

**Untersuchungen zur Anwendbarkeit und Validität  
von *In-vitro*-Methoden bezüglich der Inhibition  
von Cytochrom-P450-Enzymen durch  
Arzneipflanzenextrakte**

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

vorgelegt von  
**Andreas Frank**  
aus Frickenhausen

Würzburg 2009

Eingereicht am: .....  
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: .....  
2. Gutachter: .....  
der Dissertation

1. Prüfer: .....  
2. Prüfer: .....  
3. Prüfer: .....  
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....

*Für Carmen, Max und Tim*





## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung und unter Anleitung von

**Herrn PD Dr. Matthias Unger**

bei dem ich mich für seine tatkräftige Unterstützung, die vielen Diskussionen, wichtigen Anregungen und gute Zusammenarbeit bedanken möchte. Vor allem danke ich ihm dafür, dass er mir die Teilnahme an zahlreichen Kongressen im In- und Ausland ermöglichte und mir zu einigen Stipendien verholfen hat.

Weiterhin möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe möchte ich für die stets gute und angenehme Zusammenarbeit danken. Herrn Prof. Dr. Heribert Warzecha danke ich für die interessante wissenschaftliche Kooperation und tatkräftige Unterstützung in zahlreichen Projekten. Herzlichen Dank auch an Dr. Eberhard Heller für die vielen aufschlussreichen Diskussionen bei chemischen Fragen sowie für die NMR-Messungen.

Ein besonderer Dank gilt meinen ehemaligen bzw. jetzigen Kollegen Michael Völker, Carina Rikanović, Leonhard Schaefflein und Daniela Ferme, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben. Danke für die gute und angenehme Zusammenarbeit!

Besonders bedanke ich mich bei Dr. Bernd Reyer, Frau Ebner, Frau Möhler-Reitzenstein und dem Team aus der Werkstatt, die mich in den verschiedensten Angelegenheiten unterstützt haben.

Außerdem danke ich dem AK Holzgrabe für die freundliche Aufnahme als „Fremden“ sowie für die Unterhaltung und zahlreichen Diskussionen in den Kaffeepausen.

Meinen Eltern danke ich für die immerwährende Unterstützung in jeglicher Hinsicht, ohne die ich heute nicht da stehen würde, wo ich jetzt bin.

Mein besonderer Dank gilt meiner „kleinen“ Familie Carmen, Max und Tim. Ihr seid die Größten! Danke Carmen, dass du mir immer zur Seite stehst.

Zu guter Letzt danke ich all denen, die ich in dieser Aufzählung vergessen habe und die eigentlich auch hier stehen müssten!

***Man sollte alles so einfach wie möglich sehen -  
aber auch nicht einfacher.***

Albert Einstein



---

<b>I Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1 Phytopharmaka</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Phytopharmaka</b> .....	<b>3</b>
2.1 Pharmakodynamische Arzneimittelwechselwirkungen .....	6
2.2 Pharmakokinetische Arzneimittelwechselwirkungen .....	7
2.2.1 Wechselwirkungen durch Beeinflussung von Transportvorgängen .....	8
2.2.2 Wechselwirkungen durch Beeinflussung der Biotransformation .....	9
2.2.2.1 Biotransformation .....	9
2.2.2.2 Cytochrom-P450-Enzyme (CYP-Enzyme).....	11
2.2.2.3 Induktion und Inhibition von CYP-Enzymen .....	20
2.2.3 Phytopharmaka-Wechselwirkungen .....	24
<b>3 Motivation und Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>34</b>
<b>II Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>39</b>
<b>1 Entwicklung LC/MS-basierter Methoden zur Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte</b> .....	<b>39</b>
1.1 Single-Quadrupol-Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisierung.....	39
1.2 HPLC mit Online-Festphasenextraktion .....	47
1.3 Methoden zur Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen.....	51
1.3.1 Kriterien für die Auswahl geeigneter Substrate.....	51
1.3.2 Methode zur Bestimmung der Inhibition von CYP2B6 .....	54
1.3.2.1 Auswahl von Bupropion als geeignetes Substrat .....	54
1.3.2.2 Identifizierung von 4-Hydroxybupropion .....	56
1.3.2.3 Analytik von 4-Hydroxybupropion .....	56
1.3.2.4 Bestimmung der Linearität .....	59
1.3.2.5 $K_m$ -Wert-Bestimmung von Bupropion (CYP2B6) .....	61
1.3.2.6 Durchführung des CYP2B6-Assays .....	67
1.3.3 Methoden zur Bestimmung der Inhibition von CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 .....	68
1.3.4 Berechnung der inhibitorischen Aktivität.....	75
1.3.5 Evaluierung der CYP-Assays mittels Standardinhibitoren .....	78

---

<b>2 Fluorimetrische Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen .....</b>	<b>81</b>
2.1 Grundlagen der fluorimetrischen Detektion .....	81
2.1.1 Prinzip der Fluoreszenz .....	81
2.1.2 Gesetzmäßigkeit der Fluoreszenzintensität .....	83
2.1.3 Strukturelle Voraussetzungen .....	84
2.2 Störungen der Fluoreszenzmessungen .....	85
2.2.1 Streustrahlung .....	85
2.2.2 Quenching-Effekte .....	86
2.2.3 Eigenfluoreszenz .....	88
2.3 Mikrotiterplatten-basierte Fluoreszenz-Assays .....	88
2.3.1 Substrate und Metabolite .....	89
2.3.1.1 Cumarin-Derivate .....	89
2.3.1.2 Resorufin-Derivate .....	97
2.3.1.3 Fluorescein-Derivate .....	99
2.3.2 Berechnung der inhibitorischen Aktivität .....	100
2.3.3 Untersuchungen von Pflanzenextrakten und Pflanzeninhaltsstoffen ..	101
2.3.4 Vor- und Nachteile der Fluoreszenz-Assays .....	103
2.4 Evaluierung der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays .....	105
2.4.1 Eignung der Mikrotiterplatten .....	106
2.4.1.1 Signal/Rausch-Verhältnis .....	106
2.4.1.2 Vergleich von IC <sub>50</sub> -Werten .....	108
2.4.1.3 Fazit .....	110
2.4.2 Bestimmung der Linearität der Fluoreszenzintensität .....	111
2.4.3 Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit der Substrate .....	112
2.4.4 Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte von Standardinhibitoren .....	114
<b>3 Vergleich der nichtlinearen Regression und linearen Interpolation als   Verfahren zur Berechnung von IC<sub>50</sub>-Werten .....</b>	<b>119</b>
<b>4 Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von Standardinhibitoren: Fluoreszenz- vs. LC/MS-   Assay .....</b>	<b>122</b>

---

<b>5 Untersuchungen zur Anwendbarkeit und Validität der Mikrotiterplatten-</b>	
<b>basierten Fluoreszenz-Assays bei Pflanzenextrakten.....</b>	<b>124</b>
5.1 Auswahl von geeigneten Arzneidrogen .....	124
5.2 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der Pflanzenextrakte .....	127
5.2.1 Ergebnisse für Pflanzenextrakte mit geringer inhibitorischer Aktivität.	128
5.2.2 Ergebnisse für Pflanzenextrakte mit starker inhibitorischer Aktivität...	130
5.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	131
5.3 Bestimmung von Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten .....	132
5.3.1 Methoden.....	132
5.3.2 Ergebnisse.....	137
5.3.2.1 Inhibitorisch schwach aktive Pflanzenextrakte .....	137
5.3.2.2 Inhibitorisch stark aktive Pflanzenextrakte .....	143
5.3.2.3 Zusammenfassung.....	145
5.4 Abhängigkeit der Abweichungen der mittels LC/MS- und Fluoreszenz-	
Methoden erhaltenen IC <sub>50</sub> -Werte von Quenching- und Eigenfluoreszenz-	
Effekten.....	146
5.4.1 Einfluss von Quenching-Effekten.....	147
5.4.2 Einfluss der Eigenfluoreszenz .....	151
5.4.3 Pflanzenextrakte mit Besonderheiten .....	152
5.4.4 Zusammenfassung .....	155
5.5 Abhängigkeit der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte von der	
Metabolitenkonzentration (Substratumsatz).....	156
5.5.1 Ergebnisse.....	156
5.5.2 Zusammenfassung .....	160
5.6 Diskussion über Kompensation der Quenching- und Eigenfluoreszenz-	
Effekte bei Berechnung der IC <sub>50</sub> -Werte .....	162
<b>6 Alternative HPLC-Methoden für die Bestimmung der Inhibition von</b>	
<b>CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 durch Pflanzenextrakte .....</b>	<b>170</b>
6.1 IC <sub>50</sub> -Werte von Standardinhibitoren .....	174
6.2 Selektivität der LC/Fluoreszenz- und LC/MS-Methoden .....	174
6.3 IC <sub>50</sub> -Werte von Pflanzenextrakten.....	176
6.4 Fazit .....	178

---

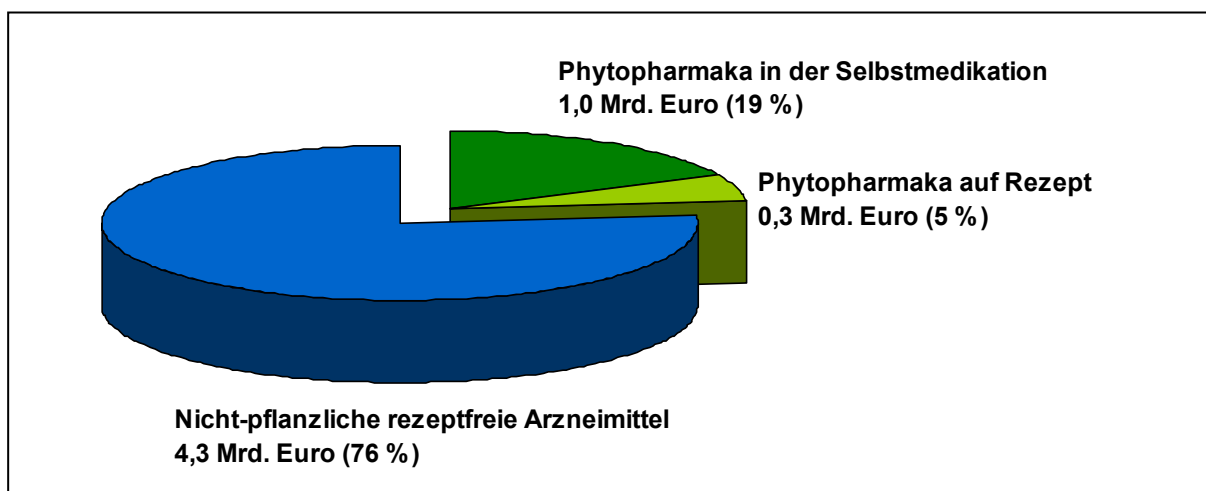
<b>III Zusammenfassung</b> .....	<b>181</b>
<b>IV Summary</b> .....	<b>185</b>
<b>V Material und Methoden</b> .....	<b>189</b>
<b>1 Material</b> .....	<b>189</b>
1.1 Technische Geräte.....	189
1.2 Verbrauchsmaterialien.....	189
1.3 Chemikalien.....	190
1.4 Pflanzliche Arzneidrogen.....	191
1.5 Cytochrom-P450-Enzyme (CYP-Enzyme).....	192
<b>2 Methoden</b> .....	<b>193</b>
2.1 Herstellung der Pflanzenextrakte.....	193
2.2 Herstellung der Inkubationspuffer.....	194
2.3 HPLC-basierte <i>In-vitro</i> -Assays.....	195
2.3.1 Stammlösungen.....	195
2.3.2 LC/MS-basierte <i>In-vitro</i> -Assays.....	197
2.3.3 LC/Fluoreszenz-basierte <i>In-vitro</i> -Assays.....	207
2.4 Mikrotiterplatten-basierte Fluoreszenz-Assays.....	209
2.4.1 Stammlösungen.....	209
2.4.2 <i>In-vitro</i> -Assays.....	211
2.5 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität.....	213
2.6 Untersuchung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte.....	216
2.6.1 Bestimmung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte.....	216
2.6.2 Bestimmung der Eigenfluoreszenz.....	217
<b>VI Anhang</b> .....	<b>219</b>
<b>VII Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>231</b>
<b>VIII Veröffentlichungen</b> .....	<b>233</b>
<b>IX Literaturverzeichnis</b> .....	<b>237</b>



# I EINLEITUNG

## 1 Phytopharmaka

In den letzten Jahren erfreut sich die Therapie mit pflanzlichen Arzneimitteln (Phytopharmaka) zunehmender Beliebtheit in der Bevölkerung insbesondere im Rahmen der Selbstmedikation. Für einige Menschen spielt die eigenverantwortliche Medikation mit Phytopharmaka eine bedeutende Rolle zur Therapie von Erkrankungen, aber auch zur Vorbeugung von Gesundheitsstörungen. Im Jahr 2006 lag der Umsatzanteil von pflanzlichen Arzneimitteln bei etwa 24 % (ca. 1,3 Mrd. Euro) gemessen am Gesamtumsatz von 5,6 Mrd. Euro aller in deutschen Apotheken abgegebenen rezeptfreien Arzneimittel (Abb. 1). Seit Inkrafttreten des Gesundheitsmodernisierungsgesetzes im Jahre 2004 hat die Selbstmedikation mit Phytopharmaka sehr stark an Bedeutung gewonnen, da die Patienten pflanzliche Arzneimittel in den meisten Fällen selbst bezahlen müssen und nur noch in Ausnahmefällen auf Kassenrezept verordnet bekommen. Während nur noch etwa 5 % des Gesamtumsatzes (ca. 0,3 Mrd. Euro) ärztliche Verordnungen widerspiegeln, wurde der Großteil von etwa 1,0 Mrd. Euro für Phytopharmaka in der Selbstmedikation ausgegeben.<sup>1</sup>



**Abb. 1** Der Markt der rezeptfreien pflanzlichen und nicht-pflanzlichen Arzneimittel in deutschen Apotheken zu Endverbraucherpreisen im Jahr 2006.<sup>1</sup>

Zusätzlich finden natürlich auch Phytopharmaka, die als freiverkäufliche Arzneimittel in Drogerien, Reformhäusern und Supermärkten erhältlich sind, sehr großen

Zuspruch. Die umsatzstärksten Indikationsgebiete in der Selbstmedikation mit pflanzlichen Arzneimitteln sind Husten- und Erkältungsmittel, Herz- und Kreislaufmittel, Magen- und Verdauungsmittel, Beruhigungs- und Schlafmittel, Mittel gegen Muskel- und Gelenkschmerzen sowie pflanzliche Tonika und Geriatrika. In Tab. 1 sind die umsatzstärksten Indikationsbereiche der Selbstmedikation mit Phytopharmaka und deren Umsatzanteile in Apotheken gemessen an den Endverbraucherpreisen aufgelistet.<sup>1</sup>

**Tab. 1** Die umsatzstärksten Indikationsbereiche der Selbstmedikation mit Phytopharmaka in deutschen Apotheken gemessen an den Endverbraucherpreisen im Jahr 2006.<sup>1</sup> Der Gesamtumsatz in der Selbstmedikation betrug 1,0 Mrd. Euro (Abb. 1).

Indikationsbereich	Umsatzanteil
Husten- und Erkältungsmittel	30 %
Herz- und Kreislaufmittel	26 %
Magen- und Verdauungsmittel	13 %
Mittel gegen Muskel- und Gelenkschmerzen	9 %
Beruhigungs- und Schlafmittel	5 %
Pflanzliche Tonika und Geriatrika	1 %
alle anderen	16 %

Im Unterschied zu chemisch-synthetischen Arzneimitteln enthalten Phytopharmaka als arzneilich wirksame Bestandteile ausschließlich Pflanzen, Pflanzenteile bzw. Pflanzenbestandteile oder Kombinationen davon in rohem oder pharmazeutisch bearbeitetem Zustand. Sie werden oft als Fertigarzneimittel in verschiedenen Darreichungsformen wie Dragees, Kapseln, Tabletten oder Lösungen angeboten. Als Beispiele sind Trockenextrakte aus *Ginkgo-biloba*-Blättern in Form von Tabletten oder Presssäfte aus Purpursonnenhutkraut (*Echinacea purpurea*) zu nennen. Chemisch definierte Substanzen pflanzlicher Herkunft, die im industriellen Maßstab isoliert und hergestellt werden, wie z. B. Paclitaxel oder Digitoxin, werden nicht zu den Phytopharmaka gezählt.

In Deutschland benötigen Phytopharmaka eine Zulassung des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) und unterliegen somit genau wie synthetische Arzneistoffe der Nachweispflicht von Wirksamkeit, Qualität und

Unbedenklichkeit. Eine Ausnahme hiervon stellen pflanzliche Präparate dar, die als so genannte "traditionelle pflanzliche Arzneimittel" beim BfArM eine Registrierung nach §§ 39a-d Arzneimittelgesetz erhalten. Bei diesen Präparaten genügt es zur Überprüfung der Wirksamkeit und Unbedenklichkeit, wenn ihre pharmakologische Wirkung plausibel erscheint und diese seit mindestens 30 Jahren, davon mindestens 15 Jahre in der EU, medizinisch unbedenklich im Einsatz sind. Beim BfArM sind insgesamt 2.424 Phytopharmaka als Mono- bzw. Kombinationspräparate zugelassen (Stand: BfArM 07.01.2008). Generell sind Phytopharmaka in Deutschland qualitativ hochwertige und analytisch aufwändig charakterisierte Arzneimittel, bei denen sich allerdings die Durchführung von pharmakodynamischen und -kinetischen Studien wegen der komplexen Zusammensetzung sehr schwierig gestaltet. Sowohl die für die Wirkung verantwortlichen Inhaltsstoffe als auch die genaue Wirkungsweise sind häufig unbekannt, zumal bei vielen pflanzlichen Arzneimitteln die Wirksamkeit auf die synergistische Wirkung zahlreicher Inhaltsstoffe zurückgeführt werden kann.

Allgemein werden pflanzliche Arzneimittel aufgrund ihres natürlichen Ursprungs und der traditionellen Anwendung als wirksame und sichere Alternative zu synthetischen Arzneimitteln angesehen und gelten oft als nebenwirkungsarme und weitgehend wechselwirkungsfreie Therapeutika. Jedoch wurden in jüngster Zeit einzelne Fallberichte von unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) sowie *In-vitro*-Untersuchungen zu möglichen Wechselwirkungen von pflanzlichen Zubereitungen mit synthetischen Arzneimitteln veröffentlicht. Dadurch ist die Therapie mit Phytopharmaka hinsichtlich der Sicherheit und Unbedenklichkeit in die Kritik geraten.

## **2 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Phytopharmaka**

### **Arzneimittelnebenwirkungen**

Über das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen unter der Therapie mit Phytopharmaka existieren im Vergleich mit synthetischen Arzneimitteln nur sehr wenige Fallberichte. Zudem lassen einige Fälle keine Rückschlüsse auf eine Kausalität zu. Ein bekanntes Beispiel ist die Lebertoxizität in Verbindung mit der Einnahme von Extrakten aus dem Kava-Kava-Wurzelstock (*Piper methysticum*). Im Jahr 2002 wurden in einigen europäischen Ländern, wie Deutschland, Frankreich,

Großbritannien, Österreich, Portugal, Niederlande und Schweiz, alle Kava-Kava- bzw. Kavain-haltigen Präparate, die zur Behandlung nervöser Angst-, Spannungs- und Unruhezustände indiziert waren, aufgrund eines erhöhten Risikos einer Leberschädigung vom Markt genommen. Die vermehrt aufgetretenen Fälle von Leberschäden reichten von hepatotoxischen Reaktionen bis hin zu Leberversagen, (cholestatischer) Hepatitis oder Leberzirrhose. Dem BfArM liegen für Deutschland insgesamt 39 spontan gemeldete Verdachtsfälle von leberbezogenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen vor, von denen drei Fälle tödlich verliefen.<sup>2</sup> Laut der deutschen Überwachungsbehörde geht die Schwere der Leberschäden über ein nach Erkenntnissen der medizinischen Wissenschaft vertretbares Maß hinaus und der Hepatotoxizität steht keine hinreichend belegte therapeutische Wirkung gegenüber.<sup>2</sup> Für die lebertoxische Wirkung des Kava-Kava-Wurzelstock-Extrakts konnten bislang noch keine eindeutigen Mechanismen bzw. experimentellen Beweise aufgezeigt werden. Trotz der Marktrücknahme beschäftigt sich die Wissenschaft mit der Untersuchung dieser Arzneidroge im Hinblick auf die Aufklärung der Lebertoxizität sehr ausgiebig.<sup>3-8</sup>

Des Weiteren kamen im Juli 2006 das BfArM sowie der Ausschuss für pflanzliche Arzneimittel der europäischen Zulassungsbehörde EMA (European Medicines Agency) aufgrund von mehreren Spontanberichten sowie Literaturberichten über eine Lebertoxizität während der Einnahme von Cimicifuga-haltigen Präparaten<sup>9-12</sup> zu der Schlussfolgerung, dass möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Anwendung dieser Phytopharmaka und dem Auftreten von Leberschäden besteht. Pflanzliche Arzneimittel aus Extrakten der Traubensilberkerze (*Cimicifuga racemosa*) werden vor allem zur Besserung psychischer und neurovegetativer Beschwerden in den Wechseljahren verwendet. Das BfArM sieht im Rahmen seines Stufenplanverfahrens für Cimicifuga-haltige Arzneimittel vor, dass die Inhaber von Arzneimittelzulassungen angehalten sind, die Angaben zu Leberschädigungen in den Abschnitten der Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen in der Gebrauchs- und Fachinformation zu ergänzen und eventuell notwendige Vorsichtsmaßnahmen zum frühest möglichen Zeitpunkt durchzuführen.<sup>13</sup> Der genaue Grund für das Auftreten der Lebertoxizität ist noch völlig unklar und erst durch wissenschaftliche Experimente zu belegen.

Als weiteres Beispiel für das Auftreten von Leberschäden sind Schöllkraut-haltige Präparate zu nennen,<sup>14,15</sup> die bei krampfartigen Beschwerden im Bereich der

Gallenwege und des Magen-Darm-Traktes Anwendung finden. Das BfArM hat 2005 die Zulassung von Präparaten mit Schöllkraut (*Chelidonium majus*), bei deren Anwendung mehr als 2,5 µg Gesamtalkaloide pro Tagesdosis verabreicht werden, aufgrund einiger Verdachtsfälle widerrufen. Bei der Einnahme von Schöllkraut-Präparaten mit höheren Tagesdosen an Alkaloiden können hepatotoxische Reaktionen auftreten. Diese Vermutung stützt sich auf Einzelfallberichte und auf eine von den Verbänden der pharmazeutischen Industrie in Auftrag gegebene *In-vitro*-Studie, in der isolierte Alkaloide an Hepatozyten getestet wurden.<sup>16</sup>

### **Arzneimittelwechselwirkungen (-interaktionen)**

Arzneimittelwechselwirkungen werden allgemein als eine unerwünschte Veränderung in der Pharmakodynamik (PD) oder in der Pharmakokinetik (PK) eines Arzneistoffes bezeichnet, die durch gleichzeitige Gabe eines anderen Arzneistoffes oder Einnahme von Lebens- und Genussmitteln wie zum Beispiel Alkohol und Zigarettenrauch hervorgerufen wird.<sup>17</sup> Diese gegenseitige Beeinflussung kann sowohl zu einem unzureichenden therapeutischen Effekt als auch zu toxischen Nebenwirkungen führen, die unter Umständen lebensbedrohlich oder mit bleibenden Schäden verbunden sind. Von klinisch relevanten Arzneimittelinteraktionen wird immer dann gesprochen, wenn die pharmakologische Wirkung oder die Toxizität eines Arzneistoffs so verändert ist, dass eine Dosisanpassung oder ein medizinisches Eingreifen erforderlich ist. Vor allem bei Arzneistoffen mit einer engen therapeutischen Breite ist Vorsicht geboten, da schon eine geringe Beeinflussung der Pharmakodynamik oder -kinetik dieser Arzneistoffe lebensgefährliche Auswirkungen haben kann. Arzneimittelinteraktionen stellen alltägliche Phänomene dar, da nicht nur synthetische Arzneimittel sondern auch Phytopharmaka sowie Nahrungsbestandteile mit anderen Arzneimitteln interagieren können.

Prinzipiell lassen sich zwei große Klassen von Arzneimittelinteraktionen unterscheiden, nämlich die pharmakodynamischen und die pharmakokinetischen Wechselwirkungen. Während sich die Pharmakodynamik mit der pharmakologischen Wirkung der Arzneistoffe beschäftigt, beschreibt die Pharmakokinetik die Zusammenhänge zwischen applizierter Dosis und den daraus resultierenden Plasmakonzentrationen. Bei Pflanzenextrakten sind sowohl pharmakodynamische als auch pharmakokinetische Interaktionen berichtet worden, wobei die pharmakokinetischen Wechselwirkungen eine bedeutendere Rolle spielen.

## 2.1 Pharmakodynamische Arzneimittelwechselwirkungen

Pharmakodynamische Wechselwirkungen sind immer dann zu erwarten, wenn die miteinander interferierenden Wirkstoffe an einem Rezeptor, an einem Erfolgsorgan oder in einem Regelkreis synergistisch oder antagonistisch wirken.<sup>18</sup> Diese Wechselwirkungen lassen sich bei gleichzeitig eingesetzten synthetischen Arzneistoffen aufgrund der meist gut erforschten pharmakokinetischen Eigenschaften abschätzen bzw. sogar therapeutisch ausnützen. Für eine sinnvolle Therapie werden solche Interaktionen z. B. bei der Applikation von indirekten Parasympathomimetika am Ende einer Narkose zur Aufhebung der Wirkung von stabilisierenden Muskelrelaxantien oder bei der Gabe von Antidoten bei Vergiftungen bewusst herbeigeführt.<sup>18</sup> Im heutigen Sprachgebrauch wird der Begriff Interaktion jedoch praktisch nur bei unerwünschten Wechselwirkungen verwendet. Bekannte unerwünschte pharmakodynamische Arzneimittelwechselwirkungen sind beispielsweise die erhöhte Blutungsneigung bei der Gabe von nichtsteroidalen Antirheumatika (z. B. Acetylsalicylsäure) während der Therapie mit Antikoagulantien wie Phenprocoumon und die Wirkungsverstärkung von Herzglykosiden durch die gleichzeitige Einnahme von Schleifendiuretika oder Thiaziden.

Pharmakodynamische Arzneimittelinteraktionen pflanzlicher Arzneimittel werden nur selten durch klinische Studien belegt, so dass sich diese sehr oft auf Einzelfallberichte oder *In-vitro*-Untersuchungen stützen. So wird vor allem auf eine erhöhte Blutungsneigung bei der Einnahme von Ginkgo (*Ginkgo biloba*), Gelbwurz (*Curcuma longa/xanthorriza*), Ingwer (*Zingiber officinale*), Knoblauch (*Allium sativum*) oder einigen anderen pflanzlichen Präparaten hingewiesen, wenn diese gleichzeitig mit nichtsteroidalen Antirheumatika wie Acetylsalicylsäure<sup>19</sup> oder indirekten Antikoagulantien wie Phenprocoumon oder Warfarin appliziert werden.<sup>20-22</sup> Diese unerwünschten Arzneimittelwechselwirkungen sollten kritisch betrachtet jedoch nicht überbewertet werden, da meistens keine *In-vivo*-Studien vorliegen und die *In-vivo*-Relevanz der zahlreichen *In-vitro*-Ergebnisse nicht zwangsläufig gegeben ist.

Extrakte aus Johanniskraut (*Hypericum perforatum*), die bei leichten bis mittelschweren Depressionen Anwendung finden, sind im Hinblick auf Wirkung und Interaktionen häufig untersucht worden. Die antidepressive Wirkung von Hypericum-

Extrakten wurde durch zahlreiche Studien belegt und in wissenschaftlichen Publikationen ausführlich beschrieben.<sup>23-25</sup> Die pharmakologische Wirkung von Hypericum-Extrakten ist vor allem auf das Phloroglucinol-Derivat Hyperforin (Abb. 10, Seite 27) zurückzuführen. Hyperforin hemmt die Wiederaufnahme von Neurotransmittern wie Serotonin und Noradrenalin im synaptischen Spalt, so dass es bei gleichzeitiger Verabreichung von Reuptake-Inhibitoren, insbesondere von selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitoren wie Fluoxetin, Sertralin oder Paroxetin zu einem „Serotonin-Syndrom“ kommen kann. Als Symptome treten Tremor, Schwitzen, Übelkeit, Kopfschmerzen, Unruhe, Bewusstseins- und Verhaltensstörungen auf.<sup>26</sup>

Bei anderen Phytopharmaka werden aufgrund ihrer Wirkungsweisen pharmakodynamische Interaktionen mit bestimmten Arzneimitteln vermutet und diskutiert.<sup>27,28</sup> So ist die gleichzeitige Verabreichung von Präparaten mit Baldrianwurzel (*Valeriana officinalis*), die gegen Schlafstörungen indiziert sind, mit Benzodiazepinen und anderen Sedativa kritisch zu betrachten,<sup>28</sup> da eine Wirkungsverstärkung der Sedierung durch eine Veränderung der Funktion des GABA-Rezeptors durch Baldrian vermutet wird.<sup>29</sup> Bei Extrakten aus dem Kraut von *Echinacea purpurea* (Purpursonnenhut) wird aufgrund von immunomodulatorischen Wirkungen davon abgeraten, diese in Kombination mit immunsuppressiven Medikamenten einzunehmen.<sup>28</sup>

## 2.2 Pharmakokinetische Arzneimittelwechselwirkungen

Die Pharmakokinetik beschreibt im Gegensatz zur Pharmakodynamik die Wirkung des Organismus auf einen Arzneistoff. Pharmakokinetische Wechselwirkungen sind somit auf die Beeinflussung derjenigen Prozesse zurückzuführen, denen ein Pharmakon im Körper unterliegt. Zu diesen Prozessen gehören vor allem die Resorption der Arzneistoffe (engl. *Absorption*), die Verteilung im peripheren Gewebe (engl. *Distribution*), die hepatische und extrahepatische Biotransformation (engl. *Metabolism*) sowie die renale und biliäre Ausscheidung der Medikamente (engl. *Excretion*). In diesem Zusammenhang wird in der Pharmakokinetik von den so genannten ADME-Parametern gesprochen, die im Wesentlichen die Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen beeinflussen. Während die Bindung an Plasmaproteine als

Ursache für pharmakokinetische Interaktionen generell überschätzt wurde und nur sehr selten von klinischer Relevanz ist,<sup>30</sup> spielt für die Ursache von Arzneimittelwechselwirkungen die Beeinflussung von Transportvorgängen und der Biotransformation (Metabolismus) die wichtigste Rolle.

### **2.2.1 Wechselwirkungen durch Beeinflussung von Transportvorgängen**

Bei Interaktionen, die auf einer verstärkten oder verminderten Resorption von Arzneistoffen beruhen, sind vor allem Transporter wie z. B. der Effluxtransporter P-Glykoprotein (P-gp) in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Der Effluxtransporter P-gp ist ein 170 kDa schweres Membranprotein aus der Familie der ABC-Transporter, die als gemeinsame Strukturelemente ATP-bindende Einheiten (engl. **ATP-Binding Cassette**, ABC) besitzen und spezifische Substrate durch Bindung und Hydrolyse von ATP aktiv durch eine Zellmembran transportieren. Neben der Expression in den proximalen Nierentubuli ist unter anderem die Expression in den kanalikulären Membranen der Hepatozyten und vor allem in den apikalen Membranen der Epithelien des Dünndarms mitverantwortlich für die geringe orale Bioverfügbarkeit von zahlreichen Arzneistoffen, wie z. B. Ciclosporin, Digoxin, Indinavir und Tacrolimus. Die Aktivität der Effluxpumpe vermindert die enterale Arzneistoffsresorption und steigert die renale und biliäre Ausscheidung. Zu den Pflanzenextrakten und Pflanzeninhaltsstoffen, die die Aktivität und die Expression von P-gp beeinflussen und somit die Resorption bzw. die Bioverfügbarkeit von P-gp-Substraten verändern können, gehören Extrakte aus Johanniskraut sowie Curcumin und Piperin. Während Johanniskrautextrakte die Expression von P-gp steigern,<sup>31</sup> wird die Aktivität des Effluxtransporters durch Curcumin und Piperin gehemmt.<sup>32,33</sup>

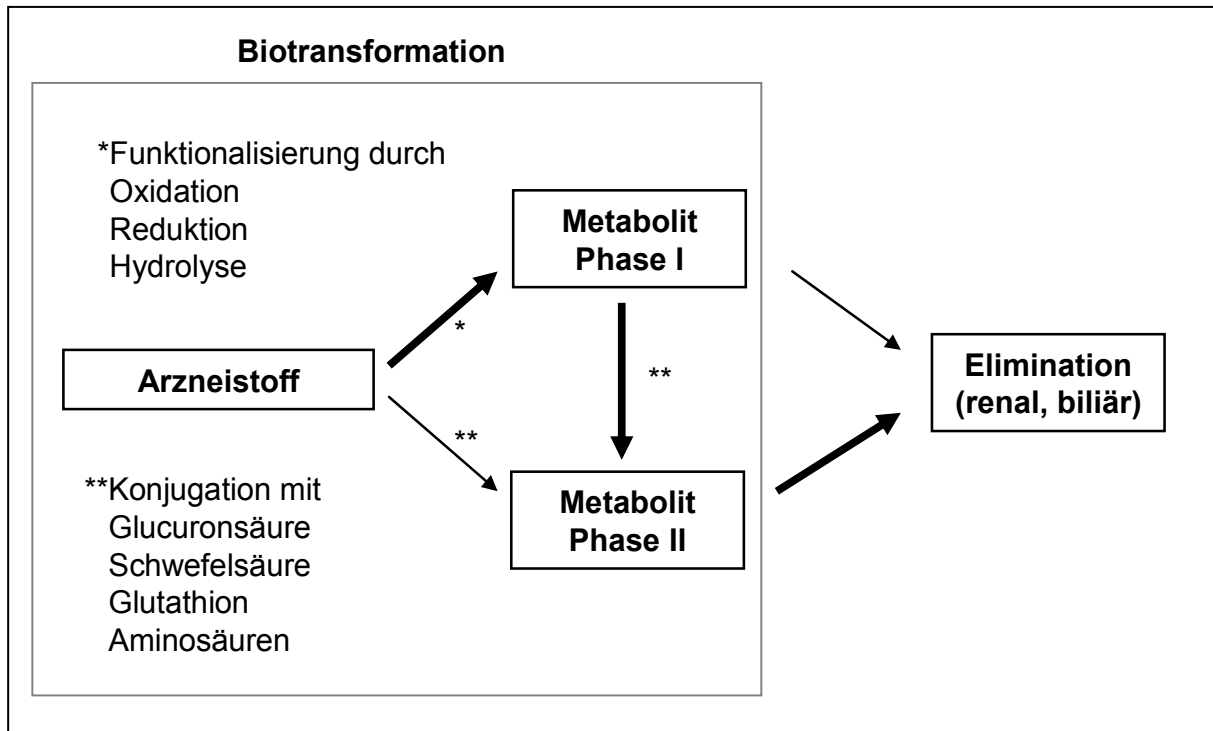


## 2.2.2 Wechselwirkungen durch Beeinflussung der Biotransformation

### 2.2.2.1 Biotransformation

Die größte klinische Relevanz bei pharmakokinetischen Arzneimittelinteraktionen besitzt die Biotransformation (Metabolismus), welche die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln beträchtlich beeinflussen kann. Für den Organismus stellen exogene Substanzen wie Chemikalien, Umweltgifte, Nahrungsbestandteile und auch Arzneistoffe Fremdstoffe (Xenobiotika) dar, die im menschlichen Körper einer mehr oder weniger starken Biotransformation unterliegen. Vor allem im Dünndarm und in der Leber aber auch in anderen Organen wie Niere, Lunge oder Haut befinden sich Enzymsysteme, die die Arzneistoffe in der Regel so verstoffwechseln, dass sie ihre pharmakologische Wirkung verlieren. Durch die höhere Wasserlöslichkeit der Metabolite wird eine Akkumulation der meist lipophilen Arzneistoffe im Körper verhindert und die renale Elimination erleichtert. Diese Vorgänge werden als Entgiftung bzw. als Bioinaktivierung der Arzneistoffe bezeichnet. Dennoch können Arzneistoffe auch zu aktiven Metaboliten (Bioaktivierung, „Prodrug-Prinzip“) oder sogar zu toxischen Substanzen (Biotoxifizierung) verstoffwechselt werden.

Biotransformationsprozesse lassen sich generell in zwei Phasen unterteilen (Abb. 2). In Phase I des Arzneistoffwechsels werden die Arzneistoffe durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionalisiert, d. h. sie werden mit polaren funktionellen Gruppen versehen oder die entsprechenden Gruppen werden durch z. B. Esterhydrolyse gebildet. Die Einführung bzw. Entstehung neuer funktioneller Gruppen wie z. B. OH, NH<sub>2</sub> oder COOH dient häufig als Vorbereitung für die sich anschließenden Phase-II-Reaktionen. In Phase II werden die Substanzen durch Konjugationsreaktionen unter anderem mit Glucuronsäure, Schwefelsäure, Glutathion oder Aminosäuren gekoppelt, so dass gut wasserlösliche und somit ausscheidbare Konjugate entstehen. Bei Arzneistoffen mit einer ausgeprägten Hydrophilie kann die Phase-I-Reaktion im menschlichen Körper auch entfallen. Des Weiteren ist die Phase-II-Reaktion keine zwingende Voraussetzung für die Elimination von Arzneistoffen aus dem Körper, so dass auch Phase-I-Metabolite im Urin oder in den Faeces auftreten.



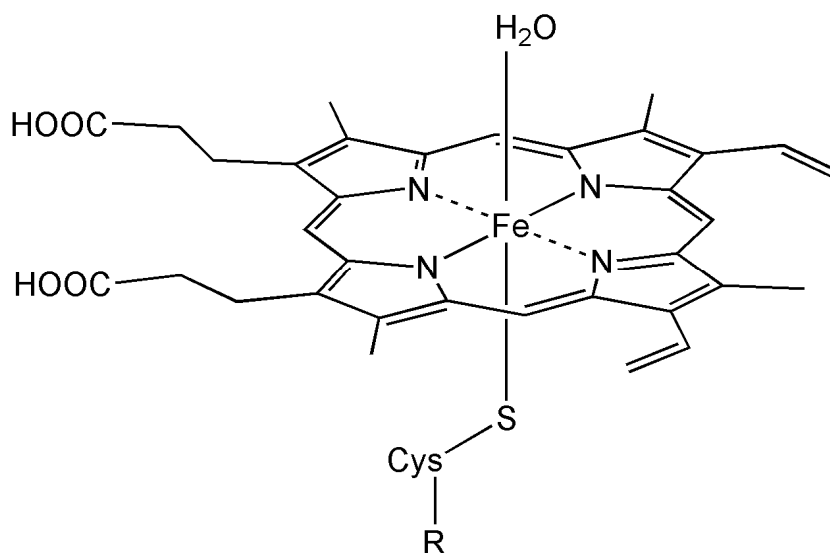
**Abb. 2** Vereinfachte Darstellung möglicher Biotransformations- und Eliminationsprozesse von Arzneistoffen im menschlichen Körper.

Die Biotransformation von Arzneistoffen wird durch Enzyme katalysiert, die überwiegend in der Leber vorkommen, so dass diese den Hauptmetabolisierungsort im Körper darstellt. Neben Alkoholdehydrogenasen, Aldehyddehydrogenasen, Esterasen, flavinhaltigen Monooxygenasen, Epoxidhydrolasen und Monoamin-oxidasen (z. B. MAO A/B) stellen die wichtigsten Enzyme des Phase-I-Metabolismus die Cytochrom-P450-Enzyme (CYP-Enzyme) dar, die überwiegend membrangebunden im endoplasmatischen Retikulum vorkommen. Zu den wichtigsten Enzymen der Phase II gehören die UDP (Uridindinucleotidphosphat)-Glucuronosyltransferasen, die Sulfotransferasen, die *N*-Acetyltransferasen und die Glutathion-S-Transferasen.

Obwohl seit einigen Jahren der Phase-II-Metabolismus mehr Beachtung in der Erforschung von Arzneimittelinteraktionen findet, besitzen die Enzyme der Phase I allen voran die CYP-Enzyme die größte Bedeutung für Interaktionen, da CYP-Enzyme am Metabolismus von über 90 % aller auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe beteiligt sind.<sup>34</sup>

### 2.2.2.2 Cytochrom-P450-Enzyme (CYP-Enzyme)

Cytochrom-P450-Enzyme (CYP-Enzyme) sind Protoporphyrin-haltige Hämproteine, die am Metabolismus zahlreicher exogener aber auch endogener Substanzen beteiligt sind. Sie besitzen ein Molekulargewicht von etwa 45-60 kDa und bestehen aus einem ca. 500 Aminosäuren großen Apoprotein und einer Häm-Domäne mit einem Eisen-Protoporphyrin-IX-Gerüst als prosthetische Gruppe (Abb. 3).<sup>35</sup> Das Porphyrin-Ringsystem mit seinen vier Stickstoffatomen bildet zu dem Eisen als Zentralatom vier stabile Liganden-Bindungen aus. Die Bindung an die fünfte Koordinationsstelle von Häm erfolgt über eine Thiolatgruppe der Cysteinseitenkette des Apoproteins, die eine hoch konservierte Region innerhalb der P450-Sequenz darstellt.<sup>36</sup> Die sechste Koordinationsstelle des Eisenatoms wird im Ruhezustand durch ein Wassermolekül besetzt. Erst durch Bindung eines Substrates in der Bindungstasche kommt es zur Verdrängung des Wassermoleküls und nachfolgender Bindung eines Sauerstoffmoleküls, das für die oxidative Verstoffwechslung benötigt wird.



**Abb. 3** Häm-Domäne von CYP-Enzymen mit einem Eisen-Protoporphyrin-IX-Gerüst als prosthetische Gruppe.

Namensgebend für diese Enzymfamilie war die Entdeckung von Pigmenten in Ratten-Lebermikrosomen, die ein Kohlenmonoxid-Differenzspektrum von 450 nm zeigten<sup>37</sup> und später als Cytochrome identifiziert wurden.<sup>38</sup> CYP-Enzyme besitzen im

reduzierten Zustand durch Komplexbildung von Kohlenmonoxid als sechsten Liganden ein typisches Absorptionsmaximum bei 450 nm, das aufgrund der Thiolatgruppe einzigartig für Eisen(II)-protoporphyrin-haltige Häm-Proteine ist. Andere Häm-Proteine zeigen dagegen ein charakteristisches Maximum bei 420 nm.

Während das Porphyringerüst bei allen CYP-Isoenzymen identisch ist (Abb. 3), unterscheiden sie sich in der Struktur ihres Apoproteins. Auf dieser Unterscheidung beruht die heutige Klassifikation der Isoenzyme. Die Einteilung in Familien und Unterfamilien erfolgt gemäß der Homologie der Aminosäuresequenz.<sup>39</sup> Beträgt die Sequenzhomologie über 40 %, gehören die Häm-Proteine zur selben Genfamilie. Sequenzen, die zu über 55 % identisch sind, werden der gleichen Unterfamilie zugeordnet. So steht beispielsweise bei CYP1A2 das mit Großbuchstaben geschriebene Kurzwort CYP für das Cytochrom-P450-Enzym, die Ziffer 1 für die Familie und der Großbuchstabe A für die Unterfamilie. Die letzte Zahl definiert das Gen, das für das jeweilige Isoenzym codiert.<sup>40</sup> Beim Menschen sind ca. 57 Isoenzyme bekannt (Tab. 2), die in 18 Familien und 43 Subfamilien unterteilt werden.<sup>41</sup> Während die Familien 1-3 vorwiegend für den Metabolismus von exogenen Substanzen (Xenobiotika) verantwortlich sind, katalysieren die mit höheren Ziffern versehenen Familien die Biosynthese von endogenen Substanzen wie Eicosanoide, Fettsäuren, Steroide und Vitamine (Tab. 2).<sup>42</sup>

**Tab. 2** Einteilung der humanen CYP-Enzyme nach Substratklassen.<sup>42</sup>

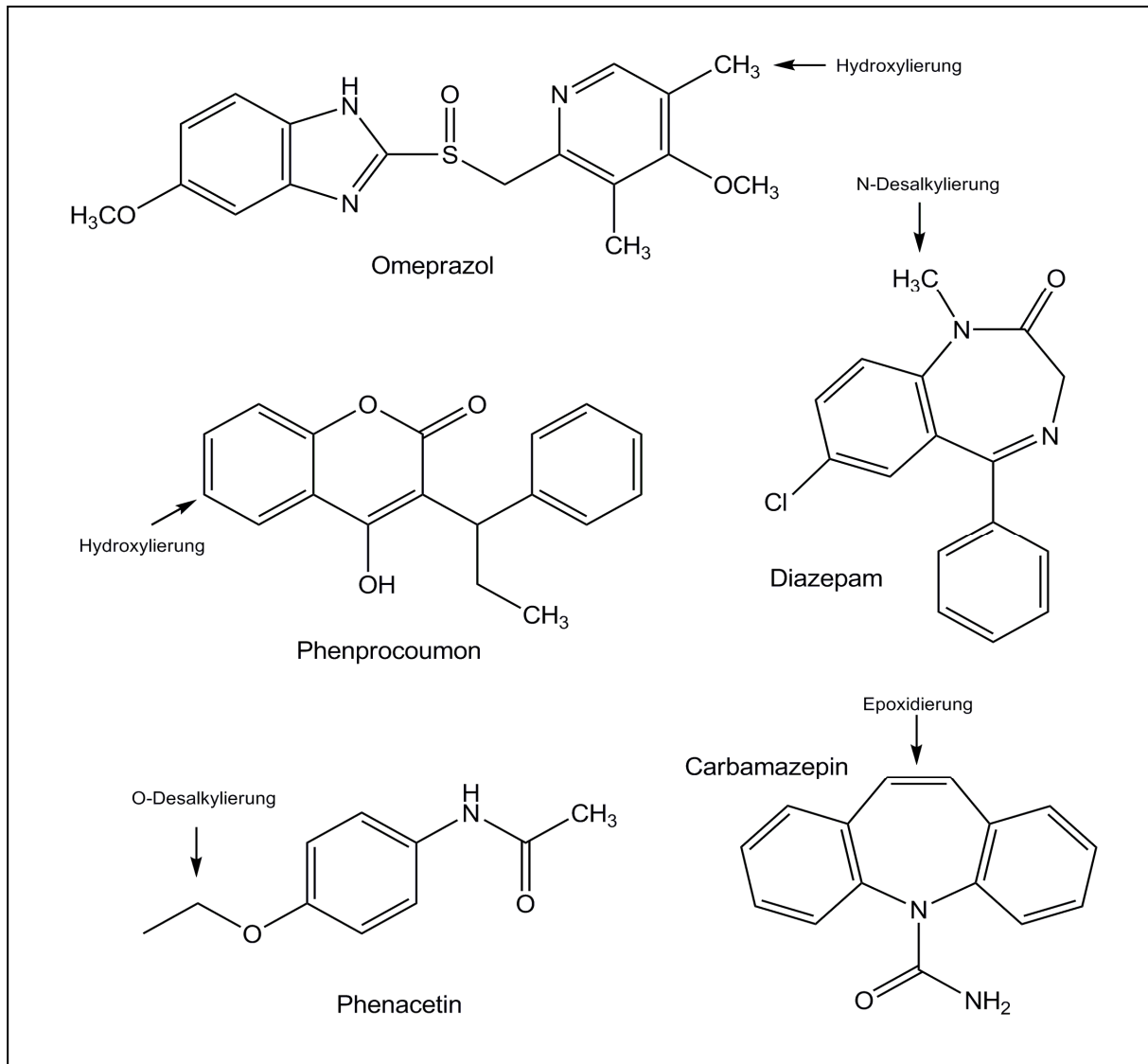
<b>Xenobiotika</b>	<b>Eicosanoide</b>	<b>Fettsäuren</b>	<b>Steroide</b>	<b>Vitamine</b>	<b>unbekannt</b>
1A1	4F2	2J2	1B1	2R1	2A7
1A2	4F3	4A11	7A1	24A1	2S1
2A6	4F8	4B1	7B1	26A1	2U1
2A13	5A1	4F12	8B1	26B1	2W1
2B6	8A1		11A1	26C1	3A43
2C8			11B1	27B1	4A22
2C9			11B2		4F11
2C18			17A1		4F22
2C19			19A1		4V2
2D6			21A2		4X1
2E1			27A1		4Z1
2F1			39A1		20A1
3A4			46A1		27C1
3A5			51A1		
3A7					

CYP-Enzyme besitzen hauptsächlich Monooxygenase-Eigenschaften, wobei ein Sauerstoff-Atom aus molekularem Sauerstoff auf die zu metabolisierende Substanz übertragen wird und gleichzeitig das andere unter Wasserbildung reduziert wird (Abb. 4). Aufgrund der Übertragung von einem Sauerstoff-Atom auf das Substrat (Oxidation) und Reduktion des anderen Sauerstoffatoms werden die CYP-Enzyme auch als mischfunktionelle Oxidasen bezeichnet. Die für diese Reaktion notwendigen Elektronen werden von dem Cosubstrat Nicotinamid-Adenindinucleotidphosphat (NADPH) bereitgestellt.



**Abb. 4** Allgemeine Summenformel der Monooxygenase-Reaktion von CYP-Enzymen.

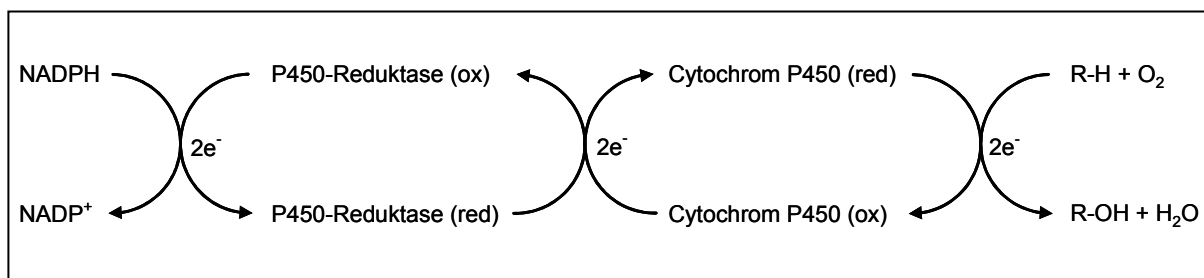
Durch die Einführung eines Sauerstoffatoms kommt es überwiegend zu aliphatischen und aromatischen Hydroxylierungen, Epoxidierungen von Aromaten und Alkenen, N- und S-Oxidationen, N-Hydroxylierungen sowie zu O-, N- und S-Desalkylierungen (Abb. 5).<sup>36</sup>



**Abb. 5** Beispiele für CYP-Enzym-katalysierte Reaktionen ausgewählter Arzneistoffe.

Für die Oxidation werden zwei Elektronen benötigt (Abb. 6). Da aber CYP-Enzyme nur Ein-Elektronenakzeptoren darstellen und das Cosubstrat NADPH zwei Elektronen liefert, werden die Elektronen mit Hilfe der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase schrittweise auf die CYP-Enzyme übertragen. Die NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase ist ein ebenfalls im endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes Flavoprotein, das je ein Molekül Flavinadeninucleotid (FAD) und Flavinmononucleotid (FMN) als prosthetische Gruppe enthält und durch NADPH, jedoch nicht NADH (Nicotinamid-Adenindinucleotid), reduziert werden kann. NADPH überträgt die Elektronen auf das FAD-Molekül, das als Elektronenakzeptor des Flavoproteins fungiert. Die Übertragung der Elektronen an das Häm des CYP-Enzyms erfolgt durch die FMN-Gruppe (Elektronendonator). Da jedoch das Häm ein Ein-Elektronen-

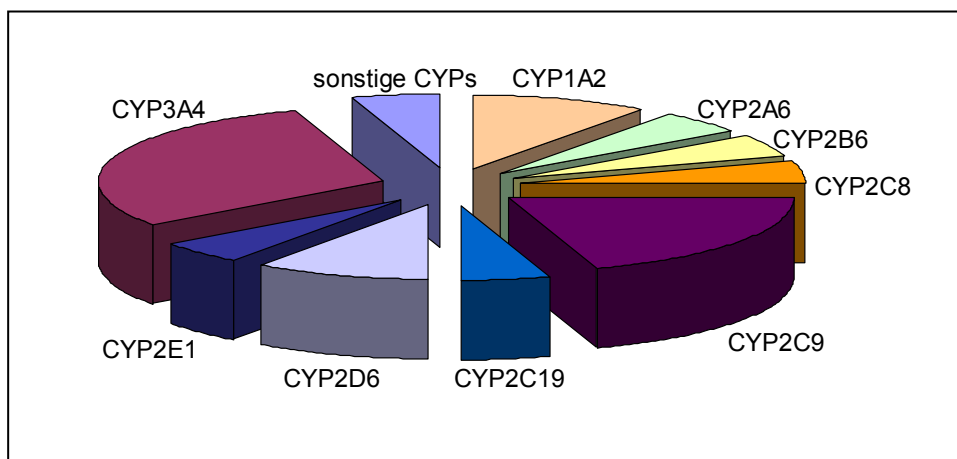
akzeptor darstellt, können die Elektronen nicht gleichzeitig an das Häm des CYP-Enzyms übertragen werden. Die Übertragung des zweiten Elektrons auf das CYP-Enzym ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Oxygenierung und kann auch über Cytochrom  $b_5$  erfolgen,<sup>43</sup> das ebenfalls an der Membran des endoplasmatischen Retikulums gebunden ist. Diskutiert wird die Bildung eines heterodimeren Komplexes zwischen Cytochrom  $b_5$  und den CYP-Enzymen, wodurch zwei Elektronen gleichzeitig von der P450-Reduktase auf diesen Komplex übertragen werden können.<sup>44</sup> Cytochrom  $b_5$  kann abhängig vom CYP-Isoenzym einen stimulierenden Effekt auf die Oxygenierung ausüben<sup>45</sup> und wird bei einigen heterolog exprimierten Isoenzymen neben der notwendigen NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase co-exprimiert, um eine Aktivitätssteigerung zu bewirken.



**Abb. 6** Mechanismus der Elektronenübertragung bei CYP-abhängigen Monooxygenasen.<sup>46</sup>

Während die CYP-Enzyme, die an der Biosynthese und Metabolisierung endogener Verbindungen beteiligt sind, eine sehr hohe Substratspezifität aufweisen, besitzen die für den Fremdstoffmetabolismus verantwortlichen Isoenzyme nur eine geringe Substratspezifität. In vielen Fällen wird ein Arzneistoff durch mehrere Isoenzyme unterschiedlich stark verstoffwechselt. Dennoch gibt es einige wenige Substanzen, deren Metabolismus fast ausschließlich durch ein einzelnes Isoenzym erfolgt, so dass die Reaktion absolut spezifisch für ein bestimmtes CYP-Enzym ist. Diese Substratspezifität wird für das *In-vivo*-Phenotyping hinsichtlich der metabolischen Kapazität eines Patienten ausgenutzt. Hierfür wird häufig ein Arzneistoff oder eine Mischung aus Arzneistoffen verabreicht und anschließend z. B. im Blutplasma oder im Urin der entsprechende Metabolit quantitativ bestimmt.

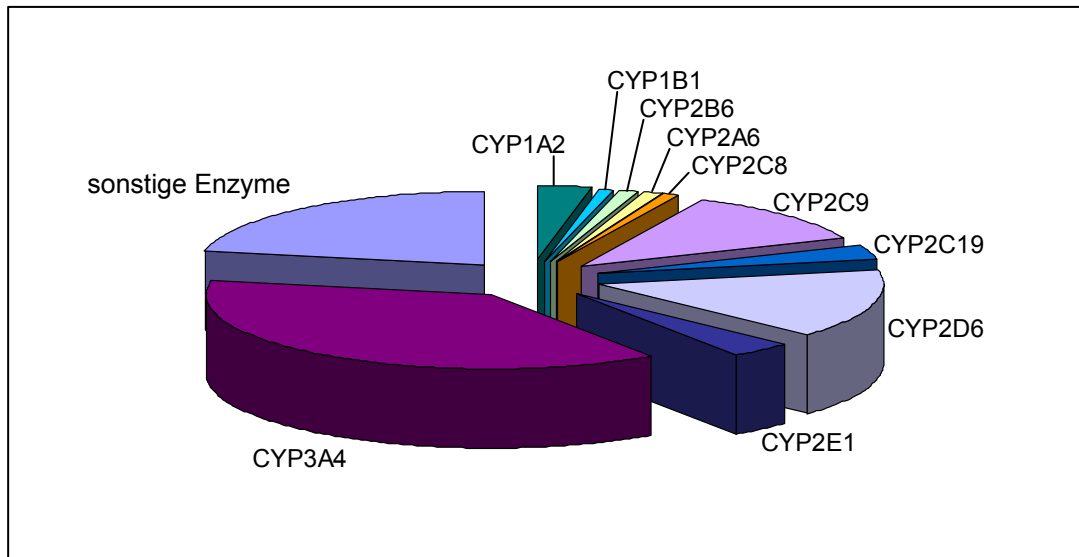
Die menschliche Leber ist das Organ mit dem höchsten Anteil an den am Arzneistoffwechsel beteiligten Cytochrome-P450 (CYP)-Enzymen und enthält 90-95 % aller CYP-Enzyme.<sup>47</sup> Ungefähr 70 % der CYP-Enzyme entfallen auf die Familien CYP1 bis 3,<sup>48</sup> die hauptsächlich an der Biotransformation von Xenobiotika beteiligt sind. Während das Cytochrom-P450-Enzym 3A4 (CYP3A4) mit etwa 30 % quantitativ den größten Anteil der CYP-Enzyme in der Leber stellt, repräsentieren die Isoenzyme CYP1A2 und CYP2D6 jeweils ca. 10 %, CYP2A6 etwa 4 %, CYP2B6 bis zu 5 %, die Unterfamilie 2C (2C8, 2C9, 2C19) ca. 30 % und CYP2E1 5 % des Gesamtgehaltes an CYP-Enzymen (Abb. 7).<sup>48,49</sup> Diese Zahlen unterliegen jedoch starken interindividuellen Schwankungen, was vor allem auf Gen-Mutationen und die Induzierbarkeit einiger Isoenzyme zurückzuführen ist.



**Abb. 7** Anteile einzelner CYP-Enzyme am Gesamtgehalt der CYP-Enzyme der Leber.<sup>48,49</sup>

Die größte Bedeutung für die Biotransformation von Arzneistoffen kommt dem CYP3A4 zu, das schätzungsweise ca. 40 % aller therapeutisch eingesetzten Arzneistoffe verstoffwechselt (Abb. 8).<sup>49</sup> Des Weiteren sind CYP2D6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 und CYP1A2 zu einem erheblichen Anteil an der Biotransformation von wichtigen Arzneistoffen beteiligt. Somit werden über 75 % aller Arzneistoffe in Phase I der Biotransformation durch die Isoenzyme 1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 verstoffwechselt (Abb. 8),<sup>49</sup> so dass sich die Untersuchungen hinsichtlich pharmakokinetischen Wechselwirkungen meist auf diese wichtigen Isoenzyme beschränken.





**Abb. 8** Beteiligung der CYP-Enzyme am Phase-I-Metabolismus aller auf dem Markt befindlichen Arzneimittel.<sup>49</sup>

Während bisher nur wenige Arzneistoffe identifiziert wurden, bei denen CYP2B6 wesentlich zum Metabolismus beiträgt, ist dieses Enzym vor allem für die Bioaktivierung der Zytostatika Cyclophosphamid und Ifosphamid<sup>50</sup> sowie für den Metabolismus von Methadon<sup>51</sup> und Bupropion<sup>52</sup> verantwortlich. Da diese Arzneimittel eine geringe therapeutische Breite aufweisen, ist in Interaktionsstudien eine Untersuchung der Beeinflussung von CYP2B6 sinnvoll. Die Rolle von CYP2A6 und CYP2E1 in der Biotransformation von Arzneistoffen erscheint dagegen eher gering. Während CYP2E1 die Oxidation von Ethanol katalysiert und toxisch relevante Substanzen wie Anilin zu p-Aminophenol umsetzt,<sup>53</sup> ist CYP2A6 beispielsweise für die Hydroxylierung von Cumarin zu 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon) und von Nicotin zu *trans*-5'-Hydroxynicotin, das durch eine Aldehydoxidase weiter zu Cotinin verstoffwechselt wird, verantwortlich.<sup>54</sup> Interessanterweise konnte humanes CYP2A6 in Tabakpflanzen heterolog exprimiert werden, wodurch in der transgenen Pflanze ebenfalls der Metabolit Cotinin nachgewiesen werden konnte.<sup>55,56</sup>

### **Cytochrom-P450-3A4 (CYP3A4)**

CYP3A4 nimmt eine Sonderstellung unter den CYP-Enzymen ein, da dieses, wie oben bereits erwähnt das wichtigste, am Arzneistoffmetabolismus beteiligte CYP-Enzym darstellt. Es besitzt ein breites Substratspektrum, da sowohl relativ kleine Substanzen wie Paracetamol (Molekulargewicht: 151) als auch große wie Ciclosporin

(Molekulargewicht: 1203) verstoffwechselt werden. Außer in den Hepatozyten wird CYP3A4 auch in nennenswerten Konzentrationen in den Enterozyten des Dünndarms exprimiert und ist mit mehr als 70 % der dort befindlichen CYP-Enzyme maßgeblich am enteralen First-Pass-Metabolismus von Arzneistoffen beteiligt.<sup>57</sup> Damit lässt sich auch die geringe orale Bioverfügbarkeit von vielen CYP3A4-Substraten begründen, wobei ein so genanntes „dynamisches Zwischenspiel“ zwischen CYP3A4 und dem Effluxtransporter P-Glykoprotein (P-gp) in den Enterozyten erheblich dazu beiträgt.<sup>58</sup> Während das Transportprotein P-gp die Substanz immer wieder aus den Zellen zurück in das Darmlumen pumpt, verstoffwechselt CYP3A4 den verbleibenden Rest. So zeigen einige Arzneistoffe, wie z. B. Ciclosporin oder Saquinavir, die sowohl Substrat für CYP3A4 als auch für P-gp sind, eine extrem geringe orale Bioverfügbarkeit.

### **Polymorphe CYP-Enzyme**

Bei den Isoenzymen CYP2D6, CYP2C9 und CYP2C19 treten genetische Polymorphismen mit klinischer Relevanz auf, d. h. die Häufigkeit für das Auftreten in der Bevölkerung beträgt mehr als 1 %. Polymorphismus bezeichnet das Phänomen, dass Enzyme interindividuell durch Gendefekte, Gen-Duplikationen oder -Deletionen in ihrer Aktivität teilweise sehr stark variieren. Je nach Mutation des entsprechenden Enzyms werden Arzneimittel interindividuell unterschiedlich schnell metabolisiert, so dass sowohl extrem hohe als auch sehr niedrige Plasmaspiegel resultieren können. Die meisten Polymorphismen basieren auf einem Austausch einer einzelnen Base in der für das Isoenzym kodierenden DNA („single nucleotide polymorphism“, SNP), wobei folglich bei dem Enzymprotein eine Aminosäure ausgetauscht wird. Dies kann abhängig von der Position der ausgetauschten Aminosäure zu einer verminderten Affinität zu den Substraten bzw. zu einer verminderten Umsatzgeschwindigkeit führen. Von großer Bedeutung für den Arzneistoffmetabolismus ist, in wieweit beide Allele des Individuums von der Mutation betroffen sind. Träger von zwei Wildtyp-Allelen werden als schnelle („extensive“) bzw. normale Metabolisierer bezeichnet. Bei Mutationen von nur einem Allel wird von einem heterozygoten Träger bezüglich des Polymorphismus gesprochen. Demnach werden heterozygote Träger, die eine verminderte Enzymaktivität aufweisen, als „intermediate“ Metabolisierer bezeichnet. Weisen jedoch beide Allele Veränderungen auf, handelt es sich um einen homozygoten Träger des Polymorphismus, der bei erheblichen Funktionsverlusten

des Enzyms als langsamer Metabolisierer („poor“) bezeichnet wird. Des Weiteren können auch Gen-Duplikationen auftreten, die zu einer stark erhöhten Aktivität des Enzyms führen. Substrate des betreffenden Enzyms werden somit sehr schnell („ultrarapid“) metabolisiert.

Für CYP2C9 sind zwei Mutationen (CYP2C9\*2, CYP2C9\*3) klinisch relevant und gehen mit Funktionsverlusten des Isoenzym einher (Tab. 3). Im Vergleich zum Wildtyp-Allel CYP2C9\*1 führen die Allelvarianten \*2 und \*3 zu einem Austausch von Arginin durch Cystein an Position 144 bzw. Isoleucin durch Leucin an Position 359, was eine verminderte Aktivität von CYP2C9 zur Folge hat (Tab. 3).<sup>59</sup> Etwa 1-3 % der deutschen Bevölkerung sind homozygote Träger bezüglich CYP2C9\*2 oder \*3 und weisen für Substrate wie Celecoxib, Phenytoin, Fluvastatin oder Phenprocoumon eine erniedrigte Clearance auf.<sup>60</sup>

**Tab. 3** Klinisch relevante Polymorphismen von CYP2C9.<sup>59</sup>

<b>Allelvariante</b>	<b>Mutation</b>	<b>Konsequenz</b>
CYP2C9*1	Wildtyp	
CYP2C9*2	<i>Arg 144 Cys</i>	Verminderte Affinität zur P450-Reduktase
CYP2C9*3	<i>Ile 359 Leu</i>	Verminderte Affinität zum Substrat

Circa 2-5 % der deutschen Bevölkerung sind als langsame Metabolisierer für CYP2C19 bekannt. Bereits im Jahre 1984 konnte durch die Gabe des Antiepileptikums Mephenytoin bei einigen Patienten aufgrund erheblicher Nebenwirkungen ein Polymorphismus festgestellt werden.<sup>61</sup> Bei CYP2C19 wurden bisher zwei klinisch relevante Allelmutationen (CYP2C19\*2 und \*3) identifiziert, welche zu einer herabgesetzten Enzymaktivität führen.<sup>62</sup> Bei homozygoten Trägern der Allele \*2 bzw. \*3, die als langsame Metabolisierer bezeichnet werden, sind die Metabolisierungsrate und somit die Clearance von CYP2C19-Substraten wie beispielsweise Diazepam deutlich erniedrigt.<sup>62</sup> Bei der Eradikation von *Helicobacter pylori* mit Antibiotika (z. B. Amoxicillin und Clarithromycin) in Kombination mit Protonenpumpenhemmern, wie z. B. Omeprazol, weisen die Träger dieser Polymorphismen jedoch eine höhere Eradikationsrate auf.<sup>63</sup> Der Arzneistoff Omeprazol, der zu über 80 % von CYP2C19 verstoffwechselt wird, erreicht bei Patienten mit langsamem CYP2C19-Metabolismus sehr viel höhere Plasmakonzentrationen und

AUC-Werte als bei Patienten mit normaler CYP2C19-Aktivität, wodurch sich aufgrund des höheren Magen-pH-Wertes die Heilungsrate bei *Helicobacter pylori* Infektionen verbessert.

Am besten untersucht ist der CYP2D6-Polymorphismus, der durch eine große Variabilität zu ganz unterschiedlich aktiven Isoenzymen führt. Mitte der 70er-Jahre wurde der damals so genannte Spartein/Debrisoquin-Polymorphismus entdeckt. Bei der Therapie von Patienten mit den Arzneistoffen Spartein und Debrisoquin traten interindividuell verschiedene Nebenwirkungen auf, die unterschiedliche Metabolisierungsraten der Arzneistoffe vermuten ließen.<sup>64,65</sup> Bei ca. 5-10 % der deutschen Bevölkerung wird das Enzym nicht exprimiert, d. h. diese Individuen gehören zu den langsamen Metabolisierern.<sup>66</sup> Während etwa 10 % der Bevölkerung eine herabgesetzte CYP2D6-Aktivität („intermediate“) besitzen, weisen 1 bis 5 % aufgrund einer Genduplikation eine stark erhöhte Aktivität des CYP2D6-Isoenzym auf und werden demnach als ultraschnelle Metabolisierer bezeichnet. Substrate für CYP2D6 sind unter anderem Codein, Dextromethorphan sowie Wirkstoffe aus den Arzneimittelklassen der trizyklischen Antidepressiva,  $\beta$ -Blocker und Antiarrhythmika.

### 2.2.2.3 Induktion und Inhibition von CYP-Enzymen

Eine Vielzahl von Arzneistoffen wird über das CYP-Enzymsystem metabolisiert, so dass die pharmakologische Wirkung der meisten Arzneistoffe in erheblichem Maße von der Expression und Aktivität der CYP-Enzyme abhängt. Neben den Faktoren wie genetische Polymorphismen, Alter, Geschlecht oder Rasse spielen die Induktion und Inhibition durch Xenobiotika für die Expression bzw. für die Aktivität der CYP-Enzyme eine große Rolle.

#### **Induktion**

Bei der Induktion von CYP-Enzymen werden vermehrt Enzyme gebildet, wobei die Induktoren über Interaktionen mit intrazellulären Rezeptoren (Transkriptionsfaktoren) die Expression der Enzyme steigern. Der wichtigste Rezeptor ist hierbei der Pregnan-X-Rezeptor (PXR), über den unter anderem die Expression von CYP3A4 und P-gp gesteuert wird. Die Folge der Induktion von CYP-Enzymen ist ein beschleunigter Metabolismus, was in einer verkürzten Wirkdauer resultiert oder

sogar einen Verlust der Wirkung des entsprechenden Arzneistoffes zur Folge haben kann. Die Substanzen Phenobarbital und Rifampicin induzieren die CYP-Enzyme 2B6, 3A4 und die Unterfamilie 2C, aber auch Lebens- und Genussmittel können eine Induktion von CYP-Enzymen hervorrufen. Zum Beispiel induzieren gegrilltes Fleisch oder Kohlgemüse das Isoenzym CYP1A2. In Tab. 4 sind weitere Beispiele von Induktoren verschiedener CYP-Isoenzyme aufgeführt, unter anderem Johanniskraut-extrakt, welcher bei längerer Einnahme die Expression von CYP3A4 induziert (siehe I.2.2.3 Phytopharmaka-Wechselwirkungen).

### **Inhibition**

Für klinisch relevante Arzneimittelinteraktionen ist zumeist eine Inhibition der am Arzneistoffmetabolismus beteiligten CYP-Enzyme verantwortlich. Die Hemmung von CYP-Enzymen kann eine Verlängerung und Steigerung der Wirkung von Pharmaka hervorrufen. Diese Arzneimittelinteraktionen sind vor allem bei Arzneistoffen mit einer geringen therapeutischen Breite von Bedeutung, da bei diesen Substanzen toxische und therapeutische Plasmakonzentrationen nahe beieinander liegen und so ein höherer Plasmaspiegel zu schwerwiegenden oder gar lebensbedrohlichen Zwischenfällen führen kann.

Man unterscheidet verschiedene Mechanismen der Enzyminhibition, von denen *in vivo* die irreversible Inhibition von besonderer Bedeutung ist. Die irreversible Inhibition führt zu einer Inaktivierung und zu einem völligen Aktivitätsverlust der betroffenen Enzyme. Erst durch Neusynthese kann die Aktivität der Enzyme wieder hergestellt werden, was in der Regel 1-3 Tage beansprucht. Zu den sehr starken irreversiblen Hemmstoffen gehören die mechanismusbasierten Inhibitoren, wie z. B. Furafyllin (CYP1A2) oder Bergamottin (CYP1A2/2B6/3A4). Hierbei wird der Hemmstoff im aktiven Zentrum des Enzyms in einen reaktiven Metaboliten umgewandelt und bindet irreversibel (kovalent) an das Enzym. Diese Hemmstoffe werden deswegen auch als Suizid-Substrate bezeichnet und haben eine hohe Affinität zum jeweiligen Enzym. Eine weitere sehr starke Hemmung von CYP-Enzymen zeigen die so genannten „tight-binding-inhibitors“, wie z. B. die Azol-Antimykotika Ketoconazol und Itraconazol. Sie koordinieren als sechster Ligand das Eisenatom im aktiven Zentrum und bilden eine hochaffine Bindung aus; in diesem Fall spricht man von einer quasi-irreversiblen Hemmung. Die Hemmung eines Enzyms kann aber auch durch die Konkurrenz zweier oder mehrerer Arzneistoffe um

die gleiche Bindungsstelle des metabolisierenden Enzyms erfolgen, d. h. eine gleichzeitige Einnahme z. B. von den CYP3A4-Substraten Simvastatin und Erythromycin kann zu höheren Plasmaspiegeln und folglich zu einer Wirkungsverstärkung führen. Generell sind somit alle Substrate von CYP-Enzymen auch kompetitive Hemmstoffe der entsprechenden Enzyme. Einige Beispiele von Substraten und Inhibitoren von CYP-Enzymen sind in Tab. 4 aufgeführt.

Ein bekanntes Beispiel für Arzneimittelwechselwirkungen, die auf der Inhibition Arzneistoff-metabolisierender CYP-Enzyme beruhen, sind Interaktionen mit dem H<sub>1</sub>-Antihistaminikum Terfenadin. Der Wirkstoff wurde in den USA vom Markt genommen und in Deutschland wieder unter Verschreibungspflicht gestellt, da der Arzneistoff durch die Beeinflussung des Metabolismus lebensbedrohliche Nebenwirkungen zeigt und dadurch ein ausgeprägtes, klinisch relevantes Interaktionspotential besitzt.<sup>67</sup> Terfenadin wird über CYP3A4 verstoffwechselt. Bei gleichzeitiger Gabe von CYP3A4-Hemmstoffen wie beispielsweise Makrolid-Antibiotika (Erythromycin) oder Azol-Antimykotika (Ketoconazol) kommt es zum Anstieg des Terfenadin-Plasmaspiegels, was zu lebensgefährlichen bis tödlichen Herzrhythmusstörungen (*Torsade de pointes*) führen kann.<sup>68</sup> Auch das Prokinetikum Cisaprid wurde wegen klinisch relevanter Arzneimittelinteraktionen bei gleichzeitiger Einnahme von CYP3A4-Inhibitoren mit zum Teil lebensbedrohlichen kardialen Zwischenfällen zurückgezogen.<sup>68</sup>

Der Calciumkanalblocker Mibefradil wurde kurz nach der Zulassung aufgrund des zu hohen Interaktionsrisikos wieder vom Markt genommen, da dieser Arzneistoff ein sehr potenter mechanismusbasierter Hemmstoff von CYP3A4 ist und somit die Konzentration aller Arzneistoffe erhöht, die über dieses Enzymsystem verstoffwechselt werden.<sup>69</sup> Die gleichzeitige Gabe von HMG-CoA-Reduktasehemmern führte zu schweren myotoxischen Nebenwirkungen (Rhabdomyolysen) und auch in Kombination mit  $\beta$ -Blockern traten schwere Interaktionen auf.

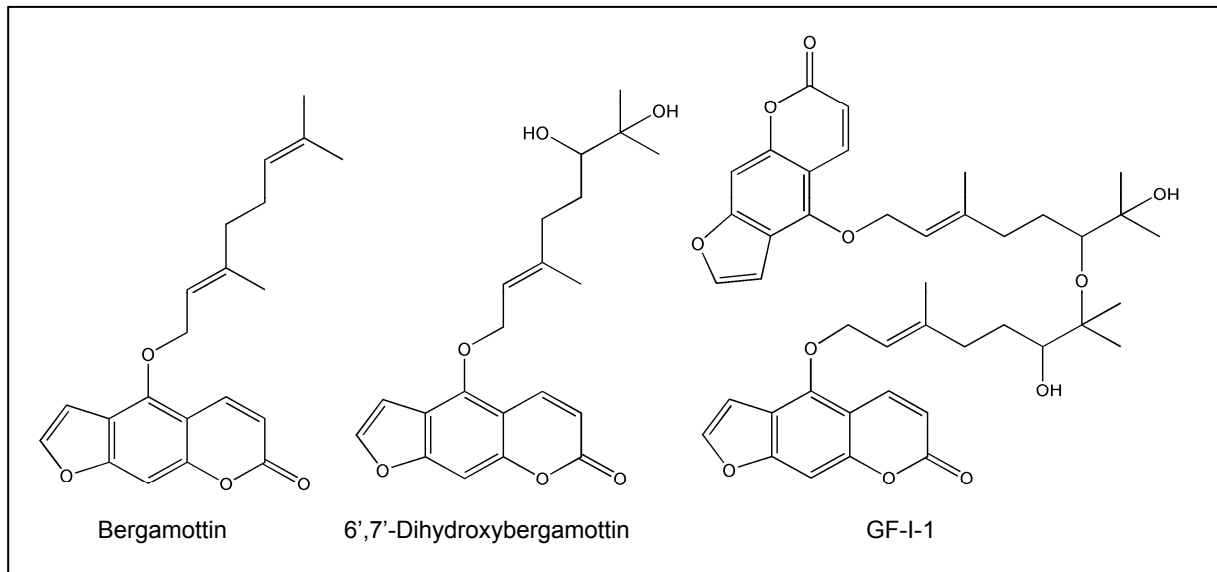
**Tab. 4** Beispiele für Substrate, Inhibitoren und Induktoren der wichtigsten am Arzneistoffmetabolismus beteiligten CYP-Enzyme.<sup>17,70</sup>

<b>Isoenzym</b>	<b>Substrat</b>	<b>Inhibitor</b>	<b>Induktor</b>
CYP1A2	Coffein Naproxen Phenacetin Tacrin Tizanidin Theophyllin	Ciprofloxacin Fluvoxamin Furafyllin	Carbamazepin Omeprazol gegrilltes Fleisch Kohlgemüse Tabakrauch
CYP2A6	Cumarin Nicotin	Tranlycypromin	
CYP2B6	Bupropion Cyclophosphamid Evafirenz Ifosphamid Methadon	Clopidogrel Ticlopidin	Phenobarbital Rifampicin
CYP2C8	Amodiaquin Cerivastatin Paclitaxel Repaglinid Trimethoprim	Gemfibrozil Montelukast Quercetin	Rifampicin Phenobarbital Phenytoin
CYP2C9	Diclofenac Flurbiprofen Losartan Phenprocoumon Phenytoin Tolbutamid Warfarin	Sulfaphenazol Sufinpyrazon	Rifampicin Phenobarbital Phenytoin
CYP2C19	Imipramin Diazepam Mephenytoin Omeprazol Proguanil Voriconazol <sup>71</sup>	Tranlycypromin	Rifampicin Phenobarbital Phenytoin
CYP2D6	Amitriptylin Chlorpromazin Codein Dextromethorphan Imipramin Propranolol Propafenon	Chinidin Paroxetin	
CYP2E1	Chlorzoxazon Halothan	Disulfiram	Ethanol Isoniazid
CYP3A4	Alprazolam Ciclosporin Cisaprid Diazepam Diltiazem Erythromycin Indinavir Midazolam Nifedipin Saquinavir Simvastatin Tacrolimus Terfenadin Verapamil	Bergamottin Clarithromycin Erythromycin Itraconazol Ketoconazol Mibefradil Ritonavir Grapefruitsaft	Hyperforin Rifampicin Phenobarbital Phenytoin Carbamazepin Johanniskraut

### 2.2.3 Phytopharmaka-Wechselwirkungen

Das bekannteste und wohl wichtigste Beispiel für Arzneimittelinteraktionen mit Pflanzenextrakten ist Grapefruitsaft, der zwar therapeutisch nicht genutzt wird, aber als Lebensmittel klinisch relevante Arzneimittelinteraktionen zeigt. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* werden neben CYP1A2 und den Isoenzymen der Unterfamilie CYP2C vor allem CYP3A4 sehr potent gehemmt.<sup>72</sup> Die im Grapefruitsaft enthaltenen Furanocumarin-Derivate wie Bergamottin, 6',7'-Dihydroxybergamottin und GF-I-1 (Abb. 9) verursachen eine mechanismusbasierte Inhibition und sind hauptsächlich für die inhibitorische Aktivität verantwortlich.<sup>73</sup> Die Furanocumarine werden durch CYP3A4 in reaktive elektrophile Furanocumarin-Epoxide umgewandelt, welche irreversibel im aktiven Zentrum des Isoenzym binden können.<sup>74</sup> Die durch den Grapefruitsaft verursachte Hemmung von CYP3A4 findet hauptsächlich in den Epithelzellen des Duodenums statt, da erst bei Konsum von mehr als ca. drei Gläsern Saft pro Tag (ab etwa 600 ml) die verantwortlichen Inhaltsstoffe resorbiert werden und so den hepatischen Abbau von Arzneistoffen beeinflussen können.<sup>75</sup> Grapefruitsaft führt somit überwiegend zu einem starken Anstieg der Plasmaspiegel oral applizierter Arzneistoffe, die durch CYP3A4 einem hohen intestinalen First-Pass-Effekt unterliegen. *In vivo* konnten für zahlreiche Arzneistoffe, darunter Ciclosporin, Terfenadin, Nifedipin und den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Atorvastatin, Lovastatin) Arzneimittelwechselwirkungen mit Grapefruitsaft nachgewiesen werden.<sup>76</sup> Die Hemmung des CYP3A4-vermittelten intestinalen First-Pass-Effekts wird von manchen Experten auch als „Grapefruit-Effekt“ bezeichnet.





**Abb. 9** Strukturformeln von den in Grapefruitsaft enthaltenen Furanocumarin-Derivaten, die hauptsächlich für die mechanismusbasierte Inhibition von CYP3A4 verantwortlich sind.

Für zahlreiche Extrakte und deren Inhaltsstoffe von Arzneipflanzen wie Baldrian (*Valeriana officinalis*), Ginkgo (*Ginkgo biloba*), Goldenseal (*Hydrastis canadensis*), Johanniskraut (*Hypericum perforatum*), Kava-Kava (*Piper methysticum*), Kamille (*Matricaria recutita*), Knoblauch (*Allium sativum*), Mariendistel (*Sylibum marianum*), Purpursonnenhut (*Echinacea purpurea*), Salbei (*Salvia officinalis*), Süßholzwurzel (*Glycyrrhiza glabra*), Thymian (*Thymus vulgaris*), Rotklee (*Trifolium pratense*) und Weihrauch (*Boswellia serrata*) wird *in vitro* eine potente Inhibition verschiedener CYP-Enzyme beschrieben.<sup>3,77-84</sup> Auch in Tierversuchen (Ratte, Maus) wurden einige Pflanzenextrakte mit inhibitorischer Aktivität auf CYP-Isoenzyme identifiziert. Jedoch konnte bei nur sehr wenigen Pflanzenextrakten eine *In-vitro-in-vivo*-Korrelation hergestellt werden.

In einer Humanstudie wurde von einer Interaktion zwischen einem Knoblauchhaltigen Präparat und dem Protease-Inhibitor Saquinavir berichtet.<sup>85</sup> Nach Einnahme von Knoblauchkapseln über drei Wochen war die AUC von Saquinavir um 51 % reduziert und sogar nach einer 10-tägigen Auswaschphase ohne Einnahme des Präparates immer noch deutlich erniedrigt (30-40 %). Da Saquinavir ein CYP3A4-Substrat ist, lassen diese Daten eine Induktion von CYP3A4 vermuten, zumal in Untersuchungen an Ratten das im Knoblauch enthaltene Diallyldisulfid zu einer erhöhten Expression der Unterfamilie CYP3A führte.<sup>86</sup> Allerdings ist in dieser Studie

ein Knoblauchpräparat verwendet worden, das um ein Vielfaches höhere Konzentrationen der Allylsulfid-Derivate Alliin und Allicin aufwies, als vom Hersteller deklariert. Die gleichzeitige Einnahme eines anderen Knoblauchpräparates mit dem CYP3A4-Substrat Alprazolam und CYP2D6-Substrat Dextromethorphan führte dagegen zu keiner Interaktion.<sup>87</sup> Bei der Komedikation von Ritonavir mit einem Knoblauch-haltigen Präparat konnte lediglich eine klinisch nicht relevante Abnahme der AUC von 17 % beobachtet werden.<sup>88</sup>

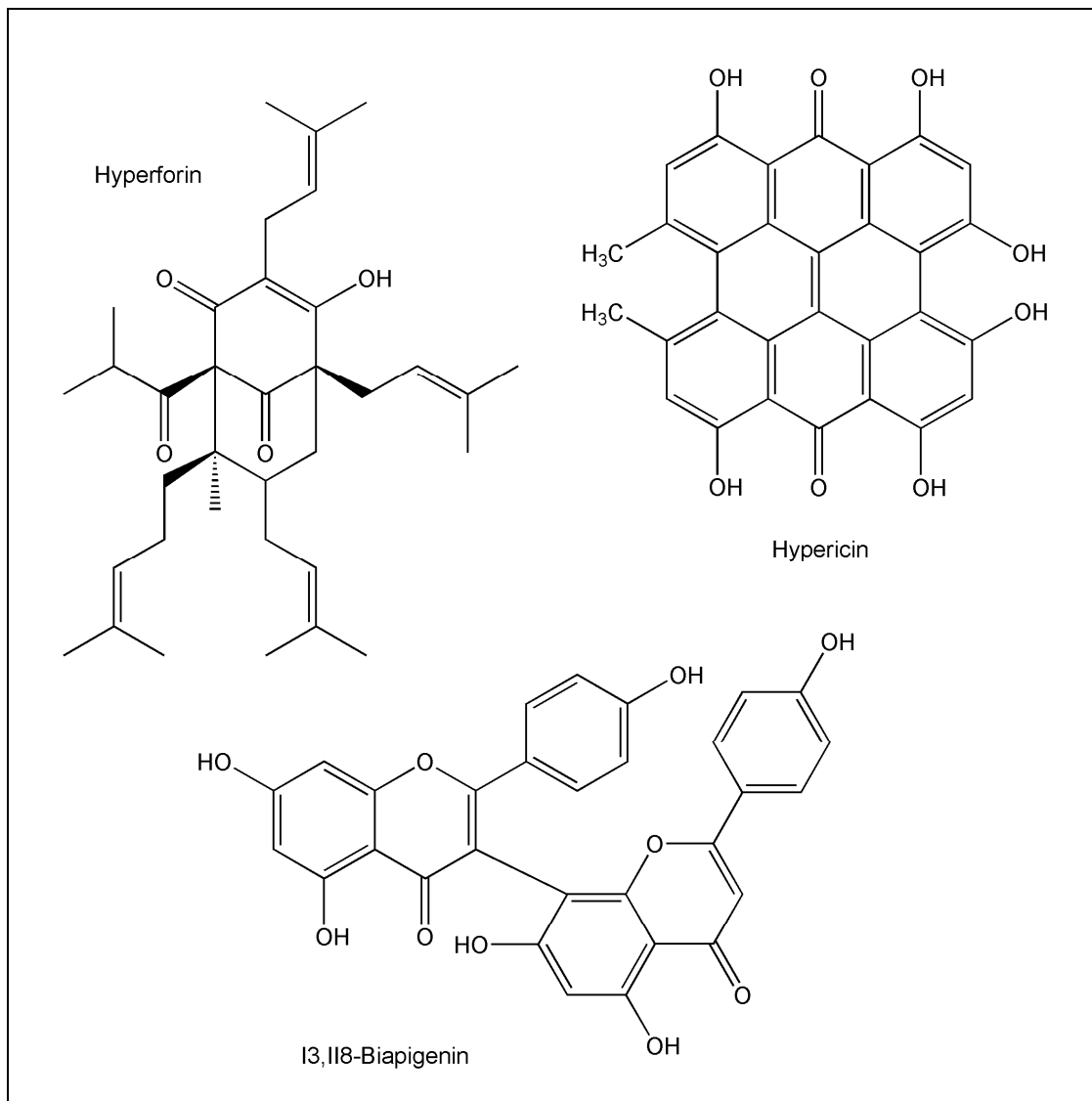
Die achttägige Einnahme eines *Echinacea-purpurea*-Wurzelextrakts zeigte einen schwachen Anstieg der AUC von Tolbutamid (CYP2C9-Substrat) und eine klinisch signifikante Erhöhung der AUC von Coffein (CYP1A2-Substrat), was auf eine Inhibition der entsprechenden CYP-Enzyme durch *Echinacea* hinweist.<sup>89</sup> Interessanterweise erhöhte sich zwar die orale Bioverfügbarkeit von Midazolam (CYP3A4-Substrat) bei gleichzeitiger Einnahme von *Echinacea purpurea*, jedoch blieb die AUC von Midazolam gleich. Zudem war die AUC von Midazolam bei intravenöser Applikation deutlich erniedrigt. Der Grund hierfür ist vermutlich eine Hemmung von CYP3A4 im Dünndarm entsprechend Grapefruitsaft, wohingegen hepatisch eine Induktion des entsprechenden Enzyms vorliegt.<sup>89</sup>

Klinisch relevante pharmakokinetische Wechselwirkungen konnten bisher jedoch nur bei *Hypericum perforatum*<sup>90</sup>, *Hydrastis canadensis*<sup>91,92</sup> und *Schisandra sphenanthera*<sup>93</sup> nachgewiesen werden.

### ***Hypericum perforatum***

Für Johanniskrautextrakte, besonders für deren Inhaltsstoffe Hypericin, Hyperforin und 13,118-Biapigenin (Abb. 10), konnte *in vitro* eine starke Hemmung von CYP-Enzymen ermittelt werden.<sup>94</sup> Von größerer Bedeutung und klinischer Relevanz ist aber die über den PXR-vermittelte Induktion von CYP3A4 und P-gp nach 1- bis 3-tägiger Einnahme von Johanniskrautextrakt, die zu erniedrigten Plasmaspiegeln von CYP3A4- und P-gp-Substraten führt.<sup>95,96</sup> Hauptverantwortlich hierfür ist der lipophile Inhaltsstoff Hyperforin (Abb. 10), der eine hohe Affinität zum PXR zeigt ( $K_i$ -Wert 27 nM).<sup>97</sup> In Interaktionsstudien mit *Hypericum*-Extrakten konnte gezeigt werden, dass Präparate mit einem hohem Gehalt an Hyperforin (>2 %) die AUC-Werte von CYP3A4- und P-gp-Substraten, darunter Digoxin<sup>98</sup>, Simvastatin<sup>99</sup>, Ciclosporin<sup>100</sup>, Tacrolimus<sup>101</sup> und Voriconazol<sup>102</sup>, klinisch signifikant senken konnten (25-62 %). Ein

Extrakt mit einem relativ niedrigen Hyperforin-Gehalt konnte dagegen die AUC von Alprazolam, Digoxin, Coffein und Tolbutamid nicht beeinflussen.<sup>103</sup> Bei der Einnahme von Johanniskrautextrakt sind also hauptsächlich pharmakokinetische Wechselwirkungen mit CYP3A4- und P-gp-Substraten durch Induktion zu erwarten.



**Abb. 10** Strukturformeln wichtiger Inhaltsstoffe des Johanniskraut-Extrakts.

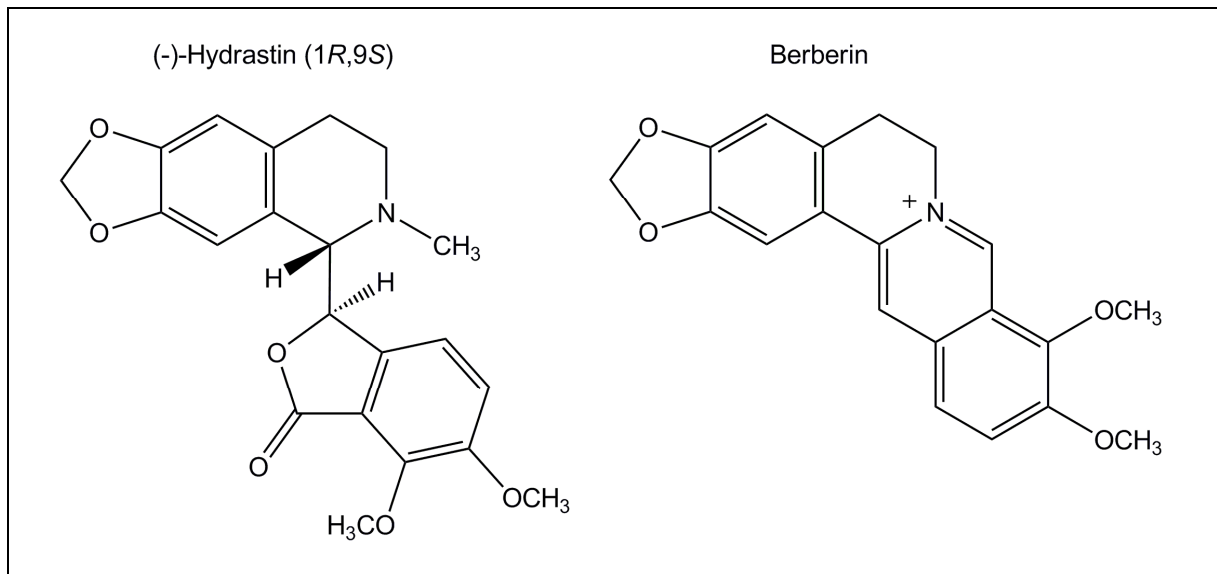
### ***Hydrastis canadensis***

Die Kanadische Gelbwurz (*Hydrastis canadensis*; engl. Goldenseal), beheimatet in Nordamerika, ist eine sehr selten gewordene Arzneipflanze und wird für die Heilmittelherstellung angebaut. Goldenseal-Wurzelextrakte sind in den USA sehr beliebt zur Prävention und Therapie von Infektionen aller Art, vor allem bei Erkältungen und grippalen Infekten. Die Arzneidroge gilt als hochwirksamer, natürlicher Entzündungshemmer und Stimulans für das menschliche Immunsystem. In Deutschland sind Hydrastis-Präparate vom Markt genommen worden, da der Inhaltsstoff Berberin (ca. 2-4 %, Abb. 11) durch Interkalation an die DNA binden kann und damit vermutlich eine krebserregende Wirkung besitzt.<sup>104</sup> Über das Internet können dennoch Goldenseal-Extrakte bezogen werden.

*In vitro* führten Goldenseal-Extrakte und deren Inhaltsstoffe Berberin und (-)-Hydrastin (Abb. 11) zu einer mechanismusbasierten Inaktivierung von CYP2D6 und CYP3A4. Der Grund hierfür ist eine enzymatische Oxidation der Methylendioxyfunktion von Hydrastin und Berberin (Abb. 11) zu einem Carben, welches das Fe<sup>2+</sup>-Atom im Häm pseudo-irreversibel komplexiert und somit mit dem Häm ein stabiles Addukt bildet.<sup>105</sup>

In einer Interaktionsstudie wurde der Einfluss von Goldenseal auf die Pharmakokinetik des Protease-Inhibitors und CYP3A4-Substrats Indinavir untersucht.<sup>106</sup> Nach 14-tägiger Einnahme eines Goldenseal-Präparates konnte jedoch keine statistisch signifikante Veränderung der maximalen Plasmakonzentration und der Halbwertszeit sowie der AUC von Indinavir beobachtet werden. Der Grund hierfür ist, dass Indinavir nur einen sehr geringen First-Pass-Metabolismus durch CYP3A4 im Dünndarm erfährt und eine relativ hohe orale Bioverfügbarkeit besitzt (ca. 65 %). Auch Grapefruitsaft, der vor allem die intestinale CYP3A4-Aktivität erniedrigt, konnte die Plasmakonzentration von Indinavir nicht beeinflussen.<sup>107</sup> Somit hemmt *Hydrastis canadensis* überwiegend die CYP3A4-Aktivität im Dünndarm, wobei die Inhibition von CYP2D6, das nur in sehr geringen Mengen im Dünndarm exprimiert wird, auf eine hepatische Beeinflussung hindeutet. In einer kürzlich veröffentlichten Interaktionsstudie wurde der Einfluss von Goldenseal auf das CYP3A4-Substrat Midazolam *in vivo* untersucht.<sup>91</sup> Die tägliche Einnahme von 3969 mg *Hydrastis-canadensis*-Wurzelextrakt über einen Zeitraum von 14 Tagen resultierte in einer 62 %igen Zunahme der AUC von Midazolam. In einer weiteren *In-vivo*-Studie wurde nach 28-tägiger Einnahme eines Goldenseal-

Präparates eine reduzierte Aktivität (ca. 40 %) von CYP2D6 und CYP3A4 festgestellt, wobei CYP1A2 und CYP2E1 nicht beeinflusst wurden.<sup>92</sup> Da Goldenseal somit *in vitro* und *in vivo* CYP2D6 und CYP3A4 hemmte, konnte für *Hydrastis canadensis*, wie bisher nur bei Grapefruitsaft, eine *In-vitro-in-vivo*-Korrelation gezeigt werden.



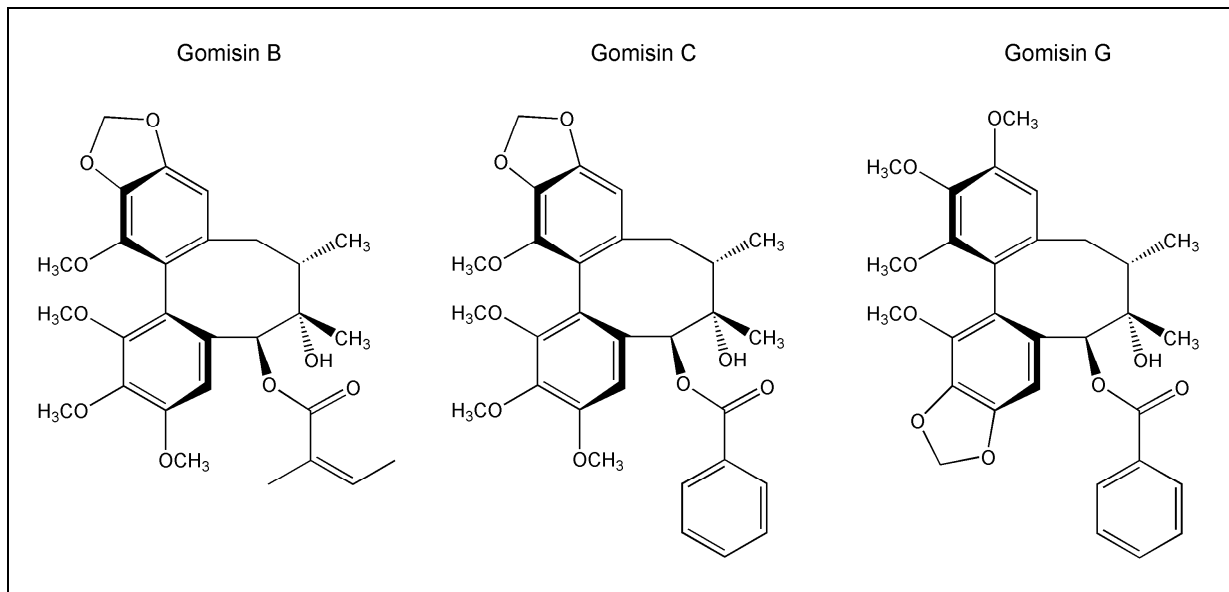
**Abb. 11** Strukturformeln der Methylenedioxy-Verbindungen, die hauptsächlich im Wurzelextrakt von *Hydrastis canadensis* enthalten sind.

### ***Schisandra sphenanthera***

In der traditionellen chinesischen Medizin (TCM), die sich in den letzten Jahren auch in Deutschland zunehmender Beliebtheit erfreut, werden Schisandrafrüchte als Aufbau- und Stärkungsmittel bei verschiedenen Schwächeformen verwendet. Die biologisch aktiven Inhaltsstoffe sind vor allem Lignane, die unter anderem leberprotektive und -regenerierende Eigenschaften besitzen sollen. Therapeutisch werden vorwiegend die getrockneten, reifen Früchte von zwei Arten, *Schisandra chinensis* und *Schisandra sphenanthera*, verwendet, die in der chinesischen Pharmakopoe als „Wu wei zi“ bezeichnet werden.

In einer *In-vitro*-Untersuchung konnten Lignane, darunter Gomisins B, C und G (Abb. 12), in *Schisandra chinensis*-Früchten identifiziert werden, die für die starke Inhibition von CYP3A4 durch den Extrakt verantwortlich sind.<sup>84</sup> Diese Lignane

besitzen eine Methylenedioxyfunktion und führen zu einer mechanismusbasierten Inaktivierung von CYP3A4. Entsprechend Hydrastin und Berberin (siehe *Hydrastis canadensis*) wird das  $\text{Fe}^{2+}$ -Atom im Häm durch das Carben, welches durch die enzymatische Oxidation der Methylenedioxyfunktion entsteht, pseudo-irreversibel komplexiert.<sup>105</sup>



**Abb. 12** Strukturformeln von in Schisandra-Früchten enthaltenen Lignane, die aufgrund ihrer Methylenedioxyfunktion CYP3A4 sehr stark inhibieren.

Auch für Schisandra-Früchte wurde eine *In-vitro-in-vivo-Korrelation* hergestellt. In einer erst kürzlich veröffentlichten Interaktionsstudie konnte gezeigt werden, dass ein Extrakt aus *Schisandra-sphenanthera*-Früchten den Metabolismus von Tacrolimus beeinflusst.<sup>93</sup> Tacrolimus, das als Immunsuppressivum bei Organtransplantationen eingesetzt wird, hat vor allem aufgrund des hohen intestinalen First-Pass-Effekts durch CYP3A4 und P-gp eine geringe orale Bioverfügbarkeit (ca. 25 %).<sup>108</sup> Der Extrakt aus *Schisandra-sphenanthera*-Früchten erhöhte die AUC von Tacrolimus um 164 %, was offensichtlich auf eine Inhibition von CYP3A4 und P-gp im Dünndarm zurückzuführen ist. Problematisch ist hierbei, dass erhöhte Plasmakonzentrationen von Tacrolimus sowie auch von Ciclosporin, ebenfalls ein CYP3A4- und P-gp-Substrat, zu einer irreversiblen Schädigung der Niere führen.

## Fazit

Phytopharmaka führten bei bestimmungsgemäßen Gebrauch bis heute nur sehr selten zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen sowie Arzneimittelinteraktionen und stellen demzufolge sichere und weitgehend nebenwirkungsfreie Arzneimittel dar.<sup>109</sup>

Die meisten Erkenntnisse zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen basieren auf mehr oder weniger gut dokumentierten Einzelfallberichten oder auf *In-vitro*-Untersuchungen. Die Inhibition bzw. die Induktion von Cytochrom-P450-Enzymen führte lediglich bei sehr wenigen Phytopharmaka wie Johanniskraut, Goldenseal und Schisandra zu klinisch relevanten Wechselwirkungen mit synthetischen Arzneimitteln (Tab. 5).<sup>110</sup> In verschiedenen Interaktionsstudien konnte gezeigt werden, dass eine Mehrzahl der Extrakte von Arzneipflanzen, darunter Weißdorn (*Crataegus oxyacantha*), Purpursonnenhut (*Echinacea purpurea*), Sibirischer Ginseng (*Eleutherococcus senticosus*), Ginkgo (*Ginkgo biloba*), Sägepalme (*Serenoa repens*) und Mariendistel (*Silybum marianum*) *in vivo* entweder keinen Einfluss hatten oder eine nur leichte, klinisch nicht relevante Abnahme der AUC verschiedener Arzneistoffe zeigten (Tab. 5).<sup>85,87,111-114</sup>

Trotzdem sollte bei der Einnahme von Phytopharmaka immer dann Vorsicht geboten sein, wenn gleichzeitig Arzneimittel mit einer engen therapeutischen Breite verabreicht werden, da das Risiko für das Auftreten von Arzneimittelwechselwirkungen bei Arzneistoffen, wie z. B. Ciclosporin, Theophyllin und Phenprocoumon, grundsätzlich sehr hoch ist.<sup>115</sup>

Tab. 5 Ausgewählte Beispiele von *In-vivo*-Interaktionsstudien mit Phytopharmaka.

Pflanzenextrakt	Dosis (mg/Tag)	Dauer (Tage)	N*	Komedikation	Effekt (%)
<i>Allium sativum</i> <sup>87</sup>	3600	14	14	Alprazolam Dextromethorphan	AUC ↓↑ AUC ↓↑
<i>Allium sativum</i> <sup>88</sup>	20	4	10	Ritonavir	AUC ↓ (17)
<i>Allium sativum</i> <sup>**85</sup>	1200	21	9	Saquinavir	AUC ↓ (51)
<i>Crataegus oxyacantha</i> <sup>111</sup>	900	21	8	Digoxin	AUC ↓ (7)
<i>Echinacea purpurea</i> <sup>89</sup>	1600	8	12	Coffein Dextromethorphan Midazolam (oral) Midazolam (iv) Tolbutamid	AUC ↑ (29) AUC ↓↑ AUC ↓↑ AUC ↓ (23) AUC ↑ (14)
<i>Eleutherococcus senticosus</i> <sup>112</sup>	970	14	12	Alprazolam Dextromethorphan	AUC ↓↑ AUC ↓↑
<i>Ginkgo biloba</i> <sup>114</sup>	240	14	12	Alprazolam Dextromethorphan	AUC ↓ (17) AUC ↓↑
<i>Hydrastis canadensis</i> <sup>106</sup>	2280	14	10	Indinavir	AUC ↓↑
<i>Hydrastis canadensis</i> <sup>91</sup>	3969	14	16	Midazolam	AUC ↑ (62)
<i>Hypericum perforatum</i> <sup>98</sup>	900	10	13	Digoxin	AUC ↓ (25)
<i>Hypericum perforatum</i> <sup>99</sup>	900	14	8	Simvastatin	AUC ↓ (62)
<i>Hypericum perforatum</i> <sup>100</sup>	600	14	11	Ciclosporin	AUC ↓ (46)
<i>Hypericum perforatum</i> <sup>101</sup>	900	18	10	Tacrolimus	AUC ↓ (34)
<i>Hypericum perforatum</i> <sup>102</sup>	900	15	16	Voriconazol	AUC ↓ (59)
<i>Hypericum perforatum</i> <sup>***103</sup>	240	10	28	Alprazolam Coffein Digoxin Tolbutamid	AUC ↓↑ AUC ↓↑ AUC ↓↑ AUC ↓↑
<i>Schisandra sphenanthera</i> <sup>93</sup>	67,5****	13	12	Tacrolimus	AUC ↑ (164)
<i>Serenoa repens</i> <sup>113</sup>	320	14	12	Alprazolam Dextromethorphan	AUC ↓↑ AUC ↓↑
<i>Silybum marianum</i> <sup>116</sup>	600	14	6	Irinotecan	AUC ↓↑
<i>Silybum marianum</i> <sup>117</sup>	480	14	10	Indinavir	AUC ↓↑
<i>Silybum marianum</i> <sup>118</sup>	525	21	10	Indinavir	AUC ↓ (9)

\*N: Probandenzahl; \*\*Extrakt mit hohen Gehalten an Alliin und Allicin; \*\*\*Extrakt mit niedrigem Hyperforin-Gehalt; \*\*\*\*Dosisangabe von Deoxyschizandrin im *S.-sphenanthera*-Extrakt



### Stellungnahme des BfArM

Da in den letzten Jahren Interaktionen zwischen pflanzlichen und synthetischen Arzneimitteln aufgrund von Einzelfallberichten und einer Vielzahl von Publikationen zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen haben, wurden von einigen Experten generell klinische Interaktionsstudien für Phytopharmaka gefordert. Während die Wechselwirkungen synthetischer Arzneistoffe mit CYP-Enzymen und P-gp sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch pharmakokinetische Studien sehr gut untersucht sind, gibt es bezüglich Interaktionen von Phytopharmaka mit CYP-Enzymen und P-gp nur wenige Untersuchungen. Anders als bei synthetischen Arzneimitteln waren bislang zur Zulassung von Phytopharmaka keine Untersuchungen zu ihrem Interaktionspotential vorgeschrieben. Angesichts der wissenschaftlichen Publikationen über das Interaktionspotential verschiedener Pflanzenextrakte sah das BfArM jedoch Handlungsbedarf und brachte einen Entwurf zur „Bewertung möglicher pharmakokinetischer Arzneimittelinteraktionen mit Phytopharmaka“ heraus. Hersteller von pflanzlichen Arzneimitteln werden nunmehr dazu verpflichtet, Pflanzenextrakte auf eine Hemmung oder Verstärkung des Arzneistoffmetabolismus zu untersuchen, sollten sich aus Fallberichten oder Literaturdaten Anhaltspunkte für mögliche Interaktionen ergeben; bei Neuzulassungen sind zumindest *In-vitro*-Untersuchungen zu Interaktionen vorzulegen.<sup>119</sup> Zu den geforderten Unterlagen zählen vor allem Untersuchungen zur Inhibition und Induktion von CYP-Enzymen und P-Glykoprotein, sowie gegebenenfalls Untersuchungen zum Metabolismus der Pflanzeninhaltsstoffe. Laut BfArM sollen zuerst *In-vitro*-Experimente durchgeführt werden und nur bei positiven Ergebnissen müssen klinische Interaktionsstudien veranlasst werden. Bei Untersuchungen der Arzneimittelinteraktionen spielt die Inhibition von CYP-Enzymen die bedeutendste Rolle, wobei die Interpretation solcher *In-vitro*-Inhibitionsdaten für Phytopharmaka mit großer Vorsicht erfolgen muss.

Im Vergleich zu synthetischen Arzneimitteln ergibt sich bei *In-vitro*-Untersuchungen von Phytopharmaka bezüglich der Inhibition von CYP-Enzymen ein allgemeines Problem der Übertragbarkeit der *In-vitro*-Ergebnisse auf die *In-vivo*-Situation. Bei der *In-vitro*-Testung pflanzlicher Arzneimittel ist zu berücksichtigen, dass es sich hierbei um Vielstoffgemische handelt, von denen *in vivo* nur ein Teil der Pflanzeninhaltsstoffe resorbiert wird. Die Bioverfügbarkeit der inhibitorisch aktiven Inhaltsstoffe ist in der Regel völlig unbekannt, so dass die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte der Pflanzenextrakte

nur eine begrenzte Aussagekraft besitzen. Bei synthetischen Arzneistoffen ist im Vergleich zu Pflanzenextrakten die *In-vitro-in-vivo*-Korrelation wesentlich einfacher abzuschätzen, da die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes bekannt ist. Des Weiteren spielen für die Übertragbarkeit der *In-vitro*-Ergebnisse der Mechanismus der Inhibition und die Dosierung des Pflanzenextraktes eine große Rolle. Liegt z. B. eine mechanismusbasierte Inhibition vor, ist diese aufgrund der irreversiblen Bindung im Gegensatz zu einer kompetitiven Hemmung mit vergleichbarem  $IC_{50}$ -Wert *in vivo* als sehr viel potenter einzuschätzen.<sup>120</sup> Grapefruitsaft zeigt beispielsweise *in vitro* für CYP3A4 einen relativ hohen  $IC_{50}$ -Wert (ca. 400 µg/ml).<sup>80</sup> Die hohe Dosierung von einem Glas Grapefruitsaft (ca. 200 ml) und die mechanismusbasierte Inhibition von CYP3A4 im Dünndarm führen bei Grapefruitsaft jedoch zu klinisch relevanten Arzneimittelinteraktionen.<sup>110</sup> Bei Pflanzenextrakten muss sowohl die Dosierung des Extraktes und die Konzentration der Inhaltsstoffe im Extrakt als auch die Bioverfügbarkeit der inhibitorisch aktiven Inhaltsstoffe sowie der Mechanismus der Inhibition berücksichtigt werden, um die *In-vivo*-Relevanz der inhibitorischen Aktivität des Phytopharmakons beurteilen zu können. Fachleute üben unter anderem wegen der fehlenden *In-vitro-in-vivo*-Relevanz Kritik an dem Entwurf des BfArM.<sup>121,122,123</sup>

### 3 Motivation und Zielsetzung dieser Arbeit

Werden *In-vitro*-Untersuchungen zur Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte durchgeführt, müssen die Methoden zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität valide Ergebnisse liefern. Meistens werden zur Ermittlung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten typische Markersubstrate der jeweiligen CYP-Isoenzyme in Anwesenheit der Pflanzenextrakte mit den betreffenden Enzymen und NADPH inkubiert und die entstandene Menge des Metaboliten bestimmt. Solche *In-vitro*-Untersuchungen sind jedoch sehr schwierig, weil die zahlreichen Inhaltsstoffe der Pflanzenextrakte die Messungen der Metaboliten erschweren und die Ergebnisse beeinflussen können. Da die bisher angewandten Methoden nicht speziell für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten entwickelt wurden, sind ihre Aussagekraft und Anwendbarkeit fraglich.<sup>120,124</sup>

Im Allgemeinen wird zur Bestimmung der Inhibition die Menge der enzymatisch gebildeten Metaboliten in Anwesenheit von Inhibitoren (z. B. Pflanzenextrakte) mit der Metabolitenkonzentration einer Kontrollinkubation (kein Inhibitor, 100 %ige Enzymaktivität) verglichen. Die Quantifizierung der Metabolitenkonzentration kann durch unterschiedliche analytische Verfahren erfolgen. Hierfür findet die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC bzw. LC) mit anschließender massenspektrometrischer oder photometrischer Detektion Anwendung. Als Substrate werden meistens Arzneistoffe verwendet, deren Metabolismus durch bestimmte CYP-Enzyme katalysiert werden und deren Produkte sich nach chromatographischer Trennung sehr gut UV-spektroskopisch oder massenspektrometrisch detektieren lassen. Allerdings besitzen die UV-basierten Methoden für die meisten Pflanzenextrakte trotz chromatographischer Trennung keine ausreichende Selektivität. Die Pflanzenmatrix mit ihren zahlreichen UV-aktiven Pflanzeninhaltsstoffen verhindert die selektive Detektion der enzymatisch gebildeten Produkte.<sup>123</sup> Somit konnte lediglich die inhibitorische Aktivität von wenigen Naturstoffen durch UV- bzw. Fluoreszenzdetektion mit Hilfe von Markerreaktionen für verschiedene CYP-Enzyme bestimmt werden.<sup>125,126</sup> Obwohl die enzymatisch gebildeten Metabolite in Anwesenheit eines Pflanzenextraktes nach chromatographischer Trennung und anschließender massenspektrometrischer Detektion weitgehend selektiv bestimmt werden können, werden LC/MS-basierte Methoden bei Pflanzenextrakten relativ selten angewendet.<sup>3,80,82,94</sup> Von Usia et al. (2006) wurde für die Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte sogar die Detektion radioaktiv markierter Arzneistoffe verwendet, wofür allerdings spezielle Laboratorien notwendig sind.<sup>127</sup>

Die Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte wurde *in vitro* bisher fast ausschließlich mit fluorimetrischen Verfahren untersucht. Hierfür werden artifizielle Substrate, wie z. B. Coumarin- oder Resorufin-Derivate, verwendet, die arzneilich nicht genutzt werden und durch CYP-Enzyme in stark fluoreszierende Produkte umgewandelt werden. Hierbei findet die Inkubation und die anschließende fluorimetrische Quantifizierung der enzymatisch gebildeten Produkte mit Hilfe von Fluorimetern direkt in 96-Well-Mikrotiterplatten statt. Diese fluorimetrischen Verfahren wurden insbesondere von der Firma Gentest (Woburn, MA, USA) vor allem für das Hochdurchsatz-Screening (High-Throughput-Screening; HTS) von synthetischen Wirkstoffen und potentiellen Arzneistoffkandidaten entwickelt und waren ursprünglich

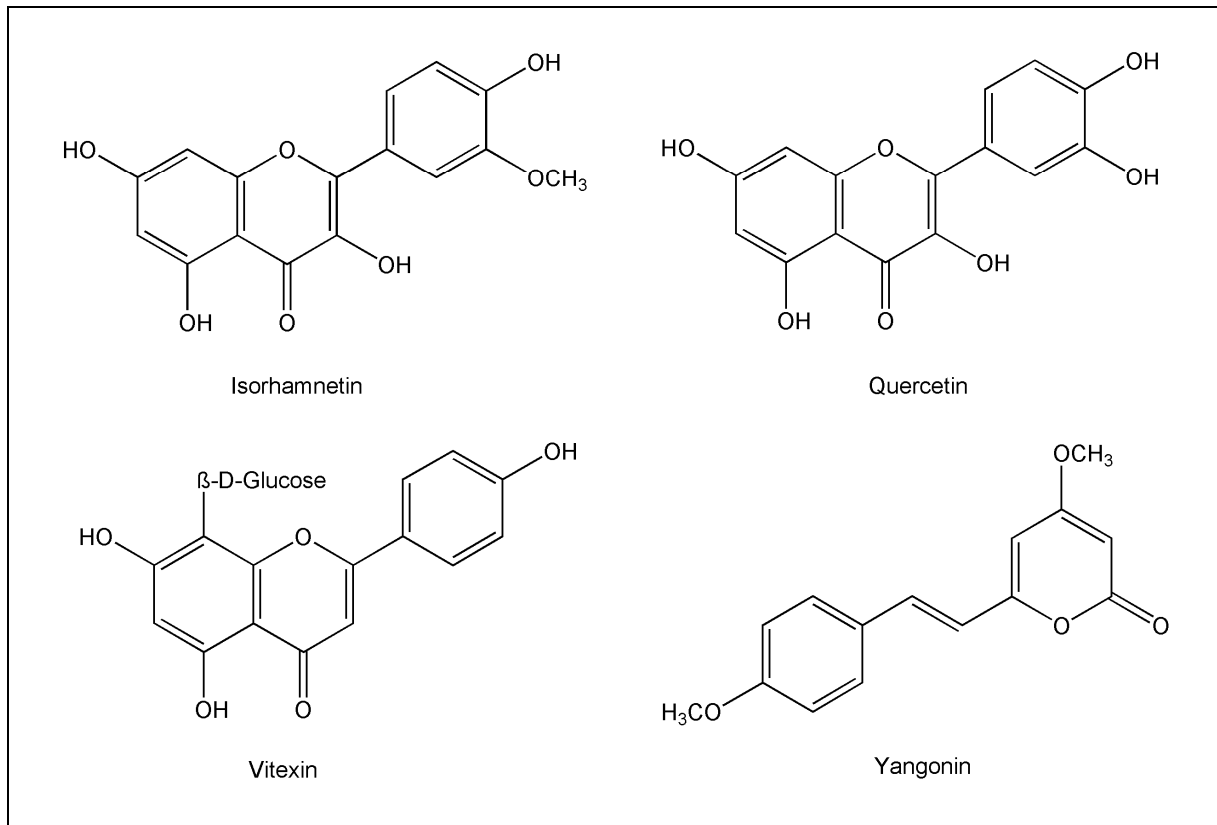
nicht für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten konzipiert.<sup>128,129,130</sup>

Die Validität der fluoreszenzbasierten Methoden zur Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte ist fraglich, da die in den Arzneipflanzen ubiquitär vorkommenden Naturstoffe, wie z. B. Flavonoide, Cumarine oder Alkaloide, häufig selbst eine stark ausgeprägte Eigenfluoreszenz besitzen oder die Fluoreszenzintensität quenchen (reduzieren) können.<sup>123</sup>

Zum Beispiel sind für die stark fluoreszierenden Naturstoffe Hypericin und Berberin mittels Fluoreszenz-Assay für CYP3A4 wesentlich höhere  $IC_{50}$ -Werte erhalten worden als bei LC/MS-basierten Methoden.<sup>123</sup> Während sich für Berberin mit dem von Gentest entwickelten Fluoreszenz-Assay ein  $IC_{50}$ -Wert für CYP3A4 von 5,7 mM ergab,<sup>77</sup> wurde nach chromatographischer Trennung und anschließender massenspektrometrischer Detektion des Metaboliten ein viel niedriger Wert von 400  $\mu$ M erhalten.<sup>105</sup> Des Weiteren wurde mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten Assays ein fast 40-fach höherer  $IC_{50}$ -Wert (330  $\mu$ M) für Hypericin erhalten<sup>77</sup> als bei einem LC/MS-basierten Verfahren (8,7  $\mu$ M).<sup>94</sup> Diese Abweichungen der  $IC_{50}$ -Werte sind höchstwahrscheinlich auf die starke Eigenfluoreszenz von Berberin und Hypericin zurückzuführen.

Bei den Flavonoiden Isorhamnetin, Quercetin, Vitexin sowie dem Kavapyron Yangonin (Abb. 13) konnte sowohl eine Beeinflussung der Messergebnisse durch Eigenfluoreszenz als auch durch Quenching festgestellt werden.<sup>131</sup> Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die fluorimetrisch ermittelten  $IC_{50}$ -Werte für Isorhamnetin, Quercetin, Vitexin und Yangonin für die jeweiligen Isoenzyme zu hoch bzw. zu niedrig sein können, da diese Substanzen Eigenfluoreszenz oder Quenching-Effekte zeigen und somit die Bestimmung der fluoreszierenden Metabolite beeinflussen.<sup>132</sup>

Durch diese Untersuchungen wurde ersichtlich, dass die Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen bei Naturstoffen mittels fluoreszenzbasierten Methoden sowohl falsch-negative Ergebnisse durch Eigenfluoreszenz als auch falsch-positive Ergebnisse durch Quenching liefern können, so dass die Validität der fluoreszenzbasierten Methoden für Pflanzeninhaltsstoffe und somit natürlich auch für Pflanzenextrakte offenbar nicht gegeben ist.



**Abb. 13** Strukturformeln von Isorhamnetin, Quercetin, Vitexin und Yangonin.

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, die Mikrotiterplatten-basierten fluorimetrischen Methoden bezüglich der Anwendbarkeit und Eignung für die Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte zu überprüfen und durch experimentelle Untersuchungen zu klären, ob diese Methoden bei Pflanzenextrakten valide Ergebnisse liefern. Als Referenzmethoden wurden für die sieben relevanten Isoenzyme CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 LC/MS-basierte Methoden entwickelt, bei denen eine selektive und empfindliche Detektion der Metabolite in Anwesenheit einer Pflanzenmatrix gewährleistet ist.



## II ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 1 Entwicklung LC/MS-basierter Methoden zur Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden für die sieben wichtigsten am Arzneistoffmetabolismus beteiligten CYP-Enzyme 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 LC/MS-basierte Methoden entwickelt, so dass trotz komplexer Probenmatrix (Pflanzenmatrix) eine einfache, sensitive und schnelle Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte möglich ist. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten sollte nach automatischer Probenextraktion mit Hilfe chromatographischer Trennung und anschließender massenspektrometrischer Detektion der enzymatisch gebildeten Metabolite erfolgen, so dass sich keine möglichen Interferenzen mit der Probenmatrix ergeben.

#### 1.1 Single-Quadrupol-Massenspektrometrie mit Elektrospray-Ionisierung

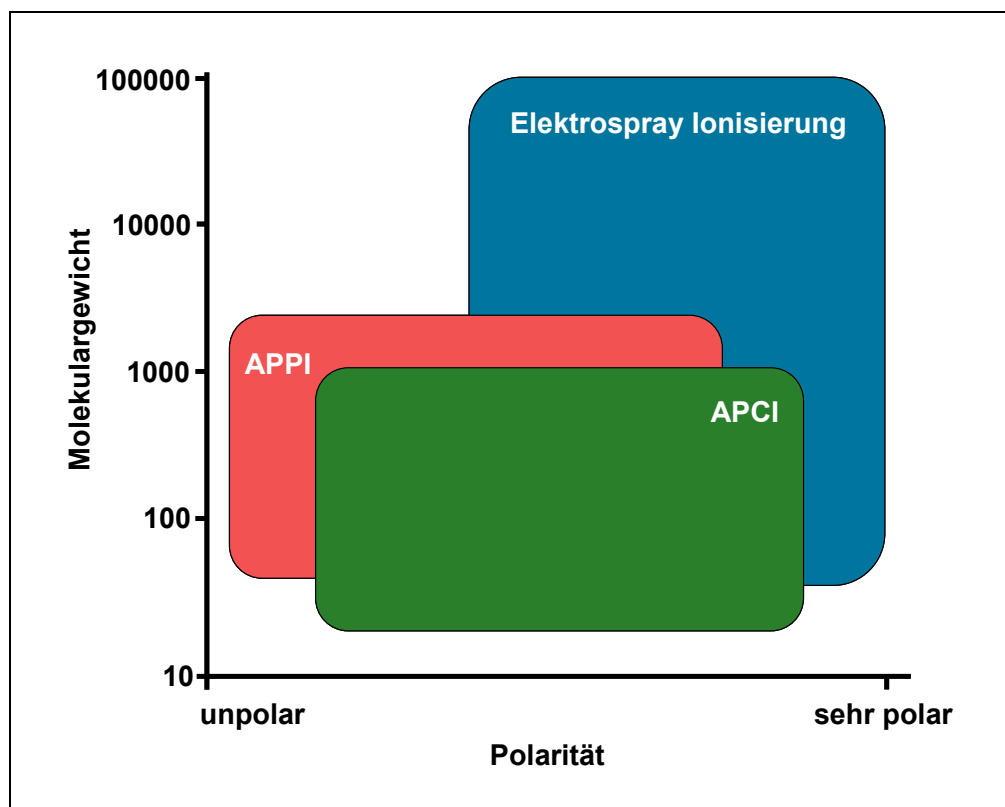
Im Folgenden soll das Prinzip sowie die Anforderungen an Substanzen für eine massenspektrometrische Detektion mit einem Single-Quadrupol-Massenspektrometer erläutert werden. Die Angaben und technischen Daten beziehen sich überwiegend auf das in dieser Arbeit verwendete Single-Quadrupol-Massenspektrometer der 1100 Serie der Firma Agilent, das mit einem Elektrospray-Kopplungssystem (ESI-Interface) ausgestattet war.

Um mittels LC/MS Massenspektren erhalten zu können, müssen die Analyten aus der Probenlösung (HPLC-Eluat) in die Gasphase überführt und anschließend in das Hochvakuumsystem des Massenanalysators transportiert werden. Somit sind Massenspektrometer für LC/MS-Kopplungen neben einem Quadrupol-Massenfilter und einem Elektronenvervielfacher zur Ionen-Detektion zusätzlich mit einer Ionisierungsquelle ausgestattet. In dieser Arbeit wurde ausschließlich eine ESI-Quelle als Interface verwendet.

Die ESI-Quelle gehört bezüglich der Ionisierungstechnik zur Ionisierung bei Atmosphärendruck („**A**tmospheric **P**ressure Ionisation“; API) und wird neben der

„Atmospheric Pressure Chemical Ionisation“ (APCI) und der „Atmospheric Pressure Photo Ionisation“ (APPI) am häufigsten als Kopplungstechnik für die LC/MS angewendet. Während die Ionisierung in der ESI-Quelle aufgrund eines Hochspannungsfeldes erfolgt, sorgt in der APPI-Quelle eine Vakuum-UV-Lampe für die Photoionisation der Analyten. Bei APCI bewirkt eine Coronanadel die chemische Ionisierung der Analyten.

Die API-Quellen sind sehr robust und können polare bis unpolare Substanzen sehr effektiv ionisieren (Abb. 14). Während sich APPI und APCI zur Ionisierung von niedermolekularen Substanzen eignen, kann mit Hilfe der Elektrospray-Ionisierung eine Vielzahl von ionisierbaren polaren bis mittelpolaren Analyten bis zu einem Molekulargewicht von ca. 100.000 Da sehr empfindlich und selektiv detektiert werden (Abb. 14). ESI/MS eignet sich hervorragend zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Arzneistoffen, Naturstoffen und anderen niedermolekularen organischen Substanzen, aber auch von hoch molekularen Verbindungen wie Proteinen und Peptiden. ESI-Quellen sind somit am häufigsten als Interface bei Massenspektrometern wie Single-Quadrupol-, Triple-Quadrupol- und Flugzeit (Time of Flight; TOF)-Massenspektrometern sowie Ionenfallen zu finden.

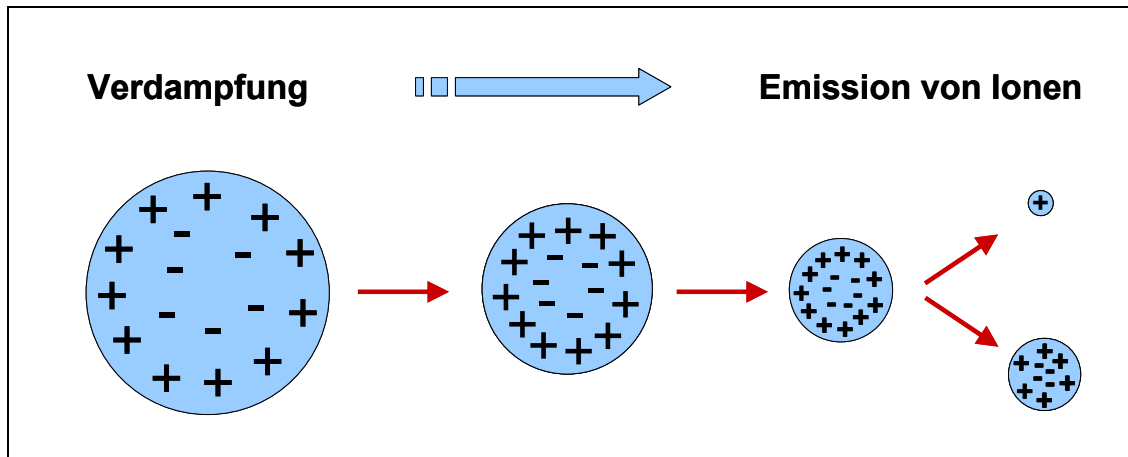


**Abb. 14** Anwendungsbereich von verschiedenen LC/MS-Ionisierungstechniken (modifiziert nach <sup>133</sup>).



Um eine ausreichende Ionisation der Analyten für eine empfindliche massenspektrometrische Detektion zu gewährleisten, sollten diese bereits in der Probenlösung (z. B. HPLC-Eluat) größtenteils ionisch vorliegen. Die ESI-Quelle überführt bei Atmosphärendruck die Analyten als Ionen in die Gasphase und anschließend in das Hochvakuumsystem des Massenanalysators. Für die Ionenbildung sind vor allem der  $pK_S$ -Wert der Analyten sowie der pH-Wert der Probenlösung ausschlaggebend.

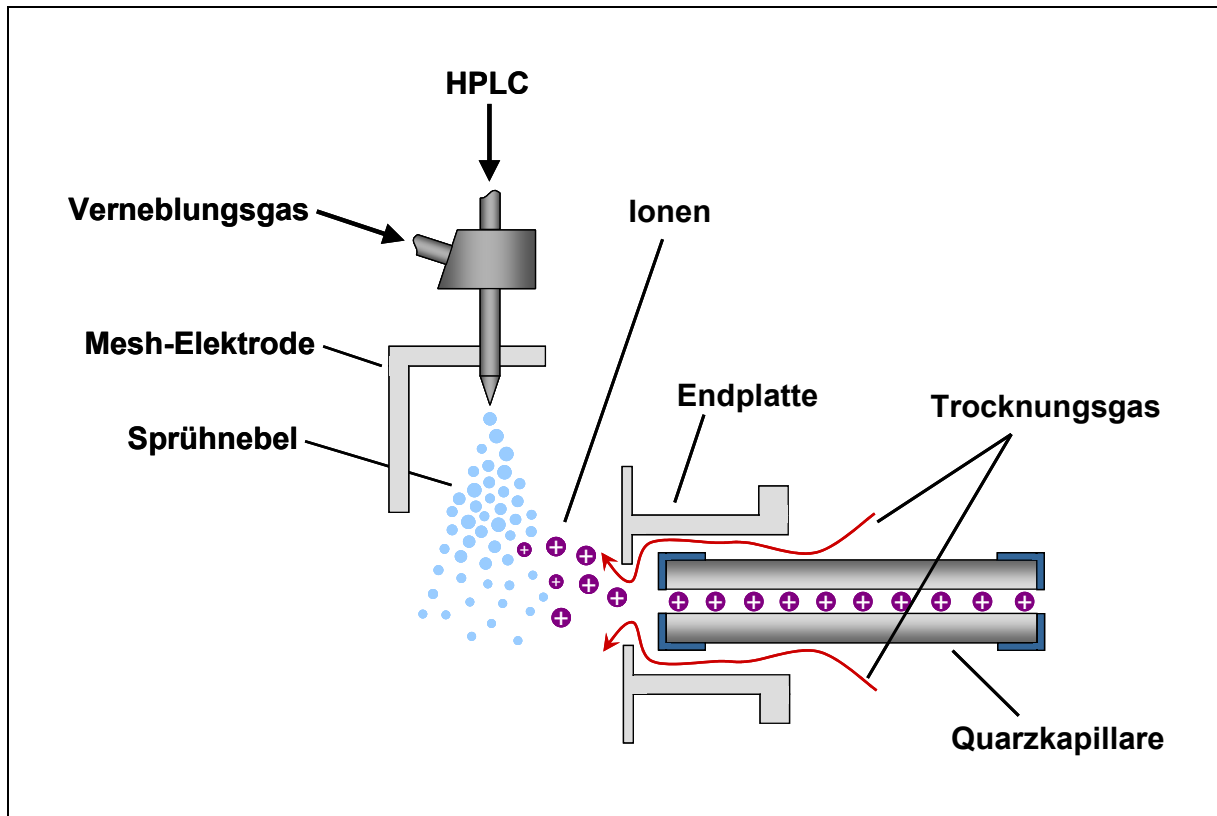
Unter Einfluss einer elektrischen Hochspannung an einer so genannten Mesh-Elektrode (3-5 kV) und mit Unterstützung eines Gasflusses wird die Probenlösung als geladene Tröpfchen in die Ionisierungskammer versprüht. Als Verneblungsgas wird vor allem Stickstoff verwendet. Der Druck des Gases muss der Fließgeschwindigkeit und Lösungsmittelzusammensetzung der Probenlösung angepasst werden, um einen konstanten und feinen Sprühnebel zu erhalten. Nach der Verneblung der Probenlösung in elektrisch geladene Tröpfchen reduziert sich deren Größe aufgrund der Lösungsmittelverdampfung, wodurch die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche zunimmt (Abb. 15). Gleichzeitig kann es dabei auch zu einer Teilung der geladenen Tröpfchen kommen. Der Prozess der Tröpfchenverkleinerung wird thermisch durch das Trocknungsgas (z. B. Stickstoff) unterstützt, welches je nach Eigenschaften des Analyten, Zusammensetzung und Fließgeschwindigkeit der Probenlösung auf eine Temperatur von ca. 250-350 °C und einer Flussrate von 3-12 L/min eingestellt werden muss. Der Radius der primär dispergierten Tröpfchen (ca. 0,5 bis 1  $\mu\text{m}$ ) verringert sich in wenigen Millisekunden auf ca. 10 nm. Bei dieser Größe ist das so genannte Rayleigh-Limit erreicht, bei dem die Coulomb-Abstoßung der gleichsinnigen Ladungen die Oberflächenspannung der Tröpfchen übersteigt, so dass eine weitere Verkleinerung der Tröpfchengröße zur Emission von Ionen führt, man spricht hier von der so genannten Coulomb-Explosion (Abb. 15). Für diesen Prozess werden zwei Modelle vorgeschlagen.<sup>134</sup> Das Charged-Residue-Modell geht von einem Zerfall in kleinere Tröpfchen (Coulomb-Explosion) aus, bis zuletzt nur noch geladene Ionen übrig bleiben. Nach dem Ion-Evaporation-Modell werden die Ionen aus den hochgeladenen Tröpfchen emittiert.



**Abb. 15** Prinzip der Ionen-Emission aus geladenen Tröpfchen bei der Elektrospray-Ionisierung (modifiziert nach <sup>133</sup>).

Die vollständige Desolvatisierung und Zerschlagung von Ionenclustern wird bei einigen ESI-Interfaces ebenfalls durch eine beheizbare Kapillare erreicht, die bei dem in dieser Arbeit verwendeten Massenspektrometer durch das Umfließen mit heißem Trocknungsgas temperiert wird (Abb. 16).

Die entstandenen Ionen werden durch einen elektrostatischen Gradienten und ein Druckgefälle über eine Kapillare in Richtung Massenanalysator transportiert. Durch Anlegen einer hohen Spannung (5 kV) an die Endplatte und an die beschichteten Endkappen der Quarz-Kapillare werden die Ionen elektrostatisch angezogen und durch den elektrostatischen Gradienten, der durch die Spannungsdifferenz zwischen den beiden Endkappen der Kapillare erzeugt wird, beschleunigt. Durch die orthogonale Anordnung des Verneblers zur Kapillare, eine so genannte „*Off-axis*-Anordnung“ (Abb. 16), wird eine möglichst geringe Verschmutzung der Kapillare und des Massenanalysators gewährleistet, da so weniger Neutralkomponenten, Partikel und große Tropfen in das Massenspektrometer gelangen. Die gebildeten Ionen werden durch das elektrische Feld aus ihrer Flugrichtung abgelenkt und dadurch von nicht flüchtigen und ionisierbaren Probenbestandteilen größtenteils abgetrennt. *Off-axis*-Ionenquellen sind somit bezüglich nichtflüchtiger Pufferbestandteile robuster als Quellen mit axialer Anordnung von Sprühkopf und Kapillare. Dennoch sollte generell bei API-Quellen auf nichtflüchtige Pufferbestandteile größtenteils verzichtet werden, damit eine möglichst geringe Verschmutzung der Endplatte und der Kapillare gewährleistet werden kann, so dass die Analyten empfindlich und reproduzierbar detektiert werden können.



**Abb. 16** Elektrospray-Ionisierungsquelle („Off-axis-Anordnung“; modifiziert nach <sup>133</sup>)

Des Weiteren ist für den Transport der Ionen in Richtung Analysator ein Druckgradient verantwortlich. Während in der Sprühkammer ein Atmosphärendruck von 1013 mbar herrscht, sorgen Turbopumpen innerhalb des Massenspektrometers für einen Druck von 1-2 mbar im Bereich des Kapillarendes und der Linsenoptik bis hin zu  $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$  mbar im Bereich des eigentlichen Massenanalysators, dem Quadrupol.

Im Vakuumbereich werden im ersten Schritt die Ionen durch die Ionenquellen-Optik scharf fokussiert und zum Massenanalysator weitertransportiert. Die Ionenquellen-Optik besteht aus dem Fragmentor, Skimmer, Oktopol und Linsen, an denen für die Fokussierung und Transmission unterschiedliche Spannungen angelegt werden. Die Fragmentorspannung (Capillary Exit Voltage) ist zudem auch für die Fragmentierung der Ionen verantwortlich, so dass deren Einstellung eine wichtige Rolle für die Empfindlichkeit der Analysen spielt. Während zum Einstellen der Spannungen des Skimmers, des Oktopols und der Linsen eine so genannte Tuninglösung des Herstellers (verschiedene Substanzen mit unterschiedlichen  $m/z$ -Werten) für eine

empfindliche Detektion der Analyten meistens ausreicht, sollte auf jeden Fall die Fragmentorspannung (50-400 mV) für jede Substanz optimiert werden.

Um ein Massenspektrum zu erhalten, müssen die gebildeten Ionen nach ihren Massen getrennt werden. Hierfür besteht ein Quadrupol-Massenspektrometer aus vier parallel im Quadrat angeordneten Metallstäben, von denen kreuzweise jeweils zwei miteinander leitend verbunden sind.<sup>134</sup> Durch Anlegen von Gleich- und Wechselspannungen an den Metallstäben werden elektrische Felder erzeugt, durch die die Ionen in der Mitte entlang der Metallstäbe beschleunigt werden. Durch geeignete Abstimmung der Gleich- und Wechselspannungen wird erreicht, dass jeweils nur Ionen mit bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnissen ( $m/z$ -Werte) mit dem elektrischen Feld im Stabsystem in Resonanz treten und auf einer geradlinigen Bahn zum Elektronenvervielfacher zur Detektion gelangen. Ionen mit anderen  $m/z$ -Werten werden jeweils unterschiedlich stark seitlich abgelenkt.

In der Single-Quadrupol-Massenspektrometrie sind zwei Einstellungen für die Messung von Ionen möglich, der Full-Scan-Modus und der SIM-Modus (**S**elected-**I**on-**M**onitoring-Modus). Im Full-Scan-Modus wird ein bestimmter Massenbereich kontinuierlich aufgezeichnet, so dass alle in der Quelle gebildeten Ionen mit entsprechendem  $m/z$ -Werten registriert werden. Im SIM-Modus hingegen werden nur wenige ausgewählte  $m/z$ -Werte detektiert, wodurch die Nachweisempfindlichkeit gegenüber dem Scan-Modus erheblich gesteigert werden kann (bis zu Faktor 50-100). So wird der SIM-Modus ausschließlich für eine gezielte und empfindliche Detektion und Quantifizierung von Substanzen eingesetzt, während der Full-Scan-Modus vorzugsweise für qualitative Analysen angewendet wird, bei denen die Massen bzw. die  $m/z$ -Werte der Analyten im Vorfeld nicht bekannt sind.

Verbindungen wie Arznei- und Naturstoffe, die nur eine protonierbare bzw. deprotonierbare funktionelle Gruppe besitzen, liefern meist einfach geladene Quasimolekülonen ( $[M+H]^+$  bzw.  $[M-H]^-$ ), die im Negativ- bzw. Positiv-Modus gemessen werden können. Einige Substanzklassen neigen zur Adduktbildung mit den in der Probenlösung vorhandenen Ionen, so dass zusätzlich zu den protonierten Quasimolekülonen Addukte mit Natrium-, Kalium- oder Ammoniumionen auftreten können. Die Elektrospray-Ionisierung wird als „sanfte“ Ionisierungsmethode

bezeichnet, da nur eine geringe Fragmentierung der Moleküle zu beobachten ist und nur bei instabilen Molekülen Fragmentationen auftreten.

Bei großen Molmassen (bis zu 100.000 Da) und bei mehreren funktionellen Gruppen werden in der Regel mehrfach geladene Ionen nach der allgemeinen Formel  $[M+nH]^{n+}$  bzw.  $[M-nH]^{n-}$  beobachtet. Vor allem hochmolekulare Biomoleküle wie Proteine und Peptide ergeben aufgrund der vielen protonierbaren funktionellen Gruppen mehrfach geladene Molekülionenserien (z. B.  $n=13, 14, 15$  usw.), die in den Massenspektren ein typisches Verteilungsprofil von bestimmten  $m/z$ -Werten ergeben, woraus das exakte Molekulargewicht eines Analyten berechnet werden kann (Dekonvolution).

Damit Substanzen generell mittels Elektrospray-Ionisierung empfindlich negativ oder positiv detektiert werden können, müssen diese leicht ionisierbare funktionelle Gruppen besitzen, damit die Moleküle bereits in der mobilen Phase weitgehend als Ionen vorliegen. Als weiteren Vorteil für eine empfindliche ESI-MS-Detektion erweisen sich hohe Masse-zu-Ladungsverhältnisse ( $m/z$ -Werte  $> 200$ ), da die Empfindlichkeit der massenspektrometrischen Detektion durch das Hintergrundrauschen, bedingt durch die Probenmatrix (z. B. Urin, Blut, Plasma, Pflanzenextrakt), überwiegend bei niedrigen  $m/z$ -Werten und vor allem im positiven Modus beeinträchtigt wird.

### **Nachteile der Elektrospray-Ionisierung**

Da bei der Verwendung von Massenspektrometern Ionen nach ihren  $m/z$ -Werten selektiv isoliert und anschließend quantifiziert werden, ist im Gegensatz zu weniger selektiven Detektoren, wie z. B. UV-VIS, der Anspruch an die Effizienz der chromatographischen Trennung deutlich geringer. Jedoch können in der Massenspektrometrie Interferenzen auftreten, die im Ionen-Chromatogramm nicht ersichtlich werden. Ein großer Nachteil der weit verbreiteten LC/ESI-MS Analytik ist die so genannte Ionensuppression, die eine große Barriere für die Entwicklung von High-Throughput-Methoden in der LC/MS-Technik darstellt, aber größtenteils nicht berücksichtigt wird.<sup>135,136</sup> Durch koeluierende Substanzen kann die Ionisierung eines Analyten so beeinflusst werden, dass wesentlich weniger bzw. gar keine Analyt-Ionen entstehen. In diesem Fall kommt der Probenaufbereitung und vor allem der chromatographischen Trennung eine große Bedeutung zu, um valide Ergebnisse vor

allem für die Quantifizierung zu generieren. In Kapitel II.1.3.2.5 wird ausführlich dargestellt, welche Auswirkung eine reduzierte Signalintensität durch Ionensuppression auf die Art der Enzymkinetik und der Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante von Bupropion und CYP2B6 hat. Des Weiteren wird die Signalintensität der Analyten durch Zusatz von Ionenpaar-Reagenzien in der mobilen Phase wie beispielsweise Trifluoressigsäure erheblich beeinträchtigt, da sehr stabile nach außen neutral geladene Ionenpaare entstehen.<sup>137</sup>

Aufgrund der hohen Spezifität massenselektiver Detektoren wurden vor allem mit Triple-Quadrupol-Geräten sehr viele LC/MS/MS-Methoden entwickelt, bei denen die chromatographische Trennung der Analyten vernachlässigt wird. Beispielsweise wurden bei Bu et al. (2001) für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Arzneistoffen die Analyten nach Extraktion der Probenlösung mittels einer kurzen Extraktionssäule (4 x 2,0 mm) in das MS-System eingebracht.<sup>138</sup> Teilweise wird auch auf die Reinigung der Proben verzichtet,<sup>139</sup> unter der Annahme, dass MS-Geräte, vor allem Triple-Quadrupol-Geräte, unter jeglichen Bedingungen eine hohe Richtigkeit und Spezifität zeigen. So sind mittels Triple-Quadrupol-Geräten sehr viele Hochdurchsatzmethoden für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Arzneistoffen gegenüber CYP-Enzymen entwickelt worden, mit denen die Metaboliten innerhalb von wenigen Minuten registriert und quantifiziert werden.<sup>138,139</sup> Zudem wurden High-Throughput-Methoden entwickelt, die die gleichzeitige Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von mehreren CYP-Enzymen durch Arzneistoffe erlauben, so genannte Cocktail-Methoden.<sup>138-140</sup>

### **Anforderungen an Substanzen für die ESI-MS-Detektion**

Da Triple-Quadrupol- und Ionenfallen-Massenspektrometer im Selected-Reaction-Monitoring- (SRM) bzw. Multiple-Reaction-Monitoring- (MRM) Modus eine Isolierung und Fragmentierung der Metaboliten erlauben, zeigen diese Massenspektrometer eine hohe Selektivität und Empfindlichkeit und sind somit hervorragend geeignet für die Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Arzneistoffe.<sup>141</sup> Da in dieser Arbeit die Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte mittels eines Single-Quadrupol-Massenspektrometers im SIM-Modus durchgeführt werden sollte, musste bei der Methodenentwicklung berücksichtigt werden, dass die Pflanzenmatrix zu einem hohen Grundrauschen in der Ionenspur des jeweiligen

Metaboliten führen kann, so dass die Empfindlichkeit der Messung erheblich beeinträchtigt wird. Außerdem besteht bei einem Gemisch aus mehr als 100 Pflanzeninhaltsstoffen die Möglichkeit, durch identische Molekulargewichte Interferenzen und somit auch eine Beeinflussung der Spezifität der analytischen Methode zu erhalten. Zudem darf bei LC/ESI-MS-Messungen die Ionensuppression bezüglich der Probenmatrix, vor allem Pflanzenextrakt, nicht unterschätzt werden.

So musste der Probenaufreinigung und der chromatographischen Trennung besondere Beachtung geschenkt werden. Als Reinigungsschritt wurde eine Online-Festphasenextraktion (automatische Probenextraktion) durchgeführt<sup>142,143</sup> und als Substrate der CYP-Enzyme wurden Arzneistoffe verwendet, deren Metabolite chromatographisch von der meist polaren Pflanzenmatrix abzutrennen waren. Als Grundlage für die Methodenentwicklung der einzelnen CYP-Assays wurde eine in unserem Arbeitskreis bereits etablierte und validierte LC/MS-Methode mit Online-Festphasenextraktion herangezogen, die für die simultane Bestimmung der Inhibition der sechs wichtigsten humanen CYP-Enzyme 1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 speziell für Pflanzenextrakte entwickelt wurde.<sup>80</sup>

## 1.2 HPLC mit Online-Festphasenextraktion

Da wie oben beschrieben Single-Quadrupol-Massenspektrometer im SIM-Modus eine niedrigere Selektivität zeigen als Triple-Quadrupol- oder Ionenfallen-Massenspektrometer im MRM- bzw. SRM-Modus, kann es sowohl durch das hohe Hintergrundrauschen der Pflanzenmatrix als auch durch identische Molekulargewichte der Pflanzeninhaltsstoffe zur Beeinträchtigung der Empfindlichkeit und zu Interferenzen kommen. Ein zusätzlicher Reinigungsschritt in Form einer automatischen Probenextraktion vor der eigentlichen LC/MS-Analytik sollte neben der chromatographischen Trennung für eine selektive Bestimmung der Metabolite sorgen und eine Ionensuppression durch die Probenmatrix vermeiden. Hierfür wurde eine automatische Online-Festphasenextraktion vor der analytischen Trennung der Metabolite durchgeführt. Dies stellt eine hervorragende Möglichkeit dar, um eine Aufreinigung vor der Probeninjektion zu vermeiden. Andere Varianten der Probenaufbereitung sind die Offline-Festphasenextraktion<sup>144,145</sup> oder die Flüssig-Flüssig-Extraktion<sup>146,147</sup> vor der Injektion der Probe. Yin et al. (2000) verwendeten zur

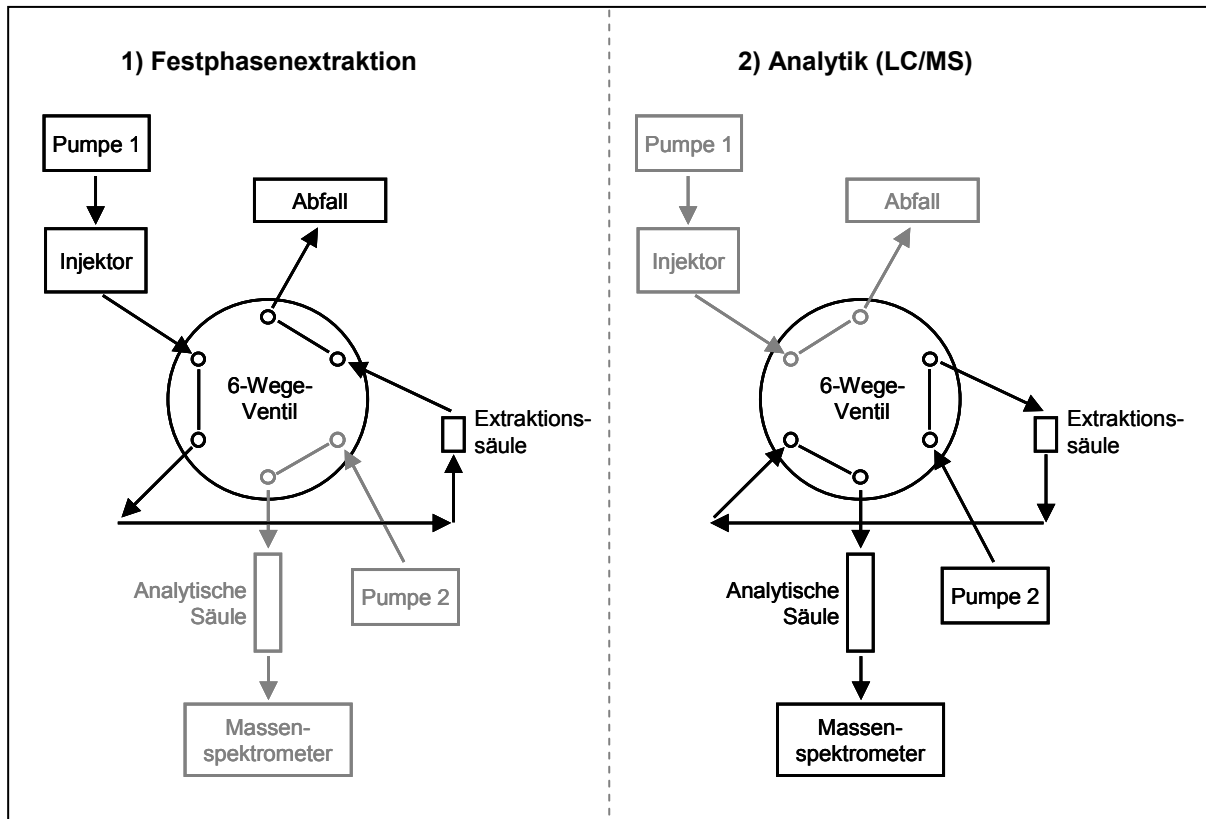
Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Arzneistoffen spezielle Mikrotiterplatten, auf der die Inkubation und anschließend die Festphasenextraktion der Proben durchgeführt wurden.<sup>145</sup>

### **Durchführung**

Die für die LC/MS mit Online-Festphasenextraktion benötigte Anlage besteht im Prinzip aus zwei HPLC-Anlagen, die durch ein 6-Wege-Ventil miteinander gekoppelt sind (Abb. 17). Während die eine HPLC-Anlage bestehend aus einer Pumpe, einem Injektor und einer Extraktionssäule für die automatische Probenextraktion zuständig ist, wird mit der anderen Anlage (Pumpe, analytische Säule, Massenspektrometer) nach erfolgter Anreicherung die chromatographische Trennung der Analyten mit anschließender massenspektrometrischer Detektion durchgeführt.

Das Fließmittel der Pumpe 1 muss so gewählt werden, dass nach erfolgter Aufgabe der Probe die zu untersuchenden Substanzen an der Extraktionssäule angereichert und die unerwünschten meist polaren Matrixbestandteile der Probe (Puffer, Pflanzeninhaltsstoffe etc.) größtenteils in das Abfallgefäß gespült werden (Abb. 17; Festphasenextraktion). Nach erfolgter Anreicherung der Analyten (1-2 min) mit einer Flussrate von 3-5 ml/min wird das 6-Wege-Ventil so geschaltet, dass das Fließmittel der Pumpe 2 die Analyten von der Extraktionssäule rückwärts im so genannten Backflush-Modus auf die analytische Säule spült (Abb. 17; Analytik LC/MS). Nach chromatographischer Trennung auf der analytischen Säule werden die zu analysierenden Substanzen massenspektrometrisch detektiert. Bei Unger et al. (2002) wurde beispielsweise eine einfache und schnelle LC/MS-Methode mit Online-Festphasenextraktion beschrieben, die eine empfindliche Quantifizierung von Isatin, einem endogenen Monoaminoxidase-Hemmstoff, in Urin nach Derivatisierung durch Hydroxylaminhydrochlorid ohne weitere Extraktionsschritte ermöglicht.<sup>143</sup>





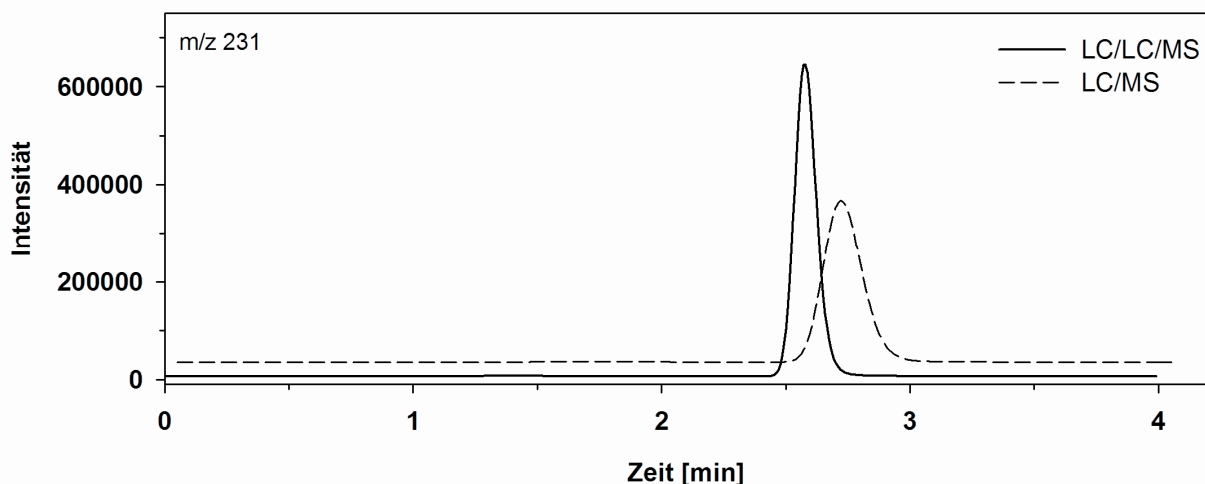
**Abb. 17** Säulenschaltung der LC/MS-Analytik mit Online-Festphasenextraktion (modifiziert nach Christians et al., 2000)<sup>142</sup>; HPLC 1 (Pumpe 1, Injektor, Extraktionssäule) und HPLC 2 (Pumpe 2, Analytische Säule, Massenspektrometer) verbunden durch ein 6-Wege-Ventil.

### Vorteile

Der größte Vorteil der automatischen Probenextraktion liegt darin, dass die Metabolite in Anwesenheit der Probenmatrix (Pflanzenextrakt) sehr selektiv und empfindlich gemessen werden können.<sup>148</sup> Die erhaltenen Ionenspuren der Produkte in den Chromatogrammen zeigen äußerst geringe Interferenzen und das Hintergrundrauschen der Ionenspuren für die entsprechenden  $m/z$ -Werte wird stark reduziert, da die unerwünschten meist polaren Matrixbestandteile der Probe zum größten Teil während des Extraktionsschrittes ausgewaschen werden. Der praktische Gesichtspunkt des zusätzlichen Reinigungsschrittes ist, dass sehr viel weniger an nicht bzw. schwer flüchtigen polaren Matrixbestandteilen der Probe (Salze, Polysaccharide etc.) in die ESI-Quelle gelangen und sich dort als Ablagerungen festsetzen können. Die Reinigung der Quelle kann somit im Vergleich zu einer konventionellen LC/MS-Anlage ohne automatische Probenextraktion in

größeren Zeitabständen erfolgen, ohne dass die Reproduzierbarkeit und die Empfindlichkeit der Analyten beeinträchtigt werden.

Die Elutionskraft des Fließmittels für die Extraktion wird so gewählt, dass die Analyten an der Extraktionssäule festgehalten und die unerwünschten Bestandteile der Probe zum größten Teil ausgewaschen werden. Durch die anschließende Elution der Analyten von der Extraktionssäule im so genannten Backflush-Modus werden diese zu einer schmalen Bande am Anfang der analytischen Säule konzentriert. Wichtig ist in diesem Schritt, dass die Analyten keine Chromatographie auf der Extraktionssäule zeigen. Im Vergleich zu einer herkömmlichen LC/MS-Methode werden durch die Probenextraktion besonders scharfe und symmetrische Peaks im Chromatogramm der Analyten erhalten, was zu einer Erhöhung der chromatographischen Trenneffizienz und zu einer empfindlicheren Detektion der Analyten führt.<sup>149</sup> In Abb. 18 ist ein Beispiel dargestellt, bei dem ein fast doppelt so hoher und nur halb so breiter Peak für 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin mittels LC/MS mit Online-Festphasenextraktion im Vergleich zu LC/MS erhalten wurde. So wurde sowohl die Effizienz der chromatographischen Trennung als auch die Empfindlichkeit („Response“) des Analyten erhöht.



**Abb. 18** Extrahierte Ionenspuren von 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin ( $m/z$  231) bestimmt mittels LC/MS und LC/MS mit Online-Festphasenextraktion (LC/LC/MS) im positiven SIM-Modus (Injektionsvolumen 25  $\mu$ l, Konzentration 50 ng/ml).

Aufgrund der vorgeschalteten Probenextraktion kann auch ein großes Probenvolumen (bis zu 1 ml) oder eine hohe Probenkonzentration injiziert werden ohne den

analytischen Lauf zu beeinflussen.<sup>149</sup> Bei herkömmlichen HPLC-Methoden werden oftmals bereits bei Injektionsvolumina von mehr als 50  $\mu\text{l}$  unsymmetrische und sehr breite Peaks erhalten.

Schließlich eignet sich die Online-Festphasenextraktion als automatische Probenextraktion natürlich auch hervorragend für Methoden mit UV- oder Fluoreszenzdetektion.

### 1.3 Methoden zur Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen

Mit Hilfe der LC/ESI-MS-Analytik mit Online-Festphasenextraktion wurden Methoden entwickelt, die für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten geeignet sind. Alle Inkubationsansätze wurden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4; 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ) und 1 mM NADPH bei 37° C durchgeführt. Enzymmenge und Inkubationszeit variieren je nach CYP-Enzym (siehe V.2.3 ).

#### 1.3.1 Kriterien für die Auswahl geeigneter Substrate

Für die Auswahl der Substrate zur Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen sind verschiedene Anforderungen von Bedeutung. Generell sollen die CYP-Substrate und deren Metabolite kommerziell erhältlich und relativ preiswert sein.

#### Enzymkinetische Parameter

Substrate für das *In-vitro*-Phenotyping sollten, wenn humane Lebermikrosomen (HLM) oder eine Mischung aus rekombinanten CYP-Enzymen verwendet werden, möglichst selektiv durch ein Isoenzym metabolisiert werden und ein einfaches Metabolisierungsschema aufweisen.<sup>150</sup> Zusätzlich sollten die Substrate günstige enzymkinetische Parameter (z. B. Umsetzungsgeschwindigkeit, Affinität) bezüglich der jeweiligen Isoenzyme aufweisen, so dass die enzymatische Umsetzung eine ausreichend detektierbare Metabolitenmenge gewährleistet. Hier ist vor allem die reduzierte Umsetzung der Substrate durch Anwesenheit von Inhibitoren zu berücksichtigen. Die Substratkonzentration sollte bei der Bestimmung von  $\text{IC}_{50}$ -Werten der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ -Wert) entsprechen.<sup>150</sup> In Tab. 6 sind für verschiedene CYP-Enzyme einige Markerreaktionen von Substraten mit ihren

entsprechenden  $K_m$ -Werten aufgelistet, die für die *In-vitro*-Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Arzneistoffen sehr häufig verwendet werden<sup>139,141,151,152</sup> und von der FDA im Zusammenhang mit einem Entwurf für Richtlinien bezüglich Arzneimittelinteraktions-Studien<sup>150</sup> als Modellsubstrate für CYP-Enzyme vorgeschlagen werden. Diese Substrate sind für *In-vitro*-Untersuchungen zur Inhibition von CYP-Enzymen durch Arzneistoffe besonders geeignet und sollten bevorzugt für solche Untersuchungen verwendet werden (Tab. 6). Für die Quantifizierung der Metabolite werden sehr häufig LC/MS- bzw. LC/MS/MS-Methoden verwendet, da massenspektrometriebasierte Methoden eine sehr selektive und empfindliche Detektion der Metaboliten erlauben.<sup>139,141,151,152</sup>

**Tab. 6** Ausgewählte Markerreaktionen mit den entsprechenden  $K_m$ -Werten für den Metabolismus von Arzneistoffen durch die humanen rekombinanten CYP-Enzyme 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4.

CYP	Substrat	katalys. Reaktion	Metabolit	$K_m$ -Wert [ $\mu\text{M}$ ]
1A2	Phenacetin Tacrin	O-Deethylierung Hydroxylierung	Paracetamol 1-Hydroxytacrin	1,7-152 <sup>150</sup> 2,8; 16 <sup>150</sup>
2B6	Bupropion Efavirenz	Hydroxylierung Hydroxylierung	4-Hydroxybupropion 8-Hydroxyefavirenz	67-168 <sup>150</sup> 17-23 <sup>150</sup>
2C8	Amodiaquin Paclitaxel	N-Deethylierung Hydroxylierung	N-Desethylamodiaquin 6 $\alpha$ -Hydroxypaclitaxel	2,4 <sup>150</sup> 5,4-19 <sup>150</sup>
2C9	Tolbutamid Diclofenac	Hydroxylierung Hydroxylierung	4-Hydroxytolbutamid 4'-Hydroxydiclofenac	67-838 <sup>150</sup> 3,4-52 <sup>150</sup>
2C19	S-Mephenytoin Imipramin	Hydroxylierung N-Demethylierung	4'-Hydroxymephenytoin Desipramin	13-35 <sup>150</sup> 22 <sup>152</sup> , 25 <sup>153</sup>
2D6	Bufuralol Dextromethorphan	Hydroxylierung O-Demethylierung	1'-Hydroxybufuralol Dextrorphan	9-15 <sup>150</sup> 0,44-8,5 <sup>150</sup>
3A4	Midazolam Testosteron Nifedipin	Hydroxylierung Hydroxylierung Oxidation	1'-Hydroxymidazolam 6 $\beta$ -Hydroxytestosteron Dehydronifedipin	1-14 <sup>150</sup> 52-94 <sup>150</sup> 5,1-47 <sup>150</sup>

### **LC/ESI-MS mit Online Festphasenextraktion**

Während die enzymkinetischen Parameter der Substrate ein wichtiger Aspekt für die Auswahl der Substanzen sind, müssen die aus den Substraten enzymatisch gebildeten Produkte (Metabolite) je nach Analysenverfahren weitere besondere Kriterien erfüllen. Da in dieser Arbeit die Metabolite selektiv mit Hilfe von LC/ESI-MS nach Online-Festphasenextraktion in Anwesenheit der Pflanzenmatrix bestimmt werden sollen, müssen die verwendeten Metabolite folgende Eigenschaften aufweisen.

Für eine ausreichende und selektive massenspektrometrische Detektion in Anwesenheit einer Pflanzenmatrix spielt eine starke Retention der Metabolite an RP-Material eine große Rolle. Durch die richtige Wahl des Fließmittels (organisches Lösungsmittel, pH-Wert, Additiva etc.) und Säulenmaterials (C8, C18 endcapped etc.) kann die Retention der Analyten in einem gewissen Rahmen verstärkt werden. Dennoch sollten die Metabolite keine zu polaren Strukturen aufweisen, damit diese an der Extraktionssäule eine vollständige Retention bei einer Methanolkonzentration von mindestens 5 % zeigen. Umso stärker das Retentionsverhalten der Analyten an der Extraktionssäule ist, desto höher kann der organische Lösungsmittelanteil des Ladepuffers gewählt werden. Durch einen hohen organischen Lösungsmittelanteil des Ladepuffers kann ein großer Teil an unerwünschter polarer Probenmatrix (Salze, Polyphenole, Zucker etc.) ausgewaschen werden, so dass eine relativ saubere Probe für die LC/ESI-MS-Analytik zur Verfügung steht.

Des Weiteren sorgt eine mittlere bis hohe Retention der Metaboliten an RP-Materialien dafür, dass die Metaboliten von den an der Extraktionssäule festgehaltenen Bestandteilen der Probenmatrix (z. B. Inhaltsstoffe von Pflanzenextrakten) chromatographisch auf der analytischen Säule abgetrennt werden kann. Aufgrund der höheren Elutionskraft des analytischen Fließmittels im Vergleich zum Ladepuffer eluieren in den ersten 2 Minuten des analytischen HPLC-Laufes viele polare bis mittelpolare Substanzen der Probenmatrix, die durch den Ladepuffer nicht von der Extraktionssäule heruntergewaschen und an der Extraktionssäule zurückgehalten werden. Damit die Ionisierung der Analyten nicht beeinträchtigt wird, sollte die Elution der Analyten erst nach 2 Minuten erfolgen.

Für eine empfindliche massenspektrometrische Detektion mittels Elektrospray-Ionisierung sollten die enzymatisch gebildeten Produkte, wie unter II.1.1 ausführlich

beschrieben, leicht ionisierbare funktionelle Gruppen und einen hohen  $m/z$ -Wert besitzen.

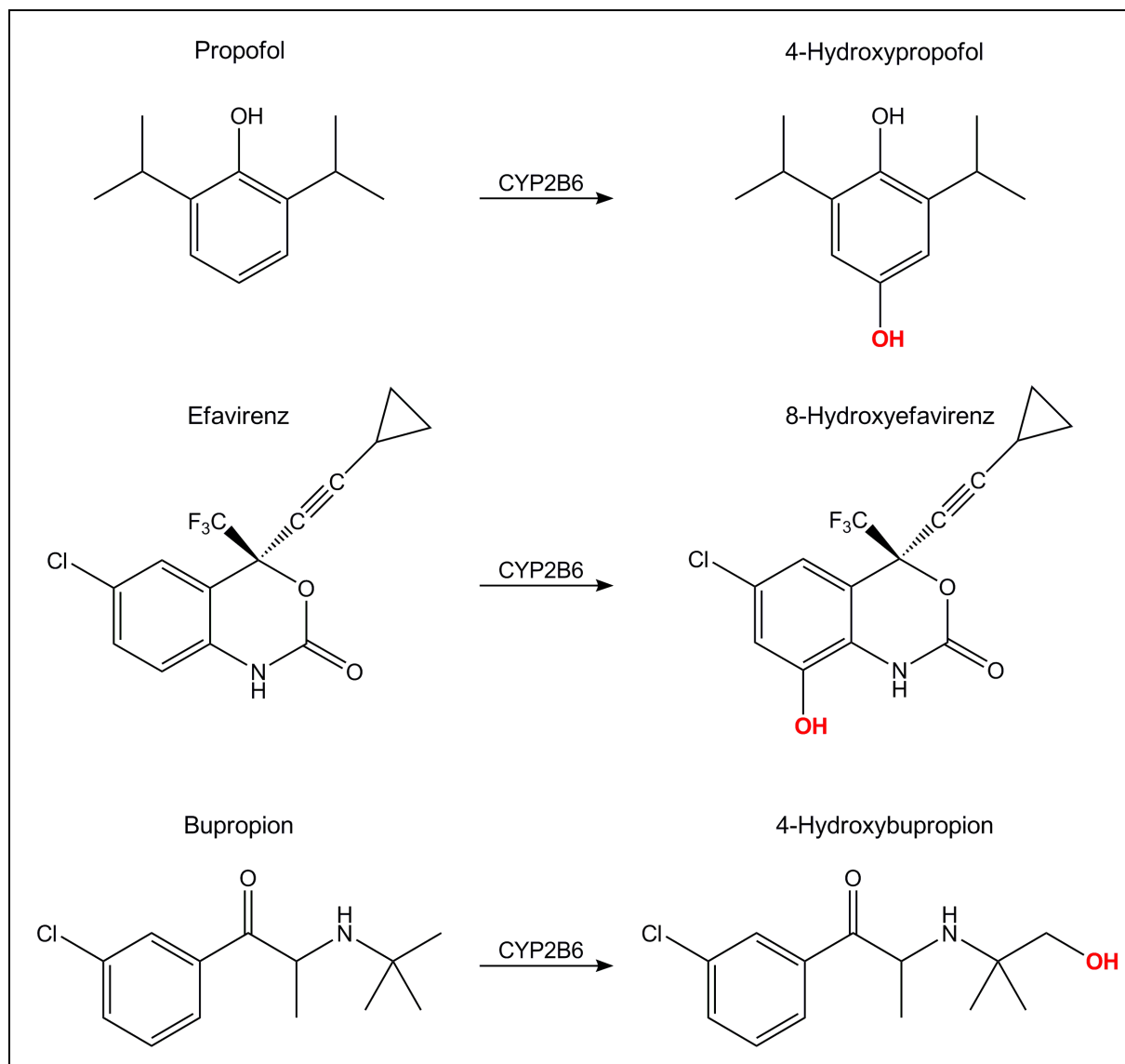
### **Fazit**

Die Auswahl von geeigneten Substraten im Hinblick auf die Online-Festphasenextraktion und die anschließende LC/ESI-MS-Analytik der enzymatisch gebildeten Produkte hat einen sehr großen Einfluss auf die Validität (Richtigkeit, Reproduzierbarkeit) und Empfindlichkeit der Methode. Voraussetzung für einen hohen und schnellen Probendurchsatz zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Testsubstanzen (Arzneimittel, Naturstoffe, Pflanzenextrakte) ist eine schnelle Probenaufbereitung und eine kurze Analysenzeit zur Quantifizierung der Analyten, was durch die Online-Festphasenextraktion hervorragend gegeben ist.

## **1.3.2 Methode zur Bestimmung der Inhibition von CYP2B6**

### **1.3.2.1 Auswahl von Bupropion als geeignetes Substrat**

Die FDA hat im Zusammenhang mit einem Entwurf für Richtlinien bezüglich Arzneimittelinteraktions-Studien<sup>150</sup> eine Reihe von Modellsubstanzen für verschiedene CYP-Enzyme vorgeschlagen (Tab. 6). Diese Substrate sind für die Evaluierung der *In-vitro*-Inhibition von CYP-Enzymen durch Arzneistoffe aufgrund ihrer enzymkinetischen Eigenschaften besonders geeignet. Als Substrate für CYP2B6 werden die Substanzen Bupropion, Efavirenz und Propofol genannt. In Abb. 19 ist die CYP2B6-katalysierte Hydroxylierung von Propofol und Efavirenz dargestellt, die als Markerreaktion für die Bestimmung der Aktivität von CYP2B6 ausgenutzt werden kann.<sup>154,155</sup> Der Hydroxymetabolit von Propofol kann jedoch nicht empfindlich mit ESI/MS nachgewiesen werden und das als Kombinations-therapeutikum zur Behandlung von HIV-Infektionen zugelassene Efavirenz ist derzeit kommerziell nicht erhältlich.



**Abb. 19** CYP2B6-katalysierte Hydroxylierung von Propofol, Efavirenz und Bupropion, als Markerreaktion für *In-vitro*-Untersuchungen zur Inhibition von CYP2B6.

Der Arzneistoff Bupropion ist dagegen kommerziell erhältlich und wird als Substrat für die *In-vitro*-Bestimmung der Inhibition von CYP2B6 verwendet.<sup>141,156</sup> Bupropion ist ein selektiver Noradrenalin-Dopamin-Wiederaufnahmehemmer und gehört zur Gruppe der atypischen Antidepressiva. Bekannt ist der Wirkstoff als Zyban<sup>®</sup>, ein zur Raucherentwöhnung in Deutschland zugelassenes Arzneimittel. Bupropion wird selektiv *in vitro*<sup>156</sup> und *in vivo*<sup>157</sup> von CYP2B6 zu 4-Hydroxybupropion verstoffwechselt (Abb. 19), so dass diese Substanz auch mit Hilfe von HLM oder einer Mischung aus CYP-Enzymen zur Bestimmung der Inhibition von CYP2B6 verwendet werden kann.<sup>141,156</sup>

### 1.3.2.2 Identifizierung von 4-Hydroxybupropion

Da 4-Hydroxybupropion nicht als Reinsubstanz zur Verfügung stand, wurde Bupropion mit CYP2B6 und NADPH inkubiert (Details siehe V.2.3.2), wobei durch LC/MS-Analytik im Full-Scan-Modus ein Peak mit einem  $m/z$ -Wert von 256 im Chromatogramm identifiziert werden konnte. Hydroxybupropion besitzt ein Molekulargewicht von 255 und somit ergibt sich als  $[M+H]^+$ -Ion ein  $m/z$ -Wert von 256. Zur Verifizierung wurde Bupropion mit CYP2B6 und NADPH in Anwesenheit von Tranylcypromin (10  $\mu$ M) inkubiert. Tranylcypromin ist ein Inhibitor von CYP2B6 mit einem  $IC_{50}$ -Wert von ca. 5,2  $\mu$ M.<sup>158</sup> In Anwesenheit von Tranylcypromin (10  $\mu$ M) wurde die CYP2B6-katalysierte Umsetzung von Bupropion zu Hydroxybupropion ungefähr zu 80 % gehemmt. D. h. die Restaktivität von CYP2B6 betrug bezogen auf die Kontrollinkubation ca. 20 %.

### 1.3.2.3 Analytik von 4-Hydroxybupropion

Die Analytik von 4-Hydroxybupropion, das Produkt der CYP2B6-katalysierten Umsetzung von Bupropion, wurde mittels LC/ESI-MS mit Online-Festphasenextraktion (siehe II.1.2) durchgeführt. Für die Wahl der Zusammensetzung der mobilen Phase und der HPLC-Säule ist vor allem die Acidität bzw. Basizität der funktionellen Gruppen der zu analysierenden Substanzen ausschlaggebend. Der Metabolit Hydroxybupropion besitzt wie Bupropion ein sekundäres Amin als basische funktionelle Gruppe (Abb. 19) und hat somit wie die Ausgangssubstanz einen ähnlichen  $pK_S$ -Wert von ungefähr 7,9.<sup>159</sup>

Um eine vollständige Retention des Bupropion-Metaboliten an der verwendeten RP18-Extraktionssäule (Zorbax, 4,6 x 12,5 mm; 5  $\mu$ m) zu erhalten, wurde für den Ladepuffer der Online-Festphasenextraktion eine Mischung aus 10 mM Ammoniumacetat (pH 7) und Methanol (90/10) gewählt. Das sekundäre Amin von Hydroxybupropion liegt bei pH 7 zwar zu ca. 90 % protoniert vor, dennoch zeigte Hydroxybupropion aufgrund seiner lipophilen Struktur eine vollständige Retention an der Extraktionssäule bei 10 % Methanol im Ladepuffer. Bei höheren Methanolkonzentrationen (15 % bzw. 20 %) wurde keine vollständige Retention von Hydroxybupropion erreicht. Ein organischer Fließmittelanteil von 10 % Methanol im Ladepuffer ist sehr gut geeignet, um viele polare Komponenten der Probenmatrix



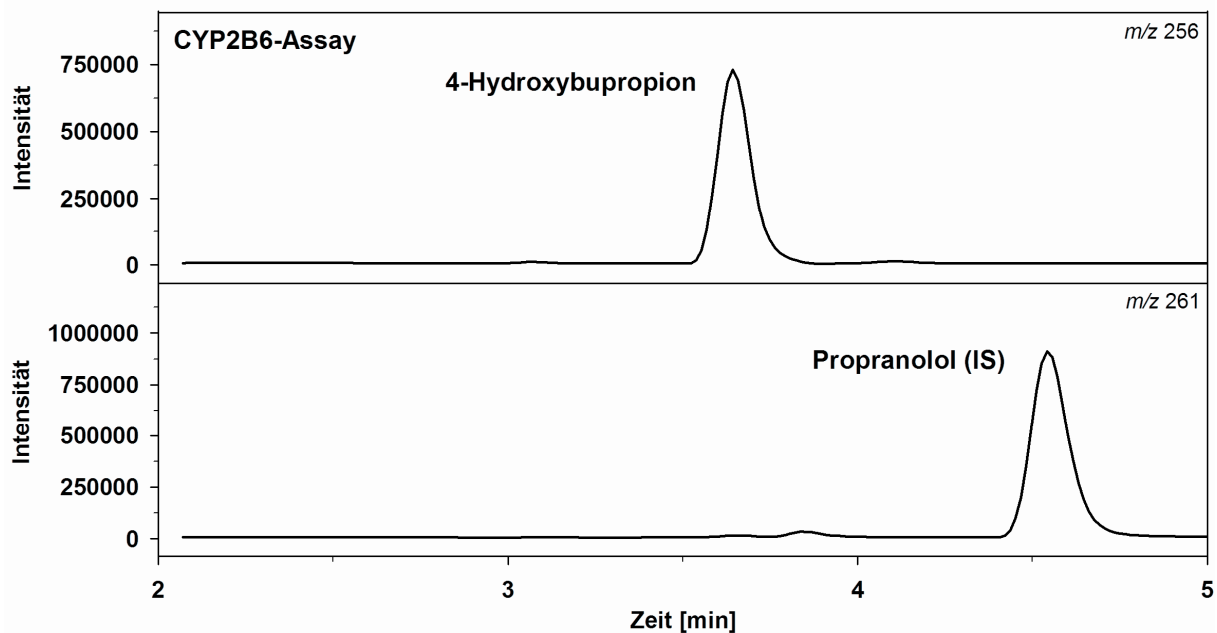
(Salze, Polyphenole, Zucker) von der verwendeten RP18-Extraktionsäule zu eluieren.<sup>80,82</sup> Der pH-Wert des wässrigen Fließmittelanteils sollte für eine vollständige Retention von Hydroxybupropion bei höheren Methanolkonzentrationen (>10 %) nicht erhöht werden, da das verwendete Säulenmaterial bei pH-Werten größer als 8 instabil ist.

Für die chromatographische Trennung von 4-Hydroxybupropion wurde eine spezielle C14-Säule (Zorbax Bonus-RP; 3,0 x 100 mm; 3,5 µm; Agilent) verwendet, die durch eingebettete Amid-Linker und dreifaches Endcapping der Restsilanolgruppen gegenüber unmodifizierten RP-Phasen eine hervorragende Trennung basischer Substanzen ermöglicht. Der Amid-Linker verstärkt die Wechselwirkung von polaren Substanzen mit der C14-Kette und erhöht somit die Selektivität der chromatographischen Trennung. Zusätzlich minimieren Isopropylreste sowie das dreifache Endcapping die Restsilanolgruppenaktivität des Säulenmaterials und verhindern somit bei pH-Werten von 3 bis 7 ein Peaktailing basischer Substanzen. Da Restsilanolgruppen bei pH-Werten größer als ca. 3,5 teilweise deprotoniert vorliegen, zeigen basische Substanzen vor allem auf unmodifizierten RP-Phasen starke ionische Wechselwirkungen, was durch ein ausgeprägtes Peaktailing im Chromatogramm ersichtlich wird.

Für die chromatographische Trennung von 4-Hydroxybupropion wurde ein Gradient aus Wasser/10 mM Ammoniumacetat/0.1 % Ameisensäure (A) und Acetonitril/0.1 % Ameisensäure (B) verwendet. Das wässrige Fließmittel (A) besitzt einen pH-Wert von ca. 3,5. Trotz vollständiger Protonierung von Hydroxybupropion wurde aufgrund der verwendeten Säule ein relativ symmetrischer Peak erhalten (Abb. 20).

Mit einem Fließmittelgradienten (25 auf 40 % B) wurde für 4-Hydroxybupropion eine Retentionszeit von 3,7 min erhalten (Abb. 20). Als interner Standard (IS) wurde der Arzneistoff Propranolol verwendet, der ähnliche strukturelle Eigenschaften wie Hydroxybupropion aufweist und demzufolge ein vergleichbares Retentionsverhalten auf dem verwendeten Säulenmaterial zeigt. Die Retentionszeit von Propranolol betrug 4,6 min. 4-Hydroxybupropion und Propranolol wurden als  $[M+H]^+$ -Ionen mit ihren entsprechenden  $m/z$ -Werten von 256 bzw. 261 detektiert (Abb. 20). Hydroxybupropion ist durch seine strukturellen Eigenschaften vor allem durch den protonierbaren Stickstoff mittels Elektrospray leicht ionisierbar und empfindlich mittels ESI/MS zu bestimmen.<sup>141,160</sup> Aufgrund der relativ hohen Retention von

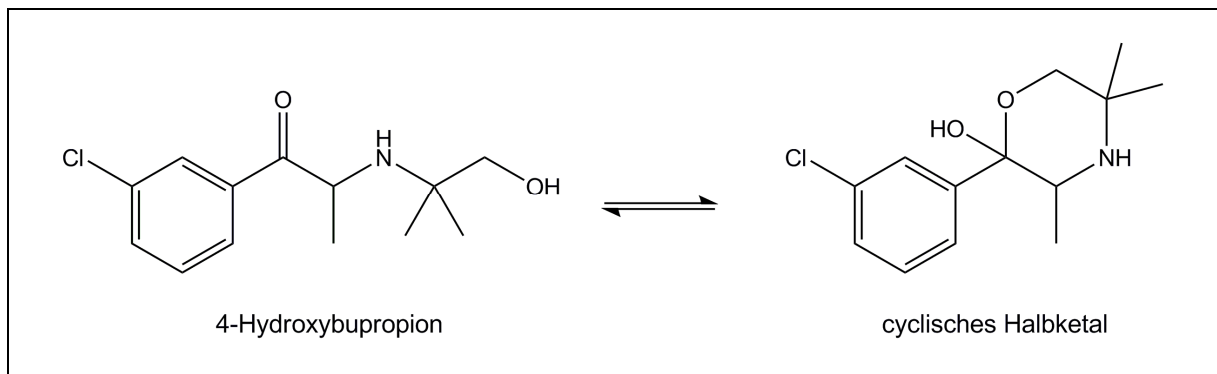
4-Hydroxybupropion und Propranolol auf RP-Material sind so kaum Interferenzen mit polaren bis mittelpolaren Komponenten der Pflanzenmatrix zu erwarten. Dennoch ist es wichtig, die Wiederfindung des Metaboliten in Anwesenheit der zu testenden Pflanzenextrakte zu überprüfen (siehe II.1.3.2.4).



**Abb. 20** Extrahierte Ionenspuren von 4-Hydroxybupropion ( $m/z$  256) und Propranolol (IS, interner Standard;  $m/z$  261) nach LC/ESI-MS mit Online-Festphasenextraktion.

Da in einem Inkubationsansatz neben dem Inhibitor (z. B. Arzneistoff, Naturstoff, Pflanzenextrakt) das Substrat in einer höheren Konzentration im Vergleich zum Metaboliten enthalten ist, müssen Substrat und Metabolit chromatographisch voneinander getrennt sein, um eine Ionensuppression des Metaboliten in der ESI-Quelle zu vermeiden. Da durch CYP-Enzyme meist polare funktionelle Gruppen (z. B. Hydroxyl) eingeführt werden, zeigt das Substrat in der Regel eine wesentlich höhere Retention auf RP-Materialien. Bupropion und Hydroxybupropion dagegen haben bei Verwendung einer 50 mm-Säule (Zorbax Bonus-RP; 2,1 x 50 mm; 3,5  $\mu$ m) ähnliche Retentionszeiten, so dass keine ausreichende Trennung von Bupropion und Hydroxybupropion erzielt wurde. Der Grund hierfür ist vermutlich, dass sich Hydroxybupropion intramolekular in ein zyklisches Halbketal umlagert (Abb. 21),<sup>161</sup> das ein ähnliches Retentionsverhalten an dem verwendeten RP-Material aufweist wie Bupropion. Eine 100 mm-Säule gleichen Säulenmaterials (3,0 x 100 mm; 3,5  $\mu$ m)

konnte Substrat und Metabolit selektiv voneinander trennen. Bei einer nicht ausreichenden chromatographischen Trennung wurde eine Ionensuppression von Hydroxybupropion durch Bupropion beobachtet. Welche Auswirkungen eine Ionensuppression von Hydroxybupropion durch Bupropion hat, soll am Beispiel der  $K_m$ -Wert-Bestimmung der CYP2B6-katalysierten Umsetzung von Bupropion in Kapitel II.1.3.2.5 veranschaulicht werden.



**Abb. 21** Intramolekulare Umlagerung von 4-Hydroxybupropion in ein zyklisches Halbketal.

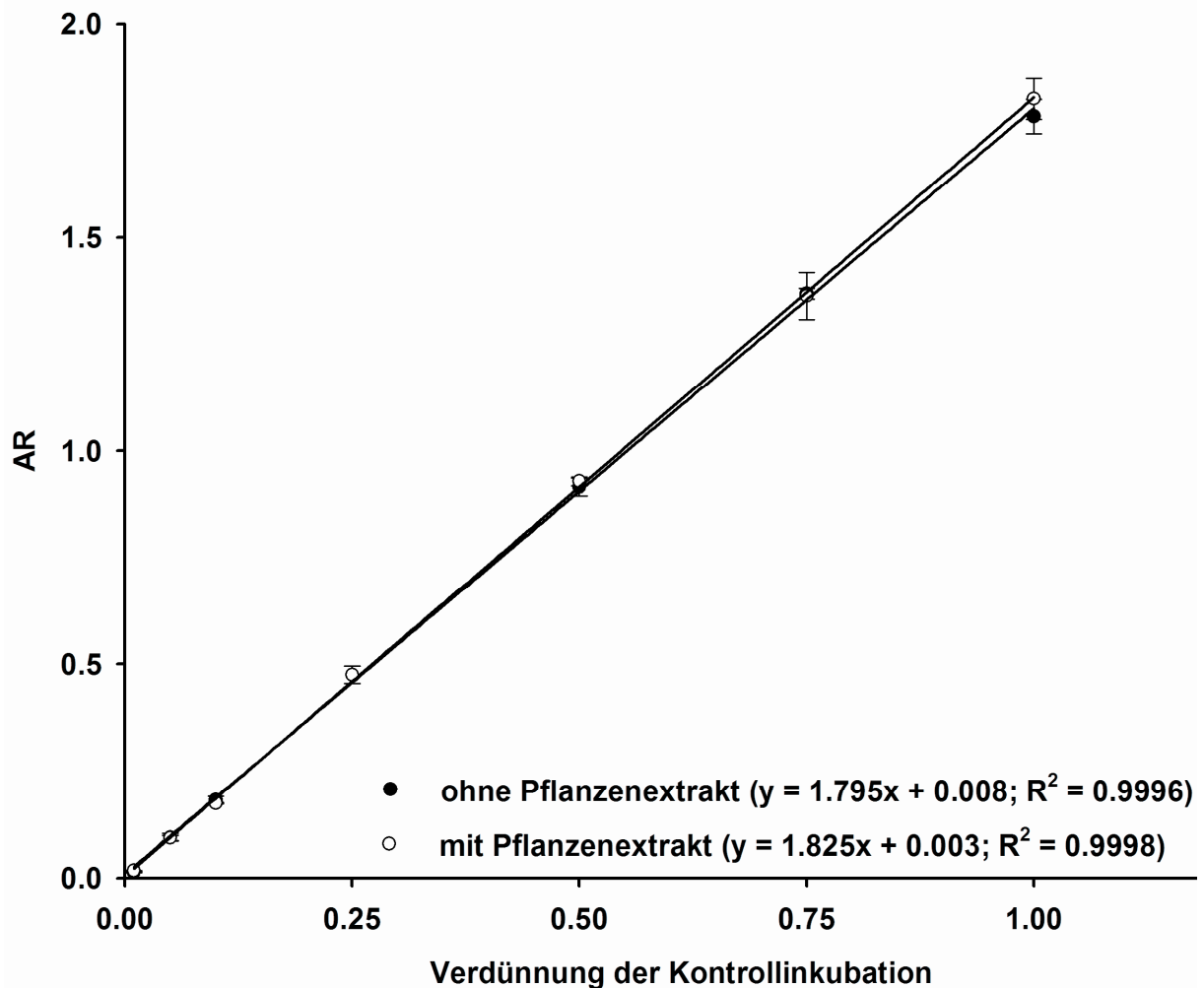
### 1.3.2.4 Bestimmung der Linearität

Grundvoraussetzung für eine korrekte Bestimmung der inhibitorischen Aktivität ist der lineare Zusammenhang zwischen der Konzentration des Metaboliten und dem Verhältnis der gemessenen Peakflächen von Metabolit zu internem Standard (IS, Propranolol). Das bedeutet, dass die Response des Massenspektrometers im Bereich der zu analysierenden Metabolitenkonzentrationen eine Linearität aufweisen muss. Hierfür wurden in einem sinnvollen Konzentrationsbereich Kalibrierstandards der Metaboliten in der Probenmatrix (Inkubationspuffer) hergestellt und die gemessenen Peakflächenverhältnisse (Metabolit/IS) gegen die Metabolitenkonzentrationen aufgetragen. Da jedoch Hydroxybupropion als Reinsubstanz nicht zur Verfügung stand, wurde als Stammlösung von einer Inkubation von Bupropion mit CYP2B6 und NADPH (Kontrollinkubation) ausgegangen. Eine Kontrollinkubation enthält keinen Inhibitor, so dass die Metabolitenkonzentration dieser Inkubation der maximal zu analysierenden Konzentration entspricht. So wurden ausgehend von der Kontrollinkubation (entspricht 1) verschiedene Verdünnungen hergestellt (3:4, 1:2, 1:4, 1:10, 1:20, 1:100). Dabei entspricht beispielsweise die Lösung der

1:100-Verdünnung (0,01) einer Hydroxybupropion-Konzentration, die bei einer 99 %igen Inhibition von CYP2B6 enzymatisch gebildet wird. Hiermit beträgt die Restaktivität von CYP2B6 1 %. Für die Bestimmung der Linearität wurde so ein Konzentrationsbereich für 4-Hydroxybupropion festgelegt, der einem Bereich einer 1 bis 100 %igen Restaktivität von CYP2B6 entspricht, was für eine Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Testsubstanzen völlig ausreichend ist.

Für die graphische Darstellung wurden die resultierenden Peakflächenverhältnisse Metabolit/IS gegen die Verdünnungen der Kontrollinkubation aufgetragen (Abb. 22). Nach linearer Regression der erhaltenen Datenpunkte konnte so die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  berechnet werden. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  gibt an, inwieweit ein linearer Zusammenhang der Messwerte besteht, wobei  $R^2$  einen Wert zwischen 0 (kein linearer Zusammenhang) und 1 (exakter linearer Zusammenhang) annimmt. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für Hydroxybupropion betrug nach linearer Regression der erhaltenen Datenpunkte 0,9996, so dass ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und dem gemessenen Signal des Metaboliten angenommen werden kann.

Auf gleiche Weise wurde die Linearität von 4-Hydroxybupropion in Anwesenheit eines Pflanzenextraktes (500 µg/ml Fieberkrautextrakt) bestimmt (Abb. 22). Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für Hydroxybupropion in Anwesenheit von 500 µg/ml Fieberkrautextrakt (*Tanacetum parthenium*) entsprach nach linearer Regression der erhaltenen Datenpunkte 0,9998, so dass auch hier ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und dem gemessenen Signal des Metaboliten angenommen werden kann. Des Weiteren waren die erhaltenen Geraden in An- und Abwesenheit von Fieberkrautextrakt nahezu identisch, so dass die Anwesenheit des Pflanzenextrakts die Analytik des Metaboliten und somit das Ergebnis nicht beeinflusste.

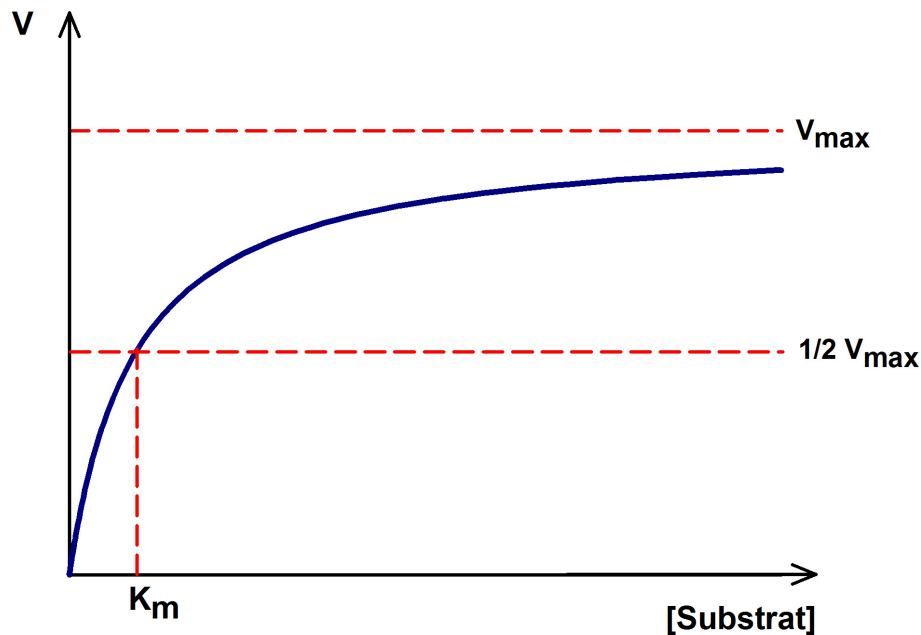


**Abb. 22** Bestimmung der Linearität von 4-Hydroxybupropion in An- und Abwesenheit von 500 µg/ml Fieberkrautextrakt. Auf der x-Achse ist die Verdünnung der Kontrollinkubation und auf der y-Achse das Peakflächenverhältnis (AR) von Hydroxybupropion und internem Standard Propranolol aufgetragen.

### 1.3.2.5 $K_m$ -Wert-Bestimmung von Bupropion (CYP2B6)

Für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Testsubstanzen ( $IC_{50}$ -Werte) wird das entsprechende Substrat in einer Konzentration eingesetzt, die der Michaelis-Menten-Konstanten, also dem  $K_m$ -Wert entspricht.<sup>150</sup> Der  $K_m$ -Wert ist die Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Umsetzungsgeschwindigkeit erreicht wird. Da der  $K_m$ -Wert für ein Substrat je nach Inkubationsbedingung (Art des Puffers, pH-Wert, Ionenstärke und Temperatur) sehr stark variieren kann, sollte dieser Wert speziell für jedes Labor unter Standardbedingungen bestimmt werden.

Für eine klassische Darstellung eines Michaelis-Menten-Diagramms werden die verschiedenen getesteten Substratkonzentrationen gegen die entsprechenden berechneten Geschwindigkeiten  $V$  aufgetragen (Abb. 23). Die Geschwindigkeit  $V$  ist definiert als die entstehende Metabolitenmenge pro Zeit und Enzymmenge (z. B. pmol/min/pmol Enzym).



**Abb. 23** Klassische Darstellung einer Michaelis-Menten-Kinetik ( $V$ : Umsetzungsgeschwindigkeit;  $V_{max}$ : maximale Umsetzungsgeschwindigkeit,  $K_m$ : Michaelis-Menten-Konstante)

Zur  $K_m$ -Wert-Bestimmung werden unterschiedliche Substratkonzentrationen mit der gleichen Menge an Enzym und NADPH inkubiert, und mit Hilfe von externen Kalibrierstandards werden anschließend die Metabolitenkonzentrationen bestimmt. Enzymatische Reaktionen mit Michaelis-Menten-Kinetik zeigen typischerweise einen hyperbolen Kurvenverlauf mit einem Sättigungsverhalten ab einer bestimmten Substratkonzentration, bei der die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit  $V_{max}$  erreicht wird (Abb. 23). Der hyperbole Kurvenverlauf einer enzymatischen Umsetzung nach Michaelis-Menten lässt sich unter Verwendung der Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  mathematisch wie folgt formulieren:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Gl. 1})$$

$V$  = enzymatische Umsetzungsgeschwindigkeit des Substrats

$V_{\max}$  = maximal erreichbare enzymatische Umsetzungsgeschwindigkeit des Substrats

$[S]$  = Substratkonzentration

$K_m$  = Michaelis-Menten-Konstante

Die Berechnung der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) aus den so erhaltenen Datenpunkten kann mit Hilfe von speziellen Computerprogrammen wie z. B. SigmaPlot<sup>®</sup> mit Enzym-Kinetik-Modul (Systat Software, Chicago, IL, USA) durchgeführt werden. Allerdings lassen sich die Parameter  $K_m$  und  $V_{\max}$  sehr einfach auch durch so genannte Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Scatchard oder Hanes-Woolf annäherungsweise bestimmen. Als bestmögliches Verfahren hat sich die Auftragung nach Hanes-Woolf bewährt, bei der das Verhältnis von Substratkonzentration zur Geschwindigkeit ( $[S]/V$ ) und die Substratkonzentration ( $[S]$ ) einen linearen Zusammenhang ergeben (Abb. 24). Nach linearer Regression lassen sich die Parameter  $K_m$  und  $V_{\max}$  anhand einer Geradengleichung berechnen (Gl. 2), bei der die Steigung der Gerade  $1/V_{\max}$ , der x-Achsenabschnitt  $-K_m$  und der y-Achsenabschnitt  $K_m/V_{\max}$  entspricht (Abb. 24).

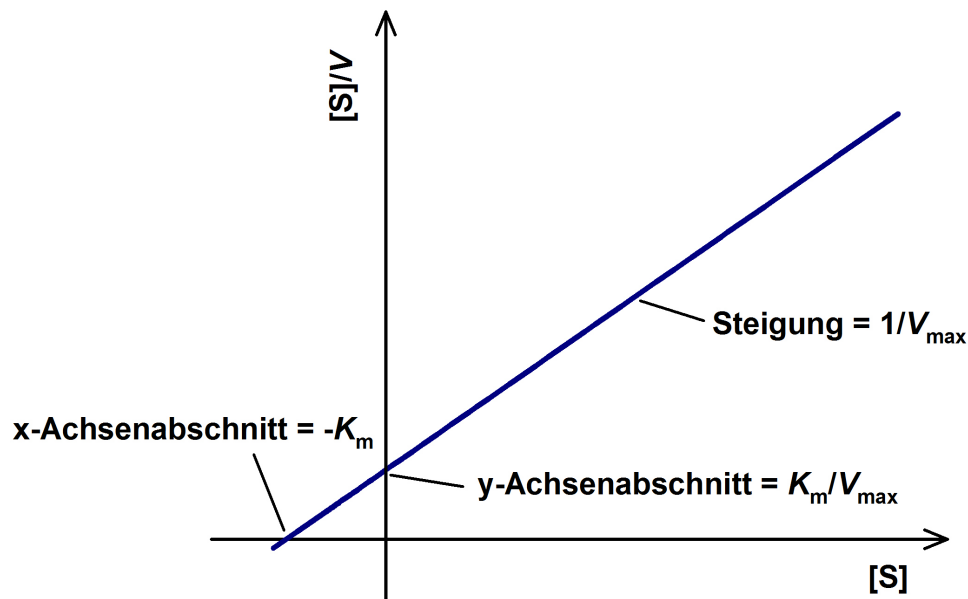
$$\frac{[S]}{V} = \left( \frac{1}{V_{\max}} \right) \cdot [S] + \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (\text{Gl. 2})$$

$[S]$  = Substratkonzentration

$V$  = enzymatische Umsetzungsgeschwindigkeit des Substrats

$V_{\max}$  = maximal erreichbare enzymatische Umsetzungsgeschwindigkeit des Substrats

$K_m$  = Michaelis-Menten-Konstante



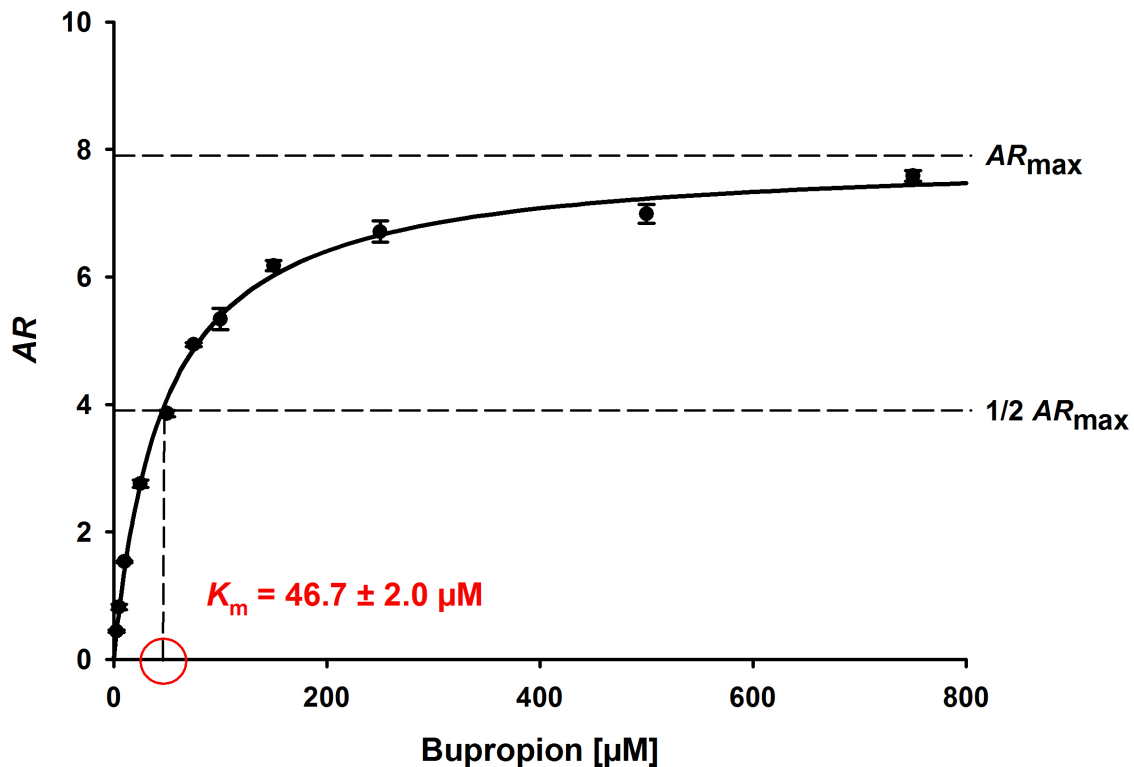
**Abb. 24** Darstellung einer Michaelis-Menten-Kinetik nach Hanes-Woolf ( $[S]$ : Substratkonzentration;  $V$ : Umsetzungsgeschwindigkeit;  $V_{\max}$ : maximale Umsetzungsgeschwindigkeit;  $K_m$ : Michaelis-Menten-Konstante)

Da, wie schon erwähnt, Hydroxybupropion als Reinsubstanz nicht zur Verfügung stand, konnte die enzymatisch umgesetzte Metabolitenmenge nicht mit Hilfe von externen Kalibrierstandards quantifiziert werden. Der Parameter  $V_{\max}$  ließ sich somit für die CYP2B6-katalysierte Umsetzung von Bupropion zu Hydroxybupropion nicht bestimmen, da hierfür die enzymatisch umgesetzte Konzentration an Hydroxybupropion quantifiziert werden muss. Der  $K_m$ -Wert von Bupropion lässt sich jedoch auch ohne Quantifizierung der Metabolitenmenge berechnen, da angenommen werden kann, dass die Peakflächenverhältnisse ( $AR$ ) Metabolit/ Interner Standard direkt proportional zu den entsprechenden Geschwindigkeiten  $V$  sind. Anstelle des Parameters  $V_{\max}$  wird hierfür der Parameter  $AR_{\max}$ , das maximal erreichbare Peakflächenverhältnis, eingeführt.

Anstelle der Geschwindigkeit  $V$  wird so das Verhältnis der Peakflächen ( $AR$ ) Hydroxybupropion/ Interner Standard Propranolol gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Für die Umsetzung von Bupropion durch CYP2B6 zu Hydroxybupropion wird so eine klassische Michaelis-Menten-Kinetik mit Enzymsättigung bei hohen Substratkonzentrationen erhalten (Abb. 25). Mit Hilfe der Software SigmaPlot<sup>®</sup>, die zur Berechnung einen Algorithmus verwendet, wurde für die CYP2B6-katalysierte Umsetzung von Bupropion zu Hydroxybupropion ein  $K_m$ -Wert von  $46,7 \pm 2,0 \mu\text{M}$

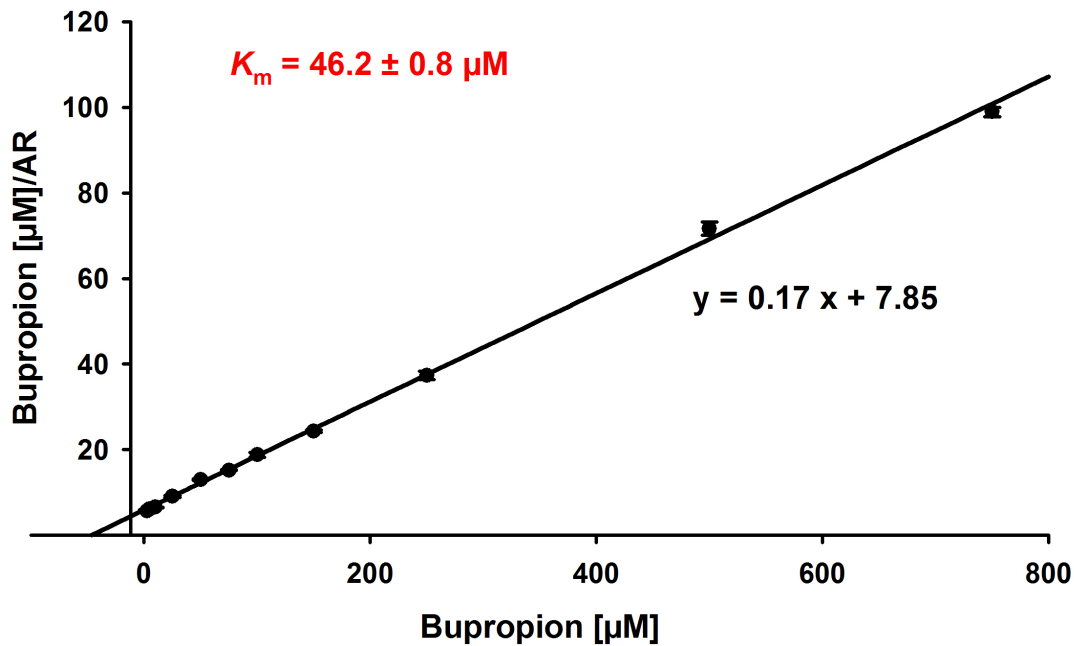


berechnet, der sehr gut mit dem von Walsky und Obach (2004)<sup>141</sup> publizierten Wert von 67  $\mu\text{M}$  übereinstimmt.



**Abb. 25** Michaelis-Menten-Diagramm zur  $K_m$ -Wert-Bestimmung der CYP2B6-katalysierten Umsetzung von Bupropion zu Hydroxybupropion (AR: Peakflächenverhältnis 4-Hydroxybupropion/Interner Standard Propranolol;  $AR_{\text{max}}$ : maximal erreichbares Peakflächenverhältnis;  $K_m$ : Michaelis-Menten-Konstante).

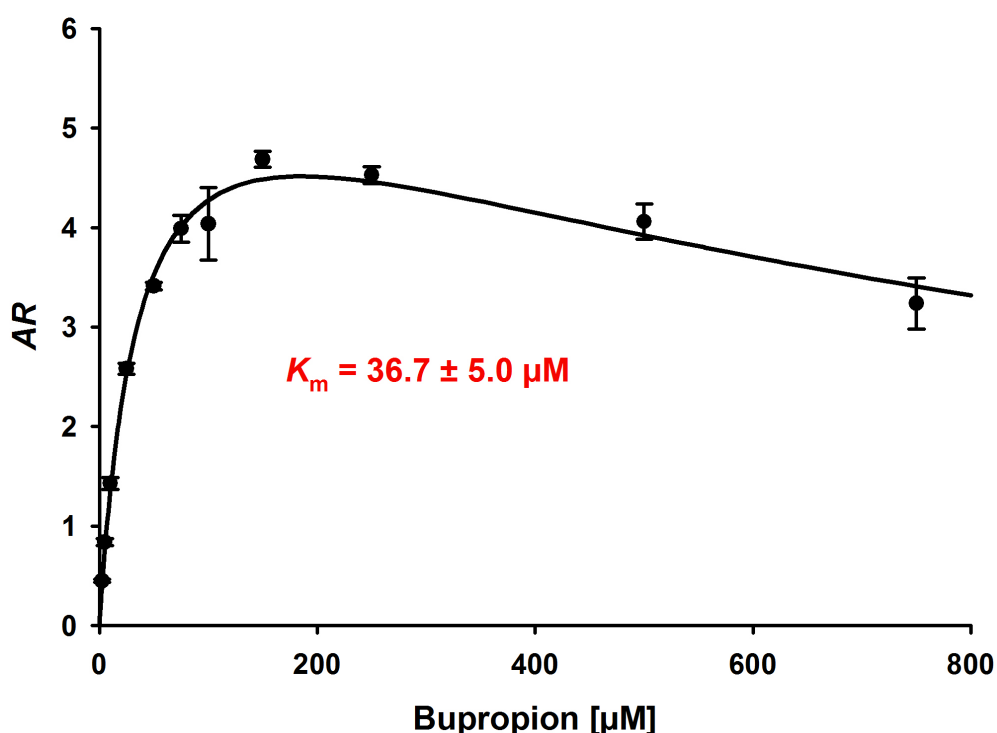
Für die Berechnung des  $K_m$ -Wertes mit Hilfe des Linearisierungsverfahrens nach Hanes-Woolf, wurde in diesem Fall das Verhältnis der Bupropion-Konzentration zum Peakflächenverhältnis (AR; 4-Hydroxybupropion/Propranolol) gegen die Bupropion-Konzentration aufgetragen (Abb. 26). Nach linearer Regression der erhaltenen Datenpunkte wurde aus der Geradengleichung ein  $K_m$ -Wert von  $46,2 \pm 0,8 \mu\text{M}$  berechnet (x-Achsenabschnitt =  $-K_m$ ). Dieser berechnete Wert unterscheidet sich statistisch nicht signifikant ( $P < 0,01$ ) von dem mit SigmaPlot<sup>®</sup> ermittelten Wert ( $46,7 \mu\text{M}$ ).



**Abb. 26** Modifizierte Darstellung der Michaelis-Menten-Kinetik nach Hanes-Woolf zur  $K_m$ -Wert-Bestimmung der CYP2B6-katalysierten Umsetzung von Bupropion zu 4-Hydroxybupropion (AR: Peakflächenverhältnis 4-Hydroxybupropion/Interner Standard Propranolol;  $K_m$ : Michaelis-Menten-Konstante).

Des Weiteren soll am Beispiel der  $K_m$ -Wert-Bestimmung für die Umsetzung von Bupropion zu 4-Hydroxybupropion durch CYP2B6 veranschaulicht werden, wie sich eine Ionensuppression von Hydroxybupropion aufgrund einer nicht vollständigen analytischen Trennung von Bupropion und Metabolit (siehe II.1.3.2.3) auf die Berechnung des  $K_m$ -Wertes auswirkte. Für eine modifizierte Darstellung des Michaelis-Menten-Diagramms wurden wie zuvor die ermittelten Peakflächenverhältnisse (AR) gegen die entsprechende Substratkonzentration aufgetragen (Abb. 27). Abb. 27 zeigt im Gegensatz zur Abb. 25, dass bei einer Bupropion-Konzentration von ca. 200 µM ein Maximum erreicht wurde und mit höheren Konzentrationen der Kurvenverlauf wieder abflacht. Diese Art von Kurvenverlauf deutet normalerweise auf eine Substratinhibition hin. In diesem Fall aber wurde die Ionenbildung von 4-Hydroxybupropion in der Ionisierungskammer (ESI-Quelle) durch Bupropion unterdrückt, so dass vor allem bei sehr hohen Bupropion-Konzentrationen zu niedrige Peakflächen von 4-Hydroxybupropion detektiert wurden. Im Michaelis-Menten-Diagramm (Abb. 27) spiegelt sich dies durch einen abflachenden Kurvenverlauf bei hohen Konzentrationen von Bupropion (>200 µM) wider. Durch

Auswertung dieser Daten mit Hilfe von SigmaPlot® resultiert fälschlicherweise ein  $K_m$ -Wert von  $36,7 \pm 5,0 \mu\text{M}$  und eine Kinetik mit Substratinhibition für die CYP2B6-katalysierte Umsetzung von Bupropion zu 4-Hydroxybupropion. Für den CYP2B6-Assay zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Testsubstanzen hätte die Ionensuppression von 4-Hydroxybupropion zur Folge, dass eine stärkere inhibitorische Aktivität der Testsubstanzen vorgetäuscht wird. Da die Ionenbildung von 4-Hydroxybupropion aufgrund einer Koelution durch Bupropion unterdrückt wird, liegen die ermittelten Werte für Hydroxybupropion generell zu niedrig.



**Abb. 27** Michaelis-Menten-Diagramm zur  $K_m$ -Wert-Bestimmung der CYP2B6-katalysierten Umsetzung von Bupropion zu 4-Hydroxybupropion, wobei die Ionenbildung von Hydroxybupropion in der ESI-Quelle aufgrund einer Koelution durch Bupropion unterdrückt wurde (AR: Peakflächenverhältnis 4-Hydroxybupropion/Interner Standard Propranolol;  $K_m$ : Michaelis-Menten-Konstante).

### 1.3.2.6 Durchführung des CYP2B6-Assays

Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von CYP2B6 wurde mit einer Bupropion-Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  durchgeführt. Diese Konzentration entspricht weitgehend dem ermittelten  $K_m$ -Wert von Bupropion ( $46,7 \mu\text{M}$ ). Die Enzym-

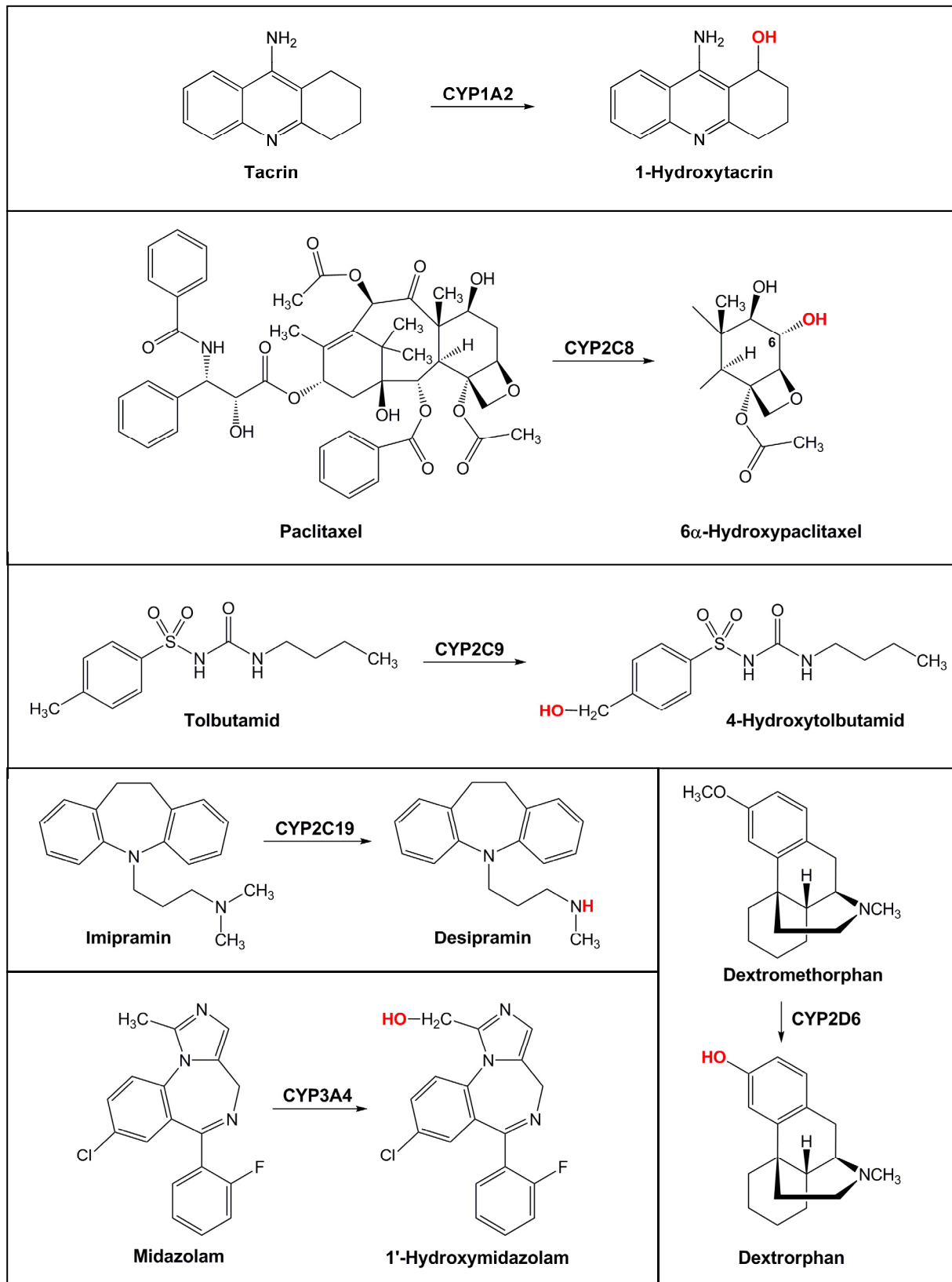
konzentration und die Inkubationszeit wurden entsprechend der Publikation von Walsky und Obach (2004)<sup>141</sup> auf 6 pmol/ml und 20 min festgelegt, was eine ausreichende Detektion von 4-Hydroxybupropion mittels LC/MS mit Online-Festphasenextraktion gewährleistet.

### **1.3.3 Methoden zur Bestimmung der Inhibition von CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4**

Als Basis für die Entwicklung der Methoden zur Bestimmung der Inhibition von CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 diente die von M. Unger entwickelte und validierte LC/MS-Methode mit automatischer Probenextraktion für die simultane Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte.<sup>80</sup> Die simultane Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen wird auch als Cocktail-Methode bezeichnet, da eine Mischung aus verschiedenen Substraten und rekombinanten CYP-Enzymen eingesetzt wird.

#### **Cocktail-Methode**

Durch Verwendung der Cocktail-Methode kann die Hemmung der sechs wichtigsten humanen CYP-Enzyme 1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 durch Pflanzenextrakte mittels LC/MS nach automatischer Probenextraktion (siehe II.1.2) gleichzeitig bestimmt werden und stellt damit eine schnelle, effiziente und reproduzierbare Screening-Methode für die Identifizierung von Pflanzenextrakten als Inhibitoren von CYP-Enzymen dar.<sup>80</sup> Hierfür werden die Pflanzenextrakte in einem Phosphatpuffer mit NADPH, einer kommerziell erhältlichen Mischung aus rekombinanten CYP-Enzymen (Supermix<sup>®</sup>, Gentest) bestehend aus CYP1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 und mit den entsprechenden Substraten inkubiert. Die verwendeten Substrate sind Tacrin (CYP1A2), Paclitaxel (CYP2C8), Tolbutamid (CYP2C9), Imipramin (CYP2C19), Dextromethorphan (CYP2D6) und Midazolam (CYP3A4). Diese werden durch die jeweiligen Isoenzyme zu den entsprechenden Produkten metabolisiert (Abb. 28).

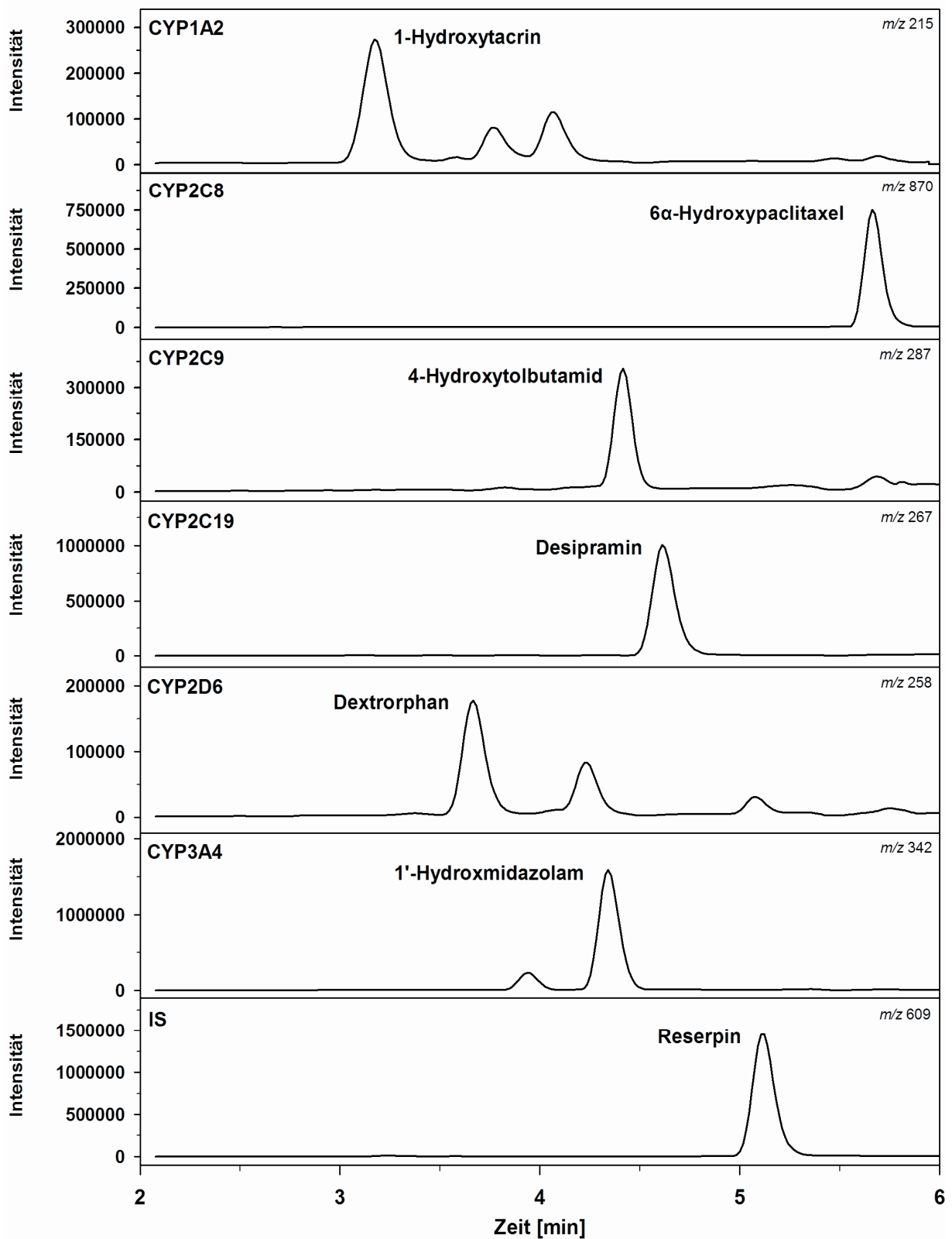


**Abb. 28** Markerreaktionen zur Bestimmung der Inhibition von CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4.<sup>80</sup>

Nach Abstoppen der enzymatischen Umsetzung der Substrate mit eiskaltem Methanol und nach der Zentrifugation der Proben werden die Metabolite mittels LC/MS nach automatischer Probenextraktion analysiert (Abb. 29). Als interner Standard (IS) wird Reserpin der Abstopplösung zugesetzt. Zur Berechnung der inhibitorischen Aktivität der Testsubstanz (z. B. Pflanzenextrakt) wird das Verhältnis der Peakfläche von Metabolit zu internem Standard verwendet. In Kapitel II.1.3.4 wird die Berechnung der inhibitorischen Aktivität ausführlich beschrieben. Im extrahierten Ionen-Chromatogramm der  $m/z$ -Werte von 1-Hydroxytacrin und 1'-Hydroxymidazolam (Abb. 29) werden weitere Peaks mit identischen  $m/z$ -Werten erhalten, da bei Tacrin und Midazolam weitere Hydroxymetabolite entstehen. Zum Beispiel katalysiert CYP3A4 in einem geringen Umfang auch die Hydroxylierung von Midazolam zu 4-Hydroxymidazolam.<sup>162</sup>

Es konnte zwar gezeigt werden, dass die Cocktail-Methode hervorragend als Screening-Methode zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten anwendbar ist, jedoch zur Ermittlung von genauen  $IC_{50}$ -Werten bei CYP1A2 und CYP2C19 nur bedingt geeignet ist. Für die simultane Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen mit einer Mischung aus rekombinanten Isoenzymen oder mit humanen Lebermikrosomen müssen die Substrate möglichst spezifisch durch ein Isoenzym metabolisiert werden, so dass keine weiteren CYP-Enzyme an der Oxidationsreaktion des Substrats beteiligt sind. Bei der zugrunde liegenden Cocktail-Methode werden jedoch Tacrin (CYP1A2) und Imipramin (CYP2C19) verwendet, die keine ausreichende Spezifität für das jeweilige Isoenzym zeigen und von weiteren CYP-Enzymen wie CYP2D6<sup>163</sup> oder CYP3A4<sup>164,165</sup> umgesetzt werden. Deshalb wurden basierend auf dieser Cocktail-Methode einzelne Enzym-Assays mit rekombinanten CYP-Enzymen entwickelt, bei denen wegen der Verwendung einzelner Isoenzyme die Substratspezifität keine Rolle spielt.

Mit der Cocktail-Methode konnte die Inhibition von CYP-Enzymen durch mehr als hundert Pflanzenextrakte ohne Interferenzen bestimmt werden. Die Cocktail-Methode stellt somit eine hervorragende Basis für die Entwicklung von Methoden dar, um die Inhibition von CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 mit Einzelassays zu bestimmen.



**Abb. 29** Extrahierte Ionen-Chromatogramme mit  $m/z$ -Werte der entsprechenden Metabolite und des internen Standards Reserpin (IS) nach LC/MS-Analytik mit Online-Festphasenextraktion einer Kontrollinkubation.<sup>80</sup> Die Analyten wurden als  $[M+H]^+$ -Ionen im positiven SIM-Modus detektiert.

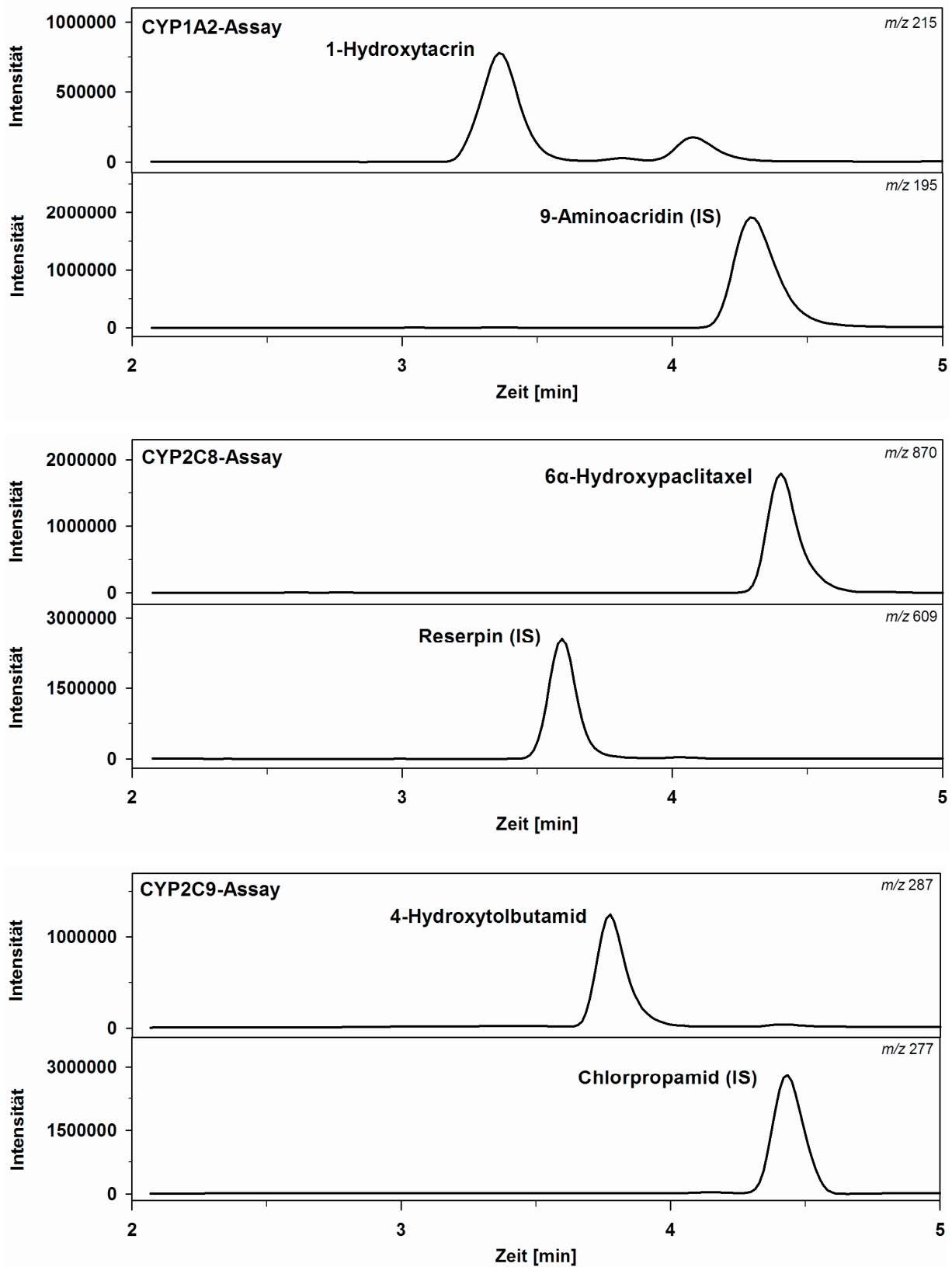
### **Einzelassays zur Bestimmung der Inhibition von CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4**

Für die Bestimmung der Inhibition von CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 mit Einzelassays wurden die Substrate jeweils mit den entsprechenden CYP-Isoenzymen inkubiert. Die Inkubationsbedingungen (Puffer, Substratkonzentration, NADPH-Konzentration) blieben gegenüber der Cocktail-Methode unverändert (siehe Material und Methoden V.2.3.2).

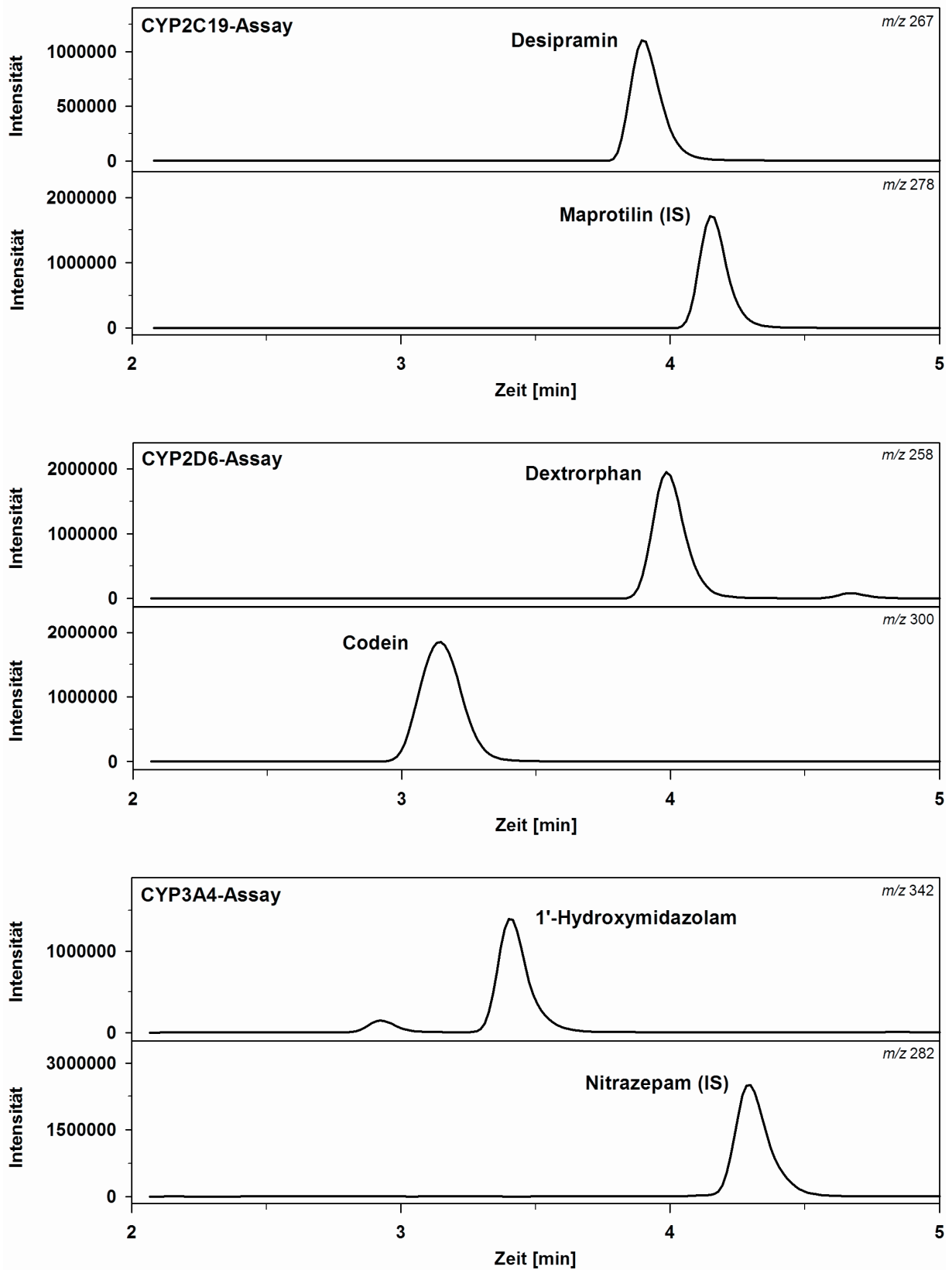
Für die LC/ESI-MS-Analytik der einzelnen CYP-Assays wurden jedoch unterschiedliche interne Standards verwendet. Da die gebildeten Metabolite angefangen von 1-Hydroxytacrin (CYP1A2) bis hin zu 6 $\alpha$ -Hydroxypaclitaxel (CYP2C8) einen sehr weiten Polaritätsbereich abdecken (Abb. 29), musste bei der Cocktail-Methode ein relativ steiler Fließmittelgradient (25 auf 100 % Acetonitril) verwendet werden, damit in einer Analysenzeit von 4 Minuten alle sechs Metabolite inklusive interner Standard eluieren (Abb. 29). Für die einzelnen CYP-Assays wurde jeweils ein anderer interner Standard verwendet, der ähnliche strukturelle Eigenschaften wie der zu analysierende Metabolit aufweist, so dass Metabolit und interner Standard ein ähnliches Retentionsverhalten an RP-Material zeigten. Während Reserpin als interner Standard für den CYP2C8-Assay (6 $\alpha$ -Hydroxypaclitaxel) weiterhin geeignet war, wurden für die weiteren CYP-Assays interne Standards aus der entsprechenden Substanzklasse wie der zu analysierende Metabolit gewählt. Als interne Standards wurden 9-Aminoacridin (1-Hydroxytacrin, CYP1A2), Chlorpropamid (4-Hydroxytolbutamid; CYP2C9), Maprotilin (Desipramin, CYP2C19) und Nitrazepam (1'-Hydroxymidazolam; CYP3A4) für die Einzelassays verwendet (Abb. 30-1/2). Zusätzlich war die Analysenzeit der einzelnen CYP-Assays im Vergleich zur Cocktail-Methode von 4 auf 3 Minuten gekürzt. (Abb. 30-1/2). Die mobile Phase sowie das Säulenmaterial und die Dimension der Extraktionssäule und der analytischen Säule wurden entsprechend der Cocktail-Methode beibehalten (siehe Material und Methoden V.2.3.2).

Nach Extraktion der Inkubationsansätze an einer RP18-Phase (2 min) erfolgten die chromatographische Trennung und die anschließende massenspektrometrische Detektion von Metabolit und internem Standard in einer Analysenzeit von nur 3 min. Die resultierenden Chromatogramme der einzelnen CYP-Assays enthielten die extrahierten Ionenspuren der  $m/z$ -Werte der  $[M+H]^+$ -Ionen von den jeweiligen Metaboliten und den entsprechenden internen Standards (Abb. 30-1/2).





**Abb. 30-1** LC/MS-Chromatogramme der CYP-Assays für CYP1A2 (Substrat: Tacrin), CYP2C8 (Substrat: Paclitaxel) und CYP2C9 (Substrat: Tolbutamid) mit den jeweiligen  $m/z$ -Werten der  $[M+H]^+$ -Ionen von Metaboliten und internen Standards (IS) nach Online-Festphasenextraktion.



**Abb. 30-2** LC/MS-Chromatogramme der CYP-Assays für CYP2C19 (Substrat: Imipramin), CYP2D6 (Substrat: Dextromethorphan) und CYP3A4 (Substrat: Midazolam) mit den jeweiligen  $m/z$ -Werten der  $[M+H]^+$ -Ionen von Metaboliten und internen Standards (IS) nach Online-Festphasenextraktion.

### 1.3.4 Berechnung der inhibitorischen Aktivität

Für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Testsubstanzen werden generell die Messwerte der enzymatisch umgesetzten Metabolitenmenge in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen prozentual mit den Werten der Kontrollinkubation verglichen. Die Kontrollinkubation enthält keinen Inhibitor und entspricht somit einer 100 %igen Enzymaktivität. Die inhibitorische Aktivität einer Testsubstanz wird so als „*Restaktivität in % der Kontrolle*“ ausgedrückt.

In dieser Arbeit wurde bei HPLC-basierten Methoden für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität das Verhältnis der Peakflächen von Metabolit zu internen Standard (Peak-Area-Ratio) der Inhibitorproben und der Kontrollprobe (100 % Enzymaktivität) bestimmt und prozentual miteinander verglichen. Für die Berechnung der *Restaktivität in % der Kontrolle* gilt folgende Gleichung:

$$\text{Restaktivität} = \frac{M_I/IS_I}{M_K/IS_K} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 3})$$

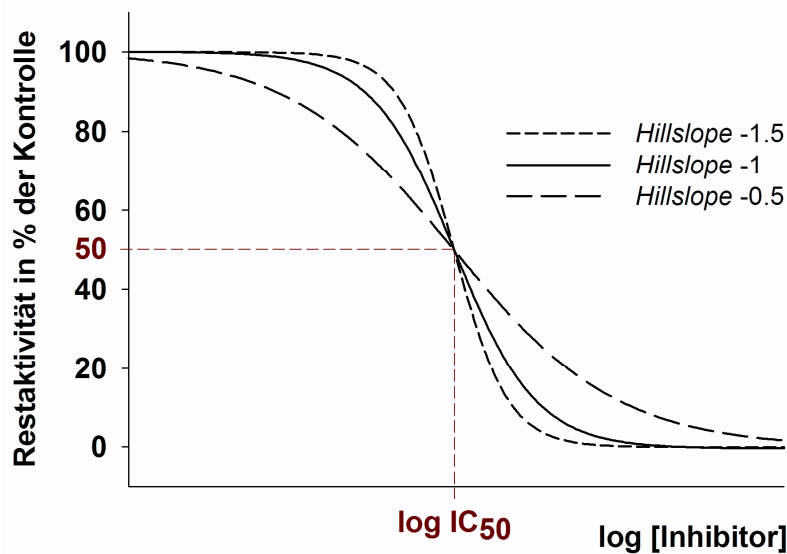
$M_I$  = Peakfläche des Metaboliten der Inhibitorprobe

$IS_I$  = Peakfläche des Internen Standards der Inhibitorprobe

$M_K$  = Peakfläche des Metaboliten der Kontrolle

$IS_K$  = Peakfläche des internen Standards der Kontrolle

Für die graphische Darstellung einer Inhibitionskurve wurden auf der Abszisse (x-Achse) der dekadische Logarithmus der Inhibitorkonzentration und auf der Ordinate (y-Achse) die *Restaktivität in % der Kontrolle* aufgetragen (Abb. 31).



**Abb. 31** Sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurven (Inhibitionskurven) mit unterschiedlichen Hill-Koeffizienten (Hillslope -0.5, -1, -1.5).

### Berechnung der $IC_{50}$ -Werte

Der  $IC_{50}$ -Wert ist die Konzentration eines Inhibitors, die eine 50 %ige Hemmung der Enzymaktivität bewirkt. Die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte erfolgte durch nichtlineare Regression mit Hilfe der 4-Parameter-Gleichung nach Hill, die den sigmoidalen Verlauf der Inhibitions-Kurve annäherungsweise mathematisch beschreibt (Gl. 4). Mit Hilfe des Softwareprogrammes SigmaPlot® (Version 10.0, Systat Software, Chicago, IL, USA) wurden die 4 Parameter ( $min$ ,  $max$ ,  $IC_{50}$  und  $n_H$ ) bestimmt, durch die der Zusammenhang des dekadischen Logarithmus der Inhibitorkonzentration ( $x$ ) und der Restaktivität in % der Kontrolle ( $y$ ) als Funktion ausgedrückt werden kann.

$$y = min + \frac{max - min}{1 + 10^{(log IC_{50} - x) \cdot n_H}} \quad (\text{Gl. 4})$$

$y$  = Restaktivität in % der Kontrolle

$min$  = angestrebtes Minimum der berechneten Kurve

$max$  = angestrebtes Maximum der berechneten Kurve

$IC_{50}$  = Inhibitorkonzentration, die eine 50 %ige Hemmung der Enzymaktivität bewirkt

$x$  = dekadische Logarithmus der Inhibitorkonzentration

$n_H$  = Hill-Koeffizient

Hierbei entspricht *max* dem angestrebten Maximum und *min* dem angestrebten Minimum der berechneten Kurve. Bei einer sigmoidalen Inhibitionskurve (Abb. 31) strebt das Maximum meistens gegen 100 % und das Minimum gegen 0 %. In diesem Zusammenhang wird auch von einem so genannten 100 %- bzw. 0 %-Plateau gesprochen.

Der Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) beschreibt das Maß der Kooperativität der Inhibitor-Enzym-Bindung und gibt die Steigung der Hemmkurve an (Abb. 31).<sup>166</sup> Die Hill-Koeffizienten von Standard-Inhibitionskurven haben einen Betrag von 1. Ist der Betrag des Hill-Koeffizienten größer 1, so erleichtert die Bindung eines Inhibitormoleküls die Bindung eines oder mehrerer weiterer Inhibitormoleküle. Das bedeutet, es besteht eine positive Kooperativität und die Kurve verläuft steil (Abb. 31). Eine eher flache Kurve weist auf eine negative Kooperativität hin. Die Bindung eines Inhibitormoleküls erschwert die Bindung weiterer Inhibitormoleküle und der Betrag des Hill-Koeffizienten ist kleiner 1.<sup>166</sup> Das Vorzeichen des Hill-Koeffizienten gibt den Verlauf der Inhibitionskurve an. Fällt die Kurve mit steigender Inhibitorkonzentration ab, wie z. B. bei der Darstellung von Hemmkurven, in der die Restaktivität gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen wird (Abb. 31), erhält man einen negativen Koeffizienten. Bei einer sigmoidalen Kurve, deren Verlauf mit höheren Konzentrationen ansteigt, resultiert dagegen ein positiver Hill-Koeffizient. Dies wäre z. B. der Fall, wenn die prozentuale Inhibition gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen wird (siehe II.3, Abb. 44).

Wurde eine 100 %ige Inhibition eines Enzyms (entspricht dem 0 %-Plateau) nicht erreicht, wurde der  $IC_{50}$ -Wert durch nichtlineare Regression mit Hilfe der 3-Parameter-Gleichung nach Hill bestimmt (Gl. 5). Für diese Berechnung wird ausgehend von der 4-Parameter-Gleichung der Parameter *min*, das angestrebte Minimum, gleich Null gesetzt, so dass SigmaPlot<sup>®</sup> zur Berechnung die nachfolgende Gleichung verwendet. Die Berechnung schätzt so den weiteren sigmoiden Verlauf der Inhibitionskurve ab und bestimmt dadurch näherungsweise einen  $IC_{50}$ -Wert. Die 3-Parameter-Gleichung nach Hill wurde jedoch nur bei experimentellen Schwierigkeiten, wie Löslichkeitsproblemen bei hohen Inhibitorkonzentrationen, angewendet.

$$y = \frac{\text{max}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x) \cdot n_H}} \quad (\text{Gl. 5})$$

$y$  = Restaktivität in % der Kontrolle

$\text{max}$  = angestrebtes Maximum der berechneten Kurve

$IC_{50}$  = Inhibitorkonzentration, die eine 50 %ige Hemmung der Enzymaktivität bewirkt

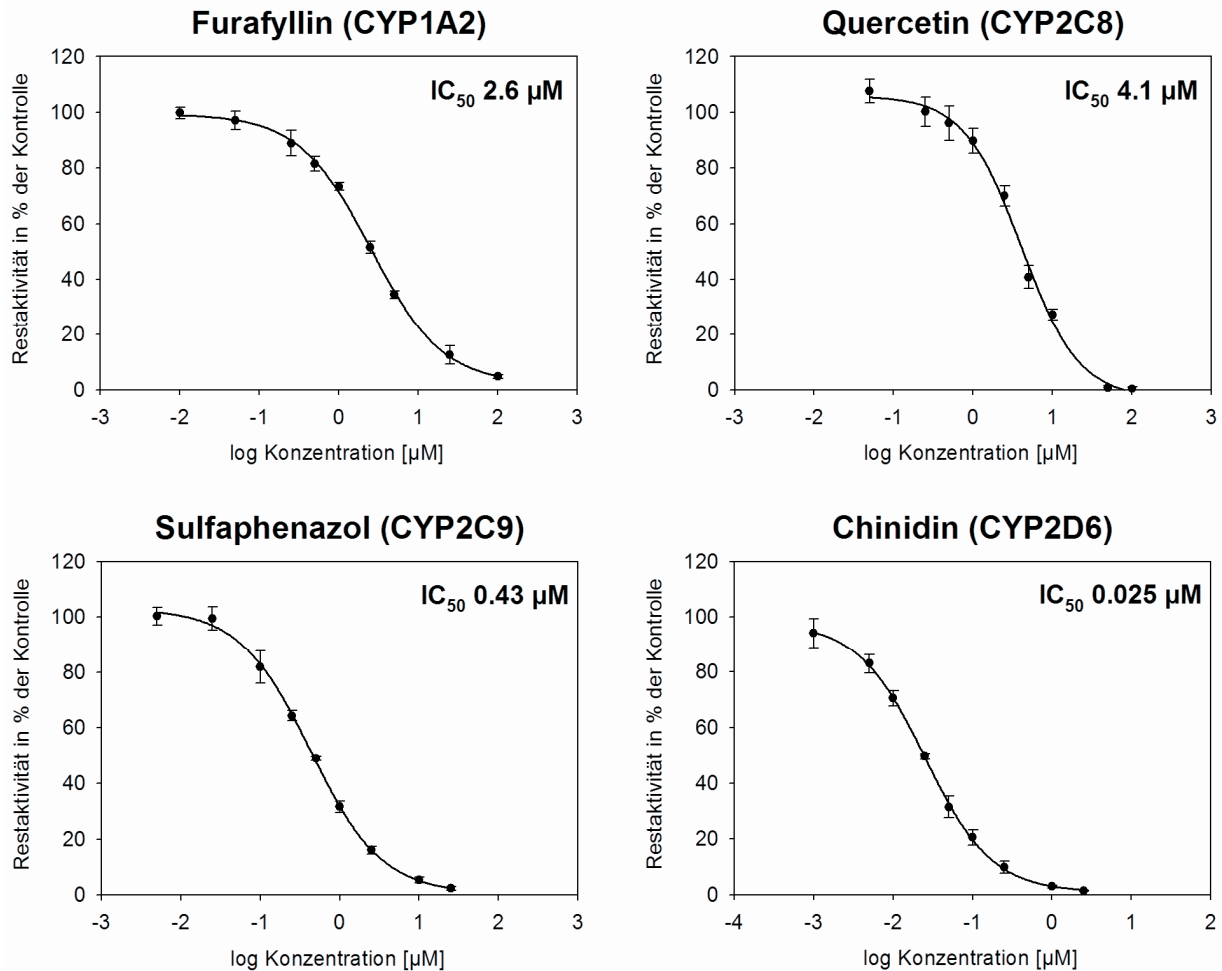
$x$  = dekadische Logarithmus der Inhibitorkonzentration

$n_H$  = Hill-Koeffizient

Experimentell muss für eine exakte Bestimmung von  $IC_{50}$ -Werten immer eine ausreichende Anzahl an Inhibitorkonzentrationen (idealerweise etwa 8 Konzentrationen) über einen bestimmten Konzentrationsbereich getestet werden, um einen sigmoiden Verlauf der Inhibitionskurve mit zwei Plateaus bei ca. 0 und 100 % zu erhalten. Nur so können mit Hilfe der 4-Parameter-Gleichung nach Hill (Gl. 4) valide und exakte  $IC_{50}$ -Werte berechnet werden.

### 1.3.5 Evaluierung der CYP-Assays mittels Standardinhibitoren

Für die Evaluierung der Anwendbarkeit der einzelnen Assays zur Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen wurden  $IC_{50}$ -Werte von so genannten Standardinhibitoren bestimmt.<sup>141,150</sup> Als Standardinhibitoren wurden Furafyllin (CYP1A2), Tranylcypromin (CYP2B6, CYP2C19), Quercetin (CYP2C8), Sulfaphenazol (CYP2C9), Chinidin (CYP2D6) und Ketoconazol (CYP3A4) verwendet. Für alle Inhibitoren wurden sigmoidal-verlaufende Inhibitionskurven für die entsprechenden CYP-Enzyme erhalten. In Abb. 32 sind die für die Inhibitoren Furafyllin (CYP1A2), Quercetin (CYP2C8), Sulfaphenazol (CYP2C9) und Chinidin (CYP2D6) resultierenden sigmoiden Hemmkurven dargestellt. Für alle Inhibitoren wurden sigmoide Hemmkurven mit Hill-Koeffizienten ( $n_H$ ) von 0,9 bis 1,2 erhalten (Tab. 7), so dass die Steigung dieser Hemmkurven der einer Standard-Inhibitionskurve ( $n_H = 1$ ) annäherungsweise entspricht und die Inhibitor-Enzym-Bindung keiner bzw. einer geringen Kooperativität unterliegt (siehe II.1.3.4).



**Abb. 32** Inhibitionskurven für die Inhibitoren Furafyllin (CYP1A2), Quercetin (CYP2C8), Sulfaphenazol (CYP2C9) und Chinidin (CYP2D6).

Die  $IC_{50}$ -Werte wurden mittels nichtlinearer Regression (4-Parameter-Gleichung nach Hill, Gl. 4) berechnet und mit bereits veröffentlichten Literaturwerten verglichen (Tab. 7). Alle ermittelten  $IC_{50}$ -Werte der Standardinhibitoren hatten eine sehr geringe Standardabweichung und lagen im Bereich der bereits publizierten  $IC_{50}$ -Werte (Tab. 7). Damit sind die entwickelten LC/LC-MS-basierten Assays zur *In-vitro*-Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen hervorragend geeignet.

**Tab. 7** Vergleich der durch die LC/MS-Assays ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte der getesteten Standardinhibitoren mit bereits veröffentlichten IC<sub>50</sub>-Werten. Der Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) gibt die Steigung der ermittelten Inhibitionskurve an.

Inhibitor	CYP	IC <sub>50</sub> -Wert [ $\mu$ M]	$n_H$	IC <sub>50</sub> -Wert [ $\mu$ M]	Literatur
Furafyllin	1A2	2,6 $\pm$ 0,1	1,0	0,48	Eagling et al. (1998) <sup>167</sup>
				1,5	Walsky und Obach (2004) <sup>141</sup>
				3,2	Yu et al. (2003) <sup>168</sup>
				6,0	Moody et al. (1999) <sup>169</sup>
Tranlycypromin	2B6	5,5 $\pm$ 0,4	1,1	5,2	Walsky et al. (2006) <sup>158</sup>
Quercetin	2C8	4,1 $\pm$ 0,4	1,2	3,9	Obach et al. (2005) <sup>170</sup>
				7,0	Dierks et al., 2001 <sup>140</sup>
Sulfaphenazol	2C9	0,43 $\pm$ 0,02	1,0	0,14	Eagling et al., 1998 <sup>167</sup>
				0,17	Walsky und Obach, 2004 <sup>141</sup>
				0,44	Weaver et al., 2003 <sup>171</sup>
				0,56	Bu et al., 2001 <sup>172</sup>
Tranlycypromin	2C19	8,6 $\pm$ 0,4	0,9	8,0	Benetton et al., 2003 <sup>173</sup>
				8,9	Yu et al., 2003 <sup>168</sup>
				9,0	Dierks et al., 2001 <sup>140</sup>
				11	Weaver et al., 2003 <sup>171</sup>
Chinidin	2D6	0,025 $\pm$ 0,001	1,0	0,02	Moody et al., 1999 <sup>169</sup>
				0,03	Weaver et al., 2003 <sup>171</sup>
				0,15	Rodrigues et al., 1997 <sup>174</sup>
				0,19	Bu et al., 2001 <sup>172</sup>
Ketoconazol	3A4	0,030 $\pm$ 0,003	1,2	0,015	Weaver et al., 2003 <sup>171</sup>
				0,062	Walsky und Obach, 2004 <sup>141</sup>
				0,10	Dierks et al., 2001 <sup>140</sup>
				0,17	Bu et al., 2001 <sup>172</sup>



## 2 Fluorimetrische Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen

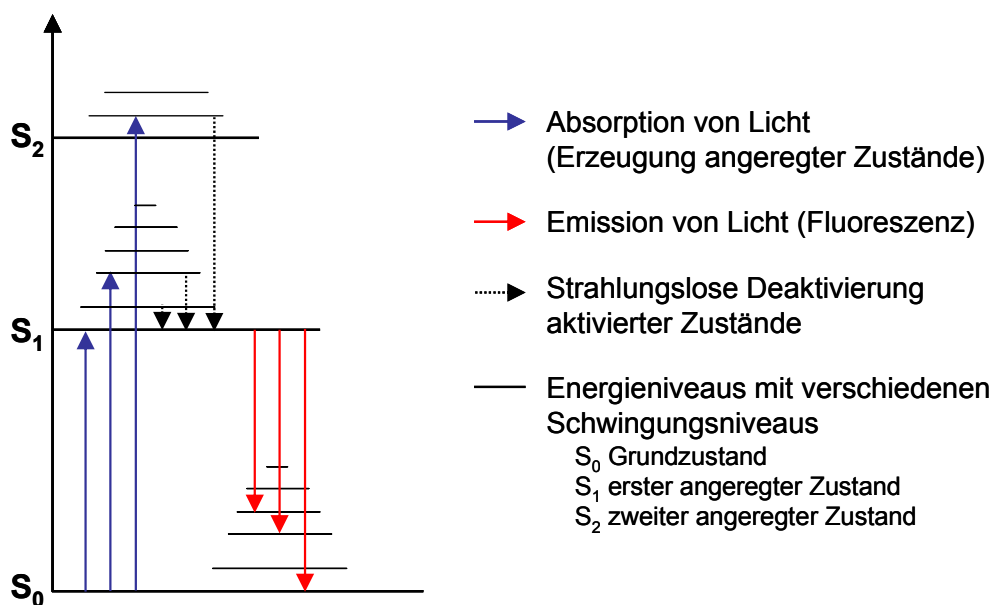
### 2.1 Grundlagen der fluorimetrischen Detektion

Voraussetzung für die Verwendung der Fluorimetrie als Detektionsverfahren sind Moleküle, die nach Absorption von elektromagnetischer Strahlung eine Emission von Licht zeigen. Im Vergleich zur UV/VIS-Spektroskopie ergibt sich eine höhere Selektivität der fluorimetrischen Detektion, da nur sehr wenige Substanzen eine intensive Fluoreszenz aufweisen. Zudem können durch die Wahl der Anregungs- und Emissionswellenlängen substanzspezifische Unterschiede analytisch genutzt werden. Allgemein gilt die Fluorimetrie als analytische Detektionsmethode mit hoher Selektivität und Empfindlichkeit. Die fluorimetrische Detektion von Arzneistoffen ermöglicht in der Regel Bestimmungen in Konzentrationsbereichen, die im Vergleich zur photometrischen Detektion bis zu vier Zehnerpotenzen niedriger liegen.<sup>175</sup>

#### 2.1.1 Prinzip der Fluoreszenz

Anhand des Jablonski-Termschemas (Abb. 33) lässt sich der Vorgang der Fluoreszenz veranschaulicht darstellen. Im nicht-angeregten Zustand befinden sich Moleküle im untersten Schwingungsniveau des Grundzustandes  $S_0$  (Singulett-Zustand; Abb. 33). Durch Anregung bzw. Absorption von sichtbarem bzw. ultraviolettem Licht definierter Wellenlänge erreicht das Elektronensystem ( $\pi$ - oder  $n$ -Elektronen) eines Moleküls den ersten angeregten Singulett-Zustand  $S_1$  oder höhere elektronisch angeregte Zustände  $S_n$  (Abb. 33). Jedem Singulett-Zustand lassen sich eine Anzahl von Schwingungsniveaus zuordnen, die sich weiterhin in feinere Rotationsniveaus unterteilen, die jedoch in Abb. 33 nicht berücksichtigt sind. Nach Anregung mit elektromagnetischer Strahlung relaxiert das Elektronensystem der fluoreszierenden Moleküle schnell und strahlungslos unter Wärmeabgabe (*internal conversion*) stets bis zum niedrigsten Energieniveau des angeregten Zustandes  $S_1$ , von wo aus die Elektronen durch Lichtemission auf die Schwingungsniveaus des Grundzustandes  $S_0$  zurückkehren. Somit fallen die Elektronen unter Aussendung von Licht höherer Wellenlänge und geringerer Energie im Vergleich zur Anregungswellenlänge in den Schwingungsniveaus des Grundzustandes  $S_0$  zurück. Da die Anordnung der Schwingungsniveaus für verschiedene elektronisch angeregte

Zustände z. B.  $S_0$  und  $S_1$  naturgemäß sehr ähnlich ist, lässt sich der Spiegelcharakter des Absorptions- und des Emissionsspektrums begründen.<sup>176</sup> Die typisch breiten Emissionsbanden basieren wie auch in der Absorptionsspektroskopie darauf, dass sich die Gesamtenergie, die in Form von Licht unterschiedlicher Wellenlänge frei wird, aus der Summe der elektronischen, vibratorischen und rotatorischen Beiträgen zusammensetzt. Die Differenz zwischen dem Maximum der Anregungs- und Emissionswellenlänge wird als Stokesche Verschiebung (*Stokes shift*) bezeichnet.



**Abb. 33** Prinzip der Fluoreszenz anhand des Jablonski-Termschemas (modifiziert nach Rücker et al., 1992<sup>177</sup>).

Wechseln die Elektronen vom niedrigsten Energieniveau des angeregten Zustandes  $S_1$  unter Spinumkehr in einen energetisch niedriger liegenden Triplett-Zustand (*intersystem crossing*) und fallen dann unter Lichtemission wieder in den Singulett-Grundzustand  $S_0$  zurück, spricht man von Phosphoreszenz. Fluoreszenz und Phosphoreszenz werden aufgrund der Ausstrahlung von Licht unter dem Oberbegriff Lumineszenz zusammengefasst.

Fluoreszenz tritt nur während oder unmittelbar nach der Anregung des Elektronensystems auf. Die Emission von Fluoreszenzlicht ist aufgrund der Schnelligkeit des ohne Spin-Umkehr verlaufenden Elektronenübergangs ( $10^{-7}$ - $10^{-9}$  s;  $S_1$  zu  $S_0$ ) im Prinzip mit der Lichteinstrahlung beendet, da die Absorption eines

Photons ca.  $10^{-15}$  s beträgt. Eine Phosphoreszenz dagegen dauert noch nach der Anregung an, da die Spin-Umkehr Singulett-Triplett ( $10^{-10}$  s) und Triplett-Singulett ( $100\text{-}10^{-4}$  s) insgesamt mehr Zeit beansprucht.<sup>175,176</sup>

### 2.1.2 Gesetzmäßigkeit der Fluoreszenzintensität

Die Intensität der Fluoreszenz  $I_F$  ist bei gegebener Anregungsenergie  $I_0$  eine Funktion aus absorbierter Energie  $I_A$  und der Quantenausbeute  $\Phi_f$ .<sup>176</sup>

$$I_F = \Phi_F I_A \quad (\text{Gl. 6})$$

Die Quantenausbeute  $\Phi_F$  ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass ein absorbiertes Photon wieder als Photon (wenn auch mit niedrigerer Energie und höherer Wellenlänge) emittiert wird. D. h.  $\Phi_F$  gibt an, wie viele der absorbierten Photonen in Form von Fluoreszenzlicht (emittierte Photonen) wieder ausgesendet werden. Die Quantenausbeute wird nicht nur durch Moleküleigenschaften, sondern auch durch externe Faktoren, wie Lösungsmittel, Anregungswellenlänge oder Konzentration der Lösung, bestimmt. Die Werte für  $\Phi_F$  liegen definitionsgemäß zwischen 0 und 100 %. Ist  $\Phi_F = 0$  %, fluoresziert die Substanz nicht. Bei  $\Phi_F = 100$  % ist die Intensität des Fluoreszenzlichts gleich der Intensität des absorbierten Lichts.

Bei *sehr niedrigen Konzentrationen* lässt sich aus dem *Lambert-Beerschen Gesetz* für die absorbierte Energie  $I_A$  nachfolgende Gleichung ableiten (Gl. 7),<sup>176</sup> wobei  $I_0$  die eingestrahlte Anregungsenergie,  $\varepsilon$  der molare Absorptionskoeffizient,  $c$  die Konzentration der fluoreszierenden Substanz und  $d$  die Schichtdicke der Lösung ist.

$$I_A = 2,303 I_0 \varepsilon c d \quad (\text{Gl. 7})$$

Somit ergibt sich für die Fluoreszenzintensität  $I_F$  folgende Gleichung:

$$I_F = 2,303 \Phi_F I_0 \varepsilon c d \quad (\text{Gl. 8})$$

Die Fluoreszenzintensität  $I_F$  nimmt mit der Quantenausbeute  $\Phi_F$ , der Intensität des Anregungslichtes  $I_0$  und der Konzentration  $c$  linear zu. Für die Analytik muss jedoch ein von der Messapparatur abhängiger Korrekturfaktor  $k$  eingeführt werden (Gl. 9).<sup>177</sup> Diese Gerätekonstante ist vor allem abhängig vom Wirkungsgrad des Strahlengangs.

$$I_F = k \cdot 2,303 \cdot \Phi_F \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot c \cdot d \quad (\text{Gl. 9})$$

Für quantitative Fluoreszenzmessungen eignen sich nur sehr verdünnte Proben, da eine Linearität der Absorption ( $A = \epsilon \cdot c \cdot d$ ) und Fluoreszenz ( $I_F$ ) für Fluorophore mit unterschiedlichen Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) nur bis zu einer Absorption von ca. 0,05 gegeben ist.<sup>176</sup> Die Nachweisgrenze kann durch Verwendung eines Lasers z. B. mit einem LIF-Detektor (*Laser Induced Fluorescence*), der Anregungslicht hoher Intensität ( $I_0$ ) liefert, gesteigert werden.

### 2.1.3 Strukturelle Voraussetzungen

Für die Rückkehr der Elektronen aus dem Anregungszustand in den Grundzustand bestehen neben der Fluoreszenz die Möglichkeiten der strahlungslosen Inaktivierung unter Wärmeabgabe und des strahlungslosen Übergangs aus dem Singulett- in den Triplett-Zustand und anschließender Phosphoreszenz. Die Rückkehr der Elektronen läuft nach demjenigen Mechanismus ab, bei dem die Lebensdauer des angeregten Zustandes am kürzesten ist. Für die Fluoreszenz trifft dies insbesondere bei starren und planaren Molekülen zu. Fluoreszierende Stoffgruppen, die eine gewisse Starrheit und planare Struktur im Molekülaufbau aufweisen, sind beispielsweise mehrkernige aromatische Kohlenwasserstoffe (Anthracen, Naphtalin, Stilben) und kondensierte Heterozyklen (Chinolin, Isochinolin, Indol). Flexible Moleküle zeigen dagegen meist sehr schnell eine interne Konversion und somit keine oder nur eine schwache Fluoreszenz. Bei der Fluoreszenz-Anregung sind energiearme  $\pi\text{-}\pi^*$ - gegenüber  $n\text{-}\pi^*$ -Übergänge bevorzugt. Zum Beispiel zeigen im Gegensatz zu Benzol einfache Heterozyklen, wie Pyridin, Furan oder Thiophen, keine Fluoreszenz. Zudem kann die Fluoreszenzfähigkeit von Molekülen bei tiefen Temperaturen, durch Adsorption an feste Oberflächen, durch Chelatbildung oder die Wahl des Lösungsmittels (Polarität,

pH-Wert) verstärkt werden. Ebenso kann bei Salzen z. B. die Art des Anions Einfluss auf die Stärke der Fluoreszenz nehmen.<sup>177</sup>

## 2.2 Störungen der Fluoreszenzmessungen

### 2.2.1 Streustrahlung

Das Fluoreszenzspektrum kann durch verschiedene Effekte beeinflusst werden. Eine bei Fluoreszenzmessungen grundsätzlich auftretende Störung ist die Streustrahlung, die im Emissionsspektrum als scheinbare Fluoreszenzbande mit einem Maximum entsprechend der Anregungswellenlänge zu beobachten ist. Diese Streuung kann unter anderem verursacht werden durch Schwebeteilchen und Luftblasen in der Lösung, durch Reflexionen an Küvettenwänden aufgrund von Verunreinigungen und Fingerabdrücken oder der *Rayleigh-Streuung* kolloidaler Lösungen (z. B. Proteinlösungen). Die Rayleigh-Streuung ist eine elastische Streuung der Photonen an den Molekülen. D. h. die Energie der Photonen ist zu klein, um das Molekül anzuregen, so dass sich die Energie der gestreuten Photonen nicht ändert. Allgemein lässt sich die Streustrahlung durch die Veränderung der Anregungswellenlänge erkennen.<sup>178</sup>

Einen weiteren Beitrag zur Streustrahlung leistet der *Raman-Effekt*, der für das Auftreten zusätzlicher Banden verantwortlich ist. Die Wellenlängen der Raman-Streuung (inelastische Streuung) ordnen sich symmetrisch um die Anregungswellenlänge an. Photonen des Anregungslichts treten mit den Schwingungs- und Rotationszuständen des Moleküls in Wechselwirkung, wodurch die Photonen entweder einen bestimmten Energiebetrag an das Molekül abgeben und selbst energieärmer werden oder diesen Energiebetrag vom Molekül übernehmen und energiereicher werden. Es entstehen in bestimmter Entfernung von der Anregungswellenlänge weniger intensive kürzerwellige (*Anti-Stokessche*) Linien und intensive längerwellige (*Stokessche*) Linien. Raman-Linien unterscheiden sich von Fluoreszenzbanden durch ihre relative Schärfe und durch ihre Eigenschaft, sich mit der Anregungswellenlänge zu verschieben.<sup>178</sup>

### 2.2.2 Quenching-Effekte

Die Intensität eines Fluoreszenzsignals kann durch verschiedene Effekte beeinflusst werden. Die Reduktion der Fluoreszenzintensität eines Fluorophors ohne Veränderung des Anregungs- und Emissionsspektrums bezeichnet man als Fluoreszenzlöschung bzw. Quenching. Eine Möglichkeit der Fluoreszenzlöschung kann durch *Reabsorption* bzw. Selbstabsorption des von einem Molekül ausgesendeten Fluoreszenzlichts durch ein anderes verursacht werden (innerer Filtereffekt). Dieser Effekt wird dann beobachtet, wenn sich in der Lösung Substanzen befinden, deren Absorptionsspektrum mit dem Spektrum des emittierten Lichts teilweise überlappt. Das Ausmaß dieses Effekts hängt sowohl von der Konzentration der absorbierenden Substanz als auch von der Wegstrecke ab, die das emittierte Licht in der Lösung zurücklegen muss.<sup>178</sup>

Ebenso können sich Fluorophore bei höheren Konzentrationen gegenseitig deaktivieren. Die Bildung von Excimeren zwischen einem im Grund- und einem im angeregten Zustand befindlichen Molekül und von Dimeren aus zwei sich im Grundzustand befindlichen Molekülen führt zu einer Verringerung der Fluoreszenzintensität. Aufgrund dieser so genannten *Konzentrationslöschung* ist die Fluoreszenzintensität nur in sehr verdünnten Lösungen proportional zur Konzentration des Fluorophors. Bei höheren Konzentrationen wird ein Abweichen von der Linearität bis hin zum völligen Verschwinden der Fluoreszenz beobachtet, so dass quantitative Fluoreszenzmessungen nur in sehr verdünnten Lösungen zuverlässige und valide Ergebnisse liefern.<sup>178</sup>

Als eine weitere Möglichkeit der Fluoreszenzlöschung ist die so genannte *Fremdlöschung* zu berücksichtigen. Die Anwesenheit von Fremdstoffen, wie z. B. Sauerstoff, schwere Halogenid-Ionen ( $I^-$ ,  $Br^-$ ) und Schwermetallionen, führen zu einer Reduktion der Fluoreszenzintensität, wobei man hier die dynamische und die statische Fluoreszenzlöschung unterscheidet.<sup>179</sup>

Die Ursachen der dynamischen Fluoreszenzlöschung sind Zusammenstöße von Molekülen (Quencher) mit dem Fluorophor im angeregten Zustand, so dass die fluoreszierende Verbindung ohne Emission von Photonen aus dem aktivierten Zustand in seinen Grundzustand zurückkehrt. Das dynamische Quenching beruht

somit auf einer strahlungslosen Abgabe der Energie des angeregten Fluorophors und auf einer reduzierten Lebensdauer des aktivierten Zustands. Als Ergebnis wird somit eine reduzierte Fluoreszenzintensität bis hin zur vollständigen Fluoreszenzlöschung von fluoreszierenden Substanzen beobachtet. Das Ausmaß der dynamischen Fluoreszenzlöschung wird durch die *Stern-Volmer*-Gleichung beschrieben (Gl. 10) und hängt von der Konzentration des Quenchers  $Q$ , der bimolekularen Quenchingkonstante  $k_q$  und der Lebensdauer  $\tau_0$  des angeregten Zustands in Abwesenheit des Quenchers ab. Die Quenchingkonstante  $k_q$  und die Lebensdauer  $\tau_0$  werden als *Stern-Volmer*-Konstante  $K_D$  zusammengefasst.  $F_0$  und  $F$  sind die Fluoreszenzintensitäten in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit des Quenchers  $Q$ . Somit ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen  $F_0/F$  und der Konzentration des Quenchers  $Q$  mit einem y-Achsenabschnitt von 1. Beispiele für Moleküle, die eine sehr starke dynamische Fluoreszenzlöschung zeigen, sind beispielsweise molekularer Sauerstoff, Acrylamid, Bromat und Iodid-Ionen.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (\text{Gl. 10})$$

Bei der statischen Fluoreszenzlöschung besteht ein Gleichgewicht zwischen dem Fluorophor und einem nichtfluoreszierenden Komplex aus Fluorophor und Quencher. Somit verändert sich lediglich die „freie“ Konzentration des Fluorophors, die zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Die Lebensdauer des aktivierten Zustands wird im Vergleich zum dynamischen Quenching nicht reduziert. Quantitativ kann die statische Fluoreszenzlöschung mit einer der *Stern-Volmer*-Gleichung (Gl. 10) sehr ähnlichen Gleichung beschrieben werden, wobei  $K_s$  die Dissoziationskonstante für die Bildung des nichtfluoreszierenden Komplexes nach dem Massenwirkungsgesetz darstellt (Gl. 11).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s [Q] \quad (\text{Gl. 11})$$

Abgesehen von dem unterschiedlichen Einfluss auf die Lebensdauer des angeregten Zustandes des Fluorophors unterscheiden sich die beiden Mechanismen aufgrund ihrer Abhängigkeit von der Temperatur. Das Ausmaß der dynamischen Fluoreszenz-

löschung nimmt mit steigender Temperatur aufgrund der erhöhten Anzahl der Zusammenstöße zu. Bei der statischen Fluoreszenzlöschung wird der Wert der Dissoziationskonstanten  $K_S$  mit steigender Temperatur kleiner und das Quenching nimmt aufgrund einer höheren „freien“ Konzentration des Fluorophors ab.

Die Mechanismen der dynamischen und statischen Fluoreszenzlöschung können in einfachen homogenen Lösungen sehr gut und einfach bestimmt werden. In sehr komplexen Systemen, wie z. B. einer Pflanzenmatrix oder anderen biologischen Proben, überlagern sich jedoch die verschiedenen Mechanismen der Fluoreszenzlöschung. Zudem können einige Substanzen der Probenmatrix insbesondere bei Pflanzenextrakten Eigenfluoreszenz zeigen. Ein linearer Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Ab- und Anwesenheit des Quenchers und der Konzentration des Quenchers ist somit in komplexen Systemen nicht mehr gegeben.<sup>179</sup>

### **2.2.3 Eigenfluoreszenz**

Neben Quenching-Effekten können Substanzen der Probenmatrix (z. B. Pflanzeninhaltsstoffe) auch Eigenfluoreszenz zeigen, so dass für die zu analysierende Substanz eine erhöhte Fluoreszenzintensität zu beobachten ist. Bei der quantitativen Bestimmung des Analyten ohne Abtrennung der Probenmatrix hat dies zur Folge, dass ein zu hoher Wert resultiert oder die Anwesenheit des Analyten vorgetäuscht wird.

## **2.3 Mikrotiterplatten-basierte Fluoreszenz-Assays**

Die Firma Gentest (Woburn, MA, USA) entwickelte und validierte ein fluorimetrisches Screening-Verfahren für die *In-vitro*-Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen und zeigte in zahlreichen internationalen Veröffentlichungen die Anwendbarkeit, Eignung und Validität dieser Fluoreszenz-Assays für Arzneistoffe.<sup>128-130,180-183</sup> Dieses Verfahren wird vor allem von der pharmazeutischen Industrie und von Auftragslaboratorien genutzt, um Wirkstoffe und potenzielle Arzneistoffkandidaten auf Wechselwirkungen mit anderen Arzneistoffen aufgrund der Inhibition von CYP-Enzymen zu untersuchen. Hierfür werden spezielle Substrate, Inhibitoren und CYP-



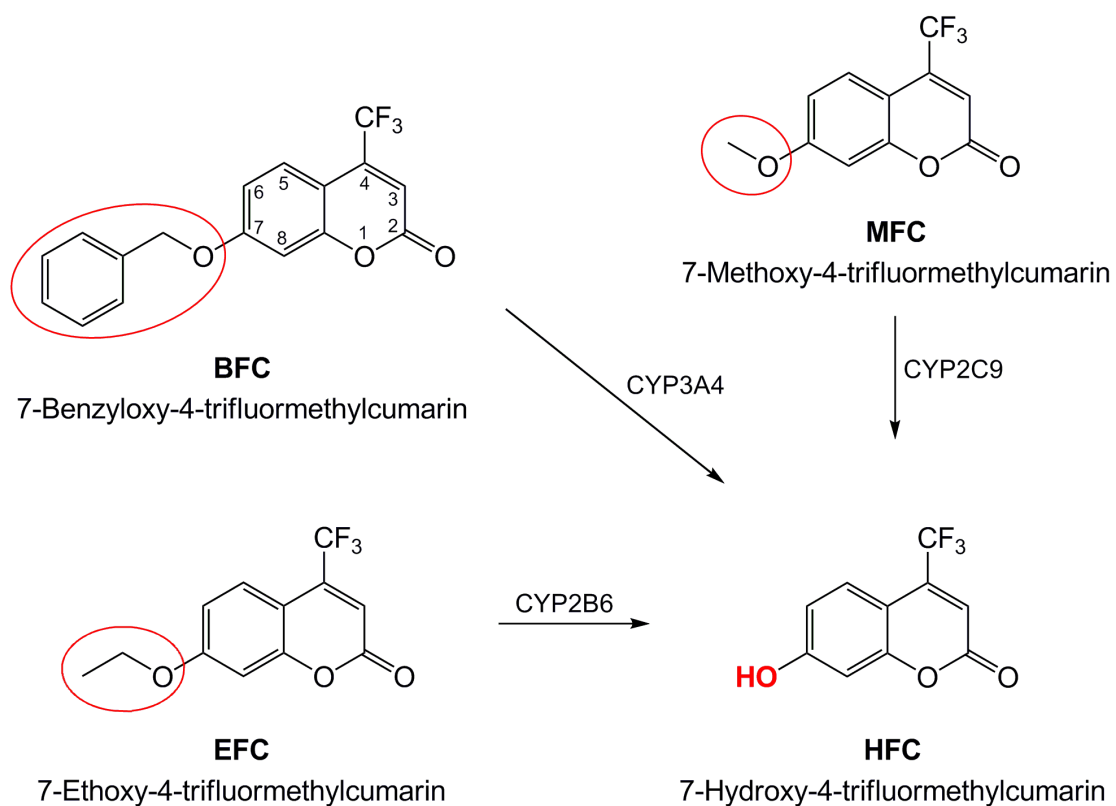
Enzyme mit NADPH in Phosphat-Puffer (200  $\mu$ l; pH 7,4) bei 37 °C in 96-Well-Mikrotiterplatten inkubiert und anschließend die enzymatisch gebildeten Metabolite direkt in Mikrotiterplatten in Anwesenheit der Probenmatrix (Substrat, Inhibitor, NADPH etc.) fluorimetrisch bestimmt. Für die Durchführung der *In-vitro*-Assays stellt Gentest ein sehr ausführliches Arbeitsprotokoll im Internet zu Verfügung ([www.gentest.com](http://www.gentest.com)). Dieses beinhaltet detailliert unter anderem die Herstellung von Lösungen und Puffern, die einzelnen Pipettier- und Inkubationsschritte sowie die Einstellungen des Fluorimeters. Die in dieser Arbeit durchgeführten Fluoreszenz-Assays wurden entsprechend den Vorschriften von Gentest durchgeführt (Details unter Material und Methoden, V.2.4). Die einzige Ausnahme war die Verwendung von NADPH anstatt eines NADPH-regenerierendes Systems. Gentest verwendet ein NADPH-regenerierendes System bestehend aus Glucose-6-phosphat, NADP<sup>+</sup> und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, die Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphoglucono- $\delta$ -lacton dehydriert. Bei dieser enzymatischen Reaktion dient NADP<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor und wird zu NADPH reduziert. Die Anwesenheit von NADPH bei CYP-katalysierten Reaktionen ist notwendig, da NADPH als Cosubstrat dient. Der Nachteil eines NADPH-regenerierenden Systems ist, dass neben dem CYP-Enzym ein weiteres Enzym während der Inkubation anwesend ist, das durch den Inhibitor (z. B. Pflanzenextrakt) gehemmt werden kann. Dies hat zur Folge, dass zu wenig oder kein NADPH gebildet wird, wodurch eine starke inhibitorische Aktivität des Inhibitors vorgetäuscht wird. Besonders bei der Bestimmung der Hemmung von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte ist durch die Vielzahl der Pflanzeninhaltsstoffe eine Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase nicht auszuschließen, so dass die Verwendung von NADPH zu bevorzugen ist.

### **2.3.1 Substrate und Metabolite**

#### **2.3.1.1 Cumarin-Derivate**

Zur Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen mit Hilfe von Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays kommen als Substrate ausschließlich artifizielle Substanzen zum Einsatz, die durch CYP-Enzyme in stark fluoreszierende Produkte überführt werden. Im Gegensatz zu den hauptsächlich bei LC/MS-Methoden verwendeten Substraten finden diese arzneilich keine Anwendung. Am häufigsten

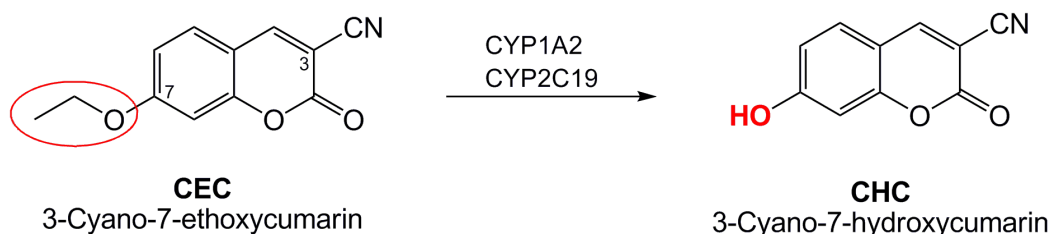
werden als Substrate Cumarin-Derivate verwendet, die generell in Position 7 eine Alkoxy-Gruppe (z. B. Methoxy, Ethoxy) oder Benzoyloxy besitzen und deren Metabolite nach Dealkylierung bzw. Debenzylierung eine freie phenolische Hydroxylgruppe aufweisen (Abb. 34-36). Beispielsweise debenzyliert CYP3A4 bevorzugt das Substrat 7-Benzoyloxy-4-trifluormethylcumarin (BFC) zu 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC). Ebenso wird 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin (MFC) und 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin (EFC) durch CYP2B6 bzw. CYP2C9 zu HFC metabolisiert (Abb. 34).



**Abb. 34** O-Dealkylierung von BFC (CYP3A4), MFC (CYP2C9) und EFC (CYP2B6) zu dem Produkt HFC.

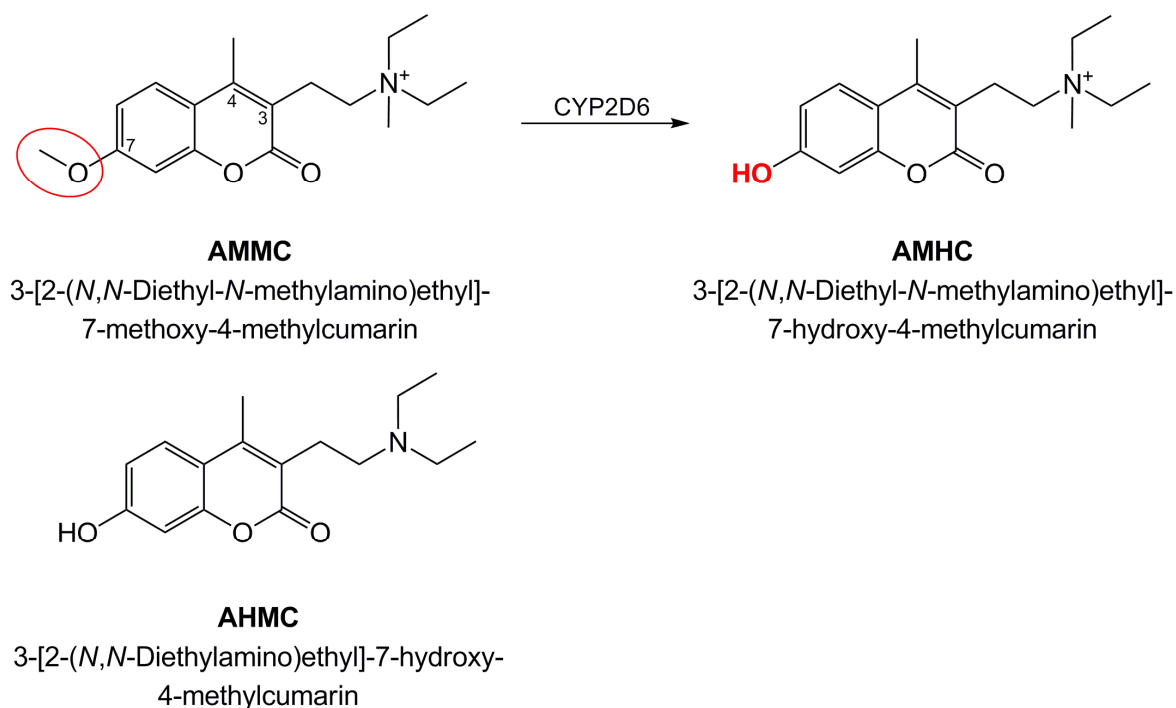
Für CYP1A2 und CYP2C19 wird 3-Cyano-7-ethoxycumarin (CEC) als Substrat verwendet, das zu 3-Cyano-7-hydroxycumarin (CHC) verstoffwechselt wird (Abb. 35). Die Substratspezifität dieser Cumarin-Derivate ist allerdings sehr gering ausgeprägt. Beispielsweise wird BFC ebenfalls in einem beträchtlichen Umfang durch CYP1A2 metabolisiert.<sup>184</sup> CEC kann neben CYP1A2 und CYP2C19 auch als Substrat für die Bestimmung der Inhibition von CYP2C9 und CYP2D6 verwendet werden.<sup>128</sup> D. h. mit

diesen Substraten ist die gleichzeitige Bestimmung der Inhibition von Isoenzymen mit humanen Lebermikrosomen (HLM) oder Mischungen aus rekombinanten CYP-Enzymen nicht möglich. Hier müssen immer einzelne rekombinante CYP-Enzyme eingesetzt werden.



**Abb. 35** O-Dealkylierung von CEC durch CYP1A2 und CYP2C19 zu dem Produkt CHC.

Eine Ausnahme bildet jedoch das Substrat 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin (AMMC), das spezifisch nur durch CYP2D6 zu 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin (AMHC) umgesetzt wird (Abb. 36). Für dieses Substrat sind somit HLM oder CYP-Mischungen für die Bestimmung der Inhibition von CYP2D6 geeignet.<sup>182</sup> Zur Quantifizierung des enzymatisch gebildeten Produkts AMHC ist jedoch als externer Standard 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin (AHMC) notwendig (Abb. 36), da das Produkt offensichtlich nicht in einem finanziell angemessenem Rahmen synthetisiert werden kann. Die Fluoreszenz-Eigenschaften von AMHC und des externen Standards AHMC sind jedoch sehr ähnlich, da der tertiäre bzw. quaternäre Stickstoff in der Seitenkette keinen Einfluss auf das Fluorophor hat (Abb. 36). Der Stickstoff ist nämlich über eine Ethyl-Gruppe mit dem Cumaringrundgerüst (Fluorophor) verbunden.



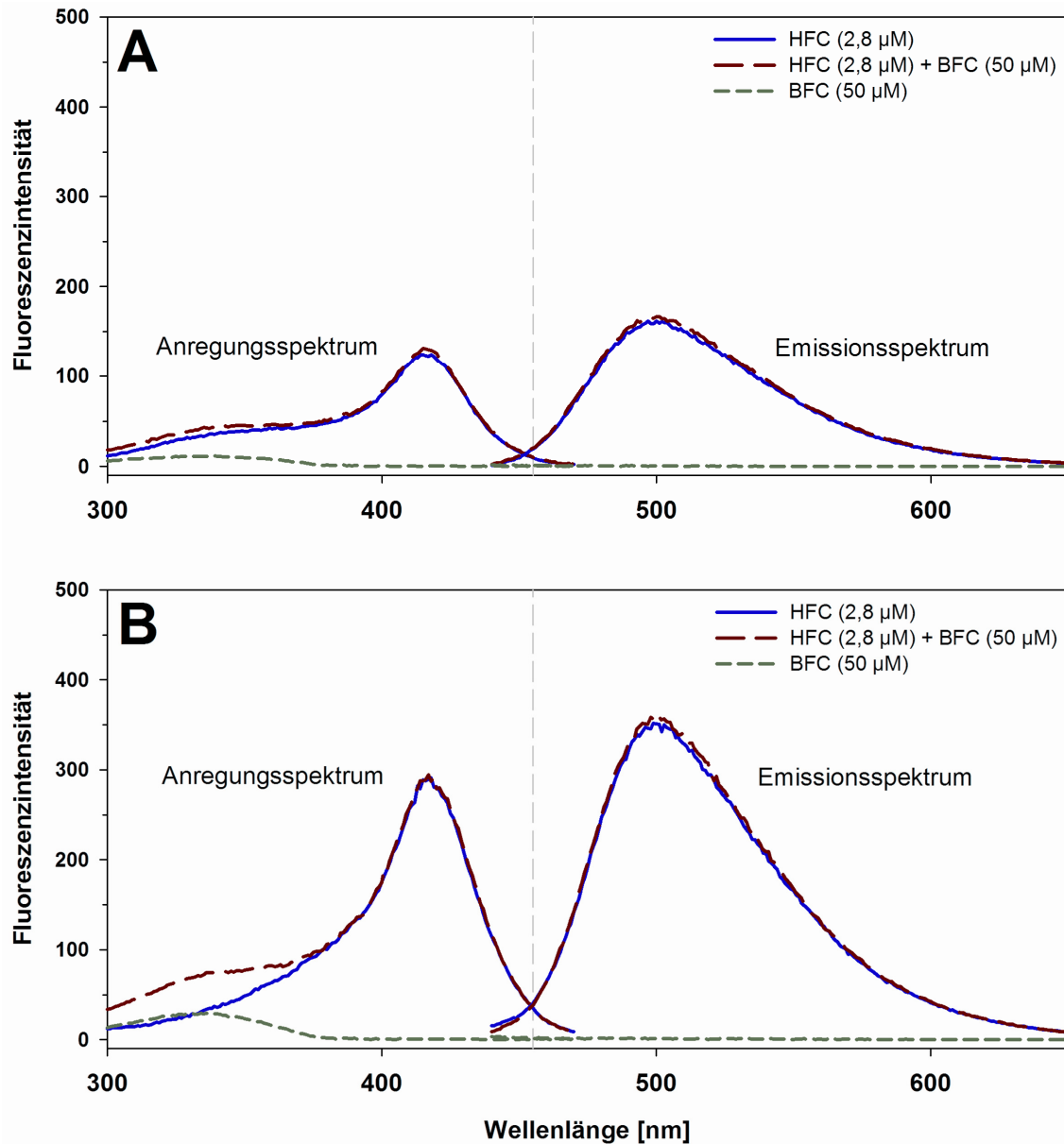
**Abb. 36** O-Dealkylierung von AMMC durch CYP2D6 zu dem Produkt AMHC. Zur fluorimetrischen Quantifizierung des Metaboliten AMHC wird als externer Standard AHMC verwendet.

Da im Gegensatz zu chromatographischen Methoden bei Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Methoden keine Trennung von Produkt und Probenmatrix stattfindet, ist für die Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen eine selektive Quantifizierung der Produkte in Anwesenheit der Substrate unabdingbar. Voraussetzung hierfür sind unterschiedliche fluorimetrische Eigenschaften der Substrate und deren Produkte, was durch die enzymatisch gebildete, schwach acide phenolische Hydroxylgruppe gegeben ist (Abb. 34-36). Der  $pK_S$ -Wert von AHMC entspricht ungefähr dem Wert von 7-Hydroxy-4-methylcumarin ( $pK_S$ -Wert 7,8); CHC und HFC besitzen aufgrund der elektronenziehenden Gruppen einen niedrigeren  $pK_S$ -Wert.<sup>185</sup> Der -I-Effekt der Trifluormethylgruppe erniedrigt den  $pK_S$ -Wert von HFC auf ca. 7,3, der stärkere -M-Effekt der Cyanogruppe erniedrigt den  $pK_S$ -Wert von CHC auf etwa 6,5.<sup>185,186</sup>

Durch Deprotonierung der phenolischen Hydroxygruppe im Alkalischen wird das Anregungs- und Emissionsspektrum der Metabolite bathochrom verschoben,<sup>187</sup> so dass die Metabolite in Anwesenheit der Substrate selektiv und empfindlich quantifiziert werden können. Eine vollständige Deprotonierung und Steigerung der Fluoreszenzintensität für die Bestimmung der Metabolite im Assay wird dadurch

erreicht, dass nach Inkubation der Proben eine Abstopplösung bestehend aus Acetonitril und 0,5 M Tris-Base (80/20) zugegeben wird, wodurch der pH-Wert der Inkubationslösung von 7,4 auf ungefähr 9,0-9,5 erhöht wird.

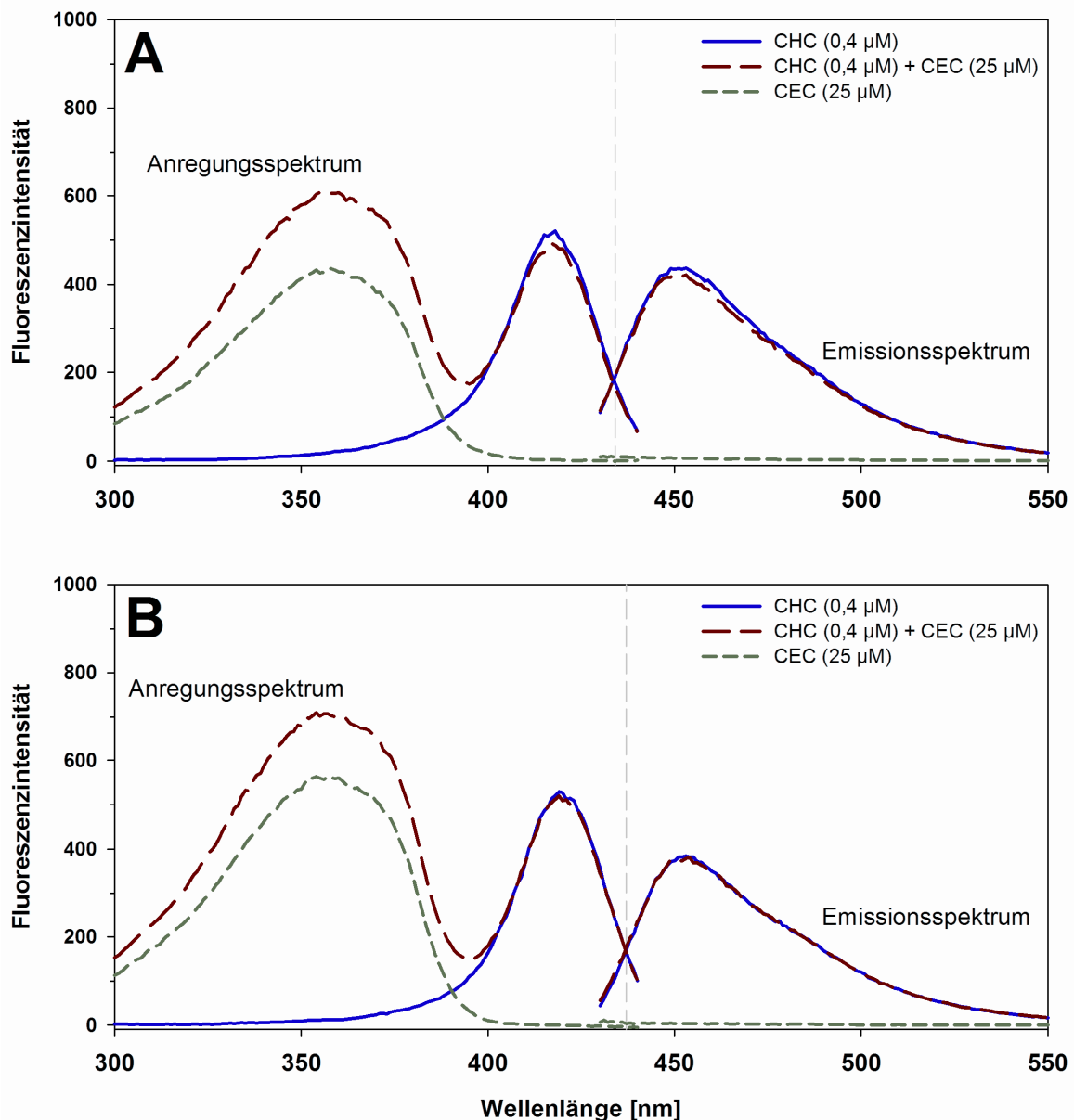
In Abb. 37 sind die Absorptions- und Emissionsspektren von HFC in Anwesenheit des Substrats BFC vor und nach Zugabe von Acetonitril/0,5 M Tris-Base (80/20) dargestellt. Es zeigt sich, dass durch Zugabe der Abstopplösung (Acetonitril/Tris-Base) die Fluoreszenzintensität von HFC um mehr als das 2-fache erhöht wird (Abb. 37). Ebenso wird deutlich, dass BFC bei einer Anregungswellenlänge von 409 nm keine Fluoreszenz-Emission zeigt und sich somit das Emissionsspektrum von HFC (2,8  $\mu\text{M}$ ) in Anwesenheit von BFC (50  $\mu\text{M}$ ) nicht verändert. Die BFC-Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ) entspricht der im CYP3A4-Assay verwendeten Substratkonzentration, die HFC-Konzentration (2,8  $\mu\text{M}$ ) entspricht der Assay-Konzentration, die aus BFC durch CYP3A4 ohne die Anwesenheit eines Inhibitors entsteht. Auf die Bestimmung der Metabolitenkonzentrationen in Kontrollinkubationen (100 %ige Enzymaktivität) wird in Kapitel II unter 5.3.1 (Tab. 22) näher eingegangen. Die Anregungswellenlänge (409 nm) und die Emissionswellenlänge (530 nm) zur Aufnahme des Anregungs- bzw. Emissionsspektrums entspricht den von Gentest angegebenen Parametern für die fluorimetrische Bestimmung von HFC (Tab. 8).



**Abb. 37** Anregungs- und Emissionsspektren von BFC (50  $\mu\text{M}$ ) und HFC (2,8  $\mu\text{M}$ ) bei einer Emissionswellenlänge von 530 nm und einer Anregungswellenlänge von 409 nm im Inkubationspuffer vor (A) und nach (B) Zugabe von 75  $\mu\text{l}$  Acetonitril/0.5 M Tris-Base.

Aufgrund des niedrigen  $pK_S$ -Wertes von CHC (ca. 6,5) erhöht die Zugabe von Acetonitril/Tris-Base die Fluoreszenzintensität von CHC kaum (Abb. 38), da CHC im Inkubationspuffer (pH 7,4) bereits zu ungefähr 90 % deprotoniert vorliegt. Der niedrige  $pK_S$ -Wert ermöglicht somit auch eine kontinuierliche Messung der enzymatischen Umsetzung im Inkubationspuffer ohne Zugabe der Abstopplösung.<sup>187</sup> Ebenfalls zeigt das Substrat CEC (25  $\mu\text{M}$ ) keine Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 409 nm, so dass das Emissionsspektrum von CHC nicht

beeinflusst wird. Die CEC-Konzentration ( $25 \mu\text{M}$ ) entspricht der im CYP2C19-Assay verwendeten Substrat-Konzentration, die CHC-Konzentration ( $0,4 \mu\text{M}$ ) entspricht der Assay-Konzentration, die aus CEC durch CYP2C19 ohne die Anwesenheit eines Inhibitors entsteht (II.5.3.1, Tab. 22).



**Abb. 38** Anregungs- und Emissionsspektren von CEC ( $25 \mu\text{M}$ ) und CHC ( $0,4 \mu\text{M}$ ) bei einer Emissionswellenlänge von 460 nm und einer Anregungswellenlänge von 409 nm im Inkubationspuffer vor (A) und nach (B) Zugabe von 75  $\mu\text{l}$  Acetonitril/0.5 M Tris-Base.

Elektronenziehende Substituenten haben nicht nur Einfluss auf die  $pK_S$ -Werte, sondern auch auf die Maxima der Anregungs- und Emissionswellenlängen. Da das Fluorophor von AHMC (Abb. 36) nicht durch elektronenziehende Substituenten beeinflusst wird, entsprechen bei pH 9 die Maxima für Anregung und Emission von AHMC (380 nm/465 nm) ungefähr den Maxima des unsubstituierten 7-Hydroxy-4-methylcumarin (HMC; 370 nm/460 nm; Tab. 8). Die Anregungsspektren von HFC (Abb. 34) und CHC (Abb. 35) sind dagegen durch die elektronenziehenden Substituenten bathochrom verschoben. Das Absorptionsmaximum liegt für beide ungefähr bei 415 nm (Tab. 8). Während das Emissionsmaximum von CHC (450 nm) in etwa dem Emissionsmaximum von HMC (460 nm) und AHMC (465 nm) entspricht, resultiert für HFC (Abb. 34) durch die Trifluormethyl-Substitution eine Rotverschiebung des Emissionsmaximums (500 nm; Tab. 8).

**Tab. 8** Vergleich der Anregungs- und Emissionsmaxima von AHMC, CHC, HFC, HMC und NADPH mit den in Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays (Gentest) verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen zur Quantifizierung der Produkte AHMC, CHC und HFC.

Substanz	Anregungs-/Emissionsmaximum (pH 9)	Anregungs-/Emissionswellenlänge (Fluoreszenz-Assay, Gentest) <sup>a</sup>
AHMC <sup>b</sup>	380 nm/465 nm	409 nm/460 nm
CHC <sup>c</sup>	418 nm/450 nm	409 nm/460 nm
HFC <sup>d</sup>	416 nm/500 nm	409 nm/530 nm
HMC <sup>e</sup>	370 nm/460 nm	-
NADPH	340 nm/436 nm	-

<sup>a</sup>Bestimmung im Inkubationspuffer nach Zugabe von Acetonitril/0,5 M Tris-Base; <sup>b</sup>AHMC: 3-[2-(N,N-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin; <sup>c</sup>CHC: 3-Cyano-7-hydroxycumarin; <sup>d</sup>HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>e</sup>HMC: 7-Hydroxy-4-methylcumarin;

Da Gentest die Anregungs- und Emissionswellenlängen für die Bestimmung der Metabolite optimiert hat, um jegliche Überlappungen bei den Metaboliten und den entsprechenden Substraten zu vermeiden, weichen die in den Assays verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen für die Metabolite zum Teil von den entsprechenden Maxima ab (Tab. 8). Zum Beispiel wird für die Bestimmung von AHMC neben der Erhöhung der Anregungswellenlänge zusätzlich die NADPH-Konzentration von 1,3 mM auf 8,2  $\mu$ M erniedrigt, um eine Interferenz mit der Fluoreszenz von NADPH (340 nm/436 nm) zu vermeiden (Tab. 8).



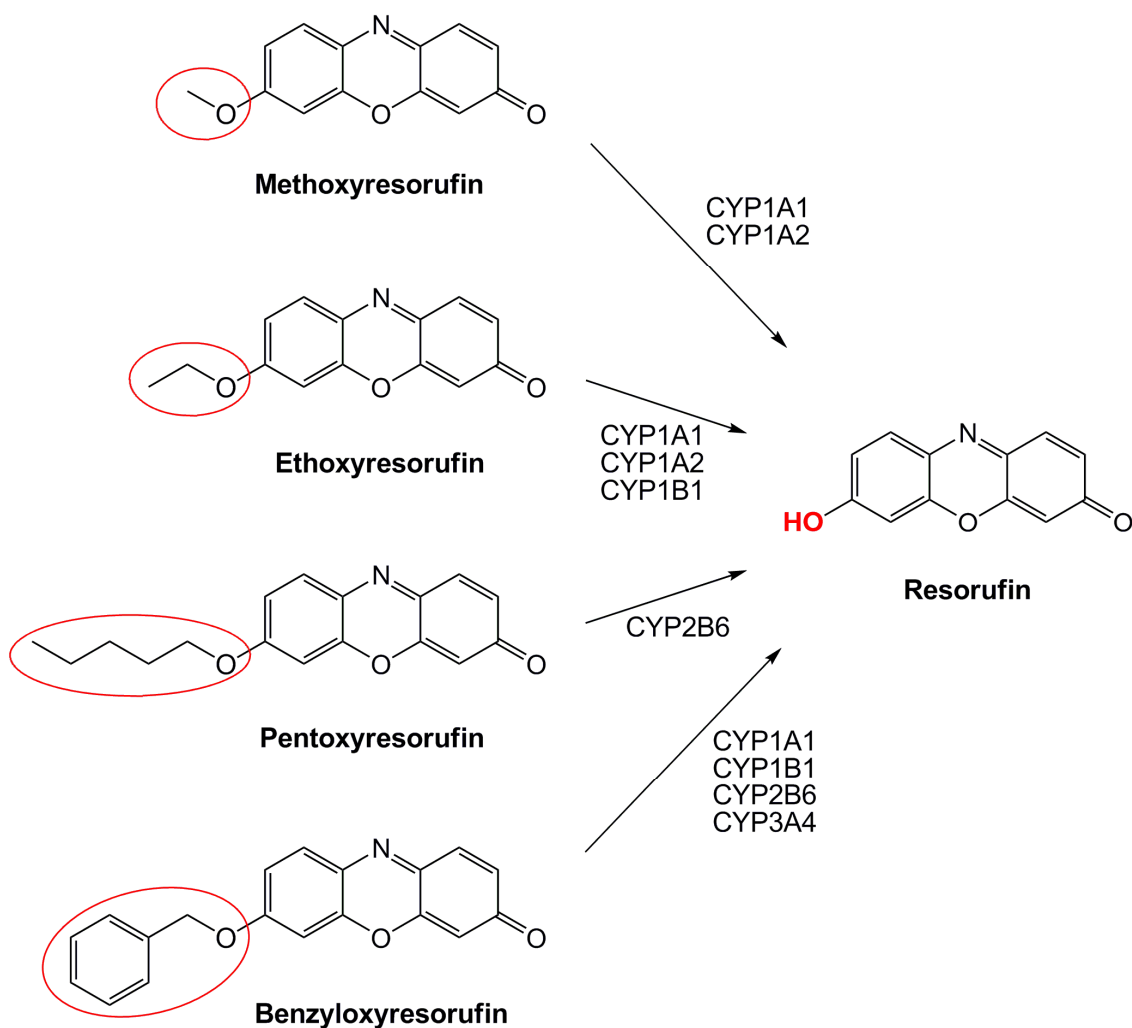
Für die Cumarin-Derivate ist auffällig, dass bei gleicher CHC und HFC-Konzentration die Fluoreszenzintensität von CHC mehr als das 5-fache höher ist. Der Grund hierfür liegt vor allem an dem höheren molaren Absorptionskoeffizienten von CHC ( $43.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) im Vergleich zu HFC ( $16.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ).<sup>185</sup> Während HFC einen zu 7-Hydroxy-4-methylcumarin identischen Wert aufweist und somit die Trifluormethyl-Substitution in Position 4 keinen Einfluss auf den Absorptionskoeffizienten hat, erhöht die Cyano-Substitution in Position 3 den Absorptionskoeffizienten des Fluorophors.<sup>185</sup> Ein weiterer Grund für die niedrige Fluoreszenzintensität von HFC ist, dass in Position 4 Trifluormethyl-substituierte Cumarin-Derivate eine relativ niedrige Fluoreszenzausbeute aufweisen (z. B. HFC 34 %), wobei 7-Hydroxy-4-methylcumarin dagegen eine Fluoreszenzausbeute von 63 % zeigt.<sup>185</sup>

### 2.3.1.2 Resorufin-Derivate

Als weitere Substrate für die Mikrotiterplatten-basierte Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen sind auch Resorufin-Derivate geeignet, die z. B. mit einer Methyl-, Ethyl-, Pentyl- oder Benzyl-Gruppe verethert sind (Abb. 39). Die Substratspezifität der Resorufin-Derivate ist sehr gering ausgeprägt, da unterschiedliche CYP-Enzyme, wie z. B. CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2B6 und CYP3A4 am Metabolismus beteiligt sind (Abb. 39).<sup>188,189</sup> Am häufigsten wird Ethoxyresorufin (EthRes) als Substrat für CYP1A2 und Benzyloxyresorufin (BzRes) für CYP3A4 verwendet, aus denen durch enzymatische O-Dealkylierung das fluoreszierende Resorufin gebildet wird (Abb. 39).

Die Absorption und Fluoreszenz von Resorufin ist stark pH-Wert abhängig. Bei pH-Werten größer als der  $pK_S$ -Wert (ca. 6,5-7,0) liegt das Absorptions-/Emissionsmaximum von Resorufin bei 571 nm/585 nm. Bei niedrigeren pH-Werten verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 480 nm und der molare Absorptionskoeffizient sowie die Fluoreszenzquantenausbeute werden stark reduziert. Die Absorptionsmaxima der Resorufin-Substrate liegen unabhängig vom pH-Wert bei etwa 465 nm, so dass ab einem pH-Wert größer als 8 eine selektive und empfindliche Bestimmung von Resorufin (Absorptionsmaximum 571 nm) in Anwesenheit der Substrate möglich ist. Wie auch bei den Cumarin-Derivaten wird nach der Inkubation eine Abstopplösung bestehend aus Acetonitril/0,5 M Tris-Base zugegeben, um durch

Erhöhung des pH-Wertes der Inkubationslösung eine vollständige Deprotonierung von Resorufin und somit eine bathochrome Verschiebung der Anregungswellenlänge sowie eine Steigerung der Fluoreszenzintensität zu erzielen. Die Anregungswellenlänge für die fluorimetrische Bestimmung von Resorufin in CYP-Assays entspricht nicht dem Absorptionsmaximum (571 nm) sondern liegt bei einer niedrigeren Anregungswellenlänge (530 nm), um Störungen bei der Fluoreszenzmessung von Resorufin z. B. durch Streustrahlung zu vermeiden (siehe II.2.2.1).

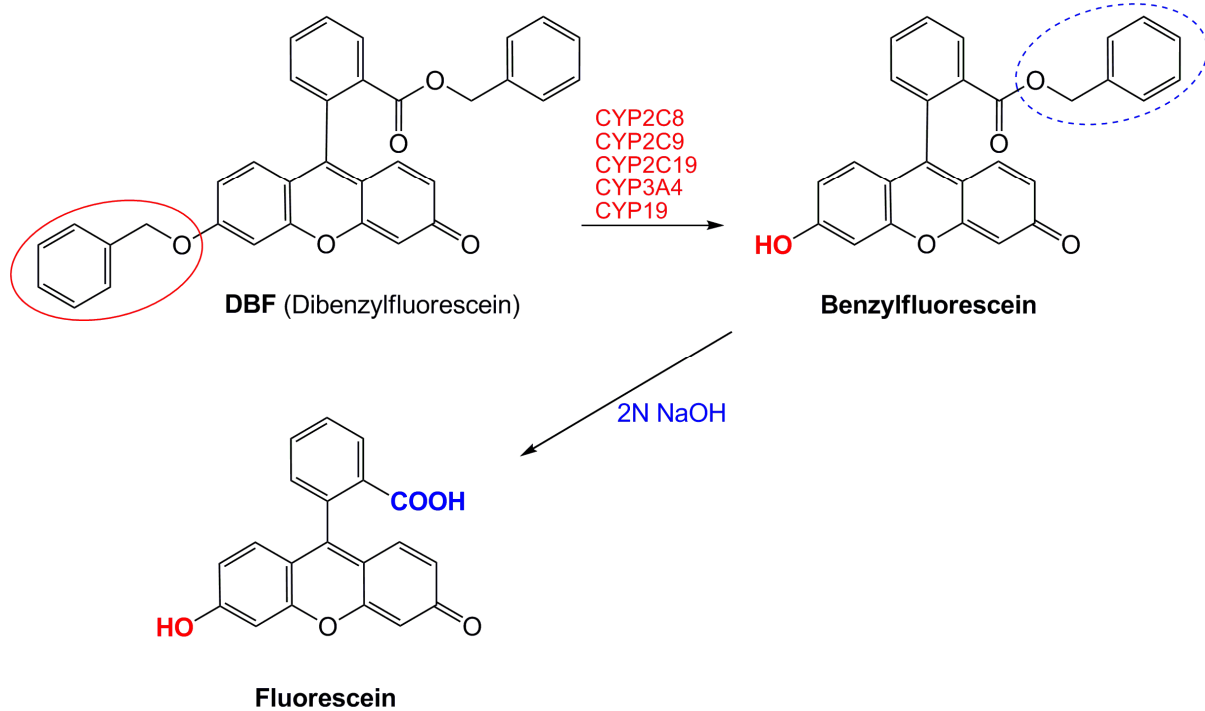


**Abb. 39** CYP-katalysierte O-Dealkylierungsreaktionen von Methoxy-, Ethoxy-, Pentoxy- und Benzyloxyresorufin zu Resorufin.

### 2.3.1.3 Fluorescein-Derivate

Das Fluorescein-Derivat Dibenzylfluorescein (DBF) wird eher selten als Substrat zur Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen verwendet.<sup>190,191,192</sup> Die Dealkylierungsreaktion ist sehr unspezifisch, neben CYP3A4 und CYP2C8 kann DBF auch als Substrat für CYP2C9 und CYP2C19 verwendet werden. DBF ist zurzeit das einzige Substrat das zur fluorimetrischen Bestimmung der Inhibition von CYP2C8 in Mikrotiterplatten eingesetzt wird. Die seltene Verwendung von DBF als Fluoreszenzsubstrat hat wahrscheinlich mehrere Gründe. Die Cumarin- und Resorufin-Derivate weisen höhere Umsetzungsgeschwindigkeiten bezüglich CYP2C9, CYP2C19 und CYP3A4 auf, so dass niedrigere Proteinkonzentrationen eingesetzt werden können. Die Inhibition von CYP2C8 wird meistens nicht getestet, da nur wenige Arzneistoffe von CYP2C8 metabolisiert werden (I.2.2.2, Abb. 8) und somit das Risiko einer Arzneimittelinteraktion gering ist. Ebenso wird DBF als Substrat für das Cytochrom-P450-Enzym Aromatase (CYP19A1), das oft als CYP19 bezeichnet wird, zur Identifizierung von Hemmstoffen eingesetzt.<sup>193</sup> Da die Aromatase die Umwandlung der Androgene in Östrogene katalysiert und dadurch das Schlüsselenzym der Östrogen-Biosynthese darstellt, werden Aromatase-Hemmstoffe (z .B. Anastrozol, Exemestan) in der Therapie von östrogenabhängigen Mammakarzinomen eingesetzt.

DBF wird durch die CYP-Enzyme CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 und CYP3A4 sowie CYP19 dealkyliert, wodurch ein Fluoresceinbenzylester gebildet wird (Abb. 40). Erst nach Zugabe einer starken Base wie z. B. 2 N Natronlauge wird der pH-Wert der Inkubationslösung so weit erhöht (>10), dass durch alkalische Hydrolyse das fluoreszierende Fluorescein entsteht und die (indirekte) fluorimetrische Quantifizierung des Metaboliten ermöglicht wird. Die fluorimetrische Bestimmung von Fluorescein muss jedoch relativ schnell erfolgen, da aufgrund der starken Base die Fluoreszenzintensität der Inkubationsproben nach 2 Stunden stark ansteigt ([www.gentest.com](http://www.gentest.com)). Dies ist wahrscheinlich auf die Instabilität von DBF im stark Alkalischen zurückzuführen, wodurch stark fluoreszierende Abbauprodukte entstehen. Fluorescein allein zeigt in einem Experiment 4 h nach Zugabe der Abstopplösung keine Veränderung der Fluoreszenzintensität.



**Abb. 40** CYP-katalysierte O-Dealkylierungsreaktion von Dibenzylfluorescein zu Benzy fluorescein, aus dem im Alkalischen nach Zugabe einer starken Base (2 N Natronlauge) Resorufin entsteht.

### 2.3.2 Berechnung der inhibitorischen Aktivität

Bei Bestimmungen der inhibitorischen Aktivität mit Hilfe eines Fluorimeters ist im Gegensatz zu HPLC-basierte Methoden (siehe II.1.3.4) für die Berechnung der Restaktivität neben der Bestimmung der Intensität des Fluoreszenzsignals der Inhibitorprobe und der Kontrolle (100 %ige Enzymaktivität) zusätzlich eine Messung der Fluoreszenz des Hintergrundes notwendig. Die so genannte Hintergrund-Kontrolle entspricht einer Kontrollinkubation, wobei Enzym und Substrat erst nach der Abstopplösung zugegeben wird, so dass keine Umsetzung des Substrates stattfindet. Durch die Hintergrund-Kontrolle kann eine eventuelle Eigenfluoreszenz der Mikrotiterplatte, des Substrats, des Cosubstrats und von anderen Pufferbestandteile berücksichtigt werden und die gemessenen Fluoreszenzintensitäten um den Wert der Intensität der Hintergrundfluoreszenz korrigiert werden. Für die Berechnung der Restaktivität in % der Kontrolle ergibt sich folgende Gleichung:

$$\text{Restaktivität} = \frac{F_I - F_{\text{HG}}}{F_K - F_{\text{HG}}} \cdot 100 \quad (\text{Gl. 12})$$

$F_I$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Inhibitorprobe

$F_{\text{HG}}$  = Intensität des Fluoreszenzsignals des Hintergrunds

$F_K$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Kontrolle

### 2.3.3 Untersuchungen von Pflanzenextrakten und Pflanzeninhaltsstoffen

In Tab. 9 ist ein Überblick von Arbeiten dargestellt, in denen für die *In-vitro*-Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte und Pflanzeninhaltsstoffe Mikrotiterplatten-basierte Fluoreszenz-Assays verwendet wurden. Am häufigsten wurden als Substrate für CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 Cumarin-Derivate verwendet (Tab. 9). Des Weiteren wurde auch Benzyloxyresorufin (BzRes) sehr oft zur Bestimmung der Inhibition von CYP3A4 eingesetzt. Ethoxyresorufin (EthRes) für CYP1A2 und Dibenzylfluorescein (DBF) für CYP3A4 wurden jeweils nur einmal verwendet. Ergebnisse zur Bestimmung der Inhibition von CYP2B6 und CYP2C8 durch Pflanzenextrakte mit Hilfe von Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays wurden bis jetzt noch nicht veröffentlicht.

**Tab. 9** Literatur-Übersicht über die *In-vitro*-Testung von Pflanzenextrakten und Pflanzeninhaltsstoffen auf Inhibition von CYP-Enzymen durch Mikrotiterplatten-basierte Fluoreszenz-Assays.

Arbeitsgruppe	Inhibitor	verwendete Substrate <sup>a</sup>				
		1A2	2C9	2C19	2D6	3A4
Henderson et al. (1999) <sup>194</sup>	Ginseng-Inhaltsstoffe	CEC	MFC	CEC	AMMC	BzRes BFC
Budzinski et al. (2000) <sup>77</sup>	Pflanzenextrakte Pflanzeninhaltsstoffe	-	-	-	-	BzRes
Foster et al. (2001) <sup>78</sup>	Knoblauch-Extrakte	-	MFC	CEC	AMMC	BzRes
Foster et al. (2002) <sup>195</sup>	TCM-Drogen <sup>b</sup>	-	MFC	CEC	AMMC	BzRes
Zou et al. (2002) <sup>132</sup>	Pflanzeninhaltsstoffe	CEC	MFC	CEC	AMMC	BzRes BFC
Foster et al. (2003) <sup>79</sup>	Pflanzenextrakte Pflanzeninhaltsstoffe	-	MFC	CEC	AMMC	BzRes
Gaudineau et al. (2004) <sup>196</sup>	Extrakt-Fractionen aus <i>Ginkgo biloba</i>	EthRes	MFC	-	AMMC	BFC
Strandell et al. (2004) <sup>81</sup>	Phytopharmaka	-	-	CEC	AMMC	BFC
Lefebvre et al. (2004) <sup>197</sup>	Baldrian-Extrakte und Inhaltsstoffe	-	-	-	-	DBF
Yale u. Glurich (2005) <sup>198</sup>	Pflanzenextrakte	-	MFC	-	AMMC	BzRes BFC
Ganzera et al. (2006) <sup>199</sup>	Kamillenöl und Inhaltsstoffe	CEC	MFC	-	AMMC	BFC
Modarai et al. (2007) <sup>200</sup>	Echinacea-Extrakte und Inhaltsstoffe	CEC	-	CEC	AMMC	BFC

<sup>a</sup>AMMC: 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin; BFC: 7-Benzoyloxy-4-trifluormethylcumarin, BzRes: Benzoyloxyresorufin; CEC: 3-Cyano-7-ethoxycumarin, DBF: Dibenzylfluorescein; EFC: 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; EthRes: Ethoxyresorufin; MFC: 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>b</sup>TCM: traditionelle chinesische Medizin.

### **2.3.4 Vor- und Nachteile der Fluoreszenz-Assays**

In Tab. 10 sind die bereits in den vorangegangenen Kapiteln erwähnten Vor- und Nachteile der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Methoden tabellarisch zusammengefasst und den Vor- und Nachteilen von HPLC/UV- und HPLC/MS-basierten Methoden gegenübergestellt. Hervorzuheben ist, dass die Fluoreszenzmethoden zwar eine relativ günstige und schnelle Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen ermöglichen, jedoch durch Quenching und Eigenfluoreszenz der Testsubstanzen die Ergebnisse zur inhibitorischen Aktivität stark beeinflusst werden können. Im Gegensatz dazu sind die HPLC/MS-Methoden zeitaufwendig und mit relativ hohen Kosten verbunden. Allerdings ist bei diesen Methoden eine sehr selektive Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch die chromatographische Trennung und massenspektrometrische Detektion der Produkte möglich. Die HPLC/UV-Methoden besitzen dagegen aufgrund der UV-Detektion eine geringe Selektivität. Zudem werden aufgrund der geringen Empfindlichkeit von UV-Methoden sehr hohe Enzymkonzentrationen eingesetzt, um ausreichend detektierbare Produktkonzentrationen zu erhalten.

**Tab. 10** Vergleich der Vor- und Nachteile Mikrotiterplatten-basierter Fluoreszenz- und HPLC-basierter MS- bzw. UV-Methoden.

Vorteile	Nachteile
<b>Mikrotiterplatten-basierte Fluoreszenz-Methoden</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ keine Methodenentwicklung notwendig (kommerziell erhältliche Kits); Methoden sind validiert und standardisiert (Firma Gentest)</li> <li>▪ schnelle Messung der Proben möglich; geeignet für Robotersysteme und das Hochdurchsatz-Screening von z. B. neuen Arzneistoffkandidaten</li> <li>▪ Fluorimeter sind relativ günstig und in Laboratorien weit verbreitet</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ als Substrate sind artifizielle Substanzen notwendig, die teilweise sehr teuer sind (Patente von Gentest)</li> <li>▪ empfindliche und selektive Bestimmung der Metabolitenfluoreszenz erst bei höheren pH-Werten (&gt;8) möglich</li> <li>▪ sehr geringe Substratspezifität; keine simultane Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen mit z. B. humanen Lebermikrosomen (HLM) möglich</li> <li>▪ Eigenfluoreszenz und Quenching der Testsubstanzen können die Ergebnisse stark beeinflussen</li> </ul>
<b>HPLC-basierte MS-Methoden</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ als Substrate dienen Arzneistoffe, die meist relativ preiswert sind</li> <li>▪ Metabolite können ohne pH-Wert-Änderungen massenspektrometrisch detektiert werden</li> <li>▪ hohe Substratspezifität; simultane Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen mit z. B. HLM möglich</li> <li>▪ selektive Bestimmung der Metabolite durch chromatographische Trennung und massenspektrometrische Detektion; keine bzw. nur geringe Matrixeffekte</li> <li>▪ <i>In-vivo</i>-Studien sind mit den als Substraten verwendeten Arzneistoffen möglich (<i>In-vitro-in-vivo</i>-Korrelation)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ relativ komplexe Methodenentwicklung, vor allem bei simultaner Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen; komplette Validierung und Standardisierung notwendig</li> <li>▪ chromatographische Methoden sind relativ langsam und zeitaufwendig; nur bedingt geeignet für das Hochdurchsatz-Screening</li> <li>▪ HPLC/MS-(MS)-Systeme verursachen hohe Kosten in Anschaffung, Betrieb und Wartung</li> <li>▪ hoher Verbrauch an Lösungsmitteln</li> </ul>
<b>HPLC-basierte UV-Methoden</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ als Substrate dienen Arzneistoffe (vgl. HPLC-basierte MS-Methoden)</li> <li>▪ hohe Substratspezifität; Bestimmung der Inhibition von CYP-Isoenzyme mit z. B. HLM möglich</li> <li>▪ HPLC/UV-Systeme sind relativ preiswert</li> <li>▪ <i>In-vivo</i>-Studien sind mit den als Substraten verwendeten Arzneistoffen möglich (<i>In-vitro-in-vivo</i>-Korrelation)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ geringe Empfindlichkeit für die UV-Bestimmung der Produkte; hohe Enzymkonzentrationen notwendig</li> <li>▪ geringe Selektivität für die Bestimmung der Produkte aufgrund der UV-Detektion <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Interferenzen durch Matrixeffekte</li> <li>→ simultane Bestimmung der Inhibition von mehreren CYP-Enzymen mit HLM nicht möglich</li> </ul> </li> <li>▪ Methoden sind relativ langsam und zeitaufwendig; nicht für das Hochdurchsatz-Screening geeignet</li> <li>▪ hoher Verbrauch an Lösungsmitteln</li> </ul>



## 2.4 Evaluierung der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays

Die Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays für die *In-vitro*-Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen wurden hinsichtlich Durchführbarkeit, Eignung und Validität evaluiert. Hierfür wurde die Verwendbarkeit von weißen und schwarzen Mikrotiterplatten geprüft sowie die Linearität der Fluoreszenzintensität der Metabolite untersucht. Des Weiteren wurden die Umsetzungsgeschwindigkeiten der verwendeten Substrate sowie die  $IC_{50}$ -Werte von Standardinhibitoren bestimmt und mit Literaturwerten verglichen.

Für die Durchführung der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays wurde ein *Cary-Eclipse Mikrotiterplatten-Reader* der Firma Varian (Darmstadt) verwendet. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenzsignale muss gerätebedingt unter 1000 liegen, da das verwendete Fluorimeter nur Messwerte zwischen 1 und 999 registriert. Die Fluoreszenzintensität ist dabei dimensionslos. Die Spaltbreiten des Anregungs- und Emissionsfilters wurden in dieser Arbeit jeweils so gewählt, dass die Fluoreszenzintensität bei einer Inkubation mit 100 %iger Enzymaktivität etwa im mittleren Messbereich (ca. 200-600) lag. Allgemein gilt: je größer die Spaltbreite der Filter gewählt wird, desto größer wird der Wellenlängenbereich für die Anregung und Emission. D. h. aufgrund des größeren Anregungswellenlängenbereichs wird eine Probe mit einer höheren Energie angeregt und aufgrund des größeren Emissionswellenlängenbereichs wird eine höhere Emissionsenergie (Fluoreszenz) gemessen. Sowohl eine höhere Anregungs- als auch Emissionsenergie führt somit zu einer Zunahme der Fluoreszenzintensität. Bei komplexen Matrices (z. B. Pflanzenextrakten) kann die Auswahl einer großen Spaltbreite des Emissions- oder Anregungsfilters die Selektivität der Fluoreszenzmessung beeinträchtigen. Während die Firma Gentest in der Beschreibung der Fluoreszenz-Assays sehr hohe Spaltbreiten für die Filter der Anregungs- und Emissionswellenlängen (20-40 nm) angibt ([www.gentest.com](http://www.gentest.com)), wurden in dieser Arbeit Spaltbreiten zwischen 5 und 15 nm für die unterschiedlichen CYP-Assays verwendet. Die jeweils verwendeten Spaltbreiten der Anregungs- und Emissionsfilter der verschiedenen CYP-Assays sind in Kapitel V Material und Methoden unter 2.4.2 detailliert aufgeführt. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen sowie die Inkubationsbedingungen wurden der Gentest-Methode angepasst.

### 2.4.1 Eignung der Mikrotiterplatten

Für die Durchführung der Fluoreszenz-basierten CYP-Assays werden in der Regel 96-Well-Mikrotiterplatten (Arbeitsvolumen bis ca. 340 µl) mit einem Inkubationsvolumen von 200 µl verwendet. Am häufigsten werden die Fluoreszenz-Assays in schwarzen Mikrotiterplatten durchgeführt.<sup>129,130,180-183,199,201</sup> Dies beruht wahrscheinlich darauf, dass die Firma Gentest, die die Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays entwickelt und validiert hat, in einem ausführlichen Arbeitsprotokoll zur Durchführung der Assays die Verwendung von schwarzen Mikrotiterplatten empfiehlt (www.gentest.com). Die Arbeitsgruppen von Budzinski und Foster, die Naturstoffe und Pflanzenextrakte mit Hilfe der Gentest-Assays auf die Inhibition von CYP-Enzymen untersuchten, verwendeten dagegen ausschließlich Mikrotiterplatten mit durchsichtigen Boden.<sup>77-79,195</sup> Da jeweils unterschiedliche Fluorimeter verwendet wurden, ist davon auszugehen, dass die Verwendung der unterschiedlichen Mikrotiterplatten hauptsächlich abhängig ist vom verwendeten Fluorimeter. Der Hersteller des in dieser Arbeit verwendeten Fluorimeters (Varian, Darmstadt) empfiehlt die Verwendung von schwarzen oder weißen 96-Well-Mikrotiterplatten.

In den folgenden Abschnitten wurde die Eignung von weißen und schwarzen Mikrotiterplatten für die Fluoreszenz-basierten CYP-Assays untersucht. Hierfür wurden das Signal/Rausch-Verhältnis (Hintergrundfluoreszenz) von weißen und schwarzen Mikrotiterplatten sowie die IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt. Für die Untersuchungen diente die CYP1A2-katalysierte Deethylierung von CEC zu CHC (siehe II.2.3.1.1, Abb. 35).

#### 2.4.1.1 Signal/Rausch-Verhältnis

Mit Hilfe der Kontrollinkubationen für CYP1A2 (Substrat: CEC; 100 %ige Enzymaktivität) wurden die Spaltbreiten des Anregungs- und Emissionsfilters unter Verwendung von weißen und schwarzen Mikrotiterplatten so gewählt, dass eine ausreichende Intensität der Fluoreszenzsignale erhalten wurde. In Tab. 11 sind die absoluten Fluoreszenzintensitäten der Kontrollinkubation bei unterschiedlichen Spaltbreiten des Emissionsfilters dargestellt. Um bei der Kontrollinkubation Fluoreszenzintensitäten zwischen 200-600 zu erhalten, musste für die schwarzen

Mikrotiterplatten eine Spaltbreite von  $\pm 10/\pm 20$  nm (Anregung/Emission) eingestellt werden, wobei für die weißen Mikrotiterplatten eine Spaltbreite von  $\pm 5/\pm 5$  nm ausreichte (Tab. 11). Bei doppelter Spaltbreite des Emissionsfilters (von  $\pm 10$  nm auf  $\pm 20$  nm) resultierte für die schwarzen Mikrotiterplatten ungefähr eine Zunahme der Fluoreszenzintensität um den Faktor 5-6 (Tab. 11). Da jedoch die Fluoreszenzintensität des Hintergrundes („Hintergrund-Rauschen“) um den gleichen Faktor zunimmt, bewirkt eine Vergrößerung der Spaltbreite in der Regel zwar eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität aber keine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (Tab. 11). Die Hintergrundfluoreszenz wird durch eine so genannte Hintergrundkontrolle bestimmt, deren Zusammensetzung (Puffer, Enzym, NADPH, Substrat) der einer Kontrollinkubation (100 %ige Enzymaktivität) entspricht, wobei keine enzymatische Umsetzung erfolgt.

**Tab. 11** Fluoreszenzintensitäten einer CYP1A2-Kontrollinkubation (Substrat: 3-Cyano-7-ethoxycumarin; 100 %ige Enzymaktivität) und einer Hintergrundkontrolle (siehe Text) bei unterschiedlichen Filterspaltbreiten für die Anregung und Emission zur Bestimmung des Signal-Rausch-Verhältnisses der verwendeten Mikrotiterplatten. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge betrug 409 nm und 460 nm.

Filterspaltbreite ( $\pm$ ) für Anregung/Emission	Fluoreszenzintensität			
	weiße Mikrotiterplatte		schwarze Mikrotiterplatte	
	5 nm/5 nm	5 nm/10 nm	10 nm/10 nm	10 nm/20 nm
<b>Kontrolle</b>	332	>999	75	428
<b>Hintergrundkontrolle</b>	4	18	31	168
<b>Signal-Rausch-Verhältnis</b>	83:1	-	2,4:1	2,5:1

Für die weißen Mikrotiterplatten resultierte ein Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der Kontrollinkubation (CYP1A2/CEC) zur Hintergrundfluoreszenz von 83 zu 1, während sich für die schwarzen Platten ein sehr geringes Verhältnis von 2,5 zu 1 ergab (Tab. 11). Dieses Ergebnis bestätigte die Angaben des Herstellers der verwendeten Mikrotiterplatten (Nunc, Langenselbold, Deutschland). Im Gegensatz zu schwarzen Mikrotiterplatten verstärken weiße Platten die Fluoreszenzsignale und zeigen eine äußerst geringe Hintergrundfluoreszenz ([www.nunc.de](http://www.nunc.de)).

Für eine empfindliche und reproduzierbare Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen ist eine geringe Hintergrundfluoreszenz bzw. ein relativ großes Signal/Rausch-Verhältnis der Kontrollinkubation (100 %ige Enzymaktivität) von großem Vorteil, da in Anwesenheit von Inhibitoren die Bildung der Metaboliten und somit deren Fluoreszenzintensität stark abnimmt.

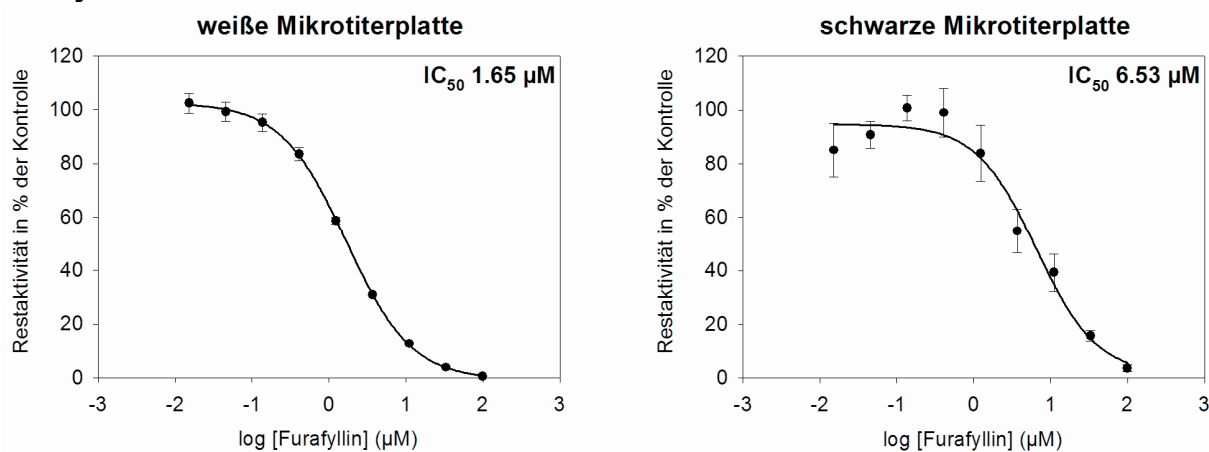
#### 2.4.1.2 Vergleich von $IC_{50}$ -Werten

Für Furafyllin und einem Extrakt aus Thymiankraut (Methanol 80 % V/V) wurden  $IC_{50}$ -Werte bezüglich der Inhibition der CYP1A2-katalysierten Deethylierung von CEC unter Verwendung von weißen und schwarzen Mikrotiterplatten bestimmt. Die fluorimetrische Bestimmung des enzymatisch gebildeten Produkts (CHC) wurde bei einer Anregungs-/Emissionswellenlänge von 409 nm/460 nm mit einer Spaltbreite der Anregungs-/Emissionsfilter von  $\pm 5$  nm/ $\pm 5$  nm für die weiße Platte und von  $\pm 10$  nm/ $\pm 20$  nm für die schwarze Platte durchgeführt, um ausreichende Fluoreszenzintensitäten zu erhalten (Tab. 11). Damit die Abweichungen der Ergebnisse lediglich auf die Verwendung von unterschiedlichen Mikrotiterplatten zurückzuführen waren, wurden die Inkubationen der Proben in Eppendorf-Vials (480  $\mu$ l; 2,4-facher Ansatz) durchgeführt und nach Abstoppen der Reaktion mit Acetonitril/Tris-Base (80/20; 180  $\mu$ l) wurden jeweils 275  $\mu$ l der Inkubationsproben in die Wells einer weißen bzw. schwarzen Mikrotiterplatte pipettiert und mit Hilfe des Fluorimeters vermessen. Anschließend wurden jeweils die  $IC_{50}$ -Werte von Furafyllin und Thymianextrakt berechnet. Die erhaltenen sigmoiden Inhibitionskurven sind in Abb. 41 dargestellt.

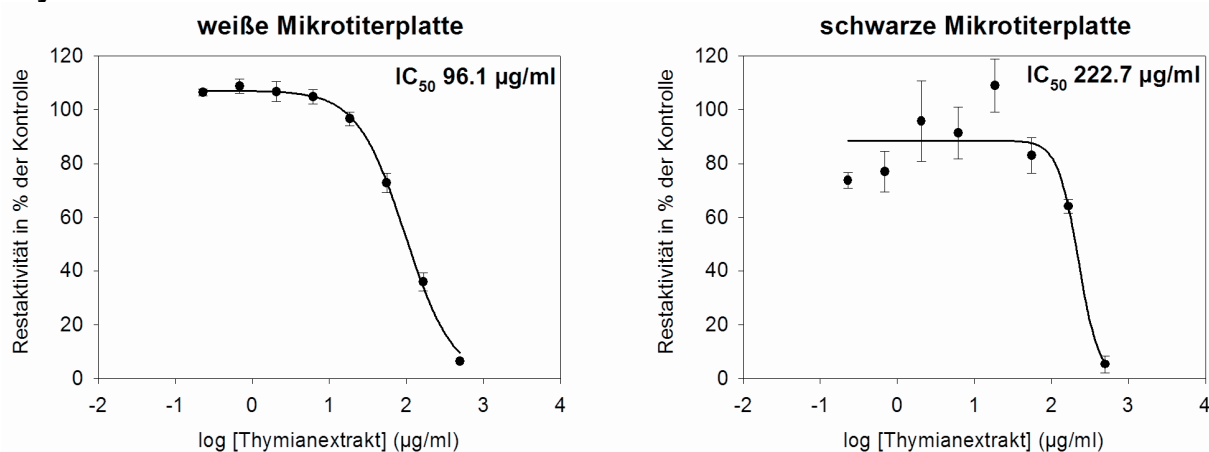
Für die Berechnung des  $IC_{50}$ -Wertes von Furafyllin wurde die nichtlineare Regression mit Hilfe der 4-Parameter-Gleichung nach Hill angewendet (siehe II.1.3.4, Gl. 4). Da selbst hohe Konzentrationen des Thymianextrakts kein 0 %-Plateau ergaben (Abb. 41), wurde für die Berechnung des  $IC_{50}$ -Wertes die nichtlineare Regression mit Hilfe der 3-Parameter-Gleichung nach Hill durchgeführt (siehe II.1.3.4, Gl. 5). Für Furafyllin resultierte unter Verwendung der weißen Platte ein  $IC_{50}$ -Wert von  $1,7 \pm 0,1$   $\mu$ M, der sich jedoch statistisch signifikant ( $P < 0,01$ ) von dem  $IC_{50}$ -Wert ( $6,5 \pm 1,6$   $\mu$ M) unter Verwendung der schwarzen Platte unterscheidet. Im Vergleich mit Literaturwerten (1,3 - 3,0  $\mu$ M)<sup>128,131,199</sup> lag lediglich der  $IC_{50}$ -Wert unter

Verwendung der weißen Platte im Bereich der veröffentlichten Werte. Der  $IC_{50}$ -Wert des Thymianextrakts betrug unter Verwendung der weißen Platte  $96,1 \pm 3,6 \mu\text{g/ml}$  und unter Verwendung der schwarzen Platte  $222,7 \pm 33,3 \mu\text{g/ml}$ . Auch diese berechneten  $IC_{50}$ -Werte unterschieden sich statistisch signifikant ( $P < 0,01$ ).

### Furafyllin



### Thymianextrakt



**Abb. 41** Inhibitionskurven für Furafyllin und Thymianextrakt (Methanol 80 % V/V) bezüglich der CYP1A2-katalysierten Deethylierung von 3-Cyano-7-ethoxycumarin (CEC) zu 3-Cyano-7-hydroxycumarin (CHC) unter Verwendung von weißen und schwarzen Mikrotiterplatten.

In Abb. 41 fällt auf, dass bei Verwendung der weißen Mikrotiterplatte die berechneten Restaktivitäten für die Konzentrationen der Substanz Furafyllin und des Thymianextrakts relativ genau eine sigmoide Hemmkurve bilden. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$ , als Maß für den sigmoiden Zusammenhang zwischen der Furafyllin-Konzentration bzw. der Konzentrationen des Thymianextrakts und der Restaktivität, betrug unter Verwendung der weißen Mikrotiterplatte mehr als 0,99 (Tab. 12). Unter Verwendung

der schwarzen Platte lagen die Werte der Restaktivität relativ „verstreut“ außerhalb der berechneten sigmoiden Hemmkurve (Abb. 41). Dies verdeutlichte das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  der sigmoiden Hemmkurven von Furafyllin mit einem Wert von 0,937 und von Thymianextrakt mit einem Wert von lediglich 0,802 (Tab. 12). Auch die Standardabweichungen der einzelnen Werte ( $n = 3$ ) waren unter Verwendung der schwarzen Mikrotiterplatte verglichen mit denen der weißen Platte sehr groß (Abb. 41).

**Tab. 12** Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) für den sigmoiden Zusammenhang zwischen der Furafyllin- bzw. Thymianextrakt-Konzentration und der Restaktivität von CYP1A2 bezüglich der Deethylierung von 3-Cyano-7-ethoxycumarin (Abb. 41).

	Bestimmtheitsmaß $R^2$	
	Furafyllin	Thymianextrakt
<b>weiße Mikrotiterplatte</b>	0,998	0,994
<b>schwarze Mikrotiterplatte</b>	0,937	0,802

### 2.4.1.3 Fazit

Für die Durchführung der Fluoreszenz-basierten CYP-Assays in Verbindung mit dem in dieser Arbeit verwendeten Fluorimeter (Cary Eclipse, Varian) sind weiße Mikrotiterplatten zu bevorzugen, da die Werte der Restaktivität sowohl für Furafyllin als auch für den verwendeten Thymianextrakt eindeutige sigmoide Hemmkurven ergaben. Außerdem stimmte der  $IC_{50}$ -Wert von Furafyllin mit den Literaturwerten überein. Ebenso war unter den gegebenen Bedingungen das Signal-Rausch-Verhältnis der weißen Platten ca. 30-fach höher als das der schwarzen Platten (Tab. 11). Das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis der schwarzen Platten begründet die relativ großen Standardabweichungen der einzelnen Messwerte und das relativ niedrige Bestimmtheitsmaß der Hemmkurven (Abb. 41, Tab. 12). Da für die Berechnung der Restaktivität die Differenz aus der Signalintensität einer Probe und des Hintergrunds gebildet wird (siehe Gl. 12), hängt die Auswertbarkeit, Richtigkeit und die Reproduzierbarkeit der Inhibitionsdaten sehr stark vom Signal-Rausch-Verhältnis ab. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse sind somit schwarze

Mikrotiterplatten für die fluorimetrische Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen zumindest mit dem in dieser Arbeit verwendeten Fluorimeter nicht geeignet.

Obwohl die Firma Gentest in ihrem Arbeitsprotokoll zur Durchführung der Fluoreszenz-basierten CYP-Assays schwarze Mikrotiterplatten vorschreibt, ist es sehr wichtig und empfehlenswert, die Mikrotiterplatten (schwarz, weiß, mit durchsichtigem Boden etc.) auf Anwendbarkeit und Eignung hinsichtlich der Methode und dem verwendeten Fluorimeter zu überprüfen.

#### **2.4.2 Bestimmung der Linearität der Fluoreszenzintensität**

Voraussetzung für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Testsubstanzen ist ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und der daraus resultierenden Fluoreszenzintensität der Metaboliten. Für die Bestimmung der Linearität wurde eine Verdünnungsreihe der entsprechenden Metaboliten über einen Konzentrationsbereich von 0,1 bis 1000 ng/ml hergestellt und fluorimetrisch vermessen. Die Verdünnungen enthielten Substrat, Protein, NADPH, Abstopplösung und Inkubationspuffer in der gleichen Zusammensetzung wie ein „echter“ Inkubationsansatz (Details siehe Material und Methoden V.2.4). Die resultierenden Fluoreszenzintensitäten wurden graphisch gegen die Metabolitenkonzentrationen aufgetragen und mit Hilfe der linearen Regression das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  als Maß für die Linearität der erhaltenen Datenpunkte berechnet. In Tab. 13 sind die Linearitätsbereiche des jeweiligen Metaboliten und das aus der linearen Regression resultierende Bestimmtheitsmaß aufgeführt. Für die Regressionsgeraden der in Tab. 13 angegebenen Konzentrationsbereiche ergab sich ein Bestimmtheitsmaß größer als 0,998.

**Tab. 13** Konzentrationsbereiche der Metaboliten AHMC, CHC, HFC, Fluorescein und Resorufin, in denen sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration und der daraus resultierenden Fluoreszenzintensität mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2 > 0,99$  ergibt.

Metabolit	Konzentrationsbereich	$R^2$
3-[2-( <i>N,N</i> -Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin* (AHMC)	2,5 - 250 ng/ml	0,999
3-Cyano-7-hydroxycumarin (CHC)	0,25 - 250 ng/ml	0,999
7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC)	1,0 - 750 ng/ml	0,999
Fluorescein	0,25 - 100 ng/ml	0,999
Resorufin	0,25 - 100 ng/ml	0,998

\*externer Standard zur Quantifizierung des CYP2D6-Metaboliten 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin (AMHC)

### 2.4.3 Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit der Substrate

Für die Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit der Fluoreszenzsubstrate wurden die CYP-Enzyme mit den entsprechenden Substraten in Anwesenheit von NADPH inkubiert, die Fluoreszenzintensität des enzymatisch gebildeten Metaboliten gemessen und mit Hilfe von externen Kalibrierstandards die Konzentrationen des Metaboliten bestimmt. Unter Einbeziehung von Inkubationsdauer und Enzymmenge (siehe Experimental-Teil X.Y.Z) wurde aus der resultierenden Metabolitenmenge die Umsetzungsgeschwindigkeit  $V$  in „pmol/min/pmol CYP-Enzym“ berechnet (Tab. 14). Fast alle verwendeten Fluoreszenzsubstrate wurden von den entsprechenden CYP-Enzymen mit einer moderaten Geschwindigkeit zwischen 0,1 und 3,5 pmol/min/pmol CYP-Enzym umgesetzt (Tab. 14). Die Ausnahmen waren BFC bezüglich CYP3A4 und CEC bezüglich CYP1A2, die mit Werten von 18,7 bzw. 28,8 pmol/min/pmol CYP-Enzym extrem hohe Umsetzungsgeschwindigkeiten zeigten (Tab. 14).



**Tab. 14** Vergleich der Umsetzungsgeschwindigkeiten (V) der Fluoreszenzsubstrate für die CYP-Enzyme 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4.

Enzym	Substrat <sup>a</sup> (Konz.)	Metabolit <sup>b</sup>	V [pmol/min/pmol CYP-Enzym]	
			Ergebnis	Literatur <sup>183</sup>
CYP1A2	CEC (5 µM)	CHC	28,80	8,60
	EthRes (5 µM)	Resorufin	1,33	-
CYP2B6	EFC (2,5 µM)	HFC	0,39	-
CYP2C8	DBF (1 µM)	Fluorescein	0,32	0,26
CYP2C9	MFC (75 µM)	HFC	0,91	0,76
CYP2C19	CEC (25 µM)	CHC	3,47	0,89
CYP2D6	AMMC (1,5 µM)	AMHC	1,02	1,20
CYP3A4	BFC (50 µM)	HFC	18,73	1,54
	BzRes (50 µM)	Resorufin	0,080	0,079

<sup>a</sup>AMMC: 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin; BFC: 7-Benzoyloxy-4-trifluormethylcumarin; BzRes: Benzoyloxyresorufin; CEC: 3-Cyano-7-ethoxycumarin; DBF: Dibenzylfluorescein; EFC: 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; EthRes: Ethoxyresorufin; MFC: 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin.

<sup>b</sup>AMHC: 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin; CHC: 3-Cyano-7-hydroxycumarin; HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin.

Die ermittelten Umsetzungsgeschwindigkeiten stimmen mit den Literaturwerten von Stresser et al. (2002)<sup>183</sup> sehr gut überein (Tab. 14). Eine sehr große Abweichung ergab sich allerdings für die Umsetzungsgeschwindigkeit von BFC bezüglich CYP3A4. Die ermittelte Umsetzungsgeschwindigkeit lag mehr als das 10-fache höher als der Literaturwert. Des Weiteren waren die Umsetzungsgeschwindigkeiten von CEC bezüglich CYP1A2 und CYP2C19 ungefähr um das 3,5-fache höher verglichen mit den Literaturwerten. Da jedoch die Umsetzungsgeschwindigkeit der Substrate sehr stark von der Enzymaktivität abhängt, können die Umsetzungsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der Expressionssysteme (z. B. Baculovirus-infizierte Insektenzellen, *Escherichia coli*), der Proteinzusammensetzung (z. B. NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase) und der Inkubationsbedingungen (z. B. Puffer) sehr stark variieren.<sup>202</sup>

#### 2.4.4 Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte von Standardinhibitoren

Zur Evaluierung der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays wurden zudem noch die IC<sub>50</sub>-Werte von Standardinhibitoren bestimmt. Als Standardinhibitoren wurden die Substanzen Furafyllin (CYP1A2), Tranylcypromin (CYP2B6, CYP2C19), Quercetin (CYP2C8), Sulfaphenazol (CYP2C9), Chinidin (CYP2D6) und Ketoconazol (CYP3A4) verwendet.<sup>141,150</sup> Für alle Inhibitoren wurden sigmoidal-verlaufende Inhibitionskurven für die entsprechenden CYP-Enzyme erhalten (Abb. 42, Abb. 43). Die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte erfolgte mittels nichtlinearer Regression. Ein großer Nachteil für die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte war, dass die hohen Konzentrationen von Quercetin, Tranylcypromin und Ketoconazol bei der Umsetzung von DBF durch CYP2C8, CYP2C19 bzw. CYP3A4 sowie die hohen Konzentrationen von Chinidin bei der Umsetzung von AMMC durch CYP2D6 nicht berücksichtigt werden konnten, da für die berechneten Restaktivitäten der entsprechenden CYP-Enzyme negative Werte erhalten wurden (Abb. 42, Abb. 43). Der Grund hierfür ist, dass die hohen Inhibitorkonzentrationen nicht nur die Umsetzung der Substrate hemmten, sondern zusätzlich das Signal der Hintergrundfluoreszenz quenchten, so dass negative Restaktivitätswerte resultierten. Um dies zu verdeutlichen, ist hier noch einmal die Gleichung zur Berechnung der inhibitorischen Aktivität angegeben (siehe II.2.3.2, Gl. 12).

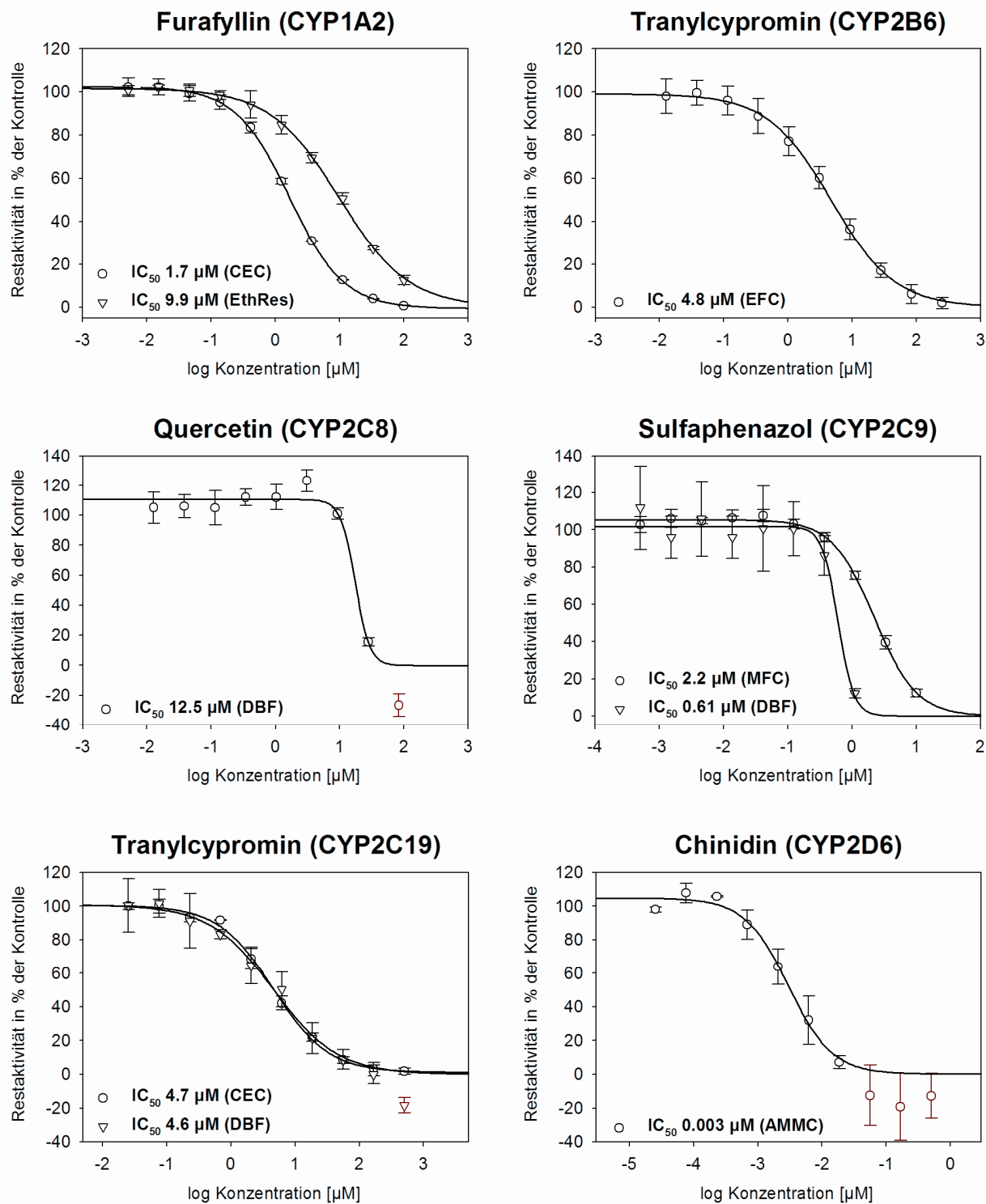
$$\text{Restaktivität} = \frac{F_I - F_{\text{HG}}}{F_K - F_{\text{HG}}} \cdot 100$$

$F_I$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Inhibitorprobe

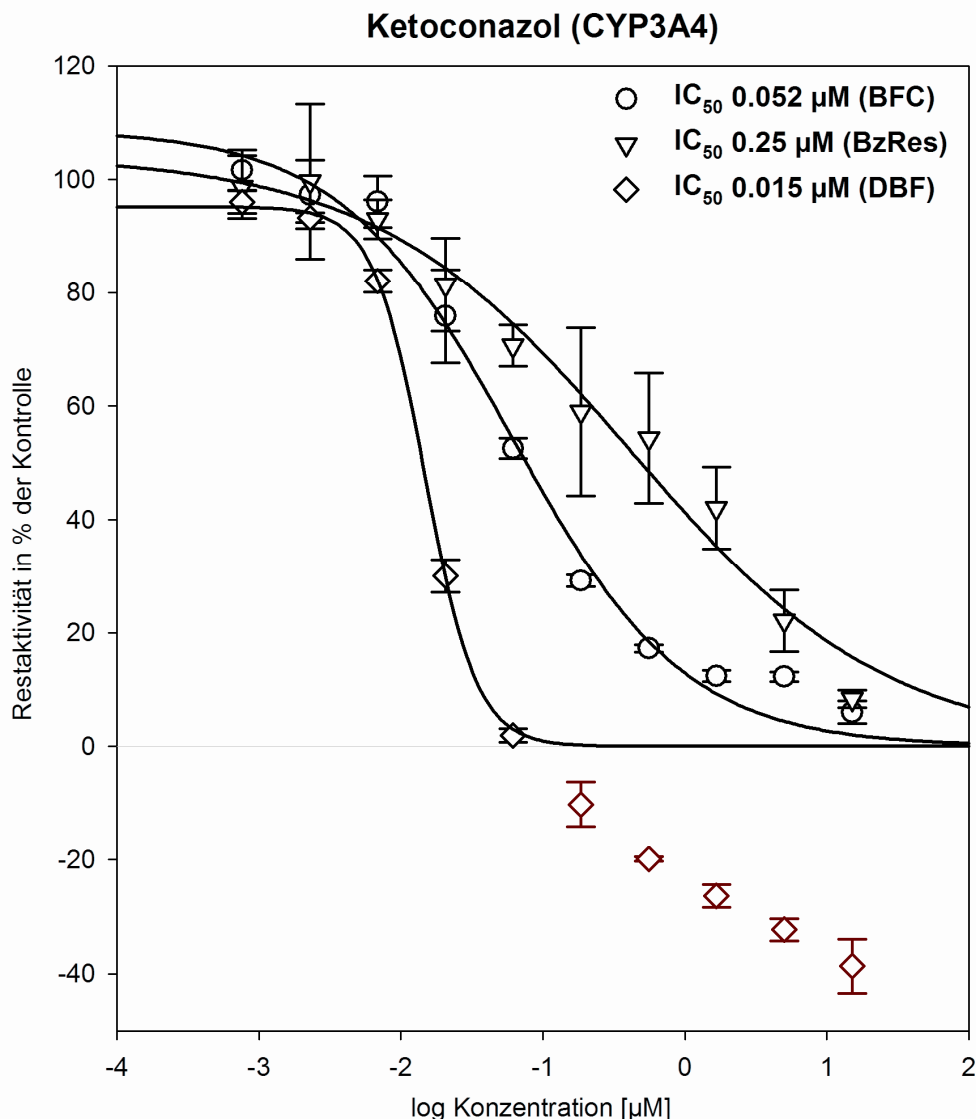
$F_{\text{HG}}$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Hintergrundkontrolle

$F_K$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Kontrolle

Negative Werte resultieren somit, wenn die Fluoreszenzintensität der Inhibitorprobe kleiner ist als die Fluoreszenzintensität der Hintergrundkontrolle ( $F_I < F_{\text{HG}}$ ). Da in der Hintergrundkontrolle kein Inhibitor sondern nur Substrat, Enzym, Puffer und Abstopplösung anwesend ist, wird die Hintergrundfluoreszenz nicht durch den Inhibitor beeinflusst.



**Abb. 42** Inhibitionskurven für die Inhibitoren Furafyllin (CYP1A2), Tranlycypromin (CYP2B6/CYP2C19), Quercetin (CYP2C8), Sulfaphenazol (CYP2C9) und Chinidin (CYP2D6). Als Substrate wurden AMMC, CEC, DBF, EFC, EthRes und MFC verwendet. Die unter 0 % liegenden Datenpunkte wurden für die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte nicht berücksichtigt.



**Abb. 43** Inhibitionskurven für Ketoconazol (CYP3A4) unter Verwendung von BFC, BzRes und DBF als Substrate. Die unter 0 % liegenden Datenpunkte wurden für die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte nicht berücksichtigt.

In Tab. 15 sind die nach nichtlinearer Regression resultierenden  $IC_{50}$ -Werte mit den entsprechenden Hill-Koeffizienten ( $n_H$ ) zusammengefasst. Für die Hemmung der Dealkylierung der Cumarin-Derivate BFC, CEC, EFC und MFC zeigten alle Inhibitoren sigmoide Hemmkurven (Abb. 42; Abb. 43) mit Hill-Koeffizienten ( $n_H$ ) von 0,9 bis 1,3 (Tab. 15). Die Steigung dieser Hemmkurven entsprach somit ungefähr einer Standard-Inhibitionskurve ( $n_H = 1$ ; siehe II.1.3.4). Auch für den Inhibitor Tranylcypromin wurde eine sigmoide Inhibitionskurve mit einem Hill-Koeffizienten von 0,9 für die Hemmung der Umsetzung von Dibenzylfluorescein (DBF) durch CYP2C19 erhalten (Tab. 15). Dagegen resultierten für die Inhibitoren Quercetin

(CYP2C8;  $n_H = 3,9$ ), Sulfaphenazol (CYP2C9;  $n_H = 3,4$ ) und Ketoconazol (CYP3A4;  $n_H = 2,5$ ) unter Verwendung von DBF als CYP-Substrat extrem steil-verlaufende sigmoide Hemmkurven (Abb. 42; 43), was auf eine positive Kooperativität der Inhibitor-Enzym-Bindung hinweist (II.1.3.4). Unter Verwendung von Resorufin-Derivaten als CYP-Substrate verliefen die Hemmkurven für die Inhibitoren Furafyllin (CYP1A2/Ethoxyresorufin;  $n_H = 0,8$ ) und Ketoconazol (CYP3A4/Benzyloxyresorufin;  $n_H = 0,4$ ) eher flach (Abb. 42; Abb. 43), was auf eine negative Kooperativität der Inhibitor-Enzym-Bindung hindeutet (II.1.3.4).

Wie in Abb. 42 (Sulfaphenazol/CYP2C9) und Abb. 43 (Ketoconazol/CYP3A4) ersichtlich, hing die Steigung der Inhibitionskurven bzw. die Kooperativität der Inhibitor-Enzym-Bindung (Hill-Koeffizient) von den verwendeten Substraten ab. Da beispielsweise CYP3A4 mehrere Bindungsstellen im aktiven Zentrum besitzt,<sup>203</sup> können mehrere Substratmoleküle an unterschiedlichen Stellen im aktiven Zentrum des Enzyms binden. Die Folge ist, dass je nach Substrat die inhibitorische Aktivität einer Substanz für CYP3A4 sehr stark variieren kann. Zum Beispiel resultierten für Ketoconazol unter Verwendung von BFC, BzRes und DBF als CYP3A4-Substrate neben unterschiedlich steil-verlaufenden Hemmkurven auch unterschiedliche  $IC_{50}$ -Werte (Tab. 15). Die Abhängigkeit der  $IC_{50}$ -Werte von den CYP3A4-Substraten ist nicht nur auf Fluoreszenz-Substrate beschränkt, sondern tritt auch bei den häufig als CYP3A4-Substraten verwendeten Arzneistoffen, wie z. B. Midazolam, Testosteron und Nifedipin, auf.<sup>204</sup> Letztendlich ist dies darauf zurückzuführen, dass CYP3A4 kooperative Bindungsstellen besitzt, d. h. je nach Substrat verändert sich (positiv oder negativ) die Affinität der Substrate für die Bindung weiterer Substratmoleküle mit der Zahl der besetzten Substrat-Bindungsstellen.<sup>205,206</sup> Für die *In-vitro*-Bestimmung der Inhibition von CYP3A4 durch Arzneistoffe werden aufgrund dieser Tatsachen sehr häufig zwei strukturell unterschiedliche Substrate verwendet.<sup>141</sup> Neben CYP3A4 wurde auch für CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9 und CYP2D6 eine Kooperativität beschrieben.<sup>207</sup>

**Tab. 15** Vergleich der durch die Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte der Standardinhibitoren mit bereits veröffentlichten IC<sub>50</sub>-Werten. Der Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) gibt die Steigung der ermittelten Inhibitionskurve bzw. die Kooperativität der Inhibitor-Enzym-Bindung an.

Inhibitor	CYP	Substrat	IC <sub>50</sub> -Wert [μM]	$n_H$	Literatur: IC <sub>50</sub> -Wert [μM]	
Furafyllin	1A2	CEC	1,7 ± 0,1	1,0	1,3 Crespi et al. (1997) <sup>128</sup> 1,7 Ganzera et al. (2005) <sup>199</sup> 3,0 Zou et al. (2002) <sup>132</sup>	
		EthRes	9,9 ± 1,5	0,8	6,0 Moody et al. (1999) <sup>169</sup> 5,1 Bu et al. (2001) <sup>172</sup>	
Tranylcypromin	2B6	EFC	4,8 ± 0,7	0,9	5,0 Crespi et al. (1997) <sup>128</sup>	
Quercetin	2C8	DBF	12,5 ± 1,2	3,9	1,5 Crespi et al. (1997) <sup>128</sup>	
Sulfaphenazol	2C9	MFC	2,2 ± 0,2	1,3	0,24 Ganzera et al. (2005) <sup>199</sup> 0,27 Crespi et al. (1997) <sup>128</sup> 0,92 Henderson et al. (1999) <sup>194</sup>	
		DBF	0,61 ± 0,40	3,4		
Tranylcypromin	2C19	CEC	4,7 ± 0,5	1,0	0,75 Crespi et al. (1997) <sup>128</sup> 5,5 Zou et al. (2002) <sup>132</sup> 4,0 Henderson et al. (1999) <sup>194</sup>	
		DBF	4,6 ± 1,3	0,9	1,9 Crespi et al. (1997) <sup>128</sup>	
Chinidin	2D6	AMMC	0,003 ± 0,001	1,3	0,004 Ganzera et al. (2005) <sup>199</sup> 0,012 Zou et al. (2002) <sup>132</sup> 0,014 Crespi et al. (1997) <sup>128</sup>	
Ketoconazol	3A4	BFC	0,052 ± 0,005	1,1	0,018 Ganzera et al. (2005) <sup>199</sup> 0,050 Crespi et al. (1997) <sup>128</sup> 0,072 Stresser et al. (2000) <sup>181</sup>	
		BzRes	0,25 ± 0,04	0,4	0,03 Stresser et al. (2000) <sup>181</sup> 0,11 Crespi et al. (1997) <sup>128</sup> 0,12 Zou et al. (2002) <sup>132</sup>	
		DBF	0,015 ± 0,001	2,5	0,002 Crespi et al. (1997) <sup>128</sup> 0,050 Bell et al. (2008) <sup>208</sup>	

AMMC: 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin; BFC: 7-Benzoyloxy-4-trifluormethylcumarin, BzRes: Benzoyloxyresorufin; CEC: 3-Cyano-7-ethoxycumarin, DBF: Dibenzylfluorescein; EFC: 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; EthRes: Ethoxyresorufin; MFC: 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin.

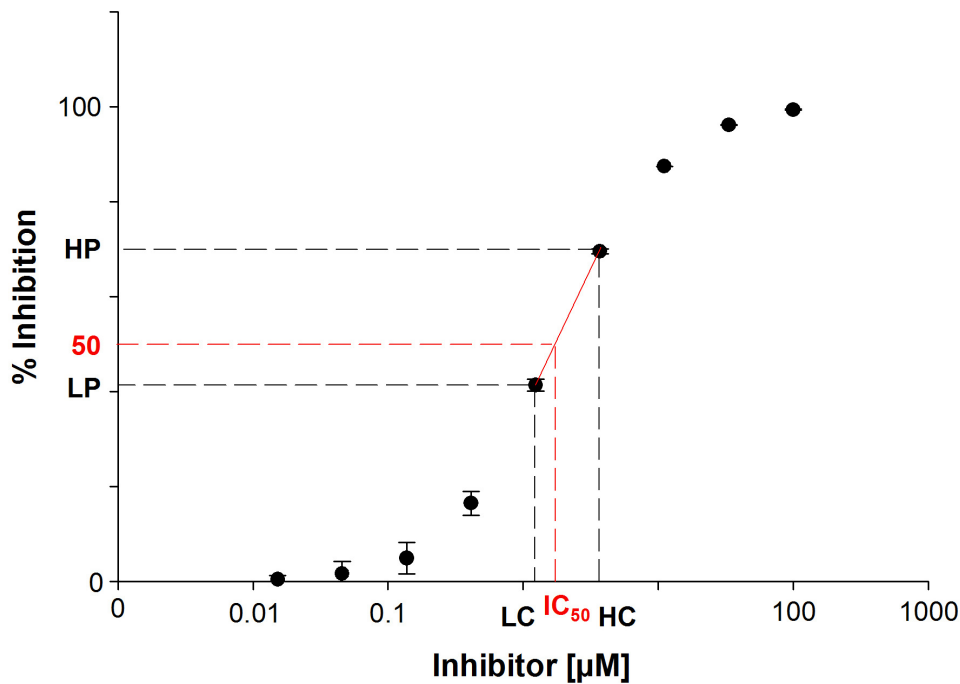
Fast alle der in dieser Arbeit ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte der Standardinhibitoren lagen im Bereich der bereits publizierten IC<sub>50</sub>-Werte (Tab. 15). Nur für den Inhibitor Quercetin (CYP2C8/DBF) resultierte ein etwa 10-fach höherer IC<sub>50</sub>-Wert (12,5 μM) als der Literaturwert (1,5 μM) und die erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte der Inhibitoren Sulfaphenazol (CYP2C9/MFC) und Ketoconazol (CYP3A4/BzRes) waren im Vergleich etwa um den Faktor zwei höher. Vergleicht man jedoch die in der Literatur veröffentlichten IC<sub>50</sub>-Werte untereinander, resultieren auch hier zum Teil große Abweichungen.

Beispielsweise ergibt sich für die Inhibitoren Tranylcypromin (CYP2C19/CEC) eine Abweichung um das 8-fache ( $0,75 \mu\text{M}$  vs.  $5,5 \mu\text{M}$ ) und für Ketoconazol (CYP3A4/DBF) sogar um das 25-fache ( $0,002 \mu\text{M}$  vs.  $0,05 \mu\text{M}$ ; Tab. 15).

### **3 Vergleich der nichtlinearen Regression und linearen Interpolation als Verfahren zur Berechnung von $IC_{50}$ -Werten**

Die  $IC_{50}$ -Werte werden in der Regel mit Hilfe der nichtlinearen Regression bestimmt, um die Sigmoidität der Inhibitionskurven zu berücksichtigen (siehe II.1.3.4). In einigen Publikationen jedoch, in denen für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität Mikrotiterplatten-basierte Fluoreszenz-Assays eingesetzt wurden, wurden die Berechnungen der  $IC_{50}$ -Werte mit Hilfe der linearen Interpolation durchgeführt.<sup>77,131,182</sup> Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass die Firma Gentest in ihrer ausführlichen Vorschrift für die Durchführung der CYP-Assays auch die Auswertung der Ergebnisse mit Hilfe der linearen Interpolation beschreibt ([www.gentest.com](http://www.gentest.com)).

Im Gegensatz zur nichtlinearen Regression, bei der durch eine algorithmische Annäherung die Inhibitionskurve mit Hilfe von Softwareprogrammen beschrieben wird (siehe II.1.3.4, Gl. 4/5), werden bei der linearen Interpolation die ermittelten Datenpunkte der Konzentrationen der Testsubstanz ( $LC$ ,  $HC$ ), die möglichst nahe unterhalb ( $LP$ ) und oberhalb ( $HP$ ) der 50 %igen-Inhibition liegen (Abb. 44), linear interpoliert.



**Abb. 44** Graphische Darstellung der  $IC_{50}$ -Wert-Bestimmung mit Hilfe der linearen Interpolation. HP und LP stellen die prozentualen Inhibitionswerte der Konzentrationen (HC, LC) dar, die sich möglichst nahe ober- und unterhalb der 50 %igen-Inhibitionsmarke befinden; x-Achse = logarithmische Auftragung der InhibitorKonzentration; y-Achse = prozentuale Inhibition der Enzymaktivität gegenüber der Kontrolle.

Der mittlere Bereich der sigmoiden Kurve wird so mit Hilfe einer Geraden durch die Koordinaten (LC,LP) und (HC,HP) näherungsweise beschrieben. Allgemein gilt für die lineare Interpolation zweier Datenpunkte  $(x_0, y_0)$  und  $(x_1, y_1)$ :

$$y = y_0 + \frac{(y_1 - y_0)}{(x_1 - x_0)} \cdot (x - x_0) \quad (\text{Gl. 13})$$

Aus dieser Formel ergibt sich so für die Berechnung des  $IC_{50}$ -Wertes folgende Gleichung:

$$50 = LP + \frac{(HP - LP)}{(HC - LC)} \cdot (IC_{50} - LC) \quad (\text{Gl. 14})$$

LP = höchste prozentuale Inhibition unterhalb von 50 %

HP = niedrigste prozentuale Inhibition oberhalb von 50 %

HC = Konzentration der Testsubstanz bei HP

LC = Konzentration der Testsubstanz bei LP

$IC_{50}$  = InhibitorKonzentration, die eine 50 %ige Hemmung der Enzymaktivität bewirkt



Aufgelöst nach dem Faktor  $IC_{50}$  ergibt sich so die nachfolgende Gleichung (Gl. 15) für die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes mit Hilfe der linearen Interpolation.

$$IC_{50} = \frac{(HC - LC)}{(HP - LP)} \cdot (50 - LP) + LC \quad (\text{Gl. 15})$$

Für die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte werden somit bei linearer Interpolation lediglich zwei Messwerte im Bereich der 50 %igen-Inhibitionsmarke berücksichtigt und nicht der sigmoide Verlauf der vollständigen Inhibitionskurve.

Des Weiteren wird aus Gl. 15 ersichtlich, dass für die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte mit Hilfe der linearen Interpolation keine Softwareprogramme benötigt werden. Für die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte mit Hilfe der nichtlinearen Regression sind dagegen spezielle Softwareprogramme, wie z .B. das in dieser Arbeit verwendete Programm SigmaPlot<sup>®</sup> notwendig.

Um zu überprüfen, ob die lineare Interpolation für die Bestimmung von  $IC_{50}$ -Werten geeignet ist und zu vergleichbaren Ergebnissen wie die nichtlineare Regression führt, wurden  $IC_{50}$ -Werte von Standardinhibitoren mittels linearer Interpolation und nichtlinearer Regression berechnet (Tab. 16). Für die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte wurden Mikrotiterplatten-basierte Fluoreszenz-Assays verwendet. Bei allen Werten, die mit nichtlinearer Regression bestimmt wurden, erfolgte die Berechnung mit Hilfe der 4-Parameter-Gleichung nach Hill (II.1.3.4, Gl. 4).

Während für Tranylcypromin (CYP2B6, CYP2C19) und Chinidin (CYP2D6) mittels linearer Interpolation vergleichbare  $IC_{50}$ -Werte bestimmt wurden, unterschieden sich die kalkulierten  $IC_{50}$ -Werte von Furafyllin (CYP1A2), Quercetin (CYP2C8), Sulfaphenazol (CYP2C9) und Ketoconazol (CYP3A4) von den Werten der nichtlinearen Regression statistisch signifikant mit  $P < 0,05$  bzw.  $P < 0,01$  (Tab. 16). Für Furafyllin (CYP1A2), Quercetin (CYP2C8) und Sulfaphenazol (CYP2C9) lagen die Abweichungen der berechneten  $IC_{50}$ -Werte zwischen 15 und 18 %. Die  $IC_{50}$ -Werte von Ketoconazol (CYP3A4) unterschieden sich sogar um 30 % (Tab. 16).

**Tab. 16** Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte verschiedener Testsubstanzen für CYP-Enzyme berechnet mit Hilfe nichtlinearer Regression und linearer Interpolation unter Verwendung von Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays (\*0,01 < P < 0,05; \*\*P < 0,01).

CYP	Testsubstanz	Substrat <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> -Wert [µM]		
			nichtlineare Regression	lineare Interpolation	Abweichung
1A2	Furafyllin	CEC	1,65 ± 0,08**	2,00 ± 0,08**	18 %
2B6	Tranilcypromin	EFC	5,16 ± 0,35	5,72 ± 1,30	10 %
2C8	Quercetin	DBF	12,43 ± 1,18*	14,64 ± 0,48*	15 %
2C9	Sulfaphenazol	MFC	2,23 ± 0,23*	2,70 ± 0,11*	17 %
2C19	Tranilcypromin	CEC	4,70 ± 0,96	4,92 ± 0,77	5 %
2D6	Chinidin	AMMC	0,0046 ± 0,0030	0,0045 ± 0,0021	0 %
3A4	Ketoconazol	BFC	0,052 ± 0,011*	0,075 ± 0,009*	30 %

<sup>a</sup>AMMC: 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin; BFC: 7-Benzoyloxy-4-trifluormethyl-cumarin; CEC: 3-Cyano-7-ethoxycumarin; DBF: Dibenzylfluorescein; EFC: 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; MFC: 7-Methoxy-4-trifluormethyl-cumarin

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Bestimmung mittels linearer Interpolation im Vergleich zur nichtlinearen Regression in einigen Fällen zu statistisch signifikant unterschiedlichen IC<sub>50</sub>-Werten führte. Die lineare Interpolation sollte somit nur für eine grobe Abschätzung der IC<sub>50</sub>-Werte benutzt werden, da für die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte lediglich zwei Messwerte im Bereich der 50 %igen-Inhibitionsmarke und nicht der sigmoide Verlauf der vollständigen Inhibitionskurve berücksichtigt werden. Für eine exakte Bestimmung von IC<sub>50</sub>-Werten sollte stets die nichtlineare Regression, wenn möglich die 4-Parameter-Gleichung nach Hill (II.1.3.4, Gl. 4), angewendet werden, da diese Funktion den sigmoiden Kurvenverlauf mit seinen Plateaus bei ca. 0 und 100 % genau beschreibt und somit alle Messwerte für die Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte berücksichtigt.

#### 4 Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von Standardinhibitoren: Fluoreszenz- vs. LC/MS-Assay

Da das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der Anwendbarkeit und Validität der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays bei Pflanzenextrakten war und als Referenzmethode die LC/MS-basierten CYP-Assays dienten, war es wichtig die aus beiden Methoden resultierenden IC<sub>50</sub>-Werte der Standardinhibitoren miteinander zu

vergleichen. Wie bereits gezeigt, können sich durch die Verwendung von unterschiedlichen Substraten starke Abweichungen der  $IC_{50}$ -Werte der Inhibitoren ergeben (II.2.4.4, Tab. 15). Für die Untersuchungen zur Validität der Fluoreszenz-basierten Assays sind diese Abweichungen jedoch zu berücksichtigen. In Tab. 17 sind die  $IC_{50}$ -Werte der Standardinhibitoren beider Methoden zusammengefasst, wobei sich Tab. 17 auf die am häufigsten in der Literatur verwendeten Fluoreszenzsubstrate beschränkt. Die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten und Pflanzeninhaltsstoffen wurden fast ausschließlich mit den hier angegebenen Fluoreszenzsubstraten durchgeführt (siehe Tab. 9). Auch alle weiteren Untersuchungen zur Validität der Fluoreszenz-basierten Assays beschränken sich auf die in Tab. 17 angegebenen Fluoreszenzsubstrate.

**Tab. 17** Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte von Standardinhibitoren, die mit Hilfe der Fluoreszenz- und LC/MS-basierten Methoden bestimmt wurden.

Inhibitor	CYP	Fluoreszenz-Assay		LC/MS-Assay	
		Substrat <sup>a</sup>	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	Substrat	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]
Furafyllin	1A2	CEC	1,7	Tacrin	2,6
		EthRes	9,9		
Tranlycypromin	2B6	EFC	4,8	Bupropion	5,5
Quercetin	2C8	DBF	12,5	Paclitaxel	4,1
Sulfaphenazol	2C9	MFC	2,2	Tolbutamid	0,43
Tranlycypromin	2C19	CEC	4,7	Imipramin	8,6
Chinidin	2D6	AMMC	0,003	Dextromethorphan	0,025
Ketoconazol	3A4	BFC	0,052	Midazolam	0,030
		BzRes	0,25		

<sup>a</sup>AMMC: 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin; BFC: 7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin; BzRes: Benzyloxyresorufin; CEC: 3-Cyano-7-ethoxycumarin; DBF: Dibenzylfluorescein; EFC: 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; EthRes: Ethoxyresorufin; MFC: 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin.

Relativ gut übereinstimmende  $IC_{50}$ -Werte der Inhibitoren wurden unter Verwendung der Substrate CEC und Tacrin für CYP1A2, EFC und Bupropion für CYP2B6, CEC und Imipramin für CYP2C19 sowie BFC und Midazolam für CYP3A4 mit Hilfe der Fluoreszenz- bzw. LC/MS-basierten CYP-Assays erhalten (Tab. 17). Während die mit Fluoreszenz-Assays bestimmten  $IC_{50}$ -Werte von Furafyllin (CYP1A2/EthRes), Quercetin (CYP2C8/DBF), Sulfaphenazol (CYP2C9/MFC) und Ketoconazol (CYP3A4/BzRes) etwa um den Faktor 3-5 höher lagen als die mit Hilfe von LC/MS

ermittelten  $IC_{50}$ -Werte, inhibierte lediglich Chinidin die Umsetzung des Fluoreszenzsubstrats AMMC stärker (ca. 8-fach) als die Umsetzung des Arzneistoffs Dextromethorphan durch CYP2D6 (Tab. 17). Der Grund für die Abweichungen der  $IC_{50}$ -Werte bei CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 und CYP3A4 unter Verwendung unterschiedlicher Substrate ist wahrscheinlich auf die unter II.2.4.4 beschriebene Kooperativität dieser CYP-Enzyme zurückzuführen.<sup>207</sup>

## **5 Untersuchungen zur Anwendbarkeit und Validität der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays bei Pflanzenextrakten**

In diesem Kapitel werden die Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays zur *In-vitro*-Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen ausführlich hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit und Validität für Pflanzenextrakte untersucht. Hierfür wurden geeignete Arzneidrogen ausgewählt, die ein unterschiedliches Spektrum an Inhaltsstoffen (z. B. Alkaloide, Cumarine, Flavonoide, Terpene usw.) aufweisen und bezüglich der CYP-Enzyme unterschiedliche inhibitorische Aktivitäten besitzen. Die verwendeten Arzneidrogen wurden über pharmazeutische Großhändler wie Caelo (Caesar & Loretz GmbH, Hilden) und Klenk (Heinrich Klenk GmbH & Co. KG, Schwebheim) bezogen. Alle Chargen der verwendeten Arzneidrogen (siehe Material und Methoden V.1.4) entsprachen laut Hersteller den Anforderungen des deutschen bzw. europäischen Arzneibuchs. Die verwendeten Arzneidrogen wurden vor der Extraktion fein pulverisiert, um eine möglichst quantitative Extraktion der im Extraktionsmittel löslichen Inhaltsstoffe zu erreichen. Als Extraktionsmittel wurde Methanol 80 % (V/V) verwendet, da in diesem Lösungsmittel ein breites Spektrum an Inhaltsstoffen löslich ist. Zudem bewirkt der wässrige Anteil von 20 % (V/V) eine Quellung des Pflanzenmaterials und somit eine bessere Extraktion der Inhaltsstoffe.

### **5.1 Auswahl von geeigneten Arzneidrogen**

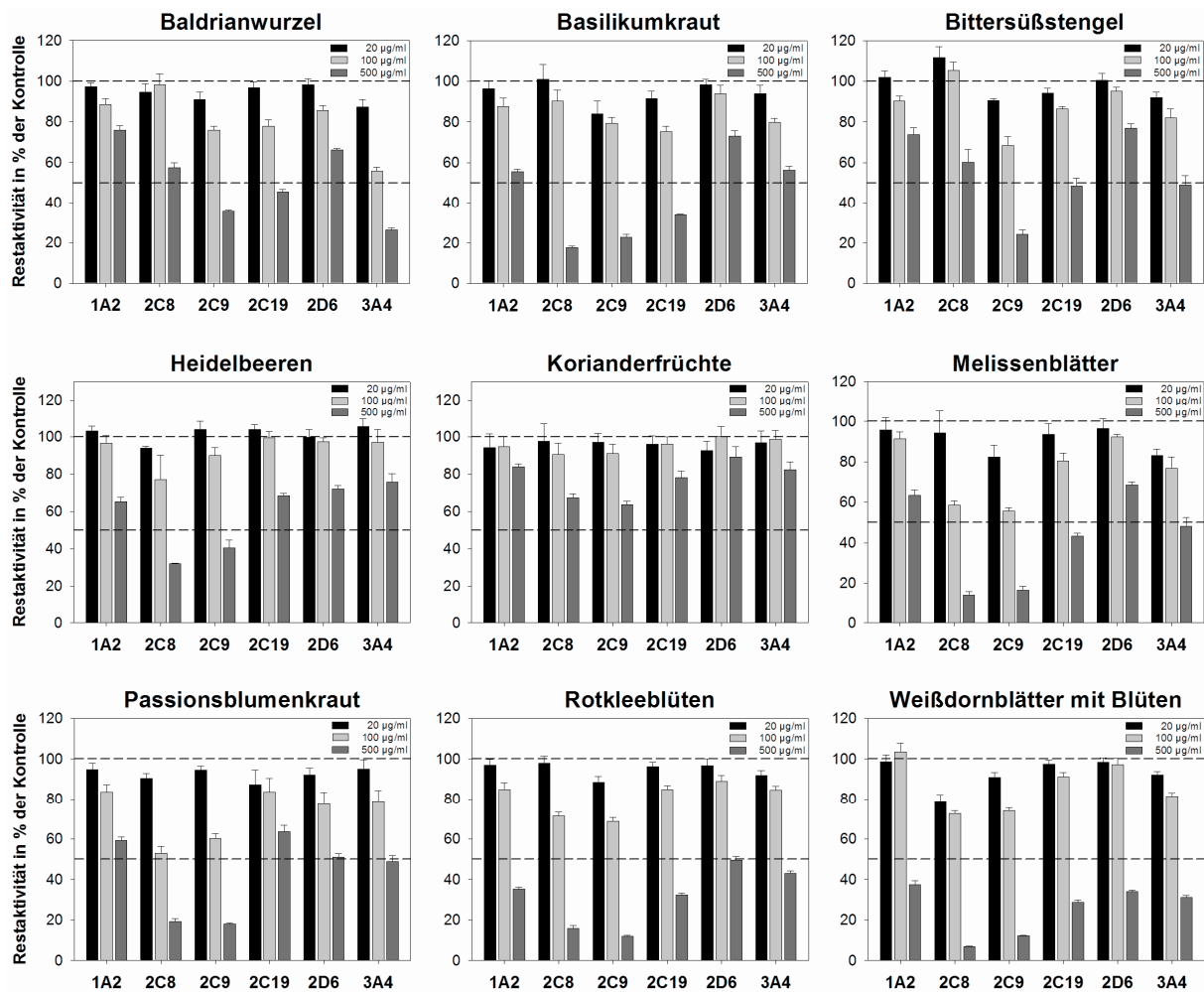
Mit der CYP-Cocktail-Methode (siehe II.1.3.3) wurden insgesamt mehr als hundert Pflanzenextrakte bezüglich einer Inhibition der sechs wichtigsten humanen CYP-Enzyme 1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 getestet. Hierfür wurden die Pflanzendrogen (500 mg) mit 10 ml Methanol 80 % (V/V) im Ultraschallbad für

30 min bei 40° C extrahiert. Nach dem Zentrifugieren der Extrakte (9000-g; 10 min) wurde der Überstand 1:5 und 1:25 mit Methanol 80 % (V/V) verdünnt. Anschließend wurde die inhibitorische Aktivität der Extrakte mittels der CYP-Cocktail-Methode<sup>80</sup> bestimmt. Die Konzentrationen der getesteten Pflanzenextrakte betragen 20, 100 und 500 µg/ml bezogen auf die Drogen-Einwaage. Von den ca. hundert getesteten Pflanzenextrakten wurden insgesamt 15 verschiedene Arzneidrogen mit schwacher und starker inhibitorischer Aktivität bezüglich der getesteten CYP-Enzyme ausgewählt (Tab. 18, Abb. 45). Diese Extrakte weisen ein sehr unterschiedliches Spektrum an Inhaltsstoffen, wie z. B. Alkaloiden, Cumarinen, Flavonoiden oder Terpenen, auf (Tab. 18).

**Tab. 18** Ausgewählte Pflanzenextrakte mit ihren Hauptinhaltsstoffen, aufgeteilt nach schwacher und starker inhibitorischer Aktivität bezüglich der getesteten CYP-Enzyme 1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4.

<b>Pflanzendrogen</b>	<b>Hauptinhaltsstoffe</b> <sup>209</sup>
<b><i>schwache Inhibitoren</i></b>	
Baldrianwurzel	Valepotriate, ätherisches Öl, Phenolcarbonsäuren
Basilikumkraut	ätherisches Öl, Phenolcarbonsäuren
Bittersüßstengel	Steroidalkaloidglykoside, Steroidsaponine
Heidelbeeren	Gerbstoffe (vorwiegend Catechingerbstoffe), Anthocyane, Flavonoide
Korianderfrüchte	ätherisches Öl, Cumarine
Melissenblätter	ätherisches Öl, Phenolcarbonsäuren, Flavonoide
Passionsblumenkraut	Flavonoide
Rotkleeblüten	Isoflavone
Weißdornblätter mit Blüten	Flavonoide (v.a. Procyanidine)
<b><i>starke Inhibitoren</i></b>	
Birkenblätter	Flavonoide, Triterpensaponine
Fenchelfrüchte	ätherisches Öl
Ginkgoblätter	Flavonoide (u.a. Biflavone, Proanthocyanidine), Diterpene (Ginkgolide), Sesquiterpene
Orthosiphonblätter	Flavonoide, Saponine
Salbeiblätter	ätherisches Öl, Flavonoide, Diterpene (z. B. Carnosol), Triterpene (v.a. Ursolsäure)
Schöllkraut	Isochinolin-Alkaloide

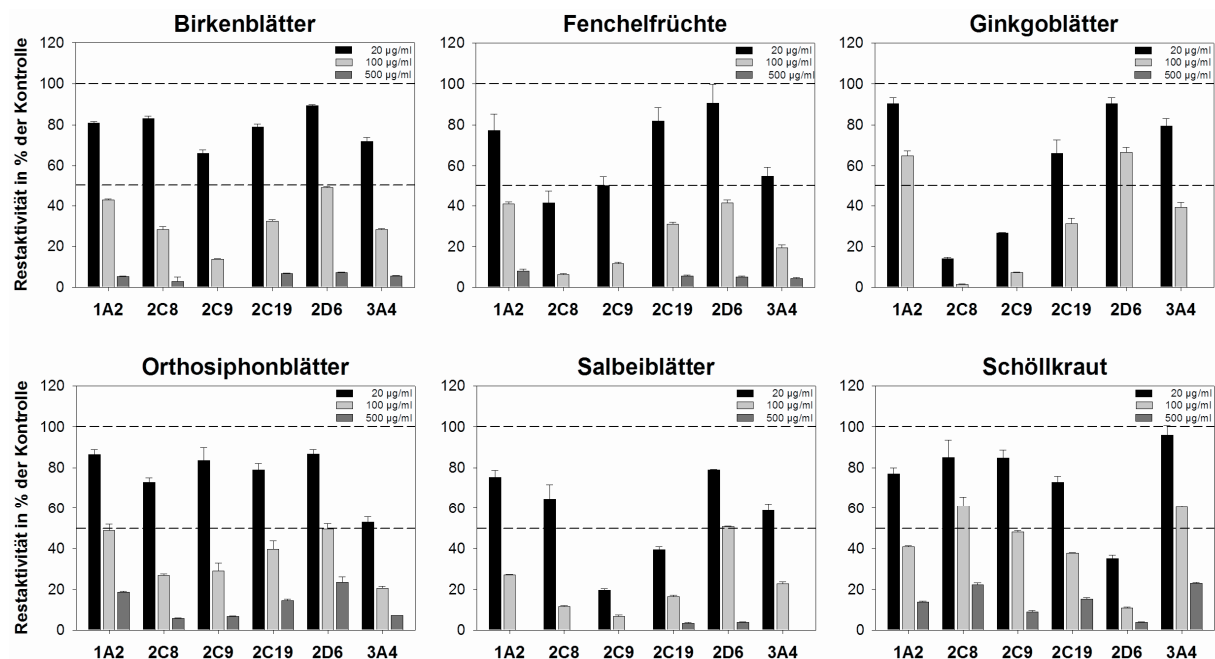
Ein Teil der ausgewählten wässrig-methanolischen Pflanzenextrakte zeigte eine sehr schwache Inhibition der CYP-Enzyme 1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4. Für diese Extrakte lagen die Konzentrationsbereiche der  $IC_{50}$ -Werte bei 100-500  $\mu\text{g/ml}$  und  $>500$   $\mu\text{g/ml}$  bezogen auf die Drogen-Einwaage (Abb. 45).



**Abb. 45** Pflanzenextrakte (20, 100 und 500  $\mu\text{g/ml}$ ) mit schwacher inhibitorischer Aktivität bezüglich der getesteten CYP-Enzyme. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Mittelwerte aus drei Bestimmungen dar.

Weitere sechs ausgewählte Extrakte wiesen eine starke Inhibition der getesteten CYP-Enzyme auf. Die Konzentrationsbereiche der  $IC_{50}$ -Werte lagen bei diesen Extrakten überwiegend zwischen 20-100  $\mu\text{g/ml}$  (Abb. 46). Bei einigen Pflanzenextrakten, wie z. B. Fenchelfrüchten, Ginkgoblätter, Salbeiblättern und Schöllkraut, lagen die  $IC_{50}$ -Werte teilweise sogar unter 20  $\mu\text{g/ml}$  (Abb. 46). Wie bereits erwähnt, beziehen sich die Konzentrationsangaben auf die Drogeneinwaage und nicht auf den

Extrakt selbst. Die „echten Extraktkonzentrationen“ würden ungefähr 1/5 der angegebenen Konzentrationen entsprechen.



**Abb. 46** Pflanzenextrakte (20, 100 und 500 µg/ml) mit starker inhibitorischer Aktivität bezüglich der getesteten CYP-Enzyme. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen der Mittelwerte aus drei Bestimmungen dar.

## 5.2 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität der Pflanzenextrakte

Für die Untersuchungen zur Anwendbarkeit und Validität der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays wurden jeweils vier Extraktkonzentrationen festgelegt, in deren Bereich die mit der Cocktail-Methode bestimmten  $IC_{50}$ -Werte überwiegend lagen (Abb. 45; 46). Bezogen auf die Einwaage wurden für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität Extraktkonzentrationen von 125, 250, 500, 1000 µg/ml (schwache Inhibitoren) bzw. 25, 50, 100 und 200 µg/ml (starke Inhibitoren) festgelegt.

### 5.2.1 Ergebnisse für Pflanzenextrakte mit geringer inhibitorischer Aktivität

Die Inhibition der CYP-Enzyme durch Pflanzenextrakte (125, 250, 500, 1000 µg/ml) mit geringer inhibitorischer Aktivität wurde mit Hilfe der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Methoden und den als Referenz dienenden LC/MS-Methoden bestimmt. Die Balkendiagramme, welche die Hemmung der CYP-Enzyme durch die getesteten Pflanzenextraktkonzentrationen zeigen, sind im Anhang unter VI.1 dargestellt. Für einen Vergleich der beiden Methoden, wurden die Konzentrationsbereiche der  $IC_{50}$ -Werte aus den Diagrammen (Anhang VI.1) abgelesen und tabellarisch aufgeführt (Tab. 19). Die Konzentrationsbereiche der  $IC_{50}$ -Werte werden im Folgenden der Einfachheit halber als  $IC_{50}$ -Werte bezeichnet, obwohl keine exakten  $IC_{50}$ -Werte bestimmt wurden und somit der Ausdruck eigentlich nicht korrekt ist.

Während 18 der 81 mit der Fluoreszenzmethode erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte (ca. 22 %) mit denen der LC/MS-Methoden übereinstimmten, lagen 46 % der fluorimetrisch bestimmten  $IC_{50}$ -Werte niedriger und 23 % höher als die Werte der Referenzmethoden (Tab. 19). Einige  $IC_{50}$ -Werte (9 %) konnten mit der Fluoreszenz-Methode nicht bestimmt werden. Der Grund hierfür war, dass für die Extrakte von Baldrianwurzel und Basilikumkraut (CYP2B6, CYP2C9) sowie Bittersüßstengel (CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6) mit steigender Inhibitorkonzentration nicht wie üblicherweise eine Abnahme sondern eine Zunahme der Fluoreszenzintensität resultierte (siehe Anhang VI.1). Diese Pflanzenextrakte besitzen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine starke Eigenfluoreszenz bei den entsprechenden Anregungs- und Emissionswellenlängen. Am besten stimmten die  $IC_{50}$ -Werte der Extrakte der Weißdornblätter mit Blüten und der Korianderfrüchte mit den Werten der Referenzmethode überein. Sehr auffällig war, dass der Passionsblumenkraut- und Heidelbeeren-Extrakt überwiegend zu niedrige  $IC_{50}$ -Werte für die fluorimetrische Bestimmung aufwiesen. Allen voran zeigten Passionsblumenkraut für CYP1A2/CEC und CYP3A4/BFC sowie Heidelbeeren für CYP2C19 extrem große Abweichungen der  $IC_{50}$ -Werte (Faktor 4-8) gegenüber den  $IC_{50}$ -Werten, die mit Hilfe der Referenzmethoden (LC/MS) bestimmt wurden. Im Gegensatz zu den Cumarin-Derivaten CEC (CYP1A2) und BFC (CYP3A4) stimmten die mit den Fluoreszenzsubstraten Ethoxyresorufin (CYP1A2) und Benzyloxyresorufin (CYP3A4) ermittelten  $IC_{50}$ -Werte mit den LC/MS-Daten relativ gut überein.



**Tab. 19** Konzentrationsbereiche der IC<sub>50</sub>-Werte (µg/ml) für die inhibitorisch schwach aktiven Pflanzenextrakte bezüglich der getesteten CYP-Enzyme. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz- und LC/MS-Methoden.

CYP	Baldrianwurzel		Basilikumkraut		Bittersüßstengel	
	Fluoresz.	LC/MS	Fluoresz.	LC/MS	Fluoresz.	LC/MS
1A2	500-1000 <sup>a</sup>	250-500	500-1000 <sup>a</sup>	250-500	>1000 <sup>a</sup>	>1000
	500-1000 <sup>b</sup>		125-250 <sup>b</sup>		500-1000 <sup>b</sup>	
2B6	- <sup>e</sup>	<125	- <sup>e</sup>	125-250	- <sup>e</sup>	500-1000
2C8	250-500	125-250	125-250	125-250	500-1000	500-1000
2C9	- <sup>e</sup>	125-250	- <sup>e</sup>	125-250	- <sup>e</sup>	125-250
2C19	<125	125-250	<125	125-250	125-250	500-1000
2D6	250-500	125-250	500-1000	250-500	- <sup>e</sup>	500-1000
3A4	500-1000 <sup>c</sup>	<125	500-1000 <sup>c</sup>	250-500	>1000 <sup>c</sup>	500-1000
	125-250 <sup>d</sup>		<125 <sup>d</sup>		125-250 <sup>d</sup>	

CYP	Heidelbeeren		Korianderfrüchte		Melissenblätter	
	Fluoresz.	LC/MS	Fluoresz.	LC/MS	Fluoresz.	LC/MS
1A2	250-500 <sup>a</sup>	500-1000	500-1000 <sup>a</sup>	500-1000	500-1000 <sup>a</sup>	500-1000
	125-250 <sup>b</sup>		250-500 <sup>b</sup>		125-250 <sup>b</sup>	
2B6	125-250	500-1000	250-500	125-250	125-250	250-500
2C8	125-250	125-250	500-1000	500-1000	<125	125-250
2C9	<125	250-500	500-1000	250-500	125-250	125-250
2C19	<125	500-1000	500-1000	500-1000	<125	250-500
2D6	125-250	500-1000	500-1000	>1000	250-500	500-1000
3A4	500-1000 <sup>c</sup>	500-1000	>1000 <sup>c</sup>	500-1000	500-1000 <sup>c</sup>	250-500
	250-500 <sup>d</sup>		125-250 <sup>d</sup>		125-250 <sup>d</sup>	

CYP	Passionsblumenkraut		Rotkleblüten		Weißdornblätter	
	Fluoresz.	LC/MS	Fluoresz.	LC/MS	Fluoresz.	LC/MS
1A2	500-1000 <sup>a</sup>	500-1000	125-250 <sup>a</sup>	250-500	125-250 <sup>a</sup>	250-500
	<125 <sup>b</sup>		125-250 <sup>b</sup>		<125 <sup>b</sup>	
2B6	<125	250-500	250-500	125-250	125-250	125-250
2C8	250-500	125-250	250-500	<125	<125	<125
2C9	<125	125-250	500-1000	125-250	<125	<125
2C19	<125	250-500	<125	125-250	<125	125-250
2D6	125-250	500-1000	250-500	250-500	125-250	125-250
3A4	500-1000 <sup>c</sup>	500-1000	250-500 <sup>c</sup>	250-500	500-1000 <sup>c</sup>	125-250
	<125 <sup>d</sup>		<125 <sup>d</sup>		<125 <sup>d</sup>	

<sup>a</sup>Substrat: Ethoxyresorufin; <sup>b</sup>Substrat: 3-Cyano-7-ethylcumarin; <sup>c</sup>Substrat: Benzylxyresorufin; <sup>d</sup>Substrat: 7-Benzyl-4-trifluor-methylcumarin; <sup>e</sup>Inhibition nicht bestimmbar (Restaktivität >100 %).

### 5.2.2 Ergebnisse für Pflanzenextrakte mit starker inhibitorischer Aktivität

Die Inhibition der CYP-Enzyme durch Pflanzenextrakte (25, 50, 100, 200 µg/ml) mit starker inhibitorischer Aktivität wurde mit Hilfe der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Methoden und den als Referenz dienenden LC/MS-Methoden bestimmt. Die Balkendiagramme, welche die Hemmung der CYP-Enzyme durch die getesteten Pflanzenextrakte zeigen, sind im Anhang unter VI.2 dargestellt. Für einen Vergleich der beiden Methoden, wurden die Konzentrationsbereiche der IC<sub>50</sub>-Werte aus den Diagrammen (Anhang VI.2) abgelesen und tabellarisch aufgeführt (Tab. 20).

**Tab. 20** Die Konzentrationsbereiche der IC<sub>50</sub>-Werte (µg/ml) für die inhibitorisch stark aktiven Pflanzenextrakte bezüglich der getesteten CYP-Enzyme. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz- und LC/MS-Methoden.

CYP	Birkenblätter		Fenchel Früchte		Ginkgoblätter	
	Fluoresz.	LC/MS	Fluoresz.	LC/MS	Fluoresz.	LC/MS
<b>1A2</b>	100-200 <sup>a</sup>	50-100	50-100 <sup>a</sup>	50-100	50-100 <sup>a</sup>	100-200
	25-50 <sup>b</sup>		25-50 <sup>b</sup>		25-50 <sup>b</sup>	
<b>2B6</b>	100-200	50-100	50-100	25-50	50-100	100-200
<b>2C8</b>	25-50	50-100	25-50	<25	<25	<25
<b>2C9</b>	25-50	25-50	<25	25-50	50-100	<25
<b>2C19</b>	<25	50-100	25-50	50-100	25-50	100-200
<b>2D6</b>	100-200	100-200	50-100	50-100	100-200	>200
<b>3A4</b>	>200 <sup>c</sup>	25-50	100-200 <sup>c</sup>	25-50	- <sup>c,e</sup>	25-50
	25-50 <sup>d</sup>		<25 <sup>d</sup>		<25 <sup>d</sup>	

CYP	Orthosiphonblätter		Salbeiblätter		Schöllkraut	
	Fluoresz.	LC/MS	Fluoresz.	LC/MS	Fluoresz.	LC/MS
<b>1A2</b>	>200 <sup>a</sup>	>200	50-100 <sup>a</sup>	50-100	>200 <sup>a</sup>	50-100
	50-100 <sup>b</sup>		25-50 <sup>b</sup>		50-100 <sup>b</sup>	
<b>2B6</b>	>200	100-200	50-100	25-50	100-200	100-200
<b>2C8</b>	50-100	50-100	<25	25-50	100-200	100-200
<b>2C9</b>	100-200	100-200	<25	<25	100-200	50-100
<b>2C19</b>	50-100	>200	<25	<25	<25	50-100
<b>2D6</b>	>200	>200	50-100	100-200	<25	<25
<b>3A4</b>	100-200 <sup>c</sup>	25-50	100-200 <sup>c</sup>	25-50	100-200 <sup>c</sup>	100-200
	<25 <sup>d</sup>		25-50 <sup>d</sup>		25-50 <sup>d</sup>	

<sup>a</sup>Substrat: Ethoxyresorufin; <sup>b</sup>Substrat: 3-Cyano-7-ethylcumarin; <sup>c</sup>Substrat: Benzyloxyresorufin; <sup>d</sup>Substrat: 7-Benzyl-4-trifluor-methylcumarin; <sup>e</sup>Inhibition nicht bestimmbar (Restaktivität >100 %).

Während 19 der 54 mit der Fluoreszenzmethode erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte (ca. 35 %) mit denen der LC/MS-Methoden übereinstimmten, lagen 39 % der fluorimetrisch bestimmten  $IC_{50}$ -Werte niedriger und 24 % höher als die Werte der Referenzmethoden. Lediglich der  $IC_{50}$ -Wert für den Ginkgo-Extrakt und CYP3A4 (Ethoxyresorufin) konnte aufgrund einer Zunahme der Fluoreszenzintensität (Anhang VI.2) mit steigender Extraktkonzentration nicht bestimmt werden. Am meisten übereinstimmende  $IC_{50}$ -Werte zeigten die Extrakte aus Orthosiphonblättern, Salbeiblättern und Schöllkraut. Die  $IC_{50}$ -Werte der Ginkgoblätter dagegen stimmten nur für CYP2C8 überein. Im Gegensatz zu den schwach inhibitorisch aktiven Pflanzenextrakten resultierten jedoch für alle stark inhibitorisch aktiven Pflanzenextrakte lediglich geringe bis moderate Abweichungen der  $IC_{50}$ -Werte. Die Gründe hierfür werden unter II.5.4 ausführlich dargelegt.

### 5.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Sowohl die fluorimetrisch bestimmten  $IC_{50}$ -Werte der inhibitorisch schwach als auch stark aktiven Pflanzenextrakte zeigten im Vergleich zur Referenzmethode Abweichungen. 46 bzw. 39 % der  $IC_{50}$ -Werte der Pflanzenextrakte mit geringer bzw. starker inhibitorischer Aktivität lagen niedriger als die Referenzwerte (Tab. 21), wobei überwiegend eine 2- bis 4-fache Abweichung resultierte (Tab. 19, Tab. 20). Bei den inhibitorisch schwach aktiven Pflanzenextrakten lagen etwa 10 % der  $IC_{50}$ -Werte sogar um das 4- bis 8-fache niedriger. Bei etwa 23 bzw. 24 % der inhibitorisch schwach bzw. stark aktiven Pflanzenextrakte wurden im Vergleich zur Referenzmethode fast ausschließlich um den Faktor 2-4 höhere  $IC_{50}$ -Werte für die inhibitorisch schwach bzw. stark aktiven Pflanzenextrakte bestimmt (Tab. 21). Eine Übereinstimmung der  $IC_{50}$ -Werte war bei lediglich 22 % der schwachen Inhibitoren und bei 35 % der starken Inhibitoren zu beobachten, so dass eine relativ schwache Korrelation der mit LC/MS und Fluoreszenz erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte bestand. Diese Tatsache lässt vermuten, dass Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte der Pflanzenextrakte die Ergebnisse der inhibitorischen Aktivität bei Mikrotiterplattenbasierten Fluoreszenz-Methoden beeinflussen.

**Tab. 21** Abweichung der fluorimetrisch bestimmten  $IC_{50}$ -Werte der inhibitorisch schwach und stark aktiven Pflanzenextrakte im Vergleich zu den LC/MS-Methoden.

<b><math>IC_{50}</math>-Werte</b>	<b>übereinstimmend</b>	<b>zu niedrig</b>	<b>zu hoch</b>	<b>nicht bestimmbar</b>
<b>schwache Inhibitoren</b>	22 %	46 %	23 %	9 %
<b>starke Inhibitoren</b>	35 %	39 %	24 %	2 %

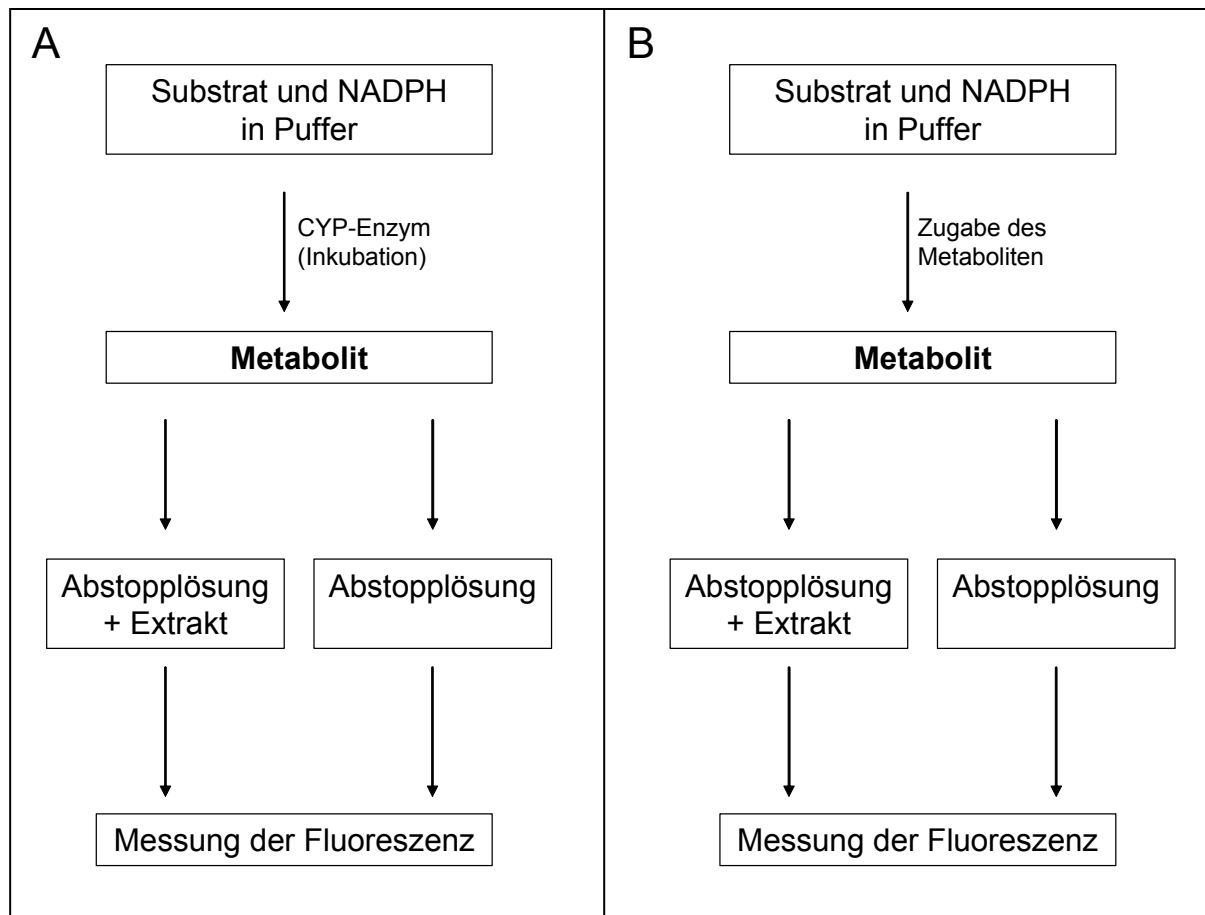
Für eine genaue statistische Auswertung und einen Vergleich der schwachen und starken Inhibitoren müssten eine größere Anzahl von Pflanzenextrakten bezüglich der Inhibition von CYP-Enzymen untersucht werden, dennoch zeichnete sich ein Trend ab. Die inhibitorisch stark aktiven Pflanzenextrakte zeigten eine geringere Anzahl der zu niedrig liegenden fluorimetrisch bestimmten  $IC_{50}$ -Werte und eine höhere Anzahl der übereinstimmenden  $IC_{50}$ -Werte (Tab. 21). Zudem zeigten die inhibitorisch stark aktiven Pflanzenextrakte keine extremen Abweichungen der  $IC_{50}$ -Werte wie die inhibitorisch schwach aktiven Pflanzenextrakte aus Passionsblumenkraut, Heidelbeeren, Baldrianwurzeln und Bittersüßstengeln. D. h. mit abnehmender Konzentration der Pflanzenextrakte (125/250/500/1000  $\mu\text{g/ml}$  gegenüber 25/50/100/200  $\mu\text{g/ml}$ ) und somit Pflanzeninhaltsstoffen wird die Beeinträchtigung der Fluoreszenzmessungen durch Quenching und Eigenfluoreszenz geringer.

### 5.3 Bestimmung von Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten

#### 5.3.1 Methoden

Für die Untersuchung von Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten von Pflanzenextrakten wurde die Veränderung der Fluoreszenzintensität der Metabolite in Anwesenheit der Pflanzenextrakte bei den entsprechenden Wellenlängen gemessen. Prinzipiell sind zwei Methoden zur Untersuchung von Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten möglich (Abb. 47). Während die eine Methode die Verwendung von Inkubationsansätzen, d. h. die enzymatische Umsetzung der Substrate zu den entsprechenden Metaboliten voraussetzt (Methode A), kommen bei der anderen Methode Metabolitenlösungen zum Einsatz (Methode B). Beispielsweise wurde bei Strandell et al. (2004) die höchste Testkonzentration der Pflanzenextrakte nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion zu den Kontrollinkubationen (100 %ige Enzymaktivität) pipettiert (Abb. 47/Methode A), um Quenching- und

Eigenfluoreszenz-Effekte für die Berechnung der inhibitorischen Aktivität der Pflanzenextrakte zu berücksichtigen.<sup>81</sup> Welche Pflanzenextrakte Quenching-Effekte und/oder Eigenfluoreszenz zeigten und wie die „korrigierte“ inhibitorische Aktivität berechnet wurde, ist in der Publikation von Strandell et al. allerdings nicht erwähnt.



**Abb. 47** Mögliche Methoden (A, B) zur Untersuchung der Beeinflussung der Metaboliten-Fluoreszenz durch Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten von Pflanzenextrakten.

Die Problematik der Quenching-Effekte und Eigenfluoreszenz bei Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays ist vor allem im Zusammenhang mit Naturstoffen und Pflanzenextrakten bekannt,<sup>131</sup> dennoch wurden fast ausschließlich Fluoreszenz-Assays für die Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte verwendet.<sup>77-79,196-200</sup> Von Zou et al. (2002) wurden 25 Naturstoffe (z. B. Flavonoide, Kavapyrone und Ginkgolide) hinsichtlich der Beeinträchtigung der Ergebnisse durch Quenching und Eigenfluoreszenz bei Fluoreszenz-Assays untersucht.<sup>131</sup> Während die Flavonoide Isorhamnetin (100  $\mu\text{M}$ ), Quercetin (100  $\mu\text{M}$ ) und Vitexin (116  $\mu\text{M}$ ) die Fluoreszenzausbeute der Metaboliten AHMC (CYP2D6) und CHC (CYP1A2,

CYP2C19) um 17-55 % reduzierte, erhöhte das Kavapyron Yangonin (175  $\mu\text{M}$ ) in Anwesenheit dieser Metabolite die Fluoreszenzintensität um 9 % (CHC; CYP1A2/CYP2C19), 42 % (HFC; CYP2C9, CYP3A4) und 173 % (AHMC; CYP2D6). Die Untersuchungen dieser Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte wurden mit Hilfe von Metabolitenlösungen durchgeführt, deren Konzentrationen in etwa den Metabolitenkonzentrationen von Kontrollinkubationen (100 %ige Enzymaktivität) entsprachen (Abb. 47/Methode B). Die Matrix der Metabolitenlösungen entsprach der Zusammensetzung einer Inkubationsprobe. Neben Puffer und NADPH enthielten die zu vermessenden Metabolitenlösungen ebenfalls die Abstopplösung (Acetonitril/Tris-Base), um durch die Erhöhung des pH-Wertes die Fluoreszenz der Metabolite bei den entsprechenden Wellenlängen zu ermöglichen und die Fluoreszenzintensität der Metabolite zu steigern. Eine Beurteilung, inwieweit die  $\text{IC}_{50}$ -Werte dieser Naturstoffe durch Quenching und Eigenfluoreszenz beeinträchtigt werden, ist schwierig, da z. B. für Isorhamnetin, Quercetin und Yangonin im Vergleich zu den  $\text{IC}_{50}$ -Werten bis zu ca. 35-fach höhere Testkonzentrationen eingesetzt wurden. Untersuchungen mit relevanten Konzentrationen der Naturstoffe im Bereich der  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden nicht durchgeführt.<sup>131</sup>

Allgemein ist zu berücksichtigen, dass Pflanzenextrakte Vielstoffgemische darstellen, so dass einzelne Pflanzeninhaltsstoffe die Fluoreszenzintensität der Metaboliten reduzieren (Quenching), während andere Inhaltsstoffe die Fluoreszenzausbeute erhöhen (Eigenfluoreszenz). Die Abweichung der Fluoreszenzintensität der Metabolite in Anwesenheit eines Pflanzenextrakts stellt somit immer die Summe aus den Quenching-Effekten und der Eigenfluoreszenz aller Inhaltsstoffe dar. Je nach Stärke der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte resultieren erniedrigte bzw. erhöhte Fluoreszenzsignale. Während bei Untersuchungen von Quenching-Effekten die Eigenfluoreszenz-Effekte der Pflanzeninhaltsstoffe nicht ausgeschaltet werden können, kann die Eigenfluoreszenz der Extrakte ohne Quenching-Effekte bestimmt werden. Für eine alleinige Bestimmung der Eigenfluoreszenz wird die Fluoreszenzintensität der Extrakte ohne Anwesenheit der Metabolite bei den entsprechenden Wellenlängen bestimmt. Für die Auswertung der Eigenfluoreszenz wird die resultierende Fluoreszenzintensität mit der Fluoreszenzintensität der entsprechenden Metabolitenlösung in Anwesenheit von Substrat, Metabolit, NADPH, und

Abstopplösung bzw. einer Inkubationsprobe (Substrat, NADPH, Enzym, Abstopplösung) verglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte der Pflanzenextrakte mit Metabolitenlösungen durchgeführt (Abb. 47/Methode B). Diese Methode ermöglicht es, die Metabolitenkonzentrationen zu variieren und somit auch die Abhängigkeit der Quenching-Effekte und der Eigenfluoreszenz von der Metabolitenkonzentration zu untersuchen. Diese Untersuchungen sind sehr wichtig, da die Metabolitenkonzentration durch die inhibitorische Aktivität der Extrakte abnimmt. Voraussetzung für die Durchführung dieser Quenching- und Eigenfluoreszenz-Bestimmungen, ist die quantitative Bestimmung der Metabolitenkonzentrationen in den Kontrollinkubationen der entsprechenden CYP-Enzyme (100 %ige Enzymaktivität). Da bereits die Umsetzungsgeschwindigkeiten der Substrate durch die entsprechenden CYP-Enzyme in den Kontrollinkubationen bestimmt wurden (siehe II.2.4.3, Tab. 14), konnten hieraus die genauen Metabolitenkonzentrationen bestimmt werden. In Tab. 22 sind die Metabolitenkonzentrationen in den entsprechenden Kontrollinkubationen angegeben.

**Tab. 22** Umsatzraten der Fluoreszenzsubstrate durch die entsprechenden CYP-Enzyme in Kontrollinkubationen (100 %ige Enzymaktivität).

	Substrat <sup>a</sup> (Konz.)	Metabolit <sup>b</sup>	Umsatzrate	
			Ergebnis	Literatur <sup>131</sup>
<b>CYP1A2</b>	CEC (5 µM)	CHC	1,1 µM (45 %)	
	EthRes (5 µM)	Resorufin	0,05 µM (1,0 %)	
<b>CYP2B6</b>	EFC (2,5 µM)	HFC	0,06 µM (2,4 %)	
<b>CYP2C8</b>	DBF (1 µM)	Fluorescein	0,2 µM (20 %)	
<b>CYP2C9</b>	MFC (75 µM)	HFC	0,4 µM (0,5 %)	0,2 µM
<b>CYP2C19</b>	CEC (25 µM)	CHC	0,3 µM (1,2 %)	0,2 µM
<b>CYP2D6</b>	AMMC (1,5 µM)	AMHC	0,2 µM (13 %)	0,3 µM
<b>CYP3A4</b>	BFC (50 µM)	HFC	2,8 µM (5,6 %)	
	BzRes (50 µM)	Resorufin	0,04 µM (0,08 %)	

<sup>a</sup>AMMC: 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin; BFC: 7-Benzoyloxy-4-trifluormethylcumarin; BzRes: Benzoyloxyresorufin; CEC: 3-Cyano-7-ethoxycumarin; DBF: Dibenzylfluorescein; EFC: 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; EthRes: Ethoxyresorufin; MFC: 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin.

<sup>b</sup>AMHC: 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin; CHC: 3-Cyano-7-hydroxycumarin; HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin.

Aus Ethoxyresorufin (EthRes) durch CYP1A2 und aus Benzyloxyresorufin (BzRes) durch CYP3A4 wurde in etwa die gleiche Menge an Resorufin (ca. 0,05  $\mu\text{M}$ ) enzymatisch gebildet. Aus dem Substrat CEC entstand durch CYP1A2 eine fast vierfach größere Konzentration des Metaboliten CHC (1,1  $\mu\text{M}$ ) als durch CYP2C19. Die geringste Konzentration an HFC (0,06  $\mu\text{M}$ ) resultierte durch Umsetzung des Substrats EFC durch CYP2B6; CYP2C9 wies eine etwa um den Faktor sieben höhere Konzentration (0,4  $\mu\text{M}$ ) auf. CYP3A4 dagegen bildete die höchste Konzentration an HFC (2,8  $\mu\text{M}$ ), die nochmals etwa um den Faktor sieben größer war als die durch CYP2C9. In Zou et al. (2002)<sup>131</sup> sind ähnliche Werte für den Substratumsatz von MFC (CYP2C9), CEC (CYP2C19) und AMMC (CYP2D6) angegeben (Tab. 22).

Für *In-vitro*-Bestimmungen der Inhibition von CYP-Enzymen sollte der Verbrauch an Substrat nicht höher sein als 30 %, damit das Substrat während der gesamten Inkubationszeit dem Enzym in ausreichender Menge zur Verfügung steht.<sup>150</sup> Wenn z. B. die Substratumsetzung nach einer Michaelis-Menten-Kinetik abläuft, nimmt die Umsetzungsgeschwindigkeit bei geringen Substratkonzentrationen stark ab, wodurch die Ergebnisse der Inhibition von CYP-Enzymen beeinflusst werden. Der Substratverbrauch bzw. die Umsetzung des Substrats reichte von 0,08 % (BzRes/CYP3A4) bis 20 % (DBF/CYP2C8). Außer für CEC (CYP1A2) lag die Umsatzrate bei etwa 45 % und damit sehr hoch.

Durch die Quantifizierung der Metabolitenkonzentrationen in den jeweiligen Kontrollinkubationen (100 %ige Enzymaktivität) konnten die Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte von Pflanzenextrakten ohne enzymatische Umsetzung der Substrate (Methode B/Abb. 47) untersucht werden. Die Metabolitenkonzentrationen wurden so gewählt, dass diese einem Substratumsatz einer 100 %igen Enzymaktivität entsprachen (Tab. 22). Die Untersuchung der Abhängigkeit der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten von der Metabolitenkonzentration (10, 25, 50, 100 %ige Enzymaktivität) ist in Kapitel II.5.5 ausführlich dargelegt.



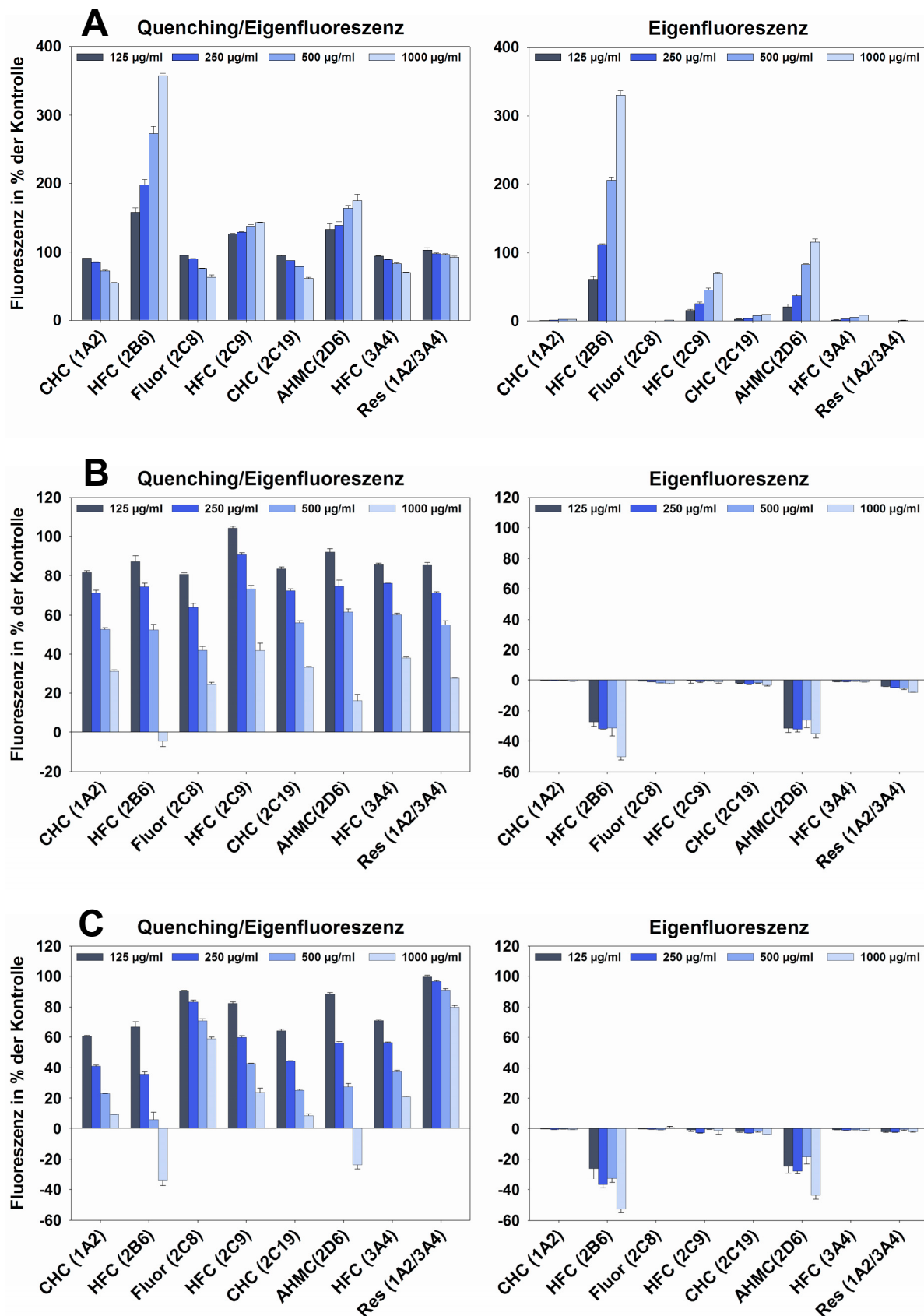
### 5.3.2 Ergebnisse

Für die Bestimmung von Quenching und Eigenfluoreszenz der Pflanzenextrakte wurden somit für alle Metabolite die in Tab. 22 angegebenen Konzentrationen verwendet mit der Ausnahme des Metaboliten Resorufin. Da dieser Metabolit durch CYP1A2 (Substrat: Ethoxyresorufin) und durch CYP3A4 (Substrat: Benzyloxyresorufin) in sehr ähnlichen Konzentrationen gebildet wurde, wurden die Untersuchungen für beide Enzyme zusammen mit 0,05  $\mu\text{M}$  Resorufin durchgeführt.

Die Matrix der Metabolitenlösungen bestand aus Substrat, Inkubationspuffer, NADPH und Abstopplösung. Die Testkonzentrationen der Pflanzenextrakte entsprachen den Konzentrationen, die für die Bestimmung der  $\text{IC}_{50}$ -Werte verwendet wurden. Für die Pflanzenextrakte mit schwacher inhibitorischer Aktivität betragen die Endkonzentrationen 125, 250, 500 und 1000  $\mu\text{g/ml}$  und mit starker inhibitorischer Aktivität 25, 50, 100 und 200  $\mu\text{g/ml}$ . Die Berechnung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte wurde entsprechend der Berechnung der inhibitorischen Aktivität (II.2.3.2, Gl. 12) durchgeführt. Anstatt „Restaktivität in % der Kontrolle“ wurden die Ergebnisse in „Fluoreszenz in % der Kontrolle“ ausgedrückt. Details für die Berechnung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte sind unter V.2.6 angegeben. Für die Untersuchung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte wurde die Fluoreszenzintensität der Metaboliten in Anwesenheit der Pflanzenextrakte bestimmt (V.2.6.1); für die Untersuchung der Eigenfluoreszenz wurde die Fluoreszenzintensität der Extrakte ohne Metaboliten bestimmt (V.2.6.2).

#### 5.3.2.1 Inhibitorisch schwach aktive Pflanzenextrakte

Die Ergebnisse der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Experimente der Pflanzenextrakte sind als Balkendiagramme im Anhang unter VI.3 dargestellt. Als Beispiele sind hier die Ergebnisse der Extrakte von Bittersüßstengel (A), Heidelbeeren (B) und Passionsblumenkraut (C) in Abb. 48 dargestellt.



**Abb. 48** Fluoreszenzintensität der Metaboliten in Anwesenheit von Bittersüßstengel- (A), Heidelbeeren- (B) und Passionsblumenkraut-Extrakt (C; links) und Intensität der Eigenfluoreszenz von Bittersüßstengel- (A), Heidelbeeren- (B) und Passionsblumenkraut-Extrakt (C; rechts).

Bei der Bestimmung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte reduzierten Bittersüßstengel die Fluoreszenzintensität von CHC (CYP1A2, CYP2C19), Fluorescein (CYP2C8) und HFC (CYP3A4) nur gering, wobei ersichtlich wird, dass mit zunehmender Extraktkonzentration die Quenching-Effekte stärker werden (A; Abb. 48). Während Bittersüßstengel bei Resorufin (CYP1A2/3A4) keine Effekte zeigten, nahm für HFC (CYP2B6, CYP2C9) und AHMC (CYP2D6) die Fluoreszenzintensität mit steigender Extraktkonzentration stark zu. In Anwesenheit von Bittersüßstengel-Extrakt (1000 µg/ml) erreichte die Fluoreszenzintensität von HFC (CYP2B6) im Vergleich zur Kontrolle sogar mehr als 350 % (A; Abb. 48). Das Ergebnis für die Bestimmung der Eigenfluoreszenz von Bittersüßstengeln (Abb. 48) bestätigte, dass bei HFC (CYP2B6, CYP2C9) und AHMC (CYP2D6) eine starke bis sehr starke Eigenfluoreszenz vorlag. Für die restlichen Metabolite bzw. Metabolitenkonzentrationen zeigten Bittersüßstengel keine (relevante) Eigenfluoreszenz.

Des Weiteren ist auffällig, dass Bittersüßstengel die Fluoreszenzintensität von HFC (CYP3A4) reduzierten, während der Extrakt bei den HFC-Konzentrationen der CYP-Enzyme 2B6 und 2C9 die Fluoreszenzintensität erhöhte. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass das Auftreten von Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten von der Konzentration der Metaboliten abhängig ist (HFC: CYP3A4>CYP2C9>CYP2B6). Die HFC-Konzentrationen unterschieden sich jeweils ca. um den Faktor 7 (Tab. 22). Die Abhängigkeit der Effekte von der Metabolitenkonzentration wurde für alle Metabolite ausführlich unter II.5.5 untersucht.

Der Heidelbeeren-Extrakt zeigte ein sehr starkes Quenching der Fluoreszenzintensitäten aller Metabolite. 500 µg/ml Extrakt quenchte die Fluoreszenzintensitäten aller Metabolite um ca. 50 % (B; Abb. 48). Passionsblumenkraut reduzierte ebenfalls die Fluoreszenz aller Metabolite, wobei der Extrakt bei Fluorescein (CYP2C8) und Resorufin (CYP1A2/CYP3A4) nur ein sehr schwaches Quenching zeigte (C; Abb. 48). Heidelbeeren- und Passionsblumenkraut-Extrakt zeigten keine Eigenfluoreszenz bei den entsprechenden Wellenlängen der Metabolite, jedoch eine starke Reduktion der Hintergrundfluoreszenz bei HFC (CYP2C9) und AHMC (CYP2D6), wodurch für die berechneten Fluoreszenzintensitäten in % der Kontrolle negative Werte resultierten (Abb. 48). Auch bei der Bestimmung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte zeigte z. B. Passions-

blumenkraut (1000 µg/ml) bei HFC (CYP2B6) und AHMC (CYP2D6) negative Werte. In diesem Fall reduzierte die entsprechende Extraktkonzentration die Fluoreszenz des Metaboliten und zusätzlich die Hintergrundfluoreszenz (Details zur Berechnung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte siehe V.2.6.1).

Alle Ergebnisse der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte der schwach inhibitorisch aktiven Pflanzenextrakte (Anhang VI.3) sind in Tab. 23 als QC<sub>50</sub>-Werte zusammengefasst. QC<sub>50</sub>-Werte werden hier definiert als die Extraktkonzentrationen, die die Fluoreszenzintensität des entsprechenden Metaboliten um 50 % reduzieren. Bei der Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen würde, falls der Pflanzenextrakt in dieser Konzentration die enzymatische Umsetzung *nicht* beeinflusst, der QC<sub>50</sub>-Wert dem IC<sub>50</sub>-Wert entsprechen und somit eine Inhibition von 50 % vortäuschen. D. h. für einen inhibitorisch nicht-aktiven Extrakt würde sich durch Quenching-Effekte ein falsch positiver IC<sub>50</sub>-Wert ergeben.

Während die Extrakte von Baldrianwurzeln, Basilikumkraut, Bittersüßstengeln, Korianderfrüchten und Rotkleeblüten die Fluoreszenzintensitäten der Metabolite nur sehr schwach reduzierten (QC<sub>50</sub> 500-1000 µg/ml) bzw. kaum beeinflussten (QC<sub>50</sub> >1000 µg/ml), zeigten Melissenblätter, Weißdornblätter, Heidelbeeren und Passionsblumenkraut starke bis sehr starke Quenching-Effekte (Tab. 23). Die QC<sub>50</sub>-Werte lagen für diese Extrakte zwischen 125 und 1000 µg/ml. Generell traten durch die Pflanzenextrakte bei allen Metaboliten sowie Metabolitenkonzentrationen Quenching-Effekte auf, wobei die Pflanzenextrakte in Anwesenheit von Resorufin ausschließlich sehr hohe QC<sub>50</sub>-Werte (>1000 µg/ml) bzw. keine Quenching-Effekte zeigten. Die einzige Ausnahme bei Resorufin war Heidelbeeren-Extrakt mit einem QC<sub>50</sub>-Wert von 500-1000 µg/ml (Tab. 23).

**Tab. 23** Konzentrationen (QC<sub>50</sub>-Werte) der inhibitorisch schwach aktiven Pflanzenextrakte, welche die Fluoreszenzintensität der entsprechenden Metaboliten um 50 % reduzieren. Die Metabolitenkonzentrationen entsprechen den Umsatzraten bei einer 100 %igen Enzymaktivität (X: keine Bestimmung möglich, Fluoreszenzintensität >100 %; O: kein Effekt).

Metabolit <sup>a</sup> (CYP)	QC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml]		
	Baldrianwurzel	Basilikumkraut	Bittersüßstengel
CHC (1A2)	>1000	500-1000	>1000
HFC (2B6)	X	X	X
Fluorescein (2C8)	>1000	500-1000	>1000
HFC (2C9)	X	>1000	X
CHC (2C19)	>1000	500-1000	>1000
AHMC (2D6)	X	>1000	X
HFC (3A4)	>1000	>1000	>1000
Resorufin (3A4/1A2)	O	>1000	>1000

	Heidelbeeren	Korianderfrüchte	Melissenblätter
CHC (1A2)	500-1000	>1000	250-500
HFC (2B6)	500-1000	O	>1000
Fluorescein (2C8)	250-500	>1000	125-250
HFC (2C9)	500-1000	>1000	500-1000
CHC (2C19)	500-1000	>1000	250-500
AHMC (2D6)	500-1000	>1000	500-1000
HFC (3A4)	500-1000	>1000	500-1000
Resorufin (3A4/1A2)	500-1000	O	>1000

	Passionsblumen- kraut	Rotkleeblüten	Weißdornblätter mit Blüten
CHC (1A2)	125-250	500-1000	250-500
HFC (2B6)	125-250	>1000	250-500
Fluorescein (2C8)	>1000	500-1000	250-500
HFC (2C9)	250-500	>1000	500-1000
CHC (2C19)	125-250	500-1000	250-500
AHMC (2D6)	250-500	>1000	250-500
HFC (3A4)	250-500	500-1000	500-1000
Resorufin (3A4/1A2)	>1000	>1000	>1000

<sup>a</sup> AHMC: 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin; CHC: 3-Cyano-7-hydroxycumarin; HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin.

Die meisten Pflanzenextrakte wiesen keine (relevante) Eigenfluoreszenz auf; lediglich Basilikumkraut, Melissenblätter, Bittersüßstengel und Baldrianwurzel zeigten bei HFC (CYP2B6 und CYP2C9) sowie AHMC (CYP2D6) eine relevante Eigenfluoreszenz (Abb. 48; Anhang VI.3). In Tab. 24 sind für diese Extrakte die Ergebnisse der Eigenfluoreszenz als  $FC_{50}$ -Werte zusammengefasst. Der  $FC_{50}$ -Wert wird in dieser Arbeit definiert als die Extraktkonzentration, durch deren Eigenfluoreszenz eine 50 %ige Fluoreszenzintensität des Metaboliten erreicht wird. Anders ausgedrückt, bei einer fluorimetrischen Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen würde der  $FC_{50}$ -Wert dem  $IC_{50}$ -Wert entsprechen, falls der Pflanzenextrakt in dieser Konzentration die enzymatische Umsetzung vollständig inhibiert (keine Bildung des Metaboliten) und die 50 %ige Fluoreszenzintensität des Metaboliten nur durch die Eigenfluoreszenz des Extrakts zu Stande kommt. D. h. aufgrund der Eigenfluoreszenz würde eine schwache inhibitorische Aktivität des Extrakts vorgetäuscht und es resultiert ein falsch-negativer  $IC_{50}$ -Wert.

**Tab. 24** Konzentrationen ( $FC_{50}$ -Werte) der Pflanzenextrakte, durch deren Eigenfluoreszenz eine 50 %ige Fluoreszenzintensität der entsprechenden Metaboliten erreicht wird. Die Metabolitenkonzentrationen entsprechen den Umsatzraten einer 100 %igen Enzymaktivität (O = keine Eigenfluoreszenz).

	$FC_{50}$ -Wert [ $\mu\text{g/ml}$ ]		
	HFC <sup>a</sup> CYP2B6	HFC <sup>a</sup> CYP2C9	AHMC <sup>b</sup> CYP2D6
<b>Baldrianwurzel</b>	250-500	>1000	>1000
<b>Basilikumkraut</b>	250-500	>1000	>1000
<b>Bittersüßstengel</b>	<125	500-1000	250-500
<b>Melissenblätter</b>	500-1000	>1000	O

<sup>a</sup>HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>b</sup>AHMC 3-[2-(N,N-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin.

Der Bittersüßstengel-Extrakt zeigte eine sehr starke Eigenfluoreszenz. Vor allem für HFC (CYP2B6) und AHMC (CYP2D6) resultierten für Bittersüßstengel  $FC_{50}$ -Werte kleiner als 125  $\mu\text{g/ml}$  bzw. zwischen 250 und 500  $\mu\text{g/ml}$ . Die Extrakte aus Baldrianwurzeln, Basilikumkraut und Melissenblättern zeigten für HFC (CYP2C9) und AHMC (CYP2D6) nur eine sehr geringe Eigenfluoreszenz ( $FC_{50}$ -Wert >1000  $\mu\text{g/ml}$ ),

während für HFC (CYP2B6) eine starke bis moderate Eigenfluoreszenz mit  $FC_{50}$ -Werten zwischen 250 und 1000  $\mu\text{g/ml}$  resultierte.

Während Quenching-Effekte bei allen Metaboliten bzw. Metabolitenkonzentrationen auftraten, konnte eine relevante Eigenfluoreszenz nur bei HFC (CYP2B6, CYP2C9) sowie bei AHMC (CYP2D6) beobachtet werden (Tab. 24). Am stärksten ausgeprägt war die Eigenfluoreszenz der Extrakte bei HFC (CYP2B6). Der Grund hierfür ist, dass bei den CYP-Enzymen 2B6, 2C9 und 2D6 die Metabolite nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen (Tab. 22), wodurch selbst die Pflanzenextrakte mit geringer Eigenfluoreszenz die Fluoreszenzintensität der Metaboliten sehr stark beeinflussen. Ebenso spielt die geringe Anregungs- und Emissionswellenlänge besonders für AHMC (390/460 nm) eine große Rolle, da Pflanzeninhaltsstoffe, wie z. B. Flavonoide und Alkaloide, bei diesen relativ niedrigen Wellenlängen angeregt werden und Fluoreszenz emittieren können.

### 5.3.2.2 Inhibitorisch stark aktive Pflanzenextrakte

Die Ergebnisse der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Experimente der inhibitorisch stark aktiven Pflanzenextrakte sind als Balkendiagramme im Anhang unter VI.4 dargestellt und in Tab. 25 als  $QC_{50}$ -Werte zusammengefasst.

Der Extrakt aus Fenchelfrüchten zeigte als einziger Pflanzenextrakt keine Beeinflussung der Fluoreszenzintensitäten aller verwendeten Metabolite durch Quenching- oder Eigenfluoreszenz-Effekte (Tab. 25; Anhang VI.4). Alle anderen Pflanzenextrakte zeigten ausschließlich schwache Quenching-Effekte mit  $QC_{50}$ -Werten größer als 200  $\mu\text{g/ml}$ . Eine Ausnahme war jedoch der Extrakt aus Birkenblättern, der mit einer Konzentration zwischen 100-200  $\mu\text{g/ml}$  die Fluoreszenzintensität des Metaboliten HFC (CYP2B6) um 50 % reduzierte. An dieser Stelle sei noch einmal darauf hingewiesen, dass sich die Konzentrationsangabe jeweils auf die Drogen-Einwaage bezieht, so dass 100-200  $\mu\text{g/ml}$  ca. 20-50  $\mu\text{g/ml}$  bezogen auf den Extrakt entsprechen. Des Weiteren wurde die Fluoreszenzintensität des Metaboliten Resorufin (CYP1A2/3A4) durch keinen der verwendeten Pflanzenextraktkonzentrationen (relevant) erhöht bzw. erniedrigt.

**Tab. 25** Konzentrationen (QC<sub>50</sub>-Werte) der inhibitorisch stark aktiven Pflanzenextrakte, welche die Fluoreszenzintensität der entsprechenden Metaboliten um 50 % reduzieren. Die jeweilige Metabolitenkonzentrationen entsprechen den Umsatzraten einer 100 %igen Enzymaktivität (X = keine Bestimmung möglich, Fluoreszenzintensität >100 %; O = kein Effekt).

Metabolit <sup>a</sup> (CYP)	QC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml]		
	Birkenblätter	Fenchel Früchte	Ginkgoblätter
CHC (1A2)	>200	O	>200
HFC (2B6)	100-200	O	>200
Fluorescein (2C8)	>200	O	>200
HFC (2C9)	>200	O	>200
CHC (2C19)	>200	O	>200
AHMC (2D6)	>200	O	>200
HFC (3A4)	>200	O	>200
Resorufin (3A4/1A2)	O	O	O

	Orthosiphonblätter	Salbeiblätter	Schöllkraut
CHC (1A2)	>200	>200	>200
HFC (2B6)	>200	X	X
Fluorescein (2C8)	>200	>200	>200
HFC (2C9)	>200	>200	>200
CHC (2C19)	>200	>200	>200
AHMC (2D6)	O	>200	>200
HFC (3A4)	>200	>200	>200
Resorufin (3A4/1A2)	O	O	O

<sup>a</sup> AHMC 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin; CHC: 3-Cyano-7-hydroxycumarin; HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin.

Diese Ergebnisse sind auch in Tab. 26 ersichtlich, in der die Reduktion bzw. Erhöhung der Fluoreszenzintensität des jeweiligen Metaboliten in Anwesenheit von 200 µg/ml Pflanzenextrakt prozentual angegeben ist. Während in Anwesenheit der Pflanzenextrakte (200 µg/ml) die Fluoreszenzintensitäten der Metabolite um 7-55 % reduziert wurden, zeigte lediglich Salbeiblätter-Extrakt bei HFC (CYP2B6) eine Eigenfluoreszenz (Anhang VI.4) und erhöht die Fluoreszenzintensität um 22 % (Tab. 26).



**Tab. 26** Beeinflussung der Fluoreszenzintensität (Reduktion „-“ und Erhöhung „+“) der jeweiligen Metaboliten in Anwesenheit von 200 µg/ml Pflanzenextrakt.

Metabolit <sup>a</sup> (CYP)	Birkenblätter	Fenchelfrüchte	Ginkgoblätter	Orthosiphonblätter	Salbeiblätter	Schöllkraut
<b>CHC (1A2)</b>	-40 %	0	-20 %	-15 %	-39 %	-23 %
<b>HFC (2B6)</b>	-55 %	0	-34 %	-16 %	+22 %	0
<b>Fluorescein (2C8)</b>	-37 %	0	-25 %	-10 %	-48 %	-10 %
<b>HFC (2C9)</b>	-38 %	0	-17 %	-10 %	-22 %	-12 %
<b>CHC (2C19)</b>	-47 %	0	-23 %	-15 %	-37 %	-22 %
<b>AHMC (2D6)</b>	-27 %	0	-26 %	0	-12 %	-18 %
<b>HFC (3A4)</b>	-28 %	0	-12 %	-7 %	-20 %	-7 %
<b>Resorufin (3A4/1A2)</b>	0	0	0	0	0	0

<sup>a</sup> AHMC 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin; CHC: 3-Cyano-7-hydroxycumarin; HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin.

### 5.3.2.3 Zusammenfassung

Das Ausmaß der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte der einzelnen Pflanzenextrakte ist in Tab. 27 zusammengefasst. Während die stark inhibitorisch aktiven Pflanzenextrakte nur schwache Quenching-Effekte und kaum Eigenfluoreszenz zeigten, ergaben sich für die schwach inhibitorisch aktiven Pflanzenextrakte unterschiedlich starke Quenching und Eigenfluoreszenz-Effekte (Tab. 27). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die in Tab. 27 angegebenen Stärken der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte auf die Konzentrationsbereiche der IC<sub>50</sub>-Werte der entsprechenden Extrakte beschränkt sind. Beispielsweise zeigten Birkenblätter ebenso wie Passionsblumenkraut bei hohen Extraktkonzentrationen (>200 µg/ml) vergleichbar starke Quenching-Effekte.

**Tab. 27** Einfluss der Pflanzenextrakte auf die Signalintensitäten der verwendeten Metabolite durch Quenching-Effekte und Eigenfluoreszenz (+++ stark, ++ moderat, + schwach, O kein Effekt) im Konzentrationsbereich ihrer IC<sub>50</sub>-Werte (schwache Inhibitoren: 125-1000 µg/ml; starke Inhibitoren: 25-200 µg/ml).

Pflanzenextrakt	Quenching-Effekt	Eigenfluoreszenz
<i>schwache Inhibitoren</i>		
Baldrianwurzel	O	++
Basilikumkraut	+	++
Bittersüßstengel	O	+++
Heidelbeeren	++	O
Korianderfrüchte	O	O
Melissenblätter	+++	O
Passionsblumenkraut	+++	O
Rotkleeblüten	++	O
Weißdornblätter mit Blüten	++	O
<i>starke Inhibitoren</i>		
Birkenblätter	+	O
Fenchelfrüchte	O	O
Ginkgoblätter	+	O
Orthosiphonblätter	+	O
Salbeiblätter	+	+
Schöllkraut	+	O

#### 5.4 Abhängigkeit der Abweichungen der mittels LC/MS- und Fluoreszenz-Methoden erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte von Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten

Die bisher erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass die mit LC/MS und Fluoreszenz erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte nur sehr schwach miteinander korrelieren. Beispielsweise waren die durch LC/MS bestimmten IC<sub>50</sub>-Werte von Passionsblumenkraut bei CYP1A2 und CYP3A4 um das 4-fache höher als die fluorimetrisch bestimmten IC<sub>50</sub>-Werte (500-1000 µg/ml vs. <125 µg/ml). Zudem konnten insgesamt ca. 6 % der fluorimetrisch ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte wegen zunehmender Fluoreszenzintensität nicht bestimmt werden. Die nachfolgenden Abschnitte sollen am Beispiel einiger Pflanzenextrakte verdeutlichen, dass die Abweichungen der IC<sub>50</sub>-Werte (LC/MS vs.

Fluoreszenz) mit den Ergebnissen der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Experimenten korrelieren. Die mit Hilfe von Ethoxyresorufin (CYP1A2) und Benzyloxyresorufin (CYP3A4) ermittelten  $IC_{50}$ -Werte der Pflanzenextrakte werden in den nachfolgenden Tabellen nicht berücksichtigt, da diese  $IC_{50}$ -Werte mit den LC/MS-Werten relativ gut übereinstimmen und die Fluoreszenzintensität des Metaboliten Resorufin durch Quenching- und Eigenfluoreszenz der Pflanzenextrakte kaum beeinflusst wird. Diese Tatsache beruht vermutlich auf der relativ hohen Anregungs- und Emissionswellenlänge von Resorufin (530 nm/590 nm). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die  $IC_{50}$ -Werte besonders bei CYP3A4 von den verwendeten Substraten abhängen können. Zum Teil wurden Abweichungen (Faktor 3-5) für die  $IC_{50}$ -Werte der Standardinhibitoren erhalten, wobei fast ausschließlich die  $IC_{50}$ -Werte der Fluoreszenzmethoden höher lagen (siehe II.4).

#### 5.4.1 Einfluss von Quenching-Effekten

Für die CYP-Enzyme 1A2, 2B6, 2C19, 2D6 und 3A4 (Passionsblumenkraut) bzw. für die CYP-Enzyme 1A2 und 2C19 (Melissenblätter) war zu beobachten, dass bei starken Quenching-Effekten ( $QC_{50}$ -Werte 125-500  $\mu\text{g/ml}$ ) die fluorimetrisch bestimmten  $IC_{50}$ -Werte im Vergleich zu den LC/MS-Werten zu niedrig lagen (Tab. 28). Bei moderaten und geringen Quenching-Effekten ( $QC_{50}$ -Werte >500  $\mu\text{g/ml}$ ) zeigte dagegen der Melissenblätter-Extrakt keine oder nur geringe Abweichungen der  $IC_{50}$ -Werte. In diesem Zusammenhang bedeutete eine geringe Abweichung ein Unterschied der  $IC_{50}$ -Werte um maximal einen Konzentrationsbereich, z. B. Melissenblätter/CYP2B6: 250-500  $\mu\text{g/ml}$  (LC/MS) vs. 125-250  $\mu\text{g/ml}$  (Fluoreszenz).

Bei Heidelbeeren-Extrakt wurden die  $IC_{50}$ -Werte der Fluoreszenz-Methode fast durchgehend durch moderate Quenching-Effekte ( $QC_{50}$ -Wert 500-1000  $\mu\text{g/ml}$ ) erniedrigt (Tab. 28).

**Tab. 28** Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte (LC/MS, Fluoreszenz) und der QC<sub>50</sub>-Werte für Heidelbeeren-, Passionsblumenkraut- und Rotkleeblüten-Extrakte, die starke bis moderate Quenching-Effekte zeigen. Gleiche IC<sub>50</sub>-Werte und IC<sub>50</sub>-Werte mit geringen Abweichungen (maximal ein Konzentrationsbereich) sind grau hinterlegt.

CYP-Enzym	IC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml] LC/MS	IC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml] Fluoreszenz	QC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml] Fluoreszenz
<b>Heidelbeeren (getrocknet)</b>			
CYP1A2	500-1000	125-250	500-1000 (CHC)
CYP2B6	500-1000	125-250	500-1000 (HFC)
CYP2C8	125-250	125-250	250-500 (Fluorescein)
CYP2C9	250-500	<125	500-1000 (HFC)
CYP2C19	500-1000	<125	500-1000 (CHC)
CYP2D6	500-1000	125-250	500-1000 (AHMC)
CYP3A4	500-1000	250-500	500-1000 (HFC)
<b>Passionsblumenkraut</b>			
CYP1A2	500-1000	<125	125-250 (CHC)
CYP2B6	250-500	<125	125-250 (HFC)
CYP2C8	125-250	250-500	>1000 (Fluorescein)
CYP2C9	125-250	<125	250-500 (HFC)
CYP2C19	250-500	<125	125-250 (CHC)
CYP2D6	500-1000	125-250	250-500 (AHMC)
CYP3A4	500-1000	<125	250-500 (HFC)
<b>Melissenblätter</b>			
CYP1A2	500-1000	125-250	250-500 (CHC)
CYP2B6	250-500	125-250	>1000 (HFC)
CYP2C8	125-250	<125	125-250 (Fluorescein)
CYP2C9	125-250	125-250	500-1000 (HFC)
CYP2C19	250-500	<125	250-500 (CHC)
CYP2D6	500-1000	250-500	500-1000 (AHMC)
CYP3A4	250-500	125-250	500-1000 (HFC)

AHMC 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin; CHC: 3-Cyano-7-hydroxycumarin;  
HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin.

Auffällig ist die relativ gute Übereinstimmung der  $IC_{50}$ -Werte für CYP2C8 bei Heidelbeeren und Melissenblättern, obwohl das Fluoreszenzsignal von Fluorescein (CYP2C8) sehr stark reduziert wurde (geringe  $QC_{50}$ -Werte; Tab. 28). Beispielsweise zeigte ein Heidelbeeren-Extrakt einen starken Quenching-Effekt für Fluorescein ( $QC_{50}$  250-500  $\mu\text{g/ml}$ ); dennoch resultierten bei der LC/MS- und Fluoreszenz-Methode gleiche  $IC_{50}$ -Werte (Tab. 28). Hierfür ist wahrscheinlich die Verwendung von unterschiedlichen Substraten bei den beiden Methoden verantwortlich, da CYP2C8 ebenso wie CYP3A4 kooperative Bindungsstellen besitzt, d. h. je nach Substrat verändert sich mit der Zahl der besetzten Substrat-Bindungsstellen die Affinität von CYP2C8 zum Substrat (II.2.4.4).<sup>207</sup> Der fluorimetrisch bestimmte  $IC_{50}$ -Wert des Standardinhibitors Quercetin (12,5  $\mu\text{M}$ ) war etwa viermal höher als der LC/MS-Wert (4,1  $\mu\text{M}$ ), so dass eigentlich durch Verwendung des Fluoreszenzsubstrats Dibenzylfluorescein generell höhere  $IC_{50}$ -Werte für CYP2C8 im Vergleich zum Substrat Paclitaxel (LC/MS) resultieren müssten. Da jedoch diese Unterschiede durch Quenching-Effekte der Pflanzenextrakte kompensiert wurden, resultierten relativ gute Übereinstimmungen der  $IC_{50}$ -Werte.

Pflanzenextrakte, wie z. B. Korianderfrüchte, Orthosiphonblätter oder Schöllkraut, die hohe  $QC_{50}$ -Werte und somit schwache Quenching-Effekte zeigten, besaßen dagegen fast ausschließlich übereinstimmende  $IC_{50}$ -Werte oder geringe Abweichungen (Tab. 29). Zum Beispiel unterschieden sich die  $IC_{50}$ -Werte des Schöllkraut-Extrakts für CYP2C9 nur gering: 50-100  $\mu\text{g/ml}$  (LC/MS) vs. 100-200  $\mu\text{g/ml}$  (Tab. 29). Größere Abweichungen trotz geringer Quenching-Effekte zeigten lediglich die  $IC_{50}$ -Werte von Korianderfrüchten und Schöllkraut bei CYP3A4 sowie Orthosiphonblättern und Schöllkraut bei CYP2C19.

**Tab. 29** Vergleich der Abweichungen der IC<sub>50</sub>-Werte (LC/MS, Fluoreszenz) mit den QC<sub>50</sub>-Werten für die Extrakte aus Korianderfrüchten, Orthosiphonblättern und Schöllkraut, die moderate bis keine Quenching-Effekte zeigen. Gleiche IC<sub>50</sub>-Werte und IC<sub>50</sub>-Werte mit geringen Abweichungen (maximal ein Konzentrationsbereich) sind grau hinterlegt (X = keine Bestimmung möglich, Fluoreszenzintensität >100 %; O = kein Effekt).

CYP-Enzym	IC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml] LC/MS	IC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml] Fluoreszenz	QC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml] Fluoreszenz
<b>Korianderfrüchte</b>			
CYP1A2	500-1000	250-500	>1000 (CHC)
CYP2B6	125-250	250-500	O (HFC)
CYP2C8	500-1000	500-1000	>1000 (Fluorescein)
CYP2C9	250-500	500-1000	>1000 (HFC)
CYP2C19	500-1000	500-1000	>1000 (CHC)
CYP2D6	>1000	500-1000	>1000 (AHMC)
CYP3A4	500-1000	125-250	>1000 (HFC)
<b>Orthosiphonblätter</b>			
CYP1A2	>200	50-100	>200 (CHC)
CYP2B6	100-200	>200	>200 (HFC)
CYP2C8	50-100	50-100	>200 (Fluorescein)
CYP2C9	100-200	100-200	>200 (HFC)
CYP2C19	>200	50-100	>200 (CHC)
CYP2D6	>200	>200	O (AHMC)
CYP3A4	25-50	<25	>200 (HFC)
<b>Schöllkraut</b>			
CYP1A2	50-100	50-100	>200 (CHC)
CYP2B6	100-200	100-200	O (HFC)
CYP2C8	100-200	100-200	>200 (Fluorescein)
CYP2C9	50-100	100-200	>200 (HFC)
CYP2C19	50-100	<25	>200 (CHC)
CYP2D6	<25	<25	>200 (AHMC)
CYP3A4	100-200	25-50	>200 (HFC)

AHMC 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin; CHC: 3-Cyano-7-hydroxycumarin; HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin.

### 5.4.2 Einfluss der Eigenfluoreszenz

Für alle Pflanzenextrakte die eine Eigenfluoreszenz bei den entsprechenden Metaboliten zeigten, waren die fluorimetrisch bestimmten IC<sub>50</sub>-Werte im Vergleich zur LC/MS-Methode entweder zu hoch oder nicht bestimmbar (Tab. 30). Beispielsweise konnten die IC<sub>50</sub>-Werte des Bittersüßstengel-Extrakts für CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6 nicht bestimmt werden, da dieser Extrakt eine sehr starke Eigenfluoreszenz mit FC<sub>50</sub>-Werten von 125-1000 µg/ml aufwies.

**Tab. 30** Vergleich der Abweichungen der IC<sub>50</sub>-Werte (LC/MS, Fluoreszenz) mit den FC<sub>50</sub>-Werten für Baldrianwurzel-, Basilikumkraut-, Bittersüßstengel- und Salbeiblätter-Extrakt (X = keine Bestimmung möglich, Fluoreszenzintensität nimmt zu).

CYP-Enzym	IC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml] LC/MS	IC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml] Fluoreszenz	FC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml] Fluoreszenz
<b><i>Baldrianwurzel</i></b>			
CYP2B6	<125	X	250-500 (HFC)
CYP2C9	125-250	X	>1000 (HFC)
CYP2D6	125-250	250-500	>1000 (AHMC)
<b><i>Basilikumkraut</i></b>			
CYP2B6	125-250	X	250-500 (HFC)
CYP2C9	125-250	X	>1000 (HFC)
CYP2D6	250-500	500-1000	>1000 (AHMC)
<b><i>Bittersüßstengel</i></b>			
CYP2B6	500-1000	X	<125 (HFC)
CYP2C9	125-250	X	500-1000 (HFC)
CYP2D6	500-1000	X	250-500 (AHMC)
<b><i>Salbeiblätter</i></b>			
CYP2B6	25-50	50-100	>200 (HFC)

AHMC: 3-[2-(N,N-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin; HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin.

Während Quenching-Effekte bei allen Fluoreszenzmetaboliten der CYP-Enzyme auftraten, wurden ausschließlich die Fluoreszenzintensitäten der Metabolitenkonzentrationen von HFC (CYP2B6, CYP2C9) und AHMC (CYP2D6) durch die Eigenfluoreszenz der Pflanzenextrakte beeinträchtigt (Tab. 30). Wie bereits erwähnt, beruht diese Tatsache vor allem auf der sehr geringen Metabolitenkonzentration bei den CYP-Enzymen 2B6, 2C9 und 2D6, wodurch die Pflanzenextrakte schon mit geringer Eigenfluoreszenz die Fluoreszenzintensität der Metaboliten sehr stark beeinflussen.

### 5.4.3 Pflanzenextrakte mit Besonderheiten

In diesem Abschnitt wird auf Pflanzenextrakte eingegangen, die Besonderheiten im Zusammenhang mit der Bestimmung der inhibitorischen Aktivität sowie der Bestimmung von Quenching und Eigenfluoreszenz-Effekten aufwiesen.

Der Melissenblätter-Extrakt zeigte in Anwesenheit des Metaboliten HFC (CYP2B6, CYP2C9) Quenching-Effekte (Tab. 23). Die Fluoreszenzintensität von HFC wurde durch 500-1000 µg/ml bzw. >1000 µg/ml Melissenblätter-Extrakt um 50 % reduziert (QC<sub>50</sub>-Wert), während in Abwesenheit von HFC der Extrakt bei den entsprechenden Wellenlängen Eigenfluoreszenz aufwies (Tab. 31). Auch Basilikumkraut-Extrakt zeigte für CYP2C9 (HFC) sowohl geringe Quenching-Effekte (QC<sub>50</sub>-Wert >1000 µg/ml) als auch Eigenfluoreszenz (FC<sub>50</sub>-Wert >1000 µg/ml; Tab. 23).

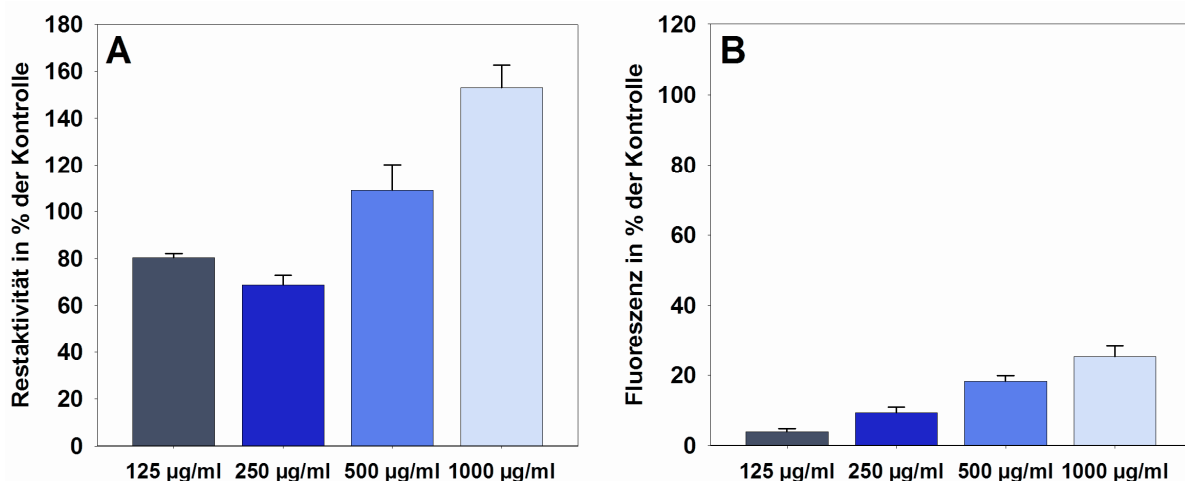
**Tab. 31** Vergleich der Abweichungen der IC<sub>50</sub>-Werte (LC/MS, Fluoreszenz) mit den QC<sub>50</sub>- und FC<sub>50</sub>-Werten von Basilikumkraut- und Melissenblätter-Extrakt.

	IC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml] LC/MS	IC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml] Fluoreszenz	QC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml] Fluoreszenz	FC <sub>50</sub> -Wert [µg/ml] Fluoreszenz
<b><i>Basilikumkraut</i></b>				
CYP2C9	125-250	- <sup>a</sup>	>1000 (HFC)	>1000 (HFC)
<b><i>Melissenblätter</i></b>				
CYP2B6	250-500	125-250	>1000 (HFC)	500-1000 (HFC)
CYP2C9	125-250	125-250	500-1000 (HFC)	>1000 (HFC)

<sup>a</sup>keine Bestimmung möglich, da berechnete Restaktivität des Enzyms >100 %.



Der  $IC_{50}$ -Wert von Basilikumkraut für CYP2C9 (Substrat: 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin; MFC; Metabolit: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin, HFC) konnte fluorimetrisch nicht bestimmt werden, da die Fluoreszenz nach Inkubation mit 500 und 1000  $\mu\text{g/ml}$  Extrakt extrem zunahm und eine Restaktivität von mehr als 100 % resultierte (A; Abb. 49). Dies lag zum einen daran, dass Basilikum bei der Wellenlänge von HFC Eigenfluoreszenz zeigte (B; Abb. 49), so dass bei starker Hemmung der Substratumsetzung und somit geringer Metabolitenkonzentration die Eigenfluoreszenz die Metabolitenfluoreszenz überlagerte. Die relativ starke Erhöhung der Restaktivität von ca. 55 % durch 1000  $\mu\text{g/ml}$  Basilikumkraut (Abb. 49/A) trotz relativ geringer Eigenfluoreszenz (ca. 25 %; Abb. 49/B), lässt jedoch vermuten, dass Inhaltsstoffe von Basilikum durch CYP2C9 zu stark fluoreszierenden Produkten verstoffwechselt wurden und diese somit zu einer Erhöhung der Metabolitenfluoreszenz beitrugen.



**Abb. 49** Balkendiagramme der inhibitorischen Aktivität (A) und der Eigenfluoreszenz (B) von Basilikumkraut-Extrakt (125, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) für CYP2C9 (Substrat: MFC; Metabolit: HFC).

Diese Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Untersuchung der Eigenfluoreszenz- und Quenching-Effekte in Anwesenheit der Metabolite als auch die Eigenfluoreszenz (ohne Metabolite) wichtig ist. Das Auftreten von Quenching und Eigenfluoreszenz hing von der An- oder Abwesenheit der Metaboliten bzw. Metabolitenkonzentrationen ab. Dieses Phänomen ist jedoch nicht nur auf Pflanzenextrakte beschränkt. So wurde von Zou et al. (2002) gezeigt, dass z. B. die Flavonoide Quercetin (100  $\mu\text{M}$ ) und Vitexin (116  $\mu\text{M}$ ) die Fluoreszenzintensität von HFC (0,2  $\mu\text{M}$ /CYP2C9) um 15 %

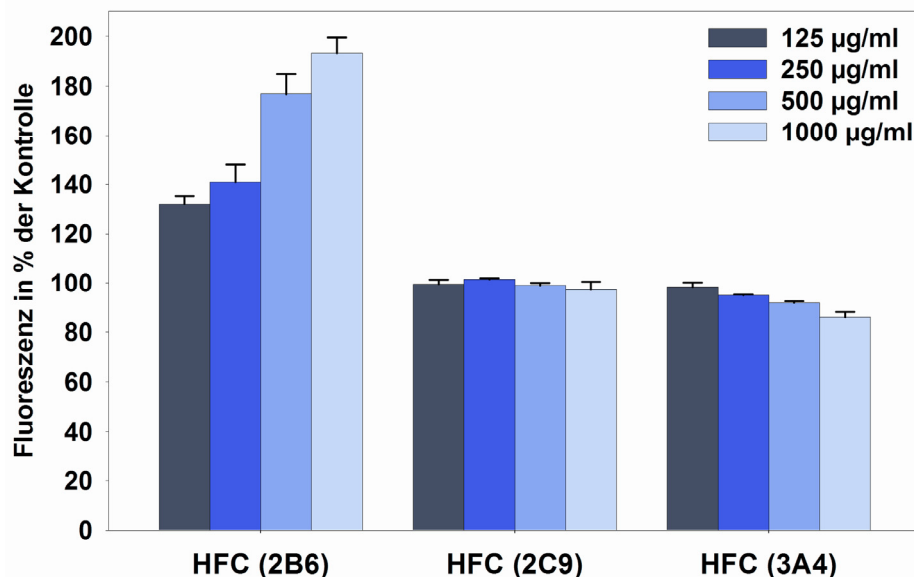
bzw. 23 % reduzierten, während diese Naturstoffe in Abwesenheit von HFC Eigenfluoreszenz zeigten.<sup>131</sup> Die Eigenfluoreszenz von Quercetin und Vitexin entsprach einer Fluoreszenzintensität des Metaboliten von 33 % und 16 %. Da in Melissenblättern und Basilikumkraut unter anderem auch Flavonoide enthalten sind (Tab. 18), sind vermutlich unter anderem diese Inhaltsstoffe für die Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte verantwortlich.

Der  $IC_{50}$ -Wert von Ginkgoblätter-Extrakt für CYP3A4 (Substrat: Benzyloxyresorufin; Metabolit: Resorufin) konnte durch die zunehmende Fluoreszenzintensität bei höheren Extraktkonzentrationen nicht bestimmt werden, obwohl die Ginkgoblätter bei dem Metaboliten Resorufin keine Eigenfluoreszenz-Effekte zeigten. Da jedoch der  $IC_{50}$ -Wert für CYP1A2 (Substrat: Ethoxyresorufin; Metabolit: Resorufin) bestimmt werden konnte und hier keine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet wurde (Anhang VI.2), deutet das Ergebnis darauf hin, dass Inhaltsstoffe von Ginkgoblättern durch CYP3A4 zu stark fluoreszierenden Produkten metabolisiert wurden.

Bei der fluorimetrischen Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten ist somit zu beachten, dass Inhaltsstoffe zu fluoreszierenden Produkten verstoffwechselt werden können und damit die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte durch Eigenfluoreszenz beeinträchtigen. Ebenso besteht natürlich die Möglichkeit, dass Extrakt-Inhaltsstoffe zu Substanzen metabolisiert werden, die das Fluoreszenzsignal quenchen.

Es konnte somit gezeigt werden, dass das Auftreten und das Ausmaß der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte von den Metaboliten und somit von den Wellenlängen für die Anregung und Emission, den Inhibitoren (Pflanzenextrakten) sowie den Inhibitorkonzentrationen abhängig ist. Die Abhängigkeit von der Metabolitenkonzentration konnte zum Teil bei dem Metaboliten HFC, der durch CYP2B6 (Substrat: EFC), CYP2C9 (Substrat: MFC) und CYP3A4 (Substrat: BFC) in unterschiedlichen Konzentrationen gebildet wird (Tab. 22), beobachtet werden. In Abb. 50 ist als Beispiel Baldrianwurzel dargestellt. Während Baldrianwurzel-Extrakt bei CYP2B6 (HFC: 0,06  $\mu$ M) eine starke Eigenfluoreszenz zeigte, wies der Extrakt bei CYP2C9 (HFC: 0,4  $\mu$ M) keine Effekte auf und bei CYP3A4 (HFC: 2,8  $\mu$ M) geringe Quenching-Effekte. In Kapitel II.5.5 wird die Abhängigkeit der Quenching- und

Eigenfluoreszenz-Effekte von der Metabolitenkonzentration (Substratumsatz) genauer untersucht, um zu prüfen, ob eine korrekte Bestimmung der inhibitorischen Aktivität bei Vorliegen von Quenching- oder Eigenfluoreszenz-Effekten durch Kontrollexperimente möglich ist.



**Abb. 50** Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte durch Baldrianwurzel-Extrakt bei HFC-Konzentrationen, die einer 100 %igen Enzymaktivität von CYP2B6 (HFC: 0,06 µM), CYP2C9 (HFC: 0,4 µM) und CYP3A4 (HFC: 2,8 µM) entsprechen.

#### 5.4.4 Zusammenfassung

Allgemein traten Quenching-Effekte bei den Pflanzenextrakten weitaus häufiger auf als Eigenfluoreszenz. Das Verhältnis der Quenching-Effekte zur Eigenfluoreszenz betrug bei den untersuchten Extrakten etwa 5-10:1. Interessanterweise zeigten auch die untersuchten Flavonoid-Drogen, wie z. B. Birkenblätter, Ginkgoblätter, Melissenblätter, und Passionsblumenkraut, weitaus häufiger Quenching-Effekte als Eigenfluoreszenz. Vor allem bei hohen Extraktkonzentrationen waren starke Quenching-Effekte bei den Arzneidrogen zu beobachten, so dass vor allem inhibitorisch schwach aktive Pflanzenextrakte große Abweichungen der  $IC_{50}$ -Werte aufwiesen. Stark inhibitorisch aktive Pflanzenextrakte zeigten wenig Quenching-Effekte sowie kaum Eigenfluoreszenz und geringe Abweichungen der  $IC_{50}$ -Werte. Der Grund hierfür ist, dass bei Pflanzenextrakten mit hoher inhibitorischer Aktivität geringe

Extraktkonzentrationen und bei Pflanzenextrakten mit geringer inhibitorischer Aktivität hohe Extraktkonzentrationen für die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte notwendig sind.

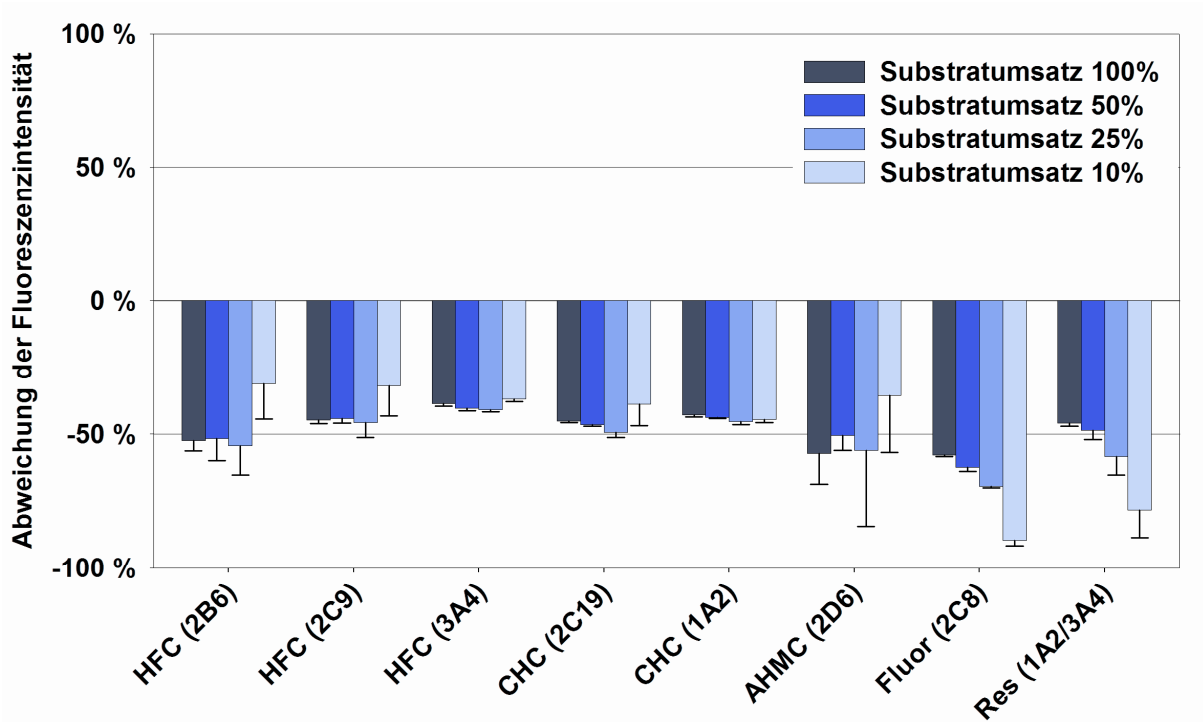
### **5.5 Abhängigkeit der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte von der Metabolitenkonzentration (Substratumsatz)**

Für fünf ausgewählte Pflanzenextrakte (Basilikumkraut, Heidelbeeren, Bittersüßstengel, Korianderfrüchte und Passionsblumenkraut) wurde die Abhängigkeit der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte von der Metabolitenkonzentration (Substratumsatz) untersucht. Hierfür wurde die Fluoreszenzintensität unterschiedlicher Konzentrationen der Metabolite AHMC (CYP2D6), CHC (CYP1A2, CYP2C19), Fluorescein (CYP2C8), HFC (CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4) und Resorufin (CYP1A2, CYP3A4) in Anwesenheit der Pflanzenextrakte gemessen. Für die Metaboliten der jeweiligen CYP-Enzyme wurden vier Konzentrationen ausgewählt, die einem 100, 50, 25 und 10 %igen Substratumsatz entsprachen. Zum Beispiel entspricht ein 25 %iger Substratumsatz einer 25 %igen Restaktivität und somit einer 75 %igen Hemmung des entsprechenden CYP-Enzyms. Somit wurde bei konstanten Extraktkonzentrationen das Ausmaß der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte bei unterschiedlichen Metabolitenkonzentrationen untersucht. Die Pflanzenextrakte wurden in einer Konzentration von 500 µg/ml (Ausnahme: Passionsblumenkraut 125 µg/ml) eingesetzt.

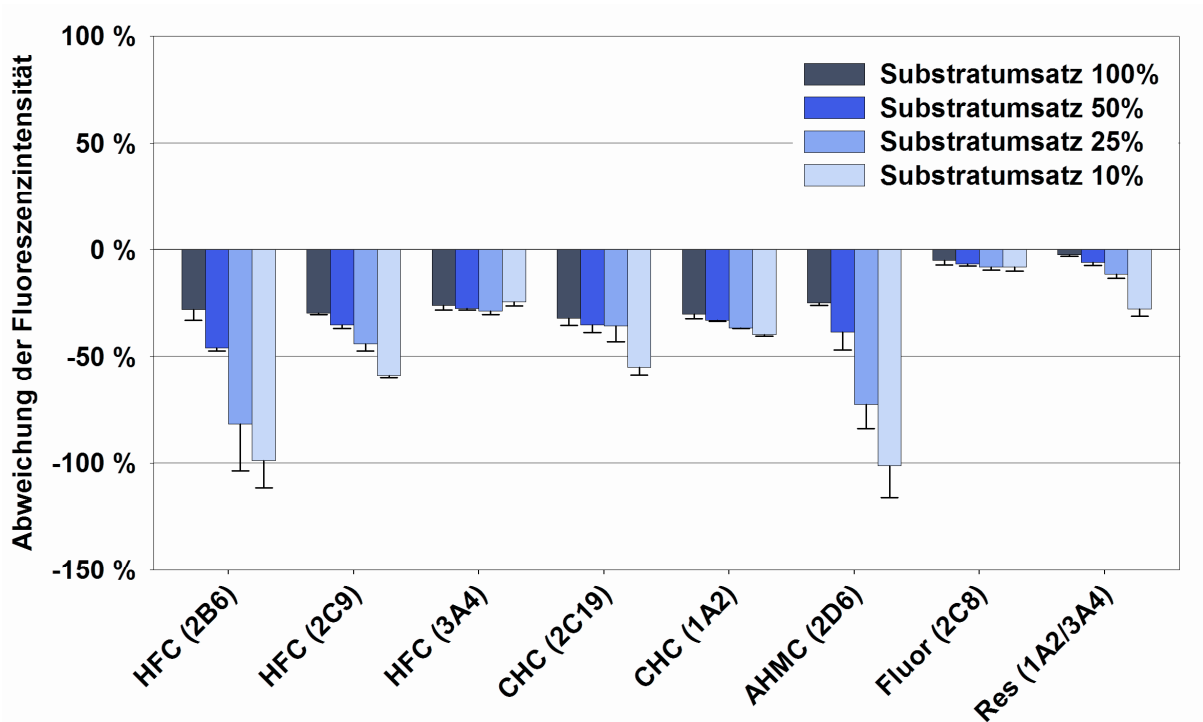
#### **5.5.1 Ergebnisse**

Während der Passionsblumenkraut-Extrakt in einer Konzentration von 125 µg/ml die Signale von HFC (CYP2B6, CYP2C9) und AHMC (CYP2D6) abhängig von der Metabolitenkonzentration unterschiedlich stark reduzierte, blieb das Quenching des Fluoreszenzsignals von HFC (CYP3A4) konstant, was auf die wesentlich höheren Konzentrationen von HFC bei der durch CYP3A4 katalysierten Umsetzung von BFC zurückzuführen ist (Abb. 51). Obwohl auch der Heidelbeeren-Extrakt ausgeprägte Quenching-Effekte aufwies, wurden die Signale der Metaboliten HFC, CHC und AHMC unabhängig von der Metabolitenkonzentration konstant gequencht (Abb. 51).

Heidelbeeren-Extrakt (500 µg/ml):



Passionsblumenkraut-Extrakt (125 µg/ml):

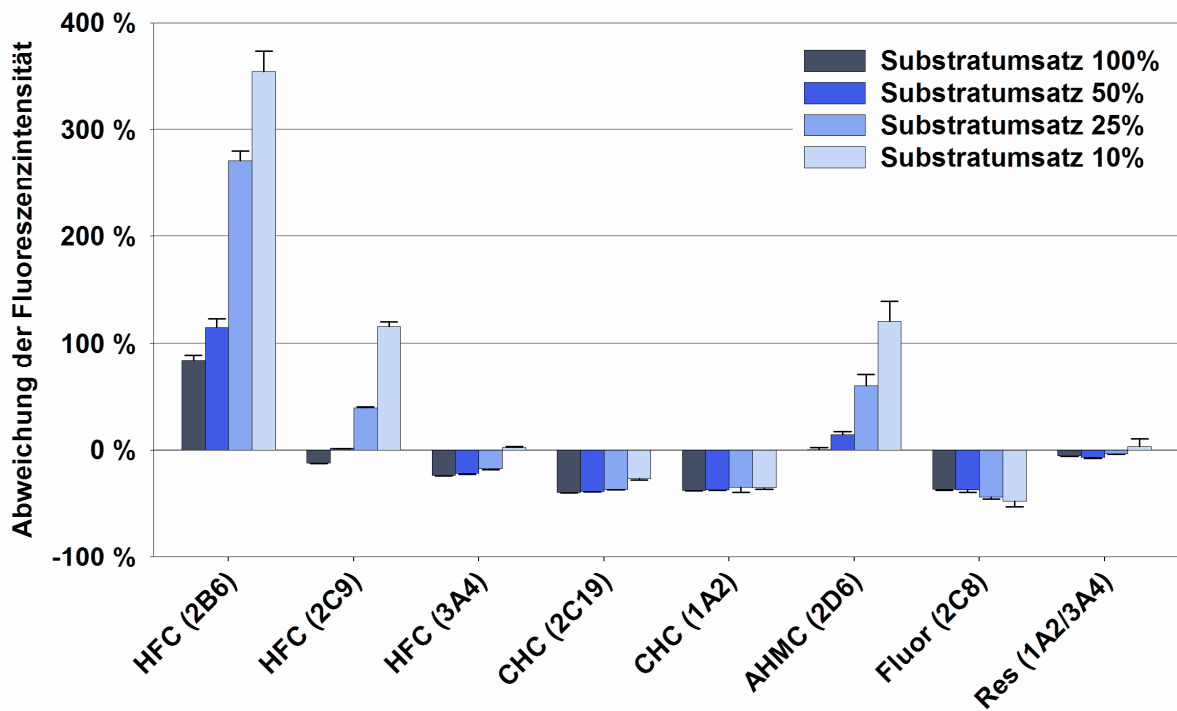


**Abb. 51** Abweichungen der Fluoreszenzintensitäten bei unterschiedlichen Produktkonzentrationen von HFC, CHC, AHMC, Fluorescein und Resorufin in Anwesenheit von Heidelbeeren- (500 µg/ml) und Passionsblumenkraut-Extrakt (125 µg/ml). Die eingesetzten Produktkonzentrationen entsprachen einer 100, 50, 25 und 10 %igen Enzymaktivität der jeweiligen CYP-Enzyme.

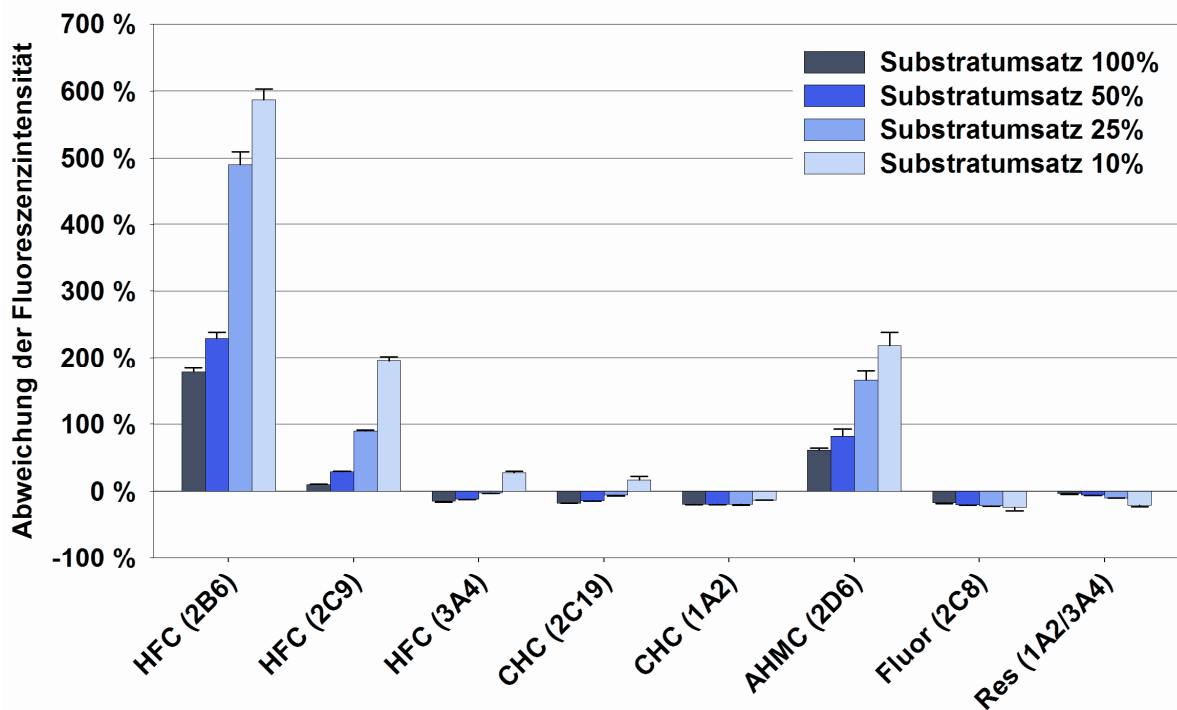
Im Unterschied zum Passionsblumenkraut-Extrakt wurden beim Heidelbeeren-Extrakt vor allem die Signale von Fluorescein und Resorufin konzentrationsabhängig gequencht, was wahrscheinlich mit den stark blau-rot gefärbten Anthocyanen in den Heidelbeerfrüchten zusammenhängt, da Fluorescein und vor allem Resorufin im Vergleich zu den Cumarin-Derivaten bei höheren Wellenlängen zur Fluoreszenz angeregt werden.

Während das Fluoreszenzsignal von 3-Cyano-7-hydroxycumarin (CHC: CYP1A2, CYP2C19) und Fluorescein (CYP2C8) durch den Basilikumkraut-Extrakt gequencht wurde, zeigte der Bittersüßstengel-Extrakt bei CHC und Fluorescein kaum einen Effekt (Abb. 52). Das Fluoreszenzsignal von HFC wurde bei einem Substratumsatz, der einer 10 %igen Restaktivität (90 % Inhibition) von CYP2B6 entsprach, um fast 400 % durch den Basilikumkraut-Extrakt und 600 % durch den Bittersüßstengel-Extrakt erhöht (Abb. 52). Dieser Effekt war bei CYP2C9 deutlich schwächer ausgeprägt (ca. 100 % Abweichung bei Basilikumkraut und ca. 200 % bei Bittersüßstengeln) und spielte bei CYP3A4 aufgrund der sehr viel höheren HFC-Konzentration keine Rolle mehr. Die HFC-Konzentration bei 100 % Enzymaktivität von CYP2B6 betrug 0,06  $\mu\text{M}$ , von CYP2C9 0,4  $\mu\text{M}$  und CYP3A4 2,8  $\mu\text{M}$ . Die Eigenfluoreszenz von Basilikumkraut- und Bittersüßstengel-Extrakt nahm vor allem bei sehr niedrigen Konzentrationen von HFC (CYP2B6, CYP2C9) und AHMC (CYP2D6) stark zu (Abb. 52). Die Abweichungen der Fluoreszenzintensitäten bei CYP2B6, CYP2C9 und CYP2D6 nahmen in Anwesenheit der Extrakte von Basilikum und Bittersüßstengeln bei niedrigen Metabolitenkonzentrationen (Substratumsatz) zu, wobei kein linearer Zusammenhang ersichtlich war. Während sich beispielsweise die Abweichung der Fluoreszenzintensität bei Bittersüßstengeln (CYP2B6) bei Erhöhung der HFC-Konzentration von 25 % auf 50 % Substratumsatz ungefähr verdoppelte, ergab sich bei einer Erhöhung des Substratumsatzes von 50 % auf 100 % lediglich eine Steigerung der Fluoreszenzabweichung um den Faktor 1,2.

Basilikumkraut-Extrakt (500 µg/ml):



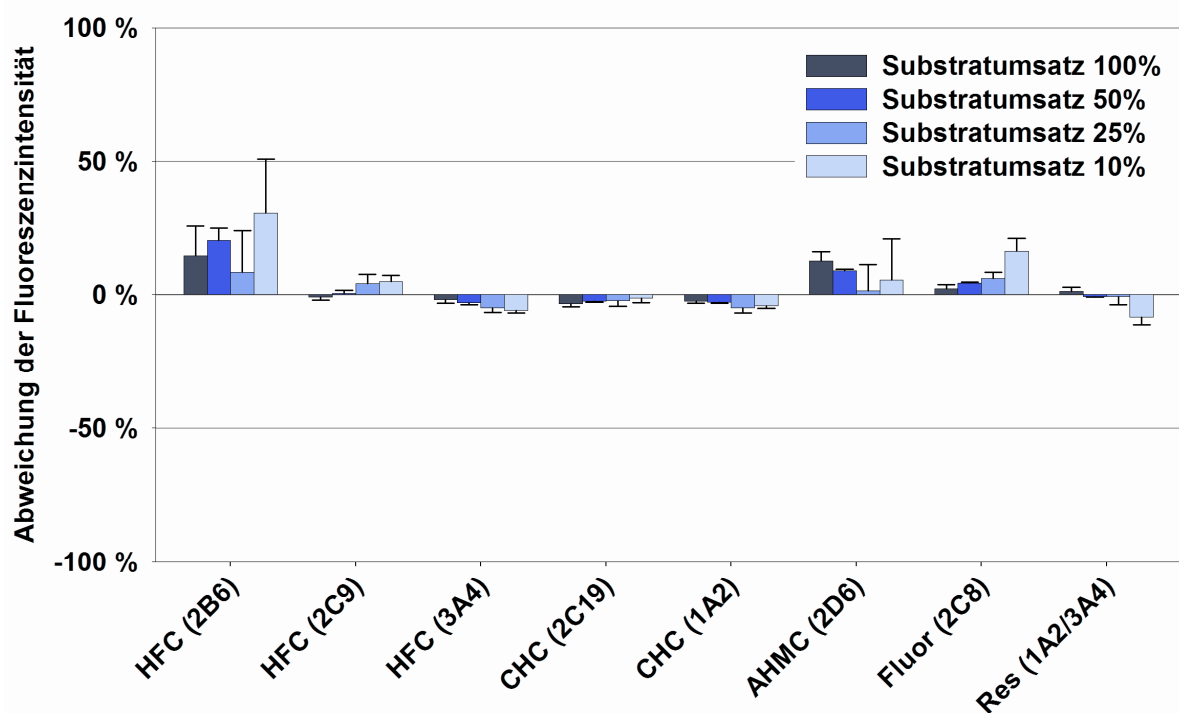
Bittersüßstengel-Extrakt (500µg/ml):



**Abb. 52** Abweichungen der Fluoreszenzintensitäten bei unterschiedlichen Produktkonzentrationen von HFC, CHC, AHMC, Fluorescein und Resorufin in Anwesenheit von Basilikumkraut- und Bittersüßstengel-Extrakt (500 µg/ml). Die eingesetzten Produktkonzentrationen entsprachen einer 100, 50, 25 und 10 %igen Enzymaktivität der jeweiligen CYP-Enzyme.

Im Gegensatz zu den vorher getesteten Pflanzenextrakten resultierte für Korianderfrüchte bei allen Metaboliten kaum eine Beeinträchtigung der Fluoreszenzsignale. D. h. Korianderfrüchte zeigten trotz abnehmender Metabolitenkonzentrationen keine Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte.

Korianderfrüchte-Extrakt (500 µg/ml):



**Abb. 53** Abweichungen der Fluoreszenzintensitäten bei unterschiedlichen Produktkonzentrationen von HFC, CHC, AHMC, Fluorescein und Resorufin in Anwesenheit von Korianderfrüchte-Extrakt (500 µg/ml). Die eingesetzten Produktkonzentrationen entsprachen einer 100, 50, 25 und 10%igen Enzymaktivität der jeweiligen CYP-Enzyme.

### 5.5.2 Zusammenfassung

Der Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Metabolite in Anwesenheit der Pflanzenextrakte zeigte, dass die Fluoreszenzintensität je nach Pflanzenextrakt erhöht (Basilikumkraut, Bittersüßstengel) oder erniedrigt wurde (Heidelbeeren, Passionsblumenkraut), wobei je nach Isoenzym und Umsatzrate die Fluoreszenzintensität sehr stark von der Metabolitenkonzentration abhing. Dies spielte vor allem



bei CYP2B6 und CYP2D6 aufgrund der entsprechend niedrigen Produktkonzentrationen eine große Rolle.

Während Eigenfluoreszenz-Effekte (Bittersüßstengel, Basilikumkraut) immer abhängig von der Konzentration des Metaboliten sind, können die Quenching-Effekte der Pflanzenextrakte sowohl abhängig als auch unabhängig von der Konzentration der Metaboliten sein (Abb. 51-52). In Tab. 32 sind die Ergebnisse der Pflanzenextrakte bezüglich der Abhängigkeit der Effekte von den Metabolitenkonzentrationen zusammengefasst, wobei nur sehr signifikante Unterschiede zur Bewertung der Abhängigkeit berücksichtigt wurden.

**Tab. 32** Vergleich der Abhängigkeit der Eigenfluoreszenz- und Quenching-Effekte von der Metabolitenkonzentration (Substratumsatz) der entsprechenden CYP-Enzyme (A: abhängig; U: unabhängig; ↓ = Quenching; ↑ = Eigenfluoreszenz; -: kein relevanter Effekt).

Metabolit <sup>a</sup> (CYP)	Passionsblumenkraut 125 µg/ml	Heidelbeeren 500 µg/ml	Bittersüßstengel 500 µg/ml	Basilikumkraut 500 µg/ml	Korianderfrüchte 500 µg/ml
HFC (2B6)	A (↓)	U (↓)	A (↑)	A (↑)	-
HFC (2C9)	A (↓)	U (↓)	A (↑)	A (↑)	-
HFC (3A4)	U (↓)	U (↓)	-	A (↓)	-
CHC (2C19)	A (↓)	U (↓)	-	U (↓)	-
CHC (1A2)	A (↓)	U (↓)	-	U (↓)	-
AHMC (2D6)	A (↓)	U (↓)	A (↑)	A (↑)	-
Fluorescein (2C8)	-	A (↓)	-	U (↓)	-
Resorufin (1A2/3A4)	A (↓)	A (↓)	-	-	-

<sup>a</sup>AHMC 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin; CHC: 3-Cyano-7-hydroxycumarin; HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin.

Die Quenching-Effekte bei den Cumarin-Derivaten HFC, CHC und AHMC sowie bei Fluorescein waren je nach Pflanzenextrakt, Metabolit und Metabolitenkonzentration sowohl abhängig als auch unabhängig von der Konzentration der Metaboliten (Tab. 32). Die Fluoreszenzintensität von Resorufin wurde durch den Passionsblumenkraut- und Heidelbeeren-Extrakt lediglich abhängig von der Konzentration des Metaboliten gequench (Tab. 32). Der Korianderfrüchte-Extrakt zeigte bei allen Metaboliten keine relevanten Effekte.

Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, dass Eigenfluoreszenz- und Quenching-Effekte die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten stark beeinflussen. Das Auftreten und das Ausmaß der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte sind von folgenden Parametern abhängig:

- Inhibitor (z. B. Pflanzenextrakt),
- Inhibitorkonzentration,
- Metabolit bzw. Anregungs- und Emissionswellenlänge,
- Metabolitenkonzentration (Substratumsatz des CYP-Enzyms und Inhibition).

Allgemein gilt, je höher die Metabolitenkonzentration und somit deren gemessene Fluoreszenzintensität, desto geringer sind die Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte und folglich der Einfluss auf das Ergebnis der inhibitorischen Aktivität.

## **5.6 Diskussion über Kompensation der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte bei Berechnung der $IC_{50}$ -Werte**

In diesem Kapitel soll an Hand der durchgeführten Untersuchungen ausführlich dargestellt werden, ob und inwieweit Kontrollinkubationen zur Kompensation von Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten bei der Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten geeignet sind. Während der Inhibitor (Extrakt), die zu testende Inhibitorkonzentration, der Metabolit sowie dessen Anregungs- und Emissionswellenlänge eine feste Größe darstellen, wird die Metabolitenkonzentration letztendlich durch die inhibitorische Aktivität des Inhibitors bestimmt. Durch Hemmung der CYP-Enzyme nimmt die Metabolitenkonzentration zwar ab, aber die genaue Metabolitenkonzentration kann bei Vorliegen von Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten nicht bestimmt werden, da eine Abtrennung der Metaboliten von der Pflanzenmatrix in der Mikrotiterplatte nicht möglich ist.

Eine Kompensation der Eigenfluoreszenz-Effekte für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität wäre möglich, wenn die Zunahme der Fluoreszenzintensität in Anwesenheit der Pflanzenextrakte der Eigenfluoreszenz der Pflanzenextrakte (ohne Metabolite) entspricht. In Tab. 33 wird jedoch ersichtlich, dass die gemessene Eigenfluoreszenz der Extrakte höher war als die Zunahme der Fluoreszenzintensität

der Metaboliten in Anwesenheit der Extrakte. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich die Metaboliten und Pflanzenextrakte gegenseitig in ihrer Fluoreszenz durch Quenching-Effekte beeinflussen, so dass die Eigenfluoreszenz höher ausfiel als die Zunahme der Fluoreszenzintensität in Anwesenheit der Pflanzenextrakte (Tab. 33). Dieses Phänomen ist jedoch nicht auf Pflanzenextrakte beschränkt. Während das Kavapyron Yangonin (175 µM) eine Eigenfluoreszenz von 424 % bezogen auf die Signalintensität von AHMC (0,3 µM; CYP2D6) zeigte, ergab sich eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität von AHMC in Anwesenheit von Yangonin lediglich um 173 %.<sup>131</sup> Auch hier ist wahrscheinlich, dass Yangonin und AHMC sich gegenseitig in ihrer Fluoreszenz durch Quenching-Effekte beeinflussen.

**Tab. 33** Vergleich der Zunahmen der Fluoreszenzintensitäten der Metaboliten (MF) in Anwesenheit von Pflanzenextrakten mit den Eigenfluoreszenzen dieser Pflanzenextrakte (EF; ohne Metabolit). Die Extraktkonzentrationen betragen 1000 µg/ml und die Metabolitenkonzentrationen entsprachen 100 % Substratumsatz.

	HFC <sup>a</sup> CYP2B6		HFC <sup>a</sup> CYP2C9		AHMC <sup>b</sup> CYP2D6	
	MF	EF	MF	EF	MF	EF
<b>Baldrianwurzel</b>	85 %	93 %	-3 %	14 %	12 %	16 %
<b>Basilikumkraut</b>	96 %	137 %	-20 %	25 %	-20 %	20 %
<b>Bittersüßstengel</b>	258 %	330 %	43 %	70 %	75 %	115 %
<b>Melissenblätter</b>	-25 %	52 %	-52 %	12 %	-54 %	16 %

<sup>a</sup>HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>b</sup>AHMC 3-[2-(N,N-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin.

Bei der Bestimmung der inhibitorischen Aktivität (Inkubation der Substrate in Anwesenheit der Pflanzenextrakte) ist somit der Anteil der Eigenfluoreszenz der Pflanzenextrakte an der gemessenen Fluoreszenzintensität nicht zu ermitteln, so dass die genaue Metabolitenkonzentration nicht bestimmt und die „echte“ enzymatische Hemmung nicht berechnet werden kann. Eine Kompensation der Eigenfluoreszenz-Effekte ist somit generell nicht möglich.

Für die Kompensation von Quenching-Effekten durch Kontrollinkubationen ergab sich eine ähnliche Problematik. Die Untersuchungen der Quenching-Effekte haben ergeben, dass das Ausmaß dieser Effekte bei konstanten Inhibitorkonzentrationen

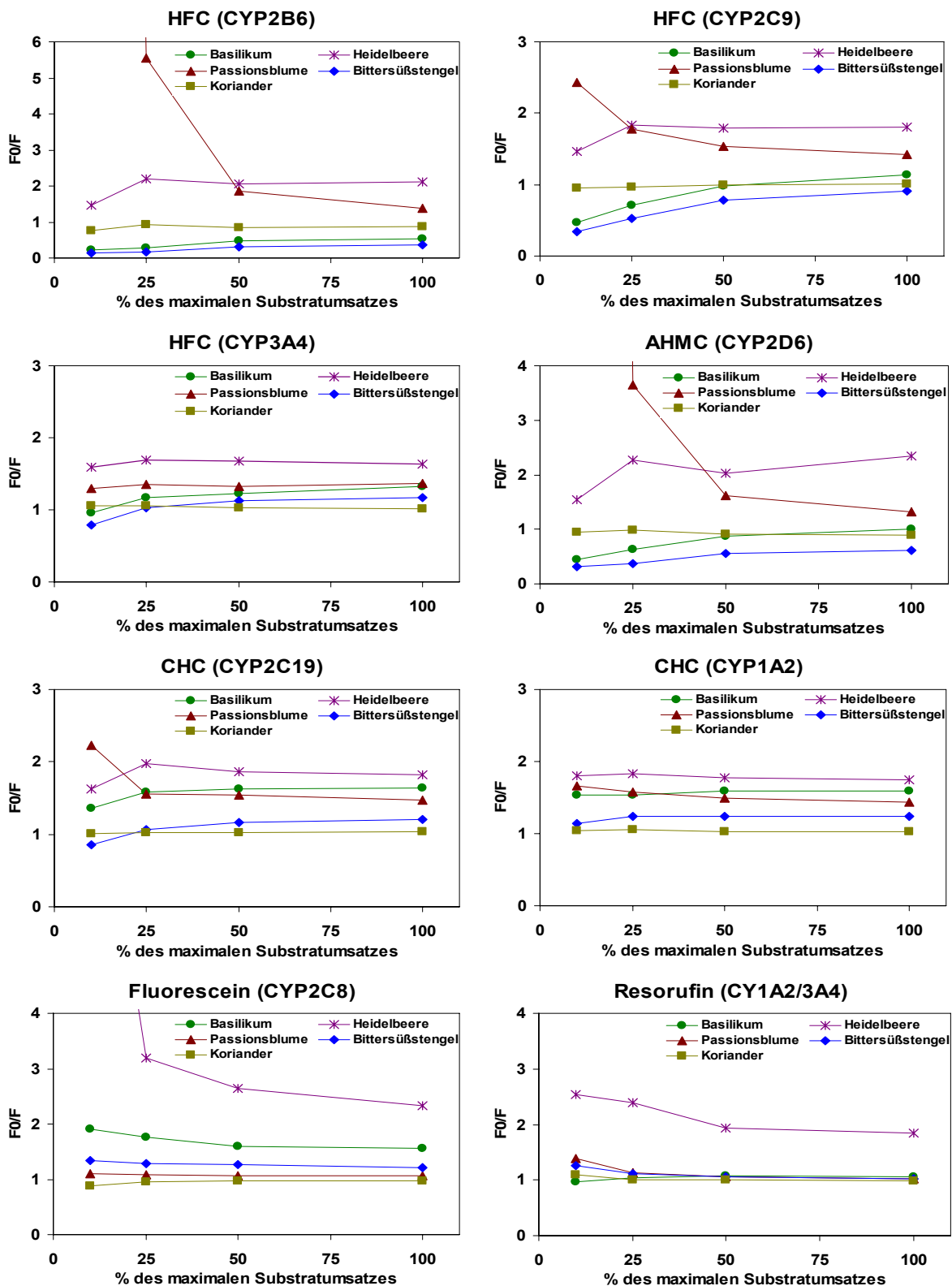
und Anregungs- und Emissionswellenlängen überwiegend abhängig ist von den Metabolitenkonzentrationen (siehe Tab. 32). Da durch die Inhibition der Pflanzenextrakte die Umsetzung der Substrate zu den Metaboliten gehemmt wird, entsteht eine geringere Metabolitenkonzentration als bei den Kontrollinkubationen mit 100 %iger Enzymaktivität, die für die Untersuchung der Quenching-Effekte und Eigenfluoreszenz der Pflanzenextrakte eingesetzt wurden.<sup>81,132,197,199</sup> Somit können die Quenching-Effekte für die Berechnung der „echten“ inhibitorischen Aktivität nicht berücksichtigt werden, da wie auch bei den Eigenfluoreszenz-Effekten die genaue Metabolitenkonzentration nicht bekannt ist. Folglich kann die Fluoreszenzintensität der Metaboliten durch Kompensation der Quenching-Effekte mit Hilfe von Kontrollinkubationen nicht bestimmt werden.

Mit Hilfe der in Abb. 54 gezeigten Diagramme wird diese Problematik noch einmal veranschaulicht. Hierfür sind die Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten der Metabolitenkonzentrationen ( $F_0$ ) und der Fluoreszenzintensitäten der Metabolitenkonzentrationen in Anwesenheit der getesteten Pflanzenextrakte ( $F$ ) gegen unterschiedliche Metaboliten bzw. Metabolitenkonzentrationen graphisch aufgetragen (siehe *Stern-Volmer*-Gleichung, Gl. 10). D. h. Pflanzenextrakte mit  $F_0/F > 1$  zeigen Quenching-Effekte, mit  $F_0/F < 1$  Eigenfluoreszenz und mit  $F_0/F = 1$  keinen Effekt. Die Metabolitenkonzentrationen sind ausgedrückt als „% des maximalen Substratumsatzes“.

Für den Korianderfrüchte-Extrakt ergibt sich für alle Metabolite und Metabolitenkonzentrationen der CYP-Enzyme ein konstantes Verhältnis von  $F_0/F$  mit einem Wert von ca. 1 (Abb. 54). Dies bestätigt, dass Korianderfrüchte keine Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte aufweisen. Ebenso zeigen alle getesteten Pflanzenextrakte (einzige Ausnahme: Heidelbeere) keine Effekte ( $F_0/F = 0$ ) für CYP1A2 und CYP3A4 (Resorufin) bei einem Substratumsatz von 25-100 % (Abb. 54). Bei einem Substratumsatz von 10 % ist jedoch ein Anstieg von  $F_0/F$  erkennbar, d. h. die Extrakte zeigen hier bei kleinen Substratumsätzen Quenching-Effekte. Bei Passionsblumenkraut- und Basilikumkraut-Extrakt ist das Verhältnis  $F_0/F$  für CYP2B6, CYP2C9 und CYP2D6 kleiner 1, da diese Extrakte die Fluoreszenzintensität des Metaboliten durch Eigenfluoreszenz beeinflussen. Zeigen die getesteten Pflanzenextrakte Quenching-Effekte ( $F_0/F > 1$ ), veränderte sich das

Verhältnis  $F_0/F$  bei fast allen Extrakten mit abnehmenden Substratumsätzen (Metabolitenkonzentrationen). Beispielsweise erhöht sich das Verhältnis  $F_0/F$  für Passionsblumenkraut-Extrakt bei CYP2D6; das Verhältnis  $F_0/F$  für den Heidelbeeren-Extrakt bei CYP2D6 wird kleiner. Somit ergibt sich für Pflanzenextrakte, bei denen das Verhältnis  $F_0/F$  bei unterschiedlichen Substratumsätzen (10-100 %) nicht konstant bleibt, das Problem, dass das Ausmaß der Quenching-Effekte auf die Metabolitenfluoreszenz und folglich die Metabolitenkonzentration selbst nicht bestimmt werden kann. Die Quantifizierung der Metabolitenkonzentration ist jedoch die Voraussetzung für die Berechnung der inhibitorischen Aktivität.

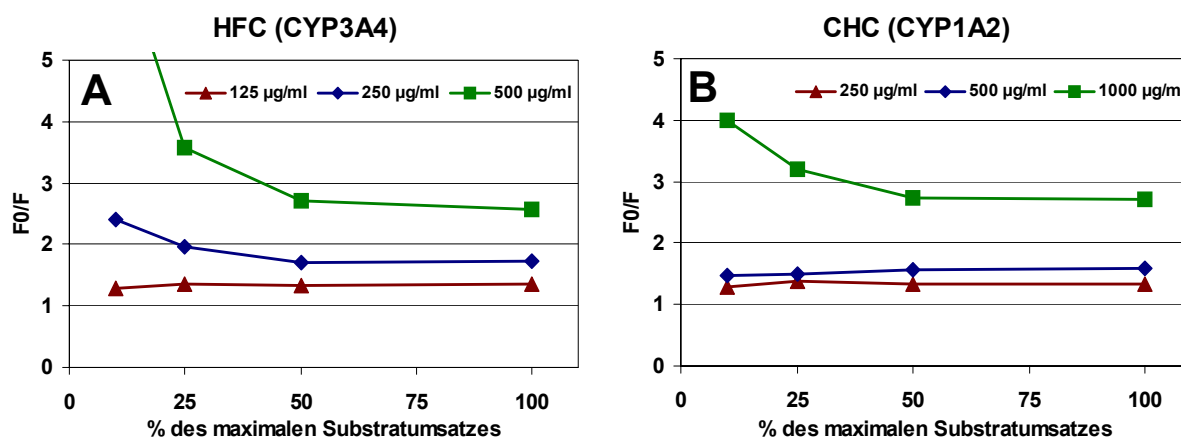
Anders sieht es bei Pflanzenextrakten aus, die ein Quenching unabhängig von der Metabolitenkonzentration zeigen. Hier ist eine Korrektur der inhibitorischen Aktivität durch Kompensation der Quenching-Effekte möglich, da bei gegebener Extraktkonzentration das Ausmaß der Quenching-Effekte bei unterschiedlichen Substratumsätzen konstant bleibt. Dieses Phänomen war jedoch nur bei sehr wenigen Pflanzenextrakten und nur bei bestimmten CYP-Enzymen (Metabolitenkonzentrationen) erkennbar (siehe Tab. 32). Beispielsweise zeigten Heidelbeeren bei CYP3A4 und CYP1A2, Passionsblumenkraut bei CYP3A4 und Basilikumkraut bei CYP1A2 und den entsprechenden Metabolitenkonzentrationen (10-100 % des maximalen Substratumsatzes) relativ konstante Quenching-Effekte (Abb. 54). Zur Kompensation der Quenching-Effekte bei der Bestimmung der inhibitorischen Aktivität würden sich die durchgeführten Kontrollinkubationen bei unterschiedlichen Substratumsätzen (10, 25, 50, 100 %) sehr gut eignen.



**Abb. 54** Graphische Darstellung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten der Metabolitenkonzentrationen ( $F_0$ ) zu den Fluoreszenzintensitäten der Metabolitenkonzentrationen in Anwesenheit der getesteten Pflanzenextrakte ( $F$ ) gegen die Metabolitenkonzentrationen, ausgedrückt als „% des maximalen Substratumsatzes“. Basilikumkraut, Heidelbeeren, Bittersüßstengel, Korianderfrüchte (jeweils 500  $\mu\text{g/ml}$ ), Passionsblumenkraut (125  $\mu\text{g/ml}$ ).

Für einen korrigierten  $IC_{50}$ -Wert muss jedoch das Ausmaß der Quenching-Effekte sowie deren Unabhängigkeit von den Metabolitenkonzentrationen für alle zu testenden Pflanzenextraktkonzentrationen bestimmt werden. Diese Untersuchungen erfordern eine hohe Probenanzahl und sind zeitlich sehr aufwendig. Das größte Problem ist jedoch, dass die Korrektur der inhibitorischen Aktivität nur bei sehr wenigen Pflanzenextrakten und nur bei einzelnen CYP-Enzymen durchgeführt werden kann.

Für Passionsblumenkraut bei CYP3A4 und Basilikumkraut bei CYP1A2 wurden bei verschiedenen Extraktkonzentrationen (125, 250, 500 und 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) die Fluoreszenzintensitäten der Metabolitenkonzentrationen ( $F_0$ ) und die Fluoreszenzintensitäten der Metabolitenkonzentrationen in Anwesenheit der Extrakte ( $F$ ) bestimmt. In Abb. 55 sind die Verhältnisse von  $F_0/F$  bei verschiedenen Extraktkonzentrationen gegen die Metabolitenkonzentrationen graphisch aufgetragen. Während bei geringen Konzentrationen von Passionsblumenkraut- (125  $\mu\text{g/ml}$ ) und Basilikumkraut-Extrakt (250  $\mu\text{g/ml}$ , 500  $\mu\text{g/ml}$ ) die Quenching-Effekte konstant blieben und relativ gering waren, wurde bei höheren Extraktkonzentrationen jedoch eine relativ starke Zunahme der Quenching-Effekte abhängig von den Metabolitenkonzentrationen ersichtlich (Abb. 55). Somit ist zwar bei geringen Extraktkonzentrationen eine Kompensation der Quenching-Effekte möglich, jedoch bei hohen Extraktkonzentrationen aufgrund der Abhängigkeit der Quenching-Effekte von den Metabolitenkonzentrationen eine Korrektur nicht durchführbar.



**Abb. 55** Graphische Darstellung der Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten der Metabolitenkonzentrationen ( $F_0$ ) zu den Fluoreszenzintensitäten der Metabolitenkonzentrationen in Anwesenheit der Extrakte ( $F$ ) aus Passionsblumenkraut (A) und Basilikumkraut (B) gegen die Metabolitenkonzentrationen bei CYP3A4 und CYP1A2. Die Metabolitenkonzentrationen sind ausgedrückt als „% des maximalen Substratumsatzes“.

Allgemein gilt somit, dass die inhibitorische Aktivität nur korrigiert werden kann, wenn die Unabhängigkeit der Quenching-Effekte von unterschiedlichen Metabolitenkonzentrationen (Substratumsätzen) für alle zu testenden Inhibitor-konzentrationen bestimmt wurde. Bei Abhängigkeit der Quenching-Effekte von unterschiedlichen Metabolitenkonzentrationen sowie bei Eigenfluoreszenz-Effekten der Pflanzenextrakte ist generell keine Korrektur der inhibitorischen Aktivität möglich.

Widersprüchlich zu den in dieser Arbeit dargelegten Daten, wurde von Strandell et al. (2004)<sup>81</sup> die inhibitorische Aktivität verschiedener Pflanzenextrakte bestimmt und die Extrakte mit nur einer Metabolitenkonzentration (maximale Substratumsetzung; 100 %ige Enzymaktivität) auf Quenching und Eigenfluoreszenz nach der Methode von Zou et al (2002)<sup>131</sup> getestet. Für die Berechnung der inhibitorischen Aktivität der untersuchten Pflanzenextrakte wurden laut Publikation von Strandell et al. Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte berücksichtigt; welche Pflanzenextrakte Quenching-Effekte und/oder Eigenfluoreszenz zeigten und wie die „korrigierte“ inhibitorische Aktivität berechnet wurde, ist jedoch nicht erwähnt.<sup>81</sup> Da für die Kompensation der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte zur Berechnung der inhibitorischen Aktivität, wie bereits dargelegt, mehrere Kontrollinkubationen mit unterschiedlichen Metaboliten- und Extraktkonzentrationen notwendig sind und die



Abhängigkeit der Effekte von den Metaboliten- und Extraktkonzentrationen genau untersucht werden muss, sind die inhibitorischen Aktivitäten der in der Publikation von Strandell et al. untersuchten Pflanzenextrakte nur schwer zu interpretieren.

Letztendlich ist eine Bestimmung von  $IC_{50}$ -Werten mit Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenzmethoden bei Pflanzenextrakten nur sinnvoll, falls Quenching und Eigenfluoreszenz-Effekte für alle zu testenden Extraktkonzentrationen bei allen möglichen Metabolitenkonzentrationen (ca. 5-100 % Substratumsatz) ausgeschlossen werden können. Da dies bei Pflanzenextrakten sehr selten der Fall ist und zudem die Untersuchungen sehr zeitaufwendig sind, ist die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität mit einer Methode zu bevorzugen, die eine Abtrennung der Pflanzenmatrix (Inhaltsstoffe) und eine selektive Detektion der Metaboliten ermöglicht. Diese Eigenschaften erfüllen die bereits unter II.1.3 vorgestellten LC/MS-basierten Methoden, die speziell zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten entwickelt und validiert wurden, und in dieser Arbeit als Referenzmethoden für die Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays dienen. Eine Alternative für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten mit Fluoreszenzsubstraten ist eine chromatographische Trennung und anschließende fluorimetrische oder eventuell massenspektrometrische Detektion der Metabolite. Außer für das CYP1A2-Substrat Ethoxyresorufin<sup>140,168</sup> sind zurzeit keine HPLC-basierten CYP-Assays mit massenspektrometrischer oder fluorimetrischer Detektion unter Verwendung von Fluoreszenzsubstraten veröffentlicht. Vor allem LC/Fluoreszenz-basierte Methoden stellen eine kostengünstige Alternative dar, um valide Ergebnisse für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten zu erhalten. Im nächsten Kapitel dieser Arbeit werden solche alternativen HPLC-basierten Methoden unter Verwendung von Fluoreszenzsubstraten vorgestellt.

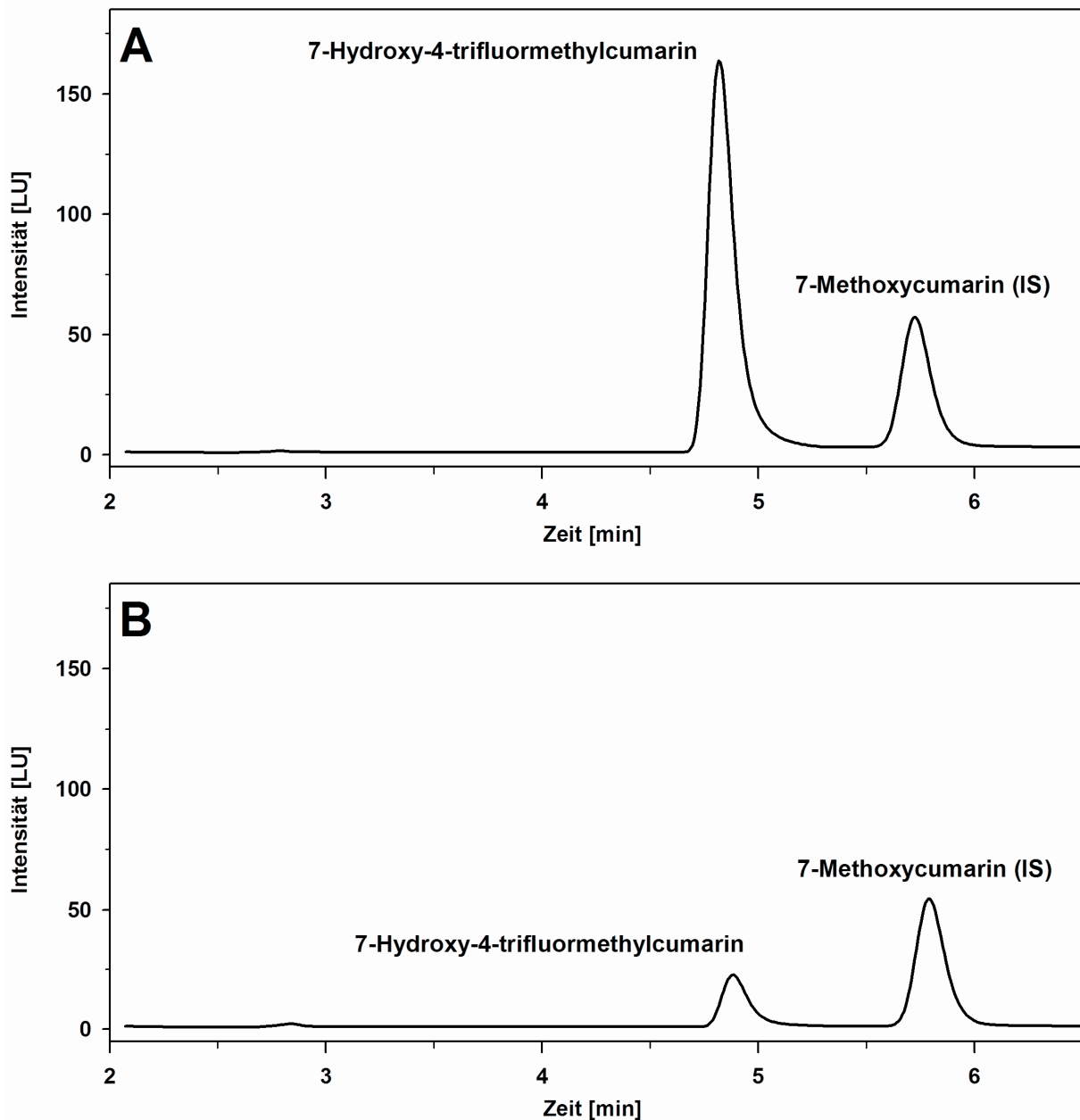
## 6 Alternative HPLC-Methoden für die Bestimmung der Inhibition von CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 durch Pflanzenextrakte

Da bei Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenzmethoden Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte von Pflanzenextrakten die Signalintensität der Metabolitenfluoreszenz stark beeinflussen und somit zu hohe bzw. zu niedrige inhibitorische Aktivitäten vorgetäuscht werden, wurden in dieser Arbeit LC/Fluoreszenz- und LC/MS-basierte Methoden für die Bestimmung der Inhibition von CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 durch Pflanzenextrakte unter Verwendung von Fluoreszenzsubstraten entwickelt. Als Fluoreszenzsubstrate wurden 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin (EFC, CYP2B6), 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin (MFC, CYP2C9) und 7-Benzoyloxy-4-trifluormethylcumarin (BFC, CYP3A4) verwendet, aus denen das Produkt 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC) enzymatisch gebildet wird. Für die LC/Fluoreszenz- und LC/MS-Methode wurde eine Online-Festphasenextraktion durchgeführt, so dass ein Großteil der Pflanzenmatrix bereits vor der analytischen Trennung abgetrennt und eine hohe Selektivität sowohl für die massenspektrometrische als auch fluorimetrische Quantifizierung der Metaboliten erreicht wurde (siehe Online-Festphasenextraktion, II.1.2). Da HFC aufgrund seiner Trifluorsubstitution insgesamt eine relativ lipophile Struktur und somit eine relativ starke Retention an RP-Material aufweist, eignet sich HFC hervorragend für eine Online-Festphasenextraktion mit anschließender RP-Chromatographie, um eine vollständige Abtrennung der Pflanzenmatrix zu erreichen und Interferenzen zu vermeiden (II.1.2). Im Gegensatz dazu sind jedoch die Fluoreszenzmetabolite 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin (AHMC; CYP2D6), 3-Cyano-7-hydroxycumarin (CHC; CYP1A2/CYP2C19), Fluorescein (CYP2C8/CYP3A4) und Resorufin (CYP1A2/CYP3A4) aufgrund ihrer relativ polaren Struktur und schlechtem chromatographischem Verhalten auf RP-Material für eine HPLC-basierte Quantifizierung zur Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte nicht geeignet.

Für die Quantifizierung von HFC bestand die wässrige mobile Phase der analytischen Trennung aus 0,05 % Essigsäure und 10 mM Ammoniumacetat (pH-Wert ca. 5), so dass eine hohe chromatographische Trenneffizienz von HFC erreicht wurde, da HFC ( $pK_s$ -Wert 7,3<sup>185</sup>) bei diesem pH-Wert des Fließmittels vollständig

ungeladen vorliegt. Für die Steigerung der Selektivität und vor allem der Empfindlichkeit der LC/Fluoreszenz-Methode wurde nach der analytischen Säule über ein T-Stück 25 mM Ammoniumacetat (pH 9,75) zugemischt (post-column Zugabe). Hierdurch resultierte nach der Säule ein pH-Wert des Fließmittels von ca. 8,5, so dass HFC über 90 % deprotoniert vorliegt und eine bathochrome Verschiebung der Anregungs- und Emissionswellenlänge zeigt.

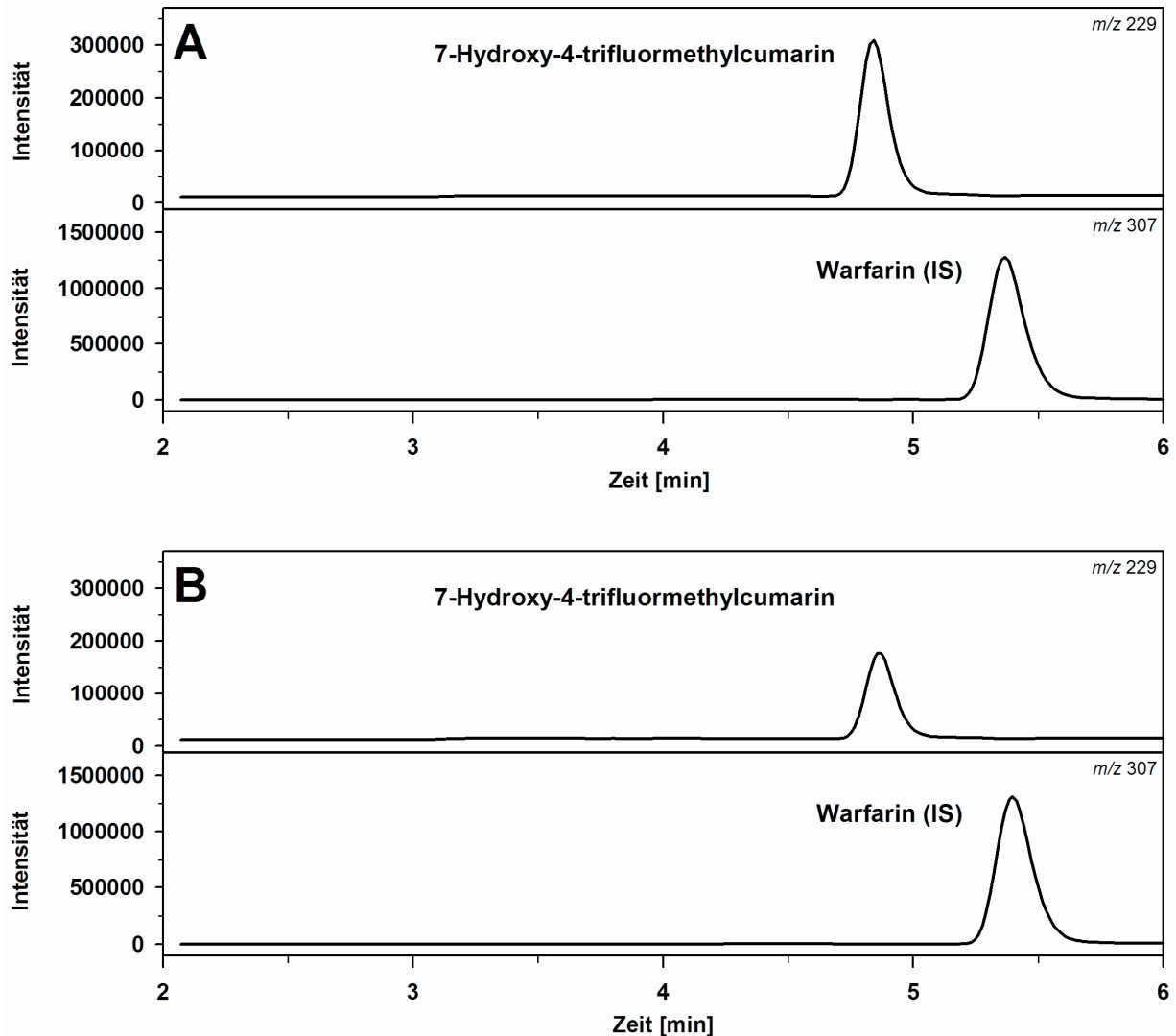
In Abb. 56 sind HPLC/Fluoreszenz-Chromatogramme von HFC und 7-Methoxycumarin (IS, interner Standard) nach Inkubation von MFC mit CYP2C9 und NADPH in An- und Abwesenheit von Salbeiblätter-Extrakt (200 µg/ml) dargestellt. Es wird ersichtlich, dass im Vergleich zur Kontrolle (A) bei der Inkubation in Anwesenheit von Salbeiblätter-Extrakt (B) weniger Metabolit (HFC) gebildet wurde. D. h. die CYP2C9-katalysierte Umsetzung des Substrats (MFC) wurde durch Salbeiblätter-Extrakt (200 µg/ml) gehemmt (ca. 15 % Restaktivität).



**Abb. 56** HPLC/Fluoreszenz-Chromatogramme von 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin und 7-Methoxycumarin (IS) nach Inkubation von CYP3A4, 7-Methoxycumarin und NADPH ohne (A) und in Anwesenheit von 200 µg/ml Salveiblätter-Extrakt (B) bei einer Anregungs-/Emissionswellenlänge von 409/530 nm.

Abb. 57 zeigt die extrahierten Ionen-Chromatogramme von HFC und dem internen Standard (IS) Warfarin nach LC/ESI-MS-Analytik von CYP2B6-Inkubationsproben mit EFC als Substrat. Auch hier wird ersichtlich, dass im Vergleich zur Kontrolle (A) in Anwesenheit von Passionsblumenkraut-Extrakt (B) die enzymatische Substrat-

umsetzung um ca. 50 % gehemmt wurde. Details zu den Methoden (Säule, Fließmittel, Interner Standard etc.) sind unter V.2.3 angegeben.



**Abb. 57** Extrahierte Ionen-Chromatogramme der *m/z*-Werte von 7-Hydroxy-4-trifluoromethylcumarin (229) und des internen Standards Warfarin (307) nach LC/ESI-MS-Analytik mit Online-Festphasenextraktion einer Inkubationsprobe von CYP2B6, 7-Ethoxy-4-trifluoromethylcumarin und NADPH ohne (A) und in Anwesenheit von 250 µg/ml Passionsblumenkraut-Extrakt (B). Die Analyten wurden als  $[M-H]^-$ -Ionen im negativen SIM-Modus detektiert.

Für beide Methoden wird im Folgenden gezeigt, dass die Ergebnisse der LC/Fluoreszenz- bzw. LC/MS-Methode nicht durch die Pflanzenmatrix beeinflusst wurden und somit eine selektive Bestimmung des Metaboliten HFC möglich ist. Zudem wurden  $IC_{50}$ -Werte von Standardinhibitoren und Pflanzenextrakten bestimmt.

### 6.1 IC<sub>50</sub>-Werte von Standardinhibitoren

Für die Untersuchung und Bewertung der Anwendbarkeit der LC/Fluoreszenz- und der LC/MS-Methode wurden IC<sub>50</sub>-Werte von Standardinhibitoren bestimmt (Tab. 34). Als Standardinhibitoren wurden Tranylcypromin (CYP2B6), Sulfaphenazol (CYP2C9) und Ketoconazol (CYP3A4) verwendet. Die resultierenden IC<sub>50</sub>-Werte stimmten im Vergleich zu den Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Methoden sehr gut überein (Tab. 34), so dass die neu entwickelten Methoden zur *In-vitro*-Bestimmung der Inhibition von CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 geeignet sind.

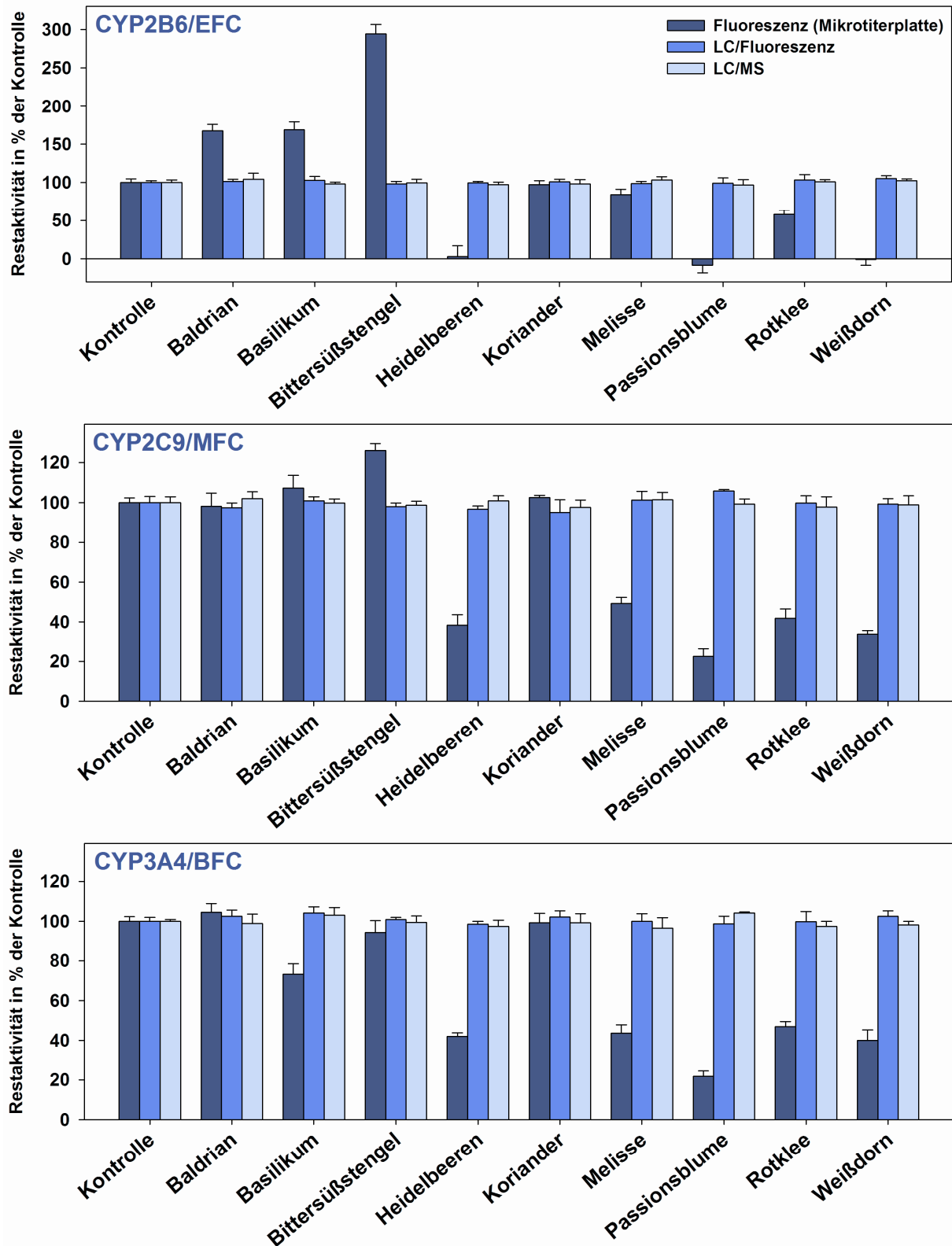
**Tab. 34** Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von Standardinhibitoren für CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 unter Verwendung der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-, LC/Fluoreszenz- und der LC/MS-Methode.

Inhibitor	CYP (Substrat)	IC <sub>50</sub> -Wert [µM]		
		Fluoreszenz (Mikrotiterplatte)	LC/Fluoreszenz	LC/MS
Tranylcypromin	2B6 (EFC <sup>a</sup> )	5,14 ± 0,31	4,88 ± 0,34	4,94 ± 0,20
Sulfaphenazol	2C9 (MFC <sup>b</sup> )	2,20 ± 0,07	2,14 ± 0,11	2,07 ± 0,18
Ketoconazol	3A4 (BFC <sup>c</sup> )	0,052 ± 0,005	0,039 ± 0,004	0,042 ± 0,005

<sup>a</sup>7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>b</sup>7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>c</sup>7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin.

### 6.2 Selektivität der LC/Fluoreszenz- und LC/MS-Methoden

Für die Untersuchung der selektiven Bestimmung des Metaboliten HFC in Anwesenheit einer Pflanzenmatrix wurde EFC mit CYP2B6, MFC mit CYP2C9 und BFC mit CYP3A4 in Anwesenheit von NADPH inkubiert (Kontrollinkubationen; 100 %ige Enzymaktivität). Nach Abstoppen der Kontrontrollinkubationen wurde jeweils 1000 µg/ml Pflanzenextrakt hinzugefügt und der Metabolit HFC unter Verwendung der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-, LC/Fluoreszenz- und der LC/MS-Methode quantifiziert (Abb. 58).



**Abb. 58** Bestimmung der Aktivität von Kontrollinkubationen (100 %ige Enzymaktivität) in Anwesenheit verschiedener Pflanzenextrakte (1000 µg/ml) mit der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-, LC/Fluoreszenz- und der LC/MS-Methode. Die Kontrollinkubationen wurden mit CYP2B6/7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin (EFC), CYP2C9/7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin (MFC) und CYP3A4/7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin (BFC) in Anwesenheit von NADPH inkubiert.

Durch Eigenfluoreszenz- und Quenching-Effekte einiger Pflanzenextrakte wurden die Ergebnisse der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenzmethode sehr stark beeinflusst. Während Baldrian, Basilikum und Bittersüßstengel bei CYP2B6 die Restaktivität durch Eigenfluoreszenz deutlich erhöhten, erniedrigten Heidelbeeren, Melissenblätter, Passionsblumenkraut, Rotkleeblüten und Weißdornblätter durch Quenching-Effekte sehr stark die Restaktivitäten von CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 (Abb. 58). Sowohl die LC/Fluoreszenz- als auch die LC/MS-Methode zeigten dagegen keine Beeinflussung der Ergebnisse durch Interferenzen der Pflanzenmatrix. Die resultierenden Restaktivitäten in Anwesenheit der Pflanzenextrakte unterschieden sich nicht signifikant von der Restaktivität der Kontrolle (100 %), bei der kein Pflanzenextrakt anwesend war (Abb. 58).

### 6.3 IC<sub>50</sub>-Werte von Pflanzenextrakten

Für den Passionsblumenkraut-Extrakt, der starke Quenching-Effekte zeigte, wurden die IC<sub>50</sub>-Werte für CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 mittels LC/Fluoreszenz und LC/MS bestimmt und mit den Werten der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenzmethode verglichen (Tab. 35). Der Vergleich zeigte, dass die IC<sub>50</sub>-Werte der LC/Fluoreszenz- und der LC/MS-Methode für alle CYP-Enzyme übereinstimmten, wobei die IC<sub>50</sub>-Werte der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenzmethode aufgrund der Quenching-Effekte deutlich niedriger lagen. Ebenso wurde ersichtlich, dass je stärker die Quenching-Effekte ausgeprägt waren (CYP2B6>CYP2C9>CYP3A4; siehe Tab. 23), desto stärker wichen die IC<sub>50</sub>-Werte der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz- und der LC/Fluoreszenz- bzw. LC/MS-Methode ab (Tab. 35). Aufgrund von Quenching-Effekten wurden somit falsch positive IC<sub>50</sub>-Werte erhalten. Zum Beispiel betrug die Abweichung für CYP2B6 mehr als Faktor 2.



**Tab. 35** Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von Passionsblumenkraut-Extrakt für CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 unter Verwendung der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-, LC/Fluoreszenz- und der LC/MS-Methode. Die erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte beziehen sich auf die Drogeneinwaage (1 g/10 ml Methanol 80 % V/V).

CYP	Substrat	IC <sub>50</sub> -Wert Passionsblumenkraut-Extrakt [µg/ml]		
		Fluoreszenz (Mikrotiterplatte)	LC/Fluoreszenz	LC/MS
2B6	EFC <sup>a</sup>	118,4 ± 20,7	275,9 ± 14,3	288,5 ± 11,4
2C9	MFC <sup>b</sup>	74,4 ± 4,2	117,2 ± 5,1	111,4 ± 4,8
3A4	BFC <sup>c</sup>	117,3 ± 12,1	178,7 ± 14,5	169,4 ± 17,3

<sup>a</sup>7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>b</sup>7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>c</sup>7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin.

Des Weiteren wurden für den Passionsblumenkraut-Extrakt die IC<sub>50</sub>-Werte für CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 mittels LC/MS unter Verwendung der Substrate Bupropion, Tolbutamid und Midazolam bestimmt (Tab. 36). Die IC<sub>50</sub>-Werte für CYP2B6 und CYP2C9 stimmten sehr gut mit den Werten der LC/Fluoreszenz- und der LC/MS-Methode (Tab. 35) überein. Eine sehr große Abweichung (Faktor 4) ergab sich für den IC<sub>50</sub>-Wert von CYP3A4 unter Verwendung von Midazolam und BFC als CYP3A4-Substrat (Tab. 35, Tab. 36), was auf die unter II.2.4.4 beschriebene Kooperativität zurückgeführt werden kann. Aus diesem Grund schreibt die FDA für die *In-vitro*-Bestimmung der Inhibition von CYP3A4 bei neuen Arzneistoffen die Verwendung von mindestens zwei strukturell unterschiedlichen Substraten vor.<sup>150</sup>

**Tab. 36** Mit Hilfe von LC/MS bestimmte IC<sub>50</sub>-Werte von Passionsblumenkraut-Extrakt für CYP2B6 (Substrat: Bupropion), CYP2C9 (Substrat: Tolbutamid) und CYP3A4 (Substrat: Midazolam). Die erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte beziehen sich auf die Drogeneinwaage (1 g/10 ml Methanol 80 % V/V).

CYP	Substrat	IC <sub>50</sub> -Wert Passionsblumenkraut-Extrakt [µg/ml]
2B6	Bupropion	232,0 ± 9,4
2C9	Tolbutamid	142,0 ± 2,3
3A4	Midazolam	770,4 ± 115,5

In einem weiteren Experiment wurden die  $IC_{50}$ -Werte von Birkenblätter-, Ginkgoblätter- und Salbeiblätter-Extrakt für CYP3A4 (Substrat: BFC) unter Verwendung der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-, LC/Fluoreszenz- und der LC/MS-Methode bestimmt (Tab. 37). Während die  $IC_{50}$ -Werte der LC/Fluoreszenz- und der LC/MS-Methode hervorragend übereinstimmten, waren die  $IC_{50}$ -Werte der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Methode geringer. Auch hier wurde ersichtlich, dass je stärker die Quenching-Effekte ausgeprägt waren (Birkenblätter>Salbeiblätter>Ginkgoblätter; siehe Tab. 26), desto stärker wichen die  $IC_{50}$ -Werte der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz- und der LC/Fluoreszenz- bzw. LC/MS-Methode ab. Im Vergleich zur LC/Fluoreszenz- bzw. LC/MS-Methode wich der  $IC_{50}$ -Wert der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Methode für Birkenblätter-Extrakt aufgrund von Quenching-Effekten ca. um den Faktor 3,5 ab.

**Tab. 37** Vergleich der  $IC_{50}$ -Werte von Birkenblätter-, Ginkgoblätter- und Salbeiblätter-Extrakt für CYP3A4 (BFC) unter Verwendung der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-, LC/Fluoreszenz- und der LC/MS-Methode. Die erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte beziehen sich auf die Drogeneinwaage (1 g/10 ml Methanol 80 % V/V).

CYP3A4/BFC <sup>a</sup>	$IC_{50}$ -Wert [ $\mu$ g/ml]		
	Fluoreszenz (Mikrotiterplatte)	LC/Fluoreszenz	LC/MS
<b>Birkenblätter</b>	31,0 $\pm$ 2,0	114,7 $\pm$ 3,9	112,4 $\pm$ 2,5
<b>Ginkgoblätter</b>	18,3 $\pm$ 2,7	23,8 $\pm$ 3,6	24,7 $\pm$ 1,9
<b>Salbeiblätter</b>	10,0 $\pm$ 0,7	14,8 $\pm$ 2,0	16,8 $\pm$ 3,4

<sup>a</sup>7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin.

## 6.4 Fazit

Am Beispiel von CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 konnte gezeigt werden, dass bei einer Trennung von Pflanzenmatrix und Metaboliten die erhaltenen Ergebnisse nicht durch Matrixeffekte beeinflusst wurden. Somit sind die neu entwickelten chromatographischen Methoden (LC/MS, LC/Fluoreszenz) der Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Methode vorzuziehen, da falsch positive und falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden können.

Zusätzlich kann in Zukunft die HPLC/Fluoreszenz-Methode als einfache, preiswerte und valide Referenzmethode bei Pharmaunternehmen, Auftragslaboratorien oder Universitäten etabliert werden, um für Pflanzenextrakte aber auch einzelne Wirkstoffe einheitliche, nachvollziehbare und reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten.



### III ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren haben aufgrund von Einzelfallberichten und einer Vielzahl von Publikationen pharmakokinetische Wechselwirkungen (Interaktionen) zwischen pflanzlichen und synthetischen Arzneimitteln an Aufmerksamkeit gewonnen und die Unbedenklichkeit pflanzlicher Arzneimittel in Frage gestellt. Das Bundesministerium für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) und andere europäische Zulassungsbehörden haben daraufhin diskutiert, ob und inwieweit Phytopharmaka zukünftig auf pharmakokinetische Interaktionen hin untersucht werden sollen. Anders als bei synthetischen Arzneimitteln waren bislang zur Zulassung von Phytopharmaka diesbezüglich keine Untersuchungen vorgeschrieben.

Pharmakokinetische Wechselwirkungen sind hauptsächlich auf die Inhibition oder Induktion von fremdstoffmetabolisierenden Cytochrom-P450-Enzymen (CYP-Enzymen) in Leber und Dünndarm zurückzuführen, da diese Enzyme am Metabolismus von mehr als 90 % der auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe beteiligt sind. Die mehrtägige Einnahme von Johanniskrautextrakten (*Hypericum perforatum*) bewirkt z. B. eine Induktion von CYP-Enzymen, was aufgrund des beschleunigten Arzneistoffmetabolismus zu klinisch relevanten Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von Arzneistoffen führen kann. Für klinisch relevante Arzneimittelinteraktionen ist jedoch zumeist eine Inhibition von CYP-Enzymen verantwortlich. Die Hemmung von CYP-Enzymen kann eine Verlängerung und Steigerung der Wirkung von Pharmaka bewirken, was vor allem bei Arzneistoffen mit einer geringen therapeutischen Breite zu lebensbedrohlichen Nebenwirkungen führen kann. In der Vergangenheit wurden einige Arzneistoffe, wie Terfenadin, Cisaprid und Mibefradil, aufgrund von schwerwiegenden Arzneimittelinteraktionen vom Markt genommen.

Um Arzneimittelwechselwirkungen von Arzneistoffen sowie neuen Arzneistoffkandidaten zu vermeiden, werden zur Abschätzung des Interaktionsrisikos so genannte *In-vitro*-Interaktionsstudien durchgeführt. Hierfür werden vor allem Mikrotiterplatten-basierte Fluoreszenz- und LC/MS-Methoden verwendet. Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Anwendbarkeit und Validität dieser *In-vitro*-Methoden bezüglich der Inhibition von CYP-Enzymen durch Arzneipflanzenextrakte. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten belegen, dass die verwendeten Fluoreszenz-

Assays für Pflanzenextrakte keine validen Ergebnisse liefern und für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten nur in wenigen Fällen geeignet sind. Bei einigen untersuchten Pflanzenextrakten wurden sehr starke inhibitorische Aktivitäten gefunden, da durch Quenching des Fluoreszenzsignals falsch positive Ergebnisse vorgetäuscht wurden. Ebenso war die Inhibition bei einigen Pflanzenextrakten aufgrund einer starken Eigenfluoreszenz sehr schwach oder konnte überhaupt nicht bestimmt werden. Des Weiteren wurden als Referenzmethoden für die Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen LC/MS-basierte Methoden mit Online-Festphasenextraktion verwendet, die speziell für Pflanzenextrakte entwickelt und validiert wurden. Die Ergebnisse der LC/MS-basierten CYP-Assays wurden durch die Pflanzenmatrix nicht beeinflusst, so dass diese Assays hervorragend als Referenzmethoden für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten geeignet sind.

Bei sehr hohen Extraktkonzentrationen (250-1000 µg/ml, bezogen auf die Drogeneinwaage) zeigten einige Pflanzenextrakte sehr starke Abweichungen der mittels LC/MS und Fluorimetrie in Mikrotiterplatten erhaltenen inhibitorischen Aktivität. Die Verwendung von niedrigen Extraktkonzentrationen im Bereich von 25-200 µg/ml führte zu einer besseren Übereinstimmung der erhaltenen Ergebnisse. D. h. vor allem bei hohen Extraktkonzentrationen sind starke Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte zu erwarten. Dennoch sind auch bei niedrigen Extraktkonzentrationen diese Effekte nicht auszuschließen. In den meisten Veröffentlichungen wurden sehr hohe Testkonzentrationen für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten verwendet, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit aufgrund von Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten falsch positive bzw. negative Ergebnisse erhalten wurden.

Untersuchungen zum Quenching haben gezeigt, dass die meisten Extrakte in den üblicherweise verwendeten Konzentrationen (ca. 10-1000 µg/ml) die Fluoreszenzintensität der Metabolite sehr stark reduzierten. Die Quenching-Effekte der Pflanzenextrakte beeinflussten das Fluoreszenzsignal aller enzymatisch gebildeten Metabolite (Cumarin-Derivate, Resorufin, Fluorescein), wobei die Quenching-Effekte bei Resorufin und Fluorescein in ihrer Stärke und Häufigkeit geringer ausfielen. Bei CYP2B6, CYP2C9 und CYP2D6 wurden in Verbindung mit Fluoreszenzsubstraten,

die eine Cumarinstruktur aufweisen, sehr oft falsch negative oder gar keine Ergebnisse erhalten, weil die Eigenfluoreszenz der Extrakte, wie z. B. Bittersüßstengel und Basilikumkraut, die Metabolitenfluoreszenz überlagerte. Quenching-Effekte traten bei den untersuchten Pflanzenextrakten weitaus häufiger auf als eine Eigenfluoreszenz. Das Verhältnis betrug ungefähr 5-10:1.

Aufgrund dieser Tatsachen können die Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Methoden nur eingesetzt werden, wenn vorher gezeigt wurde, dass die Pflanzenextrakte bei allen Testkonzentrationen sowie bei verschiedenen Metabolitenkonzentrationen weder Quenching- noch Eigenfluoreszenz-Effekte zeigen. Ebenso wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die bisher in Veröffentlichungen durchgeführten Kontrollinkubationen nur bedingt zur Kompensation von Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten geeignet sind. Das Auftreten und Ausmaß der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte sind abhängig vom Inhibitor (Pflanzenextrakt), der Inhibitorkonzentration, dem Metaboliten und dessen Anregungs- und Emissionswellenlänge sowie der Metabolitenkonzentration, die durch die enzymatische Umsetzung des Substrats und der inhibitorischen Aktivität des Inhibitors bestimmt wird. Während der Inhibitor, die zu testenden Inhibitorkonzentrationen, der Metabolit sowie dessen Anregungs- und Emissionswellenlänge eine feste Größe darstellen, ist die Metabolitenkonzentration je nach inhibitorischer Aktivität des Inhibitors sehr unterschiedlich. D. h. letztendlich hängt das genaue Ausmaß der Eigenfluoreszenz- und Quenching-Effekte von der inhibitorischen Aktivität der Pflanzenextrakte ab. Es konnte gezeigt werden, dass je geringer die Metabolitenkonzentration ist, desto stärker wird das Fluoreszenzsignal reduziert (Quenching) bzw. erhöht (Eigenfluoreszenz). Eine sinnvolle Kontrollinkubation zur Kompensation von Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten kann also gar nicht durchgeführt werden. Bei *In-vitro*-Untersuchungen zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität ist die Metabolitenkonzentration nicht bekannt und somit der Einfluss der Effekte nicht bestimmbar.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine LC/MS- und LC/Fluoreszenz-Methode für die Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte unter Verwendung von Fluoreszenzsubstraten entwickelt. Es zeigte sich, dass die Pflanzenmatrix nach chromatographischer Trennung und anschließender

massenspektrometrischer bzw. fluorimetrischer Detektion der Metabolite keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat. Am Beispiel von CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 wurde dargelegt, dass bei einer Trennung von Pflanzenmatrix und dem Metaboliten 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC) vor der Detektion eine wesentlich bessere Übereinstimmung der inhibitorischen Aktivität erhalten wurde, so dass bei Verwendung von chromatographischen Methoden falsch positive und falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden können.

Im Gegensatz zu HFC sind die Fluoreszenzmetabolite 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin (AHMC, CYP2D6), 3-Cyano-7-hydroxycumarin (CHC, CYP1A2/CYP2C19), Fluorescein (CYP2C8/CYP3A4) und Resorufin (CYP1A2/CYP3A4) aufgrund ihrer polaren Struktur und schlechten chromatographischen Eigenschaften für eine HPLC-basierte Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte nicht geeignet.

Die neu entwickelte HPLC/Fluoreszenz-Methode ist als einfache, preiswerte und valide Referenzmethode zur Bestimmung der Inhibition von CYP-Enzymen durch Pflanzenextrakte anzusehen. Bei Pharmaunternehmen und Auftragslaboratorien sowie Universitäten kann diese als Referenzmethode etabliert werden, um für Pflanzenextrakte valide, nachvollziehbare und reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten. Darüber hinaus ermöglichen die Ergebnisse dieser Arbeit eine bessere Bewertung der in Veröffentlichungen und Zulassungsunterlagen gemachten Angaben über die inhibitorische Aktivität von Pflanzenextrakten und pflanzlichen Arzneimitteln bezüglich der am Arzneistoffmetabolismus beteiligten CYP-Enzyme und eine bessere Abschätzung des Interaktionspotentials dieser Zubereitungen.



## IV SUMMARY

In recent years pharmacokinetic interactions between herbal remedies and synthetic drugs attracted attention and the safety of herbal remedies was called into question because of individual case reports and several publications. The Federal Institute for Drugs and Medical Devices (BfArM) and other European regulatory authorities consequently discussed whether and how far herbal remedies should be investigated with regard to pharmacokinetic interactions. In contrast to synthetic drugs, no studies concerning drug interactions were required for the approval of herbal remedies so far.

Pharmacokinetic drug-drug interactions can be traced back mainly to the inhibition and induction of drug metabolising cytochrome P450 enzymes (CYP enzymes) in the liver and small intestine, because these enzymes are involved in the metabolism of more than 90 % of all marketed drugs. For example, the intake of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) extracts for several days causes an induction of CYP enzymes, which can lead to clinically relevant drug interactions due to an increased metabolism. However, the inhibition of CYP enzymes is mostly responsible for clinically relevant drug interactions. The inhibition of CYP enzymes leads to a prolonged and increased drug effect, which results in life-threatening side effects for drugs with a narrow therapeutic window. In the past, several drugs e.g. terfenadine, cisapride and mibefradil were withdrawn from the market due to severe drug interactions.

To avoid interactions with drugs or new drug candidates, *in vitro* interaction studies are performed for the assessment of their drug interaction potential. For this purpose, microtiterplate-based fluorimetric and LC/MS-based methods are used. The goal of this work was to investigate the applicability and validity of the microtiterplate-based fluorescence methods with respect to the inhibition of CYP enzymes by plant extracts. The results show that the microtiterplate-based fluorimetric assays do not provide reliable results for plant extracts and that these assays are only suitable for the determination of the inhibitory activities of plant extracts in some cases. Several of the tested plant extracts showed very strong inhibitory activities. But, due to quenching effects, the extracts additionally reduced the fluorescence signals of the

metabolites thereby pretending false positive results. Also, the inhibition of CYP enzymes by some plant extracts was very weak or even not determinable due to intrinsic fluorescence. Additionally, LC/MS-based methods with online solid phase extraction were developed and validated as reference methods for the determination of the inhibition of CYP enzymes. Since the results of the LC/MS-based assays were not affected by the matrix of the plant extracts, these assays are suitable reference methods for the determination of the inhibitory activities of plant extracts.

At high extract concentrations (250-1000 µg/ml, corresponding to the weighted plant material) some plant extracts showed strong deviations of the inhibitory activities using LC/MS- and microtiterplate-based fluorimetric assays. The use of low extract concentrations in the range of 25-200 µg/ml provided a good correlation of the obtained inhibitory activities. That means, especially high extract concentrations are responsible for strong quenching effects and intrinsic fluorescence thereby pretending false positive or negative results. Nevertheless, also at low extract concentrations these effects were observed. Interestingly, in most publications very high concentrations of plant extracts were used for the determination of the inhibitory activities, so that reduced or increased IC<sub>50</sub> values were obtained due to quenching and intrinsic fluorescence.

Analyses of the quenching effects showed that most extracts strongly reduced the fluorescence intensity of the metabolites at frequently used concentrations (ca. 10-1000 µg/ml). The quenching effects of the plant extracts decreased the fluorescence signal of all enzymatically produced metabolites (coumarin derivatives, resorufin and fluorescein), whereas the quenching effects for resorufin and fluorescein were much less potent and frequent. By using coumarin derivatives as substrates for CYP2B6, CYP2C9 und CYP2D6 often false negative or no results were obtained, because the intrinsic fluorescence of the extracts e. g. bittersweet nightshade and basil interfered with the metabolite fluorescence. Finally, quenching effects occurred more often than intrinsic fluorescence. The ratio was approximately 5-10:1.

Due to these facts, microtiterplate based fluorimetric methods are only useable if the plant extracts show neither quenching nor intrinsic fluorescence for all inhibitor concentrations at various metabolite concentrations. Also, analyses of this work

showed that control incubations performed in recently published studies are only of limited use for the compensation of quenching effects and intrinsic fluorescence. The occurrence and the extent of quenching effects and intrinsic fluorescence depend on the inhibitor (plant extract), the inhibitor concentration, the metabolite and its excitation and emission wavelength as well as the metabolite concentration, which is determined by the inhibitory activity of the inhibitor. Whereas the inhibitor, the inhibitor concentration, the metabolite as well as its excitation and emission wavelength are constant parameters, the metabolite concentration depends on the inhibitory activity of the inhibitor. That means, the extent of quenching and intrinsic fluorescence depends mainly on the inhibitory activity of the plant extracts. Studies in this work showed that the lower the metabolite concentration the more the fluorescence signal is decreased (quenching) or increased (intrinsic fluorescence). Thus, control incubations to compensate quenching effects and intrinsic fluorescence are not valid, because the metabolite concentration is unknown and thus the influence of the effects is not determinable.

In this work, also a LC/MS- and LC/fluorescence method were developed for the determination of the inhibition of CYP enzymes by plant extracts using fluorescence substrates. In this case, the plant matrix had no effect on the quantitation of the metabolites after chromatographic separation and mass spectrometric or fluorimetric detection of the metabolites. For CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 it was shown that the separation of the plant matrix and the metabolite 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin (HFC) provides  $IC_{50}$  values, which were in good agreement with the values of the reference methods. Hence, false positive and negative results can be excluded with these newly developed chromatographic methods.

In contrast to HFC the fluorescent metabolites e.g. 3-[2-(*N,N*-diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcoumarin (AHMC, CYP2D6), 3-cyano-7-hydroxycoumarin (CHC, CYP1A2/CYP2C19), fluorescein (CYP2C8/CYP3A4) and resorufin (CYP1A2/CYP3A4) are not suitable for the HPLC based determination of the inhibition of CYP enzymes by plant extracts, because these metabolites show poor chromatographic properties due to their polar structures.

The newly developed HPLC/fluorescence method is an easy, reproducible and valid method for the determination of the inhibition of CYP enzymes by plant extracts. This method can be established as a reference method for pharmaceutical companies, contract laboratories or universities to obtain valid and reproducible results. Furthermore, the results of this work allow a better evaluation of reported inhibitory activities of plant extracts and herbal remedies in publications and approval documents with respect to human drug metabolising CYP enzymes and a better assessment of the interaction potentials of these preparations.

## V MATERIAL UND METHODEN

### 1 Material

#### 1.1 Technische Geräte

Technische Geräte	Bezeichnung/Firma
Fluorimeter	Cary-Eclipse Mikrotiterplatten-Reader, Varian (Darmstadt, Deutschland)
Blockthermostat	QBD4, Grant Instruments (Cambridgeshire, UK)
HPLC-System	1100-Serie, Agilent (Waldbronn, Deutschland): G1379A Vakuum-Entgaser, G1312A binäre Pumpe, G1311A quaternäre Pumpe, G1313A Autosampler, G1316A Säulenthermostat mit 6-Wege-Ventil (7240; Rheodyne; Cotati, CA, USA), G1321A Fluoreszenzdetektor und G1946D Single-Quadrupol-Massenspektrometer
pH-Meter	pH lab 827, Metrohm (Filderstadt, Deutschland)
Pipetten	Reference, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Standmixer	La Moulinette, Moulinex (Ecully Cedex, Frankreich)
Ultraschallbad	Sonorex, Bandelin (Berlin, Deutschland)
Vortex	Vortex-Genie 2, Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Waagen	ABJ Analysenwaage, Kern (Balingen, Deutschland) EW Präzisionswaage, Kern (Balingen, Deutschland)
Wasserbad	Fisherbrand, Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

#### 1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
96-Well-Mikrotiterplatten (weiß/schwarz, unbeschichtet)	Nunc (Langenselbold, Deutschland)
HPLC-Vials	YMC Europe GmbH (Dinslaken, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reaktionsgefäße mit Deckel aus Polypropylen (1,5 ml)	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)

### 1.3 Chemikalien

Chemikalien	Firma
NADPH-Tetranatriumsalz	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Acetonitril (HPLC gradient grade)	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Ameisensäure (purissimum p.A.), Ammoniumacetat (purissimum p.A.), Dikaliumhydrogenphosphat, Essigsäure (purissimum p.A.), Chlorpropamid, Ethoxyresorufin, 7-Ethoxy-4-trifluormethyl- cumarin, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 7-Methoxy- 4-trifluormethylcumarin, Trifluoressigsäure (purissimum p.A.)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Midazolam	Fährhaus Pharma (Hamburg, Deutschland)
3-Cyano-7-hydroxycumarin, 3-Cyano- 7-ethoxycumarin, 7-Hydroxy-4-trifluor- methylcumarin	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol (LiChrosolv®)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
7-Benzylloxy-4-trifluormethylcumarin, Dibenzylfluorescein, 3-[2-( <i>N,N</i> -Diethyl- <i>N</i> -methylammonium)ethyl]-7-methoxy- 4-methylcumarin-Iodid, 3-[2-( <i>N,N</i> -Diethyl- amino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin- Hydrochlorid	NatuTec (Frankfurt, Deutschland)
9-Aminoacridin, Benzylloxyresorufin, Bupropion-Hydrochlorid, Chinidinsulfat, Clotrimazol, Dextromethorphan-Hydro- bromid, Dimethylsulfoxid, Fluorescein- Natrium, Furafyllin, Imipramin-Hydrochlorid, Ketoconazol, Maprotilin-Hydrochlorid, 7-Methoxycumarin, Natriumhydroxid, Nitrazepam, Paclitaxel, Pluronic F68, Propranolol-Hydrochlorid, Quercetin, Reserpin, Resorufin-Natrium, Sulfaphenazol, Tacrin, Tranylcyprominsulfat, Tris-Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan), Tolbutamid, Warfarin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Das verwendete Wasser (HPLC, Puffer etc.) stammte aus der hauseigenen Demineralisierungsanlage (Umkehrosmose) und wurde mit einer Wasseraufbereitungsanlage (Milli-Q<sup>®</sup> reagent grade water system) von Millipore (Schwalbach, Deutschland) nochmals gereinigt.

#### 1.4 Pflanzliche Arzneidrogen

Die verwendeten pflanzlichen Arzneidrogen wurden von Caelo (Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland) und Klenk (Heinrich Klenk GmbH & Co. KG, Schwebheim, Deutschland) bezogen. Alle Chargen der verwendeten Arzneidrogen entsprachen laut Hersteller den Anforderungen des deutschen bzw. europäischen Arzneibuchs. Mit Hilfe von LC/MS-Fingerprintanalysen wurden die Arzneidrogen auf die wichtigsten Inhaltsstoffe überprüft.

<b>Droge</b>	<b>Droge (lat.) (Gattung, Familie)</b>	<b>Charge</b>
<b>Caelo</b>		
Basilikumkraut	Basilici herba (Ocimum basilicum, Lamiaceae)	23983203
Birkenblätter	Betulae folium (Betula pendula/pubescens, Betulaceae)	24315023
Bittersüßstengel	Dulcamarae stipes (Solanum dulcamara, Solanaceae)	30036233
Fenchelfrüchte	Foeniculi fructus (Foeniculum vulgare, Apiaceae)	30730084
Ginkgoblätter	Ginkgo bilobae folium (Ginkgo biloba, Ginkgoaceae)	40151084
Heidelbeeren (getrocknet)	Myrtilli fructus (Vaccinium myrtillus, Ericaceae)	30806503
Melissenblätter	Melissae folium (Melissa officinalis, Lamiaceae)	330449044
Orthosiphonblätter	Orthosiphonis folium (Orthosiphon aristatus, Lamiaceae)	23886193
Passionsblumenkraut	Passiflorae herba (Passiflora incarnata, Passifloraceae)	31077034
Salbeiblätter	Salviae folium (Salvia officinalis, Lamiaceae)	32057024
Schöllkraut	Chelidonii herba (Chelidonium majus, Papaveraceae)	24923183

Weißdornblätter mit Blüten	Crataegi folium cum flore (Crataegus laevigata/monogyna, Rosaceae)	32849024
<b>Klenk</b>		
Baldrianwurzel	Valerianae radix (Valeriana officinalis, Valerianaceae)	6641 B 05082502
Korianderfrüchte	Coriandri fructus (Coriandrum sativum, Apiaceae)	2790 A 05091501
Rotkleeblüten	Trifolii pratensis flos (Trifolium pratense, Fabaceae)	1640 A 05061502

### 1.5 Cytochrom-P450-Enzyme (CYP-Enzyme)

Die rekombinanten CYP-Enzyme aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen (Supersomes<sup>®</sup>) wurden von Gentest (Woburn, MA, USA) über NatuTec (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Die CYP-Enzyme waren mit NADPH-P450-Reduktase und zum Teil mit Cytochrome b<sub>5</sub> co-exprimiert (siehe Tabelle unten). Der Proteingehalt der verwendeten rekombinanten CYP-Enzyme variierte je nach CYP-Enzym und Charge ungefähr zwischen 5 und 12 mg/ml.

Enzym	CYP-Gehalt [pmol/ml]	Co-Expression	
		NADPH-P450-Reduktase	Cytochrom b <sub>5</sub>
CYP1A2	1000	✓	-
CYP2B6	1000	✓	✓
CYP2C8	1000	✓	✓
CYP2C9*1 (Arg <sub>144</sub> )	1000	✓	✓
CYP2C19	1000	✓	✓
CYP2D6*1 (Val <sub>374</sub> )	1000	✓	-
CYP3A4	1000	✓	✓

Die Mischung aus den rekombinanten CYP-Enzymen 1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen (Supermix<sup>®</sup>) wurde ebenfalls von Gentest (Woburn, MA, USA) über NatuTec (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Der Proteingehalt variierte je nach Charge zwischen 5,5 und 7,5 mg/ml. Der Cytochrom-P450-Gehalt entsprach insgesamt 2000 pmol/ml. Der NADPH-Reduktase-Gehalt ist bei diesem Produkt ca. 17-fach höher als bei humanen Lebermikrosomen.<sup>210</sup>



## 2 Methoden

Alle in dieser Arbeit berechneten Werte sind jeweils Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung) aus 3 Bestimmungen. Für einen statistischen Vergleich von Mittelwerten wurde der t-Test für unabhängige Stichproben mit Hilfe des Statistikprogramms SigmaPlot<sup>®</sup> (Version 10.0, Systat Software, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die berechnete Wahrscheinlichkeit  $P$  gibt an, inwieweit die Annahme, dass die Mittelwerte zweier Messreihen verschieden sind, falsch ist. Die Signifikanzgrenzen wurden auf 1 und 5 % gesetzt, so dass bei einer Wahrscheinlichkeit von  $0,01 < P < 0,05$  ein statistisch signifikanter und bei  $P < 0,01$  ein statistisch sehr signifikanter Unterschied der Mittelwerte vorliegt.

### 2.1 Herstellung der Pflanzenextrakte

Für die Herstellung der Pflanzenextrakte wurden die Arzneidrogen mit einem Standmixer fein gemahlen und jeweils 1 g der gemahlene Droge in 10 ml Methanol 80 % (V/V) im Ultraschallbad für 30 min bei 40 °C extrahiert. Die resultierende Extraktlösung (100 mg/ml) wurde bei 9000-g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und zu den entsprechenden Konzentrationen mit Methanol 80 % (V/V) verdünnt.

Für die Extrakte aus Baldrianwurzeln, Basilikumkraut, Bittersüßstengeln, Heidelbeeren, Korianderfrüchten, Melissenblättern, Passionsblumenkraut, Rotkleeblüten und Weißdornblättern mit Blüten wurden Assay-Konzentrationen zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität sowie Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekten von 1000, 500, 250 und 125  $\mu\text{g/ml}$  verwendet. Für die Extrakte aus Birkenblättern, Fenchelrüchten, Ginkgoblättern, Orthosiphonblättern, Salbeiblättern und Schöllkraut wurden Assay-Konzentrationen von 200, 100, 50 und 25  $\mu\text{g/ml}$  verwendet.

Für die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte von Birkenblättern, Ginkgoblättern, Passionsblumenkraut, Salbeiblättern und Thymiankraut wurden die unten angegebenen Assay-Konzentrationen verwendet.

<b>Pflanzenextrakt</b>	<b>Assay-Konzentrationen</b>
Birkenblätter	0,5/1,25/2,5/5/12,5/25/50/125/250 µg/ml
Ginkgoblätter	0,5/1,25/2,5/5/12,5/25/50/125/250 µg/ml
Passionsblumenkraut	1/2,5/5/10/25/50/100/250/500/1000 µg/ml
Salbeiblätter	0,5/1,25/2,5/5/12,5/25/50/125/250 µg/ml

Alle in der Arbeit angegebenen Extraktkonzentrationen beziehen sich auf die eingewogene Menge an Arzneidroge pro Extraktionsmittel.

## 2.2 Herstellung der Inkubationspuffer

Für die Herstellung des 100 mM Kaliumphosphatpuffers (pH 7,4) wurden 150 ml einer 100 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (16,61 g/L) mit ca. 700 ml einer 100 mM Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung (17,42 g/L) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Anschließend wurde im Puffer Magnesiumchlorid-Hexahydrat (609,9 mg/L bzw. 81.3 mg/L) gelöst, um einen 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) mit 3 mM bzw. 0,4 mM Magnesiumchlorid zu erhalten. Der Kaliumphosphatpuffer mit 0,4 mM Magnesiumchlorid wurde ausschließlich für den Mikrotiterplattenbasierten CYP2D6-Fluoreszenz-Assay verwendet.

## 2.3 HPLC-basierte *In-vitro*-Assays

### 2.3.1 Stammlösungen

#### Substrate

Die Stammlösungen der Substrate wurden mit DMSO hergestellt. Die Konzentrationen der Stammlösungen und die entsprechenden Assay-Konzentrationen sind unten angegeben.

Substrat	CYP-Enzym	Stammlösung	Assay-Konzentration
Tacrin	1A2	0,5 mM	5 $\mu$ M
Bupropion	2B6	5 mM	50 $\mu$ M
Paclitaxel	2C8	1 mM	10 $\mu$ M
Tolbutamid	2C9	10 mM	100 $\mu$ M
Imipramin	2C19	0,25 mM	2,5 $\mu$ M
Dextromethorphan	2D6	0,5 mM	5 $\mu$ M
Midazolam	3A4	0,5 mM	5 $\mu$ M
EFC <sup>a</sup>	2B6	0,25 mM	2,5 $\mu$ M
MFC <sup>b</sup>	2C9	7,5 mM	75 $\mu$ M
BFC <sup>c</sup>	3A4	5 mM	50 $\mu$ M

<sup>a</sup>EFC: 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>b</sup>MFC: 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>c</sup>BFC: 7-Benzoyloxy-4-trifluormethylcumarin.

Für die  $K_m$ -Wert Bestimmung von Bupropion bezüglich CYP2B6 wurden Bupropion-Assay-Konzentrationen von 2,5/5,0/10/25/50/75/100/150/250/500/750  $\mu$ M verwendet

#### Interne Standards

Die Stammlösungen der internen Standards 9-Aminoacridin, Propranolol, Reserpin, Chlorpropamid, Maprotilin, Codein, Nitrazepam, Warfarin und 7-Methoxycumarin wurden mit Methanol hergestellt. Die Konzentrationen der Stammlösungen und die entsprechenden Assay-Konzentrationen sind unten angegeben.

Interner Standard	<i>In-vitro</i> -Assay	Stammlösung	Assay-Konz.
<b>LC/MS-Methoden</b>			
9-Aminoacridin	CYP1A2/Tacrin	1 mg/ml	250 ng/ml
Propranolol	CYP2B6/Bupropion	1 mg/ml	450 ng/ml
Reserpin	CYP2C8/Paclitaxel	1 mg/ml	100 ng/ml
Chlorpropamid	CYP2C9/Tolbutamid	1 mg/ml	1000 ng/ml
Maprotilin	CYP2C19/Imipramin	1 mg/ml	250 ng/ml
Codein	CYP2D6/Dextromethorphan	1 mg/ml	500 ng/ml
Nitrazepam	CYP3A4/Midazolam	1 mg/ml	500 ng/ml
Warfarin	CYP2B6/EFC <sup>a</sup> CYP2C9/MFC <sup>b</sup> CYP3A4/BFC <sup>c</sup>	1 mg/ml	350 ng/ml
<b>LC/Fluoreszenz-Methoden</b>			
7-Methoxycumarin	CYP2B6/EFC <sup>a</sup> CYP2C9/MFC <sup>b</sup> CYP3A4/BFC <sup>c</sup>	1 mg/ml	3000 ng/ml

<sup>a</sup>EFC: 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>b</sup>MFC: 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>c</sup>BFC: 7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin.

### Standardinhibitoren

Die Stammlösungen der Standardinhibitoren wurden mit DMSO hergestellt und zu den entsprechenden Konzentrationen mit DMSO verdünnt. Die Konzentrationen der Stammlösungen und die Assay-Konzentrationen für die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte sind unten angegeben.

Inhibitor	CYP-Enzym	Stammlösung	Assay-Konzentrationen
Furafyllin	1A2	10 mM	100/25/5/2,5/1/0,5/0,25/0,05/0,01 µM
Tranlycypromin	2B6	25 mM	250/100/25/10/5/2,5/1/0,25/0,05 µM
Quercetin	2C8	10 mM	100/50/10/5/2,5/1/0,5/0,25/0,05 µM
Sulfaphenazol	2C9	2,5 mM	25/10/2,5/1/0,5/0,25/0,1/0,025/0,005 µM
Tranlycypromin	2C19	25 mM	250/100/50/25/10/5/2,5/1/0,25 µM
Chinidin	2D6	0,25 mM	2500/1000/250/100/50/25/10/5/1 nM
Ketoconazol	3A4	1 mM	10000/2500/500/100/50/25/10/5/1 nM

### 2.3.2 LC/MS-basierte *In-vitro*-Assays

Die LC/ESI-MS-Analytik mit Online-Festphasenextraktion wurde mit einem LC/MS-System der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland) durchgeführt, welches aus folgenden Komponenten bestand: HPLC 1 (Online-Festphasenextraktion): G1379A Vakuum-Entgaser, G1311A quaternäre Pumpe und G1313A Autosampler; HPLC 2 (LC/MS-Analytik): G1379A Vakuum-Entgaser, G1312A binäre Pumpe, G1316A Säulenthermostat und G1946D Single-Quadrupol-Massenspektrometer. Die zwei HPLC-Systeme sind über ein 6-Wege Ventil der Firma Rheodyne (7240; Cotati, CA, USA) miteinander verbunden. Die Steuerung und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Agilent ChemStation-Software (Revision A.10.01).

#### **CYP1A2-Assay (1-Hydroxylierung von Tacrin)**

Der Inhibitor, gelöst in Methanol 80 % (V/V) oder DMSO, wurde mit rekombinantem CYP1A2 (10 pmol/ml), Tacrin (5  $\mu$ M) und NADPH (1 mM) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7,4) bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l inkubiert und nach 30 min mit 150  $\mu$ l eiskaltem Methanol, der den internen Standard 9-Aminoacridin enthielt, abgestoppt. Nach Zentrifugation bei 10.000-g wurden jeweils etwa 400  $\mu$ l des klaren Überstands in ein HPLC-Vial überführt und mittels LC/ESI-MS mit Online-Festphasenextraktion analysiert.

50  $\mu$ l des Inkubationsansatzes wurde auf die Extraktionssäule (Zorbax Eclipse XDB-C18; 12,5 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) injiziert. Der Ladepuffer bestand aus 0,1 % Trifluoressigsäure/10 mM Ammoniumacetat in Wasser (A) und Methanol (B). Die Zusammensetzung des Ladepuffers war während der Extraktionsphase (0-2 min) 95 % A und 5 % B, wobei die Flussrate 3 ml/min betrug. Das Schaltventil wurde nach 2 min umgeschaltet, so dass die Analyten im Backflush-Modus von der Extraktionssäule auf die analytische Säule (Zorbax Bonus-RP; 50 x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m) gespült wurden. Die Zusammensetzung der mobilen Phase für die analytische Trennung war 10 mM Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B). Der Fließmittelgradient sowie die Flussrate der analytischen Trennung sind unten angegeben. Die Temperatur für die analytische Säule und Extraktionssäule betrug 30 °C.

Zeit [min]	Fließmittel (% B)	Flussrate [ml/min]
0,00	35	0,8
2,00	35	0,8
5,00	60	0,8
5,01	100	1,0
7,00	100	1,0

Das Massenspektrometer wurde 2 min nach der Probeninjektion aktiviert und der Metabolit 1-Hydroxytacrin ( $m/z$  215) sowie der interne Standard 9-Aminoacridin ( $m/z$  195) wurden als  $[M+H]^+$ -Ionen mittels Elektrospray-Ionisierung (ESI) im positiven SIM-Modus quantifiziert (Fragmentorspannung 150 mV). Als Verneblungs- und Trocknungsgas wurde Stickstoff verwendet (Druck 50 psi; Temperatur 300 °C, Flussrate 12 L/min). Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V.

#### **CYP2B6-Assay (4-Hydroxylierung von Bupropion)**

Der Inhibitor, gelöst in Methanol 80 % (V/V) oder DMSO, wurde mit rekombinantem CYP2B6 (6 pmol/ml), Bupropion (50  $\mu$ M) und NADPH (1 mM) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM  $MgCl_2$ ; pH 7,4) bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l inkubiert und nach 20 min mit 150  $\mu$ l eiskaltem Methanol, der den internen Standard Propranolol enthielt, abgestoppt. Nach Zentrifugation bei 10.000-g wurden jeweils etwa 400  $\mu$ l des klaren Überstands in ein HPLC-Vial überführt und mittels LC/ESI-MS mit Online-Festphasenextraktion analysiert.

50  $\mu$ l des Inkubationsansatzes wurde auf die Extraktionssäule (Zorbax Eclipse XDB-C18; 12,5 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) injiziert. Der Ladepuffer bestand aus 10 mM Ammoniumacetat in Wasser (A) und Methanol (B). Die Zusammensetzung des Ladepuffers war während der Extraktionsphase (0-2 min) 90 % A und 10 % B, wobei die Flussrate 3 ml/min betrug. Das Schaltventil wurde nach 2 min umgeschaltet, so dass die Analyten im Backflush-Modus von der Extraktionssäule auf die analytische Säule (Zorbax Bonus-RP; 100 x 3,0 mm; 3,5  $\mu$ m) gespült wurden. Die Zusammensetzung der mobilen Phase für die analytische Trennung war 10 mM Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B). Der Fließmittelgradient sowie die Flussrate der analytischen Trennung sind unten angegeben. Die Temperatur für die analytische Säule und Extraktionssäule betrug 30 °C.

Zeit [min]	Fließmittel (% B)	Flussrate [ml/min]
0,00	25	1,0
2,00	25	1,0
5,00	40	1,0
5,01	100	1,0
7,00	100	1,0

Das Massenspektrometer wurde 2 min nach der Probeninjektion aktiviert und der Metabolit 4-Hydroxybupropion ( $m/z$  256) sowie der interne Standard Propranolol ( $m/z$  260) wurden als  $[M+H]^+$ -Ionen mittels ESI im positiven SIM-Modus quantifiziert (Fragmentorspannung 100 mV). Als Verneblungs- und Trocknungsgas wurde Stickstoff verwendet (Druck 50 psi; Temperatur 300 °C, Flussrate 12 L/min). Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V.

#### **CYP2C8-Assay (6 $\alpha$ -Hydroxylierung von Paclitaxel)**

Der Inhibitor, gelöst in Methanol 80 % (V/V) oder DMSO, wurde mit rekombinantem CYP2C8 (12 pmol/ml), Paclitaxel (10  $\mu$ M) und NADPH (1 mM) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7,4) bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l inkubiert und nach 30 min mit 150  $\mu$ l eiskaltem Methanol, der den internen Standard Reserpin enthielt, abgestoppt. Nach Zentrifugation bei 10.000-g wurden jeweils etwa 400  $\mu$ l des klaren Überstands in ein HPLC-Vial überführt und mittels LC/ESI-MS mit Online-Festphasenextraktion analysiert.

50  $\mu$ l des Inkubationsansatzes wurde auf die Extraktionssäule (Zorbax Eclipse XDB-C18; 12,5 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) injiziert. Der Ladepuffer bestand aus 0,1 % Trifluoressigsäure/10 mM Ammoniumacetat in Wasser (A) und Methanol (B). Die Zusammensetzung des Ladepuffers war während der Extraktionsphase (0-2 min) 90 % A und 10 % B, wobei die Flussrate 3 ml/min betrug. Das Schaltventil wurde nach 2 min umgeschaltet, so dass die Analyten im Backflush-Modus von der Extraktionssäule auf die analytische Säule (Zorbax Bonus-RP; 50 x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m) gespült wurden. Die Zusammensetzung der mobilen Phase für die analytische Trennung war 10 mM Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B). Der Fließmittelgradient sowie die Flussrate der analytischen Trennung sind unten angegeben. Die Temperatur für die analytische Säule und Extraktionssäule betrug 30 °C.

Zeit [min]	Fließmittel (% B)	Flussrate [ml/min]
0,00	45	0,8
2,00	45	0,8
5,00	75	0,8
5,01	100	1,0
7,00	100	1,0

Das Massenspektrometer wurde 2 min nach der Probeninjektion aktiviert und der Metabolit 6 $\alpha$ -Hydroxypaclitaxel ( $m/z$  870) sowie der interne Standard Reserpin ( $m/z$  609) wurden als  $[M+H]^+$ -Ionen mittels ESI im positiven SIM-Modus quantifiziert (Fragmentorspannung 150 mV). Als Verneblungs- und Trocknungsgas wurde Stickstoff verwendet (Druck 50 psi; Temperatur 300 °C, Flussrate 12 L/min). Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V.

#### **CYP2C9-Assay (4-Hydroxylierung von Tolbutamid)**

Der Inhibitor, gelöst in Methanol 80 % (V/V) oder DMSO, wurde mit rekombinantem CYP2C9 (15 pmol/ml), Tolbutamid (100  $\mu$ M) und NADPH (1 mM) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7,4) bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l inkubiert und nach 45 min mit 150  $\mu$ l eiskaltem Methanol, der den internen Standard Chlorpropamid enthielt, abgestoppt. Nach Zentrifugation bei 10.000-g wurden jeweils etwa 400  $\mu$ l des klaren Überstands in ein HPLC-Vial überführt und mittels LC/ESI-MS mit Online-Festphasenextraktion analysiert.

50  $\mu$ l des Inkubationsansatzes wurde auf die Extraktionssäule (Zorbax Eclipse XDB-C18; 12,5 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) injiziert. Der Ladepuffer bestand aus 0,1 % Trifluoressigsäure/10 mM Ammoniumacetat in Wasser (A) und Methanol (B). Die Zusammensetzung des Ladepuffers war während der Extraktionsphase (0-2 min) 90 % A und 10 % B, wobei die Flussrate 3 ml/min betrug. Das Schaltventil wurde nach 2 min umgeschaltet, so dass die Analyten im Backflush-Modus von der Extraktionssäule auf die analytische Säule (Zorbax Bonus-RP; 50 x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m) gespült wurden. Die Zusammensetzung der mobilen Phase für die analytische Trennung war 10 mM Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B). Der Fließmittelgradient sowie die Flussrate der analytischen Trennung sind unten angegeben. Die Temperatur für die analytische Säule und Extraktionssäule betrug 30 °C.



Zeit [min]	Fließmittel (% B)	Flussrate [ml/min]
0,00	35	0,8
2,00	35	0,8
5,00	70	0,8
5,01	100	1,0
7,00	100	1,0

Das Massenspektrometer wurde 2 min nach der Probeninjektion aktiviert und der Metabolit 4-Hydroxytolbutamid ( $m/z$  287) sowie der interne Standard Chlorpropamid ( $m/z$  277) wurden als  $[M+H]^+$ -Ionen mittels ESI im positiven SIM-Modus quantifiziert (Fragmentorspannung 100 mV). Als Verneblungs- und Trocknungsgas wurde Stickstoff verwendet (Druck 50 psi; Temperatur 300 °C, Flussrate 12 L/min). Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V.

#### **CYP2C19-Assay (N-Demethylierung von Imipramin)**

Der Inhibitor, gelöst in Methanol 80 % (V/V) oder DMSO, wurde mit rekombinantem CYP2C19 (6 pmol/ml), Imipramin (2,5  $\mu$ M) und NADPH (1 mM) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM  $MgCl_2$ ; pH 7,4) bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l inkubiert und nach 30 min mit 150  $\mu$ l eiskaltem Methanol, der den internen Standard Maprotilin enthielt, abgestoppt. Nach Zentrifugation bei 10.000-g wurden jeweils etwa 400  $\mu$ l des klaren Überstands in ein HPLC-Vial überführt und mittels LC/ESI-MS mit Online-Festphasenextraktion analysiert.

50  $\mu$ l des Inkubationsansatzes wurde auf die Extraktionssäule (Zorbax Eclipse XDB-C18; 12,5 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) injiziert. Der Ladepuffer bestand aus 0,1 % Trifluoressigsäure/10 mM Ammoniumacetat in Wasser (A) und Methanol (B). Die Zusammensetzung des Ladepuffers war während der Extraktionsphase (0-2 min) 90 % A und 10 % B, wobei die Flussrate 3 ml/min betrug. Das Schaltventil wurde nach 2 min umgeschaltet, so dass die Analyten im Backflush-Modus von der Extraktionssäule auf die analytische Säule (Zorbax Bonus-RP; 50 x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m) gespült wurden. Die Zusammensetzung der mobilen Phase für die analytische Trennung war 10 mM Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B). Der Fließmittelgradient sowie die Flussrate der analytischen Trennung sind unten angegeben. Die Temperatur für die analytische Säule und Extraktionssäule betrug 30 °C.

Zeit [min]	Fließmittel (% B)	Flussrate [ml/min]
0,00	30	0,8
2,00	30	0,8
5,00	65	0,8
5,01	100	1,0
7,00	100	1,0

Das Massenspektrometer wurde 2 min nach der Probeninjektion aktiviert und der Metabolit Desipramin ( $m/z$  267) sowie der interne Standard Maprotilin ( $m/z$  278) werden als  $[M+H]^+$ -Ionen mittels ESI im positiven SIM-Modus quantifiziert (Fragmentorspannung 150 mV). Als Verneblungs- und Trocknungsgas wurde Stickstoff verwendet (Druck 50 psi; Temperatur 300 °C, Flussrate 12 L/min). Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V.

#### **CYP2D6-Assay (O-Demethylierung von Dextromethorphan)**

Der Inhibitor, gelöst in Methanol 80 % (V/V) oder DMSO, wurde mit rekombinantem CYP2D6 (7 pmol/ml), Dextromethorphan (5  $\mu$ M) und NADPH (1 mM) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM  $MgCl_2$ ; pH 7,4) bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l inkubiert und nach 30 min mit 150  $\mu$ l eiskaltem Methanol, der den internen Standard Codein enthielt, abgestoppt. Nach Zentrifugation bei 10.000-g wurden jeweils etwa 400  $\mu$ l des klaren Überstands in ein HPLC-Vial überführt und mittels LC/ESI-MS mit Online-Festphasenextraktion analysiert.

50  $\mu$ l des Inkubationsansatzes wurde auf die Extraktionssäule (Zorbax Eclipse XDB-C18; 12,5 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) injiziert. Der Ladepuffer bestand aus 0,1 % Trifluoressigsäure/10 mM Ammoniumacetat in Wasser (A) und Methanol (B). Die Zusammensetzung des Ladepuffers war während der Extraktionsphase (0-2 min) 95 % A und 5 % B, wobei die Flussrate 3 ml/min betrug. Das Schaltventil wurde nach 2 min umgeschaltet, so dass die Analyten im Backflush-Modus von der Extraktionssäule auf die analytische Säule (Zorbax Bonus-RP; 50 x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m) gespült wurden. Die Zusammensetzung der mobilen Phase für die analytische Trennung war 10 mM Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B). Der Fließmittelgradient sowie die Flussrate der analytischen Trennung sind unten angegeben. Die Temperatur für die analytische Säule und Extraktionssäule betrug 30 °C.

Zeit [min]	Fließmittel (% B)	Flussrate [ml/min]
0,00	10	0,8
2,00	10	0,8
5,00	50	0,8
5,01	100	1,0
7,00	100	1,0

Das Massenspektrometer wurde 2 min nach der Probeninjektion aktiviert und der Metabolit Dextrophan ( $m/z$  258) sowie der interne Standard Codein ( $m/z$  300) wurden als  $[M+H]^+$ -Ionen mittels ESI im positiven SIM-Modus quantifiziert (Fragmentorspannung 150 mV). Als Verneblungs- und Trocknungsgas wurde Stickstoff verwendet (Druck 50 psi; Temperatur 300 °C, Flussrate 12 L/min). Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V.

#### **CYP3A4-Assay (1'-Hydroxylierung von Midazolam)**

Der Inhibitor, gelöst in Methanol 80 % (V/V) oder DMSO, wurde mit rekombinantem CYP3A4 (5 pmol/ml), Midazolam (5  $\mu$ M) und NADPH (1 mM) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM  $MgCl_2$ ; pH 7,4) bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l inkubiert und nach 30 min mit 150  $\mu$ l eiskaltem Methanol, der den internen Standard Nitrazepam enthielt, abgestoppt. Nach Zentrifugation bei 10.000-g wurden jeweils etwa 400  $\mu$ l des klaren Überstands in ein HPLC-Vial überführt und mittels LC/ESI-MS mit Online-Festphasenextraktion analysiert.

50  $\mu$ l des Inkubationsansatzes wurde auf die Extraktionssäule (Zorbax Eclipse XDB-C18; 12,5 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) injiziert. Der Ladepuffer bestand aus 0,1 % Trifluoressigsäure/10 mM Ammoniumacetat in Wasser (A) und Methanol (B). Die Zusammensetzung des Ladepuffers war während der Extraktionsphase (0-2 min) 90 % A und 10 % B, wobei die Flussrate 3 ml/min betrug. Das Schaltventil wurde nach 2 min umgeschaltet, so dass die Analyten im Backflush-Modus von der Extraktionssäule auf die analytische Säule (Zorbax Bonus-RP; 50 x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m) gespült wurden. Die Zusammensetzung der mobilen Phase für die analytische Trennung war 10 mM Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B). Der Fließmittelgradient sowie die Flussrate der analytischen Trennung sind unten angegeben. Die Temperatur für die analytische Säule und Extraktionssäule betrug 30 °C.

Zeit [min]	Fließmittel (% B)	Flussrate [ml/min]
0,00	30	0,8
2,00	30	0,8
5,00	70	0,8
5,01	100	1,0
7,00	100	1,0

Das Massenspektrometer wurde 2 min nach der Probeninjektion aktiviert und der Metabolit 1'-Hydroxymidazolam ( $m/z$  342) sowie der interne Standard Nitrazepam ( $m/z$  282) wurden als  $[M+H]^+$ -Ionen mittels ESI im positiven SIM-Modus quantifiziert (Fragmentorspannung 150 mV). Als Verneblungs- und Trocknungsgas wurde Stickstoff verwendet (Druck 50 psi; Temperatur 300 °C, Flussrate 12 L/min). Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V.

### CYP-Cocktail-Assay

Der Inhibitor, gelöst in Methanol 80 % (V/V) oder DMSO, wurde mit einer Mischung aus den rekombinanten CYP-Enzymen 1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 (insgesamt 6 pmol/ml), einem Substrat-Cocktail und NADPH (1 mM) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM  $MgCl_2$ ; pH 7,4) bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l inkubiert. Als Substrate wurden für CYP1A2 Tacrin (5  $\mu$ M), für CYP2C8 Paclitaxel (10  $\mu$ M), für CYP2C9 Tolbutamid (100  $\mu$ M), für CYP2C19 Imipramin (2,5  $\mu$ M), für CYP2D6 Dextromethorphan (5  $\mu$ M) und für CYP3A4 Midazolam (5  $\mu$ M) verwendet. Die Reaktionen wurden nach 30 min mit 150  $\mu$ l eiskaltem Methanol, der den internen Standard Reserpin enthielt, abgestoppt. Nach Zentrifugation bei 10.000-g wurden jeweils etwa 400  $\mu$ l des klaren Überstands in ein HPLC-Vial überführt und mittels LC/ESI-MS mit Online-Festphasenextraktion analysiert.

50  $\mu$ l des Inkubationsansatzes wurde auf die Extraktionssäule (Zorbax Eclipse XDB-C18; 12,5 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m) injiziert. Der Ladepuffer bestand aus 0,1 % Trifluoressigsäure/10 mM Ammoniumacetat in Wasser (A) und Methanol (B). Die Zusammensetzung des Ladepuffers war während der Extraktionsphase (0-2 min) 90 % A und 10 % B, wobei die Flussrate 3 ml/min betrug. Das Schaltventil wurde nach 2 min umgeschaltet, so dass die Analyten im Backflush-Modus von der Extraktionssäule auf die analytische Säule (Zorbax Bonus-RP; 50 x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m)

gespült wurden. Die Zusammensetzung der mobilen Phase für die analytische Trennung war 10 mM Ammoniumacetat und 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und 0,1 % Ameisensäure in Acetonitril (B). Der Fließmittelgradient sowie die Flussrate der analytischen Trennung sind unten angegeben. Die Temperatur für die analytische Säule und Extraktionssäule betrug 30 °C.

Zeit [min]	Fließmittel (% B)	Flussrate [ml/min]
0,00	25	0,8
2,00	25	0,8
3,50	45	0,8
6,00	100	0,8
6,01	100	1,0
7,00	100	1,0

Das Massenspektrometer wurde 2 min nach der Probeninjektion aktiviert und die Metabolite sowie der interne Standard Reserpin wurden als  $[M+H]^+$ -Ionen mittels ESI im positiven SIM-Modus quantifiziert (Fragmentorspannung 150 mV). Die  $m/z$ -Werte für die Bestimmung der Metabolite sind unten angegeben. Als Verneblungs- und Trocknungsgas wurde Stickstoff verwendet (Druck 50 psi; Temperatur 300 °C, Flussrate 12 L/min). Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V.

Enzym	Substrat	Metabolit	$m/z$
CYP1A2	Tacrin	1-Hydroxytacrin	215
CYP2C8	Paclitaxel	6 $\alpha$ -Hydroxypaclitaxel	870
CYP2C9	Tolbutamid	4-Hydroxytolbutamid	287
CYP2C19	Imipramin	Desipramin	267
CYP2D6	Dextromethorphan	Dextrophan	258
CYP3A4	Midazolam	1'-Hydroxymidazolam	342
<i>Interner Standard</i>		Reserpin	609

### **CYP2B6/CYP2C9/CYP3A4-Assay (O-Dealkylierung von EFC/MFC/BFC)**

Der Inhibitor, gelöst in Methanol 80 % (V/V) oder DMSO, wurde mit rekombinantem CYP-Enzym, Substrat und NADPH (1 mM) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 7,4) bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l inkubiert.

Anschließend wurde die Reaktion mit 150 µl eiskaltem Methanol, der den internen Standard Warfarin enthielt, abgestoppt. Nach Zentrifugation bei 10.000-g wurden jeweils etwa 400 µl des klaren Überstands in ein HPLC-Vial überführt und mittels LC/ESI-MS mit Online-Festphasenextraktion analysiert. Die Enzym- und Substratkonzentrationen sowie die Inkubationszeiten sind unten angegeben.

<b><i>In-vitro</i>-Assay</b>	<b>Enzym</b>	<b>Substrat</b>	<b>Inkubationszeit</b>
CYP2B6/EFC <sup>a</sup>	6 pmol/ml	2,5 µM	30 min
CYP2C9/MFC <sup>b</sup>	8 pmol/ml	75 µM	45 min
CYP3A4/BFC <sup>c</sup>	5 pmol/ml	50 µM	30 min

<sup>a</sup>7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>b</sup>7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>c</sup>7-Benzoyloxy-4-trifluormethylcumarin.

50 µl des Inkubationsansatzes wurde auf die Extraktionssäule (Zorbax Eclipse XDB-C18; 12,5 x 4,6 mm; 5 µm) injiziert. Der Ladepuffer bestand aus 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und Methanol (B). Die Zusammensetzung des Ladepuffers war während der Extraktionsphase (0-2 min) 90 % A und 10 % B, wobei die Flussrate 3 ml/min betrug. Das Schaltventil wurde nach 2 min umgeschaltet, so dass die Analyten im Backflush-Modus von der Extraktionssäule auf die analytische Säule (Phenomenex Gemini C18; 100 x 4,6 mm; 5 µm) gespült wurden. Die Zusammensetzung der mobilen Phase für die analytische Trennung war 10 mM Ammoniumacetat und 0,05 % Essigsäure in Wasser (A) und Acetonitril (B). Der Fließmittelgradient sowie die Flussrate der analytischen Trennung sind unten angegeben. Die Temperatur für die analytische Säule und Extraktionssäule betrug 30 °C.

<b>Zeit [min]</b>	<b>Fließmittel (% B)</b>	<b>Flussrate [ml/min]</b>
0,00	50	1,0
2,00	50	1,0
6,00	55	1,0
6,01	100	1,0
8,00	100	1,0

Das Massenspektrometer wurde 2 min nach der Probeninjektion aktiviert und der Metabolit 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin ( $m/z$  229) sowie der interne Standard

Warfarin ( $m/z$  307) wurden als  $[M-H]^-$ -Ionen mittels ESI im negativen SIM-Modus quantifiziert (Fragmentorspannung 150 mV). Als Verneblungs- und Trocknungsgas wurde Stickstoff verwendet (Druck 50 psi; Temperatur 300 °C, Flussrate 12 L/min). Die Spannung der Kapillare betrug +3500 V.

### 2.3.3 LC/Fluoreszenz-basierte *In-vitro*-Assays

Die LC/Fluoreszenz-Analytik mit Online-Festphasenextraktion wurde mit einem HPLC-System der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland) durchgeführt, welches aus folgenden Komponenten bestand: HPLC 1 (Online-Festphasenextraktion): G1379A Vakuum-Entgaser, G1311A quaternäre Pumpe und G1313A Autosampler; HPLC 2 (LC/MS-Analytik): G1379A Vakuum-Entgaser, G1312A binäre Pumpe, G1316A Säulenthermostat und G1321A Fluoreszenzdetektor. Die zwei HPLC-Systeme waren über ein 6-Wege Ventil der Firma Rheodyne (7240; Cotati, CA, USA) miteinander verbunden. Zudem wurde zwischen analytischer Säule und Fluoreszenzdetektor über ein T-Stück eine isokratische Pumpe (G1310A) in das System integriert. Die Steuerung und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Agilent ChemStation-Software (Revision A.10.01).

#### **CYP2B6/CYP2C9/CYP3A4-Assay (O-Dealkylierung von EFC/MFC/BFC)**

Der Inhibitor, gelöst in Methanol 80 % (V/V) oder DMSO, wurde mit rekombinantem CYP-Enzym, Substrat und NADPH (1 mM) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM  $MgCl_2$ ; pH 7,4) bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 300  $\mu$ l inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 150  $\mu$ l eiskaltem Methanol, der den internen Standard 7-Methoxycumarin enthielt, abgestoppt. Nach Zentrifugation bei 10.000-g wurden jeweils etwa 400  $\mu$ l des klaren Überstands in ein HPLC-Vial überführt und mittels LC/Fluoreszenz mit Online-Festphasenextraktion analysiert. Die Enzym- und Substratkonzentrationen sowie die Inkubationszeiten sind unten angegeben.

<i>In-vitro</i> -Assay	Enzym	Substrat	Inkubationszeit
CYP2B6/EFC <sup>a</sup>	8 pmol/ml	2,5 $\mu$ M	30 min
CYP2C9/MFC <sup>b</sup>	10 pmol/ml	75 $\mu$ M	45 min
CYP3A4/BFC <sup>c</sup>	5 pmol/ml	50 $\mu$ M	30 min

<sup>a</sup>7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>b</sup>7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin; <sup>c</sup>7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin.

50 µl des Inkubationsansatzes wurde auf die Extraktionssäule (Zorbax Eclipse XDB-C18; 12,5 x 4,6 mm; 5 µm) injiziert. Der Ladepuffer bestand aus 0,1 % Ameisensäure in Wasser (A) und Methanol (B). Die Zusammensetzung des Ladepuffers war während der Extraktionsphase (0-2 min) 90 % A und 10 % B, wobei die Flussrate 3 ml/min betrug. Das Schaltventil wurde nach 2 min umgeschaltet, so dass die Analyten im Backflush-Modus von der Extraktionssäule auf die analytische Säule (Phenomenex Gemini C18; 100 x 4,6 mm; 5 µm) gespült wurden. Die Zusammensetzung der mobilen Phase für die analytische Trennung war 10 mM Ammoniumacetat und 0,05 % Essigsäure in Wasser (A) und Acetonitril (B). Der Fließmittelgradient sowie die Flussrate der analytischen Trennung sind unten angegeben. Die Temperatur für die analytische Säule und Extraktionssäule betrug 30 °C.

Zeit [min]	Fließmittel (% B)	Flussrate [ml/min]
0,00	45	1,2
2,00	45	1,2
6,00	50	1,2
6,01	100	1,2
8,00	100	1,2

Nach der analytischen Trennung wurde 25 mM Ammoniumacetat, eingestellt mit einer 25 %igen Ammoniak-Lösung auf pH 9,75, mit einer Flussrate von 0,3 ml/min über ein T-Stück mit Hilfe einer isokratischen Pumpe zugemischt, so dass der resultierende pH-Wert ca. 8,5 betrug. Die Einstellungen des Fluoreszenzdetektors zur fluorimetrischen Bestimmung des Metaboliten 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin und des internen Standards sind unten angegeben.

Zeit [min]	Anregung	Emission	PMT-Gain*
0,00	400 nm	500 nm	12
5,40	400 nm	500 nm	12
5,41	330 nm	400 nm	8
7,00	330 nm	400 nm	8

\*Photomultiplier-Tube-Spannung



## 2.4 Mikrotiterplatten-basierte Fluoreszenz-Assays

Die Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Assays wurden entsprechend den Bedingungen von Gentest durchgeführt ([www.gentest.com](http://www.gentest.com)).

### 2.4.1 Stammlösungen

#### Substrate

Die Stammlösungen der Substrate wurden mit Acetonitril hergestellt. Die Konzentrationen der Stammlösungen und die entsprechenden Assay-Konzentrationen sind unten angegeben.

Substrat	CYP-Enzym	Stammlösung	Assay-Konz.
3-Cyano-7-ethoxycumarin (CEC)	1A2	20 mM	5 µM
	2C19		25 µM
Ethoxyresorufin (EthRes)	1A2	5 mM	5 µM
7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin (EFC)	2B6	5 mM	2,5 µM
Dibenzylfluorescein (DBF)	2C8	2 mM	1 µM
	2C9		1 µM
	2C19		2 µM
	3A4		1 µM
7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin (MFC)	2C9	25 mM	75 µM
3-[2-( <i>N,N</i> -Diethyl- <i>N</i> -methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin (AMMC)	2D6	10 mM	1,5 µM
7-Benzyl-4-trifluormethylcumarin (BFC)	3A4	50 mM	50 µM
Benzyloxyresorufin (BzRes)	3A4	10 mM	50 µM

#### Metabolite

Zur Quantifizierung der enzymatisch gebildeten Metabolite wurden Stammlösungen von 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin (AHMC) und der Metabolite 3-Cyano-7-hydroxycumarin (CHC), 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC), Fluorescein und Resorufin mit Acetonitril hergestellt. Die Stammlösungen und die verwendeten Assay-Konzentrationen der Metabolite sind unten angegeben.

Metabolit	Stammlösung	Assay-Konzentrationen
CHC	0,1 mg/ml	0,25/0,5/1/2,5/5/10/25/50/100/250 ng/ml
AHMC	0,1 mg/ml	2,5/5/10/25/50/100/250 ng/ml
HFC	0,1 mg/ml	1,0/2,5/5/10/25/50/100/250/500/750 ng/ml
Fluorescein	0,1 mg/ml	0,25/0,5/1/2,5/5/10/25/50/100 ng/ml
Resorufin	0,1 mg/ml	0,25/0,5/1/2,5/5/10/25/50/100 ng/ml

Zur Bestimmung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte von Pflanzenextrakten wurden Stammlösungen der Metabolite CHC, HFC, Fluorescein und Resorufin mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4; 3 mM MgCl<sub>2</sub>) sowie von AHMC in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4; 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>) hergestellt. Die Stammlösungen und die verwendeten Assay-Konzentrationen der Metabolite sind unten angegeben. Die Assay-Konzentrationen der Metabolite entsprachen einer 100, 50, 25 und 10 %igen Enzymaktivität (siehe II.5.3.1, Tab. 22).

CYP-Assay	Metabolit	Stammlösung	Assay-Konzentrationen (100/50/25/10 %ige Enzymaktivität)
CYP1A2/CEC	CHC	0,1mM	1,1/0,55/0,275/0,11 µM
CYP1A2/EthRes	Resorufin	0,5 mM	0,05/0,025/0,0125/0,005 µM
CYP2B6/EFC	HFC	0,25 mM	0,06/0,03/0,015/0,006 µM
CYP2C8/DBF	Fluorescein	0,01 mM	0,2/0,1/0,05/0,02 µM
CYP2C9/MFC	HFC	0,25 mM	0,4/0,2/0,1/0,04 µM
CYP2C19/CEC	CHC	0,1mM	0,3/0,15/0,075/0,03 µM
CYP2D6/AMMC	AHMC	1 mM	0,2/0,1/0,05/0,02 µM
CYP3A4/BFC	HFC	0,25 mM	2,8/1,4/0,7/0,28 µM
CYP3A4/BzRes	Resorufin	0,5 mM	0,05/0,025/0,0125/0,005 µM

### Standardinhibitoren

Die Stammlösungen der Standardinhibitoren wurden mit Acetonitril hergestellt; außer Tranylcypromin mit Acetonitril/Wasser (50/50). Die Konzentrationen der Stammlösungen und die Assay-Konzentrationen für die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte sind unten angegeben. Für die Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte wurden jeweils 10

Konzentrationen verwendet, die ausgehend von den höchsten Assay-Konzentrationen jeweils einer 1:3 Verdünnung entsprachen.

Inhibitor	CYP-Enzym	Stammlösung	Assay-Konzentrationen
Furafyllin	1A2	5 mM	100/33,3/11,1/3,70/1,23/0,412/0,137/ 0,0457/0,0152/0,00508 $\mu$ M
Tranylcypromin	2B6	25 mM	250/83,3/27,8/9,26/3,09/1,03/0,343/ 0,114/0,0381/0,0127 $\mu$ M
Quercetin	2C8	10 mM	200/66,7/22,2/7,41/2,47/0,823/0,274/ 0,0914/0,0305/0,0102 $\mu$ M
Sulfaphenazol	2C9	0,5 mM	10/3,33/1,11/0,370/0,123/0,0412/0,0137/ 0,00457/0,00152/0,000508 $\mu$ M
Tranylcypromin	2C19	25 mM	500/167/55,6/18,5/6,17/2,06/0,686/ 0,229/0,0762/0,0254 $\mu$ M
Chinidin	2D6	0,025 mM	500/167/55,6/18,5/6,17/2,06/0,686/ 0,229/0,0762/0,0254 nM
Ketoconazol	3A4	0,25 mM	5000/1670/556/185/61,7/20,6/6,86/ 2,29/0,762/0,254 nM

### Abstopplösung

Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktionen wurde eine Acetonitril/0,5 M TrisBase-Lösung (80/20) verwendet. Für die Herstellung dieser Lösung wurden 100 ml einer wässrigen 0,5 M TrisBase-Lösung (60,55 g/L) und 400 ml Acetonitril miteinander gemischt. Ausnahmen bildeten CYP-Assays mit Dibenzylfluorescein (DBF) als Substrat. Bei diesen Assays wurde als Abstopplösung eine 2 N Natronlauge verwendet, für deren Herstellung 8,0 g Natriumhydroxid in 100 ml Wasser gelöst wurden.

#### 2.4.2 *In-vitro*-Assays

Der Inhibitor, gelöst in Methanol 80 % (V/V) oder Acetonitril, wurde mit rekombinantem CYP-Enzym, Substrat und NADPH in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l in einem Well der Mikrotiterplatte inkubiert. Neben der Inhibitorprobe war für die Berechnung der inhibitorischen Aktivität ebenfalls eine Kontrollinkubation notwendig, die keinen Inhibitor enthielt und somit einer 100 %igen Enzymaktivität entsprach.

Zudem ist zur Kompensation der Hintergrundfluoreszenz (Mikrotiterplatte, Puffer, Substrat, NADPH und Abstopplösung) eine so genannte Hintergrund-Kontrolle notwendig. Die Zusammensetzung der Hintergrund-Kontrolle entsprach der einer Kontrollinkubation, wobei Enzym und Substrat erst nach der Abstopplösung zugegeben wurde, so dass keine Umsetzung des Substrats stattfand. Details zur Hintergrundfluoreszenz und zur Berechnung der inhibitorischen Aktivität sind unter II.2.3.2 sowie V.2.5 aufgeführt. Die Inkubationsbedingungen der einzelnen CYP-Assays sind unten angegeben.

<b>CYP-Assay</b>	<b>Enzym</b>	<b>Substrat</b>	<b>NADPH</b>	<b>MgCl<sub>2</sub></b>	<b>Inkubationszeit</b>
CYP1A2/CEC	2,5 pmol/ml	5 µM	1 mM	3 mM	15 min
CYP1A2/EthRes	2,5 pmol/ml	5 µM	1 mM	3 mM	30 min
CYP2B6/EFC	5 pmol/ml	2,5 µM	1 mM	3 mM	30 min
CYP2C8/DBF	20 pmol/ml	1 µM	1 mM	3 mM	30 min
CYP2C9/MFC	10 pmol/ml	75 µM	1 mM	3 mM	45 min
CYP2C9/DBF	10 pmol/ml	1 µM	1 mM	3 mM	30 min
CYP2C19/CEC	2,5 pmol/ml	25 µM	1 mM	3 mM	30 min
CYP2C19/DBF	5 pmol/ml	2 µM	1 mM	3 mM	30 min
CYP2D6/AMMC	7,5 pmol/ml	1,5 µM	8 µM	0,4 mM	30 min
CYP3A4/BFC	5 pmol/ml	50 µM	1 mM	3 mM	30 min
CYP3A4/BzRes	15 pmol/ml	50 µM	1 mM	3 mM	30 min
CYP3A4/DBF	5 pmol/ml	2 µM	1 mM	3 mM	10 min

Nach der Inkubation wurde die enzymatische Reaktion mit 75 µl Acetonitril/0,5 M TrisBase-Lösung (80/20) oder mit 75 µl 2 N Natronlauge (CYP-Assays mit DBF als Substrat) abgestoppt.

Die Auswertung der Mikrotiterplatte erfolgte mit Hilfe des Cary-Eclipse Mikrotiterplatten-Readers der Firma Varian. Die verwendeten Anregungs- und Emissionswellenlängen sowie die Filterbandbreiten sind unten angegeben. Der PMT-Gain („Photomultiplier-Tube-Spannung“) des Fluorimeters wurde auf 600 eingestellt.

<b>CYP-Assay</b>	<b>Produkt</b>	<b>Anregung (Filterbandbreite)</b>	<b>Emission (Filterbandbreite)</b>
CYP1A2/CEC	CHC	409 nm (5 nm)	460 nm (5 nm)
CYP1A2/EthRes	Resorufin	530 nm (10 nm)	590 nm (10 nm)
CYP2B6/EFC	HFC	409 nm (10 nm)	530 nm (10 nm)
CYP2C8/DBF	Fluorescein	485 nm (5 nm)	538 nm (10 nm)
CYP2C9/MFC	HFC	409 nm (10 nm)	530 nm (10 nm)
CYP2C9/DBF	Fluorescein	485 nm (10 nm)	538 nm (10 nm)
CYP2C19/CEC	CHC	409 nm (5 nm)	460 nm (10 nm)
CYP2C19/DBF	Fluorescein	485 nm (5 nm)	538 nm (10 nm)
CYP2D6/AMMC	AMHC	390 nm (10 nm)	460 nm (10 nm)
CYP3A4/BFC	HFC	409 nm (5 nm)	530 nm (10 nm)
CYP3A4/BzRes	Resorufin	530 nm (10 nm)	590 nm (10 nm)
CYP3A4/DBF	Fluorescein	485 nm (5 nm)	538 nm (10 nm)

## 2.5 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität

Für die graphische Darstellung der Inhibitionskurven wurden auf der Abszisse (x-Achse) der dekadische Logarithmus der Inhibitorkonzentrationen und auf der Ordinate (y-Achse) die *Restaktivität in % der Kontrolle* aufgetragen.

### HPLC-basierte *In-vitro*-Assays

Für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität mit Hilfe von HPLC-basierten Methoden wurde das Verhältnis der Peakflächen von Metabolit zu internen Standard (Peak-Area-Ratio) der Inhibitorproben und der Kontrollprobe (100 % Enzymaktivität) bestimmt und prozentual miteinander verglichen. Für die Berechnung der *Restaktivität in % der Kontrolle* wurde folgende Gleichung verwendet.

$$\text{Restaktivität} = \frac{M_i/IS_i}{M_k/IS_k} \cdot 100$$

$M_i$  = Peakfläche des Metaboliten der Inhibitorprobe

$IS_i$  = Peakfläche des Internen Standards der Inhibitorprobe

$M_k$  = Peakfläche des Metaboliten der Kontrolle

$IS_k$  = Peakfläche des internen Standards der Kontrolle

### Mikrotiterplatten-basierte *In-vitro*-Assays

Bei Bestimmungen der inhibitorischen Aktivität mit Hilfe von Mikrotiterplatten-basierten Fluoreszenz-Methoden war für die Berechnung der Restaktivität neben der Bestimmung der Intensität des Fluoreszenzsignals der Inhibitorprobe und der Kontrolle (100 %ige Enzymaktivität) zusätzlich eine Messung der Fluoreszenz des Hintergrundes notwendig. Die so genannte Hintergrund-Kontrolle entsprach einer Kontrollinkubation, wobei Enzym und Substrat erst nach der Abstopplösung zugegeben wurde, so dass keine Umsetzung des Substrates stattfand (siehe V.2.4.2). Für die Berechnung der *Restaktivität in % der Kontrolle* wurde folgende Gleichung verwendet.

$$\text{Restaktivität} = \frac{F_I - F_{\text{HG}}}{F_K - F_{\text{HG}}} \cdot 100$$

$F_I$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Inhibitorprobe

$F_{\text{HG}}$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Hintergrundkontrolle

$F_K$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Kontrolle

### Berechnung der $IC_{50}$ -Werte

Die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte erfolgte durch nichtlineare Regression mit Hilfe des Softwareprogrammes SigmaPlot® (Version 10.0, Systat Software, Chicago, IL, USA) unter Verwendung der 4-Parameter-Gleichung nach Hill.

$$y = \text{min} + \frac{\text{max} - \text{min}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x) \cdot n_H}}$$

$y$  = Restaktivität in % der Kontrolle

$\text{min}$  = angestrebtes Minimum der berechneten Kurve

$\text{max}$  = angestrebtes Maximum der berechneten Kurve

$IC_{50}$  = Inhibitorkonzentration, die eine 50 %ige Hemmung der Enzymaktivität bewirkt

$x$  = dekadische Logarithmus der Inhibitorkonzentration

$n_H$  = Hill-Koeffizient

Wurde eine 100 %ige Inhibition der CYP-Enzyme aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht erreicht, wurde der  $IC_{50}$ -Wert durch nichtlineare Regression unter Verwendung der 3-Parameter-Gleichung nach Hill bestimmt.

$$y = \frac{\text{max}}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x) \cdot n_H}}$$

$y$  = Restaktivität in % der Kontrolle

$\text{max}$  = angestrebtes Maximum der berechneten Kurve

$IC_{50}$  = Inhibitorkonzentration, die eine 50 %ige Hemmung der Enzymaktivität bewirkt

$x$  = dekadische Logarithmus der Inhibitorkonzentration

$n_H$  = Hill-Koeffizient

Details zur Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte mit Hilfe der 3- bzw. 4-Paramater-Gleichung nach Hill sind in Kapitel II.1.3.4 ausführlich dargelegt.

Um die Ergebnisse der linearen Interpolation und der nichtlinearen Regression zu vergleichen, wurde in dieser Arbeit ebenfalls die Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte von Standardinhibitoren mit Hilfe der linearen Interpolation durchgeführt (siehe II.3). Für die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte mit Hilfe der linearen Interpolation wurde folgende Gleichung verwendet. Details zur Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte mit Hilfe der linearen Interpolation sind in Kapitel II.3 ausführlich dargelegt.

$$IC_{50} = \frac{(HC - LC)}{(HP - LP)} \cdot (50 - LP) + LC$$

$LP$  = höchste prozentuale Inhibition unterhalb von 50 %

$HP$  = niedrigste prozentuale Inhibition oberhalb von 50 %

$HC$  = Konzentration der Testsubstanz bei  $HP$

$LC$  = Konzentration der Testsubstanz bei  $LP$

$IC_{50}$  = Inhibitorkonzentration, die eine 50 %ige Hemmung der Enzymaktivität bewirkt

## 2.6 Untersuchung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte

### 2.6.1 Bestimmung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte

Die Probenvorbereitung und die Fluoreszenzmessung für die Bestimmung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte der Pflanzenextrakte erfolgte gemäß den unter V.2.4.2 gemachten Angaben. Jedoch enthielten die Proben anstelle der CYP-Enzyme Metabolitenkonzentrationen, so dass keine Inkubationen durchgeführt wurden. Die verwendeten Metabolitenkonzentrationen sind unten angegeben und entsprachen der jeweiligen Substratumsetzung bei einer 100, 50, 25 und 10 %igen Enzymaktivität. Somit wurde die Fluoreszenzintensität der Metabolite in Anwesenheit von Pflanzenextrakt, Puffer, NADPH und Substrat bestimmt, wobei als Referenzwert (Kontrolle) die Fluoreszenzintensität des entsprechenden Metaboliten in Anwesenheit von Puffer, NADPH und Substrat (ohne Pflanzenextrakt) diente. Zusätzlich wurde die Hintergrundfluoreszenz mit Hilfe einer so genannten Hintergrundkontrolle, die lediglich Puffer, NADPH, Substrat und Abstopplösung enthielt, bestimmt.

<b>CYP-Assay</b>	<b>Metabolit</b>	<b>Konzentrationen (100/50/25/10 %ige Enzymaktivität)</b>
CYP1A2/CEC	CHC	1,1/0,55/0,275/0,11 µM
CYP1A2/EthRes	Resorufin	0,05/0,025/0,0125/0,005 µM
CYP2B6/EFC	HFC	0,06/0,03/0,015/0,006 µM
CYP2C8/DBF	Fluorescein	0,2/0,1/0,05/0,02 µM
CYP2C9/MFC	HFC	0,4/0,2/0,1/0,04 µM
CYP2C19/CEC	CHC	0,3/0,15/0,075/0,03 µM
CYP2D6/AMMC	AMHC	0,2/0,1/0,05/0,02 µM
CYP3A4/BFC	HFC	2,8/1,4/0,7/0,28 µM
CYP3A4/BzRes	Resorufin	0,05/0,025/0,0125/0,005 µM



Die Berechnung der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte erfolgte durch folgende Gleichung:

$$F_{Q/E} = \frac{F_{M/P} - F_{HG}}{F_M - F_{HG}} \cdot 100$$

$F_{M+P}$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Metaboliten-Probe in Anwesenheit des Pflanzenextrakts

$F_{HG}$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Hintergrundkontrolle

$F_M$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Metaboliten-Probe (Kontrolle)

Die berechnete Fluoreszenzintensität  $F_{Q/E}$  wurde ausgedrückt als „Fluoreszenz in % der Kontrolle“, wobei für  $F_{Q/E}$  folgendes gilt:

$F_{Q/E} > 100$  %;      Eigenfluoreszenz ( $F_{M/P} > F_M$ )

$F_{Q/E} = 100$  %;      keine Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte ( $F_{M/P} = F_M$ )

$0 \leq F_{Q/E} < 100$  %;      Quenching-Effekte der Metaboliten-Fluoreszenz ( $F_{HG} < F_{M/P} < F_M$ )

$F_{Q/E} < 0$  %;      Quenching-Effekte der Metaboliten- und der Hintergrundfluoreszenz ( $F_{M/P} < F_{HG}$ ).

### 2.6.2 Bestimmung der Eigenfluoreszenz

Die Probenvorbereitung und die Fluoreszenzmessung für die Bestimmung der Eigenfluoreszenz der Pflanzenextrakte erfolgte gemäß den unter V.2.4.2 gemachten Angaben. Jedoch enthielten die Proben keine CYP-Enzyme und schließlich wurden keine Inkubationen durchgeführt. D. h. die Fluoreszenzintensität der Pflanzenextrakte wurde in Anwesenheit von Puffer, NADPH und Substrat bestimmt, wobei als Referenzwert (Kontrolle) die Fluoreszenzintensität des entsprechenden Metaboliten in Anwesenheit von Puffer, NADPH und Substrat diente. Die verwendeten Metabolitenkonzentrationen sind unter V.2.6.1 angegeben. Ebenfalls wurde die Hintergrundfluoreszenz mit Hilfe einer so genannten Hintergrundkontrolle (Puffer, NADPH und Substrat) bestimmt.

Die Berechnung der Eigenfluoreszenz-Effekte erfolgte durch folgende Gleichung:

$$F_E = \frac{F_P - F_{HG}}{F_M - F_{HG}} \cdot 100$$

$F_P$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Pflanzenextrakt-Probe

$F_{HG}$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Hintergrundkontrolle

$F_M$  = Intensität des Fluoreszenzsignals der Metaboliten-Probe (Kontrolle)

Die berechnete Fluoreszenzintensität  $F_E$  wurde ausgedrückt als „Fluoreszenz in % der Kontrolle“, wobei für  $F_E$  folgendes gilt:

$F_E > 0$  %; Eigenfluoreszenz ( $F_P > F_{HG}$ )

$F_E = 0$  %; keine Eigenfluoreszenz ( $F_P = F_{HG}$ )

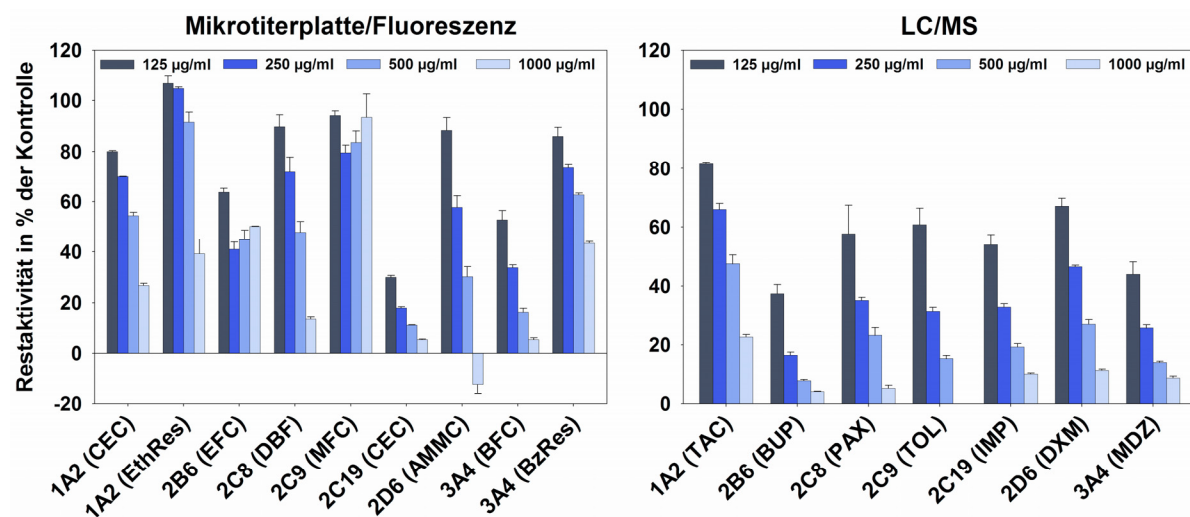
$F_E < 0$  %; Quenching der Hintergrundfluoreszenz ( $F_P < F_{HG}$ ).

## VI ANHANG

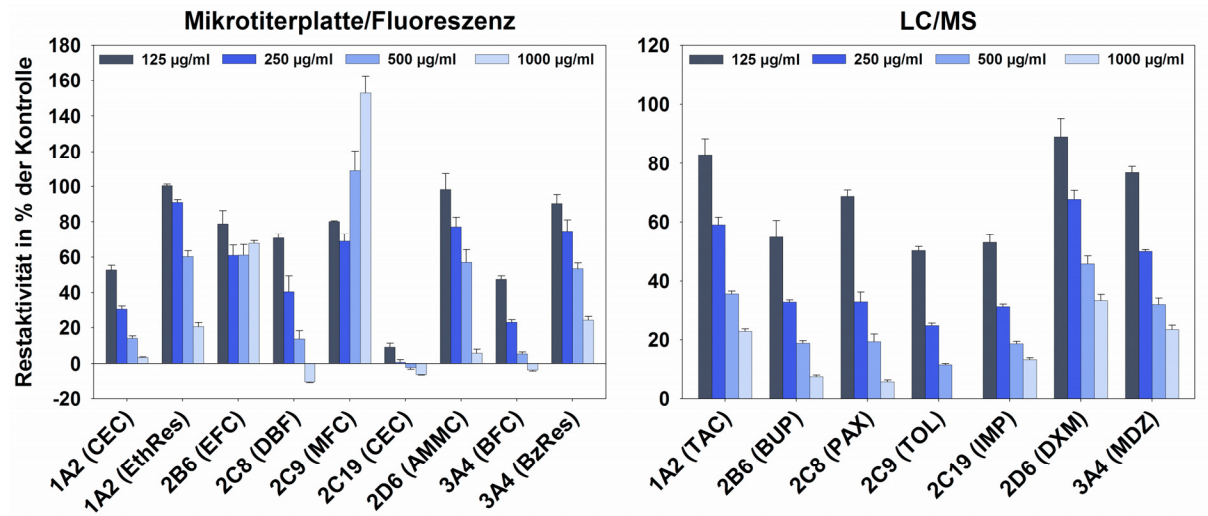
### 1 Inhibition der CYP-Enzyme durch inhibitorisch schwach aktive Pflanzenextrakte

Die Ergebnisse der Inhibition der CYP-Enzyme durch Pflanzenextrakte (125, 250, 500 und 1000 µg/ml) mit geringer inhibitorischer Aktivität sind unten als Balkendiagramme dargestellt. Die Bestimmung der Inhibition wurde mit Hilfe Mikrotiterplatten-basierter Fluoreszenz- und LC/MS-Methoden bestimmt. Folgende Abkürzungen werden verwendet: CEC: 3-Cyano-7-ethoxycumarin; EthRes: Ethoxyresorufin; EFC: 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; DBF: Dibenzylfluorescein; AMMC: 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin; BFC: 7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin; BzRes: Benzyloxyresorufin; TAC: Tacrin; BUP: Bupropion; PAX: Paclitaxel; TOL: Tolbutamid; IMP: Imipramin; DXM: Dextromethorphan; MDZ: Midazolam.

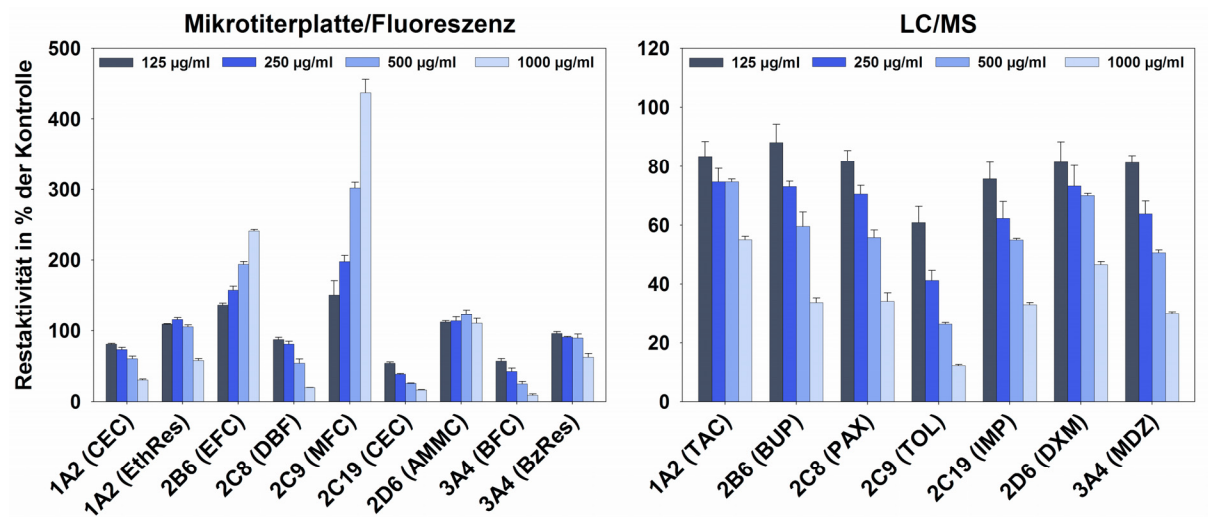
Baldrianwurzel:



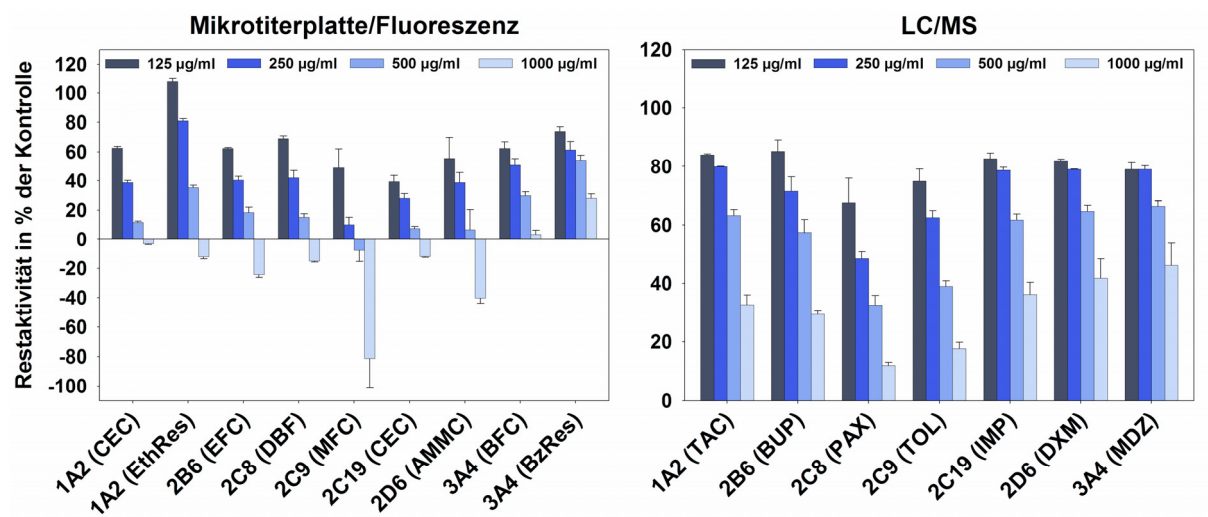
## Basilikumkraut:



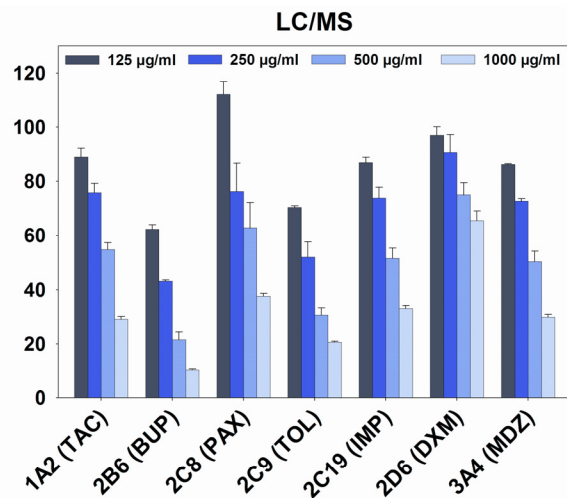
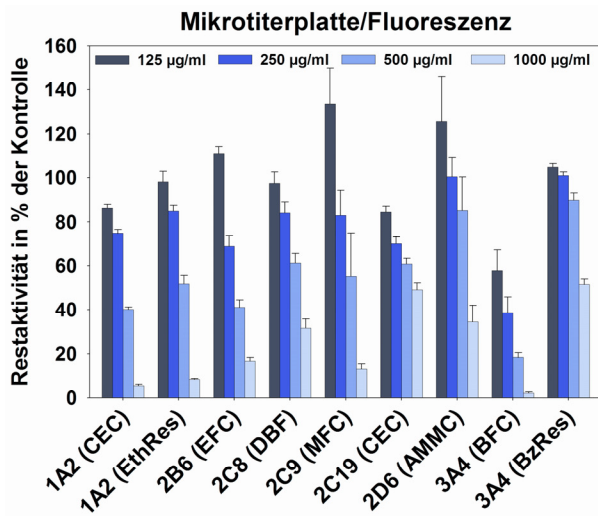
## Bittersüßstengel:



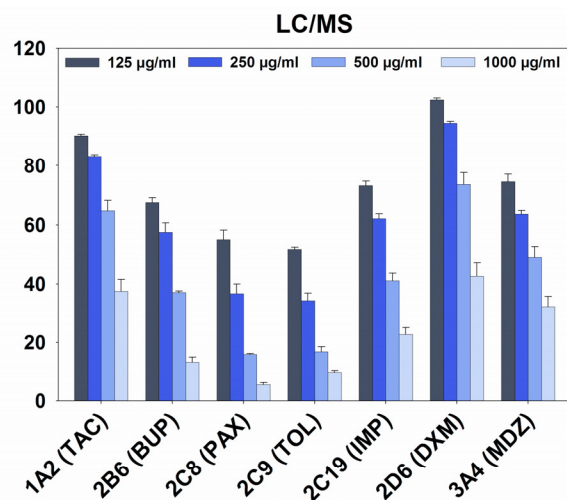
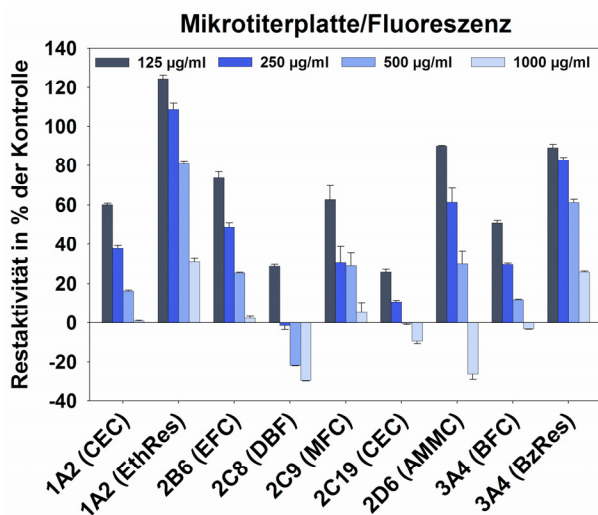
## Heidelbeeren:



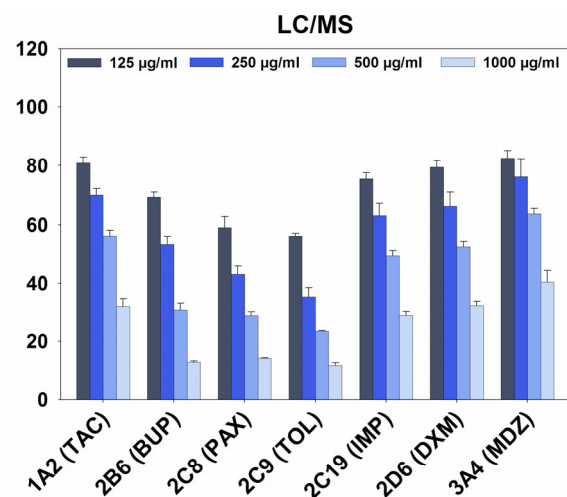
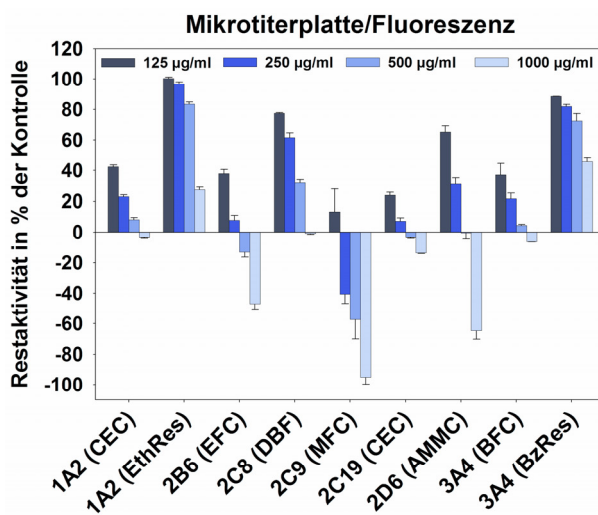
Korianderfrüchte:



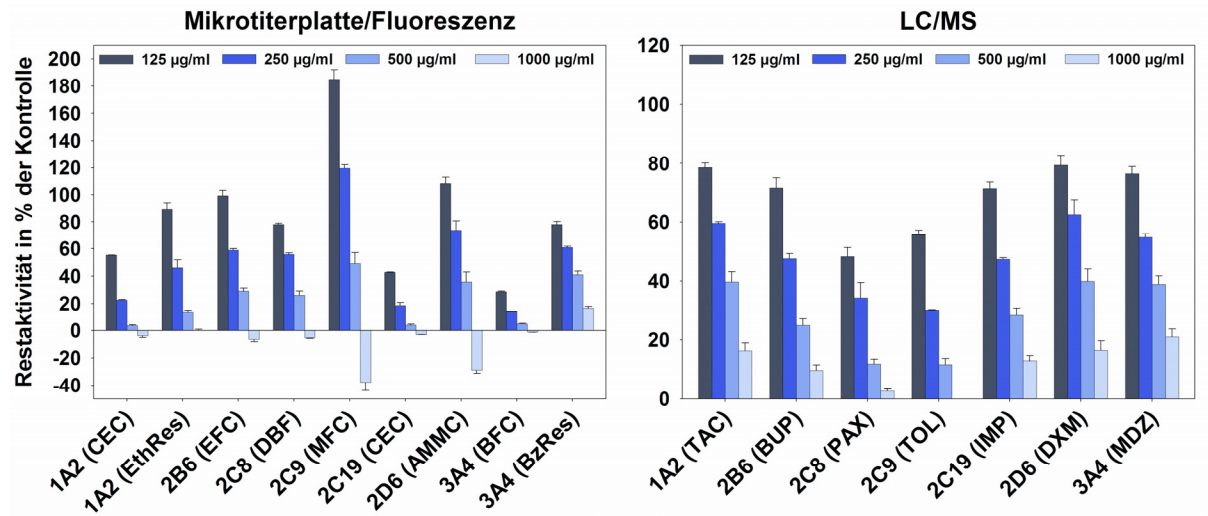
Melissenblätter:



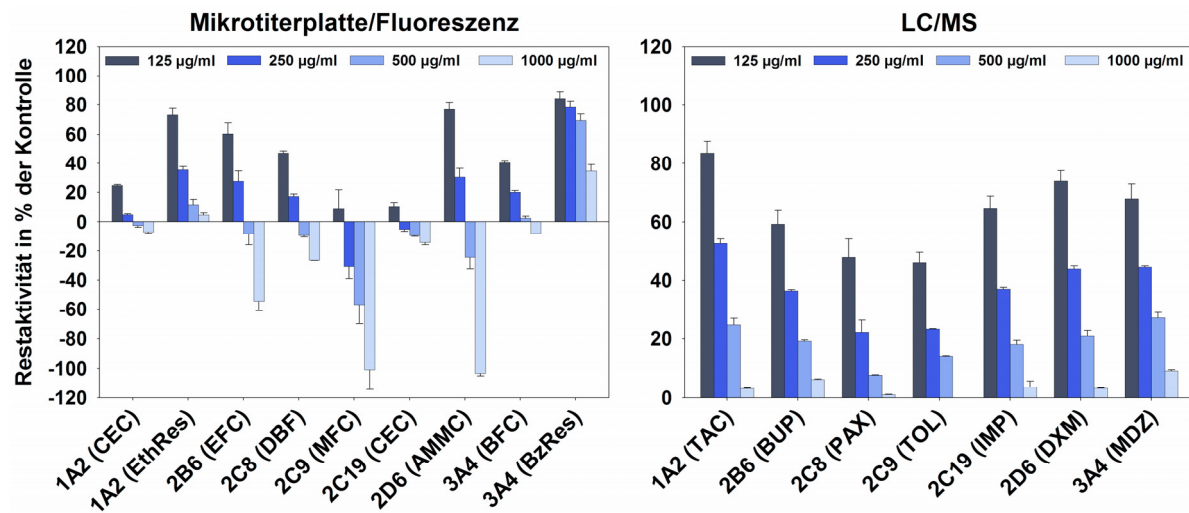
Passionsblumenkraut:



## Rotkleeblüten:



## Weißdornblätter mit Blüten

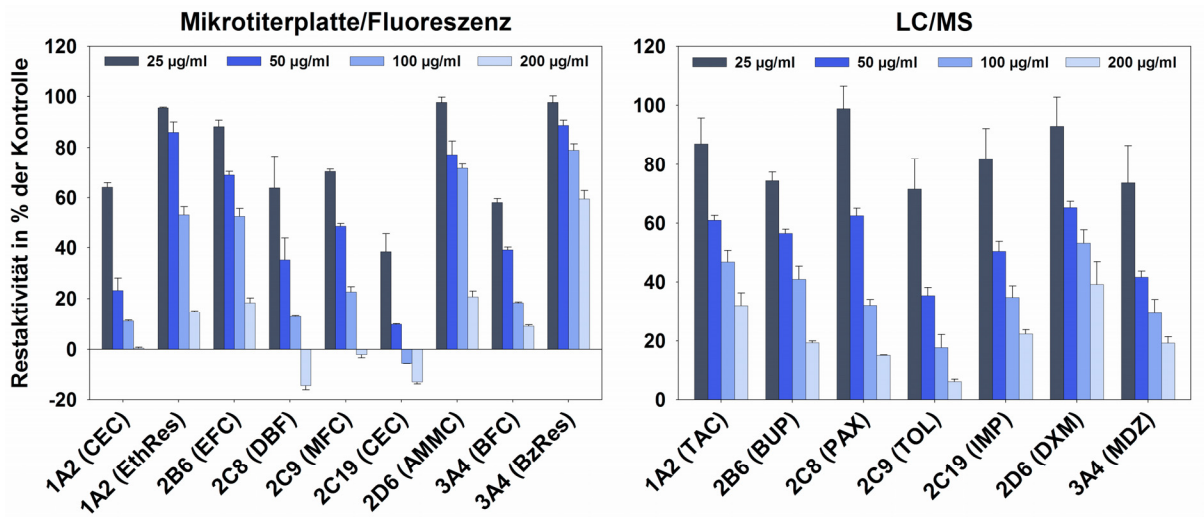


## 2 Inhibition der CYP-Enzyme durch inhibitorisch stark aktive Pflanzenextrakte

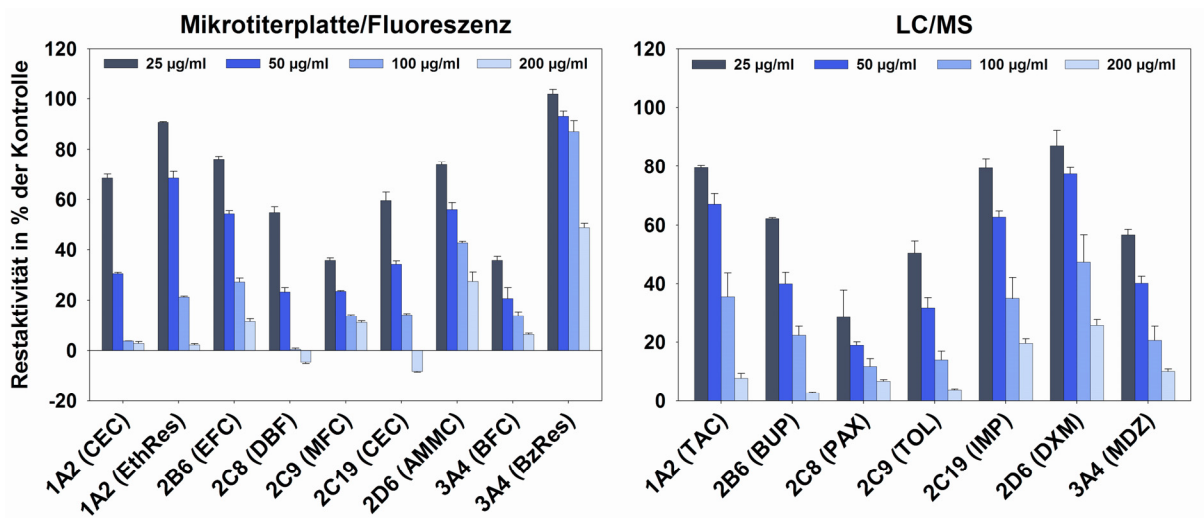
Die Ergebnisse der Inhibition der CYP-Enzyme durch Pflanzenextrakte (25, 50, 100 und 200 µg/ml) mit starker inhibitorischer Aktivität sind unten als Balkendiagramme dargestellt. Die Bestimmung der Inhibition wurde mit Hilfe Mikrotiterplatten-basierter Fluoreszenz- und LC/MS-Methoden bestimmt. Folgende Abkürzungen werden verwendet: CEC: 3-Cyano-7-ethoxycumarin; EthRes: Ethoxyresorufin; EFC: 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin; DBF: Dibenzylfluorescein; AMMC: 3-[2-(*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin; BFC: 7-Benzoyloxy-4-trifluor-

methylcumarin; BzRes: Benzyloxyresorufin; TAC: Tacrin; BUP: Bupropion; PAX: Paclitaxel; TOL: Tolbutamid; IMP: Imipramin; DXM: Dextromethorphan; MDZ: Midazolam.

Birkenblätter:

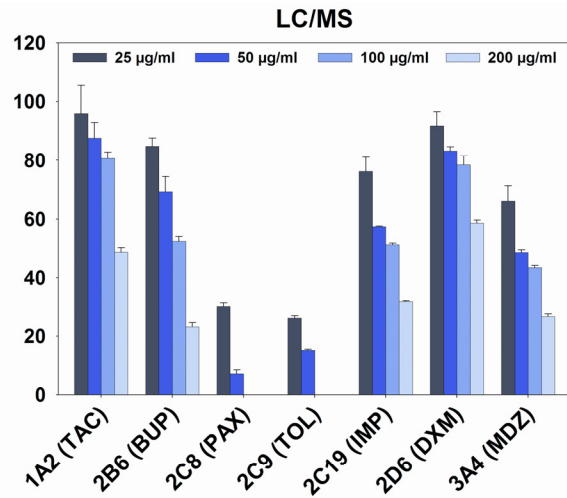
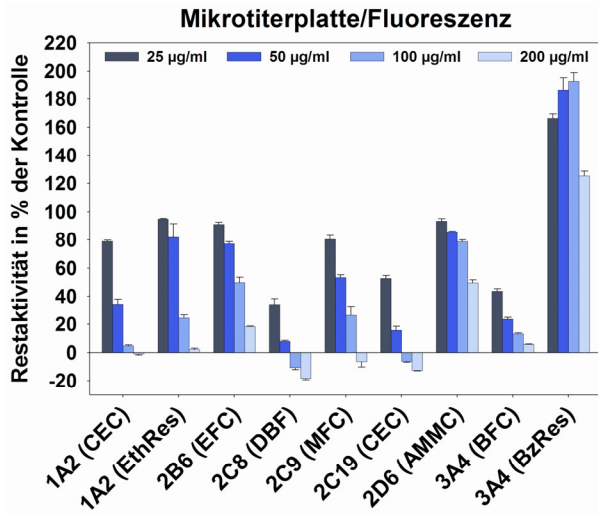


Fenchelfrüchte:

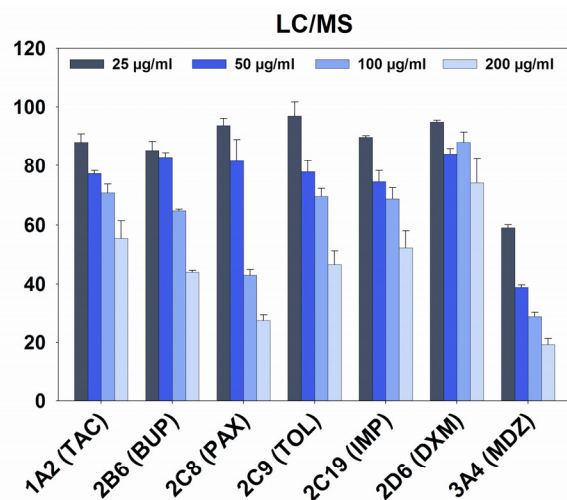
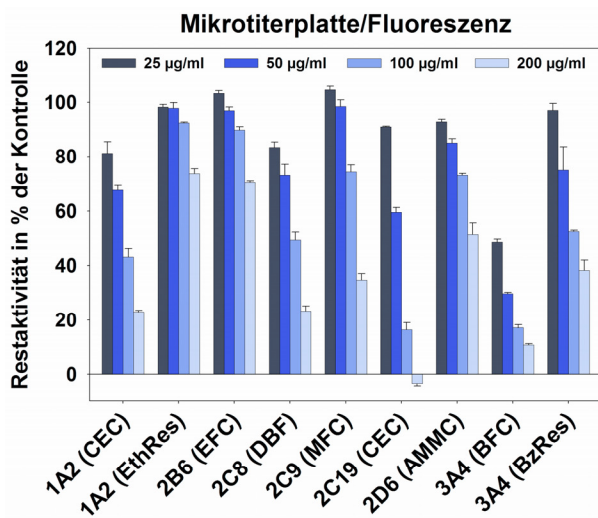




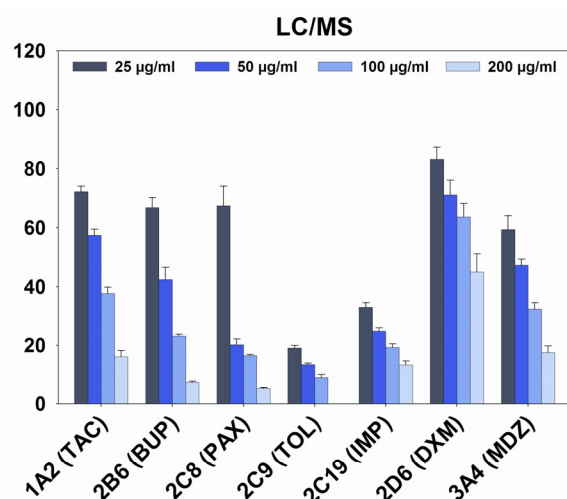
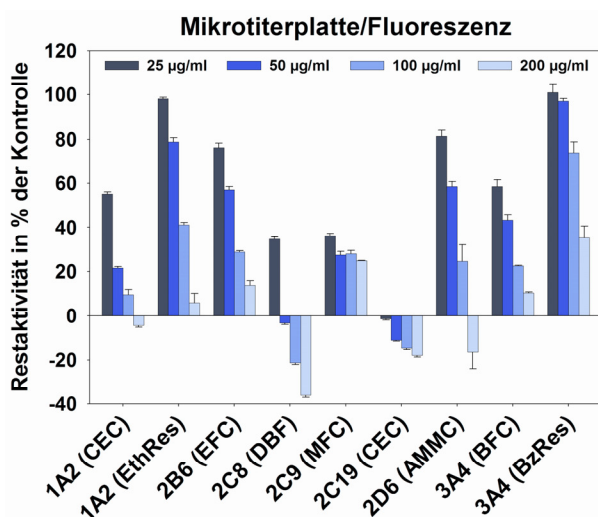
Ginkgoblätter:



Orthosiphonblätter:

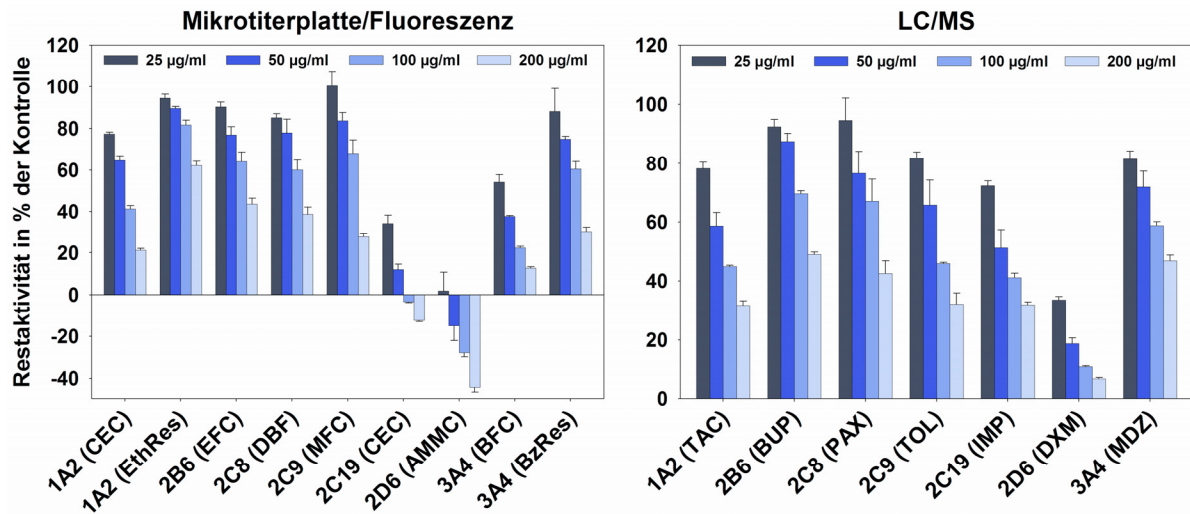


Salbeiblätter:





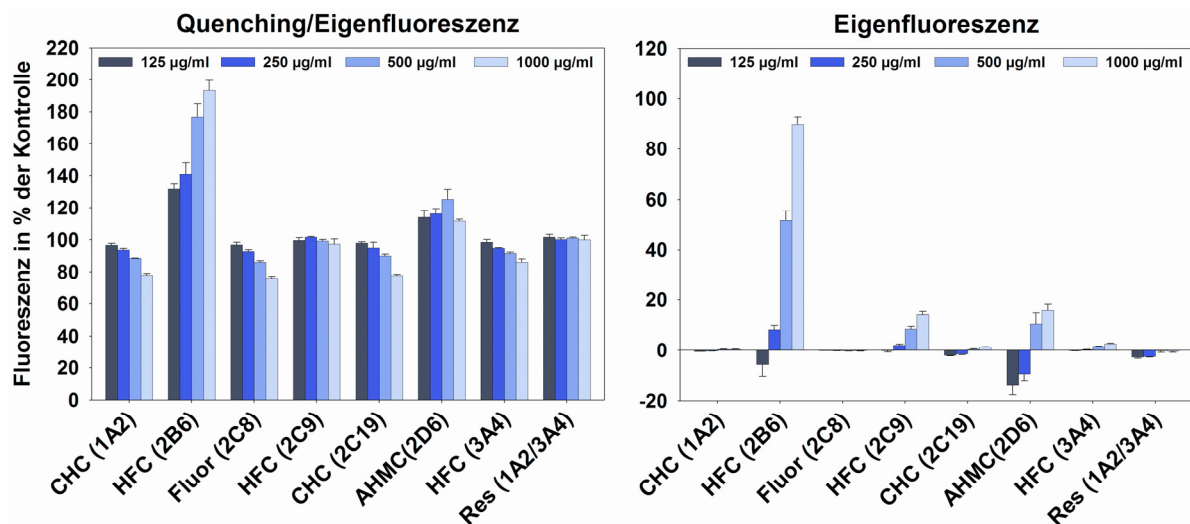
## Schöllkraut



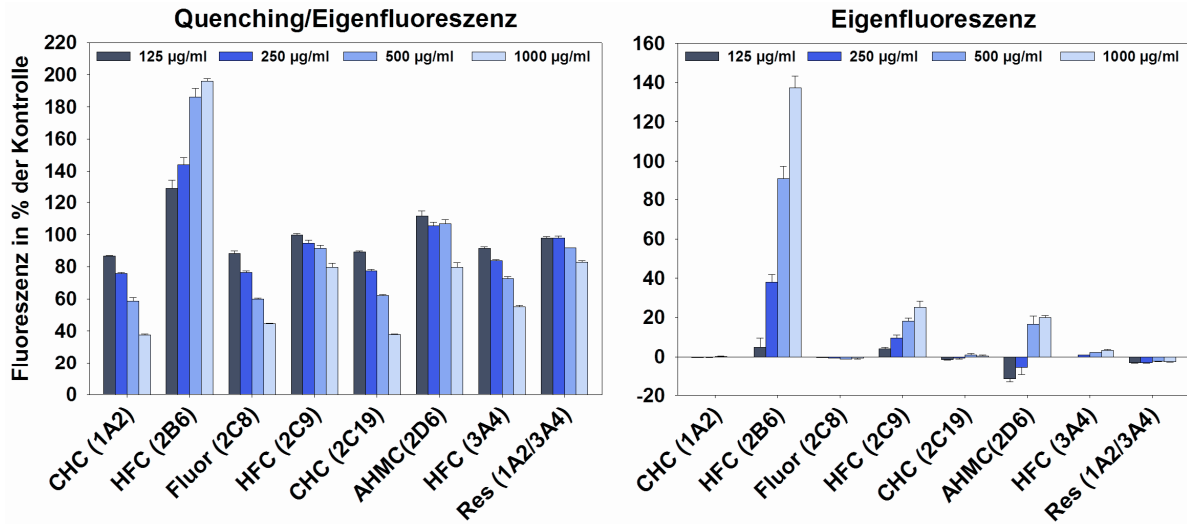
### 3 Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte der inhibitorisch schwach aktiven Pflanzenextrakte

Die Ergebnisse der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte durch Pflanzenextrakte (125, 250, 500 und 1000 µg/ml) mit geringer inhibitorischer Aktivität sind unten als Balkendiagramme dargestellt. Folgende Abkürzungen werden verwendet: CHC: 3-Cyano-7-hydroxycumarin; HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin; Fluor: Fluorescein; AHMC: 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin; Res: Resorufin.

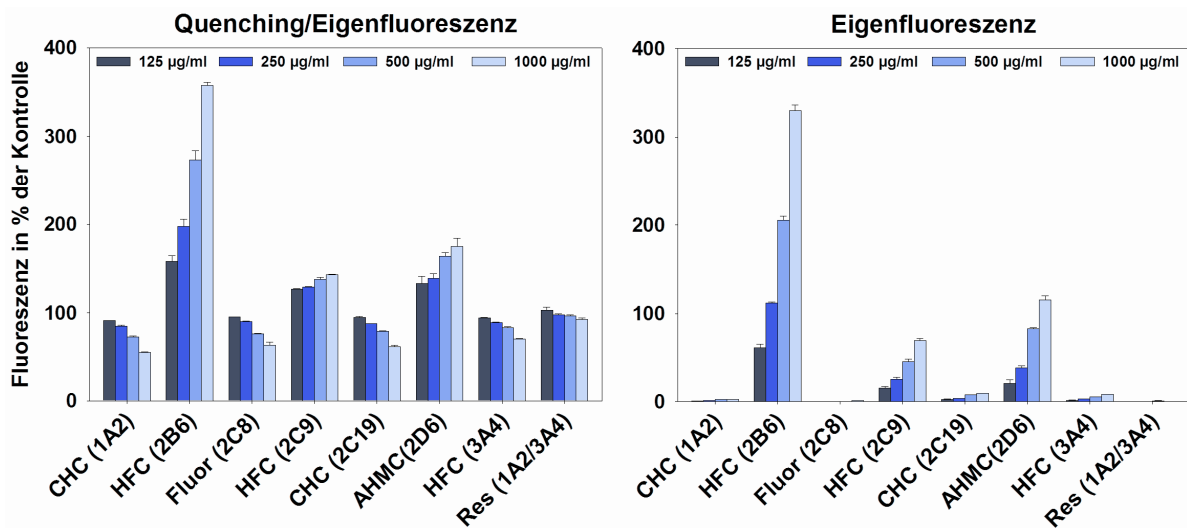
## Baldrianwurzel:



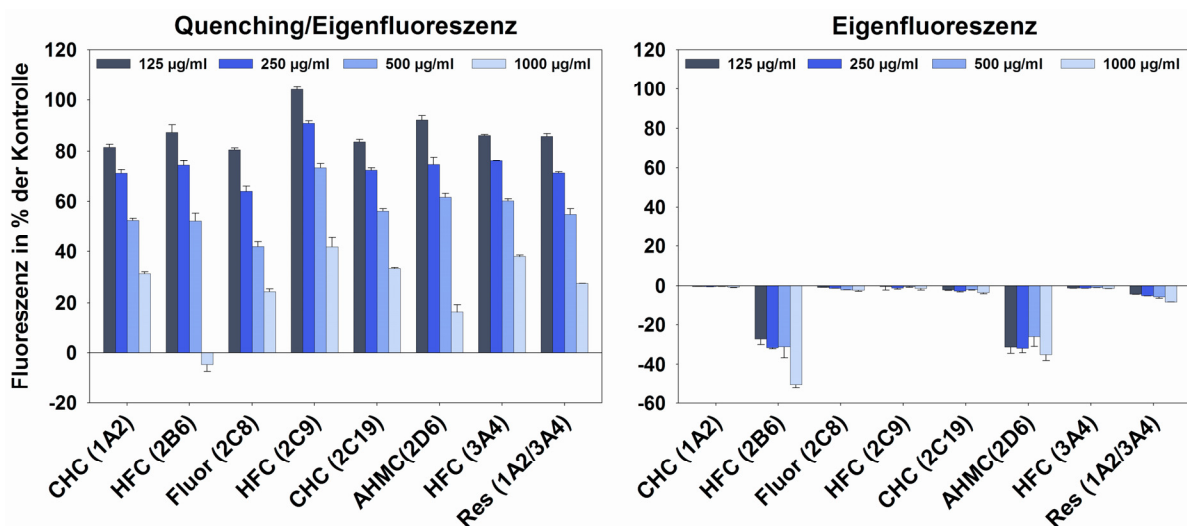
Basilikumkraut:



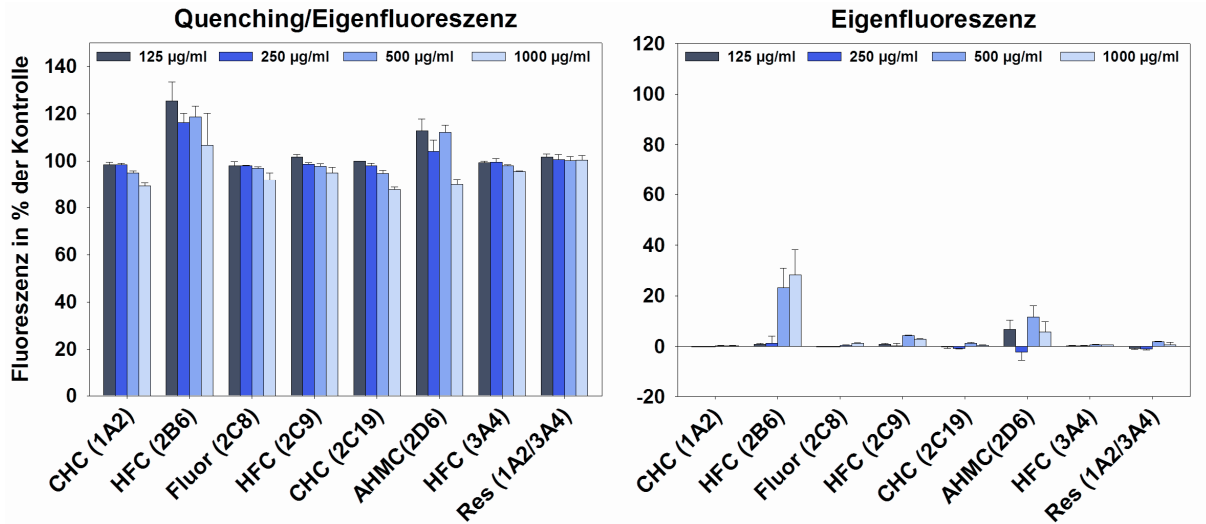
Bittersüßstengel:



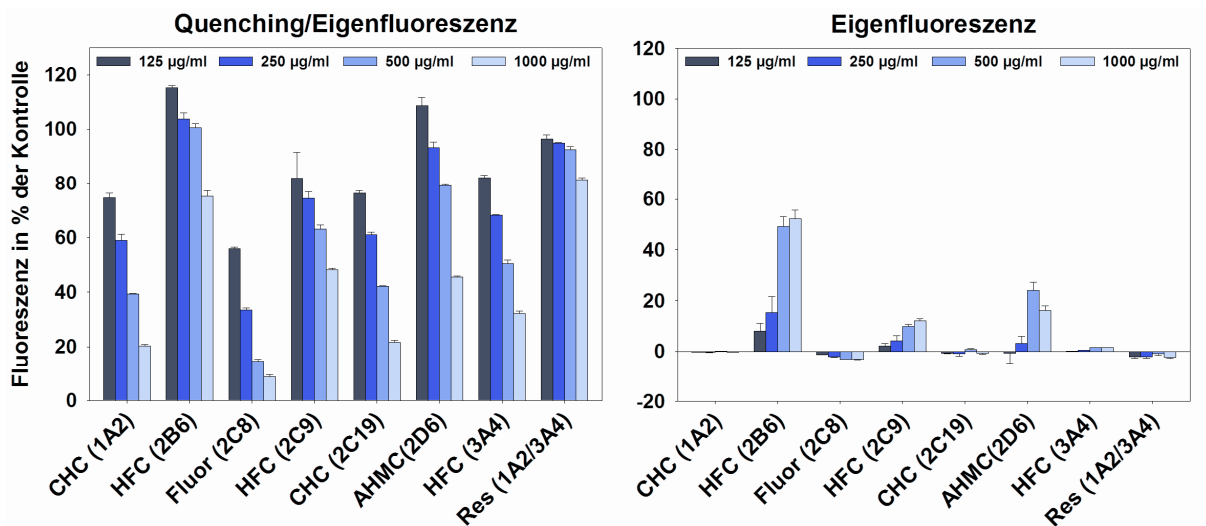
Heidelbeeren:



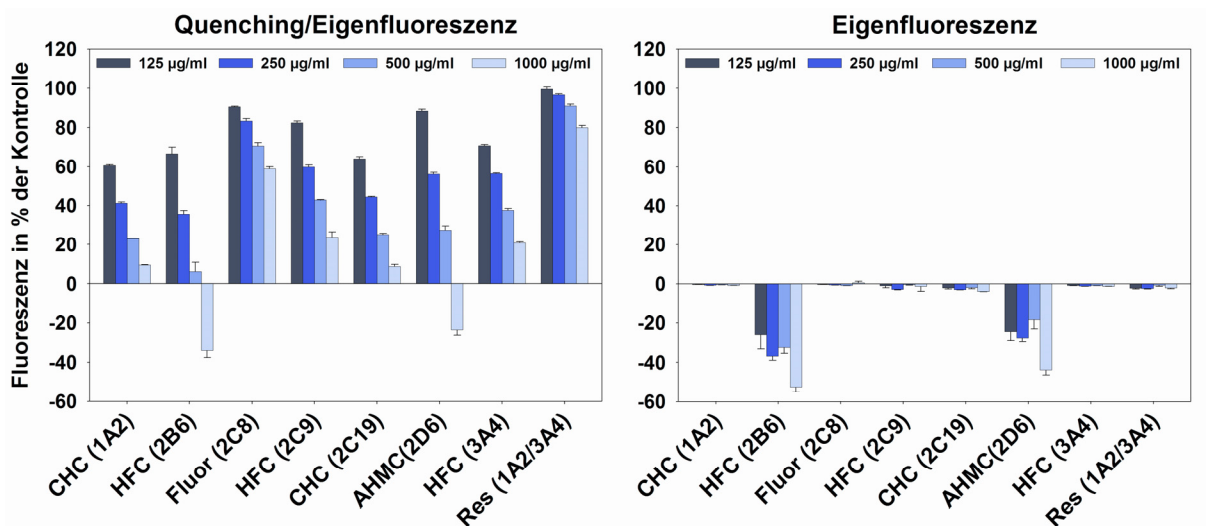
Korianderfrüchte:



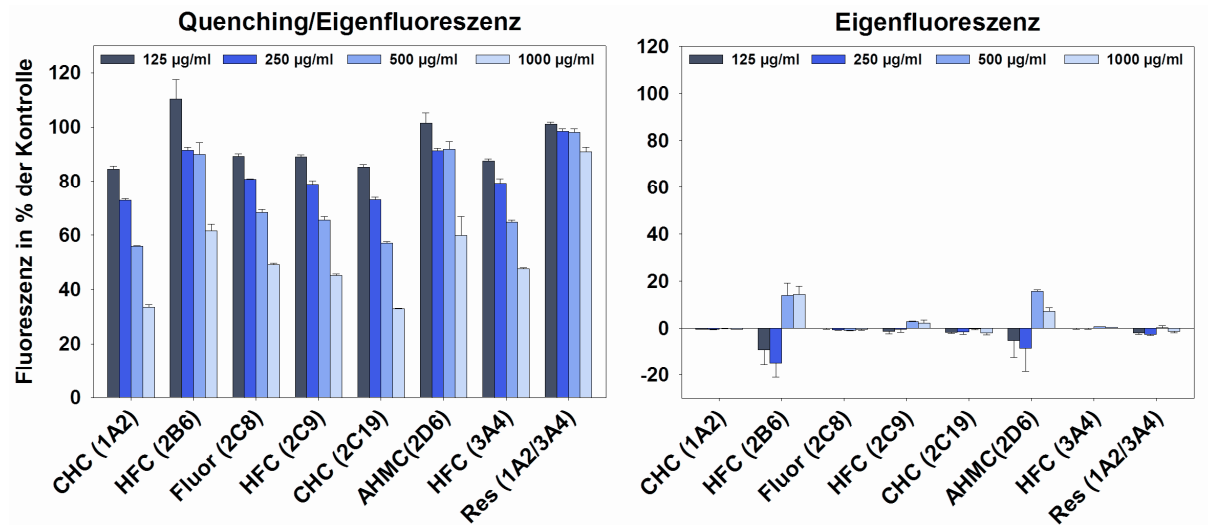
Melissenblätter:



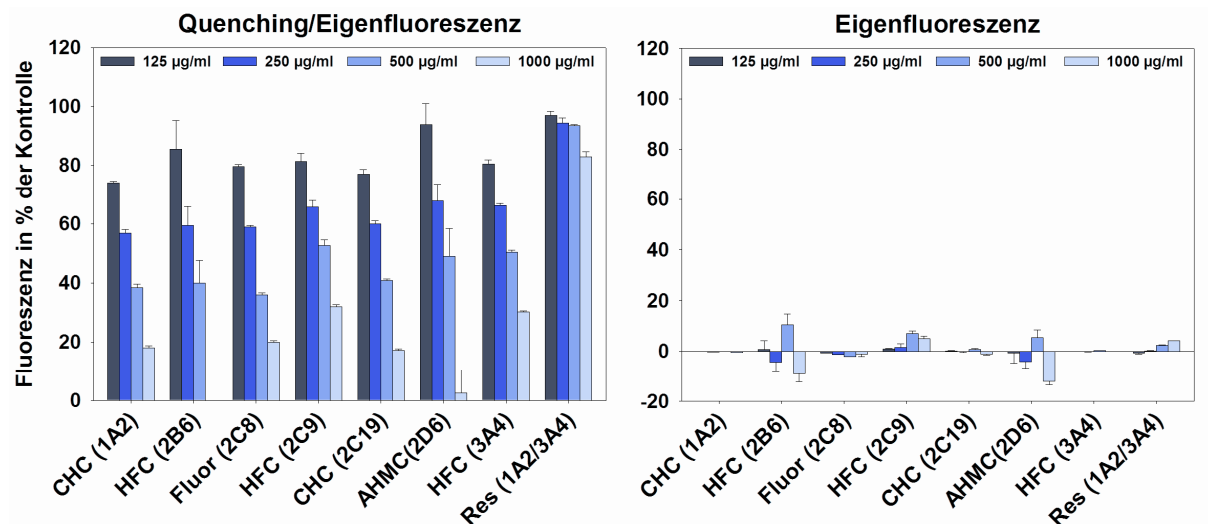
Passionsblumenkraut:



## Rotkleeblüten:



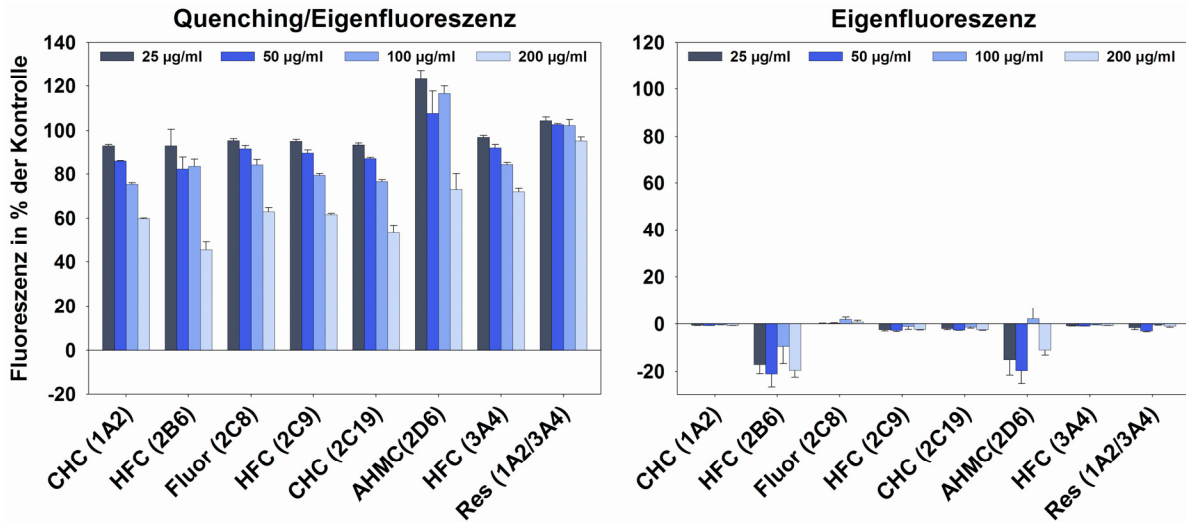
## Weißdornblätter mit Blüten



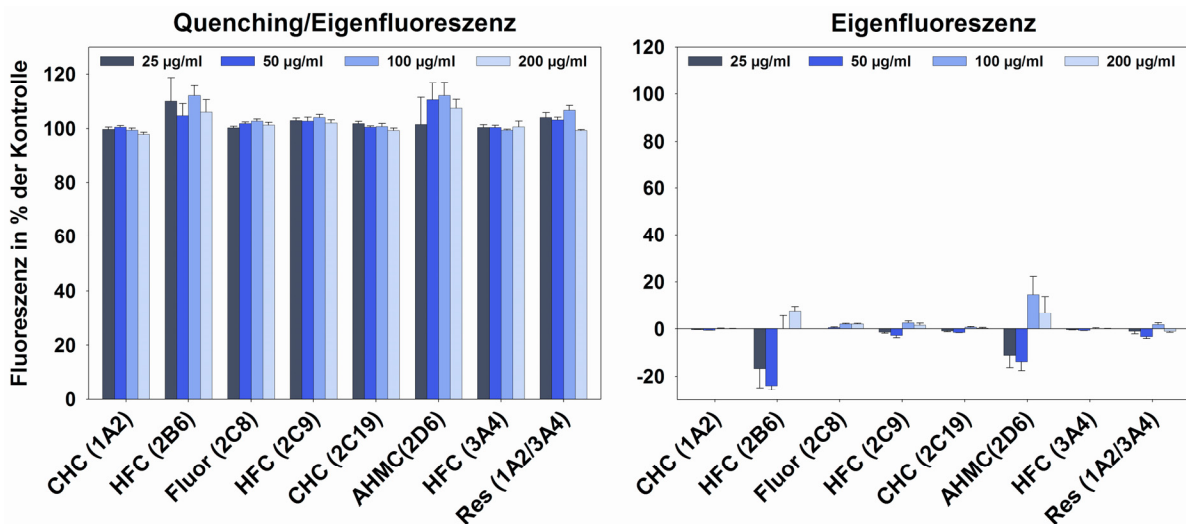
#### 4 Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte der inhibitorisch stark aktiven Pflanzenextrakte

Die Ergebnisse der Quenching- und Eigenfluoreszenz-Effekte durch Pflanzenextrakte (25, 50, 100 und 200 µg/ml) mit starker inhibitorischer Aktivität sind unten als Balkendiagramme dargestellt. Folgende Abkürzungen werden verwendet: CHC: 3-Cyano-7-hydroxycumarin; HFC: 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin; Fluor: Fluorescein; AHMC: 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin; Res: Resorufin.

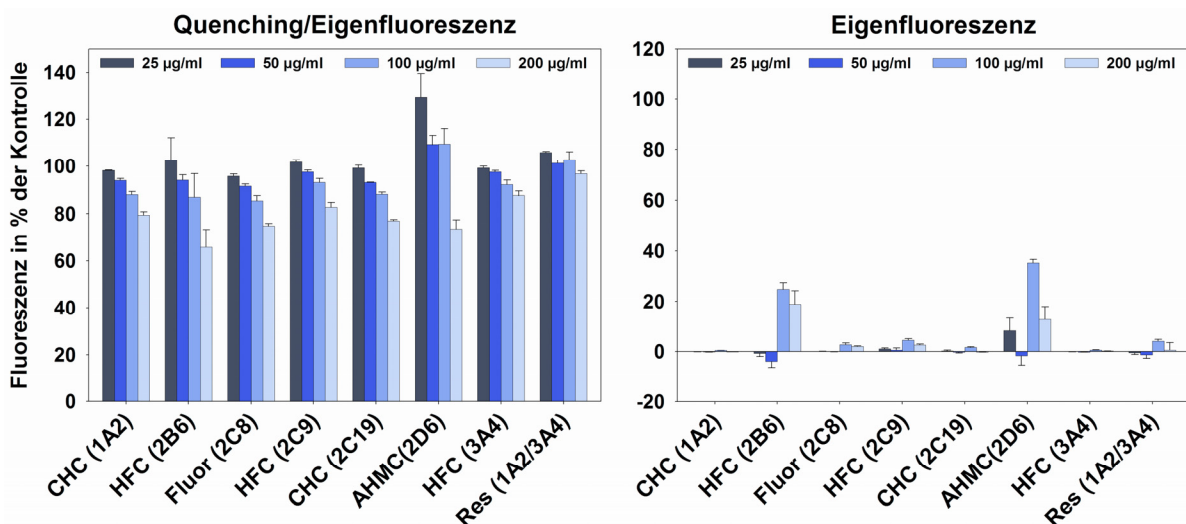
Birkenblätter:



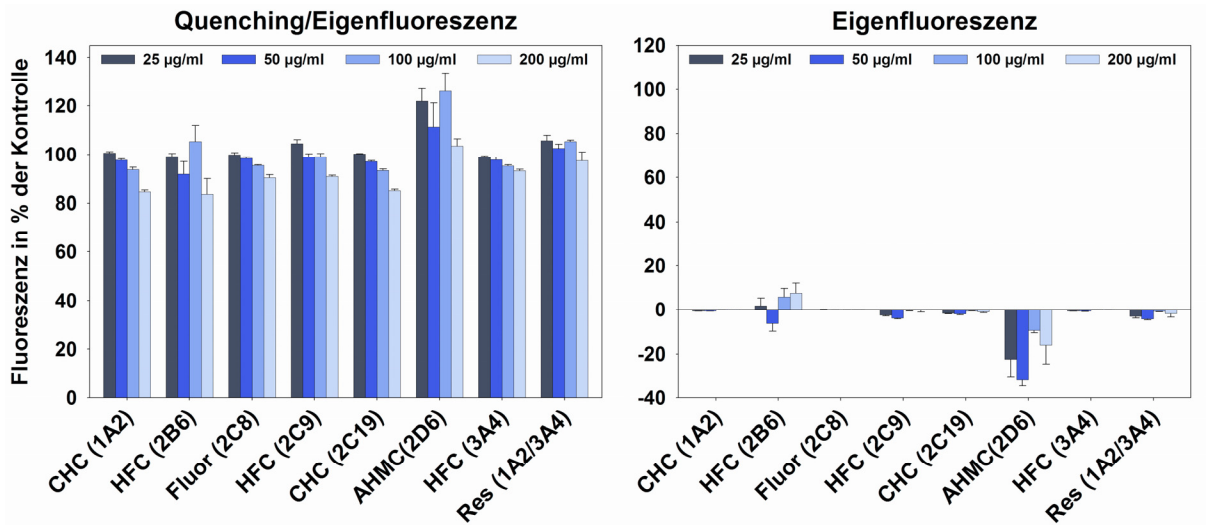
Fenchelfrüchte:



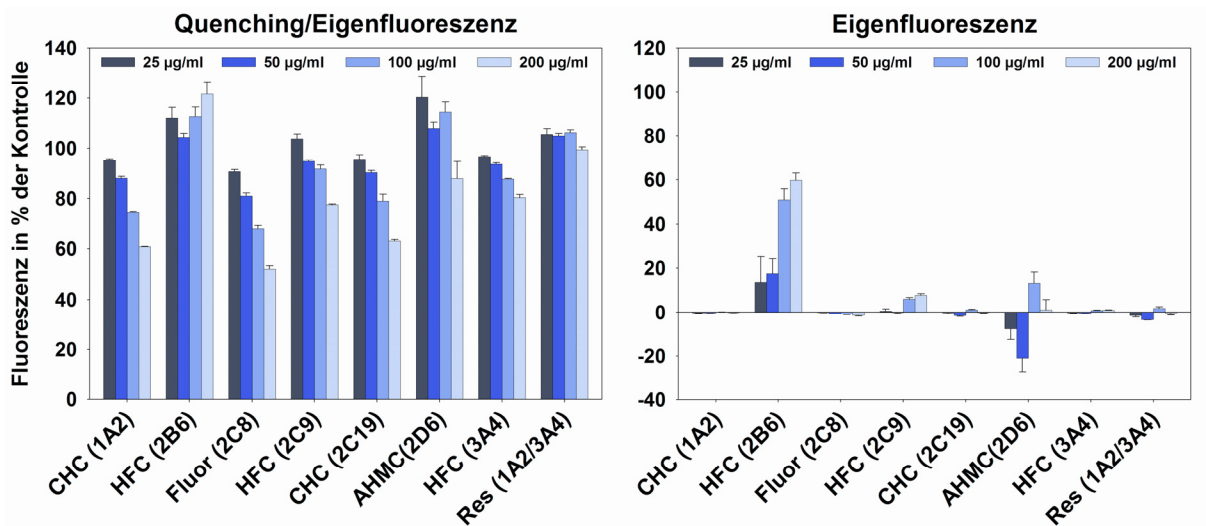
Ginkgoblätter:



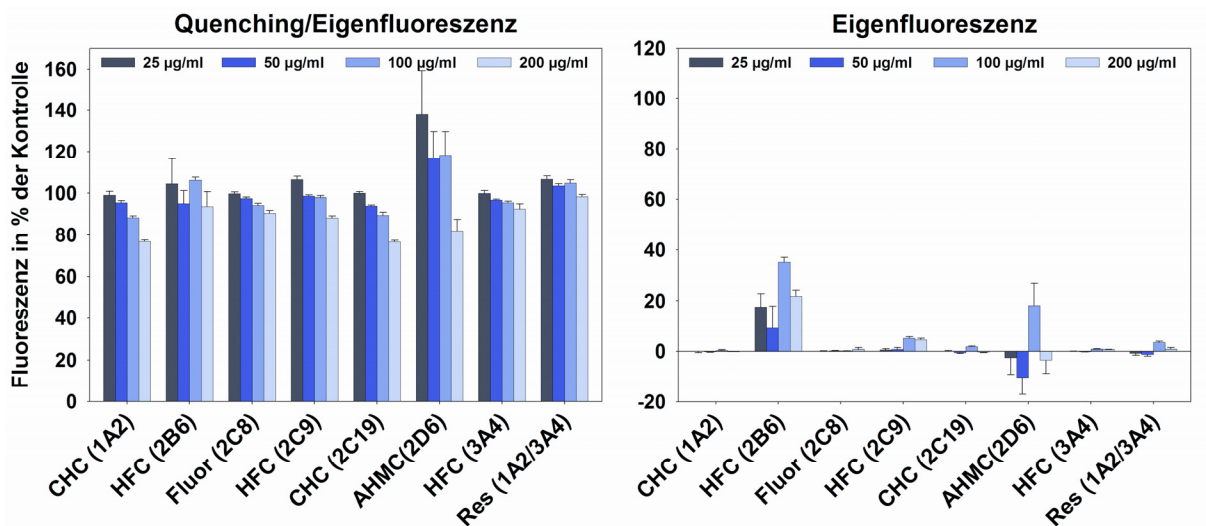
Orthosiphonblätter:



Salbeiblätter:



Schöllkraut



## VII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### Häufig verwendete Abkürzungen

AHMC	3-[2-(N,N-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin
AMHC	3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin
AMMC	3-[2-(N,N-Diethyl-N-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BFC	7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin
BzRes	Benzyloxyresorufin
CHC	3-Cyano-7-hydroxycumarin
CEC	3-Cyano-7-ethoxycumarin
CYP	Cytochrom-P450
EFC	7-Ethyl-4-trifluormethylcumarin
ESI	Elektrospray-Ionisierung
EthRes	Ethoxyresorufin
FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
HFC	7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
LC	Flüssigkeitschromatographie
MFC	7-Methyl-4-trifluormethylcumarin
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MW	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Verhältnis von Masse zu Ladung
NADPH	Nicotinamid-Adenindinucleotidphosphat
NADH	Nicotinamid-Adenindinucleotid
P-gp	P-Glykoprotein
RP	Reversed Phase
SIM	Selected Ion Monitoring
SRM	Selected Reaction Monitoring





## VIII VERÖFFENTLICHUNGEN

### 1 Originalarbeiten

Ponte-Sucre A, Gulder T, Wegehaupt A, Albert C, Rikanović C, Schaefflein L, Frank A, Schultheis M, Unger M, Holzgrabe U, Bringmann G, Moll H, 2009. Structure-activity relationship and studies on the molecular mechanism of leishmanicidal *N,C*-coupled arylisoquinolinium salts. *J Med Chem* **52**: 626-636.

Warzecha H, Frank A, Peer M, Gillam EM, Guengerich FP, Unger M, 2007. Formation of the indigo precursor indican in genetically engineered tobacco plants and cell cultures. *Plant Biotechnol J* **5**: 185-191.

Frank A, Unger M, 2006. Analysis of frankincense from various *Boswellia* species with inhibitory activity on human drug metabolising cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography mass spectrometry after automated on-line extraction. *J Chromatogr A* **1112**: 255-262.

Weiss J, Sauer A, Frank A, Unger M, 2005. Extracts and kavalactones of *Piper methysticum* G. Forst (kava-kava) inhibit P-glycoprotein in vitro. *Drug Metab Dispos* **33**: 1580-1583.

Dueckershoff K, Unger M, Frank A, Gillam EM, Guengerich FP, Warzecha H, 2005. Modified nicotine metabolism in transgenic tobacco plants expressing the human cytochrome P450 2A6 cDNA. *FEBS Lett* **579**: 2480-2484.

Unger M, Frank A, 2004. Simultaneous determination of the inhibitory potency of herbal extracts on the activity of six major cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography/mass spectrometry and automated online extraction. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**: 2273-2281.

### 2 Posterpräsentationen

Frank A, Unger M, 2008. Validity of fluorescence-based assays for the in vitro identification of herb drug interactions. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Bonn.

Unger M, Schaefflein L, Frank A, 2008. New and improved substrates for the major drug metabolising cytochrome P450 enzymes 1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A4. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Bonn.

Schaefflein L, Frank A, Unger M, 2008. Identification of herbal extracts as strong inhibitors of cytochrome P450 2C19. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Bonn.

- Unger M, Plomer M, Röhr A, Frank A, Schaefflein L, 2007. Hemmung der Cyt-P450-vermittelten Bioaktivierung von Cyclophosphamid durch Arzneistoffe und Pflanzenextrakte. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Erlangen.
- Frank A, Unger M, 2006. In vitro inhibition of cytochrome P450 enzymes by herbal extracts: fluorimetric vs. LC-MS methods. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Marburg.
- Unger M, Ferme D, Frank A, 2006. Inhibition of cytochrome P450 enzymes and UDP-glucuronosyltransferases by herbal extracts. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Marburg.
- Frank A, Knöss W, Unger M, 2006. Validity of microtiter plate-based fluorescence assays for the determination of the inhibitory activity of plant extracts on cytochrome P450 enzymes. *16th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO)*, Budapest, Ungarn
- Unger M, Frank A, Ferme D, 2006. Development of an efficient LC/LC-MS-based assay for the rapid identification of herbal extracts with inhibitory activity on human glucuronosyltransferases. *16th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO)*, Budapest, Ungarn
- Frank A, Unger M, 2005. LC/LC/ESI-MS analysis of boswellic acids in frankincense of various *Boswellia* species. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Mainz
- Unger M, Frank A, 2005. Inhibition of human drug metabolising cytochrome P450 enzymes by frankincense extracts in vitro. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Mainz
- Frank A, Unger M, 2004. Validation of an in vitro method for the screening of plant extracts interacting with CYT P450 enzymes. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Regensburg
- Frank A, Unger M, 2004. Development of an in vitro method for the simultaneous evaluation of the inhibitory activity of herbal extracts on six drug metabolising cytochrome P450 enzymes. *International Conference on Natural Products Research (ICNPR)*, Phoenix, AZ, USA.
- Frank A, Unger M, 2004. LC/LC-MS determination of the inhibitory activity of plant extracts on cytochrome P450 enzymes in vitro. *15th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (MDO)*, Mainz
- Frank A, Unger M, 2003. Identification of herbal drugs with inhibitory activity on drug metabolising Cyt P450 enzymes. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Würzburg.

Frank A, Frenk D, Zhang YL, Unger M, Henthorn T, Christians U, 2003. A simple HPLC/MS assay for the opioids alfentanil, fentanyl, loperamide, remifentanil and sufentanil. *51st Annual Conference of the American Society of Mass Spectrometry (ASMS)*, Montreal, Kanada.

### 3 Vorträge

Frank A, Schaefflein L, Unger M, 2008. Entwicklung von High-Turnover-Substraten für humane Cytochrom-P450-Enzyme. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Bonn.

Frank A, Unger M, 2004. Validation of an in vitro method for the screening of plant extracts interacting with CYT P450 enzymes. *Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Regensburg.

Frank A, Unger M, 2004. LC/LC-MS determination of the inhibitory activity of plant extracts on cytochrome P450 enzymes in vitro. *15th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations*, Mainz.

Frank A, Unger M, 2003. LC/LC-MS-Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Pflanzenextrakten auf Cytochrom-P450-Enzyme. *Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft*, Freudenstadt-Lauterbad.



## IX LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller e.V., 2006. Der Arzneimittelmarkt in Deutschland in Zahlen - Verordnungsmarkt und Selbstmedikation (<http://www.bah-bonn.de>).
- 2 Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, 2002. Stufenplanverfahren: Kava-Kava (*Piper methysticum*)-haltige und Kavainhaltige-Arzneimittel einschließlich homöopathischer Zubereitungen mit einer Endkonzentration bis einschließlich D4 (<http://www.bfarm.de>).
- 3 Unger M, Holzgrabe U, Jacobsen W, Cummins C, Benet LZ, 2002. Inhibition of cytochrome P450 3A4 by extracts and kavalactones of *Piper methysticum* (Kava-Kava). *Planta Med* **68**: 1055-1058.
- 4 Anke J, Ramzan I, 2004. Pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interactions with Kava (*Piper methysticum* Forst. f.). *J Ethnopharmacol* **93**: 153-160.
- 5 Weiss J, Sauer A, Frank A, Unger M, 2005. Extracts and kavalactones of *Piper methysticum* G. Forst (kava-kava) inhibit P-glycoprotein in vitro. *Drug Metab Dispos* **33**: 1580-1583.
- 6 Jhoo JW, Freeman JP, Heinze TM, Moody JD, Schnackenberg LK, Beger RD, Dragull K, Tang CS, Ang CY, 2006. In vitro cytotoxicity of nonpolar constituents from different parts of kava plant (*Piper methysticum*). *J Agric Food Chem* **54**: 3157-3162.
- 7 DiSilvestro RA, Zhang W, DiSilvestro DJ, 2007. Kava feeding in rats does not cause liver injury nor enhance galactosamine-induced hepatitis. *Food Chem Toxicol* **45**: 1293-1300.
- 8 Matthias A, Blanchfield JT, Penman KG, Bone KM, Toth I, Lehmann RP, 2007. Permeability studies of Kavalactones using a Caco-2 cell monolayer model. *J Clin Pharm Ther* **32**: 233-239.
- 9 Cohen SM, O'Connor AM, Hart J, Merel NH, Te HS, 2004. Autoimmune hepatitis associated with the use of black cohosh: a case study. *Menopause* **11**: 575-577.
- 10 Thomsen M, Vitetta L, Sali A, Schmidt M, 2004. Acute liver failure associated with the use of herbal preparations containing black cohosh. *Med J Aust* **180**: 598-599.
- 11 Levitsky J, Alli TA, Wisecarver J, Sorrell MF, 2005. Fulminant liver failure associated with the use of black cohosh. *Dig Dis Sci* **50**: 538-539.
- 12 Lynch CR, Folkers ME, Hutson WR, 2006. Fulminant hepatic failure associated with the use of black cohosh: a case report. *Liver Transpl* **12**: 989-992.
- 13 Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, 2006. Cimicifuga-haltige Arzneimittel: Leberschäden, Stufenplan Stufe II (<http://www.bfarm.de>).

- 14 Benninger J, Schneider HT, Schuppan D, Kirchner T, Hahn EG, 1999. Acute hepatitis induced by greater celandine (*Chelidonium majus*). *Gastroenterology* **117**: 1234-1237.
- 15 Stickel F, Pöschl G, Seitz HK, Waldherr R, Hahn EG, Schuppan D, 2003. Acute hepatitis induced by Greater Celandine (*Chelidonium majus*). *Scand J Gastroenterol* **38**: 565-568.
- 16 Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, 2005. Schöllkraut-haltige Arzneimittel zu innerlichen Anwendung (<http://www.bfarm.de>).
- 17 European Medicines Agency (EMA), 1998. Note for Guidance on the Investigation of Drug Interactions (CPMP/EWP/560/95).
- 18 Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, 2001. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. **8. Auflage**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- 19 Abebe W, 2002. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. *J Clin Pharm Ther* **27**: 391-401.
- 20 Heck AM, DeWitt BA, Lukes AL, 2000. Potential interactions between alternative therapies and warfarin. *Am J Health Syst Pharm* **57**: 1221-1227.
- 21 Evans V, 2000. Herbs and the brain: friend or foe? The effects of ginkgo and garlic on warfarin use. *J Neurosci Nurs* **32**: 229-232.
- 22 Krüth P, Brosi E, Fux R, Mörike K, Gleiter CH, 2004. Ginger-associated overanticoagulation by phenprocoumon. *Ann Pharmacother* **38**: 257-260.
- 23 Butterweck V, Böckers T, Korte B, Wittkowski W, Winterhoff H, 2002. Long-term effects of St. John's wort and hypericin on monoamine levels in rat hypothalamus and hippocampus. *Brain Res* **930**: 21-29.
- 24 Müller WE, Singer A, Wonnemann M, 2001. Hyperforin - antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry* **34**: 98-102.
- 25 Butterweck V, 2003. Mechanism of action of St John's wort in depression: what is known? *CNS Drugs* **17**: 539-562.
- 26 Singh YN, 2005. Potential for interaction of kava and St. John's wort with drugs. *J Ethnopharmacol* **100**: 108-113.
- 27 Fugh-Berman A, 2000. Herb-drug interactions. *Lancet* **355**:134-138.
- 28 Ang-Lee MK, Moss J and Yuan CS, 2001. Herbal medicines and perioperative care. *JAMA* **286**: 208-216.
- 29 Ortiz JG, Nieves-Natal J and Chavez P, 1999. Effects of Valeriana officinalis extracts on [3H]flunitrazepam binding, synaptosomal [3H]GABA uptake, and hippocampal [3H]GABA release. *Neurochem Res* **24**: 1373-1378.
- 30 Benet LZ and Hoener BA, 2002. Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* **71**: 115-121.
- 31 Zhou S, Lim LY, Chowbay B, 2004. Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* **36**: 57-104.

- 32 Bhardwaj RK, Glaeser H, Becquemont L, Klotz U, Gupta SK, Fromm MF, 2002. Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. *J Pharmacol Exp Ther* **302**: 645-650.
- 33 Romiti N, Tongiani R, Cervelli F, Chieli E, 1998. Effects of curcumin on P-glycoprotein in primary cultures of rat hepatocytes. *Life Sci* **62**: 2349-2358.
- 34 Lewis DF, 2003. Human cytochromes P450 associated with the phase 1 metabolism of drugs and other xenobiotics: a compilation of substrates and inhibitors of the CYP1, CYP2 and CYP3 families. *Curr Med Chem* **10**: 1955-1972.
- 35 Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NP, 1995. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* **25**: 25-65.
- 36 Guengerich FP, 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* **14**: 611-650.
- 37 Klingenberg M, 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **75**: 376-386.
- 38 Omura T, Sato R, 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* **239**: 2370-2378.
- 39 Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsaius IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman MR, 1987. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* **6**: 1-11.
- 40 Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW, 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**: 1-42.
- 41 Nelson D, 2003. Cytochrome P450s in humans (<http://drnelson.utmem.edu/P450lect.html>).
- 42 Guengerich FP, 2006. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J* **8**: E101-111.
- 43 Lewis DF, Pratt JM, 1998. The P450 catalytic cycle and oxygenation mechanism. *Drug Metab Rev* **30**: 739-786.
- 44 Schenkman JB, Jansson I, 1999. Interactions between cytochrome P450 and cytochrome b5. *Drug Metab Rev* **31**: 351-364.
- 45 Perret A, Pompon D, 1998. Electron shuttle between membrane-bound cytochrome P450 3A4 and b5 rules uncoupling mechanisms. *Biochemistry* **37**: 11412-11424.
- 46 Woolf TF, 1999. Handbook of Drug Metabolism. **1. Auflage**, Marcel Dekker, Inc., New York.
- 47 Watkins PB, 1992. Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. *Gastroenterol Clin North Am* **21**: 511-526.

- 48 Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP, 1994. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 414-423.
- 49 Guengerich FP, 2003. Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv* **3**: 194-204.
- 50 Chang TK, Weber GF, Crespi CL, Waxman DJ, 1993. Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer Res* **53**: 5629-5637.
- 51 Kharasch ED, Hoffer C, Whittington D, Sheffels P, 2004. Role of hepatic and intestinal cytochrome P450 3A and 2B6 in the metabolism, disposition, and miotic effects of methadone. *Clin Pharmacol Ther* **76**: 250-269.
- 52 Faucette SR, Hawke RL, Lecluyse EL, Shord SS, Yan B, Laethem RM, Lindley CM, 2000. Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metab Dispos* **28**: 1222-1230.
- 53 Tanaka E, Terada M, Misawa S, 2000. Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role. *J Clin Pharm Ther* **25**: 165-175.
- 54 Le Gal A, Dréano Y, Lucas D, Berthou F, 2003. Diversity of selective environmental substrates for human cytochrome P450 2A6: alkoxyethers, nicotine, coumarin, N-nitrosodiethylamine, and N-nitrosobenzylmethylamine. *Toxicol Lett* **144**: 77-91.
- 55 Warzecha H, Frank A, Peer M, Gillam EM, Guengerich FP, Unger M, 2007. Formation of the indigo precursor indican in genetically engineered tobacco plants and cell cultures. *Plant Biotechnol J* **5**: 185-191.
- 56 Dueckershoff K, Unger M, Frank A, Gillam EM, Guengerich FP, Warzecha H, 2005. Modified nicotine metabolism in transgenic tobacco plants expressing the human cytochrome P450 2A6 cDNA. *FEBS Lett* **579**: 2480-2484.
- 57 Watkins PB, Wrighton SA, Schuetz EG, Molowa DT, Guzelian PS, 1987. Identification of glucocorticoid-inducible cytochromes P-450 in the intestinal mucosa of rats and man. *J Clin Invest* **80**: 1029-1036.
- 58 Cummins CL, Jacobsen W, Benet LZ, 2002. Unmasking the dynamic interplay between intestinal P-glycoprotein and CYP3A4. *J Pharmacol Exp Ther* **300**: 1036-1045.
- 59 Miners JO, Birkett DJ, 1998. Cytochrome P450 2C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* **45**: 525-538.
- 60 Kirchheiner J, Brockmüller J, 2005. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* **77**: 1-16.
- 61 Küpfer A, Preisig R, 1984. Pharmacogenetics of mephenytoin: A new drug hydroxylation polymorphism in man. *Eur J Clin Pharmacol* **26**: 753-759.
- 62 Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA, 2002. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* **41**: 913-958.



- 63 Furuta T, Shirai N, Takashima M, Xiao F, Hanai H, Sugimura H, Ohashi K, Ishizaki T, Kaneko E, 2001. Effect of genotypic differences in CYP2C19 on cure rates for helicobacter pylori infection by triple therapy with a proton pump inhibitor, amoxicillin, and clarithromycin. *Clin Pharmacol Ther* **69**: 158-168.
- 64 Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL, 1977. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* **2**: 584-586.
- 65 Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ, 1979. Defective oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol* **39**: 533-537.
- 66 Raimundo S, Fischer J, Eichelbaum M, Griese EU, Schwab M, Zanger UM, 2000. Elucidation of the genetic basis of the common 'intermediate metabolizer' phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics* **10**: 577-581.
- 67 Renwick AG, 1999. The metabolism of antihistamines and drug interactions: the role of cytochrome P450 enzymes. *Clin Exp Allergy* **29**: 116-124.
- 68 Paakkari I, 2002. Cardiotoxicity of new antihistamines and cisapride. *Toxicol Lett* **127**: 279-284.
- 69 Krayenbühl JC, Vozeh S, Kondo-Oestreicher M, Dayer P, 1999. Drug-drug interactions of new active substances: mibefradil example. *Eur J Clin Pharmacol* **55**: 559-565.
- 70 Flockhart DA, 2007. Cytochrome P450 drug interaction table. **Version 4.0** (<http://www.medicine.iupui.edu/flockhart/>).
- 71 Murayama N, Imai N, Nakane T, Shimizu M, Yamazaki H, 2007. Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methyl hydroxylated and N-oxidized metabolite formation from voriconazole, a new anti-fungal agent, in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **73**: 2020-2026.
- 72 Tassaneeyakul W, Guo LQ, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y, 2000. Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys* **378**: 356-363.
- 73 Schmiedlin-Ren P, Edwards DJ, Fitzsimmons ME, He K, Lown KS, Woster PM, Rahman A, Thummel KE, Fisher JM, Hollenberg PF, Watkins PB, 1997. Mechanisms of enhanced oral availability of CYP3A4 substrates by grapefruit constituents. Decreased enterocyte CYP3A4 concentration and mechanism-based inactivation by furanocoumarins. *Drug Metab Dispos* **25**: 1228-1233.
- 74 Zhou S, Koh HL, Gao Y, Gong ZY, Lee EJ, 2004. Herbal bioactivation: the good, the bad and the ugly. *Life Sci* **74**: 935-968.
- 75 Veronese ML, Gillen LP, Burke JP, Dorval EP, Hauck WW, Pequignot E, Waldman SA, Greenberg HE, 2003. Exposure-dependent inhibition of intestinal and hepatic CYP3A4 in vivo by grapefruit juice. *J Clin Pharmacol* **43**: 831-839.
- 76 Huang SM, Lesko LJ, 2004. Drug-drug, drug-dietary supplement, and drug-citrus fruit and other food interactions: what have we learned? *J Clin Pharmacol* **44**: 559-569.

- 77 Budzinski JW, Foster BC, Vandenhoeck S, Arnason JT, 2000. An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. *Phytomedicine* **7**: 273-282.
- 78 Foster BC, Foster MS, Vandenhoeck S, Krantis A, Budzinski JW, Arnason JT, Gallicano KD, Choudri S, 2001. An in vitro evaluation of human cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein inhibition by garlic. *J Pharm Pharm Sci* **4**: 176-184.
- 79 Foster BC, Vandenhoeck S, Hana J, Krantis A, Akhtar MH, Bryan M, Budzinski JW, Ramputh A, Arnason JT, 2003. In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomedicine* **10**: 334-342.
- 80 Unger M, Frank A, 2004. Simultaneous determination of the inhibitory potency of herbal extracts on the activity of six major cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography/mass spectrometry and automated online extraction. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**: 2273-2281.
- 81 Strandell J, Neil A, Carlin G, 2004. An approach to the in vitro evaluation of potential for cytochrome P450 enzyme inhibition from herbals and other natural remedies. *Phytomedicine* **11**: 98-104.
- 82 Frank A, Unger M. 2006. Analysis of frankincense from various *Boswellia* species with inhibitory activity on human drug metabolising cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography mass spectrometry after automated on-line extraction. *J Chromatogr A* **1112**: 255-262.
- 83 Etheridge AS, Black SR, Patel PR, So J, Mathews JM, 2007. An in vitro evaluation of cytochrome P450 inhibition and P-glycoprotein interaction with goldenseal, Ginkgo biloba, grape seed, milk thistle, and ginseng extracts and their constituents. *Planta Med* **73**: 731-741.
- 84 Iwata H, Tezuka Y, Kadota S, Hiratsuka A, Watabe T, 2004. Identification and characterization of potent CYP3A4 inhibitors in Schisandra fruit extract. *Drug Metab Dispos* **32**: 1351-1358.
- 85 Piscitelli SC, Burstein AH, Welden N, Gallicano KD, Falloon J, 2002. The effect of garlic supplements on the pharmacokinetics of saquinavir. *Clin Infect Dis* **34**: 234-238.
- 86 Haber D, Siess MH, de Waziers I, Beaune P, Suschetet M, 1994. Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rat fed naturally occurring allyl sulphides. *Xenobiotica* **24**: 169-182.
- 87 Markowitz JS, Devane CL, Chavin KD, Taylor RM, Ruan Y, Donovan, 2003. Effects of garlic (*Allium sativum* L.) supplementation on cytochrome P450 2D6 and 3A4 activity in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther.* **74**: 170-177.
- 88 Gallicano K, Foster B, Choudhri S, 2003. Effect of short-term administration of garlic supplements on single-dose ritonavir pharmacokinetics in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* **55**: 199-202.
- 89 Gorski JC, Huang SM, Pinto A, Hamman MA, Hilligoss JK, Zaheer NA, Desai M, Miller M, Hall SD, 2004. The effect of echinacea (*Echinacea purpurea* root) on cytochrome P450 activity in vivo. *Clin Pharmacol Ther* **75**: 89-100.

- 90 Madabushi R, Frank B, Drewelow B, Derendorf H, Butterweck V, 2006. Hyperforin in St. John's wort drug interactions. *Eur J Clin Pharmacol* **62**: 225-233.
- 91 Gurley BJ, Swain A, Hubbard MA, Hartsfield F, Thaden J, Williams DK, Gentry WB, Tong Y, 2008. Supplementation with goldenseal (*Hydrastis canadensis*), but not kava kava (*Piper methysticum*), inhibits human CYP3A activity in vivo. *Clin Pharmacol Ther* **83**: 61-69.
- 92 Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Khan IA, Shah A, 2005. In vivo effects of goldenseal, kava kava, black cohosh, and valerian on human cytochrome P450 1A2, 2D6, 2E1, and 3A4/5 phenotypes. *Clin Pharmacol Ther* **77**: 415-426.
- 93 Xin HW, Wu XC, Li Q, Yu AR, Zhu M, Shen Y, Su D, Xiong L, 2007. Effects of *Schisandra sphenanthera* extract on the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* **64**: 469-475.
- 94 Obach RS, 2000. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *Pharmacol Exp Ther* **294**: 88-95.
- 95 Xie HG, Kim RB, 2005. St John's wort-associated drug interactions: short-term inhibition and long-term induction? *Clin Pharmacol Ther* **78**: 19-24.
- 96 Dresser GK, Schwarz UI, Wilkinson GR, Kim RB, 2003. Coordinate induction of both cytochrome P4503A and MDR1 by St John's wort in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* **73**: 41-50.
- 97 Moore LB, Goodwin B, Jones SA, Wisely GB, Serabjit-Singh CJ, Willson TM, Collins JL, Kliever SA, 2000. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7500-7502.
- 98 Johne A, Brockmüller J, Bauer S, Maurer A, Langheinrich M, Roots I, 1999. Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Clin Pharmacol Ther* **66**: 338-345.
- 99 Sugimoto K, Ohmori M, Tsuruoka S, Nishiki K, Kawaguchi A, Harada K, Arakawa M, Sakamoto K, Masada M, Miyamori I, Fujimura A, 2001. Different effects of St John's wort on the pharmacokinetics of simvastatin and pravastatin. *Clin Pharmacol Ther* **70**: 518-524.
- 100 Bauer S, Störmer E, Johne A, Krüger H, Budde K, Neumayer HH, Roots I, Mai I, 2003. Alterations in cyclosporin A pharmacokinetics and metabolism during treatment with St John's wort in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol* **55**: 203-211.
- 101 Hebert MF, Park JM, Chen YL, Akhtar S, Larson AM, 2004. Effects of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) on tacrolimus pharmacokinetics in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* **44**: 89-94.
- 102 Rengelshausen J, Banfield M, Riedel KD, Burhenne J, Weiss J, Thomsen T, Walter-Sack I, Haefeli WE, Mikus G, 2005. Opposite effects of short-term and long-term St John's wort intake on voriconazole pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* **78**: 25-33.

- 103 Arold G, Donath F, Maurer A, Diefenbach K, Bauer S, Henneicke-von Zepelin HH, Friede M, Roots I, 2005. No relevant interaction with alprazolam, caffeine, tolbutamide, and digoxin by treatment with a low-hyperforin St John's wort extract. *Planta Med* **71**: 331-337.
- 104 Cushman M, Dekow FW, Jacobsen LB, 1979. Conformations, DNA binding parameters, and antileukemic activity of certain cytotoxic protoberberine alkaloids. *J Med Chem* **22**: 331-333.
- 105 Chatterjee P, Franklin MR, 2003. Human cytochrome p450 inhibition and metabolic-intermediate complex formation by goldenseal extract and its methylenedioxyphenyl components. *Drug Metab Dispos* **31**: 1391-1397.
- 106 Sandhu RS, Prescilla RP, Simonelli TM, Edwards DJ, 2003. Influence of goldenseal root on the pharmacokinetics of indinavir. *J Clin Pharmacol* **43**: 1283-1288.
- 107 Penzak SR, Acosta EP, Turner M, Edwards DJ, Hon YY, Desai HD, Jann MW, 2002. Effect of Seville orange juice and grapefruit juice on indinavir pharmacokinetics. *J Clin Pharmacol* **42**: 1165-1170.
- 108 Undre NA, 2003. Pharmacokinetics of tacrolimus-based combination therapies. *Nephrol Dial Transplant* **18**: i12-i15.
- 109 Unger M, 2004. Arzneimittelneben- und Wechselwirkungen durch Phytopharmaka. *Z Phytother* **25**: 171-178.
- 110 Unger M, 2004 Wie Naturstoffe die Bioverfügbarkeit von Phytopharmaka beeinflussen. *Pharm Ztg* **149**: 979-986.
- 111 Tankanow R, Tamer HR, Streetman DS, Smith SG, Welton JL, Annesley T, Aaronson KD, Bleske BE, 2003. Interaction study between digoxin and a preparation of hawthorn (*Crataegus oxyacantha*). *J Clin Pharmacol* **43**: 637-642.
- 112 Donovan JL, DeVane CL, Chavin KD, Taylor RM, Markowitz JS, 2003. Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*) effects on CYP2D6 and CYP3A4 activity in normal volunteers. *Drug Metab Dispos* **31**: 519-522.
- 113 Markowitz JS, Donovan JL, Devane CL, Taylor RM, Ruan Y, Wang JS, Chavin KD, 2003. Multiple doses of saw palmetto (*Serenoa repens*) did not alter cytochrome P450 2D6 and 3A4 activity in normal volunteers. *Clin Pharmacol Ther* **74**: 536-542.
- 114 Markowitz JS, Donovan JL, Lindsay DeVane C, Sipkes L, Chavin KD, 2003. Multiple-dose administration of *Ginkgo biloba* did not affect cytochrome P-450 2D6 or 3A4 activity in normal volunteers. *J Clin Psychopharmacol* **23**: 576-581.
- 115 Zhou SF, Zhou ZW, Li CG, Chen X, Yu X, Xue CC, Herington A, 2007. Identification of drugs that interact with herbs in drug development. *Drug Discov Today* **12**: 664-673.
- 116 van Erp NP, Baker SD, Zhao M, Rudek MA, Guchelaar HJ, Nortier JW, Sparreboom A, Gelderblom H, 2005. Effect of milk thistle (*Silybum marianum*) on the pharmacokinetics of irinotecan. *Clin Cancer Res* **11**: 7800-7806.

- 117 DiCenzo R, Shelton M, Jordan K, Koval C, Forrest A, Reichman R, Morse G, 2003. Coadministration of milk thistle and indinavir in healthy subjects. *Pharmacotherapy* **23**: 866-870
- 118 Piscitelli SC, Formentini E, Burstein AH, Alfaro R, Jagannatha S, Falloon J, 2002. Effect of milk thistle on the pharmacokinetics of indinavir in healthy volunteers. *Pharmacotherapy* **22**: 551-556.
- 119 Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, 2004. Entwurf zur Bewertung möglicher pharmakokinetischer Arzneimittel-Interaktionen mit Phytopharmaka (<http://www.bfarm.de>).
- 120 Unger M, Frank A, 2006. Inhibition von Cytochrom-P450-Enzymen durch Pflanzenextrakte: Eignung, Anwendbarkeit und Aussagekraft von *In-vitro*-Methoden. *Zeitschrift für Phytotherapie* **27**: V33.
- 121 Kooperation Phytopharmaka GbR, 2004. Kommentar zum Entwurfspapier des BfArM zu Interaktionsstudien mit Phytopharmaka (<http://www.koop-phyto.org>).
- 122 Butterweck V, Derendorf H, 2004. Stellungnahme zum Interaktionspapier des BfArM „Entwurf zur Bewertung möglicher pharmakokinetischer Arzneimittel-Interaktionen mit Phytopharmaka“ (<http://www.phytotherapy.org/Interaktionen-Butterweck.pdf>).
- 123 Butterweck V, Derendorf H, Gaus W, Nahrstedt A, Schulz V, Unger M, 2004. Pharmacokinetic herb-drug interactions: are preventive screenings necessary and appropriate? *Planta Med* **70**: 784-791.
- 124 Frank, A, Unger, M, 2006. Vergleichende Untersuchungen zur Validität von *In-vitro*-Methoden bezüglich der Inhibition von Cytochrom-P450-Enzymen durch Pflanzenextrakte. *Zeitschrift für Phytotherapie* **27**: V09.
- 125 Kim KA, Lee JS, Park HJ, Kim JW, Kim CJ, Shim IS, Kim NJ, Han SM, Lim S, 2004. Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. *Life Sci* **74**: 2769-2779.
- 126 von Moltke LL, Weemhoff JL, Bedir E, Khan IA, Harmatz JS, Goldman P, Greenblatt DJ, 2004. Inhibition of human cytochromes P450 by components of Ginkgo biloba. *J Pharm Pharmacol* **56**: 1039-1044.
- 127 Usia T, Iwata H, Hiratsuka A, Watabe T, Kadota S, Tezuka Y, 2006. CYP3A4 and CYP2D6 inhibitory activities of Indonesian medicinal plants. *Phytomedicine* **13**: 67-73.
- 128 Crespi CL, Miller VP, Penman BW, 1997. Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450. *Anal Biochem* **248**: 188-190.
- 129 Crespi CL, Miller VP, Stresser DM, 2002. Design and application of fluorometric assays for human cytochrome P450 inhibition. *Methods Enzymol* **357**: 276-284.
- 130 Miller VP, Stresser DM, Blanchard AP, Turner S, Crespi CL, 2000. Fluorometric high-throughput screening for inhibitors of cytochrome P450. *Ann N Y Acad Sci* **919**: 26-32.
- 131 Zou L, Harkey MR, Henderson GL, 2002. Effects of intrinsic fluorescence and quenching on fluorescence-based screening of natural products. *Phytomedicine* **9**: 263-267.

- 132 Zou L, Harkey MR, Henderson GL, 2002. Effects of herbal components on cDNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sci* **71**: 1579-1589.
- 133 Agilent Technologies, 2001. Basics of LC/MS (5988-2045EN).
- 134 Budzikiewicz H, Schäfer M, 2005. Massenspektrometrie: Eine Einführung. **5. Auflage**, Wiley-VCH GmbH, Weinheim.
- 135 Annesley TM, 2003. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* **49**: 1041-1044.
- 136 Mallet CR, Lu Z, Mazzeo JR, 2004. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**: 49-58.
- 137 Gustavsson SA, Samskog J, Markides KE, Långström B, 2001. Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents. *J Chromatogr A* **937**: 41-47.
- 138 Bu HZ, Knuth K, Magis L, Teitelbaum P, 2001. High-throughput cytochrome P450 (CYP) inhibition screening via cassette probe-dosing strategy: III. Validation of a direct injection/on-line guard cartridge extraction-tandem mass spectrometry method for CYP2C19 inhibition evaluation. *J Pharm Biomed Anal* **25**: 437-442.
- 139 Peng SX, Barbone AG, Ritchie DM, 2003. High-throughput cytochrome P450 inhibition assays by ultrafast gradient liquid chromatography with tandem mass spectrometry using monolithic columns. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**: 509-518.
- 140 Dierks EA, Stams KR, Lim HK, Cornelius G, Zhang H, Ball SE, 2001. A method for the simultaneous evaluation of the activities of seven major human drug-metabolizing cytochrome P450s using an in vitro cocktail of probe substrates and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* **29**: 23-29.
- 141 Walsky RL, Obach RS, 2004. Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos* **32**: 647-660.
- 142 Christians U, Jacobsen W, Serkova N, Benet LZ, Vidal C, Sewing KF, Manns MP, Kirchner GI, 2000. Automated, fast and sensitive quantification of drugs in blood by liquid chromatography-mass spectrometry with on-line extraction: immunosuppressants. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **748**: 41-53.
- 143 Unger M, Jacobsen W, Holzgrabe U, Benet LZ, 2002. Quantitative liquid chromatography-mass spectrometry determination of isatin in urine using automated on-line extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **767**: 245-253.
- 144 Segarra I, Brazelton TR, Guterman N, Hausen B, Jacobsen W, Morris RE, Benet LZ, Christians U, 1998. Development of a high-performance liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric assay for the specific and sensitive quantification of the novel immunosuppressive macrolide 40-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **720**: 179-187.

- 145 Yin H, Racha J, Li SY, Olejnik N, Satoh H, Moore D, 2000. Automated high throughput human CYP isoform activity assay using SPE-LC/MS method: application in CYP inhibition evaluation. *Xenobiotica* **30**: 141-154.
- 146 González HM, Romero EM, Chavez Tde J, Peregrina AA, Quezada V, Hoyos-Vadillo C, 2002. Phenotype of CYP2C19 and CYP3A4 by determination of omeprazole and its two main metabolites in plasma using liquid chromatography with liquid-liquid extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **780**: 459-465.
- 147 Rouits E, Boisdron-Celle M, Morel A, Gamelin E, 2003. Simple and sensitive high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of urinary free cortisol and 6beta-hydroxycortisol in routine practice. For CYP3A4 activity evaluation in basal conditions and after grapefruit juice intake. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **793**: 357-366.
- 148 Xu RN, Fan L, Rieser MJ, El-Shourbagy TA, 2007. Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* **44**: 342-355.
- 149 Veuthey JL, Souverain S, Rudaz S, 2004. Column-switching procedures for the fast analysis of drugs in biologic samples. *Ther Drug Monit* **26**:161-166.
- 150 Food and Drug Administration (FDA), 2006. Guidance for Industry: Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling (Draft; <http://www.fda.gov>).
- 151 Li X, Chen X, Li Q, Wang L, Zhong D, 2007. Validated method for rapid inhibition screening of six cytochrome P450 enzymes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **852**: 128-137.
- 152 Obach RS, Reed-Hagen AE, 2002. Measurement of Michaelis constants for cytochrome P450-mediated biotransformation reactions using a substrate depletion approach. *Drug Metab Dispos* **30**: 831-837.
- 153 Koyama E, Chiba K, Tani M, Ishizaki T, 1997. Reappraisal of human CYP isoforms involved in imipramine N-demethylation and 2-hydroxylation: a study using microsomes obtained from putative extensive and poor metabolizers of S-mephenytoin and eleven recombinant human CYPs. *J Pharmacol Exp Ther* **281**: 1199-1210.
- 154 Oda Y, Hamaoka N, Hiroi T, Imaoka S, Hase I, Tanaka K, Funae Y, Ishizaki T, Asada A, 2001. Involvement of human liver cytochrome P4502B6 in the metabolism of propofol. *Br J Clin Pharmacol* **51**: 281-285.
- 155 Ward BA, Gorski JC, Jones DR, Hall SD, Flockhart DA, Desta Z, 2003. The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. *J Pharmacol Exp Ther* **306**: 287-300.
- 156 Faucette SR, Hawke RL, Lecluyse EL, Shord SS, Yan B, Laethem RM, Lindley CM, 2000. Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker

- of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metab Dispos* **28**: 1222-1230.
- 157 Kirchheiner J, Klein C, Meineke I, Sasse J, Zanger UM, Mürdter TE, Roots I, Brockmöller J, 2003. Bupropion and 4-OH-bupropion pharmacokinetics in relation to genetic polymorphisms in CYP2B6. *Pharmacogenetics* **13**: 619-626.
- 158 Walsky RL, Astuccio AV, Obach RS, 2006. Evaluation of 227 drugs for in vitro inhibition of cytochrome P450 2B6. *J Clin Pharmacol* **46**: 1426-1438.
- 159 The Merck Index. **14. Auflage**, Merck, USA.
- 160 O'Donnell CJ, Grime K, Courtney P, Slee D, Riley RJ, 2007. The development of a cocktail CYP2B6, CYP2C8, and CYP3A5 inhibition assay and a preliminary assessment of utility in a drug discovery setting. *Drug Metab Dispos* **35**: 381-385.
- 161 Peters FT, 2007. Stability of analytes in biosamples - an important issue in clinical and forensic toxicology? *Anal Bioanal Chem* **388**: 1505-1519.
- 162 Gorski JC, Hall SD, Jones DR, VandenBranden M, Wrighton SA, 1994. Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol* **47**: 1643-1653.
- 163 Spaldin V, Madden S, Pool WF, Woolf TF, Park BK. The effect of enzyme inhibition on the metabolism and activation of tacrine by human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* **38**: 15-22.
- 164 Yang TJ, Krausz KW, Sai Y, Gonzalez FJ, Gelboin HV, 1999. Eight inhibitory monoclonal antibodies define the role of individual P-450s in human liver microsomal diazepam, 7-ethoxycoumarin, and imipramine metabolism. *Drug Metab Dispos* **27**: 102-109.
- 165 Lemoine A, Gautier JC, Azoulay D, Kiffel L, Belloc C, Guengerich FP, Maurel P, Beaune P, Leroux JP, 1993. Major pathway of imipramine metabolism is catalyzed by cytochromes P-450 1A2 and P-450 3A4 in human liver. *Mol Pharmacol* **43**: 827-832.
- 166 Lee JS, Obach RS, Fisher MB, 2003. Drug metabolizing enzymes: cytochrome P450 and other enzymes in drug discovery and development. **1. Auflage**, Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA/Fontis Media S.A., Lausanne, Schweiz.
- 167 Eagling VA, Tjia JF, Back DJ, 1998. Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* **45**: 107-114.
- 168 Yu C, Shin YG, Kosmeder JW, Pezzuto JM, van Breemen RB, 2003. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric determination of inhibition of human cytochrome P450 isozymes by resveratrol and resveratrol-3-sulfate. *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**: 307-313.
- 169 Moody GC, Griffin SJ, Mather AN, McGinnity DF, Riley RJ, 1999. Fully automated analysis of activities catalysed by the major human liver cytochrome P450 (CYP) enzymes: assessment of human CYP inhibition potential. *Xenobiotica* **29**: 53-75.



- 170 Walsky RL, Gaman EA, Obach RS, 2005. Examination of 209 drugs for inhibition of cytochrome P450 2C8. *J Clin Pharmacol* **45**: 68-78.
- 171 Weaver R, Graham KS, Beattie IG, Riley RJ, 2003. Cytochrome P450 inhibition using recombinant proteins and mass spectrometry/multiple reaction monitoring technology in a cassette incubation. *Drug Metab Dispos* **31**: 955-966.
- 172 Bu HZ, Magis L, Knuth K, Teitelbaum P, 2001. High-throughput cytochrome P450 (CYP) inhibition screening via a cassette probe-dosing strategy. VI. Simultaneous evaluation of inhibition potential of drugs on human hepatic isozymes CYP2A6, 3A4, 2C9, 2D6 and 2E1. *Rapid Commun Mass Spectrom* **15**: 741-748.
- 173 Benetton S, Kameoka J, Tan A, Wachs T, Craighead H, Henion JD, 2003. Chip-based P450 drug metabolism coupled to electrospray ionization-mass spectrometry detection. *Anal Chem* **75**: 6430-6436.
- 174 Rodrigues AD, Roberts EM, 1997. The in vitro interaction of dexmedetomidine with human liver microsomal cytochrome P4502D6 (CYP2D6). *Drug Metab Dispos* **25**: 651-655.
- 175 Schwedt G, 1981. Fluorimetrische Analyse - Methoden und Anwendungen. **1. Auflage**, Verlag Chemie, Weinheim.
- 176 Schmidt W, 1994. Optische Spektroskopie. **1. Auflage**, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- 177 Rücker G, Neugebauer M, Willems GG, 1992; Instrumentelle pharmazeutische Analytik. **2. Auflage**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- 178 Bissinger H, 1999. Enzymkinetik - Theorie und Methoden. **3. Auflage**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- 179 Lakowicz JR, 1999. Principles of Fluorescence Spectroscopy. **2. Auflage**, Springer Verlag, Berlin.
- 180 Crespi CL, Stresser DM, 2000. Fluorometric screening for metabolism-based drug-drug interactions. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000 **44**: 325-331.
- 181 Stresser DM, Blanchard AP, Turner SD, Erve JC, Dandeneau AA, Miller VP, Crespi CL, 2000. Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: analysis of 27 test compounds with four fluorometric substrates. *Drug Metab Dispos* **28**: 1440-1448.
- 182 Charet N, Dobbs B, Lackman RL, Bateman K, Nicoll-Griffith DA, Stresser DM, Ackermann JM, Turner SD, Miller VP, Crespi CL, 2001. The use of 3-[2-(N,N-diethyl-N-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylcoumarin (AMMC) as a specific CYP2D6 probe in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **29**: 1196-1200.
- 183 Stresser DM, Turner SD, Blanchard AP, Miller VP, Crespi CL, 2002. Cytochrome P450 fluorometric substrates: identification of isoform-selective probes for rat CYP2D2 and human CYP3A4. *Drug Metab Dispos* **30**: 845-852.

- 184 Renwick AB, Surry D, Price RJ, Lake BG, Evans DC, 2000. Metabolism of 7-benzyloxy-4-trifluoromethyl-coumarin by human hepatic cytochrome P450 isoforms. *Xenobiotica* **30**: 955-969.
- 185 Sun WC, Gee KR, Haugland RP, 1998. Synthesis of novel fluorinated coumarins: excellent UV-light excitable fluorescent dyes. *Bioorg Med Chem Lett* **8**: 3107-3110
- 186 Knoll H, Seidel A, Hennig H, 1986. Investigation on Probe Properties of 7-Hydroxy-coumarines in Micellar Cetyl-triethylammoniumbromide Solution - Means for Characterization of Micellar Systems. *Journal f prakt Chemie* **4**: 558-566.
- 187 White IN, 1988. A continuous fluorometric assay for cytochrome P-450-dependent mixed function oxidases using 3-cyano-7-ethoxycoumarin. *Anal Biochem* **172**: 304-310.
- 188 Burke MD, Thompson S, Weaver RJ, Wolf CR, Mayer RT, 1994. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem Pharmacol* **48**: 923-936.
- 189 Chang TK, Waxman DJ, 2006. Enzymatic analysis of cDNA-expressed human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 with 7-ethoxyresorufin as substrate. *Methods Mol Biol* **320**: 85-90.
- 190 Ghosal A, Hapangama N, Yuan Y, Lu X, Horne D, Patrick JE, Zbaida S, 2003. Rapid determination of enzyme activities of recombinant human cytochromes P450, human liver microsomes and hepatocytes. *Biopharm Drug Dispos* **24**: 375-384.
- 191 Donato MT, Jiménez N, Castell JV, Gómez-Lechón MJ, 2004. Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **32**: 699-706.
- 192 Turpeinen M, Korhonen LE, Tolonen A, Uusitalo J, Juvonen R, Raunio H, Pelkonen O, 2006. Cytochrome P450 (CYP) inhibition screening: comparison of three tests. *Eur J Pharm Sci* **29**: 130-138
- 193 Stresser DM, Turner SD, McNamara J, Stocker P, Miller VP, Crespi CL, Patten CJ, 2000. A high-throughput screen to identify inhibitors of aromatase (CYP19). *Anal Biochem* **284**: 427-430.
- 194 Henderson GL, Harkey MR, Gershwin ME, Hackman RM, Stern JS, Stresser DM, 1999. Effects of ginseng components on c-DNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sci* **65**: 209-214.
- 195 Foster BC, Vandenhoeck S, Tang R, Budzinski JW, Krantis A, Li KY, 2002. Effect of several Chinese natural health products of human cytochrome P450 metabolism. *J Pharm Pharm Sci* **5**: 185-189.
- 196 Gaudineau C, Beckerman R, Welbourn S, Auclair K, 2004. Inhibition of human P450 enzymes by multiple constituents of the *Ginkgo biloba* extract. *Biochem Biophys Res Commun* **318**: 1072-1078.

- 197 Lefebvre T, Foster BC, Drouin CE, Krantis A, Livesey JF, Jordan SA, 2004. In vitro activity of commercial valerian root extracts against human cytochrome P450 3A4. *J Pharm Pharm Sci* **7**: 265-273.
- 198 Yale SH, Glurich I, 2005. Analysis of the inhibitory potential of Ginkgo biloba, Echinacea purpurea, and Serenoa repens on the metabolic activity of cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9. *J Altern Complement Med* **11**: 433-439.
- 199 Ganzera M, Schneider P, Stuppner H, 2006. Inhibitory effects of the essential oil of chamomile (*Matricaria recutita* L.) and its major constituents on human cytochrome P450 enzymes. *Life Sci* **78**: 856-861.
- 200 Modarai M, Gertsch J, Suter A, Heinrich M, Kortenkamp A, 2007. Cytochrome P450 inhibitory action of Echinacea preparations differs widely and co-varies with alkylamide content. *J Pharm Pharmacol* **59**: 567-573.
- 201 Sudsakorn S, Skell J, Williams DA, O'Shea TJ, Liu H, 2007. Evaluation of 3-O-methylfluorescein as a selective fluorometric substrate for CYP2C19 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **35**: 841-847.
- 202 Kumar V, Rock DA, Warren CJ, Tracy TS, Wahlstrom JL, 2006. Enzyme source effects on CYP2C9 kinetics and inhibition. *Drug Metab Dispos* **34**: 1903-1908.
- 203 Kapelyukh Y, Paine MJ, Marechal JD, Sutcliffe MJ, Wolf CR, Roberts G, 2008. Multiple substrate binding by cytochrome P450 3A4: estimation of the number of bound substrate molecules. *Drug Metab Dispos* **36**: 2136-2144.
- 204 Racha JK, Zhao ZS, Olejnik N, Warner N, Chan R, Moore D, Satoh H, 2003. Substrate dependent inhibition profiles of fourteen drugs on CYP3A4 activity measured by a high throughput LCMS/MS method with four probe drugs, midazolam, testosterone, nifedipine and terfenadine. *Drug Metab Pharmacokinet* **18**: 128-138.
- 205 Tang W, Stearns RA, 2001. Heterotropic cooperativity of cytochrome P450 3A4 and potential drug-drug interactions. *Curr Drug Metab* **2**: 185-198.
- 206 Scott EE, Halpert JR, 2005. Structures of cytochrome P450 3A4. *Trends Biochem Sci* **30**: 5-7.
- 207 Niwa T, Murayama N, Yamazaki H, 2008. Heterotropic cooperativity in oxidation mediated by cytochrome p450. *Curr Drug Metab* **9**: 453-462.
- 208 Bell L, Bickford S, Nguyen PH, Wang J, He T, Zhang B, Friche Y, Zimmerlin A, Urban L, Bojanic D, 2008. Evaluation of fluorescence- and mass spectrometry-based CYP inhibition assays for use in drug discovery. *J Biomol Screen* **13**: 343-353.
- 209 Blaschek W, Ebel S, Hackenthal E, Holzgrabe U, Keller K, Reichling J, Schulz V, 2006. Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. HagerROM 2006, Springer-Verlag, Berlin.
- 210 Venkatakrisnan K, Von Moltke LL, Greenblatt DJ, 2002. Evaluation of Supermix as an in vitro model of human liver microsomal drug metabolism. *Biopharm Drug Dispos* **23**: 183-190.