Plasmakonzentrationen $c_{\max}$ von Quercetin in der Pilotstudie sowie Ergänzung I. und II erreicht wurden. ....	71
<b>Tab. 3.3</b> Renal eliminierte Quercetinmenge [mg] bzw [% Tagesdosis] nach Applikation der jeweiligen Prüfpräparate der Pilotstudie sowie Ergänzungen I. und II.....	72
<b>Tab. 3.4</b> Renal eliminierte Isorhamnetinmenge [mg] bzw. [% Tagesdosis] nach Applikation der jeweiligen Prüfpräparate der Pilotstudie sowie Ergänzungen I. und II.....	72
<b>Tab. 3.5</b> Im Sammelurin der <i>run-in</i> Phase (0-Wert) eliminierte Substanzmengen. ....	73
<b>Tab. 3.6</b> Renal eliminierte Substanzmengen im 24 h-Urin in % der applizierten Quercetindosis an den jeweiligen Studientagen der Pilotstudie.....	74
<b>Tab. 3.7</b> Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Applikation von Zwiebeln. ....	76
<b>Tab. 3.8</b> Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Applikation von Spiraeosid (S). ....	78
<b>Tab. 3.9</b> Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Applikation von Buchweizenkraut (B).....	80
<b>Tab. 3.10</b> Quercetin-Plasmakonzentrationen nach Applikation von Rutin (R). ....	82
<b>Tab. 3.11</b> Renale Elimination von Quercetin in Prozent der applizierten Dosis. ....	87
<b>Tab. 3.12</b> Kumulative renale Elimination von Isorhamnetin ( $U_t$ in [ $\mu\text{g}$ ]) nach Applikation von Zwiebeln (Z), Spiraeosid (S), Buchweizenkraut (B) und Rutin (R). ....	88
<b>Tab. 3.13</b> Renale Elimination von Isorhamnetin (Iso) sowie der Summe aus Quercetin und Isorhamnetin (Qu+Iso) in Prozent der applizierten Dosis.....	89
<b>Tab. 3.14</b> Pharmakokinetische Parameter der Nichtkompartiment-Analyse nach Applikation von Zwiebeln (Z) und Spiraeosid (S). ....	92
<b>Tab. 3.15</b> Pharmakokinetische Parameter der Nichtkompartiment-Analyse nach Applikation von Buchweizenkrauttee (B) und Rutin (R).....	93
<b>Tab. 3.16</b> Pharmakokinetische Parameter der Kompartiment-Analyse nach Anpassung der Mediane an ein Zwei- bzw. Einkompartimentmodell.....	95
<b>Tab. 3.17</b> Bestimmung der Halbwertszeit von Quercetin aus den dazugehörigen Sigma-Minus-Plots. ....	97
<b>Tab. 3.18</b> Bestimmung der renalen Clearance aus den Clearance-Plots ( $U_t$ cum vs. $AUC_t$ cum).....	98
<b>Tab. 3.19</b> Wiederfindung von Quercetin in % der applizierten Quercetinmenge.....	104
<b>Tab. 3.20</b> Wiederfindung von Quercetin-3-rhamnosid in % der applizierten Menge. ....	104
<b>Tab. 3.21</b> Wiederfindung und Metabolisierung von Quercetin-3-O-rhamno-7-O-glucosid in % der applizierten Menge.....	105
<b>Tab. 3.22</b> Wiederfindung von Rutin in % der applizierten Menge.....	106
<b>Tab. 3.23</b> Wiederfindung von Rutin und Quercetin % der applizierten Gesamtmenge Quercetinäquivalente. ....	107
<b>Tab. 3.24</b> Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Quercetin-4-O-glucosid (Spiraeosid) unter Verwendung von Jejunumsegmenten. ....	108
<b>Tab. 3.25</b> Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Quercetin-4-O-glucosid (Spiraeosid) unter Verwendung von Ileumsegmenten. ....	108

<b>Tab. 3.26</b> Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Quercetin(glucosiden) im Zwiebelextrakt (Stlsg.) unter Verwendung von Jejunumsegmenten.....	110
<b>Tab. 3.27</b> Wiederfindung [% Dosis] von Kämpferol. ....	111
<b>Tab. 3.28</b> Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Kämpferol-3- <i>O</i> -glucosid. ....	112
<b>Tab. 3.29</b> Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Kämpferol-3,7- <i>O</i> -diglucosid. ....	113
<b>Tab. 3.30</b> Wiederfindung [% Dosis] und Metabolisierung von Kämpferol-7- <i>O</i> -glucosid. ....	114
<b>Tab. 8.1</b> Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] von Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate nach Applikation von Zwiebeln (entsprechend 100 mg Quercetin) (Pilotstudie und Ergänzung I.) bzw. Zwiebeln und Quercetin (Ergänzung II.).....	153
<b>Tab. 8.2</b> Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] von Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate nach Applikation von Buchweizenkrauttee (entsprechend 200 mg Quercetin) sowie 200 mg und 1000 mg Quercetin jeweils als Suspension.....	153
<b>Tab. 8.3</b> Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] von Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate nach Applikation von Zwiebeln (entsprechend 100 mg Quercetin) .....	154
<b>Tab. 8.4</b> Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] von Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate nach Applikation von Spiraeosid (entsprechend 100 mg Quercetin).....	155
<b>Tab. 8.5</b> Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] von Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate nach Applikation von Buchweizenkrauttee (entsprechend 200 mg Quercetin).....	156
<b>Tab. 8.6</b> Plasmakonzentrationen [ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ] von Quercetin nach Hydrolyse der Konjugate nach Applikation von Rutin (entsprechend 200 mg Quercetin) .....	157
<b>Tab. 8.7</b> Isorhamnetin-Plasmakonzentrationen (nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate) nach Applikation von Zwiebeln (Z).....	158
<b>Tab. 8.8</b> Isorhamnetin-Plasmakonzentrationen (nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate) nach Applikation von Spiraeosid (S).....	158
<b>Tab. 8.9</b> Isorhamnetin-Plasmakonzentrationen (nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate) nach Applikation von Buchweizenkraut (B).....	159
<b>Tab. 8.10</b> Isorhamnetin-Plasmakonzentrationen (nach hydrolytischer Spaltung der Konjugate) nach Applikation von Buchweizenkraut (B).....	159
<b>Tab. 8.11</b> Kumulative Urinausscheidung $U_t$ [ $\mu\text{g}$ ] von Quercetin (detektiert nach Hydrolyse der Quercetinkonjugate) nach Applikation von Zwiebeln. ....	160
<b>Tab. 8.12</b> Kumulative Urinausscheidung $U_t$ [ $\mu\text{g}$ ] von Quercetin (detektiert nach Hydrolyse der Quercetinkonjugate) nach Applikation von Spiraeosid.....	160
<b>Tab. 8.13</b> Kumulative Urinausscheidung $U_t$ [ $\mu\text{g}$ ] von Quercetin (detektiert nach Hydrolyse der Quercetinkonjugate) nach Applikation von Buchweizenkrauttee.....	161
<b>Tab. 8.14</b> Kumulative Urinausscheidung $U_t$ [ $\mu\text{g}$ ] von Quercetin (detektiert nach Hydrolyse der Quercetinkonjugate) nach Applikation von Rutin. ....	161
<b>Tab. 8.15</b> Renale Elimination von HVA [ $\mu\text{Mol}$ ] pro Urinsammelintervall $dt$ [h].....	162
<b>Tab. 8.16</b> Pharmakokinetische Parameter der Nichtkompartiment-Analyse von Quercetin im Plasma nach Applikation von Zwiebeln .....	163
<b>Tab. 8.17</b> Pharmakokinetische Parameter der Nichtkompartiment-Analyse von Quercetin im Plasma nach Applikation von Spiraeosid.....	164
<b>Tab. 8.18</b> Pharmakokinetische Parameter der Nichtkompartiment-Analyse von Quercetin im Plasma nach Applikation von Buchweizenkrauttee.....	165

---

<b>Tab. 8.19</b> Pharmakokinetische Parameter der Nichtkompartiment-Analyse von Quercetin im Plasma nach Applikation von Rutin .....	166
<b>Tab. 8.20</b> Berechnungsgrundlagen der in Kinetica® 2000 verwendeten pharmakokinetische Parameter für extravaskuläre Applikation. ....	175
<b>Tab. 8.21</b> Tabellarische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zweikompartimentmodell nach Applikation von Zwiebeln .....	176
<b>Tab. 8.22</b> Tabellarische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zweikompartimentmodell nach Applikation von Spiraeosid .....	179
<b>Tab. 8.23</b> Tabellarische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zwei- bzw. Einkompartimentmodell nach Applikation von Buchweizenkraut.....	182
<b>Tab. 8.24</b> Tabellarische Darstellung des fittings der Quercetin-Plasmakonzentrationen an ein Zwei- bzw. Einkompartimentmodell nach Applikation von Rutin .....	185
<b>Tab. 8.25</b> Freigabe-Protokoll der Prüfformulierung am Beispiel von Quercetin 1000 mg..	198
<b>Tab. 8.26</b> ANOVA-Tabelle für $t_{max}$ .....	199
<b>Tab. 8.27</b> Ergebnisse des Tukey-Tests für den Vergleich von $t_{max}$ .....	199
<b>Tab. 8.28</b> Anova-Tabelle für den Vergleich von $c_{max}$ .....	199
<b>Tab. 8.29</b> Ergebnisse des Tukey-Tests für den Vergleich von $c_{max}$ .....	199
<b>Tab. 8.30</b> ANOVA-Tabelle für den Vergleich der terminalen Halbwertszeit .....	200
<b>Tab. 8.31</b> ANOVA-Tabelle für den Vergleich von $AUC_{0-t}$ .....	200
<b>Tab. 8.32</b> Ergebnisse des Tukey-Tests für den Vergleich der $AUC_{0-t}$ .....	200
<b>Tab. 8.33</b> ANOVA-Tabelle für den Vergleich von MRT .....	200
<b>Tab. 8.34</b> Ergebnisse des Tukey-Tests für den Vergleich von MRT .....	201
<b>Tab. 8.35</b> ANOVA-Tabelle für den Vergleich der renal eliminierten Menge [% der Dosis] ..	201
<b>Tab. 8.36</b> Ergebnisse des Tukey Tests für den Vergleich von der renale eliminierten Quercetinmenge berechnet als Prozent der applizierten Quercetindosis.....	201

## 11 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance
B	Buchweizenkraut
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CHD	coronary heart disease
CI	Konfidenzintervall
ECD	Elektrochemische Detektion
FG	Frischgewicht
HPLC	high performance liquid chromatography
HPLC-MS	gekoppelte Analysenmethode aus HPLC und MS
ICH	International Code for Harmonisation
IS	Interner Standard
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
konj.	konjugiert
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LDL	low density lipoproteins
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Messungen
n.d.	nicht bestimmbar
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
p.a.	pro analysi
Qu.	Quercetin
R	Rutin
RP	reversed phase
rel.SD	relative Standardabweichung
s.	siehe
S	Spiraeosid
SD	Standardabweichung
sek. A.	sekundäre Größenachse
SPE	Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction)
Tab.	Tabelle
TG	Trockengewicht
UV	Ultraviolett
Z	Zwiebel
z.B.	zum Beispiel



Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Diese Dissertation hat in gleicher oder ähnlicher Form zuvor keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

## CURRICULUM VITAE

### PERSÖNLICHE ANGABEN

---

Name: Eva Ulrike Gräfe  
Geburtsdatum: 11. Juli 1971  
Geburtsort: Siegen  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### AUSBILDUNG

---

**Apr 1997 – Dez 2000**

#### **Promotion**

Bei Privatdozent Dr. Markus Veit  
"Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik von Quercetin und Quercetinglykosiden im Menschen"

Jan 2000 – Dez 2000  
Apr 1997 – Dez 1999

Zentralinstitut Arzneimittelforschung GmbH, Sinzig/Rhein  
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie  
Als Wissenschaftliche Mitarbeiterin Betreuung von drei  
Diplomarbeiten und eines Ausbildungsabschnittes im Rahmen  
des Pharmaziestudiums

**Apr 1996 – März 1997**

#### **Diplomarbeit**

Bei Prof. Dr. Franz-Christian Czygan  
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie  
„Renale Metabolite pflanzlicher Phenole untersucht am Beispiel  
von Schachtelhalmkraut DAB 1996“  
Studienabschluss Biologie Diplom

März 1997

**Nov 1991 – Feb 1996**

#### **Biologiestudium**

Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
Diplomprüfung  
Diplomvorprüfung

Feb 1996  
Nov 1993

**Aug 1990 – Juni 1991**

#### **Auslandsstudium**

University of Sussex at Brighton, UK  
Englische Literatur und Philosophie

**1981 – 1990**  
Mai 1990

**Gymnasium am Giersberg, Siegen**  
Abitur

**1977 – 1981**

**Grundschule am Giersberg, Siegen**

### INTEGRIERTE AUSLANDSAUFENTHALTE

---

im Rahmen der Promotion als Stipendiatin des Deutschen Akademischen Austauschdienstes

**Apr 2000 – Mai 2000**  
**Jan 1998 – Apr 1998**  
**Apr 1997 – Juni 1997**

**University of Florida, Gainesville, FL**  
Department of Pharmaceutics  
Bei Prof. Dr. H. Derendorf  
Professor of Pharmaceutics

### STUDIENBEGLEITENDE PRAKTIKA

---

**Aug 1994 – Sept 1994**

**Max-Planck-Institut für Biochemie**  
Martinsried/München  
Bei Prof. Dr. F. Pfeifer

**Juli 1991 – Aug 1991**

**Institut f. med. Mikrobiologie u. klin. Chemie**  
Abt. medizinische Mikrobiologie  
Weingarten/Württemberg  
Bei Dr. med. H. Grimm